

Squalen-Hopen Zyklasen

vermittelte Friedel-Crafts Alkylierung

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

vorgelegt von
Sabrina Henche
aus Starnberg

Hauptberichter	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter	Prof. Dr. René Peters
Vorsitzender	Prof. Dr. Albert Jeltsch

Tag der mündlichen Prüfung	21.05.2019
----------------------------	------------

Institut für Biochemie und Technische Biochemie
Abteilung Technische Biochemie

~2019~

Die vorliegende Dissertation wurde unter Anleitung und Begleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer in der Zeit vom November 2015 bis Januar 2019 am Institut für Biochemie und Technische Biochemie, in der Abteilung Technische Biochemie, an der Universität Stuttgart angefertigt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

Syrén, P.-O., **Henche, S.**, Eichler, A., Nestl, B. M., Hauer, B., *Squalene-hopene cyclases – evolution, dynamics and catalytic scope*, Curr. Opin. Struct. Biol., **2016**, *41*, 73-82.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Squalen-Hopen Zyklasten vermittelte Friedel-Crafts Alkylierung“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Declaration of authorship

I hereby declare that this submission is entirely of my own and to the best of my knowledge has not been submitted, either in part or whole, for a degree at this or any other educational institution except where due acknowledgement is made in this work. Quotes and paraphrased material is clearly acknowledged and all sources are referenced.

Stuttgart, der 15.01.2019

Sabrina Henche

If you want to succeed, double your failure rate.

Thomas J. Watson

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer, der mir das Vertrauen schenkte, mich als „Auswärtige“ in seinen Arbeitskreis aufzunehmen und mir die Möglichkeit eröffnete, an einem tollen Projekt zu arbeiten, welches Chemie und Biochemie für mich ideal kombinierte. Ich möchte mich für Ihre immerwährende Unterstützung, auch in schwierigen Zeiten, Ihre Geduld und die fortlaufende Motivation während meiner Doktorarbeit an Ihrem Institut herzlich bedanken. Die Zeit hat mich fachlich sowie charakterlich stark geformt und zu dem gemacht, was ich heute bin.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. René Peters und Herrn Prof. Dr. Albert Jeltsch für die freundliche Übernahme des Zweitgutachters bzw. des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Mein ganz spezieller Dank geht an Dr. Bettina Nestl für die fortwährende fachliche Unterstützung, die ausführlichen Korrekturen sowie die stets hilfreichen Ratschläge. Ohne Dich würde das Institut nicht so funktionieren, wie es dies tut! An dieser Stelle möchte ich auch Dr. Bernd Nebel meinen Dank aussprechen, der das Institut aus technischer und aus manch menschlicher Sicht am Laufen hält.

Dr. Stephan Hammer möchte ich danken, weil er mir bei meinem ersten Besuch am ITB das interessante Forschungsprojekt nahe legte und immer mit Rat und Tat beiseite stand, wenn ich ihn fragte.

Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei den gesamten aktuellen sowie ehemaligen ITBlern. Da es sich um eine Vielzahl von Personen handelt, möchte ich an dieser Stelle keine Namen nennen, damit ich niemanden vergesse. Das ITB lebt von seiner Mischung aus Schwaben und Nicht-Schwaben und auch als Mittelhesse wird man dort herzlich in die Gemeinschaft aufgenommen ☺. Aufgrund dessen bin ich immer gern zur Arbeit gegangen und habe mich dort sehr wohl gefühlt. Zudem habe ich die Arbeitsatmosphäre als stets sehr angenehm empfunden und weiß sehr zu schätzen, dass man sich bei fachlichen Problemen immer an jedes ITB-Mitglied wenden konnte. Dies ist keinesfalls überall selbstverständlich.

Besonders danken möchte ich dem aktuellem Zyklaseteam, Svenja Diether und Andreas Schneider, welche bei fachlichen Fragestellungen immer Zeit für eine fruchtbare Diskussion fanden. Für die gute Arbeitsatmosphäre im „eigenen“ Labor möchte ich dem ganzen

Danksagung

Humboldt-Lab danken, inklusive dem Team candidum – es gab oft etwas worüber man zusammen diskutieren oder lachen konnte – Danke dafür! Besonders genossen habe ich zudem meinen morgendlichen Austausch mit Dr. Lars Hinner, welcher oftmals nicht nach dem „Guten Morgen“ endete, sondern bei dem ich morgens direkt nach dem Betreten des Instituts hängen blieb. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Jennifer Bischoff, die mich in die praktische Welt der Zyklen einführte und mir somit den Laboralltag etwas leichter machte. Mein Dank gilt zudem meinen Studenten Andreas Schneider, Julian Wissner und Jona Schelle. Dabei vor allem Jona, der mir im Laufe seiner Bachelorarbeit einige zunächst leicht anmutende Synthesen abnahm und im Zuge dessen sehr gute Arbeit leistete.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Kollegen und Freunden Jens Schmid, Nico Kreß und Svenja Diether, welche mir ein Auffangnetz in wirklich schweren Zeiten waren. Das vergess ich euch nie und wir bleiben in Kontakt, auch wenn es uns jetzt in alle Winde zerstreut.

Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei Dr. Birgit Claasen für die freundliche und immer sehr zuvorkommende Unterstützung bei den NMR-Experimenten.

Ich danke dem Fond der chemischen Industrie für die großzügige Unterstützung im Rahmen des Kekulé-Stipendiums sowie der Gesellschaft Deutscher Chemiker für die finanzielle Unterstützung für Konferenzen und Fortbildungen.

Danken möchte ich zudem meinem inzwischen langjährigen Studienfreund Paul, der immer für mich da ist, mir immer zuhört und bei dem ich mich freue, seinen weiteren Lebensweg als seine sehr gute Freundin begleiten zu dürfen. Zudem möchte ich meiner Freundin Anne meinen Dank aussprechen, die ich zwar noch nicht lange kenne, die aber im letzten Jahr ein fester und kontinuierlicher Bestandteil meines Lebens geworden ist.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie, die mich nicht nur finanziell, sondern auch mental auf diesem langen Weg unterstützte. Sie ermöglichte mir, meinen eigenen Weg zu gehen und somit meinen Träumen und Wünschen einen Schritt näher zu kommen. Dafür danke ich euch von ganzem Herzen. In diesem Sinne möchte ich auch meinem Freund Christopher danken, der mich trotz der Anspannung während der Doktorarbeit kennen und lieben lernte und mich seither stets unterstützte. Danke für die tolle gemeinsame Zeit, deine Geduld mit mir, deine stetige Aufmerksamkeit und deinen immerwährenden Beistand.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XV
Abstract	XVIII
1. Einleitung	1
1.1 Friedel-Crafts Alkylierung	2
1.1.1 Entdeckung und Progress	2
1.1.2 Asymmetrische Friedel-Crafts Alkylierung	7
1.1.3 Enzymkatalysierte Friedel-Crafts Alkylierung	10
1.2 Brønsted-Säurekatalyse in der Biokatalyse	12
1.3 Squalen-Hopen Zyklasten	14
1.3.1 Die natürliche Funktion und Struktur der <i>AacSHC</i>	14
1.3.2 Promiskuitive Aktivitäten der SHC Wildtypenzyme	18
1.3.3 Verbesserung der Katalysatorfähigkeit mittels <i>enzyme engineering</i>	19
1.3.4 Biologische Diversität – andere SHCs	23
2. Zielsetzung und Motivation	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Initiale Experimente	27
3.1.1 Verbesserung der Reaktionsbedingungen	29
3.1.2 Screening ausgewählter <i>AacSHC</i> Varianten	30
3.2 Erweiterung des Substratspektrums	33
3.2.1 Design und Synthese neuer Substrate	33
3.2.2 Umsetzung der neuen Substrate	34
3.2.3 Strukturaufklärung der Produkte von Substrat 36	37
3.3 Prima-Facie Assay	39
3.3.1 Etablierung des Prima-Facie Assays	39

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Substratscreening <i>via</i> Prima-Facie Assay	42
3.4	Sättigung der Schlüsselpositionen aus dem Prima-Facie Assay	46
3.5	Die Wasserhypothese und deren Evaluierung	50
3.6	Biologische Diversität nutzen – andere SHCs	53
3.6.1	Expression und Reaktionen mit anderen SHC Wildtypenzymen	54
3.6.2	Screening aller Substrate mittels Hit-Kandidaten	56
3.6.3	Austauschvarianten von <i>AacSHC</i> , <i>TelSHC</i> und <i>ZmoSHC1</i>	58
3.6.4	Einführung der Sättigungshits in <i>TelSHC</i> und <i>ZmoSHC1</i>	61
3.7	Kombinatorik aus Sättigungs- und Austauschvarianten der <i>AacSHC</i>	63
3.8	Umsetzung der Nicht-Ether-Substrate mit Hit-Kandidaten	64
3.9	Produktcharakterisierungen	67
3.9.1	En détail: Stereochemie des Hydratisierungsprodukts 31	69
3.10	Versuch der intermolekularen FC Alkylierung	71
4.	Diskussion	74
4.1	Auswahl des Modellenzym und Anpassung der Reaktionsbedingungen	74
4.2	Potentielle Produktpalette der Polyprenylphenyl-Umsetzungen	76
4.3	Erfolgreiche Alkylierung – Substratanforderungen	79
4.4	Neubetrachtung der Wasserhypothese	81
4.5	Die Sättigungsmutagenese – Trends und Hotspot-Übertragung	84
4.5.1	Sättigung der Position 261	84
4.5.2	Sättigung der Position 600	85
4.5.3	Sättigung in Position 607	86
4.5.4	Sättigung in Position 609	87
4.5.5	<i>Scaffold sampling</i>	88
4.6	Mögliche Gründe für das Misslingen der bimolekularen FC Alkylierung	89
4.7	Vergleich der aktiven Zentren von <i>AacSHC</i> und <i>TelSHC</i>	91
4.8	Allgemeine oder spezifische Schlüsselpositionen?	93
4.9	Negative (Bio-)Katalyse – SHCs und die <i>AacSHC</i> Variante Y420F	95

4.10	Biomimetische Friedel-Crafts Alkylierungen.....	97
5.	Resümee und Ausblick.....	100
6.	Material und Methoden	105
6.1	Material.....	105
6.1.1	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	105
6.1.2	Molekularbiologische Kits.....	105
6.1.3	Oligonukleotide.....	105
6.1.4	Plasmide.....	109
6.1.5	Mikroorganismen.....	115
6.1.6	Wachstumsmedien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	115
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	115
6.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese.....	115
6.2.2	Reinigung der PCR-Fragmente.....	116
6.2.3	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	117
6.2.4	Hitzeschocktransformation in <i>E. coli</i>	117
6.2.5	Plasmidpräparation und DNA-Sequenzierung.....	118
6.2.6	Wachstumsbedingungen und Glycerin-Dauerkulturen.....	118
6.3	Biochemische Methoden	119
6.3.1	Proteinproduktion	119
6.3.2	Proteinreinigung.....	120
6.3.3	SDS-PAGE	121
6.3.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	121
6.4	Chemisch-analytische Methoden.....	122
6.4.1	Gaschromatographie	122
6.4.2	Kernresonanzspektroskopie	123
6.5	Chemische Synthesen	124
6.5.1	Synthese von Geranylphenylether und seiner Derivaten.....	124
6.5.2	Synthese von (<i>E</i>)-(4,8-Dimethylnona-3,7-dien-1-yl)benzen	129

Inhaltsverzeichnis

6.5.3	Synthese eines Phenanthrenderivaten	130
6.6	Enzymatische Synthesen	131
6.6.1	Analytische Biotransformationen	131
6.6.2	Präparative Biotransformationen	133
6.7	Bioinformatische Methoden	141
6.7.1	Sequenzalignments und Erstellung von Homologiemodellen	141
6.7.2	Molekulare Dockingstudien	141
	Literaturverzeichnis	142
	Anhang	152
	Reinigung mittels IEX vom <i>TelSHC</i> Wildtypenzym	152
	Überblick der NCBI Nummern der SHCs	152
	Vektorkarten	153
	Gen- und Aminosäuresequenzen der <i>AacSHC</i> , <i>TelSHC</i> und <i>ZmoSHC1</i>	155
	Aminosäuresequenzen der anderen SHCs	157
	NMR-Spektren	159

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenkonzentration
°C	Grad Celsius
Å	Ångström
Äq.	Äquivalent
ar	aromatisch
Asp	Asparaginsäure
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BINAP	2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
BINOL	1,1'-Bi-2-naphthol
BOX	Bisoxazolin
bs	breites Signal
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
c	Konzentration
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPS	<i>ent</i> -Copalyl-Diphosphatsynthase
D	dextro von lat. <i>dexter</i> = rechts
d	Dublett
Da	Dalton
DC	Diterpen Zyklasten
dd	Dublett von Dublett
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophan-Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dt	Dublett vom Triplet

Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
E	Elution
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i>
EI	Elektronenstoßionisation (engl. <i>electron impact ionisation</i>)
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> = und andere
eV	Elektronenvolt
FC	Friedel-Crafts
FID	Flammenionisationsdetektor
FT	Durchfluss
g	Gramm
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GV	Glasreaktionsgefäße (engl. <i>glass vials</i>)
h	Stunde
His	Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IBTB	Institut für Biochemie und Technische Biochemie
IEX	Ionenaustauscher-Chromatographie (engl. <i>ion exchange chromatography</i>)
k	kilo
kb	Kilobase
KOAc	Kaliumacetat
L	laevo von lat. <i>laevus</i> = links
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LmrR	<i>Lactococcal multidrug resistance Regulator</i>
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	milli (10^{-3}) oder Meter
M	molar
M	Größenstandard
m	Multipllett
$m z^{-1}$	Masse-zu-Ladung-Verhältnis

Abkürzungsverzeichnis

MHz	Megahertz
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MTasen	Methyltransferasen
MW	Molekularemasse
n	nano (10^{-9})
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OSC	Oxidosqualen Zyklasten
<i>p</i>	<i>para</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pdb	Protein Data Bank
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
quart	quartär
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolution per minute</i>)
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde oder Singulett
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin
SHC	Squalen-Hopen Zyklaste
t	Triplett
TB	<i>terrific broth</i>
td	Triplett vom Dublett
TfB	Transformationspuffer (engl. <i>transformation buffer</i>)
THF	Tetrahydrofuran

TM	<i>Trade Mark</i>
T _{max}	maximale Temperatur
TOF	Wechselzahl (engl. <i>turnover frequency</i>)
Ts	Tosyl
V	Volt
W	Waschschritt
WT	Wildtypenzym
δ	chemische Verschiebung
μ	mikro (10 ⁻⁶)

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

Einbuchstabencode der Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Bakterienspezien

<i>Aac</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
<i>Aaci</i>	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>
<i>Ace</i>	<i>Acidothermus cellolyticus</i>
<i>Apa</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Bam</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i>
<i>Bja</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Cac</i>	<i>Catenulispora acidiphila</i>
<i>Gth</i>	<i>Geobacillus thermodentrificans</i>
<i>Mca</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i>
<i>Pca</i>	<i>Pelobacter carbinolicus</i>
<i>Rpa</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
<i>Sco</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>Sfu</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>
<i>Ssc</i>	<i>Streptomyces scabiei</i>
<i>Ssv</i>	<i>Streptomyces sviveus</i>
<i>Sth</i>	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>
<i>Svi</i>	<i>Saccharomonospora viridis</i>
<i>Tel</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
<i>Ttu</i>	<i>Teredinibacter turnerae</i>
<i>Zmo</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>

Zusammenfassung

Die Friedel-Crafts Alkylierung ist bis heute eine Schlüsselreaktion zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zum Aufbau von komplexen Kohlenstoffgerüsten, wie sie häufig in Wirk- und Naturstoffen zu finden sind. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Bandbreite der klassisch chemischen Katalysatoren sowie das Substratspektrum weitestgehend erforscht. Dabei beschränkt sich jedoch das Substratspektrum hauptsächlich auf elektronenreiche Heteroaromaten, wie z.B. Indole, Pyrrole und Furane. Während bei diesen Substraten die Kontrolle der Diastereo- und Enantioselektivität gut verstanden ist, sind in der klassischen Chemie die Beispiele für asymmetrische Umsetzungen mit reinen Kohlenstoffaromaten rar gesät. Für eine solche asymmetrische Umsetzung stellen Biokatalysatoren, wie z.B. Enzyme, eine attraktive Alternative dar. Da bis zum heutigen Zeitpunkt nur wenige Beispiele für Biokatalysatoren bekannt sind, welche in der Lage sind, eine Friedel-Crafts Alkylierung zu katalysieren, stellt diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zu deren Untersuchungen dar.

Neben Prenyl- und Methyltransferasen gelten die Squalen-Hopen Zyklasten (SHCs) als vielversprechende Katalysatoren in diesem Bereich. So konnten HAMMER *et al.* in vorherigen Arbeiten zeigen, dass die SHC1 aus *Zymomonas mobilis* (*Zmo*) in der Lage ist, selektiv eine intramolekulare Friedel-Crafts Alkylierung des Geranylphenylethers zu katalysieren. Für die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der vorhandenen Kristallstruktur des Enzyms sowie des guten Verständnisses des Enzymsystems die SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*) zunächst als Modellsystem ausgewählt, um die enzymkatalysierte intramolekulare Friedel-Crafts Alkylierung näher zu untersuchen.

Initiale Biotransformationen mit dem Modellsubstrat Geranylphenylether führten dabei zu der Erkenntnis, dass die *Aac*SHC im Gegensatz zur *Zmo*SHC1 keinesfalls selektiv gegenüber dem Alkylierungsprodukt ist, sondern im gleichen Maße ein Hydratisierungsprodukt bildet. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit befasst sich daher mit der Aktivitäts- sowie der Selektivitätssteigerung der *Aac*SHC gegenüber der Alkylierungsreaktion. Im Zuge dessen wurden außerdem unterschiedlich substituierte Substrate synthetisiert, um die Substituenteneffekte bezüglich der Friedel-Crafts Alkylierung mit der *Aac*SHC zu untersuchen. Anhand des Modellsubstrats Geranylphenylether konnten geeignete Reaktionsbedingungen für einen höheren Durchsatz an Enzymvarianten ermittelt werden. Daraufhin wurde ein Ganz-Zell-Screening in Mikrotiterplatten etabliert, um schnell und effizient die vorhandene *Aac*SHC Variantenbibliothek mit den gewählten Substraten zu

screenen. Hierdurch konnten vier Schlüsselpositionen (I261, G600, L607 und Y609) in der *AacSHC* identifiziert werden, welche einen maßgeblichen Einfluss auf die Aktivität sowie Selektivität der *AacSHC* ausübten. Durch die nachfolgende Sättigungsmutagenese dieser Positionen konnte die Produktbildung (*AacSHC* Wildtypenzym: 3 %) um das 6fache und die Produktselektivität gegenüber dem Alkylierungsprodukt auf 90 % (*AacSHC* Wildtypenzym: 50 %) gesteigert werden. Darüber hinaus war es aber auch möglich die Produktselektivität gegenüber dem Hydratisierungsprodukt auf 95 % (*AacSHC* Wildtypenzym: 50 %) zu erhöhen.

In einem nächsten Schritt wurden zwölf weitere SHC Wildtypenzyme mit einer Sequenzidentität ≥ 52 % zum *AacSHC* Wildtypenzym auf ihre Produktbildung mit dem Modellsubstrat Geranylphenylether untersucht. Dabei kristallisierte sich heraus, dass ausschließlich die *AacSHC* in der Lage war, das Modellsubstrat zu hydratisieren. Alle anderen getesteten SHCs, welche Produktbildung aufwiesen, stellten selektiv das Alkylierungsprodukt dar. Als besonders vielversprechend erwies sich dabei die SHC aus *Thermosynechococcus elongatus* (*Tel*), welche eine 4,5fach höhere Produktbildung (14 %) wie das *AacSHC* Wildtypenzym aufwies und zudem noch selektiv das Alkylierungsprodukt produzierte.

Diese Erkenntnis motivierte, die Aminosäuresequenzen des Modellenzym *AacSHC* mit der *TelSHC* zu vergleichen, um zu überprüfen, ob sich durch Transfer bestimmter Aminosäurepositionen signifikante Katalyseeigenschaften auf die *AacSHC* übertragen lassen. Zusätzlich wurde die *ZmoSHC1* zum Vergleich herangezogen, da diese den ursprünglichen selektiven SHC-basierten Friedel-Crafts Katalysator darstellt. Tatsächlich konnte durch die Durchführung dieses Konsensus-Ansatzes die Produktbildung von 3 % beim *AacSHC* Wildtypenzym auf 14 % unter Verwendung der *AacSHC* Variante Y420F und die Produktselektivität gegenüber dem Alkylierungsprodukt von 50 % auf 97 % bedeutend gesteigert werden. Zudem wurden die besten Varianten aus der Sättigungsmutagenese und dem Konsensus-Ansatz in Doppelmutanten kombiniert. Auf diesem Wege wurde die Produktbildung im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym um das 12fache gesteigert. Dabei ist diese Variante nun vollständig selektiv gegenüber der Alkylierung. Auch der inverse Ansatz einer Übertragung der Schlüsselpositionen in die *TelSHC* und *ZmoSHC1* erwies sich als erfolgreich. Hierdurch wurden zwei Einzelvarianten generiert, welche im Vergleich zum *TelSHC* Wildtypenzym eine 3fach gesteigerte Produktbildung (von bis zu 41 %) aufwiesen.

Somit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass geringfügige Variationen im SHC-Enzymkatalysator ausreichend sind, um einen selektiven Alkylierungskatalysator mit deutlich

erhöhten Produktbildungen zu generieren. Dementsprechend demonstriert und bestätigt diese Arbeit das inhärente Potential des SHC-Biokatalysators für eine Alkylierung nach Friedel und Crafts.

Abstract

To this day the Friedel-Crafts alkylation is one of the key reactions towards the formation of carbon-carbon bonds to construct complex carbon scaffolds occurring in drugs or natural products. Nowadays the scope of classical chemical catalysts and the substrate spectrum is well explored. However, the substrate spectrum is mainly restricted to electron rich heteroaromatic compounds including indoles, pyrroles and furanes. The control of diastereo- and enantioselectivity for these substrates is well understood, whereas just a few examples are known for asymmetric conversions with aromatic carbon systems. Biocatalysts, such as enzymes, provide an attractive alternative for such asymmetric conversions. Since only a small number of biocatalysts able to catalyze a Friedel-Crafts alkylation are known to date, this thesis presents a valuable contribution towards their exploration.

Besides prenyl- and methyltransferases, squalene-hopene cyclases (SHCs) are considered as promising catalysts in this field. In this regard, Hammer *et al.* could demonstrate in previous studies that SHC1 from *Zymomonas mobilis* (*Zmo*) is able to selectively catalyze an intramolecular Friedel-Crafts alkylation of geranyl phenyl ether. For the present study the SHC from *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*) was initially chosen as a model system to survey the enzyme-induced, intramolecular Friedel-Crafts alkylation because its crystal structure is available and this enzyme system is well investigated.

Initial biotransformations with the model substrate geranyl phenyl ether showed, that in contrast to the *Zmo*SHC1, the *Aac*SHC is unselective towards the alkylation product. In addition to the alkylation product also a hydration product was observed to an equal extent.

The aim of this thesis was to enhance the activity and selectivity of the *Aac*SHC towards the alkylation reaction. Moreover, substituted substrates were synthesized to study the influence of substituents on the Friedel-Crafts alkylation with *Aac*SHC. Using the model substrate geranyl phenyl ether, suitable reaction parameters for higher throughput of enzyme variants were identified. Subsequently, a whole cell screening in microtiter plates was established to screen the available *Aac*SHC variant library with the chosen substrates in a fast and efficient way. Based on the screening, four key positions (I261, G600, L607 and Y609) for *Aac*SHC activity and selectivity were found. The following saturation mutagenesis at these positions resulted in a 6fold higher product formation (*Aac*SHC wild type enzyme: 3 %) and a product selectivity of 90 % towards the alkylation product (*Aac*SHC wild type enzyme: 50 %). Furthermore, the product selectivity towards the hydration product was enhanced to 95 % (*Aac*SHC wild type enzyme: 50 %).

In a following step, twelve additional SHC wild type enzymes having a sequence identity of $\geq 52\%$ to the *AacSHC* wild type enzyme were tested in the conversion of the model substrate geranyl phenyl ether. It became apparent that solely the *AacSHC* was able to hydrate the model substrate. The other active SHCs selectively produced the alkylation product. Especially promising was the SHC from *Thermosynechococcus elongatus* (*Tel*), which showed a 4.5fold higher product formation (14 %) compared to the *AacSHC* wild type enzyme and moreover, produced the alkylation product in a selective manner.

These promising results led to the comparison of the amino acid sequences of *AacSHC* and *TelSHC* to study whether it was possible to transfer relevant catalytic features into the *AacSHC* by exchanging specific amino acid positions. In addition, *ZmoSHC1* was included in this comparison as it is the initially described selective SHC-based Friedel-Crafts catalyst. The consensus approach led to an increase in product formation from 3 % using the *AacSHC* wild type enzyme to 14 % using the *AacSHC* variant Y420F. At the same time the product selectivity towards the alkylation product could be significantly enhanced from 50 % to 97 %. Moreover, the best variants of saturation mutagenesis and consensus approach were combined in double variants. Using the generated double variants, the product formation could be increased 12fold compared to the *AacSHC* wild type enzyme while simultaneously increasing the selectivity towards the alkylation product to 100 %. Also the inverse approach of transferring the key positions into the *TelSHC* and into the *ZmoSHC1* proved successful. Two of the generated single variants showed 3fold higher product formation (up to 41 %) compared to the *TelSHC* wild type enzyme.

In conclusion, it was successfully demonstrated that minor variations in the SHC enzyme catalyst are sufficient to generate a selective alkylation catalyst featuring significantly increased product formations. Consequently, this thesis demonstrates and confirms the inherent potential of SHC biocatalysts for an alkylation according to Friedel and Crafts.

1. Einleitung

„The carbon-carbon (C-C) bond forms the ‘backbone’ of nearly every organic molecule, and lies at the heart of the chemical sciences!”^[1]

Goutam Brahmachari

Die fundamentale Basis eines jeden organischen Moleküls stellt das Kohlenstoffrückgrat der Verbindung dar. Ist die organische Chemie als die Chemie der Kohlenstoffverbindungen definiert, so muss die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoffbindungen wohl als Herz der Organik bezeichnet werden. Somit ist es nicht weiter verwunderlich, dass in der organischen Chemie weit über 100 C-C-bindungsknüpfende Reaktionen bekannt sind. Die prominentesten unter ihnen sind wohl die Aldol-^[2] und die metallorganischen Reaktionen, wie die unterschiedlichen Kreuzkupplungen^[3], die Metathese-^[4], Claisen-^[5], Wittig-^[6] und Friedel-Crafts^[7] Reaktionen sowie die Enolatalkylierungen^[8], um nur eine Hand voll zu nennen.

Bietet die organische Chemie bereits ein enorm breites Spektrum an C-C-bindungsknüpfenden Reaktionen, so ist im Vergleich die Anzahl an enzymkatalysierten C-C-bindungsknüpfenden Reaktionen noch auffallend gering. Die bestuntersuchte Enzymklasse auf diesem Anwendungsfeld sind wohl die Lyasen^[9-13], welche Aldolasen, Zyklasen, Carboxylasen, aber auch solche speziellen Enzyme wie Diels-Alderasen^[13] und Pictet-Spenglerasen^[12] umfassen. Zudem vermitteln Transketolasen, Carboligasen sowie Methyl- und Prenyltransferasen eine C-C-Bindungsknüpfung.^[10] Seit jüngstem ist sogar bekannt, dass evolvierte Oxidasen, wie P450 Monooxygenasen, in der Lage sind, eine solche Bindungsknüpfung zu katalysieren, indem sie einen Carben-Transfer vermitteln.^[14] An dem Beispiel mit den Monooxygenasen wird ersichtlich, welch großes Potential in diesem Gebiet der Biokatalyse steckt. Zudem besitzen Biokatalysatoren gegenüber den klassischen Katalysatoren einige Vorteile. So sind Biokatalysatoren in einem hohen Maße chemo-, regio-, diastereo- und zumeist enantioselektiv. Viele Enzyme zeigen zudem in ihrer nativen Form promiskuitive Aktivität und können somit weitgehendst unkompliziert mittels Enzymevolution für neue Substrate oder Reaktion evolviert werden. Außerdem kann auf die Verwendung von Schutzgruppen, chiralen Auxiliaren, metallbasierten Katalysatoren und harschen Reaktionsbedingungen verzichtet werden^[11,15,16], sodass enzymkatalysierte Reaktionen eine attraktive, effiziente und umweltfreundliche Alternative gegenüber den klassischen homogenkatalysierten Reaktionen darstellen. Aus diesen Gründen stellt sich die weitere Erforschung von C-C-bindungsknüpfenden Enzymen, wie in der vorliegenden Arbeit an der

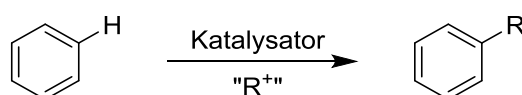
Squalen-Hopen Zyklase, als immens relevant dar, da sie metallkatalysierte Prozesse ablösen und somit ein maßgeblicher Beitrag zur Nachhaltigkeit der Chemie leisten können.

1.1 Friedel-Crafts Alkylierung

1.1.1 Entdeckung und Progress

Im Jahre 1877 isolierten Charles Friedel und James Mason Crafts Pentylbenzol, nachdem sie 1-Chlorpentan unter Zugabe von Aluminiumtrichlorid in Benzol zur Reaktion gebracht hatten und führten damit erstmals die nach ihnen benannte Alkylierungsreaktion durch.^[7] Die Friedel-Crafts (FC) Alkylierung ist somit die älteste Reaktion, welche sich einer Lewis-Säure als Katalysator bedient.^[17]

Allgemein gesprochen ist die FC Alkylierung eine aromatische elektrophile Substitution, bei der ein Proton eines Aromaten in Anwesenheit einer Lewis- oder Brønsted-Säure durch eine formal positiv geladene Alkylgruppe R^+ substituiert wird (Abbildung 1).^[18,19]



Katalysator: Lewis- oder Brønsted-Säure

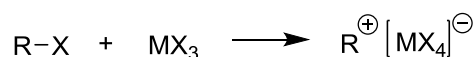
Abbildung 1: Prinzip der Friedel-Crafts Alkylierung.

Die Aktivierung der elektrophilen Komponente erfolgt dabei, indem die Lewis-Säure an das Halogenatom des Alkylhalogenids koordiniert (Abbildung 2). Dadurch wird die R-X-Bindung geschwächt, da weitere Elektronendichte vom α -Kohlenstoff abgezogen wird. Diese Interaktion konnte in vielfachen Untersuchungen nachgewiesen werden.^[20-22] Die Frage, ob die aktivierte Spezies anschließend ausschließlich eine positive Partialladung am α -Kohlenstoff trägt, oder ob ein carbokationisches, hochreaktives Intermediat vorliegt, konnte bisher jedoch noch nicht geklärt werden.^[19] Anschließend kommt es entweder zu der Ausbildung eines π -Komplexes, indem die aktivierte Spezies mit dem aromatischen System interagiert, oder ein σ -Komplex wird ausgebildet, wobei eine neue kovalente Bindung geknüpft und ein Carbokation erzeugt wird.^[23-25] Durch die nachfolgende Abspaltung eines Protons wird die Aromatizität zurückgewonnen, sodass dieser Schritt schon von einer schwachen Base, wie Cl^- , gewährleistet werden kann.^[8]

Die klassische FC Alkylierung birgt einige Probleme, wie beispielsweise das Auftreten von Mehrfachalkylierungen.^[8,18] Diese Problematik ergibt sich aus dem Sachverhalt, dass das

resultierende Alkylaren elektronenreicher und somit reaktiver ist als das initiale Edukt. Diese Weiterreaktion des Monoalkylarens zum Dialkylaren lässt sich partiell dadurch verhindern, dass ein Überschuss der aromatischen Komponente eingesetzt wird.^[8] Zusätzlich ist die Kontrolle der Regioselektivität während der Alkylierung eine Herausforderung. Für die FC Alkylierung wird ein elektronenreicher Aromat benötigt, damit dieser als Nukleophil wirken kann. Dafür werden entweder Heteroaromaten oder Arene mit elektronendonierenden Gruppen genutzt, welche die Alkylierung ausschließlich in *ortho*- oder *para*-Position dirigieren. Eine selektive Alkylierung in eine der Positionen sowie in *meta*-Position ist schwer zu gewährleisten.^[8] Eine weitere Schwierigkeit ist, dass FC Alkylierungen nur mit stabilen Kationen der elektrophilen Komponente erfolgreich gelingen. So wird z.B. bei der Alkylierung von Benzol mit *n*-Propylchlorid nur als Nebenprodukt das gewünschte *n*-Propylbenzol gebildet. Als Hauptprodukt wird *iso*-Propylbenzol dargestellt, da das entstehende *n*-Propylkation zum stabileren, tertiären Isopropylkation umlagert.^[8,18]

Aktivierung der elektrophilen Komponente



Elektrophiler Angriff und Protonabspaltung

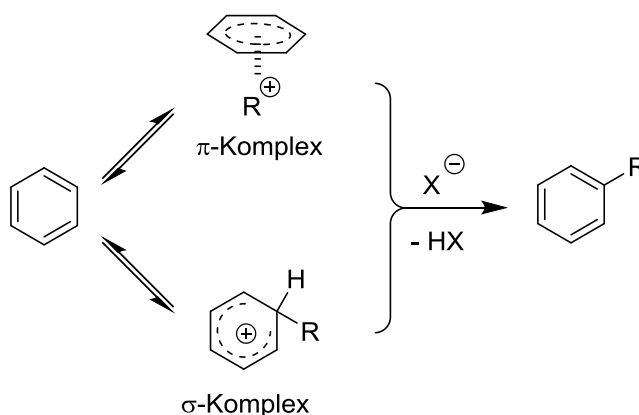


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der FC Alkylierung. Zunächst erfolgt die Aktivierung der elektrophilen Komponente, dabei steht R für einen Alkylrest, X für ein Halogenatom und M für ein Metall. Anschließend interagiert die aktivierte elektrophile Komponente entweder über einen π - oder σ -Komplex mit dem Aromaten und es kommt nach der Abspaltung eines Protons zur Ausbildung des Arylarens. Die Abbildung wurde partiell [19] entnommen und modifiziert.

In der Lehre findet oftmals nur die klassische FC Alkylierung zwischen reaktiven Alkylhalogeniden und Aromaten in Anwesenheit einer Lewis-Säure Erwähnung. Jedoch wurde in den letzten 140 Jahren intensiv in diesem Feld geforscht, sodass die FC Alkylierung in der heutigen Zeit sehr viel umfassender einsetzbar ist und noch immer eines der

leistungsstärksten Werkzeuge in der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsknüpfung in einer Vielzahl von Synthesen und industriellen Prozessen darstellt.

In den letzten Jahrzehnten konnten unter anderem weitere Lewis- (AlBr_3 , GaCl_3 , FeCl_3 , TiCl_4 , BF_3 , u.v.m), aber auch starke Brønsted-Säuren (HF , $\text{HF}\cdot\text{SbF}_5$, H_3PO_4 , H_2SO_4) identifiziert werden, welche in der Lage sind die FC Alkylierung zu katalysieren.^[17,19] Zunächst mussten diese noch in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden, um eine erfolgreiche Alkylierung gewährleisten zu können, jedoch ist heutzutage nur noch ein Einsatz von katalytischen Mengen erforderlich.^[17]

Einen weiteren Kernpunkt stellt die Reaktivität des aromatischen Systems dar. Gilt Benzol selbst als elektronenneutral, so entsprechen beispielsweise Pyrrole auch der Hückel-Regel^[26,27], weisen jedoch durch ihre Fünfringstruktur bei gleicher π -Elektronenzahl im Vergleich zum Benzol-Sechsring eine höhere Elektronendichte auf. Dies gilt ebenso für Indole, welche das strukturelle Grundmotiv von über 3000 isolierten Naturstoffen darstellen.^[19] Aufgrund der erhöhten Reaktivität dieser *N*-Heterozyklen finden genau diese hauptsächlich (bei 80 % der publizierten Veröffentlichungen^[19]) in der FC Alkylierung Anwendung.^[28-37] Eine weitere Alternative, die Elektronendichte des aromatischen Systems zu steigern, ist die Einführung von elektronendonierenden Gruppen, wie z.B. Ethern, Aminen und Hydroxygruppen. Durch diese Substituenten wird das aromatische System aktiviert und dessen Reaktivität gegenüber der elektrophilen Komponente gesteigert. Mittels dieser Methodik werden Furane^[38-41] sowie Thiophene^[41], aber auch einfache Benzol^[42-44]- und Naphthalinderivate^[45-47] für die FC Alkylierung zugänglich gemacht. Den gegenteiligen und somit desaktivierenden Effekt zeigen elektronenziehende Gruppen, wie z.B. Nitrile, Sulfonate, Nitro- und Carbonylgruppen. Aromaten mit einem solchen Substitutionsmuster finden in der FC Alkylierung durch ihre verringerte Elektronendichte keine Anwendung.

Zusätzlich gelang es, statt der toxischen Alkylhalogenide, eine Vielzahl an anderen elektrophilen Komponenten in der FC Alkylierung zu nutzen (Abbildung 3). Auf den ersten Blick ist hierbei die Verwendung von Alkoholen^[48-50] (Abbildung 3 A), Alkenen^[51-53], auch in allylischer Form^[54], (Abbildung 3 B und C) und Allenen^[55,56] besonders attraktiv, da hierbei nur Wasser in stöchiometrischen Mengen oder gar kein zusätzliches Nebenprodukt anfällt. Dabei müssen die Katalysatoren, welche eine FC Alkylierung mit Alkoholen begünstigen sollen, jedoch eine hohe Toleranz gegenüber Wasser aufweisen, wie es beispielsweise diverse Salze der Seltenen Erden^[57-59] sowie einige starke Brønsted-Säuren^[60,61] tun. Zudem werden für eine FC Alkylierung mit diesen Elektrophilen harsche Reaktionsbedingungen sowie hohe Katalysatorladungen benötigt.^[19]

Einleitung

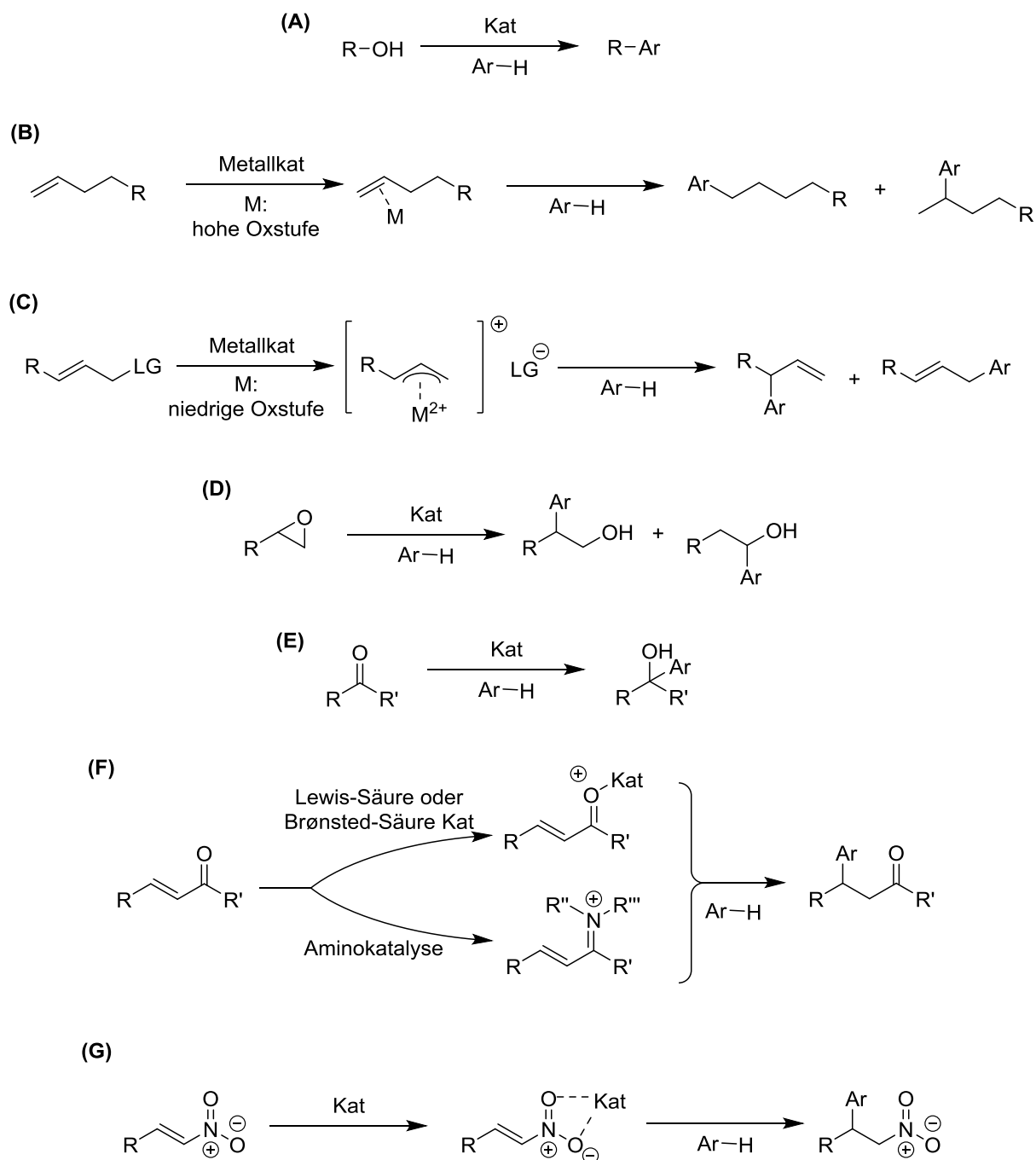


Abbildung 3: Portfolio der möglichen elektrophilen Komponenten der FC Alkylierung. Dabei reicht das Spektrum von Alkoholen (A), über nicht aktivierte Doppelbindungen (B), dabei auch allylische (C), Epoxide (D), Carbonyle (E), Michaelakzeptoren (F) bis hin zu Nitroalkenen (G). Zusammengestellt und modifiziert nach [19].

Andere elektrophile Komponenten für die FC Alkylierung, bei denen auch kein zusätzliches Nebenprodukt anfällt, sind beispielsweise Epoxide^[62] (Abbildung 3 D), aktivierte Carbonyle^[29,42] (Abbildung 3 E) und aktivierte Doppelbindungen (Michaelakzeptoren), wie α , β -ungesättigte Ketone^[28,30,34,36,37,39] (Abbildung 3 F) und Nitroalkene^[33,35,38,40,46] (Abbildung 3 G). Die Aktivierung verläuft dabei jeweils über eine Koordination der

Carbonyl- bzw. der Nitrogruppe durch den Lewis-Säure- oder Brønsted-Säure-Katalysator, was zu einer Erniedrigung des LUMOs der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung führt.^[19] Bei der sogenannten Aminokatalyse (Abbildung 3 F) kommt es durch den Einsatz eines Organokatalysators (sekundäres Amin) zur *in situ* Bildung eines reaktiven Iminiumintermediats und somit zur Aktivierung der Doppelbindung des α , β -ungesättigten Ketons.^[19]

Wie zu Beginn erwähnt, spielt die FC Alkylierung auch heute in der industriellen Anwendung noch eine bedeutende Rolle. Die Katalyse wird hierbei zumeist durch HF oder heterogene Säurekatalysatoren, wie z.B. Zeolithe, gewährleistet.^[19] Die prominentesten Vertreter, welche auf diese Weise hergestellt werden, sind Ethylbenzen (15 Mt A^{-1})^[19,63], welches hauptsächlich in der Styrolherstellung weiterverarbeitet wird, und Cumen (10 Mt A^{-1})^[19], welches im Hock-Verfahren zur Herstellung von Aceton und Phenol^[64] als Zwischenprodukt in Erscheinung tritt. Zudem werden dialkylierte Biarylsysteme, welche Vorläufer von Dicarbonsäuren darstellen und in der Herstellung von Hochleistungskunststoffen eine Rolle spielen^[65], mittels FC Alkylierung hergestellt.^[19] Von besonderem Interesse sind auch Diarylalkane^[19], welche ein passendes Grundgerüst für viele biologisch aktive Naturstoffe aufweisen, wie z.B. für Phenprocoumon^[17,51,52] (Antikoagulation, Handelsname: Marcumar), Papaverin^[17,51] (Spasmolytikum) und Beclobrat^[17,51] (Antilipidämikum). Zusätzlich spielt die FC Alkylierung auch in der Vanillin-Herstellung eine Rolle, da mit ihr aus Guaiacol der Vanillin-Precursor 4-Hydroxymethylguaiacol gewonnen werden kann.^[66]

Die FC Alkylierung stellt somit eine der ältesten organischen Synthesemethoden dar, welche heute noch einen essentiellen Wert für die C-C-Bindungsknüpfung aufweist. Das Substrat- und Katalysatorspektrum wurden über die letzten Jahrzehnte maßgeblich erweitert, wobei in diesem Kapitel der Schwerpunkt auf der achiralen Synthese mittels FC Alkylierung gelegen hat. Aber auch die asymmetrische FC Katalyse wurde in den letzten Jahren vorangebracht, wie im Nachfolgenden (Kapitel 1.1.2) ausgeführt werden soll.

1.1.2 Asymmetrische Friedel-Crafts Alkylierung

Die Erforschung der enantioselektiven FC Alkylierung rückte erst vor gut 20 Jahren in den Fokus der chemischen Gemeinschaft. Zuvor waren die Beispiele für eine chirale FC Alkylierung rar gesät.^[67] Die erste asymmetrische Lewis-saure FC Katalyse wurde 1985 mittels der Reaktion von Phenol mit Trichloracetaldehyd durchgeführt. Dabei führte der Einsatz eines (-)-Menthol-Al-Katalysators zu einer hohen *ortho*-Regioselektivität sowie zu einem *ee* von 80 %.^[68] Fünf Jahre später gelang erstmals die Formierung eines benzyllischen Stereozentrums durch eine FC Alkylierung unter Einsatz eines ZrCl₃-Dibornacylclopentadienyl-Katalysators in katalytischen Mengen (5 mol%).^[47] Schließlich erfuhr das Feld der asymmetrischen FC Alkylierung ab 1999 mit dem Einsatz von chiralen Kupferkomplexen^[69] große Aufmerksamkeit in den chemischen Wissenschaften und die Publikationszahlen auf diesem Gebiet stiegen rasant.^[67]

Die erste asymmetrische FC Alkylierung mit Alkenen wurde dann unter Einsatz eines Kupferkatalysators mit chiraalem Bisoxazolin (BOX)-Liganden (Abbildung 4) gewährleistet.^[44] Dabei wurden Substrate gewählt, welche aufgrund ihrer funktionellen Gruppen in der Lage sind ein- oder zweizählig an den chiralen Katalysator zu koordinieren, wie z.B. β,γ -ungesättigte α -Ketoester oder Alkyldenmalonate. Dies sorgt für die Abschirmung eines Halbraumes durch den Katalysator-Ligand-Komplex und sichert somit den chiralen Verlauf der Alkylierung.^[67] In den nachfolgenden Jahren wurden die BOX-Liganden, welche sich schon in einer Vielzahl von stereoselektiven Reaktionen bewährt hatten^[70], auch gängige chirale Liganden für die asymmetrische FC Alkylierung.^[38,43,71–74]

Andere prominente chirale metallorganische Katalysatoren für die enantioselektive FC Alkylierung (Abbildung 4) stellen Salen-basierte Katalysatoren dar, welche Verwendung in Michael-Additionen^[75,76] erfahren. Aber auch Derivate des 1,1'-Bi-2-naphthols (BINOL)^[77,78] und 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyls (BINAP)^[41,79] finden auf diesem Gebiet der asymmetrischen Katalyse Anwendung. Neben den genannten gängigsten chiralen Metallkatalysatoren liefert die Literatur aber auch Beispiele für den Einsatz von Phosphoramiditen^[80], Ferrocen-^[81], und Diphenylphosphinobenzoesäure^[82]-basierten Liganden.

2001 erfolgte dann durch Paras *et al.* auch die erste erfolgreiche asymmetrische FC Alkylierung mittels Organokatalyse.^[34] Der Einsatz eines chiralen Imidazolidinons (Abbildung 4) in der FC Reaktion zwischen Pyrrol und einem Michaelakzeptor führte dabei zu einer reversiblen Bildung eines Iminiumions, welches die Aktivierung der C-C-Doppelbindung zur Folge hat. Das chirale sekundäre Amin steuerte dabei die

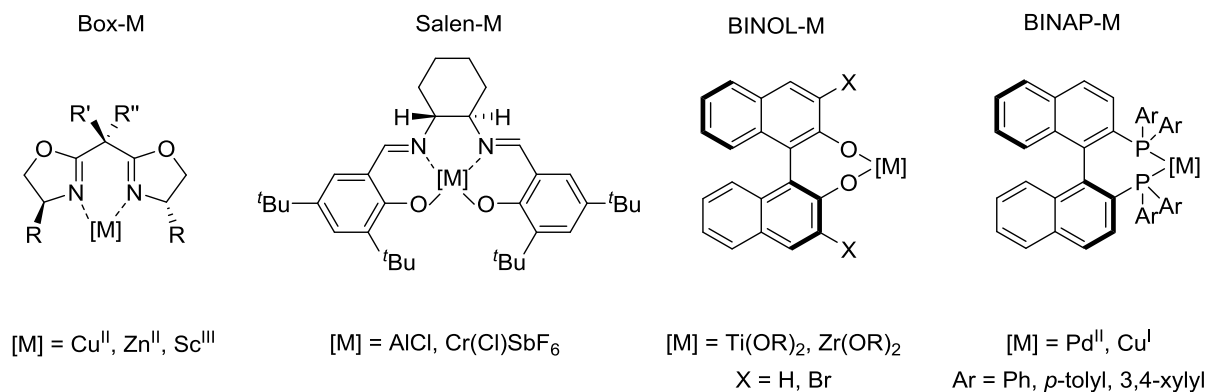
Enantioselektivität. Im Weiteren etablierte sich die Aminokatalyse als praktikable Methode der asymmetrischen FC Alkylierung für α,β -ungesättigte Carbonyle.^[83–85]

Neben dem kovalenten Ansatz der Aminokatalyse kristallisierten sich zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen-basierte organokatalytische Alternativen chiraler Natur heraus. Dabei sind besonders zwei Vertreter hervorzuheben; auf der einen Seite die Thioharnstoff-basierten und auf der anderen Seite die BINOL-basierten Phosphorsäurekatalysatoren. Derivate des Thioharnstoffs werden dabei hauptsächlich zur Reaktionsvermittlung zwischen Nitroalkenen und Indolen^[86] bzw. Naphtholen^[45,46] verwendet. Dabei sind besonders solche Thioharnstoffderivate von Bedeutung, welche in ihrer Seitenkette eine zusätzlich Hydroxy- oder Aminfunktionalität tragen. Diese sind nämlich in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den sekundären Aminen des Thioharnstoffderivats und der Nitro-funktionalität des Alkens auszubilden und zusätzlich das aromatische Substrat über eine passende Wasserstoffbrückenbindung zum Amin des Indols oder der Hydroxyfunktion des Naphthols zu fixieren. Diese gerichtete Interaktion zwischen Katalysator und beiden Substraten erlaubt eine exzellente Stereokontrolle.

Der zweite wichtige Vertreter sind die BINOL-basierten Phosphorsäurederivate. Diese sind extrem vielseitig einsetzbar und weisen keine so strikte Substratlimitierung auf wie alle zuvor beschriebenen Katalysatoren. Akiyama *et al.* postulierten 2010, dass diese Phosphorsäure-derivate in der Lage sind, zu beiden Edukten Wasserstoffbrückenbindungen aufzubauen und diese somit exakt für eine asymmetrische Umsetzung zu positionieren.^[87,88] Dabei akzeptiert diese Art von Katalysatoren Indole^[28,87–90], Pyrrole^[88,91] ebenso wie Furane^[88] und auch die elektrophile Komponente unterliegt keiner nennenswerten Einschränkung; so werden α,β -ungesättigte Carbonyle^[28], Nitroalkene^[89,91], Imine (mit SPINOL-basiertem Phosphorsäurederivat)^[90], Acylphosphonate^[87] sowie Trifluorpyruvat^[88] akzeptiert. Keine der anderen Katalysatoren zeigt ein dermaßen großes Substratspektrum wie der hier vorgestellte brøndsted-saure Katalysator.^[19]

Neben den vorgestellten drei hauptsächlich verwendeten Organokatalysatoren finden auch noch Bissulfonamide^[92] sowie Katalysatoren auf Basis des *Cinchona*-Alkaloid^[93] vereinzelt in der chiralen FC Alkylierung Anwendung.

Chirale Liganden für FC-Organometallkatalyse



Chirale Liganden für FC-Organokatalyse

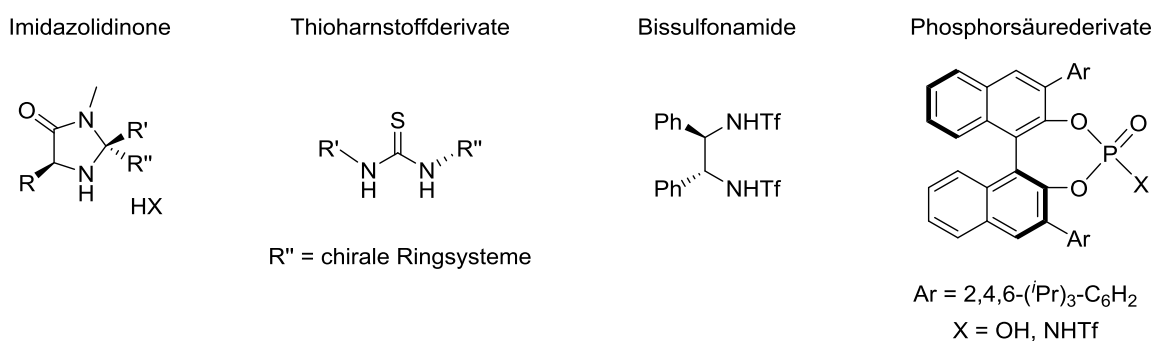


Abbildung 4: Auswahl der gängigsten asymmetrischen FC Alkylierungskatalysatoren. Zusammengestellt und modifiziert nach [19].

Die letzten 20 Jahre haben somit eine große und extrem vielseitige Auswahl an chiralen Katalysatoren für die enantioselektive FC Alkylierung hervorgebracht. Und auch der steigenden Nachfrage nach milden und grünen synthetischen Methoden in der organischen Chemie wurde mit der Weiterentwicklung der Organokatalysatoren schon ein erster Dienst erwiesen. Jedoch verbirgt sich an dieser Stelle noch einiges an Innovationspotential, wie beispielsweise durch den Einsatz von Heterogen- oder Biokatalysatoren. Gerade auf die biokatalytischen FC Alternativen soll im folgenden Kapitel (Kapitel 1.1.3) eingegangen werden.

1.1.3 Enzymkatalysierte Friedel-Crafts Alkylierung

Bis heute spielt die FC Alkylierung in der organischen Synthese sowie in der chemischen Industrie eine wesentliche Rolle, sodass die Bestrebung, eine enzymatische Alternative zur herkömmlichen FC Alkylierung zu entwickeln, nachvollziehbar ist. Dabei kommen die aussichtsreichsten Biokatalysatoren aus der Enzymklasse der Transferasen.^[94–101] Jedoch kommt es auch im Mechanismus der Histidin- sowie Phenylalanin-Ammoniak-Lyasen zur einer FC-artigen Reaktion, bei der der jeweilige (Hetero-)Aromat ein α,β -ungesättigtes Keton (Michaelakzeptor) nukleophil angreift.^[102] Zudem ist auch α -Chymotrypsin aus dem Rinderpankreas in der Lage, eine solche Reaktion mit den Derivaten von Isatin als elektrophile und verschiedenen Indolderivaten als aromatische Komponente zu vermitteln.^[103]

Des Weiteren zeigten Park *et al.*, dass die Verwendung eines DNA-basierten Cu^(II)-Katalysators mit 5,6-Dimethyl-1,10-phenanthrolin als Ligand eine Alkylierungsreaktion mit zumeist guten Enantioselektivitäten gewährleistet, wobei die helikale Chiralität der DNA die Enantioselektivität der Reaktion zu sichern scheint.^[104] Die vorgestellte DNA-basierte Methode ist jedoch soweit eher biomimetisch anstatt biokatalytisch. Allerdings wurde der Ansatz 2015 erweitert und ein artifizielles Metalloenzym generiert. Dafür wurde die exzellente Promiskuität der zentralen hydrophoben *cavity* des dimeren Transkriptionsfaktors LmrR (*Lactococcal multidrug resistance Regulator*) genutzt, da dieser eine generische Bindungsstelle für planare Koordinationskomplexe darstellt. Die Assemblierung des Metalloenzym führte teils zu hervorragenden *ee*-Werten bis zu 94 % in der Umsetzung von unterschiedlichen Indolderivaten mit einem Michaelakzeptor in einer FC Alkylierung.^[105,106]

Als vielversprechendste Biokatalysatoren auf diesem Gebiet gelten, wie zuvor erwähnt, die Transferasen; im speziellen die aromatischen Prenyltransferasen aus der Superfamilie der Dimethylallyltryptophan-Synthasen (DMATS). Diese zeigen gegenüber dem aromatischen Substrat eine hohe Flexibilität^[96], sodass beispielsweise verschiedene Derivate der 4-Hydroxybenzoesäure^[94], Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzol) und dessen Monoacylderivat^[97], Indole^[96,97], Tryptophan^[97], Tyrosin^[97], Hydroxynaphthalene^[107], Flavonoide^[108] und Xanthone^[109] von dem Enzym akzeptiert werden. Ähnlich wie bei der chemisch katalysierten FC Alkylierung führen Substrate mit einer stark elektronenziehenden Gruppe, wie z.B. einer Nitrogruppe, zum Verlust der Enzymaktivität. Hydroxybenzole, welche eine Acetyl- oder Chlor-Substitution aufweisen, werden jedoch umgesetzt, wenn auch mit verminderter Aktivität. Währenddessen werden Hydroxybenzole mit elektronendonierenden Substituenten, unabhängig von deren vergrößertem sterischen Anspruch, ohne Aktivitätseinbußen umgesetzt.^[94] Auch die Spezifität gegenüber der elektrophilen

Komponente Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) ist längst nicht mehr so strikt, wie sie lange beschrieben wurde. Schon 1996 konnten Wessjohann und Sontag zeigen, dass neben dem DMAPP auch verlängerte Polyprenylpyrophosphate wie Geranyl- und Geranylgeranylpyrophosphat als Elektrophile akzeptiert werden.^[94] In 2012 wurde das Substratspektrum noch um DMAPP-analoge Substrate wie Pent-2-enpyrophosphat und Methylallylpyrophosphat erweitert. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Methylgruppe des DMAPPs eliminiert oder verschoben werden kann, jedoch die Doppelbindung in β -Position essentiell für die Stabilisierung des entstehenden Carbokations ist und somit erhalten bleiben muss.^[96]

Neben den aromatischen Prenyltransferasen sind auch *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM)-abhängige Methyltransferasen (MTasen) im Stande, Friedel-Crafts analoge Alkylierungen zu begünstigen.^[99–101] Bemerkenswert ist dabei, dass die MTasen auch modifizierte SAM-Cofaktoren akzeptieren, sodass neben Methylierungen auch Allylierungen, Propargylierungen und Benzylierungen von aromatischen Systemen in teilweise exzellenten Regioselektivitäten bis > 99 % ermöglicht werden.^[99] Als aromatische Komponente werden dabei von den getesteten MTasen Naphthalen^[99]- und Cumarinderivate^[99] sowie beide Tyrosinisomere^[101], L-Dopa^[101] und 3-Hydroxykynurenin^[101] akzeptiert.

Die vorgestellten enzymatischen Methoden führen, im Gegensatz zu klassisch chemisch durchgeführten FC Alkylierungen, alle zu einer regioselektiven Monoalkylierung des aromatischen Edukts. Jedoch birgt auch die Biokatalyse noch mannigfaltige Herausforderungen. So ist bei den Transferasen-katalysierten Reaktionen die Aktivierung des Substrates immer durch eine sehr gute Abgangsgruppe gewährleistet. Dabei ist jedoch der native Cofaktor SAM im Falle der MTasen schon mit 1750 € g⁻¹^[110] sehr teuer und die Synthese der modifizierten SAM-Analoga aus dem *S*-Adenosyl-L-homocystein (3240 € g⁻¹^[110]) mit Silbertriflat extrem kostspielig. Auch die Synthese der nicht lagerstabilen Polyprenylpyrophosphate für die Prenyltransferasen muss vorher erfolgen, da nur wenige der Verbindungen käuflich erwerbbar und diese zusätzlich horrend teuer sind (Bsp. Geranylpyrophosphat Ammoniumsalz 545 € mg⁻¹^[110]).

Eine alternative Substrataktivierung von funktionellen Gruppen, wie z.B. Alkenen, Carbonylen oder Epoxiden, könnte über eine simple Protonierung der jeweiligen Funktionalität erreicht werden. Hammer *et al.* identifizierten für eine solche attraktive abgangsgruppenunabhängige Substrataktivierung 2012 die Squalen-Hopen Zyklase (SHC) als vermeintlichen brønsted-sauren Biokatalysator für FC Alkylierungen (Kapitel 1.3).^[111]

1.2 Brønsted-Säurekatalyse in der Biokatalyse

In der Organokatalyse wird zwischen allgemeiner und spezifischer Brønsted-Säurekatalyse unterschieden.^[112,113] Dabei stellt eine allgemeine Brønsted-Säure einen Wasserstoffbrückendonator dar. Eine allgemeine Brønsted-Säure stabilisiert somit während der Reaktion den Übergangszustand mittels Wasserstoffbrückenbindungen.^[112–114] Bei einer spezifischen Brønsted-Säure handelt es sich um einen echten Protonendonator. Dies bedeutet, dass es bei der spezifischen Brønsted-Säurekatalyse zu der Protonierung und damit zur Aktivierung des Elektrophils durch den Katalysator kommt.^[112,113] In beiden Fällen wird am Ende der Reaktion das Produkt freigesetzt und der Katalysator liegt in seinem Ursprungszustand vor. Ob ein Katalysator als allgemeine oder spezifische Brønsted-Säure wirkt, hängt dabei von der Azidität des Katalysators sowie von der Substratbasizität ab.^[112]

Auch in der Enzymkatalyse besitzt die Brønsted-Säurekatalyse eine enorme Bedeutung. So fungiert eine Vielzahl von Enzymen als allgemeiner Brønsted-Säurekatalysator, indem sie den Übergangszustand der Reaktionen *via* Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren und somit dessen Energieniveau senken. Ein Lehrbuchbeispiel hierzu, ist die Oxyaniontasche (engl. *oxyanion hole*).^[115] Diese ist Bestandteil vieler hydrolytischer Enzyme, wie Proteasen^[115,116], Lipasen^[117,118] und Esterasen^[119]. Bei der katalytischen Triade der Protease Chymotrypsin wird dabei beispielsweise zunächst das Substrat über die Koordination des Carbonyls mittels zweier Amidprotonen des Enzymrückgrates, der sogenannten Oxyaniontasche, aktiviert. Das folgende tetraedrische Intermediat weist eine negative Ladung am Carbonylsauerstoff auf, welche durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidprotonen der Oxyaniontasche stabilisiert wird (Abbildung 5).^[115]

Viele hydrolytische Enzyme bedienen sich also dem Mechanismus der allgemeinen Brønsted-Säurekatalyse. Für Biokatalysatoren, welche als spezifische Brønsted-Säure wirken, sind die Beispiele jedoch rar gesät. Dies liegt wahrscheinlich unter anderem daran, dass in den meisten Fällen die Azidität der enzymatischen Protonenquelle nicht ausreichend ist, um als spezifischer Brønsted-Säurekatalysator zu fungieren. Gleichwohl sind eine handvoll putative spezifische brønsted-saure Biokatalysatoren in der Literatur beschrieben.^[120–123] Beispielsweise ist für einzelne Hydratasen, welche die selektive Addition von Wasser an C-C-Doppelbindungen katalysieren, ein Reaktionsmechanismus postuliert, in dem diese als spezifischer Säurekatalysator wirken. Dabei soll die LinD-Hydratase^[120,121], in der Lage sein, eine Hydroxygruppe zu protonieren, während die Protonierung mittels der Enoyl-CoA Hydratase^[122] an einer C-C-Doppelbindung eines α,β -ungesättigten Ketoesters abläuft. Außerdem soll die Carotenoidhydratase^[123] in der Lage sein, eine nicht aktivierte C-C-

Doppelbindungen zu protonieren. Zudem zählen zwei Vertreter der Triterpen-Zyklenen^[124] zu den enzymatischen, spezifischen Brønsted-Säurekatalysatoren. Dies betrifft auf der einen Seite die Oxidosqualen Zyklenen^[125-127], welche im Stande sind, Epoxide zu aktivieren, und auf der anderen Seite die Squalen-Hopen Zyklenen^[126,127] (Kapitel 1.3), welche, ähnlich den Carotenoidhydratasen, in der Lage sind, anspruchsvolle Substrate, wie nicht aktivierte Alkene, zu protonieren.

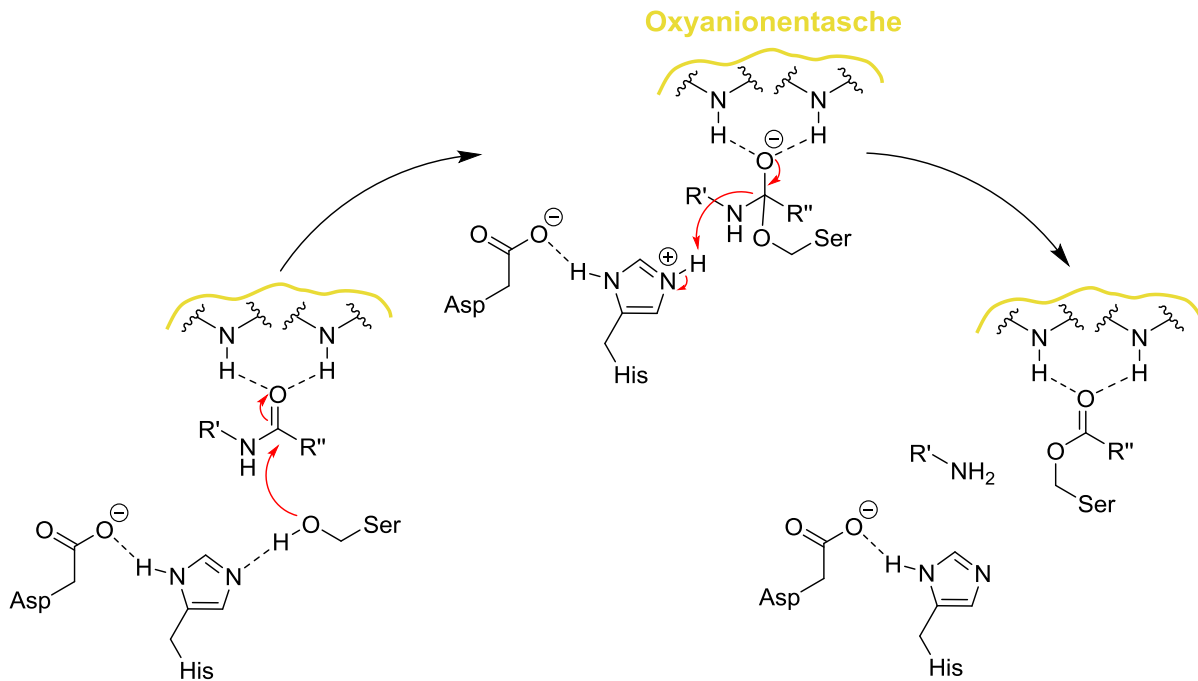


Abbildung 5: Beispiel für die allgemeine Brønsted-Säurekatalyse anhand der Oxyaniontasche im Chymotrypsin. Die katalytische Triade (Ser, His, Asp) der Serinprotease katalysiert die Spaltung einer Peptidbindung. Dafür wird das Substrat zunächst durch zwei allgemeine Brønsted-Säuren, über die sogenannte Oxyaniontasche, im Proteinrückgrat koordiniert und somit positioniert. Das katalytisch aktive Serin wird mittels eines Histidins und einer Asparaginsäure für die bevorstehende Katalyse aktiviert, sodass dieses dann nukleophil das Carbonyl angreifen kann und ein tetraedrisches Intermediat gebildet wird. Durch die Koordination der negativen Ladung des Carbonylsauerstoffs über die Amidprotonen der Oxyaniontasche wird das tetraedrische Intermediat stabilisiert und reagiert im Anschluss weiter zum Acyl-Enzym-Intermediat. Das primäre Amin verlässt die aktive Tasche und das Acyl-Enzym-Intermediat wird anschließend mittels eines aktivierten Wassermoleküls hydrolysiert (nicht gezeigt).^[115]

1.3 Squalen-Hopen Zyklasten

Die Squalen-Hopen Zyklase (SHC) ist eine Klasse II Terpen-Zyklase^[128] und zählt, zusammen mit den Oxidosqualen Zyklasten (OSC) und den Diterpen Zyklasten (DC), zu der Superfamilie der Protonasen^[124,129]. Aufgrund ihrer Fähigkeit ein Proton zu donieren, stellen die SHCs eines der wenigen literaturbekannten Beispiele für einen spezifischen Brønsted-Säure-Biokatalysator dar.

1.3.1 Die natürliche Funktion und Struktur der *Aac*SHC

1997 gelang es Wendt *et al.*, die Kristallstruktur der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*) zu lösen.^[130] Dies ist bis heute die einzige SHC, für welche eine Kristallstruktur vorliegt. Aus diesem Grund dient die *Aac*SHC als Modellsystem für alle SHCs, um neue Erkenntnisse über deren Reaktionsmechanismus zu gewinnen. Die SHCs katalysieren mit der Polyzyklisierung von Squalen **1** zu den pentazyklischen Produkten Hopen **2** und Hopanol **3** (in einem Verhältnis von $\sim 5:1$ ^[131], Abbildung 6) eine der komplexesten einschrittigen Reaktionen in der Biochemie. Allein an der Bildung von zwölf neuen Bindungen, fünf Zyklen und neun Stereozentren lässt sich die Komplexität dieser Reaktion erahnen.^[132-134]

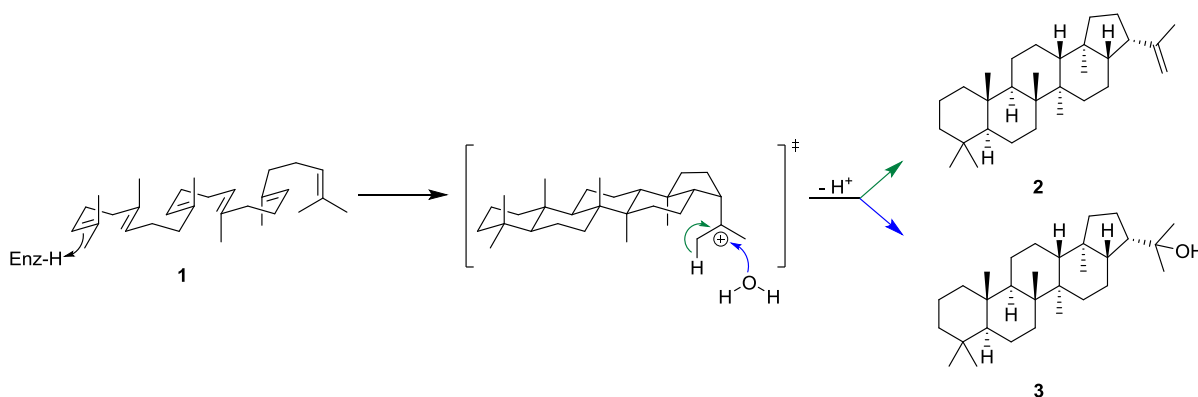


Abbildung 6: Natürliche Reaktion der SHCs. Die SHCs initiieren durch die Protonierung der Doppelbindung der terminalen Isopreneinheit die Polyzyklisierung von Squalen **1** zu den pentazyklischen Produkten Hopen **2** (grüner Reaktionspfad) und Hopanol **3** (blauer Reaktionspfad).

Die Initiierung der Reaktionskaskade wird durch die Protonierung der Doppelbindung der terminalen Isopreneinheit des Squalens **1** gewährleistet, wobei das erste intermediäre Carbokation an Position 2 generiert wird. Dieses wird anschließend kaskadenartig vom jeweils benachbarten π -System attackiert, sodass am Ende der Kaskade das pentazyklische Hopanyl-Kation vorliegt. Die Bildung des Pentazyklus verläuft dabei in einer asynchronen, konzertierten Weise.^[135,136] Die Polyzyklisierung wird schlussendlich entweder durch eine

Eliminierung eines Protons zu Hopan **2** oder durch einen nukleophilen Angriff von einem Wassermolekül zum Hopanol **3** terminiert.^[131–133,137]

Die AacSHC ist ein Heterodimer und besteht somit aus zwei Proteindomänen, der β - und der γ -Domäne (Abbildung 7). Die β -Domäne nimmt eine $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass-Struktur ein, während die γ -Domäne eine evolvierte Variante der $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass-Struktur darstellt. Die γ -Domäne bindet über die α -Helix 8 an die Zellmembran, weshalb die SHCs den monotopischen Membranproteinen zugeordnet werden. An der membranassoziierten α -Helix 8 befindet sich zusätzlich ein hydrophober Kanal, welcher die Membran mit der großen, hydrophoben aktiven Tasche (1200 \AA^3) verbindet. Es ist postuliert, dass ebendieser Kanal als Eingang für die Substrate und Ausgang für die Produkte der Polyzyklisierung dient.^[130,138]

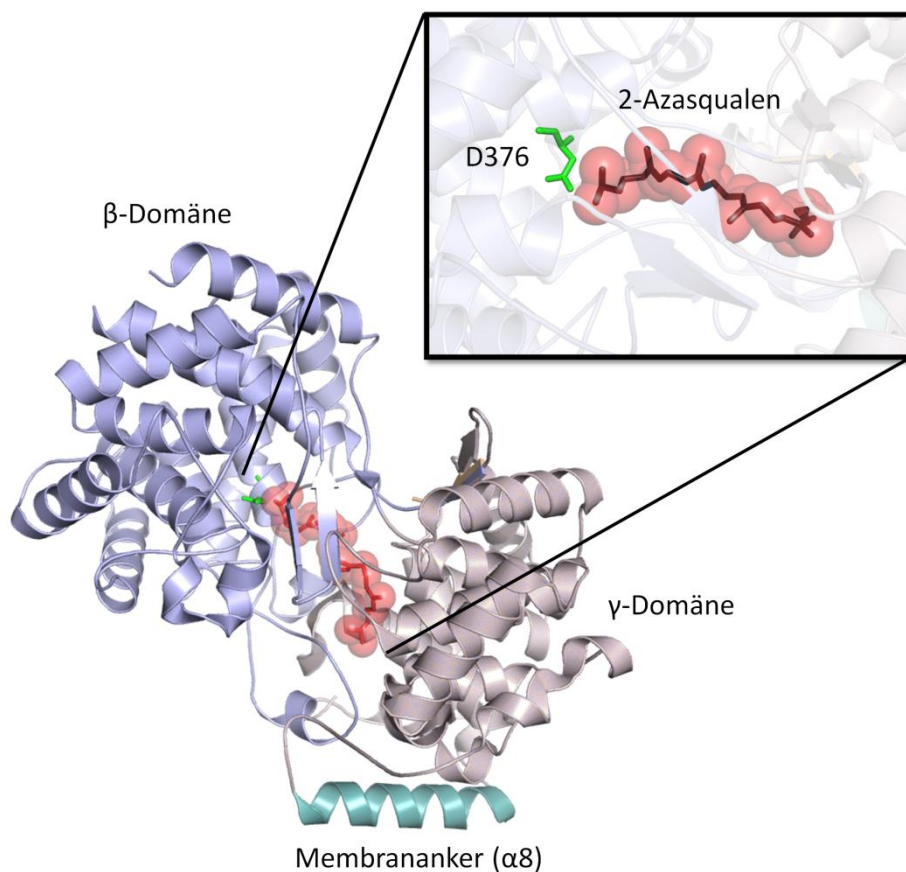


Abbildung 7: Kristallstruktur der AacSHC (pdb: 1UMP^[139]) mit co-kristallisiertem Substratanalogon 2-Azasqualen (rot) in seiner reaktiven Konformation. Die AacSHC besteht aus zwei Untereinheiten, der β - (blau) und γ -Domäne (grau). Die γ -Domäne ist über die α -Helix 8 (türkis) in der Membran assoziiert. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen den beiden Untereinheiten. Am Ende der aktiven Tasche ist die katalytisch aktive Asparaginsäure D376 (grün), welche für die Reaktionsinitiierung der Polyzyklisierung *via* Protonierung verantwortlich ist.

Die aktive Tasche, in der die Polyzyklisierungsreaktion stattfindet, ist zwischen den beiden Proteindomänen lokalisiert. Sie ist hauptsächlich aus aliphatischen und aromatischen

hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, sodass Squalen **1** in seiner reaktiven Konformation (*all-prechair* Konformation) forciert wird, wodurch die hohe Stereoselektivität der Reaktion erklärt werden kann. Lediglich das obere Ende der aktiven Tasche, welches in der β -Untereinheit lokalisiert ist, umfasst mit seinem hochkonservierten DXDD-Motiv eine Reihe von polaren Aminosäuren.^[130,138] Dabei ist die mittlere der Asparaginsäuren (D376) des DXDD-Motivs für die Aktivierung der C-C-Doppelbindung mittels des Protonentransfers zuständig. Die katalytisch aktive Asparaginsäure an Position 376 zeichnet sich hierbei durch eine biologisch außergewöhnlich hohe Azidität aus. Diese Azidität ist durch die *anti*-Orientierung des zu transferierenden Protons gewährleistet. Neben der *AacSHC* ist ein Vorkommen eines solchen *anti*-orientierten Protons in der Enzymkatalyse nur noch bei der *Enoyl-CoA Hydratase* bekannt.^[122] Diese *anti*-Orientierung des aziden Protons bewirkt eine bis zu 10^4 höhere Azidität im Vergleich zu einem *syn*-orientierten Proton^[124,129,140], welches die meisten brønsted-sauren Enzyme aufweisen.^[122] Diese Unterschiede in der Azidität kommen vermutlich durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu Stande, welche in der *syn*-Konformation realisiert werden (Abbildung 8A) und wodurch das *syn*-orientierte Proton eine bis zu 8 kcal mol^{-1} höhere Stabilität aufweist.^[124,141] Im Falle der *AacSHC* wird die *anti*-Orientierung des aziden Protons von D376 durch ein spezielles Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk garantiert. Dabei wird das zu transferierende Proton, durch Wasserstoffbrückenbindungen zum H451 sowie Y495 vermittelt über ein wohl definiertes Wassermolekül, in *anti*-Position forciert (Abbildung 8B).^[131,138]

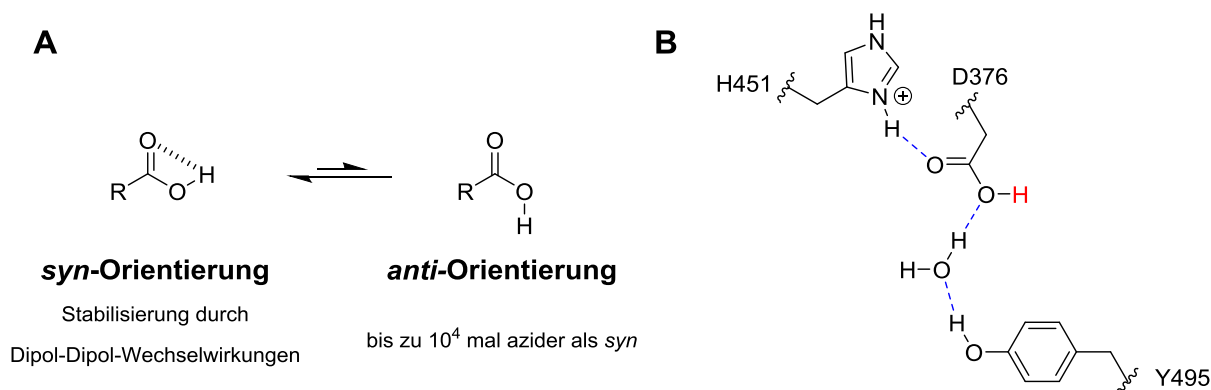


Abbildung 8: Relevanz der Protonenorientierung bei Carbonsäuren. (A) zeigt die *syn*- sowie *anti*-Orientierung eines Protons in einer Carbonsäure. Dabei ist die *syn*- um bis zu 8 kcal mol^{-1} stabiler als die *anti*-Konformation.^[141] Aus diesem Grund besitzt ein *anti*-orientiertes Proton auch eine bis zu 10^4 höhere Azidität im Vergleich zu einem *syn*-orientierten Proton.^[129,140] (B) zeigt die Protonierungsmaschinerie der *AacSHC*. Das zu übertragende Proton an D376 wird durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk, welches von H451 und von Y495 über ein wohl definiertes Wassermolekül unterstützt wird, in *anti*-Orientierung forciert. Aus diesem Sachverhalt bedingt sich die bemerkenswert hohe Azidität der *AacSHC* und deren Fähigkeit, sogar anspruchsvolle Substrate, wie nicht aktivierte Doppelbindungen, zu protonieren.

Auch die Terminierung der Polyzyklisierungsreaktion wurde näher untersucht.^[138,142] Schon 1999 beschrieben Wendt *et al.*, ein wohl definiertes Wassernetzwerk in der Sphäre von E45, E93, R1217 und Q262, welches in der Lage ist, ein Wassermolekül zu polarisieren, sodass es als katalytische Base wirken kann.^[138] Fünf Jahre später erweiterten Hoshino *et al.* diese Hypothese, indem sie ein Wassernetzwerk beschrieben, welches aus der katalytisch aktiven Base (*front water*) und zusätzlichen Wassermolekülen (*back water*) besteht, welche die katalytisch aktive Base in der geforderten Weise polarisieren. Die zusätzlichen Wassermoleküle werden dabei von sieben Aminosäureresten (T41, E45, E93, R127, W133, Q262 und Y267) passend positioniert und selbst aktiviert. Die katalytisch aktive Base wird dabei so positioniert, dass sie das Hopanyl-Kation ausschließlich an der Z-Methylgruppe deprotoniert. Variationen in der Position 262 führen zu einer verminderten Hopan- und einer vermehrten Hopanolbildung, da die Ordnung des Wassernetzwerks nicht mehr aufrecht erhalten werden kann, und die neue Orientierung der katalytischen Base einen nukleophilen Angriff an das Hopanyl-Kation und somit eine erhöhte Hopanolformierung begünstigt.^[142] Die treibende Kraft der Polyzyklisierung von Squalen **1** ist die Entropie.^[143] Bei der Zyklisierung wird, ähnlich wie beim hydrophoben Effekt bei der Proteinfaltung^[115], Wasser durch spezielle Wasserkanäle verdrängt und schließlich freigesetzt. Durch das Freisetzen der Wassermoleküle kommt es zu einer Entropiezunahme in der Umgebung, wodurch eine Vorfaltung des Substrates in seiner reaktiven Konformation ermöglicht wird. Das aktive Zentrum hält somit das flexible Substrat in der reaktiven Konformation fest und verhindert das vorzeitige Abreagieren der carbokationischen Intermediate, indem es sie vor dem Wasser abschirmt.^[124,143] Zusätzlich werden die carbokationischen Intermediate durch π -stacking zu den aromatischen Aminosäuren der aktiven Tasche, mittels Kationen- π -Wechselwirkungen, stabilisiert. Dieses Konzept der Kationen- π -Wechselwirkung findet ferner auch in der Katalyse von niedermolekularen Verbindungen in der organischen Chemie Anwendung.^[144]

Das QW-Motiv (QXXDGGWG oder QXXDGSWG) ist das zweite hochkonservierte Sequenzmotiv der SHCs. Die QW-Motive befinden sich auf der Oberfläche des Enzyms und verbinden mittels einer typischen *loop*-Struktur die äußeren α -Helices der Fass-Struktur miteinander.^[130,138] SHCs aus Gram-negativen Bakterien weisen sieben solcher QW-Motive auf, während SHCs aus Gram-positiven Bakterien acht solcher Einheiten besitzen.^[131] Sie fungieren vermutlich als eine Art Stabilisator für die Enzymstruktur gegenüber thermischer Denaturierung, indem sie die Zyklasten vor der frei werdenden Enthalpie der hoch exergonischen Polyzyklisierungsreaktion (200 kJ mol^{-1}) schützen.^[130,138]

1.3.2 Promiskuitive Aktivitäten der SHC Wildtypenzyme

SHCs besitzen ein breites Substratspektrum (Abbildung 10). Am besten erforscht ist dabei die Aktivität gegenüber nicht natürlicher Substrate bei der *Aac*SHC und den SHCs aus *Zymomonas mobilis* (*Zmo*). So akzeptiert die *Aac*SHC auch 2,3-Oxidosqualen, welches den Vorläufer des Cholesterins darstellt und normalerweise durch OSCs zyklisiert wird.^[142] Diesbezüglich wurde jedoch jüngst gezeigt, dass die initiale Aktivierung hierbei durch die Protonierung der Doppelbindung der terminalen Isopreneinheit des 2,3-Oxidosqualens und nicht, wie bei OSC und lange für die SHC postuliert, durch die Protonierung des Epoxids erfolgt.^[145]

Zudem ist das *Aac*SHC Wildtypenzym beispielsweise in der Lage, verkürzte (bis C₁₀) sowie auch verlängerte Squalen-Analoga (bis C₃₅) als Substrat stereoselektiv umzusetzen.^[146–148] Bei den verkürzten Squalen-Analoga fällt vor allem das Farnesol **4** (C₁₅) auf, da bei dessen Zyklisierung vier Produkte **5–8** aus demselben carbokationischen Vorläufer gebildet werden.^[146,149] Neben der Eliminierung eines Protons in terminaler **5** oder interner **6** Position und der elektrophilen Addition von Wasser **7**, erfolgt auch ein nukleophiler intermolekularer Angriff eines zweiten Farnesol-Moleküls **8** auf das Carbokation. Dies ist die erste durch SHCs vermittelte intermolekulare Reaktion, welche beschrieben wurde.

Auch das um eine C₁-Einheit verlängerte Homofarnesol **9** wird von der *Aac*SHC sowie den *Zmo*SHCs erfolgreich umgesetzt.^[150,151] Dabei kommt es zu der Bildung des trizyklischen Duftstoffs Ambroxan **10**, wobei das finale Carbokation durch ein *O*-Nukleophil, nämlich der Hydroxygruppe des Homofarnesols, abgefangen wird. Neben Hydroxyfunktionalitäten können ebenso Carbonsäure **11** und Ketone **13** als Nukleophile wirken, sodass es zur Bildung von Ethern **10**, Lactonen **12** und Enolethern **14** kommt.^[150] Neben *O*-Nukleophilen wurden zusätzlich auch noch *N*-Nukleophile in Form von Indolen^[152], Pyrrolen^[153] und Amidn^[154] getestet. Dabei wurden Substrate mit Indol^[152]- sowie Pyrrolmotiv^[153] zwar von der *Aac*SHC akzeptiert, jedoch wirkten diese nicht als *N*-Nukleophile, sondern es kam zu einem vorzeitigen Abbruch der Polyzyklisierung und somit zur Bildung von bi- und trizyklischen Produkten. Ausschließlich bei der Umsetzung des Acetamids mit der *Aac*SHC wirkte das Amid als *N*-Nukleophil und es kam zur Ausbildung eines *N*-Heterozyklus.^[154]

Das kleinere Squalen-Analogon Geraniol **17** (C₁₀) war lange Zeit als kein passendes Substrat für SHCs beschrieben.^[147] 2014 konnten Hammer *et al.* jedoch zeigen, dass eine Erhöhung der Enzymkonzentration der *Aac*SHC und eine längere Reaktionszeit zu einem nachweisbaren Umsatz (0,4 %) des Monoterpens führen.^[124,129] Zusätzlich wurden im Zuge eines *substrate engineering*s verschiedene Geranylalkylether, nämlich der Ethyl-, Butyl- und Octylether,

synthetisiert, um den Ursprung der geringen Aktivität der *AacSHC* gegenüber Geraniol **17** nachzuvollziehen. Dabei konnte gezeigt werden, dass mit steigender Länge der Alkylkette ein gesteigerter Umsatz des Substrates einhergeht. Dies kann damit erklärt werden, dass die zusätzliche Alkylkette das Substrat in seiner reaktiven Konformation in der aktiven Tasche stabilisiert und somit eine produktive Bindung erlaubt, während das kleine Geraniol **17** sich in der großen aktiven Tasche entfaltet und keine produktive Bindung zulässt.^[155]

Zusätzlich konnte auch 2,3-Epoxygeraniol **20** mittels der *AacSHC* zum Monozyklus **21** umgesetzt werden.^[124,129] Dabei kommt es, im Gegensatz zum 2,3-Oxidosqualen, zu einer Aktivierung des Substrats mittels der Protonierung der Epoxidfunktionalität. Weiterhin wurde auch für das (*S*)-Citronellal (*S*)-**22** erstmals eine Isopulegolbildung mittels der *AacSHC* beobachtet.^[124,129] Diese Reaktionspromiskuität der SHCs ist besonders bemerkenswert, da es sich hierbei um eine Prins-artige Reaktion handelt und somit die Aktivierung des Substrats über die Protonierung der Carbonylgruppe, und nicht der Doppelbindung der terminalen Isopreneinheit, verläuft. Diese Art der Carbonylaktivierung beim Citronellal gelang Siedenburg *et al.* bereits zuvor mit der *ZmoSHC1*.^[151,156] Die Umsetzung mit der *ZmoSHC1* erwies sich jedoch als wenig selektiv, sodass Mischungen aus den verschiedenen Isopulegol-Isomeren erhalten wurden.

Zudem wurden Substrate mit aromatischen Systemen als alternative C-Nukleophile mit dem *AacSHC* und *ZmoSHC1* Wildtypenzym getestet.^[111,124,157] Dabei zeigte die *ZmoSHC1* in der Friedel-Crafts-artigen Reaktion einen geringen bis moderaten Umsatz gegenüber des Geranylphenylethers **15** und Farnesylphenylethers. Auch die *AacSHC* zeigte einen Umsatz dieser Substrate, allerdings war dabei die Produktbildung noch geringer als bei Verwendung der *ZmoSHC1*.^[111,157]

1.3.3 Verbesserung der Katalysatorfähigkeit mittels *enzyme engineering*

Die promiskuitive Aktivität der SHCs gegenüber nicht natürlicher Substrate ist, wie in Kapitel 1.3.2 gezeigt, immens groß. Dies bedeutet, dass in dieser Enzymklasse ein großes Potential für weitere Umsetzungen nicht natürlicher Substrate sowie für gesteigerte Produktbildung gegenüber der schon getesteten Substrate ruht. Die Durchführung des *substrate engineering* zeigte ein Hauptproblem der nativen aktiven Tasche der *AacSHC* mit den kleineren nicht natürlichen Substraten auf.^[155] Die kleinen Moleküle sind nicht in der Lage, produktiv in die weiträumige aktive Tasche der *AacSHC* zu binden. Es gibt zu wenige Interaktionen zwischen Substrat und Enzym, sodass die Substrate nicht ihre notwendige reaktive Konformation einnehmen. Eine passende Optimierung kann einerseits auf der Seite der Substrate (*substrate*

engineering) oder auf der Seite des Katalysators, in diesem Falle des Enzyms (*enzyme engineering*), vorgenommen werden. Dafür ist das Vorliegen der Kristallstruktur vorteilhaft, um rationale Positionen auswählen und nach Durchführung der Reaktionen deren Einfluss auf die Aktivität und Selektivität erklären zu können. Diese Anpassung der aktiven Tasche der *AacSHC* an die kleineren Substrate führten Hammer *et al.* 2014 mittels eines rationalen Enzymdesigns durch. Hierfür wählten sie den Mutationsansatz der hydrophoben Substitution. Dabei wurden 16 Aminosäuren ausgewählt, welche sich in einer Distanz von bis zu 15 Å entfernt von der katalytisch aktiven Asparaginsäure D376 befanden und zudem in der ersten Sphäre der aktiven Tasche anzufinden waren (Abbildung 9). Da die aktive Tasche der *AacSHC* hauptsächlich mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet ist, wurden diese auch nur durch hydrophobe Aminosäuren ersetzt. Um dabei jedoch den größtmöglichen Effekt zu erzielen, wurden dafür sehr kleine (A oder G) und sehr große (W oder F) Aminosäuren ausgewählt. Die initiale Variantenbibliothek umfasste somit 33 Varianten.^[124,129]

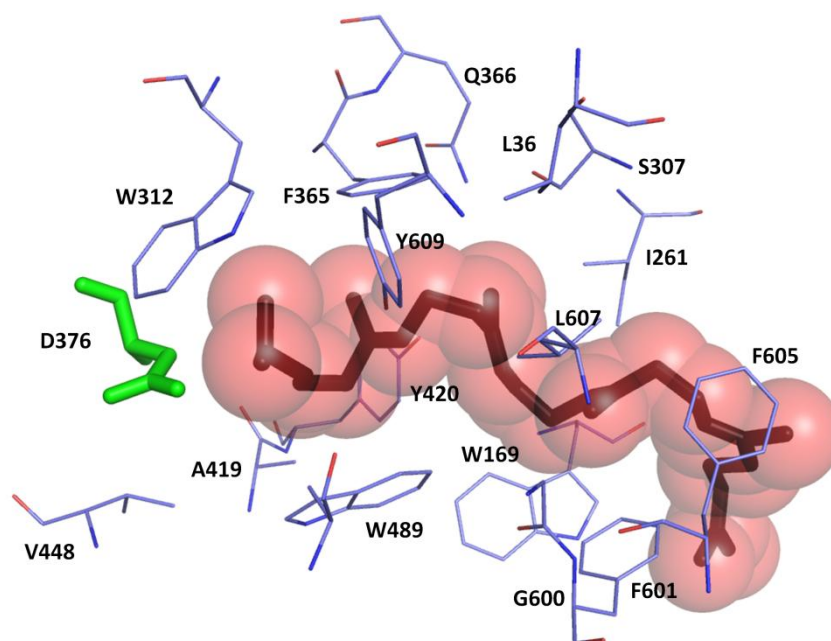


Abbildung 9: Ausgewählte Aminosäurereste für die Variantenbibliothek von Hammer *et al.*^[124,129] Die Form der aktiven Tasche des *AacSHC* Wildtypenzymes ist durch die Oberflächendarstellung des co-kristallisierten 2-Azasqualens (rot) dargestellt. Die katalytisch aktive Aminosäure D376 ist als *sticks* in grün gezeigt. Alle Aminosäuren, welche im Zuge der hydrophoben Substitution variiert wurden, sind blau dargestellt.

Mit der beschriebenen fokussierten Variantenbibliothek testeten Hammer *et al.* erneut Geraniol **17**, 2,3-Epoxygeraniol **20** sowie Citronellal **22** als Substrate. Dabei konnte die Aktivität gegenüber dem Geraniol **17** mittels Verwendung der Enzymvarianten auf das bis zu 170fache gesteigert werden. Beim Einsatz der *AacSHC* Variante F365C kam es dabei zur selektiven Bildung des terminalen Alkenprodukts **17** (15 % Umsatz), während die

Verwendung der Variante G600F zur selektiven Produktion des Hydratisierungsprodukts **18** (68 % Umsatz) führte.^[124,129] Die Verwendung der *Aac*SHC Doppelvariante Y420W G600F führte bei der Umsetzung von 2,3-Epoxygeraniol **20** zu einer selektiven Darstellung des terminalen Alkenprodukts **21** (78 % Umsatz).^[124,129]

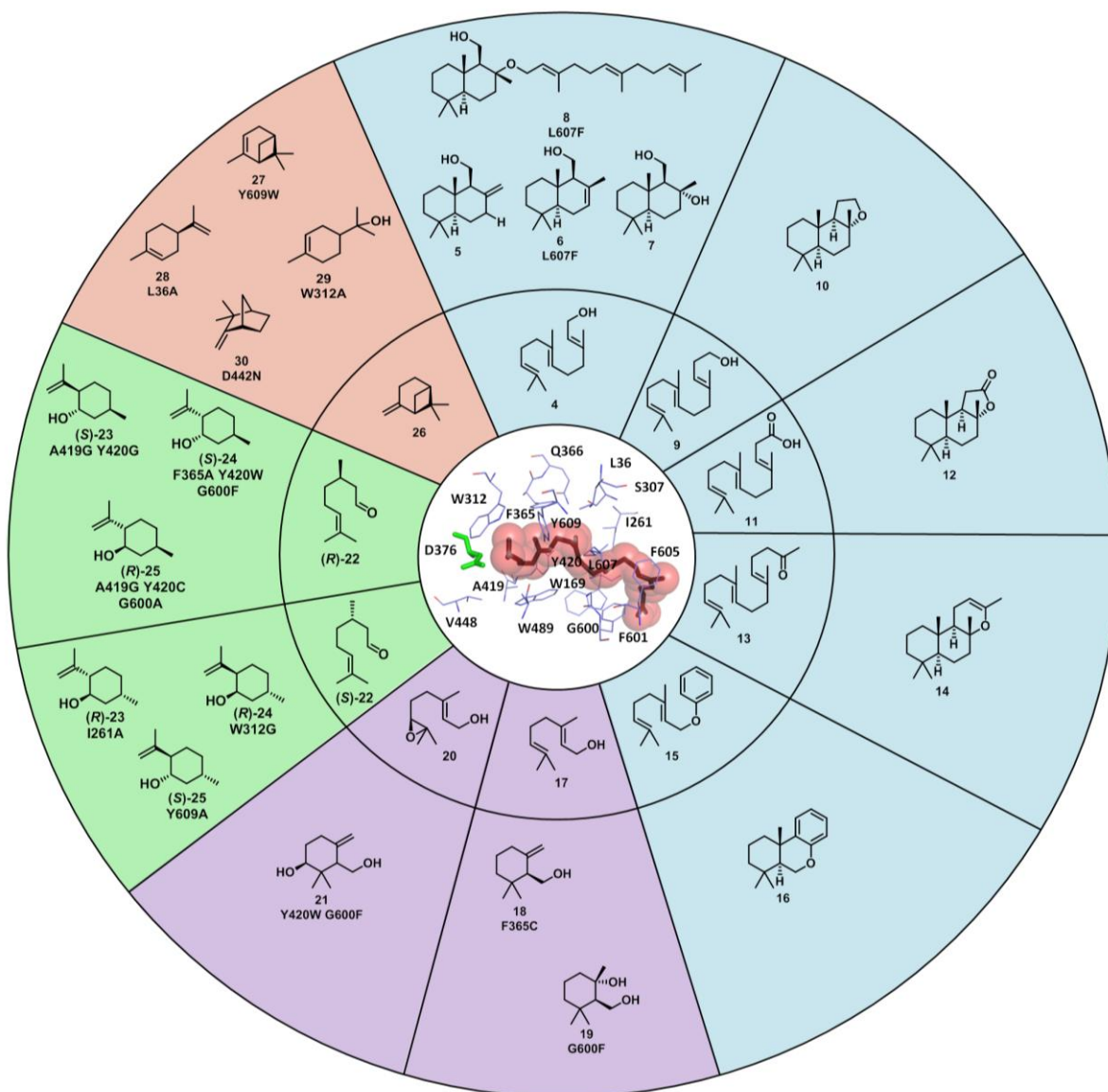


Abbildung 10: Substrat- und Produktspektrum der *Aac*SHC. In der Mitte ist das katalytisch aktive Zentrum der *Aac*SHC mit seiner katalytisch aktiven Aminosäure (D376) und dem co-kristallisierten 2-Azasqualen (rot) dargestellt. Die restlichen Aminosäuren der ersten Sphäre der aktiven Tasche sind blau dargestellt. Der innere Ring zeigt eine Auswahl der von der *Aac*SHC akzeptierten Substrate. Der äußere Ring zeigt die dazugehörigen Produkte. Produkte ohne zugeordnete Variante wurden mittels der Umsetzung mit dem *Aac*SHC Wildtypenzym erhalten. Die zugeordneten Varianten zu den Produkten zeichnen sich durch die höchste Produktbildung oder besten Produktselektivitäten aus. Die *Aac*SHC-vermittelten Polyzyklisierungsreaktionen sind blau, die Monozyklisierungen violett, die Prins-Reaktionen von Citronellal grün und die sauren Isomerisierungsreaktionen von β -Pinen rot hinterlegt. Die Abbildung wurde [122] entnommen und geringfügig modifiziert.

Auch für die Umsetzung von (*S*)-Citronellal (**S**-22) zu Isopulegol **23-26**, welches eine Vorstufe von (-)-Menthol darstellt, konnte unter Verwendung der *AacSHC* Variante I261A eine 18fache Umsatzsteigerung im Vergleich zum Wildtypenzym erreicht werden. Nach der Umsetzung von (*S*)-Citronellal (**S**-22) wurde hierbei selektiv (-)-*iso*-Isopulegol (**R**-23) erhalten.^[124,129] Weitere Studien von Bastian *et al.* ermöglichten zusätzlich auch einen selektiven Zugang zu (**R**-24) und (**S**-25) unter Einsatz der *AacSHC* Varianten W312G und Y609A. Unter Verwendung von Doppel- und Tripelvarianten konnte zudem auch eine Umsetzung von dem korrespondierenden (*R*)-Substrat (**R**-22) erzielt und der Zugang zu drei der vier Isopulegol-Isomere ermöglicht werden.^[158]

Die vorliegende Variantenbibliothek wurde auch in der intermolekularen Farnesolreaktion getestet. Hierbei gelang es, die Bildung des bimolekularen Produkts **8** unter Einsatz der *AacSHC* L607F Variante um das 6fache zu steigern und zusätzlich kurzkettige Alkohole in der *AacSHC* L607F-vermittelten Reaktion als Nukleophile zu nutzen.^[159]

Ein weiteres höchst aktuelles Forschungsgebiet stellt die saure Isomerisierung von Monoterpenen mittels *AacSHC*-Katalyse dar. Bei der *AacSHC* Wildtypenzym-vermittelten Isomerisierung von β -Pinen **26** wird dabei eine Produktmischung von α -Pinen **27**, Limonen **28**, α -Terpineol **29** und β -Camphen **30** als Hauptkomponenten erhalten. Diether gelang es dabei in jüngster Zeit jeweils eine *AacSHC* Variante zu identifizieren, welche eine verbesserte Produktelektivität für die vier Hauptprodukte im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym aufweisen (Diether, unpublizierte Daten).

Zusammenfassend konnte somit das, bereits in ihrer nativen Form breite, Substratspektrum der *AacSHC* mittels *enzyme engineering* erweitert, die Produktbildungen signifikant gesteigert und die Produktelektivität zusätzlich verbessert werden. Die FC-artigen Reaktionen wurden dabei bisher nur mittels der *AacSHC* und *ZmoSHC1* Wildtypenzyme katalysiert. Im Kapitel 1.3.3 wird jedoch ersichtlich, welches Potential in der Nutzung von *AacSHC* Enzymvarianten liegt, weswegen ein Fokus der vorliegenden Doktorarbeit auf der Optimierung des Biokatalysators gegenüber den FC-artigen Reaktionen liegt.

1.3.4 Biologische Diversität – andere SHCs

Neben der *Aac*SHC sind noch eine Vielzahl weiterer Squalen-Hopen Zyklen in der Literatur beschrieben. So umfasst die BioCatNet TTCED Datenbank bis heute 1065 identifizierte Zyklen aus der Superfamilie der SHCs.^[160] Der phylogenetische Baum (Abbildung 11) zeigt dabei eine Auswahl an SHCs, welche eine nahe Verwandtschaft zur *Aac*SHC aufweisen.



Abbildung 11: Phylogenetischer Baum der SHCs.

Neben der *Aac*SHC sind wohl die SHCs aus *Zymomonas mobilis* die bestuntersuchten Squalen-Hopen Zyklen.^[111,132,150,151,156,161,162] Interessanterweise weist das Genom von *Zymomonas mobilis* dabei zwei SHC-codierende Gene auf. Die Sequenzen dieser SHCs besitzen jedoch nur eine Sequenzidentität von 36 % und die SHCs zeigen auch in ihrer Substratspezifität signifikante Unterschiede. So sind zwar beide *Zmo*SHCs in der Lage Squalen **1** zu Hopen **2** und Hopanol **3** umzusetzen, jedoch ist die *Zmo*SHC2 dabei deutlich effizienter als die *Zmo*SHC1.^[151,162] Der Grund für das Vorkommen zweier SHC-Gene ist bis heute unbekannt, allerdings weist ein Vorkommen auch in anderen Organismen, wie beispielsweise in *Acetobacter pasteurianus*^[161,163] (*Apa*), *Burkholderia ambifaria*^[161] (*Bam*),

Pelobacter carbinolicus^[164] (*Pca*), *Rhodopseudomonas palustris*^[132,161] (*Rpa*) und *Syntrophobacter fumaroxidans*^[161,165] (*Sfu*) auf einen funktionellen Unterschied hin.

Weiterhin sind die SHCs aus *Geobacillus thermodentrificans*^[166] (*Gth*), *Methylococcus capsulatus*^[132,167] (*Mca*) und *Thermosynechococcus elongatus*^[168] (*Tel*) aufgrund ihres thermophilen Ursprungs vielversprechend für kommende Studien. Weitere SHCs wurden schon von Seitz *et al.* als interessante Kandidaten, aufgrund ihrer noch moderaten Sequenzidentität zu der *Aac*SHC und den *Zmo*SHCs, beschrieben. Dazu zählen die SHCs aus *Alicyclobacillus acidoterrestris*^[162] (*Aaci*), *Acidothermus cellolyticus*^[169] (*Ace*), *Bradyrhizobium japonicum*^[132,161] (*Bja*), *Catenulispora acidiphila*^[170] (*Cac*), *Streptomyces coelicolor*^[161] (*Sco*), *Streptomyces scabiei*^[162] (*Ssc*), *Streptomyces sviveus*^[162] (*Ssv*), *Sphaerobacter thermophilus*^[171] (*Sth*), *Saccharomonospora viridis*^[172] (*Svi*) und *Teredinibacter turnerae*^[161,173] (*Ttu*).

Trotz der Vielzahl identifizierter SHCs wurde der Fokus bisher maßgeblich auf die *Aac*SHC und in einem geringeren Umfang auf die *Zmo*SHCs gelegt. Dabei wird jedoch völlig außer Acht gelassen, dass ein erheblicher Pool an weiteren SHCs für neue enzymkatalysierte Reaktionen zur Verfügung steht. Darin können jedoch – abseits der Optimierung eines einzelnen Biokatalysators mittels *enzyme engineering* – ebenso neue Möglichkeiten liegen, bisher nicht oder schlecht konvertierte Substrate umzusetzen.

2. Zielsetzung und Motivation

Das Bestreben dieser Arbeit bestand darin, die Squalen-Hopen Zyklasen-vermittelte Friedel-Crafts Alkylierung weiterzuentwickeln und zu optimieren, deren Substratpalette zu vergrößern sowie im Optimalfall den Reaktionsansatz auf einen intermolekularen Ansatz zu erweitern.

Die Alkylierung nach Friedel und Crafts ist bis heute eine der wichtigsten Reaktionen, um die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zu gewährleisten. Klassisch chemisch ist dieser Reaktionstyp bezüglich des Substratspektrums sowie seiner achiralen und chiralen Katalysemöglichkeiten bereits umfassend untersucht. Trotz alledem ist die asymmetrische Umsetzung von reinen Kohlenstoffaromaten in der Friedel-Crafts Alkylierung immer noch eine Herausforderung. Enzyme stellen an dieser Stelle, aufgrund ihres beträchtlichen katalytischen Potentials, eine attraktive Alternative dar. Diese Art von biokatalytischem Zugang zu Friedel-Crafts-artigen Reaktionen ist bisher jedoch nur vereinzelt in der Literatur beschrieben. Die elektrophile Komponente dieser, meist Lyasen-vermittelten, Reaktionen muss zudem stets eine sehr gute Abgangsgruppe tragen, um die Aktivierung des Substrats sicherzustellen und somit die Alkylierung zu gewährleisten.

Eine aussichtsreiche alternative Substrataktivierung kann durch eine schlichte Protonierung der elektrophilen Komponente herbeigeführt werden. Eine solche abgangsgruppen-unabhängige Aktivierung lässt sich durch die Squalen-Hopen Zyklasen bewerkstelligen, welche aufgrund ihrer einzigartigen Protonierungsmaschinerie in der Lage sind, ein Proton mit außergewöhnlich hoher Azidität für die Protonierung bereitzustellen. Eine initiale Aktivität dieser Enzyme in einer Friedel-Crafts Reaktion konnte schon 2012 gezeigt werden.^[111] Ziel der vorliegenden Arbeit war infolgedessen, die Squalen-Hopen Zyklasen-vermittelte Friedel-Crafts Alkylierung im Detail zu untersuchen und weiterzuentwickeln.

3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Weiterentwicklung und Optimierung der intramolekularen SHC-katalysierten Friedel-Crafts Alkylierung und im Idealfall die Erweiterung auf einen intermolekularen Reaktionsansatz. Die Projektidee basiert dabei auf den Vorarbeiten von Hammer *et al.*^[111], welche zeigen konnte, dass das *ZmoSHC1* Wildtypenzym selektiv eine intramolekulare FC-artige Umsetzung des Geranylphenylethers **15** katalysiert. Nach einem präparativen Ansatz wurden 5,4 % des Alkylierungsprodukts **16** erhalten. Weiterhin war auch das *AacSHC* Wildtypenzym in der Lage, diese Reaktion zu vermitteln. Allerdings erwies sich die *AacSHC* als unselektiv und bildete neben dem Alkylierungsprodukt **16** ein zweites nicht identifiziertes Produkt (Abbildung 12). Bei Verwendung des Farnesylphenylethers als Substrat mit den SHCs wurde das FC Produkt als Nebenprodukt erhalten, während nach der Umsetzung des Geranylgeranylphenylethers ausschließlich die trizyklischen Eliminierungsprodukte isoliert wurden. Der Einsatz des kleinen Isoprenylphenylethers als Substrat führte hingegen zu keinerlei Produktbildung.

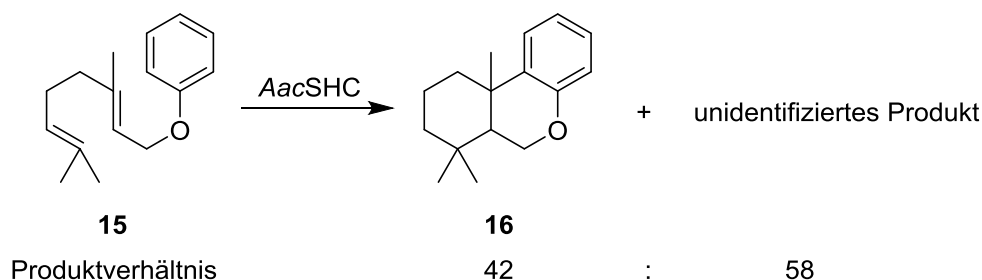


Abbildung 12: *AacSHC*-vermittelte FC Reaktion. Bei der Umsetzung des Geranylphenylethers **15** mit dem *AacSHC* Wildtypenzym kommt es zur Darstellung des gewünschten Alkylierungsprodukts **16** sowie eines unidentifizierten zweiten Hauptprodukts im Verhältnis von 42:58.^[111]

Somit konnte in den Vorarbeiten gezeigt werden, dass die Wildtypenzyme der *AacSHC* und *ZmoSHC1* in der Lage sind, eine Alkylierungsreaktion zu vermitteln. Dabei waren jedoch die detektierten Umsätze gering und die Produktselektivitäten der *AacSHC* verbesserungsfähig. Als Modellsubstrat wurde für die folgende Arbeit der Geranylphenylether **15** gewählt, da dieser die besten Umsätze mit den Wildtypenzymen zeigte. Der Ether **15** wird dabei vom *ZmoSHC1* Wildtypenzym bereits selektiv zum Alkylierungsprodukt **16** umgesetzt, während die Umsetzung mittels des *AacSHC* Wildtypenzyms zwei Produkte liefert, sodass zusätzlich die Kontrolle der Produktselektivität adressiert werden muss. Dennoch wurde als Modellsystem die *AacSHC* gewählt, da dieses bereits umfangreich untersucht wurde. So ist die Kristallstruktur der *AacSHC* bereits zugänglich^[130,138], wodurch ein rationales Design der aktiven Tasche mittels *enzyme engineering* möglich ist. Zudem war dieses Enzym schon

Gegenstand diverser Mutationsstudien^[129,131,158] und bewies in diesen eine außergewöhnliche Robustheit gegenüber der Einführung von Aminosäurevariationen. Der Ursprung der *AacSHC* aus einem thermophilen Organismus bedingt überdies eine exzellente Enzymstabilität und damit bedeutende Vorteile in ihrer allgemeinen Handhabung, insbesondere während der Reinigung.

3.1 Initiale Experimente

Um sich mit dem Enzymsystem der *AacSHC* vertraut zu machen und dessen Handhabung zu erlernen, wurden zunächst die Biotransformationen mit dem *AacSHC* Wildtypenzym als Katalysator und dem Geranylphenylether **15** als Substrat reproduziert. Für ein Kontrollexperiment wurde zusätzlich die *AacSHC* Variante D376C produziert und gereinigt. Diese Variante trägt an Position 376 anstelle der katalytisch aktiven Asparaginsäure ein Cystein und ist aus diesem Grund nicht in der Lage, die Polyzyklisierung zu initiieren.

Die Synthese des Geranylphenylethers **15** erfolgte, wie von Dominicus beschrieben^[157], mittels einer Williamsonschen Ethersynthese aus Geranyl bromid und Phenol mit einer Ausbeute von 78 %.

Das Gen des *AacSHC* Wildtypenzyms war in einen pET-22b(+) Vektor kloniert und wurde zunächst in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert (Kapitel 6.2.4). Die anschließende Proteinproduktion unter Autoinduktion sowie die Proteinreinigung erfolgten in geringfügig modifizierter Weise wie von Hammer beschrieben.^[124] Dabei wurde als Detergenz CHAPS verwendet.^[111] Das genaue Protokoll für die Proteinproduktion und -reinigung kann in den Kapiteln 6.3.1 und 6.3.2 nachvollzogen werden.

Die Reinheit und die Konzentration des IEX-gereinigten *AacSHC* Wildtypenzyms und der inaktiven Variante D376C wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 6.3.3) und des Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmungssassays (Kapitel 6.3.4) ermittelt. Der Maßstab der Biotransformationen betrug 500 μL , wobei 495 μL der gereinigten Enzymlösung und 5 μL einer 200 mM SubstratstammLösung in DMSO ($c_{\text{Ende(Substrat)}} = 2 \text{ mM}$) eingesetzt wurden (Kapitel 6.6.1). Neben der Negativkontrolle mit der inaktiven D376C Variante wurde zusätzlich eine Pufferkontrolle angesetzt. Diese beinhaltete statt der 495 μL Enzymlösung ausschließlich den Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde anschließend für 68 h bei 50 °C und 600 rpm durchgeführt. Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgte mittels Extraktion und die Analyse der Probe über massenspektrometrisch gekoppelte Gaschromatographie. Ein Ausschnitt der überlagerten Chromatogramme der Umsetzung mittels des *AacSHC*

Wildtypenzym, der *Aac*SHC Variante D376C und der Pufferkontrolle ist in Abbildung 13 dargestellt.

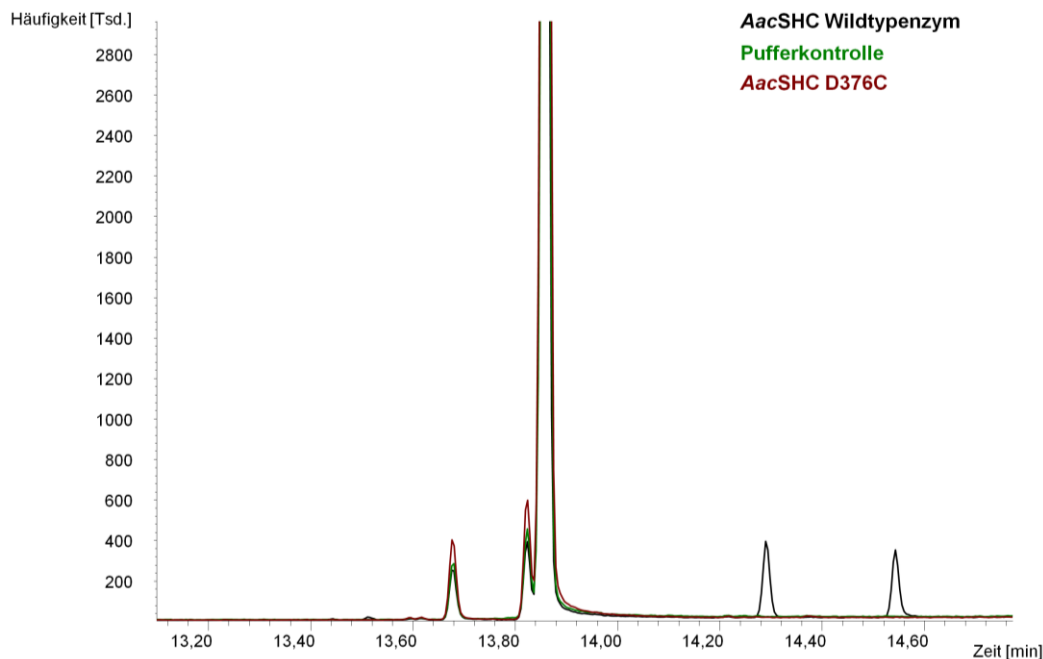


Abbildung 13: Überlagerung der Gaschromatogramme der Umsetzung von Geranylphenylether **15** mittels des *Aac*SHC Wildtypenzym (schwarz), der *Aac*SHC Variante D376C (rot) und der Pufferkontrolle (grün). Die Biotransformationen wurden mit gereinigtem Enzym ($c = 6,4 \text{ mg mL}^{-1}$) unter Einsatz von 2 mM des Substrats **15** bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % CHAPS als Detergenz durchgeführt.

Bei Betrachtung von Abbildung 13 fällt auf, dass es bei der Umsetzung des Geranylphenylethers **15** mittels der *Aac*SHC zur Bildung von zwei Produkten, welche bei 14,3 min und 14,5 min retinieren, im Verhältnis 1:1 kommt. In den Kontrollexperimenten wurden diese beiden Produkte nicht detektiert, sodass deren Formierung mittels der SHC-vermittelten Protonierung des Substrats einhergehen muss. Die Massenspektren der beiden Produkte geben einen Hinweis auf deren Identität. So besitzt das Produkt, welches bei 14,3 min retiniert, eine Masse von $m z^{-1} 230$, welche den Rückschluss erlaubt, dass es sich wahrscheinlich um das Alkylierungsprodukt **16** handelt, welches auch von dem *Zmo*SHC1 Wildtypenzym gebildet wird. Das zweite Produkt ($R_t = 14,5 \text{ min}$) besitzt eine Masse $m z^{-1}$ von 248, weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich bei dem von Hammer *et al.* unidentifizierten Produkt, um das Hydratisierungsprodukt **31** handelt (Abbildung 14).

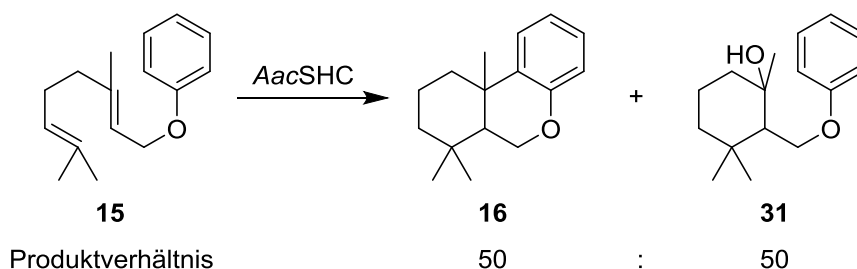


Abbildung 14: Mutmaßliche Produkte der Umsetzung des Geranylphenylethers **15** mit dem *AacSHC* Wildtypenzym. Die initiale Umsetzung des Modellsubstrats **15** legt die Annahme nahe, dass neben dem Alkylierungsprodukt **16** das Hydratisierungsprodukt **31** als zweites Hauptprodukt in einem Verhältnis 1:1 gebildet wird.

3.1.1 Verbesserung der Reaktionsbedingungen

Die initialen Biotransformationen wurden bei 50 °C für 68 h mit 0,2 % CHAPS als Detergenz durchgeführt. Um jedoch geeignete Bedingungen für die *AacSHC*-katalysierten FC Reaktionen zu identifizieren, wurden CHAPS und Triton X-100 als Detergenz sowie unterschiedliche Reaktionszeiten (21 h, 42 h und 68 h) und -temperaturen (50 °C und 60 °C) getestet. Dafür wurde erneut das *AacSHC* Wildtypenzym gereinigt und anschließend in der Umsetzung von Geranylphenylether **15** verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 zusammengestellt.

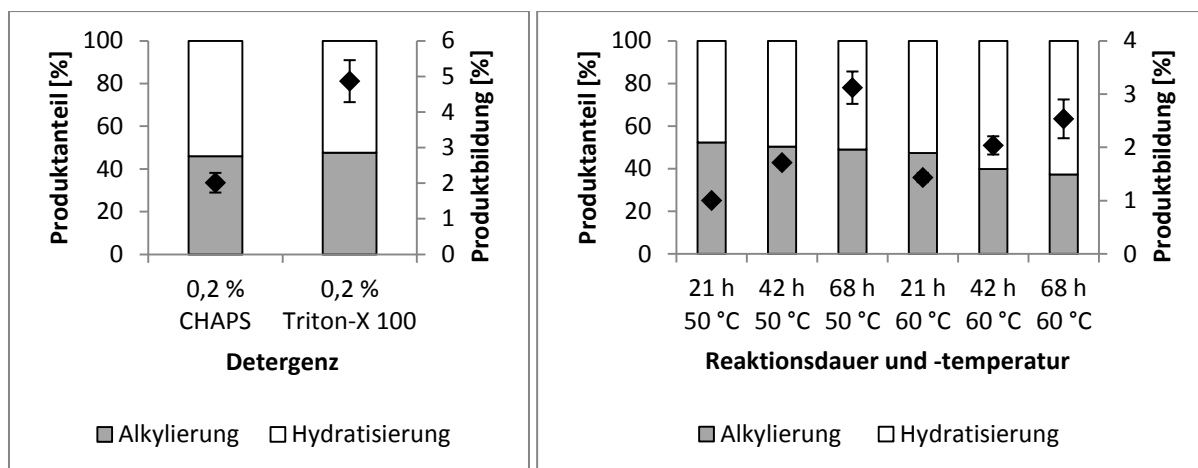


Abbildung 15: Getestete Reaktionsparameter zur Verbesserung der Produktbildung in der *AacSHC*-vermittelten Reaktion des Geranylphenylethers **15**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für den Anteil des Alkylierungs- **16** und weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Variation des Detergenzes (links) hat dabei einen signifikanten Einfluss auf die Produktbildung, jedoch keinen auf die Produktverteilung. Der Einsatz von Triton X-100 führt dabei zu einer Verdopplung der Produktbildung. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt. Die Enzymkonzentration betrug jeweils 2,5 mg mL⁻¹. Die Erhöhung der Reaktionszeit führt zu einer Steigerung in der Produktbildung (rechts), während die Erhöhung der Temperatur von 50 °C auf 60 °C keinen entscheidenden Unterschied in der Produktbildung bewirkte. Die Biotransformationen wurden bei 600 rpm und mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Enzymkonzentration betrug 3,3 mg mL⁻¹. Allen Biotransformationen wurden 2 mM Substrat **15** zugesetzt und die Ausführung erfolgte in technischen Triplikaten.

Der Wechsel des Detergenzes von CHAPS zu Triton X-100 in den Biotransformationen des Ethers **15** bewirkte eine Verdopplung der Produktformierung. Indessen blieben die Produktverhältnisse konstant. Auch die Erhöhung der Reaktionstemperatur und -dauer führten zu keiner signifikanten Verschiebung der Produktanteile zugunsten des Alkylierungsprodukts. Wobei jedoch festzuhalten ist, dass die 60 °C-Reaktionen grundsätzlich einen höheren Anteil an Hydratisierungsprodukt aufwiesen. Dieser Effekt scheint sich mit steigender Reaktionsdauer zu verstärken, sodass bei 21 h und 60 °C das Verhältnis Alkylierung zu Hydratisierung noch 1:1 ist, wohingegen das Verhältnis bei 68 h und 60 °C 2:3 beträgt. Bei den 50 °C-Reaktionen tritt dieses Phänomen nicht auf, sodass die Produktverhältnisse für alle Reaktionszeiten konstant sind.

Die Produktbildung steigt jedoch bei den 50 °C- sowie 60 °C-Reaktionen mit zunehmender Reaktionsdauer. Dieser Effekt ist bei 50 °C stärker als bei 60 °C und erreicht, in den hier durchgeführten Messungen, sein Maximum bei einer Temperatur von 50 °C und einer Reaktionsdauer von 68 h. Infolgedessen wurden als Standardbedingungen 50 °C, 68 h und 0,2 % Triton X-100 für alle weiteren *AacSHC*-vermittelten Biotransformationen gewählt.

3.1.2 Screening ausgewählter *AacSHC* Varianten

Für ein erstes Screening wurden im Folgenden 17 Varianten ausgewählt (Tabelle 1), welche in vorangegangenen Arbeiten eine Aktivitätssteigerung oder eine Verschiebung der Produktselektivität gegenüber bestimmten Substraten verglichen mit dem *AacSHC* Wildtypenzym aufwiesen.^[124,158,159,174–176] Neben den in Tabelle 1 gelisteten Varianten wurden zusätzlich das *AacSHC* Wildtypenzym und als Negativkontrolle die *AacSHC* Variante D376C sowie eine Pufferkontrolle mitgetestet. Die Enzyme wurden gereinigt und in der Modellreaktion mit 2 mM Geranylphenylether **15** versetzt. Die Biotransformationen wurden anschließend zunächst als Einfachmessung unter den ermittelten Standardbedingungen (0,2 % Triton X-100, 50 °C, 600 rpm, 68 h) durchgeführt. Die Ergebnisse dieses ersten Variantenscreenings sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 1: *AacSHC* Varianten, welche in vergangenen Projekten eine Aktivitätssteigerung oder eine Verschiebung der Produktselektivität verglichen mit dem *AacSHC* Wildtypenzym zeigten. Der Index gibt dabei das Projekt an, in welcher die jeweilige Variante Erwähnung findet: 1) Monozyklisierung von (*S*)-Citronellal^[124,129,158,174], 2) Umsetzung von Citronellalderivaten nach Bischoff^[176], 3) Umsetzung von Spiroverbindungen nach Bastian^[174], 4) Monozyklisierung von Geraniol^[124,129], 5) Monozyklisierung von 2,3-Epoxygeraniol^[124,129], 6) Monozyklisierung von (*R*)-Citronellal^[158,174] und 7) bimolekulare Reaktionen mit Farnesol von Kühnel^[159,175].

Position	W169	I261	Y420	V448	G600	F605	L607	Y609
Variation	A ^{1,3}	A ^{1,2,3,4,5}	A ^{1,2,6}	A ²	A ^{1,4,5}	A ^{1,5,6}	A ^{1,2,3,5,7}	F ⁶
		G ^{1,2,6}	G ^{2,6}	G ²		G ⁶	G ³	
		L ¹	C ^{1,6}				F ^{1,5,7}	
		V ¹	W ⁵					

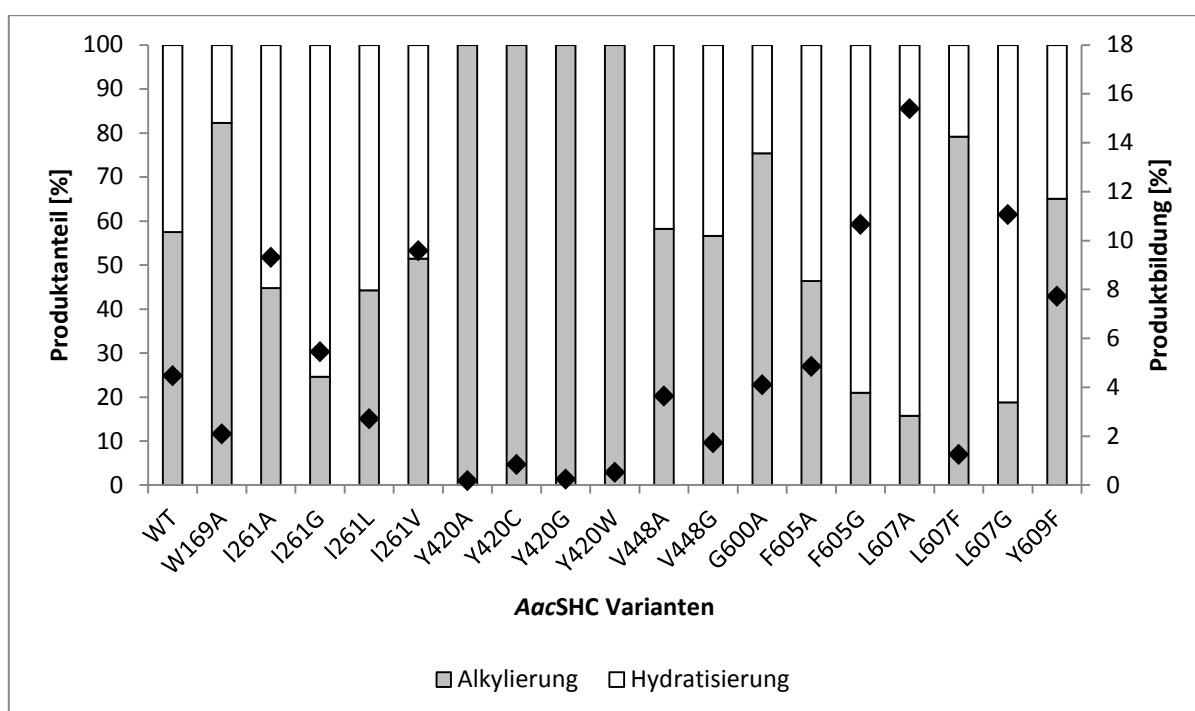


Abbildung 16: Erstes *AacSHC* Variantenscreening gegenüber der Umsetzung vom Geranylphenylether **15**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für den Anteil des Alkylierungs- und weiß für das Hydratisierungsprodukt steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen betrug jeweils 2,5 mg mL⁻¹. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt und die Ausführung erfolgte in Einfachmessungen.

Das erste Variantenscreening zeigt auf, dass die ausgewählten Varianten sowohl die Aktivität als auch die Produktselektivität steuern. Dabei scheint die Position Y420 essentiell für die Aktivität und die Produktselektivität, da diese Varianten alle eine sehr geringe Produktbildung zeigen, dabei aber vollkommen selektiv das Alkylierungsprodukt **16** darstellen. Aufgrund der sehr geringen Aktivität wurden diese Varianten jedoch an dieser Stelle nicht weiter untersucht. Varianten mit ähnlicher Produktbildung wie das *AacSHC* Wildtypenzym und

keiner signifikanten Verschiebung der Produktselektivität gegenüber dem Alkylierungsprodukt **16** wurden ebenso verworfen, sodass ausschließlich die Ergebnisse der *AacSHC* Varianten I261A, I261V, G600A, F605G, L607A, L607G und Y609F in Triplikatsmessungen evaluiert wurden (Abbildung 17).

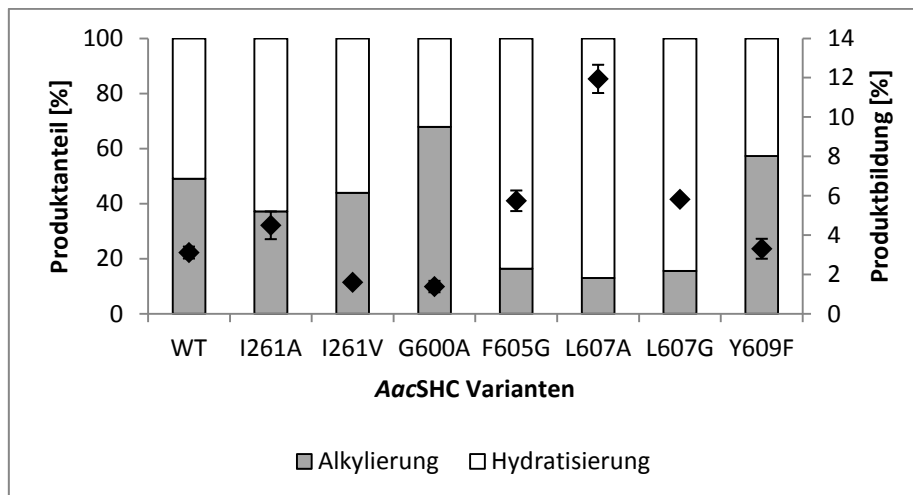


Abbildung 17: Evaluierung der Ergebnisse vielversprechender *AacSHC* Enzymvarianten aus dem ersten Variantenscreening. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für den Anteil des Alkylierungs- **16** und weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen betragen jeweils 2,5 mg mL⁻¹. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt und die Ausführung erfolgte in technischen Triplikaten.

Im Vergleich zum initialen Screening war die Produktbildung aller getesteten *AacSHC* Varianten in den Triplikatsmessungen bedeutend niedriger. Die Produktselektivitäten blieben jedoch konstant, sodass das *AacSHC* Wildtypenzym weiterhin das Alkylierungs- **16** sowie Hydratisierungsprodukt **31** in einem Verhältnis von 1:1 produzierte. Während der Einsatz der *AacSHC* Varianten I261A, I261V, F605G, L607A und L607G eine Verschiebung hin zum Hydratisierungsprodukt **31** bis zu 87 % ermöglichte, führte die Verwendung der Varianten G600A und Y609F zu eine Verschiebung der Produktselektivitäten hin zum gewünschten Alkylierungsprodukt **16**. Dabei konnte mit der *AacSHC* Variante G600A ein Anteil von 67 % an Produkt **16** erzielt werden.

Die ausgewählten Positionen scheinen einen ebensolchen Einfluss auf die Aktivität wie auf die Produktselektivität der Reaktion des Ethers **15** zu haben. Somit konnten mit den Varianten G600A und Y609F erste potentielle Schlüsselpositionen für die SHC-vermittelte Alkylierungsreaktion identifiziert werden.

3.2 Erweiterung des Substratspektrums

Neben der Anpassung des Katalysators kann auch die Veränderung des Substrats eine interessante Ausgangslage liefern. Hammer *et al.* zeigten dabei schon, dass durch *substrate engineering* beispielsweise das Substrat in einem produktiven Bindungsmodus forciert werden kann.^[124,155] Im Falle der FC Alkylierung könnte ein *substrate engineering* in zweierlei Weise eine spannende Rolle spielen. Einerseits könnte anhand dessen untersucht werden, ob die SHC-katalysierte FC Reaktion, ebenso wie der klassisch chemische FC Reaktionsansatz, ein aktiviertes Arensystem für die erfolgreiche Alkylierung benötigt, oder die SHCs einen Weg aufzeigen, wie auch elektronenneutrale oder unter Umständen sogar elektronenarme Aromaten eine solche Alkylierungsreaktion durchlaufen können. Andererseits beeinflussen Substituenten des Arensystems in der klassischen Chemie stark die Regioselektivität der neu einzuführenden Alkylkette; dabei stellt sich die Frage, ob in einem biokatalytischen Ansatz die Stereokontrolle des Enzyms die elektronische Regioselektivitätskontrolle des Substrats übersteuern kann.

3.2.1 Design und Synthese neuer Substrate

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden mittels Williamsonscher Ethersynthese brom- und methoxy-substituierte Derivate des Geranylphenylethers **32-35** synthetisiert. Die isolierten Ausbeuten betragen dabei 60-74 %. Substrat **36**, welches als einziges keine Etherfunktionalität trägt, wurde mittels einer Grignardreaktion aus Geranylacetat und Benzylmagnesiumbromid dargestellt und konnte mit einer Ausbeute von 87 % erhalten werden.

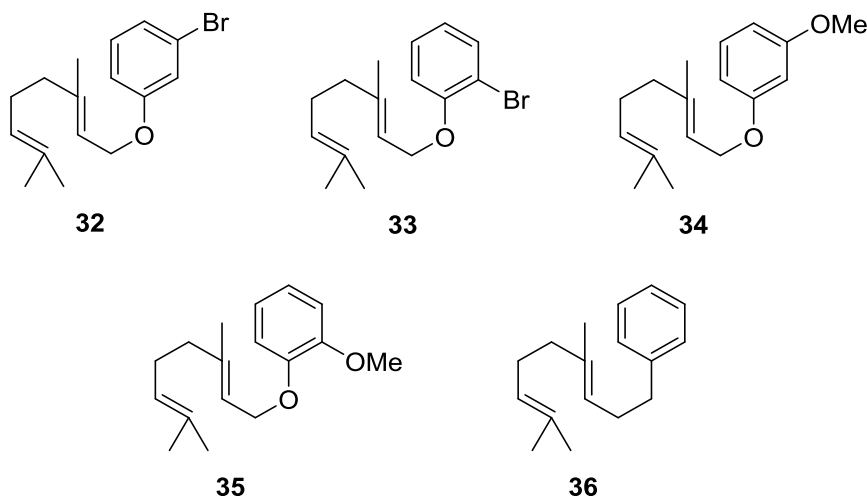


Abbildung 18: Neue Substrate für die SHC-katalysierte FC Alkylierung.

Die Etherfunktionalität in den Substraten **32-35** sowie der Alkylrest in Substrat **36** dirigieren dabei in *ortho*- und *para*-Position. Dieser Effekt zeigt sich auch schon beim Modellsubstrat **15**, sodass die Alkylierung in *ortho*-Position, wie beim Alkylierungsprodukt **16**, begünstigt wird.

Zusätzlich dirigieren die Brom- sowie Methoxysubstituenten in ihre *ortho*- und *para*-Position. Dabei besitzen die Bromsubstituenten einen schwach desaktivierenden und die Methoxysubstituenten einen aktivierenden Effekt auf das Arensystem. Im Falle der *meta*-substituierten Substrate **32** und **34** würde somit in einer klassischen chemischen Reaktion die weitere Substitution in 6-Position des Aromaten erfolgen, da die dirigierenden Effekte der Etherfunktionalität und der Substituenten sich verstärken. Im Falle der *ortho*-substituierten Substrate **33** und **35** sind die dirigierenden Effekte der Etherfunktionalität und der Substituenten gegenläufig. Die Etherfunktionalität würde die nächste Substitution in 4- und 6-Position dirigieren, während der Brom- und Methoxysubstituent in 3- und 5-Position dirigiert. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob der Katalysator in der Lage ist, diese Effekte zu übersteuern.

Substrat **36** trägt anstelle der Etherfunktionalität bloß eine Alkylkette, welche wesentlich weniger Elektronendichte in das aromatische System doniert, sodass das Arensystem nicht so stark aktiviert ist, wie bei den Substraten **15** und **32-35**. Dabei ist zu untersuchen, ob Substrat **36**, welches ansonsten Substrat **15** sehr ähnelt, trotz seiner geringen Elektronendichte am Aromaten in der Lage ist, in einer SHC-vermittelten Alkylierungsreaktion zu reagieren.

3.2.2 Umsetzung der neuen Substrate

Die Geranylphenyletherderivate **32-36** wurden anschließend in Biotransformationen mit dem *AacSHC* Wildtypenzym und den *AacSHC* Enzymvarianten (I261A, I261V, G600A, F605G, L607A, L607G und Y609F), welche in Kapitel 3.1.2 identifiziert wurden, als Substrate eingesetzt. Als Negativkontrolle diente wieder die inaktive *AacSHC* Variante D376C sowie eine Pufferkontrolle. Die Enzyme wurden in gereinigter Form eingesetzt und die Biotransformationen unter Standardbedingungen (50 °C, 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz) durchgeführt. Die Negativkontrollen wiesen für alle Substrate keine Produktformierung auf. Abbildung 19 zeigt die Produktverteilungen und -bildungen für die Umsetzungen der einzelnen Substrate.

Ergebnisse

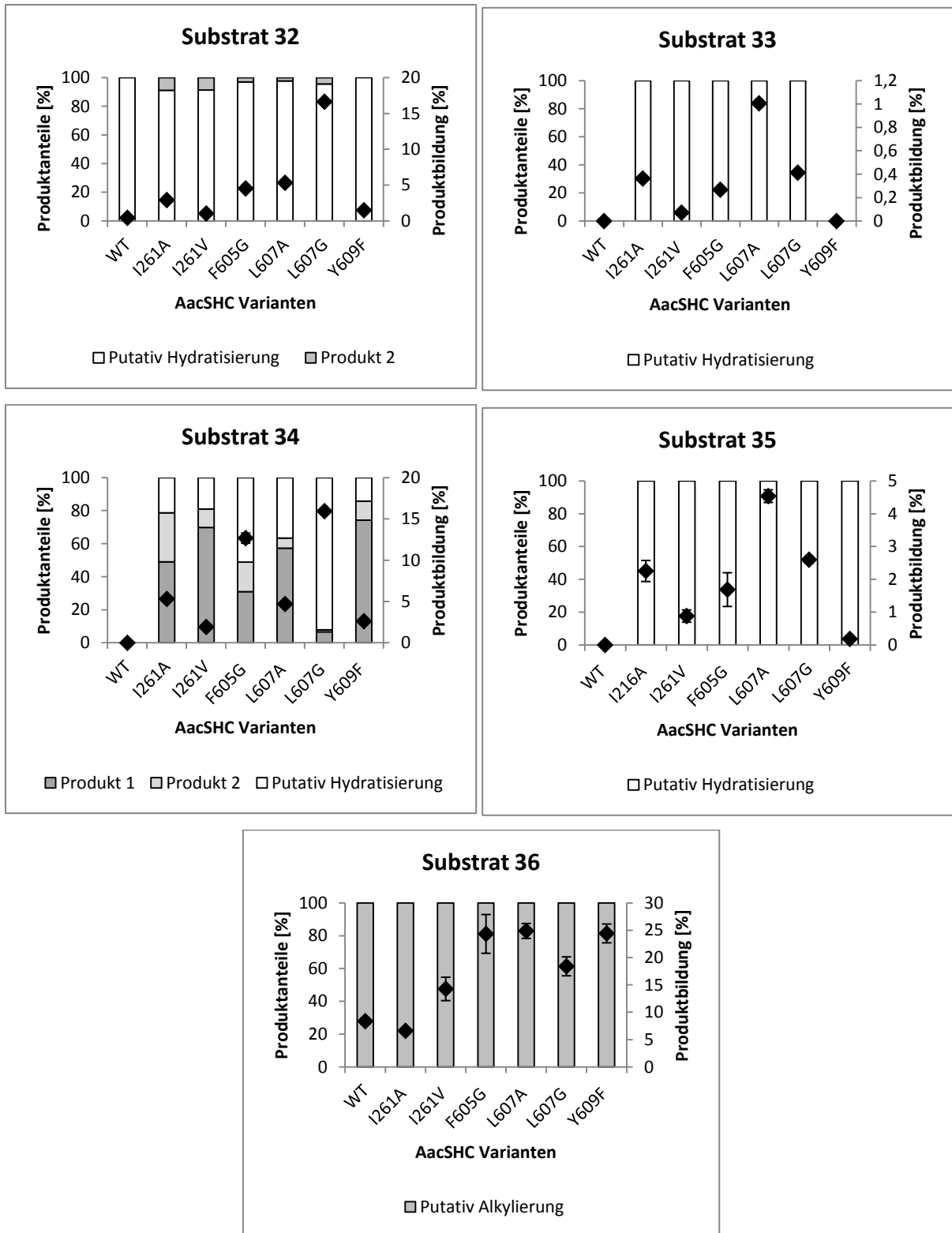


Abbildung 19: Screening der AacSHC Enzymvarianten mit den neuen Substraten **32-36**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei die Produkte als putativ bezeichnet werden, da diese noch nicht charakterisiert sind. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen betragen jeweils 4,0 mg mL⁻¹. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM des jeweiligen Substrats versetzt. Die Ausführung erfolgte für die Substrate **32-35** in technischen Duplikaten und für Substrat **36** in technischen Triplikaten.

Lediglich für die Substrate **32** und **36** war eine initiale Produktbildung durch das *AacSHC* Wildtypenzym zu beobachten. Während diese bei Einsatz des Substrats **32** mit 0,5 % sehr gering war, überstieg die initiale Produktbildung von Substrat **36** mit 8,4 % signifikant die bisherige Produktbildung mit dem Modellsubstrat **15**.

Mittels der *AacSHC* Enzymvarianten konnte für alle Substrate eine Produktbildung erzielt werden. Die Varianten in Position 607 führten dabei, unabhängig davon welches Substrat eingesetzt wurde, zur größten Steigerung in der Aktivität. Werden die Umsätze der *meta*-substituierten Substrate **32** und **34** mit denen der *ortho*-substituierten Substrate **33** und **35** verglichen, so fällt auf, dass diese für die *meta*-substituierten Substrate, gleich ob Brom **32** oder Methoxy **34**, signifikant höher sind als für die *ortho*-substituierten Substrate **33** und **35**. Die höchste Produktbildung von bis zu 25 % mit den *AacSHC* Varianten F605G, L607A und Y609F zeigte jedoch das Substrat **36** ohne weitere Substitution und Etherfunktionalität. Eine Übersicht der Trends der Produktbildungsrate ist in Abbildung 20 dargestellt.

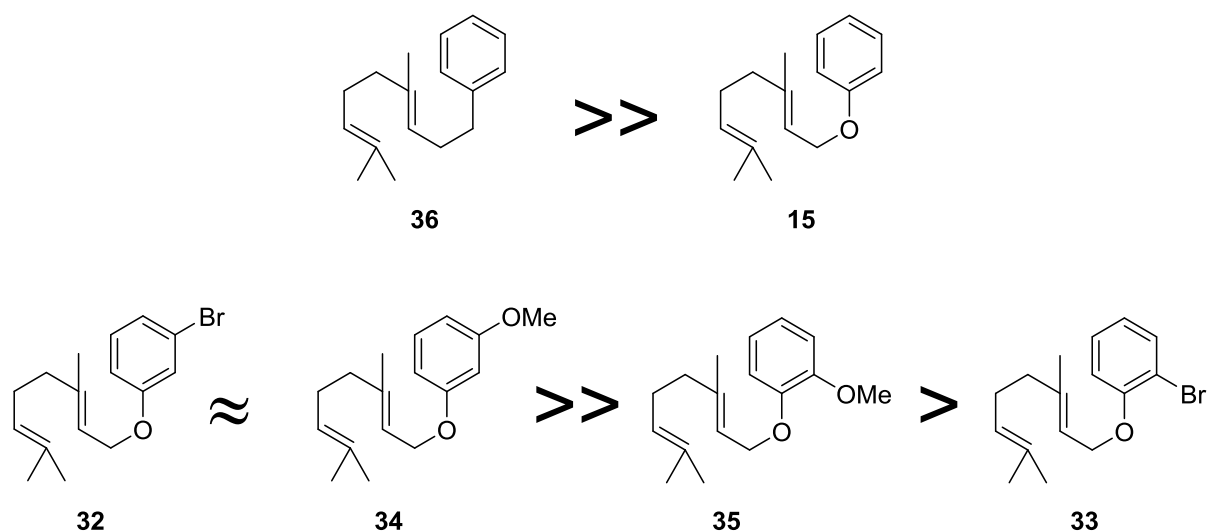


Abbildung 20: Trends der Produktbildung bei Einsatz der Substrate **15** und **32-36**. Die nicht substituierten Substrate **15** und **36** werden am besten von der *AacSHC* akzeptiert, wobei die höchste Produktbildung mit Substrat **36** zu verzeichnen ist. Bei den substituierten Substraten ist die Produktbildung bei Einsatz der *meta*-substituierten höher als bei Verwendung der *ortho*-substituierten Edukte.

Zudem fällt auf, dass bei der Umsetzung der Substrate **33**, **35** und **36** nur ein Produkt gebildet wird, während die Umsetzung von Substrat **32** zwei und die des *meta*-Methoxysubstrats **34** sogar drei Produkte liefert. Die bisher beschriebenen zwei Reaktionsprodukte (Kapitel 3.1) sind eindeutig anhand ihrer Molekülmassen unterscheidbar; so weist das Hydratisierungsprodukt eine um $m/z^{-1} 18$ höhere Masse als das jeweilige Alkylierungsprodukt auf. Aufgrund dieser Tatsache und des jeweiligen Fragmentierungsmusters lassen sich die Produkte anhand einer GC/MS-Analyse differenzieren. Bei Betrachtung der durchgeführten

GC/MS-Messungen ergibt sich somit als Hauptprodukt der Umsetzungen der Substrate **32-35** das jeweilige Hydratisierungsprodukt. Lediglich beim Einsatz von **36** kommt es ausschließlich zur Alkylierung oder eventuell Eliminierung eines Protons des finalen Carbokations. Dies wird im folgenden Kapitel 3.2.3 im Detail betrachtet.

Bei der Umsetzung der Substrate **32** und **34** kommt es neben der Hydratisierung zusätzlich zu einer Alkylierungs- bzw. Eliminierungsreaktion. Die Produkte wurden im Weiteren, wenn möglich, isoliert und charakterisiert (Kapitel 3.2.3 und Kapitel 3.9). Es konnten keine Produktstandards der Alkylierungsprodukte mittels chemischer Synthese synthetisiert werden, da es beim Einsatz der Substrate mit einer Etherfunktionalität zu einer abnormalen Claisenumlagerung kommt und somit nicht das gewünschte Produkt erhalten wird.^[177]

3.2.3 Strukturaufklärung der Produkte von Substrat **36**

Bei der Umsetzung von Substrat **36** wurden gute Produktbildungen von bis zu 25 % erreicht. Dem Massenspektrum der GC/MS-Analyse war für das detektierte Produkt eine Masse von m/z^{-1} 228 zu entnehmen. Dies entspricht entweder dem gewünschten Alkylierungs- **37** oder aber den Eliminierungsprodukten **38** und **39**. Die möglichen Produkte sind in Abbildung 21 gezeigt.

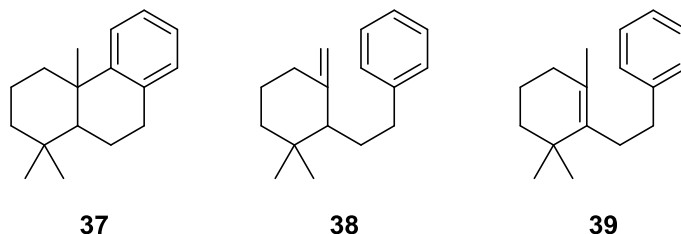


Abbildung 21: Mögliche Produkte der Masse m/z^{-1} 228 von der *Aac*SHC-vermittelten Umsetzung des Substrats **36**.

Durch die Abwesenheit der Etherfunktionalität im Substrat **36** ist an dieser Stelle die Synthese der Produktstandards für **37** realisierbar. Die Zyklisierung wurde unter Ru^{III} -Katalyse in einer Hydroarylierung gewährleistet.^[178] Das Alkylierungsprodukt **37** wurde mit einer Ausbeute von 76 % erhalten. Im Anschluss wurde der Produktstandard von **37** mittels GC/MS vermessen. Die überlagerten Chromatogramme des Produktstandards und der Biotransformation von **36** sind in Abbildung 22 dargestellt.

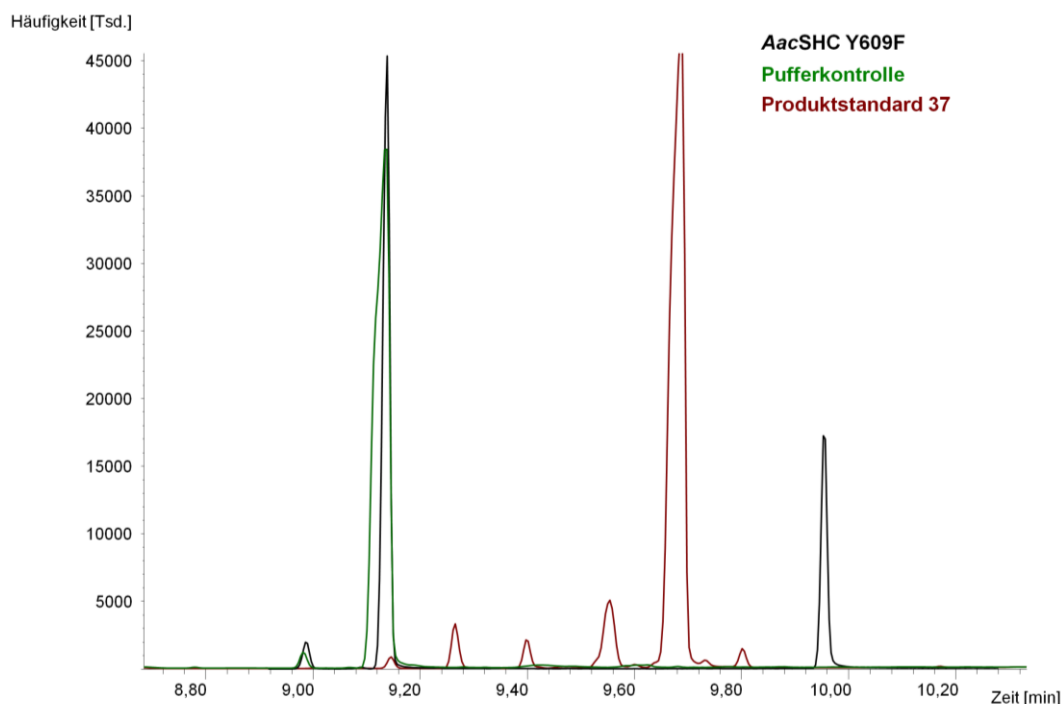


Abbildung 22: Überlagerung der Gaschromatogramme einer Biotransformation von **36** mit der *AacSHC* Variante Y609F (schwarz), der Pufferkontrolle (grün) und des Produktstandards **37** (rot).

Aus Abbildung 22 wird ersichtlich, dass das erhaltene Produkt aus der Biotransformation von Substrat **36** nicht das gewünschte Alkylierungsprodukt **37** darstellt. Somit wird mutmaßlich eines der Eliminierungsprodukte **38** oder **39** erhalten. Schelle untersuchte unter anderem diesen Sachverhalt in seiner Bachelorarbeit.^[179] Im Rahmen derer wurde eine präparative Biotransformation mit der *AacSHC* Variante Y609F ($c = 6 \text{ mg mL}^{-1}$) und dem Substrat **36** durchgeführt. Die Reaktion wurde bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 90 h inkubiert. Interessanterweise wurde dabei anstelle eines der Eliminierungsprodukte **38** oder **39** das Hydratisierungsprodukt **40** als Hauptprodukt erhalten. Zusätzlich wurde als Nebenprodukt das terminale Alken **38** isoliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

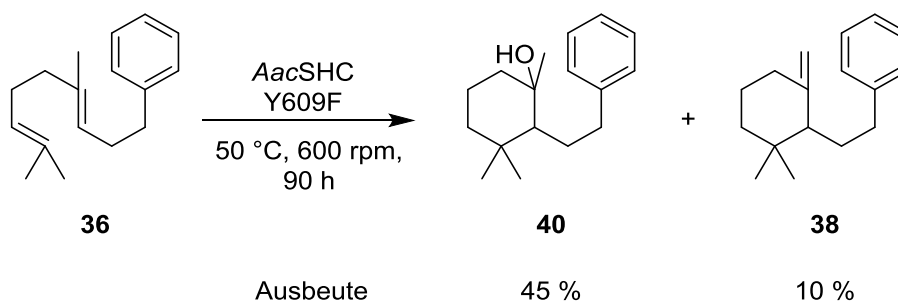


Abbildung 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der präparativen Biotransformation von Substrat **36** mit der *AacSHC* Variante Y609F, durchgeführt von Schelle.^[179]

Die Ergebnisse aus Schelles Bachelorarbeit legen nahe, dass das aromatische System von **36**, im Gegensatz zu **15**, nicht ausreichend aktiviert ist, um als Nukleophil das finale Carbokation abzufangen. Aus diesem Grund synthetisierte Schelle in seiner Arbeit *ortho*- **41**, *meta*- **42** und *para*-methylsubstituierte Aromaten **43**. Der Methylrest doniert dabei mittels seines positiven induktiven Effekts Elektronendichte in das aromatische System und aktiviert dieses. Anhand dieser Substrate wurde untersucht, ob die Aktivierung des Arensystems mittels einer Methylgruppe ausreichend ist, um anschließend als Nukleophil zu agieren. Zusätzlich zum elektronischen Einfluss der Methylsubstituenten konnte anhand der Substrate **41-43** der Einfluss der Positionierung der Substituenten untersucht (Kapitel 3.6.2) und somit Anforderungen an die Substrate formuliert werden (Kapitel 4.3).

3.3 Prima-Facie Assay

Die Präparation der Enzymvarianten mittels der Ionenaustauscherchromatographie stellte sich als zeitintensiv heraus und erlaubte aufgrund des großen Aufwands nur einen geringen Durchsatz von Enzymvarianten. Daher wurde nach einer Alternative gesucht, welche effektiv ein schnelles Screenen der Variantenbibliothek mit allen verfügbaren Substraten erlaubt. Dieses Assay sollte einen schnellen Einblick (Prima facie, lat. für „auf den ersten Blick“) in die Produktselektivitäten und ungefähren Produktbildungen erlauben, sodass putative Hit-Varianten rasch identifiziert und weiter charakterisiert werden können.

3.3.1 Etablierung des Prima-Facie Assays

Der Einsatz von gereinigtem Enzym in einem *mediumthroughput* Assay würde sich durch den erforderlichen Zellaufschluss und Reinigungsschritt zeit- und arbeitsintensiv gestalten, weswegen zunächst getestet wurde, welchen Einfluss der Einsatz von ganzen Zellen anstelle von gereinigtem Enzym auf die Produktbildung und -selektivität ausübt. Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym in diesem Ansatz nicht aus der Membran gelöst werden muss, wurde zusätzlich ein Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6,0) ohne Detergenz getestet. Weiterhin wurde die Substratkonzentration variiert (2 mM bzw. 5 mM). Als Substrate wurden das Modellsubstrat **15** und das Derivat ohne Etherfunktionalität **36** ausgewählt. Es wurden 50 mg mL⁻¹ eines *E. coli* BL21 (DE3) Zellpellets, in welche das *AacSHC* Wildtypenzym transformiert worden war, in 500 µL Reaktionsansätzen in Glasreaktionsgefäßen eingesetzt. Die Biotransformationen wurden bei den ermittelten Standardreaktionsbedingungen (50 °C, 600 rpm für 68 h) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 gezeigt.

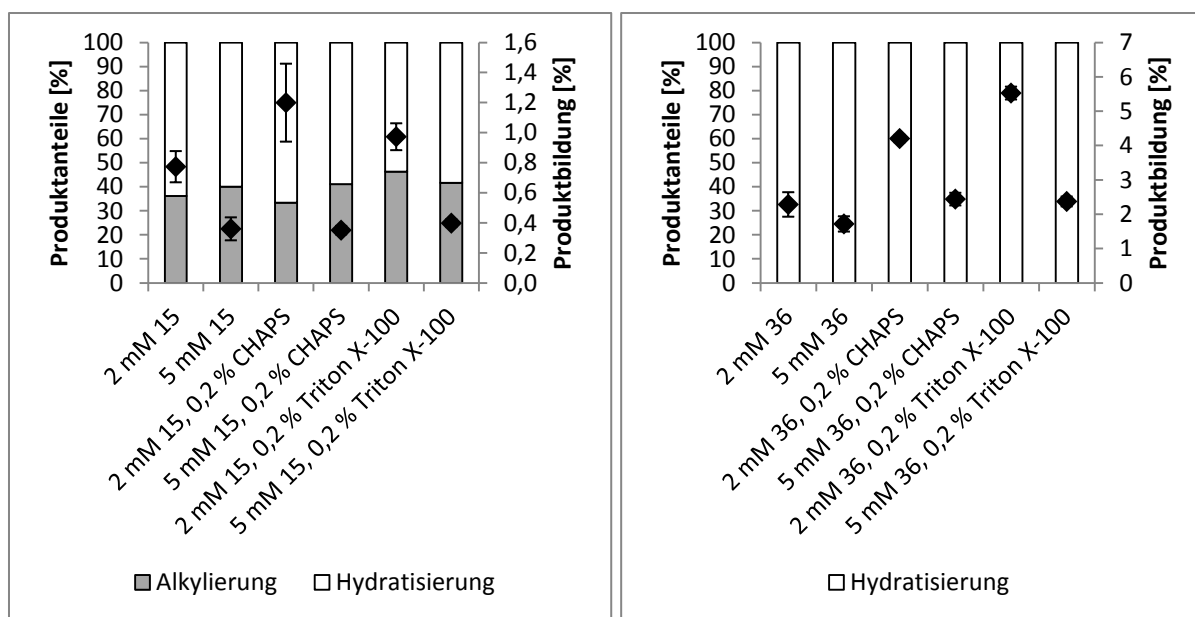


Abbildung 24: Ganz-Zell-Biotransformationen mit den Substraten **15** (links) und **36** (rechts) mit unterschiedlichen Pufferbedingungen. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für den Anteil des Alkylierungs- und weiß für das Hydratisierungsprodukt steht. Die schwarzen Rauten ♦ zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt. Es wurden 50 mg mL⁻¹ Zellpellet eingesetzt. Die Ausführung erfolgte in technischen Triplikaten.

Die Biotransformationen mittels ganzer Zellen zeigten allesamt Umsatz der Substrate **15** und **36**. Die Umsätze waren dabei auch nur unwesentlich geringer als mit gereinigtem Enzym. Die Erhöhung der Substratkonzentration auf 5 mM führte in beiden Fällen zu einer verminderten Produktbildung. Die Abwesenheit des Detergenzes führte ebenso zu einer Erniedrigung der Produktbildung. Die beste Produktbildung wurde bei der Umsetzung von 2 mM Substrat **36** mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz nachgewiesen. Bei der Umsetzung des Modellsubstrats **15** führte der Einsatz von CHAPS und Triton X-100 als Detergenz zu ähnlichen Produktbildungen. Jedoch hatte die Wahl des Detergenzes eine Auswirkung auf die Produktselektivität, sodass ein höherer Anteil an Alkylierungsprodukt **16** mit Triton X-100 erreicht werden konnte. Zur Etablierung des Prima-Facie Assays wurden somit 2 mM Substrat sowie 0,2 % Triton X-100 als Detergenz eingesetzt. Als Substrat für die Etablierung wurde aufgrund der höheren Produktbildungsraten Substrat **36** gewählt.

Im nächsten Schritt wurden erste Biotransformationen mit dem *AacSHC* Wildtypenzym in 96er *deep well plates* durchgeführt. Die Protokolle zur Kultivierung der Zellen (Kapitel 6.3.1) und zur Durchführung der Biotransformationen (Kapitel 6.6.1) befinden sich im Methodenteil. Bei manchen Substraten der SHCs ist bekannt, dass sie in der Lage sind, mit dem Plastik der Reaktionsgefäße zu interagieren. Aufgrund dessen wurde zunächst nach einem geeigneten Reaktionsgefäß gesucht. Dafür wurden Biotransformationen in *deep well*

plates direkt sowie mit passenden Glaseinsätzen (von Hirschmann[®]) durchgeführt. Zur Extraktion wurden die Reaktionsansätze in Glasreaktionsgefäße überführt. Nach der Extraktion wurde in den Ansätzen, welche direkt in den *deep well plates* inkubiert worden waren, weder Substrat noch Produkt detektiert, sodass diese vollständig in das Plastik der Platten diffundiert sein mussten. Die Biotransformationsansätze, welche in den Glaseinsätzen inkubiert worden waren, zeigten eine Produktbildung um 9 %.

Anschließend wurde getestet, ob eine direkte Extraktion in der *deep well* Platte möglich ist, ohne dass der Reaktionsansatz in ein Glasreaktionsgefäß transferiert werden muss. Dafür wurde zu den Reaktionsansätzen in den Glaseinsätzen 500 µL Ethylacetat gegeben, die *deep well* Platte mittels einer Noppenfolie verschlossen und 2 min mittels eines Vortexers die wässrige und organische Phase durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (4000 rpm, 5 min) und anschließend wurden 200 µL der organischen Phase in ein GC-Fläschchen überführt. Es konnte eine Produktbildung von 8 % detektiert werden, sodass auf den Transferschritt in ein Glasreaktionsgefäß zur Extraktion verzichtet werden kann. Es bleibt somit festzuhalten, dass die Biotransformationen in den *deep well* Platten mit passenden Glaseinsätzen durchgeführt werden müssen und die Extraktion direkt in der Platte erfolgen kann.

Nachdem das Set-up für die Reaktionen in den *deep well plates* festgelegt war, wurde die Produktbildungen des *AacSHC* Wildtypenzym gegenüber Substrat **36** betrachtet, um die Varianz über die Platten abschätzen zu können. Dafür wurden sechs 96er Platten ausschließlich mit dem *AacSHC* Wildtypenzym exprimiert und Biotransformationen mit dem Substrat **36** durchgeführt. Dabei ergab sich eine mittlere Produktbildung von 6,6 % ± 1,4 %. Die Standardabweichung ist vergleichsweise groß, sodass bei dem Assay ausschließlich Varianten mit einem beträchtlichen Anstieg in der Produktbildung im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym berücksichtigt werden sollten. Die Produktselektivitäten bleiben, ungeachtet der Produktbildung, jedoch konstant (Vergleich Kapitel 3.1.2), sodass das Prima-Facie Assay vortrefflich für die Identifikation von Positionen, welche als Selektivitätsschalter dienen, genutzt werden kann.

3.3.2 Substratscreening *via* Prima-Facie Assay

Nach der Etablierung des Prima-Facie Assays mit dem Substrat **36** unter Einsatz des *AacSHC* Wildtypenzym wurde das Prima-Facie Assay genutzt, um die vorhandene Variantenbibliothek (Tabelle 2) des IBTB zu screenen. Dabei wurden die sechs Substrate **15** und **32-36** mit allen 66 *AacSHC* Einzelvarianten umgesetzt. Die Ganz-Zell-Reaktionen wurden dabei in den Glaseinsätzen für die *deep well* Platten bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt. Es wurden 2 mM Substrat und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz eingesetzt. Auf jeder Platte befand sich als Positivkontrolle das *AacSHC* Wildtypenzym sowie als Negativkontrolle die *AacSHC* Variante D376C und Pufferkontrollen. Alle *AacSHC* Varianten wurden in biologischen Triplikaten vermessen. Die Extraktion erfolgte in *deep well plates* und die Proben wurden anschließend mittels GC/MS vermessen.

Tabelle 2: Zusammenstellung der *AacSHC* Einzelvariantenbibliothek des IBTB.

Position	L36	W169	I261	S307	W312	F365	Q366	A419	Y420	V448	W489	G490	Y495	G600	F601	F605	L607	Y609	Y612	
Variation	A	A	A	A	A	A	A	F	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	F	
	W	G	F	F	F	G	F	G	G	F	F	F	L	F	G	G	F	F	G	
			G	G	G	C	G	Y	C	G	G		W	L	W	W	G	G	W	
			W			W	W	W	W	W				W				W	W	
			L																	L
			V																	

Ausschließlich die Biotransformationsansätze mit den Substraten **15** und **36** lieferten im Prima-Facie Assay detektierbare Produktbildungen (Abbildung 25 und 26). Bei den Umsetzungen der anderen Substrate **32-35** waren keine Produktbildungen nachzuweisen. Diese zeigten schon in den Glasreaktionsgefäßen teils sehr niedrige Produktbildungen, sodass diese in dem Assay, in dem die Bildungsraten tendenziell niedriger sind, vermutlich unter dem Detektionslimit lagen. Es konnte somit keine *AacSHC* Variante identifiziert werden, die für eines der Substrate **32-35** eine signifikante Erhöhung in der Produktbildung oder eine Verschiebung der Produktselektivitäten bewirkte.

In Abbildung 25 sind die Screeningergebnisse für Substrat **36** dargestellt. 52 der 66 im Prima-Facie Assay eingesetzten *AacSHC* Varianten waren im Stande Substrat **36** umzusetzen. In Abbildung 25 sind die Varianten aufgeführt, welche eine Produktbildung ≥ 5 % zeigten.

Ergebnisse

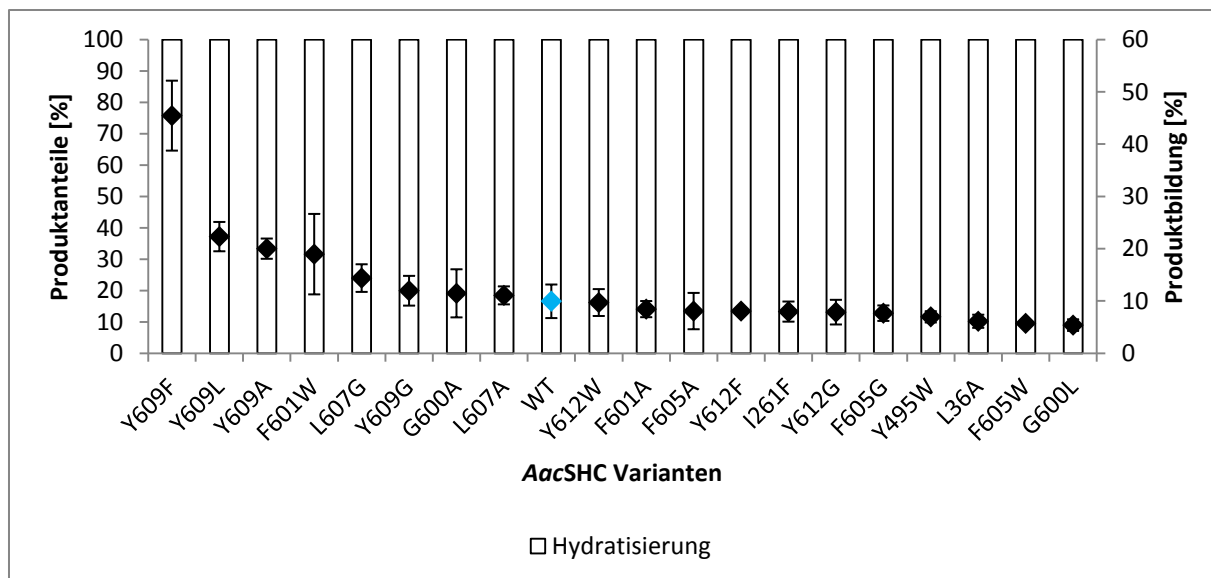


Abbildung 25: Ergebnisse des Prima-Facie Assays für die Umsetzung von Substrat **36**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei weiß für das Hydratisierungsprodukt **40** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Produktbildung des *AacSHC* Wildtypenzym ist mit einer blauen Raute \blacklozenge gekennzeichnet. Die Biotransformationen wurden in ganzen Zellen bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz in *deep well plates* durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **36** versetzt. Die Ausführung erfolgte in biologischen Triplikaten. Es sind alle *AacSHC* Varianten aufgeführt, welche in der Biotransformation eine Produktbildung $\geq 5\%$ zeigten.

Alle aktiven getesteten *AacSHC* Varianten setzten Substrat **36** ausschließlich zu seinem Hydratisierungsprodukt **40** um. Acht der gezeigten 20 *AacSHC* Varianten zeigten dabei eine höhere Produktbildung als das *AacSHC* Wildtypenzym. Besonders die Variante Y609F hebt sich mit einer Produktbildung von 45 % von allen anderen Varianten ab. Dabei scheinen allgemein Variationen in der Position 609 den größten Einfluss auf die Produktbildung auszuüben.

In Abbildung 26 sind die Screeningergebnisse für Substrat **15** dargestellt. 19 der 66 im Prima-Facie Assay eingesetzten *AacSHC* Varianten waren im Stande Substrat **15** umzusetzen.

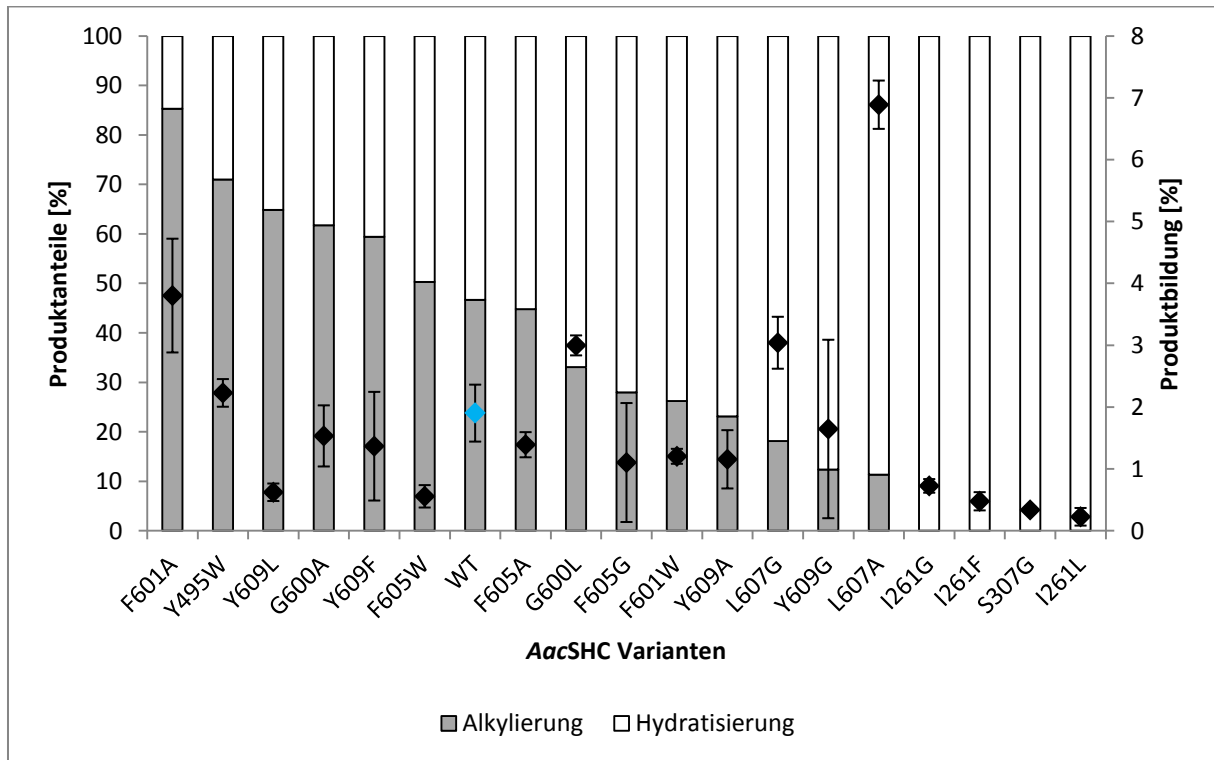


Abbildung 26: Ergebnisse des Prima-Facie Assays für die Umsetzung von Substrat **15**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16** und weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Produktbildung des *AacSHC* Wildtypenzym ist mit einer blauen Raute \blacklozenge gekennzeichnet. Die Biotransformationen wurden in ganzen Zellen bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz in *deep well plates* durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Ausführung erfolgte in biologischen Triplikaten. Die Ergebnisse sind beginnend mit dem höchsten Anteil an Alkylierungsprodukt am Produktverhältnis geordnet.

Acht der gezeigten 19 *AacSHC* Varianten zeigten dabei eine höhere Produktbildung als das *AacSHC* Wildtypenzym. Zudem war es unter Verwendung der Varianten möglich, die Produktselektivität maßgeblich zu verschieben. Führte der Einsatz der *AacSHC* Variante F601A zu 85 % Alkylierungsprodukt **16** von der gesamten Produktbildung, so war die I261G im Prima-Facie Assay komplett selektiv für die Herstellung des Hydratisierungsprodukts **31**. Den größten Einfluss auf die Produktbildung schienen dabei erneut die Positionen 600, 601 und 607 zu haben. Die Schalterpositionen für die Produktselektivität scheinen demgegenüber 261, 495, 600, 601, 607 und 609 zu sein.

Das Prima-Facie Assay bestätigte somit den Großteil der Erkenntnisse aus dem Screening der Einzelmutanten (Kapitel 3.1.2 und 3.2.2) und brachte nur bedingt neue Erkenntnisse. Die Umsetzung der Substrate **32-35** war nicht erfolgreich. Für Substrat **36** wurden erneut Varianten identifiziert, welche lediglich in der Lage waren das Hydratisierungsprodukt **40** zu

produzieren. Dies legt erneut die Überlegung nahe, dass das aromatische System von Substrat **36** ungenügend aktiviert ist, um als Nukleophil in einer FC-artigen Reaktion zu reagieren. Aus diesem Grund wurde entschieden, mit dem Modellsubstrat **15** weiterzuarbeiten. Dessen Ergebnisse aus dem Prima-Facie Assay wurden im Folgenden evaluiert, da dort mit der F601A und Y495W zwei neue selektivitätsbestimmende Varianten in Erscheinung getreten waren. Zusätzlich wurden die *AacSHC* Varianten I261G, F601W, G600A, G600L, L607A und Y609F ausgewählt, da sie einen starken Einfluss auf die Produktselektivität ausübten und dabei zumindest eine Wildtypenzym-ähnliche Produktbildung aufwiesen. Zur Evaluierung der Ergebnisse des Prima-Facie Assays wurden die Reaktionen mit den oben genannten Varianten mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 zusammengestellt.

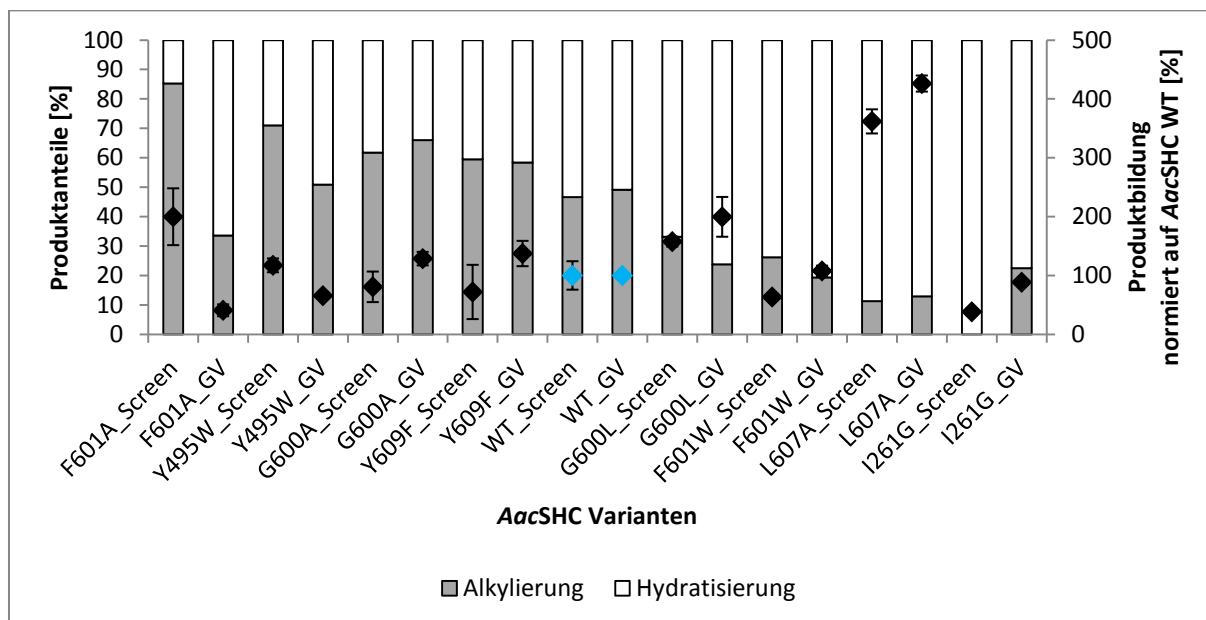


Abbildung 27: Reproduktion der Ergebnisse des Prima-Facie Assays (Screen) in Glasreaktionsgefäßen (GV). Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- und weiß für das Hydratisierungsprodukt steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Produktbildungen der *AacSHC* Wildtypenzyme sind mit blauen Rauten \blacklozenge gekennzeichnet. Die Biotransformationen des Prima-Facie Assays (Screen) wurden in ganzen Zellen bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 68 h mit $0,2 \text{ } \%$ Triton X-100 als Detergenz in *deep well plates* durchgeführt. Die Ausführung erfolgte in biologischen Triplikaten. Die Biotransformationen der Evaluierung wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und $0,2 \text{ } \%$ Triton X-100 als Detergenz bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen (GV) durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Ausführung erfolgte in technischen Triplikaten.

Die Evaluierung des Prima-Facie Assays in Glasreaktionsgefäßen bestätigte die Ergebnisse für die *AacSHC* Varianten F601A und Y495W nicht. Im Assay zeigten die beiden Varianten einen Produktanteil des Alkylierungsprodukts **16** von $85 \text{ } \%$ (F601A) bzw. $71 \text{ } \%$ (Y495W), in den reproduzierten Reaktionen jedoch nur von $33 \text{ } \%$ (F601A) und $50 \text{ } \%$ (Y495W). Zusätzlich waren auch die Produktbildungen, welche in Glasreaktionsgefäßen mit einer definierten

Menge an Zellpellet (50 mg mL^{-1}) prinzipiell höher sind, in den reproduzierten Reaktionen für die Varianten F601A und Y495W niedriger. Dies weist zusätzlich darauf hin, dass die guten Ergebnisse im Prima-Facie Assay lediglich Artefakte waren.

Bei den anderen reproduzierten Reaktionen bestätigt sich der Trend, dass in Glasreaktionsgefäßen die Produktbildung allgemein höher ist als bei Reaktionen in *deep well plates*. Jedoch weisen alle sechs getesteten Varianten eine sich ähnelnde Produktbildung in *deep well plates* sowie in Glasreaktionsgefäßen auf. Zudem konnten auch die gemessenen Produktverhältnisse bei diesen Varianten in den reproduzierten Reaktionen bestätigt werden. Somit bestätigte sich der Einfluss der Variationen in den Positionen 261, 600, 607 und 609 auf die Produktselektivität der Umsetzung des Modellsubstrats **15** sowie auf dessen Produktbildung. Infolgedessen wurden die genannten Schlüsselpositionen ausgewählt, um diese im Nachfolgenden gezielt zu sättigen.

3.4 Sättigung der Schlüsselpositionen aus dem Prima-Facie Assay

Im Folgenden wurden die identifizierten Schlüsselpositionen I261, G600, L607 und Y609 *targets* einer Sättigungsmutagenese. Die Sättigungsmutagenese wurde mittels der *Ligation-During-Amplification*-Methode (auch *QuikChange*TM) durchgeführt. Die Ganz-Zell-Reaktionen wurden unter Einsatz von 50 mg mL^{-1} Zellpellet durchgeführt.

Die Ergebnisse der Sättigungsmutagenese-Ansätze sind in Abbildung 28 und 29 dargestellt. Die Variationen in Position 261 führten dabei fortwährend zu einer Wildtypenzym-ähnlichen oder niedrigeren Produktbildung und bedingen zudem keine Verschiebung der Produktverhältnisse hin zum Alkylierungsprodukt **16**.

Die Sättigungsmutagenese in Position 600 lieferte demgegenüber sieben Varianten, welche die Produktselektivität hin zum Alkylierungsprodukt **16** verschoben. Die *AacSHC* Varianten G600I und G600M setzen dabei das Modellsubstrat **15** mit einer Selektivität von 90 % zum gewünschten Produkt **16** um. Die *AacSHC* Varianten G600V und G600L zeigten zudem eine 3fache höhere Produktbildung wie das *AacSHC* Wildtypenzym. Interessanterweise tritt bei der Umsetzung von **15** mit der Variante G600L ein weiteres Produkt, welches bisher noch nicht charakterisiert ist, auf. Die G600 Varianten, welche die Produktselektivität in Richtung des Hydratisierungsprodukts **31** verschoben, zeigten allesamt eine sehr niedrige Aktivität. Die beste unter diesen Varianten war die G600R, welche vollständig selektiv das Hydratisierungsprodukt **31** darstellte und eine Produktbildung von 0,6 % aufwies.

Ergebnisse

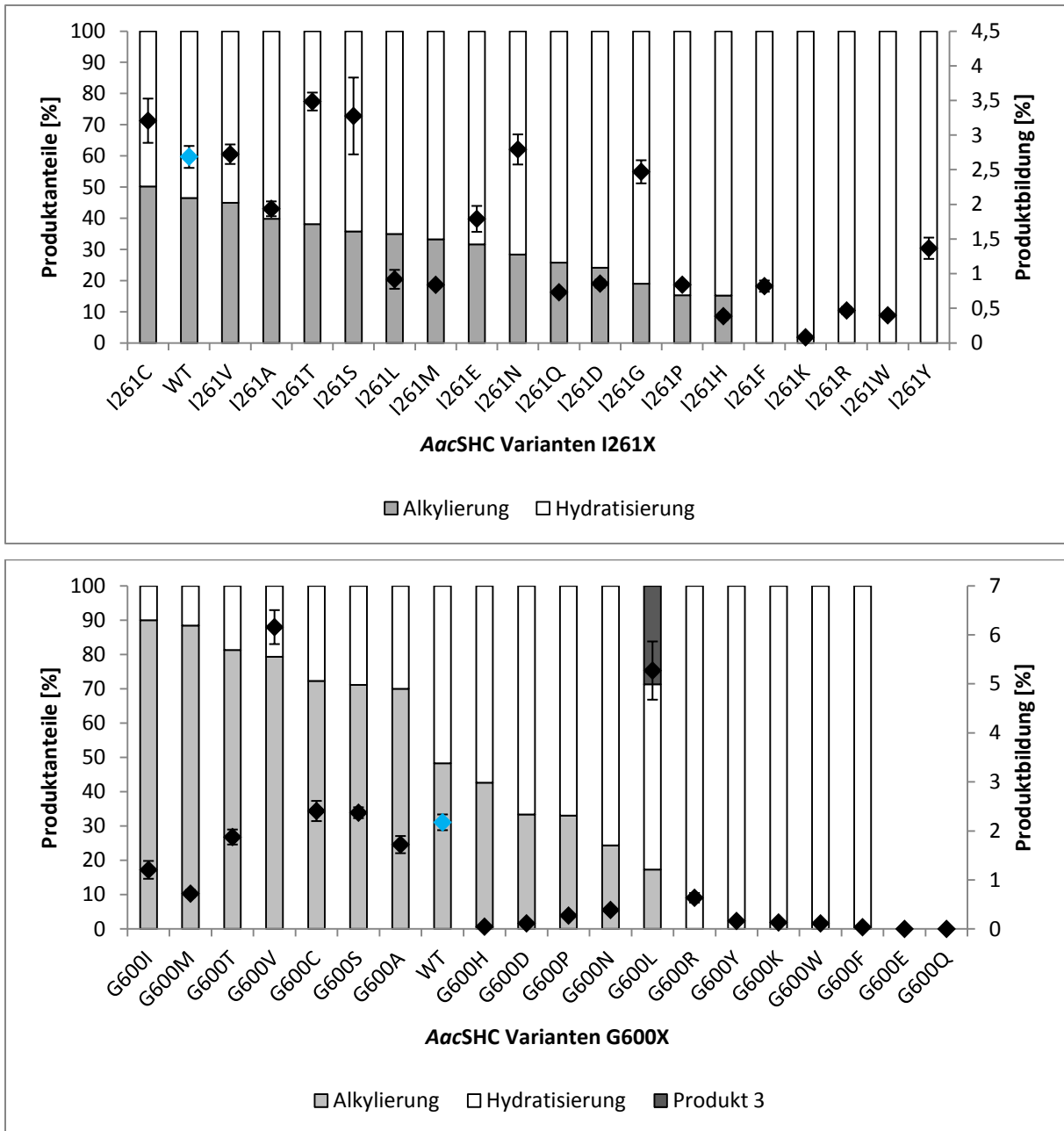


Abbildung 28: Ergebnisse der Sättigungsmutagenese-Ansätze an Position 261 (oben) und 600 (unten). Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16**, weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** und dunkelgrau für ein nicht charakterisiertes Nebenprodukt steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Produktbildung des *AacSHC* Wildtypenzym ist mit einer blauen Raute \blacklozenge gekennzeichnet. X steht für eine der kanonischen proteinogenen Aminosäuren. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Ergebnisse

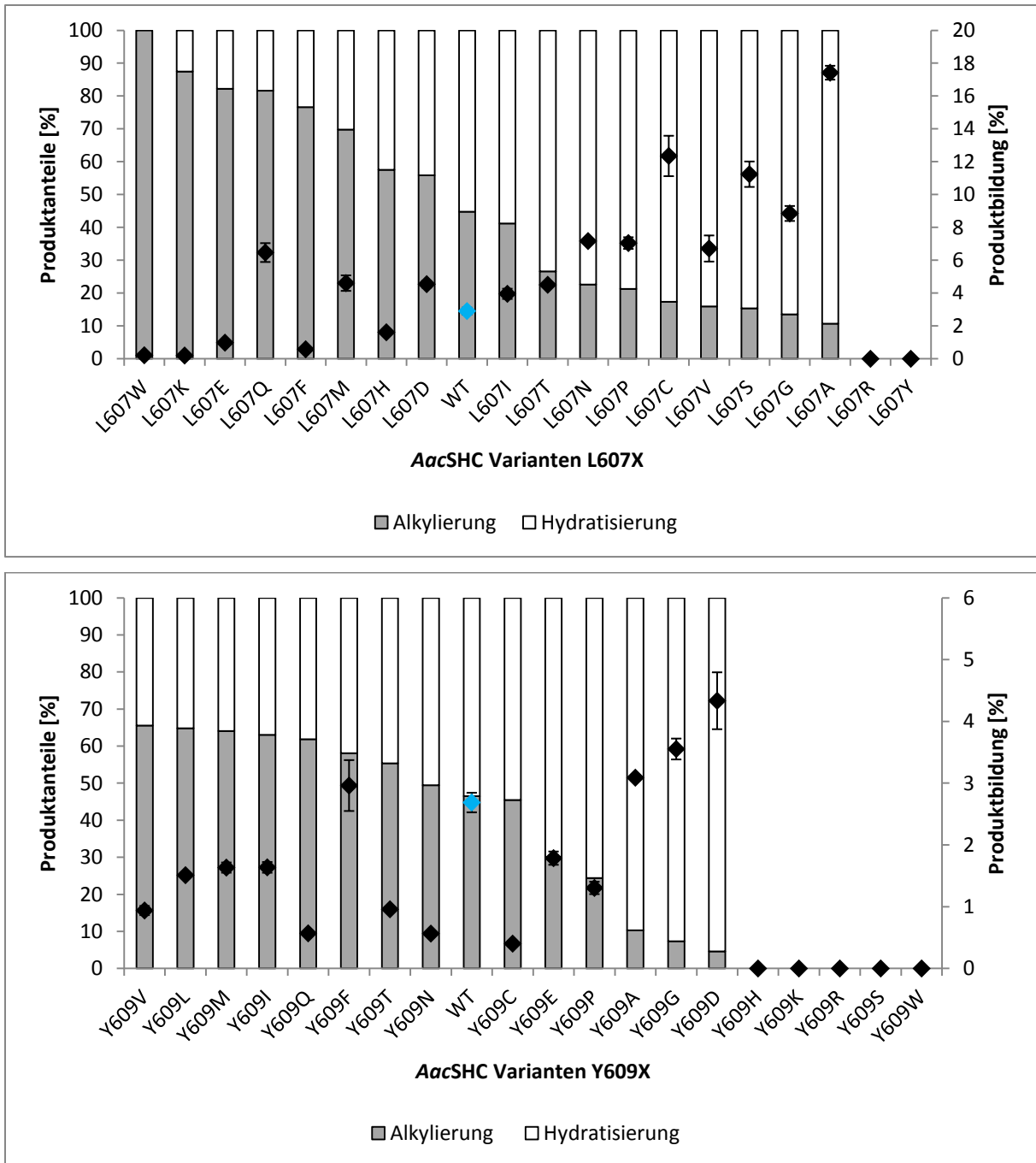


Abbildung 29: Ergebnisse der Sättigungsmutagenese-Ansätze an Position L607 (oben) und Y609 (unten). Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16** und weiß für das Hydratisierungsprodukts **31** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Produktbildung des *AacSHC* Wildtypenzym ist mit einer blauen Raute \blacklozenge gekennzeichnet. X steht für eine der kanonischen proteinogenen Aminosäuren. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Bei den *AacSHC* Varianten in Position 607 zeigten sogar acht Varianten eine höhere Selektivität gegenüber dem Alkylierungsprodukt **16** als das *AacSHC* Wildtypenzym. Dabei waren jedoch fünf dieser Varianten (W, K, E, F und H) sehr gering aktiv bis praktisch inaktiv. Die beste Selektivität mit 82 % Alkylierungsprodukt **16** und einer Produktbildung von 6,5 % wiesen dabei noch die Variante L607Q auf. Werden im Gegensatz dazu die Varianten betrachtet, welche einen höheren Anteil an Hydratisierungsprodukt **31** bedingen, ging bei diesen die Selektivitätsverschiebung immer mit einer Steigerung in der Produktbildung einher. Ihren Höhepunkt erreichte dies mit der Variante L607A, welche mit einer Produktbildung von 17,5 % sechs Mal so aktiv ist wie das *AacSHC* Wildtypenzym und zudem 90 % Selektivität gegenüber dem Hydratisierungsprodukt **31** aufwies.

Die Variationen in Position 609 führten zum größten Teil zu wenig aktiven bis inaktiven Varianten. Lediglich drei Varianten (A, G und D) sind aktiver als das *AacSHC* Wildtypenzym. Ebenso wie bei der Position 607 war auch hier zu beobachten, dass mit einer Selektivitätsverschiebung hin zum Hydratisierungsprodukt **31** eine Steigerung in der Produktbildung einherging. Der beste Kandidat war dabei die Variante Y609D, welche zu 95 % selektiv das Hydratisierungsprodukt **31** darstellte und die 1,5fache Produktbildung des Wildtypenzyms aufwies. Mit den Varianten Y609V und Y609L konnte zudem das Produktverhältnis auf 65 % hin zum Alkylierungsprodukt **16** verschoben werden.

In Tabelle 3 sind die vielversprechendsten Varianten der Sättigungsmutagenese-Ansätze mit ihrer entsprechenden Produktselektivität sowie -bildung aufgeführt. Es wurden Varianten ausgewählt, welche Einfluss auf die Selektivität ausübten und dennoch eine moderate Produktbildung aufwiesen. Die Position 261 wurde dabei nicht weiter berücksichtigt, da die Variationen an dieser Position weder die gewünschte Selektivitätsverschiebung noch eine Erhöhung der Produktbildung zur Folge hatten.

Tabelle 3: Vielversprechende Varianten für die Selektivitätskontrolle und die Erhöhung der Produktbildung aus dem Sättigungsmutagenese-Ansatz. Das *AacSHC* Wildtypenzym (WT) dient als Referenz.

Varianten	Produktbildung [%]	Produktanteile
		Alkylierung : Hydratisierung (: Nebenprodukt)
WT	2,5	48 : 52
G600I	1,2	90 : 10
G600V	6,2	79 : 21
G600L	5,3	17 : 54 (: 29)
L607Q	6,5	82 : 18
L607A	17,4	11 : 89
Y609L	1,5	65 : 35
Y609D	4,3	5 : 95

3.5 Die Wasserhypothese und deren Evaluierung

Um eine mögliche Begründung für den Einfluss der identifizierten Varianten auf die Produktselektivität zu finden, wurde die Kristallstruktur des *AacSHC* Wildtypenzym (pdb: 1UMP) analysiert. Dabei wurde ersichtlich, dass alle Schalterpositionen Teil der aktiven Tasche sind und sich in direkter Nachbarschaft zueinander befinden.

Als nächstes wurde eine Dockingstudie des Geranylphenylethers **15** in die aktive Tasche des *AacSHC* Wildtypenzym mit der YASARA Software durchgeführt. Die Überlagerung der Kristallstruktur mit dem co-kristallisierten Liganden 2-Azasqualen und dem kalkulierten Bindungsmodus des Geranylphenylethers **15** ist in Abbildung 30A dargestellt. Dabei fällt auf, dass sich der Geranylphenylether **15** laut Dockingstudie entgegengesetzt zum 2-Azasqualen in die aktive Tasche faltet. Die Doppelbindungen der ersten Isopreneinheiten sind in beiden Fällen jedoch passend für die initiale Protonierung durch die D376 positioniert, sodass der Bindungsmodus des Geranylphenylethers **15** durchaus plausibel erscheint.

Im nachfolgenden Schritt wurde das Kristallwasser genauer betrachtet. Dafür wurden zwei Wassermoleküle identifiziert, welche potentiell in der Lage sind, das zweite Carbokation im 2-Azasqualen bzw. im Geranylphenylether **15** abzufangen. Das erste Wassermolekül wird dabei vermutlich von den Seitenketten der Aminosäuren Q366, N369 und Y420 koordiniert (Abbildung 30B). Das zweite Kristallwasser befindet sich unterhalb der Substrate und wird mutmaßlich durch die Seitenkette von Y609 und durch das Proteinrückgrat von W489 und T599 positioniert (Abbildung 30C). Zusätzlich sind dort auch die Reste G600 und L607 lokalisiert. Folglich befinden sich alle identifizierten Schalterpositionen in der Nähe des zweiten Kristallwassers. Bei Betrachtung des Bindungsmodus des Geranylphenylethers **15**

wird zudem ersichtlich, dass das zweite Kristallwasser mit einer Distanz zum zweiten Carbokation-Kohlenstoff von 3,9 Å besser für einen nukleophilen Angriff positioniert ist als das erste Wassermolekül mit einer Entfernung von 6,2 Å. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Wassermolekül unterhalb des Geranylphenylethers **15** für die Hydratisierung verantwortlich ist, da es die nähere und somit bessere Positionierung zum zweiten Carbokation-Kohlenstoff aufweist und sich zudem in der Nähe der identifizierten Schalterpositionen befindet.

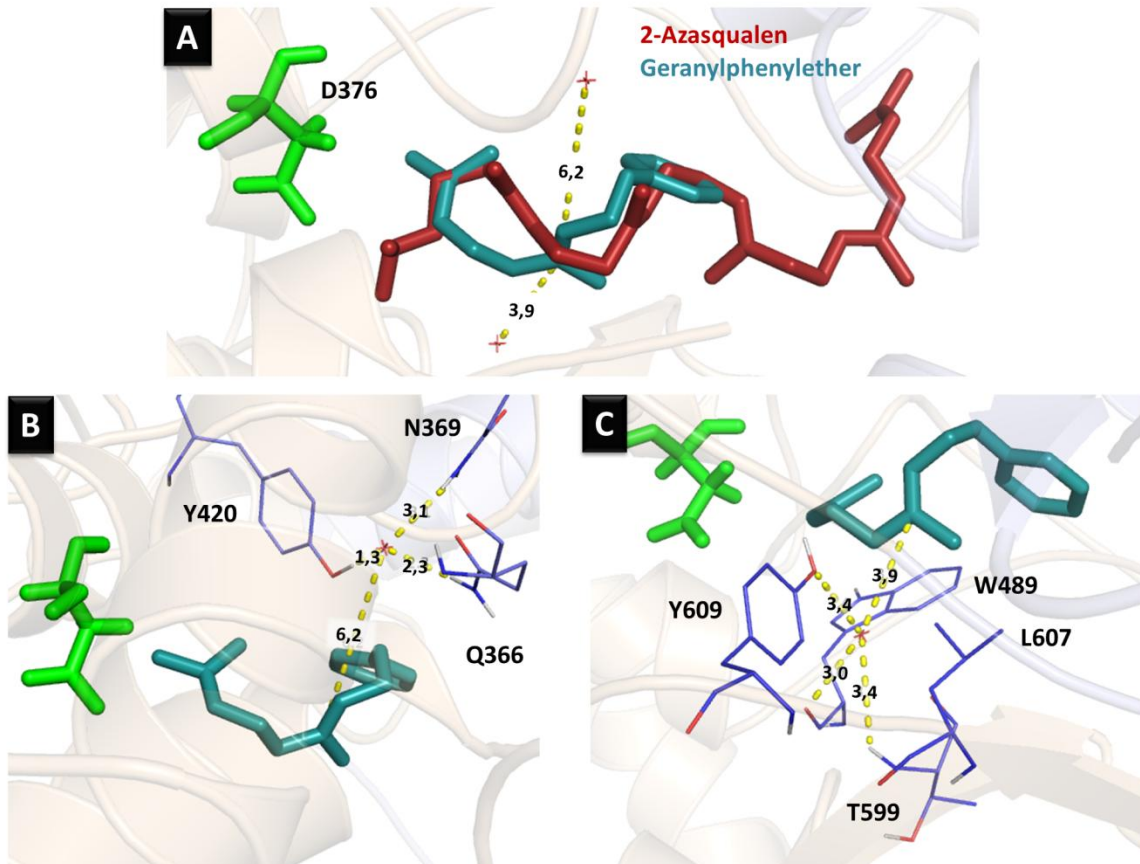


Abbildung 30: Aufstellung der Wasserhypothese. (A) zeigt die Kristallstruktur der *AacSHC* (pdb: 1UMP) mit dem co-kristallisierten Ligand 2-Azasqualen (rot), einem mittels der YASARA Software errechneten Bindungsmodus des Geranylphenylethers **15** (türkis) und der katalytisch aktiven Asparaginsäure (grün). Zusätzlich sind zwei Kristallwasser mit roten Kreuzen gekennzeichnet, die in der Lage sein sollten das zweite Carbokation des Geranylphenylethers **15** zu quenchen. Die Abstände der Wassermoleküle zum zweiten Carbokation-Kohlenstoff sind in Å angegeben. (B) zeigt die Aminosäuren Y420, N369 und Q366, welche das Wassermolekül koordinieren, das sich oberhalb des Substrats **15** befindet. (C) zeigt die Koordinationsphäre des zweiten Kristallwassers, welches im vorgeschlagenen Bindungsmodus unterhalb von **15** positioniert ist. Die Koordination wird dabei von der Seitenkette des Y609 sowie vom Proteinrückgrat der Aminosäuren W489 und T599 vorgenommen. Zudem befindet sich auch das Leucin in Position 607 in räumlicher Nähe zu dem zweiten Kristallwasser.

Um die aufgestellte Hypothese experimentell zu überprüfen, wurde angestrebt, die fixe Positionierung des Wassermoleküls aufzubrechen, indem die Wasserstoffbrücken, welche dieses koordinieren, aufgelöst werden. Dafür wurde zunächst die Koordination der Seitenkette des Y609 zum Wasser aufgebrochen, indem Aminosäuren mit großen, hydrophoben Seitenketten (F, L, I, V und M) an dieser Stelle eingeführt wurden. Diese sind nicht mehr in der Lage, das Wassermolekül zu koordinieren und blockieren zudem den Raum der aktiven Tasche, sodass sich keine weiteren Wassermoleküle positionieren können. Zusätzlich wurde durch Veränderung der Seitenketten angestrebt, die Koordination durch das Rückgrat der Aminosäuren W489 und T599 zu unterbinden. Außerdem wurden große hydrophobe Aminosäureseitenketten (I, L, M, V) in Position 600 eingeführt, um das Wassermolekül zu verdrängen und somit eine Hydratisierung des zweiten Carbokations zu verhindern.

Die Distanz des Wassermoleküls zu der Position 607 ist beträchtlich und diese Position weist mit einem Leucin schon eine große hydrophobe Aminosäure auf, sodass ausschließlich die Substitution durch noch größere hydrophobe Aminosäuren, wie W, F und M, einen Effekt erzielen sollte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 zusammengefasst.

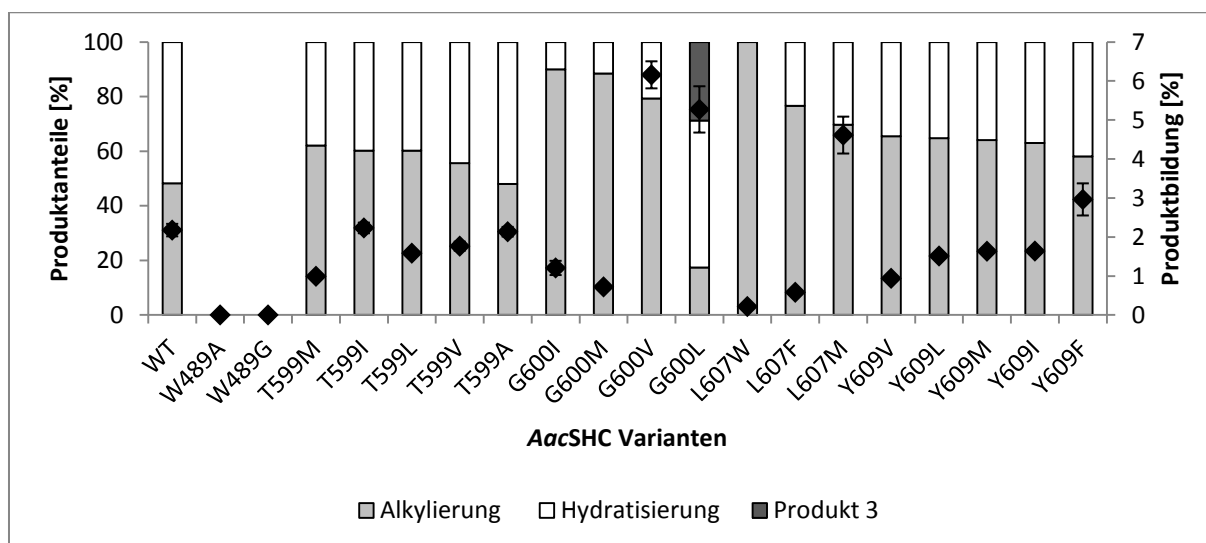


Abbildung 31: Experimentelle Evaluierung der Wasserhypothese. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16**, weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** und dunkelgrau für ein nicht charakterisiertes Nebenprodukt steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM von Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Die AacSHC Varianten in Position W489 sind vollständig inaktiv. Fünf der 19 getesteten AacSHC Varianten zeigten eine höhere Produktbildung als das Wildtypenzym. 14 der 19 AacSHC Varianten zeigten eine Selektivitätsverschiebung hin zum Alkylierungsprodukt **16**

im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym. Dabei führte das aktive Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen durch Variationen in Position T599 und Y609 zu einem Alkylierungsanteil von bis zu 65 %. Durch das Einbringen großer hydrophober Aminosäureseitenketten in Position 600 und 607 konnte ein Alkylierungsanteil von 70 bis 100 % erreicht werden. Folglich scheint das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen bzw. das Verdrängen des Wassers durch sterisch anspruchsvolle, hydrophobe Aminosäureseitenketten die Produktselektivität in Richtung des Alkylierungsprodukts **16** zu verschieben, auch wenn keine vollständig selektive Variante mit guter Aktivität erhalten werden konnte.

3.6 Biologische Diversität nutzen – andere SHCs

Durch das Screening der *inhouse* Variantenbibliothek und der Sättigung der Schlüsselpositionen wurden zwar *AacSHC* Varianten identifiziert, welche eine höhere Produktbildung (L607A: 17,4 %,.) und eine höhere Selektivität gegenüber dem Alkylierungs- (G600I: 90:10 (Alkylierung:Hydratisierung)) und Hydratisierungsprodukt (L607A, 11:89 (Alkylierung:Hydratisierung)) aufwiesen (Kapitel 3.3 und 3.4), jedoch konnte keine Variante mit einer annehmbaren Aktivität gefunden werden, welche vollständig selektiv für die Alkylierung war. Aufgrund dessen wurde nach einer Alternative gesucht, um die Aktivität sowie die Selektivität noch weiter zu verbessern. Wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben, ist ein großer Pool an SHCs bekannt, welcher jedoch bisher unzureichend genutzt wird. Am IBTB sind zu dem Plasmid der *AacSHC* auch noch Plasmide von anderen SHCs vorhanden. Diese sind in Tabelle 4 gelistet. Die SHC Wildtypenzyme sollten im Weiteren exprimiert und in der FC Reaktion des Geranylphenylethers **15** getestet werden.

Tabelle 4: Überblick der am IBTB vorhandenen SHC Plasmide.

Abkürzung	Ursprungsorganismus	Vektor	Molekularmasse [kDa]	Sequenzidentität zur <i>AacSHC</i> [%]
<i>AacSHC</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	pET-22b(+)	71,6	-
<i>ApaSHC1</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	pET-16b	80,0	43
<i>BamSHC1</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i>	pET-16b	73,3	40
<i>BamSHC2</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i>	pET-16b	76,0	39
<i>BjaSHC</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	pET-16b	76,3	44
<i>PcaSHC2</i>	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	pET-16b	77,4	44
<i>RpaSHC1</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	pET-16b	77,2	45
<i>ScoSHC</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	pET-16b	75,2	52
<i>SfuSHC1</i>	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	pET-16b	79,2	44
<i>TelSHC</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	pET-22b(+)	72,7	44
<i>TtuSHC</i>	<i>Teredinibacter turnerae</i>	pET-16b	75,4	45
<i>ZmoSHC1</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	pET-22b(+)	81,7	44
<i>ZmoSHC2</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	pET-16b	74,0	39

3.6.1 Expression und Reaktionen mit anderen SHC Wildtypenzymen

Die vorhandenen SHCs (Tabelle 4) waren jeweils in pET-16b- sowie pET-22b(+)-Vektoren kloniert. Beide Vektorsysteme vermitteln eine Ampicillin-Resistenz, sodass eine Testexpression bei den Standardexpressionsbedingungen der *Aac*SHC durchgeführt werden konnte. Die Testexpressionen wurden somit in TB-Medium mit Ampicillin als Resistenzmarker ($c_{\text{Ende}} = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) für 20 h bei 180 rpm und 37 °C durchgeführt. Der Start der Proteinproduktion erfolgte dabei unter Autoinduktion. Das resultierende Gel der SDS-PAGE ist in Abbildung 32 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass alle elf SHCs unter den gewählten Bedingungen erfolgreich überexprimiert werden konnten. Die verschiedenen SHC Wildtypenzymen wiesen dabei jeweils ein ähnliches Expressionslevel von ca. 40 % auf. Die Varianzen im Molekulargewicht stimmten mit den Werten in Tabelle 4 überein. Nach der Proteinproduktion wurden die SHC Wildtypenzymen in Reaktionsansätzen mit dem Geranylphenylether **15** getestet. Da lediglich für die *Tel*SHC der Ursprung aus einem thermophilen Organismus bekannt war, wurden die Biotransformationen standardmäßig bei 30 °C durchgeführt. Die Reaktionen mit dem *Tel*SHC Wildtypenzym und die Referenzreaktionen mit der *Aac*SHC wurden zusätzlich bei 50 °C inkubiert. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL⁻¹ Zellpellet, 2 mM Substrat **15** und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt.

Acht der 13 getesteten SHCs zeigten Produktbildung. Allerdings lag die Produktbildung bei *Apa*SHC1, *Pca*SHC2, *Rpa*SHC1, *Sco*SHC und *Zmo*SHC2 unter 0,5 %. Trotzdem ist anzumerken, dass diese SHCs, genau wie die *Tel*SHC und *Zmo*SHC1, ausschließlich das Alkylierungsprodukt **16** darstellen. Lediglich die *Aac*SHC scheint zusätzlich in der Lage zu sein, das zweite Carbokation des Geranylphenylethers **15** zu hydratisieren. Während die *Aac*SHC-, *Zmo*SHC1- und die 30 °C-Reaktionen mit dem *Tel*SHC Wildtypenzym alle eine Produktbildung um 5 % aufwiesen, konnte diese mit der Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 50 °C mit der *Tel*SHC auf 15 % gesteigert werden.

Die SHC aus *Thermosynechococcus elongatus* war somit vollständig selektiv bezüglich der Produktion des Alkylierungsprodukts **16** und wies zusätzlich eine drei Mal so hohe Produktbildung wie die bisher bekannten FC-katalysierenden SHC Wildtypenzymen auf. Aus diesem Grund wurde im Weiteren das Substratspektrum (Kapitel 3.6.2) der *Tel*SHC erforscht und ein Konsensus-Ansatz (Kapitel 3.6.3) basierend auf der Aminosäuresequenz der *Tel*SHC durchgeführt.

Ergebnisse

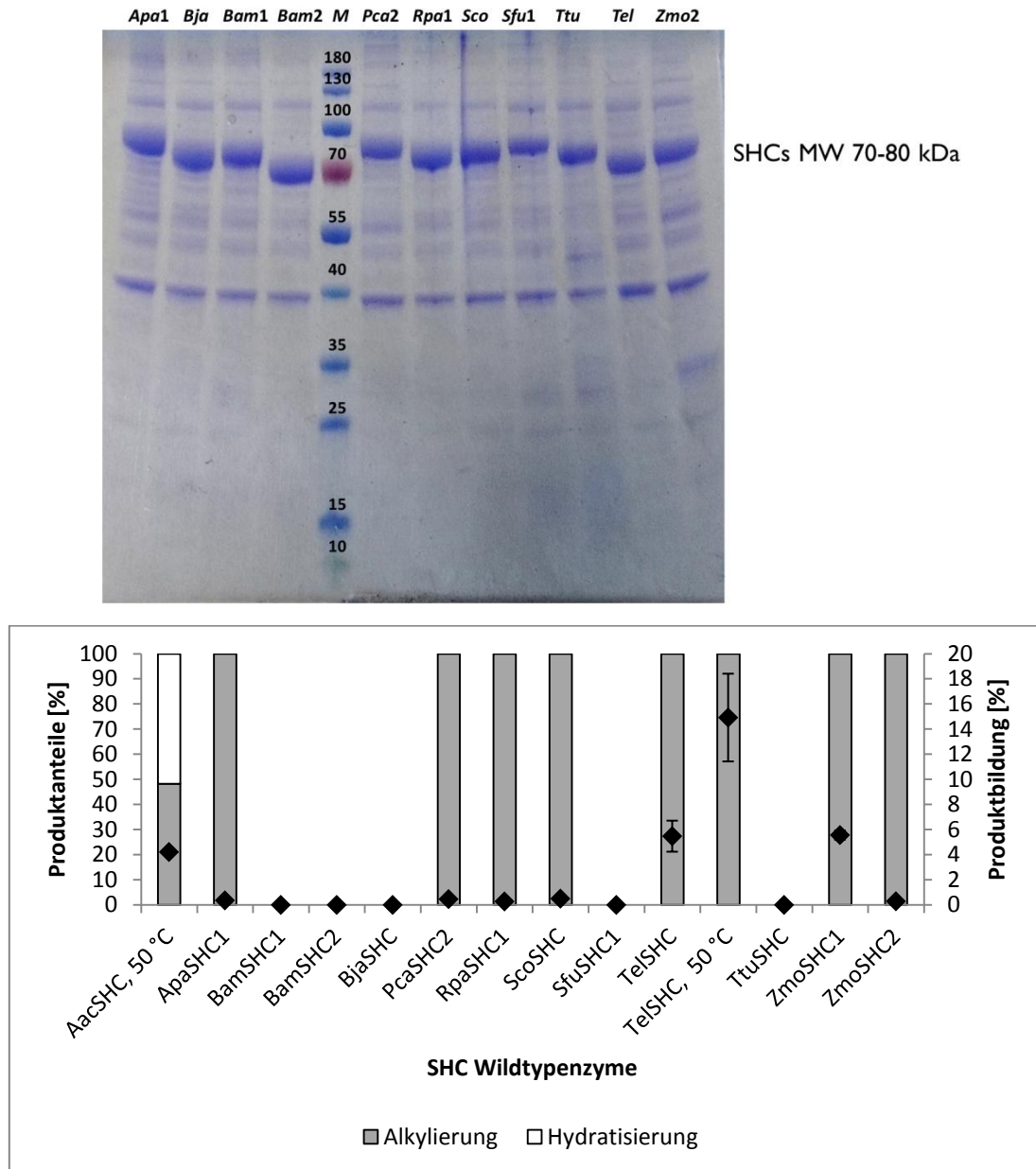


Abbildung 32: (Oben) SDS-PAGE der überexprimierten SHC Wildtypenzymen aus der Expressionskultur. Alle Wildtypenzymen konnten erfolgreich unter den Standardexpressionsbedingungen produziert werden und zeigten dabei eine vergleichbare Expression. M steht dabei für den Größenstandard. Die Zyklen sind jeweils mit der Dreibuchstabenabkürzung ihres Ursprungsorganismus bezeichnet. Die Zahl 1 bzw. 2 gibt an, um welche SHC aus dem Organismus es sich handelt. MW steht dabei für die Molekularemasse. (Unten) Testreaktionen mit den anderen SHC Wildtypenzymen. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16** und weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** steht. Die schwarzen Rauten ◆ zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und $0,2\%$ Triton X-100 als Detergenz bei 30 °C und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

3.6.2 Screening aller Substrate mittels Hit-Kandidaten

Im Nachfolgenden wurden alle Substrate mittels der vielversprechenden SHC-Kandidaten aus dem initialen Screening (Kapitel 3.6.1) umgesetzt. Dazu wurden die Substrate **15** sowie **32-36** verwendet, zuzüglich der methylsubstituierten Substrate **41-43**, welche Schelle in seiner Bachelorarbeit synthetisierte.^[179] Substrate **41-43** sind in Abbildung 33 dargestellt.

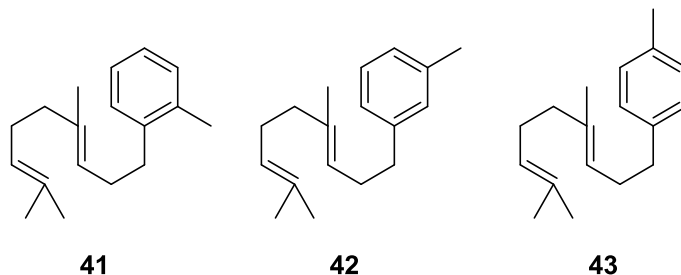


Abbildung 33: Methylsubstituierte Polyprenylphenylsubstrate **41-43**, dargestellte Substrate von Schelle.^[179]

Neben dem *Tel*SHC Wildtypenzym wurden auch die *Aac*SHC sowie die *Zmo*SHC1 in Ganz-Zell-Reaktionen eingesetzt, um das Substratspektrum der jeweiligen SHC zu untersuchen. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet, 2 mM vom jeweiligen Substrat sowie $0,2 \%$ Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Für die Wildtypenzyme der *Aac*SHC und *Tel*SHC wurde eine Temperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ gewählt, während die Reaktionen mit der *Zmo*SHC1 bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt wurden. Alle Reaktionen erfolgten bei 600 rpm für 68 h . Die Ergebnisse des Substratscreenings sind in Abbildung 34 zusammengefasst.

Das *Zmo*SHC1 Wildtypenzym wies bei Verwendung des Modellsubstrats **15** eine ähnliche Produktbildung auf wie die *Aac*SHC. Der Einsatz der *Tel*SHC führte hingegen zu einer Verdreifachung der Produktformierung. Die anderen Substrate mit Etherfunktionalität **32-35** wurden von der *Zmo*SHC1 nicht umgesetzt. Die *Tel*SHC war lediglich in der Lage, die methoxysubstituierten Substrate **34** und **35** zu akzeptieren, während die *Aac*SHC zusätzlich das *meta*-Brom-Derivat **32** umsetzte. Die Produktbildungen waren hierbei jedoch mit bis zu 2% durchgehend sehr gering.

Auch für die Substrate ohne Etherfunktionalität **36** und **41-43** zeigte die *Zmo*SHC1 geringe bis keine Aktivität. Nur das *para*-Methylsubstrat **43** wurde mit einer moderaten Produktbildung von 9% umgesetzt. Die höchste Produktbildung gegenüber diesen Substraten zeigte das *Aac*SHC Wildtypenzym. Lediglich die Verwendung des *ortho*-Methylsubstrats **41** führte zu einer Produktbildung von unter 20% , für die Substrate **36**, **42** und **43** lag diese durchweg bei 50% . Das *Tel*SHC Wildtypenzym wies für die Substrate **36**, **42** und **43** eine Produktbildung zwischen 13% und 37% auf. Für das *ortho*-methylierte Substrat **41** wies die *Tel*SHC keine nennenswerte Produktbildung auf.

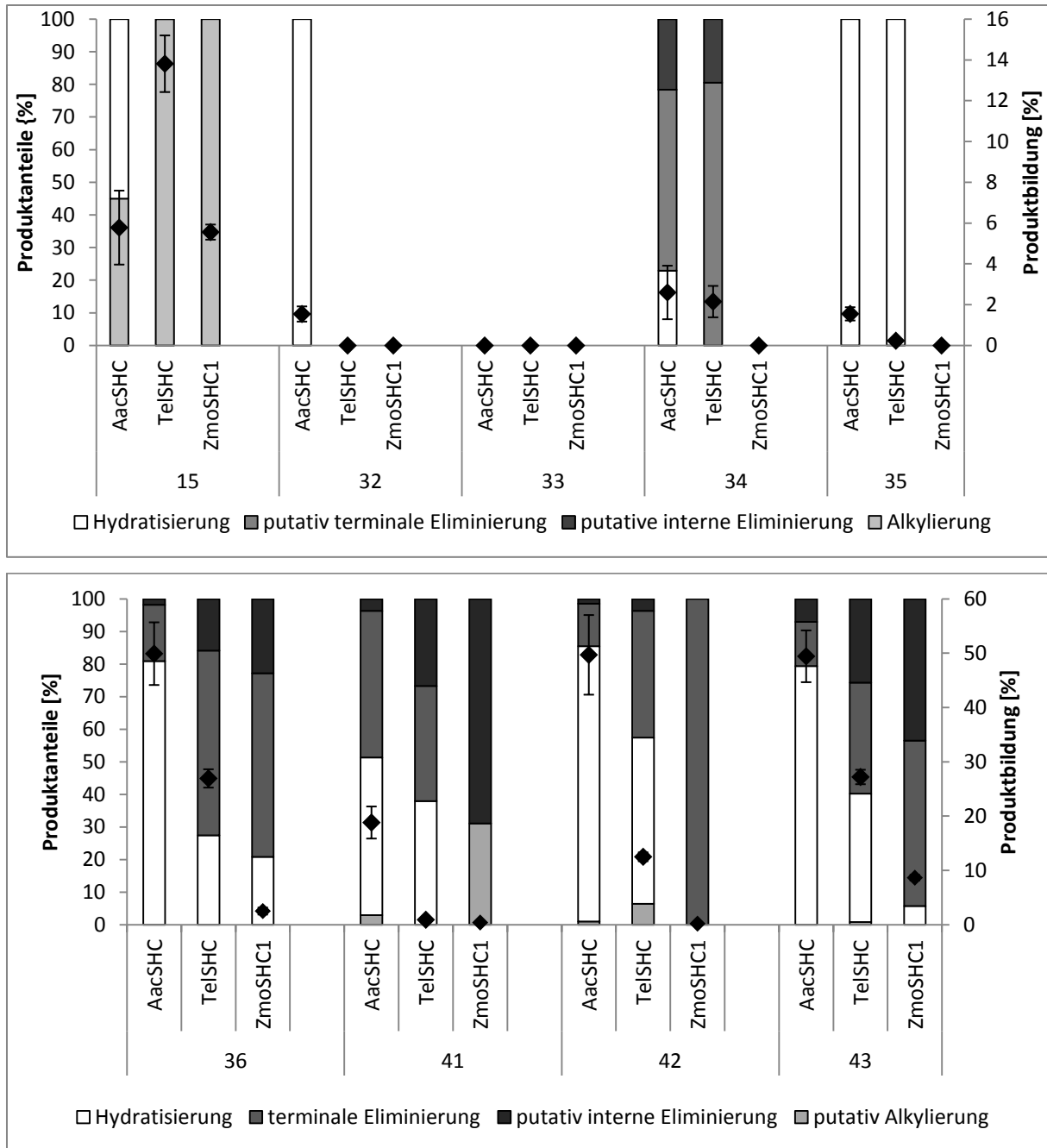


Abbildung 34: Ergebnisse der Biotransformationen mit den Wildtypenzymen der *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1* mit den Substraten mit Etherfunktionalität **15** und **32-35** (oben) und ohne Etherfunktionalität **36** und **41-43** (unten). Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei hellgrau für das Alkylierungs-, weiß für das Hydratisierungs-, grau für das terminale Alken- und dunkelgrau für das interne Alkenprodukt steht. Die Produkte wurden zum Teil in Kapitel 3.9 charakterisiert. Putativ steht dabei vor Produkten, welche nur mittels GC/MS-Analyse und nicht mittels NMR charakterisiert wurden. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug für die *ZmoSHC1*-Reaktionen $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und für die Reaktionen mit den *AacSHC* und *TelSHC* Wildtypenzymen $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM des jeweiligen Substrats versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Die Wildtypenzyme der *TelSHC* und *ZmoSHC1* setzten das Modellsubstrat **15** ausschließlich zum Alkylierungsprodukt **16** um, während der Einsatz des *AacSHC* Wildtypenzym eine 1:1 Mischung des Alkylierungs- **16** und Hydratisierungsprodukts **31** lieferte. Werden die Umsätze aller Substrate mittels der *AacSHC* betrachtet, fällt auf, dass das Hydratisierungsprodukt meist das Hauptprodukt der *AacSHC*-vermittelten Reaktion darstellt. Für die Umsetzungen der Substrate **15**, **32**, **34**, **36**, **42** und **43** konnte dieses isoliert und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden (Kapitel 3.9).

Die Zuordnung der anderen Produkte wurde mittels GC/MS-Analyse anhand der Massen sowie der Retentionszeiten vorgenommen. Somit scheinen die Wildtypenzyme für die Substrate **32-36** und **41-43** fast ausschließlich die Bildung des Hydratisierungs- bzw. der Eliminierungsprodukte des jeweiligen Substrats zu begünstigen. Nur bei Verwendung der Substrate **41-43** konnten geringe Anteile des putativen Alkylierungsprodukts detektiert werden.

3.6.3 Austauschvarianten von *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1*

Im Gegensatz zum *AacSHC* Wildtypenzym produzieren die *TelSHC* und *ZmoSHC1* Wildtypenzyme vollständig selektiv das Alkylierungsprodukt **16**. Zudem ist die *TelSHC* drei Mal so aktiv wie das *AacSHC* und das *ZmoSHC1* Wildtypenzym. Im Folgenden sollte versucht werden, diese Eigenschaften auf die *AacSHC* zu übertragen. Dafür wurden Aminosäurepositionen in der *AacSHC* betrachtet, welche sich in dem kalkulierten Bindungsmodus von Modellsubstrat **15** (Kapitel 3.5) in einer Distanz von bis 5 Å vom zweiten Carbokation bzw. von dem Kohlenstoffatom befinden, welches deprotoniert werden muss, um nach der erfolgten Alkylierung die Rearomatisierung des Arens zu gewährleisten. Nach der Identifizierung von 14 Positionen, welche einen Einfluss auf die Produktselektivität besitzen könnten, wurden die Aminosäuresequenzen der drei SHCs bezüglich der gewählten Positionen verglichen (Abbildung 35). Zehn der 14 Aminosäurereste waren in den drei SHCs konserviert, sodass ausschließlich die Positionen S168, S307, Q366 und Y420 Basis eines neuen Mutageneseansatzes wurden. In diesem wurden die jeweiligen Aminosäurereste der *TelSHC* und *ZmoSHC1* in die *AacSHC* übertragen. Die resultierenden Varianten sind in Tabelle 5 gelistet. Zusätzlich wurde die jeweiligen Aminosäurereste aus der *AacSHC* auch an den korrespondierenden Positionen der *TelSHC* und *ZmoSHC1* eingeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 zusammengefasst.

Ergebnisse

```

TelSHC      IFTKLHLALIGCYDWRGIPSLPPWIMLLPEGSPFTIYEMS SWARSSTVPLLIIVMDRKPVY
AacSHC      VFTRMWLALVGEYPWEKVPMPVPEIMFLGKRMLNIYEPGSWARATVVVLSIVMSRQPVF
ZmoSHC1     VFTRYWLALIGEWPEKTPNLPPEIIWFDPNFVFSIYNPAQWARATMVPIAALSARRPSR
:*. . . . . : * * . . . . . : . . . . . : * . . . . .
TelSHC      GMDPPTLDELSEGRANVVWELPRQ-----GDWRDVFIGLDRVFKLFET--LNIHPLR
AacSHC      PLPERARVPELYETDVP-----PRRRGAKGGGGW--IPDALDRALHGYQK--LSVHPFR
ZmoSHC1     PLRPQDRLELFPGRARFDYELPKKEGI--DLWSQFFRTTDRGLHWVQSLLKRNLSLR
:      : * . . . . . * . . . . . * . . . . . : . . . . . : * . . . . .
TelSHC      EQGLKAAEEWVLERQEASGDWGGIIPAMLNSLLALRALDYAVDDPIVQRGMAAVDRFAIE
AacSHC      RAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIOPPWFYALIALKILDMT-QHPAFIKGWEGLYGVVE
ZmoSHC1     EAAIRHVLEWIIIRHQDADGGWGGIOPPWVYGLMALHGEGYQLYHFPVMAKALSALDDPGWR
.      : * . . . . . * . . . . . * . . . . . : . . . . . : * . . . . .
TelSHC      TET--EYRVQPCVSPVWDTALVMRMVDVSGVAPDH-PALVKAGEWLLSKQILDYGDWHI
AacSHC      LDYG--GWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADH-DRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAV
ZmoSHC1     HDRGESSW-IQATNSPVWDTMLALMALKAKAEDRFTPEMDKAAADWLLARQVKVKGWSRI
:      : * . . . . . * . . . . . * . . . . . : . . . . . : * . . . . .
TelSHC      KNKKGRPGGWAFEFENRFYPDVDDTAVVVMALHAVTLPNENLKR---RAIERAVAWIASM
AacSHC      KRPNLKGGAFQFDNVYYPDVDDTAVVVMALNTRLRDPERRR---DAMTKGRWIVGM
ZmoSHC1     KLPDVEPGGWAFEYANDRYPDVDDTAVVVMALNTRLRDPERRR---DAMTKGRWIVGM
* . . . . . * . . . . . * . . . . . : * . . . . . : * . . . . .
TelSHC      QCRPGGWAFDVNDNDQDNLNGIPYDGLKAMIDPNTADVTVARVLEMVGRCLAFDRVALDR
AacSHC      QSSNGGWAYDVNDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEVDTAHVLECFGSFGYDDAWKVRIR
ZmoSHC1     QSECGGWAFDKDNNRSILSKIPFCDFGESIDPPSDVTAHVLEAFGTLGLSRDMPVIQK
* . . . . . * . . . . . * . . . . . : * . . . . . : * . . . . .
TelSHC      ALAYLRNEQEPEGCWFGRWGVNYLYGTSGVLTALSLVAPRYDRWRIRRAAEWLMQCNAD
AacSHC      AVEYLKREQKPDGSGWFGRWGVNYLYGTGAVVSALKAVGIDTREPYIQKALDWVQHQNPD
ZmoSHC1     AIDYVRSEQEAEGAWFGRWGVNYLYGTGAVLPALAAIGEDMTQPYITKACDWLVHAHQED
*: * . . . . . * . . . . . * . . . . . : * . . . . . : * . . . . .
TelSHC      GGWGETCWSYHDPSPKKGKGDSTASQTAWAIIGLLAAGDATGDYATEIERGIAYLLETOR
AacSHC      GGWGEDCRSYEDPAYAGKASTPSQTAWALMALIAGGRAE---SEAARRGVQYLVETQR
ZmoSHC1     GGWGESCSYMEIDSIGKPTTPSQTAWALMGLIAANRPED---YEAIAKGCHYLIDRQE
***** * . . . . . * . . . . . * . . . . . : * . . . . . : * . . . . .
TelSHC      PDGTWHEDYFTGTGFPCH-----FYLKYHYHQHFPLTA
AacSHC      PDGGWDEPYTGTGFPGD-----FYLGYTYMRHVFPPTLA
ZmoSHC1     QDGSWKEEFTGTGFPGYGVGQTIKLLDDPALSKRLLQGAELSRAMFLRYDFYRQFFPIMA
* * * * * :***** * * * * * : * * * * *

```

Abbildung 35: Ausschnitt eines Sequenzalignments der AacSHC, TelSHC und ZmoSHC1. Rot gekennzeichnet sind die relevanten Positionen, welche sich entweder in einer Distanz von 5 Å vom positiv geladenen Kohlenstoff des zweiten Carbokations von 15 befinden oder in einer Distanz von 5 Å vom aromatischen CH, welches schlussendlich deprotoniert werden muss, um nach der Zyklisierung die Rearomatisierung zu gewährleisten.

Tabelle 5: Positionen und Variationen für einen Mutationsansatz in der AacSHC, TelSHC und ZmoSHC1 basierend auf dem Konsensus-Ansatz (Abbildung 35).

	AacSHC		TelSHC		ZmoSHC1	
Position in der SHC Varianten	S168		S171		Q221	
	S168Q		S171Q		Q221S	
	S307		C312		T369	
	S307C	S307T	C312S	C312T	T369C	T369S
	Q366		E371		E429	
	Q366E		E371Q		E429Q	
	Y420		F425		F486	
	Y420F		F425Y		F486Y	

Ergebnisse

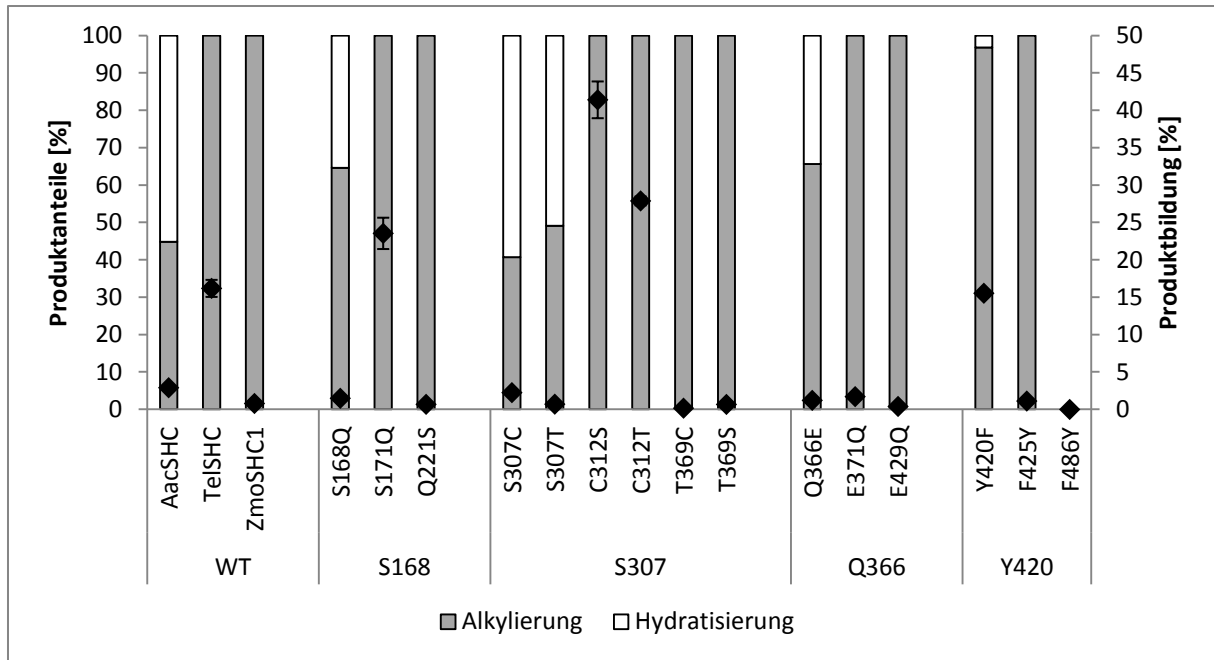


Abbildung 36: Einfluss der Austauschvarianten von *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1* auf die Produktselektivität und Produktbildung in der Umsetzung von Substrat **15**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16** und weiß für das Hydratisierungsprodukt **31** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug für die *ZmoSHC1*-Reaktionen $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und für die Reaktionen mit den *AacSHC* und *TelSHC* Wildtypenzymen $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Vier der fünf *AacSHC* Varianten zeigen eine geringere bis Wildtyp-ähnliche Produktbildung, während diese durch den Einsatz der Variante Y420F um das 5fache, auf 15 %, gesteigert werden konnte. Zudem begünstigte die Variante Y420F die Formierung des Alkylierungsprodukts **16** gravierend, sodass der Produktanteil von 50 % Alkylierungsprodukt beim *AacSHC* Wildtypenzym auf 97 % mit der Variante Y420F stieg.

Die *TelSHC* und *ZmoSHC1* Varianten waren, wie ihre Wildtypenzyme, selektiv für die Alkylierung des Substrats **15**. Während die Verwendung der Varianten der Zyklyse aus *Zymomonas mobilis* zu keiner Steigerung in der Produktbildung führte, zeigen drei der fünf *TelSHC* Varianten eine erhöhte Produktbildung. Dabei erreichte diese ihr Maximum mit 41 % bei Verwendung der *TelSHC* Variante C312S. Dies stellt nahezu eine Verdreifachung der *TelSHC* Wildtypenzymaktivität dar und übertrifft die Produktbildung des *AacSHC* Wildtypenzym um das 13fache. Die Variationen in den Positionen E371 und F425 führen im Gegensatz dazu zu einer deutlich verminderten Produktbildung.

Somit konnte mittels des Konsensus-Ansatzes die *AacSHC* Variante Y420F identifiziert werden, welche die 5fache Produktbildung des Wildtypenzym aufweist und dazu mit 97 %

beinahe selektiv das Alkylierungsprodukt **16** herstellt. Diese *AacSHC* Variante Y420F zeigt damit eine vergleichbare Produktbildung sowie -selektivität zum *TelSHC* Wildtypenzym. Zusätzlich wurde durch den Konsensus-Ansatz die *TelSHC* Variante C312S identifiziert, welche die bisher aktivste und selektivste SHC Enzymvariante auf die Modellreaktion darstellt.

3.6.4 Einführung der Sättigunghits in *TelSHC* und *ZmoSHC1*

Bis zur Durchführung des Konsensus-Ansatzes (Kapitel 3.6.3) lieferte die Sättigungsmutagenese der identifizierten Schalterpositionen aus dem Prima-Facie Assay (Kapitel 3.4) die selektivste *AacSHC* Variante bezüglich der Alkylierung des Substrats **15**. In Tabelle 3 (Kapitel 3.4) sind dabei die Varianten gelistet, welche während der Sättigungsmutagenese den größten Anteil des Alkylierungs- **16** oder Hydratisierungsprodukts **31** oder die höchste Produktbildung aufwiesen. Diese Variationen wurden im Folgenden in die korrespondierenden Positionen der SHCs aus *Thermosynechococcus elongatus* und *Zymomonas mobilis* übertragen. Die Einführung der Mutationen erfolgte dabei mittels der *Ligation-During-Amplification*-Methode. Die resultierenden Varianten sind in Tabelle 6 gelistet.

Tabelle 6: Positionen und Variationen für einen Mutationsansatz in der *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1* basierend auf den identifizierten Schlüsselpositionen mittels der Sättigungsmutagenese (Kapitel 3.4, Tabelle 3).

	<i>AacSHC</i>	<i>TelSHC</i>	<i>ZmoSHC1</i>
Position in der SHC Varianten	G600	G609	G667
	G600I G600L	G609I G609L	G667I G667L
	G600V	G609V	G667V
	L607	L616	L700
	L607A L607Q	L616A L616Q	L700A L700Q
	Y609	Y618	Y702
	Y609D Y609L	Y618D Y618L	Y702D Y702L

Die Enzymvarianten wurden nach dem Standardprotokoll produziert (Kapitel 6.3.1) und die Ganz-Zell-Reaktionen mit Substrat **15** bei 600 rpm für 68 h durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug dabei für die *ZmoSHC1*-Reaktionen 30 °C und für die Reaktionen mit den *TelSHC* Varianten 50 °C. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

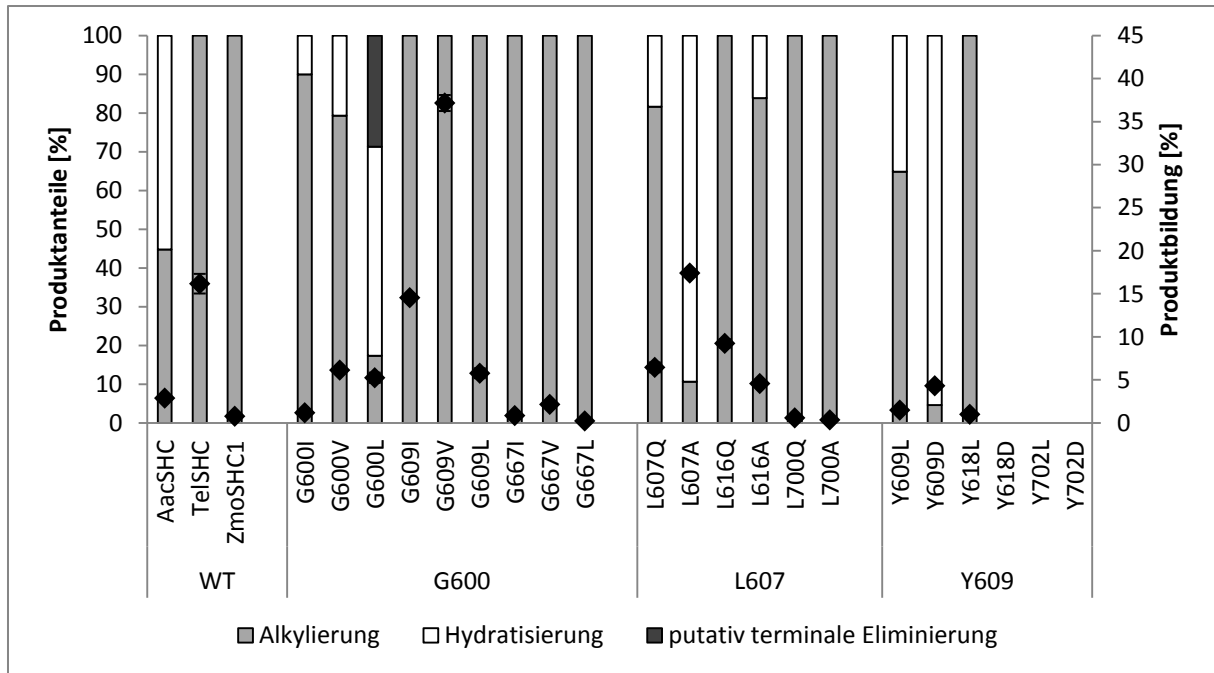


Abbildung 37: Einfluss der Enzymvarianten von *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1* auf die Produktselektivität und Produktbildung in der Umsetzung von Substrat **15**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16**, weiß für das Hydratisierungs- **31** und dunkelgrau das vermutete terminale Eliminierungsprodukt steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug für die *ZmoSHC1*-Reaktionen $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und für die Reaktionen mit den *AacSHC* und *TelSHC* Wildtypenzymen $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Bei Betrachtung von Abbildung 37 fällt auf, dass alle *TelSHC* Varianten, außer die G609V, eine geringere Produktbildung als das *TelSHC* Wildtypenzym zeigen. Mit der *TelSHC* Variante G609V wird jedoch eine Erhöhung in der Produktbildung auf 37 % erreicht. Dies entspricht der 2,5fachen Produktbildung verglichen mit dem Wildtypenzym.

Bemerkenswert ist außerdem, dass die *TelSHC* Variante L616A in der Lage ist, das Hydratisierungsprodukt **31** herzustellen. Diese Variante bricht somit die Selektivität der *TelSHC* auf und erweitert auf diesem Wege deren Produktspektrum. Dies gelang bei der *ZmoSHC1* durch den Einsatz der Variante L700A nicht.

Die Varianten der *ZmoSHC1* zeigen ausnahmslos eine Wildtyp-ähnliche Produktbildung und bilden dabei vollständig selektiv das Alkylierungsprodukt **16**. Die *ZmoSHC1* Variante G667V zeigt mit 0,9 % gleichermaßen eine sehr niedrige Produktbildung, jedoch entspricht dies noch einer drei Mal so hohen Produktbildung wie die des *ZmoSHC1* Wildtypenzym. Somit scheinen Position 600 in der *AacSHC* und die korrespondierenden Positionen in der *TelSHC* und *ZmoSHC1* durchweg einen bedeutenden Einfluss auf die Aktivität der Enzyme zu besitzen und im Falle der *AacSHC* zusätzlich die Produktselektivität maßgeblich zu beeinflussen.

3.7 Kombinatorik aus Sättigungs- und Austauschvarianten der *AacSHC*

Während der Sättigung der Schalterpositionen (Kapitel 3.4) in der *AacSHC* wurden ebenso relevante Varianten für Aktivität und Selektivität gefunden, wie durch den Konsensus-Ansatz (Kapitel 3.6.3) von *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1*. Diese beiden Ansätze sollten anschließend in einem neuen Mutageneseansatz kombiniert werden. Die *AacSHC* Variante Y420F, welche eine Produktbildung von 14 % und eine -selektivität bezüglich des Alkylierungsprodukts von 97 % aufwies, stellte dafür eine optimale Basis dar. Die Doppelmutanten wurden, mit der *AacSHC* Y420F als Templat, mittels der *Ligation-During-Amplification*-Methode erstellt. Die Enzymvarianten wurden anschließend standardmäßig produziert (Kapitel 6.3.1) und die Ganz-Zell-Reaktionen mit Substrat **15** bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der Hit-Kandidaten der Einzelvariante aus der Sättigungsmutagenese (Kapitel 3.4) und dem Konsensus-Ansatz (Kapitel 3.6.3) den Ergebnissen der Biotransformationen mit den neu generierten Doppelvarianten gegenübergestellt.

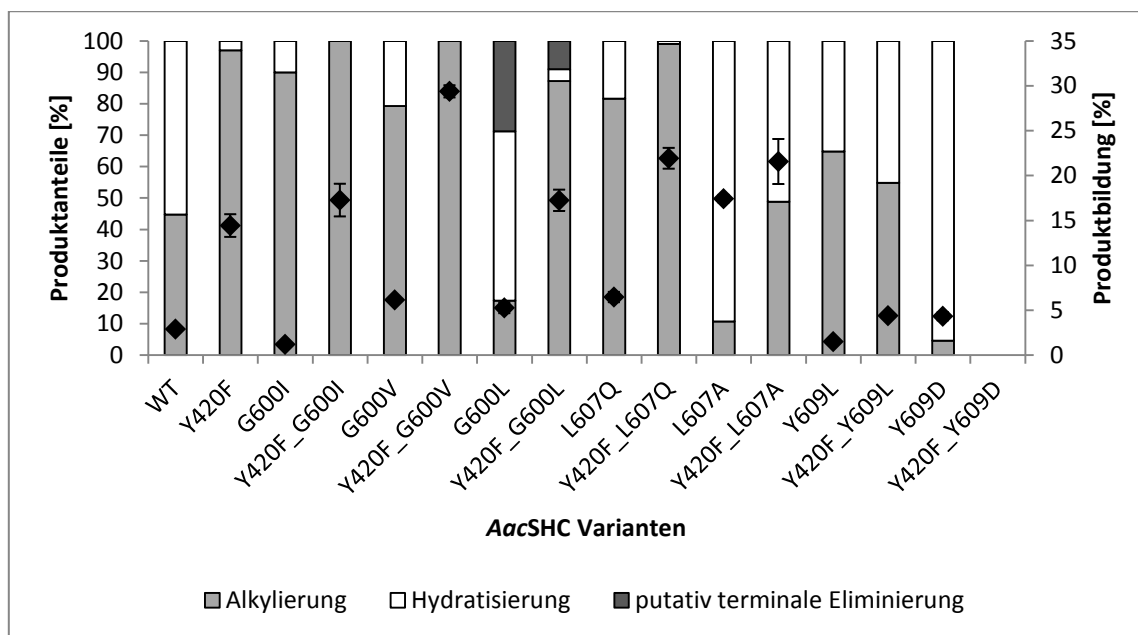


Abbildung 38: Kombinatorik der Sättigungs- und Austauschvarianten der *AacSHC*. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei grau für das Alkylierungs- **16**, weiß für das Hydratisierungs- **31** und dunkelgrau für das vermutete terminale Eliminierungsprodukt steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL⁻¹ Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei 50 °C und 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM von Substrat **15** versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Die Einführung der Y420F Variation in die Sättigungshits hatte fast ohne Ausnahme eine erhöhte Produktbildung zur Folge. Einzig die Doppelvariante Y420F_Y609D folgte diesem Trend nicht, sondern ist vollständig inaktiv.

Nahezu alle Doppelvarianten waren zudem selektiver gegenüber der Alkylierung als die vorherigen Hits aus der Sättigungsmutagenese. Dabei überstiegen drei der sieben Doppelvarianten sogar die Produktselektivität der *AacSHC* Variante Y420F von 97 %; so waren die Varianten Y420F_G600I und Y420F_G600V vollkommen selektiv gegenüber der Alkylierung, während die Variante Y420F_L607Q eine Selektivität von 99 % aufwies. Auch in Bezug auf die Verschiebung der Produktselektivität scheint die Position 609 wiederum eine besondere Rolle zu spielen. Ist die Doppelvariante Y420F_Y609D, wie zuvor beschrieben, inaktiv, so zeigte die Doppelvariante Y420F_Y609L sogar eine leicht verminderte Produktselektivität gegenüber dem Alkylierungsprodukt **16**.

Die Kombination der Sättigungshits mit der *AacSHC* Austauschvariante Y420F führte somit für fünf der sieben getesteten Doppelvarianten zu einer verbesserten Produktbildung und -selektivität im Vergleich zu den Einzelvarianten. Besonders bemerkenswert ist, dass zwei vollständig für die Alkylierung selektive *AacSHC* Doppelvarianten Y420F_G600I und Y420F_G600V identifiziert werden konnten, welche zudem noch moderate Produktbildungen (Y420F_G600I: 17 % und Y420F_G600V: 29 %) aufwiesen.

3.8 Umsetzung der Nicht-Ether-Substrate mit Hit-Kandidaten

Nachdem durch die Sättigungsmutagenese, den Konsensus-Ansatz und die Kombination der beiden Methoden aktivere sowie selektivere *AacSHC* und *TelSHC* Varianten für die Modellreaktion mit dem Geranylphenylether **15** gefunden wurden, wurden nochmals die Substrate **36** und **41-43** getestet. Substrat **36** wurde dabei aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zum Modellsubstrat **15** gewählt. Die Substrate **41-43** sollten getestet werden, falls die Elektronendichte am aromatischen System von Substrat **36** nicht ausreichend sein sollte, um eine Alkylierung zu gewährleisten. Zusätzlich besitzt die Methylgruppe der Substrate **41-43** einen geringeren sterischen Anspruch als die Brom- oder Methoxysubstituenten der Substrate **32-35**, sodass zumindest die Sterik der methylsubstituierten Substrate keine Limitierung für die Reaktion darstellen sollte. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL⁻¹ Zellpellet, 0,2 % Triton-X als Detergenz, 2 mM des jeweiligen Substrats bei 50 °C, 600 rpm für 68 h durchgeführt. Nach anschließender Extraktion wurden die Proben mittels GC/MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 zu sehen.

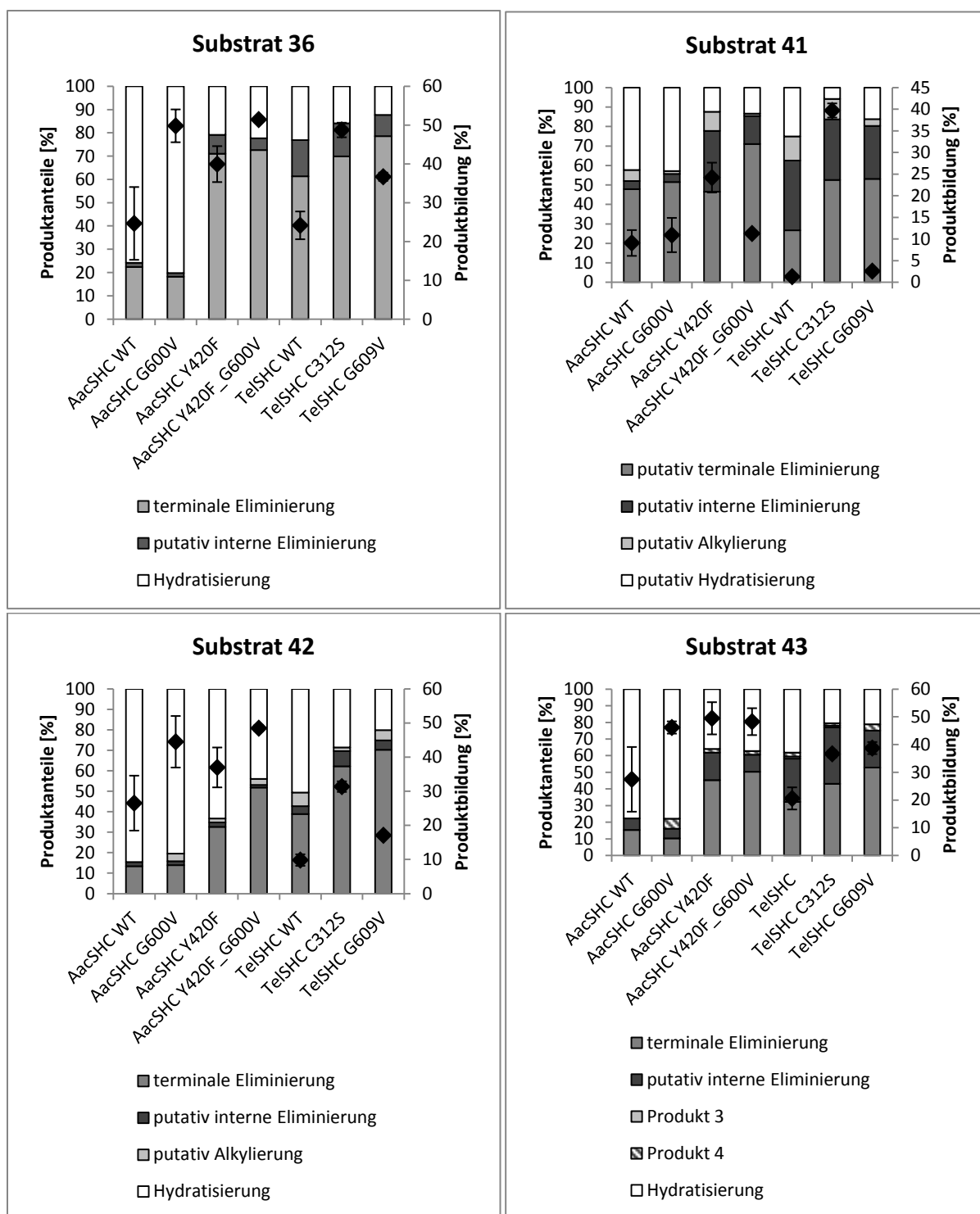


Abbildung 39: Ergebnisse der Biotransformationen mit den Wildtypenzymen sowie Varianten der *AacSHC* und *TelSHC* mit den Substraten ohne Etherfunktionalität **36** und **41-43**. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei hellgrau für das Alkylierungs-, weiß für das Hydratisierungs-, grau für das terminale Alken- und dunkelgrau für das interne Alkenprodukt steht. Die Produkte wurden zum Teil in Kapitel 3.9 charakterisiert. Putativ steht dabei vor Produkten, welche nur mittels GC/MS-Analyse und nicht mittels NMR charakterisiert wurden. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden mit 50 mg mL^{-1} Zellpellet und 0,2 % Triton X-100 als Detergenz bei 600 rpm für 68 h in Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM des jeweiligen Substrats versetzt. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten, welche in technischen Triplikaten realisiert wurden.

Die durchgeführten Biotransformationen lieferten erneut wenig bzw. kein vermeintliches Alkylierungsprodukt. Die putativen Hauptprodukte waren neben dem Hydratisierungs- noch das terminale Alken- sowie das interne Alkenprodukt. Zudem fällt wiederum auf, dass das *ortho*-substituierte Substrat **41** schlechter umgesetzt wird als die Substrate **36**, **42** und **43**. Bei der Umsetzung der letztgenannten Substrate zeigen sich ähnliche Trends. So zeigen alle getesteten *AacSHC* und *TelSHC* Varianten für diese Substrate eine höhere Produktbildung als die Wildtypenzyme.

Dabei führt der Einsatz der *AacSHC* Variante G600V lediglich zu einer gesteigerten Produktbildung, während die Produktverhältnisse Wildtyp-ähnlich bleiben. Sobald ein Phenylalanin in Position 420 eingeführt wird, verschieben sich jedoch die Produktverhältnisse vom Hydratisierungsprodukt, hin zu den Eliminierungsprodukten. Dies ist für die Einzel- sowie die Doppelvariante, welche die Variation Y420F tragen, der Fall. Die Produkte wurden dabei teilweise charakterisiert (Kapitel 3.9), die putativen Produkte wurden mittels GC/MS Analyse zugeordnet.

Bei Substrat **36** zeigen die *TelSHC* Varianten eine ähnliche Produktselektivität wie das Wildtypenzym, während der Einsatz der Varianten in den Reaktionen von Substrat **42** und **43** eine leichte Verschiebung in Richtung der Eliminierungsprodukte bewirkt.

Substrat **41** wird prinzipiell schlechter umgesetzt als die anderen Substrate **36**, **42** und **43**. Ausschließlich die *AacSHC* Variante Y420F und *TelSHC* Variante C312S bewirken eine verbesserte Produktbildung. Auch hier führt der Einsatz von *AacSHC* Varianten, welche die Y420F tragen, zu einem größeren Anteil an Eliminierungsprodukt verglichen mit dem Wildtypenzym. Eine solche Verschiebung lässt sich außerdem mit den *TelSHC* Varianten erreichen.

Die eingesetzten Varianten wiesen, trotz ihrer außerordentlich guten Selektivität in der Modellreaktion mit Substrat **15**, zwar zumeist eine bessere Produktbildung auf als die Wildtypenzyme, führten jedoch lediglich zu einer mutmaßlichen Alkylierung von den Substraten **41-43** mit sehr niedrigen Produktbildungen. Trotzdem verschoben die *AacSHC* und *TelSHC* Varianten die Produktverhältnisse maßgeblich zu den Alkenprodukten. Das Verhalten liegt vermutlich darin begründet, dass durch die Variationen der aktiven Tasche kein passend positioniertes Wassermolekül mehr für die Hydratisierung vorliegt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die enzymatische Umgebung in den Varianten zwar eine Hydratisierung weitgehend unterdrückt, jedoch die Elektronendichte am Aromaten nicht ausreichend ist, sodass dieser nicht in der Lage ist als Nukleophil das finale Carbokation abzufangen.

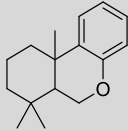
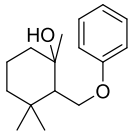
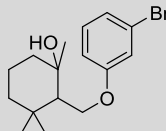
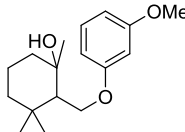
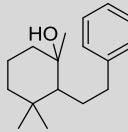
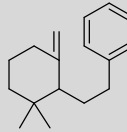
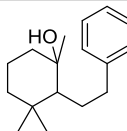
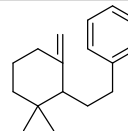
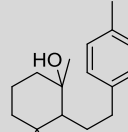
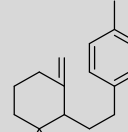
3.9 Produktcharakterisierungen

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden neun Substrate in SHC-vermittelten Reaktionen umgesetzt. Die Produkte wurden zunächst mittels GC/MS charakterisiert. Da jedoch einige Umsetzungen moderate bis gute Produktbildungen zeigten, wurden diese Reaktionen im präparativen Maßstab durchgeführt. Die präparativen Ansätze erfolgten dabei mit 150 mg des jeweiligen Substrats und gereinigtem Enzym. Dabei wurde das *Tel*SHC Wildtypenzym auf die gleiche Weise gereinigt wie die *Aac*SHC. Ein beispielhaftes Gel einer SDS-PAGE ist im Anhang in Abbildung A1 gezeigt. Die Produkte wurden mittels ^1H - und ^{13}C -NMR (^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HSQC, ^1H , ^{13}C -HMBC und ^1H , ^1H -NOESY) charakterisiert. Die verwendete Enzymvariante, die Reaktionsbedingungen sowie ein Überblick der charakterisierten Produkte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Lediglich das *Tel*SHC Wildtypenzym scheint mit dem Modellsubstrat **15** in der Lage zu sein, eine FC-artige Alkylierung zu vermitteln. Bei dieser Reaktion konnten 30 % des gewünschten Alkylierungsprodukts isoliert werden. Die anderen präparativen Biotransformationen lieferten alle den jeweiligen Alkohol als Hauptprodukt der Reaktionen. Somit scheint die Hydratisierung gegenüber der Alkylierung bei den durchgeführten Reaktionen präferiert zu sein. Bei den Substraten ohne Etherfunktionalität **36**, **42** und **43** wurde zusätzlich als Nebenprodukt das jeweilige Produkt der terminalen Eliminierung des zweiten Carbokations isoliert. Es konnte bei den durchgeführten Biotransformationen kein internes Alkenprodukt isoliert werden.

Ergebnisse

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der präparativen Biotransformationen.

Substrat	GC/MS Produktbildung ^a (Variante)	Reaktionsbedingungen	Produkte (isolierte Ausbeute)	
15	15 % (<i>Tel</i> SHC Wildtypenzym)	<i>Tel</i> SHC Wildtypenzym (c = 4,0 mg mL ⁻¹) 50 °C, 210 rpm, 7 d	 16 (30 %)	
15	17 % (<i>Aac</i> SHC L607A)	<i>Aac</i> SHC L607A (c = 2,8 mg mL ⁻¹) 50 °C, 210 rpm, 7 d	 31 (46 %)	
32	17 % (<i>Aac</i> SHC L607G)	<i>Aac</i> SHC L607G (c = 5,5 mg mL ⁻¹) 50 °C, 210 rpm, 8 d	 44 (40 %)	
34	16 % (<i>Aac</i> SHC L607G)	<i>Aac</i> SHC L607G (c = 5,9 mg mL ⁻¹) 50 °C, 210 rpm, 7 d	 45 (24 %)	
36	24 % (<i>Aac</i> SHC Y609F)	<i>Aac</i> SHC Y609F (c = 5,9 mg mL ⁻¹) 50 °C, 600 rpm, 90 h ^[179]	 40 (45 %)	 38 (10 %) [179]
42	48 % (<i>Aac</i> SHC Y609F)	<i>Aac</i> SHC Y609F (c = 4,8 mg mL ⁻¹) 50 °C, 210 rpm, 5 d	 46 (42 %)	 47 (12 %)
43	49 % (<i>Aac</i> SHC Wildtypenzym)	<i>Aac</i> SHC Wildtypenzym (c = 1,3 mg mL ⁻¹) 50 °C, 210 rpm, 7 d	 48 (37 %)	 49 (16 %)

^a Die Produktbildungen per GC/MS Analyse wurden mittels Ganz-Zell-Reaktionen mit 50 mg mL⁻¹ Zellpellet, 0,2 % Triton X-100 und 2 mM des jeweiligen Substrats in 50 °C-Reaktionen bei 600 rpm und 68 h ermittelt.

3.9.1 En détail: Stereochemie des Hydratisierungsprodukts 31

Die *Aac*SHC Wildtypenzym-vermittelten Reaktionen mit Substrat **15** lieferten durchweg ein Produktmischung aus Alkylierungs- **16** und Hydratisierungsprodukt **31** im Verhältnis 1:1. In Kapitel 3.5 wurde über ein Wassermolekül diskutiert, welches unter Umständen in der Lage ist das aliphatische zweite Carbokation abzufangen. Bei Erarbeitung der Wasserhypothese zeigte sich, dass zwei Wassermoleküle dafür in Betracht kommen, sodass der Angriff des Wassers entweder von oberhalb (Koordination durch N369, Q366 und Y420) oder unterhalb des Substrats (Koordination durch W489, T599 und Y609) erfolgen würde.

Die Isolierung des Hydratisierungsprodukts **31** erlaubt nun eine Aussage über die Stereochemie des Alkohols **31** und somit über die mögliche Position des Wassermoleküls. Um eine Aussage über die Stereochemie der Hydroxygruppe treffen zu können, wurde zunächst eine Energieminimierung der Enantiomere (*S*)- und (*R*)-**31** mittels der YASARA Software durchgeführt. Danach wurde nach eindeutigen NOE-Kontakten gesucht. Dabei wurde der NOE-Kontakt zwischen der zur Hydroxygruppe benachbarten Methylgruppe und der Ether-benachbarten CH₂-Gruppe identifiziert (Abbildung 40). Liegt das (*S*)-Enantiomer vor, in dem die Methylgruppe nach vorne steht, ist der kürzeste H-H-Abstand zu der CH₂-Gruppe 3,9 Å. Wenn das (*R*)-Enantiomer vorliegt, beläuft sich dieser Abstand auf 2,3 bis 2,4 Å, somit sollte der NOE-Kontakt im Falle des (*R*)-Enantiomer intensiver sein als beim Vorliegen des (*S*)-Enantiomers.

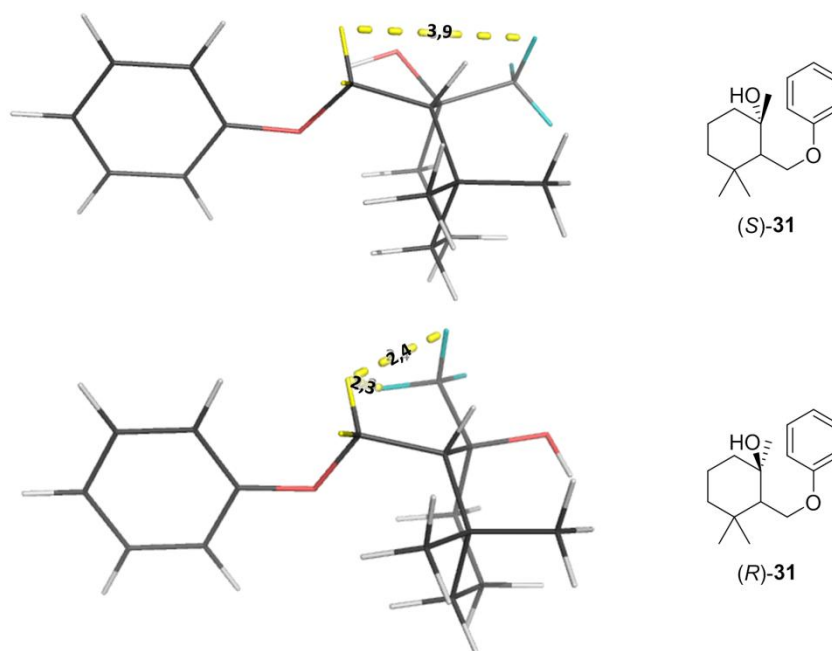


Abbildung 40: Energieminimierte Strukturen der (*S*)- und (*R*)-Enantiomere von Verbindung **31**. Gekennzeichnet ist der entscheidene Kontakt (gelb gestrichelte Linie) zwischen einer CH₂-Gruppe (gelb) und einer Methylgruppe (blau), um die Enantiomere mittels eines NOESY-Spektrums unterscheiden zu können. Die Abstände sind in Å angegeben.

Bei Betrachtung des NOESY-Spektrums (Abbildung 41) fällt auf, dass die CH₂-Gruppe in Position 8 zu der Methylgruppe in Position 10 koppelt. Die Intensität der Kopplung ist dabei ähnlich wie die der CH₂-Gruppe zu den anderen beiden Methylgruppen in Position 1 und 9, dem CH in Position 7 und den *ortho*-Wasserstoffen des Aromaten. Dies bestätigt das Vorliegen des (*R*)-Enantiomers, da die Abstände mit circa 2,5 Å alle in einer ähnlichen Größenordnung liegen. Läge das (*S*)-Enantiomer vor, wiese die Kopplung zwischen der Methylgruppe in Position 10 und der CH₂-Gruppe in Position 8, aufgrund der höheren Distanz, eine geringere Intensität auf.

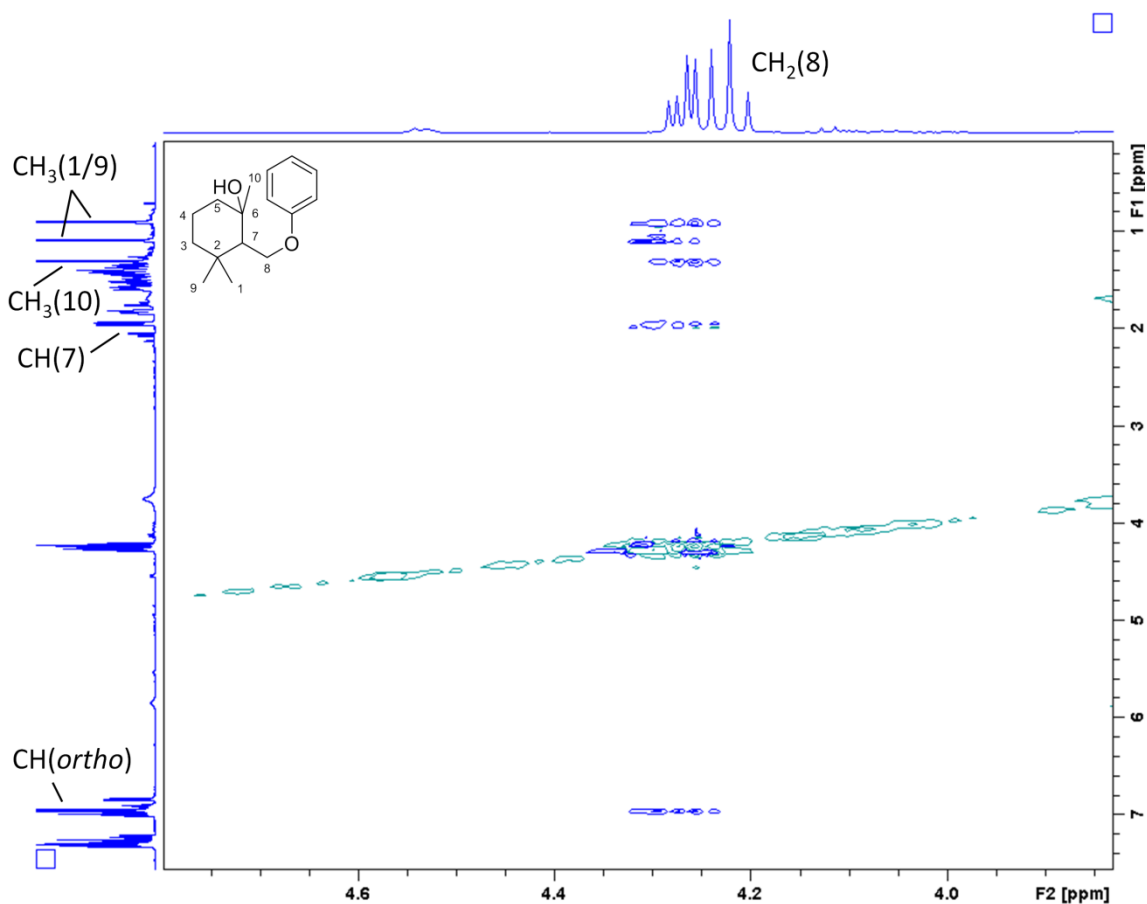


Abbildung 41: Ausschnitt des NOESY-Spektrums des Hydratisierungsprodukts **31**.

Die mögliche Bedeutung des Vorliegens des (*R*)-Enantiomers für die Positionierung des Wassermoleküls wird in der Diskussion, in Kapitel 4.4, erörtert.

3.10 Versuch der intermolekularen FC Alkylierung

Im Laufe der vorliegenden Doktorarbeit konnte mit der Y420F_G600V eine bedeutend selektivere sowie aktivere *AacSHC* Variante bezüglich der Alkylierung von Substrat **15** identifiziert werden. Die anfängliche Zielsetzung bestand darin, im Optimalfall die Vermittlung einer intermolekularen FC Alkylierung mittels SHCs zu gewährleisten. Aus diesem Grund sollten die besten *AacSHC* Varianten beispielhaft in einer intermolekularen Reaktion getestet werden. Dafür wurde als elektrophile Komponente das *trans, trans*-Farnesol **4** gewählt. Dieses wurde bereits von Kühnel in intermolekularen Reaktionen mit Alkoholen getestet.^[159,175] Dabei zeigte sich, dass eine intermolekulare Reaktion zwischen zwei Farnesolmolekülen sowie zwischen dem Farnesol **4** und kurzkettigen Alkoholen möglich ist. Die *AacSHC* Varianten L607A und L607F begünstigten hierbei am meisten die Bildung des jeweiligen Etherprodukts. Die *AacSHC* Variante L607A zeigte in der vorliegenden Arbeit den höchsten Anteil an Hydratisierungsprodukt **31** und somit an dem Produkt einer bimolekularen Reaktion, in der ein Wassermolekül den zweiten Reaktionspartner darstellt. Somit wurde neben der besten *AacSHC* Variante Y420F_G600V für die Alkylierungsreaktion von Substrat **15** auch die *AacSHC* Variante Y420F_L607A getestet. Diese zeigte im Screening der Doppelvarianten (Kapitel 3.7) eine gesteigerte Produktbildung im Vergleich zu den *AacSHC* Einzelvarianten Y420F und L607A und vermittelte die Alkylierungs- und die Hydratisierungsreaktion im Verhältnis 1:1. Zusätzlich wurden Biotransformationen mit dem *AacSHC* Wildtypenzym, der Knock-out Variante D376C und den Einzelvarianten Y420F, G600V und L607A durchgeführt. Die Enzyme wurden für den Versuch der intermolekularen Reaktion gereinigt. Als Kontrollreaktion wurden die *AacSHC* Varianten in der Reaktion mit Farnesol **4** als einziges Substrat eingesetzt. Für den Versuch der intermolekularen Reaktion wurde zusätzlich Anisol sowie 1,3-Dimethoxybenzol als aromatische Komponente zugesetzt. Dabei wurden die Nucleophile, analog zur Durchführung von Kühnel^[159,175], im Überschuss (1 % (v/v) und 2,5 % (v/v)) eingesetzt. Die Reaktionen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt und nach der Extraktion mittels GC/MS analysiert. Die Ergebnisse der Kontrollreaktion nur mit Farnesol **4** sind in Abbildung 42 und die Ergebnisse der mutmaßlich intermolekularen Reaktionen in Abbildung 43 dargestellt. Die Strukturen der Farnesolreaktion sind in Abbildung 10 (Kapitel 1.3.3) dargestellt.

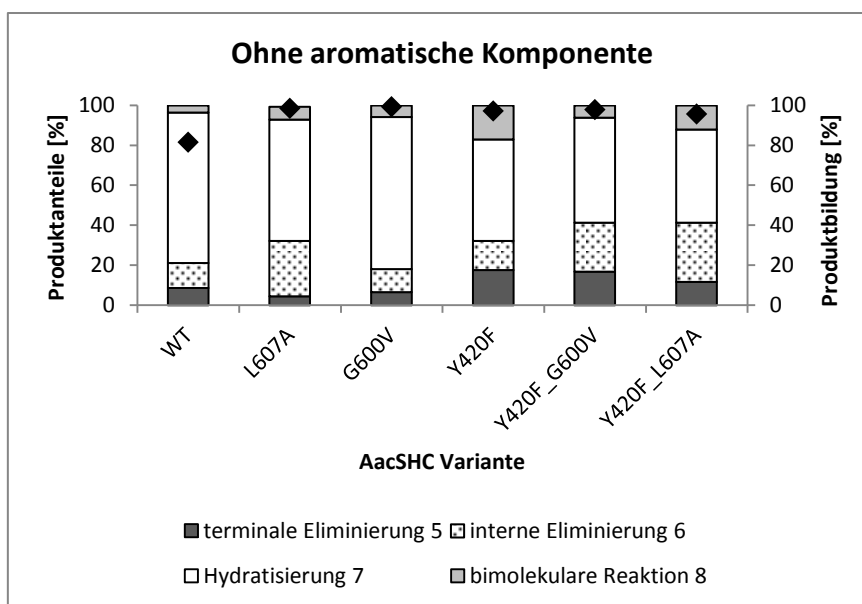


Abbildung 42: Zyklisierung von Farnesol **4** als Kontrollreaktion. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei dunkelgrau für den Anteil des terminalen Alken- **5**, strukturiert für das interne Alken- **6**, weiß für das Hydratisierungs- **7** und hellgrau für das Produkt der bimolekularen Reaktion **8** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen betragen jeweils 7,0 mg mL⁻¹. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Farnesol **4** versetzt und die Ausführung erfolgte in technischen Duplikaten.

Die Kontrollreaktion mit Farnesol **4** zeigt, dass alle Varianten zu einer erhöhten Produktbildung führen. Zudem zeigen die AacSHC Varianten L607A und Y420F_G600V beide einen Anteil des bimolekularen Produkts von 6 %. Der Einsatz der Doppelvariante Y420F_L607A verdoppelt diesen Anteil des bimolekularen Produkts noch einmal, während der Einsatz der AacSHC Varianten Y420F sogar eine Verdreifachung zur Folge hat.

In keiner der Testreaktionen für die intermolekulare FC Alkylierung wurde ein neues Produkt detektiert, sodass unter diesen Bedingungen wohl keine bimolekulare Alkylierung erfolgt. Auffällig ist jedoch, dass in den AacSHC Y420F-Reaktionen der Anteil des bimolekularen Farnesolprodukts **8** bei Zusatz der aromatischen Komponente im Vergleich zum Wildtyp vermindert wird. Die AacSHC Variante L607A liefert in allen Ansätzen den größten Anteil am bimolekularen Produkt **8**. Auffallend ist zudem, dass die AacSHC Varianten, welche die L607A Variation tragen, unter Zugabe der aromatischen Komponenten eine verminderte Produktbildung zeigen. Ist der Effekt bei 2,5 % (v/v) Anisol mit 88 % anstelle von 99 % im Vergleich zum Wildtypenzym noch gering, führt der Zusatz von 2,5 % (v/v) 1,3-Dimethoxybenzol mit 26 % anstelle von 94 % im Vergleich zum Wildtypenzym zu einem gravierenden Einbruch in der Produktbildung.

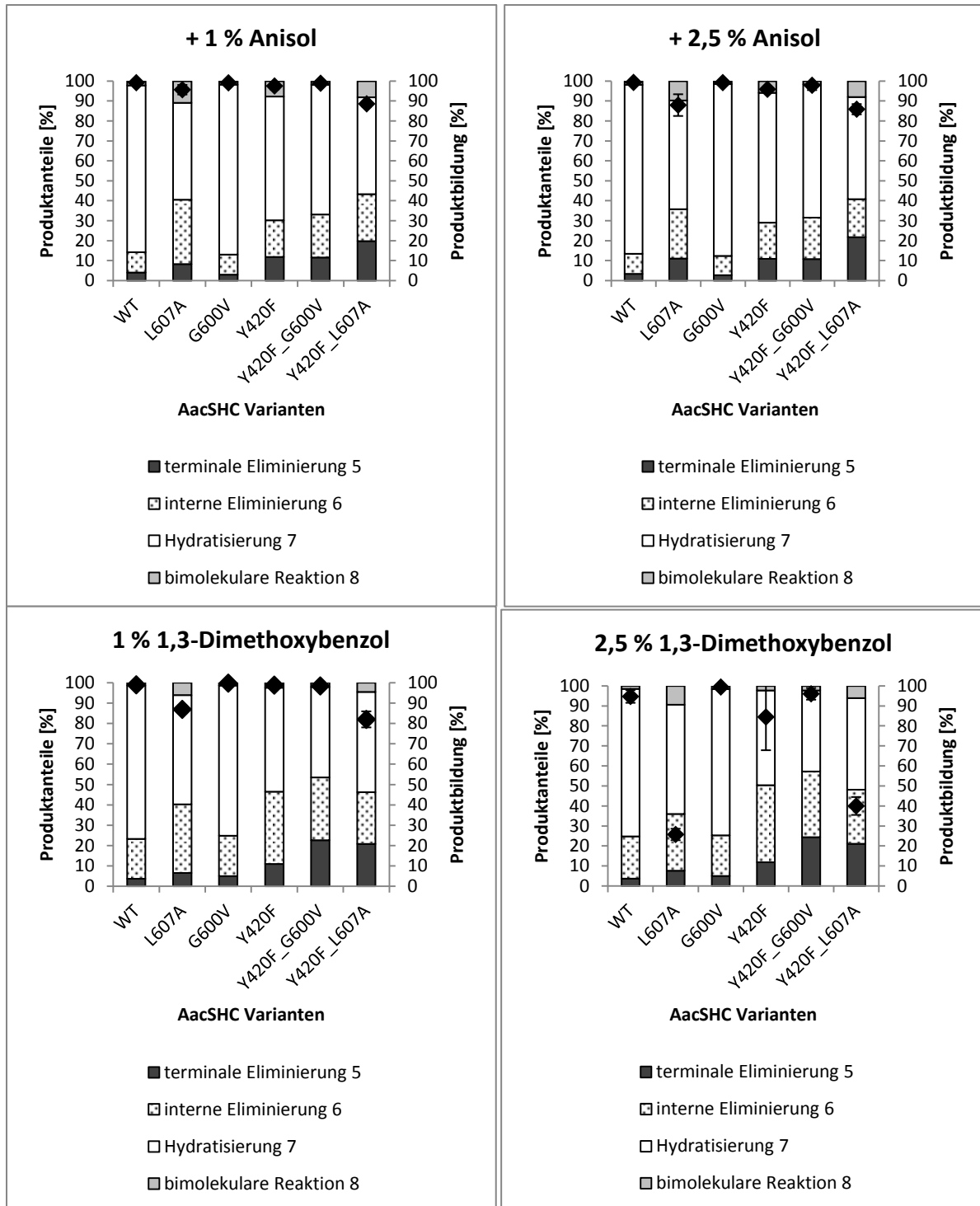


Abbildung 43: Untersuchung einer bimolekularen FC Alkylierung. Die Säulendiagramme geben dabei Auskunft über die Produktanteile, wobei dunkelgrau für den Anteil des terminalen Alken- **5**, strukturiert für das interne Alken- **6**, weiß für das Hydratisierungs- **7** und hellgrau für das Produkt der bimolekularen Reaktion **8** steht. Die schwarzen Rauten \blacklozenge zeigen die jeweilige Produktbildung an. Die Biotransformationen wurden bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % Triton X-100 als Detergenz durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen betragen jeweils 7,0 mg mL⁻¹. Alle Reaktionen wurden mit 2 mM Farnesol **4** und 1 % (v/v) oder 2,5 % (v/v) der aromatischen Komponente versetzt. Die Ausführung erfolgte in technischen Duplikaten.

4. Diskussion

Die FC Alkylierung ist immer noch eine der bedeutendsten Reaktionen für die Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, wobei sie bis heute einigen Limitierungen unterliegt. So stellen beispielsweise die Kontrolle der Regioselektivität sowie die Erweiterung des Substratspektrums um wenig bis nicht aktivierte reine Kohlenstoffarene als aromatische Komponente anspruchsvolle Herausforderungen dar. Für biokatalytische Alternativen der FC Alkylierung finden sich bisher zudem lediglich wenige Beispiele in der Literatur (Kapitel 1.1.3). Diese selektiven enzymatischen Alkylierungskatalysatoren benötigen überdies eine spezielle Substrataktivierung der elektrophilen Komponente mittels einer exzellenten Abgangsgruppe wie Pyrophosphat oder *S*-Adenosylhomocystein. SHCs sind demgegenüber in der Lage, eine alternative Substrataktivierung zu gewährleisten. Die spezielle katalytische Maschinerie dieser Enzyme (Kapitel 1.3.1), welche eine *anti*-Orientierung des katalytisch aktiven Protons zur Folge hat, befähigt die SHCs als spezifische enzymatische Brønstedsäure zu wirken und somit eine abgangsgruppenunabhängige Substrataktivierung zu verwirklichen. Aufgrund dessen wurden die SHCs als enzymatische Basis für die vorliegende Arbeit ausgewählt. Diese Arbeit beschäftigte sich anschließend mit der Weiterentwicklung und Optimierung der intramolekularen SHC-katalysierten FC Alkylierung sowie mit der Untersuchung der Substratbandbreite. Im Optimalfall sollte zudem eine Erweiterung der SHC-vermittelten FC Alkylierung auf einen bimolekularen Reaktionsansatz erfolgen.

4.1 Auswahl des Modellenzym und Anpassung der Reaktionsbedingungen

In der von Hammer *et al.* durchgeführten Studie^[111] wurde hauptsächlich mit dem *Zmo*SHC1 Wildtypenzym gearbeitet, da dieses selektiv die Alkylierung des Geranylphenylethers **15** katalysiert, wohingegen das *Aac*SHC Wildtypenzym lediglich eine Selektivität von 50 % gegenüber der Alkylierung aufwies. Die Produktbildung der *Aac*SHC bei der Umsetzung von Substrat **15** ist nicht dokumentiert. Dennoch wurde die *Aac*SHC als Modellenzym ausgewählt. Dies lag einerseits daran, dass die Kristallstruktur der *Aac*SHC in guter Auflösung zugänglich ist^[130,138] und dieses Enzym seine Robustheit gegenüber der Einführung von Aminosäurevariationen schon in diversen Mutationsstudien bewiesen hat^[129,158,180]. Darüberhinaus zeigte die *Aac*SHC in ihrer praktischen Handhabung durch ihre bemerkenswerte Stabilität aufgrund ihres thermophilen Ursprungs bedeutende Vorteile. Zudem steigerte die zusätzliche Herausforderung, neben der Aktivität noch die

Produktselektivität des Enzyms zu adressieren, erheblich die Komplexität und somit die Attraktivität des Projekts.

Die ersten Umsetzungen des Substrats **15** erfolgten mittels IEX-gereinigtem *AacSHC* Wildtypenzym bei 50 °C und 600 rpm für 68 h mit 0,2 % CHAPS als Detergenz. Letzteres wurde in Anlehnung an die Reaktionsbedingungen der Studie von Hammer *et al.* gewählt.^[111]

Die anschließenden Verbesserungen der Reaktionsbedingungen erfolgten über eine Variation des Detergenzes, der Temperatur sowie der Reaktionszeit. Dabei wurden die für die SHC gängigsten Detergenzien CHAPS und Triton X-100 näher betrachtet.^[129,150,158,159,176] Die Detergenzwahl erweist sich als essentiell, da das Detergenz maßgeblich die Enzymaktivität beeinflusst. So zeigt das *AacSHC* Wildtypenzym für sein natürliches Substrat Squalen **1** bei Verwendung von Triton X-100 vollständigen Umsatz, während die Verwendung von CHAPS in dieser Reaktion zu keinerlei Produktbildung führt (Dominicus, unpublizierte Daten). Im vorliegenden Fall zeigte der Einsatz von Triton X-100 als Detergenz bei der FC-artigen Zyklisierung des Geranylphenylethers **15** eine doppelt so hohe Produktbildung wie der Einsatz von CHAPS.

Im Zuge der Etablierung des Prima-Facie Assays für das Screening wurde für die Ganz-Zell-Reaktionen zusätzlich ein Reaktionspuffer ohne Detergenz getestet, da in diesem Falle kein Herauslösen des Enzyms aus der Membran notwendig ist. Die Reaktionsansätze ohne Detergenz zeigten hierbei jedoch die niedrigsten Produktbildungen. Dieser Effekt war bei Substrat **36** ohne Etherfunktionalität zudem stärker als bei dem Modellsubstrat **15**. Dies deutet darauf hin, dass das Detergenz nicht nur für die Solubilisierung der Zyklase notwendig ist, sondern zusätzlich auch die unpolaren Substrate solubilisiert und somit für eine bessere Substratzugänglichkeit sorgt.

In Zukunft sollte überdies noch SDS als drittes Detergenz für SHC-vermittelte Reaktionen mitberücksichtigt werden. Eichhorn *et al.* konnten allein durch die Substitution von Triton X-100 (0,005 % (w/v)) durch SDS (0,07 % (w/v)) in der Reaktion von Homofarnesol **9** zu (-)-Ambrox **10** vermittelt durch die *AacSHC* Tripelvariante M132R_A224V_I432T eine Umsatzsteigerung von 20 % auf über 80 % erzielen. Durch eine anschließende statistische Versuchsplanung (engl. *design of experiments*), während der pH, Zellmasse und SDS-Konzentration variiert wurden, wurden Reaktionsbedingungen (pH 5,5, 250 g L⁻¹ Zellen und 1,55 % SDS (w/v)) identifiziert, bei denen ein quantitativer Umsatz zum gewünschten (-)-Ambrox erzielt werden konnte.^[181]

Die Produktbildung bei den 50 °C- und 60 °C-Reaktionen stieg mit zunehmender Reaktionsdauer, wobei dieser Effekt bei 50 °C stärker war als bei 60 °C. Bei einer

Reaktionszeit von 68 h war die Produktbildung bei beiden Temperaturen vergleichbar, wodurch die tiefe Temperatur für die Folgereaktionen gewählt wurde. Dies begründete sich einerseits darin, dass das Auftreten von Hintergrundreaktionen bei niedrigeren Temperaturen verringert wird^[174] und andererseits darin, dass davon ausgegangen werden muss, dass die Einführung von Aminosäurevariationen in der *AacSHC* zu einer verminderten Stabilität des Enzyms führen kann und somit die generierten Enzymvarianten bei der nativen optimalen Reaktionstemperatur von 60 °C^[182] unter Umständen instabil bzw. inaktiv vorliegen.

Durch die Erhöhung der Reaktionsdauer von 21 h auf 68 h konnte die Produktbildung von 1 % auf 3 % gesteigert werden. Dies spiegelt die langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten des *AacSHC* Wildtypenzym gegenüber nicht natürlichen Substraten wider, da die produktive Bindung der verkürzten Squalen-Analoga in das aktive Zentrum der *AacSHC* nur unzureichend unterstützt wird.^[124,129] So sind in der Literatur zumeist lange Reaktionszeiten zwischen 20 h und 96 h für *AacSHC*-vermittelte Reaktionen von nicht natürlichen Substraten beschrieben.^[124,129,150,158,159] Demgegenüber steht ein vollständiger Umsatz des natürlichen Substrats Squalen **1** nach 60 min mit dem *AacSHC* Wildtypenzym.^[131]

4.2 Potentielle Produktpalette der Polyprenylphenyl-Umsetzungen

Bei der Umsetzung der Substrate **15**, **32-36** und **41-43** wurden bis zu fünf Produkte detektiert (Kapitel 3.2.2 und 3.6.2). Davon konnten mittels Reaktionen im präparativen Maßstab für die Umsetzungen der Substrate **15**, **32**, **34**, **36**, **42** und **43** die Hauptprodukte charakterisiert werden (Kapitel 3.9). Dabei stellte das Hauptprodukt, außer für das Modellsubstrat **15**, jeweils das Hydratisierungsprodukt **C** dar. Neben dem Hydratisierungsprodukt **C** lag bei der Modellreaktion zudem das gewünschte Alkylierungsprodukt **G** vor. In den Umsetzungen der Substrate **36**, **42** und **43** konnte zusätzlich das terminale Alkenprodukt **D** isoliert werden. Über die Identität der anderen Produkte kann lediglich anhand der Massenspektren und der möglichen Produktpalette spekuliert werden. Die potentiellen Produkte sind in Abbildung 44 dargestellt.

Abbildung 44 zeigt alle Produkte, welche nach einem Abbruch der Reaktion nach der initialen Protonierung denkbar wären. So könnte es nach der initialen Protonierung direkt zu einem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls **A** oder zur Eliminierung eines Protons in terminaler Position **B** kommen. Produkte solcher Abbruchreaktionen wurden bisher jedoch noch nie beobachtet. Selbst die detaillierte Mutationsstudie von Hoshino *et al.* zeigte den frühesten Reaktionsabbruch nach der erfolgten Monozyklisierung.^[131] Dies deutet daraufhin, dass nahe der katalytischen Maschinerie eine stark hydrophobe Umgebung vorliegt, in der

kein Wassermolekül vorhanden ist. Dies erscheint durchaus plausibel, da sonst auch das erste Carbokation des nativen Substrats **1** partiell sofort abgefangen würde und somit die hohe Produktselektivität nicht gewährleistet wäre. Auf diesem Wege werden somit das sofortige Quenchen des ersten Carbokations und damit einhergehende Nebenreaktionen verhindert.

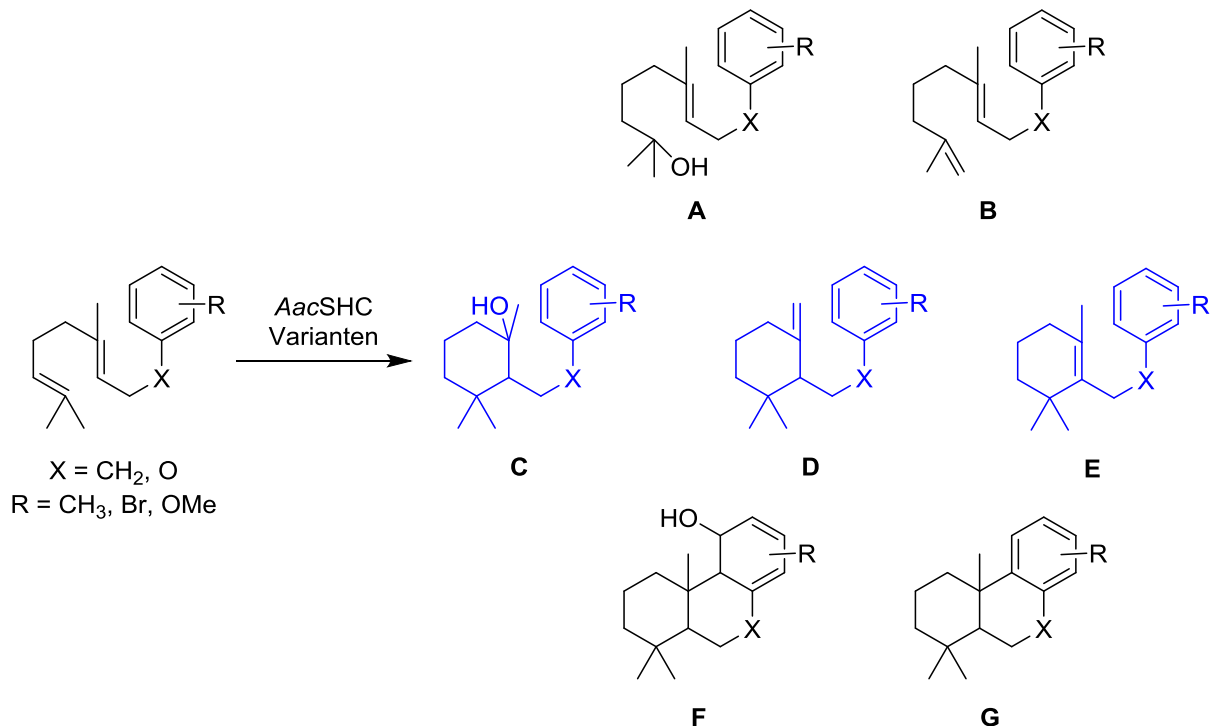


Abbildung 44: Vorstellbare Produktpalette der SHC-vermittelten Umsetzungen der Polyprenylphenylsubstrate. Dabei könnte es nach der initialen Protonierung sofort zum Abreagieren des ersten Carbokations kommen (**A** und **B**). Mittels NMR-Spektroskopie konnten zudem sicher Abbruchprodukte nach der Monozyklisierung (**C** und **D**) identifiziert werden. Da das interne Alkenprodukt **E** aus demselben Carbokation hervorgeht wie **C** und **D**, erscheint auch dessen Bildung wahrscheinlich. Die Hauptprodukte sind blau dargestellt. Zudem ist bekannt, dass für das Modellsubstrat **15** eine Alkylierung **G** erfolgt. Prinzipiell möglich, jedoch unwahrscheinlich, ist die Hydratisierung des finalen Carbokations **F**, bei dem die Aromatizität des Arensystems verloren ging.

Zwei der drei monozyklischen Abbruchprodukte **C** und **D** konnten für verschiedene Substrate isoliert und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert werden (Kapitel 3.9). Dabei ist bemerkenswert, dass neben dem Hydratisierungsprodukt **C** als zweites Hauptprodukt das terminale **D** und nicht das interne Alkenprodukt **E** gebildet wird. Rein chemisch gesehen, sind nämlich höher alkyl-substituierte Doppelbindungen stabiler als niedriger substituierte Isomere. Dies liegt daran, dass die sp^3 -Hybridorbitale der σ -(C-H)-Bindung in der Lage sind, Elektronendichte in das π^* -Molekülorbital der Doppelbindung zu donieren und somit Elektronendichte zu delocalisieren. Dieser Effekt wird als Hyperkonjugation bezeichnet.^[18] Dieses Phänomen lässt sich auch beim Geraniol **17** beobachten, bei dem ausschließlich das Hydratisierungs- **19** und terminale Alkenprodukt **18** gebildet werden. Die Umsetzung des Epoxyderivats des Geraniols **20** untermauert diesen Trend zusätzlich, da auch hier nur das

terminale Alkenprodukt **21** dargestellt wird.^[129] Einzig beim Farnesol **4** wird ein größerer Anteil internes Alken **6** als terminales Alken **5** gebildet.^[146,159] Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass es bei dem vorliegenden Reaktionsansatz mit Substrat **15** lediglich zu einer Monozyklisierung, wie beim Geraniol **17** und dessen Epoxyderivat **20**, kommt, sodass diesbezüglich die Vergleichbarkeit gegeben ist. Bei der Umsetzung von Farnesol **4** kommt es hingegen zur Ausbildung eines Bizyklus. Somit scheint nach der erfolgten Monozyklisierung die Ausbildung des Hydratisierungs- sowie des terminalen Alkenprodukts bevorzugt.

Bei den Umsetzungen der Substrate **41** und **43** wurde zudem der Anteil an einem dritten Produkt durch den Einsatz des *Te*/SHC Wildtypenzym und derer Varianten gesteigert. Aufgrund des Massenspektrums und der nur leicht abweichenden Retentionszeit des Produkts im Vergleich mit dem terminalen Alkenprodukt **D** wird davon ausgegangen, dass dies das interne Alkenprodukt **E** darstellt. Da **E** aus dem gleichen monozyklischen Carbokation hervorgeht wie **C** und **D**, erscheint dies durchaus plausibel.

Im nächsten Schritt greift das aromatische System das zweite Carbokation nukleophil an und ein trizyklisches System wird ausgebildet. Dabei bildet sich das finale Carbokation unter Aufbrechen des aromatischen Systems. Dieses finale Carbokation kann nun theoretisch wiederum von einem Wassermolekül nukleophil attackiert **F** oder durch ein passend positioniertes Wassermolekül deprotoniert **G** werden. Bei einer erfolgten Deprotonierung kommt es zur Ausbildung der gewünschten Zielstruktur. Die resultierenden Produkte besitzen dasselbe Grundgerüst wie das Antimikrobiotikum (+)-Totarol oder das antikarzinogen wirkende Ferruginol. Die beschriebenen Meroterpene werden bisher in vielschrittigen Totalsynthesen^[183–187] dargestellt, wobei jedoch ein einfacher Zugang zu diesen Verbindungen und deren Derivaten wünschenswert wäre, da beispielsweise das (+)-Totarol und seine Derivate eine vielversprechende Wirkstoffklasse bilden.^[188,189] Das vielversprechende Alkylierungsprodukt konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit lediglich für Substrat **15** isoliert werden.

Produkt **F** konnte in keiner der durchgeführten Reaktionen detektiert werden. Dies ist jedoch nachvollziehbar, weil die Rearomatisierung des Arensystems bei der Ausbildung von Produkt **F** ausbleiben würde, was energetisch ungünstig ist.

Folglich sind die wahrscheinlichsten Produkte die Produkte **C**, **D** und **E** welche sich aus dem zweiten Carbokation ergeben. Zusätzlich scheint bei den Umsetzungen der Substrate **15**, **41**, **42** und **43** noch das Alkylierungsprodukt **G** gebildet zu werden.

4.3 Erfolgreiche Alkylierung – Substratanforderungen

Während der vorliegenden Arbeit konnte nur für das Modellsubstrat **15** das Alkylierungsprodukt **16** im präparativen Maßstab hergestellt und isoliert werden. Schon im Verlauf der Studie zeichnete sich ab, dass die Variationen in den Zykласen unzureichend sind, um die gewünschte Alkylierung für die anderen Substrate zu gewährleisten. So führten die *AacSHC* Doppelvariante Y420F_G600V sowie die *TelSHC* Varianten C312S und G609V, welche mit guten Produktbildungen in der Modellreaktion selektiv das Alkylierungsprodukt **16** herstellten, in den Biotransformationen von Substrat **36** zu keinerlei Alkylierungsprodukt **37**. Lediglich der Anteil an Hydratisierungsprodukt **40** verringerte sich und der Eliminierungsproduktanteil von **37** und **38** stieg bedeutend.

In den Umsetzungen der Substrate **41-43** konnte mit den *AacSHC* Varianten Y420F, G600V, dem *TelSHC* Wildtypenzym und der *TelSHC* Variante G609V putatives Alkylierungsprodukt dargestellt werden, wie in Kapitel 4.2 diskutiert wurde. Bei Betrachtung der Substrate (Abbildung 45) wird ersichtlich, dass das Substrat für eine erfolgreiche Alkylierung spezielle Anforderungen erfüllen muss.

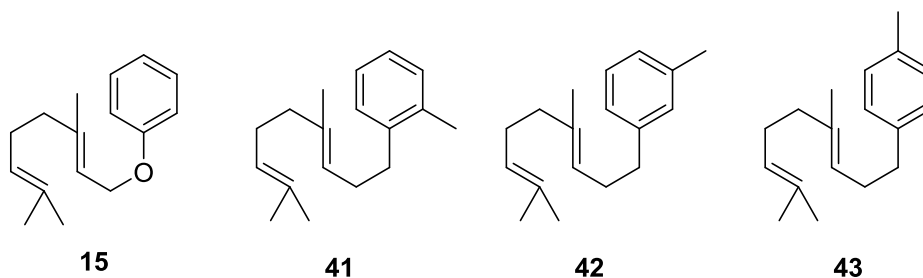


Abbildung 45: Polyprenylphenylsubstrate, welche mutmaßlich zur Darstellung des Alkylierungsprodukts geeignet sind.

Substrat **15** trägt im Gegensatz zu Substrat **36** eine Etherfunktionalität benachbart zum Phenylring. Diese doniert mittels ihres positiven mesomeren Effekts Elektronendichte in das aromatische System und aktiviert dieses somit. Das Arensystem von Substrat **36** wird ausschließlich durch die elektrostatische Induktion der Alkylkette aktiviert. Diese Aktivierung ist um ein Vielfaches schwächer als die durch den mesomeren Effekt der Etherfunktionalität von **15**. Dies spiegelt sich schließlich darin wider, dass das aromatische System von Verbindung **36** nicht genügend Elektronendichte aufweist, um nukleophil das zweite Carbokation abzufangen. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen der Doktorarbeit von Hammer^[124], der versuchte Substrate mit aromatischem Rest ohne Etherfunktionalität zu verwenden, um die Carbokationen einer SHC-vermittelten Prins-Reaktion sowie Epoxidringöffnung abzufangen. Diese Substrate waren, genau wie in der vorliegenden Arbeit,

auch nicht in Lage die Carbokationen mittels ihres aromatischen Rests nukleophil zu attackieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten nun daraufhin, dass dies mit den elektronischen Eigenschaften der Substrate zusammenhängt.

Die Substrate **41-43** sind durch den positiven induktiven Effekt der Polyprenylkette sowie durch den Methylsubstituenten doppelt aktiviert. Diese doppelte Aktivierung scheint zur Folge zu haben, dass zu einem geringen Teil die Alkylierung der Substrate ermöglicht wird. Dabei dirigieren im Fall des *meta*-Methylderivats **42** beide Reste in die gewünschte Position, an der die Alkylierung stattfindet. Die Regioselektivitätskontrolle ist hier substratunterstützt. Im Falle von **41** und **43** verstärken sich die dirigierenden Effekte jedoch nicht, sodass die Regioselektivitätskontrolle in diesen Fällen allein durch die Substratvorfaltung in der aktiven Tasche der SHCs erklärbar ist. Die Regioselektivität ist somit maßgeblich katalysator kontrolliert.

Die brom- und methoxysubstituierten Substrate **32-35** werden allesamt nicht zum trizyklischen Produkt umgesetzt. Da die aromatischen Systeme eine ähnliche bzw. höhere Elektronendichte aufweisen sollten als das Modellsubstrat **15**, muss dies damit zusammenhängen, dass diese Substrate aufgrund ihrer sterisch anspruchsvollen Substituenten nicht in der Lage sind, ihre reaktive Konformation für die Zyklisierung einzunehmen. Die *meta*-substituierten Substrate **32** und **34** zeigen dabei eine bessere Produktbildung als die *ortho*-substituierten Substrate **33** und **35**. Dies hat vermutlich ebenso sterische Gründe, da das Arensystem aufgrund der *ortho*-Substitution eine unzureichende Drehbarkeit in der aktiven Tasche aufweist und somit keine produktive Bindung eingehen kann.

Die Errungenschaft der vorliegenden Arbeit liegt darin, dass eine Unterdrückung der bevorzugten Hydratisierungsreaktion erreicht werden konnte, allerdings kann die erfolgreiche FC Alkylierung nicht durch reines *enzyme engineering* erzielt werden. Die Substrate müssen ebenfalls passend designt sein. Dabei ist es essentiell, ähnlich wie in der klassischen Chemie, dass die Arensysteme durch elektronendonierende oder zumindest elektronenschiebende Gruppen ausreichend aktiviert werden. Zusätzlich spielt die Sterik der Substituenten am aromatischen System eine bedeutende Rolle. Kleine unpolare Substituenten wie Methylgruppen erlauben noch eine produktive Bindung, während größere polare Reste wie Brom- und Methoxygruppen sterisch zu anspruchsvoll sind und somit nicht mehr passend in die aktive Tasche binden können. Der Einsatz von Enzymvarianten, wie der *AacSHC* Variante L607G oder L607A, eröffnet anscheinend für die brom- und methoxysubstituierten Substrate an der richtigen Position Raum, sodass die Substrate besser in die aktive Tasche binden können. Diese Substrate sollten aufgrund ihrer Elektrostatik nun in der Lage sein, den

nukleophilen Angriff des Arensystems zu gewährleisten, allerdings scheint zwar genügend Raum für die Bindung der Substrate vorhanden zu sein, jedoch nicht für die passende Ausrichtung des Arensystems, da kein Alkylierungsprodukt, sondern fast ausschließlich Hydratisierungsprodukt bei diesen Reaktionen gebildet wird. Somit scheint für eine erfolgreiche Alkylierung ein feines Zusammenspiel zwischen Elektrostatik und Sterik der Substrate entscheidend zu sein. Für das aktuell etablierte System kommen damit ausschließlich Substrate mit kleinen elektronendonierenden Substituenten in Frage. Als nächstes sollten Derivate des Geranylphenylethers **15**, welche Methylgruppen an ihrem aromatischen System tragen, als Substrate in der SHC-vermittelten Reaktion untersucht werden, um herauszufinden, ob es zur Bildung des Trizyklus kommt. Für Substrate mit sterisch anspruchsvolleren Resten muss eine filigrane Feinabstimmung zwischen *enzyme engineering* und *substrate design* erfolgen.

4.4 Neubetrachtung der Wasserhypothese

Die allermeisten Enzyme benötigen ein Mindestmaß an Wasser in ihrem Reaktionsmedium, um die Aufrechterhaltung ihrer nativen Struktur zu gewährleisten oder schlichtweg ihre Katalysefähigkeit beizubehalten.^[190] Dabei ist der Verlust der Katalysefähigkeit, beispielsweise in organischem Lösungsmittel, bei gleichzeitigem Beibehalten der nativen Struktur darauf zurückzuführen, dass Wasser nicht ausschließlich als Reaktionsmedium, sondern zusätzlich als Substrat, beispielsweise bei Hydrolysen, oder als Produkt, z.B. während einer Esterspaltung, in enzymatischen Reaktionen eine Rolle spielt.^[191]

Die Terminierung der SHC-katalysierten Polyzyklisierungsreaktion wird beispielsweise grundsätzlich von einem Wassermolekül gewährleistet. Entweder wirkt ein Wassermolekül als Base und deprotoniert das Carbokation zum korrespondierenden ungesättigten Produkt^[142] oder das Carbokation wird durch ein Wassermolekül abgefangen und somit hydratisiert. Aufgrund dessen spielt das Vorhandensein von Wasser für die Reaktionsterminierung der SHC-vermittelten Reaktionen eine bedeutende Rolle, welche in Kapitel 3.5 genauer betrachtet wurde. Eine ähnliche Rolle spielt Wasser auch für den Reaktionsmechanismus der *ent*-Copalyldiphosphatsynthase (CPS) aus *Arabidopsis thaliana* (*At*), bei welchem die Deprotonierung des finalen Carbokations von einem Wassermolekül gewährleistet wird, um schlussendlich Copalylpyrophosphat darzustellen. Dabei wird das Wasser, welches als katalytische Base wirkt, in der *At*CPS von einem Histidin H263 und einem Asparagin N322 passend positioniert und aktiviert. Die *At*CPS Variante H362Y, in welcher der Tyrosinrest direkt mit dem Asparagin N322 interagiert und keinen Raum mehr für ein Wassermolekül

lässt, unterbindet die Eliminierung des Protons, es kommt zur Umlagerung des Carbokations und somit zur Bildung des Kolavenylpyrophosphats.^[192] Daran wird ersichtlich, dass der Reaktionspfad und die daraus folgende Produktpalette, durch die Aufhebung von speziellen Wasserstoffbrückenbindungen oder gar durch die Verdrängung von Wassermolekülen, maßgeblich verändert werden kann. Dasselbe Phänomen wurde auch beim Einsatz der *AacSHC* Variante Y420F in der Modellreaktion mit dem Geranylphenylether **15** beobachtet.

Die Ergebnisse der Sättigungsmutagenese in Kombination mit einer Dockingstudie, durchgeführt mit der YASARA Software, führten dabei zum Aufstellen der sogenannten Wasserhypothese (Kapitel 3.5). In dieser wurde darüber gemutmaßt, ob das Wassermolekül, welches in der *AacSHC* Kristallstruktur (pdb: 1UMP) von den Aminosäuren W489, T599 und Y609 koordiniert und somit positioniert wird, für den nukleophilen Angriff an das zweite Carbokation des Modellsubstrats **15** verantwortlich sein könnte. Es ist bekannt, dass ein Wassermolekül die finale Deprotonierung des Hopanyl-Kations zum Hopen übernimmt. Dieses sogenannte *front water* wird dafür von weiteren Wassermolekülen (*back water*) aktiviert und passend positioniert. Die zusätzlichen Wassermoleküle werden dabei im Falle der natürlichen Reaktion von sieben Aminosäureresten (T41, E45, E93, R127, W133, Q262 und Y267) selbst passend aktiviert.^[142] Das in der vorliegenden Arbeit postulierte verantwortliche Wassermolekül befindet sich zusätzlich in räumlicher Nähe zu den Positionen 600 und 607, welche auch im Prima-Facie Assay als Schalterpositionen identifiziert wurden.

Durch Variationen der Aminosäureseitenketten in diesen Positionen, hauptsächlich zu mittelgroßen hydrophoben Aminosäuren, konnte zumeist eine leichte Verschiebung zum Alkylierungsprodukt **16** erreicht werden. Dies kann unter anderem daran liegen, dass die neu eingeführten Seitenketten die Koordination des Wassers teilweise unterbinden und somit dessen Aktivierung verhindern bzw. dass die neuen Aminosäureseitenketten den Raum in der aktiven Tasche ausfüllen und somit für eine Verdrängung des Wassers sorgen.

Neben dem erwähnten Wassermolekül wurde noch ein zweites in Betracht gezogen. Dieses Wassermolekül befindet sich oberhalb des Substrats und ist von den Aminosäureseitenketten von Q366, N369 und Y420 koordiniert. Bei der Durchführung des Konsensus-Ansatzes wurden die Q366 und Y420 jeweils variiert. Die *AacSHC* Variante Q366E zeigte mit einem Anteil von 65 % Alkylierungsprodukt **16** dabei schon eine Verschiebung in der Produktselektivität, war jedoch mit einer Produktbildung von 1,2 % weniger aktiv als das *AacSHC* Wildtypenzym. Die Substitution des Tyrosins durch ein Phenylalanin in Position 420 führte demgegenüber zu einer deutlichen Steigerung in der Produktbildung von 3 % beim Wildtypenzym hin zu 15 % bei der Variante Y420F. Zusätzlich war die *AacSHC* Variante

Y420F zu 97 % selektiv bezüglich dem Alkylierungsprodukt **16**. Werden die beiden Variationen betrachtet, so ist die Glutaminsäure in Position 366 immer noch in der Lage, eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül aufzubauen und dieses somit zu positionieren. Allerdings scheint die Positionierung des Wassermoleküls in diesem Falle ein wenig günstiger für die Zyklisierungs- anstatt für die Hydratisierungsreaktion zu sein. Das Glutamin in dieser Position sollte der Vollständigkeit halber in Zukunft noch gegen mittelgroße hydrophobe Aminosäuren, wie I, L, V und M, ausgetauscht werden.

Die Variante Y420F ist nicht mehr in der Lage ein Wassermolekül über ihre Seitenkette zu koordinieren und somit zu positionieren. Diese Wasserstoffbrückenbindung scheint jedoch maßgeblich für die Fixierung des Wassers für den nukleophilen Angriff an das zweite Carbokation verantwortlich zu sein, da mit der Aufhebung dieser Wasserstoffbrückenbindung eine massive Selektivitätsverschiebung einhergeht. Die finale Deprotonierung, sodass das Alkylierungsprodukt **16** ausgebildet wird, findet schließlich weiter hinten in der aktiven Tasche statt, da diese Eliminierung erst nach Formierung des Trizyklus erfolgt.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei diesem Wassermolekül um das Nukleophil handelt, welches bei der Bildung des Hydratisierungsprodukts **31** das zweite Carbokation abfängt, konnte durch die Bestimmung des Enantiomers des Hydratisierungsprodukts **31** erhalten werden (Kapitel 3.9.1).

Während der Charakterisierung des Produkts **31** wurde anhand eines NOESY-Spektrums bestimmt, dass in der SHC-vermittelten Reaktion das (*R*)-Enantiomer von **31** gebildet wird. Basierend auf diesem Wissen wurde eine Dockingstudie mit dem ermittelten Enantiomer, mittels der YASARA Software, durchgeführt. Das Ergebnis der realisierten Dockingstudie ist in Abbildung 46 gezeigt. Die Hydroxygruppe des Hydratisierungsprodukts **31** ist nach oben ausgerichtet. Dies lässt den Rückschluss zu, dass das attackierende Wassermolekül oberhalb des Substrats **15** positioniert sein muss. Dies entspricht dem Wassermolekül, welches von den Aminosäuren N369, Q366 und Y420 koordiniert wird. Dieser Sachverhalt untermauert die Ergebnisse der *AacSHC* Variante Y420F, welche fast vollständig selektiv die Alkylierungsreaktion von **15** katalysiert.

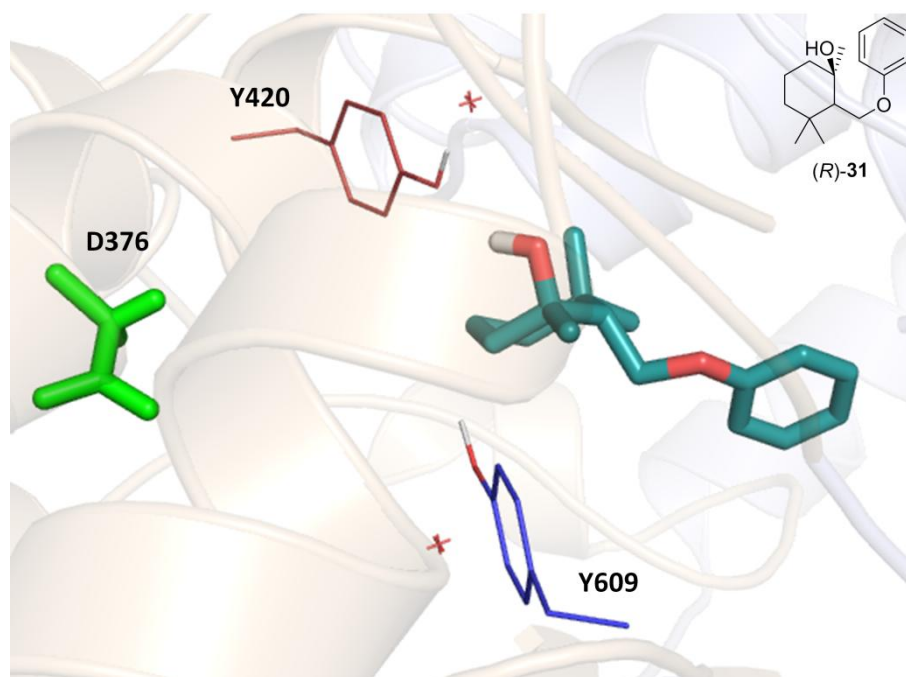


Abbildung 46: Ergebnis der Dockingstudie, durchgeführt mit der YASARA Software, mit dem *AacSHC* Wildtypenzym (pdb: 1UMP) als Protein und dem (*R*)-Enantiomer des Hydratisierungsprodukts **31** (türkis) als Ligand. Die Sauerstoffatome des Liganden sind rot und das polare Wasserstoffatom weiß dargestellt. Die katalytisch aktive Aparaginsäure in Position 376 ist grün hervorgehoben. Die beiden Kristallwasser, welche von dem Tyrosin in Position 420 (rot) und in Position 609 (blau) koordiniert werden, sind als rote Kreuze dargestellt.

4.5 Die Sättigungsmutagenese – Trends und Hotspot-Übertragung

Während des Prima-Facie Assays kristallisierten sich vier Aminosäurepositionen (I261, G600, L607 und Y609) in der *AacSHC* heraus, welche einen maßgeblichen Einfluss auf die Produktbildung sowie -selektivität ausübten. Diese wurden im Folgenden *targets* einer Sättigungsmutagenese. Im Nachfolgenden sollen die Trends der einzelnen Sättigungen der jeweiligen Positionen betrachtet werden. In Kapitel 4.8 werden die identifizierten Positionen noch einmal in Zusammenhang mit anderen *AacSHC*-vermittelten Reaktionen in vorangegangenen Projekten gebracht.

4.5.1 Sättigung der Position 261

Variationen in Position 261 hatten fast ausschließlich eine Verminderung der Produktbildung und ausschließlich eine Selektivitätsverschiebung hin zum Hydratisierungsprodukt **31** zur Folge. Die Substitution des Isoleucins durch größere Aminosäureseitenketten, gleichgültig welcher Polarität, bedingte dabei eine klare Verschiebung der Produktselektivität hin zum Hydratisierungsprodukt **31**, während der Einsatz von kleinen Aminosäureresten zum höchsten Anteil an Alkylierungsprodukt **16** führte. Dabei wurde jedoch maximal ein Anteil an Alkylierungsprodukt **16** äquivalent zum *AacSHC* Wildtypenzym erhalten.

4.5.2 Sättigung der Position 600

Die Variationen in Position 600 hatten Veränderungen in der Produktbildung sowie Selektivitätsverschiebungen zur Folge. In Abbildung 28 (Kapitel 3.4) wird ersichtlich, dass hydrophobe kleine bis mittelgroße Aminosäuren (A, I, M und V) sowie kleine polare Aminosäuren (S, C und T) die Produktselektivität hin zur Alkylierungsreaktion verschoben. Eine Ausnahme stellte dabei die Variante G600L dar, welche zusätzlich als einzige Variante die Bildung des mutmaßlichen terminalen Alkenprodukts ermöglichte.

Eine mögliche Erklärung, warum die hydrophoben Aminosäuren den Alkylierungsanteil erhöhen, ist, dass diese das Wasser, welches von Y609, W489 und T599 koordiniert wird, verdrängen, welches, wie in Kapitel 3.5 gezeigt, auch eine Rolle für die Selektivität zu spielen scheint. Die kleinen polaren Aminosäuren sind hingegen in der Lage, das Wasser zusätzlich zu koordinieren und dieses unter Umständen in einem Maße zu positionieren, dass es nicht mehr an der Reaktion teilnehmen kann. Bei Einführung von großen Aminosäureseitenketten kommt es, wie zuvor in der Position 261, zu einer Selektivitätsverschiebung hin zum Hydratisierungsprodukt **31**.

In Abbildung 47 sind die Ergebnisse der Sättigungsmutagenese in Position 600 noch einmal dargestellt, diesmal sind diese jedoch nach dem Volumen der Aminosäureseitenkette nach Esque *et al.* sortiert.^[193] Bei der Betrachtung der Abbildung fällt auf, dass Aminosäuren mit großen Seitenketten (W, Y, F, R und K), welche hauptsächlich die Hydratisierung katalysieren, wenig aktiv bis inaktiv sind. Zudem sind die Aminosäuren mit basischer (K, R und H) und saurer (D und E) Seitenkette allesamt fast vollständig inaktiv. Zusätzlich wird ersichtlich, dass kleine Aminosäuren (G, A, S und C), zusammen mit den Varianten G600L und G600V, die höchste Produktbildung aufweisen. Der Trend für die Produktbildung könnte darin begründet sein, dass große Aminosäureseitenketten keinen ausreichenden Raum mehr in der aktiven Tasche vorfinden und somit beispielsweise mit dem benachbarten Y609 kollidieren, während dies bei weniger sterisch anspruchsvollen Aminosäuren kein Problem darstellt.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass kleine bis mittelgroße hydrophobe und polare Aminosäuren in Position 600 zu Wildtyp-ähnlichen Produktbildungen und zu einer Begünstigung der Alkylierungsreaktion führen. Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten zeigen den gegenteiligen Effekt; diese *Aac*SHC Varianten sind inaktiv bis wenig aktiv und weisen eine deutliche Verschiebung der Produktselektivität hin zum Hydratisierungsprodukt **31** auf.

4.5.3 Sättigung in Position 607

Variationen in Position 607 beeinflussen, ebenso wie Variationen in Position 600, die Produktbildung sowie die Produktselektivität. Bei Betrachtung von Abbildung 29 (Kapitel 3.4) fällt auf, dass diesmal die Einführung von großen Aminosäureseitenketten (W, K, F und M) eine Verschiebung hin zur Alkylierungsreaktion bewirkt. Dies könnte, wie in Kapitel 3.5 erwähnt, darin begründet sein, dass die Distanz zwischen der Position 607 und dem Kristallwasser deutlich größer ist als zwischen der Position 600 und dem Wassermolekül, sodass größere Aminosäureseitenketten notwendig sind, um diesen Raum zu blockieren und somit die Hydratisierung oder frühzeitige Deprotonierung zu verhindern. Die Varianten L607E, L6007Q und L607D, welche auch die Alkylierung begünstigen, stellen mittelgroße Aminosäuren dar, welche vermutlich durch ihre Ausdehnung in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Wassermolekül auszubilden und dieses somit in einer Position zu fixieren, in der es nicht mehr in der Lage ist, das zweite Carbokation mittels eines nukleophilen Angriffs oder einer Eliminierung abzufangen. Die Substitution des Leucins durch kleine bis mittelgroße hydrophobe und polare Aminosäuren (A, G, S, V, C, P, N und T) begünstigt demgegenüber das Auftreten der Hydratisierung.

Abbildung 47 zeigt nochmals die Ergebnisse der Sättigungsmutagenese in Position 607, diese sind jedoch diesmal nach dem Volumen der Aminosäureseitenkette nach Esque *et al.* sortiert.^[193] Bei Betrachtung der Abbildung 47 wird der Trend ersichtlich, dass sich die Produktbildung mit steigendem sterischen Anspruch der Aminosäureseitenkette verringert. So sind die Varianten L607R, L607F, L607Y und L607W allesamt inaktiv bis geringfügig aktiv, während die sterisch wenig anspruchsvollen Varianten (G, A, S und C) alle eine deutlich erhöhte Produktbildung im Vergleich zum Wildtypenzym aufweisen. Die sterisch wenig anspruchsvollen Enzymvarianten müssen somit die produktive Bindung des Substrats **15** und die damit einhergehende initiale Protonierung unterstützen. Zusätzlich schaffen sie Raum für weitere Wassermoleküle, sodass die Bildung des Hydratisierungsprodukts **31** begünstigt wird.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Einführung von großen Aminosäureseitenketten in Position 607 eine deutliche Verminderung der Produktbildung sowie eine Begünstigung der Alkylierungsreaktion zur Folge hat. Kleine und somit sterisch wenig anspruchsvolle Aminosäuren in dieser Position hingegen bewirken eine deutliche Steigerung der Produktbildung und führen durch den erweiterten Raum für Wassermoleküle zu einer Begünstigung der Hydratisierung des zweiten Carbokations.

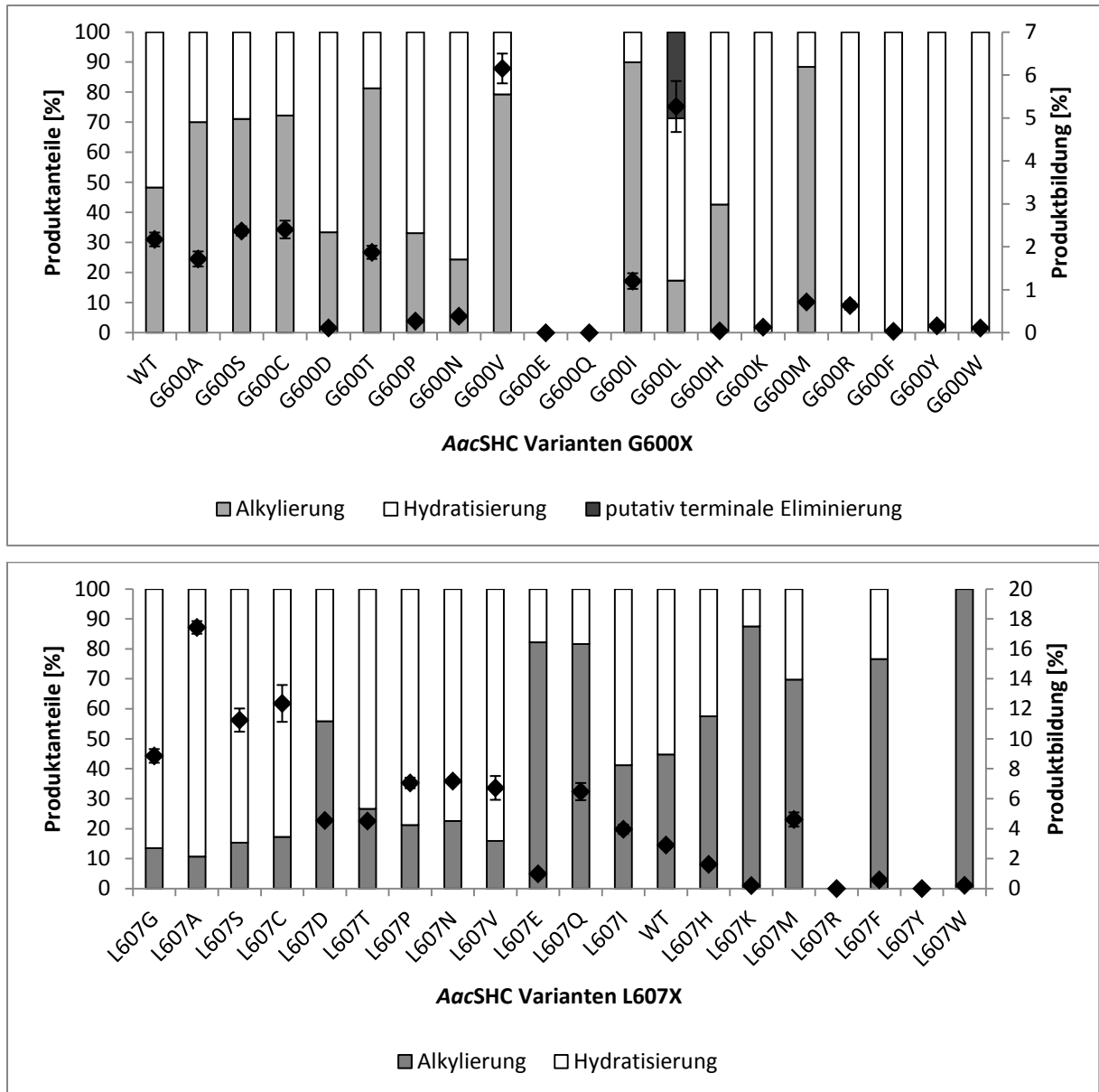


Abbildung 47: Ergebnisse der Sättigungsmutagenese-Ansätze in Position 600 (oben; Kapitel 3.4, Abbildung 28) und in Position 607 (unten, Kapitel 3.4, Abbildung 29) sortiert nach dem Volumen der Aminosäureseitenkette nach Esque *et al.*^[193]

4.5.4 Sättigung in Position 609

Variationen in Position 609 bewirken eine maßgebliche Verschiebung der Produktselektivität hin zum Hydratisierungsprodukt **31** und eine deutliche Erniedrigung der Produktbildung. Bei Betrachtung von Abbildung 29 (Kapitel 3.4) wird ersichtlich, dass die Einführung von mittelgroßen hydrophoben Aminosäuren (V, L, M und I) dabei den größten positiven Effekt auf die Bildung des Alkylierungsprodukts **16** hat. Diese Varianten sind, ähnlich wie die Variante Y609F, nicht mehr in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen auszubilden und scheinen somit die Alkylierungsreaktion leicht zu begünstigen. Die kleinen Aminosäuren A und G sowie die mittelgroße azide Aminosäure D begünstigen demgegenüber

die Hydratisierung. Vorstellbar wäre hierbei, dass durch die Einführung von kleinen Aminosäuren zusätzlich Raum für weitere Wassermoleküle geschaffen wird, bzw. dass die Asparaginsäure in der Lage ist, das Wasser passend für einen nukleophilen Angriff an das zweite Carbokation zu aktivieren und zu positionieren.

Alle Variationen in Position 609 führen zu einer Wildtyp-ähnlichen Produktbildung. Die Variante Y609D, welche die höchste Produktbildung zeigt, steigert diese gerade einmal von 2,5 % beim *AacSHC* Wildtypenzym auf 4,3 %.

Somit lässt sich am Ende festhalten, dass das Vorliegen von mittelgroßen hydrophoben Aminosäuren in dieser Position zu einem leicht erhöhten Alkylierungsanteil führt, während eine Veränderung in dieser Position die Produktbildung fast ausschließlich negativ beeinflusst.

4.5.5 Scaffold sampling

Die Sättigungsmutagenese der Schalterpositionen der *AacSHC* lieferte selektivere Varianten für Alkylierung und Hydratisierung sowie aktivere Varianten bezüglich der Produktbildung im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym ((Kapitel 3.4, Tabelle 3). Diese Schlüsselpositionen wurden zusätzlich in die korrespondierenden Positionen der *TelSHC* und *ZmoSHC1* übertragen (Kapitel 3.6.4). Die *ZmoSHC1* Varianten zeigten dabei ausnahmslos eine Wildtyp-ähnliche Produktbildung, wobei jedoch die *ZmoSHC1* Variante G667V die höchste Produktbildung aufwies. Die äquivalente *TelSHC* Variante G609V zeigt ebenso eine deutlich gesteigerte Produktbildung von 37 % im Vergleich zum *TelSHC* Wildtypenzym mit 14 %. Die Übertragung der anderen Variationen in die *TelSHC* führte jedoch zu keiner Verbesserung in der Produktbildung.

Erwähnenswert ist zudem, dass die *TelSHC* Variante L616A die Produktselektivität der *TelSHC* verschiebt. Dies ist die einzig bisher bekannte *TelSHC* Variante, welche in der Lage ist, neben der Alkylierung auch die Hydratisierung des Modellsubstrats **15** zu vermitteln. Die korrespondierende *AacSHC* Variante L607A zeigt bei der Modellreaktion eine der höchsten Produktbildungen und zusätzlich mit 90 % einen der höchsten Anteile an Hydratisierung. Somit scheint ein Alanin in dieser Position bedeutend die Hydratisierung zu begünstigen. Dies könnte auch bei der korrespondierenden *ZmoSHC1* Variante der Fall sein, jedoch waren bei den durchgeführten Biotransformationen die Produktbildungen allgemein mit der *ZmoSHC1* so niedrig, dass der geringe Anteil an Hydratisierung unter Umständen unter der Detektionsgrenze der GC/MS lag. Daher sollte diese Reaktion mit der *ZmoSHC1* Variante

L700A wiederholt werden, um zu evaluieren, ob ein Alanin in dieser Position allgemein eine Selektivitätsverschiebung ermöglicht.

Die durchgeführte Übertragung der Schlüsselpositionen zwischen den Mitgliedern einer Enzymfamilie stellt dabei eine gängige Methodik im *enzyme engineering* dar. So wird beim sogenannten *scaffold sampling* postuliert, dass durch den Transfer von identifizierten Schlüsselpositionen für Aktivität oder Selektivität in orthologe Proteinstrukturen eine ähnliche Verbesserung bei der Übertragung in die neuen Enzymstrukturen erreicht wird.^[194]

Dieser Ansatz erlaubt eine schnelle Verbesserung von Biokatalysatoren mit minimalem Screeningaufwand. Auf diesem Wege transferierten beispielsweise Dunn *et al.* vorteilhafte Mutationen zwischen homologen Proteinstrukturen von Xenonukleinsäure-Polymerasen und steigerten somit die Aktivität relativ zum Wildtypenzym bedeutend.^[194] Diese Strategie wurde auch von Gober *et al.* genutzt, um hochaktive und selektive Cyclopropanierungskatalysatoren zu generieren. Ausgangspunkt war dabei das Modellenzym P450_{BM3}, welches durch Substitution eines Threonins durch ein Alanin in Position 268 zu einem extrem aktiven sowie selektiven Biokatalysator wurde. Die korrespondierenden Positionen wurden in zwölf homologen P450 Monooxygenasen variiert und es konnten, mit einem sehr geringen Screeningaufwand, selektive P450 Enzymvarianten für jedes der vier Diastereomere des Ethyl-2-phenylcyclo-propan-1-carboxylat erhalten werden.^[195] Auch Nett *et al.* wendeten diese Methodik bei der Untersuchung der Old Yellow Enzyme an und konnten durch die Übertragung der Schlüsselpositionen exzellente TOFs (bis zu 660 h⁻¹) und hohe Enantioselektivitäten (bis zu 99 %) erreichen.^[196]

4.6 Mögliche Gründe für das Misslingen der bimolekularen FC Alkylierung

Am Ende dieser Arbeit wurden *AacSHC* Varianten ausgewählt, welche als vielversprechende Kandidaten für die Katalyse einer bimolekularen FC Alkylierung galten. Dabei kamen die Einzelvarianten Y420F und G600V zum Einsatz, da diese eine gute Selektivität gegenüber der Alkylierung aufwiesen, sowie deren Doppelvariante Y420F_G600V. Der Einsatz der Varianten Y420F und Y420F_G600V hatte außerdem eine deutlich gesteigerte Produktbildung zur Folge. Zusätzlich wurde die *AacSHC* Variante L607A ausgewählt, da diese zu einer erhöhten Produktbildung im vorliegenden Projekt führte (17 % anstelle von 3 % mit dem *AacSHC* Wildtypenzym) und in einer vorangegangenen Arbeit die besten Selektivitäten für bimolekulare Reaktionen lieferte^[159,175]. Zudem wurde die Doppelvariante

Y420F_L607A generiert, um die Eigenschaften der beiden Einzelvariationen in einer kombinatorischen Variante zu bündeln.

Als elektrophile Komponente wurde Farnesol **4** gewählt, weil es bereits in der vorangegangenen Studie zu SHC-vermittelten intermolekularen Reaktionen als Substrat eingesetzt wurde.^[159,175] Als aromatische Komponenten fanden die elektronenreichen Arensysteme Anisol und 1,3-Dimethoxybenzol Verwendung.

In allen Reaktionsansätzen wurden ausschließlich die bicyklischen Zyklisierungsprodukte **5-7** des Farnesols sowie das bimolekulare Etherprodukt **8** bestehend aus zwei Farnesolmolekülen detektiert. Es wurden keine Alkylierungsprodukte aus dem Farnesol **4** und den aromatischen Komponenten nachgewiesen. An dieser Stelle stellt sich natürlich die Frage, ob die *Aac*SHC nicht in der Lage ist, eine solche bimolekulare FC Reaktion zu vermitteln oder ob unter Umständen die Testreaktion für das evolvierte Enzym nicht sorgfältig genug ausgewählt wurde.

Wird das Modellsubstrat **15** sowie das Farnesol **4** betrachtet, fällt auf, dass der nukleophile Angriff des Aromaten beim Geranylphenylether **15** nach der Monozyklisierung erfolgt, während beim Farnesol **4** zunächst der Bizyklus gebildet werden muss, damit das Nukleophil attackieren kann. Dies bedeutet, dass beim Geranylphenylether **15** das zweite Carbokation durch das Nukleophil abgefangen wird, während es bei der Farnesolreaktion das dritte Carbokation ist, welches nukleophil abgefangen wird. Die *Aac*SHC wurde im Verlaufe dieser Arbeit somit für kleinere elektrophile Komponenten, wie den Geranylphenylether **15**, evolviert. Aus diesem Grund sollten elektrophile Komponenten mit ähnlicher Struktur, wie Geraniol **17** oder (*E*)-2-Methylocta-2,6-dien, in der intermolekularen FC Alkylierung getestet werden. Diese werden auf dem gleichen Wege wie das Modellsubstrat **15** aktiviert und können nach anschließender Monozyklisierung nukleophil attackiert werden. Eine solche bimolekulare Reaktion konnte für das Geraniol **17** schon unter Ausbildung des Etherprodukts mit einem zweiten Geraniolmolekül **17** unter Verwendung der *Aac*SHC Varianten L607F beobachtet werden.^[159,175] Dies würde bei Verwendung von Geraniol **17** als Substrat in der intermolekularen FC Alkylierung eine Konkurrenzreaktion darstellen, welche bei Verwendung des (*E*)-2-Methylocta-2,6-dien vollständig vermieden werden könnte. Die Auswahl des Testsystems für die intermolekulare FC Alkylierung war somit vermutlich nicht sorgfältig genug und der Reaktionsansatz sollte mit den vorgeschlagenen elektrophilen Komponenten wiederholt werden.

4.7 Vergleich der aktiven Zentren von *Aac*SHC und *Tel*SHC

Die beiden Wildtypenzyme der *Aac*SHC und *Tel*SHC zeigten während der vorliegenden Arbeit deutlich unterschiedliche Aktivitäten sowie Produktselektivitäten. Um eine mögliche Ursache dafür zu identifizieren, sollten die aktiven Zentren der beiden Enzyme verglichen und deren Unterschiede analysiert werden. Da von der *Tel*SHC bisher keine Kristallstruktur gelöst ist, wurde, basierend auf der *Aac*SHC Struktur (pdb: 1SQC), mittels SWISS-MODEL ein Homologiemodell der *Tel*SHC erstellt. In Abbildung 48 ist ein Ausschnitt der Überlagerung der *Aac*SHC Kristallstruktur (pdb: 1SQC) mit dem erstellten Homologiemodell der *Tel*SHC dargestellt.

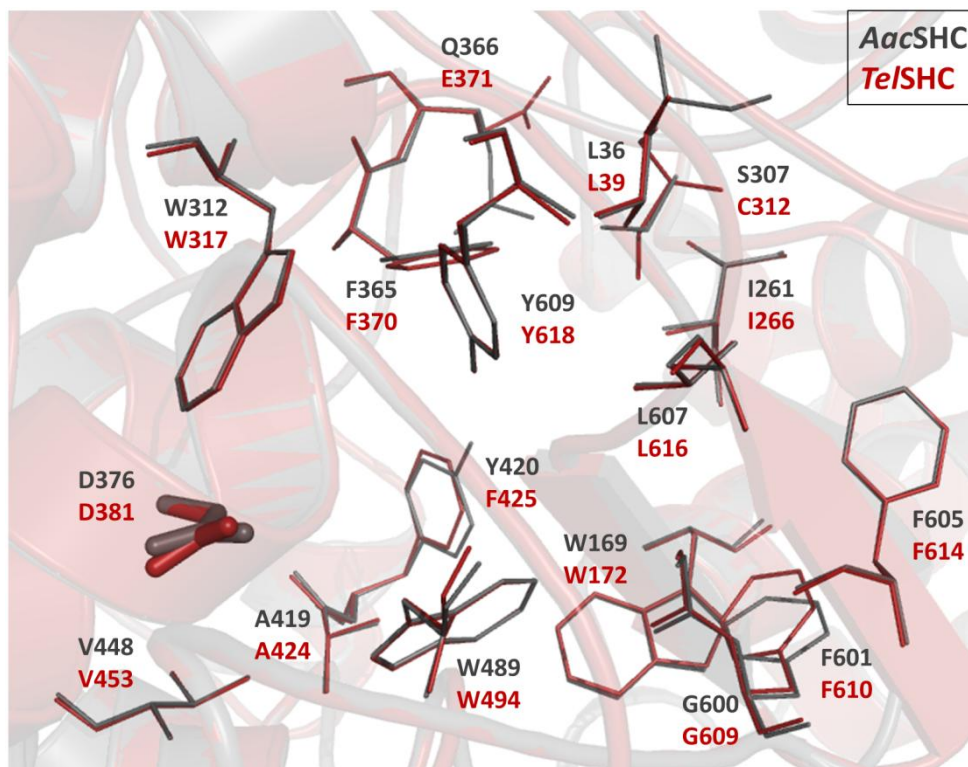


Abbildung 48: Strukturüberlagerung der aktiven Zentren der *Aac*SHC (Kristallstruktur, pdb: 1SQC) und der *Tel*SHC (Homologiemodell, basierend auf *Aac*SHC Strukturdaten). Dabei ist die *Aac*SHC Struktur in grau und das Homologiemodell der *Tel*SHC in rot dargestellt.

Entsprechend des Alignments in Abbildung 48 existieren bloß minimale strukturelle Unterschiede der aktiven Zentren der beiden SHC Wildtypenzyme. So sind 13 der 16 Aminosäuren, welche das jeweilige aktive Zentrum aufbauen, in den beiden SHCs konserviert. Die *Tel*SHC trägt lediglich in den äquivalenten Positionen zu Position 307, 366 und 420 in der *Aac*SHC anstelle eines Serins ein Cystein, eine Glutaminsäure anstelle eines Glutamins bzw. ein Phenylalanin anstatt eines Tyrosins. Diese Positionen wurden im Rahmen des Konsensus-Ansatzes (Kapitel 3.6.3) bereits variiert.

Dabei zeigte die *AacSHC* Variante S307C eine Wildtyp-ähnliche Produktbildung und -selektivität, während der Einsatz der *TelSHC* Variante C312S eine drei Mal so hohe Produktbildung verglichen mit dem *TelSHC* Wildtypenzym zur Folge hatte. Die Selektivität der *TelSHC* Variante C312S blieb jedoch unverändert.

Die größte strukturelle Änderung scheint an Position 366 vorstatten zu gehen; ist die Glutaminsäure in der *AacSHC* nach unten zum Substrat ausgerichtet, so orientiert sich das Glutamin in der *TelSHC* in die entgegengesetzte Richtung. Dies vergrößert die aktive Tasche der *TelSHC*. Die Orientierung der Glutaminsäure hin zum Substrat in der *AacSHC* sorgt wahrscheinlich für eine weitere Stabilisierung eines intermediären Carbokations und ist deswegen günstig. Die *AacSHC* Variante Q366E hingegen führte zu einer sichtbaren Selektivitätsverschiebung hin zur Alkylierung, während der Einfluss auf die Produktbildung verringert war. Die *TelSHC* Variante E371Q zeigte keine Veränderung in ihrer Selektivität, war jedoch nur noch geringfügig aktiv.

Die Verwendung der *AacSHC* Variante Y420F führte zu einer fünf Mal so hohen Produktbildung wie das *AacSHC* Wildtypenzym und war zudem zu 97 % selektiv gegenüber der Alkylierung. Die *TelSHC* Variante F425Y führte demgegenüber zu einem bedeutenden Einbruch in der Aktivität der *TelSHC* gegenüber der Modellreaktion. Somit bleibt festzuhalten, dass alle drei sich unterscheidenden Positionen in beiden Enzymen einen messbaren Einfluss auf die Aktivität bzw. Selektivität ausüben.

Racolta befasst sich im Rahmen ihrer Doktorarbeit mit der Untersuchung von konservierten Resten in der SHC Superfamilie. Dabei ist das Vorkommen einer Glutaminsäure in Position 366 zu 40 % konserviert, während die Konservierung eines Phenylalanins in den äquivalenten Positionen zu 420 in der *AacSHC* in den anderen SHCs 97 % beträgt. Eine besondere Präferenz für eine bestimmte Aminosäure in Position 307 konnte nicht gefunden werden.^[160,197] Somit stellt die *AacSHC* eine der wenigen Zyklasen dar, welche in der Position 420 mit einem Tyrosin eine polare, aromatische Aminosäure tragen. Aufgrund dessen ist vermutlich auch gerade dieses Enzym als einziges in der Lage, das Hydratisierungsprodukt **31** in der Modellreaktion darzustellen. Ein Hinweis hierfür ist, dass die Substitution des Tyrosins an dieser Stelle durch ein Phenylalanin in der *AacSHC* zu einer bedeutenden Selektivitätsverschiebung hin zur Alkylierungsreaktion führt.

Außer den genannten strukturellen Änderungen ist lediglich noch ersichtlich, dass sich die aromatischen Aminosäuren partiell ein wenig aus der Ebene herausdrehen. Dies sollte jedoch nicht überbewertet werden, da die Änderungen sehr gering sind und diese Reste bei genügend Platz zudem rotieren können.

Es konnten zwar die Produktbildung sowie die -selektivität der *AacSHC* mittels der Variante Y420F auf ein *TelSHC* Wildtyp-ähnliches Level gebracht werden, jedoch konnte keine Verschiebung der Produktselektivität mittels Einsatz der hier aufgeführten Varianten für die *TelSHC* erreicht werden. Diese gelang in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der *TelSHC* Varianten L616A, welche als einzige *TelSHC* Variante in der Lage war, die Hydratisierung des Modellsubstrats **15** zu katalysieren. Somit sind die ermittelten Positionen aus dem Konsensus-Ansatz nicht allein für Unterschiede der Produktbildung und Produktselektivität verantwortlich. Die Aufklärung dieser Unterschiede gestaltet sich somit als komplex, da die reine Betrachtung der aktiven Tasche der gewählten SHCs unzureichend ist, um ein Verständnis hierfür zu entwickeln. Schon Eichhorn *et al.* beobachteten, dass Aminosäurevariationen, welche nicht direkt das aktive Zentrum der SHCs verändern, einen bedeutenden Einfluss auf beispielsweise die Produktbildung ausüben.^[181] Dies könnte ebenso für die Kontrolle der Selektivität der Fall sein.

4.8 Allgemeine oder spezifische Schlüsselpositionen?

Im Folgenden soll diskutiert werden, ob es sich bei den identifizierten Schlüsselpositionen, 420, 600, 607 und 609, um allgemeine *hotspots* für Aktivität und Selektivität der *AacSHC* handelt, oder ob diese Positionen ausschließlich einen Einfluss auf die Modellreaktion der vorliegenden Arbeit ausüben.

Wird die Zusammenstellung der Varianten betrachtet, welche in vorangegangenen Projekten bereits zu einer Aktivitätssteigerung oder Verschiebung der Selektivität führten (Kapitel 3.1.2, Tabelle 1) wird ersichtlich, dass alle vier Positionen dort schon verzeichnet sind.

So beobachtete schon Hammer für die Umsetzung der Substrate Geraniol **17**, Linalool **50**, 2,3-Epoxygeraniol **20** und Citronellal **22**, dass Variationen in diesen Positionen häufig eine Aktivitätssteigerung zur Folge hatten (Abbildung 49).^[124]

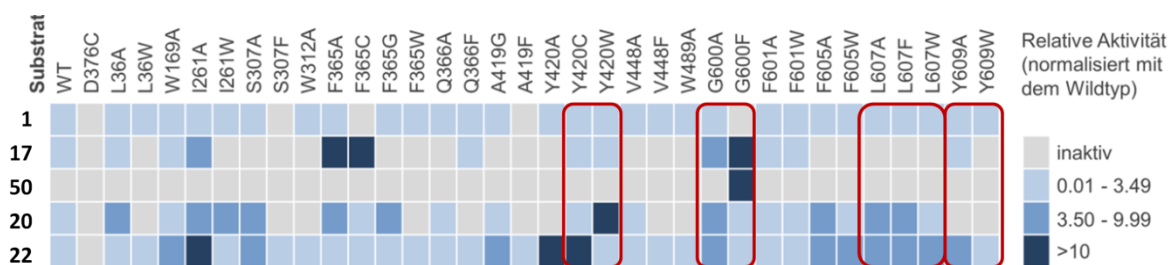


Abbildung 49: Relative Aktivitäten der initialen fokussierten *AacSHC*-Variantenbibliothek von Hammer gegenüber der Substrate Squalen **1**, Geraniol **17**, Linalool **50**, 2,3-Epoxygeraniol **20** und Citronellal **22**. Die relativen Aktivitäten sind dabei farbkodiert. Hellgrau steht dabei für keinen detektierbaren Umsatz, während die dunkelblaue Kennzeichnung eine zehn Mal höhere Aktivität als die des *AacSHC* Wildtypenzym markiert. Die relevanten Varianten sind mit einem roten Rahmen gekennzeichnet. Die Abbildung ist der Doktorarbeit von Hammer entnommen und geringfügig modifiziert.^[124]

Variationen in der Position 420 erzielten schon in der Umsetzung von 2,3-Epoxygeraniol **20**, Citronellal **22** und des Citronellalderivats 3-Methylcitronellal eine deutliche Steigerung in der Produktbildung.^[124,129,158,174,176] So führte beispielsweise der Einsatz der *AacSHC* Variante Y420W zu einem 100fach gesteigerten Umsatz des 2,3-Epoxygeraniols **20** zum monozyklischen terminalen Alkenprodukt **21** im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym.^[124,129] Einen entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung besitzt diese Position zudem für die Prins-Reaktion. Bei der Umsetzung des (*R*)-Citronellal (**R**)-**22** zu einer 3:1-Mischung aus (-)-Isopulegol (**R**)-**25** und (+)-*neo*-Isopulegol (**S**)-**24** kann die Produktbildung unter Verwendung der Variante Y420C um das 30fache gesteigert werden, während die Produktselektivität jedoch nicht verbessert wird.^[158,174] In beiden Fällen kann die Produktbildung bzw. die Selektivität unter Verwendung einer Doppelvariante in den Positionen 420 und 600 positiv beeinflusst werden. Die Verwendung der Variante Y420W_G600F führt bei der Umsetzung des 2,3-Epoxygeraniols **20** unter Erhalt der Selektivität zu einem Umsatz von 78 %. Dies ist nochmals eine Steigerung um 24 % verglichen mit der Einzelvariante Y420W.^[124,129] Bei Verwendung der Doppelvariante Y420W_G600F in der Prins-Reaktion von (**R**)-**22** kommt es hingegen zu einer Selektivitätsverschiebung, sodass nur noch (+)-*neo*-Isopulegol (**S**)-**24** gebildet wird. Während der Einsatz der Variante Y420C_G600A zu der selektiven Darstellung von (-)-Isopulegols (**R**)-**25** führt. Für diese selektive Reaktion kann mittels der Tripelvariante A419A_Y420C_G600A der Umsatz von unter 1 % auf 9 % gesteigert werden.^[158,174] In der vorliegenden Arbeit beeinflusst die Position 420 maßgeblich die Aktivität sowie Selektivität der *SHC*-vermittelten FC Alkylierung. Hinzu kommt, wie schon aus vorherigen Projekten ersichtlich, dass sich eine Kombination der Variationen in Position 420 und 600 als nutzbringend herausstellt, sodass die Produktbildung auf 37 % gesteigert und selektiv das gewünschte Alkylierungsprodukt **16** dargestellt werden konnte. Somit wurde schon in vorangegangenen Projekten der Einfluss der Positionen 420 und 600, auch in Kombination miteinander, auf die Produktbildung sowie -selektivität beobachtet.

Ein weiteres Beispiel dafür ist die Doppelvariante Y420W_G600F, welche in der Umsetzung von Geraniol **17** einen Umsatz von um die 70 % zeigte und somit eine 100fache Steigerung der Aktivität im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym erzielte. Bei der Umsetzung mit der Doppelvariante wurde eine Produktmischung vom Hydratisierungs- **19** und terminalen Alkenprodukt **18** im Verhältnis 2:1 erhalten.^[124] Wurde die Einzelvariante G600F verwendet, wurde ausschließlich das Hydratisierungsprodukt **19** mit einem vergleichbaren Umsatz erhalten.^[124,129] An dieser Stelle steuert, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, die Variation

in Position 420 die Produktselektivität. Das sterisch anspruchsvolle Tryptophan in dieser Position verändert vermutlich die Koordinationssphäre des Wassers in der räumlichen Nähe und sorgt somit für den verminderten Anteil an Hydratisierung.

Ebenso sind auch L607 Varianten in der Lage, die Produktbildung der Umsetzung des 2,3-Epoxygeraniols **20** und Citronellals **22** zu steigern.^[124,174] Besonders in den Fokus rückte diese Position jedoch während den ersten bimolekular SHC-vermittelten Reaktionen, da es mit den Varianten L607A und L607F möglich war, neben gesteigertem Umsatz, auch die Produktselektivität hin zum bimolekularen Etherprodukt **8** zu verschieben.^[159,175] Somit ist diese Position als relevant für die Aktivität sowie Selektivität bekannt.

Am unauffälligsten sind wohl die *Aac*SHC Varianten in Position 609. Der Einsatz der Variante Y609A hat eine leicht erhöhte Produktbildung in der Umsetzung des Citronellals **22** zur Folge^[124], während die gleiche Variante bei der Umsetzung des Farnesols **4** eine Verschiebung der Produktselektivität hin zum internen Alkenprodukt **6** bewirkt^[175]. Bei der Umsetzung von (*S*)-**22** wirken die Y609 Varianten jedoch als klarer Selektivitätsschalter. So wird bei Verwendung der Variante Y609F ausschließlich (-)-*neo*-Isopulegol (**R**)-**24** dargestellt, während der Einsatz der Variante Y609A die selektive Produktion von (+)-Isopulegols (*S*)-**25** zur Folge hat.^[174] Daraus wird ersichtlich, dass die Position 609 durchaus einen relevanten Einfluss auf die Selektivität von den SHC-vermittelten Reaktionen ausübt, wobei der positive Einfluss auf die Aktivität gering ist.

Somit bleibt festzuhalten, dass die identifizierten Schlüsselpositionen in der *Aac*SHC für die FC-artige Alkylierung ebenso in vorangegangenen Projekten schon eine maßgebliche Rolle spielten und somit als allgemein relevant für die Aktivität sowie Produktselektivität beschrieben werden können. Besonders vielversprechend scheinen dabei Doppelvarianten der Positionen 420 und 600.

4.9 Negative (Bio-)Katalyse – SHCs und die *Aac*SHC Variante Y420F

Wird die Aktivierungsenergie einer Reaktion gesenkt, indem entweder der Übergangszustand der Reaktion stabilisiert oder die Energie der Edukte erhöht wird, so spricht der Chemiker von Katalyse.^[8,18] Dies entspricht jedoch lediglich dem Konzept der positiven Katalyse. Der Begriff der negativen Katalyse ist dabei wesentlich weniger geläufig und uneinheitlich definiert. Die genaue Definition von negativer Katalyse führte schon 1969 zu einem Disput zwischen Singh *et al.* und Young.^[198] So werden beispielsweise Inhibitoren landläufig als negative Katalysatoren bezeichnet, da diese die Reaktion verlangsamen oder gar vollständig hemmen.^[199] Young und Malik beschrieben negative Katalysatoren hingegen als Substanzen,

welche den Reaktanden erlauben, einen Reaktionspfad mit einer höheren Aktivierungsenergie zu nehmen.^[200] Somit macht der Einsatz eines negativen Katalysators laut Young und Malik neue Reaktionspfade zugänglich.

In der Enzymkatalyse befasste sich Rétey mit dem Begriff der negativen Katalyse. Er postulierte, dass mittels der negativen Katalyse, bewerkstelligt durch das Enzym, die Lebenszeit von hochreaktiven Intermediaten, wie beispielsweise Radikalen, verlängert wird und somit Reaktionspfade mit höheren Aktivierungsenergien realisiert werden können.^[201] Diese Definition ist im Einklang mit Young and Malik^[200], widersprach jedoch dem Konzept der Enzymkatalyse nach Pauling^[202], welches besagt, dass Enzyme den Übergangszustand der vermittelten Reaktion stabilisieren und somit die Reaktion ermöglichen. Rétey stellte jedoch in Frage, wie sich dies bei mehrschrittigen Reaktionen verhalte und welcher Übergangszustand in solchen Fällen stabilisiert werde. Somit gelang er zu der Hypothese, dass bei hochreaktiven Intermediaten das Enzym hauptsächlich eine inerte Umgebung gewährleistet, indem es das Abreagieren des Intermediats über vorzeitige Abbruchreaktionen verhindert und somit die passende Selektivität ermöglicht.^[201]

Rétey nannte dabei ausschließlich radikalische Reaktionen als Beispiele, wie sie von Coenzym B₁₂-abhängigen Enzymen katalysiert werden. Werden jedoch die SHCs betrachtet, bei deren Reaktionsmechanismus intermediäre, extrem reaktive Carbokationen gebildet werden, stellen auch diese Enzyme ein passendes Beispiel für negative Katalysatoren in der Biokatalyse dar. So schaffen die SHCs eine perfekte Umgebung für die natürliche Reaktion des Squalens **1** zum Hopan **2** und Hopanol **3**. Wobei das vorzeitige Abreagieren der intermediären Carbokationen durch die hochspezifische Enzymumgebung gewährleistet wird. Kleine Änderungen in der Enzymumgebung, wie Einführungen von Einzelvarianten, führen dabei zu verfrühten Abbruchreaktionen, wie schon Hammer zeigen konnte.^[124]

Die SHCs sind somit für ihre natürliche Reaktion optimiert und bieten diese vollendete inerte Umgebung nicht für die Umsetzung unnatürlicher Substrate. Dies wird beispielsweise an der Modellreaktion der vorliegenden Arbeit ersichtlich, bei der das *Aac*SHC Wildtypenzym die Alkylierung sowie Hydratisierung im gleichen Maße vermittelt. Eine schlichte einzelne Variation des Tyrosins in Position 420 zum Phenylalanin ist jedoch schon in der Lage eine fast inerte Enzymumgebung für die Modellreaktion zu schaffen und somit nahezu selektiv die Alkylierung zu katalysieren. Durch den Austausch des Tyrosins gegen ein Phenylalanin gestaltet sich die aktive Tasche an dieser Stelle, durch den Verlust der Hydroxygruppe, anstelle von hydrophil nun hydrophob. Das Phenylalanin in Position 420 besitzt keine Möglichkeit mehr eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül aufzubauen und

dieses zu positionieren. Zusätzlich wird auf diesem Wege eine hydrophobe Umgebung geschaffen, sodass sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Wassermoleküls an dieser Stelle nochmals deutlich verringert. Im Bezug auf Rétey bedeutet dies, dass ein Reaktionspfad, nämlich der zum Hydratisierungsprodukt **31**, blockiert wird, indem eine inerte Enzymumgebung um das zweite Carbokation geschaffen wurde und somit eine vorzeitige Abbruchreaktion verhindert wird. Durch die neugestaltete Enzymumgebung wird nun ein anderer Reaktionspfad deutlich präferiert und es kommt selektiv zur Alkylierungsreaktion.

4.10 Biomimetische Friedel-Crafts Alkylierungen

In der klassischen Chemie finden immer häufiger biomimetische Synthesestrategien Anwendung, im Rahmen dessen orientieren sich beispielsweise jüngste Reaktionsansätze zur Polyzyklisierung an Zyklase-beinhaltenen Pathways. So prägte die Zyklisierung des Geranylgeranylpyrophosphats mittels einer Diterpenzyklase beispielsweise das *substrate design* von Lin *et al.*^[188] In der Studie wurde als Homolog zum Geranylgeranylpyrophosphat das Homogeranylaren als passendes Substratgrundgerüst gewählt. In den Synthesen fand schließlich das elektronenreiche 2-(Homogeranyl)anisol **51** Anwendung. Ähnlich wie das Arensystem des Geranylphenylethers **15** ist auch dessen aromatisches System aufgrund der benachbarten Etherfunktionalität besonders elektronenreich und besitzt somit eine gesteigerte Nukleophilie. Die anschließenden Zyklisierungsreaktionen erfolgten in Toluol oder Dichlormethan und unter Einsatz eines Zinnkatalysators mit unterschiedlichen BINOL-Liganden. Die Reaktionen führten zu sehr guten Ausbeuten von bis zu 91 %. Dabei wurden das Zyklisierungs- **52** sowie ein internes **53** und terminales Alkenprodukt **54** erhalten.^[188] Die Produkte sind in Abbildung 50 dargestellt. Aufgrund der Reaktionsdurchführung in organischem Lösungsmittel und somit der Abwesenheit von Wassermolekülen wurde kein Hydratisierungsprodukt erhalten. Somit kann in klassisch chemischen Reaktionsansätzen das Auftreten der Hydratisierung allein durch die Wahl des Lösungsmittels unterdrückt werden. Dies ist jedoch für die SHC-vermittelten Reaktionen nicht möglich, da die Zykhasen das Wasser nicht nur als Reaktionsmedium, sondern zusätzlich als Substrat benötigen. So würde in organischem Lösungsmittel auch die Reaktionsterminierung mittels Deprotonierung ausbleiben, da kein Wassermolekül vorläge, welches als Base wirken könnte. Interessanterweise wurde zudem ein anderes internes Alkenprodukt **53** wie in den SHC-vermittelten Reaktionen erhalten. Lediglich das terminale Alkenprodukt **54** ist äquivalent zu den SHC-vermittelten Reaktionen. Unter Verwendung des passenden BINOL-Liganden konnte eine Produktselektivität von 100 % für die Alkylierung erreicht werden, wobei jedoch

ausschließlich das racemische Produkt mit einer Ausbeute von 50 % isoliert werden konnte.^[188] Die Bestimmung der Enantioselektivität mittels NMR-Spektroskopie im Rahmen der vorliegenden Arbeit führte zu keinem eindeutigen Ergebnis, sodass keine Aussage über die exakte Enantioselektivität des Produkts **16** getroffen werden kann. Jedoch sollte die SHC-vermittelte FC Alkylierung, wie die anderen SHC-vermittelten Reaktionen, vollständig enantioselektiv verlaufen.^[129,131,146,158]

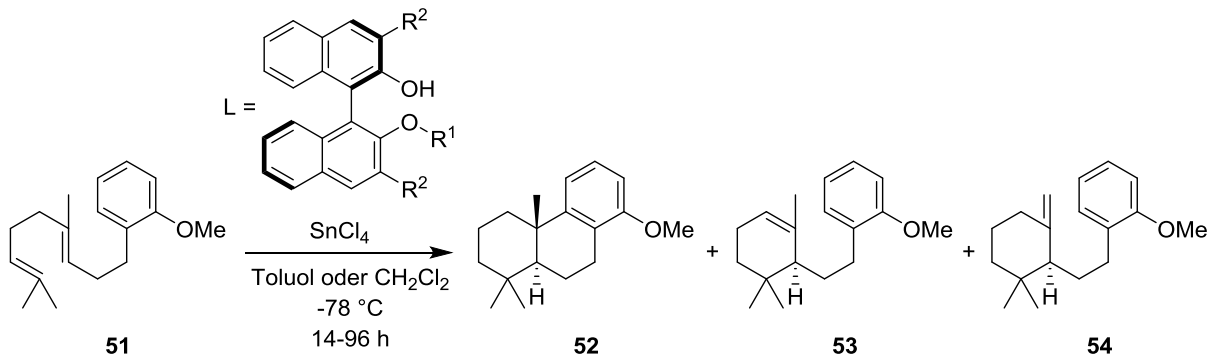
Ähnlich wie die SHC-vermittelte FC Alkylierung benötigte der Ansatz von Lin *et al.* ein elektronenreiches Arensystem, um den nukleophilen Angriff des Aromaten zu gewährleisten. Zudem wurden auch vollständig selektive Katalysemöglichkeiten mit moderaten Produktbildungen für die Alkylierung identifiziert, allerdings konnten Lin *et al.* lediglich das racemische Produkt isolieren. Dies sollte ein zusätzlicher Anreiz sein, den Nachweis für die vollständige Enantioselektivitätskontrolle der SHCs für die FC Alkylierung zu erbringen, um sich von der klassischen Chemie deutlich abheben zu können.

Ein weiterer biomimetischer Ansatz orientiert sich unmittelbar an der SHC-katalysierten Polyzyklisierung von Squalen **1**.^[203] Dabei kommt es jedoch nicht zur Protonierung einer nicht aktivierten Doppelbindung, wie bei der nativen Reaktion der SHCs oder dem vorherigen Beispiel nach Lin *et al.*, sondern es werden, wie in Abbildung 50 zu sehen, Aldehydsubstrate **55** eingesetzt, die mittels einer Iminbildung aktiviert werden. Die anschließende Zyklisierung wird durch die Protonierung der Imine *via* chiraler BINOL-basierter *N*-Phosphoramide initiiert. Die Ausbeuten der durchgeführten Reaktionen sind dabei mit maximal 65 % eher moderat. Dieser Ansatz ist trotzdem in zweierlei Hinsicht besonders faszinierend. Einerseits weil die aromatischen Reste des BINOL-Liganden die aktive Tasche der SHCs imitieren, somit die Vorfaltung des Substrats gewährleisten und auf diesem Wege Enantioselektivitäten bis zu 94 % sichern. Andererseits sind sogar Substrate ohne besonders aktiviertes Arensystem, ähnlich Substrat **36**, in der Lage, unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen eine Alkylierungsreaktion einzugehen.

Auch der zweite biomimetische Ansatz lieferte vielversprechende Ergebnisse, besonders beeindruckend ist dabei, dass es Fan *et al.* gelang Arensysteme ohne Etherfunktionalität in einer solchen Alkylierungsreaktion zu nutzen. Zusätzlich konnten eine Vielzahl von Substraten mit elektronenreichem Arensystem, welche in *para*-Position einen Substituenten tragen, zugänglich gemacht werden. Dabei wird schlichtweg ersichtlich, dass die aktive Tasche der SHCs nicht genügend Raum bietet, solche sterisch anspruchsvollen Substrate aufzunehmen und passend zu positionieren, während „freie“ chemische Katalysatoren dort keiner Limitierung unterliegen. Trotzdem sollten weitere *para*-substituierte Arensysteme,

neben Substrat **43**, in der SHC-vermittelten FC Alkylierung getestet werden, da die Orientierung der Reste in dieser Position unter Umständen schlicht die große aktive Tasche nach hinten auffüllt, ohne mit den Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums in Konflikt zu stehen.

Lin *et al.*, 2017^[189]



Fan *et al.*, 2018^[204]

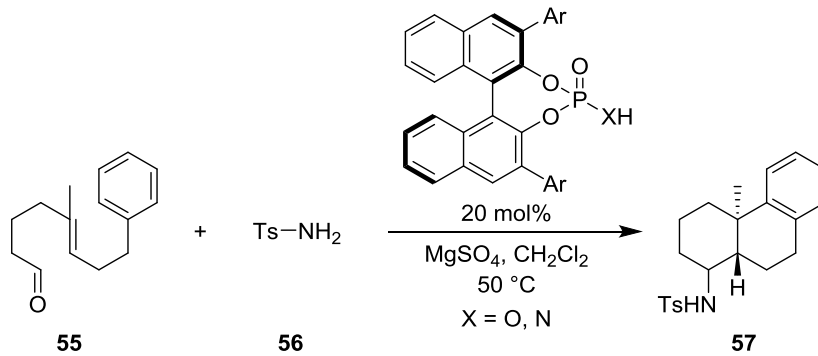


Abbildung 50: Biomimetische Polyzyklisierungsansätze von Polyenen nach Lin *et al.*^[188] und Fan *et al.*^[203]

5. Resümee und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung sowie Optimierung der intramolekularen SHC-katalysierten Friedel-Crafts Alkylierung und im Idealfall die Erweiterung auf einen intermolekularen Reaktionsansatz.

Als Modellenzym wurde dafür zu Beginn die *AacSHC* ausgewählt. Diese vermittelte die Umsetzung des Geranylphenylethers **15** mit einer Produktbildung von 3 % und katalysierte neben der gewünschten Alkylierung zusätzlich eine Hydratisierung im Verhältnis von 1:1. Um einen selektiven Alkylierungskatalysator zu generieren, musste somit neben der Enzymaktivität auch die Produktselektivität der *AacSHC* bezüglich der Alkylierung adressiert werden.

Um die Substratpalette der intramolekularen SHC-katalysierten Friedel-Crafts Alkylierung zu analysieren, wurden ferner acht Polyprenylphenylverbindungen mit unterschiedlichen Substituenten sowie Substitutionsmustern synthetisiert.

Im Rahmen der initialen Experimente konnten geeignete Reaktionsparameter (68 h, 50 °C und 0,2 % Triton X-100) für eine SHC-vermittelte Alkylierung gefunden werden. Zukünftig sollte, neben CHAPS und Triton X-100, ebenso SDS als Detergenz in SHC-vermittelten Reaktionen geprüft werden, da dessen Einsatz in einer vorangegangenen Studie mit Homofarnesol **9** als Substrat zu einer Umsatzsteigerung von 60 % führte.^[181]

Überdies ermöglichte die Etablierung eines Ganz-Zell-Assays in Mikrotiterplatten das schnelle und effiziente Screening der *inhouse* Variantenbibliothek mit den dargestellten Substraten. Im Zuge dessen konnten vier Schlüsselpositionen (261, 600, 607 und 609) für die Produktbildung und Produktselektivität identifiziert werden. Diese wurden anschließend *targets* einer Sättigungsmutagenese. Die Sättigungsmutagenese brachte Varianten mit 6fach gesteigerter Produktbildung im Vergleich zum *AacSHC* Wildtypenzym sowie einer 90 %igen Selektivität bezüglich der Alkylierung bzw. einer 95 %igen Selektivität bezüglich der Hydratisierung hervor.

Darüber hinaus wurden zwölf weitere SHC Wildtypenzyme in der Umsetzung des Geranylphenylethers **15** getestet. Dabei zeigte sich, dass lediglich die *AacSHC* in der Lage war, die Hydratisierung des zweiten Carbokations des Modellsubstrats **15** zu vermitteln. Durch die Isolierung des Hydratisierungsprodukts **31** und anschließende NMR-spektroskopische Untersuchung konnte zudem die Positionierung des Wassernukleophils bestimmt und somit ein vertieftes Verständnis des durchlaufenen Reaktionsmechanismus gewonnen werden.

Die anderen aktiven SHC Wildtypenzyme produzierten ausnahmslos selektiv das Alkylierungsprodukt **16**. Im Rahmen der durchgeführten Reaktionen wurden ausschließlich die Standardreaktionsparameter der *AacSHC* bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C angewendet. Diese Bedingungen sind jedoch womöglich aufgrund eines unpassenden Detergenzes oder einer ungeeigneten Reaktionstemperatur für die Aktivität der anderen SHCs nicht dienlich. Daher sollten an dieser Stelle für die weiteren SHC Wildtypenzyme abweichende Reaktionsparameter getestet werden, um zu untersuchen, ob eine der anderen SHCs unter passenden Reaktionsbedingungen eine verbesserte Alkylierungsfähigkeit birgt. Bei der Erforschung der Alkylierungsaktivität der anderen SHC Wildtypenzyme erwies sich die SHC aus *Thermosynechococcus elongatus* als besonders vielversprechender Kandidat. Diese vermittelte selektiv die Alkylierung des Modellsubstrats **15** mit einer Produktbildung von 15 %.

Im nachfolgenden Konsensus-Ansatz wurden, basierend auf einem Sequenzalignment der *AacSHC*, der *TelSHC* und der *ZmoSHC1*, Aminosäurepositionen in den aktiven Taschen ausgetauscht. Dabei zeigte die *AacSHC* Variante Y420F mit 14 % eine deutlich erhöhte Produktbildung sowie eine Produktselektivität von 97 % bezüglich der Alkylierung. Variationen in der Position 420 zeigten schon in vorherigen Studien einen relevanten Einfluss auf Selektivität und Produktbildung^[124,129,158,174,176], sodass Varianten in dieser Position auch in zukünftigen Projekten berücksichtigt werden sollten. Zudem sollte die Position 420 einer Sättigungsmutagenese unterzogen werden, um ihren Einfluss auf die SHC-vermittelte Friedel-Crafts Alkylierung und andere Reaktionen im Detail zu untersuchen. Die Verwendung der *TelSHC* Austauschvariante C312S wies außerdem mit 41 % eine deutliche Steigerung der Produktbildung auf. Werden die einträglichen Erkenntnisse des Konsensus-Ansatzes betrachtet, sollte der Vergleich der aktiven Zentren der Homologen der SHC Superfamilie verstärkt in zukünftige Mutageneseansätze aufgenommen werden. Ein solcher Konsensus-Ansatz stellt einen gängigen Mutageneseansatz dar und wird auch bei anderen Enzymfamilien erfolgreich angewendet.^[204–207]

In einem nächsten Schritt wurden die Schlüsselvarianten der Sättigungsmutagenese der *AacSHC* in die *TelSHC* und *ZmoSHC1* transferiert. Dieser Ansatz führte bei Verwendung der *TelSHC* Variante G609V zu einer Erhöhung der Produktbildung auf 37 %. Obendrein wurde mit der Variante L616A erstmals eine *TelSHC* Variante identifiziert, welche in der Lage war, die Hydratisierung zu vermitteln. Dies zeigte somit, dass der Transfer von Schlüsselpositionen zwischen homologen Enzymen (*scaffold sampling*)^[194–196] eine effektive Methode darstellt,

um Aktivitäten und Produktselektivitäten zu beeinflussen und somit auch in Zukunft für die Untersuchung weiterer SHC-vermittelter Reaktionen Anwendung finden sollte.

Durch die Kombination der besten *Aac*SHC Varianten in Doppelvarianten wurde schließlich mit der Variante Y420F_G600V ein selektiver Alkylierungskatalysator mit moderaten Produktbildungen für die Umsetzung des Modellsubstrats **15** erhalten. Die Kombination von Variationen in den Positionen 420 und 600 führte schon in früheren Projekten^[124,129,158,174] zu synergistischen Effekten, sodass doppelte Variationen in diesen beiden Positionen auch zukünftig stärker berücksichtigt werden sollten.

Die Umsetzung der verschiedenen Polyprenylphenylsubstrate mit den Wildtypenzymen der *Aac*SHC, *Tel*SHC und *Zmo*SHC1 sowie ihren Varianten führte zu einer breiten Produktpalette. Eine Zusammenstellung der Produktselektivitäten und Produktbildungen bezüglich der jeweiligen Produkte mit der besten dazugehörigen SHC Variante ist in Abbildung 51 aufgeführt. Als Hauptprodukt für die Wildtypenzymreaktionen wurde jeweils das Hydratisierungsprodukt erhalten. Das Alkylierungsprodukt konnte nur für eins der neun Substrate isoliert werden, während der Einsatz von den methylsubstituierten Polyprenylphenylverbindungen als Substrate mutmaßlich zu einem geringen Maß an Alkylierung führte. Aufgrund dessen wurde für eine erfolgreiche Alkylierung die Anforderung an die Substrate formuliert, dass eine Aktivierung des aromatischen Systems durch elektronendonierende oder zumindest elektronenschiebende Substituenten vorliegen muss. Zudem muss die Drehbarkeit des Arensystems in der aktiven Tasche der SHCs gegeben sein, was sterisch anspruchsvolle Substituenten anscheinend verhindern. Für die Evaluierung dieser Hypothese sollte der *para*-methylsubstituierte Geranylphenylether synthetisiert werden. Im Anschluss sollte untersucht werden, ob dessen Einsatz in der SHC-vermittelten Alkylierung eine erhöhte Produktbildung, im Vergleich zur Reaktion mit dem Modellsubstrat **15**, zur Folge hat.

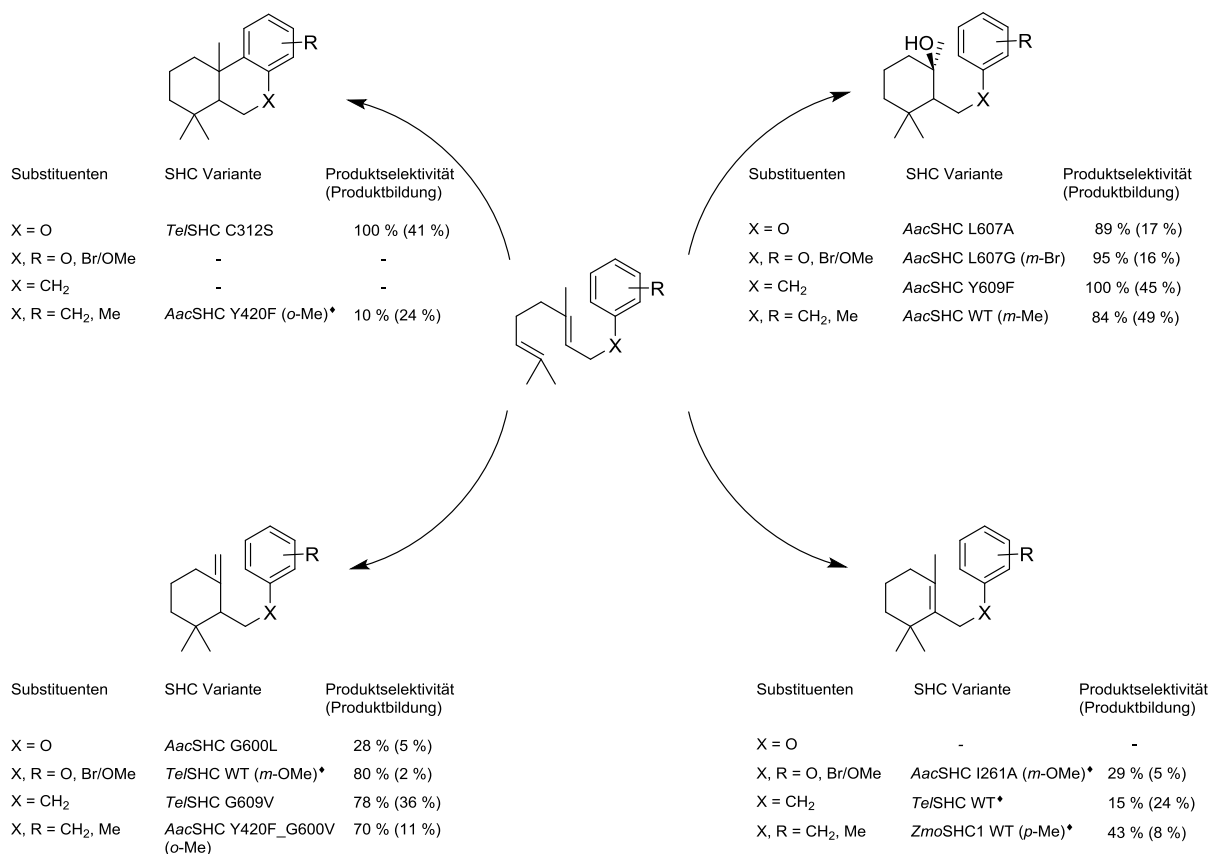


Abbildung 51: Übersicht der Produktpalette der umgesetzten Substrate. In den Tabellen sind die jeweiligen Substituenten der Produkte, die beste SHC Variante für deren Produktion sowie die Produktselektivität und -bildung ebendieser gelistet. Die schwarze Raute ♦ kennzeichnet dabei die Produkte, welche lediglich über GC/MS charakterisiert wurden. Die anderen Produkte wurden isoliert und mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Letztlich wurden die vielversprechensten *Aac*SHC und *Te*SHC Varianten in einer intermolekularen Reaktion von Farnesol **4** mit Anisol bzw. 1,3-Dimethoxybenzol getestet. Dabei konnte kein intermolekulares Alkylierungsprodukt detektiert werden. Dies könnte unter anderem darin begründet sein, dass das gewählte Testsystem, mit Farnesol **4** als elektrophiler Komponente, ungeeignet für die evolvierte *Aac*SHC ist. Die *Aac*SHC wurde in der vorliegenden Arbeit für Substrate evolviert, bei denen die Alkylierung nach der erfolgten Monozyklisierung stattfindet. Somit sollte die intermolekulare Reaktion nochmals mit den kleineren Substraten Geraniol oder (*E*)-2-Methylocta-2,6-dien wiederholt werden. Als mögliche aromatische Komponenten können elektronenreiche Arensysteme wie Anisol, 1,3-Dimethoxybenzol, Furan oder Thiophen dienen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit die *Aac*SHC für eine intramolekulare Alkylierung evolviert werden konnte, sodass schließlich ein vollständig selektiver Biokatalysator mit guten Produktbildungen für die Friedel-Crafts Alkylierung mit dem Geranylphenylether **15** erhalten wurde.

Zusätzlich wurde mit der *TelSHC* eine Zyklase identifiziert, welche eine ähnliche thermische Stabilität wie das Modellenzym *AacSHC* zeigt und ebenso eine gewisse Robustheit gegen Einzelvariationen aufweist. Darüber hinaus konnten die *TelSHC* und deren Varianten mit einer deutlich erhöhten Produktbildung, verglichen mit der *AacSHC*, überzeugen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Reaktionen mit der *TelSHC* in der Literatur beschrieben, sodass diese für eine Vielzahl von Projekten einen attraktiven Ausgangspunkt darstellen könnte. Dafür wäre zudem die Aufklärung der *TelSHC* Kristallstruktur wünschenswert, damit die Evolution der *TelSHC* gezielt mittels eines rationalen *enzyme engineering* erfolgen kann.

Außerdem konnten im Rahmen der Analyse des Substratspektrums der SHC-vermittelten Friedel-Crafts Alkylierung Anforderungen an die Substrate formuliert und ein besseres Verständnis des Reaktionsmechanismus gewonnen werden. Somit scheint das exakte Zusammenspiel von *enzyme engineering* und *substrate design* für eine solche SHC-katalysierte Alkylierung essentiell und die Darstellung eines universellen SHC-Alkylierungskatalysators hochkomplex und somit äußerst diffizil.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Standardchemikalien wurden von Sigma-Adrich, Roth oder Alfa Aesar bezogen und ohne weitere Reinigung in den Experimenten verwendet. Die verwendeten Substrate **15** und **32-36** wurden chemisch synthetisiert und analysiert (Kapitel 6.5). Die methylsubstituierten Substrate **41-43** wurde von Schelle übernommen.^[179]

Die Restriktionsenzyme und dNTPs wurden von Thermo Scientific und *PfuUltra* II Fusion HS DNA Polymerase von Agilent Technologies bezogen.

Verbrauchsmaterialien wie 15 sowie 50 mL Falcon[®] Zentrifugenröhrchen, 1,5 sowie 2,0 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Spritzen wurden von Sarstedt, Mikrotiterplatten von greiner bio-one und 2 mL *deep well* Platten mit 96 Reaktionsräumen sowie die dazugehörigen Glaseinsätze von neoLab[®] bezogen.

6.1.2 Molekularbiologische Kits

Für die DNA-Reinigung (DNA Clean & Concentrator[™]-5 Kit) und die Präparation von Plasmiden (Zyppy[™] Plasmid Miniprep Kit) wurden die molekularbiologischen Kits von Zymo Research bezogen.

6.1.3 Oligonukleotide

Für die ortsspezifische Mutagenese (Tabelle 8) und die DNA-Sequenzierung (Tabelle 9) wurden synthetische Primer der Firma Metabion verwendet.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Oligonukleotide für die ortsspezifische Mutagenese.

Mutation	Sequenz von 5'- nach 3'-Ende (<i>forward Primer</i> / <i>reverse Primer</i>)
<i>AacSHC_I261C</i>	GGCAGCTGGGGCGGCTGCCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGGCAGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261D</i>	GGCAGCTGGGGCGGCGATCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGATCGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261E</i>	GGCAGCTGGGGCGGCGAACAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGTTCGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261H</i>	GGCAGCTGGGGCGGCCATCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGATGGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261K</i>	GGCAGCTGGGGCGGCAAACAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGTTTGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261M</i>	GGCAGCTGGGGCGGCATGCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGCATGCCGCCCCAGCTGCC

<i>AacSHC_I261N</i>	GGCAGCTGGGGCGGCAACCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGGTTGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261P</i>	GGCAGCTGGGGCGGCCCGCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGCGGGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261Q</i>	GGCAGCTGGGGCGGCCAGCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGCTGGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261R</i>	GGCAGCTGGGGCGGCCCGCCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGGCGGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261S</i>	GGCAGCTGGGGCGGCAGCCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGGCTGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261T</i>	GGCAGCTGGGGCGGCACCCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGGGTGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_I261Y</i>	GGCAGCTGGGGCGGCTATCAGCCGCCGTGGTTTTATG / CATAAAACCACGGCGGCTGATAGCCGCCCCAGCTGCC
<i>AacSHC_G600C</i>	CCGTATTATACCGGCACCTGCTTCCCGGGCG / CGCCCGGGAAGCAGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600D</i>	CCGTATTATACCGGCACCGATTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAATCGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600E</i>	CCGTATTATACCGGCACCGAATTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAATTCGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600H</i>	CCGTATTATACCGGCACCCATTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAATGGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600I</i>	CCGTATTATACCGGCACCATTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAATGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600K</i>	CCGTATTATACCGGCACCAAATTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAATTTGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600M</i>	CCGTATTATACCGGCACCATGTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAACATGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600N</i>	CCGTATTATACCGGCACCAACTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAAGTTGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600P</i>	CCGTATTATACCGGCACCCCGTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAACGGGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600Q</i>	CCGTATTATACCGGCACCCAGTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAACTGGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600R</i>	CCGTATTATACCGGCACCCGCTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAAGCAGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600S</i>	CCGTATTATACCGGCACCTCGTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAACGAGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600T</i>	CCGTATTATACCGGCACCACTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAAGGTGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600V</i>	CCGTATTATACCGGCACCGTGTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAACACGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_G600Y</i>	CCGTATTATACCGGCACCTATTTTCCTCCGGGCG / CGCCCGGGAATAGGTGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_L607C</i>	CCCGGGCGATTTTTATTGCGGCTATAACCATG / CATGGTATAGCCGCAATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607D</i>	CCCGGGCGATTTTTATGATGGCTATAACCATG / CATGGTATAGCCATCATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607E</i>	CCCGGGCGATTTTTATGAAGGCTATAACCATG / CATGGTATAGCCTTCATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607H</i>	CCCGGGCGATTTTTATCATGGCTATAACCATG / CATGGTATAGCCATGATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607I</i>	CCCGGGCGATTTTTATATTGGCTATAACCATG / CATGGTATAGCCAATATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607K</i>	CCCGGGCGATTTTTATAAAGGCTATAACCATG /

	CATGGTATAGCCTTTATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607M</i>	CCCGGGCGATTTTTATATGGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCCATATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607N</i>	CCCGGGCGATTTTTATAACGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCGTTATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607P</i>	CCCGGGCGATTTTTATCCGGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCCGGATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607Q</i>	CCCGGGCGATTTTTATCAGGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCCTGATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607R</i>	CCCGGGCGATTTTTATCGCGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCGCGATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607T</i>	CCCGGGCGATTTTTATACCGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCGGTATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_L607V</i>	CCCGGGCGATTTTTATGTGGGCTATACCATG / CATGGTATAGCCACATAAAAATCGCCCCGGG
<i>AacSHC_Y609E</i>	CGATTTTTATCTGGGCGAAACCATGTATCGCC / GGCGATACATGGTTTCGCCCAGATAAAAATCG
<i>AacSHC_Y609M</i>	CGATTTTTATCTGGGCATGACCATGTATCGCC / GGCGATACATGGTCATGCCCAGATAAAAATCG
<i>AacSHC_Y609V</i>	CGATTTTTATCTGGGCGTGACCATGTATCGCC / GGCGATACATGGTCACGCCCAGATAAAAATCG
<i>AacSHC_S168Q</i>	CATTTATGAATTTGGCCAGTGGGCGCGCGGACC / GGTCGCGCGCGCCCACTGGCCAAATTCATAAATG
<i>AacSHC_S307C</i>	GGCTGGATGTTTCAGGCGTGATTAGCCCGGTG / CACCGGGCTAATGCACGCCTGAAACATCCAGCC
<i>AacSHC_S307T</i>	GGCTGGATGTTTCAGGCGACCATAGCCCGGTG / CACCGGGCTAATGGTCGCCTGAAACATCCAGCC
<i>AacSHC_Q366E</i>	GGCGGCTTTGCGTTTGAATTTGATAACG / CGTTATCAAATTCAAACGCAAAGCCGCC
<i>AacSHC_Y420F</i>	GGCTGGGGCGCGTTTGATGTGGATAACACC / GGTGTTATCCACATCAAACGCGCCCCAGCC
<i>AacSHC_T599A</i>	CCGTATTATACCGGCGCGGGGTTCCCGGGC / GCCCCGGAACCCCGCGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_T599I</i>	CCGTATTATACCGGCATTGGGTTCCCGGGC / GCCCCGGAACCCAATGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_T599L</i>	CCGTATTATACCGGCCTGGGGTTCCCGGGC / GCCCCGGAACCCAGGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_T599M</i>	CCGTATTATACCGGCATGGGGTTCCCGGGC / GCCCCGGAACCCCATGCCGGTATAATACGG
<i>AacSHC_T599V</i>	CCGTATTATACCGGCGTGGGGTTCCCGGGC / GCCCCGGAACCCACGCCGGTATAATACGG
<i>ZmoSHC1_Q221S</i>	CGATTTATAATTTTGCCAGCTGGGCGCGGGC / GCCCCGCGCCAGCTGGCAAATATAAATCG
<i>ZmoSHC1_T369C</i>	CTTGGATACAGGCCTGCAATAGTCCGGTATG / CATACCGGACTATTGCAGGCCTGTATCCAA
<i>ZmoSHC1_T369S</i>	CTTGGATACAGGCCAGCAATAGTCCGGTATG / CATACCGGACTATTGCTGGCCTGTATCCAA
<i>ZmoSHC1_E429Q</i>	GGTGGATGGGCATTTTCAGTATGCCAATG / ATTGGCATACTGAAATGCCCATCCACC
<i>ZmoSHC1_F486Y</i>	GGGGAGCCTATGATAAGGATAATAAC / GTTATTATCCTTATCATAGGCTCCCC
<i>ZmoSHC1_G667I</i>	GAATTCACCGGCACCATTTTCCCCGGTTATGGC / GCCATAACCGGGGAAAATGGTGCCGGTGAATTC
<i>ZmoSHC1_G667L</i>	GAATTCACCGGCACCCTGTTCCCCGGTTATGGC / GCCATAACCGGGGAACAGGGTGCCGGTGAATTC

<i>ZmoSHC1_G667V</i>	GAATTCACCGGCACCGTGTTCCCCGGTTATGGC / CCATAACCGGGGAACACGGTGCCGGTGAATTC
<i>ZmoSHC1_L700A</i>	CGGGCGTTTATGGCGCGTTATGATTTTTATCGG / CCGATAAAAATCATAACGCGCCATAAACGCCCG
<i>ZmoSHC1_L700Q</i>	CGGGCGTTTATGCAGCGTTATGATTTTTATCGG / CCGATAAAAATCATAACGCTGCATAAACGCCCG
<i>ZmoSHC1_Y702D</i>	GCGTTTATGCTGCGTGATGATTTTTATCGG / CCGATAAAAATCATCACGCGCAGCATAAACGC
<i>ZmoSHC1_Y702L</i>	GCGTTTATGCTGCGTCTGGATTTTTATCGG / CCGATAAAAATCCAGACGCGCAGCATAAACGC
<i>TelSHC_S171Q</i>	CCATTTATGAAATGAGCCAGTGGGCACGTAGC / GCTACGTGCCCACTGGCTCATTTCATAAATGG
<i>TelSHC_C312S</i>	CGTGTTACAGCCGAGCGTTAGTCCGGTTTGG / CCAAACCGGACTAACGCTCGGCTGAACACG
<i>TelSHC_C312T</i>	CGTGTTACAGCCGACCGTTAGTCCGGTTTGG / CCAAACCGGACTAACGGTTCGGCTGAACACG
<i>TelSHC_E371Q</i>	GGTGGTTGGGCATTTTCAGTTTGAAAATCGC / GCGATTTTCAAACCTGAAATGCCCAACCACC
<i>TelSHC_F425Y</i>	GGTGGCTGGGCAGCATATGATGTTGATAATGATCAG / CTGATCATTATCAACATCATATGCTGCCAGCCACC
<i>TelSHC_G609I</i>	GATTATTTTACCGGCACCATTTTCCGTGCC / GGCACGGAAAAATGGTGCCGGTAAAATAATC
<i>TelSHC_G609L</i>	GATTATTTTACCGGCACCCTGTTTCCGTGCC / GGCACGGAAACAGGGTGCCGGTAAAATAATC
<i>TelSHC_G609V</i>	GATTATTTTACCGGCACCGTGTTTCCGTGCC / GGCACGGAAACACGGTGCCGGTAAAATAATC
<i>TelSHC_L616A</i>	CCGTGCCATTTTTATGCGAAATACCAC / GTGGTATTTTCGCATAAAAATGGCACGG
<i>TelSHC_L616Q</i>	CCGTGCCATTTTTATCAGAAATACCAC / GTGGTATTTCTGATAAAAATGGCACGG
<i>TelSHC_Y618D</i>	GCCATTTTATCTGAAAGATCACTATTATCAGCAGC / GCTGCTGATAATAGTGATCTTTCAGATAAAAATGGC
<i>TelSHC_Y618L</i>	GCCATTTTATCTGAAACTGCACTATTATCAGCAGC / GCTGCTGATAATAGTGAGTTTCAGATAAAAATGGC

Tabelle 9: Liste der für die Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz von 5'- nach 3'-Ende
<i>AacSHC_In</i>	CGCTGAGCATTGTGATGAGCCGC
pET RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>TelSHC_In</i>	GATTGGCGTGGTATTCCGAG
<i>ZmoSHC1_In</i>	CCGTGTCTTTACCGTTATTGGC

6.1.4 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche SHC Plasmide verwendet. Der Schwerpunkt lag auf dem Arbeiten mit der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*), jedoch wurden auch SHCs aus *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC1* und *ZmoSHC2*), *Acetobacter pasteurianus* (*ApaSHC1*), *Bradyrhizobium japonicum* (*BjaSHC*), *Burkholderia ambifaria* (*BamSHC1* und *BamSHC2*), *Pelobacter carbinolicus* (*PcaSHC2*), *Rhodopseudomonas palustris* (*RpaSHC1*), *Streptomyces coelicolor* (*ScoSHC*), *Syntrophobacter fumaroxidans* (*SfuSHC1*), *Thermosynechococcus elongatus* (*TelSHC*) und *Teredinibacter turnerae* (*TtuSHC*) verwendet. Die NCBI Nummern der jeweiligen SHCs sind im Anhang in Tabelle A1 gelistet. Die *AacSHC* und *ZmoSHC1* Plasmide für das Wildtypenzym sowie einige in den Expressionsvektor pET-22b(+) klonierte Varianten wurden von Dr. Miriam Seitz, Dr. Stephan Hammer, Dr. Silke Bastian, Lisa Steiner, Svenja Diether und Andreas Schneider übernommen.^[124,162,174,208] Die anderen Plasmide der SHC Wildtypenzyme, außer die Zykase aus *Thermosynechococcus elongatus*, welche in pET-22b(+) vorlag, waren in pET-16b kloniert und wurden von Dr. Gabrielle Siedenburg zur Verfügung gestellt.^[132,161]

Alle verwendeten Plasmide sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Vektorkarten der *AacSHC*, *ZmoSHC1* und *TelSHC* Wildtypenzyme sind im Anhang (Abbildung A2-A4) dargestellt. Die Gen- sowie Aminosäuresequenzen der genutzten SHC Wildtypenzyminserts sind ebenfalls im Anhang enthalten.

Material und Methoden

Tabelle 10: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide.

ITB-Nummer	Vektor	Insert	Quelle
pITB1024	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> Wildtyp	S. C. Hammer
pITB1025	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> L36A	S. C. Hammer
pITB1026	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> L36W	S. C. Hammer
pITB5308	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> S168Q	Diese Arbeit
pITB1027	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> W169A	S. C. Hammer
pITB1291	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> W169G	S. Bastian
pITB1028	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261A	S. C. Hammer
pITB5290	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261C	Diese Arbeit
pITB5291	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261D	Diese Arbeit
pITB5292	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261E	Diese Arbeit
pITB1029	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261F	S. C. Hammer
pITB1030	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261G	S. C. Hammer
pITB5293	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261H	Diese Arbeit
pITB5294	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261K	Diese Arbeit
pITB1031	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261L	S. C. Hammer
pITB5295	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261M	Diese Arbeit
pITB5296	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261N	Diese Arbeit
pITB5297	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261AP	Diese Arbeit
pITB5298	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261Q	Diese Arbeit
pITB5299	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261R	Diese Arbeit
pITB5300	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261S	Diese Arbeit
pITB5301	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261T	Diese Arbeit
pITB1032	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261V	S. C. Hammer
pITB1033	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261W	S. C. Hammer
pITB5302	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> I261Y	Diese Arbeit
pITB1034	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> S307A	S. C. Hammer
pITB5469	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> S307C	A. Schneider
pITB1035	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> S307F	S. C. Hammer
pITB1292	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> S307G	S. Bastian
pITB5309	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> S307T	Diese Arbeit
pITB1036	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> W312A	S. C. Hammer
pITB1293	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> W312F	S. Bastian
pITB1294	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> W312G	S. Bastian
pITB1037	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> F365A	S. C. Hammer
pITB1038	pET-22b(+)	<i>AacSHC</i> F365C	S. C. Hammer

Material und Methoden

pITB1039	pET-22b(+)	<i>AacSHC F365G</i>	S. C. Hammer
pITB1040	pET-22b(+)	<i>AacSHC F365W</i>	S. C. Hammer
pITB1041	pET-22b(+)	<i>AacSHC Q366A</i>	S. C. Hammer
pITB5310	pET-22b(+)	<i>AacSHC Q366E</i>	Diese Arbeit
pITB1042	pET-22b(+)	<i>AacSHC Q366F</i>	S. C. Hammer
pITB1298	pET-22b(+)	<i>AacSHC Q366G</i>	S. Bastian
pITB1299	pET-22b(+)	<i>AacSHC Q366W</i>	S. Bastian
pITB1043	pET-22b(+)	<i>AacSHC D376C</i>	S. C. Hammer
pITB1044	pET-22b(+)	<i>AacSHC A419F</i>	S. C. Hammer
pITB1045	pET-22b(+)	<i>AacSHC A419G</i>	S. C. Hammer
pITB1300	pET-22b(+)	<i>AacSHC A419W</i>	S. Bastian
pITB1301	pET-22b(+)	<i>AacSHC A419Y</i>	S. Bastian
pITB1046	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420A</i>	S. C. Hammer
pITB1047	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420C</i>	S. C. Hammer
pITB5311	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F</i>	Diese Arbeit
pITB5314	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_G600I</i>	Diese Arbeit
pITB5313	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_G600L</i>	Diese Arbeit
pITB5312	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_G600V</i>	Diese Arbeit
pITB5315	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_L607A</i>	Diese Arbeit
pITB5316	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_L607Q</i>	Diese Arbeit
pITB5317	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_Y609D</i>	Diese Arbeit
pITB5318	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420F_Y609L</i>	Diese Arbeit
pITB1302	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420G</i>	S. Bastian
pITB1048	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y420W</i>	S. C. Hammer
pITB1049	pET-22b(+)	<i>AacSHC V448A</i>	S. C. Hammer
pITB1050	pET-22b(+)	<i>AacSHC V448F</i>	S. C. Hammer
pITB1303	pET-22b(+)	<i>AacSHC V448G</i>	S. Bastian
pITB1304	pET-22b(+)	<i>AacSHC V448W</i>	S. Bastian
pITB1051	pET-22b(+)	<i>AacSHC W489A</i>	S. C. Hammer
pITB1305	pET-22b(+)	<i>AacSHC W489F</i>	S. Bastian
pITB1306	pET-22b(+)	<i>AacSHC W489G</i>	S. Bastian
pITB1307	pET-22b(+)	<i>AacSHC G490A</i>	S. Bastian
pITB1308	pET-22b(+)	<i>AacSHC G490F</i>	S. Bastian
pITB1309	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y495G</i>	S. Bastian
pITB1310	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y495L</i>	S. Bastian
pITB1311	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y495W</i>	S. Bastian
pITB5303	pET-22b(+)	<i>AacSHC T599A</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

pITB5304	pET-22b(+)	<i>AacSHC T599I</i>	Diese Arbeit
pITB5305	pET-22b(+)	<i>AacSHC T599L</i>	Diese Arbeit
pITB5306	pET-22b(+)	<i>AacSHC T599M</i>	Diese Arbeit
pITB5307	pET-22b(+)	<i>AacSHC T599V</i>	Diese Arbeit
pITB1052	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600A</i>	S. C. Hammer
pITB5272	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600C</i>	Diese Arbeit
pITB5273	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600D</i>	Diese Arbeit
pITB5274	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600E</i>	Diese Arbeit
pITB1053	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600F</i>	S. C. Hammer
pITB5275	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600H</i>	Diese Arbeit
pITB5276	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600I</i>	Diese Arbeit
pITB5277	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600K</i>	Diese Arbeit
pITB1312	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600L</i>	S. Bastian
pITB5278	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600M</i>	Diese Arbeit
pITB5279	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600N</i>	Diese Arbeit
pITB5280	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600P</i>	Diese Arbeit
pITB5281	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600Q</i>	Diese Arbeit
pITB5282	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600R</i>	Diese Arbeit
pITB5283	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600S</i>	Diese Arbeit
pITB5284	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600T</i>	Diese Arbeit
pITB5285	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600V</i>	Diese Arbeit
pITB1313	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600W</i>	S. Bastian
pITB5286	pET-22b(+)	<i>AacSHC G600Y</i>	Diese Arbeit
pITB1054	pET-22b(+)	<i>AacSHC F601A</i>	S. C. Hammer
pITB1055	pET-22b(+)	<i>AacSHC F601W</i>	S. C. Hammer
pITB1314	pET-22b(+)	<i>AacSHC F601G</i>	S. Bastian
pITB1056	pET-22b(+)	<i>AacSHC F605A</i>	S. C. Hammer
pITB1057	pET-22b(+)	<i>AacSHC F605W</i>	S. C. Hammer
pITB1315	pET-22b(+)	<i>AacSHC F605G</i>	S. Bastian
pITB1058	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607A</i>	S. C. Hammer
pITB5259	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607C</i>	Diese Arbeit
pITB5260	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607D</i>	Diese Arbeit
pITB5261	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607E</i>	Diese Arbeit
pITB1059	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607F</i>	S. C. Hammer
pITB1316	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607G</i>	S. Bastian
pITB5262	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607H</i>	Diese Arbeit
pITB5263	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607I</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

pITB5264	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607K</i>	Diese Arbeit
pITB5265	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607M</i>	Diese Arbeit
pITB5266	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607N</i>	Diese Arbeit
pITB5267	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607P</i>	Diese Arbeit
pITB5268	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607Q</i>	Diese Arbeit
pITB5269	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607R</i>	Diese Arbeit
pITB5270	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607S</i>	Diese Arbeit
pITB5271	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607T</i>	Diese Arbeit
pITB5262	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607V</i>	Diese Arbeit
pITB1060	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607W</i>	S. C. Hammer
pITB5389	pET-22b(+)	<i>AacSHC L607Y</i>	S. Diether
pITB1061	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609A</i>	S. C. Hammer
pITB5454	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609C</i>	S. Diether
pITB5455	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609D</i>	S. Diether
pITB5287	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609E</i>	Diese Arbeit
pITB1317	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609F</i>	S. Bastian
pITB1318	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609G</i>	S. Bastian
pITB5456	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609H</i>	S. Diether
pITB5457	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609I</i>	S. Diether
pITB5458	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609K</i>	S. Diether
pITB1319	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609L</i>	S. Bastian
pITB5288	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609M</i>	Diese Arbeit
pITB5459	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609N</i>	S. Diether
pITB5460	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609P</i>	S. Diether
pITB5461	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609Q</i>	S. Diether
pITB5462	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609R</i>	S. Diether
pITB5463	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609S</i>	S. Diether
pITB5464	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609T</i>	A. Schneider
pITB5289	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609V</i>	Diese Arbeit
pITB1062	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y609W</i>	S. C. Hammer
pITB1320	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y612F</i>	S. Bastian
pITB1321	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y612G</i>	S. Bastian
pITB1322	pET-22b(+)	<i>AacSHC Y612W</i>	S. Bastian
pITB0170	pET-22b(+)	<i>TelSHC Wildtyp</i>	L. Steiner
pITB5319	pET-22b(+)	<i>TelSHC S171Q</i>	Diese Arbeit
pITB5320	pET-22b(+)	<i>TelSHC C312S</i>	Diese Arbeit
pITB5321	pET-22b(+)	<i>TelSHC C312T</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

pITB5322	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> E371Q	Diese Arbeit
pITB5323	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> F425Y	Diese Arbeit
pITB5326	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> G609I	Diese Arbeit
pITB5325	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> G609L	Diese Arbeit
pITB5324	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> G609V	Diese Arbeit
pITB5327	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> L616A	Diese Arbeit
pITB5328	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> L616Q	Diese Arbeit
pITB5329	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> Y618D	Diese Arbeit
pITB5330	pET-22b(+)	<i>TelSHC</i> Y618L	Diese Arbeit
pITB0280	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> Wildtyp	M. Seitz
pITB5331	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> Q221S	Diese Arbeit
pITB5332	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> T369C	Diese Arbeit
pITB5333	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> T369S	Diese Arbeit
pITB5334	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> E429Q	Diese Arbeit
pITB1083	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> D439A	S. C. Hammer
pITB5335	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> F486Y	Diese Arbeit
pITB5338	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> G667I	Diese Arbeit
pITB5337	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> G667L	Diese Arbeit
pITB5336	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> G667V	Diese Arbeit
pITB5339	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> L700A	Diese Arbeit
pITB5340	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> L700Q	Diese Arbeit
pITB5341	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> Y702D	Diese Arbeit
pITB5342	pET-22b(+)	<i>ZmoSHC1</i> Y702L	Diese Arbeit
pITB0312	pET-16b	<i>ApaSHC1</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0318	pET-16b	<i>BamSHC1</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0319	pET-16b	<i>BamSHC2</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0317	pET-16b	<i>BjaSHC</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0313	pET-16b	<i>PcaSHC2</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0314	pET-16b	<i>RpaSHC1</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0315	pET-16b	<i>ScoSHC</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0316	pET-16b	<i>SfuSHC1</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0320	pET-16b	<i>TtuSHC</i> Wildtyp	G. Siedenburg
pITB0282	pET-16b	<i>ZmoSHC2</i> Wildtyp	M. Seitz

6.1.5 Mikroorganismen

Für die Plasmidamplifikation wurde standardmäßig *E. coli* DH5 α verwendet, da dieser *E. coli*-Stamm eine hohe Transformationseffizienz gewährleistet. Dementgegen ist der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) für die heterologe Genexpression optimiert und wurde somit für die Proteinproduktion verwendet. Beide genetisch veränderten *E. coli*-Stämme sind der biologischen Sicherheitsstufe S1 zugeordnet.

6.1.6 Wachstumsmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Als Kulturmedien wurden LB-Medium (*lysogeny broth*; 10 g L⁻¹ Trypton, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g L⁻¹ NaCl, pH 7,0 mit 10%iger NaOH-Lösung eingestellt) und TB-Medium (*terrific broth*, 12 g L⁻¹ Trypton, 24 g L⁻¹ Hefeextrakt, 4 g L⁻¹ Glycerin) verwendet. Dabei stellt TB-Medium ein Vollmedium dar, welches eine höhere Zelldichte als LB-Medium ermöglicht und somit die Ausbeute bei einer Proteinpräparation erhöht. Die Sterilisation der Medien erfolgte für 30 min bei 121 °C und 1,5 bar. Der zum TB-Medium gehörende Phosphatpuffer (0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄) wurde separat angesetzt, autoklaviert und erst kurz vor der Inokulation in einem Verhältnis von 1:10 zum Kulturmedium hinzugefügt.

Für LB-Agar-Platten wurden zum LB-Medium 15 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wird angewendet, um gezielt einzelne Aminosäuren eines Proteins zu substituieren. Dafür wird die DNA-Sequenz des Gens mittels der sogenannten *Ligation-During-Amplification*-Methode (auch *QuikChange*TM) verändert. Bei dieser Methode werden durch sequenzspezifische Primer, welche die jeweilige Änderung im Sequenzraum beinhalten, gezielt Nukleotide auf der DNA-Ebene substituiert, um anschließend eine Variante des gewählten Enzymes zu erhalten. Zur Amplifizierung der Plasmid-DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) genutzt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist in Tabelle 11 aufgeführt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 12 gelistet.

Tabelle 11: Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Reagenz	Volumen / μL	Endkonzentration
ddH ₂ O	38,95	
10 mM dNTPs	1,25	250 μM pro dNTP
Templat	2,00	0,5 – 5 ng μL^{-1}
<i>PfuUltra</i> II Fusion Buffer (10x)	5,00	1x
<i>forward</i> Primer	1,00	0,2 μM
<i>reverse</i> Primer	1,00	0,2 μM
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS Polymerase	0,80	

Tabelle 12: Standard-PCR-Protokoll. Nach dem Ende der PCR wurde das PCR-Produkt auf 8 °C gekühlt und bis zur Entnahme auf dieser Temperatur gehalten.

Schritte	Temperatur / °C	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 s	22
Hybridisierung	55	1 min	
Elongation	72	4 min (30 s kb^{-1})	
Finale Elongation	72	7 min	1

Nach der PCR erfolgte ein Restriktionsverdau der methylierten, parentalen Templat-DNA. Hierfür wurde 1 μL *DpnI* zu jedem PCR-Produkt gegeben und das Gemisch über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.2.2 Reinigung der PCR-Fragmente

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels des *DNA Clean & Concentrator*TM Kits von Zymo Research. Dafür wurden 50 μL PCR-Produkt mit 250 μL *DNA Binding Buffer* versetzt und invertiert. Anschließend wurde das Gemisch auf die *Zymo-Spin*TM VI Column transferiert, zentrifugiert (1 min, 12000 rpm), der Durchfluss erneut aufgetragen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Durchfluss wurde verworfen und die DNA auf der Säule mittels 200 μL *DNA Wash Buffer* gewaschen (Zentrifugation 1 min, 12000 rpm). Der Waschschrift wurde wiederholt, der Durchfluss verworfen und die Säule nochmals zentrifugiert (2 min, 12000 rpm). Für die Elution wurden 10 μL ddH₂O auf die Säule aufgetragen, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (1 min, 12000 rpm). Die gereinigten PCR-Produkte wurden entweder bei -18 °C gelagert oder direkt in *E. coli* DH5a transformiert.

6.2.3 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

5 mL LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH5 α oder *E. coli* BL21 (DE3) inokuliert. Die Vorkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 100 mL LB-Medium mittels der Vorkultur inokuliert, sodass die OD₆₀₀ von 0,05 gegeben war. Die Hauptkulturen wurden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Kulturen wurden in 50 mL Falcons überführt und zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 mL TfbI-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂·H₂O, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C) und der Überstand wieder verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 mL TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂·H₂O, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Jeweils 25 μ L der chemisch kompetenten Zellen wurden anschließend in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

6.2.4 Hitzeschocktransformation in *E. coli*

Für die Hitzeschocktransformation wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 α - und BL21 (DE)-Zellen verwendet. Die 25 μ L Zellaliquotes wurden auf Eis aufgetaut und anschließend bei einer Retransformation mit 1 μ L Plasmid-DNA bzw. bei Einführung einer neuen Mutation mittels *QuickChange*TM mit 10 μ L Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock (42 °C, 45 s) und eine erneute Inkubation (5 min) auf Eis. Die anschließende Zellregeneration wurde unter Zugabe von 500 μ L LB-Medium und Inkubation bei 37 °C und 180 rpm durchgeführt. Nach der Zellregeneration wurden 150 μ L des Ansatzes auf einer Agarplatte ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (5000 rpm, 2 min), der Überstand verworfen, das Zellpellet im Restüberstand resuspendiert und auch ausplattiert. Bei der Retransformation wurde nicht pelletiert, sondern direkt 150 μ L des Ansatzes entnommen und ausplattiert. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.2.5 Plasmidpräparation und DNA-Sequenzierung

Für die Präparation von Plasmiden wurde das ZyppyTM Plasmid Miniprep Kit von Zymo Research verwendet. Eine 5 mL Übernachtkultur wurde pelletiert (12000 rpm, 2 min) und anschließend in 600 µL ddH₂O resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µL *7x Lysis Buffer* wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß mehrfach invertiert und anschließend mit 350 µL *Neutralization Buffer* versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde erneut invertiert und die Lösung zentrifugiert (5 min, 12000 rpm). Der klare Überstand wurde auf eine Zymo-SpinTM IIN Säule transferiert und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm). Der Durchfluss wurde verworfen und die Plasmid-DNA zunächst mit 200 µL *Endo-Wash Buffer* (1 min, 12000 rpm) und anschließend mit 400 µL *ZyppyTM Wash Buffer* (1 min, 12000 rpm) gewaschen. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule erneut zentrifugiert (2 min, 12000 rpm), um das restliche Ethanol zu entfernen. Die Säule wurde auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und die Plasmid-DNA mit 30 µL ddH₂O von der Säule eluiert (1 min, 12000 rpm). Die Plasmid-DNA wurde zur Sequenzüberprüfung der Firma GATC Biotech AG zugesandt. Hierzu wurde mittels des *nanodrops* die DNA-Konzentration bestimmt und 600 ng Plasmid-DNA zur Sequenzierung geschickt.

6.2.6 Wachstumsbedingungen und Glycerin-Dauerkulturen

Zur DNA-Amplifikation wurde *E. coli* DH5 α in LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Für die heterologe Genexpression in *E. coli* BL21 (DE3) wurde die Kultivierung in TB-Medium durchgeführt und diesem für eine verbesserte Autoinduktion zusätzlich D(+)-Lactose Monohydrat (12,5 g L⁻¹) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte für 18-22 h bei 37 °C und 180 rpm. LB-Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Den flüssigen sowie festen Nährmedien wurde jeweils ein Resistenzmarker ($c_{\text{Ende}}(\text{Ampicillin}) = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) hinzugefügt.

Zur Herstellung der Dauerkulturen wurde eine Transformation in *E. coli* BL21 (DE) des jeweiligen Konstrukts vorgenommen, eine Vorkultur mittels einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden anschließend im Verhältnis 1:1 mit einer sterilen Glycerinlösung (50 % Glycerin (v/v) und 50 % LB-Medium (v/v)) versetzt, durchmischt, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 Proteinproduktion

Die heterologe Genexpression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3). Die Proteinproduktion wurde entweder in 96er *deep well plates* oder in Erlenmeyerkolben durchgeführt; beide Vorgehensweisen werden im Nachfolgenden beschrieben.

Für die Proteinproduktion in *deep well plates* wurden 500 μL TB-Medium (10 % KP_i -Puffer) mit Resistenzmarker ($c_{\text{Ende}}(\text{Ampicillin}) = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) je *well* vorgelegt und diese aus Glycerin-Dauerkulturen inokuliert. Anschließend wurden die Platten mit einer atmungsaktiven Folie (Breathe-EASIERTM (6"x3,25") von Diversified Biotech) verschlossen und bei 37 °C und 350 rpm für 20 h inkubiert. Die Hauptkultur (1050 μL TB-Medium mit 10 % KP_i -Puffer, Resistenzmarker ($c_{\text{Ende}}(\text{Ampicillin}) = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) und 12,5 g L^{-1} D(+)-Lactose Monohydrat) wurde mit 50 μL der Vorkultur inokuliert, mit atmungsaktiver Folie abgedeckt und für 24 h bei 37 °C und 350 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde anschließend entweder bei -18 °C gelagert oder direkt in Biokonversionen (Kapitel 6.6.1) eingesetzt.

Für die Proteinproduktion im größeren Maßstab wurden 5 mL LB-Medium mit einem Resistenzmarker ($c_{\text{Ende}}(\text{Ampicillin}) = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) versetzt und anschließend mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Expressionskultur, bestehend aus TB-Medium mit 10 % KP_i -Puffer, wurde anschließend mit dem Resistenzmarker ($c_{\text{Ende}}(\text{Ampicillin}) = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) versetzt und mit der Vorkultur (1 % (v/v)) inokuliert. Die Proteinproduktion erfolgte wieder unter Autoinduktion, sodass der Expressionskultur D(+)-Lactose Monohydrat (12,5 g L^{-1}) hinzugefügt wurde. Die Expressionskulturen wurden bei 37 °C, 180 rpm für 18-22 h inkubiert und die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation (25 min, 7500 rpm, 4 °C). Die Zellpellets wurden anschließend entweder bei -18 °C gelagert, direkt in Biokonversionen (Kapitel 6.6.1) eingesetzt oder gereinigt (Kapitel 6.3.2).

6.3.2 Proteinreinigung

Das erhaltene Zellpellet (Kapitel 6.3.1) wurde in kaltem Wasser aufgetaut und in Lysepuffer (3 mL g⁻¹ Zellpellet; 200 mM Citrat, 0,1 mM EDTA, pH 6,0) resuspendiert. Zum Abbau der DNA wurde zudem zusätzliche DNase I (5 µL g⁻¹ Zellpellet) und als Protease-Inhibitor PMSF in Isopropanol ($c_{\text{Ende}} = 1 \mu\text{M}$) hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend mittels Ultraschall (Ultraschalllanze Sonifier S250A von Branson Ultrasonics). Nach dem Aufschluss wurde zentrifugiert (20 min, 8000 rpm, 4 °C), der Überstand verworfen und somit die löslichen Proteine abgetrennt. Die Zelltrümmer wurden anschließend in Solubilisierungspuffer (60 mM Citrat, 1 % (w/v) Detergenz, pH 6,0) resuspendiert und über Nacht in einem Überkopfmischer (Intelli-Mixer RM-2M von ELMI; Programm 90, 30 rpm) bei 4 °C inkubiert, um die Membran-assoziierten Proteine aus der Membran herauszulösen. Anschließend wurden die *E. coli* Membranproteine durch einen Hitzeschock (*AacSHC* und *TelSHC*: 50 °C, 30 min) präzipitiert und mittels Zentrifugation (1 h, 23000 rpm, 10 °C) abgetrennt. Die Enzympräparation wurde mittels Ionenaustauscher-Chromatographie (IEX) gereinigt.

Für die Reinigung der SHCs mittels IEX wurde zunächst die Enzympräparation mit ddH₂O 1:5 verdünnt, um eine Detergenzkonzentration von 0,2 % (w/v) und eine Citratkonzentration von 12 mM zu gewährleisten. Als Säulenmaterial wurde Diethylaminoethyl-Sephacel[®] von Sigma Aldrich verwendet, welches einen schwachen Anionen-Austauscher darstellt^[209]. Nach dem Auftragen der Enzympräparation auf die Anionenaustauschersäule wurde die Matrix mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Detergenz, pH 6,0) gewaschen, um unspezifisch gebundene Verunreinigung zu entfernen. Anschließend wurde die *AacSHC* bzw. *TelSHC* mit 2 Säulenvolumen Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Detergenz, 200 mM NaCl, pH 6,0) von der Matrix eluiert und die Säule mit 5 Säulenvolumen Regenerationspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Detergenz, 500 mM NaCl, pH 6,0) regeneriert.

Es wurden Proben für die SDS-PAGE (Kapitel 6.3.3) aus dem Durchfluss der Auftragung, dem Waschschrift und der Elutionsfraktion genommen, um die Reinigung zu kontrollieren. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktion wurde mittels Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Kapitel 6.3.4) bestimmt. Die gereinigten Enzympräparationen wurden direkt in Biokonversionen (Kapitel 6.6.1) eingesetzt oder bei 4 °C gelagert.

6.3.3 SDS-PAGE

Während der Proteinproduktion und –reinigung wurden Proben für die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) genommen. Für SDS-Proben direkt aus der Kultur wurde die OD₆₀₀ auf 0,25 eingestellt, um das Expressionslevel der Varianten miteinander vergleichen zu können und Unterschiede aufgrund von unterschiedlichem Zellwachstum zu vermeiden. Die SDS-Proben aus der IEX-Reinigung wurden ohne weitere Vorbehandlung mit SDS-Probenpuffer (2 mL 1 M Tris-HCl pH 6,8, 190 mg MgCl₂, 1 mL Glycerin, 0,8 g SDS, 2 mg Bromphenolblau, 310 mg DTT, aufgefüllt auf 20 mL mit ddH₂O) versetzt. Alle Proben wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend für 10 min bei 95 °C erhitzt. Für die Elektrophorese wurden Fertiggele mit einem Acrylamidanteil von 12 % (ExpressPlusTM PAGE Gel, 12 %, 12 wells von GenScript[®]) verwendet.

Die SDS-Gele wurden vertikal in die Elektrophorese-Apparatur (Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell von Bio-Rad) eingebaut und die Laufkammer mit Laufpuffer (Tris-MOPS-SDS Running Buffer von GenScript[®]) aufgefüllt. Je nach Probenkonzentration wurden 10 bis 20 µL der jeweiligen Probe auf das Gel aufgetragen. Zum Vergleich wurden jeweils 7 µL eines Molekulargewichtsstandards (PageRulerTM, Prestained Protein Ladder 10-1801 kDa, #26616 von Thermo Scientific) mit auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V für 40 min durchgeführt. Die Visualisierung aller Proteinbanden erfolgte unter Inkubation mittels Färbereagenz (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 10 % Essigsäure, 30 % Ethanol, 60 % dH₂O). Anschließend wurden die SDS-Gele in Entfärbereagenz (10 % Essigsäure, 30 % Ethanol, 60 % dH₂O) inkubiert, um den ungebundenen Farbstoff zu entfernen.

6.3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte durch Kolorimetrie mittels eines Bradfordreagenzes (Bradford Ultra Lösung von Expedeon). Dazu wurden jeweils 150 µL des Bradfordreagenzes in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit 10 µL einer 1:10 Verdünnung der erhaltenen Enzymlösung versetzt. Für die Regressionsgerade wurden BSA-Verdünnungen mit 0,0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 und 1,0 mg mL⁻¹ BSA hergestellt und jeweils 10 µL zu 150 µL des Bradfordreagenzes gegeben. Die Durchmischung wurde durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gewährleistet. Die photometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Die Konzentrationen wurden anschließend anhand der gemessenen Absorption mittels einer linearen Regression bestimmt.

6.4 Chemisch-analytische Methoden

6.4.1 Gaschromatographie

Es wurde eine Agilent 7890A GC/MS (Santa Clara, USA) verwendet. Diese verfügte über einen Flammenionisations- und einen massenselektiven Detektor (Agilent 5975C inert MSD, Santa Clara, USA) sowie einen Autosampler (Agilent, 7693A ALS). Die injizierte Analyseprobe wurde direkt nach der Trennung über die Kapillarsäule (DB5, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, $T_{\max} = 320\text{ °C}$, Agilent, Santa Clara, USA) geteilt und gelangte auf diesem Wege gleichzeitig in die beiden unterschiedlichen Detektorsysteme. Dabei diente Helium als Trägergas. Die Ionisation erfolgte hierbei mittels Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Für die Experimente mit Farnesol als Substrat wurde eine Hochtemperaturphase in der Kapillarsäule benötigt. Da die Transferlines des GC/MS-Systems nicht für solch hohe Temperaturen ausgelegt sind, wurde hierbei eine GC-2010 Plus Shimadzu (Kyōto, JPN) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), einem Autosampler (Shimadzu, AOC-20i Auto-Injector) und einer dazu passenden Hochtemperaturkapillarsäule (ZB-1HT InfernoTM, 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, $T_{\max} = 430\text{ °C}$, Phenomenex, DEU) verwendet. Bei dem FID-System diente Wasserstoff als Trägergas. Als interner Standard wurde bei jeder Extraktion der analytischen Biotransformationen Phenylhexan mitgeführt.

Auf der GC/MS wurde standardmäßig die Methode mit dem nachfolgenden Temperaturprogramm verwendet: 100 °C mit einer Haltezeit von 3 min, erhitzen auf 250 °C mit 25 °C min⁻¹, erhitzen auf 310 °C mit 30 °C min⁻¹ und einer Haltezeit von 1 min. Für das Prima-Facie Assay konnte die Methode maßgeblich für die Substrate **15** und **36** verkürzt werden, sodass dabei das folgende Temperaturprogramm verwendet wurde: 150 °C mit einer Haltezeit von 2 min, erhitzen auf 250 °C mit 40 °C min⁻¹, erhitzen auf 310 °C mit 110 °C min⁻¹ und einer Haltezeit von 1 min. Die Inlettemperatur betrug 250 °C, das Injektionsvolumen 1 µL, das Splitverhältnis 5:1 und die FID-Temperatur 320 °C.

Die gaschromatographische Trennung der Produkte der potentiellen bimolekularen Reaktion erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm: 100 °C mit einer Haltezeit von 2 min, erhitzen auf 245 °C mit 10 °C min⁻¹, erhitzen auf 380 °C mit 40 °C min⁻¹ und einer Haltezeit von 4 min. Die Inlettemperatur betrug 275 °C, das Injektionsvolumen 1 µL, das Splitverhältnis 5:1 und die FID-Temperatur 400 °C.

6.4.2 Kernresonanzspektroskopie

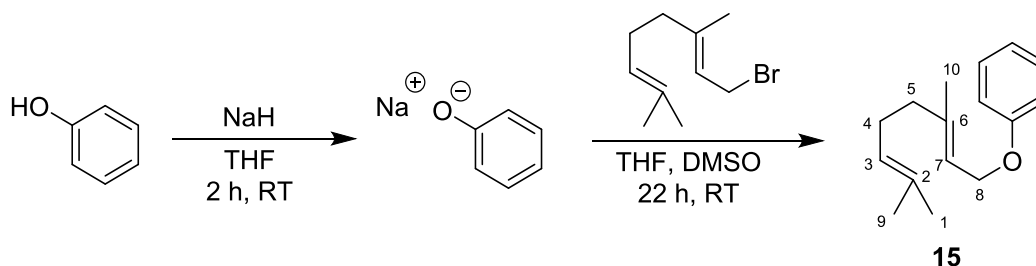
Die synthetisierten Moleküle wurden mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Dabei wurden die jeweiligen Analyten mittels eines Bruker Avance 500 Spektrometers bei 500,15 MHz und 125,76 MHz vermessen. Die chemischen Verschiebungen δ , die aus der Mitte des Kopplungsmusters abgelesen wurden, sind in *parts per million* (ppm) angegeben. Als interner Standard wurde das Resonanzsignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels verwendet (CDCl_3 , ^1H : $\delta = 7,26$ ppm, ^{13}C : $\delta = 77,16$ ppm). Die angegebenen Daten sind phänomenologisch, dies bedeutet, dass sie der Erscheinung des Signals und nicht dessen zu erwartender Multiplizität entsprechen. Im Nachfolgenden werden die verwendeten Abkürzungen erläutert: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplett, td = Triplett von Dublett und bs = breites Signal. Zur sicheren Signalzuordnung und vollständigen Strukturaufklärung wurden zudem immer 2D-NMR-Spektren aufgenommen. So wurden für die Strukturaufklärung $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- (*Correlation Spectroscopy*), $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC- (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC- (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy*)-Experimente durchgeführt.

6.5 Chemische Synthesen

6.5.1 Synthese von Geranylphenylether und seiner Derivaten

Die nachfolgenden Synthesen des Geranylphenylethers **15** und seiner Derivaten **32-36** wurden nach der Vorschrift von Dominicus durchgeführt.^[157]

Geranylphenylether **15**



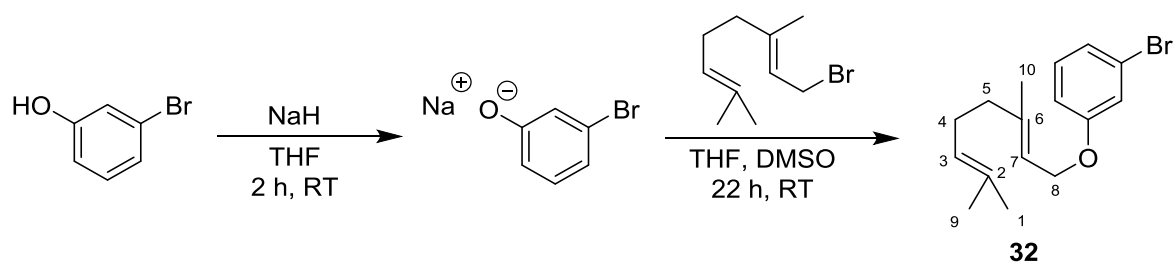
Es wurde Natriumhydrid (60%ige Dispersion, 0,32 g, 8,0 mmol, 1,2 Äq.) in abs. THF (20 mL) vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus Phenol (0,63 g, 6,7 mmol, 1,0 Äq.) in abs. THF (5 mL) in einem Zeitraum von 5 min hinzugegeben. Dabei wurde eine Gasentwicklung beobachtet. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus 96 % Geranylbromid (1,25 mL, 6,0 mmol, 0,8 Äq.) in abs. DMSO (5 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben und die Mischung über 20 h gerührt.

Zur Reaktionsterminierung wurde die Reaktionslösung mit Eiswasser hydrolysiert und drei Mal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Dichlormethan 5:1) gereinigt. Es wurde der Geranylphenylether **15** (1,08 g, 4,69 mmol, 78 % Ausbeute) als gelbliche Flüssigkeit erhalten. $R_f = 0,4$ (Cyclohexan:Dichlormethan 5:1).

GC/MS [EI]: $m_z^{-1} = 230,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,25\text{-}7,29$ (m, 2H, H^{ar}), 6,91-6,95 (m, 3H, H^{ar}), 5,49 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 5,09 (t, $^3J = 6,2$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(3)}$), 4,54 (d, $^3J = 6,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,06-2,14 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(4/5)}$), 1,73 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,68 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 1,61 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 158,87$ ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}$), 141,07 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 131,80 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 129,39 (C^{arH}), 123,83 ($\text{C}^{(3)\text{H}}$), 120,56 (C^{arH}), 119,59 ($\text{C}^{(7)\text{H}}$), 114,69 (C^{arH}), 64,75 ($\text{C}^{(8)\text{H}_2}$), 39,56 ($\text{C}^{(5)\text{H}_2}$), 26,31 ($\text{C}^{(4)\text{H}_2}$), 25,69 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 17,70 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_2}$), 16,65 ($\text{C}^{(10)\text{H}_3}$) ppm.

Geranyl-3-bromphenylether **32**

Es wurde Natriumhydrid (60%ige Dispersion, 0,32 g, 8,0 mmol, 1,2 Äq.) in abs. THF (20 mL) vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus 3-Bromphenol (0,71 mL, 6,7 mmol, 1,0 Äq.) in abs. THF (5 mL) in einem Zeitraum von 5 min hinzugegeben. Dabei wurde eine Gasentwicklung beobachtet. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus 96 % Geranylbromid (1,25 mL, 6,0 mmol, 0,8 Äq.) in abs. DMSO (5 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben und die Mischung über 20 h gerührt.

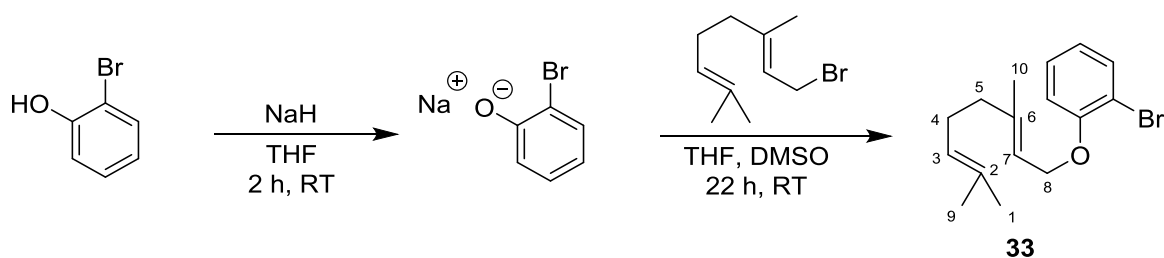
Zur Reaktionsterminierung wurde die Reaktionslösung mit Eiswasser hydrolysiert und drei Mal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Dichlormethan 7:1 \rightarrow 5:1) gereinigt. Es wurde der Geranyl-3-bromphenylether **32** (1,10 g, 3,59 mmol, 60 % Ausbeute) als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

$R_f = 0,4$ (Cyclohexan:Dichlormethan 5:1).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 308,0$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,12$ (t, $^3J = 8,3$ Hz, 1H, H^{ar}), 7,05-7,07 (m, 2H, H^{ar}), 6,84 (dt, $J = 8,0$ Hz, 1,1 Hz, 1H, H^{ar}), 5,46 (t, $^3J = 6,6$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 5,09 (t, $^3J = 6,3$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(3)}$), 4,51 (d, $^3J = 6,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,06-2,15 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(4/5)}$), 1,73 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,68 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 1,60 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 159,67$ ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}$), 141,72 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 131,88 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 130,46 (C^{ar}), 123,72 ($\text{C}^{(3)\text{H}}$), 123,64 (C^{ar}), 122,74 ($\text{C}^{\text{ar, quart-Br}}$), 118,96 ($\text{C}^{(7)\text{H}}$), 117,91 (C^{ar}), 113,83 (C^{ar}), 65,10 ($\text{C}^{(8)\text{H}_2}$), 39,53 ($\text{C}^{(5)\text{H}_2}$), 26,27 ($\text{C}^{(4)\text{H}_2}$), 25,68 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 17,70 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 16,68 ($\text{C}^{(10)\text{H}_3}$) ppm.

Geranyl-2-bromphenylether **33**

Es wurde Natriumhydrid (60%ige Dispersion, 0,32 g, 8,0 mmol, 1,2 Äq.) in abs. THF (20 mL) vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus 2-Bromphenol (0,77 mL, 6,7 mmol, 1,0 Äq.) in abs. THF (5 mL) in einem Zeitraum von 5 min hinzugegeben. Dabei wurde eine Gasentwicklung beobachtet. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus 96 % Geranyl bromid (1,25 mL, 6,0 mmol, 0,8 Äq.) in abs. DMSO (5 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben und die Mischung über 20 h gerührt.

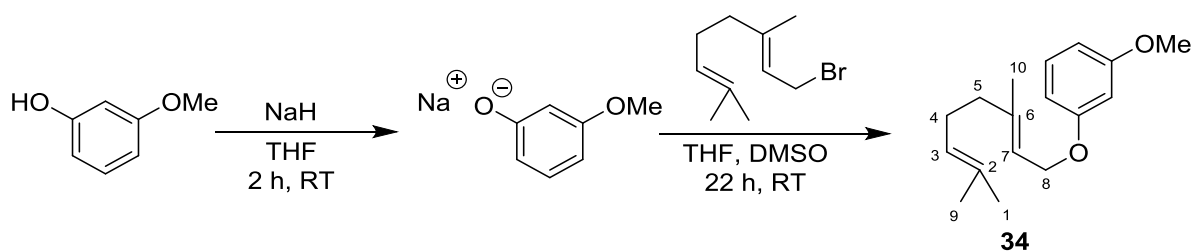
Zur Reaktionsterminierung wurde die Reaktionslösung mit Eiswasser hydrolysiert und drei Mal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Dichlormethan 7:1 \rightarrow 5:1) gereinigt. Es wurde der Geranyl-2-bromphenylether **33** (1,36 g, 4,41 mmol, 74 % Ausbeute) als farblose, leicht trübe Flüssigkeit erhalten.

$R_f = 0,38$ (Cyclohexan:Dichlormethan 5:1).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 308,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,53$ (dd, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,4$ Hz, 1H, H^{ar}), 7,23 (t, $^3J = 7,9$ Hz, 1H, H^{ar}), 6,89 (dd, $^3J = 8,2$ Hz, $^4J = 4,0$ Hz, 1,1 Hz, 1H, H^{ar}), 6,81 (td, $^3J = 7,8$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz 1H, H^{ar}), 5,49 (t, $^3J = 6,1$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 5,08 (t, $^3J = 6,8$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(3)}$), 4,62 (d, $^3J = 6,3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,07-2,13 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(4/5)}$), 1,73 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,67 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 1,60 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 155,25$ ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}$), 141,13 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 133,35 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 131,81 (C^{ar}), 128,29 ($\text{C}^{(3)\text{H}}$), 123,75 (C^{ar}), 121,74 ($\text{C}^{\text{ar, quart-Br}}$), 119,35 ($\text{C}^{(7)\text{H}}$), 113,84 (C^{ar}), 112,44 (C^{ar}), 66,22 ($\text{C}^{(8)\text{H}_2}$), 39,49 ($\text{C}^{(5)\text{H}_2}$), 26,25 ($\text{C}^{(4)\text{H}_2}$), 25,68 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 17,71 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 16,74 ($\text{C}^{(10)\text{H}_3}$) ppm.

Geranyl-3-methoxyphenylether **34**

Es wurde Natriumhydrid (60%ige Dispersion, 0,32 g, 8,0 mmol, 1,2 Äq.) in abs. THF (20 mL) vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus 3-Methoxyphenol (0,74 mL, 6,7 mmol, 1,0 Äq.) in abs. THF (5 mL) in einem Zeitraum von 5 min hinzugegossen. Dabei wurde eine Gasentwicklung beobachtet. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus 96 % Geranyl bromid (1,25 mL, 6,0 mmol, 0,8 Äq.) in abs. DMSO (5 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben und die Mischung über 20 h gerührt.

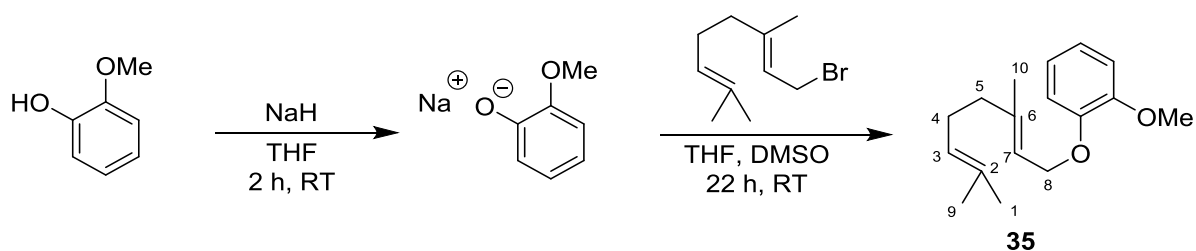
Zur Reaktionsterminierung wurde die Reaktionslösung mit Eiswasser hydrolysiert und drei Mal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Dichlormethan 7:1 \rightarrow 5:1) gereinigt. Es wurde der Geranyl-3-methoxyphenylether **34** (0,99 g, 3,81 mmol, 64 % Ausbeute) als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten.

$R_f = 0,33$ (Cyclohexan:Dichlormethan 2:1).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 260,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,17$ (t, $^3J = 7,9$ Hz, 1H, H^{ar}), 6,49-6,53 (m, 3H, H^{ar}), 5,49 (t, $^3J = 6,3$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 5,10 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(3)}$), 4,52 (d, $^3J = 6,5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 3,78 (s, 3H, OCH_3), 2,07-2,16 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(4/5)}$), 1,73 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,68 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 1,61 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 160,80$ ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}-\text{OMe}$), 160,16 ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}$), 141,19 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 131,80 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 129,80 (C^{ar}), 123,82 ($\text{C}^{(3)}\text{H}$), 119,46 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 106,85 (C^{ar}), 106,24 (C^{ar}), 101,16 (C^{ar}), 64,87 ($\text{C}^{(8)}\text{H}_2$), 55,24 (OCH_3), 39,56 ($\text{C}^{(5)}\text{H}_2$), 26,32 ($\text{C}^{(4)}\text{H}_2$), 25,67 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 17,69 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 16,65 ($\text{C}^{(10)}\text{H}_3$) ppm.

Geranyl-2-methoxyphenylether **35**

Es wurde Natriumhydrid (60%ige Dispersion, 0,32 g, 8,0 mmol, 1,2 Äq.) in abs. THF (20 mL) vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus 2-Methoxyphenol (0,74 mL, 6,7 mmol, 1,0 Äq.) in abs. THF (5 mL) in einem Zeitraum von 5 min hinzugegossen. Dabei wurde eine Gasentwicklung beobachtet. Nach 2,5 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus 96 % Geranylbromid (1,25 mL, 6,0 mmol, 0,8 Äq.) in abs. DMSO (5 mL) innerhalb von 5 min hinzugegeben und die Mischung über 20 h gerührt.

Zur Reaktionsterminierung wurde die Reaktionslösung mit Eiswasser hydrolysiert und drei Mal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Dichlormethan 5:1) gereinigt. Es wurde der Geranyl-2-methoxyphenylether **35** (1,09 g, 4,19 mmol, 70 % Ausbeute) als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten.

$R_f = 0,4$ (Cyclohexan:Dichlormethan 1:1).

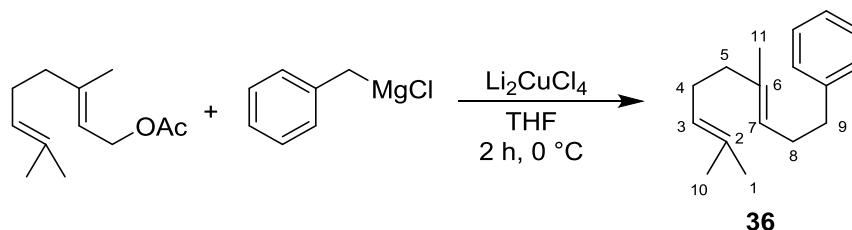
GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 260,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 6.87\text{-}6.91$ (m, 4H, H^{ar}), 5,52 (dt, $^3J = 6,3$ Hz, $^4J = 1,0$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 5,08 (dt, $^3J = 6,7$ Hz, $^4J = 1,0$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(3)}$), 4,62 (d, $^3J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 2,04-2,13 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(4/5)}$), 1,72 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,67 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 1,59 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 149,54$ ($\text{C}^{\text{ar, quart}}\text{-OMe}$), 148,29 ($\text{C}^{\text{ar, quart}}\text{-O}$), 140,41 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 131,72 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 123,90 ($\text{C}^{(3)}\text{H}$), 120,91 (C^{ar}), 120,73 (C^{ar}), 119,96 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 113,42 (C^{ar}), 111,59 (C^{ar}), 65,87 ($\text{C}^{(8)}\text{H}_2$), 55,84 (OCH_3), 39,56 ($\text{C}^{(5)}\text{H}_2$), 26,29 ($\text{C}^{(4)}\text{H}_2$), 25,67 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 17,69 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 16,66 ($\text{C}^{(10)}\text{H}_3$) ppm.

6.5.2 Synthese von (*E*)-(4,8-Dimethylnona-3,7-dien-1-yl)benzen

(*E*)-(4,8-Dimethylnona-3,7-dien-1-yl)benzen **36**



Die Synthese erfolgte nach Surendra *et al.*^[210] Dazu wurde Geranylacetat (1,51 mL, 7,0 mmol, 1,0 Äq.) in abs. THF (10 mL) bei 0 °C tropfenweise mit Li₂CuCl₄ (0,1 M in THF, 7,0 mL, 0,7 mmol, 0,1 Äq.) versetzt. Dabei färbte sich die Lösung orange. Die anschließende Zugabe des Benzylmagnesiumchlorids (2 M in THF, 7,0 mL, 14 mmol, 2,0 Äq.) erfolgte über 20 min bei 0 °C. Bei Zugabe des Grignardreagenzes färbte sich die Lösung braun. Nach 2 h bei 0 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL halb gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung beendet. Anschließend wurde die wässrige Phase drei Mal mit Diethylether (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan) gereinigt. Es wurde (*E*)-(4,8-Dimethylnona-3,7-dien-1-yl)benzen **36** als farblose Flüssigkeit (1,39 g, 6,11 mmol, 87 % Ausbeute) erhalten.

R_f = 0,46 (Cyclohexan).

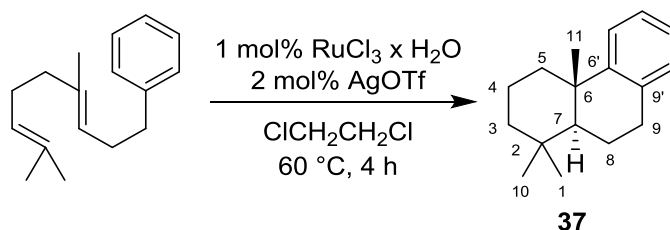
GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 228,2$.

¹H-NMR (CDCl₃, 500,15 MHz) $\delta = 7,25-7,28$ (m, 2H, H^{ar}), 7,15-7,19 (m, 3H, H^{ar}), 5,18 (t, ³J = 6,9 Hz, 1H, CH⁽⁷⁾), 5,08 (t, ³J = 6,8 Hz, 1H, CH₂⁽³⁾), 2,63 (t, ³J = 7,6 Hz, 2H, CH₃⁽⁹⁾), 2,30 (q, ³J = 7,5 Hz, 2H, CH₂⁽⁸⁾), 2,03-2,07 (m, 2H, CH₂⁽⁴⁾), 1,96-1,99 (m, 2H, CH₂⁽⁵⁾), 1,68 (s, 3H, CH₃^(1/10)), 1,60 (s, 3H, CH₃^(1/10)), 1,55 (s, 3H, CH₃⁽¹¹⁾) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃, 125,76 MHz) $\delta = 142,42$ (C^{ar}, quart), 135,76 (C^{quart}, (6)), 131,33 (C^{quart}, (2)), 128,47 (C^{ar}), 128,19 (C^{ar}), 125,64 (C^{ar}), 124,35 (C⁽³⁾H), 123,59 (C⁽⁷⁾H), 39,70 (C⁽⁵⁾H₂), 36,14 (C⁽⁹⁾H₂), 29,95 (C⁽⁸⁾H₂), 26,70 (C⁽⁴⁾H₂), 26,69 (C^(1/10)H₃), 17,68 (C^(1/10)H₃), 15,95 (C⁽¹¹⁾H₃) ppm.

6.5.3 Synthese eines Phenanthrenderivaten

1,1,4a-Trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthren **37**



Die Zyklisierung von **36** erfolgte nach Youn *et al.*^[178] 1 mol% $\text{RuCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (4,5 mg, 21,9 μmol , 0,01 Äq.) und 2 mol% AgOTf (11,3 mg, 43,8 μmol , 0,02 Äq.) wurden in 0,5 mL $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ für 1 h zur Homogenisierung gemischt. Nach der anschließenden Zugabe des (*E*)-(4,8-Dimethylnona-3,7-dien-1-yl)benzen (0,5 g, 2,19 mmol, 1,0 Äq.) in $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ (0,2 M, 10,95 mL) wurde die Reaktionslösung für 4 h bei 60 °C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan) gereinigt. Es wurde 1,1,4a-Trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthren **37** als farbloses, viskoses Öl (380 mg, 1,66 mmol, 76 % Ausbeute) erhalten.

$R_f = 0,70$ (*n*-Hexan).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 228,2$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,25$ (d, $^3J = 6,4$ Hz, 1H, H^{ar}), 7,11 (t, $^3J = 7,0$ Hz, 1H, H^{ar}), 7,02-7,12 (m, 2H, H^{ar}), 2,82-2,96 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(9)}$), 2,28 (d, $^2J = 12,6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2^{(3)}$), 1,85-1,90 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 1,67-1,77 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(4/8)}$), 1,58-1,62 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(4)}$), 1,48 (d, 3H, $^2J = 13,2$ Hz, $\text{CH}_2^{(5)}$), 1,39 (dt, $^2J = 12,8$ Hz, $^4J = 3,6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2^{(3)}$), 1,34 (dd, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 1,23 (dd, 1H, $^2J = 13,3$ Hz, $^4J = 3,8$ Hz, $\text{CH}_2^{(5)}$), 1,18 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(11)}$), 0,94 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/10)}$), 0,93 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/10)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 150,16$ ($\text{C}^{\text{ar, quart, (6')}}$), 135,23 ($\text{C}^{\text{ar, quart, (9')}}$), 128,99 (C^{ar}), 125,58 (C^{ar}), 125,14 (C^{ar}), 124,35 (C^{ar}), 124,35 ($\text{C}^{(3)\text{H}}$), 50,29 ($\text{C}^{(7)\text{H}}$), 41,69 ($\text{C}^{(5)\text{H}_2}$), 38,80 ($\text{C}^{(3)\text{H}_2}$), 37,80 ($\text{C}^{(\text{quart, 6})}$), 33,47 ($\text{C}^{(\text{quart, 2})}$), 33,30 ($\text{C}^{(1/10)\text{H}_3}$), 30,39 ($\text{C}^{(9)\text{H}_2}$), 24,85 ($\text{C}^{(11)\text{H}_3}$), 21,63 ($\text{C}^{(1/10)\text{H}_3}$), 19,30 ($\text{C}^{(4)\text{H}_2}$), 19,02 ($\text{C}^{(8)\text{H}_2}$) ppm.

6.6 Enzymatische Synthesen

6.6.1 Analytische Biotransformationen

Die analytischen Biotransformationen wurden in *deep well plates* sowie in 2 mL Glasreaktionsgefäßen durchgeführt. Der Biokatalysator wurde entweder in Form von ganzen Zellen oder von gereinigter Enzympräparation zur Reaktion hinzugegeben. Die Substrate wurden immer als 200 mM Substratstammlösung in DMSO der Reaktion hinzugefügt. Die Standardreaktionstemperatur für *AacSHC* und *TelSHC* betrug 50 °C, für *ZmoSHC1* 30 °C oder 35 °C und für die anderen getesteten SHCs jeweils 30 °C. Die Biotransformationen wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, in technischen Triplikaten durchgeführt. Auftretende Abweichungen sind in den jeweiligen Diagrammen gekennzeichnet. Die Durchführungen der jeweiligen Biotransformationen werden im Folgenden im Detail beschrieben.

Zum Screening der *inhouse* Variantenbibliothek wurden analytische Biokonversionen in 96er *deep well plates* mit Glaseinsätzen (von Hirschmann®) durchgeführt. Der Biokatalysator wurde hierbei in Form von ganzen Zellen eingesetzt. Dabei wurden die jeweiligen Zellpellets aufgetaut, in 495 µL Ganzzellreaktionspuffer (60 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Detergenz, pH 6,0) resuspendiert und in die Platte mit Glaseinsätzen transferiert. Anschließend wurden 5 µL der 200 mM Substratstammlösung ($c_{\text{Ende(Substrat)}} = 2 \text{ mM}$) hinzugefügt, die Platte mit einer Noppenfolie verschlossen und die Reaktion bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz mit 500 µL Ethylacetat mit 2 mM Phenyl octan extrahiert, 200 µL der organischen Phase in ein GC-Fläschchen überführt und mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung analysiert.

Die Biokonversionen mit ganzen Zellen in Glasreaktionsgefäßen wurden in ähnlicher Weise durchgeführt. Dabei wurde zunächst das jeweilige Zellpellet aufgetaut, eingewogen (50 mg mL^{-1}) und in 495 µL Ganzzellreaktionspuffer (60 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Detergenz, pH 6,0) resuspendiert. Anschließend wurden 5 µL der 200 mM Substratstammlösung ($c_{\text{Ende(Substrat)}} = 2 \text{ mM}$) hinzugefügt, das Glasgefäß verschlossen und die Reaktion für 68 h und 600 rpm durchgeführt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz zwei Mal mit jeweils 500 µL Ethylacetat mit 2 mM Phenyl octan extrahiert, beim ersten Mal 200 µL und beim zweiten Mal 400 µL der organischen Phase in ein GC-Fläschchen überführt und mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung analysiert.

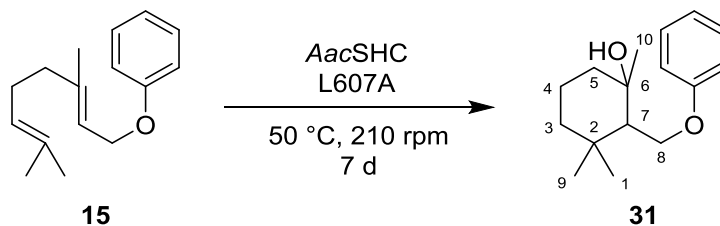
Für die Biotransformationen mit gereinigter Enzympräparation wurden 495 µL der Enzympräparation in ein 2 mL Glasreaktionsgefäß transferiert, mit 5 µL der 200 mM

Substratlösung versetzt und die Reaktion bei 50 °C und 600 rpm für 68 h durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte anschließend auf die gleiche Weise wie bei den Biokonversionen mit ganzen Zellen in den Glasreaktionsgefäßen.

Als Kontrollexperimente dienten jeweils ein Reaktionsansatz des Substrats ausschließlich im verwendeten Puffer sowie ein Reaktionsansatz mit den katalytisch inaktiven Varianten (*AacSHC*: D376C, *ZmoSHC*: D439A).

6.6.2 Präparative Biotransformationen

1,3,3-Trimethyl-2-(phenoxyethyl)cyclohexan-1-ol **31**



Für die präparative Umsetzung von Substrat **15** wurden zehn 500 mL Erlenmeyerkolben zur Proteinproduktion (Kapitel 6.3.1) von *AacSHC* L607A verwendet. Die resultierenden 50 g Zellpellet wurden, wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, aufgearbeitet und gereinigt. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet.

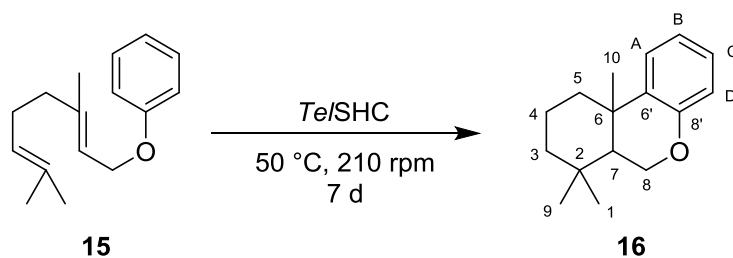
Die Enzymlösung (70 mL, $c = 4,0 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde mit 30 mL Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Triton X-100, 200 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und anschließend mit 150 mg Substrat in 1 mL DMSO (652 mM, $c_{\text{Ende(Substrat)}} = 6,52 \text{ mM}$, $c_{\text{DMSO}} = 1 \text{ % (v/v)}$) versetzt. Die Reaktion wurde über 7 d bei 210 rpm und 50 °C in einer 250 mL Schottflasche inkubiert und anschließend vier Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden zudem 30 mL gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan \rightarrow *n*-Hexan:Ethylacetat 5:1) gereinigt. Es wurden 1,3,3-Trimethyl-2-(phenoxyethyl)cyclohexan-1-ol **31** (75 mg, 0,3 mmol, 46 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0,51$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 5:1).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 248,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,30$ (t, $^3J = 8,1 \text{ Hz}$, 2H, H^{ar}), 6,99 (t, $^3J = 7,4 \text{ Hz}$, 1H, H^{ar}), 6,95 (d, $^3J = 7,8 \text{ Hz}$, 2H, H^{ar}), 4,20-4,28 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 3,68 (s, 1H, OH), 1,94 (dd, $^3J = 9,3 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 1,39-1,83 (m, 6H, $\text{CH}_2^{(3/4/5)}$), 1,29 (s, 1H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,08 (s, 1H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 0,90 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 158,20$ ($\text{C}^{\text{ar, quart}}$), 129,57 (C^{ar}), 121,41 (C^{ar}), 114,68 (C^{ar}), 72,94 ($\text{C}^{(6)\text{-OH}}$), 67,86 ($\text{C}^{(8)\text{H}_2}$), 54,00 ($\text{C}^{(7)\text{H}}$), 42,27 ($\text{C}^{(3/4/5)\text{H}_2}$), 41,84 ($\text{C}^{(3/4/5)\text{H}_2}$), 33,67 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 32,93 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 24,30 ($\text{C}^{(10)\text{H}_3}$), 22,07 ($\text{C}^{(1/9)\text{H}_3}$), 19,89 ($\text{C}^{(3/4/5)\text{H}_2}$) ppm.

(6a*S*, 10a*S*)-7,7,10a-Trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexyhydro-6*H*-benzochromen 16

Für die präparative Umsetzung von Substrat **15** wurden zehn 500 mL Erlenmeyerkolben zur Proteinproduktion (Kapitel 6.3.1) vom *Te/SHC* Wildtypenzym verwendet. Die resultierenden 50 g Zellpellet wurden, wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, aufgearbeitet und gereinigt. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet.

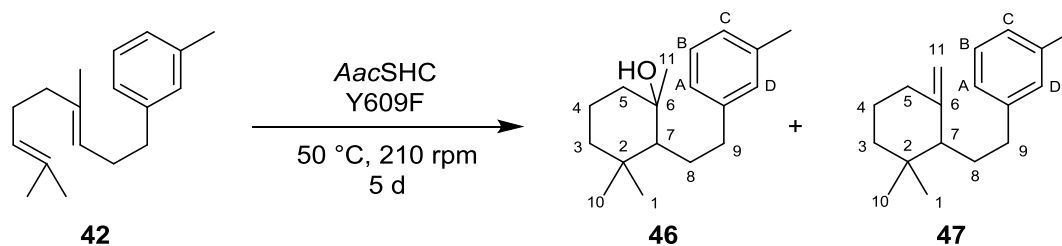
Die Enzymlösung (70 mL, $c = 5,7 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde mit 30 mL Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Triton X-100, 200 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und anschließend mit 150 mg Substrat in 1 mL DMSO (652 mM, $c_{\text{Ende(Substrat)}} = 6,52 \text{ mM}$, $c_{\text{DMSO}} = 1 \text{ % (v/v)}$) versetzt. Die Reaktion wurde über 7 d bei 210 rpm und 50 °C in einer 250 mL Schottflasche inkubiert und anschließend vier Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden zudem 30 mL gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylactat 50:1 → *n*-Hexan:Ethylactat 5:1) gereinigt. Es wurden (6a*S*, 10a*S*)-7,7,10a-Trimethyl-6a,7,8,9,10,10a-hexyhydro-6*H*-benzochromen **16** (45 mg, 0,20 mmol, 30 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0,28$ (*n*-Hexan).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 230,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,13$ (dd, $^3J = 7,7 \text{ Hz}$, $^4J = 1,3 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{ar, D}}$), 7,05 (dt, $^3J = 7,7 \text{ Hz}$, $^4J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{ar, C}}$), 6,82 (t, $^3J = 7,5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{ar, B}}$), 6,74 (dd, $^3J = 8,2 \text{ Hz}$, $^4J = 0,9 \text{ Hz}$ 1H, $\text{H}^{\text{ar, A}}$), 4,37 (dd, $^3J = 10,45 \text{ Hz}$, $^2J = 3,5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 4,19 (t, $^3J = 11,4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,23 (d, $^3J = 12,8 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2^{(5)}$), 1,62-1,77 (m, 3H, $\text{CH}_2^{(10)}/\text{CH}^{(7)}$), 1,48 (d, 1H, $^3J = 13,6 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2^{(3)}$), 1,40 (dt., $^3J = 13,2 \text{ Hz}$, $^2J = 3,74 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2^{(5)}$), 1,23-1,30 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(3)}/\text{CH}_3^{(10)}$), 1,01 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$). 0,93 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 152,64$ ($\text{C}^{\text{ar, quart, (8')}}$), 135,68 ($\text{C}^{\text{ar, quart, (6')}}$), 126,97 ($\text{C}^{\text{ar, (C)}}$), 124,26 ($\text{C}^{\text{ar, (D)}}$), 119,82 ($\text{C}^{\text{ar, (B)}}$), 116,30 ($\text{C}^{\text{ar, (A)}}$), 64,05 ($\text{C}^{(8)}\text{H}_2$), 47,84 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 41,88 ($\text{C}^{(3)}\text{H}_2$), 37,24 ($\text{C}^{(5)}\text{H}_3$), 34,66 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 32,95 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 31,99 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 24,50 ($\text{C}^{(10)}\text{H}_3$), 21,85 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 18,93 ($\text{C}^{(4)}\text{H}_2$) ppm.

1,3,3-Trimethyl-2-(3-methylphenethyl)cyclohexan-1-ol 46 und 1-(2-(2,2-dimethyl-6-methylencyclohexyl)ethyl)-3-methylbenzen 47


Für die präparative Umsetzung von Substrat **42** wurden zehn 500 mL Erlenmeyerkolben zur Proteinproduktion (Kapitel 6.3.1) von *AacSHC* Y609F verwendet. Die resultierenden 60 g Zellpellet wurden, wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, aufgearbeitet und gereinigt. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet.

Die Enzymlösung (80 mL, $c = 6,0 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde mit 20 mL Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Triton X-100, 200 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und anschließend mit 150 mg Substrat in 1 mL DMSO (620 mM, $c_{\text{Ende(Substrat)}} = 6,20 \text{ mM}$, $c_{\text{DMSO}} = 1 \text{ % (v/v)}$) versetzt. Die Reaktion wurde über 5 d bei 210 rpm und 50 °C in einer 250 mL Schottflasche inkubiert und anschließend vier Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden zudem 30 mL gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylactat 10:1 → *n*-Hexan:Ethylactat 1:1) gereinigt. Es wurden 1-(2-(2,2-Dimethyl-6-methylencyclohexyl)ethyl)-3-methylbenzen **47** (17,8 mg, 74 μmol , 12 % Ausbeute) und 1,3,3-Trimethyl-2-(3-methylphenethyl)cyclohexan-1-ol **46** (68,0 mg, 261 μmol , 42 %) als farblose Öle erhalten.

$R_f(\mathbf{46}) = 0,31$ (*n*-Hexan:Ethylactat 10:1).

$R_f(\mathbf{47}) = 0,55$ (*n*-Hexan).

GC/MS [EI]: $m z^{-1}(\mathbf{46}) = 260,1$.

GC/MS [EI]: $m z^{-1}(\mathbf{47}) = 242,2$.

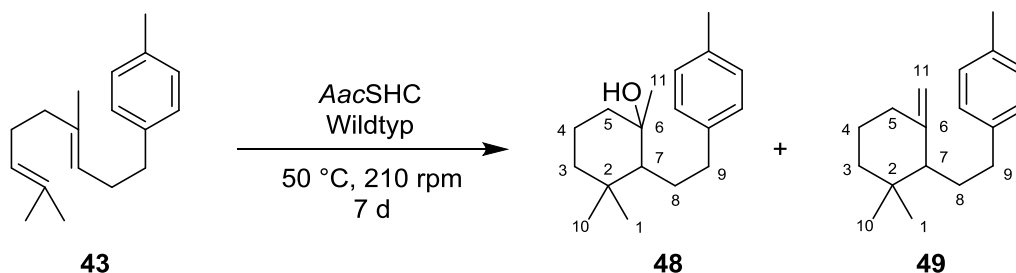
$^1\text{H-NMR}$ (**46**, CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,18$ (t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{ar, D}}$), 6,99-7,03 (m, 3H, $\text{H}^{\text{ar, A/B/C}}$), 2,75-2,81 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,63-2,69 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,33 (s, 3H, CH_3), 1,74-1,79 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(5/9)}$), 1,53-1,63 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(4/9)}$), 1,43-1,47 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(4)}$), 1,35-1,39 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(3)}$), 1,29-1,34 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(5)}$), 1,19-1,25 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(3)}/\text{CH}^{(7)}$), 1,18 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(11)}$), 1,00 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/10)}$), 0,82 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/10)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (**46**, CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 143,27$ ($\text{C}^{\text{ar, quart}}\text{-CH}_2\text{R}$), 137,88 ($\text{C}^{\text{ar, quart}}\text{-CH}_3$), 129,23 (C^{ar}), 128,24 (C^{ar}), 126,46 (C^{ar}), 125,44 (C^{ar}), 74,22 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 56,89 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 43,64

(C⁽⁵⁾H₂), 41,49 (C⁽³⁾H₂), 39,04 (C⁽⁸⁾H₂), 35,64 (C^{quart.} (2)), 32,84 (C^(1/10)H₃), 28,79 (C⁽⁹⁾H₂), 23,25 (C⁽¹¹⁾H₃), 21,41 (C^(1/10)H₃/CH₃), 21,34 (C^(1/10)H₃/CH₃), 20,52 (C⁽⁴⁾H₂) ppm.

¹H-NMR (**47**, CDCl₃, 500,15 MHz) δ = 7,16 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H^{ar, D}), 6,99 (s, 3H, H^{ar, A/B/C}), 4,82 (s, 1H, CH₂⁽¹¹⁾), 4,24 (s, 1H, CH₂⁽¹¹⁾), 2,53-2,59 (m, 1H, CH₂⁽⁹⁾), 2,33 (s, 3H, CH₃), 2,26-2,31 (m, 1H, CH₂⁽⁹⁾), 2,10-2,13 (m, 1H, CH₂⁽⁵⁾), 2,03-2,07 (m, 1H, CH₂⁽⁵⁾), 1,73-1,80 (m, 2H, CH₂⁽⁸⁾/CH⁽⁷⁾), 1,62-1,68 (m, 1H, CH₂⁽⁸⁾), 1,50-1,57 (m, 2H, CH₂⁽⁴⁾), 1,43-1,49 (m, 1H, CH₂⁽³⁾), 1,18-1,23 (m, 1H, CH₂⁽³⁾), 0,91 (s, 3H, CH₃^(1/10)), 0,83 (s, 3H, CH₃^(1/10)) ppm.

¹³C-NMR (**47**, CDCl₃, 125,76 MHz) δ = 149,25 (C^{quart.} (6)), 143,26 (C^{ar, quart}-CH₂R), 137,77 (C^{ar, quart}-CH₃), 129,20 (C^{ar}), 128,16 (C^{ar}), 126,29 (C^{ar}), 125,37 (C^{ar}), 109,15 (C⁽¹¹⁾H₂), 53,98 (C⁽⁷⁾H), 36,18 (C⁽³⁾H₂), 34,90 (C^{quart.} (2)), 34,55 (C⁽⁹⁾H₂), 32,41 (C⁽⁵⁾H₂), 28,78 (C⁽⁸⁾H₂), 28,37 (C^(1/10)H₃), 26,34 (C^(1/10)H₃), 23,71 (C⁽⁴⁾H₂), 21,41 (CH₃) ppm.

1,3,3-Trimethyl-2-(4-methylphenethyl)cyclohexan-1-ol 48 und 1-(2-(2,2-Dimethyl-6-methylencyclohexyl)ethyl)-4-methylbenzen 49


Für die präparative Umsetzung von Substrat **43** wurden zehn 500 mL Erlenmeyerkolben zur Proteinproduktion (Kapitel 6.3.1) vom *AacSHC* Wildtypenzym verwendet. Die resultierenden 50 g Zellpellet wurden, wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, aufgearbeitet und gereinigt. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet.

Die Enzymlösung (70 mL, $c = 1,9 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde mit 30 mL Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Triton X-100, 200 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und anschließend mit 150 mg Substrat in 1 mL DMSO (620 mM, $c_{\text{Ende(Substrat)}} = 6,20 \text{ mM}$, $c_{\text{DMSO}} = 1 \text{ % (v/v)}$) versetzt. Die Reaktion wurde über 7 d bei 210 rpm und 50 °C in einer 250 mL Schottflasche inkubiert und anschließend vier Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden zudem 30 mL gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan \rightarrow *n*-Hexan:Ethylacetat 1:1) gereinigt. Es wurden 1-(2-(2,2-Dimethyl-6-methylencyclohexyl)ethyl)-4-methylbenzen **49** (24,0 mg, 99 μmol , 16 % Ausbeute) und 1,3,3-Trimethyl-2-(4-methylphenethyl)cyclohexan-1-ol **48** (59,0 mg, 227 μmol , 37 %) als farblose Öle erhalten.

$R_f(\mathbf{48}) = 0,21$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 10:1).

$R_f(\mathbf{49}) = 0,68$ (*n*-Hexan).

GC/MS [EI]: $m z^{-1}(\mathbf{48}) = 260,1$.

GC/MS [EI]: $m z^{-1}(\mathbf{49}) = 242,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (**48**, CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,09\text{-}7,13$ (m, 4H, H^{ar}), 2,73-2,79 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,63-2,69 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 2,31 (s, 3H, CH_3), 1,73-1,77 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(5/9)}$), 1,52-1,63 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(4/9)}$), 1,43-1,49 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(4)}$), 1,35-1,39 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(3)}$), 1,29-1,33 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(5)}$), 1,18-1,24 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(3)}/\text{CH}^{(7)}$), 1,16 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(11)}$), 0,99 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/10)}$), 0,82 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/10)}$) ppm.

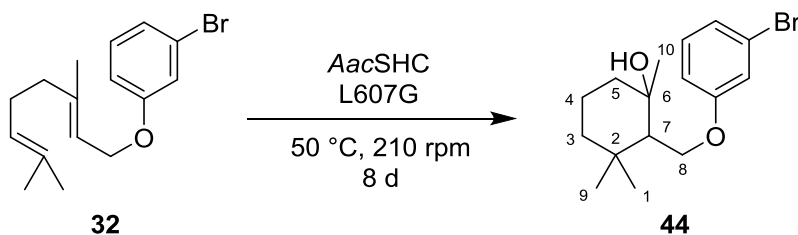
$^{13}\text{C-NMR}$ (**48**, CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 140,21$ ($\text{C}^{\text{ar, quart}}\text{-CH}_2\text{R}$), 135,15 ($\text{C}^{\text{ar, quart}}\text{-CH}_3$), 129,02 (C^{ar}), 128,35 (C^{ar}), 74,18 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 56,75 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 43,63 ($\text{C}^{(5)}\text{H}_2$), 41,49 ($\text{C}^{(3)}\text{H}_2$),

38,56 ($C^{(8)}H_2$), 35,63 ($C^{quart. (2)}$), 32,83 ($C^{(1/10)}H_3$), 28,85 ($C^{(9)}H_2$), 23,21 ($C^{(11)}H_3$), 21,01 ($C^{(1/10)}H_3$), 20,52 ($C^{(4)}H_2/CH_3$) ppm.

Das isolierte 1-(2-(2,2-Dimethyl-6-methylcyclo-hexyl)ethyl)-4-methylbenzen **49** wies nach der säulenchromatographischen Reinigung immer noch deutliche Verunreinigung auf, konnte aber mittels NMR-spektroskopischen Untersuchungen trotzdem eindeutig charakterisiert werden.

1H -NMR (**49**, $CDCl_3$, 500,15 MHz) δ = 7,06-7,12 (m, 4H, H^{ar}), 4,84 (s, 1H, $CH_2^{(11)}$), 4,61 (s, 1H, $CH_2^{(11)}$), 2,54-2,60 (m, 1H, $CH^{(7)}$), 2,33 (s, 3H, CH_3), 1,02-2,07 (m, 10H, $CH_2^{(3/4/5/8/9)}$), 0,92 (s, 3H, $CH_3^{(1/10)}$), 0,83 (s, 3H, $CH_3^{(1/10)}$) ppm.

^{13}C -NMR (**49**, $CDCl_3$, 125,76 MHz) δ = 149,27 ($C^{quart. (6)}$), 140,21 ($C^{ar, quart}-CH_2R$), 134,96 ($C^{ar, quart}-CH_3$), 128,96 (C^{ar}), 128,29 (C^{ar}), 109,16 ($C^{(11)}H_2$), 53,90 ($C^{(7)}H$), 34,90 ($C^{quart. (2)}$), 34,13 ($C^{(3/5/8/9)}H_2$), 28,87 ($C^{(1/10)}H_3$), 28,39 ($C^{(1/10)}H_3$), 23,74 ($C^{(4)}H_2$), 21,02 (CH_3) ppm.

2-((3-Bromophenoxy)methyl)-1,3,3-trimethylcyclohexan-1-ol **44**


Für die präparative Umsetzung von Substrat **32** wurden zehn 500 mL Erlenmeyerkolben zur Proteinproduktion (Kapitel 6.3.1) von *AacSHC* L607G verwendet. Die resultierenden 50 g Zellpellet wurden, wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, aufgearbeitet und gereinigt. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet.

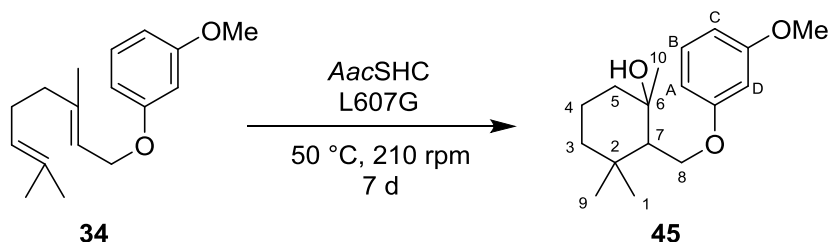
Die Enzymlösung (70 mL, $c = 7,8 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde mit 30 mL Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (w/v) Triton X-100, 200 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und anschließend mit 150 mg Substrat in 1 mL DMSO (487 mM, $c_{\text{Ende(Substrat)}} = 4,87 \text{ mM}$, $c_{\text{DMSO}} = 1 \text{ \% (v/v)}$) versetzt. Die Reaktion wurde über 8 d bei 210 rpm und 50 °C in einer 250 mL Schottflasche inkubiert und anschließend vier Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden zudem 30 mL gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan \rightarrow *n*-Hexan:Ethylacetat 10:1) gereinigt. Es wurde 2-((3-Bromophenoxy)methyl)-1,3,3-trimethylcyclohexan-1-ol **44** (64,5 mg, 197 μmol , 40 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten.

$R_f = 0,16$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 10:1).

GC/MS [EI]: $m z^{-1} = 326,0$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,10\text{-}7,16$ (m, 3H, H^{ar}), 6,87 (m, 1H, H^{ar}), 4,20-4,23 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 3,19 (s, 1H, OH), 1,88 (q, $^3J = 7,7 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 1,33-1,83 (m, 6H, $\text{CH}_2^{(3/4/5)}$), 1,28 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,08 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 0,91 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 159,04$ ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}$), 130,65 (C^{ar}), 124,42 (C^{ar}), 122,89 ($\text{C}^{\text{ar, quart-Br}}$), 117,77 (C^{ar}), 113,88 (C^{ar}), 72,97 ($\text{C}^{\text{quart. (6)}}$), 67,99 ($\text{C}^{(8)}\text{H}_2$), 54,27 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 42,13 ($\text{C}^{(3/5)}\text{H}_2$), 42,04 ($\text{C}^{(3/5)}\text{H}_2$), 33,84 ($\text{C}^{\text{quart. (2)}}$), 32,89 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 24,31 ($\text{C}^{(10)}\text{H}_3$), 22,12 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 19,91 ($\text{C}^{(4)}\text{H}_2$) ppm.

2-((3-Methoxyphenoxy)methyl)-1,3,3-trimethylcyclohexan-1-ol 45


Für die präparative Umsetzung von Substrat **34** wurden zehn 500 mL Erlenmeyerkolben zur Proteinproduktion (Kapitel 6.3.1) von *AacSHC* L607G verwendet. Die resultierenden 50 g Zellpellet wurden, wie in Kapitel 6.3.2 beschrieben, aufgearbeitet und gereinigt. Als Detergenz wurde Triton X-100 verwendet.

Die Enzymlösung (70 mL, $c = 8,4 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde mit 30 mL Elutionspuffer (12 mM Citrat, 0,2 % (*w/v*) Triton X-100, 200 mM NaCl, pH 6,0) verdünnt und anschließend mit 150 mg Substrat in 1 mL DMSO (577 mM, $c_{\text{Ende(Substrat)}} = 5,77 \text{ mM}$, $C_{\text{DMSO}} = 1 \text{ % (v/v)}$) versetzt. Die Reaktion wurde über 7 d bei 210 rpm und 50 °C in einer 250 mL Schottflasche inkubiert und anschließend vier Mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden zudem 30 mL gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylacetat 50:1 → *n*-Hexan:Ethylacetat 5:1) gereinigt. Es wurden 2-((3-Methoxyphenoxy)methyl)-1,3,3-trimethylcyclohexan-1-ol **45** (39,4 mg, 141 μmol , 24 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten.

$R_f(xY) = 0,38$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 5:1).

GC/MS [EI]: $m/z^{-1} = 278,1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500,15 MHz) $\delta = 7,19$ (t, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{ar, B}}$), 6,53-6,56 (m, 2H, $\text{H}^{\text{ar, A/C}}$), 6,50 (t, $^3J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{ar, D}}$), 4,22 (m, 2H, $\text{CH}_2^{(8)}$), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 1,91 (q, $^3J = 8,8 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}^{(7)}$), 1,79-1,83 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(3)}$), 1,56-1,59 (m, 1H, $\text{CH}_2^{(4)}$), 1,35-1,49 (m, 4H, $\text{CH}_2^{(3/4/5)}$), 1,28 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(10)}$), 1,08 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$), 0,89 (s, 3H, $\text{CH}_3^{(1/9)}$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125,76 MHz) $\delta = 160,88$ ($\text{C}^{\text{ar, quart-O Me}}$), 159,48 ($\text{C}^{\text{ar, quart-O}}$), 129,99 ($\text{C}^{\text{ar, B}}$), 106,92 ($\text{C}^{\text{ar, A/C}}$), 106,79 ($\text{C}^{\text{ar, A/C}}$), 101,23 ($\text{C}^{\text{ar, D}}$), 72,87 ($\text{C}^{\text{quart, (6)}}$), 67,89 ($\text{C}^{(8)}\text{H}_2$), 55,33 (OCH₃), 54,04 ($\text{C}^{(7)}\text{H}$), 42,26 ($\text{C}^{(3)}\text{H}_2$), 41,89 ($\text{C}^{(5)}\text{H}_2$), 33,69 ($\text{C}^{\text{quart, (2)}}$), 32,93 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 24,31 ($\text{C}^{(10)}\text{H}_3$), 22,07 ($\text{C}^{(1/9)}\text{H}_3$), 19,91 ($\text{C}^{(4)}\text{H}_2$) ppm.

6.7 Bioinformatische Methoden

6.7.1 Sequenzalignments und Erstellung von Homologiemodellen

Multiple Sequenzalignments wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Das Homologiemodell der *Tel*SHC wurde mittels SWISS-MODEL erstellt, dafür wurde die Struktur der *Aac*SHC als Templat genutzt.

ClustalW2 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

SWISS-MODEL <https://swissmodel.expasy.org/>

6.7.2 Molekulare Dockingstudien

In der vorliegenden Arbeit wurden Protein-Ligand-Dockingstudien (Protein: SHC, Ligand: jeweiliges Substrat) durchgeführt. Dabei wurde das Enzym als starr betrachtet, während der Ligand flexibel modelliert wurde. Diese flexible Betrachtung des Liganden wird durch die, im Vergleich zum Enzym, geringe räumliche Komplexität des Substrates ermöglicht.

Für die durchgeführten Dockingstudien wurde die YASARA Software von der YASARA Biosciences GmbH (Wien, AUT) verwendet.^[211] Das Enzymgerüst der *Aac*SHC entstammt dabei aus der pdb-Datei der gelösten Kristallstruktur (*Aac*SHC: 1UMP). Vor der Simulation wurde zunächst mittels der YASARA Software eine Energieminimierung des Liganden sowie des Enzyms durchgeführt. Für die Energieminimierung des Proteins wurde eine Simulationszelle um das komplette Enzym definiert, diese mit Wassermolekülen gefüllt und die Energieminimierung durchgeführt. Nach der Entfernung des Wassers wurde die Simulationszelle um das aktive Zentrum des Enzymes definiert. Die Dockingstudien wurden unter der Verwendung des Macros `dock_run.mcr`, der Dockingmethode VINA und dem Kraftfeld AMBER03 durchgeführt. Die weitere Bearbeitung der resultierenden Enzym-Ligand-Strukturen wurde in der PyMOL Software von Schrödinger LLC (New York, USA) vorgenommen. Um die Bindungssituation in den generierten Varianten darzustellen, wurde die in der Software integrierte Möglichkeit genutzt, *in silico* Variationen in das Enzym einzuführen, und die *in silico* erstellten Enzymvarianten in der Simulation als Proteintemplat verwendet.

Literaturverzeichnis

- [1] G. Brahmachari, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 64676–64725.
- [2] R. Kane, *J. Prakt. Chem.* **1838**, *15*, 129.
- [3] A. de Meijere, F. Diederich, *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2008**.
- [4] N. Calderon, H. Y. Chen, K. W. Scott, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *34*, 3327–3329.
- [5] L. Claisen, O. Lowman, *Ber.* **1887**, *20*, 651–654.
- [6] G. Wittig, G. Geissler, *Ann. Chem.* **1953**, *580*, 44–57.
- [7] C. Friedel, J. M. Crafts, *J. Chem. Soc.* **1877**, *32*, 725–791.
- [8] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organische Chemie*, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [9] W. Fessner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 85–97.
- [10] K. Fesko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248–1272.
- [11] M. Brovetto, D. Gamemara, P. Saenz Méndez, G. A. Seoane, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4346–4403.
- [12] V. Resch, J. H. Schrittwieser, E. Siirola, W. Kroutil, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 793–799.
- [13] M. Breuer, B. Hauer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 570–576.
- [14] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science (80-.)*. **2013**, *339*, 307–310.
- [15] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095.
- [16] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [17] M. Rueping, B. J. Nachtsheim, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 6.
- [18] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organische Chemie*, 4. Auflage, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2005**.
- [19] M. Bandini, *Catalytic Asymmetric Friedel-Crafts Alkylations*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- [20] H. C. Brown, H. Pearsall, L. P. Eddy, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5347.
- [21] E. Wertyporoch, T. Firla, *Liebigs Ann.* **1933**, *500*, 287–295.
- [22] G. Olah, S. Kuhn, J. Olah, *J. Chem. Soc.* **1957**, 2174–2176.
- [23] G. A. Olah, I. Hashimoto, H. C. Lin, *PNAS* **1977**, *74*, 4121–4125.

- [24] M. S. Kharasch, H. S. Isbell, *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53*, 3053–3059.
- [25] G. Dyker, *Handbook of C-H Transformations Applications in Organic Synthesis*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2005**.
- [26] E. Hückel, *Z. Phys.* **1931**, *70*, 204–286.
- [27] W. E. von Doering, F. L. Detert, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 876–877.
- [28] T. Sakamoto, J. Itoh, K. Mori, T. Akiyama, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5448–5454.
- [29] Y. Wang, W. Liu, W. Ren, Y. Shi, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4976–4979.
- [30] G. Desimoni, G. Faita, M. Toscanini, M. Boiocchi, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3630–3636.
- [31] B. Bi, Q.-X. Lou, Y.-Y. Ding, S.-W. Chen, S.-S. Zhang, W.-H. Hu, J.-L. Zhao, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 540–543.
- [32] H. M. Dong, H. H. Lu, L. Q. Lu, C. B. Chen, W. J. Xiao, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1597–1603.
- [33] T. Arai, N. Yokoyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4989–4992.
- [34] N. A. Paras, D. W. C. Macmillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4370–4371.
- [35] B. M. Trost, C. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2438–2439.
- [36] Y.-Z. Hua, X.-W. Han, X.-C. Yang, X. Song, M.-C. Wang, J.-B. Chang, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11690–11699.
- [37] D. A. Evans, K. A. Scheidt, K. R. Fandrick, H. W. Lam, J. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10029–10041.
- [38] S. O'Reilly, M. Aylward, C. Keogh-Hansen, B. Fitzpatrick, H. A. McManus, H. Müller-Bunz, P. J. Guiry, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10177–10186.
- [39] D. A. Evans, K. R. Fandrick, H. J. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8942–8943.
- [40] H. Liu, J. Xu, D. M. Du, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4725–4728.
- [41] S. Saaby, P. Bayón, P. S. Aburel, K. A. Jørgensen, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4352–4361.
- [42] J. L. Zhao, L. Liu, Y. Sui, Y. L. Liu, D. Wang, Y. J. Chen, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6127–6130.
- [43] D. A. Evans, K. A. Scheidt, K. R. Fandrick, H. W. Lam, J. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10780–10781.
- [44] K. B. Jensen, J. Thorhauge, R. G. Hazell, K. A. Jørgensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 160–163.
- [45] J. Kaur, A. Kumar, S. S. Chimni, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2138–2141.
- [46] T.-Y. Liu, H.-L. Cui, Q. Chai, J. Long, B.-J. Li, Y. Wu, L.-S. Ding, Y.-C. Chen,

- Chem. Commun.* **2007**, 2228–2230.
- [47] G. Erker, A. A. H. Van der Zeijden, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 543–545.
- [48] T. Tsuchimoto, K. Tobita, T. Hiyama, S. Fukuzawa, *Synlett* **1996**, 557–559.
- [49] I. Shimizu, K. M. Khien, M. Nagatomo, T. Nakajima, A. Yamamoto, *Chem. Lett.* **1997**, 851–852.
- [50] H. Matsuzawa, Y. Miyake, Y. Nishibayashi, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6608–6611.
- [51] J. Kischel, I. Jovel, K. Mertins, A. Zapf, M. Beller, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 19–22.
- [52] M. Rueping, B. J. Nachtsheim, T. Scheidt, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3717–3719.
- [53] R. K. Thalji, K. A. Ahrendt, R. G. Bergman, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9692–9693.
- [54] A. V. Malkov, S. L. Davis, I. R. Baxendale, W. L. Mitchell, P. Kočovský, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2751–2764.
- [55] R. A. Widenhoefer, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5382–5391.
- [56] M. A. Tarselli, M. R. Gagné, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2439–2441.
- [57] T. Tsuchimoto, K. Tobita, T. Hiyama, S. Fukuzawa, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6997–7005.
- [58] M. Noji, T. Ohno, K. Fuji, N. Futaba, H. Tajima, K. Ishii, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9340–9347.
- [59] I. Shiina, M. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6391–6394.
- [60] J. Le Bras, J. Muzart, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7942–7948.
- [61] R. Sanz, D. Miguel, J. M. Álvarez-Gutiérrez, F. Rodríguez, *Synlett* **2008**, 975–978.
- [62] M. Bandini, P. G. Cozzi, P. Melchiorre, A. Umani-Ronchi, *Angew. Chem.* **2004**, *43*, 84–87.
- [63] K. Weissermehl, H.-J. Arpe, *Industrial Organic Chemistry*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **1993**.
- [64] S. Hauptmann, *Organische Chemie*, Deutscher Verlag Für Grundstoffindustrie, Leipzig, **1985**.
- [65] J. R. Schaefgen, E. I. D. P. de N. and Company, *Aromatic Copolyester Capable Of Forming An Optically Anisotropic Melt*, **1975**.
- [66] C. Moreau, S. Razigade-Trousselier, A. Finiels, L. Gilbert, Rhône-Poulenc, *Method For Hydroxyalkylating A Carbocyclic Aromatic Ether*, **1996**.
- [67] T. B. Poulsen, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2903–2915.
- [68] F. Bigi, G. Casiraghi, G. Casnati, G. Sartori, G. G. Fava, M. F. Belicchi, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5018–5022.

- [69] M. Johannsen, *Chem. Commun.* **1999**, 2233–2234.
- [70] G. Desimoni, G. Faita, K. A. Jørgensen, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3561–3651.
- [71] W. Zhuang, T. Hansen, K. A. Jørgensen, *Chem. Commun.* **2001**, 347–348.
- [72] S. Yamazaki, Y. Iwata, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 739–743.
- [73] C. Palomo, M. Oiarbide, B. G. Kardak, J. M. García, A. Linden, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4154–4155.
- [74] H. Yang, Y. T. Hong, S. Kim, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2281–2284.
- [75] M. Bandini, A. Garelli, M. Rovinetti, S. Tommasi, A. Umani-Ronchi, *Chirality* **2005**, *17*, 522–529.
- [76] M. Bandini, M. Fagioli, P. Melchiorre, A. Melloni, A. Umani-Ronchi, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5843–5846.
- [77] A. Ishii, V. A. Soloshonok, K. Mikami, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1597–1599.
- [78] G. Blay, I. Fernández, J. R. Pedro, C. Vila, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2601–2604.
- [79] M. Bandini, A. Melloni, S. Tominasi, A. Umani-Ronchi, *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 3753–3763.
- [80] W. B. Liu, H. He, L. X. Dai, S. L. You, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1815–1818.
- [81] H. Y. Cheung, W. Y. Yu, F. L. Lam, T. T. L. Au-Yeung, Z. Zhou, T. H. Chan, A. S. C. Chan, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4295–4298.
- [82] B. M. Trost, J. Quancard, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6314–6315.
- [83] J. F. Austin, D. W. C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1172–1173.
- [84] N. A. Paras, D. W. C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7894–7895.
- [85] H. D. King, Z. Meng, D. Denhart, R. Mattson, R. Kimura, D. Wu, Q. Gao, J. E. Macor, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3437–3440.
- [86] R. P. Herrera, V. Sgarzani, L. Bernardi, A. Ricci, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6576–6579.
- [87] P. Bachu, T. Akiyama, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4112–4114.
- [88] W. Kashikura, J. Itoh, K. Mori, T. Akiyama, *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 470–472.
- [89] J. Itoh, K. Fuchibe, T. Akiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4016–4018.
- [90] F. Xu, D. Huang, C. Han, W. Shen, X. Lin, Y. Wang, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8677–8680.
- [91] Y. F. Sheng, Q. Gu, A. J. Zhang, S. L. You, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6899–6901.
- [92] W. Zhuang, R. G. Hazell, K. A. Jørgensen, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2566–2571.
- [93] H. Li, Y.-Q. Wang, L. Deng, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4063–4065.
- [94] L. A. Wessjohann, B. Sontag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1697–1699.

- [95] W. Brandt, L. Bräuer, N. Günnewich, J. Kufka, F. Rausch, D. Schulze, E. Schulze, R. Weber, S. Zakharova, L. Wessjohann, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1758–1775.
- [96] M. Liebhold, X. Xie, S. M. Li, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4882–4885.
- [97] A. Fan, X. Xie, S.-M. Li, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7551–7557.
- [98] K. Zhou, L. Ludwig, S.-M. Li, *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 929–933.
- [99] H. Stecher, M. Tengg, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl, M. Gruber-Khadjawi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9546–9548.
- [100] R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713–724.
- [101] M. Tengg, H. Stecher, L. Offner, K. Plasch, F. Anderl, H. Weber, H. Schwab, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1354–1360.
- [102] J. Rétey, *Naturwissenschaften* **1996**, *83*, 439–447.
- [103] J. W. Xue, J. T. Guo, Y. H. He, Z. Guan, *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 297–304.
- [104] S. Park, K. Ikehata, R. Watabe, Y. Hidaka, A. Rajendran, H. Sugiyama, *Chem. Commu.* **2012**, *48*, 10398–10400.
- [105] J. Bos, W. R. Browne, A. J. M. Driessen, G. Roelfes, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9796–9799.
- [106] T. Wang, X. Fan, C. Hou, J. Liu, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, *51*, 19–27.
- [107] X. Yu, X. Xie, S. M. Li, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 737–748.
- [108] X. Yu, S. M. Li, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2280–2283.
- [109] J. F. Sanchez, R. Entwistle, J. H. Hung, J. Yaegashi, S. Jain, Y. M. Chiang, C. C. C. Wang, B. R. Oakley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4010–4017.
- [110] “Sigma-Aldrich,” **18.11.2018**.
- [111] S. C. Hammer, J. M. Dominicus, P. O. Syrén, B. M. Nestl, B. Hauer, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7624–7629.
- [112] D. Kampen, Brønsted-Säure-katalysierte Hosomi-Sakurai-Reaktion und Prolin-katalysierte Mannich-Reaktion von Acetaldehyd (Doktorarbeit), Universität Köln, **2009**.
- [113] M. S. Taylor, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1550–1573.
- [114] S. J. Connon, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4013–4016.
- [115] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [116] R. Ménard, A. C. Storer, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1992**, *373*, 393–400.
- [117] S. Canaan, A. Roussel, R. Verger, C. Cambillau, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, *1441*, 197–204.

- [118] A. Bassegoda, F. I. J. Pastor, P. Diaz, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, 78, 1724–1732.
- [119] L. Mandrich, V. Menchise, V. Alterio, G. De Simone, C. Pedone, M. Rossi, G. Manco, *Proteins* **2008**, 71, 1721–1731.
- [120] S. Weidenweber, R. Marmulla, U. Ermler, J. Harder, *FEBS Lett.* **2016**, 590, 1375–1383.
- [121] B. M. Nestl, C. Geinitz, S. Popa, S. Rizek, R. J. Haselbeck, R. Stephen, M. A. Noble, M. P. Fischer, E. C. Ralph, H. T. Hau, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13, 275–281.
- [122] P. O. Syrén, S. Henche, A. Eichler, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, 41, 73–82.
- [123] R. M. Demming, M.-F. Fischer, J. Schmid, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 43–50.
- [124] S. C. Hammer, Zur Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklasen als Chirale Brønsted-Säuren in der asymmetrischen Katalyse (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2014**.
- [125] M. W. Huff, D. E. Telford, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, 26, 333–335.
- [126] K. U. Wendt, G. Schulz, E. Corey, D. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2812–2833.
- [127] K. U. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3966–3971.
- [128] Y. Gao, R. B. Honzatko, R. J. Peters, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1153–1175.
- [129] S. C. Hammer, A. Marjanovic, J. M. Dominicus, B. M. Nestl, B. Hauer, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 121–126.
- [130] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science (80-.)*. **1997**, 277, 1811–1815.
- [131] T. Hoshino, T. Sato, *Chem. Commun.* **2002**, 291–301.
- [132] G. Siedenburg, D. Jendrossek, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 3905–3915.
- [133] C. Feil, R. Süßmuth, G. Jung, K. Poralla, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 242, 51–55.
- [134] T. Sato, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 1171–1180.
- [135] B. A. Hess, L. Smentek, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1717–1720.
- [136] R. Rajamani, J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12768–12781.
- [137] I. Abe, M. Rohmer, G. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2189–2206.
- [138] K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, 286, 175–187.
- [139] D. J. Reinert, B. Gianni, G. E. Schulz, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 121–126.
- [140] R. D. Gandour, *Bioorg. Chem.* **1981**, 10, 169–176.
- [141] X. Wang, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1870–1872.
- [142] T. Hoshino, S. Nakano, T. Kondo, T. Sato, A. Miyoshi, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2,

- 1456–1470.
- [143] P. O. Syrén, S. C. Hammer, B. Claasen, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4845–4849.
- [144] C. R. Kennedy, S. Lin, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 12784–12814.
- [145] N. Ideno, S. Umeyama, T. Watanabe, M. Nakajima, T. Sato, T. Hoshino, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1873–1886.
- [146] T. Hoshino, Y. Kumai, I. Kudo, S. Nakano, S. Ohashi, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2650–2657.
- [147] J. Cheng, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1689–1699.
- [148] T. Hoshino, Y. Kumai, T. Sato, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 2091–2100.
- [149] Y. Yonemura, T. Ohyama, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem* **2012**, *10*, 440–446.
- [150] M. Seitz, P.-O. Syrén, L. Steiner, J. Klebensberger, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 436–439.
- [151] M. Seitz, J. Klebensberger, S. Siebenhaller, M. Breuer, G. Siedenburg, D. Jendrossek, B. Hauer, *J. Mol. Catal. B Enzym* **2012**, *84*, 72–77.
- [152] H. Tanaka, H. Noguchi, I. Abe, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5873–5876.
- [153] H. Tanaka, H. Noma, H. Noguchi, I. Abe, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *47*, 3085–3089.
- [154] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, M. Seitz, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 293–300.
- [155] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, B. Hauer, *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 3589–3593.
- [156] G. Siedenburg, D. Jendrossek, M. Breuer, B. Juhl, J. Pleiss, M. Seitz, J. Klebensberger, B. Hauer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 1055–1062.
- [157] J. M. Dominicus, Enzymatische Synthese von Neuartigen Heterozyklen Mit Triterpenzyklasen (Diplomarbeit), Universität Stuttgart, **2011**.
- [158] S. A. Bastian, S. C. Hammer, N. Kreß, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 4364–4368.
- [159] L. C. Kühnel, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2222–2225.
- [160] S. Fademrecht, Systematische Analyse von familienspezifischen Proteindatenbanken für die biotechnologische Anwendung (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2015**.
- [161] G. Siedenburg, M. Breuer, D. Jendrossek, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 1571–1580.
- [162] M. Seitz, Characterization of the Substrate Specificity of Squalene-Hopene Cyclases (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2012**.
- [163] Y. Azuma, A. Hosoyama, M. Matsutani, N. Furuya, H. Horikawa, T. Harada, H.

- Hirakawa, S. Kuhara, K. Matsushita, N. Fujita, et al., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5768–5783.
- [164] M. Akhujkar, S. A. Haveman, R. DiDonato, O. Chertkov, C. S. Han, M. L. Land, P. Brown, D. R. Lovley, *BMC Genomics* **2012**, *13*, DOI 10.1186/1471-2164-13-690.
- [165] C. M. Plugge, A. M. Henstra, P. Worm, D. C. Swarts, A. H. Paulitsch-Fuchs, J. C. M. Scholten, A. Lykidis, A. L. Lapidus, E. Goltsman, E. Kim, et al., *Stand. Genomic Sci.* **2012**, *7*, 91–106.
- [166] L. Feng, W. Wang, J. Cheng, Y. Ren, G. Zhao, C. Gao, Y. Tang, X. Liu, W. Han, X. Peng, et al., *PNAS* **2007**, *104*, 5602–5607.
- [167] N. Ward, Ø. Larsen, J. Sakwa, L. Bruseth, H. Khouri, A. S. Durkin, G. Dimitrov, L. Jiang, D. Scanlan, K. H. Kang, et al., *PLoS Biol.* **2004**, *2*, DOI 10.1371/journal.pbio.0020303.
- [168] Y. Nakamura, T. Kaneko, S. Sato, M. Ikeuchi, H. Katoh, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, K. Kawashima, T. Kimura, et al., *DNA Res.* **2002**, *9*, 123–130.
- [169] R. D. Barabote, G. Xie, D. H. Leu, P. Normand, A. Necsulea, V. Daubin, C. Médigue, W. S. Adney, C. X. Xin, A. Lapidus, et al., *Genome Res.* **2009**, *19*, 1033–1042.
- [170] A. Copeland, A. Lapidus, T. G. del Rio, M. Nolan, S. Lucas, F. Chen, H. Tice, J. F. Cheng, D. Bruce, L. Goodwin, et al., *Stand. Genomic Sci.* **2009**, *1*, 119–125.
- [171] B. Foster, R. Pukall, B. Abt, M. Nolan, T. G. del Rio, F. Chen, S. Lucas, H. Tice, S. Pitluck, J. F. Cheng, et al., *Stand. Genomic Sci.* **2010**, *2*, 1–8.
- [172] A. Pati, J. Sikorski, M. Nolan, A. Lapidus, A. Copeland, T. Glavina Del Rio, S. Lucas, F. Chen, H. Tice, S. Pitluck, et al., *Stand. Genomic Sci.* **2009**, *1*, 141–149.
- [173] J. C. Yang, R. Madupu, A. S. Durkin, N. A. Ekborg, C. S. Peadamallu, J. B. Hostetler, D. Radune, B. S. Toms, B. Henrissat, P. M. Coutinho, et al., *PLoS One* **2009**, *4*, DOI 10.1371/journal.pone.0006085.
- [174] S. Bastian, Stereoselektive enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse unter Verwendung einer Squalen-Hopen-Cyclase (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2016**.
- [175] L. Kühnel, Asparaginsäure-Vermittelte enzymatische Reaktionen (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2016**.
- [176] J. N. Bischoff, Enzymatische Lewis- Und Brønsted-Säure Katalysatoren für Carbonyl-aktivierte organische Reaktionen (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2016**.
- [177] S. Nakamura, K. Ishihara, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8131–8140.
- [178] S. W. Youn, S. J. Pastine, D. Sames, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 581–584.
- [179] J. Schelle, Einfluss des Substitutionsmusters von Arenen auf die Zyklen-

- katalysierten Friedel-Crafts Alkylierungen (Bachelorarbeit), Universität Stuttgart, **2017**.
- [180] T. Hoshino, T. Sato, *Chem. Commun.* **2002**, *4*, 291–301.
- [181] E. Eichhorn, B. Schilling, D. Wahler, L. Fourage, E. Locher, *Enzymes and Applications Thereof*, **2016**.
- [182] B. Seckler, K. Poralla, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *881*, 356–363.
- [183] M. B. Kim, J. T. Shaw, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3324–3327.
- [184] I. S. Marcos, M. A. Cubillo, R. F. Moro, D. Díez, P. Basabe, F. Sanz, J. G. Urones, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8831–8835.
- [185] S. S. Bhar, M. M. V. Ramana, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8935–8937.
- [186] T. Miyake, H. Kigoshi, H. Akita, *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *18*, 2915–2922.
- [187] M. A. González, D. Pérez-Guaita, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9612–9615.
- [188] S. C. Lin, R. J. Chein, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 1575–1583.
- [189] G. B. Evans, R. H. Furneaux, M. B. Gravestock, G. P. Lynch, G. K. Scott, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1953–1964.
- [190] A. Kumar, K. Dhar, S. S. Kanwar, P. K. Arora, *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 1–11.
- [191] K. Rezaei, E. Jenab, F. Temelli, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, *27*, 183–195.
- [192] K. C. Potter, J. Zi, Y. J. Hong, S. Schulte, B. Malchow, D. J. Tantillo, R. J. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 634–638.
- [193] J. Esque, C. Oguey, A. G. De Brevern, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 947–960.
- [194] M. R. Dunn, C. Otto, K. E. Fenton, J. C. Chaput, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1210–1219.
- [195] J. G. Gober, A. E. Rydeen, E. J. Gibson-O’Grady, J. B. Leuthaeuser, J. S. Fetrow, E. M. Brustad, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 394–397.
- [196] N. Nett, S. Dewel, A. A. Richter, S. Hoebenreich, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 685–691.
- [197] S. Racolta, P. B. Juhl, D. Sirim, J. Pleiss, *Proteins* **2012**, *80*, 2009–2019.
- [198] H. Singh, K. L. Mittal, *J. Chem. Educ.* **1969**, *46*, 185.
- [199] H. S. Taylor, *J. Phys. Chem.* **1923**, *27*, 322–341.
- [200] J. A. Young, J. G. Malik, *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 477.
- [201] J. Rétey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 355–361.
- [202] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375–1377.
- [203] L. Fan, C. Han, X. Li, J. Yao, Z. Wang, C. Yao, W. Chen, T. Wang, J. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2115–2119.
- [204] R. M. Demming, Enzymatische Hydratisierung kurzkettiger Fettsäuren und Alkene

- (Doktorarbeit), Universität Stuttgart, **2018**.
- [205] H. Yu, Y. Yan, C. Zhang, P. A. Dalby, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1–15.
- [206] K. Steiner, H. Schwab, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2012**, 2, e201209010.
- [207] A. Dror, E. Shemesh, N. Dayan, A. Fishman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 1515–1527.
- [208] L. Steiner, Zyklase-katalysierte Synthese von Naturstoffderivaten (Bachelorarbeit), Universität Stuttgart, **2012**.
- [209] W. Müller, *J. Chromatogr. A* **1990**, 510, 133–140.
- [210] K. Surendra, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 11992–11994.
- [211] E. Krieger, G. Vriend, *Bioinformatics* **2014**, 30, 2981–2982.

Anhang

Reinigung mittels IEX vom *Tel*SHC Wildtypenzym

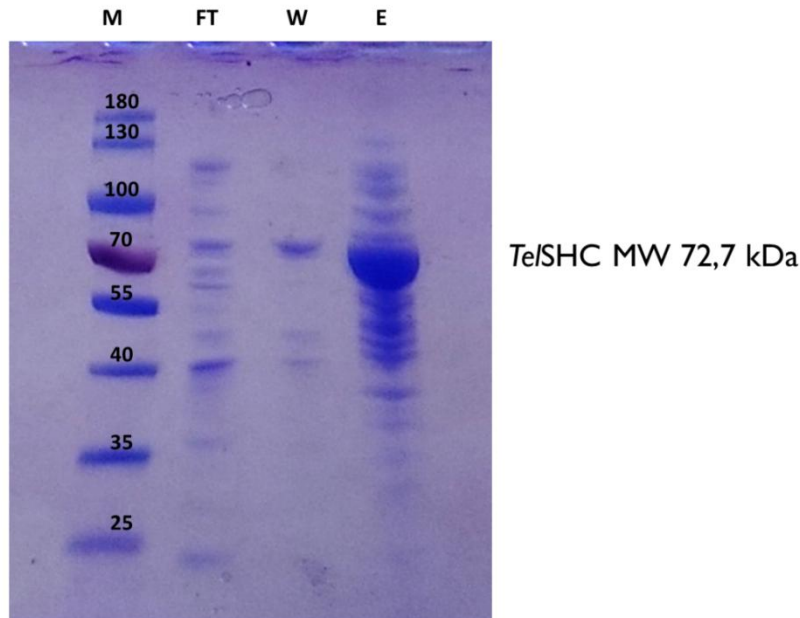


Abbildung A1: SDS-PAGE von der IEX-Reinigung der *Tel*SHC. M steht dabei für den Größenstandard, FT für den Durchfluss, W für den Waschschriff und E für die Elution der Ionenaustauscherchromatographie. MW entspricht der Abkürzung für die Molekularemasse.

Überblick der NCBI Nummern der SHCs

Tabelle A1: Überblick der am IBTB vorhandenen SHCs und deren NCBI Nummern.

Abkürzung	Ursprungsorganismus	NCBI Nummer
<i>Aac</i> SHC	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ASC07046.1
<i>Apa</i> SHC1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ACV59449.1
<i>Bam</i> SHC1	<i>Burkholderia ambifaria</i>	AJY25620.1
<i>Bam</i> SHC2	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ABI91648.1
<i>Bja</i> SHC	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ABQ33590.1
<i>Pca</i> SHC2	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	ABA87615.1
<i>Rpa</i> SHC1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ABJ08391.1
<i>Sco</i> SHC	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAB39697.1
<i>Sfu</i> SHC1	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	ABK17672.1
<i>Tel</i> SHC	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BAC09861.1
<i>Ttu</i> SHC	<i>Teredinibacter turnerae</i>	ACR13362.1
<i>Zmo</i> SHC1	<i>Zymomonas mobilis</i>	AVZ42714.1
<i>Zmo</i> SHC2	<i>Zymomonas mobilis</i>	AHJ71916.1

Vektorkarten

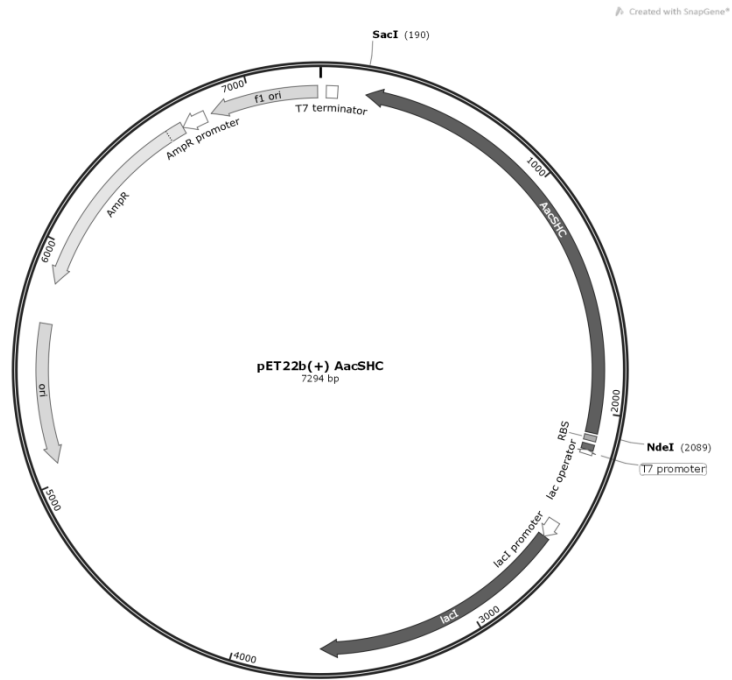


Abbildung A2: Vektorkarte der verwendeten *AacSHC*-Plasmide.



Abbildung A3: Vektorkarte der verwendeten *ZmoSHC1*-Plasmide.



Abbildung A4: Vektorkarte der verwendeten *TelSHC*-Plasmide.

Gen- und Aminosäuresequenzen der *AacSHC*, *TelSHC* und *ZmoSHC1*

Squalen-Hopen-Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*)

Gensequenz:

```
ATGGCCGGAACAGCTGGTGGAAAGCGCCGGCGTATGCGCGCACCCCTGGATCGCGCGGTGGAATATCTGCTGAGCTGCCAGAAAGATGAAGGCTATT
GGTGGGGCCCGCTGCTGAGCAACGTGACCATGGAAGCGGAATATGTGCTGCTGTCATATTCTGGATCGCGTGGATCGCATCGCATGGAATAA
AATTCCGGCTATCTGCTGCATGAACAGCGCGAAGATGGCACCTGGGGCGTGTATCCGGCGGCCCGCCCGCATCGGATACCACCATGAAGCG
TATGTGGCGCTGAAATATATTGGCATGAGCCCGCATGAAGAACCAGATGCAGAAAGCGCTGCGCTTTATTCAGAGCCAGGGCGGCATTGAAGCA
GCCCGTGTTCACCCGCATGTGGCTGGCGCTGGTGGCCGAATATCCCGTGGGAAAAGTCCCGATGGTGGCCGGGAAATATGTTCTTGGGCAA
ACGCATGCCGTGAACATTTATGAATTTGGCAGCTGGCGCGCGCGCAGCCGTTGGCGCTGAGCATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCC
CTGGCCGGAACGCCCGCGGTGCCGAACTGTATGAAACCGATGTGCCCGCGCCGCCGCGGAAAGCGCGGCGAAAGCGGGTGGATTTTGGATG
CGCTGGATCGCGCGCTGCATGGCTATCAGAAACTGAGCGTGCATCCGTTTCCCGCGCGCGGAAATTCGCCGCTGGATTGGCTGCTGGAACG
CCAGGCCGCGCATGGCAGCTGGGGCGGCATTCCAGCCCGCGTGGTTTATGCGCTGATTGCGCTGAAAATTCCTGGATATGACCCAGCATCCGGC
TTTATTAAGGCTGGGAAGCCGTGAACATGTATGGCGTGAACATGGAATATGCGCGCTGGATTGTTTCCAGGCGAGCATTAGCCCGGTGTTGGGATA
CCGGCCTGCGCTGTGGCTGGCGCGCCGGCTGCGCGGCATCATGATGCGCTGAAAGCGGGCGGAAAGCGGGGAAAGTGGATTCGCCCG
TACCCTGCGCGGCATTTGGCGGTGAAACGCCCGAACCGGCGGCCGTTTGGCTTTCAGTTTGATAACGTGTATTATCCGGATGTTGGAT
GATACCCGGTGGTGGTGGCGCTGAACACCTGCGCTGCGGCATGAACCGCGCCCGCGCATGCGATGACCAAAGGCTTTCCTGCTGGATTG
TGGGATGCAGAGCAGCAACGGCGGCTGGGGCGGATGATGTTGGATAACACAGCGATGTCGGAACCATATCCGTTTTCGATTTTGGCGA
AGTGAACCGATCCGCGGAGCGAAGATGTGACCCGCGCATGTGCTGGAATGCTTGGCAGCTTGGCTATGATGATGCTGGAAAGTGGATTCGCCCG
CGGGTGAATATCTGAAACCGGAAACAGAAACCGGATGCGAGCTGGTTTGGCCGCTGGGGCGTGAACATCTGATGACCAGCGCGCGTGGTGA
GGCGCTGAAAGCGGTGGGCATTGATACCCGCAACCTATATTCAGAAAGCGCTGGATTGGGTGGAAACAGCATCAGAACCCGGATGGCGGCTG
GGCGAAGATTGCCGAGCTATGAAGATCCGGCGTATCGGGCAAGGCGCGAGCACCCCGAGCCAGACCCGCTGGGCGCTGATGGCGCTGATT
CGGGCGCGCGCGGAAAGCGGAAAGCGCGCGCGCGCGCCTGCGCGGCATGATGTTGGGAAACCGCAAGCGCCGGATGGCGCTGGATGAACCTATT
ATACCCGACCCGGGTTCCCGGGCGATTTTTATCTGGGCTATACCATGTATCGCCATGTGTTCCGACCCGTCGCTGGCGGCTATAAACAGCC
GATTGAACGCCGCTAA
```

Aminosäuresequenz:

```
MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWGWPLLSNVTMEAEYVLLCHILDRVDRMEKIRRYLLHQREDGTWALYPPGPPDLDTTIEA
YVALKYIGMSRDEEPMQKALRFIQSQGGEISSRVFTRMNLALVGEYKVPVMPPEIMFLGKRMPLNIYFEGSWARATVVAISIVMSRQVFVFP
LPERARVPELYDTPVPPRRRGAAGGGGRIFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQQPFWYTLIALKILDMTQHPA
FIKWEGELELYGVDLDYGGWWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHRLVKAGEWLLDRQITVPGDWAIVKRPNLKPGGFQFDFNVYYPDVL
DTAVVVMALNSLRPLPDERRRRDMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDVDNNTDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDVTAHVLECFGFSFGYDDAWKVIIR
AVYLLKREQRPDGWSWFGWVNYLYGTGAVVPALKAVGLDVREFFIQKALDWVQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWALMALI
AGGRAESDSVRRGVQYLVEYLRQRPDGGWDEPYTGTGFPDGDFYLGYTMYRHVFFPTLALGRYKQAIR
```

Squalen-Hopen-Zyklase aus *Thermosynechococcus elongatus* (*TelSHC*)

Gensequenz:

```
ATGCCACCGAGCTGGCAACCGCAATTGATCCGAAACAGCTGCAGCAGGCAATTCGTGCAAGCCAGGATTTCTGTTAGCCAGCAGTATGCCG
AAGGTTATTGGTGGCGAGAAGCTGAAAGCAATGTACCATGACCGCAGAAGTTATTCTGCTGCATAAAATTTGGGGCACCGAACAGCGTCTGCC
GCTGGCAAAAGCAGAACAGTATCTGCGTAAATCATCAGCGTGATCATGGTGGTTGGAACTGTTTTATGGTGATGGTGGTATCTGAGCACCAGC
GTGGAAGCATATATGGGTCTGCGTCTGCTGGGTGTCCGGAAACCGATCCGGCACTGGTTAAAGCACGTCAGTTTATTCGGCAGTGGTGGTA
TTAGCAAAACCCGATTTTACCACACTGATCTGGCACTGATGTTGGTGTGATGATTGGCGTGGTATCCGAGCCTGCCCTCCGTGGATTTATGCT
GCTGCCGGAAGGTAGCCCGTTCACCATTATGAAATGAGCAGCTGGGCAAGTACGAGCAGCAGCCGTTCCGCTGCTGATGTTATGGATCGTAAACCG
GTTTATGGTATGGACCCTCCGATTACCCTGGATGAACTGTATAGCGAAGGTGCTGCAAAATGTTGTTTGGGAAGTCCCTCGTCAGGGTGATTGGC
GTGATGTTTTTATGGTCTGGATCGTGTGTAACTGTTTGAACCCGTAATATCATCCGCTGCGTGAACAGGGTCTGAAAGCAGCAGAAAGA
ATGGGTTCTGGAACCGTCAAGAAGCATCAGGCGATTGGGGTGGTATTATCCGGCAATGCTGAATAGCCTGCTGGCAGTGGTGCAGTGGATTAT
GCAATGATGATCCGATGTTGTTCAGCGTGGTATGGCAGCAGTGTGATCGTTTGGCAATGAAACCGAAACCGAATATGATGCTGTCGCTGTTA
GTCCGGTTTGGGATACCGCACTGGTTATGCGTGAATGTTGATAGCGGTGTTGCACCGGATCATCCGCTGCTGGTGAAGCCGGTGAATGGCT
GCTGAGCAAACAATTTGATTGATTGCGGATGCGCATATAAAATAAAAGGTCGTCGGGTGGTGGGCATTTGAATTTGAAAATCCTGTTT
TATCCGGATGTGGATGATACCGCAGTGTGTTGTTATGGCCCTGCATGCAAGTACCCTGCGCAATGAAAATCTGAAACGCTGGTGAATGAACGTC
CAGTTGCATGGATTGCAAGCATGCAGTGCCGTCCTGGTGGCTGGCAGCAGCATTTGATGTTGATAATGATCAGGATGGCTGAATGGTATTCCGTA
TGGTGTATCTGAAAGCAATGATTGATCCGAATACCGCAGATGTTACCAGCAGTGTCTGGAAATGGTGGTCTGGTGCAGTGGCATTGATCGT
GTTGCACTGGATCGTGACTGGCATATCTGCGCAATGAACAAGACCGGAAGGTTGTTGGTGGTGGTGGGTTGTTAATTTATCTGTATGGCA
CCAGCGGTTCTGACCGCAGTGGTGGTGCACCGGTTTATGATCGTGGCGTATTCGTCGTCAGCAGAAATGGCTGATGCAGTGTGAGAA
TCAGACCGGTTGGTGGGTGAAACCTGTTGGAGCTATCATGATCCGAGCCTGAAAGTTAAAGTTGATAGCACCGCAAGCCAGCAGCAGCATGGCA
ATTATGGTCTGCTGGCAGCCGTTGATGCAACCGGTTTATGCAACCGAAGCATTGAACTGGTATTGCATATCTGCTGAAACCCAGCGTC
CGGATGGCACCTGGCATGAAGATTATTTTACCAGCAGCGTTTCCGTGCCATTTTTATCTGAAATACCCTATTTATCAGCAGCATTTCCGCT
GACCGCTCTGGGTGCTTATGCCCGTTGGCGTAACTGCTGGCAACC
```

Aminosäuresequenz:

```
MPTSLATAIDPKLQQAIRASQDFLFSQQAEGYWAAELESNTMTAEVILLHKIWGTEQRLPLAKAEQYLRNHQRDHGGWELFYDGGDLSTS
VEAYMGLRLLGVPETDPAVKARQFIFLARGGISKTRIFTKLHLALIGCYDWRGIPSLPWIIMLLPEGSPFTIYEMSSWARSTVPLLIIVMDRKP
VYGMDFPIITLDELYSEGRANVWELPRQGDWRDVFIGLDRVFKLFETLNHPLREQGLKAAEWWLERQASGDWGGII PAMLNLSLLALRALDY
AVDDPIVQRGMAAVDRFAIETETEYRVQPCVSPVWDTALVMMRAMVDVSGVAPDHPALVKAGEWLLSKQILDYGDWHIKNKKRPPGGWAFEFENRF
YPDVDDTAVVVVMALHAVTLNENLKRRAIERAVAWIASMQCRPGGWAADFVDNDQDNLNGIPIYGDVKAMIDPNADVTRVLEMVGRCLAFDR
VALDRALAYLRNEQEPEGCWFGRWVNYLYGTSGVLTALSVAAPRYDRWRIRRAAEWLMQCQNADGGWGETCWSYHDPCLKKGKDSTASQTAWA
IIGLLAAGDATGDYATEAIEIRGIAYLLETQRPDGTWHEDYFTGTGFPCHFYLKYHYQQHFPLTALGRYARWRNLLAT
```


Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1)

Gensequenz:

```
ATGGGTATTGACAGAATGAATAGCTTAAGTCGCTTGTTAATGAAGAAGATTTTCGGGGCTGAAAAACCTCGTATAAACCGGCTCCGATACCA
TAATCGGAACGGATACCCTGAAAAGACCGAACCGGGCGCTGAACCGACGGCAAAAGTCGACAAAACGATATTCAGACTATGGGAATAGTCT
GAATAATACCCTTGTTTTAGCCTGTGACTGGTTGATCGGACAACAAAAGCCCGATGGTCATTGGGTCGGTGCCTGGAAATCCAAATGCTTCGATG
GAAGCAGAATGGTGTCTGGCCTTGTTGGTTTTGGGTCTGGAAGATCATCCGCTTCGTCCAAGATTGGGCAATGCTCTTTGGAAATGCAGCGGG
AAGATGGCTCTTGGGGAGTCTAATTTTCGGCGCTGGAATGCGGATATCAATGCCACGGTTGAAGCCTATGCGGCCCTGCGGCTTTGGGGTATTC
TGCCGATAATCCTGTTTTGAAAAAGCGGCAGCATGGATTGCTGAAAAAGCGGATTAATAAATATCCGTGCTTTTACCCTGTTATTGGCTGGCG
TTGATCGGGGAATGGCCTTGGGAAAAGACCCCTAACCTTCCCCCTGAAATATCTGGTCCCTGATAATTTTGTCTTTTCGATTTATAATTTTG
CCCAATGGGCGGGCAACCATTGGTGGCGATTGCTATTCTGTCCGAGACGACCAAGCCCGCTGCGCCCTCAAGACCGATTGGATGAAT
GTTTCCAGAAGCCCGCTCGCTTTGATTATGAATTGCCGAAAAAGAGGCATCGATCTTTGGTCGCAATTTTCCGAAACCTGACCGTGGA
TTACATTGGGTTCACTCAATCTGTTAAAGCGCAATAGCTTGCCTGAAGCCGCTATCCGTGATGTTTTGGAATGGATTATCCGGCATCAGGATG
CCGATGGCGGTTGGGGTGAATTCAGCCACCTTGGGCTATGTTTGTATGGCGTTACATGGTGAAGGCTATCAGCTTTATCATCCGGTATGGC
CAAGGCTTTGTGGCTTTGGATGATCCCGGTTGGCGACATGACAGAGGCGAGTCTTCTTGGATACAGGCCACCAATAGTCCGGTATGGGATACA
ATGTTGGCCTTGATGGCGTTAAAAGACGCCAAGGCCGAGGATCGTTTTTACGCCGAAATGGATAAGGCCCGCATGGCTTTTGGCTCGACAGG
TCAAAGTCAAAGCGATTGGTCAATCAAAGTCCCGATGTTGAACCCGTTGGATGGGCATTTGAATATGCCAATGATCGCTATCCCGATACCGA
TGATACCGCCGCTCGCTTTGATCGCCCTTTCCTCTTATCGTGATAAGGAGGAGTGGCAAAAGAAAGCGCTGAGGACGCCATTACCCGTGGGGTT
AATTGGTTGATCGCCATGCAAAGCGAATGTGGCGGTTGGGGAGCCTTTGATAAGGATAATAACAGAAGTATCCTTTCCAAAATTCCTTTTTGTG
ATTTCCGAGAATCTATTGATCCGCTTTCAGTCGATGTAACGGCCGATGTTTTAGAGGCTTTGGCACCTGGGACTGTCCCGCATATGCGCGT
CATCCAAAAGCGATCGACTATGTCCGTTCCGAACAGGAAGCCGAAGGCGCGTGGTTTGGTCTGTTGGGGCTTAATTATATCTATGGCACCGGT
GCGGTTCTGCCTGCTTTGGCGGCGATCGGTGAAGATATGACCCAGCCTTACATACCAAGGCTTGGCATTTGGCTGGTTCGCACATCAGCAGGAAG
ACGGCGGTTGGGGCGAAAGCTGCTCTTCCCTATATGGAGATTGATTCCATTGGGAAGGGCCCAACCACGCCGTCAGACTGCTTGGGCTTTGAT
GGGTTGATCGCGGCCAATCGTCCCGAAGATTATGAAGCCATTGCCAAGGATGCCATTATCTGATTGATCGCCAAGAGCAGGATGGTAGCTGG
AAAGAAGAAGAATTCACCGGCACCGGATTTCCCGGTTATGGCGTGGGTGAGACGATCAAGTTGGATGATCCGGCTTTATCGAAACGATTGCTTC
AAGGCGCTGAACGTGTCACGGGCTTTATGCTGCGTTATGATTTTATCGGCAATCTTCCCGATTATGGCGTTAAGTCGGGCAGAGACTGAT
TGATTTGAATAATTGA
```

Aminosäuresequenz

```
MGIDRMNSLSRLLMKKIFGAEKTSYKPSADTIIGDTLKRPNRRPEPTAKVDKTIKFTMGNSLNNTLVSACDWLIGQQKPDGHVVGAVESNASM
EAEWCLALWFLGLEDPRLRPNLGNALLEMQREDGWSWVYFGAGNGDINATVEAYAALRSLGYSADNPVLKKAAWIAEKGLKNIIRVFTRYWLA
LIGEPWEKTPNLPPEIIWFDPDNFVFSIYNFAQWARATMVPIAILSRARPSRPLRPQDRLELDFEGRARFDYELPKKEGIDLWSQFFRTRDRG
LHWVQSNLLKRNLSLREAAIRHVLEWIIHQDADGGWGGIQQPPWVYGLMALHGEQYQLYHPVMAKALSALDDPGRHRDRGESSWIQATNSPVWDT
MLALMALKDAKAEDRFTPEMDKAADWLLARQVKVGDWSIKLPDVEPGGWAFEYANDRYPDTDDTAVALIALSSYRDKKEEWQKKGVEDAITRGV
NWLIAMQSECGGWGAFDKDNNRSILSKI PFCDFGESIDPPSVDVTAHVLEAFGLGLSRDMPVIQKAIIDYVRSEQEAEGAWFGRWGVNYIYGTG
AVLPALAAIGEDMTQPYITKACDWLVAHQQEDGGWGESCSYMEIDISIGKGP TTPSQTAWALMGLIAANRPEDYEAIKAGCHYLIDRQEQDGSW
KEEFTGTGFPYGVGQTIKLDPA LSKRLLQGAELSRFMLRYDFYRQFFPIMALSRAERLIDLNN
```

Aminosäuresequenzen der anderen SHCs

Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus *Acetobacter pasteurianus* (ApaSHC1)

MNMAFRSLKILRSGSDTQGTNVNTLIQSGTSDIVRQKPAQEPADLSALKAMGNSLTHLSSACEWLMKQKQKPDGHWVGSVGSNASMEAEWC
LALWFLGLEDHPLRRLGKALLEMQRDPDGSWGTYYGAGSGDINATVESYAALRSLGYAEDDPAVSKAAAWIISKGLKKNRVVFTRYWLALIGEW
PWEKTPNLPPEIIFWPDNFVFSIYNFAQWARATMMPLAALSARRPSRLRPQDRDLALFPGGRANFDYELPTKEGRDVIADFFRLADKGLHLWLO
SSFLKRAPSREAAIKYVLEWI IWHQDADGGWGGIQPPWVYGLMALHGEYQFHHPVMAKALDALNDPGRHDKGDASWIQATNSPVWDTMLSLM
ALHDANAEEERFTPEMDKALDWLRSRQVRVKGDWSVKLPNTEPGGWAFYANDRYPTDDTAVALIAIASCRNRPEWQAKGVVEAIGRGRVRLVA
MQSSCGGWAFDKDNNKSI LAKI PFCD FGEALDPPSVVTAHVLEAFGLLGLPRDLPCIQRGLAYIRKEQDPTGPFWGRWGVNLYGTGAVLPA
LAALGEDMTQPYISKACDWLINCQQENGGWGESCASYMEVSSIGHGATTSPQTAWALMGLIAANRPQDYEAIAKGCRYLIDLQEEEDGSWNEEF
TGTGFPYGVGQTIKLDPAISKRMLQGAELSRAFMLRDLRQLFPIIALSRASRLIKLGN

Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus *Burkholderia ambifaria* (BamSHC1)

MNDLTEMATLSAGTVPAGLDAAVASATDALLAAQNADGHVVYLEADSTIPAEVLLVHYLGETPNLELEQKIGRYLRRVQOAGGGWPLFTDGA
PNISASVKAYFALKVIGDDENAEHMQRRARAIQAMGGAEMSNVFTRIQLALYGAIPWRAPVPMMPVEIMLLPQWFFHLSKVSYWARTVIVPLLV
LNAKRPIAKNPRGVRIDELFDVDPVFNAGLLPRQGHQSPGWFAFFRVVDHALRAADGLFPNYTRERAIRQAVSFVDERLNGEDGLGAIYPAMANA
VMYDVLGYAEDHPNRAIARKSIEKLLVVEDEAYCQPCLSPVWDTSLAAHALLETGDARAEAEVIRGLEWLRPLQILDVRGDWISRRPHVRPG
GWAFQYANPHYPDVDDTAVVAVAMDVRVQKLNKNDAFRDSIARAREVWVGMQSSDGGWGAFFEPENTQYYLNNIPFSDHGALLDPPADVSGRCLS
MLAQLGETPLNSEPARRALDYLKEQEPDGSWYGRWGMNYVYGTWTALCALNAAGLTPDDPRVKRGAQWLLSIQNKDGGWGEDGDSYKLNRYRGF
EQAPSTASQTAWALLGLMAAGEVNNPAVARGVEYLIAEQKEHGLWDETRFTATGFPRVYLYRYHGYRKFPLWALARYRNLRNNATRVTFGL

Squalen-Hopen-Zyklase 2 aus *Burkholderia ambifaria* (BamSHC2)

MIRRMNKSGPSWSALDAAIARGDALMRLQQPDGSWCFELESATITAEYIIMMHFMDKIDDAEQEKMARYLRAIQRLDTHGGWDLVYDGDPP
VCSVKAYFALKAAGDSEHAPHMVRARDAILELGAARSNVFTRI LLATFGQVPWRATPFMPIEFVLPFKWVPI SMYKVAYWARTMVPLLVLC
SLKARARNPRNIAIPELFTVTPDQERQYFP PARGMRRALDRVVRHVEPLLKRLRQRAIRHAQAWCAERMNGEDGLGGIFPPIVYSYQMMD
VLGYDDHPLRRDCENALEKLLVTRPDGSMYCQPCLSPVWDTAWSTMALEQARGVAVPEAGAPASALDELDAIRARAYDWLAERQVNDLRGDWI
ENAPADTQPGGWAFQYANPHYIPIIDDSAVVTAMLDRRGRTRHRNADGSHPYAARVARALDWMRGLQSRNNGGFAAFDADCDRLYLNAI PFADHGAL
LDPPTEDVSGRVLFCFGVTKRADDRASLARAI D YVKRTQPPDGSWWRGWTNYLYGTWSVLGALAGEDPSQPIARALAWLRARQHADGGWG
ETNDSYIDPALAGTNAGESTSNTAWALLAQMAFGDGESESVRRGIAYLQSVQDDGFWHRSHNAPGFPRIFYLYKHYGYTAYFPLWALARYRR
LAGGVSAAGAHAVPASTGADAALA

Squalen-Hopen-Zyklase aus *Bradyrhizobium japonicum* (BjaSHC)

MTVTSSASARATRDPGNYQTALQSTVRAAADWLIANQKPDGHWVGRAESNACMEAQWCLALWFMGLEDHPLRKRGLQSLDLSQRPDGAWQVYFG
APNGDINATVEAYAALRSLGRDDEPAVRRAREWIEAKGGLNRNIRVFTRYWLALIGEPWPKTPNIPPEVIWFFLWFFFSIYNFAQWARATLMP
IAVLSARRPSRLPFPENRLDALFP HGRKAFDYE L P V K A G A G W D R F R G A D K V L H K L Q L N G R N L N L G L F R P A A T S R V L E W M I R H Q D F D G A W G G I
Q P P W I Y G L M A L Y A E G Y P L N H P V L A K G L D A L N D P G W R V D V G D A T Y I Q A T N S P V W D T I L T L L A F D D A G V L G D Y P E A V D K A V D W V L Q R Q V R V P G D W S
M K L P H V K P G G W A F E Y A N N Y P D T D D T A V A L I A L A P L R H D P K W K A K G I D E A I Q L G V D W L I G M Q S Q G G W G A F D K D N N Q K I L T K I P F C D Y G E A L D P
P S V D V T A H I I E A F G K L G I S R N H P S M V Q A L D Y I R R E Q E P S G P W F G R W G V N Y V Y G T G A V L P A L A A I G E D M T Q P Y I G R A C D W L V A H Q Q A D G G W G E S C
A S Y M D V S A V G R G T T A S Q T A W A L M A L L A A N R P Q D K D A I E R G C M W L V E R Q S A G T W D E P E F T G T G F P Y G V G Q T I K L N D P A L S Q R L M Q G P E L S R A F
M L R Y G M Y R H Y F P L M A L G R A L R P Q S H S

Squalen-Hopen-Zyklase 2 aus *Pelobacter carbinolicus* (PcaSHC2)

MNVIRQLNSGVNAAKSLDDGIESAIEWLAENQDKEGFVGMLESNSCIEAEWILAMHLLGVKDDPKYDKVQVAILNEQREDGSWAVYDAPAGD
INATVEAYAALRTAGFGAGDERLIKARNWIFSHGGLKNRVVFTRYWLALIGEPWDETPALAPEI IYLPAWCPLNIYDFACWARATLVPLSVLS
VRRPVKPLPAESRLDELPEFEGRENADYSLPESEKGLAERFFLVVDWFLKKNRPLPMQFGREKAI RLCLEWIVRHQDYDGGWGGIQPPLIYSLIA
LNTEGYGINHPVISKGLDAFNPPWAYEYKNGGVYLQCSSEPVWDTLFTMLALFESGCSFDDTPMMRPALDWILSKQITSWGWDQVKVGRVPPGGW
AFERANTAYPDVDDTALALVLAEARRHVKDSAAVDAALERAEEWILGLQCRNNGGWAFFDRDNNNSAIVTKI PFCD FGEVLDPPSVVTAHVVEA
LAALGRDRHDPVVARALKYIRSEQEPGGSWFGRWGVNHIYGTCAVLPAALAAIGEDMRAPYVLRADWLVHRQNDGGWGESCASYMDDSCQCGQ
SSTASQTGWALMALVAMSHDYDEAIRGLDYLLSHQKSGTWDEPQYTGTFPGYGVGERTNLKEAGATLDQGCCELARGFMINYMYRHYFPLI
AMARARRHLGLAANPRHQDSRSSVEVAPEALRGRACC

Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus *Rhodopseudomonas palustris* (RpaSHC1)

MDSILAPRADAPRNIDGALRESVQQAADWLVANQKPDGHWVGRAETNATMEAQWCLALWFLGLEDHPLRRLGRALLDTPDQAWHVFYAGPN
GDINATVEAYAALRSLGRDDEFLRKARDWILSKGGLANIRVFTRYWLALIGEPWPKTPNIPPEVIWLPWFPPFSIYNFAQWARATLMP IAV
LSAHRPSRPLAPQDRDLALFPQGRDSFNVDLPARLGAQVWDVIFRKIDTILHRLQDWGARRGPHGIMRRGAI DHVLQWI IRHQDYDGSWGGIQP
PWIIYGLMALHTEGYAMTHPVMKALDALNEPGWRIDIGDATFIQATNSPVWDTMLSLLAFDDAGLGERYPEQVERAVRWLKRQVLVPGDWSVK
LPDVKPGGWAFYANNFYPTDDTSVALMALAPFRHDPKWAEGIEDA IQRGIDWLVAMQCKEGGWGAFDKDNDKILAKI PFCD FGEALDPPS
ADVTAHIEEFAKVLDRNHPSIVRALDYLKREQEPGPFWGRWGVNHIYGTCAVLPAALAAIGEDMRQPIARACDWLIARQQANGGWGESCVS
YMDAQAGEGTATASQTAWALMALIAADRPPQDRDAIERGCLYLTETQRDGTWQEVHYTGTGFPYGVGQTIKLNPLLSKRLMQGPELSRSFML
RYDLRYHYFPMMAIGRVLRLQRGRSGH

Squalen-Hopen-Zyklase aus *Streptomyces coelicolor* (ScoSHC)

MTATTGSGTASLRPLAASASDITIPAAAAGVPEAAARATRRATDFLLAKQDAEGWVKDLETNVTMDAEDLLRQLG IQDEETTRAAALF
IRGEQREDGTWATFYGGPGLSTTIEAYVALRLAGDSPEAPHMARAEEWIRSRGGIASARVFTRIWLALFGWKKWDDLPELPELIYFPTWVPL
NIYDFGCWARQTI VPLTIVSAKRPVRPAFFPLDELHTDPARPNPRLPAPVAVSNDGAFQRI DKALHAYRKVAPRRLRRAAMNSAARWI IERQEN
DGCWGGIQPPAVYSVIALYLLGYDLEHPVMRAGLES LDRFAVWREDGARMIEACQSPVWDTCLATIALADAGVPEDHPQLVKASDWMLGEQIVR
PGDWSVKRPLPGGWAFEFHNDNYPDI DDTAEVVLALRRVRHHDPERVEKAI GRGVRWNLGMQSKNGAWGAFVDNNTSAFPNRLPFCD FGEVI

Anhang

DPPSADVTAHVVEMLAVEGLAHDPRTRRGIQWLLDAQETDGSWFRWGVNYVYGTGSVI PALTAAGLPTSHPAIRRAVRWLESVQNEDEGGWGED
LRSYRYVREWSGRGASTASQTGWALMALLAAGERDSKAVERGVAWLAATQREDGSWDEPYFTGTGFPWDFSINYNLYRQVFLPTALGRYVHGEP
FAKKPRAADAPAEAAPAEVKGS

Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus *Syntrophobacter fumaroxidans* (*SfuSHC1*)

MRRLDTFPPEIPTGSRDKPPSGEEHSCSTPAEPLRSRLDEGILRAVDWLVCQHPDGFWAGMLQSNCSMEAEWVLMHFLLGIDDDPKYDGVIRA
ILGEQRADGSWGVFHKAPNGDINTTVECYAALRASGLAPESAPLSSAREWILAGGGLANIRNFTKYWLALIGEWPWEGTPTIPPELIFFPPRMP
LNIYHFASWARSTIVPLSILSARRPVRPLPEDRRLELFPQGRSAFDRLPRKDGWLSWEGFFHVCDRI LRLYARTRRAPFRETAIRVCLWEI I
RRQETDGAWSGIQPPWIYALLALHAEGYGLDHPILRAGLRAFDSHWSYERDGGIYLQASESPVWDTVLSLRALADCGEERKASVSIASALEWLL
NRQISVPGDWAVRVSPVPCGGWAFQANSFYPDVDDTAVAIIEVLARLRPFTANQSAVDRAIRSARDWVLMAMQCSNGGWAADFDRDNDFKLVTKIP
FCDFGELLDPPSVDVTAHVIEALALGWDMSREIEAAVSFIRREQEAGSWFRWGVNHIYGTATVLPALRAIGEDMSAYVLRADWLASRQ
NADGGWGETPASYMDDSLRGVGESTASQTAWAIMGLVAVGSGAHDVTVRGIDFLLFAHQHGGTWEPPQYTGTFPGYSVGERIRLRDMGASLKQ
GTELQRAFMINYNLYRHYFPLMALGRARYHLQLRRSAREGGNGETTPNGSAL

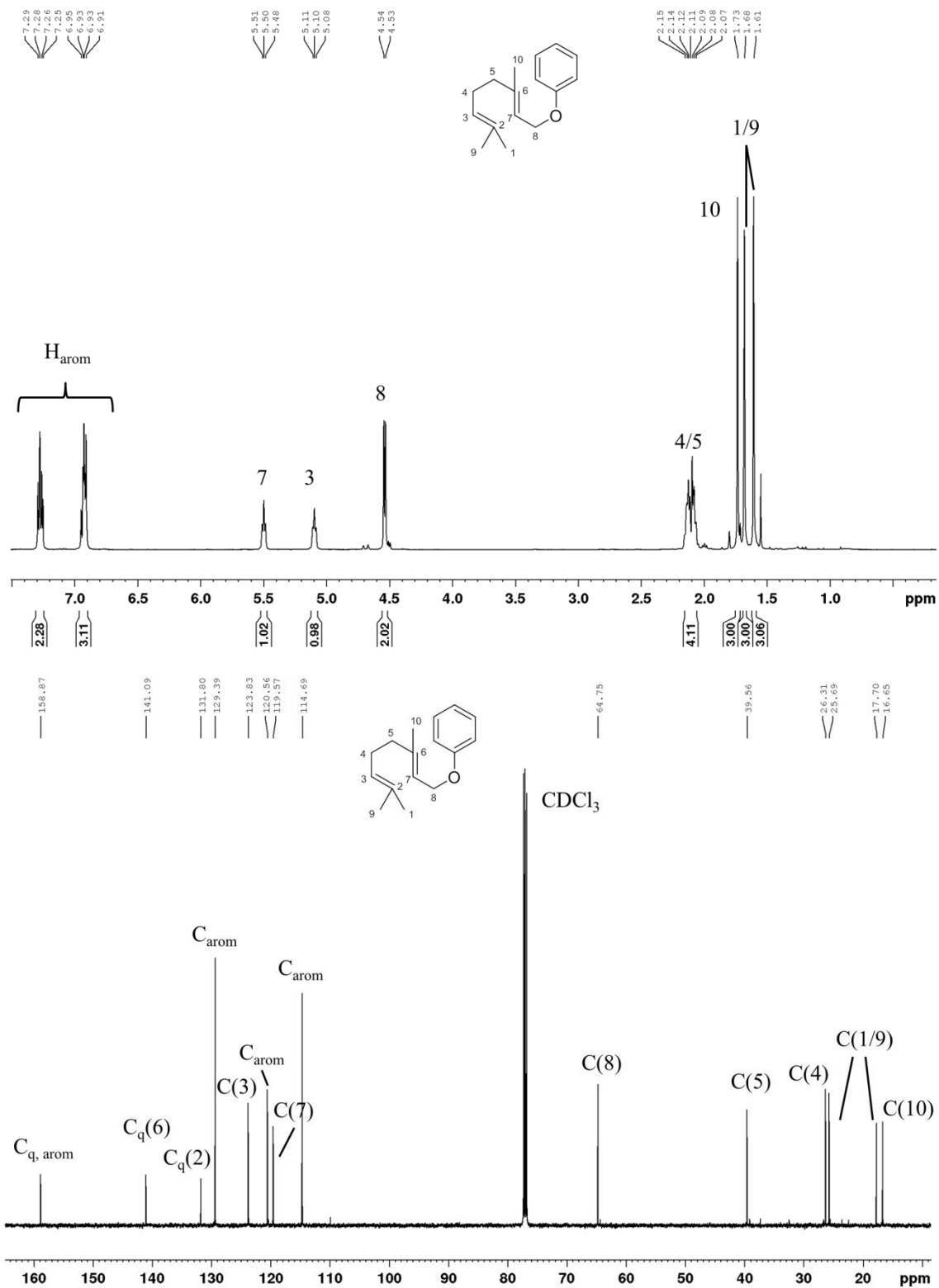
Squalen-Hopen-Zyklase aus *Teredinibacter turnerae* (*TtuSHC*)

MEIQDEVLDLEPQESLTASADSAVDRALFWLLDAQYEDGYWAGILESNACMEAEWLLCFHVLGIANHPMSRGLVQGLLQQRADGSWDVYYGAR
AGDINTTVEVYAALRCQGYAADHPDIKRARDWIQLQGGVKQVRVTRFWLALIGEWPWEETPNLPPEILFFPRWFFPNIYHFAAWARATLVPLC
ILSARRMVVPLNKKKSCLELFPEDRSVAVVALGKAGAWSTFFYHADRALKKYQRTFKRPPGRQQAIKMCLEWILRRQDADGAWGGIQPPWIYSL
MALKAEGYPVTHPVMAGLAALDAHWSYERPGGARFVQACESPVWDTLLSSFALLDCGFSTSSSELKRAVDWILDQQVLLPGDWQQKLPVSP
GGWAFERANVHYPDVDDTAVALIVLAKVRPDYPTARVNLAIERGLNWLAFAMQCRNGGWAFAFDKDNKDLLTKIPFSDGETIDPASVDVTAHV
LEALGLLGYRTHPAVAKALEFIRSEQENDGCWFRWGVNHIYGTAAVLPALASLNMNMNQEFIRRAANWILGKQNNDDGGWGESCASYMDDTQR
GRGPSTASQTAWAMMSLLAVDGGTYAESLLRAEAYLKTQTPEGTWDEPYTGTGFPYGIIGRREIKRQRLQQAELSRGFMINYNLYRHYFP
LMALGRLAALRGA

Squalen-Hopen-Zyklase 2 aus *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC2*)

MTVSTSSAFHHSPLSDDVEPIIQKATRALLEKQQQDGHVWFELEADATI PAEYILLKHYLGEPEDLEIEAKIGRYLRRIQGEHGGWSLFYGGDL
DLSATVKAYFALKMIGDSPDAPHMLRARNEILARGGAMRANVFTRIQLALFGAMSWEHVQMPVELMLMPEWFPVHINKMAYWARTVLPVLLVL
QALKPVARNRRIILVDELFPVPLPTLQESGDP IWRFFSALDKVLHKVEPYWPKNMRKAIHSCVHFVTERLNGEDGLGAIYPAIANSVMYD
ALGYPENHPERAIARRAVEKLMVLDGTEDQGDKEVYCQPLSP IWDALVAHAMLEVGGDEAEKSAISALSWLKPPQIILDVKGDAWRRRDLRP
GGWAFQYRNDYYPDVDDTAVVTMAMDRAAKLSDLHDDFEESKARAMEWTIGMQSDNGGWAFAFDANNSYTYLNNIPFADHGALLDPPTVDVSARC
VSMMAQAGISITDPKMKAAVDYLLKEQEEEDGSWFRWGVNHIYGTWSALCALNVAALPHDHLAVQKAVAWLKTIQNEDEGGWGENCDSYALDYSG
YEPMDSTASQTAWALLGLMAVGANSEAVTKGINWLAQNQDEEGLWKEDYSSGGGFPRVYLYRHYGYSKYFPLWALARYRNKKANQPIVHYGM

NMR-Spektren

Abbildung A5: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung **15**.

Anhang

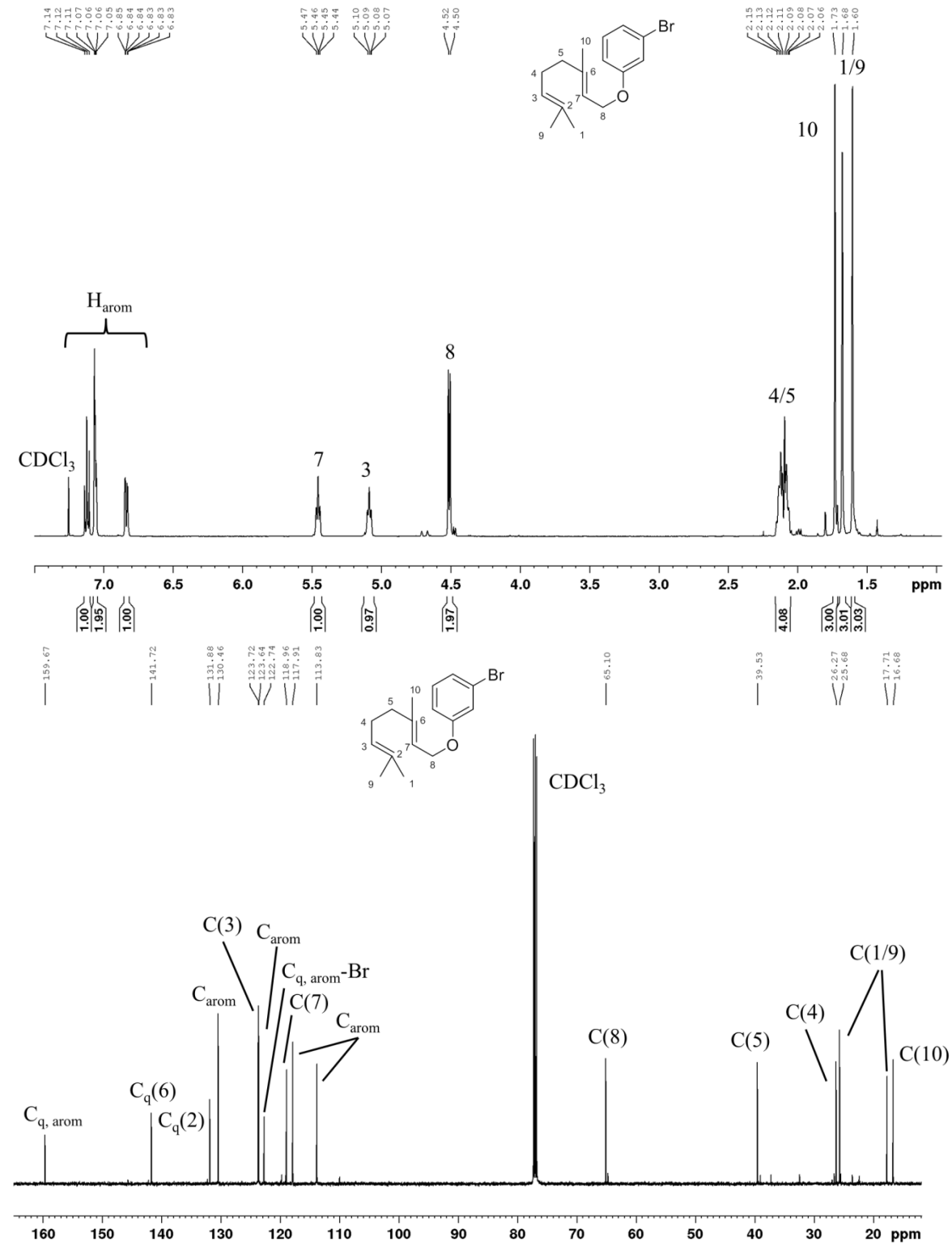


Abbildung A6: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung 32.

Anhang

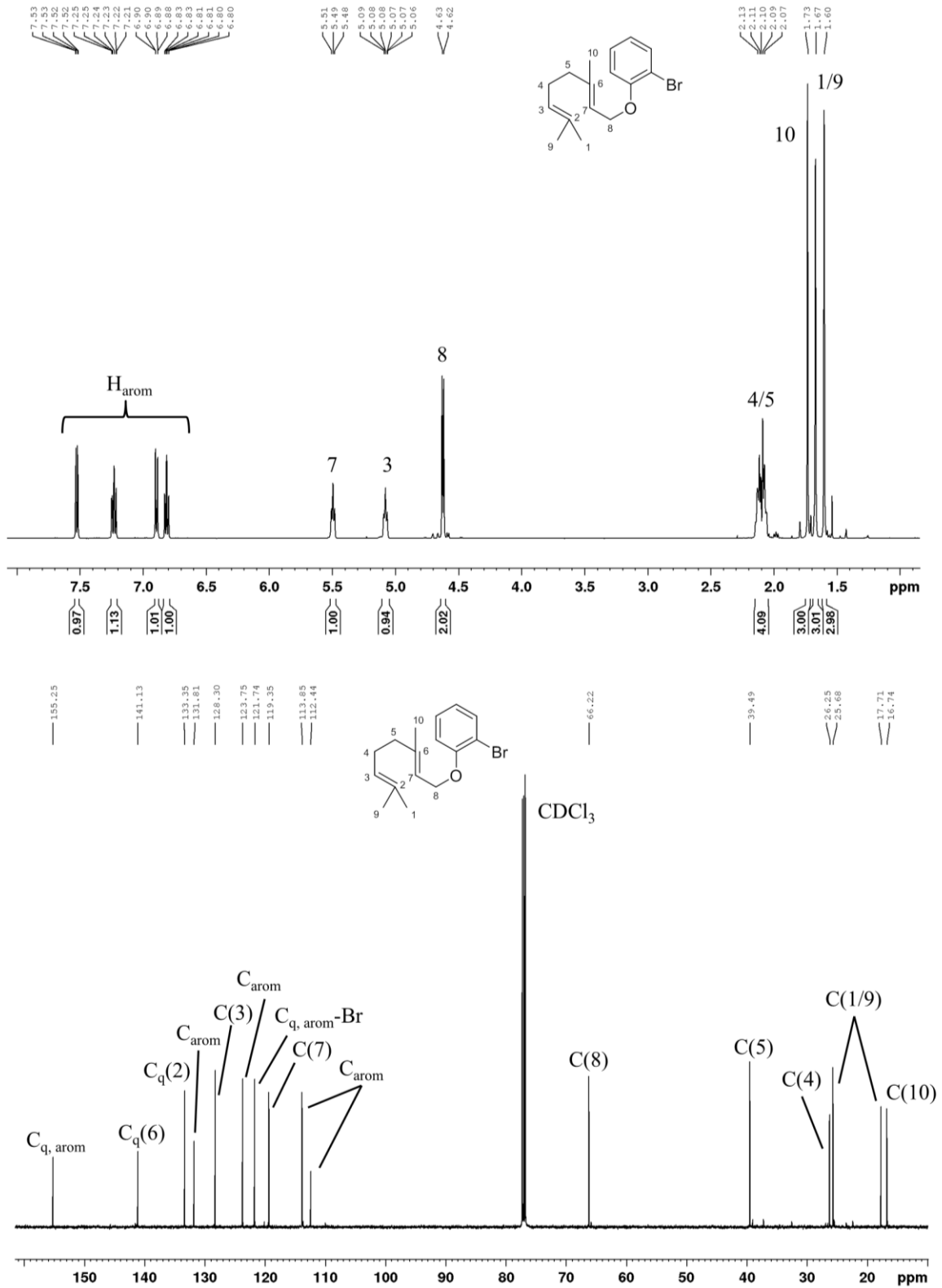


Abbildung A7: ^1H -NMR-Spektrum (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten) von Verbindung **33**.

Anhang

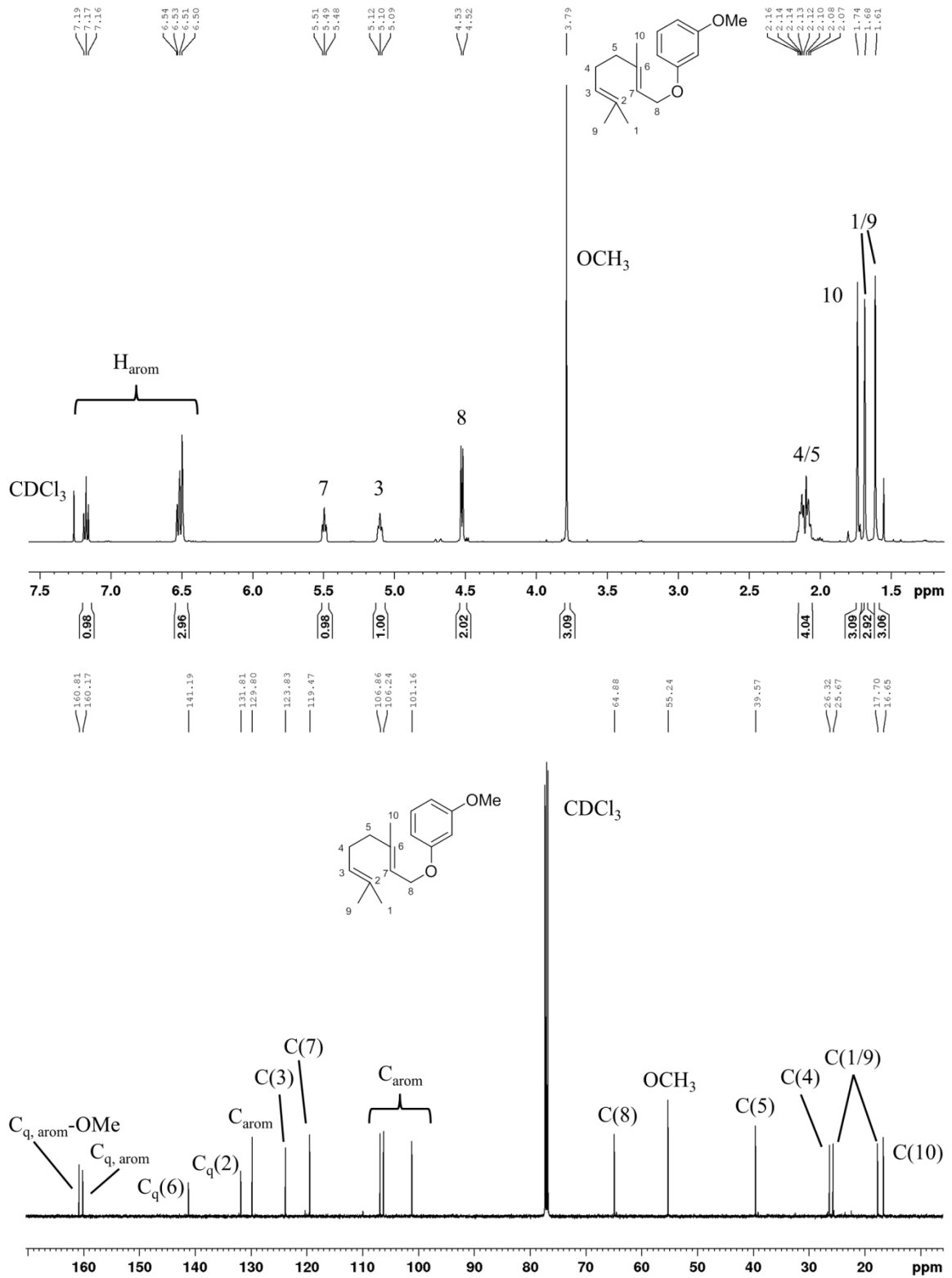


Abbildung A8: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung **34**.

Anhang

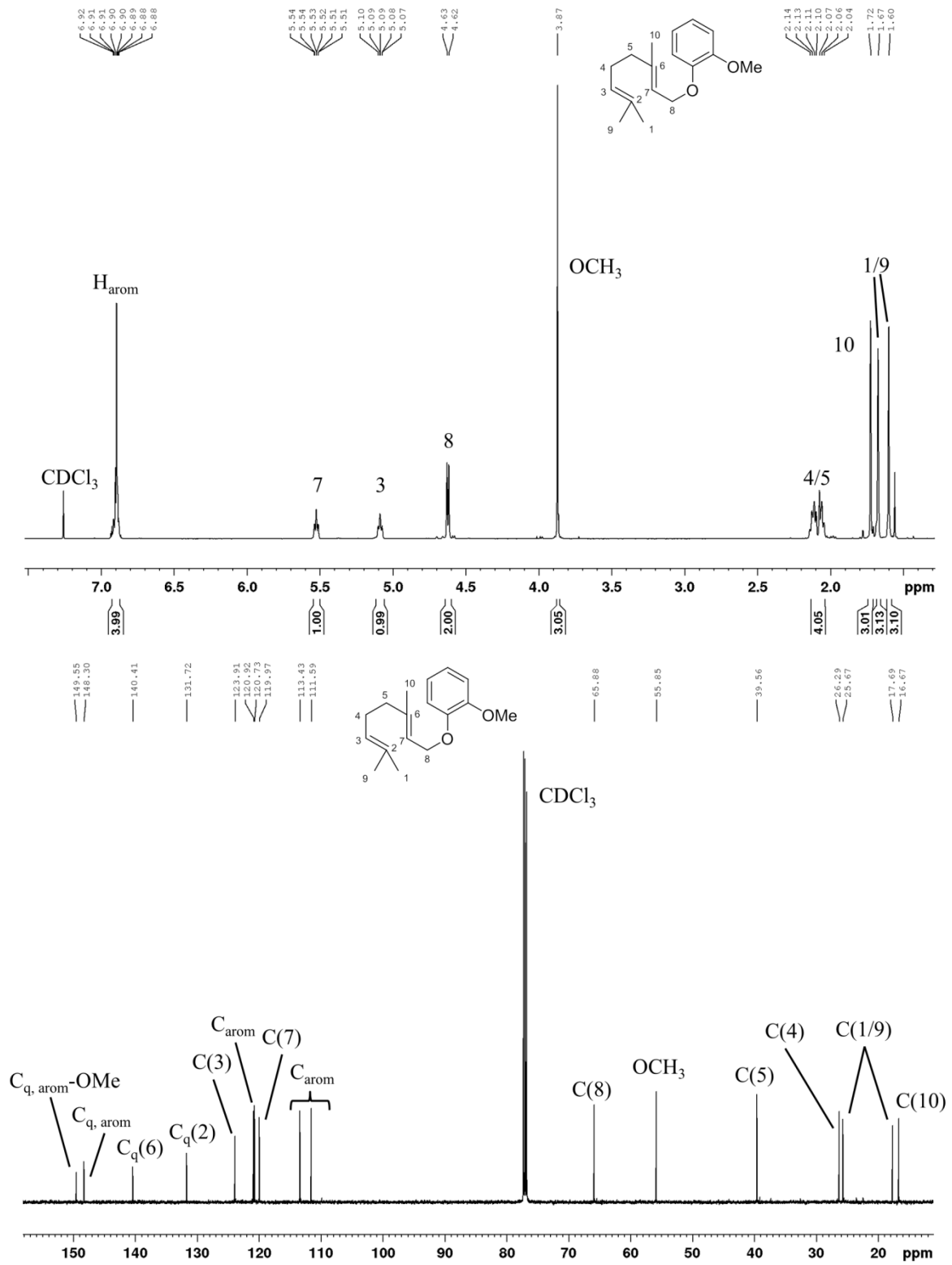


Abbildung A9: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung **35**.

Anhang

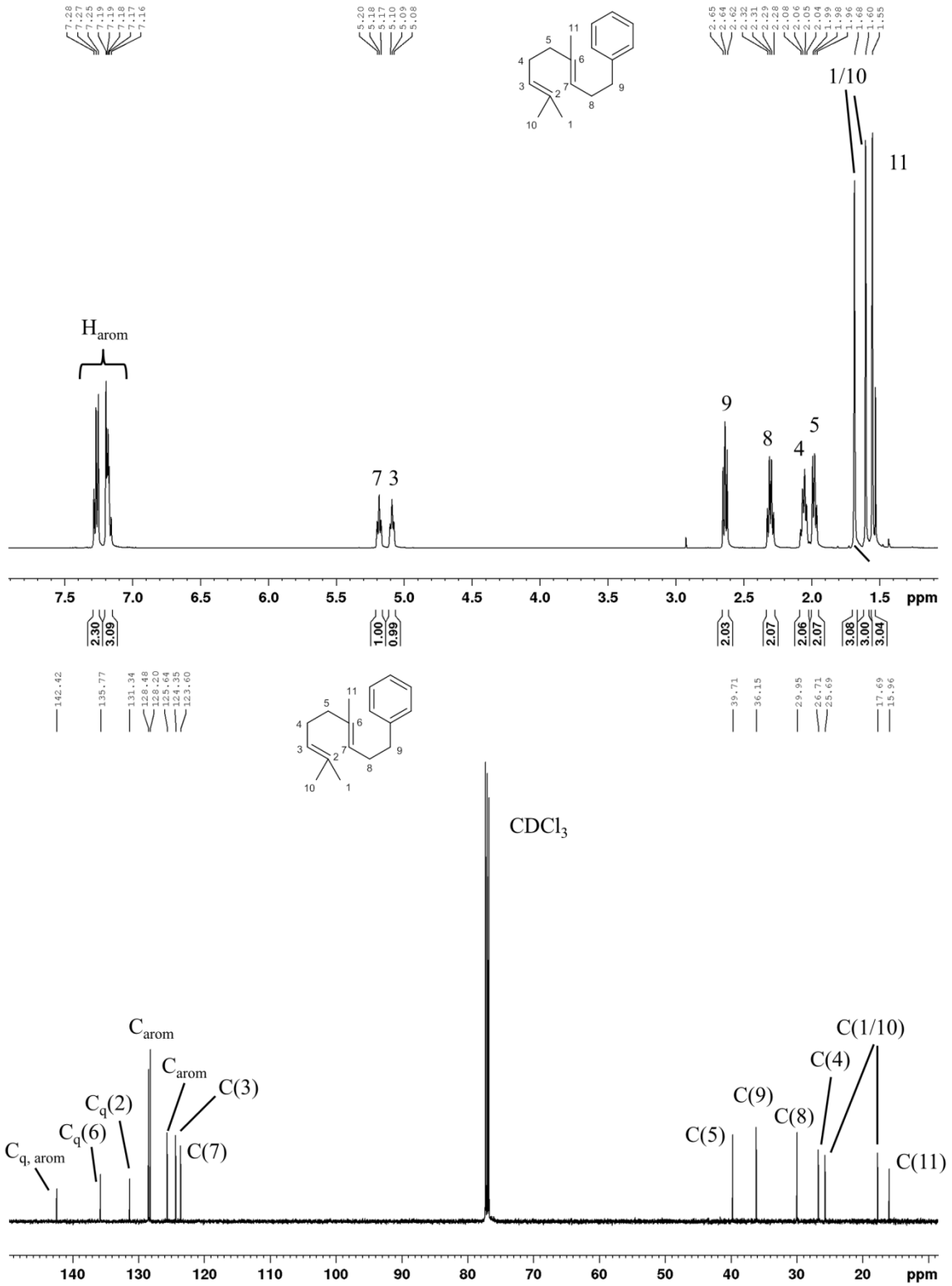


Abbildung A10: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (oben) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (unten) von Verbindung 36.

Anhang

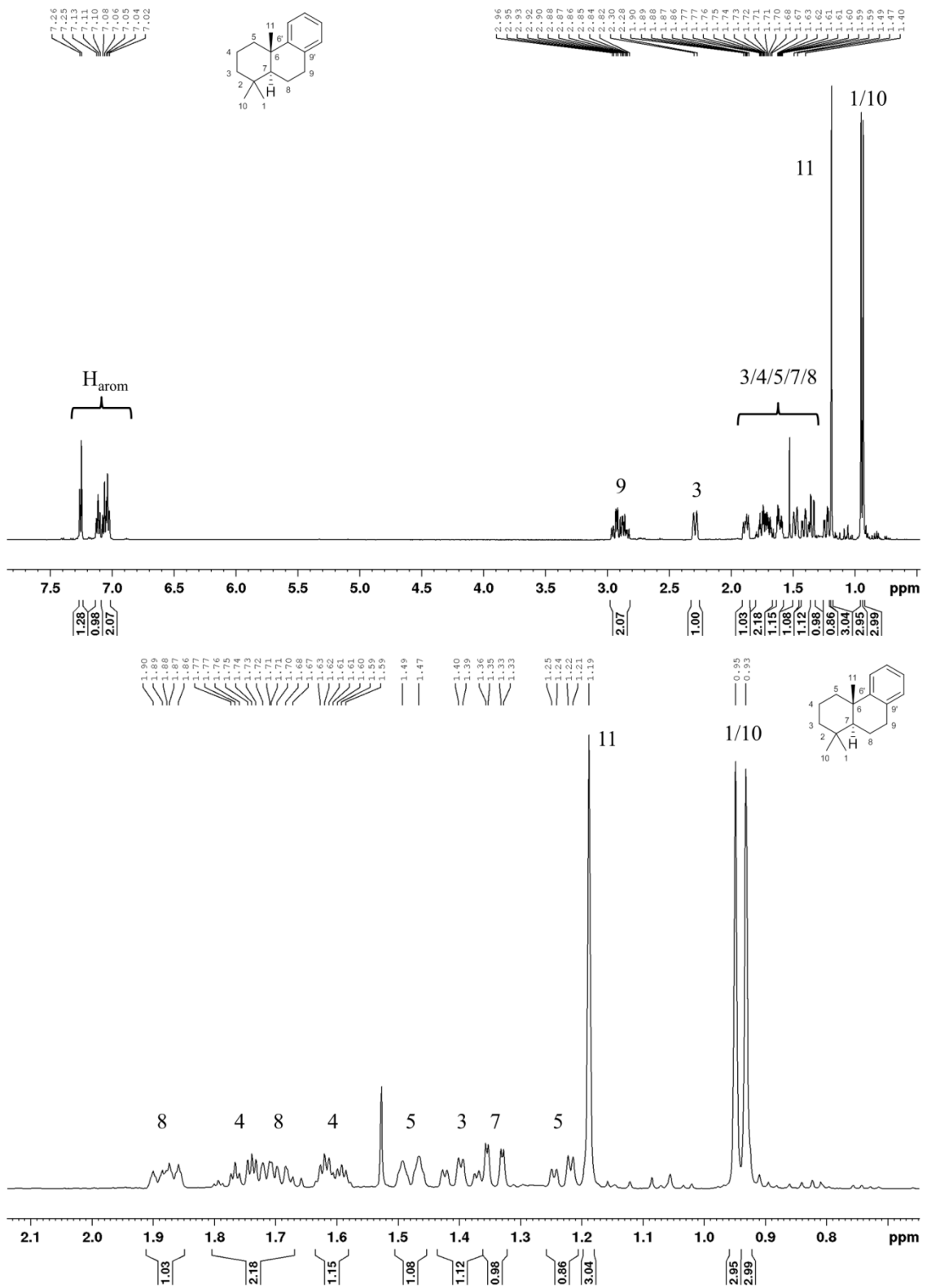
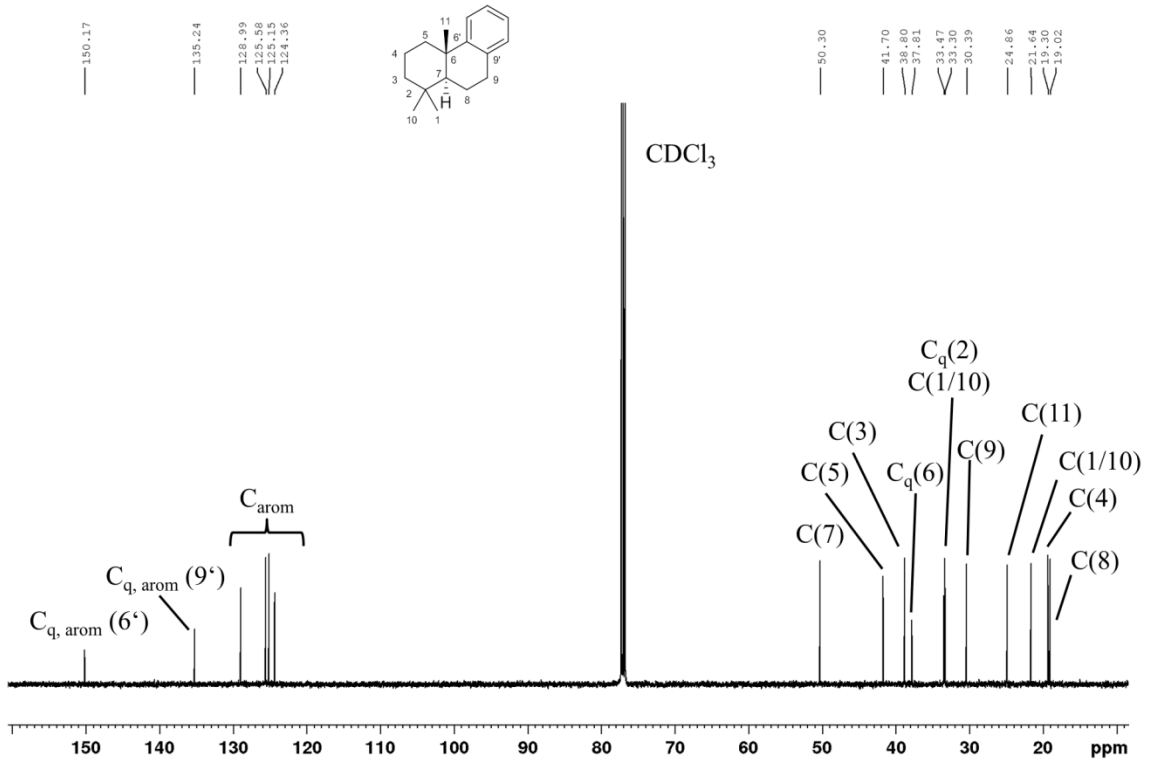


Abbildung A11: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (oben) und Ausschnitt des aliphatischen Bereichs des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (unten) von Verbindung **37**.

Abbildung A12: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 37.

Anhang

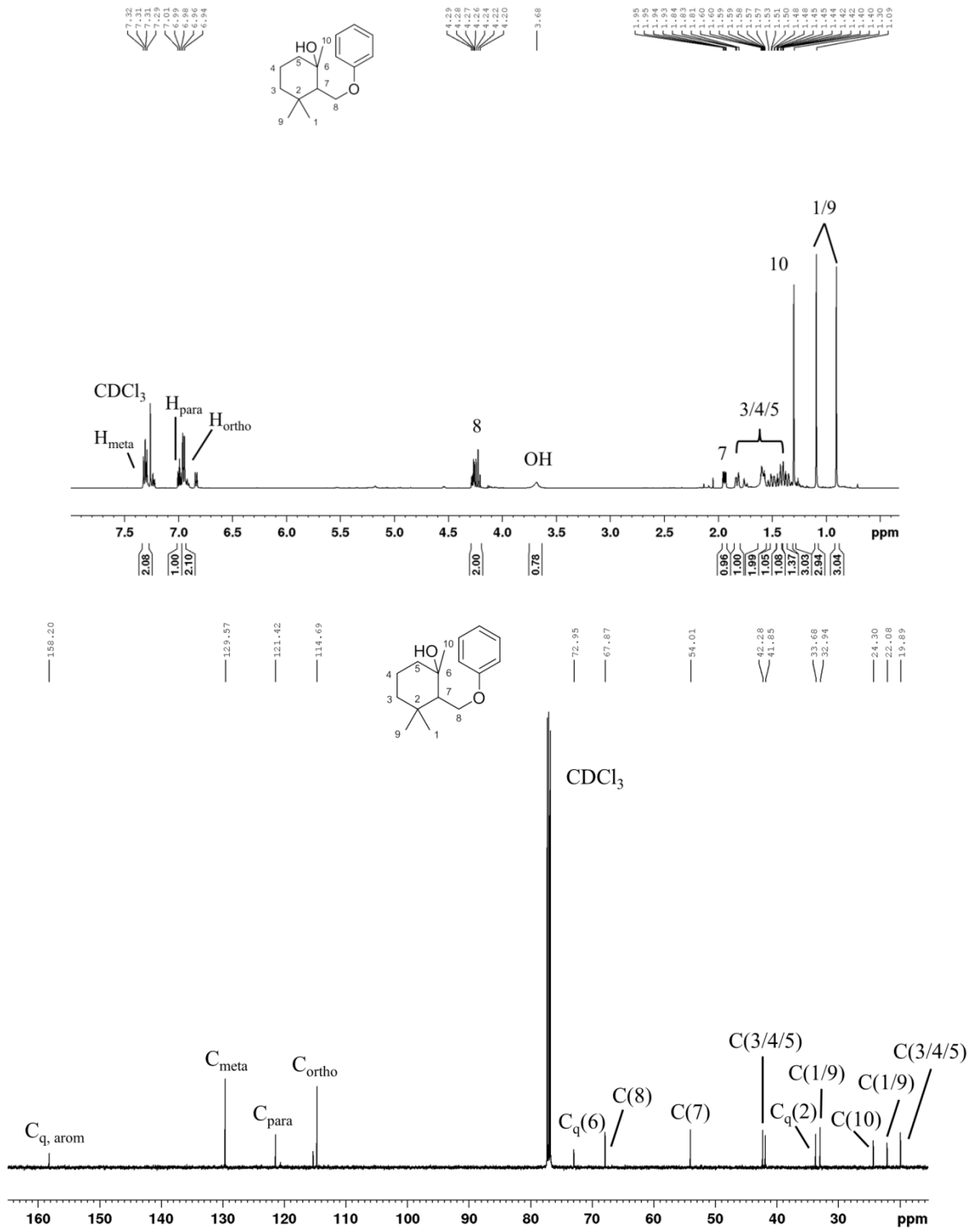


Abbildung A13: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung 31.

Anhang

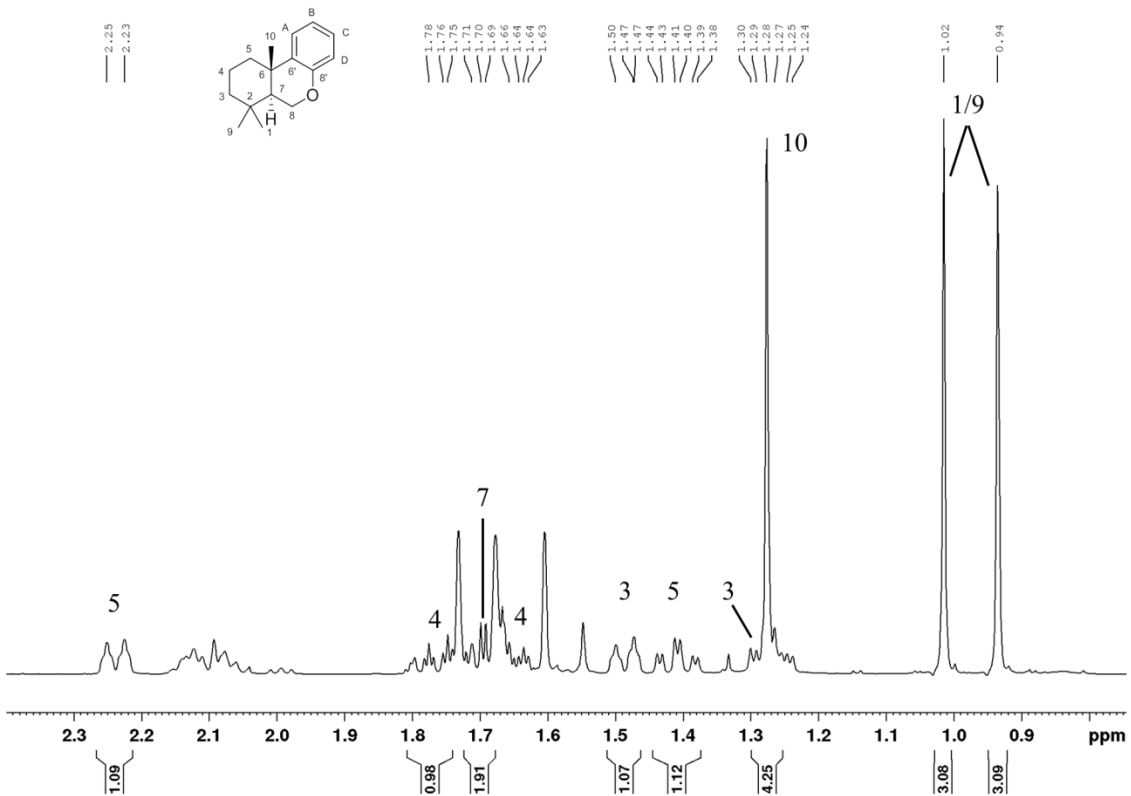
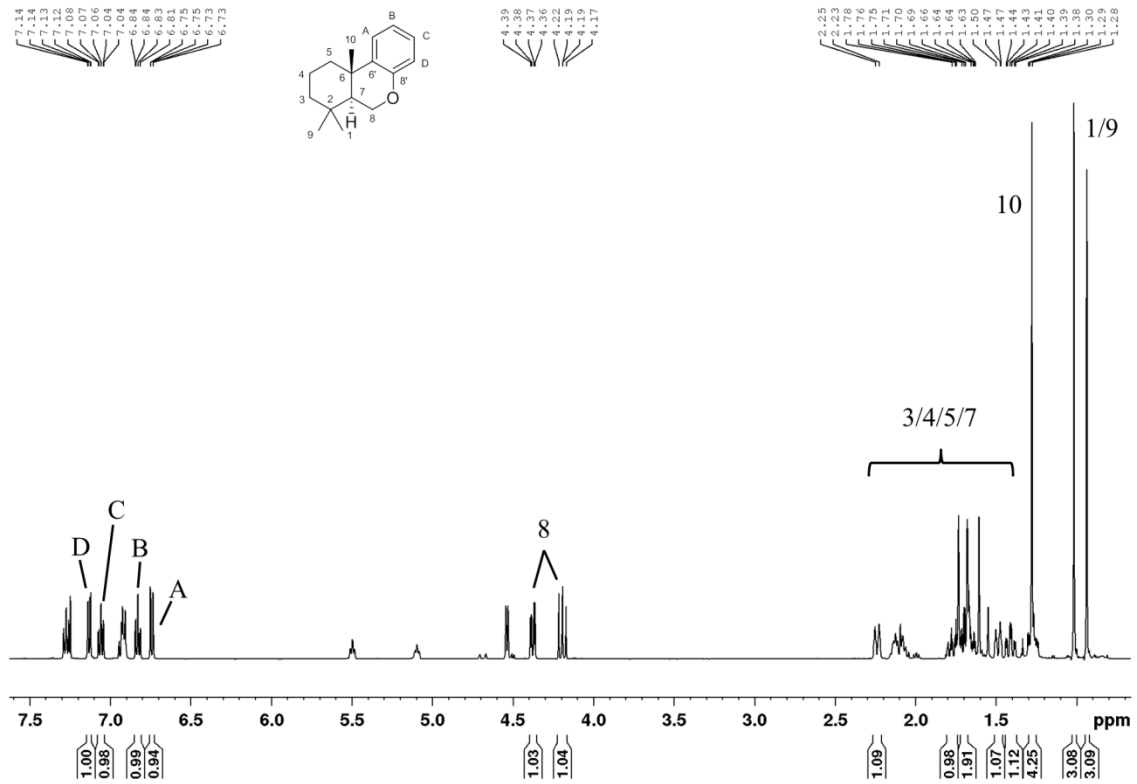


Abbildung A14: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und Ausschnitt des aliphatischen Bereichs des ¹H-NMR-Spektrums (unten) von Verbindung 16.

Anhang

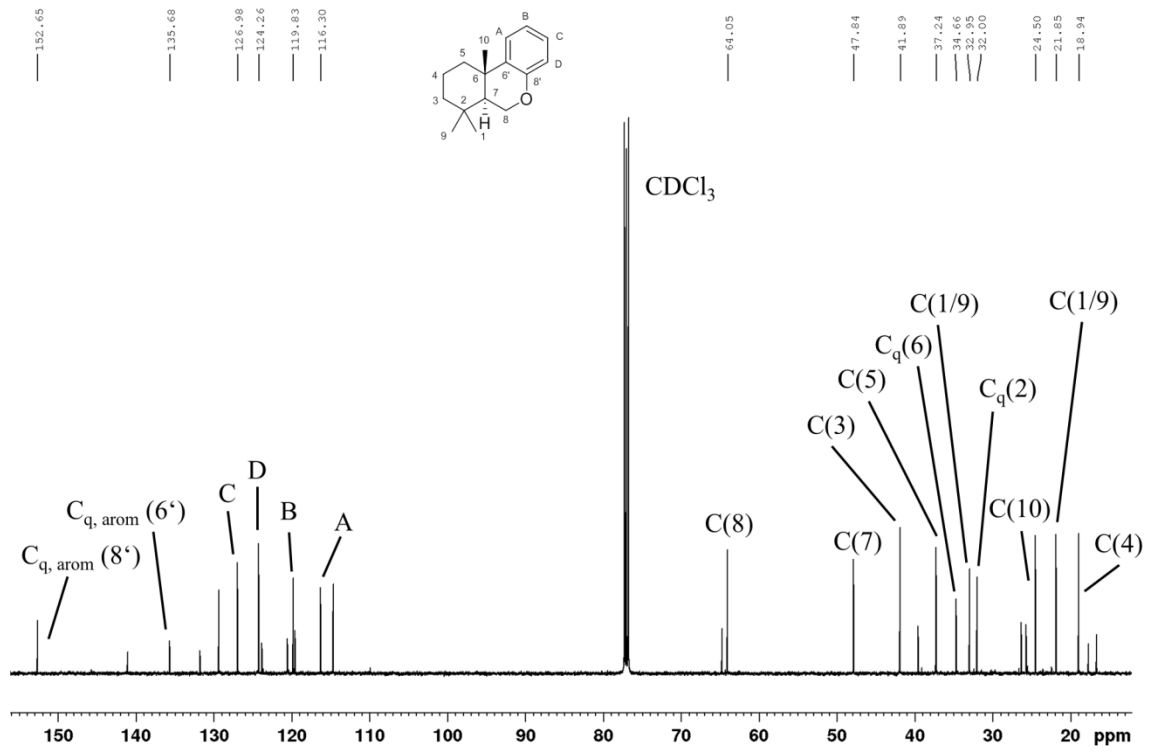


Abbildung A15: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 16.

Anhang

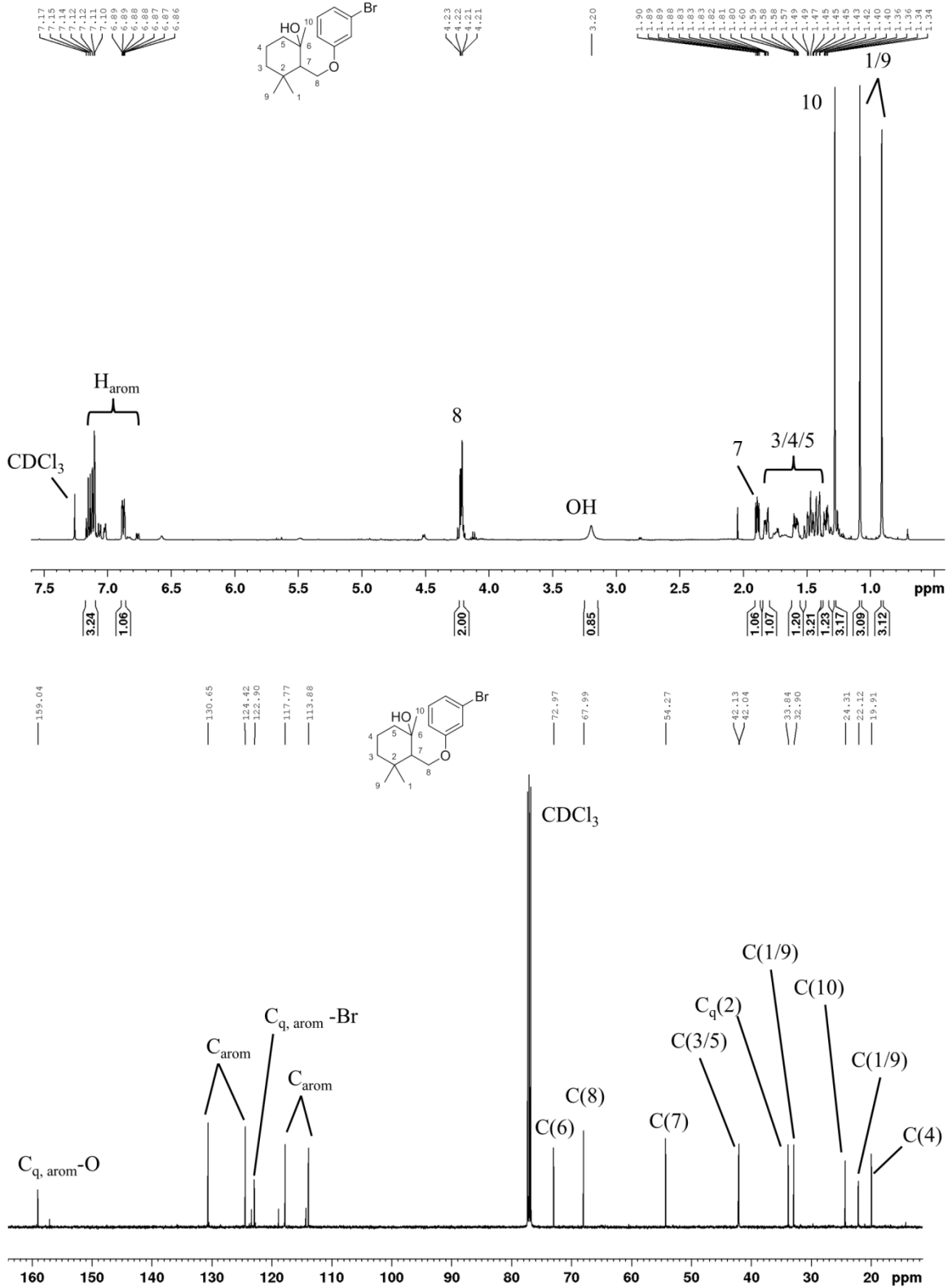


Abbildung A16: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung 44.

Anhang

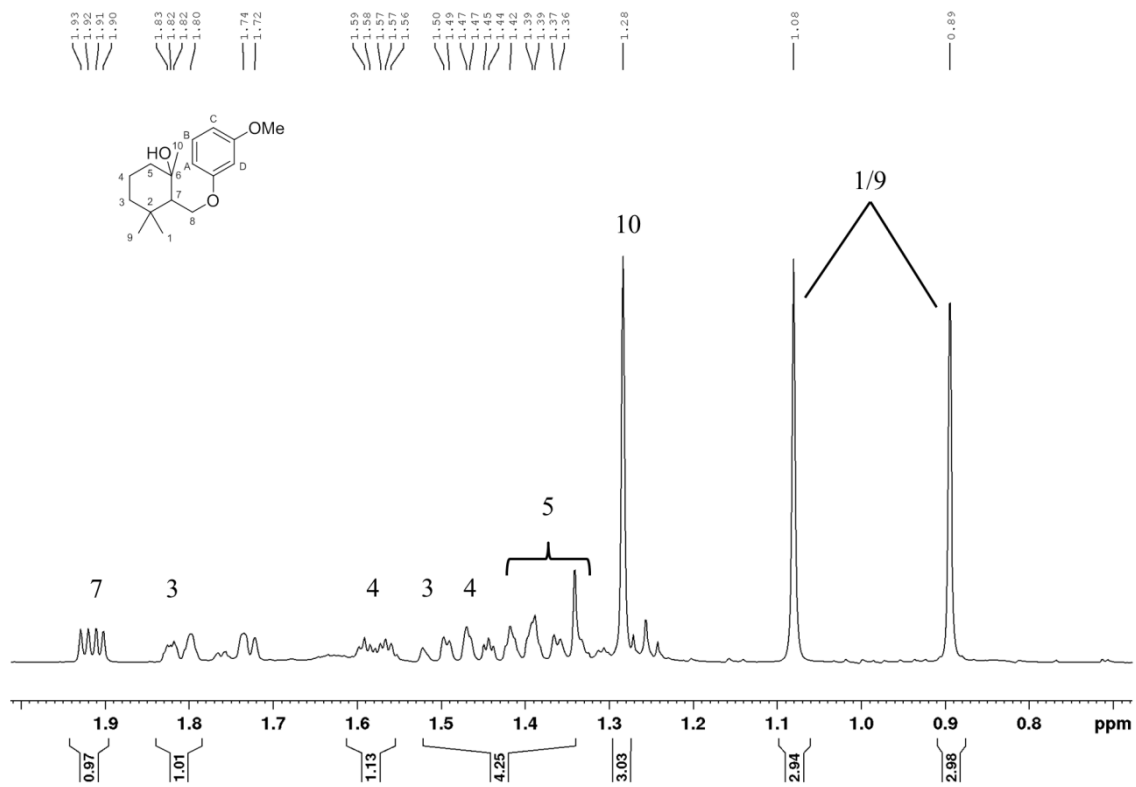
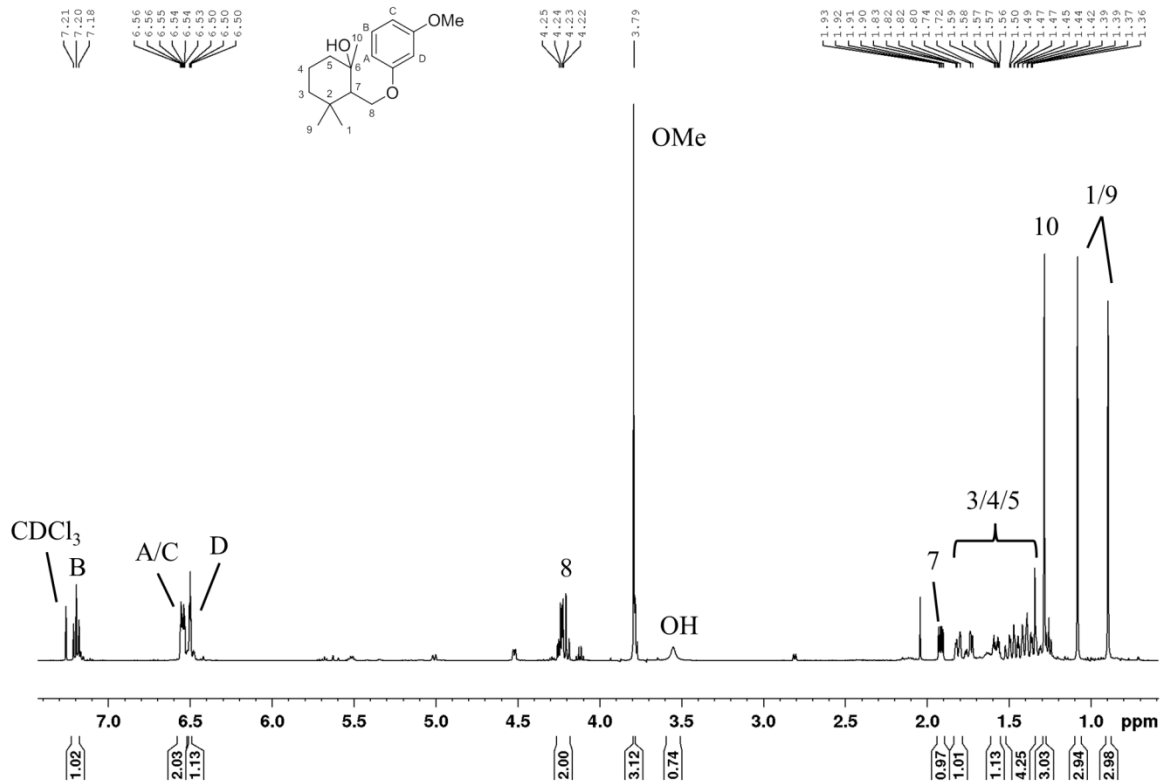


Abbildung A17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (oben) und Ausschnitt des aliphatischen Bereichs des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (unten) von Verbindung 45.

Anhang

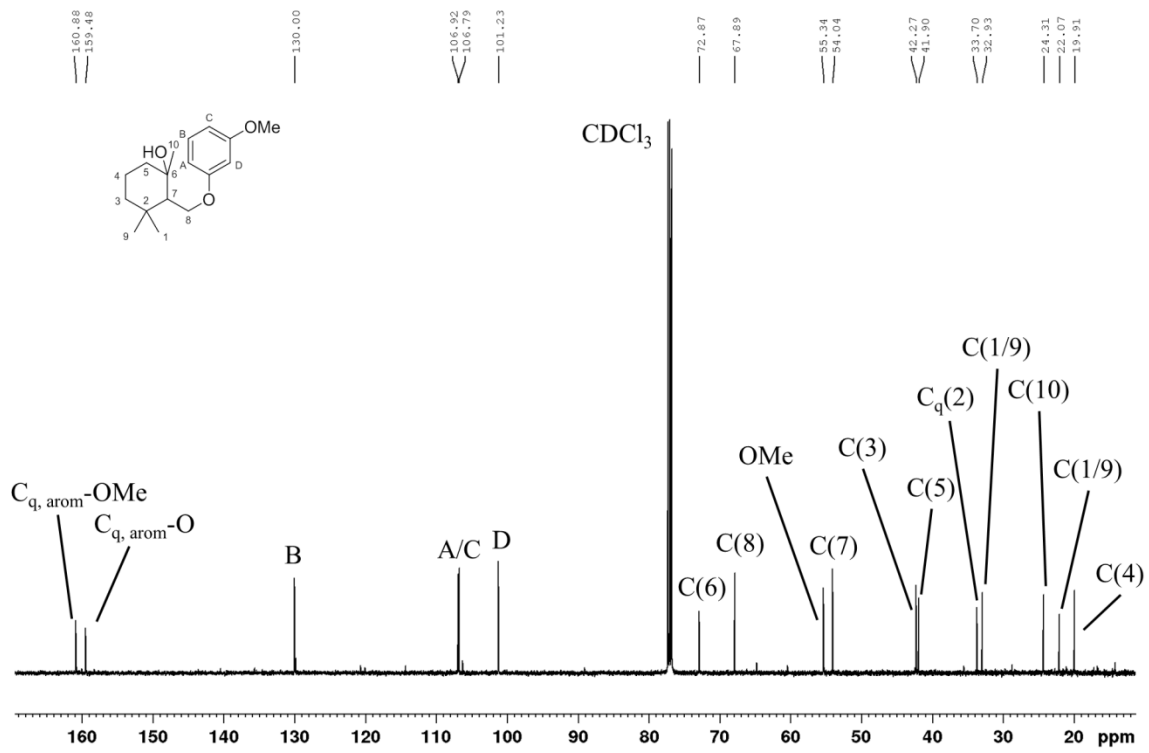


Abbildung A18: ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung 45.

Anhang

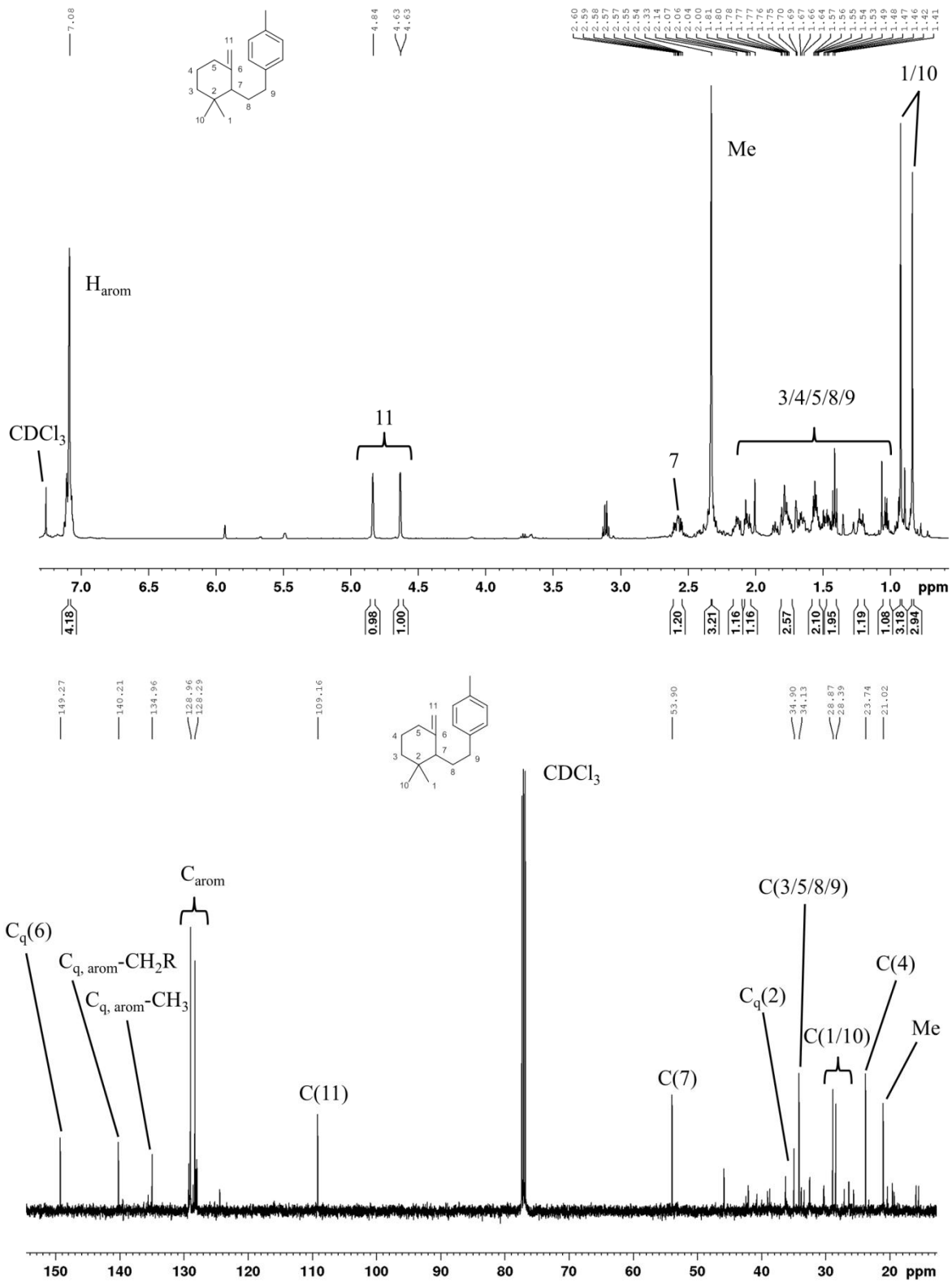


Abbildung A19: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (unten) von Verbindung **49**.

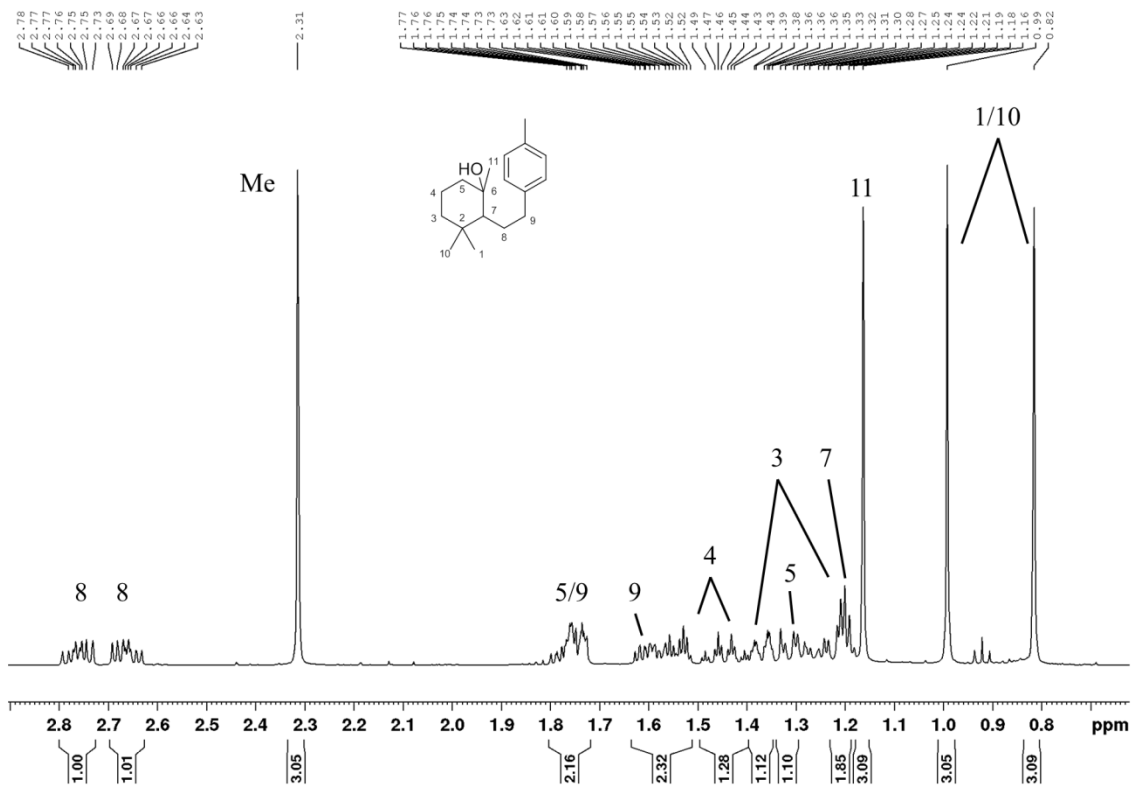
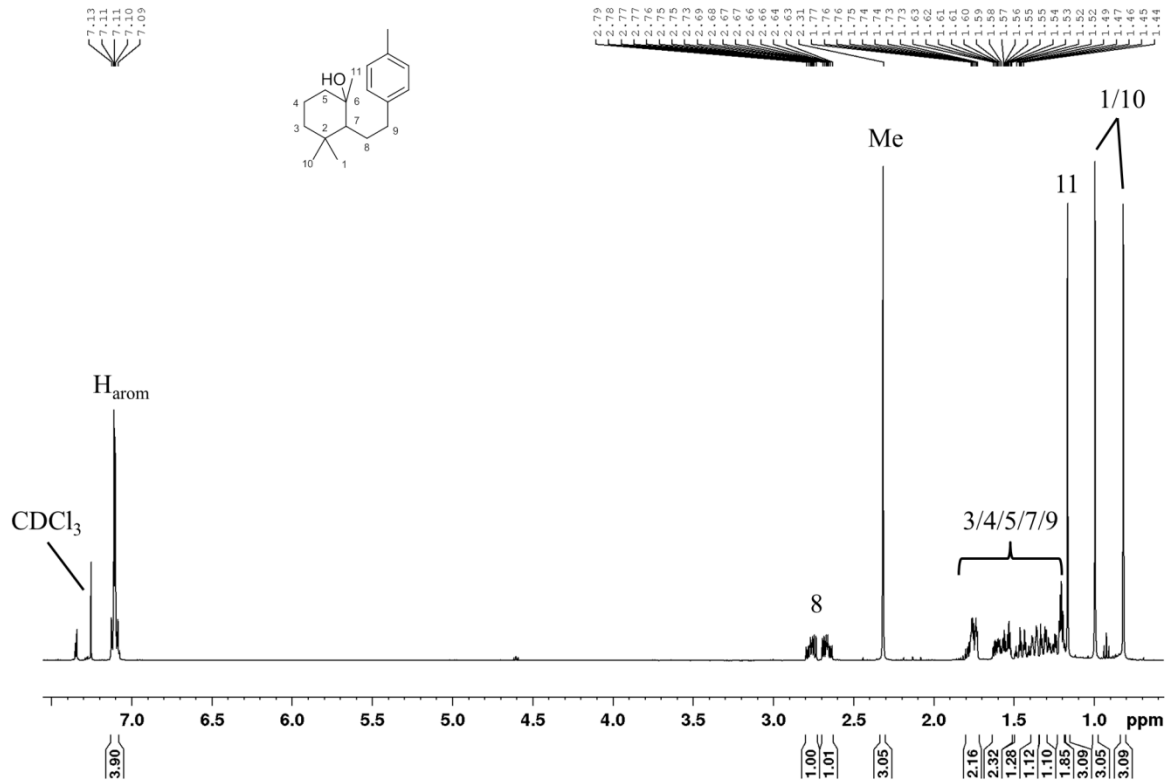
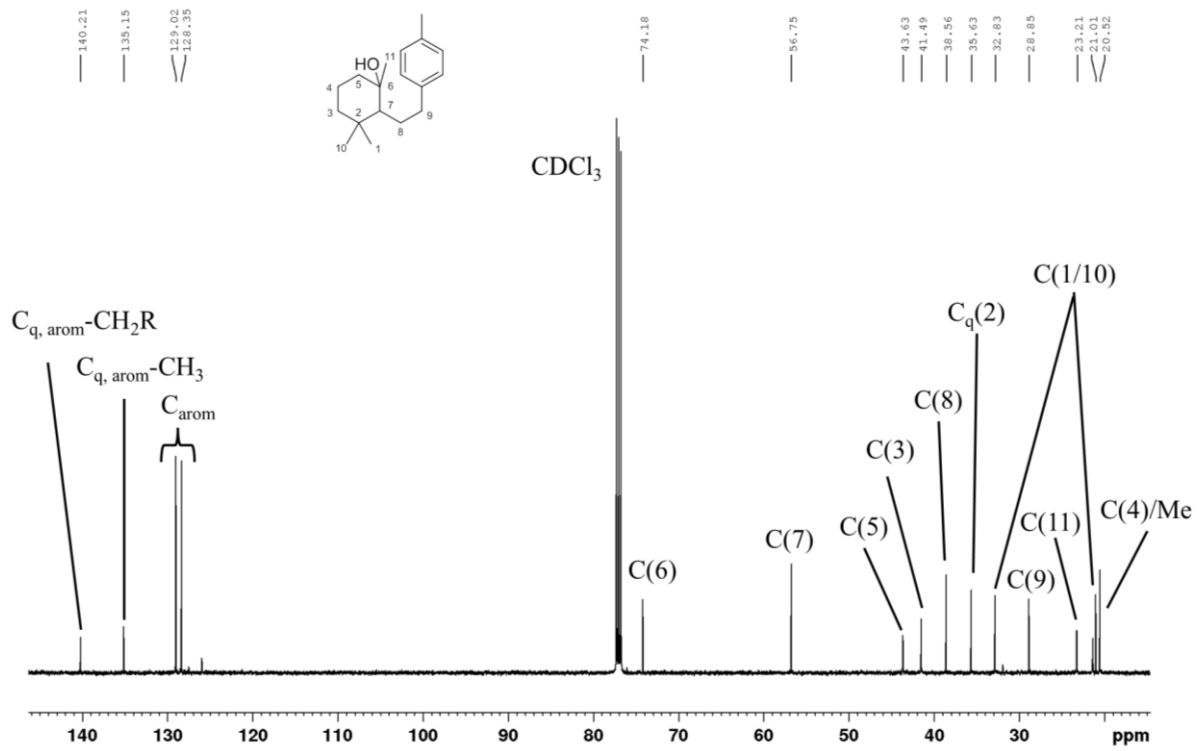


Abbildung A20: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und Ausschnitt des aliphatischen Bereichs des ¹H-NMR-Spektrums (unten) von Verbindung **48**.

Abbildung A21: ¹³C-NMR-Spektrum von Verbindung 48.

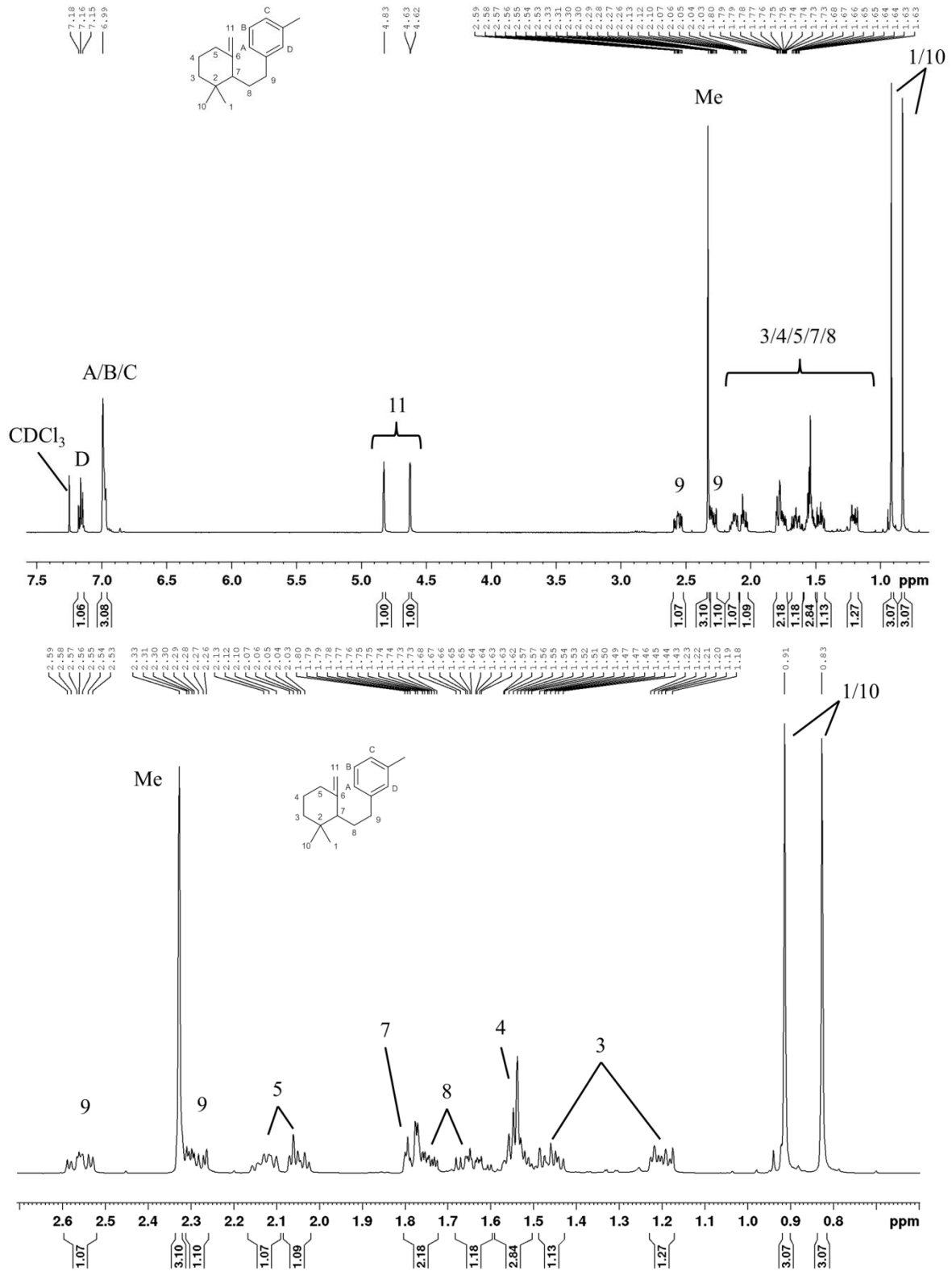
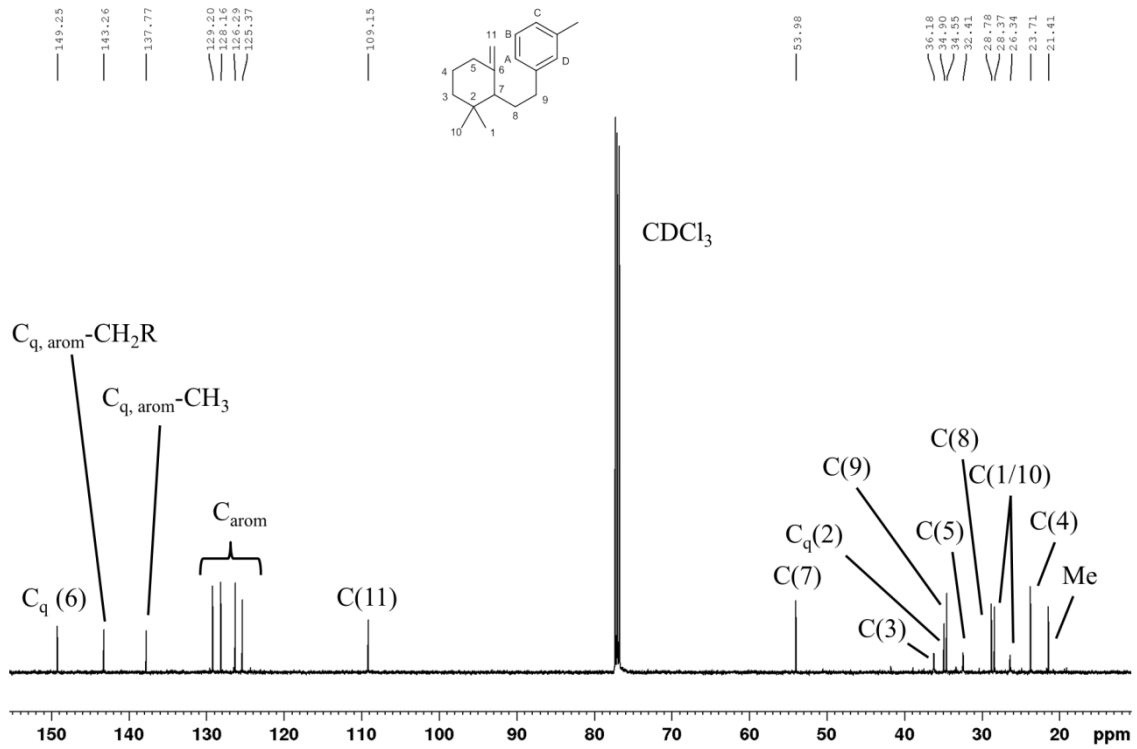


Abbildung A22: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (oben) und Ausschnitt des aliphatischen Bereichs des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (unten) von Verbindung 47.

Abbildung A23: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung **47**.

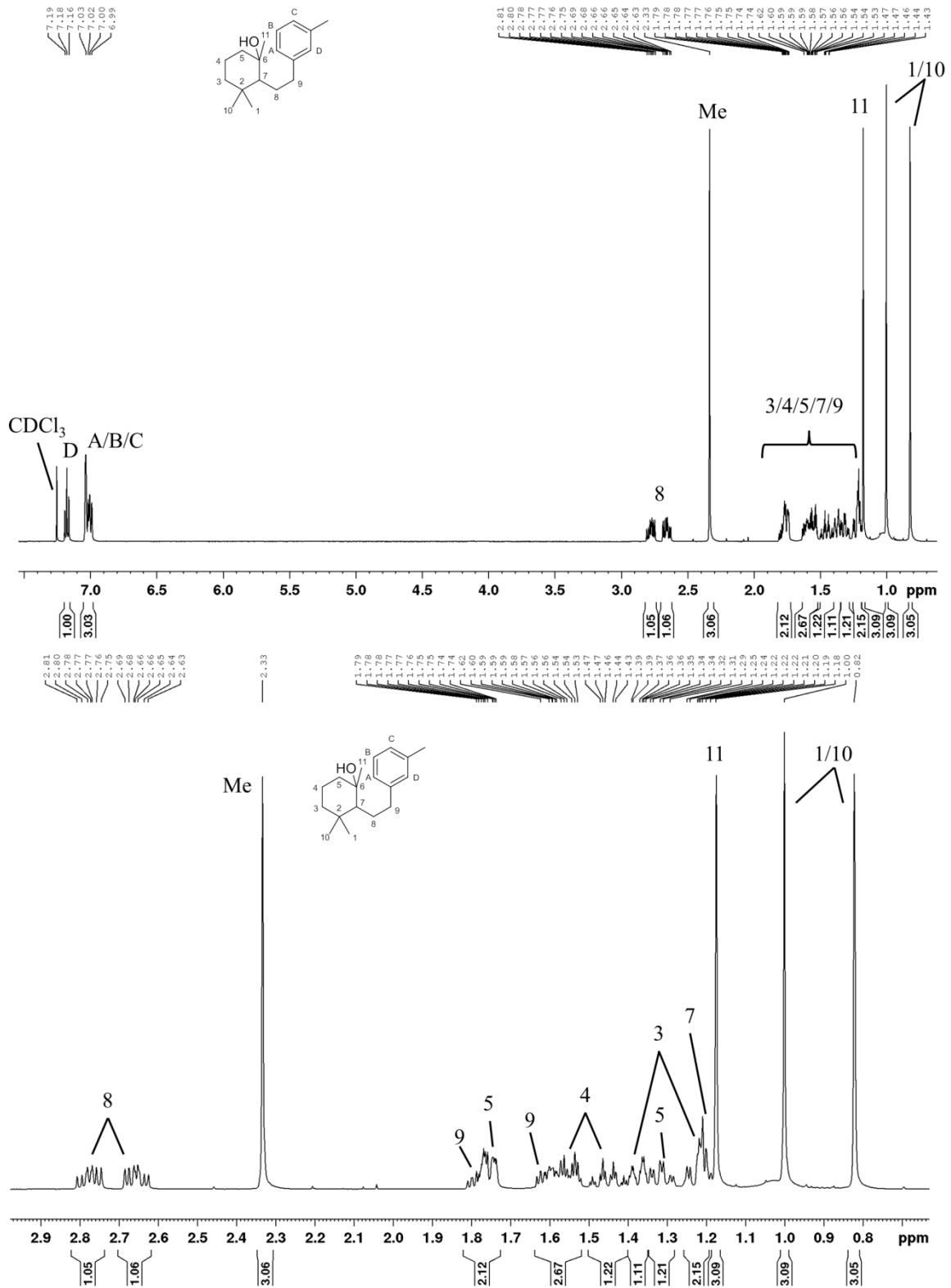
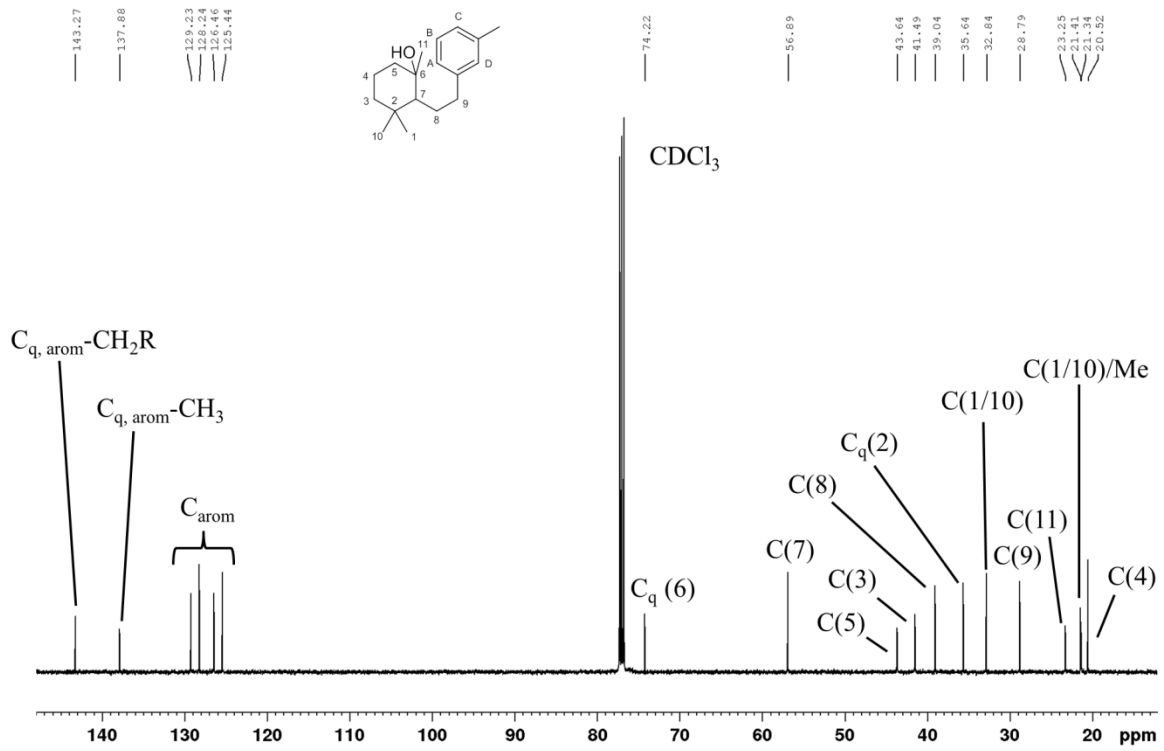


Abbildung A24: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (oben) und Ausschnitt des aliphatischen Bereichs des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (unten) von Verbindung 46.

Abbildung A25: ^{13}C -NMR-Spektrum von Verbindung 46.