

Biosynthese von *N*-Heterocyclen mittels Putrescinoxidase und Iminreduktase

Von der Fakultät 4 (Energie-, Verfahrens- und Biotechnik)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Leonie Weinmann
aus Rottenburg am Neckar

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Mitberichter: apl. Prof. Dr. Andreas Stolz

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2018

Institut für Biochemie und Technische Biochemie

-2018-

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich diese Arbeit mit dem Titel „Biosynthese von *N*-Heterocyclen mittels Putrescinoxidase und Iminreduktase“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen entnommenen Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled “Biosynthesis of *N*-heterocycles with putrescine oxidase and imine reductase” is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been indicated.

Stuttgart, den 28.04.2018

Leonie Weinmann

Danksagung

Mein sehr großer Dank geht an Prof. Dr. Bernhard Hauer für die hervorragende Unterstützung und Betreuung während meiner Dissertation, wodurch es mir möglich war meine praktischen und theoretischen Fähigkeiten beträchtlich zu erweitern.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Bettina Nestl für die ausgezeichnete Betreuung und Ratschläge für die Erstellung dieser Arbeit. Vielen Dank für die stetige Motivation und dein offenes Ohr.

Zudem möchte ich Dr. Bernd Nebel für seinen unermüdlichen Einsatz für das Institut besonders im Bezug auf die Analytik danken.

Desweiteren möchte ich mich beim IRED Team (Bettina, Philipp Scheller, Maike Lenz und Niels Borlinghaus) für Diskussionen, Ideen und Unterstützung bedanken.

Vielen Dank an Philipp Trauzettel, Sandra Vlahovic, Lisa Kühnel, Philipp Scheller, Jan Klenk und Jennifer Bischoff für den tollen Start am ITB und ihre Unterstützung sowie Diskussionen. Besonderer dank an Philipp Trauzettel, Sandra und Lisa für jegliche Hilfe bezüglich chemischer Fragestellungen.

Durch meine wechselnden Arbeitsplätze innerhalb des Labors bin ich vor allem Sara Hoffmann und Philipp Trauzettel als Benchnachbarn für die tolle Arbeitsatmosphäre dankbar.

Ich danke zudem Sandra, Lisa und Philipp Trauzettel für die entspannten Mittagessen mit kulinarischer Inspiration und für die großartigen Abende in Stuttgart. Für die kleinen Kaffeepausen zwischendurch danke ich Lea Rapp, Max-Philipp Fischer, Peter Heinemann und Andreas Schneider.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen für die unvergesslichen vier Jahre mit einer tollen Arbeitsatmosphäre und den schönen Feierabenden mit Grillen oder auf dem Wasen bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die an mich geglaubt hat und mir bei der Wahl der Schule oder des Studiums immer freie Hand gelassen hat. An dieser Stelle auch ein sehr großer Dank an meinen Ehemann Philipp, der mich bei meinem Studium und während dieser Arbeit immer unterstützt hat und auf den ich mich immer verlassen konnte. DANKE!

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	N-HETEROCYCLEN UND DEREN BEDEUTUNG	1
1.2	SYNTHESE VON AMINEN	3
1.2.1	Chemische Synthese von chiralen Aminen	3
1.2.2	Enzym Toolbox für die Synthese von Aminen	4
1.2.3	Biokatalytische Kaskadenreaktionen zur Synthese von Aminen	8
1.3	PUTRESCINOXIDASE	14
1.4	IMINREDUKTASE	18
1.5	KOMBINATION VON POLYAMINOXIDASE UND IMINREDUKTASE ZUR GENERIERUNG VON N-HETEROCYCLEN	20
1.6	MOTIVATION	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	MATERIALIEN	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Biochemische Reagenzien und Marker	22
2.1.3	Oligonukleotide (Primer)	22
2.1.4	Plasmide	23
2.1.5	E. coli-Stämme	24
2.1.6	Kits	25
2.1.7	Medien und Puffer	25
2.2	METHODEN	28
2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli	28
2.2.2	Herstellung kompetenter E. coli Zellen	28
2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	29
2.2.5	Methoden zur Erstellung von Mutanten und Mutantenbibliotheken	30
2.2.6	Restriktionsverdau und Ligierung von DNA	31
2.2.7	Überprüfung einer Gen-insertion mittels Kolonie PCR	31
2.2.8	Transformation RbCl-kompetenter E. coli Zellen	31
2.2.9	Transformation von elektrokompetenten E. coli Zellen	32
2.2.10	Wachstum und Proteinexpression	32
2.2.11	Zellaufschluss	33
2.2.12	Proteinreinigung mittels HisGraviTrap™ TALON® Chromatographie	33
2.2.13	SDS-PAGE Analyse	34
2.2.14	Proteinkonzentrationsbestimmung	35
2.2.15	Selektion von Mutanten aus Mutantenbibliotheken	35

2.2.16	DNA Sequenzierung	36
2.2.17	Kaskadenreaktion	36
2.2.18	Analytik.....	37
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	PUTRESCINOXIDASE.....	39
3.1.1	<i>Semi-Rationales Design der Putrescinoxidase</i>	39
3.1.2	<i>Rationales Design der aktiven Tasche</i>	44
3.2	KASKADENREAKTION.....	49
3.2.1	<i>In vitro</i>	49
3.2.2	<i>In vivo</i>	56
4	DISKUSSION.....	65
4.1	PUTRESCINOXIDASE	66
4.1.1	<i>Expression und Reinigung der PuO-Re</i>	66
4.1.2	<i>Semi-rationales Design</i>	67
4.1.3	<i>Rationales Design der aktiven Tasche</i>	70
4.2	ENZYMKASKADE	74
4.2.1	<i>In vitro Kaskade</i>	74
4.2.2	<i>In vivo Kaskade</i>	81
5	AUSBLICK	87
5.1	PUTRESCINOXIDASE	87
5.2	KASKADE	87
6	ANHANG.....	89
6.1	GEN SEQUENZEN.....	89
6.2	EXPRESSION UND AUFRÄUIGUNG	91
6.3	MICHAELIS-MENTEN PLOTS VON PUO-RE, PUOM1, PUOM2, PUO-RE E202G FÜR 1, 2, 3 UND 5 UND VON PUOS1 UND PUOS2 FÜR 5	93
6.4	GC-CHROMATOGRAMME	99
7	LITERATURVERZEICHNIS	103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µM	Mikromol pro Liter
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	L-Arabinose
BCA	Bichinoninsäure
CAST	Combinatorial active-site saturation test
Cm	Chloramphenicol
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Essigsäureanhydrid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
epPCR	error prone PCR
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase
IBCF	Isobutylchlorformiat

Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
k_{cat}	katalytische Konstante
kDa	Kilodalton
K_M	Michaeliskonstante
KP_i	Kaliumphosphat
LB	Luria Bertani
min	Minute
mM	Millimol pro Liter
MOPs	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	Terrific-Broth
TEMED	<i>N, N'</i> -Ethylenbis-(diacetamid)
TfB	Transformationspuffer
t_R	Retentionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V	Volumen
v/v	Volume per volume, Volumenkonzentration
w/v	Weight per volume, Massenkonzentration

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer neuen Enzymkaskade zur Synthese von *N*-Heterocyclen. Vor allem chirale *N*-Heterocyclen bilden wichtige Vorstufen für die Synthese von Pharmazeutika oder Agrochemikalien und sind daher von besonderem industriellem Interesse. Über 90% der potenziellen pharmazeutischen Wirkstoffe beinhalten Stickstoff und viele davon in Form von substituierten Piperidinderivaten, weswegen stetig nach neuen Synthesewegen gesucht wird. Für die Entwicklung einer neuen alternativen Enzymkaskade wurden die Putrescinoxidase von *Rhodococcus erythropolis* (PuO-*Re*) und die (*R*)-selektive Iminreduktase von *Streptosporangium roseum* (IRED-*Sr*) oder die (*S*)-selektive Iminreduktase von *Paenibacillus elgii* (IRED-*Pe*) gewählt um chirale *N*-Heterocyclen ausgehend von Diaminderivaten, die z.B. über die Decarboxylierung von Aminosäuren zugänglich sind, herzustellen. In dieser Kaskade oxidiert die PuO-*Re* eine Aminogruppe der Diamine, wodurch ein Aminoketon entsteht. Dieses Aminoketon cyclisiert spontan unter Bildung einer Schiff-Base, dieses Imin kann dann von der Iminreduktase mit dem Kofaktor NADPH zum gesättigten *N*-Heterocyclus reduziert werden. Da die Aktivität der PuO-*Re* für länger-kettige oder verzweigte Diamine im Vergleich zum natürlichen Substrat 1,4-Diaminobutan drastisch abnimmt, wurde ein semi-rationales Design durchgeführt um die Aktivität gegenüber Diaminopentanderivaten zu steigern und das Substratspektrum zu erweitern. Dabei konnten zwei Varianten identifiziert werden, die eine gesteigerte Umsatzzahl für ebendiese Substrate aufweisen. Um eine weitere Steigerung der Aktivität zu erreichen wurde ein rationales Design für die aktive Tasche angewendet, dabei konnte eine Variante erstellt werden, die aliphatische Monoamine als Substrat akzeptiert und weitere zwei Varianten mit gesteigerter Aktivität gegenüber 1,5-Diaminohexan. Mit der Variante, die aliphatische Monoamine als Substrate akzeptiert, konnte gezeigt werden, dass die PuO-*Re* bei verzweigten Aminen, die weniger gehinderte Aminogruppe oxidiert. Alle positiven PuO-*Re* Varianten wurden erfolgreich mit den beiden IREDs kombiniert und die beste Umsetzung eines substituierten Diamins resultierte *in vitro* in 90% Produktbildung. Erstaunlicherweise konnte bei der Umsetzung von 1,5-

Diaminohexan zu 2-Methylpiperidin in der Kaskade ein Switch im Enantiomerenüberschuss, zwischen den PuO-*Re* Varianten aus dem semi-rationalen Design und dem rationalen Design der aktiven Tasche, beobachtet werden. Somit konnte in der aktiven Tasche die Position 206 identifiziert werden, die verantwortlich ist für die Unterscheidung der Enantiomere von 1,5-Diaminohexan. Des Weiteren wurde die Kaskade mit einer der PuO-*Re* Variante in Kombination mit der IRED-*Sr* in ein *in vivo* System übertragen. Dabei konnte durch Variation des *E. coli* Stammes und durch Reaktionsoptimierung die Produktbildung von 3-Methylpiperidine aus 1,5-Diamino-2-methylpentan von 10% auf 83% gesteigert werden. Eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen in Kooperation mit Sanofi führte zu einer Umsetzung von fast 30 mM 1,5-Diamino-2-methylpentan zu 3-Methylpiperidin in einem 20 L Reaktor.

Abstract

In this work a new enzymatic cascade was developed for the synthesis of *N*-heterocycles. Especially chiral *N*-heterocycles are important building blocks for the synthesis of pharmaceuticals and agrochemicals and are therefore of industrial interest. New routes for the synthesis of *N*-heterocycles are needed, because more than 90% of potential pharmaceuticals contain nitrogen and often in form of substituted piperidine derivatives. Two enzymes, the putrescine oxidase from *Rhodococcus erythropolis* (PuO-*Re*) and the (R)-selective imine reductase from *Streptosporangium roseum* (IRED-*Sr*) or the (S)-selective imine reductase from *Paenibacillus elgii* (IRED-*Pe*), were selected for the development of a new enzymatic cascade. These enzymes were selected for the synthesis of *N*-heterocycles from diamine derivatives, which can be obtained by the decarboxylation of amino acids. In this cascade PuO-*Re* oxidizes the diamine to an aminoketone, which cyclizes spontaneously under the formation of a Schiff base. This imine is reduced by the imine reductase with its cofactor NADPH to a saturated *N*-heterocycle. The activity of PuO-*Re* decreases towards longer chained diamines compared to the natural substrate 1,4-diaminobutane and therefore a semi-rational design was performed to enhance the activity towards diamine derivatives. Two variants were identified with increased turnover numbers for diamine derivatives. For further enhancement of the activity a rational design of the active site was performed with the result of a variant accepting aliphatic monoamines as substrates and two new variants with increased activity towards 1,5-diaminohexane. It was shown that PuO-*Re* oxidizes the less hindered amino group of substituted amines by using the variant accepting monoamines. All variants of the semi-rational and rational design were successfully combined with IREs and obtained *in vitro* over 90% of product with the conversion of substituted diamines. Surprisingly, a switch of the enantiomeric excess in the conversion of 1,5-diaminohexane to 2-methylpiperidine in the cascade between the PuO-*Re* variants of the semi-rational design and the rational design could be observed. This showed that the position 206 in PuO-*Re* is responsible for the distinction between the enantiomers of 1,5-diaminohexane. Furthermore, the cascade with one PuO-*Re* variant in combination with the (R)-IRE-*Sr* was transformed into an *in vivo* system. Variations of the *E.coli*

strain and of the reaction conditions increased the product formation of 3-methylpiperidine from 1,5-diamino-2-methylpentane from 10% to 83%. A further optimization of the cascade by Sanofi led to a conversion of nearly 30 mM of 1,5-diamino-2-methylpentane to 3-methylpiperidine in a 20 L reactor.

1 Einleitung

1.1 N-Heterocyclen und deren Bedeutung

N-Heterocyclen spielen eine zentrale Rolle in allen lebenden Organismen, was durch ihre weite Verbreitung verdeutlicht wird. Sie sind Bestandteil von Nukleotiden, die Bausteine der DNA oder RNA, die essentiell für das Leben sind. Aminosäuren sind essentiell für die Synthese von Proteinen und auch hier findet man in Histidin, Prolin und Tryptophan *N*-Heterocyclen¹. Alkaloide stellen eine große, diverse Gruppe an sekundären Metaboliten dar, die alle ein Stickstoffmolekül beinhalten². Diese weite Verbreitung spiegelt die hohe biologische Aktivität vieler dieser Moleküle wider und daher dienen viele dieser Amine als Bausteine für die Synthese von Pharmazeutika oder Agrochemikalien^{3,4}. Besonders die Chiralität von substituierten *N*-Heterocyclen ist von großer Bedeutung, denn die mögliche unterschiedliche Wirkung von Enantiomeren spielt in Pharmazeutika eine entscheidende Rolle. Dies stellte man tragischer Weise in den 1960er Jahren mit dem Arzneimittel Thalidomid, bekannt auch unter dem Markennamen Contergan, fest⁵. Das Medikament enthielt das Racemat, aber nur das (*R*)-Enantiomer hatte die gewünschte Wirkung und das (*S*)-Enantiomer führte hingegen zu teratogenen Folgen. Erst Jahre später fand man heraus, dass durch ein enantiomerenreines Medikament der Skandal nicht hätte verhindert werden können, da Thalidomid *in vivo* racemisiert⁵.

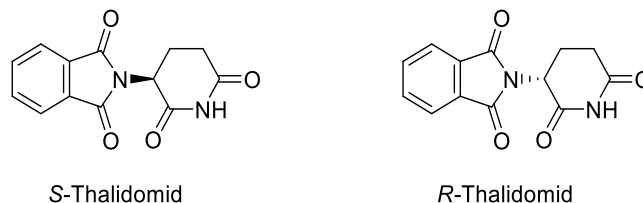
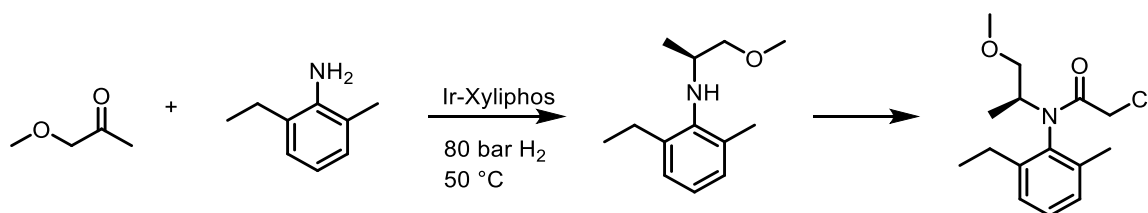


Abbildung 1: Die Enantiomere von Thalidomid, welche in den 1960er Jahren zu einem Arzneimittelskandal führten, da das (*S*)-Enantiomer folgenschwere Nebenwirkungen aufwies.

Trotz dieses schwerwiegenden Skandals blieben chirale Amine wichtige Bestandteile in der pharmazeutischen Industrie, da über 90% der pharmazeutisch eingesetzten Heterocyclen Stickstoff enthalten, viele davon in Form von

substituierten Piperidinderivaten. Zudem findet man auch auf der WHO Model List of Essential Medicines von 2017 viele Beispiele, wie z.B. Atropin oder Haloperidol, die substituierte Piperidinderivate enthalten⁶. Die Synthese dieser pharmazeutischen *N*-Heterocyclen ist chemisch immer noch anspruchsvoll, da die Anzahl der Schutzgruppen für Aminogruppen die Anzahl der Schutzgruppen für Hydroxyl- und Carboxylgruppen weit übersteigt³. Deswegen wird die Biokatalyse für die Synthese dieser *N*-Heterocyclen immer bedeutender, da der Einsatz von enantio-, stereo- und regioselektiven enzymatischen Reaktionen den Einsatz von Schutzgruppen vermeidet und die Technologien für die Entwicklung geeigneter Biokatalysatoren stetig erweitert wird^{7,8,9}. Neben der Selektivität, die Enzyme oft zeigen, sind die milden Reaktionsbedingungen ein weiterer Vorteil¹⁰.

inhibiert werden¹⁸. Mit diesem Verfahren ist es möglich (*S*)-Metolachlor, ein Gräserherbizid, herzustellen (Schema 2)¹⁹.



Schema 2: Synthese von (*S*)-Metolachlor, einem Gräserherbizid, mittels chemischer reduktiver Aminierung. Die Iminbildung als auch die asymmetrische Hydrierung finden in einem Gefäß statt.

Gesättigte *N*-Heterocyclen wie Pyrrolidine und Piperidine spielen nicht nur als Lösungsmittel eine wichtige Rolle, denn besonders chirale gesättigte *N*-Heterocyclen sind oft wegen ihrer biologischen Aktivität Bestandteil von Pharmazeutika. Die Synthese von gesättigten *N*-Heterocyclen wird hauptsächlich über die Hydrierung der entsprechenden ungesättigten *N*-Heterocyclen mittels Palladium oder Ruthenium durchgeführt^{20,21}. Die Hydrierung mit chiralen Hilfsgruppen führt direkt zum enantioangereichtem Produkt, allerdings bleibt hier die asymmetrische Hydrierung eine Herausforderung, da die Synthese mit hohen Ausbeuten und hohem Enantiomerenüberschuss schwierig ist²⁰.

1.2.2 Enzym Toolbox für die Synthese von Aminen

Eine alternative zur chemischen Synthese von chiralen Aminen bildet die Biokatalyse, da diese einige Vorteile gegenüber der chemischen Synthese bereitstellt. Durch die Anwendung von regio-, stereo- und enantioselektiven Enzymen, fällt der Einsatz von Schutzgruppen weg und die Reaktionen laufen bei milden Bedingungen ab. Allerdings bringt die Biokatalyse im Allgemeinen einige Nachteile mit sich, da die Entwicklung neuer Biokatalysatoren sehr langwierig sein kann²². Zudem haben Biokatalysatoren nur einen eingeschränkten Einsatzbereich bezüglich pH, Temperatur und Lösungsmitteln²², um diesen zu überkommen ist aufwendiges Enzymengineering notwendig^{23,24}. Des Weiteren sind im Vergleich zu chemischen Katalysatoren nur sehr wenige Enzyme genauso gut charakterisiert, geschweige denn kommerziell erhältlich²². Daher ist die Entdeckung und

Entwicklung neuer Biokatalysatoren von bedeutender Wichtigkeit um die biokatalytische Toolbox für verschiedene Reaktion stetig zu erweitern^{7,25}.

Nichtsdestotrotz stehen für die Synthese von Molekülen mit C-N Chiralität einige Enzyme zur Verfügung, wie Lipasen, ω -Transaminasen, Ammoniaklyasen und Aminosäuredehydrogenase^{26,27,28,29,30,31,32}. Diese aufgezählten Enzymklassen dienen hauptsächlich zur Deracemisierung oder asymmetrischen Synthese von primären chiralen Aminen¹¹ (Abbildung 2).

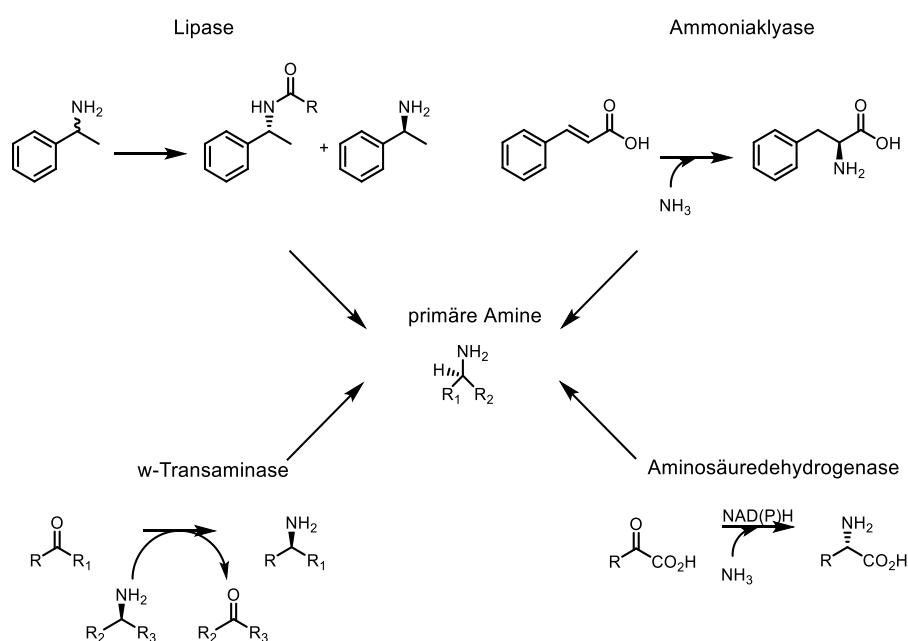


Abbildung 2: Bekanntesten Enzymklasse für die Biosynthese der unterschiedlichsten chiralen primären Amine.

Die BASF optimierte eine kinetische Auflösung mittels einer Lipase, im Maßstab von mehreren tausend Tonnen, für eine große Anzahl an Aminen, ermöglicht durch das breite Substratspektrum der Lipase^{33,34}. Hierfür wird die Lipase von *Burkholderia plantarii* genutzt, aber auch die Lipase B von *Candida antarctica* kann eingesetzt werden^{35,27}. Durch die kinetische Auflösung kann nur eine Ausbeute von 50% des gewünschten Enantiomers erreicht werden, es sei denn ein Racemisierung wird angewendet für eine dynamische kinetische Auflösung³⁵. Die Einführung eines Racemisierungsschrittes bleibt allerdings noch problematisch, da dieser unter harschen Bedingungen durchgeführt werden muss³⁵ und dadurch die Kombination mit Enzymen, die milde Reaktionsbedingungen bevorzugen, schwierig ist.

Ein weiteres Enzym für die Synthese primärer Amine ist die Ammoniaklyase. Die L-Asparaginsäure-Ammoniaklyase wird zum Beispiel eingesetzt um L-

Asparaginsäure aus Fumarsäure und Ammoniak herzustellen^{4,36}. Des Weiteren können auch unnatürliche Aminosäuren und deren Derivate mit Ammoniaklyasen synthetisiert werden³⁷.

Auch die ω -Transaminasen können auf zwei Arten genutzt werden um chirale Amine zu generieren. Zum einen können chirale Amine generiert werden, durch eine kinetische Auflösung, indem ein Enantiomer des racemischen Amins zum Keton überführt wird. Zum anderen ist die bevorzugte asymmetrische Synthese ausgehend vom prochiralen Keton möglich³⁸. Für diese Aminierung ist allerdings eine hohe Konzentration an Amindonor, als treibende Kraft, notwendig und die aktive Tasche der ω -Transaminasen ist sehr spezifisch, wodurch diese für größere Moleküle nicht geeignet ist²⁹. Gerichtete Evolution ermöglichte die Synthese von Sitagliptin, ein Medikament für Diabetes Typ II, mittels einer ω -Transaminase³⁹. Da Transaminasereaktionen im Gleichgewicht sind und um eine Möglichst hohe Produktbildung von Sitagliptin zu erreichen, musste das Gleichgewicht auf die Seite des Produktes gezogen werden. Dafür wurden ein großer Überschuss des Amindonors Isopropylamin eingesetzt und das Nebenprodukt Aceton, über Verdunstung bei erhöhter Temperatur, aus dem Reaktionsgemisch entfernt³⁹.

Eine weitere Enzymklasse, die Aminosäuredehydrogenasen ermöglichen die Synthese von natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren mittels reduktiver Aminierung^{40,41,42}. Anfangs hatten Aminosäuredehydrogenasen ein auf natürliche Aminosäuren beschränktes Substratspektrum, durch Enzymengineering konnte das Substratspektrum erweitert werden und auch die Umsetzung unnatürlicher Substrate, wie L-Homophenylalanin und β -Aminosäuren, ist möglich^{43,44,45}. Des Weiteren war es möglich, aus der Leucin Dehydrogenase von *Bacillus stercorarius* durch intensives Enzymengineering in der aktiven Tasche eine Aminodehydrogenase zu generieren⁴⁶. Das erweiterte das Substratspektrum immens, da nicht mehr wie bisher das Carboxylmotiv für die Erkennung des Substrates nötig ist.

Für die Synthese von sekundären und tertiären chiralen Aminen stehen weniger biokatalytische Möglichkeiten zur Verfügung, hier bieten Aminoxidasen und Iminreduktasen die populärsten Beispiele^{47,48,49} (Abbildung 3).

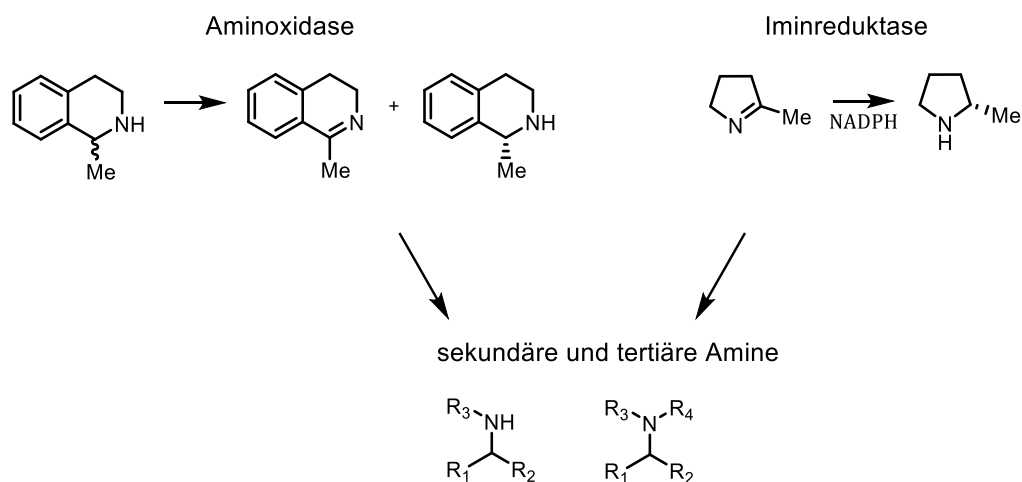
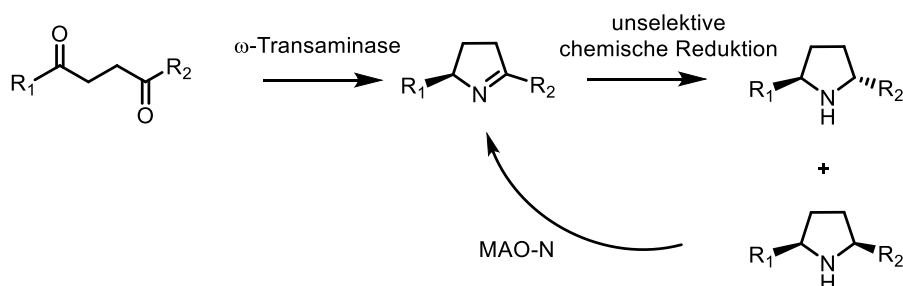


Abbildung 3: Enzyme für die biokatalytische Synthese von sekundären und tertiären Aminen.

Monoaminoxidasen, wie die Monoaminoxidase von *Aspergillus niger* (MAO-N), werden zur Deracemisierung von Aminen eingesetzt⁵⁰. Bei der Entdeckung der MAO-N durch Schilling und Lerch beschränkte sich deren Substratspektrum hauptsächlich auf primäre Amine⁴⁷. Erst durch intensives Enzymengineering wurden Varianten generiert mit gesteigerter Aktivität, erweitertem Substratspektrum und verbesserter Selektivität^{49,51}. Dadurch war die Möglichkeit gegeben die MAO-N in Kombination mit ω -Transaminasen einzusetzen um *N*-Heterocyclen zu synthetisieren (Schema 3)^{52,53}.



Schema 3: Kaskade bestehend aus ω -Transaminase und MAO-N für die selektive Synthese von *N*-Heterocyclen aus Diketonen⁵³.

Iminreduktasen werden im Gegensatz zu Aminoxydasen zur asymmetrischen Synthese von chiralen Aminen eingesetzt. Sie wurden 2010 von Mitsukara *et al.* in *Streptomyces* sp. entdeckt^{48,54,55}. Beim Screening einer großen Bibliothek an Mikroorganismen wurden schließlich in zwei *Streptomyces* sp. Stämmen eine (*R*)-selektive Iminreduktase und eine (*S*)-selektive Iminreduktase identifiziert und charakterisiert^{54,55}. Das Substratspektrum umfasst Pyrrolin, Piperidein, Isoquinolin

Substrate und weitere Iminiumverbindungen⁵⁶. Seit 2014 wurde die Klasse der Iminreduktasen stetig erweitert und charakterisiert^{57,58,59,60}. Durch die stetig erweiterte Auswahl an Iminreduktasen wurde auch ihre Anwendung in Kaskaden interessant und untersucht⁶¹. Eine genauere Beschreibung der Klasse der Iminreduktasen erfolgt in Kapitel 1.4.

Wie bereits erwähnt wird in der Biokatalyse stetig nach neuen Enzymen als auch über Enzymengineering nach neuen Aktivitäten gesucht um die biokatalytische Toolbox zu erweitern. Auch im Bereich der Bildung von Aminen gibt es einige exotische Beispiele, wie etwa die Pictet-Spenglerasen Norcoclaurinsynthase und Strictosidinsynthase. Beide Enzyme stammen aus der Alkaloidbiosynthese und führen die Kondensation eines Arylethylamins mit einem Aldehyd durch^{62,63}. Ein weiteres Beispiel ist die neu entdeckte NADP(H) abhängige reduktive Aminase von *Aspergillus oryzae*, welche ein großes Spektrum von Carbonylsubstraten mit primären und sekundären Aminen koppelt mit einem Substratverhältnis von 1:1⁶⁴. Auch Enzymengineering führte zu einer Erweiterung der biokatalytischen Toolbox, da McIntosh *et al.* eine P450_{BM3} für die intramolekulare C-H Aminierung entwickelte⁶⁵.

Die aufgezeigten Enzyme geben die Möglichkeit primäre, sekundäre wie auch tertiäre Amine ausgehend von den unterschiedlichsten Substraten zu generieren. Trotzdem gibt es noch immer ein Defizit an biokatalytischen Synthesemöglichkeiten für die Generierung chiraler *N*-Heterocyclen, wodurch weiterhin eine stetige Erweiterung der biokatalytischen Toolbox erfolgt.

1.2.3 Biokatalytische Kaskadenreaktionen zur Synthese von Aminen

Enzymatische Kaskaden rückten in den letzten Jahren zunehmend, für die Synthese von z.B. Pharmazeutika, Agrochemikalien oder deren Bausteine, in den Fokus⁶⁶. Sie ermöglichen die Synthese dieser Komponenten ohne die Anwendung von Schutzgruppen, harschen Reaktionsbedingungen oder der Reinigung der Intermediate⁶¹. Im Fall von *in vivo* angewandten Enzymkaskaden werden diese Vorteile der Biokatalyse mit der intrazellularen Regenerierung von benötigten Kofaktoren kombiniert. Ein weiterer Vorteil von *in vivo* Enzymkaskaden ist der deutlich geringere Arbeitsaufwand, da die Reinigung der Enzyme nicht durchgeführt

werden muss. Nichtsdestotrotz bringt besonders die Entwicklung einer *in vivo* Enzymkaskade einige Herausforderungen mit sich, wie die gleichzeitige Expression der beteiligten Enzyme oder das Finden der optimalen Reaktionsbedingung. Zudem können die Balance der Enzymaktivitäten, die Aufnahme des Substrates in die Zelle und das Ausscheiden des Produktes aus der Zelle sowie die Akkumulation von Intermediaten Probleme darstellen. Für die Entwicklung einer Kaskade stehen je nach Problemstellung verschiedene Kaskadendesigns zur Auswahl. Zum einen die lineare Kaskade, bei der das Substrat über ein Intermediat ins Produkt überführt wird (Abbildung 4 (1)). Zum anderen gibt es auch die orthogonale Kaskade, bei der ein Substrat ins Produkt überführt wird und gleichzeitig die Regeneration eines Kofaktors stattfinden oder ein problematisches Nebenprodukt aus der Reaktion entfernt wird (Abbildung 4 (2)). In der parallelen Kaskade können benötigte Kofaktoren von der jeweils anderen Reaktion regeneriert werden (Abbildung 4 (3)). Bei der cyclischen Kaskade werden zwei Substrate in das gewünschte Produkt, aber auch in ein Intermediat, das wieder zu den Substraten umgesetzt wird, generiert (Abbildung 4 (4)). Die cyclischen Kaskaden werden hauptsächlich für Deracemisierungen eingesetzt, bei denen oft ein chemisches Reduktionsmittel die Überführung des Intermediats in die Substrate erlaubt⁶⁷. Diese Kaskadendesigns können natürlich auch miteinander kombiniert werden, wobei z.B. ein Schritt der linearen Kaskade einer Kofaktorregeneration entsprechen kann und somit auch teilweise orthogonal wäre.

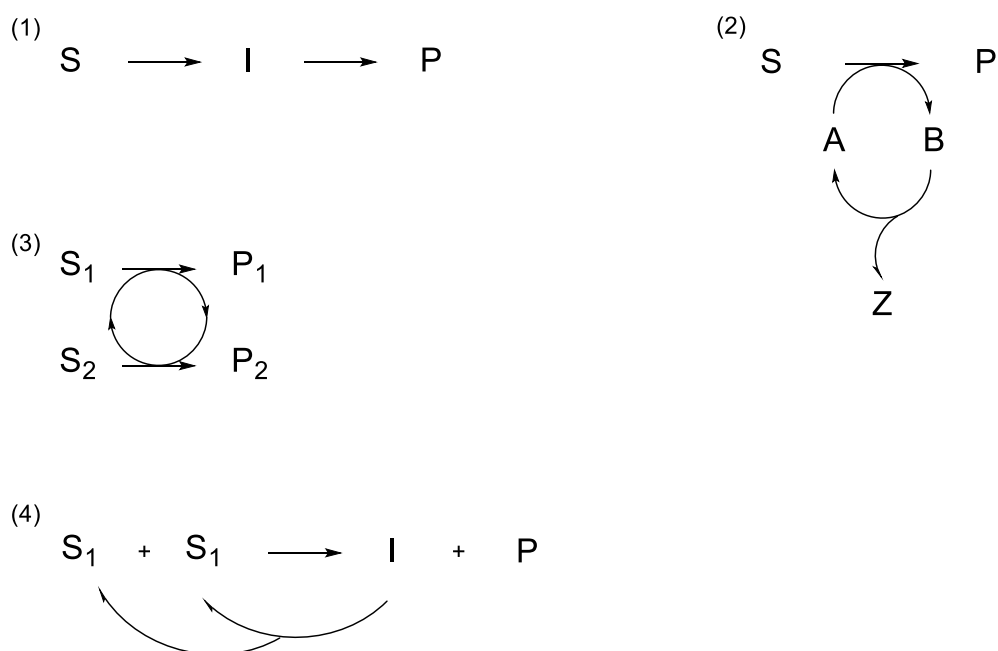
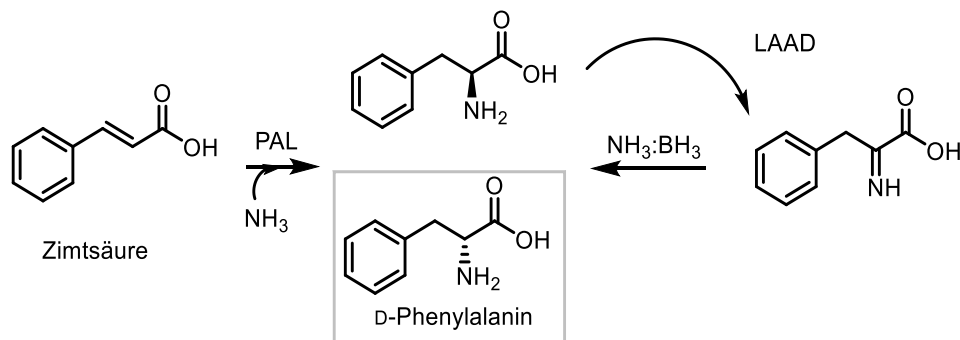


Abbildung 4: Verschiedene Kaskadendesigns. In **(1)** ist die einfache lineare Kaskade zu sehen, bei der das Substrat über ein Intermediat in das Produkt umgesetzt wird. In **(2)**, der orthogonalen Kaskade, wird das Substrat direkt ins Produkt überführt, wobei gleichzeitig eine Kofaktorregeneration oder das Entfernen eines ungewünschten Nebenproduktes Z stattfindet. Bei **(3)** handelt es sich um eine parallele Kaskade, die durch Kombination zweier Reaktionen, das Problem der Kofaktorregeneration löst. Bei der zyklischen Kaskade **(4)** werden zwei Substrate in das gewünschte Produkt und in ein Intermediat umgesetzt, das anschließend direkt wieder zu den beiden Substraten überführt wird⁶⁷.

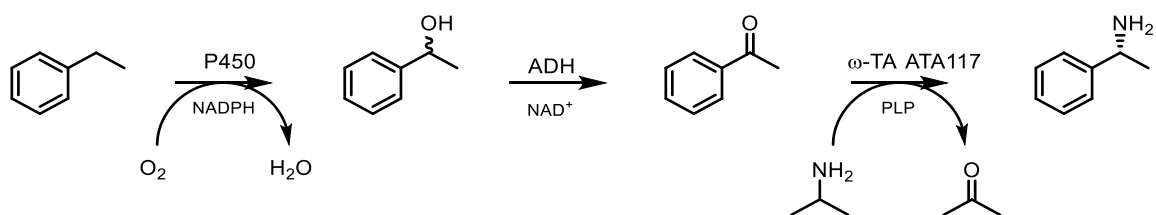
Die im vorherigen Kapitel (1.2.2) aufgezeigten Enzymklassen wurden wegen ihrer Eigenschaften natürlich auch in Kaskaden eingesetzt um chirale Amine zu generieren.

Für die Synthese von substituierten Phenylalaninderivaten wurde zum Beispiel die Phenylalanin-Ammoniaklyase (PAL) von *Anabaena variabilis* durch gerichtete Evolution weiterentwickelt³¹. Um die Phenylalaninderivate ausgehend von substituierten Zimtsäuren zu generieren wurde die PAL mit einer L-Aminosäuredeaminase (LAAD) und einem nichtselektiven chemischen Reduktionsmittel zu einer cyclischen Kaskade kombiniert. Dadurch wurde die Anreicherung des D-Phenylalanins ermöglicht, da nach der Aminierung der Zimtsäure nur das L-Phenylalanin oxidiert wurde um danach vom Reduktionsmittel in beide Enantiomere wieder überführt zu werden (Schema 4)³¹. Dadurch wurden für verschiedene Phenylalaninderivaten eine Produktbildung von bis zu 80 % mit einem *ee* von bis zu >99 % erreicht³¹.



Schema 4: Reaktionsschema für die Synthese von D-Phenylalanin. Das Substrat die Zimtsäure wird mittels Phenylalanin-Ammoniaklyase zum L- und D-Phenylalanin umgesetzt. L-Phenylalanin wird anschließend durch die L-Aminosäuredeaminase (LAAD) oxidiert um anschließend über das Reduktionsmittel NH₃:BH₃ wieder unselektiv reduziert zu werden. Dadurch kommt es zu einer Anreicherung von D-Phenylalanin³¹.

Auch ω -Transaminasen wurden bereits mit vielen Enzymen kombiniert, z.B. mit einer Pyruvatdecarboxylase⁶⁸. Da bei der asymmetrischen Synthese von Aminen mit ω -Transaminasen das Gleichgewicht auf der Seite des Ketons liegt, muss eine hohe Konzentration des Aminendonors, in diesem Fall L-Alanin, eingesetzt werden. Zusätzlich hatte hier die Pyruvatdecarboxylase die Aufgabe das Nebenprodukt der Reaktion Pyruvat in Acetaldehyd umzuwandeln um das Gleichgewicht weiter auf die Seite des Aminproduktes zu ziehen⁶⁸. Des Weiteren wurde die ω -Transaminase ATA-117 von *Arthrobacter* sp. mit einer P450 Monooxygenase und einer Alkoholdehydrogenase kombiniert⁶⁹. Durch eine Oxyfunktionalisierung mittels Monooxygenase und der Alkoholdehydrogenase mit darauffolgender Aminierung des Ketons durch ATA-117 ist die Synthese von Aminen in der ganzen Zelle möglich (Schema 5)⁶⁹.

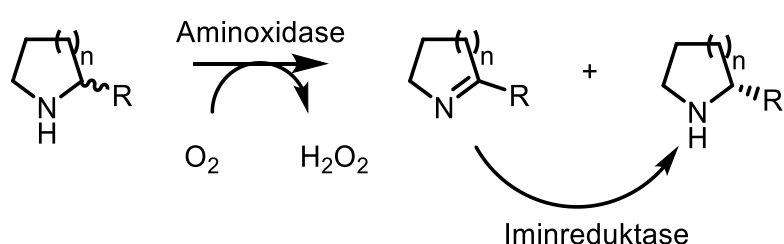


Schema 5: Reaktionskaskade für die Synthese von Aminen mittels P450 Monooxygenase, Alkoholdehydrogenase (ADH) und ω -Transaminase (ω -TA). Nach der Oxyfunktionalisierung mittels P450 Monooxygenase und ADH wird das Keton durch die ω -Transaminase aminiert⁷⁰.

Auch Aminosäuredehydrogenasen wurden in Kaskaden zur Synthese von Aminen eingesetzt. Durch die Kombination einer Alkoholdehydrogenase und einer

entwickelten Phenylalanindehydrogenase, die auch Ketone als Substrat akzeptiert, ist die Aminierung von Alkoholen möglich^{71,72}.

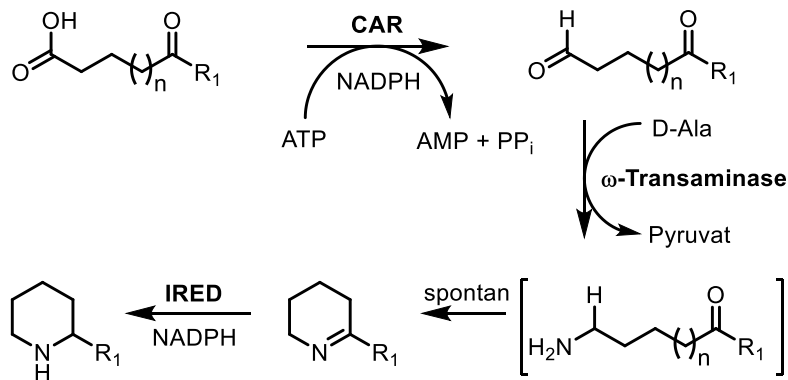
Iminreduktasen wurden für das Einführen einer C-N Chiralität in entweder Deracemisierungs- oder Synthesekaskaden eingesetzt^{73,74}. Für eine Deracemisierung wurde die (*R*)-selektive Iminreduktase (IRED) von *Streptomyces* sp. GF3587, welche das (*S*)- Enantiomer generiert, mit der (*R*)-selektiven 6-Hydroxynicotinoxidase kombiniert. Die Oxidase überführt das (*R*)-Enantiomer des Racemats zum prochiralen Imin, welches selektiv von der Iminreduktase zum (*S*)-Enantiomer reduziert wird (Schema 6)⁷³.



Schema 6: Deracemisierung von *N*-Heterocyclen mittels einer Aminoxidase und Iminreduktase⁷³.

Hier ersetzte die Iminreduktase, mit der selektiven Reduzierung des Iminintermediats, die unselektive Reduktion durch chemische Reduktionsmittel, welches in vorherigen Arbeiten in Kombination mit der Aminoxidase beschrieben wurde^{75,76}. Das Zwei-Enzym System hat in diesem Fall nicht nur den Vorteil der selektiven Reduktion und dadurch höheren *ee*'s, sondern auch den Vorteil der *in vivo* Regeneration von NADPH ausgehend von Glucose, die günstiger ist als das chemische Reduktionsmittel Ammoniumboran⁷³.

Für die Biosynthese von *N*-Heterocyclen wurden Iminreduktasen mit einer Putrescintransaminase kombiniert, wodurch die Synthese von Pyrrolidin und Piperidin ausgehend von den entsprechenden Diaminen ermöglicht wurde⁷⁷. Zudem wurde bereits während der Anfertigung dieser Arbeit eine komplexe lineare Kaskade zur Synthese wichtiger *N*-Heterocyclen, durch Verwendung von einer Carboxylsäurereduktase (CAR), einer ω -Transaminase und einer entsprechenden Iminreduktase, in einem One-Pot System entwickelt⁷⁴ (Schema 7).



Schema 7: Kaskade zur Synthese von *N*-Heterocyclen mittels Carboxylsäurereduktase (CAR), ω -Transaminase und Iminreduktase (IRED)^{74,78}.

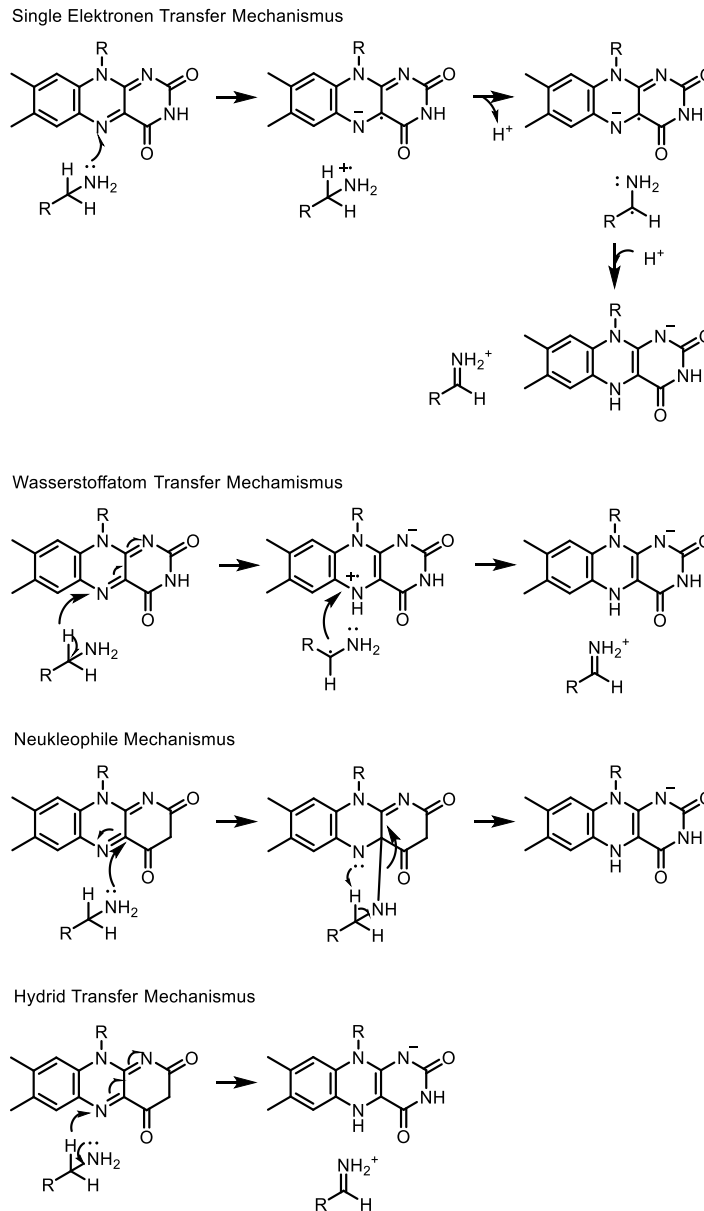
Dies ermöglicht die Synthese von substituierten *N*-Heterocyclen ausgehend von Ketosäuren. Mit Hilfe von CAR und ω -Transaminase wird aus der Ketosäure ein Aminoketon generiert, welches spontan zum Imin cyclisiert. Das resultierende Imin kann dann von der entsprechenden Iminreduktase selektiv reduziert werden. Durch den hohen Bedarf an Kofaktoren in diesem System, NADPH und ATP für CAR, Pyridoxalphosphat (PLP) für die ω -Transaminase und NADPH für die IRED, wurde ein Ganzzell System entwickelt um die Kofaktoren ausgehend von Glukose zu generieren⁷⁸.

1.3 Putrescinoxidase

In Enzymkaskaden zur Generierung von *N*-Heterocyclen, die eine Iminreduktase als Schlüsselenzym zur Bildung des chiralen Zentrums enthalten, ist die vorherige Bildung des Imins notwendig. Hierfür können wie bereits beschrieben ω -Transaminase eingesetzt werden, aber auch Polyaminoxidasen eignen sich für diese Aufgabe und können die Limitierung der ω -Transaminasen umgehen. Polyaminoxidasen gehören zu den Oxidoreduktasen, die Amine zu Imine oxidieren und gleichzeitig Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduzieren. Durch die Akzeptanz von molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor sind diese Enzyme für biotechnologische Anwendung besonders interessant, da keine kostenintensiven Kofaktoren benötigt werden. Aminoxidasen können in zwei Typen unterteilt werden, zum einen in Typ I Aminoxidasen, welches Kupfer-abhängige Enzyme sind, und zum anderen in Typ II Aminoxidase, welches Flavin-abhängige Enzyme sind. Kupfer-abhängige Aminoxidasen benötigen neben Kupfer als Kofaktor auch Pyrrolochinolinchinon (PQQ) und kommen in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren vor^{79,80}. Sie sind dort in mehreren metabolischen Stoffwechselwegen, wie im Aminosäuremetabolismus oder im Alkaloidmetabolismus, beteiligt^{81,82}. Im Fokus dieses Kapitels stehen allerdings die Flavin-abhängigen Aminoxidasen, da der Typ II Aminoxidasen eine zentrale Rolle in dieser Arbeit einnehmen. Typ II Aminoxidasen oxidieren Kohlenstoff-Stickstoff Bindungen von Aminosäuren, primären und sekundären Aminen^{83,84,85}. Die Oxidation einer C-N Bindung führt zur Doppelbindung und dann zur Hydrolyse. Im Fall von primären Aminen wird Ammonium abgespaltet und im Fall von sekundären Aminen wird die Bindung gespalten. Aminoxidasen werden bereits in z.B. Biosensoren für die Detektion von biogenen Aminen angewendet um die Frische von Lebensmitteln zu beurteilen^{86,87}. Bisher wurden die Polyaminoxidasen im Gegensatz zu den Monoaminoxidasen nicht intensiv in Hinblick auf Enzymengineering beleuchtet, daher beschränkt sich die Anzahl der am bekanntesten Polyaminoxidasen auf die Putrescinoxidase aus *Kocuria rosea*⁸⁶, die Putrescinoxidase aus *Micrococcus rubens*^{88,89,90} und die Putrescinoxidase aus *Rhodococcus erythropolis*^{91,92}. Die Putrescinoxidase aus *Rhodococcus erythropolis* (PuO-Re) wurde erst in 2008 entdeckt und beschrieben und ist somit die jüngst charakterisierte Putrescinoxidase⁹¹. Die PuO-Re gehört zu den Flavin-abhängigen

Polyaminoxidasen und liegt als Homodimer mit nur einem nicht kovalent gebundenen Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) pro Dimer in Lösung vor^{88,93,94}. Die Reaktion der Flavin-abhängigen Putrescinoxidase kann in die reduktive Halbreaktion und die oxidative Halbreaktion unterteilt werden. In der reduktiven Halbreaktion wird das Hydrid vom Substrat auf den Kofaktor Flavin übertragen⁹². Um den katalytischen Zyklus zu schließen, werden die Elektronen auf einen Elektronenakzeptor übertragen⁹². Obwohl die Flavin-abhängige Oxidasen intensiv erforscht wurden, ist der Reaktionsmechanismus noch nicht aufgeklärt, da der Flavin Kofaktor neben zwei Elektronen auch einzelne Elektronen akzeptiert. Daher wurden vier mögliche Reaktionsmechanismen vorgeschlagen (Schema 8)⁹⁵. Zum einen den Single Elektronentransfer Mechanismus, bei welchem das Semiquinone Flavin und ein Ammoniumkation Radikal als Intermediate gebildet werden⁹⁵. Zum anderen den direkten Wasserstoffatom Transfer vom Substrat zum Flavin⁹⁵. Eine weitere Möglichkeit ist der nukleophile Mechanismus, bei welchem die Aminogruppe des Substrates das C4a vom Flavin attackiert und ein kovalentes Intermediat bildet⁹⁵. Zudem wurde noch ein direkter Hydridtransfer vorgeschlagen, der möglicherweise bei der *PuO-Re* stattfindet⁹².

Der kinetische Mechanismus hängt vom verfügbaren Sauerstoff ab, da der Mechanismus bei hohem Sauerstoffgehalt vorzugsweise sequentiell verläuft und bei niedrigem Sauerstoffgehalt wurde hauptsächlich ein Ping-Pong Mechanismus beobachtet⁹². Zudem wurde beobachtet, dass die Reoxidation schneller verläuft, wenn das Iminprodukt noch gebunden ist⁹².



Schema 8: Vier vorgeschlagene Mechanismen für die Amin Oxidation durch Monoaminoxidasen⁹⁵.

2011 wurde die Kristallstruktur von PuO-*Re* gelöst und zeigte eine starke Homologie zu den humanen Monoaminoxidasen A und B (MAO-A und MAO-B), obwohl das FAD in PuO-*Re* nicht kovalent gebunden ist⁹⁴. Ein Unterschied der PuO-*Re* im Gegensatz zur MAO-B im aktiven Zentrum ist die Glutaminsäure 324 mit 9Å Abstand zum Flavin. Dieser Abstand entspricht der Länge des natürlichen Substrates Putrescin, dessen eine Aminogruppe durch die Glutaminsäure stabilisiert wird⁹¹. Schon 1976 vermuteten Swain und Desa in diesem Abstand zum FAD einen anionischen Punkt⁹⁶. Das wurde durch die gelöste Kristallstruktur bestätigt und ist somit auch der ausschlaggebende Punkt weswegen die Putrescinoxidasen einen deutlichen

Aktivitätsverlust mit kürzeren und längeren aliphatischen Diaminen aufweist, zudem werden von der PuO-Re keine Monoamine als Substrate akzeptiert (Abbildung 5). Diese dienen als Inhibitoren, da sie an die Glutaminsäure 324 binden und somit die aktive Tasche blockieren. Der Austausch der Glutaminsäure 324 mit einer unpolaren Aminosäure, wie Alanin und Leucin, verringerte die katalytische Aktivität drastisch⁹¹. Trotzdem wurde durch diesen Austausch keine Monoaminoxidase generiert.

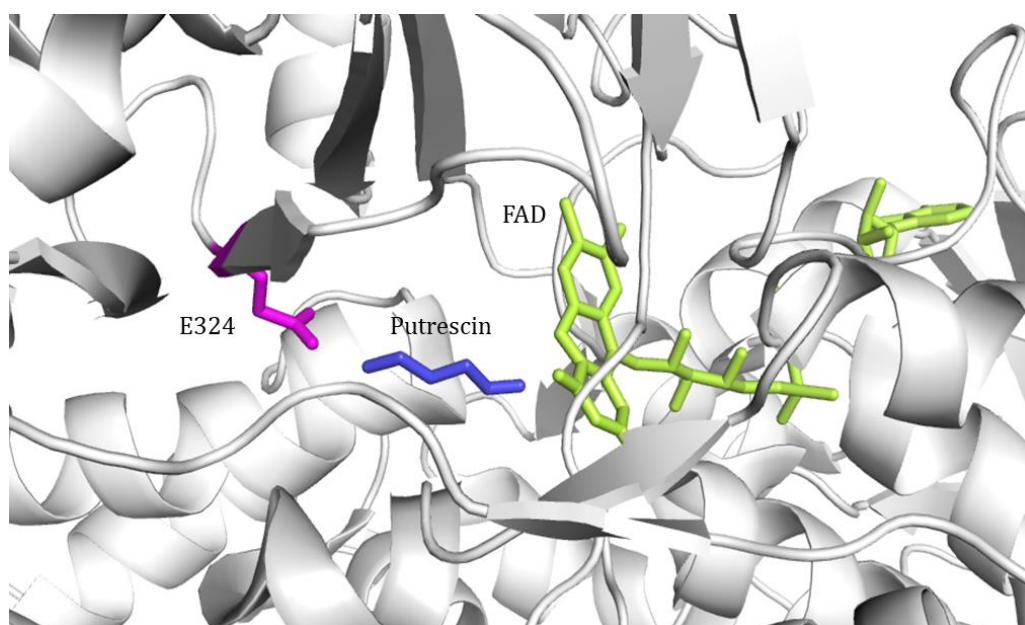


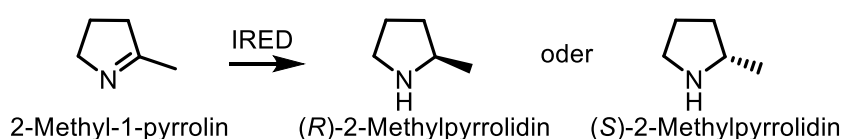
Abbildung 5: Kristallstruktur der PuO von *Rhodococcus erythropolis* (pdb:2YG4) in der man sieht, dass das Substrat Putrescin (blau) von der Glutaminsäure 324 (lila) in der aktiven Tasche in der richtigen Position zum FAD (gelb) gehalten wird. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphic System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

Die PuO liegt als Dimer in Lösung vor, mit allerdings nur einem nicht kovalent gebundenen FAD per Dimer⁹³. Die Tasche des FAD bindet auch sehr gut ADP, wodurch dieses mit FAD kompetitiert und somit zu einem geringeren gebundenen FAD Anteil führt⁹³. Die Bindetasche für das FAD ist sehr ähnlich zu der Bindetasche von MAO-A und MAO-B, allerdings binden diese zwei Monoaminoxidasen das FAD kovalent über ein Cystein. Die Einführung dieses Cysteins an Position 394 führte in PuO-Re auch zu kovalent gebundenem FAD, jedoch verursachte diese kovalente Bindung einen geringere Affinität mit gleichzeitig verringerter katalytischer Konstante k_{cat} ⁹³. Die geringere Aktivität wird vermutlich durch eine veränderte Position des Isoalloxacin Rings hervorgerufen. Bisher konnte keine Variante

entdeckt werden, die einen höheren FAD Anteil mit gleicher oder gesteigerter Aktivität für das natürliche Substrat 1,4-Diaminobutan aufweist⁹⁴.

1.4 Iminreduktase

Erstaunlicherweise gibt es bisher wie bereits beschrieben nur wenige bekannte Enzyme für die sekundäre und tertiäre Aminsynthese, obwohl Iminintermediate of eine wichtige Rolle in Stoffwechselwegen einnehmen^{97,98}. 2003 entdeckte Li *et al.* durch das Screening einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek an Iminsubstraten das anaerobe Bakterium *Acetobacterium woodii* mit einer Iminreduktase Aktivität⁹⁹. Daraufhin wurden auch in *Saccharomyces* sp. oder in Zellfreiem Extrakt des Kompostwurms Iminreduktase Aktivität nachgewiesen, allerdings wurden die entsprechenden Enzyme nicht identifiziert^{100,101,102}. Die Identifizierung der heutigen Klasse der Iminreduktasen wurde von Mitsukara *et al.* 2010, durch das Screening einer großen Bibliothek an Mikroorganismen, erreicht⁴⁸. Zwei Stämme, *Streptomyces* sp. GF3587 und 3546, wurden identifiziert mit einer Aktivität gegenüber 2-Methyl-1-pyrrolin mit hoher (*R*)- oder (*S*)-Selektivität (Schema 9).



Schema 9: Reduktion von 2-Methyl-1-pyrrolin zu (*R*)-2-Methylpyrrolidine oder (*S*)-2-Methylpyrrolidine entsprechend der Selektivität der Iminreduktase⁴⁸.

Kurz darauf erfolgte die Charakterisierung der gereinigten (*R*)- und (*S*)-selektiven Iminreduktasen^{54,55}. Kurz darauf wurde die erste Kristallstruktur einer weiteren (*R*)-selektiven Iminreduktase von *Streptomyces kanamyceticus* gelöst und ein möglicher Reaktionsmechanismus publiziert¹⁰³. Es wurde vorgeschlagen, dass ein Asparaginsäure in der aktiven Tasche genutzt wird um das Iminsubstrat zu protonieren, die Wichtigkeit dieses Restes wurde mit gerichteter Mutagenese bestätigt, denn der Austausch der Asparaginsäure zu Asparagin oder Alanin führte zu inaktiven Varianten (Abbildung 6)¹⁰³.

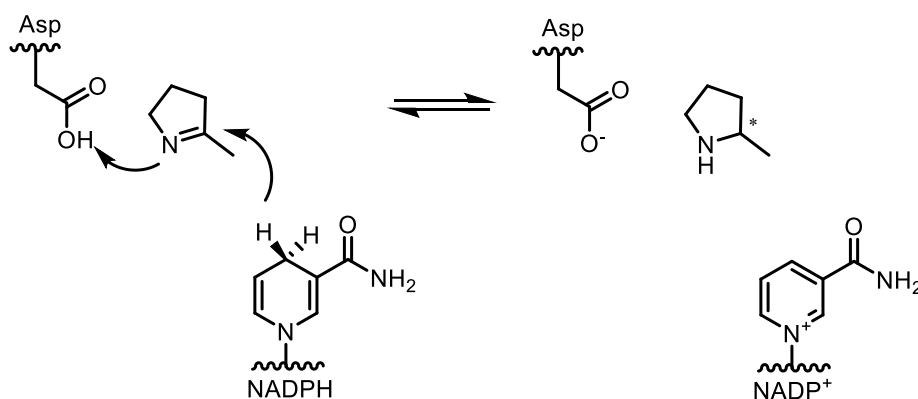
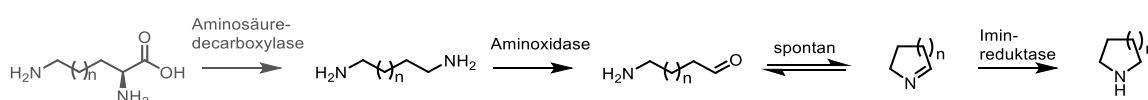


Abbildung 6: Vorgeschlagerener Reaktionsmechanismus für die Iminreduktasen, wobei das Imin vom Asparaginsäure in der aktiven Tasche ein Proton abstrahiert und auf die Bildung des Iminiums folgt der Hydridtransfer vom NADPH ¹⁰³.

In der darauffolgenden Zeit wurde das limitierte Substratspektrum der bereits bekannten Iminreduktase drastisch erweitert, so dass es möglich war verschiedene substituierte Pyrrolidine, Piperidine und Isoquinoline zu synthetisieren⁵⁶. Seither wurde die Klasse der Iminreduktasen und deren Anwendungen stetig erweitert^{57,60,104,105}. Die Anwendung erweiterte sich zum Beispiel auch auf die reduktive Aminierung von Ketonen^{106,107}, aber auch auf die stereoselektive Reduzierung von Ketonen¹⁰⁸. Des Weiteren ergab eine Datenbankanalyse, dass die Iminreduktase Familie viel größer ist, als ursprünglich angenommen: es wurden hunderte mutmaßliche Iminreduktasen identifiziert und drei davon charakterisiert⁵⁷. Zwei dieser neuen charakterisierten Iminreduktasen, die (*R*)-selektive Iminreduktase von *Streptosporangium roseum* (IRED-*Sr*) und die (*S*)-selektive Iminreduktase von *Paenibacillus elgii* (IRED-*Pe*), wurden in dieser Arbeit verwendet. Wie bereits die vorherigen beschriebenen oder kristallisierten Iminreduktasen, bilden diese auch in Lösung Dimere^{55,103,106}. Die Dimerisierung ist für die Aktivität essentiell, da beide Untereinheiten überlagern um die aktive Tasche auszubilden¹⁰³. Die beiden charakterisierten Enzyme ziehen deutlich 6-gliedrige cyclische Imine den 5-gliedrigen vor, allerdings kann für alle getesteten Substrate eine geringere Aktivität der IRED-*Pe* im Vergleich zur IRED-*Sr* beobachtet werden⁵⁸. Das besondere an der (*R*)-selektiven IRED-*Sr* ist die bisher höchste beschriebene Umsatzzahl für cyclische Imine⁵⁷.

1.5 Kombination von Polyaminoxidase und Iminreduktase zur Generierung von *N*-Heterocyclen

Für die Synthese von *N*-Heterocyclen wurden wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben Iminreduktasen in Kombination mit MOA-N zur Deracemisierung aber auch in Kombination mit ω -Transaminasen zur linearen Synthese eingesetzt^{73,78,74}. Der Nachteil von ω -Transaminasen für die Synthese von Iminen aus Diketonen, liegt an dem Reaktionsgleichgewicht, das auf Seite des Ketosubstrates liegt, wodurch ein Einsatz an hohen Konzentrationen von Aminodonor nötig ist³⁸. Daher bilden auch Polyaminoxidasen eine Möglichkeit cyclische Imine zu generieren. Hier können Diaminsubstrate eingesetzt werden, die bereits die nötige Anzahl an Kohlenstoffatomen aufweisen. Die selektive Oxidation einer Aminogruppe führt dann zur spontanen Zyklisierung und der Bildung eines Imins. Dieses Imin kann dann selektiv von Iminreduktasen reduziert werden. Durch die Nutzung einer Polyaminoxidase mit Diaminen als Substrat wäre eine Synthese von *N*-Heterocyclen ausgehend von einigen Aminosäuren, wie L-Ornithine oder L-Lysin, denkbar, da diese durch eine Aminosäuredecarboxylase in Diamine überführt werden könnten (Schema 10). Somit könnten über eine weitere biosynthetische Reaktion die Substrate der Kaskade bereitgestellt werden, da Diamine chemisch schwer zugänglich sind. Für die Kombination mit einer Iminreduktase bildet die bereits im vorherigen Kapitel beschriebene Putrescinoxidase aus *Rhodococcus erythropolis* ein vielversprechender Kandidat, da diese gut charakterisiert ist und eine hohe Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat Putrescin zeigt.



Schema 10: Enzymatische Kaskade zur Bildung von *N*-Heterocyclen mittels einer Aminoxidase und Iminreduktase. Die Aminoxidase kann das Diamin zum Aminoaldehyd oxidieren, welches dann spontan cyclisiert. Dieses Imin wird dann von der Iminreduktase zum cyclischen Amin reduziert. Die Diaminsubstrate sind z.B. zugänglich durch die Decarboxylierung von Aminosäuren.

1.6 Motivation

In der vorliegenden Arbeit soll eine enzymatische Kaskade für die Synthese von *N*-Heterocyclen entwickelt werden. *N*-Heterocyclen, besonders substituierte Piperidinderivate, sind in der Natur weit verbreitet. Deswegen sind diese wegen ihrer biologischen Aktivität oft als Bausteine in Pharmazeutika oder Agrochemikalien vertreten. Besonders die selektive Synthese von chiralen substituierten *N*-Heterocyclen stellt in der Chemie eine Herausforderung dar, daher bieten enantio-, stereo- und regioselektive Enzyme eine gute Alternative. Für die enzymatische Kaskade wurden die Putrescinoxidase aus *Rhodococcus erythropolis* und die enantiokomplementären Iminreduktasen aus *Streptosporangium roseum* oder aus *Paenibacillus elgii* gewählt. Mit der Kombination dieser beiden Enzyme ist die selektive Synthese von *N*-Heterocyclen ausgehend von Diaminderivaten möglich, die wiederum nachhaltig über die Decarboxylierung von einigen Aminosäuren gewonnen werden können. Das Substratspektrum der Putrescinoxidase ist beschränkt, daher soll eine gerichtete Evolution, einmal mit Fokus auf einen Kanal, der in die aktive Tasche führt, und einmal mit Fokus auf die aktive Tasche, durchgeführt werden. Dabei dient die vorherig durchgeführte gerichtete Evolution von Dr. Philipp Scheller als Anhaltspunkt für die Wichtigkeit des Kanals zur aktiven Tasche. Mit den evolvierten Putrescinoxidasen soll die Kaskade erst *in vitro* umgesetzt werden, wobei die optimalen Reaktionsbedingungen gefunden werden müssen. Danach soll das System mit der besten Putrescinoxidase Variante *in vivo* etabliert werden um ein Modellsubstrat umzusetzen. Dafür soll der *E.coli* Wirtsstamm und die Reaktionsbedingungen optimiert werden. Dieses System soll dann an Sanofi übergeben werden um ein Fermentationsprozess zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), VWR (Bruchsal, DE) oder Alfa Aesar (Ward Hill, US) bezogen. Alle Enzyme und Enzypuffer wurden von der Firma ThermoScientific (Karlsruhe, DE) erworben.

2.1.2 Biochemische Reagenzien und Marker

Tabelle 1: Für diese Arbeit verwendete Protein Ladder und DNA Ladder.

Marker/Standard	Anbieter
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoScientific, Karlsruhe, DE
GeneRuler 1kb DNA Ladder	ThermoScientific, Karlsruhe, DE

2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried, DE) bezogen. Die erhaltenen Primer wurden auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μL in ddH₂O gelöst. Diese Lösung wurde auf eine Konzentration von 10 pmol/μL verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: Alle verwendeten Primer.

Primer	Sequenz
pBAD18-FW	CTACTGTTTCTCCATACCCG
pBAD18-RV	CTGTATCAGGCTGAAAATCTTCTC
PuOE202G-FW	CACCTCGTGGACGGGGACTTCATCCTCGAC
PuOE202G-RV	GTCGAGGATGAAGTCCCCGTCCACGAGGTG
PuOE324A-FW	CGAGGTAGTGCAGGCGGTGTACGACAACACC
PuOE324A-RV	GGTGTTCGTACACCGCCTGCACTACCTCG

PuOE324L-FW	CGAGGTAGTGCAGCTGGTGTACGACAACACC
PuOE324L-RV	GGTGTTCGTCGTACACCAGCTGCACTACCTCG
PuOE324D-FW	CGAGGTAGTGCAGGACGTGTACGACAACACC
PuOE324D-RV	GGTGTTCGTCGTACACGTCCTGCACTACCTCG
PuOE324Y-FW	CCGAGGTAGTGCAGTACGTGTACGACAACACC
PuOE324Y-RV	GGTGTTCGTCGTACACGTA CTGCACTACCTCGG
PuOF341W-FW	GGCACCTGGTCGCTTGGGTCTCCGACGAGAAGG
PuOF341W-RV	CCTTCTCGTCGGAGACCCAAGCGACCAGGGTGCC
PuOF341Y-FW	GGCACCTGGTCGCTTACGTCTCCGACGAGAAGG
PuOF341Y-RV	CCTTCTCGTCGGAGACGTAAGCGACCAGGGTGCC
PuOW60NNK-FW	GATCGGGCGCCAGNNKGTCTCCCCGACC
PuOW60NNK-RV	GGTCGGGGGAGACMNNCTGGCCGCCGATC
PuOG172NNK-FW	CTTCATCGCGGTNNKATGCTCACCAAGC
PuOG172NNK-RV	GCTTGGTGAGCATMNNACCCGCGATGAAG
PuOM173NNK-FW	CATCGCGGGTGGTNNKCTCACCAAGCCCG
PuOM173NNK-RV	CGGGCTTGGTGAGMNNACCAACCCGCGATG
PuOL206NNK-FW	CGGGGACTTCATCANNKGACAAGCGAGTG
PuOL206NNK-RV	CACTCGCTTGTGMNNGATGAAGTCCCCG
PuOQ431NNK-FW	GCCGAGGGATACNNKCACGTGGACGG
PuOQ431NNK-RV	CCGTCCACGTGMNNGTATCCCTCGGC
pBAD33-IRED-Sr-SalI-FW	CTGAGTCGACCACACTTTGCTATGCCATAG
pBAD33-IRED-RV	ACAGCCAAGCTTCTGCAGT

2.1.4 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	Insert	ITB Nummer	Merkmale	Resistenz
pBAD18			L-Arabinose induzierbar, pBR322 ori	Ampicillin
pBAD33			L-Arabinose induzierbar, pADYD184 ori	Chloramphenicol
Plasmidkonstrukt	Insert	ITB Nummer	Quelle	
pBAD33_IRED-Sr	IRED-Sr	pITB1236	Dr. Philipp	

			Scheller ¹⁰⁹
pBAD33_IRED- <i>Pe</i>	IRED- <i>Pe</i>	pITB1238	Dr. Philipp Scheller ¹⁰⁹
pBAD18_His-PuO- <i>Re</i>	PuO- <i>Re</i>	pITB1526	Dr. Philipp Scheller ¹⁰⁹
pBAD18_His-PuOM1	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L	pITB1527	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM2	PuO- <i>Re</i> E202P I205L	pITB1528	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM3	PuO- <i>Re</i> V200F	pITB1529	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM4	PuO- <i>Re</i> V200L D203H	pITB1530	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM6	PuO- <i>Re</i> D201C	pITB1531	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM5	PuO- <i>Re</i> D201S F204I	pITB1532	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1-IRED- <i>Sr</i>	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L IRED- <i>Sr</i>	pITB1533	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOS1	PuO- <i>Re</i> E202G L206I	pITB1534	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOS2	PuO- <i>Re</i> E202G L206S ΔD207	pITB1535	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuO- <i>Re</i> E202G	PuO- <i>Re</i> E202G	pITB1536	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1 E324Y	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L E324Y	pITB1537	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1 E324D	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L E324D	pITB1538	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1 E324A	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L E324A	pITB1539	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1 E324L	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L E324L	pITB1540	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1 E342W	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L E342W	pITB1541	Diese Arbeit
pBAD18_His-PuOM1 E342Y	PuO- <i>Re</i> L199I E202S I205L E342Y	pITB1542	Diese Arbeit

2.1.5 *E. coli*-Stämme

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i>	Genotyp	ITB Nummer
XL1 blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk ⁻ mk ⁺)	
JW5510	F- Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ- ΔyjiG763::kan rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514	
BL21 melAB:p(TAC)_IRED- <i>Sr</i>	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S) melAB:p(TAC)_IRED- <i>Sr</i>	ITB2036

BL21 p(BAD)_His-PuOM1	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S) p(BAD)_His-PuOM1	ITB2037
BL21 p(BAD)_IRED-Sr	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S) p(BAD)_IRED-Sr	ITB2038

2.1.6 Kits

Folgende Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 5: Kits, die in dieser Arbeit entsprechend den Herstellerangaben verwendet wurden.

Kit	Anbieter
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoScientific, Karlsruhe, DE
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, US
Zymoclean DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research, Irvine, US
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Irvine, US

2.1.7 Medien und Puffer

2.1.7.1 Kulturmedien

Den Flüssigmedien für die Anzucht von *E. coli* Zellkulturen wurde zur Selektion, je nach Plasmid mit der gegebenen Antibiotikum-Resistenz, das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/mL, Chloramphenicol 34 µg/mL) zugegeben. Die Zugabe des Antibiotikums erfolgte nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 60 °C.

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O	ad 1000 mL

TB-Medium

Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin (99%)	4 mL
ddH ₂ O	ad 900 mL
10x TB-Phosphatpuffer (KH ₂ PO ₄ 0,17 M, K ₂ HPO ₄ 0,72 M)	100mL nach Autoklavieren

2.1.7.2 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

6x DNA- Ladepuffer

Glycerin (99%)	3 mL
Bromphenolblau 1% in ddH ₂ O	2.5 g
ddH ₂ O	4,5 mL

50x TAE-Puffer

Tris	242 g
EDTA	18,6 g
Essigsäure	57 mL
ddH ₂ O	ad 1000 mL
Salzsäure	pH 8 einstellen

2.1.7.3 Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

6x SDS Probenpuffer

Tris-HCl pH 6,8	280 mM
DTT	600 mM
Glycerin	30% (w/v)
SDS	10% (w/v)
Bromphenolblau	0,12 % (w/v)

Trenngel 12%

ddH ₂ O	1,6 mL
Acrylamidlösung 30%	2,0 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	1,3 mL
SDS 10%	0,05 mL
APS 10%	0,05 mL
TEMED	0,002 mL

Sammelgel 5%

ddH ₂ O	0,68 mL
Acrylamidlösung 30%	0,17 mL
1,0M Tris-HCl pH 6,8	0,13 mL
SDS 10%	0,01 mL
APS 10%	0,01 mL
TEMED	0,001 mL

Elektrodenpuffer

Tris	15,0 g
Glycin	72,0 g
SDS	5,0 g
ddH ₂ O	ad 1000mL

Coomassie Färbelösung

Ethanol	30% (v/v)
Essigsäure (99,8%)	10% (v/v)
ddH ₂ O	60% (v/v)
Coomassie-Brilliantblau R-250	1 g/L

Coomassie Entfärbelösung

Ethanol	30% (v/v)
Essigsäure (99,8%)	10% (v/v)
ddH ₂ O	60% (v/v)

2.1.7.4 Puffer für die Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli*-Zellen

Tfbl Puffer

KOAc	0,59 g
RbCl	2,42 g
CaCl ₂	0,29 g
MnCl ₂ * 4H ₂ O	2,00 g
Glycerin	30 mL
ddH ₂ O	ad 200ml
Essigsäure (99,8%)	pH 5,8

TfbII Puffer

MOPs	0,21 g
CaCl ₂	1,10 g
RbCl	0,12 g
Glycerin	15 mL
ddH ₂ O	ad 100 mL
1M NaOH	pH 6,5

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde das Zyppy MiniPrep Kit verwendet. Hierfür wurde ein Übernachtkulturröhrchen mit 5 mL LB-Selektionsmedium angeimpft und bei 37 °C und 180 U/min über Nacht kultiviert. Die Übernachtkultur wurde bei 13 000 U/min und Raumtemperatur abzentrifugiert und die Plasmid-DNA den Herstellerangaben entsprechend aus dem Zellpellet isoliert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels Absorptionsmessung an einem NanoDrop 1000 (Agilent, Santa Clara, US)

2.2.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

2.2.2.1 Herstellung RbCl-kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente Zellen für die Plasmidtransformation wurden mit der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Dafür wurden 50 mL LB-Medium mit den entsprechenden *E. coli* Zellen angeimpft und bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Dann wurden die Zellen 15 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei 4000 U/min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 mL TfbI-Puffer resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei 4000 U/min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 2 mL TfbII-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in 50 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde ein Übernachtkulturröhrchen mit 5mL LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtkultur wurde am nächsten Tag geerntet und anschließend zweimal mit sterilem, eiskaltem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das gewaschene

Zellpellet in 200µL sterilem, eiskaltem 10%-igen Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden während der Aufbereitung immer auf Eis gelagert. 50 µL des resuspendierten Zellpellets wurden für die Transformation verwendet.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, bestehend aus der periodischen Wiederholung der Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation.

Tabelle 6: PCR Ansatz

10x Reaktionspuffer mit MgSO ₄	5 µL
Forward Primer	0,2 µM
Reverse Primer	0,2 µM
DNA-Templat	0,1 – 0,5 µg
dNTPs (10mM pro Nukleotid)	1µL
<i>Pfu</i> / <i>Psp</i> DNA Polymerase (GeneOn)	2,5 U
ddH ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 7: PCR Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3 min	1
Denaturierung	95	1 min	
Annealing	55 – 69	1 min	25
Elongation	72	2 min/kb	
Finale Elongation	72	5 min	1

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Um das PCR Produkt oder ein Restriktionsverdau aufzutrennen wurde eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1%-igen Agarosegel durchgeführt. Die DNA wurde visualisiert indem dem Gel 0,01% (v/v) Midori Green hinzugefügt wurde. Als Standard wurden 3 µL GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific, Karlsruhe, DE) aufgetragen. Die DNA Proben wurden mit 10x DNA Ladepuffer versetzt und entsprechend in die Geltaschen aufgetragen. Die Trennung wurde bei

konstanter Spannung von 100V für 35 min durchgeführt. Die Detektion erfolgte im Geldokumentationssystem Quantum ST4 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE). Zur Aufreinigung von bestimmten DNA-Fragmente wurde die Bande mittels einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des GelExtraction Kits (Zymo Research, Irvine, US) den Herstellerangaben entsprechend extrahiert.

2.2.5 Methoden zur Erstellung von Mutanten und Mutantenbibliotheken

2.2.5.1 Gerichtete Mutagenese – QuikChange™ PCR- Methode

Die DNA Sequenz eines Gens kann mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese gezielt durch den Austausch von Nukleotiden verändert werden¹¹⁰. Diese ortsgerichtete Mutagenese wurde durch die QuikChange™ PCR-Methode, angelehnt an das Protokoll der QuikChange™Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, US), durchgeführt.

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (GeneON, Ludwigshafen, DE) verwendet. Die Primer (siehe Abschnitt 2.1.3) wurden nach dem Protokoll vom QuikChange™Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, US) designt. Der verwendete Ansatz sowie das Temperaturprogramm sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgeführt. Nach der PCR wurde 1 µL *DpnI* zum PCR Ansatz hinzugegeben und für 2h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der PCR Ansatz über das DNA Clean & Concentrator™-5 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) gereinigt, konzentriert und in RbCl-kompetente *E. coli* XL1 blue transformiert (siehe Abschnitt 2.2.8).

2.2.5.2 Sättigungsmutagenese mit degenerierten Codons

Die Sättigungsmutagenese mit degenerierten Codons wurde mit der QuikChange™ PCR-Methode unter Verwendung der entsprechenden Primer durchgeführt und der PCR Ansatz nach Reinigung und Konzentrierung in elektrokompetente *E. coli* JW5510 Zellen transformiert. (siehe Abschnitt 2.2.5.1)

2.2.6 Restriktionsverdau und Ligierung von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte mit den entsprechenden Enzymen (Sall, HindIII, Thermo Scientific, Karlsruhe, DE). Die Bedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Die Restriktionsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und gereinigt (siehe Abschnitt 2.2.4).

Die Ligierung der DNA Fragmente wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, US) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde anschließend mit dem DNA Clean & Concentrator™-5 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) gereinigt, konzentriert und in kompetente *E. coli* XL1 blue Zellen transformiert (siehe Abschnitt 2.2.8).

2.2.7 Überprüfung einer Gen-insertion mittels Kolonie PCR

Eine Gen-insertion wurde mittels Kolonie PCR mit anschließender Sequenzierung der positiven Kolonien überprüft. Hierfür wurden einzelne Kolonien gepickt und in den PCR-Ansatz (Tabelle 6) überführt. Für die PCR-Kolonie wurde allerdings die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Thermo Scientific, Karlsruhe, DE) verwendet. Das PCR-Programm nach Tabelle 7 durchgeführt mit der Verlängerung der initialen Denaturierung auf 10 min. Die PCR-Ansätze wurden durch Agarosegelelektrophorese (2.2.4) aufgetrennt und die Banden unter UV-Licht detektiert. Von den PCR-Ansätzen mit einer Bande in der richtigen Größe, wurden die entsprechenden Kolonien gepickt und eine LB-Übernachtskultur angeimpft. Die Plasmide wurden gereinigt und zum Sequenzieren verschickt (siehe Abschnitte 2.2.1 und 2.2.16.).

2.2.8 Transformation RbCl-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation RbCl-kompetenter Zellen wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Hierfür wurde ein 50 µL Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 0,5 µL Plasmid DNA (5 µL eines QuikChange™ PCR Ansatz oder Ligationsansatz) hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C in einem Wasserbad wurden die Zellen kurz auf Eis

inkubiert um 500 μ L LB-Medium zuzugeben. Der Ansatz wurde dann nach 45 min bei 37 °C und 180 U/min im Inkubator abzentrifugiert (15000 U/min, 2 min, RT). 450 μ L des Überstandes wurden abgenommen und das Zellpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.2.9 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation der Mutantenbibliotheken wurden die elektrokompetenten Zellen mit der DNA in einer gekühlten Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 0,2 cm (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) inkubiert. Die Elektroporation wurde mit 2,5 V in einem GenePulser von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE) durchgeführt. Nach der Transformation wurde sofort 2 mL LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1h bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/mL Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.10 Wachstum und Proteinexpression

2.2.10.1 Expression der Putrescinoxidase

Für die Expression der Putrescinoxidase wurden 400 mL TB-Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur von *E. coli* JW5510 pBAD18_His-PuO-*Re* auf eine OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Daraufhin wurde die Expression mit der Zugabe von 0,02% L-Arabinose induziert und die Kultur für weitere 14h bei 25 °C und 180 U/min geschüttelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation mit einem JLA 8.1 Rotor (7000 U/min, 30 min, 4 °C).

2.2.10.2 Expression der Iminreduktase

Für die Expression der Iminreduktase wurden 400 mL TB-Medium mit 34 μ g/mL Chloramphenicol in einem 2L Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur von

E. coli JW5510 pBAD33_IRED-Sr auf eine OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft. Weiterhin wurde die Expression wie bei der Putrescinoxidase (siehe Abschnitt 2.2.10.1) durchgeführt.

2.2.10.3 Expression der Enzymkaskade

Für die Expression der Enzymkaskade wurden 400 mL TB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 34 µg/mL Chloramphenicol in einem 2L Erlenmeyerkolben mit einer Übernachtskultur von *E. coli* JW5510 pBAD18_His-PuO-Re pBAD33_IRED-Sr auf eine OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft. Die weitere Expression wurde wie bei der Putrescinoxidase (siehe Abschnitt 2.2.10.1) durchgeführt.

2.2.11 Zellaufschluss

Für die Proteinreinigung wurden die Zellpellets in 2 mL pro g Pellet in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 10 mM Imizadol (für PuO) und 50mM Tris-HCl pH7,5 mit 300mM KCl 5% Glycerin 1mM β-Mercaptoethanol und 5mM Imidazol (für IREDS) mit 1 µL/mL DNase (5 mg/mL Stocklösung) und 1 µL/mL Lysozym (5 mg/mL Stocklösung) resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mittels Ultraschall mit einem Sonifier S250A der Firma Branson Ultrasonics (Danbury, USA) bei 80 Watt und einem Arbeitsintervall von 40 % für 6 min durchgeführt. Der Zellaufschluss wurde mit einem JA 55.10 Rotor (17000 U/min, 30 min, 4 °C) abzentrifugiert.

2.2.12 Proteinreinigung mittels HisGraviTrap™ TALON® Chromatographie

2.2.12.1 Proteinreinigung der Putrescinoxidase

Die Putrescinoxidase wurde mit Hilfe des His₆-Tags über Co-Affinitätschromatographie gereinigt. Hierbei wird das Lysat mit den enthaltenen Proteinen über eine mit Co²⁺-Ionen gebundene Säulenmatrix geführt, wobei die Proteine mit His₆-Tag aufgrund der Affinität der Histidinreste gegenüber Co²⁺ gebunden bleiben. Diese werden dann mit Hilfe von Imidazol, welches eine höhere Affinität aufweist, eluiert. Die Reinigung erfolgte mit HisGraviTrap™ TALON®-Säulen (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Vor dem Auftragen des Lysates auf die Säule wurde dieses mit 0.45 µm Filter (PES membrane, VWR, Darmstadt, DE) gefiltert. Die Reinigung wurde nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt: Nach

dem Auftragen des Lysates wurden die Säulen mit Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 10 mM Imidazol) gewaschen. Die Putrescinoxidase wurde dann mit dem Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 300 mM Imidazol) eluiert. Über Vivaspin6-Säulen mit 10 kDa MWCO (Sartorius Stedem biotech, Göttingen, DE) wurde das vorhandene Imidazol entfernt und das Zielprotein in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 10% Glycerin aufkonzentriert.

2.2.12.2 Proteinreinigung der Iminreduktase

Die Proteinreinigung der IRED erfolgte wie beschrieben in 2.2.12.1 mit dem Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 300 mM KCl, 5% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol und 5 mM Imidazol) und Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 300 mM KCl, 5% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol und 150 mM Imidazol). Zudem wurde das Zielprotein in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 5% Glycerin aufkonzentriert.

2.2.13 SDS-PAGE Analyse

Um Proteine nachzuweisen und deren Reinheit zu bestimmen wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der die in der Lösung enthaltenen Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierfür wurden 12%-ige Acrylamid Trenngele mit einem 4%-igen Sammelgel hergestellt. Die Proben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert (14000 U/min, 3 min, RT) und mit einem Größenmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, Karlsruhe, DE) auf das SDS-PAGE Gel aufgetragen. Die Kammern wurden mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese für 15 min bei 10 mA pro SDS-PAGE Gel gestartet. Anschließend wurde für 1 h auf 30 mA pro SDS-PAGE Gel erhöht und danach das SDS-PAGE Gel mit Coomassie Brilliant Blue in der Coomassie Färbelösung gefärbt. Für die Entfärbung wurde das SDS-PAGE Gel in der Coomassie Entfärbelösung inkubiert.

2.2.14 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Gesamtproteinkonzentration zu bestimmen wurde das BCA-Kit von ThermoScientific nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.15 Selektion von Mutanten aus Mutantenbibliotheken

2.2.15.1 Festphasen-Assay

Das Festphasen-Assay für Aminoxidasenaktivität wurde nach Alexevaa *et al.* verändert^{111,112}. Hierfür wurden frisch transformierte *E. coli* Zellen auf Nylon Membranen 0,45 µM (Carl Roth, Karlsruhe, DE) auf LB-Agar mit 100 µg/mL Ampicillin und 0,02% L-Arabinose ausplattiert. Diese Platten wurden für 20h bei 25 °C inkubiert und danach für mindestens 1h bei -20 °C eingefroren um die Zellen teilweise zu lysieren. Um die Hintergrundaktivität zu minimieren wurden anschließend die Membranen auf ein Filterpapier mit 90 mm Durchmesser (SCHOTT AG, Mainz, DE), das mit 2 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,1 mg/mL HRP durchtränkt ist, überführt und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen auf ein neues Filterpapier mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,01 mg/mL HRP, 0,5 mg/mL Diaminobenzidin und 10 mM Substrat überführt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt bis die aktiven Klone eine intensive Braunfärbung aufwiesen. Diese Klone wurden auf eine frische LB-Agar Platte mit 100 µg/mL Ampicillin überführt, um diese in einer weiteren Runde Flüssigphasen-Assay zu untersuchen.

2.2.15.2 Flüssigphasen-Assay

Für die Expression der Klone in 96-Deep-Well-Platten wurde die mit jeweils 1 mL TB Medium mit 100 mg/mL Ampicillin und 0,02% L-Arabinose angeimpft und die Platten bei 25 °C und 180 U/min für 20h inkubiert. Danach wurden die Platten abzentrifugiert (4000 U/min, 50 min, 4 °C) und die Pellets wurden in 200 µL Puffer (1x BugBuster (Merck Millipore, Billerica, US) von einem 10x Stock, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 0,1 µg/mg DNase und 5% Glycerol) resuspendiert und für 15 min bei 25 °C und 180 U/min geschüttelt. Das Lysat wurde zentrifugiert (4000 U/min, 90 min, 4 °C) und der Überstand in eine 96-Well-Platte

überführt, welche sofort weiter verwendet werden konnte oder bei -80 °C eingefroren wurde. Die Aktivität der Putrescinoxidase wurde wie im Festphasen-Assay über das produzierte Nebenprodukt H₂O₂ über ein spektrophotometrisches Assay mit HRP und dem Farbstoff 4-Aminoantipyrin und Vanillinsäure detektiert¹¹³. Abhängig von der Aktivität gegenüber dem verwendeten Substrat wurden 30 – 75 µL Lysat im Assay eingesetzt. Dieser Assay wurde auch verwendet um die kinetischen Konstanten der gereinigten Putrescinoxidase zu bestimmen. Dafür wurde die spezifische Aktivität der gereinigten Varianten bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen und die Werte wurden nach Michaelis-Menten Kinetik gefittet um die kinetischen Konstanten zu bestimmen.

2.2.16 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde bei GATC Biotech (GATC Biotech, Konstanz, DE) durchgeführt. Hierfür wurde die Didesoxymethode nach Sanger verwendet und als Primer dienten die bei GATC vorhandenen Standardprimer pBAD-FP und pTrcHis-RP¹¹⁴.

2.2.17 Kaskadenreaktion

2.2.17.1 Kaskadenreaktionen mit gereinigtem Enzym – in Vitro

Für die Kaskadenreaktion *in vitro* wurde die Putrescinoxidase und die Iminreduktase in gleicher Molarität eingesetzt mit 2 µM in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 um 10 mM Substrat (1M Stocklösung in DMSO) in 5 mL umzusetzen. Zudem wurde neben 2 mM NADPH ein NADPH Regenerationssystem (20 mM Glucose-6-phosphat, 5 U/mL Glucose-6-phosphat Dehydrogenase) verwendet. Um der Bildung von Wasserstoffperoxid der PuO entgegenzuwirken wurden 2000 U/mL Katalase (Sigma Aldrich, St. Louis, US) eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 25 °C und 180 U/min inkubiert und nach 1h, 3h und 5h Proben entnommen.

2.2.17.2 Kaskadenreaktionen mit ganzen Zellen – in Vivo

Für die Kaskadenreaktion *in vivo* wurden die exprimierten *E. coli* JW5510 pBAD18_His-PuO-Re pBAD33_IRED-Sr in 50mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert. Für

die Reaktion wurden 5 mL mit einer OD₆₀₀ von 50 der *E. coli* JW5510 pBAD18_His-PuO-Re pBAD33_IRED-Sr mit 10mM Glucose und 10mM Substrat (1M Stocklösung in DMSO) bei 25 °C und 180 U/min geschüttelt und nach 3h, 6h, 24h und 48h Proben entnommen.

2.2.18 Analytik

2.2.18.1 Probenaufarbeitung

1,5-Diamino-2-methylpentan **3**, 3-Methylpiperidin **13**, 1,5-Diaminohexan **5** und 2-Methylpiperidin **15** wurden mit Essigsäureanhydrid (EA) in Dichlormethan als Lösungsmittel derivatisiert und extrahiert nach Dobos *et al.*¹¹⁵.

1,4-Diaminobutan **1**, 1,5-Diaminopentan **2**, Pyrrolidin **11**, Piperidin **12**, Diethylenetriamin **4** und Piperazin **14** wurden mit Chlorameisensäureisobutylester (IBCF) und Dichlormethan nach Cunha *et al.* derivatisiert und extrahiert¹¹⁶. Danach wurde in der organischen Phase das restliche IBCF durch Methanol gesättigt mit KOH eliminiert.

2.2.18.2 Gaschromatographische Analyse

Die Proben der Kaskadenreaktion wurden mittels Gaschromatographie analysiert. Die GC-FID Analyse erfolgte an einer Shimadzu GC-2010 mit einem AOC-20i Autoinjektor verwendet. Die Moleküle wurden mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert und über die Retentionszeit mit käuflich erwerblichen Standards identifiziert. Für die Quantifizierung der einzelnen Verbindungen wurden Kalibrationskurven mit passenden Standards hergestellt. Die einzelnen Temperaturprogramme sind in Tabelle 8 gegeben.

Tabelle 8: GC-FID Konditionen für die Detektion und Quantifizierung der Substrate und Produkte der Kaskadenreaktion.

Molekül	Säule	Split Verhältnis	Injektor- temperatur [°C]	Detektor- temperatur [°C]	Ofen- temperatur- programm	Kommentar
13 15	DB5	5	250	330	100 °C für 1 min, 30 °C/min auf 130 °C, 5 °C/min auf 150 °C für 1 min, 50 °C/min auf 250 °C für 30s, 50 °C/min auf 300°C für 1 min, 50 °C/min auf 325 °C für 3 min	Derivatisiert mit EA
1 2 3 11 12 13 14	DB5	50	250	330	70 °C für 1 min, 15 °C/min auf 90 °C, 20 °C/min auf 185°C für 1 min, 25 °C/min auf 320 °C für 3 min	Derivatisiert mit IBCF
13 15	β-DEX 225	10	250	255	100 °C für 2 min, 50 °C/min auf 130°C, 1,5 °C/min auf 150°C, 75 °C/min auf 210 °C für 3 min	Derivatisiert mit EA

DB5 (Agilent, Waldbronn, Germany): length 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm

Supelco β-Dex 225 (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany): length 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll eine Kaskade bestehend aus Putrescinoxidase und Iminreduktase zur Synthese von *N*-Heterocyclen aus Polyaminen entwickelt werden, da *N*-Heterocyclen eine große Bedeutung als Bausteine in der pharmazeutischen Industrie besitzen. Dafür wurde die Putrescinoxidase wegen ihres geringen Substratspektrums durch gerichtete Evolution evolviert um ihre Aktivität gegenüber linearen und substituierten Diaminen zu steigern. Dieses Set an Diaminen wurde in der Kaskade zur Synthese der entsprechenden *N*-Heterocyclen *in vitro* als auch *in vivo* angewendet, in dem die evolvierten PuOs mit der (*R*)-selektiven Iminreduktase von *Streptosporangium roseum* (IRED-*Sr*) und der (*S*)-selektiven Iminreduktase von *Paenibacillus elgii* (IRED-*Pe*) kombiniert wurden, um einen alternativen Biosyntheseweg zu entwickeln.

3.1 Putrescinoxidase

3.1.1 Semi-Rationales Design der Putrescinoxidase

Um die Aktivität der Putrescinoxidase gegenüber Diaminopentanderivaten zu steigern wurden drei Mutantenbibliotheken mittels CASTing von Dr. Philipp Scheller erstellt^{117,109}. Für die Erstellung der Bibliotheken diente die Variante E202G, die bereits durch das Screenen einer error prone PCR (epPCR) Bibliothek identifiziert wurde, mit einer deutlichen Aktivitätssteigerung für Diaminopentanderivaten als Anhaltspunkt. Diese Position ist auf einem α -helikalen Loop an einem der sieben Kanäle zum aktiven Zentrum lokalisiert (Abbildung 7).

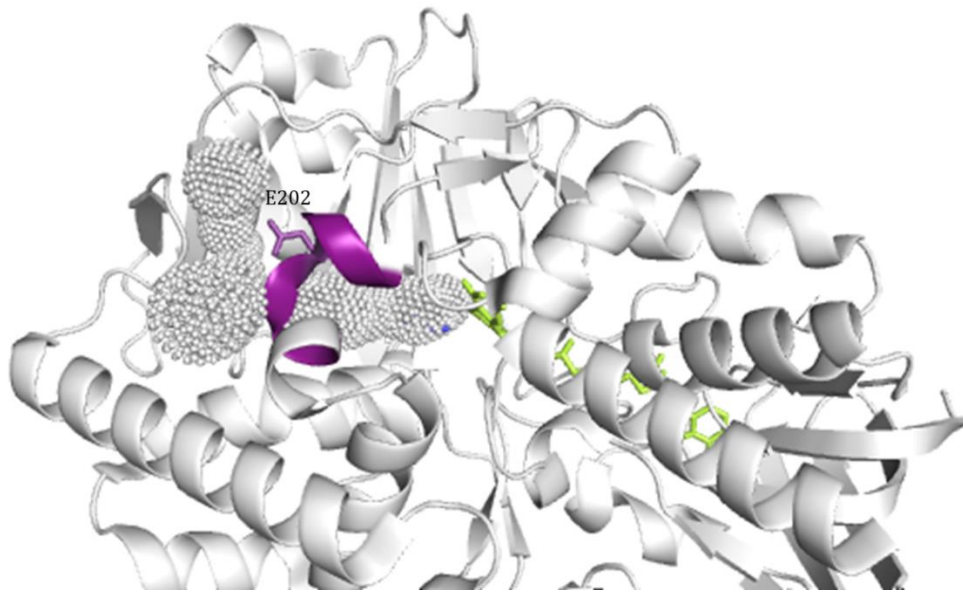


Abbildung 7: PuO (pdb:2YG4) mit dem Substrat in blau und FAD in gelb. Der α -helikale Loop mit E202, der mit dem semi-rationalen Design adressiert wird, ist in lila dargestellt. Die grauen Punkte stellen den Kanal zur aktiven Tasche dar, der sich direkt an diesem Loop befindet. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphic System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

Für diesen Kanal ist noch keine spezielle Funktion bekannt und könnte daher als Substratkanal dienen. Deswegen wurden die Aminosäurereste auf diesem α -helikalen Loop für ein semi-rationales Design ausgewählt (Tabelle 9).

Tabelle 9: 3 Bibliotheken des semi-rationalen Designs der Putrescinoxidase von Dr. Philipp Scheller.

Bibliothek	Positionen	Degenerierte Codons
A	L199 E202 I205	NDT NHK NDT
B	V200 D203	NDT NDT
C	D201 F204	NDT NDT

Die Bibliotheken wurden über zwei Runden mittels Festphasen-Assay und mit einer Runde Flüssigphasen-Assay zu einer Vollständigkeit von 95% gescreent (Abbildung 8).

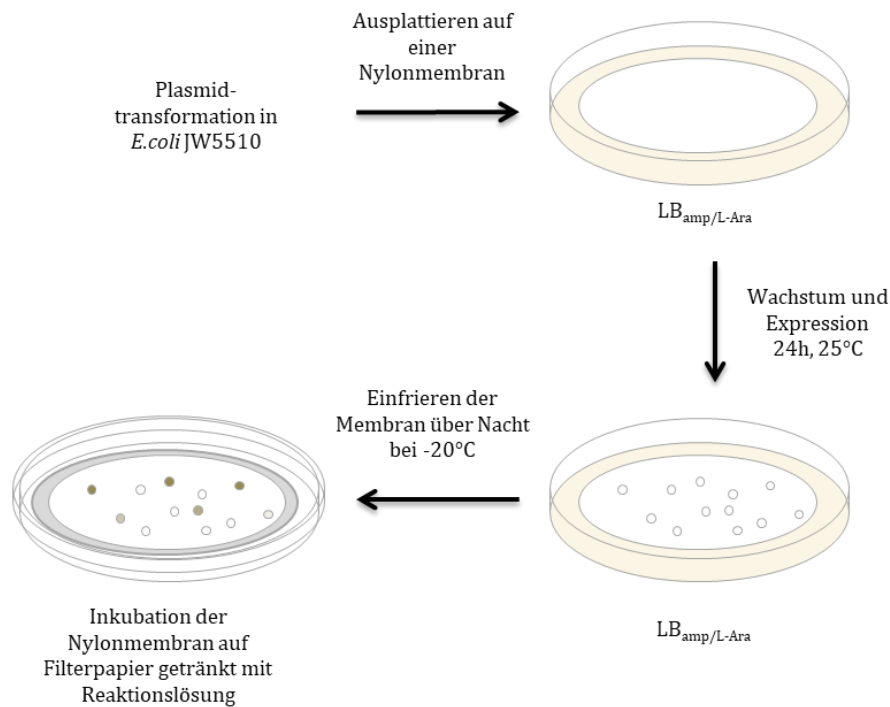


Abbildung 8: Durchführung des Festphasen-Assays. Die Plasmidtransformation wurde auf einer Nylonmembran auf einer LB Agar Platte mit Ampicillin und L-Arabinose ausplattiert. Diese wurde 24h bei 25°C inkubiert um danach die Nylonmembran mit den Kolonien über Nacht bei -20°C einzufrieren. Die aufgetaute Nylonmembran wurde dann auf einem Filterpapier mit der Reaktionslösung (50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,1 mg/mL HRP) inkubiert.

Die positiven Hits (Tabelle 10) wurden sequenziert und gereinigt um die spezifische Aktivität zu bestimmen (siehe 2.2.12.1 und 2.2.15.2).

Tabelle 10: Hits des semi-rationalen Designs mit PuOM1, PuOM2, PuOM3, PuOM4, PuOM5 und PuOM6.

Variante		Mutationen
PuOM1	aus Bibliothek A	L199I E202S I205L
PuOM2		E202P I205L
PuOM3	aus Bibliothek B	V200F
PuOM4		V200L D203H
PuOM5	aus Bibliothek C	D201S F204I
PuOM6		D201C

3.1.1.1 Expression und Reinigung der positiven Klone

Die positiven Klone und der WT der PuO wurden exprimiert und gereinigt (siehe 2.2.10.1 und 2.2.12.1). Die Expression aller Varianten wurde mittels SDS-PAGE untersucht (siehe 2.2.13).

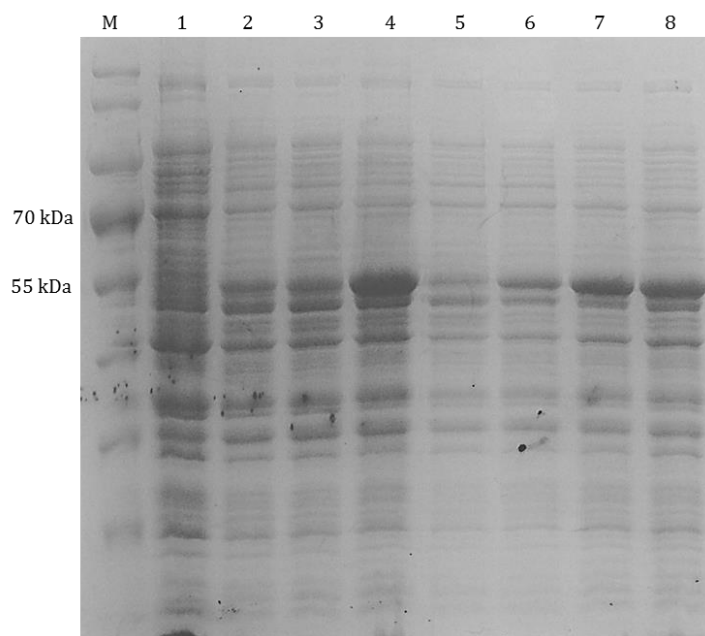


Abbildung 9: SDS-PAGE der Expression von PuO WT und der Varianten in *E. coli* JW5510. Als Referenz in Spalte 1 diente eine Probe vor der Induktion der PuO WT und die weiteren Proben zeigen die Banden nach der Expression (2: WT, 3: PuOM2, 4: PuOM4, 5: PuOM1, 6: PuOM3, 7: PuOM6, 8: PuOM5). PuO-Re hat ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa⁹¹. Alle Varianten konnten erfolgreich exprimiert werden, allerdings mit einem unterschiedlichen Expressionslevel. Die Proben wurden normiert auf eine OD₆₀₀ von 0,25.

Alle Varianten konnten erfolgreich exprimiert werden, allerdings konnte ein unterschiedliches Expressionslevel beobachtet werden (Abbildung 9). Die Reinigung erfolgte mittel HisGraviTrap™ TALON® Säulen über der Affinität des His-Tags der Enzyme an Co²⁺-Ionen der Säulenmatrix. Dafür wurde ein Protokoll entwickelt und dieses auch über SDS-PAGE überprüft. Der His-Tag der PuO wurde sehr gut von den Co²⁺-Ionen der Säulenmatrix gebunden, da im Durchfluss keine Bande der Putrescinoxidase nachgewiesen werden konnte (Abbildung 10). Nach der Elution konnte eine Reinheit von über 95% erreicht werden, daher wurden die Varianten ebenfalls nach der entsprechenden Methode gereinigt.

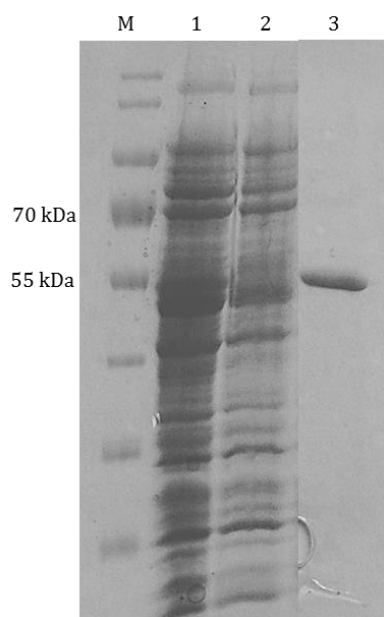


Abbildung 10: SDS-PAGE der Reinigung des PuO-Re WT. In der Spalte 1 wurde Lysat aufgetragen, in Spalte 2 der Durchfluss bei der Reinigung mit der HisGraviTrap™ TALON® Säule und in Spalte 3 der gereinigte PuO-Re WT. (Vollständiges Gel siehe Anhang). PuO-Re hat ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa⁹¹.

3.1.1.2 Aktivität und Kinetiken der positiven Klone

Die spezifische Aktivität der gereinigten Hits des semi-rationalen Designs wurde mittels des Flüssigphasen-Assay durchgeführt (siehe 2.2.15.2).

Die spezifische Aktivität der Hits wurde mit den Substraten 1,4-Diaminobutan und 1,5-Diamino-2-methylpentan bestimmt um die Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat und einem Diaminopentanderivat zu testen.

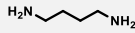
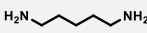
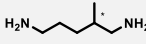
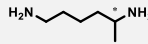
Tabelle 11: Spezifische Aktivität der Varianten des semi-rationalen Designs der Bibliotheken A, B und C gegenüber dem natürlichen Substrat 1,4-Diaminobutan und dem Diaminopentanderivat 1,5-Diamino-2-methylpentan.

Substrat	WT [U/mg]	Spezifische Aktivität zum WT [%]					
		PuOM1	PuOM2	PuOM3	PuOM4	PuOM5	PuOM6
1,4-Diaminobutan 1	2,35	141	159	307	156	361	240
1,5-Diamino-2-methylpentan 3	0,08	562	498	458	192	415	211

Die Varianten PuOM1 und PuOM5 wurden ausgesucht um weitere Kinetiken zu bestimmen, da PuOM1 die höchste spezifische Aktivität gegenüber 1,5-Diamino-2-methylpentan und PuOM5 die höchste spezifische Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat gezeigt haben (Tabelle 11). Es konnte auch eine geringe spezifische Aktivität gegenüber dem Polyamin Diethylenetriamine **4** bestimmt

werden, allerdings war diese so gering (WT $0,003 \pm 0,001$ U/mg), dass mit **4** keine kinetischen Daten bestimmt werden konnten.

Tabelle 12: Kinetischen Daten von PuO WT, PuOM1, PuOM5 und E202G mit den Substraten 1,4-Diaminobutan **1**, 1,5-Diaminopentan **2**, 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und 1,5-Diaminohexan **5**.

	 1		 2		 3		 5	
	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]
WT	$0,17 \pm 0,01$	$11,38 \pm 0,33$	$0,14 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,08$	$0,07 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$
PuOM1	$0,46 \pm 0,16$	$8,57 \pm 1,26$	$0,59 \pm 0,07$	$3,74 \pm 0,22$	$0,27 \pm 0,03$	$1,43 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$
PuOM5	$0,27 \pm 0,04$	$14,07 \pm 0,20$	$0,16 \pm 0,11$	$2,05 \pm 0,35$	$0,19 \pm 0,10$	$0,63 \pm 0,14$	$0,07 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$
E202G	$0,37 \pm 0,05$	$15,28 \pm 1,23$	$1,44 \pm 0,31$	$2,97 \pm 0,56$	$0,17 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,04$	$0,51 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,01$

Alle Varianten zeigten gegenüber den nicht natürlichen Substraten (**2**, **3** und **5**) eine höhere katalytische Konstante k_{cat} als der WT, allerdings konnte in allen Fällen auch eine höhere Michaeliskonstante K_M und somit geringere Affinität beobachtet werden.

Die höchste Steigerung der katalytischen Konstante k_{cat} für Diaminopentanderivate wurden mit der Variante PuOM1 mit $3,74 \pm 0,22$ s^{-1} für 1,5-Diaminopentan **2**, $1,43 \pm 0,08$ s^{-1} für 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und der Variante E202G mit $0,12 \pm 0,01$ s^{-1} für 1,5-Diaminohexan **5** erreicht. Aber auch für das natürliche Substrat 1,4-Diaminobutan **1** zeigte die Variante PuOM5 eine Steigerung in der katalytischen Konstante. Allerdings konnte mit keiner Variante die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M gesteigert werden, da alle Varianten einen erhöhten K_M Wert im Vergleich zum PuO-Re WT zeigen.

3.1.2 Rationales Design der aktiven Tasche

Für das rationale Design der aktiven Tasche wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen die Adressierung der Ankerposition E324 und der benachbarten Position F341 in PuOM1 um die Regioselektivität zu klären. Eine weitere Strategie beinhaltet die Sättigungsmutagenese von Aminosäuren in der aktiven Tasche in PuO-Re E202G um die Aktivität gegenüber 1,5-Diaminohexan **5** zu steigern.

3.1.2.1 Rationales Design der Ankerposition E324

Neben dem semi-rationalen Design wurden über ein rationales Design weitere Aminosäuren in der aktiven Tasche adressiert. Hierfür wurde zum einen die Position E324 ausgewählt, da diese als eine Ankerposition für eine Aminogruppe der Diamine beschrieben ist⁹¹. An dieser Stelle wurden Asparaginsäure, Tyrosin, Alanin und Leucin eingeführt um einen kleinen sauren Aminosäurerest, einen polaren und einen kleinen und großen unpolaren Aminosäurerest zu testen. Die Asparaginsäure wurde gewählt, um die Funktionalität des Restes zu erhalten, aber auch mehr Platz für die Diaminopentanderivate zu generieren. In der Monoamine Oxidase B (MAO-B)⁹¹, die nur Monoamine akzeptiert, ist an dieser Position ein Tyrosin, daher wurde diese Funktionalität genau wie die hydrophoben Reste eingeführt um eine Aktivität der PuO gegenüber Monoaminen zu generieren. Zudem wurde an der Position 341, da diese sich strukturell direkt neben E324 in der aktiven Tasche befindet, das Phenylalanin gegen Tryptophan und Tyrosin ausgetauscht, um dort eine größere hydrophobe Aminosäure und eine polare Aminosäure zu platzieren. Durch die größere Raumforderung von Tryptophan sollte eine Verschiebung des Glutaminsäurerests 324 erreicht werden, damit diese die Ankerfunktion für die Diaminsubstrate nicht mehr ausführen kann. Alle Punktmutationen wurden mit der QuikChange Methode (siehe 2.2.5.1) auf Basis der Variante PuOM1 (L199I E202S I205L) erstellt, da diese die höchste Aktivität gegenüber 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** aufweist. Mit dem Flüssigphasen-Assay wurde die spezifische Aktivität der Varianten gegenüber den Substraten 1,5-Diaminopentan **2**, 1,5-Diamino-2-methylpentan **3**, 1,5-Diaminohexane **5**, Butylamin **6** und Pentylamin **7** bestimmt. Abgesehen von einer Ausnahme zeigte keine der getesteten Varianten gegenüber den Substraten eine höhere spezifische Aktivität als die Variante PuOM1. Die Ausnahme bildete die vierfach Variante PuOM1 E324Y, die für Pentylamin **7** eine geringe spezifische Aktivität von 1,2 mU/mg aufwies. Dahingegen setzt die Variante PuOM1 keine Monoamine um. Die Variante PuOM1 E324Y konnte nun für weitere Untersuchungen mit dem Fokus auf die Regioselektivität verwendet werden. Dafür wurden die zwei Monoamine, 2-Aminoheptan **8**, mit einer sterisch gehinderten Aminogruppe, und 5-Methyl-1-hexanamin **9**, mit einer nicht gehinderten Aminogruppe, mit dieser Variante getestet (Abbildung 11).

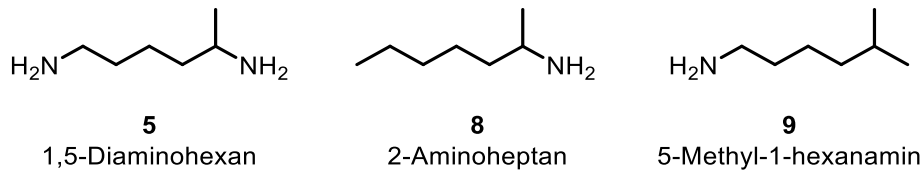


Abbildung 11: Die zwei Monoamine 2-Aminoheptan **8** und 5-Methyl-1-hexanamin **9**, die ausgesucht wurden um die Regioselektivität der PuOM1 E324Y zu untersuchen, da diese die gleiche Struktur wie 1,5-Diaminohexan **5** aufweisen.

Diese beiden Monoamine (**8** und **9**) wurden gewählt, da diese die gleiche Struktur wie 1,5-Diaminohexan **5** aufweisen.

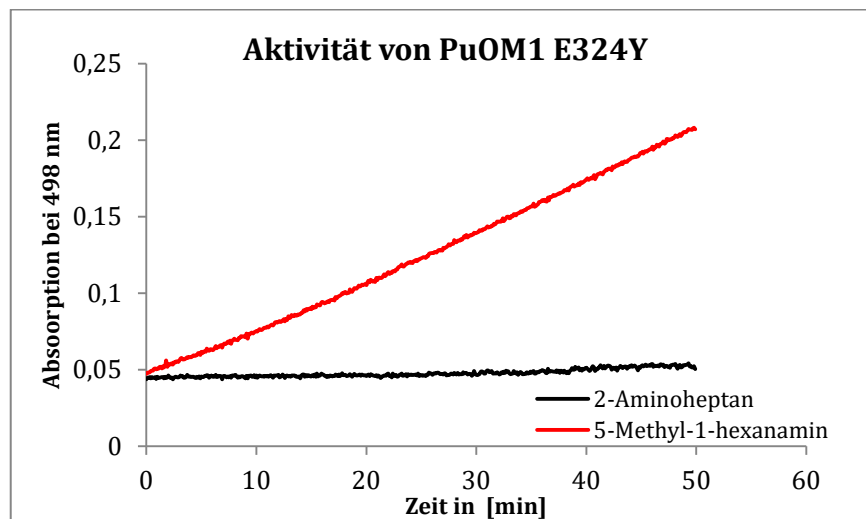


Abbildung 12: Aktivität von PuOM1 E324Y gegenüber den Monoaminen 5-Methyl-1-hexanamin **9** und 2-Aminoheptan **8**. Die Aktivität wurde mit gereinigtem Enzym (5µM) und einer Substratkonzentration von 1mM durchgeführt.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, dass PuOM1 E324Y nur Aktivität gegenüber 5-Methyl-1-hexanamin **9**, mit der sterisch weniger gehinderten Aminogruppe, zeigt und nicht gegenüber **8**, mit der sterisch gehinderten Aminogruppe. Allerdings ist die Aktivität von PuOM1 E324Y mit einer spezifischen Aktivität von 2,2 mU/mg gegenüber 5-Methyl-1-hexanamin **9** sehr gering.

3.1.2.2 Sättigungsmutagenese von Aminosäuren der aktiven Tasche von PuO-Re

Weitere fünf Aminosäurereste, die im Bereich von 5 Å um das Substrat Putrescin in der aktiven Tasche liegen, wurden ausgesucht um eine Sättigungsmutagenese an fünf Positionen durchzuführen um die sehr geringe Aktivität gegenüber 1,5-

Diaminohexan **5** zu steigern. Dabei wurden die Reste Y395 und H342 nicht mit einbezogen, da diese den aromatischen Käfig darstellen und somit an der Positionierung des Substrats beteiligt sind und die Nukleophilie der Aminogruppe erhöhen¹¹⁸. Deswegen wurden die Positionen W60, G172, M173, L206 und Q431 für eine Sättigungsmutagenese (degeneriertes Codon NNK) mit PuO E202G als Templat gewählt, da diese Variante die höchste Aktivität gegenüber 1,5-Diaminohexane aufweist (Abbildung 13). Die Bibliotheken wurden mit dem Flüssigphasen-Assay mit einer Vollständigkeit von über 95%, was in diesem Fall 94 Transformanten pro Bibliothek entspricht, gescreent.

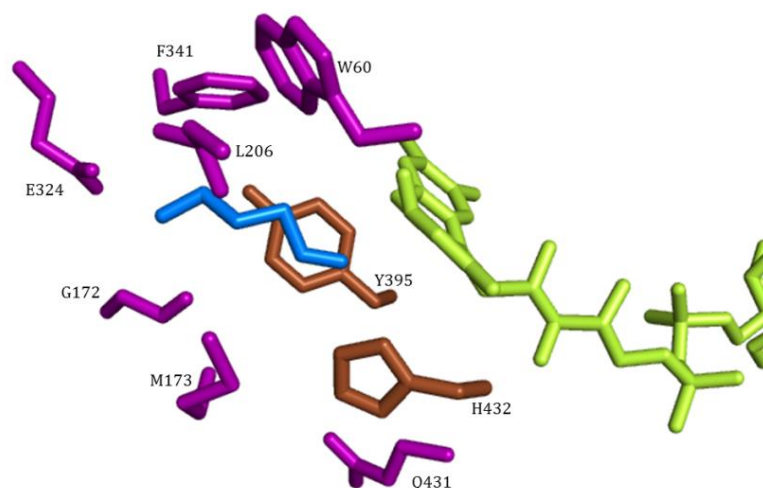


Abbildung 13: Aktive Tasche der Putrescinoxidase (pdb:2YG4) mit dem natürlichen Substrat Putrescin in blau und dem FAD in gelb. Die im rationalen Design der aktiven Tasche adressierten Aminosäure Reste (W60, G172, M173, L206 und Q431) sind in lila dargestellt und der aromatischen Käfig Y395 und H432 in braun. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphic System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

Mit einer Sättigungsmutagenese an den Positionen W60, G172, M173 und Q431 konnte keine Variante identifiziert werden, die eine gesteigerte Aktivität gegenüber 1,5-Diaminohexan aufweist. Die Sättigungsmutagenese an Position L206 hingegen resultierte in zwei Varianten mit gesteigerter Aktivität. Erstaunlicherweise führte die durchgeführte Sättigungsmutagenese, wie bei einer der beiden Varianten PuOS1 (E302G L206I), nicht nur zu einem Aminosäureaustausch, sondern in PuOS2 E202G L206S auch zu einer Deletion von D207. Mit beiden Varianten wurden die kinetischen Konstanten mit dem Substrat 1,5-Diaminohexan bestimmt.

Tabelle 13: Katalytische Konstanten der Varianten PuOS1 und PuOS2 für das Substrat 1,5-Diaminohexan **5**.

	K_m [mM]	k_{cat} [s^{-1}]
PuOS1	$0,78 \pm 0,08$	$0,33 \pm 0,01$
PuOS2	$1,70 \pm 0,11$	$0,89 \pm 0,04$

Im Vergleich zur PuO-Re E202G Variante mit einer katalytischen Konstante von $0,12 \pm 0,01 s^{-1}$, die in diesem Screening als Parent diente, zeigten PuOS1 und PuOS2 beide eine deutliche Steigerung. Allerdings konnten auch hier, wie in den bereits identifizierten Varianten mit gesteigerter katalytischer Konstante, eine höherer K_M und somit geringere Affinität für das Substrat, nachgewiesen werden.

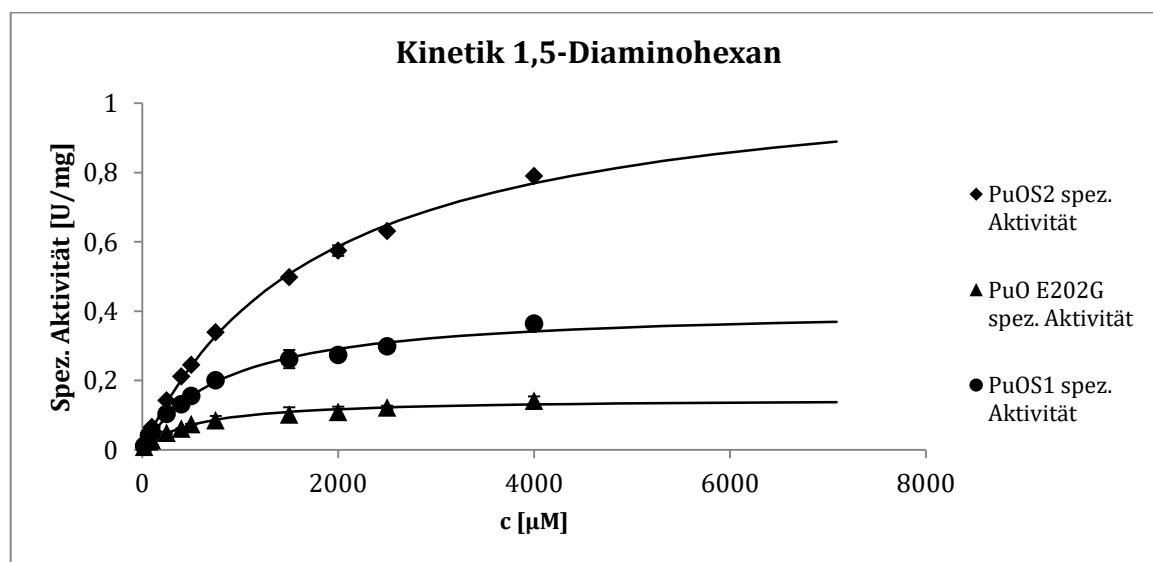


Abbildung 14: Die Kinetiken für das Substrat 1,5-Diaminohexan **5** im Vergleich von PuO-Re E202G zu PuOS1 und PuOS2 zeigen deutlich die Steigerung in der maximalen Geschwindigkeit v_{max} , allerdings auch einen gesteigerten K_M .

In Abbildung 14 ist deutlich zu erkennen, dass eine Steigerung der maximalen Geschwindigkeit v_{max} von der Variante PuO E202G ausgehend möglich war, dass sich aber dabei auch die Affinität gegenüber dem Substrat verringert hat. Trotzdem wurden die Varianten PuOS1 und PuOS2 mit der IRED-Sr *in vitro* kombiniert um deren Potential in der Kaskade zu verdeutlichen.

3.2 Kaskadenreaktion

Für die Kaskadenreaktion wurden die evolvierten Putrescinoxidasevarianten mit der (*R*)-selektiven Iminreduktase von *Streptosporangium roseum* (IRED-*Sr*) kombiniert. Die Kaskadenreaktion wurde zuerst *in vitro* mit der besten Variante PuOM1 mit dem Substrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** optimiert um dann mit den weiteren Varianten und weiteren Substraten angewendet zu werden. Die *in vivo* Kaskadenreaktion wurde ebenfalls mit der Variante PuOM1 mit dem Substrat 1,5-Diamino-2-methylpentan optimiert und durchgeführt.

3.2.1 *In vitro*

3.2.1.1 Expression und Reinigung von IRED-*Sr* und IRED-*Pe*

Die Expression der IRED-*Sr* erfolgte wie in 2.2.10.3 beschrieben. Die Reinigung erfolgte mittels HisGraviTrap™ TALON® Säulen über der selektiven Bindung des His-Tags der Iminreduktase an den Co²⁺-Ionen der Säulenmatrix.

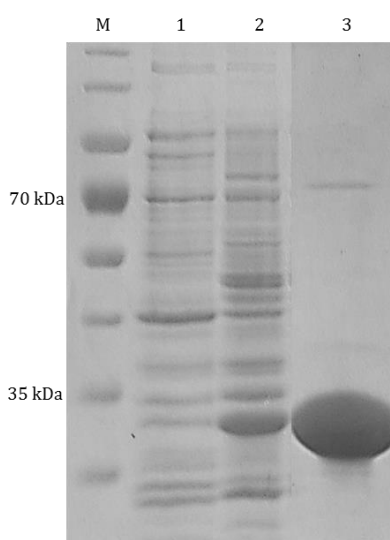


Abbildung 15: SDS-PAGE der Expression und Reinigung der IRED-*Sr*. In Spalte 1 ist die Probe von *E. coli* JW5510 pBAD33_IRED-*Sr* vor der Induktion mit L-Arabinose und in Spalte 2 nach der Expression zu sehen. In Spalte 3 wurde die gereinigte IRED-*Sr* aufgetragen und es zeigt sich, dass eine Reinheit >95% erreicht wurde. Die IRED-*Sr* hat ein Molekulargewicht von ca. 33 kDa⁵⁸ (Vollständiges Gel im Anhang).

Die Reinigung der IRED-*Sr* war erfolgreich und erzielte eine Reinheit von >95% und konnte somit in den *in vitro* Kaskadenreaktionen eingesetzt werden.

Die Expression und Reinigung der IRED-*Pe* wurde gleich durchgeführt und resultierte im gleichen Ergebnis.

3.2.1.2 Optimierung

Zu Beginn wurde die *in vitro* Kaskade mit der Variante PuOM1 durchgeführt, da diese die höchste katalytische Konstante für das Modellsubstrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** aufweist (siehe 3.1.1.2). Die Reaktion wurde wie in 2.2.17.1 beschrieben durchgeführt und dabei die Temperatur zwischen 25°C und 30°C, der pH von 7, 7,5 und 8 und das Verhältnis PuO:IRED 1:2 und 2:1 variiert und verglichen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, hat die Variation der Temperatur zwischen 25°C und 30°C keine große Auswirkung auf die Produktbildung nach 5h, da bei beiden Temperaturen volle Produktbildung beobachtet werden kann. Allerdings verläuft die Reaktion schneller bei 25°C, da hier bei dem Einsatz von 10 mM 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** schon nach einer Stunde 6.7 mM 3-Methylpiperidine **13** und bei 30°C nur 4 mM nachgewiesen werden konnte. Daher wurde für die weiteren Reaktionen 25°C gewählt.

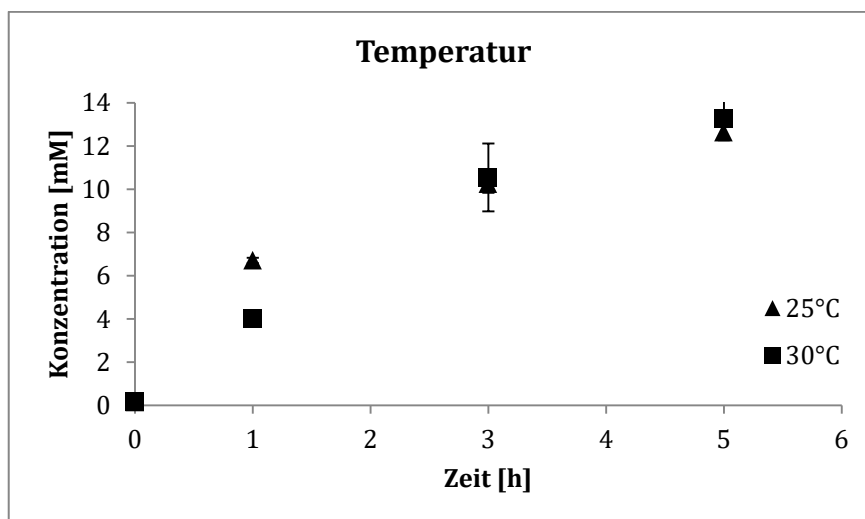


Abbildung 16: *In vitro* Kaskade mit PuOM1 und IRED-Sr bei 25°C und 30°C über 5h.

Auch die Variation im pH von 7, 7,5 und 8 führte zur vollständigen Produktbildung nach 5 Stunden und zu keiner Änderung in der Geschwindigkeit der Kaskade.

Die Veränderung des Verhältnisses von PuO:IRED zeigte geringe Auswirkungen auf die Produktbildung (Abbildung 17). Nur das Verhältnis PuO:IRED 1:2 zeigte eine etwas geringere Produktbildung als die Verhältnisse 1:1 und 2:1.

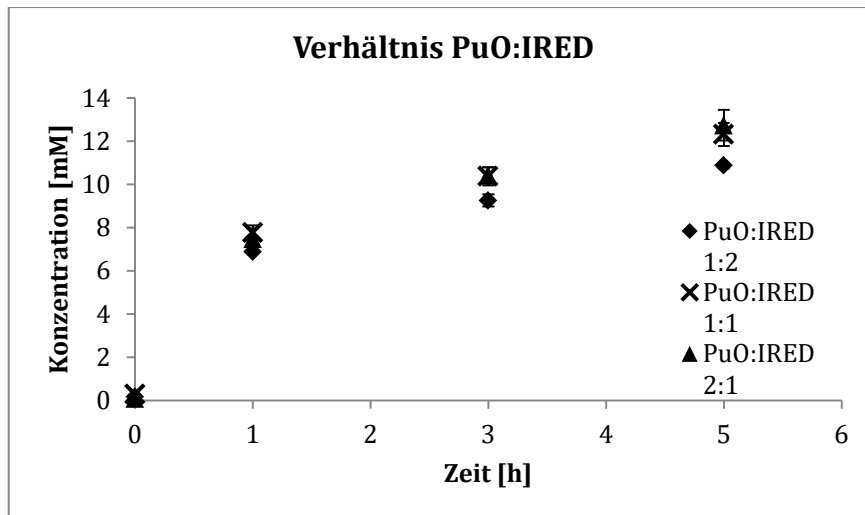







Abbildung 17: *In vitro* Kaskade mit verschiedenen Verhältnissen von PuO: IRED.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die Standardreaktionsbedingungen auf 25°C, pH 7,5 und ein PuO:IRED Verhältnis von 1:1 festgelegt.

3.2.1.3 Kaskade mit PuO WT und den Varianten E203G, PuOM1 und PuOM5 mit IRED

Um das Potential der Kaskade zu ermitteln wurden weitere Substrate mit den Putrescinoxidase Varianten in Kombination mit der IRED-Sr getestet. Hierfür wurden das natürliche Substrat Putrescin **1**, die länger-kettigen Substrate 1,5-Diaminopentan **2**, 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und 1,5-Diaminohexan **5** wie auch ein Polyamine, Diethylentriamin **4**, gewählt. Die Reaktionen wurden wie in 2.2.17.1 beschrieben durchgeführt, wobei die negativ Kontrollen, Reaktionen nur mit einem Enzym, keine Produktbildung gezeigt haben. Allerdings zeigten die negativ Kontrollen mit Putrescinoxidase eine Abnahme der Substrate **1**, **2**, und **3** ohne Produktbildung.

Tabelle 14: Produktbildung der Kaskade mit WT und den Varianten PuOM1, PuOM5 und E203G mit IRED-Sr nach einer Reaktionszeit von 5h. Von den Produkten **13** und **15** wurden zudem die ee's bestimmt.

					
[%]	11	12	(R)-13	14	(S)-15
PuO WT + IRED-Sr	23,0 ± 3,2	81,9 ± 0,4	64,6 ± 1,8 43% ee	-	4,2 ± 1,4 45% ee
PuOM1 + IRED-Sr	23,3 ± 3,6	84,0 ± 1,5	90,4 ± 4,7 Racemat	-	9,5 ± 1,4 25% ee
PuOM5 + IRED-Sr	24,1 ± 2,7	83,5 ± 0,6	68,0 ± 1,6 35% ee	-	6,5 ± 1,5 35% ee
PuO E202G + IRED-Sr	31,0 ± 3,0	83,1 ± 2,7	73,9 ± 3,7 49% ee	n.d.	19,8 ± 1,1 39% ee

Mittels der Kaskade mit beiden Enzymen konnten die Produkte Pyrrolidin **11**, Piperidin **12**, 3-Methylpiperidin **13** und 2-Methylpiperidin **15** hergestellt werden (Tabelle 14). Die Synthese von Piperazin **14** ausgehend von dem Substrat Diethylentriamine **4** war nicht möglich, obwohl PuO-Re WT Aktivität gegenüber **4** gezeigt hat (siehe 3.1.1.2), somit zeigt die IRED-Sr gegenüber dem Iminintermediat keine Aktivität. Die Bildung von **11** ist im Vergleich zu den 6-Ring Produkten **12** und **13** niedrig. Aber auch die Produktbildung des 6-Rings **15** ist gering und interessanterweise wurde von **15** ein ee des (S)-Enantiomer gebildet.

Zudem wurde der Enantiomerenüberschuss ee von **13** über der Zeit verfolgt und es zeigte sich, dass der ee des (R)-Enantiomers mit der Zeit abnimmt (Abbildung 18).

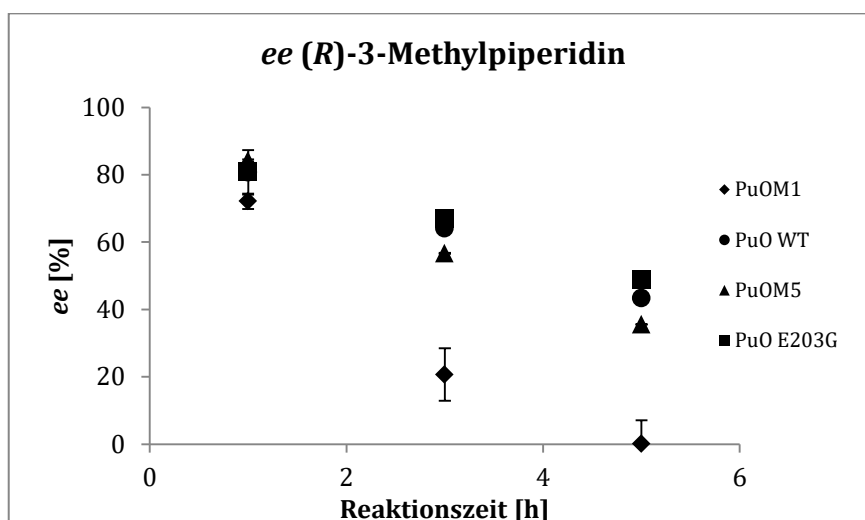




Abbildung 18: Enantiomerenüberschuss *ee* von (*R*)-3-Methylpiperidin über der Zeit. Der *ee* nimmt mit zunehmender Produktbildung ab. Im Fall von der Kaskade mit PuOM1 und IRED-*Sr* wird nach 5h ein Racemat gebildet.

In der Kaskade mit Anwendung der PuOM1 nimmt der *ee* von (*R*)-**13** stärker ab als bei der Anwendung der anderen Varianten. In diesem Fall wird nach 5h ein Racemat von **13** detektiert, wie auch die höchste Produktbildung von **13** mit $90,4\% \pm 4,7$.

Die Reaktionen mit den substituierten Substraten **3** und **5** wurden auch in Kombination mit der (*S*)-selektiven IRED-*Pe* von *Paenibacillus elgii* durchgeführt, um zu prüfen ob der *ee* der beiden Produkte **13** und **15** von der angewendeten IRED abhängig ist.

Tabelle 15: Produktbildung der Kaskade mit dem PuO WT und den Varianten PuO E202G, PuOM1 und PuOM5 in Kombination mit der *S*-selektiven IRED-*Pe* für Produkte 3-Methylpiperidine **13** ausgehend von 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und 2-Methylpiperidin **15** ausgehend von 1,5-Diaminohexan **5** nach 5h Reaktionszeit.

	PuO WT + IRED- <i>Pe</i>	PuOM1 + IRED- <i>Pe</i>	PuOM5 + IRED- <i>Pe</i>	PuO E202G + IRED- <i>Pe</i>
 (R)-13 [%]	$47,3 \pm 0,41 \%$ 76% <i>ee</i>	$50,1 \pm 0,36 \%$ 55% <i>ee</i>	$51,5 \pm 0,61 \%$ 72% <i>ee</i>	$37,1 \pm 0,41 \%$ 89% <i>ee</i>
 (S)-15 [%]	$3,8 \pm 2,37$ 54% <i>ee</i>	$12,4 \pm 2,40$ 39% <i>ee</i>	$5,4 \pm 2,45$ 46% <i>ee</i>	$14,9 \pm 1,1$ 53% <i>ee</i>



Auch mit Anwendung der (*S*)-selektiven IRED-*Pe* innerhalb der *in vitro* Kaskade zeigt sich bei der Umsetzung von **3** eine geringere Produktbildung im Vergleich zur

IRED-*Sr*, die aber auch eine höhere Aktivität besitzt. Auch hier wurde ein *ee* von 55% des (*R*)-Enantiomers von **13** mit der Kaskade PuOM1 und IRED-*Pe* detektiert, da es nach 5h nicht zu einem vollen Umsatz gekommen ist. Die Umsetzung des Substrates **5** führte mit allen PuO Varianten in Kombination mit der IRED-*Pe*, wie auch mit der IRED-*Sr*, zur Bildung eines (*S*)-enantiomerenreichen Produkt von **15**. Mit der Kaskade PuO-*Re* E202G mit IRED-*Pe* wurde eine Produktbildung von $14,9 \pm 1,1$ % mit einem *ee* von 53% des (*S*)-**15**.

3.2.1.4 Kaskade mit PuOS1, PuOS2 und IRED

Um das Potential der weiteren Varianten PuOS1 und PuOS2, die in der Sättigungsmutagenese der aktiven Tasche identifiziert wurden, durch ihre Steigerung in der katalytischen Konstante k_{cat} für 1,5-Diaminohexan **5** in der Kaskade zu veranschaulichen, wurden diese mit der IRED-*Sr* in Biotransformationen mit dem Substrat 1,5-Diaminohexan **5** und 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** eingesetzt.

Tabelle 16: Produktbildung der *in vitro* Kaskade mit den Varianten PuOS1 und PuOS2 in Kombination mit der IRED-*Sr* für die Substrate 1,5-Diaminohexan **5** und 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** nach 5h Reaktionszeit.

	Produktbildung [%]	
	 (R)-15	 (R)-13
PuOS1 + IRED- <i>Sr</i>	$61,9 \pm 0,89$ 17% <i>ee</i>	$99 \pm 0,64$ 29% <i>ee</i>
PuOS2 + IRED- <i>Sr</i>	$45,6 \pm 1,59$ 53% <i>ee</i>	$83,4 \pm 1,48$ 49% <i>ee</i>

Die Produktbildung von 2-Methylpiperidin **15** konnte deutlich von 19,8% mit PuO E202G und IRED-*Sr* auf 62% mit der Anwendung von PuOS1 gesteigert werden. Dabei zeigte, PuOS1 eine höhere Produktbildung als PuOS2, obwohl PuOS2 eine höhere katalytische Konstante von $0,89 \text{ s}^{-1}$ aufwies (Tabelle 16). Allerdings zeigte PuOS2 auch einen deutlich höheren K_M und weist daher vermutlich eine geringere Umsetzung innerhalb der Kaskade auf. Zusätzlich zu der deutlich gesteigerten Produktbildung von **15** konnte auch ein *ee* des (*R*)-**15** detektiert werden. Die Kaskade bestehend aus dem Templat von PuOS1 und PuOS2 (PuO-*Re* E202G) und IRED-*Sr*, wurde ein *ee* des (*S*)-**15** detektiert (Abbildung 19).

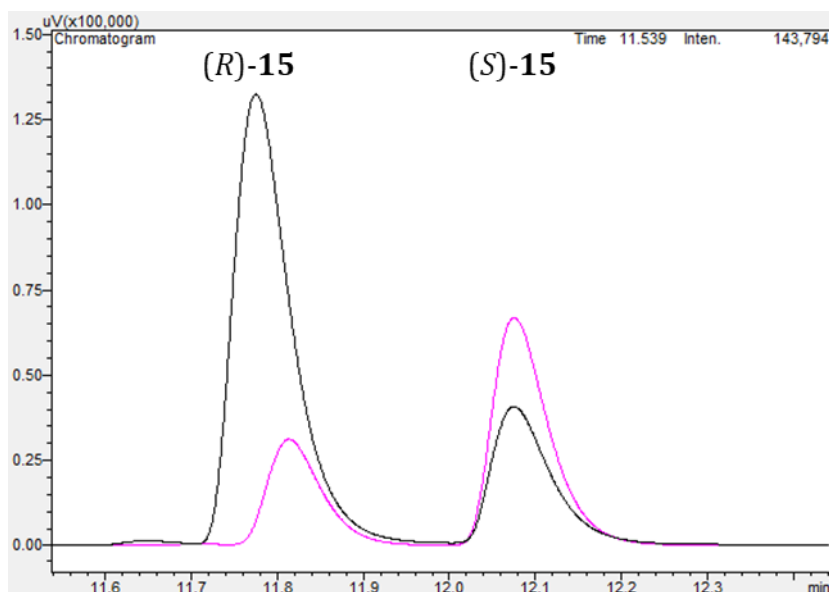



Abbildung 19: Chromatogramm der enantiomeren Auftrennung von 2-Methylpiperidin **15** der Kaskade mit PuOS2 und IRED-Sr (53% ee (R)-**15**) in schwarz und PuO E202G und IRED-Sr (39% ee (S)-**15**) in pink.

Um zu bestimmen ob die Bildung des (*R*)-enantiomerenreichen Produkts **15** der Kaskade mit PuOS1 und PuOS2 mit IRED-Sr auf eine Änderung der Regioselektivität der PuO-Re durch durch das rationale Design der aktiven Tasche zurückzuführen ist, wurde die Kaskade mit PuOS1 und PuOS2 mit der (*S*)-selektiven IRED-Pe mit dem Substrat 1,5-Diaminohexan **5** durchgeführt.

Tabelle 17: Produktbildung von **15** in der Kaskaden mit PuOS1 und PuOS2 in Kombination mit der *S*-selektiven IRED-Pe nach 5h.

	PuOS1 + IRED-Pe	PuOS2 + IRED-Pe
 (R)-15 [%]	$22,6 \pm 2,14$ <i>racemate</i>	$21,2 \pm 1,66$ 36% ee

Die Kombination beider Varianten mit der (*S*)-selektiven IRED-Pe führte im Vergleich zu der Kombination mit der (*R*)-selektiven IRED-Sr in beiden Fällen nicht zu einer Änderung des gebildeten Enantiomers sondern nur zu einer Reduktion des Enantiomerenüberschusses von 17%. Mit der PuOS1 und IRED-Pe entstand nach 5h ein Racemat und mit der PuOS2 und IRED-Pe ein ee von 36% des (*R*)-Enantiomers.

3.2.2 *In vivo*

Die *in vivo* Kaskade wurde zuerst mit einem Zwei-Plasmid System (pBAD18_HisPuOM1, pBAD33-IRED-Sr) in *E. coli* JW5510 umgesetzt. Die *in vivo* Kaskade wurde mit der Variante PuOM1 mit der IRED-Sr durchgeführt, da PuOM1 anfangs für das gewählte Modells substrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** die höchste katalytische Konstante aufwies und auch in der *in vitro* Kaskade die höchste Ausbeute erzielte. Zuerst wurden die Reaktionsbedingungen der *in vivo* Kaskadenreaktion angepasst um eine höhere Produktbildung zu erreichen. Danach wurde zudem getestet, ob ein Ein-Plasmid System (pBAD18_HisPuO-IRED-Sr) oder eine separate Expression (Zwei-Zell System) und die Kombination der Zellen für die Reaktion zu einer erhöhten Produktbildung führen (Abbildung 20). Zudem wurde jeweils eines der Gene ins Genom von *E. coli* integriert, um den Selektionsdruck durch die nötigen Antibiotika für die Plasmide zu verringern (M. Geier, B. Wiltsch, A. Glieder, acib Graz).

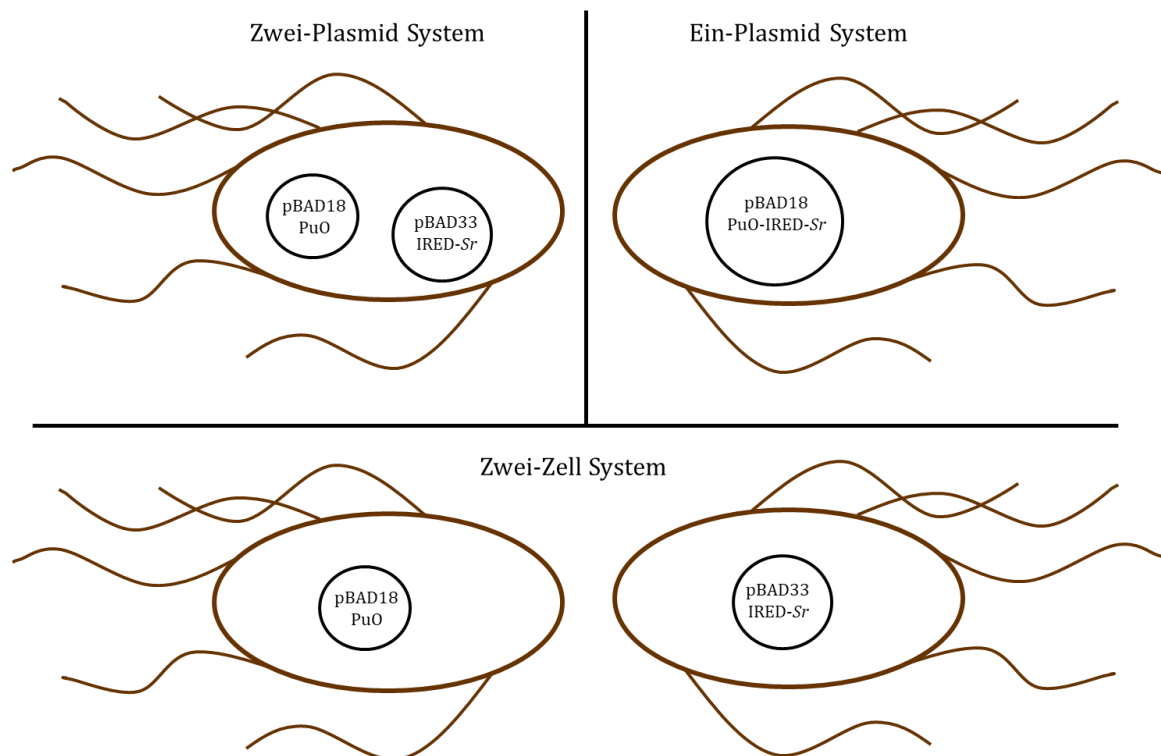


Abbildung 20: Darstellung der verschiedenen getesteten *in vivo* Systeme. Die Enzyme wurden im Zwei-Plasmid System und im Ein-Plasmid System parallel exprimiert. Im Zwei-Zell System erfolgte die Expression getrennt und die Kombination der Zellen erfolgte in der Biotransformation.

3.2.2.1 Expression der Kaskade

Die Expression der Kaskade im Zwei-Plasmid System erfolgte wie bereits die separate Expression der Enzyme und wurde über SDS-PAGE verfolgt.

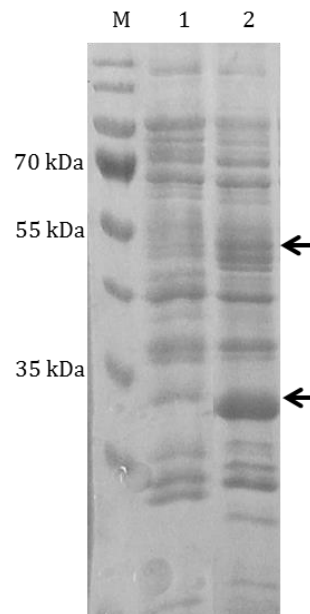


Abbildung 21: SDS-PAGE der Expression der Kaskade im Zwei-Plasmid System. In Spalte 1 ist die Probe vor der Induktion aufgetragen und in Spalte 2 nach der Expression (Proben genormt auf $OD_{600}=0.25$). Der obere Pfeil markiert die exprimierte PuOM1 und der untere Pfeil die Bande für die IRED-Sr. Das Expressionslevel der IRED-Sr ist etwa 5-fach höher als das der PuOM1. PuO-Re hat ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa und die IRED-Sr von ca. 33 kDa^{91, 58}.

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass beide Enzyme erfolgreich exprimiert wurden. Allerdings ist das Expressionslevel der PuOM1 um etwa 5-fach geringer als das der IRED-Sr.

Die Expression der Enzyme im Ein-Plasmid System wurde gleich durchgeführt und mit dem Zwei-Plasmid System über SDS-PAGE verglichen (Abbildung 22).

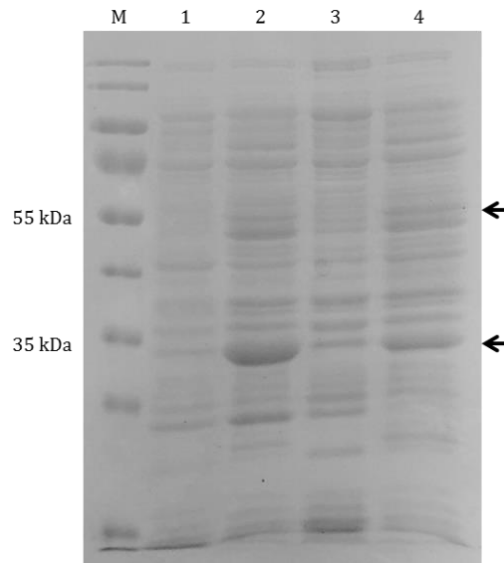


Abbildung 22: Vergleich der Expression der Kaskade im Zwei-Plasmid System und im Ein-Plasmid System. In Spalten 1 und 2 sind die Proben des Zwei-Plasmid Systems vor und nach der Expression zu sehen und in Spalten 3 und 4 des Ein-Plasmid System vor und nach der Expression, wobei der obere Pfeil die Bande der PuOM1 mit ca. 54 kDa markiert und der untere Pfeil die der IREd-Sr mit ca. 33 kDa^{91, 58}.

Das Expressionslevel der PuOM1 ist im Ein-Plasmid System im Vergleich zum Zwei-Plasmid System etwas höher, allerdings ist das Expressionslevel der IREd-Sr im Ein-Plasmid System deutlich geringer.

3.2.2.2 Optimierung der Reaktion

Die Reaktion wurde mit dem Zwei-Plasmid System zuerst in 50mM Tris-HCl pH7,5 und 50 mM Glucose für die NADPH-Regeneration mit einer OD₆₀₀ von 50 mit 10 mM Substrat **3** durchgeführt. Die Reaktion wurde in zwei unterschiedlich großen Gefäßen, 5 mL und 20 mL, durchgeführt um zu prüfen ob eine größere Oberfläche und damit ein höherer Sauerstoffeintrag für die Reaktion förderlich sind.

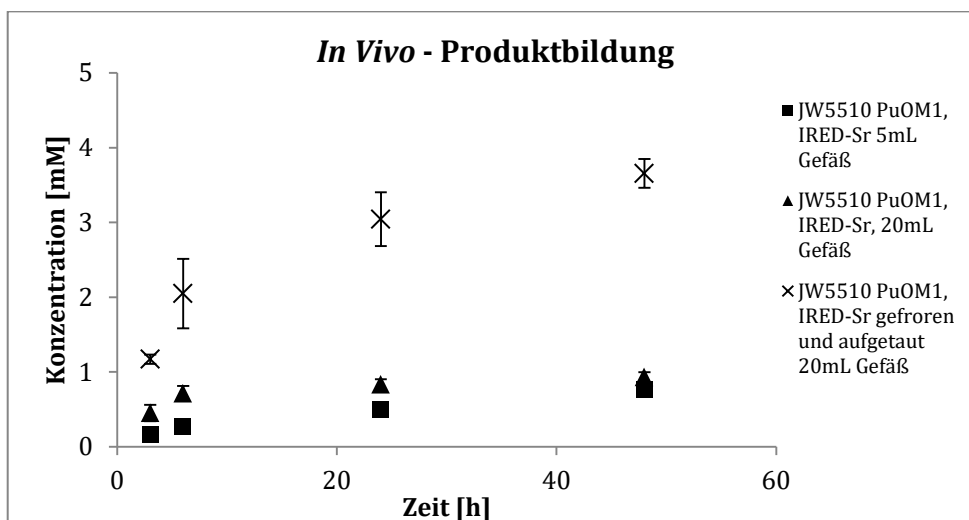


Abbildung 23: Produktbildung der *in vivo* Kaskadenreaktion im Zwei-Plasmid System. Zwei unterschiedlich große Gefäße, 5mL und 20mL, wurden getestet, wie auch gefrorene und danach wieder aufgetaute Zellen.

In Abbildung 23 ist zu sehen, dass das Volumen des Reaktionsgefäßes für die Anfangsgeschwindigkeit der Kaskade eine Rolle spielt. Hier ist die Anfangsgeschwindigkeit im 20 mL Reaktionsgefäß höher als im 5 mL Reaktionsgefäß bei gleichem Reaktionsvolumen. Allerdings wird in beiden Fällen nach 48h nahezu die gleiche Produktbildung (1 mM) erreicht. Eine deutliche Steigerung wurde in der Reaktion beobachtet, in der die gefrorenen und aufgetauten Zellen verwendet wurden, hiermit wurde eine Produktbildung von $3,6 \pm 0,19$ mM (36%) des 3-Methylpiperidin **13** erreicht. Weitere Optimierungen wurden bezüglich der Puffer- und Glukosekonzentration durchgeführt. Die Erhöhung der Pufferkonzentration von 50 mM auf 1M bewirkte eine deutliche Steigerung in der Produktbildung (Abbildung 24). Die höchste Produktbildung von $7,6 \pm 0,21$ mM (76%) wurde allerdings mit einer niedrigeren Glukosekonzentration von 10 mM erreicht. Gleichzeitig wurde in den Biotransformationen mit einer höheren Glukosekonzentration von 50 mM ein pH von 4,9 gemessen, in den Biotransformationen mit 10 mM Glukose ein pH von 6,9, obwohl der pH anfangs auf 7,5 eingestellt war.

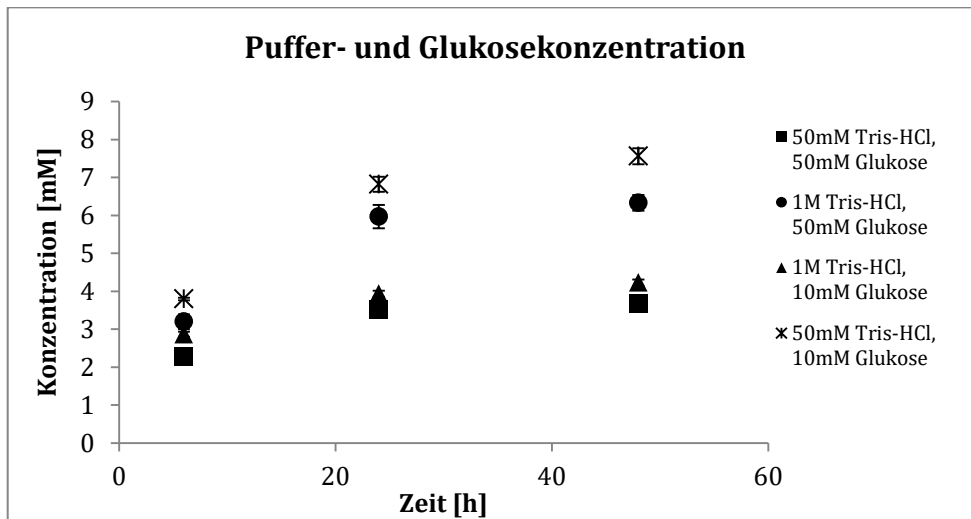


Abbildung 24: Produktbildung der *in vivo* Kaskade des Zwei-Plasmid Systems mit unterschiedlichen Puffer- und Glukosekonzentrationen mit eingefrorenen und aufgetauten Zellen. Die Erhöhung der Pufferkonzentration und die Reduzierung der Glukosekonzentration führten zu einer Steigerung der Produktbildung.

Die Biotransformationen mit Variierung der Puffer- und Glukosekonzentrationen wurden mit gefrorenen und aufgetauten Zellen durchgeführt, daher wurden die Auswirkungen der neuen Bedingungen (niedriger Glukosekonzentration von 10 mM) auch mit frischen Zellen durchgeführt. Dafür wurden die *E. coli* JW5510 pBAD18_HisPuOM1 pBAD33_IRED-Sr direkt nach der Expression der Enzyme in der Biotransformation eingesetzt. Diese Biotransformation mit OD₆₀₀ von 50 in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM Glukose erreichte eine noch höhere Produktbildung von 8,3 ± 0,27 mM. Nichtsdestotrotz wurde die Permeabilität weiter durch die Zugabe von DMSO oder EDTA zur Biotransformation in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Dies führte allerdings nicht zu einer weiteren Steigerung der Produktbildung (Tabelle 18).

Tabelle 18: Produktbildung der Enzymkaskade *in vivo* in *E. coli* JW5510 pBAD18_PuOM1 pBAD33_IRED-Sr ohne und mit Zugabe von Permeabilisierungsreagenz.

Permeabilisierungsreagenz	Produktbildung [mM]
-	8,3 ± 0,36
5% DMSO	5,3 ± 0,29
10% DMSO	4,8 ± 0,49
15% DMSO	4,0 ± 0,32
1mM EDTA	6,7 ± 0,10
3mM EDTA	5,7 ± 0,30
5mM EDTA	5,9 ± 0,26
10mM EDTA	7.3 ± 0.45

Zudem wurden das Ein-Plasmid System und das Zwei-Zell System getestet. Im Zwei-Zell System wurden unterschiedliche OD₆₀₀ von den Zellen kombiniert. Hierfür wurden die Zellen *E. coli* JW5510 pBAD18_HisPuOM1 und *E.coli* JW5510 pBAD33_IRED-Sr mit den OD₆₀₀ 25:25, 30:20 und 50:50 kombiniert (Tabelle 19).

Tabelle 19: *In vivo* Kaskade mit der separaten Expression in *E. coli* JW5510 pBAD18_HisPuOM1 und *E. coli* JW5510 pBAD33_IRED-Sr in unterschiedlichen OD₆₀₀ Kombinationen.

OD ₆₀₀ (<i>E. coli</i> JW5510 pBAD18_PuOM1: <i>E. coli</i> JW5510 pBAD33_IRED-Sr)	Produktbildung [mM]
25:25	1,25 ± 0,15
30:20	1,40 ± 0,27
50:50	0,74 ± 0,25

Erstaunlicherweise führte das Zwei-Zell System auch mit der höchsten OD₆₀₀ Kombination 50:50 zu der geringsten Produktbildung von 0,74 ± 0,25 mM, obwohl hier die Zelldichte deutlich höher liegt. Im Vergleich mit dem Zwei-Plasmid und Ein-Plasmid System führte das Zwei-Zell System zur geringsten Produktbildung von 1,4 ± 0,27 mM. Im Gegensatz dazu, zeigte das Ein-Plasmid System eine deutlich höhere Produktbildung von 7,4 ± 0,13 mM, die allerdings immer noch geringer ist, als die des Zwei-Plasmid Systems mit 8,3 ± 0,27 mM.

3.2.2.3 Integration der Gene ins Genom

Eine weitere Strategie war die Integration der Gene in das Genom von *E. coli*. Hierfür wurden drei Stämme konstruiert (M. Geier, B. Wiltsch, A. Glieder, acib Graz):

E. coli BL21 melAB::P(TAC)_IRED

E. coli BL21 P(BAD)_IRED

E. coli BL21 P(BAD)_HisPuOM1

Als erstes wurde versucht die insertierten Gene zu exprimieren, dafür wurden die Kulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C inkubiert und anschließend induziert, im Fall von *E. coli* BL21 melAB::P(TAC)_IRED mit 0,2 mM IPTG und bei den beiden anderen Stämmen mit 0,02% L-Arabinose. Die Expression wurde bei 25°C über Nacht durchgeführt und über SDS-PAGE kontrolliert.

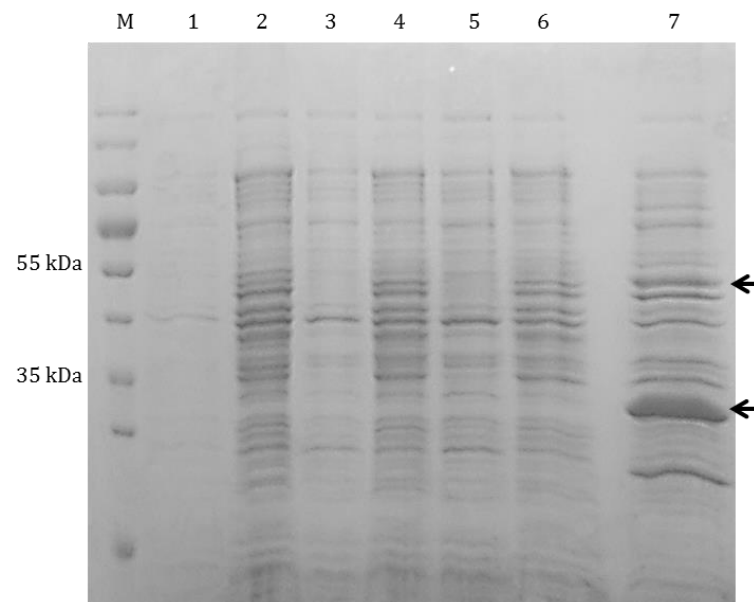


Abbildung 25: Die SDS-PAGE zeigt in Spalte 1, 3 und 5 die Proben vor der Induktion von *E. coli* BL21 melAB::P(TAC)_IRED, *E. coli* BL21 P(BAD)_IRED und *E. coli* BL21 P(BAD)_HisPuOM1 vor der Zugabe des Induktors. Spalten 2, 4 und 6 zeigen die entsprechenden Proben nach der Expression und in Spalte 7 ist die Probe der Expression von *E. coli* JW5510 pBAD18_HisPuOM1 pBAD33_IRED-Sr zu sehen. PuO-Re hat ein Molekulargewicht von ca. 54 kDa und die IRED-Sr von ca. 33 kDa^{91,58}.

Es ist keine Überexpression der IRED-Sr in den Stämmen *E. coli* BL21 melAB::P(TAC)_IRED und *E. coli* BL21 P(BAD)_IRED zu erkennen, zudem ist keine Überexpression der PuOM1 im Stamm *E. coli* BL21 P(BAD)_HisPuOM1 zu sehen. Daher wurde in einer weiteren Expression die Induktor Konzentrationen auf 0,5 mM, 1 mM and 1,5 mM IPTG und 0,2%, 1% and 2% L-Arabinose erhöht. Allerdings wurde trotz der Induktorsteigerung keine Überexpression der Enzyme

auf SDS-PAGE sichtbar. Trotzdem wurden die Integrationsstämme mit den entsprechenden Plasmiden kombiniert, exprimiert und in Biotransformationen getestet.

E. coli BL21 melAB::P(TAC)_IRED pBAD18_HisPuOM1

E. coli BL21 P(BAD)_IRED pBAD18_HisPuO1

E. coli BL21 P(BAD)_HisPuOM1 pBAD33_IRED-Sr

Die Expression wurde im Fall des ersten Stammes mit 0,5 mM IPTG und 0,2% L-Arabinose und im Fall der beiden weiteren Stämme nur mit 0,2% L-Arabinose induziert. In allen drei Biotransformationen konnte keine Produktbildung beobachtet werden, bei dem Stamm *E. coli* BL21 P(BAD)_IRED pBAD18_HisPuOM1 wurde allerdings eine leichte Abnahme des Substrates 1,5-Diamino-2-methylpentan beobachtet. Somit war eine geringe Überexpression der PuOM1 kodiert auf dem Plasmid möglich, obwohl *E. coli* BL21 nicht defizient im Arabinose Abbau ist. Allerdings ist in diesem Fall trotzdem die Expression der IRED-Sr zu niedrig um eine Produktbildung zu erreichen, das konnte auch bei den weiteren Stämmen mit integrierten Genen beobachtet werden.

3.2.2.4 *Upscaling der in vivo Kaskade von Sanofi*

Sanofi führte ein erstes Upscaling der *in vivo* Kaskade durch. Hierfür wurde anfangs die Expression der beiden Enzyme im zwei Plasmid System im 20L Fermenter durchgeführt mit anschließender Ernte der Zellen. Diese wurden dann im Reaktionspuffer gelöst und die Biotransformation wurde in einem 7L Fermenter mit einem Reaktionsvolumen von 3L über 48h durchgeführt. Abgesehen von dem Volumen wurde das Protokoll der Versuchsdurchführung des kleinen Maßstabes übernommen. Dabei wurde allerdings nur eine Produktbildung von 2,4 mM erreicht. Um dies zu optimieren führte Sanofi eine schrittweise Verbesserung der Versuchsdurchführung durch. Diese Verbesserung betraf die Expression der Enzyme, Eliminierung der Zentrifugation der Zellen um den Prozessablauf zu erleichtern. Zudem wurde noch ein DoE (Design of Experiment) bezüglich der Parameter pH, Temperatur, pO₂ und Substratkonzentration durchgeführt. Anschließend wurde eine maximale Produktbildung von 3-Methylpiperidin **13** von 78% mit einer Produktkonzentration von 27,3 mM (35 mM von 1,5-Diamino-2-

methylpentan **3** wurden als Substrat eingesetzt) in einem 20L Fermenter mit einem Reaktionsvolumen von 12 L erreicht.

4 Diskussion

Enzymkaskaden bildeten in den letzten Jahren für die Synthese von z.B. Pharmazeutika, Agrochemikalien oder deren Vorstufen ein immer größer werdendes Feld in der Biokatalyse⁶⁶. Sie verbinden die Vorteile der Biokatalyse, wie z.B. milde Reaktionsbedingungen ohne den Einsatz von Schutzgruppen, mit den Vorteilen der Kaskaden, bei denen die Reinigung der Intermediate entfällt⁶¹. Daher wurde in dieser Arbeit eine enzymatische Kaskade zur Synthese von *N*-Heterocyclen entwickelt. *N*-Heterocyclen spielen eine zentrale Rolle in allen Organismen, da sie Bausteine für DNA und Aminosäure sind, was zeigt, dass sie eine hohe biologische Aktivität besitzen¹. Daher ist es nicht verwunderlich, dass diese Strukturen in Pharmazeutika oder Agrochemikalien wieder gefunden werden und somit auch als Bausteine für deren Synthese dienen^{3,4}. Besonders die selektive Synthese von chiralen substituierten *N*-Heterocyclen stellt in der Chemie eine Herausforderung dar, daher bieten enantio-, stereo- und regioselektive Enzyme eine gute Alternative. Biokatalytische Kaskadenreaktionen stellen eine geeignete Möglichkeit dar um substituierte *N*-Heterocyclen selektiv durch die Kombination selektiver Enzyme zu synthetisieren. Für die biokatalytische Synthese von *N*-Heterocyclen aus Diaminen wurden in dieser Arbeit eine Kaskade bestehend aus zwei Enzymen, zum einen die Putrescinoxidase von *Rhodococcus erythropolis* (PuO-*Re*) und die (*R*)-selektive Iminreduktase von *Streptosporangium roseum* (IRED-*Sr*) oder die (*S*)-selektive Iminreduktase von *Paenibacillus elgii* (IRED-*Pe*), gewählt. Die Synthese von *N*-Heterocyclen aus Diaminen wurde gewählt, da diese wie z.B. Putrescin und Cadaverin fermentativ zugänglich sind oder mit Hilfe einer Aminosäuredecarboxylase ausgehend von Aminosäuren generiert werden können^{119,120}. Da das Substratspektrum der PuO-*Re* stark begrenzt war, wurde Enzymengineering durchgeführt um die Aktivität gegenüber länger-kettigen und verzweigten Diaminen im Vergleich zum natürlichen Substrat Putrescin (1,4-Diaminobutan) zu steigern. Zudem wurde durch eine Variante, generiert über ein rationales Design der aktiven Tasche, die Regioselektivität der PuO-*Re* für das Substrat 1,5-Diaminohexan **5** aufgeklärt. Des Weiteren wurde über das rationale Design die Position 206 in PuO-*Re* identifiziert, die eine Rolle bei der Unterscheidung der Enantiomere von **5** spielt. Diese Ergebnisse spiegelten sich

wieder in der Anwendung der Kaskade. Mittels der Kaskade aus PuO-*Re* und IRED war es dann möglich Pyrrolidin und Piperidine aus Diaminen zu generieren. Zudem war die Übertragung der *in vitro* Kaskade in ein *in vivo* System erfolgreich und wurde von Sanofi im 20L Fermenter durchgeführt.

4.1 Putrescinoxidase

Bedingt durch die geringe Aktivität gegenüber Diaminopentanderivaten im Vergleich zum natürlichen Substrat 1,4-Diaminobutan der PuO-*Re* wurden basierend auf den Ergebnissen von Dr. Philipp Scheller ein semi-rationales Design um den Hot-spot der Glutaminsäure 202 durchgeführt. Diese Position wurde durch das Screening einer error prone PCR (epPCR) Bibliothek entdeckt und befindet sich auf einem α -helikalen Loop an einem Kanal zur aktiven Tasche¹⁰⁹. In Tabelle 12 sind die kinetischen Daten der zwei identifizierten Varianten PuOM1 (L199I E202S I205L) und PuOM5 (D201S F204I) zu sehen, diese Ergebnisse werden in Kapitel 4.1.2 diskutiert.

Aufgrund der geringen katalytischen Aktivität mit $0,12 \text{ s}^{-1}$ für 1,5-Diaminohexan **5** von PuO-*Re* E202G wurde danach ein rationales Design der aktiven Tasche auf Basis der Variante PuO-*Re* E202G durchgeführt. Bei diesem Screening konnten zwei weitere Varianten PuOS1 (E202G L206I) und PuOS2 (E202G L206I und Deletion von D207) mit gesteigerter katalytischen Aktivität von $1,7 \text{ s}^{-1}$ gegenüber **5** identifiziert werden, die in Kapitel 4.1.3 diskutiert werden. Zudem führte ein rationales Design der Glutaminsäure 324, die als Ankerposition im aktiven Zentrum für das Substrat dient⁹¹, zur Aufklärung der Regioselektivität der PuO-*Re* (4.1.3).

4.1.1 Expression und Reinigung der PuO-*Re*

Die Expression der PuO-*Re* und die Reinigung mittels des *N*-terminalen His₆-tags wurden entwickelt und über SDS-PAGE überprüft. Mit dem PuO-*Re* WT wurden die kinetischen Parameter für das natürliche Substrat **1**, über die Bildung des Nebenproduktes Wasserstoffperoxid und eines kolorimetrischen Assays, bestimmt. Dabei lag der K_M Wert mit $170 \mu\text{M}$ für das natürlich Substrat deutlich über den bereits bekannten Wert von $15 \mu\text{M}$, wohingegen der k_{cat} in der gleichen

Größenordnung bestimmt wurde ($11,38 \text{ s}^{-1}$, Literatur $16,91 \text{ s}^{-1}$)¹⁰⁹. Der drastische Unterschied im K_M Wert zum literaturbekannten Wert ist durch eine unterschiedliche Präparation des gereinigten Enzyms zu erklären. Für diese Arbeit wurde die PuO-*Re* mit His₆-tag exprimiert und darüber auch gereinigt, dies war bisher nicht der Fall. Erstaunlicherweise scheint dies auf die katalytische Konstante nicht so große Auswirkungen zu haben. Der His₆-Tag befindet sich am *N*-Terminus und ist nicht in der Nähe der aktiven Tasche und hat somit keinen direkten Einfluss auf die Affinität gegenüber dem Substrat. Es wäre allerdings möglich, dass der His₆-Tag einen Einfluss auf das FAD und dessen Position hat und somit indirekt auf die Affinität gegenüber dem Substrat wirkt.

4.1.2 Semi-rationales Design

Die Aktivität des PuO-*Re* WT gegenüber Diaminopentanderivaten nimmt im Vergleich zum natürlichen Substrat **1** deutlich ab⁹¹ und um diese zu steigern, wurde ein semi-rationales Design entworfen. Grundlage für diese drei Bibliotheken, war die bereits identifizierte Position E202 auf dem α -helikalen Loop an einem Kanal zur aktiven Tasche¹⁰⁹. Daher wurden über CASTing¹¹⁷, die weiteren Positionen auf diesem α -helikalen Loop adressiert. Das Screening der Bibliothek A (Positionen: L199, E202, I205), der Bibliothek B (Positionen: V200, D203) und der Bibliothek C (Positionen: D201, F204) wurde in dieser Arbeit vervollständigt. Es konnten dabei sechs Varianten mit erhöhter Aktivität bestimmt werden, wobei die dreifach Variante PuOM1 (L199I E202S I205L) die höchste spezifische Aktivität für 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und PuOM5 (D201S F204I) für 1,4-Diaminobutan **1** aufwiesen. Daher wurden diese beiden Varianten gewählt um kinetische Parameter für die Substrate 1,4-Diaminobutan **1**, 1,5-Diaminopentan **2**, 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und 1,5-Diaminohexan **5** zu bestimmen. Im Vergleich zu literaturbekannter kinetischer Parameter für das natürliche Substrat **1** ist von PuO-*Re* zu erkennen, dass dieser von der katalytischen Konstante im gleichen Bereich liegt, der K_M Wert aber um eine 100er Potenz höher liegt ($0,17 \pm 0,01 \text{ mM}$, Literatur: $8,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$)⁹¹. Zum einen wurden die Literaturwerte in Reaktionen mit einem pH 8 gemessen, in dieser Arbeit wurde immer mit einem pH 7,5 gearbeitet. Zudem besteht noch ein weiterer Unterschied, PuO-*Re* wurde mit einem *N*-terminalen His₆-

Tag exprimiert um die Reinigung zu erleichtern. Bei den Literatur bekannten Werten, wurde PuO-*Re* ohne His₆-Tag verwendet⁹¹, daher könnte dieser Einfluss auf die Substrataffinität aufweisen. Mit beiden Varianten, PuOM1 und PuOM5, konnte im Vergleich zum WT für die Substrate **1**, **2** und **3** die katalytische Konstante k_{cat} gesteigert werden, allerdings zeigten Sie auch einen erhöhten K_M als der PuO-*Re*. Für das Substrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** zeigte der WT eine k_{cat} von $0,44 \text{ s}^{-1}$ und einen K_M von $0,07 \text{ mM}$. Der k_{cat} konnte mit der Variante PuOM1 auf $1,43 \text{ s}^{-1}$ gesteigert werden, allerdings stieg auch der K_M auf $0,27 \text{ mM}$. Somit wurde die Umsatzzahl erhöht, aber die Affinität für das Substrat nahm ab, wodurch auch keine Steigerung der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) erreicht wurde. Die Abnahme der Affinität für die Substrate liegt vermutlich an der Position der gewählten Aminosäurereste des semi-rationalen Designs. Diese Positionen liegen alle auf einem α -helikalen Loop an einem der sieben Tunnel zur aktiven Tasche (Abbildung 26). Veränderungen führten hier vermutlich zu einem Tunnel mit größerem Durchmesser, wodurch das Substrat leichter Zugang zur aktiven Tasche hat, aber nicht mehr so fest gebunden werden kann. Dies zeigt sich durch einen gesteigerten K_M Wert der Varianten PuOM1, PuOM5 und PuO-*Re* E202G für die Substrate **1**, **2**, **3** und **5** im Vergleich zur PuO-*Re*. Dabei besitzt die Variante PuOM1 für die Substrate **1** und **3** den höchsten K_M ($0,46 \text{ mM}$ und $0,27 \text{ mM}$) und somit geringste Affinität, wobei diese Variante für **3** die höchste katalytische Konstante mit $1,43 \text{ s}^{-1}$ zeigt. Allgemein zeigen die Identifikation des Hot-Spots E202 in einer vorherigen Arbeit¹⁰⁹ und die großen Auswirkungen des Engineering an diesem Tunnel, dass dies der Substratkanal sein könnte (Abbildung 26).

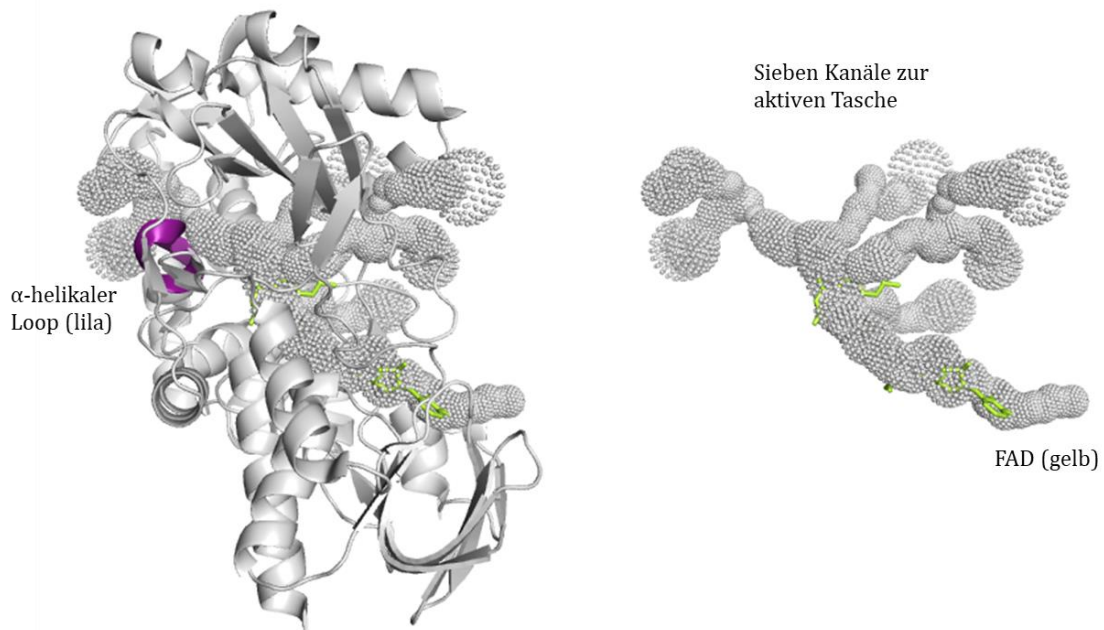


Abbildung 26: PuO-Re (pdb:2yg4) mit den sieben Kanälen zur aktiven Tasche, die mittels grauer Punkte dargestellt sind. Ein Kanal ist für das FAD (gelb) und ein Kanal verläuft an dem α -helikalen Loop (lila), der mit dem semi-rationalen Design adressiert wurde. Die Kanäle wurden mit dem CAVER plugin identifiziert¹²¹. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphic System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

Allgemein hat sich durch das semi-rationale Design des α -helikalen Loops der hydrophobe Charakter der Aminosäuren seitlich am Rand des gewählten Bereichs nicht verändert und die sauren Aminosäuren in der Mitte wurden durch eine kleinere polare Aminosäure, Serin, getauscht, um den Kanal zu erweitern (Tabelle 20). An dieser Position ist in der Monoaminoxidase von *Aspergillus niger* (MAO-N) ebenfalls ein Kanal zu finden, der als möglicher Substratkanal vorgeschlagen wurde¹²². In diesem Fall ist der Kanal aber, entsprechend der Monoaminsubstrate, komplett hydrophob. Die korrespondierende Aminosäure zu E202 ist in der MAO-N die hydrophobe Aminosäure Methionin an der Stelle 242, die auch als Teil des Substratkanals beschrieben ist¹²².

Tabelle 20: Positionen des Semi-rationalen Designs des α -helikalen Loops am Tunnel zur aktiven Tasche der PuO-Re mit den sauren Aminosäuren 201, 202 und 203 in der Mitte des Loops. Die hydrophoben Aminosäuren wurden bei den besten Varianten ebenfalls nur mit hydrophoben Aminosäuren ausgetauscht.

	199	200	201	202	203	204	205
WT	L	V	D	E	D	F	L
PuOM1	I			S			L
PuOM5			S			I	

Für das Substrat 1,5-Diaminohexan **5** hatten beide Varianten PuOM1 und PuOM5 keine erhöhten katalytischen Konstanten, obwohl das Substrat **5** strukturell sehr ähnlich zu **3** ist und die Methylgruppe nur um eine Position verschoben ist. Dies führt aber schon zu drastisch unterschiedlichen Aktivitäten, die vermutlich durch eine stärkere sterische Hinderung der Aminogruppe hervorgerufen wird. Entweder kann die Aminogruppe nicht mehr so gut als Anker dienen oder der Angriff des FAD ist gehindert. Für das Substrat **5** war die beste Variante immer noch PuO-*Re* E202G, also mit einer kleinen hydrophoben Aminosäure. Diese Position wurde von Dr. Philipp Scheller durch eine gerichtete Evolution mit Screening einer epPCR Bibliothek entdeckt und diente als Anhaltspunkt für das semi-rationale Design. Um die Aktivität für **5** zu steigern, wurde ein weiteres rationales Design der aktiven Tasche auf Basis von PuO-*Re* E202G durchgeführt.

4.1.3 Rationales Design der aktiven Tasche

Das rationale Design der aktiven Tasche wurde über zwei Strategien durchgeführt. Die erste Strategie beinhaltete die Adressierung der Ankerposition Glutaminsäure 324 in PuOM1 (L199I E202S I205L), um die Regioselektivität zu klären. Die zweite Strategie zielte darauf ab, die Aktivität gegenüber 1,5-Diaminohexan **5** zu steigern, indem eine Sättigungsmutagenese der Aminosäuren in der aktiven Tasche von PuO-*Re* E202G durchgeführt wurde.

*4.1.3.1 Rationales Design der Ankerposition in PuO-*Re**

Im ersten Teil des rationalen Designs der aktiven Tasche, wurde die Glutaminsäure 324 gewählt, da diese als Ankerposition für eine der Aminogruppe der Substrate beschrieben ist und daher die PuO-*Re* nur Diamine oder Polyamine, aber keine Monoamine, als Substrate akzeptiert⁹¹. Die Glutaminsäure 324 wurde gegen Asparaginsäure, Tyrosin, Alanin und Leucin getauscht. Die Strategie hinter diesen Mutationen war bei der Asparaginsäure eine kleinere Aminosäure mit gleichen Eigenschaften an dieser Stelle zu positionieren um einen längeren Abstand zwischen dem Aminosäurerest 324 und dem FAD in dem das Substrat liegt zu generieren. Dadurch sollte die Aktivität gegenüber länger-kettigen Substraten, durch die Generierung einer längeren aktiven Tasche, gesteigert werden. Dies war allerdings

nicht erfolgreich, da die Variante PuOM1 E324D keine höhere Aktivität gegenüber den Substraten **2**, **3** und **5** als die Ausgangsvariante PuOM1 aufwies. Durch den Austausch wurde somit wahrscheinlich die Carboxylgruppe anders positioniert, wodurch diese nicht mehr als Anker dienen konnte. Die Strategie hinter dem Austausch von Glutaminsäure 324 zu Tyrosin, Alanin und Leucin, war die Generierung einer PuO-Re, die Monoamine akzeptiert durch die Entfernung der Ankerposition. Dabei sollte der saure Rest der Glutaminsäure mit einem kleinen und einem großen hydrophoben Rest, Alanin oder Leucin, oder dem Tyrosinrest ausgetauscht werden. Tyrosin wurde für diese Stelle gewählt, da diese in der menschlichen Monoamine Oxidase B (MAO-B), die nur Monoamine als Substrate akzeptiert, an der korrespondierenden Stelle zu E324 liegt (Abbildung 27)⁹¹. Die Akzeptanz des Monoamins Pentylamin **7** wurde mit der vierfach Variante PuOM1 E324Y erreicht (1,2 mU/mg), wohingegen der Austausch mit hydrophoben Aminosäuren nicht das gewünschte Ergebnis zeigte.

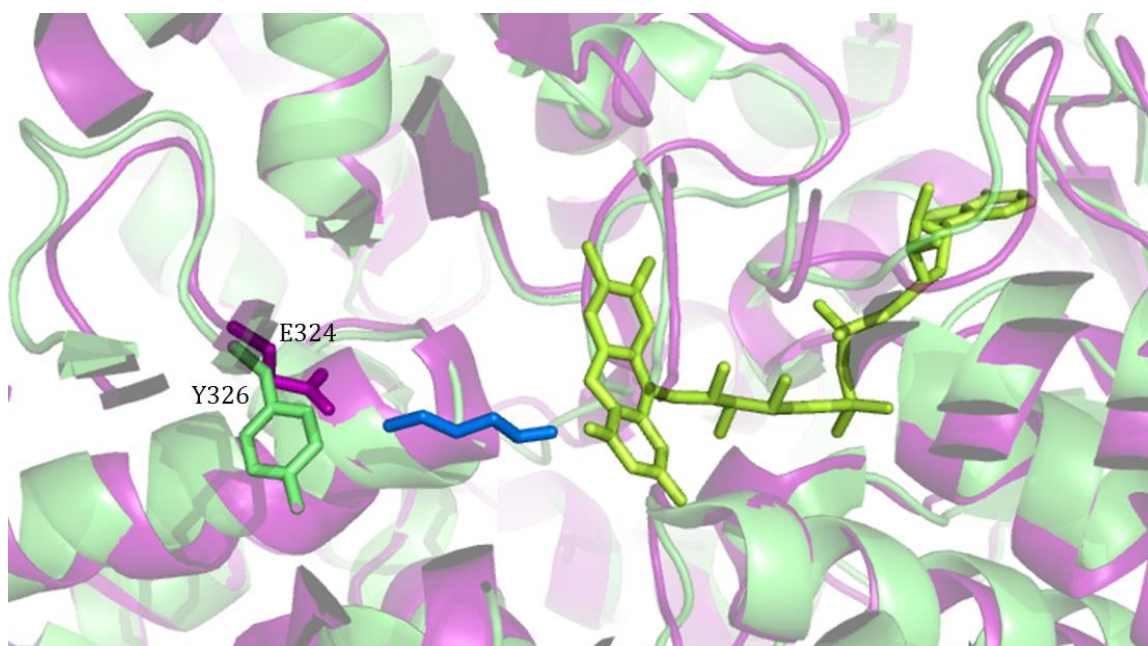


Abbildung 27: Alignment von PuO-Re (lila, pdb: 2yg4) und der menschlichen MAO-B (grün, pdb: 1GOS). Das FAD in gelb dargestellt und 1,4-Diaminobutan **1** in blau. In der aktiven Tasche erkennt man deutlich, dass bei PuO-Re die Glutaminsäure an Position 324 das 1,4-Diaminobutan **1** positioniert. An dieser Position in MAO-B findet man ein Tyrosin, das diese Aufgabe nicht übernehmen kann⁹¹. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphic System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

Mit dieser aktiven Variante PuOM1 E324Y konnte nun die Regioselektivität der PuO-Re über Monoaminanaloga untersucht werden. Dafür wurden die Substrate 2-

Aminoheptan **8** und 5-Methyl-1-hexanamin **9** ausgesucht, da beide die Struktur von 1,5-Diaminohexan **5** aufweisen, aber nur eine Aminogruppe besitzen (Abbildung 28).

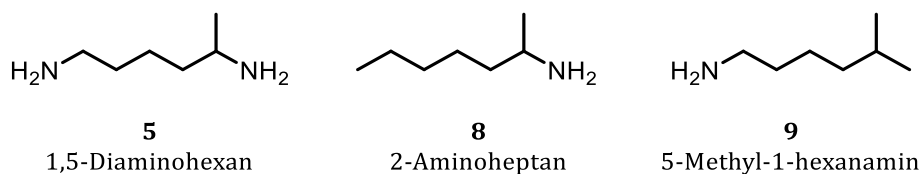


Abbildung 28: Die beiden Monoamine 5-Methyl-1-hexanamin **9** und 2-Aminoheptan **8** die für den Regioselektivitätstest der PuOM1 E324Y dienten, da sie die gleiche Struktur wie 1,5-Diaminohexan **5** aufweisen.

Die Variante PuOM1 E324Y zeigte nur Aktivität gegenüber 5-Methyl-1-hexanamin **9**, mit der sterisch weniger gehinderten Aminogruppe. Das heißt, dass PuO-Re die ω -Aminogruppe bevorzugt.

4.1.3.2 Sättigungsmutagenese von Aminosäuren der aktiven Tasche von PuO-Re

Der zweite Teil des rationalen Designs der aktiven Tasche befasste sich mit den Aminosäureresten im Umkreis von 5Å um das Substrat. Daher wurde an den Positionen W60, G172, M173, L206 und H342 eine Sättigungsmutagenese durchgeführt. Die Reste Y395 und H342 wurden nicht mit einbezogen, da diese den aromatischen Käfig bilden und somit an der Positionierung des Substrats beteiligt sind und die Nukleophilie der Aminogruppe erhöhen¹¹⁸. Die Sättigungsmutagenese führte nur an Position 206 zu positiven Varianten, die eine höhere Aktivität gegenüber 1,5-Diaminohexan **5** aufweisen als das Template dieser Mutationsstudie PuO-Re E202G. Allerdings zeigte eine der positiven Varianten nicht nur ein Aminosäureaustausch (PuOS1 E202G L206I) sondern auch in PuOS2 E202G L206S eine Deletion von D207 (Abbildung 29). Die beiden Varianten zeigten in ihren kinetischen Daten wie bereits die Varianten des semi-rationalen Designs einen erhöhte katalytische Konstante k_{cat} , allerdings auch einen höheren K_M . Somit wurde auch für diese Varianten keine Steigerung der katalytischen Effizienz erreicht. Die geringere Affinität lässt sich bei der Variante PuOS2 auch durch eine Erweiterung der aktiven Tasche bzw. des Tunnels zur aktiven Tasche erklären, da die Position 207, die in PuOS2 deletiert ist, direkt neben dem α -helikalen Loop liegt, bei dem das semi-rationale Design ebenfalls zu einer geringeren Affinität gegenüber allen

getesteten Substraten gezeigt hat. Der α -helikalen Loop könnte durch die Deletion verschoben sein und somit auch zu einer Erweiterung des Substratkanals führen.

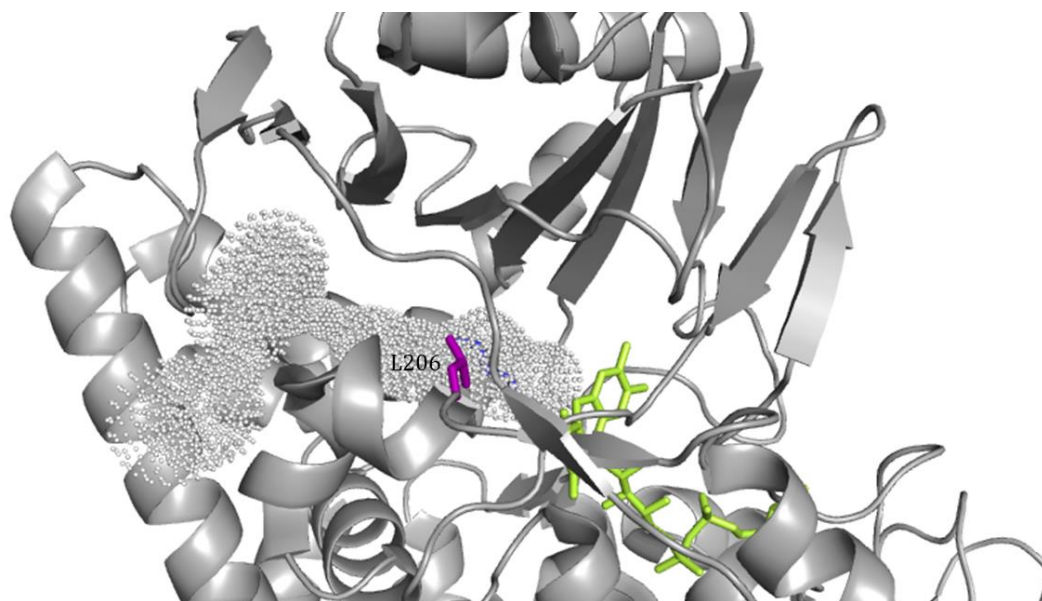


Abbildung 29: PuO-Re (pdb:2yg4) dargestellt in grau mit dem potentiellen Substratkanal in grauen Punkten, dem FAD in gelb und dem 1,4-Diaminobutan in blau. Die Aminosäure des aktiven Zentrums L206, die sich direkt neben dem α -helikalen Loop befindet, ist in lila dargestellt. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphic System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.

Insgesamt konnte durch das Engineering der Putrescinoxidase die katalytische Konstante gegenüber Diaminopentanderivaten gesteigert werden, allerdings sollten weitere Varianten auch eine bessere katalytische Effizienz zeigen. Durch die gesteigerten katalytischen Konstanten ist es sinnvoll diese PuO-Re Varianten in der Kaskade in Kombination mit der (*R*)-selektiven oder (*S*)-selektiven Iminreduktase für die Synthese von Piperidinen einzusetzen. Zudem konnte über das Engineering der Ankerposition Glutaminsäure 324 die Regioselektivität der PuO-Re bezüglich der ω -Aminogruppe in **5** identifiziert werden.

4.2 Enzymkaskade

Die evolvierten PuO-*Re* Varianten wurden in der Enzymkaskade in Kombination mit der (*R*)-selektiven Iminreduktase von *Streptosporangium roseum* oder mit der (*S*)-selektiven Iminreduktase von *Paenibacillus elgii* eingesetzt. Die neuen PuO-*Re* Varianten bildeten durch ihre höhere spezifische Aktivität gegenüber Diaminopentanderivaten eine Möglichkeit innerhalb der Kaskade Piperidine zu generieren. Die Kaskaden wurden zuerst *in vitro* umgesetzt (4.2.1) und anschließend wurde die Kaskade exemplarisch mit PuOM1 und der IRED-*Sr* in einem *in vivo* System angewendet (4.2.2).

4.2.1 *In vitro* Kaskade

Zuerst wurden die besten Reaktionsbedingungen für das Modellsubstrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** mit der dafür am besten geeigneten gereinigten dreifach Variante PuOM1 (L199I E202S I205L), die anfangs die höchste katalytische Konstante für **3** gezeigt hat, in Kombination mit der gereinigten IRED-*Sr* gesucht. 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** wurde als Modellsubstrat gewählt, da es innerhalb der Kaskade zu dem substituierten Produkt 3-Methylpiperidin **13** führt und käuflich erwerblich ist. Beide gereinigten Enzyme wurden mit einer Katalase und einem NADPH Regenerationssystem kombiniert. Die Katalase soll in der Reaktion dafür sorgen, dass das von der PuO-*Re* produzierte Wasserstoffperoxid wieder abgebaut wird. Um die besten Reaktionsbedingungen zu finden, wurden die Parameter Temperatur, pH und Verhältnis PuO:IRED untersucht, da die optimale Reaktionstemperatur der IRED bei 25°C und der PuO-*Re* bei 30°C, der optimale pH der IRED bei 7 und der PuO-*Re* bei 8 liegen^{58,91}. Zudem spielt das Verhältnis von PuO:IRED eine Rolle in der Reaktion, da die Aktivitäten beider Enzyme ausgewogen sein muss, damit es nicht zu einer Ansammlung der Intermediate kommt. Die Variation der Parameter Temperatur von 25°C und 30°C, des pH von 7, 7,5 und 8 und das Verhältnis PuO:IRED von 1:1, 1:2 und 2:1 zeigte keine bedeutende Änderung der Produktbildung über die Zeit. Allerdings konnte im Fall der Temperatur von 25°C eine etwas höhere Anfangsgeschwindigkeit beobachtet werden, da hier die Umsetzung des Imins durch die Iminreduktase schneller

erfolgte. Die Variation des pH Wertes führte zu keiner Änderung in der Produktbildung, daher wurde die Mitte mit pH 7,5 für weitere Reaktionen verwendet. Die Variation zwischen den Verhältnis PuO:IRED führte im Fall von PuO:IRED 1:2 zu einer etwas geringeren Produktbildung und die Anfangsgeschwindigkeit war bei einem Verhältnis von 1:1 am höchsten. Daher wurden die weiteren Versuche bei einer Temperatur von 25°C bei einem pH von 7,5 und mit einem Verhältnis PuO:IRED von 1:1 durchgeführt.

Mit diesen Reaktionsbedingungen wurden dann mit allen PuO-*Re* Varianten und der IRED-*Sr* mit den Substraten 1,4-Diaminobutan **1**, 1,5-Diaminopentan **2**, 1,5-Diamino-2-methylpentan **3**, Diethylenetriamin **4**, 1,5-Diaminohexan **5** die Reaktionen durchgeführt. Bei der Umsetzung des natürlichen Substrates 1,4-Diaminobutan wurde mit allen getesteten PuO-*Re* Varianten erfolgreich Pyrrolidin **11** gebildet. Allerdings wurde hier nur eine geringe Produktbildung von $31,0 \pm 3,0$ % mit PuO-*Re* E202G erreicht mit geringeren Bildungen von **11** mit den Varianten PuO-*Re* WT ($23,0 \pm 3,2$ %), PuOM1 ($23,3 \pm 3,6$ %) und PuOM5 ($24,1 \pm 2,7$ %). In diesem Fall, sind die Umsatzzahlen von PuO-*Re* und *R*-IRED-*Sr* zu unterschiedlich. PuO-*Re* zeigt einen k_{cat} des WT von $11,38 \pm 0,33$ s⁻¹ für **1** und die *R*-IRED-*Sr* für ein 5-gliedriges Imin nur $0,96 \pm 0,02$ s⁻¹ (2-Methylpyrrolin)⁵⁷, dadurch kommt es möglicherweise zu einer Anhäufung des Aminoaldehyds oder Iminintermediats, was wiederum zu einer Nebenproduktbildung oder zur Substratinhibition der IRED führen kann⁵⁷. Eine Nebenproduktbildung findet statt, wenn die Aminoaldehyde keine intramolekularen Schiff-Basen sondern intermolekulare Schiff-Basen und somit ein Polymer bilden können. Zudem kann das Imin nach der Bildung auch wieder hydrolysieren. Die Produktbildung von Piperidin **12** aus **2** zeigte mit allen PuO-*Re* Varianten eine Produktbildung über 80% und war damit deutlich höher als von **11**. Da die Aktivität der IRED-*Sr* für 6-gliedrigen cyclischen Imine mit $10,73 \pm 0,14$ s⁻¹ (2-Methylpiperidein)⁵⁸ deutlich höher liegt als bei 5-gliedrigen cyclischen Iminen und damit auch höher ist als der k_{cat} von PuO-*Re* für **2** (PuOM1 für **2** $3,74 \pm 0,22$ s⁻¹), kommt es nicht zu einem Überschuss des Aminoaldehyds oder Iminintermediats. Die Produktbildung von 3-Methylpiperidin **13** zeigte einen größeren Unterschied zwischen der Anwendung der einzelnen PuO-*Re* Varianten. Hier wurde die niedrigste Produktbildung von **13** mit PuO-*Re* WT von $64,6 \pm 1,8$ % und die höchste mit PuOM1 mit $90,4 \pm 4,7$ % erreicht. In diesem Fall ist die Produktbildung stark

vom k_{cat} der PuO-*Re* Varianten abhängig, da PuO-*Re* WT für **3** mit $0,44 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ den niedrigsten k_{cat} und PuOM1 mit $1,43 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ den höchsten k_{cat} aufweisen. Auch hier liegen die katalytischen Konstanten für **3** deutlich unter der katalytischen Konstante der IRED-*Sr* für 6-gliedrige cyclische Imine⁵⁸, wodurch das Iminintermediat sofort umgesetzt werden kann und die Produktbildung nicht von der Iminreduktase abhängt. Die Produktbildung von 6-gliedrigen cyclischen Aminen mit der Enzymkaskade bestehend aus CAR, ω -TA und IRED ausgehend von Ketosäuren resultierte für mehrere Beispiele ebenso in einer Produktbildung von über 90%⁷⁴. Mit dieser Kaskade wurde ebenfalls gezeigt, dass die Bildung von Pyrrolidinen geringer ausfiel als von Piperidinen, obwohl das entsprechende Imin zu >98% gebildet wurde⁷⁴. Das zeigt zusätzlich, dass die geringere Produktbildung im Fall von Pyrrolidin von der geringeren Aktivität der IRED für Pyrrolin abhängt. Mit der Kaskade war es nicht möglich Piperazin **14** aus **4** zu generieren, mit allen PuO-*Re* Varianten konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Es wurde allerdings Aktivität der PuO-*Re* gegenüber **4** nachgewiesen, entweder war diese zu gering oder die IRED-*Sr* zeigt für dieses Iminintermediat keine Aktivität. Die Produktbildung von **15** fiel am geringsten aus da auch hier die Umsatzzahl von PuO-*Re* am geringsten war. Dabei konnte mit PuO-*Re* E203G mit $19,8 \pm 1,1 \%$ an **15** die höchste Produktbildung gezeigt werden. Hier zeigt sich also die gleiche Abhängigkeit der Produktbildung vom k_{cat} der PuO-*Re* wie bei der Produktbildung von **13**, da es auch hier durch die hohe katalytische Konstante von IRED-*Sr* für das Iminintermediat zu keiner Anhäufung des Zwischenproduktes kommt.

Des Weiteren wurde die Kaskade mit dem Substraten **3** und **5** zudem mit den Varianten PuOS1 und PuOS2 aus dem rationalen Design in Kombination mit der IRED-*Sr* durchgeführt. Mit beiden Varianten innerhalb der Kaskade konnten für die Bildung von 2-Methylpiperidin **15** aus **5** deutlich höhere Produktbildungen erreicht werden, da diese beiden Varianten durch das Engineering der aktiven Tasche eine deutlich höhere katalytische Konstante mit $0,33 \text{ s}^{-1}$ (PuOS1) und $0,89 \text{ s}^{-1}$ (PuOS2) im Vergleich zur bisherigen besten Variante PuO-*Re* E202G mit $0,12 \text{ s}^{-1}$ aufweisen. Allerdings wurde mit der Variante PuOS2 innerhalb der Kaskade, die eine höhere katalytische Konstante aufweist als PuOS1, nicht die Produktbildung der PuOS1 Kaskade von 61,9 % erreicht. Hier ist dann der K_M Wert der PuOS2 der limitierende Faktor, da er mit 1,7 mM über doppelt so hoch ist wie von PuOS1.

Erstaunlicherweise wurde mit der Variante PuOS1 innerhalb der Kaskade auch eine höhere Produktbildung von 3-Methylpiperidin **13** (>99%) als mit der PuOM1 Kaskade erreicht. Somit hat auch die Position 206 einen Einfluss auf die Aktivität gegenüber 1,5-Diamino-2-methylpentan **3**, da diese Position direkt am α -helikalen Loop liegt, der mit dem semi-rationalen Design adressiert wurde.

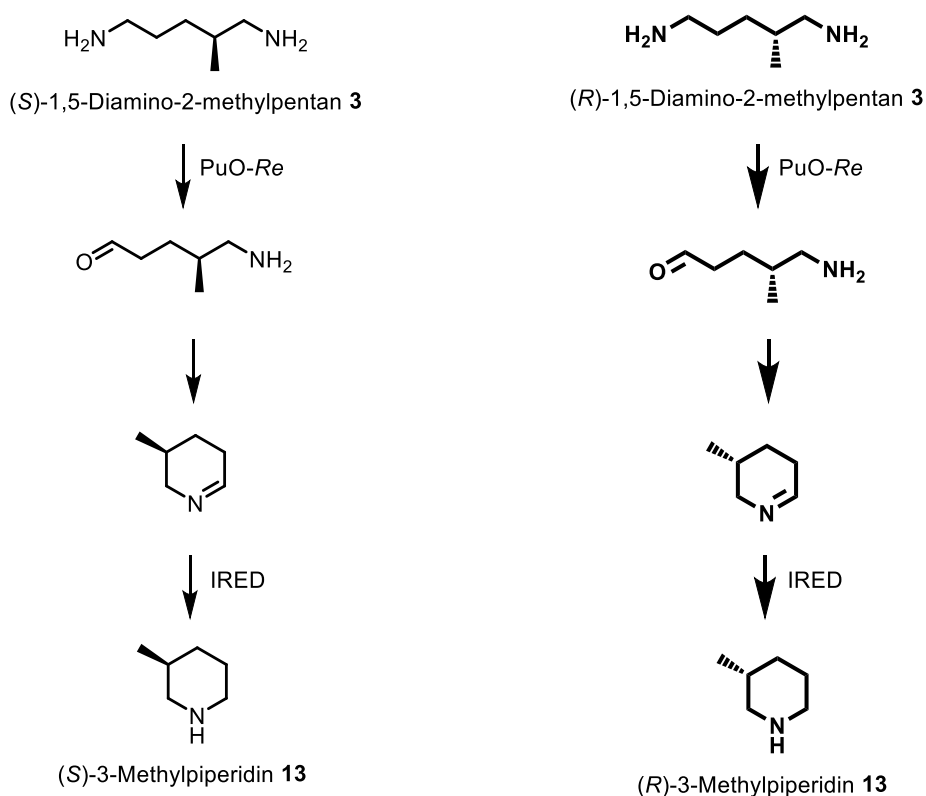
Zusammenfassend kann man sagen, dass die Produktbildung von **11**, also 5-gliedrigen cyclischen Aminen, von der IRED-Sr limitiert wird, da hier die katalytische Konstante k_{cat} geringer ist als die der PuO-Re für **1** und es somit zur Ansammlung des Zwischenproduktes kommen kann. Somit ist die Produktbildung in diesem Fall gering, da eine Substratinhibierung der IRED durch das Iminintermediat möglich ist oder es zur Nebenproduktbildung kommen kann⁵⁸. Dies ist nicht der Fall für 6-gliedrige cyclische Amine, da hier die IRED-Sr eine deutlich höhere katalytische Konstante k_{cat} aufweist als die PuO-Re für die entsprechenden Diamine.

Die Enantiomerenüberschüsse (*ee*) wurden über der Zeit von 3-Methylpiperidin **13** und 2-Methylpiperidin **15** beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass ein *ee* des (*R*)-**13** gebildet wird, dieser aber über der Zeit abnimmt und im Fall vom Einsatz der PuOM1 zur Bildung eines Racemats führt. Wie bereits in Kapitel 4.1.3.1 diskutiert, oxidiert die PuO-Re bei 1,5-Diaminohexan **5** die weniger sterisch gehinderte Aminogruppe. Wenn sich diese Regel der Regioselektivität auf das Substrat **3** übertragen lässt und dieses als Racemat eingesetzt wird, werden dann wie in Abbildung 30 a) zu sehen ist, zwei mögliche Iminintermediate, das (*R*)-Imin und das (*S*)-Imin, gebildet. Bei diesem Substrat kommt es bei der Bildung der Schiff-Base nicht zu einer Bildung eines prochiralen Imins. Die Iminreduktase hat auf den gebildeten Enantiomerenüberschuss somit keinen Einfluss, weil kein prochirales Imin vorliegt. Das wurde auch gezeigt, durch den Einsatz der IRED-Pe, diese ist (*S*)-selektiv führte aber innerhalb der Kaskade genau wie die (*R*)-selektive IRED-Sr zur Bildung von (*R*)-**13** (Tabelle 15). Somit ist die Bildung eines Enantiomerenüberschusses im Falle des Substrates **3** von der PuO-Re abhängig, da aber innerhalb der Kaskade das chirale Zentrum nicht erzeugt wird, kann die PuO-Re zwischen den zwei Enantiomeren von **3** unterscheiden. Da Anfangs ein Überschuss von (*R*)-**13** gebildet wird, wird (*R*)-**3** von PuO-Re WT, PuOM1, PuOM5 und PuO-Re E202G schneller umgesetzt. Erst als ein Mangel an (*R*)-**3** entsteht, wird

auch langsam (*S*)-**3** zum Aminoketon umgesetzt, wodurch auch die Konzentration an (*S*)-**13** über der Zeit steigt und somit der *ee* sinkt.

Bei der Bildung von **15** PuO-*Re* WT, PuOM1, PuOM5 und PuO-*Re* E202G ist aufgefallen, dass das (*S*)-Enantiomer gebildet wird, obwohl die (*R*)-selektive IRED-*Sr* eingesetzt wurde. Auch bei der Kombination der PuOs mit der (*S*)-selektiven IRED-*Pe* wurde ein *ee* von (*S*)-**15** gebildet. Das spiegelt die Ergebnisse von Kapitel 4.1.3.1 wider, indem gezeigt wurde, dass PuO-*Re* die sterisch weniger gehinderte Aminogruppe oxidiert. Da bei Substrat **5** die ω -Aminogruppe oxidiert wird, kommt es bei der Bildung der Schiff-Base nicht zur Bildung eines prochiralen Imins (Abbildung 30 b) Fall 1), wie es im Falle der Oxidation der sterisch gehinderten Aminogruppe wäre (Abbildung 30 b) Fall 2). Dadurch kann wiederum die eingesetzte Iminreduktase keinen Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss des Produktes zeigen, weil durch die Reduktion kein neues chirales Zentrum entsteht, sondern es noch vom Substrat ausgehend besteht. Auch bei diesem Substrat zeigen die PuO-*Re* WT, PuOM1, PuOM5 und PuO-*Re* E202G eine Präferenz für das (*S*)-Enantiomer von **5**, wodurch sich der Enantiomerenüberschuss von (*S*)-**15** erklären lässt.

a) Umsetzung von 1,5-Diamino-2-methylpentan **3**



b) Umsetzung von 1,5-Diaminohexan **5**

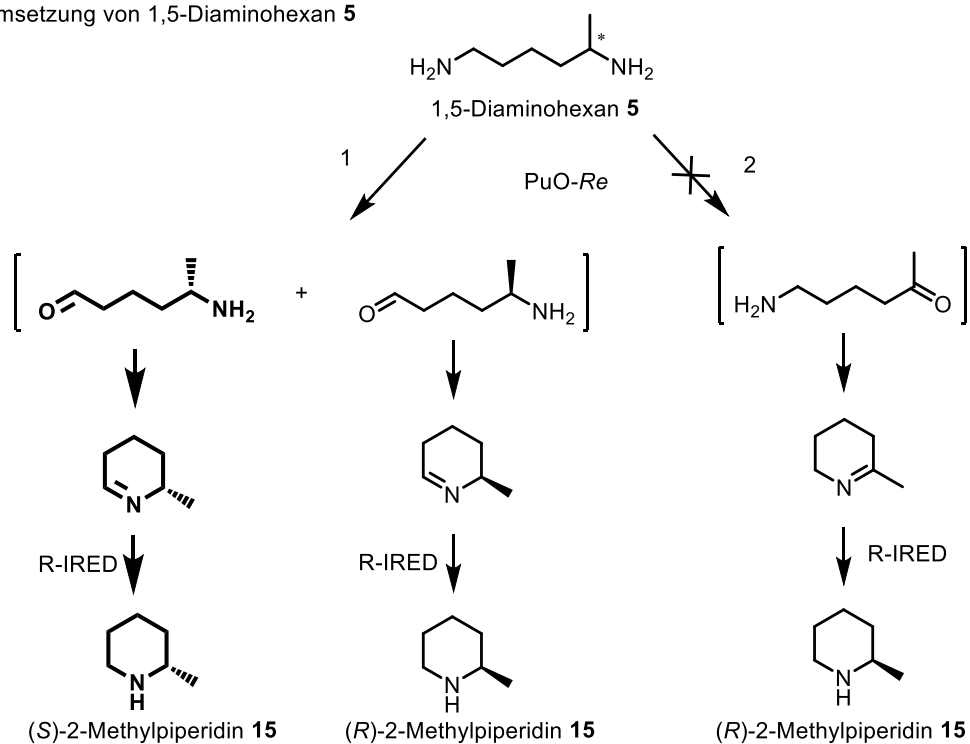


Abbildung 30: Ablauf der Kaskadenreaktion PuO-Re und IRED für die Substrate **3** und **5** mit den Zwischenprodukten. a) Für das Substrat **3** sind die Zwischenprodukte dargestellt, die im Falle einer Regioselektivität der Oxidation der ω -Aminogruppe entstehen. b) Im Falle des Substrates **5** konnte die Selektivität für die ω -Aminogruppe mittels der Kaskadenreaktion bestätigt werden, was in Fall 1 dargestellt ist.

Über das rationale Design innerhalb der aktiven Tasche, wurden die Varianten PuOS1 und PuOS2 identifiziert. Beide PuO-*Re* Varianten wurden auch in der Kaskade in Kombination mit der *R*-IRED-*Sr* getestet für die Umsetzung von **3** und **5**. Erstaunlicherweise zeigte sich bei der Umsetzung von **5** bei der Produktbildung ein *ee* des (*R*)-Enantiomers im Unterschied zum PuO-*Re* WT und den drei weiteren PuO-*Re* Varianten. Dies könnte zum einen bedeuten, dass sich die Regioselektivität der beiden Varianten durch die Mutationen geändert hat, wodurch das prochirale Imin entstehen würde, oder die Regioselektivität wurde beibehalten und eines der Substratenantiomere wird bevorzugt umgesetzt. Um die Änderung der Regioselektivität auszuschließen, wurde die Kaskadenreaktion mit der (*S*)-selektiven IRED-*Pe* durchgeführt, wodurch im Falle der Bildung eines prochiralen Imins, (*S*)-**15** gebildet werden müsste. Mit PuOS1 entstand das Racemat von 2-Methylpiperidine, mit PuOS2 wurde weiterhin ein Enantiomerenüberschuss von (*R*)-**15** von detektiert. Dadurch kann man ausschließen, dass es zu einer Änderung der Regioselektivität kam, da es in diesem Falle zu einem Switch des Enantiomerenüberschusses hätte kommen müssen.

Allerdings ist erstaunlich, dass bei der Bildung von **13** mit PuOS1 eine Produktbildung von >99% mit einem *ee* von 29% erreicht wird. Da hier in diesem Fall kein prochirales Imin entsteht, sollte bei einer quantitativen 100%igen Produktbildung ein Racemat entstehen. Die Bildung eines Enantiomerenüberschusses kann nur erklärt werden, indem bei der Variante PuOS1 für das Substrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** keine strikte Regioselektivität besteht. Durch die Oxidation der sterisch gehinderten Aminogruppe in **3** wäre die Bildung eines Enamins möglich, wodurch die Enantiomere des Iminintermediats ineinander überführt werden können (Abbildung 31). Die Bildung eines Enantiomerenüberschusses aus einem Racemat von **3** mit der PuO-*Re* und *R*-IRED-*Sr* ist also nur möglich, wenn eine Racemisierung über das Enamin stattfindet, da kein prochirales Iminintermediat gebildet wird (Abbildung 30 b) und Abbildung 31). Somit ist es nicht möglich die Regioselektivität, die von der PuO-*Re* für das Substrat **5** nachgewiesen wurde, bedingungslos auf Substrat **3** zu übertragen. Bei 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** ist die sterische Hinderung der Methylgruppe nicht gleichzusetzen mit der sterischen Hinderung in **5**, da diese weiter von der Aminogruppe entfernt ist.

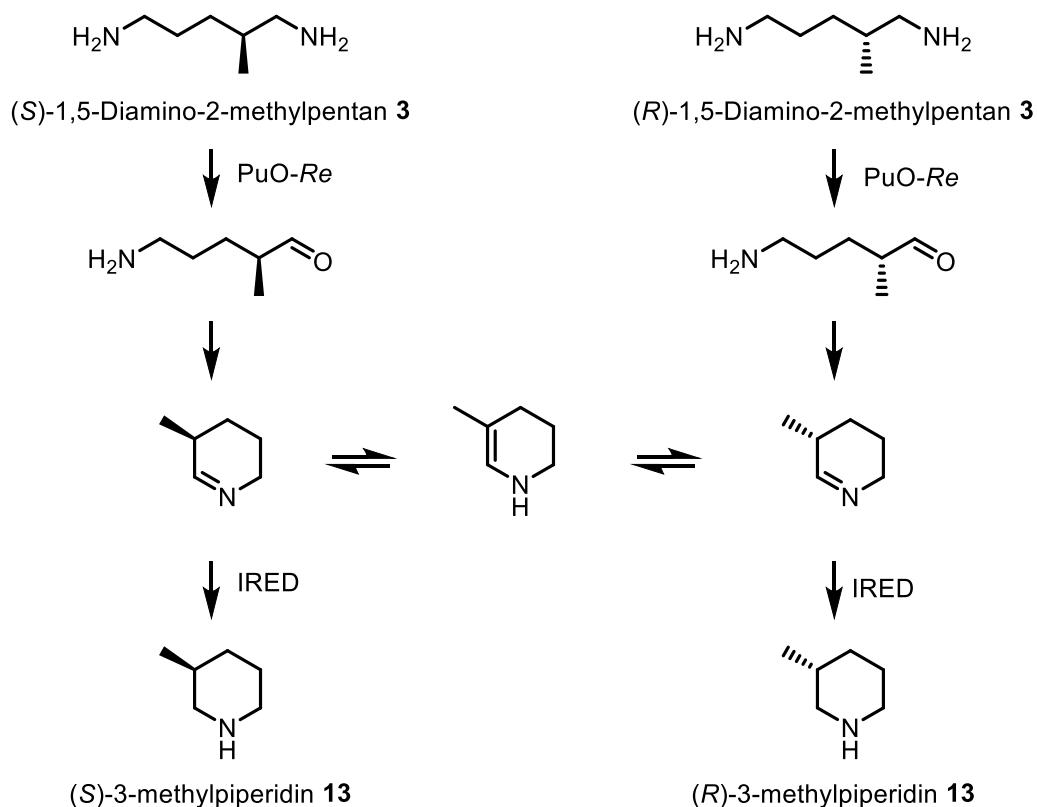


Abbildung 31: Umsetzung von **3** durch PuO-Re und IRED-Sr mit einer Oxidation der sterisch gehinderten Aminogruppe durch PuO-Re. Das hierbei gebildete Iminintermediat kann über die Bildung eines Enamins racemisieren. Dadurch kann es bei der Umsetzung eines Racemats zu der Bildung eines ee's von **13** kommen, obwohl von der PuO-Re kein prochirales Iminintermediat gebildet wird.

4.2.2 *In vivo* Kaskade

Nach der erfolgreichen Durchführung der *in vitro* Kaskade wurde die Kaskade in ein *in vivo* System übertragen. Im Allgemeinen hat eine Fermentation im Vergleich zur *in vitro* Produktion den Vorteil, dass Enzyme nicht gereinigt werden müssen und dass eine intrazelluläre Regeneration von Kofaktoren stattfindet, was zeitsparend und kostengünstig ist. Speziell ein Vorteil der fermentativen Anwendung dieser Kaskade ergibt sich durch die chemisch schwer zugänglichen Diaminsubstrate, da die Kaskade *in vivo* mit der fermentativen Synthese von Diaminen gekoppelt werden kann oder die Kaskade über eine Aminosäuredecarboxylase mit der intrazellulären Aminosäureproduktion gekoppelt werden kann. Für die Entwicklung der *in vivo* Kaskade wurde die Kombination angewendet, die anfangs *in vitro*, die besten Ergebnisse erzielte. Somit wurde die dreifach Variante PuOM1 (L199I E202S I205L) mit der R-IRED-Sr für die Umsetzung des Substrates 1,5-Diamino-2-methylpentan **3**

kombiniert. Die erste Anwendung der *in vivo* Kaskade wurde mit einem zwei-Plasmid System (pBAD18_PuOM1, pBAD33_IRED-Sr) in *E. coli* JW5510 durchgeführt und resultierte in nur 10% 3-Methylpiperidin **13** Produkt. Dafür wurden frisch exprimierte Zellen mit einer OD₆₀₀ von 50 in 50 mM Tris-HCl, 10 mM 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** und 50 mM Glucose für die NADPH Regeneration eingesetzt. Um die Produktbildung zu steigern, wurden verschiedene Strategien angewendet. Zuerst wurden die Reaktionsbedingungen verändert um die Produktbildung zu steigern, dafür wurden die Pufferkonzentration und die Glukosekonzentration variiert. Bei einer bereits veröffentlichten Kaskade bestehend aus einer Oxidase und Iminreduktase, zeigte sich im *in vivo* System, dass eine erhöhte Pufferkonzentration von bis zu 1M und eine niedrigere Glukosekonzentration von 10 mM zu einer erhöhten Produktbildung führte⁷³. In diesem Fall war die gesteigerte Aktivität nicht auf die Iminreduktase zurückzuführen, da die Änderung der Reaktionsbedingungen keine Auswirkungen auf die Umsetzung des Imins hatte⁷³. Daher wurden diese Bedingungen, zum einen die erhöhte Pufferkonzentration und zum anderen die niedrigere Glukosekonzentration, auf das bestehende Zwei-Plasmid System angewendet. Es zeigte sich auch hier, dass bei der erhöhten Pufferkonzentration (Tris-HCl) auf 1M oder einer niedrigeren Glukosekonzentration auf 10 mM, mehr Produktbildung erfolgte. Die höhere Produktbildung bei einer Pufferkonzentration von 1M ist auf eine teilweise Lyse der Zellen zurückzuführen, wodurch eine Limitierung durch die Aufnahme des Substrates in die Zelle nicht mehr gegeben ist. Die höchste Produktbildung mit 82,5 % wurde allerdings mit einer Pufferkonzentration von 50 mM Tris-HCl und einer Glukosekonzentration von 10 mM erreicht. Die gesteigerte Produktbildung bei diesen neuen Reaktionsbedingungen ist auf die Oxidation durch die PuO-Re oder die intramolekulare Schiff-Basenbildung zurückzuführen, da eine höhere Glukosekonzentration von 50 mM bisher bei *in vivo* Reaktionen der R-IRED-Sr angewendet wurden⁵⁷. Des Weiteren wurde beobachtet, dass bei dieser Reaktion unter Verwendung von 50 mM Glukose der pH innerhalb der ersten Stunde von 7,5 auf 4,9 fällt. Dies lässt darauf schließen, dass bei einer höheren Glukosekonzentration ein Überflussmetabolismus von *E.coli* auftritt, wobei Acetat gebildet wird, wodurch der pH sinkt. Bei der Anwendung von nur 10 mM Glukose sinkt der pH Wert während der Reaktion nur von 7,5 auf pH 6,9, wodurch eine

höhere Produktbildung möglich ist. Somit wurden für die weiteren Reaktionen eine Pufferkonzentration von 50 mM und eine Glukosekonzentration von 10 mM angewendet.

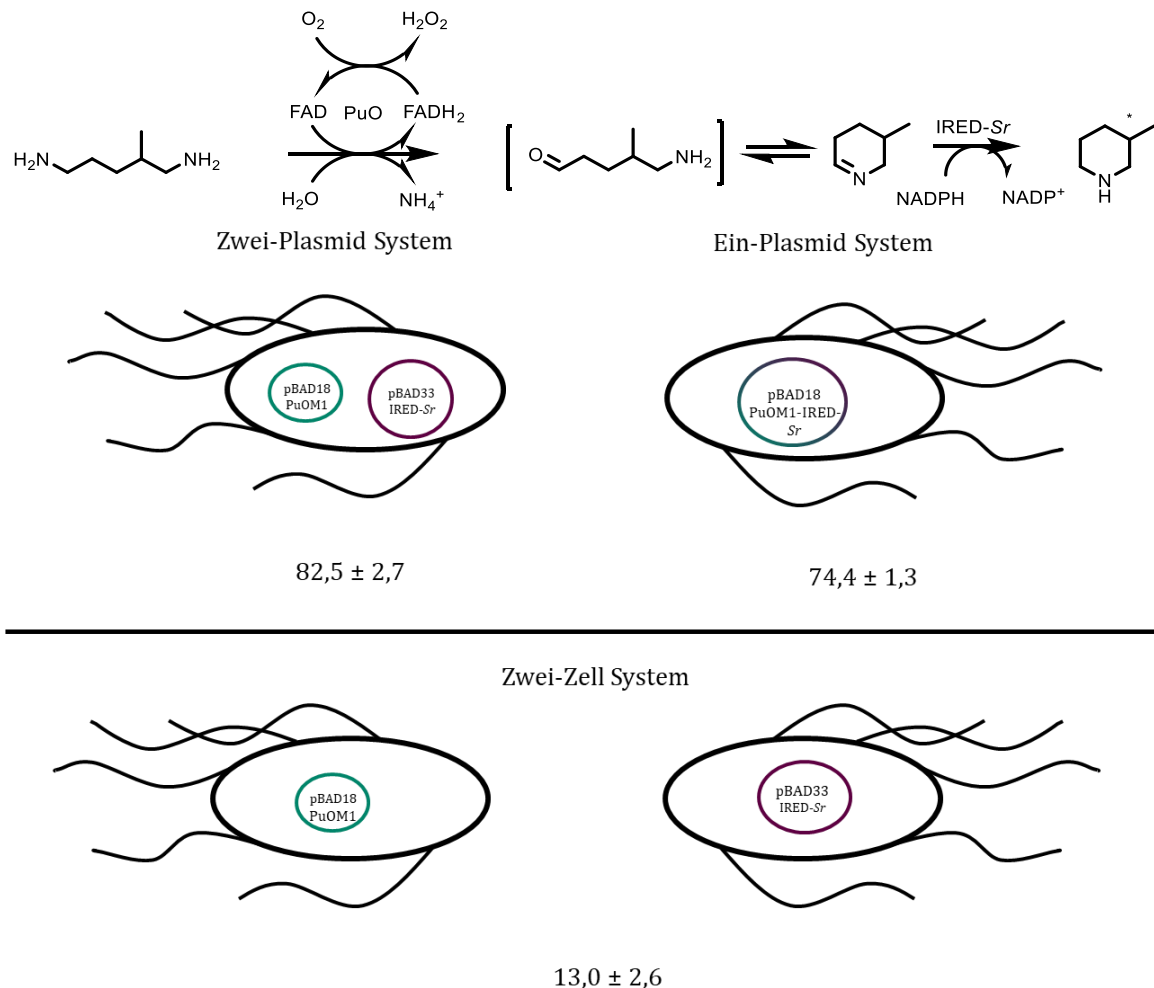


Abbildung 32: *In vivo* Kaskade mit den entsprechenden Produktbildungen des Zwei-Plasmid Systems, Ein-Plasmid Systems und des Zwei-Zell Systems. Für das Zwei-Plasmid System wurden beide Plasmide pBAD18_PuOM1 und pBAD33_IRED-Sr gleichzeitig in *E.coli* JW5510 transformiert. Für das Ein-Plasmid System wurden beide Gene hintereinander in das Plasmid pBAD18 kloniert und für das Zwei-Zell System wurden beide Plasmide jeweils einzeln in *E.coli* JW5510 transformiert. Die Reaktionen mit den drei Systemen wurden gleich durchgeführt.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass das Expressionslevel der IRED-Sr etwa fünffach höher liegt als das Expressionslevel der PuO-Re. Dieses niedrigere Expressionslevel könnte zu einer Limitierung in der Produktbildung führen, da beide Enzyme im *in vitro* System äquimolar eingesetzt wurden. Deswegen wurden zwei weitere Expressionsmöglichkeiten untersucht, um das Expressionslevel der PuO-Re zu steigern. Zum einen wurden beide Gene in ein Plasmid kloniert für ein

Ein-Plasmid System (pBAD18_PuOM1_IRED-Sr) und zum anderen wurden beide Plasmide einzeln separat transformiert und die Enzyme getrennt exprimiert um ein Zwei-Zell System zu bilden. Das Ein-Plasmid System sollte zu einem höheren Expressionslevel der PuO-Re im Vergleich zur IRED-Sr führen, da sich das Gen der PuO-Re auf dem Plasmid vor dem Gen der IRED-Sr befindet. Das Ziel des Zwei-Plasmid Systems war die separate Expression um dadurch ein höheres Expressionslevel beider Enzyme zu erreichen, da die *E.coli* Zellen nur mit der Expression eines Gens belastet waren. Beide Systeme führten allerdings zu einer geringeren Produktbildung als das Zwei-Plasmid System. Mit dem Zwei-Zell System wurde zwar ein höheres Expressionslevel der PuO-Re und IRED-Sr erreicht, allerdings ist in diesem Fall vermutlich der Austausch der Zwischenprodukte zwischen den Zellen mit der PuO-Re und den Zellen mit IRED-Sr nicht effizient. Ein besseres Ergebnis wurde mit dem Ein-Plasmid System erreicht, denn hier wurde eine Produktbildung von 74,4 % ermittelt (Abbildung 32). Dieses liegt aber trotzdem noch unter der Produktbildung des Zwei-Plasmid Systems, vermutlich weil das Expressionslevel der PuO-Re leicht höher war allerdings von der IRED-Sr etwas niedriger. Somit ist das Expressionslevel beider Enzyme im Zwei-Plasmid System für die Umsetzung von 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** zu 3-Methylpiperidine **13** am besten geeignet. Das vorhandene deutlich höhere Expressionslevel der R-IRED-Sr im Zwei-Plasmid System ist hier von Vorteil, weil es dadurch nicht zu einer Anhäufung der Intermediate kommt, sondern das Imin gleich von der R-IRED-Sr umgesetzt werden kann. Bei einer Anhäufung des Imins kann es entweder wieder zur Hydrolyse kommen und mehrere Aminoaldehyde können auch polymerisieren und somit als Nebenprodukt ausscheiden. Dieses Problem tritt vermutlich, wenn auch geringfügig, auch schon auf, wenn das Expressionslevel der PuO-Re gesteigert wird und gleichzeitig weniger R-IRED-Sr exprimiert wird, wie bei Ein-Plasmid System beobachtet. Daher ist für das System ein deutlich höheres Expressionslevel der R-IRED-Sr im Vergleich zur PuO-Re ein Vorteil um die Nebenproduktbildung zu verringern. Das muss jedoch für jedes Substrat gesondert betrachtet werden. Hier wurde im Falle des Substrates 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** gezeigt, dass genau dieser Unterschied im Expressionslevel der Enzyme von Vorteil ist. Für das Substrat 1,4-Diaminobutan **1**, für das PuO-Re eine deutlich höhere Aktivität aufweist als für 1,5-Diamino-2-methylpentan **3**, und die R-IRED-Sr eine deutlich geringere Aktivität

gegenüber 5-gliedrigen Iminen zeigt, müsste das Expressionslevel der (R)-IRED-Sr gesteigert werden. Somit müsste für jedes Substrat das Expressionssystem neu angepasst werden, da es auch nicht möglich ist vom Verhältnis des *in vitro* Systems auf das *in vivo* System zu schließen. Für **3** war nämlich im *in vitro* System mit den gleichen Enzymen ein äquimolares Verhältnis für die höchste Produktbildung von **13** verantwortlich, was für das *in vivo* System nicht der Fall ist, da das Expressionslevel der (R)-IRED-Sr deutlich über dem der PuOM1 liegt. Ein weiteres Problem ist die Stabilität der (R)-IRED-Sr, wodurch die Reaktionsdauer beschränkt ist. Die Halbwertszeit der (R)-IRED-Sr beträgt nur 9 h bei 30°C und obwohl die Reaktion bei 25°C für 48 h durchgeführt wurde, ist die Iminreduktion somit limitiert⁵⁸. Wiederum ein weiterer limitierender Faktor ist die Sauerstoffaufnahme der *E. coli* Zellen für die PuO-Re Reaktion. Der Sauerstoff wird benötigt um das FAD zu regenerieren um eine weitere Oxidation der Diamine zu ermöglichen. Die Sauerstoffaufnahme der *E. coli* Zellen hängt von der Sauerstoffkonzentration in Lösung ab, die in einem Reaktor über den Rührer optimiert werden kann. Die Auswirkungen der Sauerstoffkonzentration in Lösung konnten auch im kleinen Maßstab beobachtet werden, denn anfangs wurden zwei unterschiedliche Gefäße, 5 mL und 20 mL, verwendet. Im 20 mL Gefäß verlief die Reaktion anfangs schneller (Abbildung 23), da durch die Verwendung des gleichen Reaktionsvolumens in dem größeren Gefäß eine größere Oberfläche der Reaktionslösung entstand, wodurch mehr Sauerstoff durch das Schütteln in Lösung gekommen ist.

Um das *in vivo* System stabiler in Bezug auf die Plasmid zu gestalten, wurde jeweils eines der Gene ins Genom von *E. coli* integriert, um den antibiotischen Selektionsdruck auf die *E. coli* Zellen zu reduzieren (M. Geier, B. Wiltsch, A. Glieder, acib Graz). Dies führte nicht zu einer auf SDS-PAGE sichtbaren Überexpression und somit auch in den Reaktionen nicht zu einer Produktbildung. Die nicht ausreichende Überexpression ist zu erklären, da nur eine Kopie des jeweiligen Gens ins Genom integriert wurde, wodurch während der Induktionsphase nicht genügend Kopien für die Transkription zur Verfügung stehen. Zwar sind beide Plasmide pBAD18 und pBAD33, Plasmide mit niedriger Kopienzahl, trotzdem liegen in der Zelle 15-20 Kopien vor. Nur mit der höheren Kopienzahl in Form von Plasmiden konnte eine effiziente Expression der Enzyme erreicht werden, daher wurde der Ansatz mit der Integration der Gene ins Genom verworfen.

Durch die starke Verbesserung der Produktbildung der *in vivo* Kaskade konnten die bisherigen Erkenntnisse der Versuchsdurchführung an Sanofi übermittelt werden, um den *in vivo* Versuchsansatz zu vergrößern. Um den Prozess effektiver zu gestalten wurde von Sanofi ein neuer Versuchsablauf entwickelt, wodurch das Expressionslevel der Enzyme gesteigert wurde und der Zentrifugationsschritt mit anschließendem Lösen des Zellpellets in Reaktionspuffer nach der Expression entfallen ist. Dies wurde zum einen durch eine erhöhte L-Arabinose Konzentration für die Expression der Enzyme erreicht und durch den Einsatz eines chemisch definierten Mediums, indem nach der Expression durch Zugabe des Substrates gleich die Reaktion stattfinden konnte. Zudem wurde ein Design of Experiment (DoE) mit den Parametern pH, Temperatur, pO₂ und Substratkonzentration durchgeführt. Anschließend wurde eine maximale Produktbildung von 3-Methylpiperidin **13** von 27,3 mM (35 mM von 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** wurden als Substrat eingesetzt) in einem 20L Fermenter mit einem Reaktionsvolumen von 12 L erreicht. Dies zeigt, dass die Produktbildung der *in vivo* Kaskade durch die Adressierung von nur vier Reaktionsparametern deutlich gesteigert werden konnte und offenbart dadurch ihr Potential für die Produktion von Piperidinen.

5 Ausblick

5.1 Putrescinoxidase

In dieser Arbeit konnte die Aktivität der Putrescinoxidase gegenüber Diaminpentanderivaten gesteigert werden, wie auch die Regioselektivität bezüglich des Substrates 1,5-Diaminohexan geklärt werden. Für die weitere Applikation der Putrescinoxidase für die Oxidation von Diaminen wäre es sinnvoll die Aminosäurereste zu bestimmen, die die Regioselektivität des Enzyms festlegen. Ein Austausch dieser Aminosäurereste könnte dann zu einer PuO-*Re* Variante führen, die die sterisch gehinderte Aminogruppe oxidiert um z.B. prochirale Imine zu generieren. Des Weiteren kann das Substratspektrum noch erweitert werden. In dieser Arbeit wurden zum Beispiel keine substituierten 1,4-Diaminobutanderivate getestet. Zudem können mit Hilfe des Festphasen-Assays weitere Bibliotheken gescreent werden um auch Varianten mit einer gesteigerten katalytischen Effizienz zu identifizieren.

5.2 Kaskade

Für die Applikation der *in vitro* Kaskade kann es von Vorteil sein, die Verhältnisse von PuO-*Re* zu IRED-*Sr* je nach Substrat anzupassen. Es wurde beobachtet, dass das äquimolare Verhältnis im Fall von Substrat 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** am besten geeignet ist. Für das Substrat 1,4-Diaminobutan **1** wurde allerdings eine niedrigere Produktbildung detektiert, weil es hier vermutlich zu einer Anhäufung des Zwischenproduktes und dadurch zu einer Nebenproduktbildung kommt. Dies könnte möglicherweise durch den Einsatz einer höheren Konzentration an IRED-*Sr* verhindert werden. Somit wäre es sinnvoll die Kaskade für jedes Substrat bezüglich des Verhältnisses von PuO-*Re*:IRED-*Sr* anzupassen um höhere Produktbildungen zu erreichen.

Die Anwendung der *in vivo* Kaskade kann durch den Einsatz weiterer Substrate erweitert werden. Dafür kann die PuOM1 leicht in dem Zwei-Plasmid System durch das Plasmid mit dem entsprechenden PuO-*Re* Gen getauscht werden, dessen Enzym

die beste Aktivität gegenüber dem jeweiligen Substrat aufweist. Dafür ist das Zwei-Plasmid System besonders gut geeignet, da keine Klonierung etc. notwendig sind. Allerdings muss dann darauf geachtet werden, ob mit dem vorhandenen Expressionssystem (pBAD18, pBAD33) eine ausreichende Produktbildung erzielt werden kann, da das Expressionslevel der IRED-*Sr* um etwa fünffach höher ist als der PuO-*Re* und das Verhältnis der beiden Enzyme von Bedeutung für die Produktbildung ist.

6 Anhang

6.1 Gen Sequenzen

Sequenz PuO-Re:

ATGGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCCCTACTCTCCAGAGAGATGTTGCAATC
GTCGGGCGCCGGCCCCTCTGGCCTGGCAGCGGCAACCGCGCTGCGCAAGGCCGGCTTGTCCG
TCGCCGTGATCGAAGCACGCGATCGTGTGCGAGGCCGCACGTGGACCGACACCATCGACG
GCGCAGTCCTGGAGATCGGCGGCCAGTGGGTCTCCCCGACCAGACTGCTCTGATCTCCTT
GCTCGACGAACTCGGCCTGAAGACTTTCGAGCGCTACCGCGAGGGCGAGTCCGTCTACAT
CTCGTCAGCAGGCGAGCGGACTCGATACACGGGCGATTCTTCCCCACGAACGAGACCAC
CAAGAAGGAGATGGACCGTCTCATCGACGAGATGGACGATCTCGCAGCGCAGATCGGCGC
CGAGGAGCCGTGGGCACATCCCCTCGCCGCGATCTCGACACAGTCTCCTTCAAGCAGTGG
CTGATCAATCAGTCCGACGACGCCGAGGCCCGTGACAACATCGGCCTTTCATCGCGGGT
GGTATGCTCACCAAGCCCGCCACTCGTTCTCCGCCCTACAGGCCGTAATCATGGCCGCTT
CCGCAGGCTCGTTCTCCACCTCGTGGACGAGGACTTCATCCTCGACAAGCGAGTGATCG
GCGGAATGCAGCAGGTATCTATCCGCATGGCGGAGGCCCTCGGTGACGACGTCTTCTCA
ACGCACCCGTGCGTACGGTGAAGTGGAACGAATCCGGTGCAACGGTGTTGGCGGACGGCG
ACATTTCGCGTCGAGGCAAGCCGAGTGATCCTGGCCGTACCACCCAACCTCTACTCCCGGAT
CTCCTACGATCCCCGCTGCCGCGTCGTACGACCAGATGCATCAGCATCAGTCTCTCGGC
CTCGTCATCAAGGTGCACGCCGTGTACGAGACGCCTTTCTGGCGCGAAGACGGCCTCTCC
GGCACCCGGCTTCGGCGCGTCCGAGGTAGTGCAGGAGGTGTACGACAACACCAACCACGAG
GACGATCGCGGCACCCTGGTTCGCTTTTGTCTCCGACGAGAAGGCCGACGCGATGTTTCGAG
CTTTCGCGCGAGGAGCGTAAGGCCACGATTCTGGCCTCACTCGCCCCTACCTGGGCCCGA
AGGCCGAAGAGCCGGTTGTGTACTACGAATCCGACTGGGGCTCGGAGGAATGGACCCGCG
GTGCGTACGCGGCGAGCTTCGATCTCGGCGGCCTGCACCGCTACGGCGCGGATTCCCGCAC
GCCCCTCGGACCGATCCACTTCTCGTGCTCCGACATCGCAGCCGAGGGATAACCAGCACGTG
GACGGTGCCGTTTCGGATGGGTCAGCGCACCCGCCCGACATCATCGCCCGCAGCAAGGCC
TGA

Sequenz (R)-IRED-Sr:

ATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATAGCAGCGGTCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGT
CCGGCAGGTGATACCGATGTTACCGTTCTGGGTCTGGGCCTGATGGGTCAGGCACTGGCA
GGCGCATTTCTGAAAGATGGTCATGCAACCACCGTTTGAATCGTAGCGAAGGTAAAGCA
GGTCAGCTGGCAGAACAGGGTGCAGTTCTGGCAAGCAGCGCACGTGATGCAGCAGAAGCA
AGTCCGCTGGTTGTTGTTTGTGTTAGCGATCATGCAGCAGTTCGTGCCGTTCTGGATCCG
CTGGGTGATGTTCTGGCAGGTCGTGTTCTGGTTAATCTGACCAGCGGCACCAGCGAACAG
GCACGTGCAACCGCAGAATGGGCAGCAGAACGTGGTATTACCTATCTGGATGGTGCAATT
ATGGCAATTCGCGAGGTTGTGGGCACCGCAGATGCATTTCTGCTGTATAGCGGTCCGGAA
GCAGCATATGAAGCACATGAACCGACCCTGCGTAGCCTGGGTGCAGGCACCACATATCTG
GGTGCCGATCATGGTCTGAGCAGCCTGTATGATGTTGCACTGCTGGGTATTATGTGGGGC
ACCCTGAATAGCTTTCTGCATGGTGCAGCCCTGCTGGGCACAGCAAAGTTGAAGCCACC
ACTTTTCACCGTTTGGCAAATCGTTGGATTGAAGCAGTTACCGGTTTTGTTAGCGCATAT
GCCGGTCAGGTTGATCAGGGTGCATATCCGGCACTGGATGCAACCATTGATACCCATGTT
GCAACCGTTGATCATCTGATTCATGAAAGCGAAGCAGCCGGTGTTAATACCGAACTGCCT
CGTCTGGTTCGTACCCTGGCAGATCGTGCCCTGGCTGGCGGTGAGGGTGGTCTGGGTAT
GCAGCAATGATTGAACAGTTTTCGTAGCCCGAGCGCATAA

Sequenz (S)-IRED-Pe:

ATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATAGCAGCGGTCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGT
CCGGCAAATAGCAGCAATCCGAAAGATAACATTAGCGTTGGTAGCGCAAGCACCGCAACC
AATCGTAAAAGCGTTACCGTTATGGGTCTGGGTCCGATGGGTCAGGCAATGGCAGGCGTT
TTTCTGGAAAGCGGTTATGAAGTTACCGTTTGGAAATCGTACCGCAAGCAAAGCAGATGA
ACTGGTTGCAAAGGTGCAATTCGTGCCAGCACCGTTGATGAAGCACTGGCAGCAAACGA
ACTGGTTATTCTGAGCCTGACCGATTATGATGCAATGTATGCAATTCTGGAACCGAGCAG
CGCAAATCTGAGCGGTAAAGTTCTGGTGAATCTGAGCAGCGATACACCGGAAAAAGTTCC
TGAAGCAGCAAATGGCTGGCAGATCGTGGTGCACGTCATGTTACCGGTGGTGTTCAGGT
TCCGCCTAGCGGTATTGGTAAACCGGAAAGCTATACCTATTATAGCGGTCCGCGTGAAGT
TTTTGAAGCACATCGTGAAAGCCTGGAAATTCTGACCGGTACAGATTATCGTGGTGAAGA
TCCGGGTCTGGCAATGCTGTATTATCAGATTCAGATGGATATCTTCTGGACCAGTATGCT
GAGCTATCTGCATGCACTGGCCGTTGCCAAAGCAAATGGTATTACCGCAAACAGTTTCT
GCCGTATGCAAGCGCAACCCTGAGCAGCCTGCCGCAGTTTGTGTAATTCTATACACCGCG
TCTGGATGAAGGTAAACATCCGGGTGATGTTGATCGTCTGGCCATGGGCCTGGCAAGCGT

TGAACATATTGTTTCATACCACCGAAGATGCAGGTATTGATACCACCCTGCCTGCAGCAGT
TCTGGAAATCTTTAAACGTGGCATGGAAAATGGTCATGCCGGTGATAGCTTTACCAGCCT
GATTGAAATTTTCAAAAATCCGGTGCGCAGCTAA

6.2 Expression und Aufreinigung

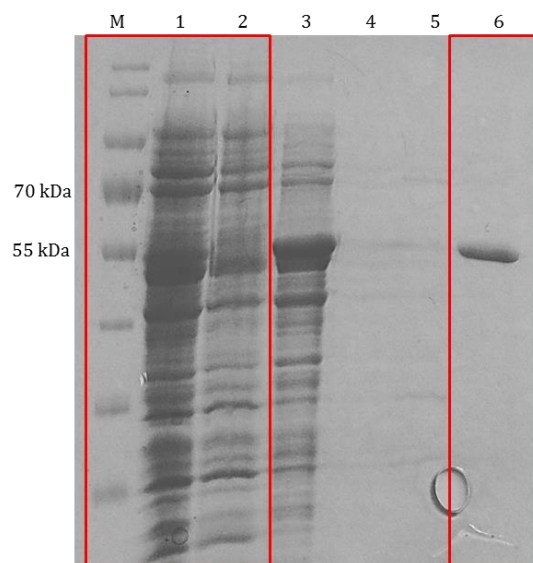


Abbildung 33: SDS-PAGE der Reinigung mit Lysat in der 1. Spalte, Durchfluss in Spalte, Waschschrift mit 50mM Tris-HCl 10mM Imidazol vor der Elution in Spalte 3. In Spalte 4 und 5 wurden die Waschschrte (300mM Imidazol und danach 450mM Imidazol) nach der Elution der PuO verfolgt um zu verfolgen ob eine höhere Imidazolkonzentration nötig ist um die PuO zu eluieren. In Spalte 6 wurde die gereinigte PuO aufgetragen. In rot markierte Spuren sind in 3.1.1.1 aufgeführt.

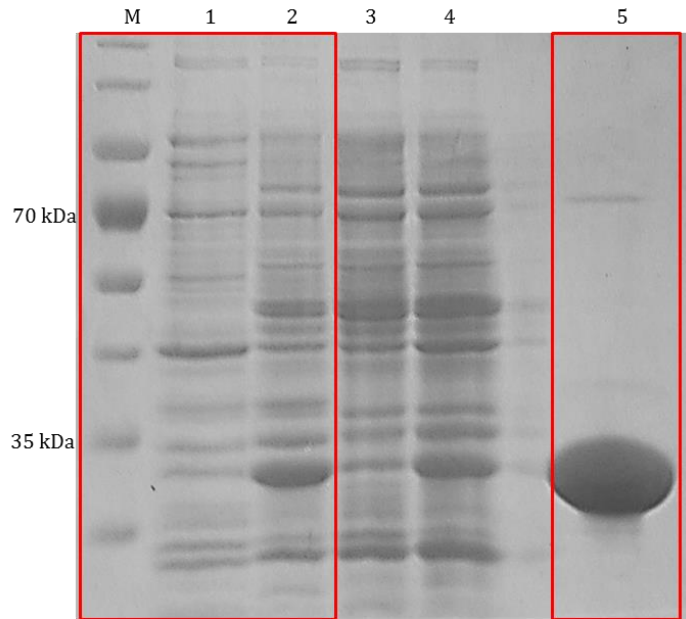


Abbildung 34: SDS-PAGE der Expression und Reinigung der IRED-Sr. In Spalte 1 ist die Probe von *E.coli* JW5510 pBAD33_IRED-Sr vor der Induktion mit L-Arabinose und in Spalte 2 nach der Expression zu sehen. Spalte 3 zeigt das Lysat nach Zellaufschluss und in Spalte 4 der Waschschrift bei der Reinigung vor der Elution. In Spalte 5 ist die gereinigte IRED-Sr zu sehen mit einer Reinheit von >95%.

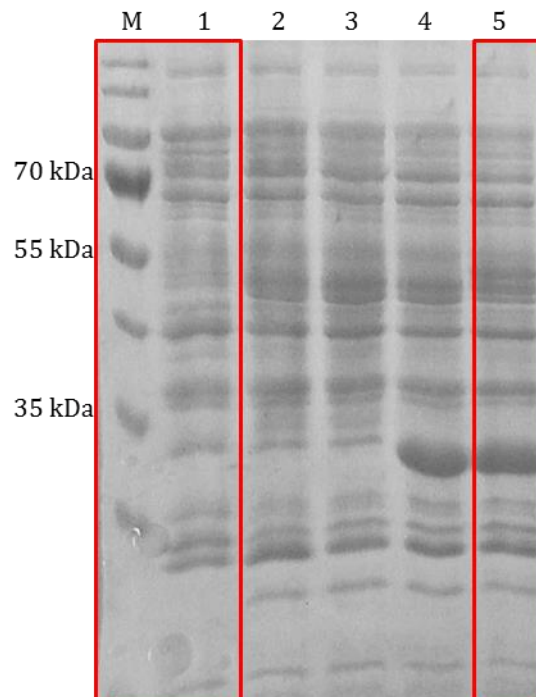


Abbildung 35: Expression der Kaskade im Zwei-Plasmid System. In Spalte 1 ist die Probe vor der Induktion aufgetragen, in Spalten 2, 3 und 4 die negativ Kontrollen (*E.coli* JW5510 pBAD18 pBAD33, JW5510 pBAD18_PuOM1-His pBAD33, *E.coli* JW5510 pBAD18 pBAD33-IRED-Sr) und in Spalte 5 die Expression der Kaskade in *E.coli* JW5510 pBAD18_PuOM1-His pBAD33_IRED-Sr (Proben genormt auf OD=0.25). Der obere Pfeil markiert die exprimierte Variante PuOM1 und der untere Pfeil die Bande für die IRED-Sr. Das Expressionslevel der IRED-Sr ist etwa 5-fach höher als das der PuOM1.

6.3 Michaelis-Menten Plots von PuO-Re, PuOM1, PuOM2, PuO-Re E202G für 1, 2, 3 und 5 und von PuOS1 und PuOS2 für 5

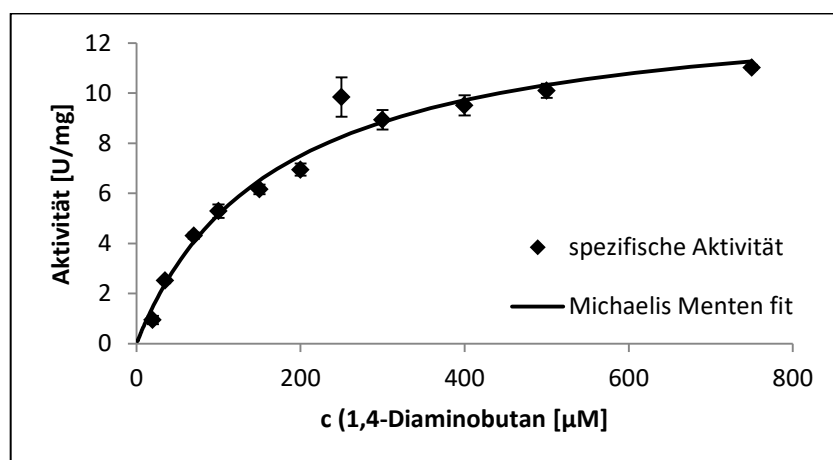


Abbildung 36: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re für **1** (k_{cat} : $11,38 \pm 0,33 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,17 \pm 0,01 \text{ mM}$).

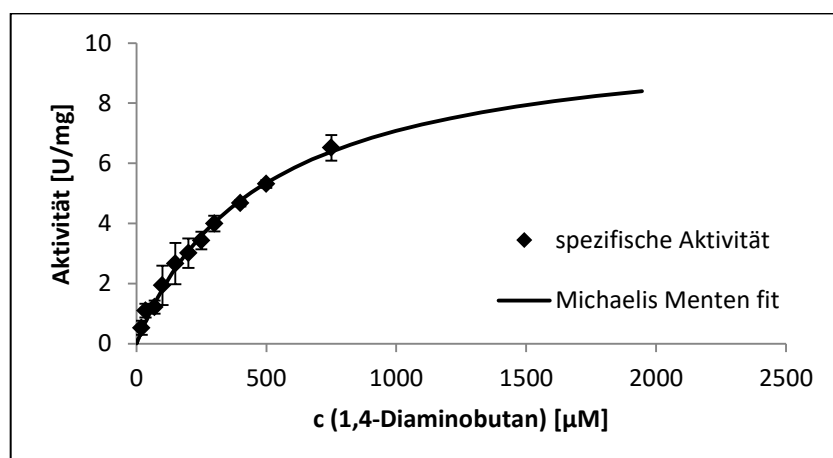


Abbildung 37: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM1 für **1** (k_{cat} : $8,57 \pm 1,26 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,46 \pm 0,16 \text{ mM}$).

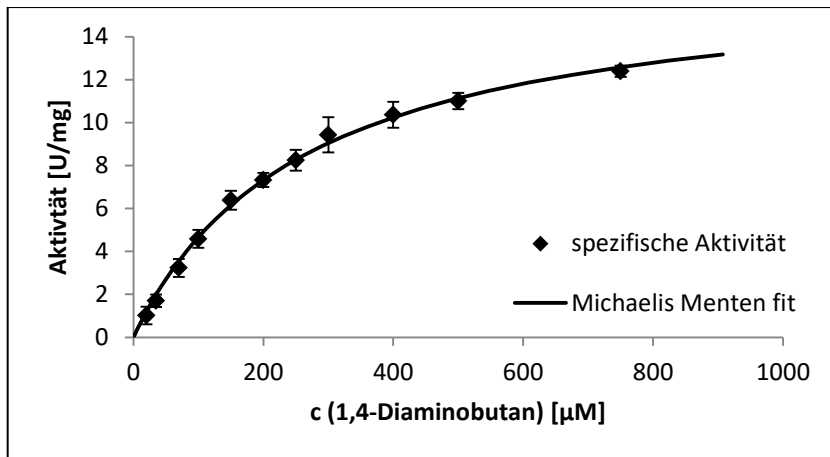


Abbildung 38: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM5 für **1** (k_{cat} : $14,07 \pm 0,20 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,27 \pm 0,04 \text{ mM}$).

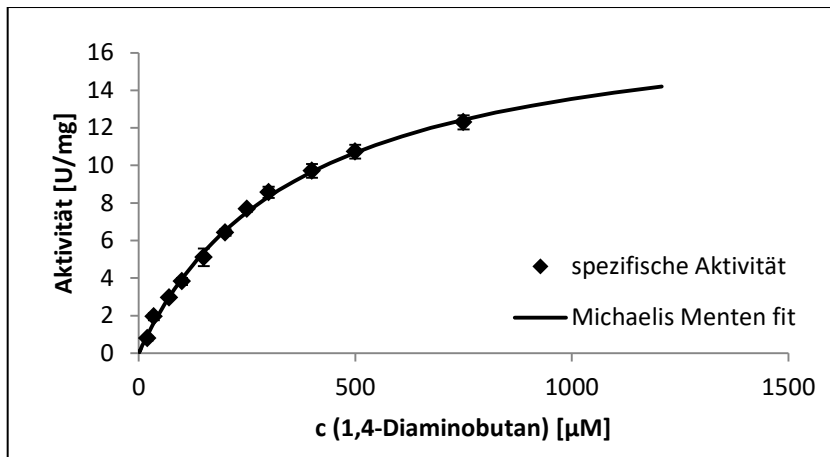


Abbildung 39: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re E202G für **1** (k_{cat} : $15,28 \pm 1,23 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,37 \pm 0,05 \text{ mM}$).

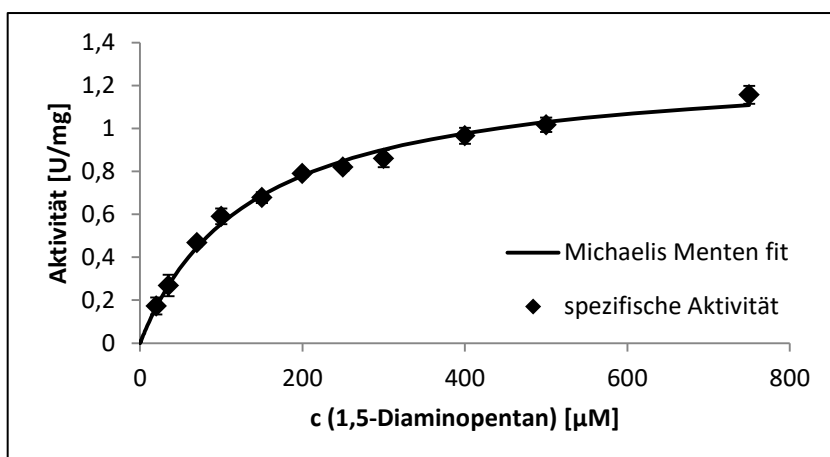


Abbildung 40: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re für **2** (k_{cat} : $1,08 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,14 \pm 0,03 \text{ mM}$).

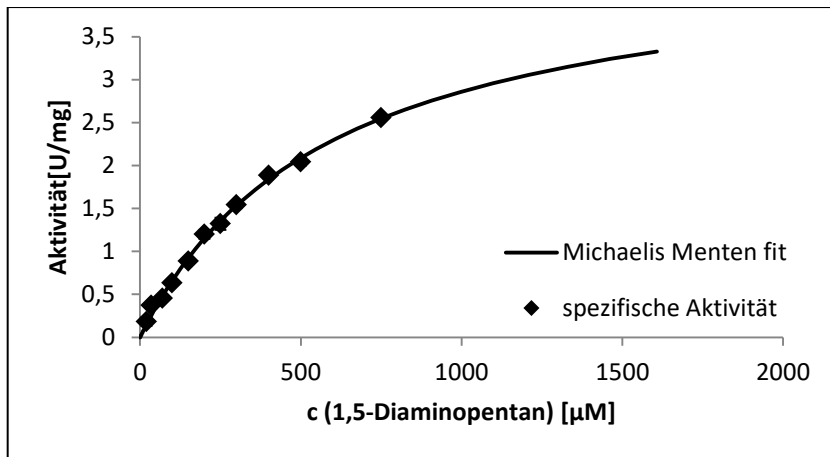


Abbildung 41: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM1 für **2** (k_{cat} : $3,74 \pm 0,22 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,59 \pm 0,07 \text{ mM}$).

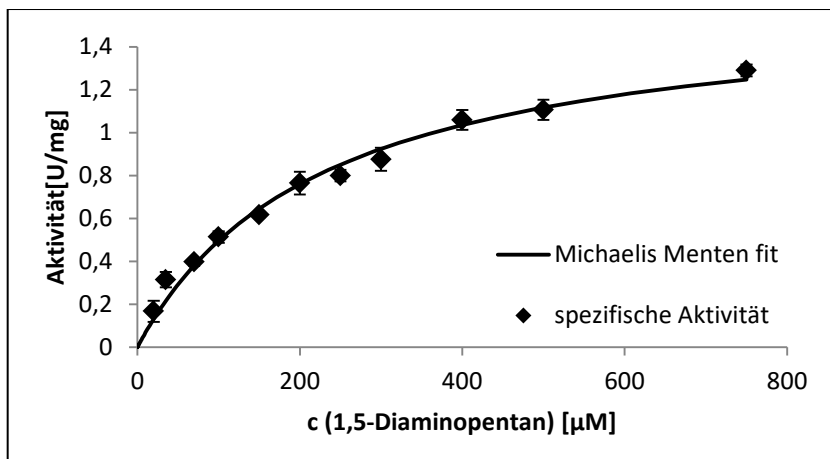


Abbildung 42: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM5 für **2** (k_{cat} : $2,05 \pm 0,35 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,16 \pm 0,11 \text{ mM}$).

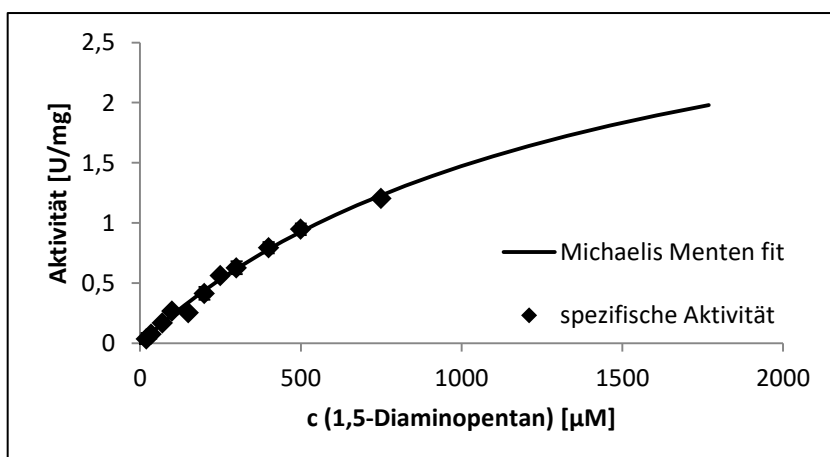


Abbildung 43: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re E202G für **2** (k_{cat} : $2,97 \pm 0,56 \text{ s}^{-1}$, K_M : $1,44 \pm 0,31 \text{ mM}$).

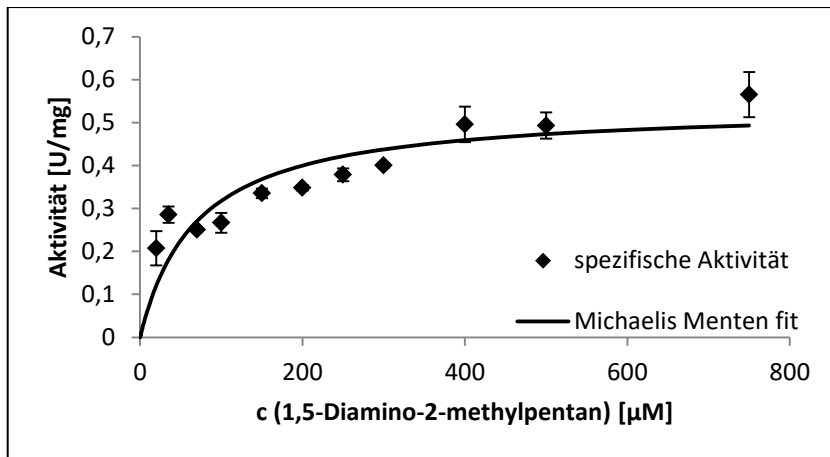


Abbildung 44: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re für 3 (k_{cat} : $0,44 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,07 \pm 0,01 \text{ mM}$).

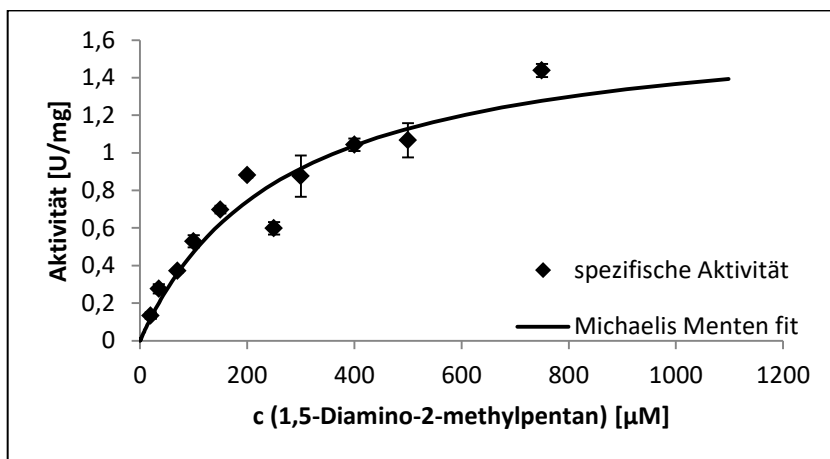


Abbildung 45: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM1 für 3 (k_{cat} : $1,43 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,27 \pm 0,03 \text{ mM}$).

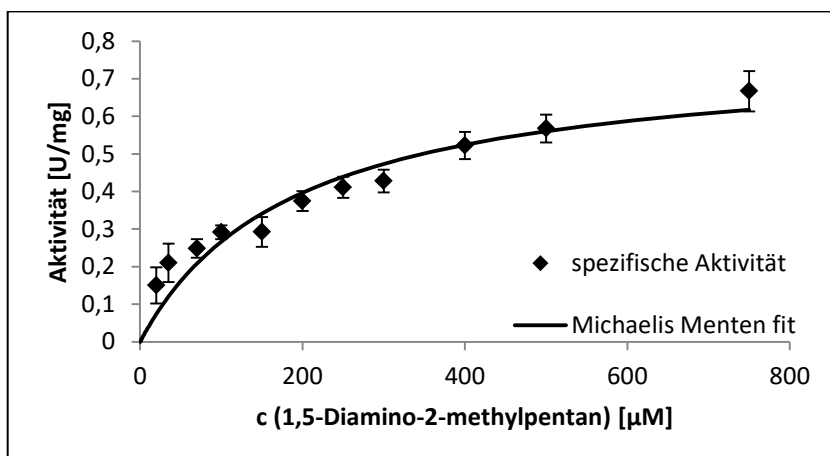


Abbildung 46: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM5 für 3 (k_{cat} : $0,63 \pm 0,14 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,19 \pm 0,10 \text{ mM}$).

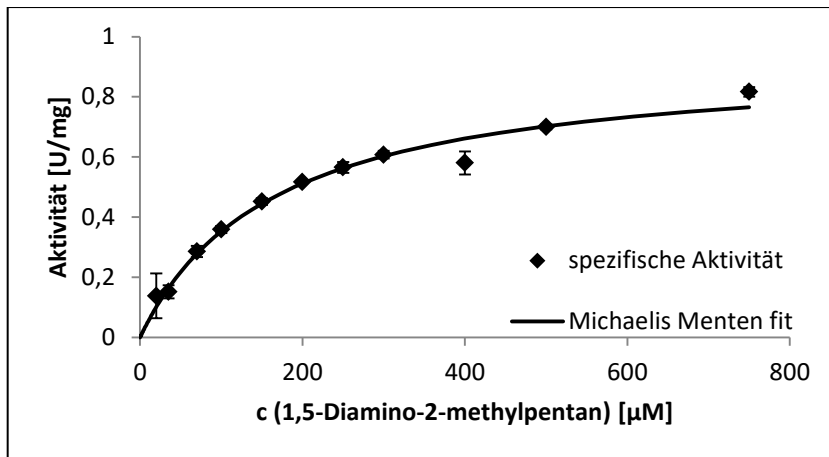


Abbildung 47: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re E202G für **3** (k_{cat} : $0,77 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,17 \pm 0,02 \text{ mM}$).

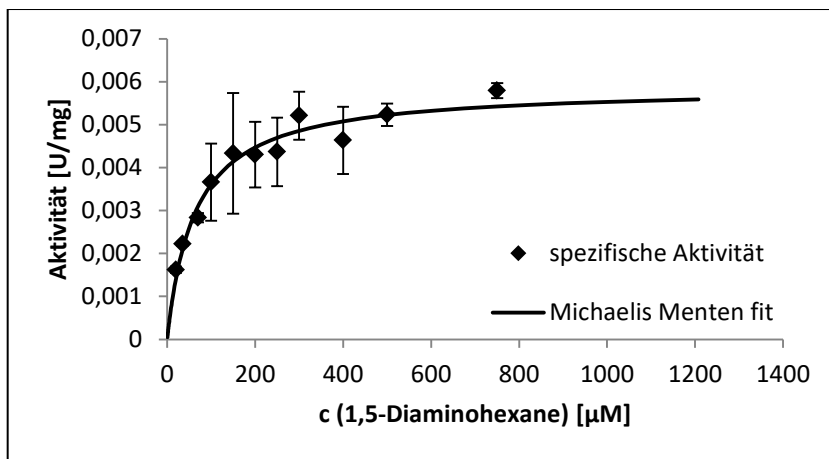


Abbildung 48: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re für **5** (k_{cat} : $0,01 \pm 0,00 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,07 \pm 0,01 \text{ mM}$).

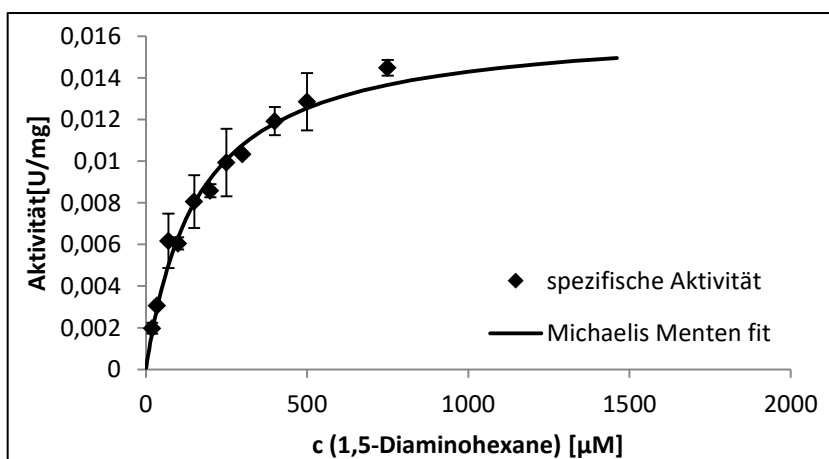


Abbildung 49: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM1 für **5** (k_{cat} : $0,01 \pm 0,00 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,17 \pm 0,02 \text{ mM}$).

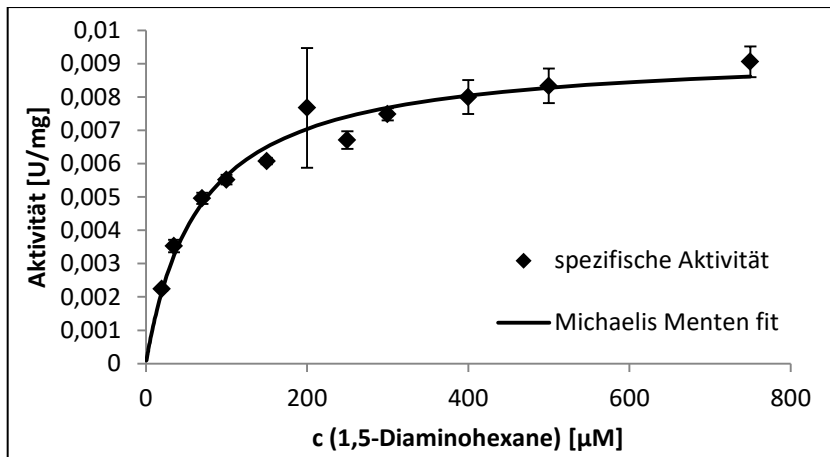


Abbildung 50: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOM5 für **5** (k_{cat} : $0,01 \pm 0,00 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,07 \pm 0,01 \text{ mM}$).

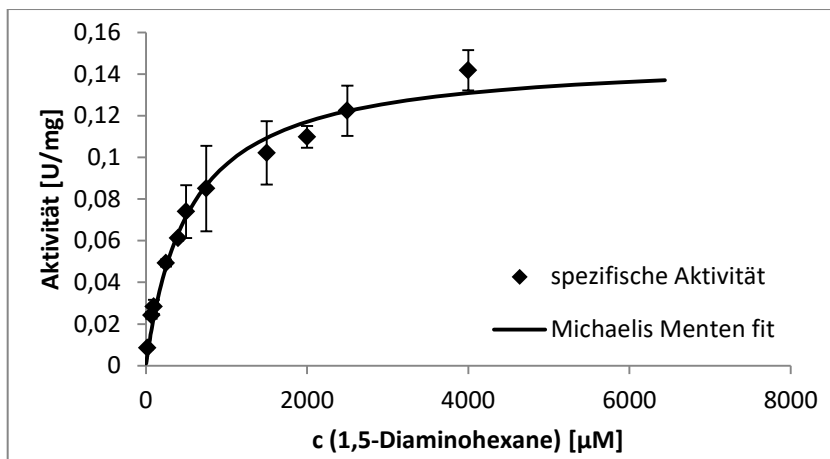


Abbildung 51: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuO-Re E202G für **5** (k_{cat} : $0,12 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,51 \pm 0,04 \text{ mM}$).

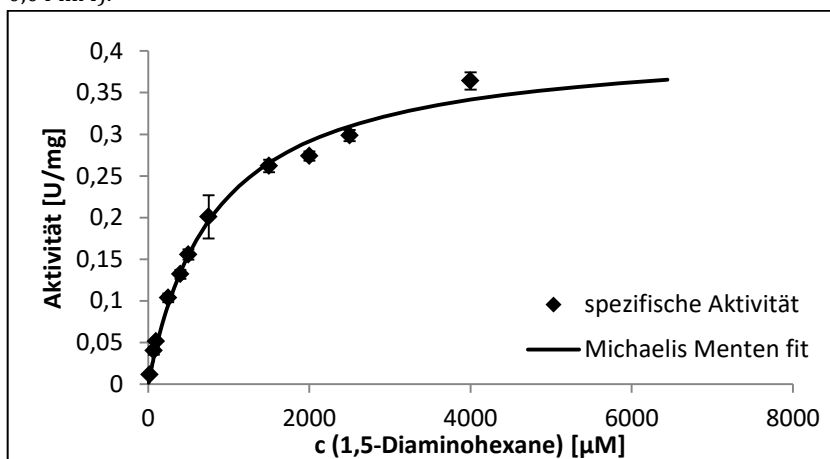


Abbildung 52: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOS1 für **5** (k_{cat} : $0,33 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$, K_M : $0,78 \pm 0,08 \text{ mM}$).

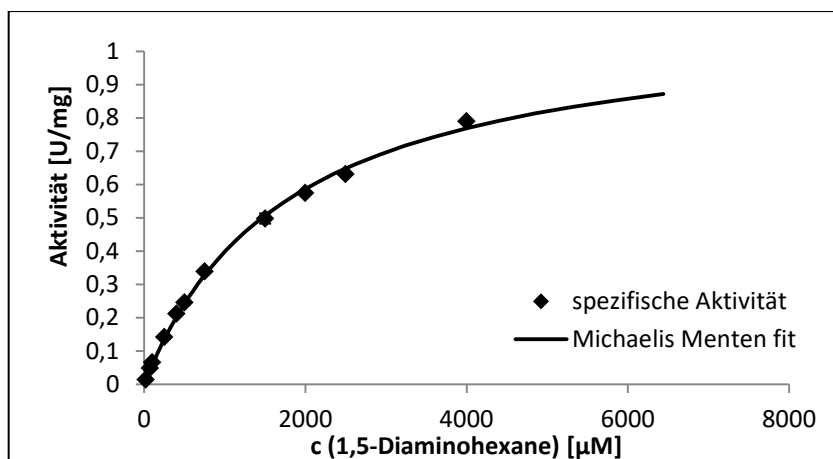


Abbildung 53: Bestimmung der kinetischen Konstanten von PuOS₂ für **5** (k_{cat} : $0,89 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$, K_M : $1,70 \pm 0,11 \text{ mM}$).

6.4 GC-Chromatogramme

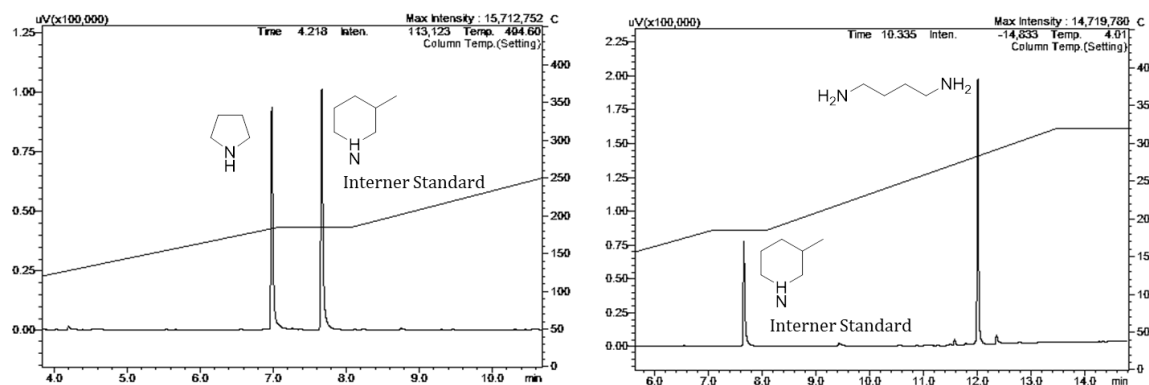


Abbildung 54: GC-Diagramme der Standards Pyrrolidin **11** und 1,4-Diaminobutan **1** derivatisiert mit IBCF.

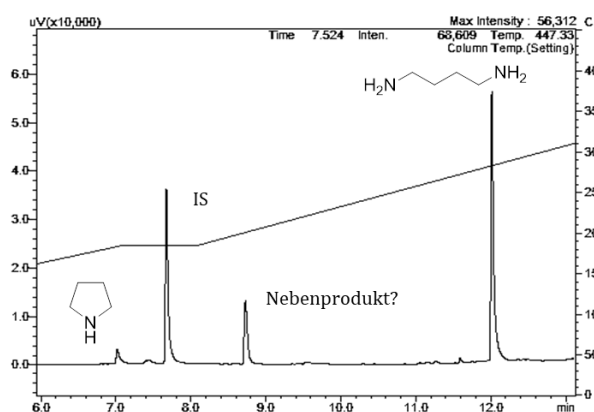


Abbildung 55: GC-Diagramm der Kaskade PuO-Re mit der IRED-Sr von der Umsetzung von 1,4-Diaminobutan **1** zu Pyrrolidin **11** nach 1h Reaktionszeit.

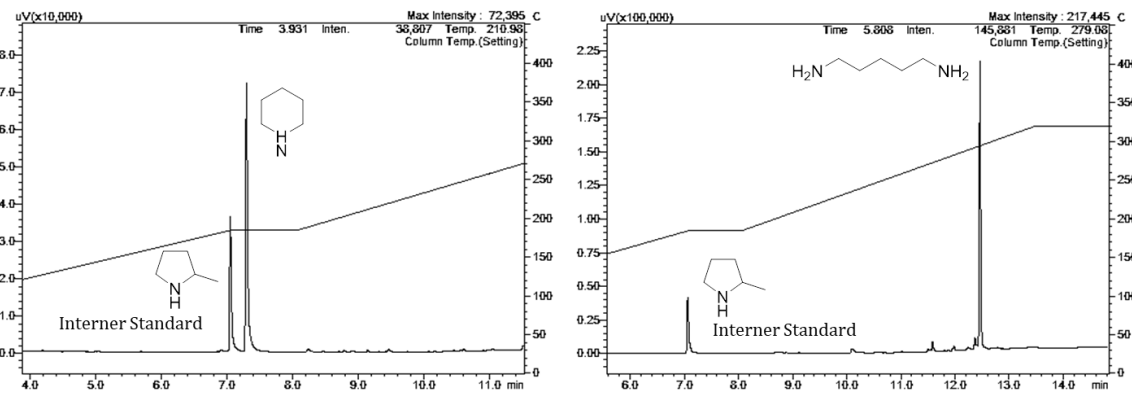


Abbildung 56: GC-Diagramm der Standards Piperidin 12 und 1,5-Diaminopentan 2 derivatisiert mit IBCF.

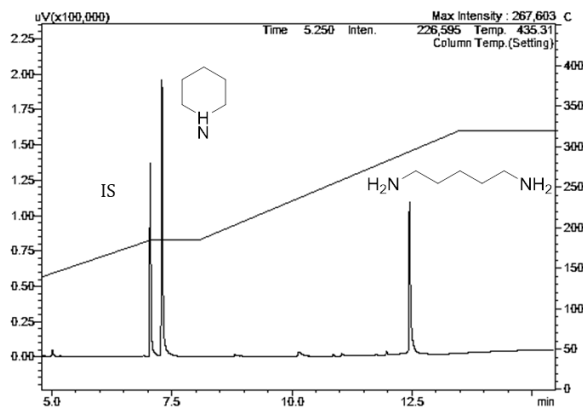


Abbildung 57: GC-Diagramm der Kaskade PuOM1 mit der IRED-Sr von der Umsetzung von 1,5-Diaminopentan 2 zu Piperidin 12 nach 1h Reaktionszeit.

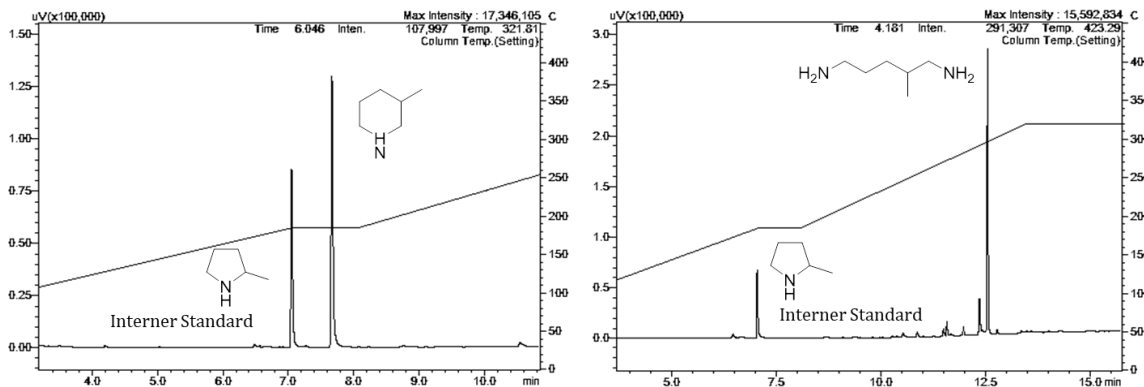


Abbildung 58: GC-Diagramm der Standards 3-Methylpiperidin 13 und 1,5-Diamino-2-methylpentan 3 mit IBCF derivatisiert.

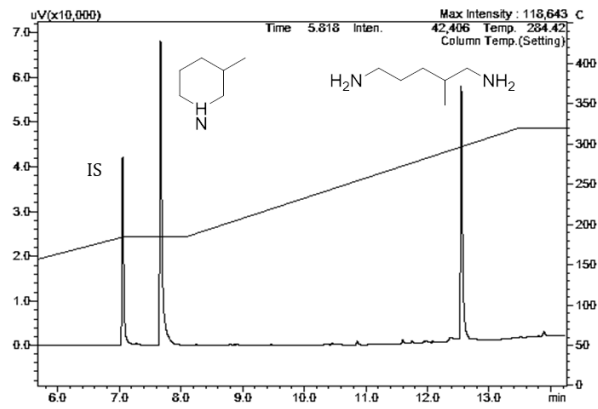


Abbildung 59: GC-Diagramm der Kaskade PuOM1 mit der IRED-Sr von der Umsetzung von 1,5-Diamino-2-methylpentan **3** zu 3-Methylpiperidin **13** nach 3h Reaktionszeit.

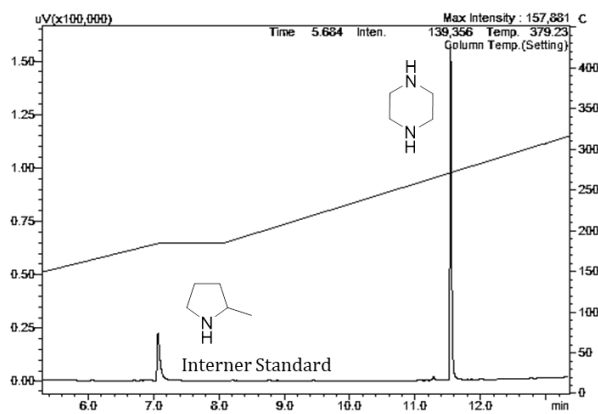


Abbildung 60: GC-Diagramm des Standards Piperazin **14** mit IBCF derivatisiert.

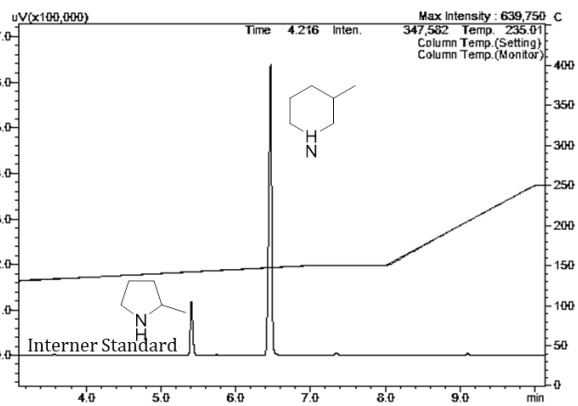


Abbildung 61: GC-Diagramm des Standards 3-Methylpiperidine **13** mit EA derivatisiert.

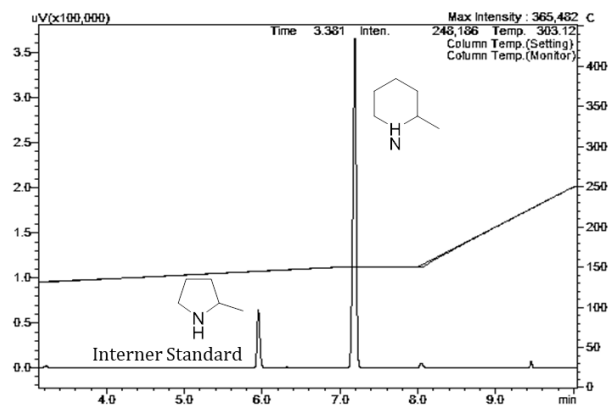


Abbildung 62: GC-Diagramm des Standards 2-Methylpiperidine **15** mit EA derivatisiert.

7 Literaturverzeichnis

1. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. 2009:1-17. doi:10.1007/s00726-009-0269-0.
2. Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. 2008. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730.
3. Carey JS, Laffan D, Williams MT, Carey JS, Williams MT. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. 2006:2337-2347. doi:10.1039/b602413k.
4. Breuer M, Ditrich K, Habicher T, et al. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chemie - Int Ed.* 2004;43(7):788-824. doi:10.1002/anie.200300599.
5. Agranat I, Caner H, Caldwell J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(10):753-768. doi:10.1038/nrd915.
6. WHO. WHO Model List of Essential Medicines. *19Th Ed.* 2015;(August):39. doi:10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
7. Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature.* 2012;485(7397):185-194. doi:10.1038/nature11117.
8. Nestl BM, Hammer SC, Nebel BA, Hauer B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew Chemie - Int Ed.* 2014;53(12):3070-3095. doi:10.1002/anie.201302195.
9. Reetz MT, Reetz MT. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology : Past , Present and Future. 2013. doi:10.1021/ja405051f.
10. Bommarius, Andreas S, Paye MF. Stabilizing biocatalysts. *Chem Soc Rev.* 2013;42:6534-6565. doi:10.1039/c3cs60137d.
11. Höhne M, Bornscheuer UT. Biocatalytic routes to optically active amines. *ChemCatChem.* 2009;1(1):42-51. doi:10.1002/cctc.200900110.
12. Breuer M, Ditrich K, Habicher T, et al. Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. *Angew Chemie.* 2004;116:806-843. doi:10.1002/ange.200300599.
13. Ingersoll AW. d- AND l-a-PHENYLETHYLAMINE. *Org Synth.*

-
- 1937;17(September):80. doi:10.15227/orgsyn.017.0080.
14. Cowart M, Pratt JK, Stewart AO, Bennani YL, Esbenshade TA, Hancock AA. A new class of potent non-imidazole H3 antagonists: 2-Aminoethylbenzofurans. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2004;14(3):689-693. doi:10.1016/j.bmcl.2003.11.032.
 15. Krajewski K, Zhang Y, Parrish D, Deschamps J, Roller PP, Pathak VK. New HIV-1 reverse transcriptase inhibitors based on a tricyclic benzothiophene scaffold: Synthesis, resolution, and inhibitory activity. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2006;16(11):3034-3038. doi:10.1016/j.bmcl.2006.02.049.
 16. Pu YM, Grieme T, Gupta A, et al. A facile and scaleable synthesis of ABT-239, a benzofuranoid H3 antagonist. *Org Process Res Dev.* 2005;9(1):45-50. doi:10.1021/op049809c.
 17. Zhao D, Kuethe JT, Journet M, Peng Z, Humphrey GR. Efficient and Practical Synthesis of (*R*)-2-Methylpyrrolidine. *J Org Chem.* 2006;71(11):4336-4338. doi:10.1021/jo060319n.
 18. Nugent TC, El-Shazly M. Chiral amine synthesis - Recent developments and trends for enamide reduction, reductive amination, and imine reduction. *Adv Synth Catal.* 2010;352(5):753-819. doi:10.1002/adsc.200900719.
 19. Blaser HU, Pugin B, Spindler F, Thommen M. From a chiral switch to a ligand portfolio for asymmetric catalysis. *Acc Chem Res.* 2007;40(12):1240-1250. doi:10.1021/ar7001057.
 20. Glorius F, Spielkamp N, Holle S, Goddard R, Lehmann CW. Efficient asymmetric hydrogenation of pyridines. *Angew Chemie - Int Ed.* 2004;43(21):2850-2852. doi:10.1002/anie.200453942.
 21. Lei A, Chen M, He M, Zhang X. Asymmetric hydrogenation of pyridines: Enantioselective synthesis of nipecotic acid derivatives. *European J Org Chem.* 2006;(19):4343-4347. doi:10.1002/ejoc.200600558.
 22. Bommarius AS. Biocatalysis : A Status Report. 2015. doi:10.1146/annurev-chembioeng-061114-123415.
 23. Bommarius AS, Blum JK, Abrahamson MJ. Status of protein engineering for biocatalysts: How to design an industrially useful biocatalyst. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(2):194-200. doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.011.
 24. Bommarius AS, Blum JK, Abrahamson MJ. Status of protein engineering for

-
- biocatalysts : how to design an industrially useful biocatalyst. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(2):194-200. doi:10.1016/j.cbpa.2010.11.011.
25. Davids T, Schmidt M, Böttcher D, Bornscheuer UT. Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17(2):215-220. doi:10.1016/j.cbpa.2013.02.022.
 26. Malik MS, Park ES, Shin JS. Features and technical applications of ω -transaminases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;94(5):1163-1171. doi:10.1007/s00253-012-4103-3.
 27. Balkenhohl F, Ditrich K, Hauer B, Ladner W. Optically Active Amines via Lipase-Catalyzed Methoxyacetylation. *J für Prakt Chemie/Chemiker-Zeitung.* 1997;339(1):381-384. doi:10.1002/prac.19973390166.
 28. Asano Y, Kato Y, Levy C, Baker P, Rice D. Structure and Function of Amino Acid Ammonia-lyases. *Biocatal Biotransformation.* 2004;22(2):133-140. doi:10.1080/10242420410001703496.
 29. Hollmann F, Arends IWCE, Holtmann D. Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chem.* 2011;13(9):2285. doi:10.1039/c1gc15424a.
 30. Koszelewski D, Tauber K, Faber K, Kroutil W. ω -Transaminases for the synthesis of non-racemic α -chiral primary amines. *Trends Biotechnol.* 2010;28(6):324-332. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.003.
 31. Parmeggiani F, Lovelock SL, Weise NJ, Ahmed ST, Turner NJ. Synthesis of D- and L-Phenylalanine Derivatives by Phenylalanine Ammonia Lyases: A Multienzymatic Cascade Process. *Angew Chemie - Int Ed.* 2015;54(15):4608-4611. doi:10.1002/anie.201410670.
 32. Lovelock SL, Lloyd RC, Turner NJ. Phenylalanine Ammonia Lyase Catalyzed Synthesis of Amino Acids by an MIO-Cofactor Independent Pathway. *Angew Chemie.* 2014;126(18):4740-4744. doi:10.1002/ange.201311061.
 33. Karl U, Andrea S. BASF's ChiPros® chiral building blocks: The cornerstones of your API syntheses! *Chem Today.* 2009;27(5):66-69.
 34. Torrelo G, Hanefeld U, Hollmann F. Biocatalysis. *Catal Letters.* 2015;145(1):309-345. doi:10.1007/s10562-014-1450-y.
 35. Höhne M, Bornscheuer UT. Biocatalytic routes to optically active amines. *ChemCatChem.* 2009;1(1):42-51. doi:10.1002/cctc.200900110.
 36. Yamada S, Nabe K, Izuo N, Nakamichi K, Chinata I. Production of l-

-
- Phenylalanine from trans -Cinnamic Acid with *Rhodotorula glutinis* Containing l-Phenylalanine Production of L-Phenylalanine from trans-Cinnamic Acid with *Rhodotorula glutinis* Containing L-Phenylalanine Ammonia- Lyase Activity. *Appl Environ Microbiol.* 1981;42(5):773-778.
37. Lovelock SL, Turner NJ. Bacterial *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase: A biocatalyst with broad substrate specificity. *Bioorganic Med Chem.* 2014;22(20):5555-5557. doi:10.1016/j.bmc.2014.06.035.
 38. Fuchs M, Farnberger JE, Kroutil W. The Industrial Age of Biocatalytic Transamination. *European J Org Chem.* 2015;2015(32):6965-6982. doi:10.1002/ejoc.201500852.
 39. Savile CK, Janey JM, Mundorff EC, et al. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science (80-).* 2010;329(5989):305-309. doi:10.1126/science.1188934.
 40. Bommarius AS, Schwarm M, Stingl K, Kottenhahn M, Huthmacher K, Drauz K. Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron: Asymmetry.* 1995;6(12):2851-2888. doi:10.1016/0957-4166(95)00377-0.
 41. Vedha-peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, Novick SJ. Creation of a Broad-Range and Highly Stereoselective D -Amino Acid Dehydrogenase for the One-Step Synthesis of D -Amino Acids. *Jacs.* 2006;128(5):10923-10929. doi:10.1021/ja0603960.
 42. Zhang K, Li H, Cho KM, Liao JC. Expanding metabolism for total biosynthesis of the nonnatural amino acid L-homoalanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(14):6234-6239. doi:10.1073/pnas.0912903107.
 43. Vedha-Peters K, Gunawardana M, Rozzell JD, Novick SJ. Creation of a broad-range and highly stereoselective D-amino acid dehydrogenase for the one-step synthesis of D-amino acids. *J Am Chem Soc.* 2006;128(33):10923-10929. doi:10.1021/ja0603960.
 44. Li H, Liao JC. Development of an NADPH-dependent Homophenylalanine dehydrogenase by protein engineering. *ACS Synth Biol.* 2014;3(1):13-20. doi:10.1021/sb400093x.
 45. Zhang D, Chen X, Zhang R, Yao P, Wu Q, Zhu D. Development of β -Amino Acid Dehydrogenase for the Synthesis of β -Amino Acids via Reductive Amination of β -Keto Acids. *ACS Catal.* 2015;5(4):2220-2224. doi:10.1021/cs5017358.

-
46. Abrahamson MJ, Vázquez-Figueroa E, Woodall NB, Moore JC, Bommarium AS. Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(16):3969-3972. doi:10.1002/anie.201107813.
 47. Schilling B, Lerch K. Amine oxidases from *Aspergillus niger*: identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1995;1243(3):529-537. doi:10.1016/0304-4165(94)00183-X.
 48. Mitsukura K, Suzuki M, Tada K, Yoshida T, Nagasawa T. Asymmetric synthesis of chiral cyclic amine from cyclic imine by bacterial whole-cell catalyst of enantioselective imine reductase. *Org Biomol Chem.* 2010;8(20):4533-4535. doi:10.1039/c0ob00353k.
 49. Carr R, Alexeeva M, Dawson MJ, Gotor-Fernandez V, Humphrey CE, Turner NJ. Directed evolution of an amine oxidase for the preparative deracemisation of cyclic secondary amines. *ChemBioChem.* 2005;6(4):637-639. doi:10.1002/cbic.200400329.
 50. Ahn Y, Ko SB, Kim MJ, et al. Deracemization of α -methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution. *Tetrahedron Lett.* 2008;43(4):1247-1250. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
 51. Dunsmore CJ, Carr R, Fleming T, Turner NJ. A chemo-enzymatic route to enantiomerically pure cyclic tertiary amines. *J Am Chem Soc.* 2006;128(7):2224-2225. doi:10.1021/ja058536d.
 52. O'Reilly E, Iglesias C, Turner NJ. Monoamine oxidase- ω -transaminase cascade for the deracemisation and dealkylation of amines. *ChemCatChem.* 2014;6(4):992-995. doi:10.1002/cctc.201300990.
 53. O'Reilly E, Iglesias C, Ghislieri D, et al. A regio- and stereoselective ω -transaminase/monoamine oxidase cascade for the synthesis of chiral 2,5-disubstituted pyrrolidines. *Angew Chemie - Int Ed.* 2014;53(9):2447-2450. doi:10.1002/anie.201309208.
 54. Mitsukura K, Suzuki M, Shinoda S, Kuramoto T, Yoshida T, Nagasawa T. Purification and Characterization of a Novel (*R*)-Imine Reductase from *Streptomyces* sp. GF3587. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(9):1778-1782. doi:10.1271/bbb.110303.
 55. Mitsukura K, Kuramoto T, Yoshida T, Kimoto N, Yamamoto H, Nagasawa T. A

-
- NADPH-dependent (S)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: Purification, characterization, gene cloning, and expression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(18):8079-8086. doi:10.1007/s00253-012-4629-4.
56. Leipold F, Hussain S, Ghislieri D, Turner NJ. Asymmetric reduction of cyclic imines catalyzed by a whole-cell biocatalyst containing an (S)-imine reductase. *ChemCatChem.* 2013;5(12):3505-3508. doi:10.1002/cctc.201300539.
57. Scheller PN, Fademrecht S, Hofelzer S, et al. Enzyme Toolbox: Novel Enantiocomplementary Imine Reductases. *ChemBioChem.* 2014;15(15):2201-2204. doi:10.1002/cbic.201402213.
58. Scheller PN, Nestl BM. The biochemical characterization of three imine-reducing enzymes from *Streptosporangium roseum* DSM43021, *Streptomyces turgidiscabies* and *Paenibacillus elgii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(24):10509-10520. doi:10.1007/s00253-016-7740-0.
59. Hussain S, Leipold F, Man H, et al. An (R)-Imine Reductase Biocatalyst for the Asymmetric Reduction of Cyclic Imines. *ChemCatChem.* 2015;7(4):579-583. doi:10.1002/cctc.201402797.
60. Gand M, Müller H, Wardenga R, Höhne M. Characterization of three novel enzymes with imine reductase activity. *J Mol Catal B Enzym.* 2014;110:126-132. doi:10.1016/j.molcatb.2014.09.017.
61. Sigrist R, da Costa BZ, Marsaioli AJ, de Oliveira LG. Nature-inspired enzymatic cascades to build valuable compounds. *Biotechnol Adv.* March 2015:1-18. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.010.
62. Resch V, Schrittwieser JH, Siirola E, Kroutil W. Novel carbon-carbon bond formations for biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;22(6):793-799. doi:10.1016/j.copbio.2011.02.002.
63. Stöckigt J, Antonchick AP, Wu F, Waldmann H. The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Angew Chemie - Int Ed.* 2011;50(37):8538-8564. doi:10.1002/anie.201008071.
64. Aleku GA, France SP, Man H, et al. A reductive aminase from *Aspergillus oryzae*. *Nat Chem.* 2017;(May). doi:10.1038/NCHEM.2782.
65. McIntosh JA, Coelho PS, Farwell CC, et al. Enantioselective intramolecular C-H

-
- amination catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes in vitro and in vivo. *Angew Chemie - Int Ed.* 2013;52(35):9309-9312. doi:10.1002/anie.201304401.
66. O'Reilly E, Turner NJ. Enzymatic cascades for the regio- and stereoselective synthesis of chiral amines. *Perspect Sci.* 2015;4:55-61. doi:10.1016/j.pisc.2014.12.009.
67. García-Junceda E, Lavandera I, Rother D, Schrittwieser JH. (Chemo)enzymatic cascades - Nature's synthetic strategy transferred to the laboratory. *J Mol Catal B Enzym.* 2015;114:1-6. doi:10.1016/j.molcatb.2014.12.007.
68. Höhne M, Kühl S, Robins K, Bornscheuer UT. Efficient asymmetric synthesis of Chiral amines by combining transaminase and pyruvate decarboxylase. *ChemBioChem.* 2008;9(3):363-365. doi:10.1002/cbic.200700601.
69. Both P, Busch H, Kelly PP, Mutti FG, Turner NJ, Flitsch SL. Whole-Cell Biocatalysts for Stereoselective C-H Amination Reactions. *Angew Chemie - Int Ed.* 2016;55(4):1511-1513. doi:10.1002/anie.201510028.
70. Both P, Busch H, Kelly PP, Mutti FG, Turner NJ, Flitsch SL. Whole-Cell Biocatalysts for Stereoselective C-H Amination Reactions. *Angew Chemie - Int Ed.* 2016;55(4):1511-1513. doi:10.1002/anie.201510028.
71. Abrahamson MJ, Wong JW, Bommarius AS. The evolution of an amine dehydrogenase biocatalyst for the asymmetric production of chiral amines. *Adv Synth Catal.* 2013;355(9):1780-1786. doi:10.1002/adsc.201201030.
72. Mutti FG, Knaus T, Scrutton NS, Breuer M. Europe PMC Funders Group Conversion of alcohols to enantiopure amines through dual enzyme hydrogen-borrowing cascades. 2016;349(6255):1525-1529. doi:10.1126/science.aac9283.Conversion.
73. Heath RS, Pontini M, Hussain S, Turner NJ. Combined Imine Reductase and Amine Oxidase Catalyzed Deracemization of Nitrogen Heterocycles. *ChemCatChem.* 2015:n/a-n/a. doi:10.1002/cctc.201500822.
74. France SP, Hussain S, Hill AM, et al. One Pot Cascade Synthesis of Mono- and Di-Substituted Piperidines and Pyrrolidines using Carboxylic Acid Reductase (CAR), ω -Transaminase (ω -TA) and Imine Reductase (IRED) Biocatalysts. *ACS Catal.* 2016:acscatal.6b00855. doi:10.1021/acscatal.6b00855.
75. Alexandre F-R, Pantaleone DP, Taylor PP, Fotheringham IG, Ager DJ, Turner NJ.

-
- Amine – boranes : effective reducing agents for the deracemisation of DL - amino acids using L -amino acid oxidase from *Proteus myxofaciens*. *Tetrahedron Lett.* 2002;43:707-710. doi:10.1016/S0040-4039(01)02233-X.
76. Beard TM, Turner NJ. Deracemisation and stereoinversion of [small alpha]-amino acids using D-amino acid oxidase and hydride reducing agents. *Chem Commun.* 2002;(3):246-247. doi:10.1039/b107580m.
77. Slabu I, Galman JL, Weise NJ, Lloyd RC, Turner NJ. Putrescine Transaminases for the Synthesis of Saturated Nitrogen Heterocycles from Polyamines. *ChemCatChem.* 2016:n/a-n/a. doi:10.1002/cctc.201600075.
78. Hepworth LJ, France SP, Hussain S, Both P, Turner NJ, Flitsch SL. Enzyme Cascades in Whole Cells for the Synthesis of Chiral Cyclic Amines. *ACS Catal.* 2017;7(4):2920-2925. doi:10.1021/acscatal.7b00513.
79. Wilce MCJ, Dooley DM, Freeman HC, et al. Crystal structures of the copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* in the holo and apo forms: Implications for the biogenesis of topaquinone. *Biochemistry.* 1997;36(51):16116-16133. doi:10.1021/bi971797i.
80. Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, et al. Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 ?? resolution. *Structure.* 1996;4(8):943-955. doi:10.1016/S0969-2126(96)00101-3.
81. Ghislieri D, Turner NJ. Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. 2014:284-300. doi:10.1007/s11244-013-0184-1.
82. Wilmot CM, Murray JM, Alton G, et al. Catalytic mechanism of the quinoenzyme amine oxidase from *Escherichia coli*: Exploring the reductive half-reaction. *Biochemistry.* 1997;36(7):1608-1620. doi:10.1021/bi962205j.
83. Pawelek PD, Cheah J, Coulombe R, Macheroux P, Ghisla S, Vrielink A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J.* 2000;19(16):4204-4215. doi:10.1093/emboj/19.16.4204.
84. Yamada H, Adachi O, Ogata K. Putrescine Oxidase, a Diamine Oxidase Requiring Flavin Adenine Dinucleotide. *Agric Biol Chem.* 1965;29(12):1148-1149. doi:10.1080/00021369.1965.10858523.
85. Carr R, Alexeeva M, Enright A, Eve TSC, Dawson MJ, Turner NJ. Directed

-
- Evolution of an Amine Oxidase Possessing both Broad Substrate Specificity and High Enantioselectivity. *Angew Chem.* 2003;115(39):4955-4958. doi:10.1002/ange.200352100.
86. Bóka B, Adányi N, Szamos J, Virág D, Kiss A. Putrescine biosensor based on putrescine oxidase from *Kocuria rosea*. *Enzyme Microb Technol.* 2012;51(5):258-262. doi:10.1016/j.enzmictec.2012.07.006.
 87. Lee J-I, Kim Y-W. Characterization of amine oxidases from *Arthrobacter aurescens* and application for determination of biogenic amines. *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29(4):673-682. doi:10.1007/s11274-012-1223-y.
 88. DeSa JR. Putrescine oxidase from *Micrococcus rubens*. *J Biol Chem.* 1972;247(17):5527-5534.
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00021369.1965.10858382>.
Accessed April 13, 2015.
 89. Ishizuka H, Horinouchi S, Beppu T. Putrescine oxidase of *Micrococcus rubens*: primary structure and expression in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* 1993;139(5):1115-1115. doi:10.1099/00221287-139-5-1115.
 90. Okada M, Kawasflma S. Substrate Specificity and Reaction Mechanism of Putrescine Oxidase. 1979;104:97-104.
 91. van Hellemond EW, van Dijk M, Heuts DPHM, Janssen DB, Fraaije MW. Discovery and characterization of a putrescine oxidase from *Rhodococcus erythropolis* NCIMB 11540. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;78(3):455-463. doi:10.1007/s00253-007-1310-4.
 92. Kopacz MM, Heuts DPHM, Fraaije MW. Kinetic mechanism of putrescine oxidase from *Rhodococcus erythropolis*. *FEBS J.* 2014;281(19):4384-4393. doi:10.1111/febs.12945.
 93. van Hellemond EW, Mazon H, Heck AJ, et al. ADP competes with FAD binding in putrescine oxidase. *J Biol Chem.* 2008;283(42):28259-28264. doi:10.1074/jbc.M803255200.
 94. Kopacz MM, Rovida S, van Duijn E, Fraaije MW, Mattevi A. Structure-based redesign of cofactor binding in putrescine oxidase. *Biochemistry.* 2011;50(19):4209-4217. doi:10.1021/bi200372u.
 95. Gaweska H, Fitzpatrick PF. Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. *Biomol Concepts.* 2011;2(5):365-377.

-
- doi:10.1515/BMC.2011.030.
96. Swain WF, Desa RJ. Mechanism of action of putrescine oxidase. *Biochim Biophys Acta - Enzymol.* 1976;429(2):331-341. doi:10.1016/0005-2744(76)90281-3.
 97. Kalgutkar A, Gardner I, Obach R, et al. A Comprehensive Listing of Bioactivation Pathways of Organic Functional Groups. *Curr Drug Metab.* 2005;6(3):161-225. doi:10.2174/1389200054021799.
 98. Meneely K, Lamb A. Structures of a Thiazolanyl Imine Reductase from *Yersinia enterocolitica* Provide Insight into Catalysis and Binding to the Nonribosomal Peptide Synthetase Module of. *Biochemistry.* 2012;51:9002-9013. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi3011016>.
 99. Li H, Williams P, Micklefield J, Gardiner JM, Stephens G. A dynamic combinatorial screen for novel imine reductase activity. *Tetrahedron.* 2004;60(3):753-758. doi:10.1016/j.tet.2003.10.114.
 100. Espinoza-Moraga M, Petta T, Vasquez-Vasquez M, Laurie VF, Moraes LAB, Santos LS. Bioreduction of beta-carboline imines to amines employing *Saccharomyces bayanus*. *Tetrahedron Asymmetry.* 2010;21(16):1988-1992. doi:10.1016/j.tetasy.2010.06.036.
 101. Chimni SS, Singh RJ. Bioreduction of a carbon-nitrogen double bond using immobilized baker's yeast - A first report. *World J Microbiol Biotechnol.* 1998;14(2):247-250. doi:10.1023/A:1008894416058.
 102. Mirabal-Gallardo Y, Soriano MDPC, Santos LS. Stereoselective bioreduction of beta-carboline imines through cell-free extracts from earthworms (*Eisenia foetida*). *Tetrahedron Asymmetry.* 2013;24(8):440-443. doi:10.1016/j.tetasy.2013.03.003.
 103. Rodríguez-Mata M, Frank A, Wells E, et al. Structure and activity of NADPH-dependent reductase Q1EQE0 from *Streptomyces kanamyceticus*, which catalyses the R-selective reduction of an imine substrate. *Chembiochem.* 2013;14(11):1372-1379. doi:10.1002/cbic.201300321.
 104. Fademrecht S, Scheller PN, Nestl BM, Hauer B, Pleiss J. Identification of imine reductase-specific sequence motifs. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 2016;84(5):600-610. doi:10.1002/prot.25008.
 105. Wetzl D, Berrera M, Sandon N, et al. Expanding the Imine Reductase Toolbox

-
- by Exploring the Bacterial Protein-Sequence Space. *ChemBioChem*. 2015;16(12):1749-1756. doi:10.1002/cbic.201500218.
106. Huber T, Schneider L, Präg A, Gerhardt S, Einsle O, Müller M. Direct reductive amination of ketones: Structure and activity of S-selective imine reductases from streptomyces. *ChemCatChem*. 2014;6(8):2248-2252. doi:10.1002/cctc.201402218.
107. Scheller PN, Lenz M, Hammer SC, Hauer B, Nestl BM. Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones. *ChemCatChem*. 2015;7(20):3239-3242. doi:10.1002/cctc.201500764.
108. Lenz M, Meisner J, Quertinmont L, Lutz S, Kästner J, Nestl BM. Asymmetric Ketone Reduction by Imine Reductases. *ChemBioChem*. 2017;18(3):253-256. doi:10.1002/cbic.201600647.
109. Scheller PN. Characterization and application of novel imine reductases. Dissertation, Universität Stuttgart. 2016.
110. Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem*. 1997;254(2):157-178. doi:10.1006/abio.1997.2428.
111. Alexeeva M, Enright A, Dawson MJ, Mahmoudian M, Turner NJ. Deracemization of alpha-methylbenzylamine using an enzyme obtained by in vitro evolution. *Angew Chem*. 2002;41(17):3177-3180. doi:10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3177::AID-ANIE3177>3.0.CO;2-P.
112. Alexeeva M, Carr R, Turner NJ. Directed evolution of enzymes: new biocatalysts for asymmetric synthesis. *Org Biomol Chem*. 2003;1(23):4133-4137. doi:10.1039/b311055a.
113. Holt A, Palcic MM. A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes. *Nat Protoc*. 2006;1(5):2498-2505. doi:10.1038/nprot.2006.402.
114. Sanger F, Nicklen S, Coulson a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
115. Dobos A, Hidvégi E, Somogyi GP. Comparison of five derivatizing agents for the determination of amphetamine-type stimulants in human urine by extractive acylation and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol*.

-
- 2012;36(5):340-344. doi:10.1093/jat/bks026.
116. Cunha SC, Faria MA, Fernandes JO. Gas Chromatography À Mass Spectrometry Assessment of Amines in Port Wine and Grape Juice after Fast Chloroformate Extraction / Derivatization. 2011:8742-8753.
117. Reetz MT, Bocola M, Carballeira JD, Zha D, Vogel A. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test. *Angew Chemie - Int Ed.* 2005;44(27):4192-4196. doi:10.1002/anie.200500767.
118. Li M, Binda C, Mattevi A, Edmondson DE. Functional role of the “aromatic cage” in human monoamine oxidase B: structures and catalytic properties of Tyr435 mutant proteins. *Biochemistry.* 2006;45(15):4775-4784. doi:10.1021/bi051847g.
119. Morris DR, Koffron KL. Putrescine Biosynthesis in Escherichia coli. 1969;244(22):6094-6099.
120. Schneider J, Wendisch VF. Biotechnological production of polyamines by Bacteria: Recent achievements and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;91(1):17-30. doi:10.1007/s00253-011-3252-0.
121. Chovancova E, Pavelka A, Benes P, et al. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(10):23-30. doi:10.1371/journal.pcbi.1002708.
122. Atkin KE, Reiss R, Koehler V, et al. The Structure of Monoamine Oxidase from *Aspergillus niger* Provides a Molecular Context for Improvements in Activity Obtained by Directed Evolution. *J Mol Biol.* 2008;384(5):1218-1231. doi:10.1016/j.jmb.2008.09.090.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Leonie Franziska Weinmann geb. Schön
Geburtsdatum und Ort	29.01.1989
Nationalität	deutsch

Akademische und schulische Laufbahn

Seit 07/2014	Promotion am Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Hauer
10/2008 – 05/2014	Studium Technische Biologie, Universität Stuttgart Abschluss: Diplom Biologin t.o. (technisch orientiert) Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Technische Biochemie, Universität Stuttgart Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Hauer Studienarbeit, Department of Biochemistry, University of Toronto Betreuerin: Prof. Dr. Cordula Enenkel
09/2005 – 06/2008	Zweites Städtisches Gymnasium Rottenburg a. N. Abschluss: allgemeine Hochschulreife