

Kopplung von Aldolasereaktionen und der
Thiamindiphosphat-abhängigen Synthase MenD zur
Gewinnung funktionalisierter Feinchemikalien

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

Vorgelegt von
Matthias Schapfl
aus Gräfelfing, Deutschland

Hauptberichter: Prof. Dr. Georg A. Sprenger

Mitberichter: Prof. Dr. Michael Müller (Universität Freiburg)

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2020

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2021

Meiner Familie

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Georg A. Sprenger am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart in den Jahren 2014 - 2017 durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schapfl, M.; Baier, S.; Fries, A.; Ferlino, S.; Waltzer, S.; Müller, M.; Sprenger, G.A. (2018): Extended substrate range of thiamine diphosphate-dependent MenD enzyme by coupling of two C–C-bonding reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, S. 8359–8372.

Erklärung:

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt zu haben. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches gekennzeichnet.

Freiburg, den 30.03.2020

Matthias Schapfl

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Georg A. Sprenger bedanken für die Betreuung, für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, an einem so spannenden, vielseitigen und weitsichtigen Thema arbeiten zu dürfen. Zudem bedanke ich mich für die Übernahme des Referats, die stete Diskussionsbereitschaft und für die angenehmen Arbeitsbedingungen sowie das in mich gesetzte Vertrauen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Müller von der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg für die sehr gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit, die zahlreichen Diskussionen und die freundliche Übernahme des Koreferats. Ich möchte mich darüber hinaus bei ihm für die Überlassung und den Austausch von für diese Arbeit wichtigen Plasmiden und Chemikalien bedanken. Ich möchte mich ebenfalls bei ihm und seinen Mitarbeitern für die Durchführung von CD-, NMR- und LC-MS/MS-Messungen in Freiburg und die ausführliche gemeinsame Interpretation und Diskussion der Ergebnisse bedanken.

Herrn apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss danke ich für die zahlreichen Diskussionen während meiner Doktorarbeit und Herrn Prof. Dr. Hauer für die Bereitschaft den Vorsitz des Prüfungsausschusses zu übernehmen.

Ein Dank an Frau Prof. Dr. Martina Pohl (Forschungszentrum Jülich) für die Überlassung der (S)-selektiven *EcMenD*-Varianten und an Frau Prof. Dr. Dörte Rother (Forschungszentrum Jülich) für die Überlassung putativer MenD-Proteine zur Aktivitätsanalyse.

Ein besonderer Dank geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Förderung dieser Arbeit im Rahmen der DFG-Forschungsgruppe 1296 „Diversity of Asymmetric Thiamine Catalysis“. Namentlich erwähnen möchte ich hier Herrn Prof. Dr. Michael Müller als wissenschaftlichen Koordinator. Besonders bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang für die vielen Forschergruppentreffen und die vielen regen Diskussionen über die Vorträge, die zu neuen Ideen und Lösungsansätzen geführt haben. Ebenso einen herzlichen Dank an alle Professoren und wissenschaftlichen Mitarbeitern für den intensiven Gedankenaustausch insbesondere auf den Forschergruppentreffen.

Auch die geknüpften Kontakte sollten nicht unerwähnt bleiben, die dazu führten, dass bei technischen Engpässen oder Schwierigkeiten am eigenen Institut eine unkomplizierte Kooperation mit anderen Instituten möglich war. An dieser Stelle einen herzlichen Dank an Herrn Dr. Alexander Fries, Frau Alex Walter, Herrn Dr. Philipp Germer, Frau Dr. Lydia Walter und Herrn Simon Waltzer für die Hilfe bei Messungen und der Datenauswertung an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Herrn Sascha Ferlaino (Universität Freiburg) herzlichen Dank

für die Messung der NMR-Proben. Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Steffen Lüdecke und Frau Dr. Marija Marolt für die Durchführung und Interpretation von CD-Messungen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Patrick Buchholz (Arbeitsgruppe Bioinformatik, Universität Stuttgart) für seine Unterstützung insbesondere bei Datenbankanalysen und Kristallstrukturen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer (Abteilung für technische Biochemie, Universität Stuttgart) für die Möglichkeit von LC-MS-Messungen und bei Herrn Dr. Bernd Nebel für die Unterstützung bei diesen LC-MS-Messungen bedanken. Ein Dank an Herrn Wolf Röther (Institut für Mikrobiologie) für die regen Diskussionen bei chemischen Fragestellungen.

Frau Shiromi Baier danke ich für die Vorarbeiten und Hinweise zur Durchführung von Versuchen. Ein Dank an Frau Lena Stellmacher, Herrn Dr. Florian Baumgärtner, Herrn Dr. Jakob Birke und Herrn Marcel Wolfer für die tolle Bürogemeinschaft und die stetige und abwechslungsreiche Versorgung mit kraftspendenden Süßwaren. Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie für die stetige Hilfsbereitschaft. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei den Mitarbeitern aus Labor 3, vor allem Frau Selina Sabatini für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und die Übernahme vieler Routinearbeiten. Ebenfalls ein Dank an Frau Dr. Natalia Trachtmann, Frau Dr. Katrin Gottlieb und Frau Emma Guitart Font für die Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten.

Ein besonderer Dank an Herrn Erik Eppinger, Herrn Dr. Jakob Birke und Herrn Wolf Röther für die Diskussionen nach Dienstschluss in den Büros 2, 3 und 4 und die vielen unterhaltsamen Stunden auch außerhalb des Institutes. Herrn Dr. Jakob Birke danke ich außerdem für das Lektorat.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine ganze Familie und Freunde für die Unterstützung und das Verständnis dafür, dass die Arbeit manchmal Vorrang hatte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis.....	XVI
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 C-C-Bindungsknüpfende und -spaltende Enzyme	5
1.1.1 ThDP-abhängige Enzyme.....	5
1.1.2 Stereoselektivität ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme	9
1.1.3 Die Stetter-ähnliche SEPHCHC-Synthase MenD.....	11
1.1.4 ThDP-Reaktionsmechanismus – Carboligaseaktivität am Beispiel MenD.....	12
1.1.4.1 Kristallstruktur von MenD	14
1.1.4.2 Substratspektrum von MenD.....	16
1.2 C-C-Bindungsspaltung und - Knüpfung durch Aldolasen	19
1.2.1 KDPGlc- und KDPGal-Aldolasen // HOG-Aldolasen Eda und DgoA.....	20
1.2.2 HOG-Aldolasen Eda und DgoA: Struktur und Reaktionsmechanismus.....	21
1.2.3 Substratspektrum	23
1.2.4 Physiologische Rolle von 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG)	24
1.3 Fragestellung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Geräte.....	27
2.2 Chemikalien.....	27
2.3 Bakterienstämme und Plasmide.....	28
2.4 Eingesetzte Enzyme.....	30
2.5 Kultivierung von <i>E. coli</i>	30
2.5.1 Nährmedien	30
2.5.2 Medienzusätze	32
2.5.3 Kultivierungsbedingungen	32
2.5.4 Bestimmung der Zelldichte der Kulturen.....	34
2.5.5 Stammhaltung.....	34
2.5.6 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA mittels Hitzeschock	34

2.6	Molekularbiologische Arbeiten	36
2.6.1	DNA-Präparation	36
2.6.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	36
2.6.3	Restriktionsverdau von DNA	36
2.6.4	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.6.5	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.6.6	Restriktionsanalyse.....	37
2.6.7	DNA-Sequenzierungen	38
2.6.8	Klonierung der Aldolasen Eda und DgoA	38
2.7	Proteinbiochemische Methoden	39
2.7.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	39
2.7.2	Zellaufschluss und Proteinreinigung.....	39
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.8	Enzymatische Reaktionen.....	44
2.8.1	Bildung von HOG durch die Aldolasen Eda und DgoA	45
2.8.2	MenD als Biokatalysator.....	45
2.8.3	HOPA als neuartiges Substrat für MenD	47
2.8.4	Putative SEPHCHC-Synthasen (= MenD).....	48
2.9	Analytik	48
2.9.1	NMR-Analytik	48
2.9.2	UV/Vis- und Circular dichroismus-Messungen.....	49
2.9.3	Gaschromatographie.....	49
2.9.4	HPLC-Analytik	50
2.9.5	Nachweis der Decarboxylierung durch DCPIP-Assay.....	53
2.9.6	Bestimmung der Glucosekonzentration	53
2.10	Reinigung der Metabolite Chorismat und 2,3-CHD.....	53
2.11	Gefriertrocknung	56
2.12	Visualisierungs-Software.....	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Enzymreinigungen.....	57
3.2	2-Ketoglutarat als physiologisches Donorsubstrat für MenD	58
3.3	Ein-Topf-Reaktionen	60
3.3.1	Enzymatische Gewinnung von HOG	60
3.3.2	HOG als Donorsubstrat für MenD	65

3.3.3	1,4-Addition von HOG an 2,3-CHD	67
3.3.4	1,4-Addition von HOG an Acrylsäure	80
3.3.5	1,2-Addition von HOG an aromatische und aliphatische Aldehyde	83
3.3.6	1,2-Addition mit der (<i>S</i>)-selektiven MenD_I474A_F475G	90
3.3.7	1,4-Addition mit der (<i>S</i>)-selektiven MenD_I474A_F475G	96
3.4	Untersuchung des Substratspektrums von MenD.....	101
3.4.1	Untersuchung des Akzeptorspektrums von MenD.....	101
3.4.2	Untersuchung des Donorspektrums von MenD	105
3.4.3	Aufbau einer zweiten Ein-Topf-Reaktion mit HOPA als Donorsubstrat für MenD 110	
3.5	Stabilisierung der Donorsubstrate im aktiven Zentrum von MenD	111
3.6	Annotierte SEPHCHC-Synthasen	114
4	Diskussion	116
4.1	Substratspektrum von MenD	116
4.1.1	Ausbau der Enzymkaskaden	117
4.1.2	<i>in silico</i> -Substratscreening	117
4.1.3	Ganzzellsynthesen zur Produktgewinnung	118
5	Ausblick	120
6	Literaturverzeichnis.....	121
7	Anhang	135

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition/Beschreibung
2,3- <i>trans</i> -CHA	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-1-carboxylat
2,3- <i>trans</i> -CHD (2,3-CHD)	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-1-carboxylat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAL	Benzaldehydlyase
c	Konzentration
C-C-Bindungen	Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen
C-term	C-terminal
CD	Circulardichroismus
CT	<i>Chloroherpeton thalassium</i>
d	Duplett
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DCPIP	2,6-Dichlorophenolindophenol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcMenD</i>	MenD aus <i>E. coli</i>
ee	Enantiomerenüberschuss
EntB	Isochorismatase
EntC	Isochorismat-Synthase
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
g	Ortsfaktor
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
His-Tag	Histidin-Tag
HOG	4-Hydroxy-2-oxoglutarat
HOPA	2-Hydroxy-4-oxopentanoat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Iso-MDHCHC	(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-Malyl-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-carboxylat
Iso-SAHCHC	2-Succinyl-6-amino-5-hydroxycyclohex-2-en-1-carboxylat
Iso-SDHCHC	(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-Succinyl-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-carboxylat
Iso-SEPHCHC	(1 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxycyclohex-2-en-1-carboxylat
J	Kopplungskonstante
KDPGal	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogalactonat
KDPGlc	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat
LB	Lysogeny-Broth
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
Log-Phase	Logarithmische Phase
m	Multipllett
M	Molekularmasse
MDHCHC	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-Malyl-5,6-dihydroxycyclohex-3-en-1-carboxylat
MenD	2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxycyclohex-3-en-1-carboxylat-Synthase
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungsverhältnis
ng	Nanogramm
N-term	N-terminal
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PEP	Phosphoenolpyruvat
ppm	Parts per million
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RP-HPLC	Reverse-Phase-HPLC
RT	Retentionszeit
s	Sekunde
s	Singulett
SAHCHC	2-Succinyl-6-amino-5-hydroxycyclohex-3-en-1-carboxylat
SDHCHC	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-Succinyl-5,6-dihydroxycyclohex-3-en-1-carboxylat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPHCHC	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxycyclohex-3-en-1-carboxylat
SHCHC	2-Succinyl-6-hydroxycyclohexa-2,4-dien-1-carboxylat
SRB	Standardreaktionsbedingung
T	Temperatur [°C]
t	Zeit [min]
TEED	ThDP-dependent Enzyme Engineering Database
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
ThDP	Thiamindiphosphat
TOCSY	NMR-Spektroskopie Methode (Total Correlation Spectroscopy)
TSS-Medium	Transformation & Storage Solution
U	Unit
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
v/v	Volumenanteil
Vc	<i>Vibrio cholerae</i>
Vis	sichtbar (visible)
WT	Wildtyp
vgl.	vergleiche
Ya	<i>Yersinia aldovae</i>
δ	Chemische Verschiebung
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lösliches (links) und an Enzym gebundenes ThDP (rechts).	6
Abbildung 1.2: Katalysierte Reaktionen ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme.	8
Abbildung 1.3: (<i>S</i>)-Pocket von <i>EcMenD</i> _WT mit den gebundenen Substraten 2-Ketoglutarat (1) und Benzaldehyd (5).	10
Abbildung 1.4: Menachinonbiosynthese in <i>E. coli</i>	11
Abbildung 1.5: Postulierter Mechanismus der durch MenD katalysierten 1,4-Addition von 1 an Isochorismat.	13
Abbildung 1.6: Aufteilung des aktiven Zentrums von MenD in einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich.	15
Abbildung 1.7: Verlauf der nucleophilen durch MenD katalysierten 1,2- und 1,4-Additionsreaktionen.	16
Abbildung 1.8: Produkt der MenD katalysierten Addition von 1 an 7.	18
Abbildung 1.9: Reaktionsschema für die Katalyse der Aldolkondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat und 7 durch die komplementären Aldolasen Eda bzw. DgoA.	21
Abbildung 1.10: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Aldolase Eda.	22
Abbildung 3.1: (<i>RS</i>)-2 als ein neuartiger Donor für MenD und Analogon zum natürlichen Donor 1.	57
Abbildung 3.2: Kontrollreaktionen von MenD mit dem Donor 1.	59
Abbildung 3.3: Enzymatische Synthese von 2 durch die Pyruvat- abhängigen Aldolasen Eda bzw. DgoA.	61
Abbildung 3.4: LC-MS-Chromatogramm mit extrahierten Ionen (<i>m/z</i> 161.0) nach 24 h Inkubation von 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL Eda.	61
Abbildung 3.5: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, D ₂ O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL Eda.	62
Abbildung 3.6: CD-Spektren von (A): 5 mM 2a (blau) bzw. 5 mM 2b (schwarz); (B): 5 mM (<i>RS</i>)-2 (blau) bzw. der Mischung von 3.15 mM 2a und 1.85 mM 2b (schwarz).	63
Abbildung 3.7: LC-MS/MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.	68
Abbildung 3.8: Postulierte (nicht enzymatische) Umlagerung von MDHCHC zu Iso-MDHCHC.	69
Abbildung 3.9: Einsatz von markiertem [2,3- ¹³ C]-7 zum Nachweis der neuen C-C-Bindung bei der durch MenD katalysierten 1,4-Addition von 2a an 3.	70
Abbildung 3.10: Fragmentierungsmuster des putativen Produktes MDHCHC.	71
Abbildung 3.11: Postulierter Mechanismus der Fragmentierung von Iso-MDHCHC bei LC-MS/MS-Experimenten mit theoretischen Masse/Ladungs-Verhältnissen (<i>m/z</i>) und in Klammern den entsprechenden gemessenen Werten.	72
Abbildung 3.12: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, D ₂ O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 3, mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion und einer anschließenden Inkubation für eine Woche bei 4 °C.	74

Abbildung 3.13: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 1 und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD.....	75
Abbildung 3.14: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD als Ein-Topf-Reaktion.....	76
Abbildung 3.15: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) nach 24 h Inkubation von 50 mM (<i>RS</i>)-2 (hergestellt nach Riedel <i>et al.</i> , 2011) und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD.....	77
Abbildung 3.16: 1D-Tocsy-Experiment (400 MHz, D_2O) zur Anregung des olefinischen H-Atomes mit der Verschiebung 5.6 ppm zum Nachweis der Cyclohexenstruktur in den putativen Produkten der 1,4-Addition von 1 bzw. 2a an 3 katalysiert durch MenD.....	78
Abbildung 3.17: 1D-Tocsy-Experiment (400 MHz, D_2O) zur Anregung des olefinischen H-Atomes mit der Verschiebung 6.9 ppm zum Nachweis der Cyclohexenstruktur in den putativen Produkten der 1,4-Addition von 1 bzw. 2a an 3 katalysiert durch MenD.....	79
Abbildung 3.18: Mögliche Folgereaktion für Iso-MDHCHC bestehend aus einer Oxidation der Hydroxylgruppe des Malyrestes des Iso-MDHCHC und der nachfolgenden reduktiven Aminierung.....	80
Abbildung 3.19: 2-Hydroxy-4-oxoheptandioat als postuliertes Produkt der durch MenD katalysierten 1,4-Addition von 2 an 4.....	81
Abbildung 3.20: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.....	81
Abbildung 3.21: Mögliche Aminierung des Produktes der MenD-katalysierten 1,4-Addition von 2 an 4.....	82
Abbildung 3.22: Postulierte 1,2-Addition von 2 an 5 bzw. an 6 katalysiert durch MenD.....	83
Abbildung 3.23: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.....	84
Abbildung 3.24: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.....	86
Abbildung 3.25: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) nach 24 h Inkubation von 50 mM (<i>RS</i>)-2 und 20 mM 2-F-Benzaldehyd mit 0.7 mg/mL MenD.....	87
Abbildung 3.26: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 2-F-Benzaldehyd mit 0.7 mg/mL MenD als Ein-Topf-Reaktion (A); 50 mM (<i>RS</i>)-2 (Sigma-Aldrichs) statt 2a (B); 50 mM (<i>RS</i>)-2 (hergestellt nach Riedel <i>et al.</i> , 2011) statt 2a (C).....	88
Abbildung 3.27: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.....	89
Abbildung 3.28: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 1 und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G bei 30 °C.....	91
Abbildung 3.29: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.....	92
Abbildung 3.30: Postulierte Produkte der 1,2-Addition von 1, 2a bzw. 2b an 5 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.....	93
Abbildung 3.31: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 1 und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G.....	94

Abbildung 3.32: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.....	95
Abbildung 3.33: Postulierte Produkte der 1,2-Addition von 2a bzw. 2b an 6 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.	96
Abbildung 3.34: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 1 und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G.	98
Abbildung 3.35: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.....	99
Abbildung 3.36: Postulierte Produkte der 1,4-Addition von 1 an 4 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.....	100
Abbildung 3.37: Postulierte Produkte der 1,4-Addition von 2a bzw. 2b an 4 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.	100
Abbildung 3.38: Putative Akzeptorsubstrate für MenD.....	101
Abbildung 3.39: Postuliertes Produkt der 1,2-Addition von 2a bzw. 2b an Salicylaldehyd katalysiert durch MenD.	102
Abbildung 3.40: Potentielle Donoren für MenD-katalysierte 1,2- und 1,4-Additionsreaktionen.	105
Abbildung 3.41: 1 und die Analoga 2 und 4-Hydroxy-2-oxopentanoat (HOPA).....	110
Abbildung 3.42: Postulierte 1,2-Additionsreaktion von (S)-HOPA an 5 katalysiert durch MenD.	110
Abbildung 3.43: Aktives Zentrum von MenD mit den für die Bindung der zweiten Carboxylgruppe des Donorsubstrates 1 entscheidenden Aminosäuren.	112
Abbildung 3.44: Stabilisierung des an ThDP gebundenen Succinylsemialdehyds im aktiven Zentrum von MenD.	113
Abbildung 7.1: Sequenz für das Gen <i>eda</i> , codierend die Aldolase Eda.....	135
Abbildung 7.2: Codonoptimierte Sequenz für das Gen <i>dgoA</i> (<i>dgoA/b4477</i>), codierend für die Aldolase DgoA.	135
Abbildung 7.3: Sequenz von <i>menD</i> , codierend für MenD.....	136
Abbildung 7.4: SDS-Gelelektrophorese-Analyse (12%) der Reinigung der Aldolase DgoA.	137
Abbildung 7.5: SDS-Gelelektrophorese-Analyse (12%) der gereinigten Enzyme Eda, EntC, MenD_WT und MenD_I474A_F475G.....	137
Abbildung 7.6: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL DgoA.	138
Abbildung 7.7: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.	138
Abbildung 7.8: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.	139
Abbildung 7.9: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.	139
Abbildung 7.10: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.	140

Abbildung 7.11: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.....	140
Abbildung 7.12: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.....	141
Abbildung 7.13: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.....	141
Abbildung 7.14: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.2 min aus Abbildung 3.20.....	142
Abbildung 7.15: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.2 min (oben) bzw. mit RT = 3.4 min (unten) aus Abbildung 3.23.....	143
Abbildung 7.16: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 3.8 min aus Abbildung 3.27.....	144
Abbildung 7.17: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 3.7 min aus Abbildung 3.28.....	144
Abbildung 7.18: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.4 min (oben) bzw. mit RT = 3.4 min (unten) aus Abbildung 3.29.....	145
Abbildung 7.19: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 4.0 min aus Abbildung 3.31.....	146
Abbildung 7.20: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 0.6 min aus Abbildung 3.32.....	146
Abbildung 7.21: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 0.6 min aus Abbildung 3.34.....	147
Abbildung 7.22: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.2 min aus Abbildung 3.35.....	147
Abbildung 7.23: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, D ₂ O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL DgoA.	148
Abbildung 7.24: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl ₃) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 0.1: Übersicht der verwendeten Substrate (Auswahl) und erhaltenen Produkte (Auswahl).....	1
Tabelle 0.1: Overview of the used substrates (selection) and products obtained (selection).....	3
Tabelle 1.1: Strukturelle Merkmale der Proteindomänen der Superfamilien der ThDP-abhängigen Enzyme.	7
Tabelle 1.2: Ausgewählte Akzeptor- und Donorsubstrate von MenD für die 1,4-Additionsreaktion.....	17
Tabelle 1.3: Ausgewählte Akzeptor- und Donorsubstrate von MenD für die 1,2-Additionsreaktion.....	18
Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und ihre relevanten Marker.....	28
Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre relevanten genetischen Marker.	29
Tabelle 2.3: Für <i>in vitro</i> -Experimente eingesetzte Enzyme.	30
Tabelle 2.4: Zusammensetzung von LB-Medium (Bertani, 1951) und 2*YT-Medium.	31
Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Gerhardt <i>et al.</i> (1994).....	31
Tabelle 2.6: Spurenelementelösung nach Pan <i>et al.</i> (1987).	31
Tabelle 2.7: Eingesetzte sterilfiltrierte (0.2 µm-Filter) Medienzusätze.	32
Tabelle 2.8: Transformation & Storage Solution (TSS)-Medium zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	35
Tabelle 2.9: Primer zur Sequenzierung der Plasmide durch GATC Biotech (Konstanz).	38
Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Reinigungspuffer für Zellaufschluss und Proteinreinigung.	40
Tabelle 2.11: Imidazolgehalt der Reinigungspuffer für Gradientenelution der Proteine MenD_WT, MenD_I474A_F475G, EntC, Eda und DgoA ¹⁾	41
Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Puffer für die Lagerung der Enzyme und für die Aktivitätsassays.	42
Tabelle 2.13: Zusammensetzung der SDS-Trenn- und Sammelgele.	42
Tabelle 2.14: Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers (5fach konzentriert ¹⁾).	43
Tabelle 2.15: Zusammensetzung des 10 x Tris-Glycin-Laufpuffers für SDS-Gelelektrophorese ¹⁾	43
Tabelle 2.16: Coomassie-Färbelösung.	43
Tabelle 2.17: Puffer zur Lagerung der Enzyme und für Aktivitätsassays.	44
Tabelle 2.18: Beispielhaftes Pipettierschema für die 1,4-Addition von 1 bzw. 2a bzw. 2b an 3 katalysiert durch MenD.	46
Tabelle 2.19: Putative MenD.	48
Tabelle 2.20: Scan-Parameter für Massenspektrometer.....	51
Tabelle 2.21: HPLC-Methoden.	52
Tabelle 2.22: Erhaltene Konzentrationen der Metabolite Chorismat bzw. 3 nach 24 und 48 h Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen mit den kanamycinbasierten Plasmiden.....	54

Tabelle 3.1: In der Arbeit eingesetzte Enzyme mit Laufhöhe in der SDS-Gelelektrophorese und nach Reinigung erhaltene Ausbeuten je Liter Kultur.....	57
Tabelle 3.2: Kontrollreaktionen von MenD mit dem Donor 1.....	59
Tabelle 3.3: Produkte der MenD-katalysierten Addition von 1 bzw. 2a bzw. 2b an Salicylaldehyd nach 24 h.....	102
Tabelle 3.4: Produkte der MenD-katalysierten Addition von 1 bzw. 2a bzw. 2b an 3-Formylchromon nach 24 h.	103
Tabelle 3.5: Produkte der MenD-katalysierten Addition von 1 bzw. 2a bzw. 2b an 2-Amino-3-formylchromon nach 24 h.	104
Tabelle 3.6: Umsätze von 2-Ketosäuren mit Isochorismat durch MenD nach 24 h.	106
Tabelle 3.7: Umsätze von 2-Ketosäuren mit (2-F-)Benzaldehyd durch MenD.	108
Tabelle 3.8: Produktbildung der annotierten SEPHCHC-Synthasen für die postulierten Produkte SHCHC und MHCHC.	115
Tabelle 7.1: ausgewählte ThDP-abhängige Enzyme.....	149
Tabelle 7.2: ausgewählte Donorsubstrate ThDP-abhängiger Enzyme.....	150
Tabelle 7.3: Ermittelte Retentionszeiten der Substrate und Produkte für die mit MenD katalysierten Reaktionen.	154

Zusammenfassung

Die Knüpfung intermolekularer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (C-C-Bindungen) und die Spaltung von C-C-Bindungen haben in vielen Stoffwechselwegen eine wichtige Bedeutung. Die Kohlenstoffkette verlängernde enzymkatalysierte Carboligationsreaktionen finden darüber hinaus in der Biokatalyse breite Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurden durch Aldolasen und durch das Thiamindiphosphat-(ThDP)-abhängige Enzym MenD katalysierte Reaktionen kombiniert, um hochfunktionalisierte Produkte zu erhalten.

Tabelle 0.1: Übersicht der verwendeten Substrate (Auswahl) und erhaltenen Produkte (Auswahl).

Abkürzung	1	2	2a	2b	3
Substanz	2-Ketoglutarat	HOG	HOG (Eda)	HOG (DgoA)	2,3-CHD
Abkürzung	4	5	6	7	8
Substanz	Acrylsäure	Benzaldehyd	Hexanal	Pyruvat	Glyoxylat

Im ersten Schritt wurde durch die Aldolasen Eda bzw. DgoA aus 50 mM Pyruvat (**7**) und 100 mM Glyoxylat (**8**) 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, **2**) gebildet. Beide Enzyme zeigten Umsätze von > 99% (Eda) bzw. von > 90% (DgoA). Die Bildung des Produktes **2** wurde für beide Aldolasen durch LC-MS-Analyse und die Struktur mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestätigt. Mit Circular dichroismus wurde gezeigt, dass DgoA zu einem höheren Enantiomerenüberschuss der Produkte führt als Eda. Das enzymatisch gebildete HOG (Eda) (**2a**) bzw. HOG (DgoA) (**2b**) wurde zusammen mit verschiedenen Akzeptorsubstraten und MenD inkubiert. Der Umsatz der MenD-Reaktionen wurde als Abnahme des jeweils eingesetzten Akzeptorsubstrates definiert.

Für die Ein-Topf-Reaktionen mit **2a** bzw. **2b** wurden zu dem oben beschriebenen Assay für die Gewinnung von **2a** bzw. **2b** zusätzlich 20 mM Akzeptorsubstrat und 0.7 mg/mL MenD hinzugefügt. MenD zeigte für die Kontrollreaktion des physiologischen Donors 2-Ketoglutarat (**1**) an 2,3-CHD (**3**) eine Abnahme des Akzeptorsubstrates von 90%. Für die 1,4-Addition von **2a** an **3** wurde eine Abnahme für **3** von 78% bestimmt, die höher lag als für **2b** mit 23%.

Sowohl LC-MS-Messungen als auch aufgenommene ¹H-NMR-Spektren zeigten, dass das jeweils aus **2a** bzw. **2b** und **3** gebildete 2-Malyl-5,6-dihydroxycyclohexen-1-carboxylat (MDHCHC) zu Iso-MDHCHC isomerisiert, wie es durch Kurutsch *et al.* (2009) entsprechend für die 1,4-Addition von **1** an **3** zu 2-Succinyl-5,6-dihydroxycyclohexen-1-carboxylat (SDHCHC) bzw. Iso-SDHCHC beschrieben wurde. ¹H-NMR-Messungen und 1D-Tocsy-

Experimente bestätigten die Decarboxylierung von **2a** und die anschließende 1,4-Addition an den Cyclohexadienring von **3** unter Ausbildung eines Cyclohexenringes. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass neben **1** sowohl **2a** als auch **2b** als Donor für die 1,4-Addition mit Acrylsäure (**4**) als aliphatischem Akzeptor dienen können. Die Abnahmen des Akzeptors waren jeweils > 99% und die Produktbildung wurde mittels LC-MS bestätigt.

Die 2-Stufen-Synthese bestehend aus der Bildung von **2a** bzw. **2b** und deren 1,4-Addition an **3** bzw. **4** konnte auf die 1,2-Addition an den aromatischen Akzeptor Benzaldehyd (**5**) als auch an den aliphatischen Akzeptor Hexanal (**6**) übertragen werden. Für die 1,2-Addition an **5** als Akzeptor lag die Substratabnahme für **1**, **2a** und **2b** jeweils > 99% und Produktbildung wurde in allen drei Fällen mit Hilfe von LC-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie bestätigt. Produktbildung wurde auch für die 1,2-Addition von **1** als Positivkontrolle (Abnahme des Akzeptorsubstrates: 95%) und **2a** bzw. **2b** an **6** mittels LC-MS bestätigt. Die Abnahme des Akzeptorsubstrates **6** war für **2a** mit 87% bzw. für **2b** mit 62% niedriger.

Das Wildtypenzym MenD ist wie viele ThDP-abhängige Enzyme spezifisch für die (*R*)-Konfiguration der 2-Hydroxyketon-Produkte. Um Produkte mit einer gewünschten Stereokonfiguration zu erhalten, wurde für die 1,2-Addition von **1** an **5** die (*S*)-selektive MenD-Variante MenD_I474A_F475G (Westphal *et al.*, 2013a) eingesetzt (Abnahme von **5**: 86%). Ebenso wurden für **2a** bzw. **2b** als Donorsubstrate Abnahmen des Akzeptors **5** von 94% (**2a**) bzw. 89% (**2b**) gezeigt. Außerdem wurde für diese MenD-Variante gezeigt, dass sie die 1,2-Addition der Donorsubstrate **1** (91%), **2a** (63%) bzw. **2b** (40%) an **6** katalysiert. Die Produktbildung wurde für alle sechs Produkte mit Hilfe von LC-MS bestätigt.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde MenD_I474A_F475G in der vorliegenden Arbeit erstmals für 1,4-Additionsreaktionen eingesetzt. Es wurde die Eignung dieser Variante für die 1,4-Addition gezeigt, die Abnahme des Akzeptors betrug für die 1,4-Addition von **1** und **4** > 99%. Darüber hinaus akzeptiert diese MenD-Variante auch **2a** und **2b** als Substrat für die 1,4-Addition an **4** (Substratabnahme für **2a**: 76% bzw. für **2b**: 76%).

Zudem wurden weitere Akzeptorsubstrate (Salicylaldehyd, 3-Formylchromon und 2-Amino-3-formylchromon) und Monocarbonsäuren (2-Ketobutyrat und 3-Methyl-2-ketobutyrat) als Donoren für MenD eingeführt. Auf Grund der fehlenden Carboxylgruppe ist die Stabilisierung der Monocarbonsäuren schlechter als die des physiologischen Donors **1**.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Enzymreaktionen funktionalisierte Substrate hergestellt, die als Donoren für MenD dienen. Nachdem **2** als neuer Donor für MenD eingeführt werden konnte, könnte diese 2-Stufen-Synthese in andere Stoffwechselwege von Bakterien integriert werden.

Abstract

The formation of intermolecular carbon-carbon bonds (C-C bonds) and the cleavage of C-C bonds are important in many metabolic pathways. Enzyme-catalyzed carboligation reactions that extend the carbon chain are also widely used in biocatalysis. In the present work, reactions catalyzed by aldolases and by the thiamine diphosphate (ThDP)-dependent enzyme MenD were combined to obtain highly functionalized products.

Tabelle 0.1: Overview of the used substrates (selection) and products obtained (selection).

abbreviation	1	2	2a	2b	3
substance	2-oxoglutarate	HOG	HOG (Eda)	HOG (DgoA)	2,3-CHD
abbreviation	4	5	6	7	8
substance	acrylic acid	benzaldehyde	hexanal	pyruvate	glyoxylate

In the first step, 4-hydroxy-2-oxoglutarate (HOG, **2**) is formed from 50 mM pyruvate (**7**) and 100 mM glyoxylate (**8**) catalysed by aldolases Eda or DgoA. Both enzymes showed conversions of > 99% (Eda) or > 90% (DgoA). Formation of the product **2** was confirmed for both aldolases by LC-MS-analysis and the structure by ¹H-NMR spectroscopy. Circular dichroism showed a higher enantiomeric excess for the product of DgoA compared to the product of Eda. In the second step enzymatically formed HOG (Eda) (**2a**) or HOG (DgoA) (**2b**) was incubated with various acceptor substrates and MenD. Conversion of MenD catalyzed reactions was defined as decrease of the used acceptor substrate.

For one-pot reactions with **2a** and **2b**, additional 20 mM acceptor substrate and 0.7 mg/mL MenD were added to the above-described assay. For the control reaction of the physiological donor 2-oxoglutarate (**1**) to 2,3-CHD (**3**), MenD showed a decrease in the acceptor substrate of 90%. For the 1,4-addition of **2a** to **3**, a decrease of 78% was determined for **3**, which was higher compared to the addition of **2b** with 23%.

Both LC-MS measurements and recorded ¹H-NMR spectra showed that the 2-methyl-5,6-dihydroxycyclohexene-1-carboxylate (MDHCHC) formed from **2a** or **2b** and **3** isomerises to Iso-MDHCHC as described by Kurutsch *et al.* (2009) for the 1,4-addition of **1** on **3** to 2-succinyl-5,6-dihydroxycyclohexene-1-carboxylate (SDHCHC) or Iso-SDHCHC. ¹H-NMR measurements and 1D-Tocsy experiments confirmed the decarboxylation of **2a** and the subsequent 1,4-addition to the cyclohexadiene ring of **3** to form a cyclohexene ring. Furthermore, it was shown that in addition to **1**, both **2a** and **2b** can serve as donors for the 1,4-addition with acrylic acid (**4**) as aliphatic acceptors. The acceptor decreases were > 99%, the product formation was confirmed by LC-MS.

The 2-step synthesis consisting of the formation of **2a** and **2b** and their 1,4-addition to **3** and **4** was applied to the 1,2-addition to the aromatic acceptor benzaldehyde (**5**) and to the aliphatic acceptor hexanal (**6**). For the 1,2 addition of **1**, **2a** and **2b** to **5** as acceptor, the substrate decrease was > 99% in each case and product formation was confirmed in all three cases by LC-MS and ¹H-NMR spectroscopy. Product formation was also confirmed for the 1,2-addition of **1** as positive control (decrease of the acceptor substrate: 95%) and **2a** and **2b** on **6** by LC-MS. The decrease in acceptor substrate **6** was lower for **2a** with 87% and for **2b** with 62%.

Like many ThDP-dependent enzymes the wild type enzyme MenD is specific to the (*R*)-configuration of the 2-hydroxyketones. In order to obtain products with a desired stereo configuration, the (*S*)-selective MenD variant MenD_I474A_F475G (Westphal *et al.*, 2013a) was used for 1,2-addition of **1** to **5** (decrease of **5**: 86%). Likewise, **2a** and **2b** were shown to act as donor substrates with decreases of **5** of 94% (**2a**) and 89% (**2b**), respectively. This MenD variant also catalyzed the 1,2-addition of donor substrates **1** (91%), **2a** (63%) and **2b** (40%) to **6**. The product formation was confirmed for all six products with the help of LC-MS.

Based on the results in this work, MenD_I474A_F475G was used for 1,4-addition reactions for the first time. The suitability of this variant for the 1,4-addition was shown, the decrease in the acceptor for the 1,4-addition of **1** and **4** was > 99%. In addition, this MenD variant also accepts **2a** and **2b** as a substrate for the 1,4-addition on **4** (substrate decrease for **2a**: 76% and for **2b**: 76%).

In addition, other acceptor substrates (salicylaldehyde, 3-formylchromone und 2-amino-3-formylchromone) and monocarboxylic acids (2-oxobutyrate and 3-methyl-2-oxobutyrate) were introduced as donors for MenD. Due to the lack of a carboxyl group, the stabilization of the monocarboxylic acids is worse than that of the physiological donor **1**.

In the present work, functionalized substrates were produced with the help of enzyme reactions and used as donors for MenD. After **2** was introduced as a new donor for MenD, this 2-step synthesis could be integrated into other metabolic pathways of bacteria.

1 Einleitung

Enzyme weisen für die industrielle Anwendung einige Vorteile gegenüber der chemischen Synthese auf. Viele Enzyme zeigen eine hohe Selektivität und bilden nur einen geringen Anteil an Nebenprodukten, wogegen bei der chemischen Synthese häufig eine aufwendige Schutzgruppenchemie notwendig ist (Waldmann und Sebastian, 1994; Schelhaas und Waldmann, 1996; Lessmann *et al.*, 2007). Außerdem sind viele Enzyme bei milden Reaktionsbedingungen aktiv, wogegen bei der chemischen Synthese häufig harsche Reaktionsbedingungen wie hohe Drücke, hohe Temperaturen und toxische bzw. umweltgefährdende Chemikalien benötigt werden. Ein weiterer Vorteil von Enzymen für die Synthese chiraler Substanzen ist, dass die Reaktionsprodukte häufig mit einem hohen Enantiomerenüberschuss (ee) gebildet werden, wogegen die chemische Synthese häufig zu racemischen Produkten führt.

1.1 C-C-Bindungsknüpfende und -spaltende Enzyme

Insbesondere Aldolasen und Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Carboligasen bieten auf Grund ihrer biokatalytischen Eigenschaften vielfältige potentielle Einsatzmöglichkeiten in der enantioselektiven Biosynthese zur Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts (Clapés *et al.*, 2010; Brovetto *et al.*, 2011; Clapés und Garrabou, 2011; Fesko und Gruber-Khadjawi, 2013; Müller *et al.*, 2013; Windle *et al.*, 2014; Prier und Arnold, 2015; Busto, 2016; Giovannini *et al.*, 2016; López-Iglesias *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2016). Auf Grund ihrer hohen Regio- und Stereospezifität eignen sich C-C-knüpfende Enzyme als Biokatalysatoren (Sprenger *et al.*, 2007).

1.1.1 ThDP-abhängige Enzyme

ThDP-abhängige Enzyme katalysieren eine Vielzahl synthetisch interessanter Reaktionen. Ein großes Potential besitzen vor allem Reaktionen, die zur asymmetrischen Ausbildung einer neuen C-C-Bindung führen (Iding *et al.*, 1998; Schörken und Sprenger, 1998; Sprenger und Pohl, 1999; Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2009; Rother née Gocke *et al.*, 2009; Müller, 2012; Müller *et al.*, 2013; Clapés, 2016; Giovannini *et al.*, 2016; Zecevic *et al.*, 2018). Enzyme dieser Gruppe sind in vielen Stoffwechselwegen anzutreffen und katalysieren z.B. die nicht-oxidative und die oxidative Decarboxylierung von 2-Ketosäuren, die Spaltung

von C-C-Bindungen und die Carboligation von Aldehyden (Sprenger und Pohl, 1999; Pohl *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004; Duggleby, 2006; Müller *et al.*, 2009; Andrews und McLeish, 2012; Müller, 2012; Müller *et al.*, 2013; Germer *et al.*, 2019). Neben der Knüpfung und Spaltung von C-C-Bindungen können verschiedene ThDP-abhängige Enzyme auch die Bildung und Spaltung von C-S-, C-N-, C-O- und C-P-Bindungen katalysieren (Pohl *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2007). ThDP-abhängige Enzyme benötigen ThDP als Cofaktor. Freies ThDP weist im Gegensatz zu an Enzym gebundenem ThDP nur geringe katalytische Eigenschaften auf (Kluger und Tittmann, 2008). Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Enzym die Substrate in einen optimalen Abstand zum Cofaktor ThDP bringt und so die Reaktion ermöglicht wird (Kluger und Tittmann, 2008). ThDP enthält einen Pyrimidinring, der über eine Methylengruppe (CH₂) an einen Thiazoliumring gebunden ist (Abbildung 1.1; Jordan *et al.*, 2002, 2003).

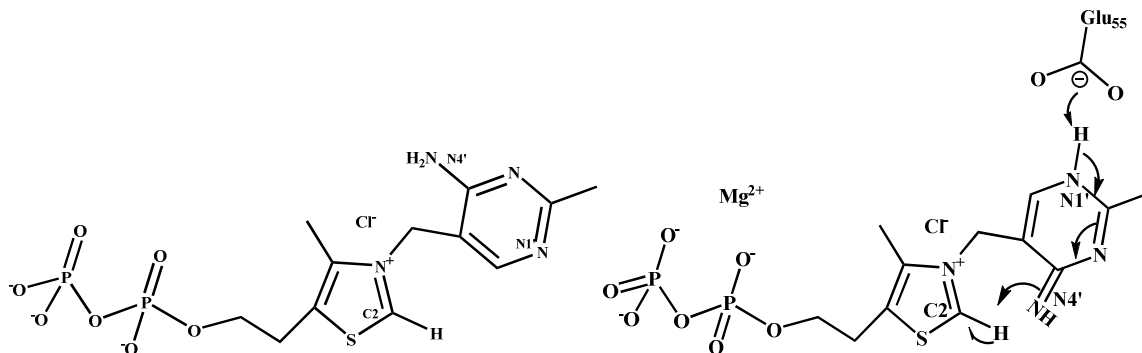


Abbildung 1.1: Lösliches (links) und an Enzym gebundenes ThDP (rechts).
(Modifiziert nach Jordan *et al.*, 2002, 2003; Nemeria *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2007)

Auch wenn der Katalysemechanismus von ThDP-abhängigen Enzymen vergleichbar ist, weisen sie eine relativ geringe Aminosäuresequenzidentität auf (Frank *et al.*, 2007). Die Tertiärstrukturen dieser Enzyme zeigen dagegen eine große Ähnlichkeit (Frank *et al.*, 2007). Es lässt sich daraus schließen, dass sich der den Cofaktor ThDP bindende Bereich im Rahmen einer divergenten Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat (Frank *et al.*, 2007; Costelloe *et al.*, 2008). Lindqvist *et al.* (1992) haben mit der Transketolase aus *Saccharomyces cerevisiae* als erste die Struktur eines ThDP-abhängigen Enzyms gelöst. Der Cofaktor wird koordinativ in der sogenannten V-Konformation über den Pyrimidinring an die N-terminale Pyrimidindomäne eines Monomers gebunden (Lindqvist *et al.*, 1992). Der Diphosphatrest wird über ein zweiwertiges Metallion an der C-terminalen Pyrophosphatdomäne des zweiten Monomers verankert. Die V-Konformation des ThDP gehört zu den konservierten Merkmalen der Gruppe ThDP-abhängiger Enzyme und ist für die Bildung der aktiven Ylid-Form des ThDP und damit für die enzymatisch katalysierte Reaktion essentiell

(Lindqvist *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1993; Dobritzsch *et al.*, 1998; Jordan, 2003; Schütz *et al.*, 2005; Duggleby, 2006; Amara *et al.*, 2007; Berthold *et al.*, 2007; Bruning *et al.*, 2009).

ThDP-abhängige Enzyme sind meist sehr spezifisch für das Donorsubstrat und werden nach diesem klassifiziert (vgl. Anhang Tabelle 7.1 und dort angegebene Referenzen).

Nach der katalysierten Reaktion können ThDP-abhängige Enzyme in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Enzyme mit einer Transferase-ähnlichen Aktivität und Enzyme mit einer Decarboxylaseaktivität (Frank *et al.*, 2007). Die Unterteilung in Subfamilien erfolgt nach der Sequenz- und Strukturähnlichkeit: eine Möglichkeit ist die Einteilung in acht Superfamilien mit abweichenden Domänen und einer funktionellen Annotation (Widmann *et al.*, 2010), die die Ergebnisse von Costelloe *et al.* (2008) und Duggleby (2006) kombiniert (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Strukturelle Merkmale der Proteindomänen der Superfamilien der ThDP-abhängigen Enzyme.

(Modifiziert nach Widmann *et al.*, 2010; Pyr = Pyrimidindomäne, PP = Pyrophosphatdomäne, TH3 = Transhydrogenase dIII-Domäne, TKC = Transketolase C-terminale Domäne)

Superfamilie	Anordnung der strukturellen Domänen
Decarboxylasen	
Transketolasen	
Oxidoreduktasen	
2-Ketosäuredehydrogenasen (K1)	
2-Ketosäuredehydrogenasen (K)	
Sulfofpyruvatdecarboxylasen	
Phosphopyruvatdecarboxylasen	
2-Ketoglutaratdehydrogenasen	

Aufbauend auf dieser Einteilung wurde die „ThDP-dependent Enzyme Engineering Database“ (TEED) aufgebaut, die einen umfassenden Überblick über die derzeit bekannten und untersuchten ThDP-abhängigen Enzyme liefert (Widmann *et al.*, 2010; Vogel *et al.*, 2012; Vogel und Pleiss, 2014; Buchholz *et al.*, 2016; <https://teed.biocatnet.de/>). Das Standardnummerierungsschema für die Familie der ThDP-abhängigen Decarboxylasen basiert auf der Pyruvatdecarboxylase aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 2VK8) (Vogel *et al.*, 2012). Vogel und Pleiss (2014) haben dieses System auf alle ThDP-abhängigen Enzyme ausgedehnt. Die Datenbank BioCatNet verbindet diese Enzymsequenzen mit den experimentellen Daten, wie den Reaktionsbedingungen und dem zeitlichen Verlauf der Reaktion (Buchholz *et al.*, 2016).

Diese Datenbank ist auch für die Verbesserung kinetischer Modelle von Enzymreaktionen geeignet (Buchholz *et al.*, 2018). Buchholz *et al.* (2019) haben statistische Methoden entwickelt, die den Struktur- und Funktionsvergleich der ThDP-abhängigen Enzyme vereinfachen. Nach Decarboxylierung der 2-Ketosäure durch das ThDP-abhängige Enzym sind je nach Enzym verschiedene Reaktionen möglich. In Abbildung 1.2 ist eine Auswahl dieser Additionsreaktionen dargestellt. Für weitere Beispiele vergleiche auch Müller (2012).

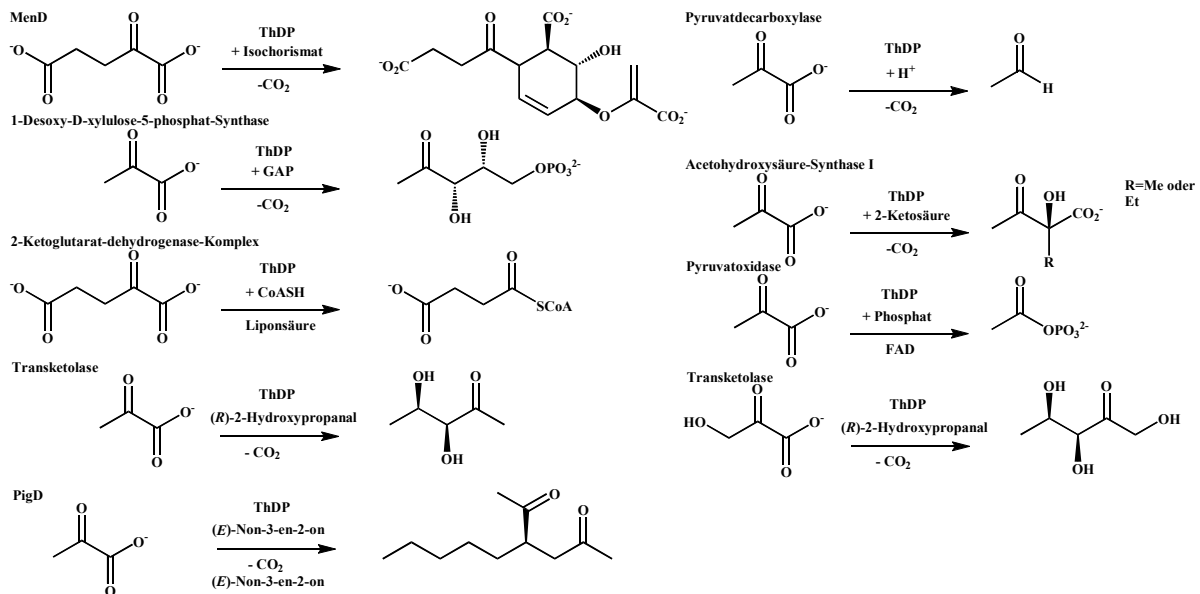


Abbildung 1.2: Katalysierte Reaktionen ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme.

Bei diesen Reaktionen werden 2-Ketosäuren als Substrate an den Cofaktor ThDP gebunden, decarboxyliert und die gebildeten Produkte freigesetzt. Hierbei werden in Abhängigkeit vom Enzym verschiedene Produkte gebildet (modifiziert und erweitert nach Holzer *et al.*, 1956; Kanzaki *et al.*, 1969; Muller und Schulz, 1993; Sprenger *et al.*, 1997; Turner, 2000; Pang *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007a; Dresen *et al.*, 2010)

Eine Gruppe der ThDP-abhängigen Enzyme, die sogenannten „Stetterasen“, katalysieren die 1,4-Addition des aktivierten Acetaldehydes an α,β -ungesättigte Ketone und Thioester (Beigi *et al.*, 2014). Ein Beispiel für eine Stetterase ist PigD, die die 1,4-Addition von Pyruvat (7) (nach Decarboxylierung zu Acetaldehyd) an eine Doppelbindung im Akzeptorsubstrat katalysiert (Abbildung 1.2; Dresen *et al.*, 2010). Bei diesen Reaktionen handelt es sich um typische Stetterreaktionen. Als Stetterreaktion wird die Transformation aromatischer Aldehyde als Donorsubstrate mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen (Michael-Akzeptorsubstrate) in der Anwesenheit von Cyanidionen als Katalysatoren bezeichnet, die in der Bildung von 1,4-Additionsprodukten resultiert (Stetter und Schreckenber, 1973). Hierbei wird ein Aldehyd durch einen nucleophilen Katalysator umpololt. Als Elektrophil dient bei dieser Reaktion nicht die Carbonylfunktion eines Akzeptormoleküles, sondern eine elektronenarme Doppelbindung. Alle als Stetterasen eingestuft ThDP-abhängigen-Enzyme wie PigD (Dresen *et al.*, 2010),

SeAAS und HapD (Kasparyan *et al.*, 2014) gehören zur PigD-Enzym-Unterfamilie und akzeptieren aliphatische und aromatische α,β -ungesättigte Säuren, Ketone, Nitrile und Thioester als Michael-Akzeptorsubstrate (Beigi *et al.*, 2014).

MenD katalysiert eine sogenannte Stetter-ähnliche 1,4-Addition (Kurutsch *et al.*, 2009). PigD und MenD zeigen beide auch eine 1,2-Carboligaseaktivität (Kurutsch *et al.*, 2009; Dresen *et al.*, 2010). Die Stetterasen, die zur Decarboxylase-Superfamilie gehören, sind nicht durch eine globale Sequenzähnlichkeit zu den anderen Familien innerhalb der Decarboxylasefamilie gekennzeichnet (Widmann *et al.*, 2010).

In den letzten Jahren wurden viele Publikationen zum Akzeptorspektrum und der Stereoselektivität der ThDP-abhängigen Enzyme veröffentlicht. Dagegen wurden nur wenige Arbeiten über das Donorspektrum ThDP-abhängiger Enzyme veröffentlicht. Häufige Donoren sind Acetaldehyd, 7, 2-Ketoglutarat (**1**) und Benzaldehyd (**5**) (vgl. Anhang Tabelle 7.2). Für einen detaillierten Überblick über das Donorspektrum von ThDP-abhängigen Enzymen vergleiche Anhang Tabelle 7.2 und weiterführende Literatur (Schörken und Sprenger, 1998; Dünkemann *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2013).

In den letzten Jahren wurden nur wenige neue Donoren eingeführt (vgl. Anhang Tabelle 7.2). Gerade deswegen können neue Donoren, die für eines der ThDP-abhängigen Enzyme eingeführt werden, auch für die anderen ThDP-abhängigen Enzyme große Möglichkeiten bieten.

1.1.2 Stereoselektivität ausgewählter ThDP-abhängiger Enzyme

Die Stereoselektivität einer Reaktion ist sowohl von den Substraten als auch vom Enzym abhängig (vgl. Gerhards *et al.*, 2012; Hailes *et al.*, 2013; Westphal *et al.*, 2013a, b, 2014a, b). Für eine hohe Stereoselektivität ist eine gute Stabilisierung der gebundenen Substrate im aktiven Zentrum erforderlich (Hailes *et al.*, 2013; Westphal *et al.*, 2013a, b, 2014a, b). Die meisten ThDP-abhängigen Enzyme weisen ebenso wie MenD eine hohe Selektivität für das (*R*)-konfigurierte Produkt auf, wodurch der Zugang zu (*S*)-konfigurierten Produkten eingeschränkt ist (Wilcocks und Ward, 1992; Iding *et al.*, 2000). Ausnahmen sind z.B. die Transketolase (Turner, 2000) und die Benzoylformiatdecarboxylase aus *Pseudomonas putida* (Wilcocks und Ward, 1992; Iding *et al.*, 1998). Rother née Gocke *et al.* (2008) haben das Konzept der „(*S*)-Pocket“ zur Erklärung der Stereochemie für die Bildung von Hydroxyketonen entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine 2-dimensionale Betrachtung der

Bindung der Substrate im aktiven Zentrum der Enzyme. Eine spezielle Konfiguration der Aminosäurereste im aktiven Zentrum erlaubt die antiparallele Anordnung von Donor- und Akzeptorsubstraten im aktiven Zentrum, die zur Bildung des (*S*)-konfigurierten Produktes führen kann (Abbildung 1.3).

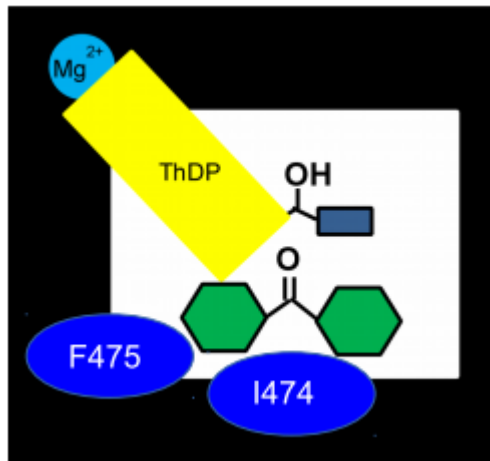


Abbildung 1.3: (*S*)-Pocket von *EcMenD_WT* mit den gebundenen Substraten 2-Ketoglutarat (1) und Benzaldehyd (5).
(Modifiziert nach Westphal *et al.*, 2013a)

Diese (*S*)-Pockets sind in den aktiven Zentren vieler (*R*)-selektiver Enzyme vorhanden, wobei eine antiparallele Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum häufig nicht möglich ist, da lange Aminosäureseitenketten den Platz einnehmen (Rother née Gocke *et al.*, 2011). Rother née Gocke *et al.* (2011) haben aus der (*R*)-selektiven *ApPDC* eine (*S*)-selektive Variante (*ApPDC*-E469G) entwickelt, die den Zugang zu (*S*)-Phenylacetylcarbinolderivaten mit bis zu 89% Enantiomerenüberschuss (*ee*) ermöglicht. Reaktionen mit aliphatischen Substraten führen häufig zu deutlich niedrigeren *ee* (vgl. Domínguez de María *et al.*, 2007; Rother née Gocke *et al.*, 2009; Gerhards *et al.*, 2012).

Westphal *et al.* (2013a) haben das (*S*)-Pocket-Konzept auf MenD übertragen. Die beiden Aminosäuren I474 und F475 verhindern die antiparallele Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum. Durch rationales Proteindesign haben Westphal *et al.* (2013a) MenD-Varianten entwickelt und die inhärente Stereoselektivität von MenD für die 1,2-Additionsreaktion von 2-Ketoglutarat (1) an Benzaldehyd (5) von *ee* > 99% (*R*)-Konfiguration zu ~75% *ee* (*S*)-Konfiguration durch den Austausch zweier Aminosäuren (I474A/F475G) gedreht. Westphal *et al.* (2013b) haben das aktive Zentrum so verändert, dass die zum (*R*)-Enantiomer führende Anordnung der Substrate nicht mehr stabilisiert wird und in der Folge die Bildung des (*R*)-Enantiomeres schlechter abläuft. Diese Variante MenD_I474A_F475G_R395Y katalysiert

die 1,2-Addition von **1** an meta-substituierte Benzaldehydderivate mit einem ee von 99% für das (*S*)-Enantiomer (Westphal *et al.*, 2013b).

Für MenD aus *Bacillus subtilis* wurden MenD-Varianten erhalten, die (*S*)-selektiv die 1,2-Addition von **1** an **5** mit moderaten bis hohen Umsatzraten katalysieren und das (*S*)-Enantiomer mit ee bis zu 98% bilden (Westphal *et al.*, 2014a). Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Aussagen zur Stereoselektivität von MenD bisher nur für die 1,2-Addition und die Bildung von 2-Hydroxyketonen untersucht wurden. Dieses (*S*)-Pocket-Konzept beschreibt somit die Stereoselektivität für Acyloinkondensationsreaktionen und nicht für 1,4-Additionsreaktionen. Außerdem wurde eine eventuelle Anwendung dieses Konzeptes für Decarboxylasereaktionen, d.h. eine eventuelle Stereoselektivität für das Substrat bei der Decarboxylierung, bisher nicht beschrieben.

1.1.3 Die Stetter-ähnliche SEPHCHC-Synthase MenD

Das ThDP-abhängige Enzym MenD ist ein Bestandteil des Menachinonbiosyntheseweges in einigen Bakterien wie *E. coli* (Abbildung 1.4, Emmons *et al.*, 1985; Jiang *et al.*, 2007a).

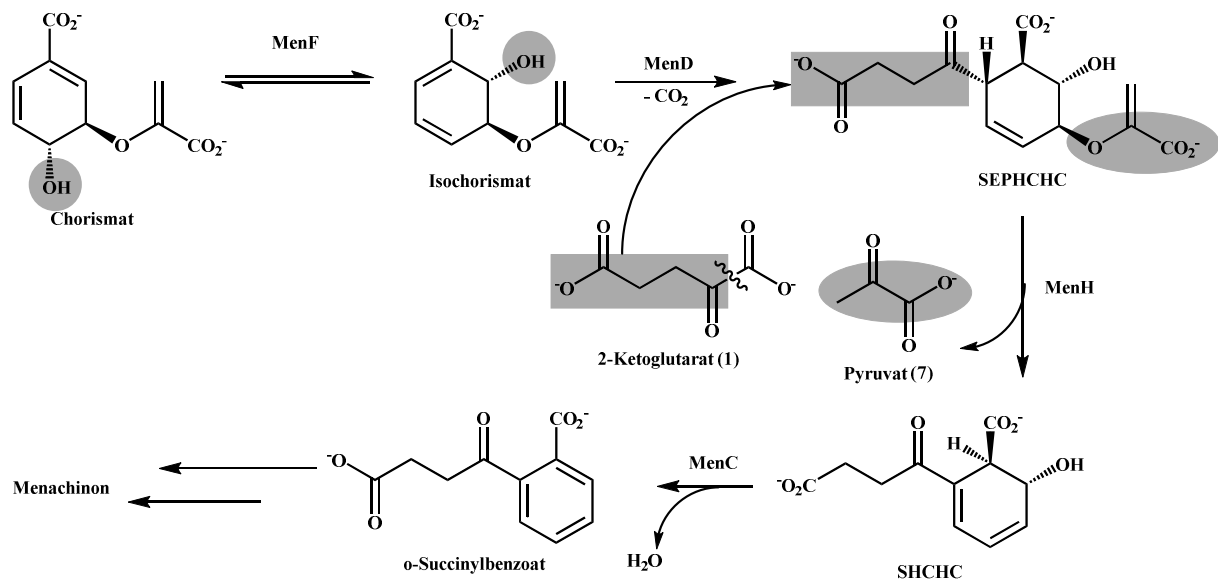


Abbildung 1.4: Menachinonbiosynthese in *E. coli*.

Die Umsetzung von SEPHCHC zu SHCHC wird durch MenH katalysiert, kann *in vitro* auch basenkatalysiert ablaufen (Sharma *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1996; Daruwala *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2007a, b, 2009).

Der erste Reaktionsschritt ist die Isomerisierung von Chorismat zu Isochorismat, der durch die Isochorismat-Synthase MenF aus dem Gencluster des Menachinonbiosyntheseweges katalysiert wird (Abbildung 1.4; Daruwala *et al.*, 1996). Die Isomerase EntC aus dem

Enterobactinbiosyntheseweg katalysiert ebenfalls die Isomerisierung von Chorismat zu Isochorismat (Liu *et al.*, 1990). MenD katalysiert die 1,4-Addition von 2-Ketoglutarat (**1**) an Isochorismat (Meganathan und Bentley, 1983; Emmons *et al.*, 1985; Jiang *et al.*, 2007a). Hierbei handelt es sich um eine sogenannte Stetter-ähnliche 1,4-Additionsreaktion. Jiang *et al.* (2007a) zeigten, dass das Produkt der MenD-Reaktion SEPHCHC ist und die Enolpyruvatgruppe nicht-enzymatisch unter leicht alkalischen Bedingungen abgespalten, als Pyruvat (**7**) freigesetzt und SHCHC gebildet werden kann. Die Eliminierung von **7** kann auch durch das Enzym MenH katalysiert werden (Jiang *et al.*, 2009). Die Struktur des Produktes der MenD-Reaktion wurde durch Jiang *et al.* (2007b) als (1*R*,2*S*,5*S*,6*S*)-2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylat bestimmt. Menachinon ist ein Teil des Elektronentransportsystems und wird von anaeroben Bakterien für das Wachstum benötigt (Meganathan, 1996). In den meisten anaeroben und Gram-positiven aeroben Bakterien ist Menachinon der einzige Elektronentransporter in der Atmungskette und ist für das Überleben der Bakterien essentiell (Meganathan 1996, 2001). In fakultativ anaeroben Gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, dient Menachinon während des anaeroben Wachstums als Elektronenüberträger (Meganathan 1996, 2001).

Daneben gibt es in Bakterien wie *Streptomyces coelicolor* einen zweiten Menachinonbiosyntheseweg, der als Futalosinstoffwechselweg bezeichnet wird (Hiratsuka *et al.*, 2008; Seto *et al.*, 2008). Ausgehend von Chorismat, Inosin und einer C2-Einheit, die möglicherweise von Phosphoenolpyruvat stammt, wird über mehrere enzymatische Zwischenschritte Menachinon gebildet.

1.1.4 ThDP-Reaktionsmechanismus – Carboligaseaktivität am Beispiel MenD

ThDP-abhängige Enzyme katalysieren die Ausbildung von C-C-Bindungen in zwei sequentiell aufeinanderfolgenden Reaktionen, die zur Bildung metastabiler Intermediate führen (Frank *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007a; Meshalkina *et al.*, 2009; Tittmann und Wille, 2009; Meyer *et al.*, 2010; Belenky *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2013; Jordan und Nemeria, 2014). Der Einfluss der Struktur des aktiven Zentrums der ThDP-abhängigen Enzyme und die katalytischen Prinzipien der durch ThDP-abhängige Enzyme katalysierten Reaktionen wurden durch Tittmann (2014) zusammengefasst. Der enzymatische Mechanismus für die durch MenD katalysierte 1,4-Addition von 2-Ketoglutarat (**1**) an Isochorismat zu SEPHCHC ist vergleichbar mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen und wurde bereits 1985 durch Emmons *et al.* postuliert. Durch

Arbeiten von Jiang *et al.* (2007a, b), Jirgis *et al.* (2016) und Song *et al.* (2016) wurden detailliertere Erkenntnisse für die MenD-Reaktion gewonnen, so dass der postulierte Reaktionsmechanismus angepasst werden musste (Abbildung 1.5).

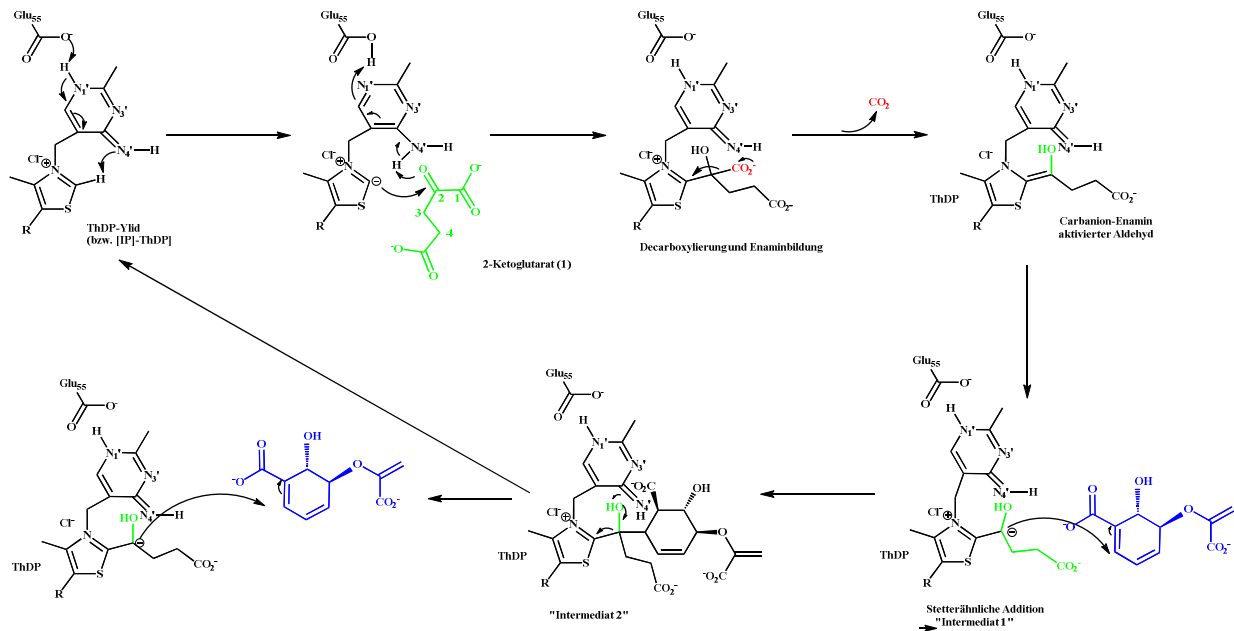


Abbildung 1.5: Postulierter Mechanismus der durch MenD katalysierten 1,4-Addition von 1 an Isochorismat.

(Modifiziert nach Jirgis *et al.*, 2016)

Die Katalyse beginnt – vergleichbar mit anderen ThDP-abhängigen Enzymen - mit der Deprotonierung des Cofaktors ThDP am C2-Atom des Thiazoliumringes, wodurch ein sogenanntes aktives Ylid gebildet wird (Abbildung 1.5; Breslow, 1958; Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Das gebildete Ylid greift im nächsten Schritt nucleophil das Donorsubstrat **1** an der Carbonylgruppe an und bindet diese an das C2-Atom des Thiazoliumringes des Cofaktors ThDP unter Ausbildung eines metastabilen Zwischenproduktes (Emmons *et al.*, 1985; Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Bei der anschließenden nicht-oxidativen Decarboxylierung des Donorsubstrates **1** wird unter Freisetzung eines CO_2 -Moleküls ein Enamin-Carbanion-Komplex bzw. ThDP-gebundener Aldehyd („aktivierter Aldehyd“) gebildet (Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Hierbei wird am Carbonylkohlenstoff ein Carbanion gebildet, dieser Kohlenstoff wird dadurch umgepolt und erhält einen nucleophilen Charakter (Breslow, 1958; Emmons *et al.*, 1985; Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Nach der nucleophilen 1,4-Addition des elektrophilen Akzeptormoleküles Isochorismat und der Bildung einer neuen intermolekularen C-C-Bindung erfolgt die Freisetzung des Produktes und die Regeneration des ThDP (Emmons *et al.*, 1985; Fang *et al.*, 2011; Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016).

Paulikat *et al.* (2017) konnten mittels Circular dichroismus (CD) den Elektronentransfer zwischen dem Pyrimidin – und dem Thiazoliumring des ThDP und dem für die Reaktion wichtigen Glutamat zeigen. Viele dieser Teilschritte wurden mittels CD, Kristallstrukturanalyse und NMR bestätigt (vgl. Balakrishnan *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2012, 2013; Neumann und Tittmann, 2014; Tittmann, 2014; Paulikat *et al.*, 2017; Andrews *et al.*, 2016; und dort angegebene weiterführende Literatur).

Für die Katalyse durch ThDP-abhängige Enzyme wurde ein Enamin als reaktives Intermediat beschrieben (Kluger und Tittmann, 2008; Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Dieses Intermediat konnte jedoch beim Katalysezyklus von MenD nicht nachgewiesen werden (Song *et al.*, 2016). Stattdessen wird nach Decarboxylieren des Donorsubstrates ein aktives tetrahedrales Intermediat gebildet und nach Addition an das Akzeptorsubstrat wird das Produkt freigesetzt und der Cofaktor regeneriert (Jirgis *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2016). Qin *et al.* (2018a) wiesen einige Intermediate nach, die zeigen, dass der Reaktionsmechanismus bei MenD sich in Details von anderen ThDP-abhängigen Enzymen unterscheidet. Nach der Decarboxylierung bildet sich, geschwindigkeitslimitiert durch die Bindung von **1**, ein Intermediat, das sich im nächsten Schritt zum tetrahedralen Breslow-Intermediat umlagert.

1.1.4.1 Kristallstruktur von MenD

Die Kristallstruktur von *E. coli* MenD (*EcMenD*) wurde erstmals 2008 durch Dawson *et al.* gelöst. Diese Struktur zeigt, dass die für die ThDP-abhängigen Enzyme typische Drei-Domänenstruktur ausgebildet wird, bei der der Cofaktor durch zwei Domänen verschiedener Monomere des dimeren Enzyms gebunden und in die aktive V-Konfiguration gebracht wird, die wiederum die Bildung des Ylides unterstützt.

Dawson *et al.* (2010) konnten die Kristallstruktur von MenD aus *Bacillus subtilis* (*BsMenD*) lösen und zeigen, dass *EcMenD* und *BsMenD* in der Struktur große Ähnlichkeiten zeigen, obwohl die Sequenzidentität mit 28% gering ist. Ein Monomer besteht aus 556 Aminosäuren, die 23 α -Helices und 17 β -Faltblätter ausbilden (Molare Masse ~ 61.4 kDa) (Dawson *et al.*, 2008; Priyadarshi *et al.*, 2009a, b; Dawson *et al.*, 2010). Das aktive Zentrum wird jeweils von zwei Monomeren gebildet und der Substratkanal befindet sich zwischen den beiden Dimeren. Dieser Kanal ermöglicht es die zwei korrespondierenden aktiven Zentren zu steuern (Dai *et al.*, 2019; Mitschke *et al.*, 2010). Das Reaktionszentrum mit dem gebundenen Cofaktor ThDP befindet sich am Ende des Substratkanals. Zur richtigen Faltung des aktiven Zentrums wird die Bindung des Cofaktors benötigt, wogegen dieser zur Ausbildung der Quartärstruktur nicht

zwingend erforderlich ist (Priyadarshi *et al.*, 2009b). Wie in Abbildung 1.6 dargestellt, bilden hoch-konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum von MenD einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich (vgl. auch Dawson *et al.*, 2008). Qin *et al.* (2018b) zeigten, dass Arg395 und Arg413 im aktiven Zentrum für die richtige Orientierung des Donors wichtig sind.

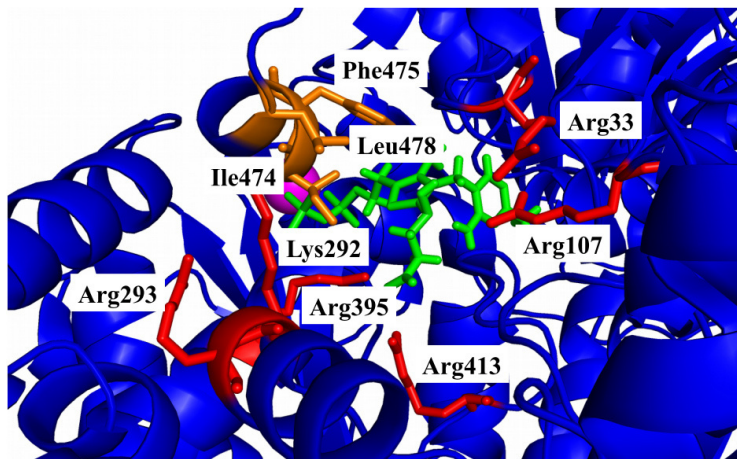


Abbildung 1.6: Aufteilung des aktiven Zentrums von MenD in einen hydrophoben und einen hydrophilen Bereich.

Orange: hydrophobe Aminosäuren (Ile474, Phe475, Leu478), rot: hydrophile Aminosäuren (Arg33, Arg107, Lys292, Arg293, Arg395, Arg413), Cofaktor THDP mit gebundenen Substraten Isochorismat und 2-Ketoglutarat (**1**): grün, Mn^{2+} : pink; Kristallstruktur: PDB 5EJA, Song *et al.*, 2016, erstellt mit PyMOL im Darstellungsmodus „sticks“.

2016 wurden Kristallstrukturen von MenD aus *Mycobacterium tuberculosis* (*MtMenD*, Jirgis *et al.*, 2016) bzw. aus *E. coli* (*EcMenD*, Song *et al.*, 2016) veröffentlicht. Diese Kristallstrukturen enthalten sowohl den Donor 2-Ketoglutarat (**1**) als auch den Cofaktor ThDP, wodurch erstmalig die Bindung von **1** bzw. Succinylaldehyd an den Cofaktor ThDP nachgewiesen werden konnte. Somit können aus diesen Strukturen Rückschlüsse auf die Bindung von **1** an den Cofaktor ThDP im aktiven Zentrum von MenD gezogen werden (vgl. Kapitel 3.5).

Jirgis *et al.* (2016) lösten eine Serie von Kristallstrukturen, die die einzelnen Reaktionsschritte der Substratbindung und der 1,4-Addition von **1** an Isochorismat abbilden (vgl. Kapitel 1.1.4). Darüber hinaus zeigen diese Strukturen, dass von den beiden aktiven Zentren eines Monomeren immer nur eines ThDP gebunden hat, somit aktiv ist und Substrat binden kann. Dies entspricht der Beobachtung, dass viele ThDP-abhängige Enzyme eine sogenannte alternierende Aktivität zeigen, d.h. das immer nur eines der beiden aktiven Zentren der funktionalen Dimere das Substrat bindet (Schröder-Tittmann *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Substratspektrum von MenD

Im folgenden Kapitel ist dargestellt, was die Arbeitsgruppe von Michael Müller als maßgebliche Quelle über das Substratspektrum von MenD beschrieben hat. Diese Arbeiten wurden durch weitere Gruppen (Pohl, Rother und Palmer) ergänzt. Neben der 1,4-Addition katalysiert MenD 1,2-Additionsreaktionen an α,β -ungesättigte Carbonyl- oder Carboxylgruppen des Akzeptorsubstrates (Kurutsch *et al.*, 2009; Beigi *et al.*, 2013b). Sowohl bei der 1,2-Addition als auch bei der 1,4-Addition handelt es sich um nucleophile Additionsreaktionen (Kurutsch *et al.*, 2009). Der Donor 2-Ketoglutarat (**1**) wird hierbei zu aktiviertem Succinylsemialdehyd decarboxyliert, der im nächsten Schritt an eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung addiert wird (Kurutsch *et al.*, 2009). Bei der 1,2-Addition wird das decarboxylierte Donorsubstrat an die Carbonylgruppe (Kurutsch *et al.*, 2009) und bei der 1,4-Addition an die Doppelbindung des Akzeptorsubstrates (Jiang *et al.*, 2007a) addiert (Abbildung 1.7).

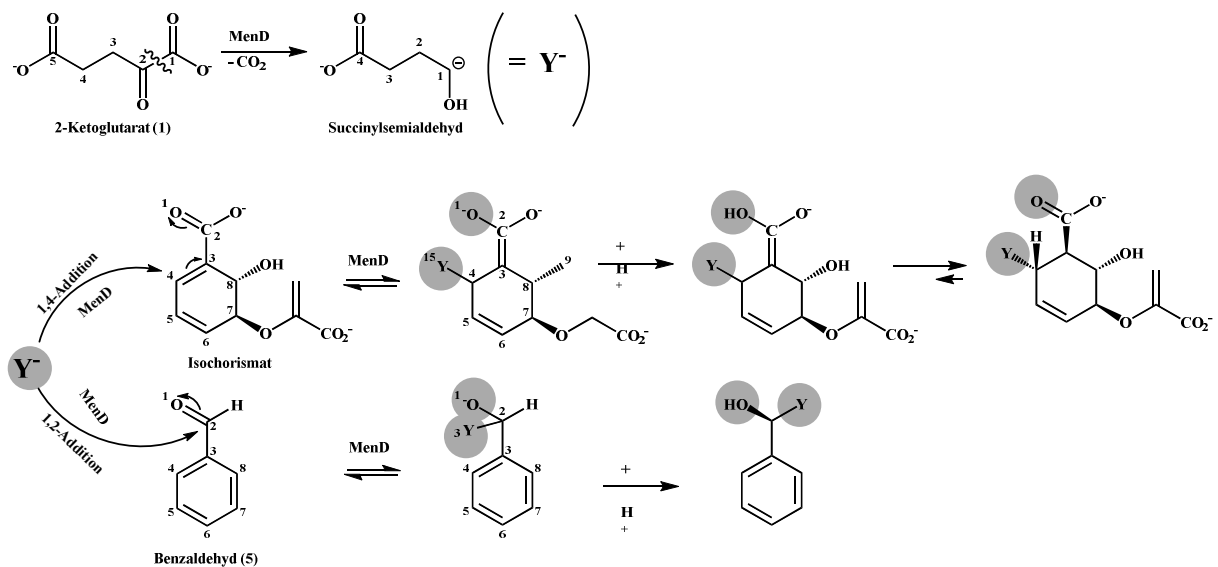


Abbildung 1.7: Verlauf der nucleophilen durch MenD katalysierten 1,2- und 1,4-Additionsreaktionen.

(Basierend auf Kurutsch *et al.*, 2009)

Bei der 1,4-Addition bildet sich zuerst ein Enol, das auf Grund des thermodynamischen Gleichgewichtes in das stabilere Keton übergeht. Der besseren Übersichtlichkeit wird im Folgenden geschrieben, dass **1** addiert wird, auch wenn der nach der Decarboxylierung erhaltene Succinylsemialdehyd an das Akzeptorsubstrat addiert wird.

Enge Substratspezifität für die 1,4-Addition

MenD zeigt für die 1,4-Addition an cyclische Verbindungen ein enges Substratspektrum für das Akzeptorsubstrat (Kurutsch *et al.*, 2009; Beigi *et al.*, 2014). Kurutsch *et al.* (2009) wiesen die 1,4-Addition von **1** an 2,3-CHD (**3**) zum Produkt (5*S*,6*S*)-2-Succinyl-5,6-dihydroxycyclohex-3-en-1-carboxylat (SDHCHC) nach. Dieses kann durch eine Umlagerung der Doppelbindung im Ring zu (5*S*,6*S*)-2-Succinyl-5,6-dihydroxycyclohex-2-en-1-carboxylat (Iso-SDHCHC) isomerisieren (Kurutsch *et al.*, 2009). **3** zeigt eine deutlich erhöhte Stabilität im Vergleich zu Chorismat und Isochorismat (Hubrich *et al.*, 2014) was insbesondere bei *in vitro*-Umsätzen zu einer höheren Produktausbeute führt, da **3** nicht wie Chorismat bzw. Isochorismat zerfällt. Daneben katalysiert MenD auch die 1,4-Addition an aliphatische Substrate wie Acrylsäure (**4**). Eine Übersicht der Akzeptor- und Donorsubstrate für die 1,4-Additionsreaktion ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

Tabelle 1.2: Ausgewählte Akzeptor- und Donorsubstrate von MenD für die 1,4-Additionsreaktion.

Akzeptorsubstrat	Referenz	Donorsubstrat	Referenz
Isochorismat	Emmons <i>et al.</i> , 1985; Jiang <i>et al.</i> , 2007a	2-Ketoglutarat (1)	Emmons <i>et al.</i> , 1985; Jiang <i>et al.</i> , 2007a
2,3-CHD (3)	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009	HOG (Eda) (2a)	Baier, persönliche Mitteilung
Isochorismat-Analogon: (5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-trans-5-Carboxymethoxy-6-hydroxycyclohexa-1,3-dien-1-carboxylat	Fang <i>et al.</i> , 2010, 2011	(<i>RS</i>)-HOG (2)	Baier, persönliche Mitteilung
Acrylsäure (4)	Beigi <i>et al.</i> , 2014	2-Ketobutyrat	Baier, persönliche Mitteilung
Methacrylsäure	Beigi <i>et al.</i> , 2014	Oxalacetat	Baier, persönliche Mitteilung
Acrylnitril	Beigi <i>et al.</i> , 2014	Pyruvat (7)	Baier, persönliche Mitteilung
Acrylsäuremethylester	Beigi <i>et al.</i> , 2014		
Methylvinylketon	Beigi <i>et al.</i> , 2014		

Substratspezifität für die 1,2-Addition

Für die durch MenD katalysierten 1,2-Additionen ist das Spektrum für das Akzeptorsubstrat deutlich umfangreicher als für die 1,4-Addition (Kurutsch *et al.*, 2009; Beigi *et al.*, 2014). *In vitro* wurden 1,2-Additionsreaktionen an aromatische Aldehyde wie Benzaldehyd (**5**) bzw. 2-F-Benzaldehyd oder aliphatische Aldehyde wie Hexanal (**6**) mit **1** als Donor unter Bildung chiraler 2-Hydroxyketone gezeigt (Kurutsch *et al.*, 2009).

Die Kohlenstoffkette der aliphatischen Akzeptorsubstrate kann variiert werden (Kurutsch *et al.*, 2009). MenD akzeptiert auch Aldehyde als Substrate, die Doppelbindungen in der Struktur oder Seitengruppen aufweisen (Kurutsch *et al.*, 2009). Eine Auswahl der Akzeptor- und Donorsubstrate für MenD ist in Tabelle 1.3 dargestellt, wobei zu berücksichtigen ist, dass eine Vielzahl von hydroxylierten, halogenierten oder mit Methoxygruppen versehenen Benzaldehydderivaten erfolgreich als Akzeptorsubstrate für MenD untersucht wurden (Kurutsch *et al.*, 2009; Westphal *et al.*, 2013a, b, 2014a).

Tabelle 1.3: Ausgewählte Akzeptor- und Donorsubstrate von MenD für die 1,2-Additionsreaktion.

Akzeptorsubstrat	Referenz	Donorsubstrat	Referenz
Benzaldehyd (5)	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009	2-Ketoglutarat (1)	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009
F-Benzaldehyd	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009	Pyruvat (7)	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009
Hexanal (6)	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009	Oxalacetat	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009
Acetaldehyd	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009	2-Ketosuccinat	Beigi <i>et al.</i> , 2013
Cyclohex-1-en-1-carbaldehyd	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009		
Pentalen	Beigi <i>et al.</i> 2013		
Zimtaldehyd	Beigi <i>et al.</i> , 2013		

MenD zeigt eine hohe Regioselektivität (Kurutsch *et al.*, 2009; Westphal *et al.*, 2013a, b). Eine Ausnahme bildet die Addition von **1** und Pyruvat (**7**) durch MenD, die eine scheinbar veränderte Regioselektivität zeigt (Kurutsch *et al.*, 2009). Durch NMR- und CD-Spektroskopie konnten Beigi *et al.* (2013a) zeigen, dass die Reaktion nach dem üblichen MenD-Schema verläuft und **1** zu Succinylsemialdehyd decarboxyliert und dann auf **7** übertragen wird, das als Akzeptor dient. Im nächsten Schritt kommt es zur Decarboxylierung des Produktes und es wird das Endprodukt mit der scheinbar veränderten Regioselektivität gebildet (Abbildung 1.8, Beigi *et al.*, 2013a).

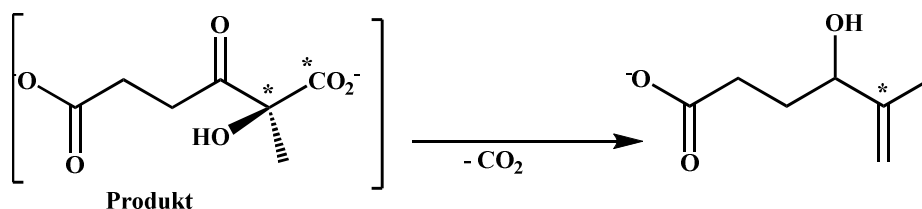


Abbildung 1.8: Produkt der MenD katalysierten Addition von **1 an **7**.**
(Modifiziert nach Beigi *et al.*, 2013a)

1.2 C-C-Bindungsspaltung und - Knüpfung durch Aldolasen

Eine wichtige Gruppe der C-C-Bindungsenzyme sind Aldolasen, von denen viele sowohl die Aldolspaltung als auch die Aldolkondensation katalysieren (Samland und Sprenger, 2006; Sprenger *et al.*, 2007; Clapés *et al.*, 2010; Brovetto *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2016; Bilal *et al.*, 2018). Aldolasen gehören zur Enzymklasse der Lyasen (E.C. 4.1.x.x) und katalysieren die Addition von nucleophilen Donorsubstraten (meistens Ketone) an elektrophile Akzeptoren (meistens Aldehyde) zu β -Hydroxycarbonylverbindungen (Samland und Sprenger, 2006; Clapés *et al.*, 2010; Brovetto *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2016; Bilal *et al.*, 2018). Die meisten Aldolasen zeigen eine hohe Stereoselektivität, was bedeutet, dass die Stereokonfiguration der neu gebildeten Stereozentren der Produkte durch die Strukturen im aktiven Zentrum der Enzyme vorgegeben wird und nicht durch die Wahl der eingesetzten Substrate (Clapés *et al.*, 2010; Brovetto *et al.*, 2011; Schmidt *et al.*, 2016; Bilal *et al.*, 2018). Die Aldolkondensationsreaktionen der Aldolasen sind thermodynamisch begünstigt bzw. können durch Zugabe eines Überschusses eines Substrates zum Produkt verschoben werden (Samland und Sprenger, 2006; Sprenger *et al.*, 2007; Clapés *et al.*, 2010; Brovetto *et al.*, 2011). Viele Aldolasen werden zur Synthese komplexer Zucker, deren Analoga und anderer natürlicher Komponenten eingesetzt (Sprenger und Pohl, 1999; Fessner, 2004; Samland und Sprenger, 2006; Hecquet *et al.*, 2009; Clapés *et al.*, 2010; Samland 2012; Samland *et al.*, 2015; Hernandez *et al.*, 2017). Ein weiterer Vorteil für die Anwendung ist, dass viele Aldolasen (Klasse 1-Aldolasen) keinen Cofaktor benötigen und somit auf den Einsatz kostspieliger Cofaktoren verzichtet werden kann (Fessner, 2004).

Aldolasen werden nach der Art des Nucleophilen in fünf Gruppen eingeteilt: Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)-Aldolasen, Glycin-Aldolasen, Acetaldehyd-Aldolasen, Pyruvat/Phosphoenolpyruvat-(PEP)-Aldolasen und Dihydroxyaceton (DHA)-Aldolasen (Samland *et al.*, 2015). Die Fructose-6-Phosphat-Aldolase (FSA), die die Spaltung von Fructose-6-phosphat in Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton katalysiert, bildet eine eigene Gruppe (erstmalig gezeigt durch Schürmann und Sprenger, 2001). Die größte Gruppe der Aldolasen nutzt Pyruvat (7) oder Phosphoenolpyruvat als Nucleophil. Die meisten Pyruvat/PEP-abhängigen Aldolasen sind mikrobiellen Ursprungs (Samland und Sprenger, 2006). Pyruvat-abhängige Aldolasen haben *in vivo* meist katabole Funktionen, wogegen PEP-abhängige Aldolasen in die Biosynthese von α -Ketosäuren involviert sind (Samland und Sprenger, 2006).

1.2.1 KDPGlc- und KDPGal-Aldolasen // HOG-Aldolasen Eda und DgoA

Im Entner-Doudoroff-Weg katalysiert die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPGlc)-Aldolase (Entner-Doudoroff-Aldolase), die reversible, stereoselektive Retroaldolspaltung von KDPGlc zu Pyruvat (7) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (Entner und Doudoroff, 1952; MacGee und Doudoroff, 1954; Conway, 1992). Die HOG-Aldolase Eda aus *E. coli* besitzt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Glyoxylatkonzentration in *E. coli*, die auf der Aldolkondensation bzw. Aldolspaltung von 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, 2) beruht (Gupta und Dekker, 1980, 1984; vgl. Kovachevich und Wood, 1955; Shelton und Toone, 1995). Interessant ist, dass Eda aus *E. coli* eine ähnliche Nukleotidsequenz aufweist wie die KDPGlc-Aldolase aus *E. coli*, was die Ähnlichkeit der Enzyme andeutet (Conway 1992; Egan *et al.*, 1992; Patil und Dekker, 1992). Vlahos und Dekker (1988) konnten zeigen, dass die Aminosäuresequenzen der Aldolasen Eda und KDPGlc-Aldolase eine sehr gute Übereinstimmung zeigen. Egan *et al.* (1992) haben die HOG-Aldolase Eda nach der von Patil und Dekker (1992) publizierten Sequenz kloniert und zeigten, dass dieses Enzym vergleichbare strukturelle Eigenschaften aufweist wie bei Vlahos und Dekker (1988) beschrieben. Um dies zu belegen, haben Egan *et al.* (1992) diese HOG-Aldolase Eda zur Spaltung von KDPGlc eingesetzt. Das positive Ergebnis dieser KDPGlc-Aldolase-Reaktion verbunden mit den großen Ähnlichkeiten der postulierten Primärsequenzen und Strukturen bestätigt, dass es sich um identische Enzyme handelt. Deshalb werden im Folgenden die beiden Enzyme KDPGlc-Aldolase und HOG-Aldolase Eda als ein Enzym zusammengefasst und kurz als Eda bezeichnet.

Im De Ley-Doudoroff-Weg katalysiert die 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogalactonat (KDPGal)-Aldolase (codiert durch das Gen *dgoA*, vgl. UniProt Q6BF16) die Spaltung von KDPGal zu 7 und Glycerinaldehyd-3-phosphat (Ley und Doudoroff, 1957; Peekhaus und Conway, 1998; Gerhardt *et al.*, 1994). Im Folgenden wird dieses Enzym vereinfachend als „DgoA“ bezeichnet.

Nach Henderson *et al.* (1998) sind die Aldolasen Eda und DgoA komplementär für die Spaltung der Zuckerphosphate KDPGlc (Eda) bzw. KDPGal (DgoA) zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und 7, wobei sich die Spezifität der Enzyme für die Stereokonfiguration am C4 des Substrates unterscheidet (Abbildung 1.9, vgl. auch Cotterill *et al.*, 1998).

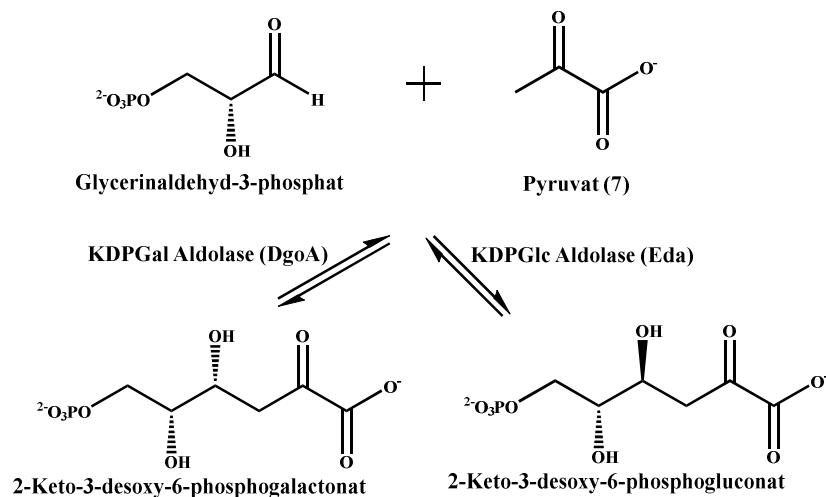


Abbildung 1.9: Reaktionsschema für die Katalyse der Aldolkondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat und 7 durch die komplementären Aldolasen Eda bzw. DgoA.

(Modifiziert nach Henderson *et al.*, 1998)

Somit besteht die Möglichkeit, dass beide Enzyme auch für die Bildung von **2** komplementär sind. Für DgoA wurde die Reaktion zur Bildung von **2** bisher nicht beschrieben. Henderson *et al.* (1998) haben gezeigt, dass die Aldolase DgoA 7 und Glyoxylat (**8**) als Substrate akzeptiert. Die Autoren haben weder die Bildung von Produkt nachgewiesen noch dessen Struktur bestimmt. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auch DgoA ebenso wie Eda **2** bilden könnte, allerdings müsste zur Klärung zuerst die Struktur des Produktes der DgoA-Reaktion bestimmt werden.

Funktionell ist Eda in *E. coli*-Zellen an der Stressantwort der Zellen beteiligt (Cayrol *et al.*, 1995). Die Aldolase Eda kann, wenn sie als Fusionsprotein exprimiert wird, die Löslichkeit heterologer Proteine im Zytoplasma von *E. coli* erhöhen (Kang *et al.*, 2015). Eda wird konstitutiv gebildet und eine stark erhöhte Expression kann bei Wachstum auf Gluconat, Glucuronat oder auch Methyl- β -D-glucuronid induziert werden (Murray und Conway, 2005). Ebenso können eine Limitierung der Phosphat – und Kohlenstoffquellen die Bildung von Eda induzieren (Murray und Conway, 2005). Die Expression von DgoA kann bei Wachstum auf Galactose oder Galactonat induziert werden (Henderson *et al.*, 1998).

1.2.2 HOG-Aldolasen Eda und DgoA: Struktur und Reaktionsmechanismus

Die beiden aus *E. coli* stammenden Aldolasen Eda und DgoA zeigen in der Aminosäuresequenz eine Identität von 25% und in der räumlichen Struktur von 43% (Ran und Frost, 2007). Beide Aldolasen sind Lysin-abhängige Aldolasen (Klasse 1-Aldolasen), benötigen keinen Cofaktor und katalysieren die Reaktion über die Bildung einer Schiff'schen Base als Intermediat (Wymer

et al., 2001 bzw. Walters *et al.*, 2008). Beide Aldolasen sind gleich groß (Eda: 22 kDa (Patil und Dekker, 1992); DgoA: 21 kDa (Walters *et al.*, 2008)) und liegen als Homotrimer vor (Patil und Dekker, 1992; Walters *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Strukturen der Eda und der DgoA hat gezeigt, dass beide Aldolasen die für Klasse-1-Aldolasen typische α,β -Barrel-Struktur ausbilden (Fullerton *et al.*, 2006; Walters *et al.*, 2008). In einem konservierten Bereich am Kanal des C-terminalen Endes des Barrels in der Nähe der Schiff'schen Base wird durch das „Phosphat-Binde-Motiv“ in jeder Untereinheit ein Phosphat gebunden (Fullerton *et al.*, 2006).

Fullerton *et al.* (2006) haben, aufbauend auf Kristallstrukturen von Wildtyp-Enzym und Enzymvarianten, einen Mechanismus für die durch Eda katalysierte Aldoladdition postuliert (Abbildung 1.10).

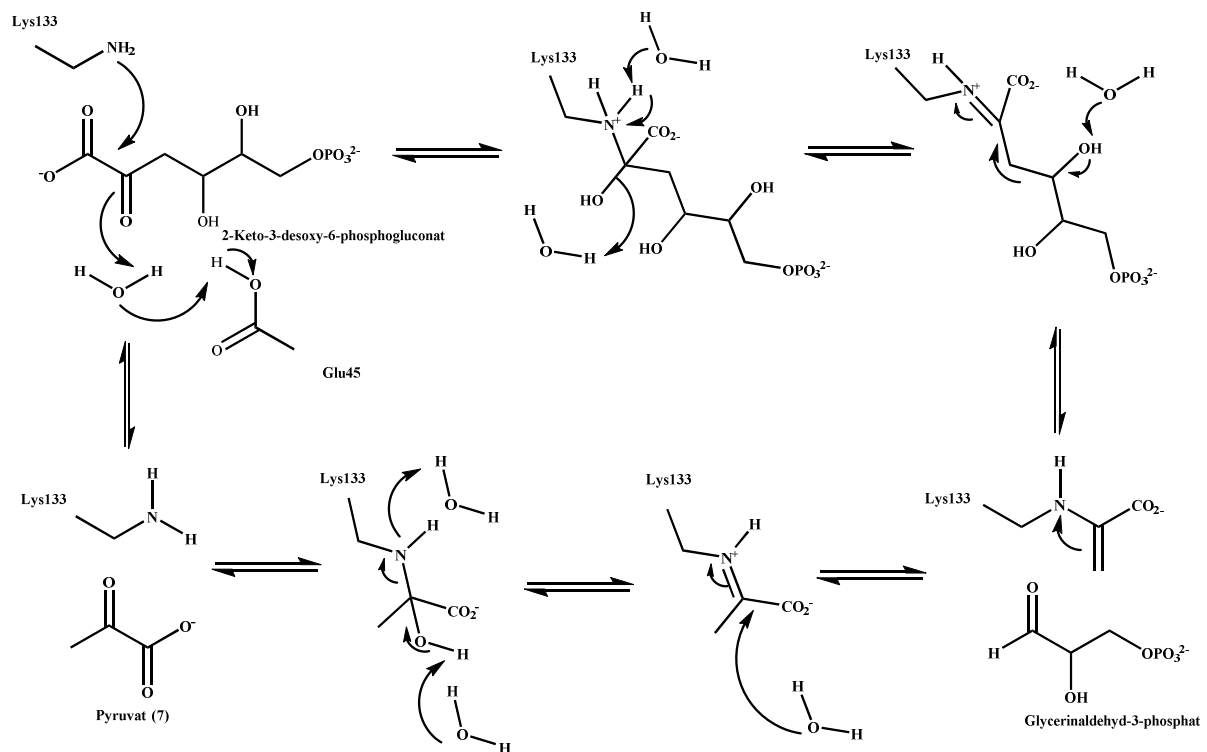


Abbildung 1.10: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Aldolase Eda.
(Modifiziert nach Fullerton *et al.*, 2006)

Bei der Aldoladdition wird zuerst Pyruvat (7) an das deprotonierte Lys133 gebunden, ein Pyruvyl-Carbinolamin gebildet und dieses zu einem Imin bzw. einer Schiff'schen Base dehydratisiert (Abbildung 1.10; Fullerton *et al.*, 2006). Nach Bildung eines nucleophilen Enamines attackiert das C3-Atom des Enamines die elektrophile Aldehydgruppe des Glycerinaldehyd-3-phosphates und das Ketosäureprodukt wird freigesetzt. Bei der Reaktion

dient ein hochkonserviertes Glutamat (Glu45) sowohl als Base als auch als Säure für eine Serie von Protonentransfers.

Der Katalysemechanismus der DgoA ist mit dem oben für Eda beschriebenen vergleichbar (vgl. Walters *et al.*, 2008). Ebenso sind viele für die Aktivität der Aldolase wichtige Aminosäuren wie das katalytisch aktive Lysin oder die Aminosäuren zur Ausbildung einer Phosphatbindetasche in beiden Enzymen konserviert (Fullerton *et al.*, 2006; Cheriyan *et al.*, 2007; Walters *et al.*, 2008). Die Aminosäureseitenketten an der Substratbindestelle zeigen dagegen bei den beiden Aldolasen nur eine geringe Übereinstimmung. Aminosäureaustausche an der Position Threonin 161 (Eda) bzw. Valin 154 (DgoA) können die Stereoselektivität und Aktivität der beiden Enzyme verändern (Walters *et al.*, 2008).

1.2.3 Substratspektrum

Neben oben beschriebenen Reaktionen (vgl. Kapitel 1.2.1) können die beiden Aldolasen Eda und DgoA auch für weitere Synthesereaktionen eingesetzt werden. Dabei sind die erzielten Umsätze gering. Substrate, die keine Phosphatgruppe in Analogie zu Glycerinaldehyd-3-phosphat aufweisen, werden durch Eda bzw. DgoA nur mit ca. 1% der Rate mit dem entsprechenden phosphorylierten natürlichen Substrat Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt (vgl. u.a. Shelton *et al.*, 1996; Walters *et al.*, 2008). Auf Grund der geringen Umsätze erscheint eine detaillierte Aufzählung nicht sinnvoll. Deshalb wird nur ein kurzer Überblick gegeben. Eda akzeptiert 2-Ketobutyrat, 3-Fluoropyruvat und 3-Hydroxypyruvat als Nucleophile (Shelton *et al.*, 1996), wogegen DgoA nur Pyruvat (**7**) als Nucleophil akzeptiert (Henderson *et al.*, 1998; Walters *et al.*, 2008). Für das Elektrophil ist das Substratspektrum weiter. Interessanterweise werden D-Erythrose-4-phosphat und Glyoxylat (**8**) mit Eda mit mehr als 25% des Umsatzes des D-Glycerinaldehyd-3-phosphates umgesetzt (Walters *et al.*, 2008).

Eda und DgoA akzeptierten Benzaldehyd (**5**) nicht als Substrat (Allen *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1998), zeigten aber dafür für 2-Pyridincarboxaldehyd sehr gute Umsätze (Henderson *et al.*, 1998; Shelton 1996). Die Autoren Henderson *et al.* (1998) schließen hieraus, dass eine Wasserstoffbrückenbindung des Substrates mit einem Aminosäurerest in der Nähe des aktiven Zentrums für die Bindung wichtig ist. Sowohl Eda als auch DgoA zeigten für aliphatische Aldehyde als Substrate sehr geringe Umsatzraten (Henderson *et al.*, 1998).

Die Herkunft des Enzymes hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stereospezifität. Die HOG-Aldolasen aus *E. coli* und *Pseudomonas putida* sind spezifisch für die D-Konfiguration

am C2-Kohlenstoff, wogegen die HOG-Aldolase aus *Zymomonas mobilis* keine stereospezifische Bevorzugung eines elektrophilen Substrates zeigt (Shelton *et al.*, 1996). Alle drei Aldolasen zeigen eine breite Substratspezifität für Elektrophile mit polaren Resten an den Positionen 2, 3, 4 (Shelton *et al.*, 1996). Entscheidend für den Umsatz ist, dass die Substrate möglichst wenige sterisch störende Reste und dafür Elektronen-ziehende Substituenten am C2-Kohlenstoff aufweisen (Shelton *et al.*, 1996).

Für viele Substratkombinationen wiesen die Autoren Shelton *et al.* (1996) nur ein gebildetes Diastereomer als Produkt nach, wobei als Ausnahme D-Glycerinaldehyd zu 50% ee führte (Shelton *et al.*, 1996). Nach Henderson *et al.* (1998) sind beide Aldolasen aus *E. coli* komplementär für die Spaltung des Substrates (*R*)-4-hydroxy-2-oxo-4-(2'-pyridyl)butyrat. Während Eda die (*S*)-Konfiguration am C2 des Elektrophiles bevorzugt, akzeptiert DgoA beide Stereokonfigurationen (Walters und Toone, 2007).

Durch Einsatz von nicht-phosphorylierten Substraten für die Synthesereaktion von chiralen 4-Hydroxyoxosäuren ergeben sich interessante Anwendungsfelder für Eda und DgoA, da diese Produkte zu Substanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften umgewandelt werden können. Als Beispiel sei hier die Bildung der Nikkomycine KX und KZ genannt (Henderson *et al.*, 1997).

1.2.4 Physiologische Rolle von 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG)

Gupta und Dekker (1984) postulieren für *E. coli*-Zellen ein Reaktionsschema, in das die HOG-Aldolase Eda eingebunden ist: Eda bildet aus Pyruvat (**7**) und Glyoxylat (**8**) HOG (**2**), das stereoselektiv durch den ThDP-abhängigen α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex zu Malyl-CoA oxidiert werden kann. In darauffolgenden Schritten wird durch die Citrat-Synthase Malat gebildet und dieses entweder durch das Malatenzym zu **7** decarboxyliert oder durch die Malat-Decarboxylase weiter zu Oxalacetat umgesetzt. Das entstehende Produkt Oxalacetat kann in einer Nebenaktivität der Aldolase Eda zu **7** und CO₂ decarboxyliert werden (Nishihara und Dekker, 1972; Gupta und Dekker, 1984; Patil und Dekker, 1992). Diese Spaltungsreaktion von Oxalacetat durch Eda wurde für Rinder-HOG-Aldolase bereits durch Kobes und Dekker (1971) beschrieben. Interessant ist an dieser Stelle, dass **8** (Adinolfi *et al.*, 1967; Bunik und Fernie, 2009) und **2** (Payes und Laties, 1963; Laties, 1967) Inhibitoren für verschiedene Enzyme des Zitratzyklus sind. In Säugetieren liegt die HOG-Aldolase in den Mitochondrien der Niere (Riedel *et al.*, 2011) oder auch der Leber (Lane *et al.*, 1971) vor. Daneben wurde **2** auch in Pflanzen nachgewiesen (Morton und Wells, 1964).

Im menschlichen Stoffwechsel besitzt die HOG-Aldolase eine wichtige Funktion im 4-Hydroxyprolinstoffwechsel (Riedel *et al.*, 2011; Riedel *et al.*, 2012). Dieses 4-Hydroxyprolin wird durch die HOG-Aldolase in **7** und **8** gespalten, womit die HOG-Aldolase auch eine Funktion im Glyoxylat-Stoffwechsel besitzt (Riedel *et al.*, 2011).

1.3 Fragestellung

Insbesondere durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten von Aldolasen und ThDP-abhängigen Enzymen mit spezifischen enantioselektiven Eigenschaften eröffnet sich ein großes Feld potentieller chiraler Produkte. Als Beispiel für die Kopplung von Aldolasen und ThDP-abhängigen Enzymen zur Gewinnung chiraler Produkte sollte in der vorliegenden Arbeit die Aldolase Eda mit dem ThDP-abhängigen Enzym MenD kombiniert werden. Im Hinblick auf mögliche Folgereaktionen, insbesondere auch für potentielle zukünftige Anwendungen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, ist die Gewinnung von Produkten mit möglichst hohen Enantiomerenüberschüssen (ee) wünschenswert.

Für MenD wurden erst wenige Donorsubstrate erfolgreich eingeführt. Ein potentieller Donor für MenD ist 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, **2**) ein Analogon zu 2-Ketoglutarat (**1**). Diese Substanz **2** kann enzymatisch gewonnen werden. Die Verbindung **2** weist eine höhere Funktionalisierung auf als **1** und sollte als Substrat für MenD dienen. Für den Einsatz von **2** als Substrat in Synthesereaktionen ist es wünschenswert, mit möglichst enantiomerenreinem **2** als Substrat zu arbeiten. Die chirale Substanz **2** ist derzeit nur als Racemat aus beiden Enantiomeren kommerziell erhältlich. Die chemische Synthese von racemischem **2** ist z.B. durch eine Basen-katalysierte Aldolkondensation aus Oxalacetat und Glyoxylat (**8**) möglich (Riedel *et al.*, 2011). In einer enzymatischen Reaktion katalysiert die Aldolase Eda das hochfunktionalisierte **2** stereospezifisch aus den kostengünstigen Rohstoffen Pyruvat (**7**) und **8** unter Bildung eines Überschusses des (*S*)-**2** von > 95% (Floyd *et al.*, 1992).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung des enzymatisch gebildeten **2** als Donor für MenD und die 1,2- und 1,4- Addition an aliphatische und cyclische Akzeptorsubstrate untersucht werden. Die Kombination der Aldolase Eda mit MenD bzw. der (*S*)-selektiven MenD-Varianten MenD_I474A_F475G kann die Gewinnung bzw. die Herstellung verschiedenster Produkte mit der gewünschten Stereokonfiguration ermöglichen. Diese Produkte der MenD-Reaktionen stellen auf Grund ihres hohen Funktionalisierungsgrades potentielle Vorstufen für weitere chemische und enzymatische Reaktionen dar.

2 Material und Methoden

Die im Rahmen der Arbeit eingesetzten Geräte sind in den Beschreibungen der einzelnen Methoden angegeben.

2.1 Geräte

Für Zentrifugationen wurden folgende Geräte verwendet:

Zentrifugationen bei 4 °C:

> 3 845 g: Multifuge Avanti JXN26, Rotor JA-25.50 (Beckman Coulter, Krefeld)

≤ 3 845 g: Zentrifuge Rotina 380 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

20 800 g: Zentrifuge Mikro 22 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

Zentrifugationen bei Raumtemperatur:

20 800 g: Zentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, Puffersubstanzen, 2-Ketosäuren und Aldehyde wurden, soweit nicht anders angegeben, in der höchsten verfügbaren Reinheit von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Fluka (Honeywell International Inc, Morristown, New Jersey, Vereinigte Staaten von Amerika), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen und, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet. Die verwendeten 2-Ketosäuren wurden in Form ihrer Natriumsalze eingesetzt. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten (*EcoR* I, *Mlu* I, *Nde* I, *Nco* I, *Hind* III, *Sac* II), T4 DNA-Ligase und DNA-Polymerase wurden von New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) erworben.

Die folgenden Produkte wurden von anderen Herstellern bezogen:

DNA-Präparationskits: Macherey-Nagel, Düren

DNA-Präparations- und Reinigungskits: Qiagen GmbH, Hilden

Protein-Standard: BioRad, München

[2,3-¹³C]-Pyruvat ([2,3-¹³C]-7): Euriso-Top GmbH, Saarbrücken

2.3 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 und die eingesetzten Plasmide in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme und ihre relevanten Marker.

Bakterienstamm	Genotyp	Antibiotikaresistenz	Referenz
BL21(DE3) pLysS	F ⁻ ompT <i>hdsS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Chloramphenicol	Novagen, Schwalbach
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>gal-phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>		Invitrogen, Karlsruhe
KB532	Chorismatproduktionsstamm (Δ(<i>tyrR</i>) Δ (<i>pheA tyrA aroF^{trb}</i>))		erstellt durch die Arbeitsgruppe von Keith Backmann, basierend auf Backman und Balakrishnan (1988); vgl. auch Miller <i>et al.</i> , (1987); Backman <i>et al.</i> (1990); Müller <i>et al.</i> (2006)

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre relevanten genetischen Marker.

Plasmidname	Genotyp	Resistenz	Referenz
pJF119EH	Amp ^R , <i>lacI</i> ^q , <i>Ptac</i> , <i>ori colE1</i>	Ampicillin	Fürste <i>et al.</i> , 1986
pF112	pJF119EH- <i>aroF</i> - <i>aroB</i> - <i>aroL</i> ; Amp ^R ; <i>lacI</i> ^q , <i>Ptac</i> , <i>ori colE1</i>	Ampicillin	wie es von Eßer (2006) beschrieben wurde; Degner und Sprenger, unveröffentlicht
pC20	pJF119EH- <i>aroF</i> - <i>entC</i> ^(A194T) - <i>entB</i> - <i>aroB</i> - <i>aroL</i> ; Amp ^R ; <i>lacI</i> ^q , <i>Ptac</i> , <i>ori colE1</i>	Ampicillin	Eßer, 2006
pF81-Kan	pJF119EH, <i>pheA</i> ^{br} , <i>aroF</i> , <i>aroB</i> , <i>aroL</i> , <i>Ptac</i> , Km ^R	Kanamycin	Trachtmann, Sprenger, persönliche Mitteilung
pF81KmaroFBL	pF81-Kan- <i>aroFBL</i> ; die Gensequenz <i>pheA</i> ^{br} - <i>aroF</i> - <i>aroB</i> - <i>aroL</i> wurde durch die Gensequenz <i>aroF</i> - <i>aroB</i> - <i>aroL</i> aus pF112 mit <i>Mlu</i> I und <i>Sac</i> II ersetzt, Km ^R , <i>lacI</i> ^q , <i>Ptac</i>	Kanamycin	diese Arbeit
pF81KmaroFentCBaroBL	pF81-Kan- <i>aroF</i> - <i>entCB</i> - <i>aroBL</i> ; die Gensequenz <i>pheA</i> ^{br} - <i>aroF</i> - <i>aroB</i> - <i>aroL</i> wurde durch die Gensequenz <i>aroF</i> - <i>entCB</i> - <i>aroBL</i> aus pC20 mit <i>Mlu</i> I und <i>Sac</i> II ersetzt, Km ^R , <i>lacI</i> ^q , <i>Ptac</i>	Kanamycin	diese Arbeit
pET28a(+)	Km ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} , 6x His-Tag, (C-term., N-term.),	Kanamycin	Novagen, Schwalbach
15ACT5EP_dgoA_pMA-T	pMA-T- <i>dgoA</i> ; Amp ^R , <i>ori colE1</i>	Ampicillin	Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg
pET28a(+)_eda	pET28a(+)- <i>eda</i> ; <i>eda</i> (chromosomale DNA aus <i>E. coli</i>) kloniert in pEt28a(+) mit <i>Nde</i> I / <i>Hind</i> III; N-terminaler 6x-His-Tag, Km ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac}	Kanamycin	Baier, veröffentlicht in Schapfl <i>et al.</i> , 2018
pEt28a(+)_dgoA	pET28a(+)_ <i>dgoA</i> ; <i>dgoA</i> kloniert aus 15ACT5EP_dgoA_pMA-T (Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH, Regensburg) in pEt28a(+)_ <i>eda</i> mit <i>Nde</i> I / <i>Hind</i> III; N-terminaler 6x-His-Tag, Km ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac}	Kanamycin	diese Arbeit
pET19b_menD_WT	pET19b- <i>menD</i> ; Amp ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} N-terminal 10x His, <i>menD</i> WT	Ampicillin	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009
pET19b_menD_I474A_F475G (MP25.01.8)	pET19b- <i>menD</i> _I474A_F475G; Amp ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} N-terminal 10x His, <i>menD</i> WT	Ampicillin	Westphal <i>et al.</i> , 2013a
pET22b_entC	pET22b- <i>entC</i> ; Amp ^R , ori _{pBR322} , P ¹ _{T7lac} , 6x C-terminal His-Tag	Ampicillin	Kurutsch, 2009

2.4 Eingesetzte Enzyme

Die in dieser Arbeit für *in vitro*-Experimente eingesetzten Enzyme sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Für *in vitro*-Experimente eingesetzte Enzyme.

Enzym	Ursprungsorganismus	EC-Nummer	Referenz
Eda ¹⁾	<i>E. coli</i> K12 LJ110	4.1.3.42	Baier, veröffentlicht in Schapfl <i>et al.</i> , 2018
DgoA ²⁾	<i>E. coli</i> K12	4.1.2.21	diese Arbeit
EntC	<i>E. coli</i> K12 W3110	5.4.4.2	Kurutsch, 2009; Ursprung: Franke <i>et al.</i> , 2001
MenD ³⁾	<i>E. coli</i> K12	2.2.1.9	Kurutsch <i>et al.</i> , 2009
MenD_I474A_F475G	<i>E. coli</i> K12	2.2.1.9	Westphal <i>et al.</i> , 2013a, b, 2014b; Mutagenese
MenD	<i>Chloroherpeton thalassium</i> (CtMenD) <i>Vibrio cholerae</i> (VcMenD) <i>Yersinia aldovae</i> (YaMenD)	2.2.1.9	Forschungszentrum Jülich, Saskia Bock, AG D. Rother, nicht veröffentlicht

¹⁾ Sequenz: Anhang Abbildung 7.1

²⁾ Sequenz: Anhang Abbildung 7.2

³⁾ Sequenz: Anhang Abbildung 7.3

2.5 Kultivierung von *E. coli*

2.5.1 Nährmedien

Als Standardmedium für die Anzucht und Kultivierung von *E. coli* dienen, wenn nicht anders angegeben, das Komplexmedium Lysogeny-Broth (LB)-Flüssigmedium (Bertani, 1951, Tabelle 2.4) bzw. LB-Agarplatten. Abweichend wurde zur Gewinnung kompetenter Zellen 2*YT-Medium (Tabelle 2.4) eingesetzt. Zur Herstellung der Medien wurden die in den entsprechenden Tabellen gelisteten Substanzen gelöst und durch Autoklavieren sterilisiert.

Für die Herstellung von Agarplatten erfolgte die Zugabe von 18 g/L Agar.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung von LB-Medium (Bertani, 1951) und 2*YT-Medium.

Komponente	LB-Medium Endkonzentration [g/L]	2*YT-Medium Endkonzentration [g/L]
Trypton	10	16
Hefeextrakt	5	10
NaCl	5	5

Für die Ganzzellkultivierung von *E. coli* zur Gewinnung von Metaboliten wurde ein Minimalmedium nach Gerhardt *et al.* (1994) eingesetzt. Dieses Minimalmedium ist ein mit Kaliumphosphat gepuffertes Minimalmedium (Tabelle 2.5). Diesem Medium wurde eine Spurenelementelösung nach Pan *et al.* (1987, Tabelle 2.6) zugegeben.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Minimalmediums nach Gerhardt *et al.* (1994).

Komponente	Endkonzentration im Medium [g/L]
KH ₂ PO ₄	3
K ₂ HPO ₄	12
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.015
NaCl	0.1
MgSO ₄ x 7 H ₂ O ¹⁾	0.3
Glucose x 1 H ₂ O ¹⁾	10
FeSO ₄ x 7 H ₂ O/Na-Citrat ²⁾	0.1125
Thiamin x HCl ³⁾	0.0075
Spurenelementelösung nach Pan <i>et al.</i> (1987, vgl. Tabelle 2.6) ⁴⁾	-
L-Phenylalanin ^{3) 5)}	0.05
L-Tyrosin ³⁾	0.05

¹⁾ getrennt autoklavieren

²⁾ Zugabe von 15 mL einer Lösung aus 7,5 g/L FeSO₄ x 7 H₂O und 100 g/L Na-Citrat zu 1 L Medium

³⁾ sterilfiltrieren

⁴⁾ Zugabe von 3 mL Spurenelementelösung nach Pan *et al.* (1987, vgl. Tabelle 4.6) zu 1 L Medium

⁵⁾ Zugabe von 37%iger HCl, um Löslichkeit zu erhöhen, dann mit H₂O auffüllen

Tabelle 2.6: Spurenelementelösung nach Pan *et al.* (1987).

Komponente	Konzentration [g/L]
MnSO ₄ x 1 H ₂ O	10
AlCl ₃ x 6 H ₂ O	10
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	7.33
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	2
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	0.5

2.5.2 Medienzusätze

Nach dem Autoklavieren wurden zu den Medien entsprechende Konzentrationen sterilfiltrierter (0.2 µm-Filter) Antibiotikallösungen zugegeben (Tabelle 2.7). Zur Induktion von Enzymen, die unter Kontrolle des T7_{lac}-Promotors stehen, wurde 1 mM (Endkonzentration) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zugegeben.

Tabelle 2.7: Eingesetzte sterilfiltrierte (0.2 µm-Filter) Medienzusätze.

Komponente	Endkonzentration
Ampicillin (gelöst in H ₂ O)	100 µg/mL
Chloramphenicol (gelöst in 70% Ethanol)	25 µg/mL
Kanamycin (gelöst in H ₂ O)	50 µg/mL
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, gelöst in H ₂ O)	1 mM

2.5.3 Kultivierungsbedingungen

Zur Expression der Gene für die Enzyme MenD_WT, MenD_I474A_F475G, EntC, Eda und DgoA wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS eingesetzt. Das Plasmid pLysS codiert für Bakteriophage T7-Lysozym, das für den Zellaufschluss (T7-Lysozym spaltet Peptidoglykan, vgl. Inouye *et al.*, 1973) genutzt wurde und codiert für ein Resistenzgen gegenüber Chloramphenicol (Novagen, Schwalbach). T7-Lysozym ist an der Regulation des T7-Promotors beteiligt (Moffatt und Studier, 1987; Studier, 1991). Dieses T7-Lysozym ist ein Inhibitor der T7-RNA-Polymerase und unterdrückt die basale Expression der T7-Promotoren (Moffatt und Studier, 1987; Studier, 1991). Beim Einfrier- und Auftauprozess der Zellen gelangt T7-Lysozym in das Periplasma der Zellen und kann die Zellwände lysieren.

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37 °C auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium jeweils mit entsprechenden Antibiotika auf einem Schüttler bei 180 rpm. Für Volumina kleiner 5 ml wurden zur Anzucht sterile Reagenzgläser eingesetzt, für größere Volumina Erlenmeyerkolben, die mit nicht mehr als 20% des Gesamtvolumens befüllt wurden. Vor der Kultivierung wurden jeweils kompetente Zellen frisch mit den Plasmiden transformiert und Einzelkolonien zweimal auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika durch Vereinzelungsausstriche gereinigt. Anschließend wurde zur Herstellung der Vorkulturen 5 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 8 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Mit der Vorkultur wurde eine Übernachtskultur (100 mL) im Verhältnis 1:25 angeimpft und

unter denselben Bedingungen für 12 – 16 h inkubiert. Die Hauptkulturen (600 mL) wurden im Verhältnis 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.5 - 0.6 [] wurden die Kulturen durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und für 16 h bei 20 °C und 180 rpm inkubiert. Das zugegebene IPTG induziert die T7-RNA-Polymerase und ermöglicht die Expression der Zielproteine. Die verringerte Temperatur wurde gewählt, um die Proteinexpression zu verlangsamen und den Anteil falsch gefalteter Proteine zu reduzieren. Zur Expression des Genes *eda* wurden die Zellen abweichend von der oben beschriebenen Vorgehensweise nach der Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (8 000 g, 4 °C und 20 min). Die Zellsedimente wurden bis zum Zellaufschluss bei - 20 °C gelagert.

Kultivierungsbedingungen von Produktionsstämmen

Zur Gewinnung und späteren Reinigung der Metabolite Chorismat und 2,3-CHD (**3**) war eine Produktion im Grammmaßstab erforderlich. Folgende Abweichungen wurden zu oben beschriebenem Schema durchgeführt: Einsatz von Minimalmedium/-Agar nach Gerhardt *et al.* (1994) an Stelle von LB-Agarplatten bzw. Medium; Animpfen der Hauptkulturen im Verhältnis 1:25, alle Kultivierungsschritte bei 30 °C; Stamm: *E. coli* KB532

Die Glucosekonzentration wurde regelmäßig überprüft (Kapitel 2.9.6) und bei Bedarf 5 g/L (Endkonzentration) steriler Glucoselösung zugegeben. Der pH-Wert wurde über pH-Teststreifen kontrolliert und gegebenenfalls durch Zugabe von steriler Pufferlösung korrigiert. Stichprobenartig wurde die Chorismat- bzw. 2,3-CHD (**3**)-Bildung mittels HPLC-Analyse überprüft (Luna C18, Kapitel 2.9.4). Zur Zellernte wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 40 000 g, 1 h), der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Reinigung bei – 70 °C gelagert (Kapitel 2.10).

2.5.4 Bestimmung der Zelldichte der Kulturen

Die optische Dichte (OD_{600}) der Bakterienkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektrophotometer (Varian Cary 50 Bio UV/Vis, Agilent Technologies, Waldbronn) gegen einen Leerwert bestehend aus unbeimpftem Medium bestimmt. Wenn die Absorption der Proben über 0.8 [] lag, wurden die Proben mit unbeimpftem Medium verdünnt, da bei höheren Absorptionswerten kein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 600 nm und der in der Probe enthaltenen Biomasse besteht.

2.5.5 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Cryostocks angesetzt. Hierzu wurden kompetente *E. coli*-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und zweimal auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika durch Vereinzlungsausstriche gereinigt. Anschließend wurden in Reagenzgläsern 5 mL LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit jeweils einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zu je 600 µL *E. coli*-Kultur in der log-Phase wurden 600 µL einer sterilen 60%igen (v/v) Glycerol-Lösung zugegeben und durchmischt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 70 °C gelagert.

2.5.6 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA mittels Hitzeschock

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mit der auf Magnesiumchlorid und Polyethylenglykol basierenden Methode nach Chung *et al.* (1989). Hierzu wurde die autoklavierte Lösung nach Tabelle 2.8 verwendet.

Tabelle 2.8: Transformation & Storage Solution (TSS)-Medium zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.(Medium modifiziert nach Chung *et al.*, 1989)

Komponente	Endkonzentration
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Polyethylenglykol 6000	100 g/L
Dimethylsulfoxid (DMSO)	50 mL/L
2 M MgCl ₂ -Lösung in H ₂ O	25 mL/L

Die Lösung wurde auf pH 6.5 eingestellt und nach sterilfiltrieren (0.2 µm-Filter) bei 4 °C gelagert.

Zur Gewinnung chemisch-kompetenter Zellen wurde eine Reinkultur des erwünschten Stammes in 50 ml 2*YT-Medium im Verhältnis 1:50 aus einer Übernachtskultur angeimpft, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0.5 [] bei 37 °C und 180 rpm inkubiert und durch Zentrifugation (4 °C, 2 944 g, 15 min) geerntet. Die Zellsedimente wurden anschließend in 2.5 ml des eisgekühlten TSS-Mediums (Tabelle 2.8) und 250 µL 86%iges Glycerin resuspendiert, in 200 µL-Portionen aufgeteilt und entweder direkt für Transformationen eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei - 70 °C gelagert.

Zur Transformation chemisch-kompetenter Zellen nach Mülhardt (2009) wurden diese entweder frisch hergestellt (für Transformation von Ligationsprodukten) oder Aliquots mit 200 µL kompetenter Zellen (Lagerung bei - 70 °C) 20 min auf Eis aufgetaut. Jeder Ansatz wurde mit 0.5 – 1.0 µL Plasmid-DNA-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte für 1 min 45 s ein Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock um die Effizienz der Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Zellen zu erhöhen. Nach der Ruhephase (2 min auf Eis) wurden 600 µL 2*YT-Medium zugegeben und die Zellen für 1 - 2 h bei 37 °C und 180 rpm zur Regeneration und Expression der Antibiotika-Resistenzgene geschüttelt (Regenerationsphase). Jeweils 100 µL wurden auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika vereinzelt und mit den erhaltenen Einzelkolonien weitergearbeitet. Als Negativkontrolle der Transformationen wurde jeweils zu einem Ansatz chemisch-kompetenter Zellen statt Plasmid-DNA bzw. Ligationsprodukt das entsprechende Volumen steriles H₂O gegeben und die Zellen gleich behandelt. Für *E. coli* KB532 wurden Platten mit modifiziertem Minimalmedium nach Gerhardt *et al.* (1994) mit Glucose als Kohlenstoffquelle eingesetzt (vgl. Kapitel 2.5.1).

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

2.6.1 DNA-Präparation

Plasmide wurden mit dem Kit „Nucleo Spin Plasmid Kit“ (Macherey & Nagel, Düren) aus Übernachtskulturen von *E. coli* DH5 α mit entsprechendem Plasmid isoliert. Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde das Kit „Nucleo Bond Xtra Midi“ (Macherey & Nagel, Düren) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte jeweils gemäß Herstellerangaben.

2.6.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde an einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen den entsprechenden Puffer als Leerwert ermittelt. Als Referenzwellenlänge zur Bestimmung der Reinheit der DNA wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, um an Hand des Verhältnisses 260 nm/280 nm die Reinheit der DNA abzuschätzen.

2.6.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme wurden gemäß den Vorgaben des Herstellers (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) in dem jeweils empfohlenen Reaktionspuffer eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 - 4 h bei der für das jeweilige Enzym bzw. die jeweiligen Enzyme optimalen Temperatur inkubiert. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden ca. 400 ng DNA in einem 25 μ l-Ansatz eingesetzt und für einen präparativen Restriktionsansatz wurden bis zu 5 μ g DNA in einem Gesamtvolumen von 100 μ l eingesetzt.

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Plasmiden und DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele eingesetzt (Sambrook und Russell, 2001). Anschließend wurde die DNA in einem Ethidiumbromidbad (Konzentration: 10 µg/mL) 2 - 10 min angefärbt. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit einem Agarosegel-Dokumentationssystem durch Fluoreszenzanregung des in die DNA eingelagerten Ethidiumbromids mit einer Wellenlänge von 365 nm (UV-Schirm: UVT-20 M/L (Herolab, Wiesloch), Bildsensor-System: IDA (Raytest, Straubenhardt), Monitor: RMB92 (Rainbow CCTV, USA), Drucker: P91 (Mitsubishi Electric, Ratingen)).

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Kit „QIAquick Gel extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben eingesetzt.

2.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit Sticky Ends erfolgte mit T4 DNA-Ligase (20 U/µL, New England Biolabs, Frankfurt a. M.) nach den Herstellervorgaben in 20 µL T4 DNA-Ligase-Reaktionspuffer (+ 2 mM MgCl₂ (Endkonzentration), vgl. auch Sambrook und Russell, 2001). Das Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA wurde nach Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, USA) und unter Einbeziehung der Größenverhältnisse von Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 1:3 variiert. Ansätze nur mit der Insert-DNA bzw. nur mit der Vektor-DNA bzw. mit sterilem H₂O anstelle des jeweils anderen DNA-Fragments dienten als Negativkontrollen für die Ligationen. Für die Ligation wurde eine maximale Gesamtmenge von 200 ng DNA eingesetzt. Anschließend wurden 10 µL des Ligationsansatzes in frisch hergestellte kompetente *E. coli* DH5α transformiert (Kapitel 2.5.6).

2.6.6 Restriktionsanalyse

Zur Kontrolle, ob DNA-Fragmente richtig in die Plasmide eingebaut wurden, wurde die Plasmid-DNA einer Restriktionsanalyse unterzogen. Hierzu wurden Restriktionsenzyme gewählt, die beim sequenzspezifischen Schneiden der Plasmid-

DNA ein anderes Bandenmuster ergeben, als die zum Einbau eingesetzten Enzyme. Diese Restriktionsansätze mit einem Volumen von mindestens 10 µL wurden nach Herstellerangaben angesetzt und bei entsprechender Temperatur inkubiert. Nach Auftrennung durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.6.4) wurde der korrekte Einbau der DNA-Fragmente anhand des charakteristischen Fragmentierungsmusters verifiziert.

2.6.7 DNA-Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) mit Standardprimern (Tabelle 2.9) durchgeführt. Der Vergleich der sequenzierten DNA erfolgte mittels Sequenzanalyse im Clone Manager 7.0 (Scientific & Educational Software, Denver, USA).

Tabelle 2.9: Primer zur Sequenzierung der Plasmide durch GATC Biotech (Konstanz).

Primer	Sequenz	Plasmid
pET-RP (GATC-Standardprimer)	CTAGTTATTGCTCAGCGG	pET19b <i>menD</i>
T7minus1 (GATC-Standardprimer)	AATACGACTCACTATAGGG	pET19b <i>menD</i>
pET-RP (GATC-Standardprimer)	CTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28a(+) <i>eda</i>
T7minus1 (GATC-Standardprimer)	AATACGACTCACTATAGGG	pET28a(+) <i>eda</i>
pET-RP (GATC-Standardprimer)	CTAGTTATTGCTCAGCGG	pET28a(+) <i>dgoA</i>
T7minus1 (GATC-Standardprimer)	AATACGACTCACTATAGGG	pET28a(+) <i>dgoA</i>

2.6.8 Klonierung der Aldolasen Eda und DgoA

In der vorliegenden Arbeit wurde das durch Shiromi Baier gewonnene Plasmid zur Expression der Aldolase Eda eingesetzt (Baier, veröffentlicht in Schapfl *et al.*, 2018). Die Sequenz des Genes *eda* ist im Anhang in Abbildung 7.1 dargestellt.

Das Gen *dgoA* für die Aldolase DgoA wurde als synthetische Gensequenz erworben. Die Sequenz *dgoA/b4477* (Gen aus *E. coli*; aus Datenbank: <http://coryneregnet.de/>) wurde mit Hilfe des Online-Tools der Firma Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH (Regensburg) codonoptimiert und mit den nachfolgend beschriebenen Änderungen versehen (Sequenz: Anhang Abbildung 7.2). Die Sequenz stammte aus *E. coli* und wurde homolog in *E. coli* exprimiert. Um die Klonierung der *dgoA*-Gensequenz aus dem Klonierungsvektor in Expressionsvektoren zu erleichtern, wurden zusätzliche Schnittstellen für die

Restriktionsenzyme *Bgl* III, *EcoR* V und *Nde* I vor die Gensequenz *dgoA* gesetzt und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamH* I, *Xho* I und *Hind* III hinter die Gensequenz *dgoA*. Zusätzlich wurde die Ribosomenbindestelle des Vektors pET28a(+) vor die Sequenz gesetzt, um die Gensequenz mit der Ribosomenbindestelle in Expressionsvektoren klonieren zu können und hierdurch eine verstärkte Expression des Gens *dgoA* zu ermöglichen. Diese so optimierte Sequenz wurde durch Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH (Regensburg) im Plasmid 15ACT5EP_dgoA_pMA-T zur Verfügung gestellt.

Aus dem Plasmid 15ACT5EP_dgoA_pMA-T wurde die Gensequenz *dgoA* mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nde* I und *Hind* III ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pET28a(+)_*eda* (ebenfalls geschnitten mit *Nde* I und *Hind* III) ligiert. Im erhaltenen Plasmid pET28a(+)_*dgoA* ist DgoA als Protein mit N-terminalen 6x-Histidin-Tag (His-Tag) codiert. Das erhaltene Plasmid pET28a(+)_*dgoA* wurde sequenziert, um den korrekten Einbau des Gens *dgoA* zu verifizieren.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) erfolgte am Mikrotiterplattenreader EON (Biotek, Bad Friedrichshall). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 190 μ L Bradfordreagenz mit 10 μ L Probe bzw. Standardlösung versetzt und gemischt. Nach drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit dem jeweiligen Puffer an Stelle der Probe. Die Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg) wurde im linearen Bereich von 0 – 0.9 mg/mL erstellt.

2.7.2 Zellaufschluss und Proteinreinigung

Der Zellaufschluss zur Reinigung von Fusionsproteinen mit His-Tag und die Reinigung dieser rekombinanten Proteine wurden für alle Enzyme (MenD_WT,

MenD_I474A_F475G, EntC, Eda und DgoA) nach dem gleichen Verfahren durchgeführt. Die Reinigung und Expression erfolgte mit geringen Modifikationen nach Kurutsch *et al.* (2009).

Der zur Proteinexpression eingesetzte Stamm *E. coli* BL21 (DE3) pLysS enthält das Plasmid pLysS, das das T7-Lysozym codiert (Kapitel 2.5.3). Für den Zellaufschluss wurden die Zellsedimente in 5% (v/v) des Kulturvolumens Reinigungspuffer 1 (+ 20 mM Imidazol + 500 μ L aus 5 mg/mL DNase) resuspendiert (Tabelle 2.10). Die Zellsedimente wurden 30 min bei 30 °C und 90 rpm (Schüttler, 30 °C-Brutraum) aufgetaut und dann für 30 min auf Eis (ca. 4 °C) inkubiert (durch den Temperaturwechsel wird das Lysozym aktiviert). Mit Hilfe des Ultraschall-Homogenisators wurde ein zusätzlicher Aufschlussschritt (maximal 25 mL je Falcon, achtmal bei 30% Cycle, à 30 s) unter Eiswasserkühlung durchgeführt. Um die Zellsuspension abzukühlen erfolgte zwischen den Aufschlusszyklen je eine Pause für 30 s. Durch Zentrifugation (4 °C, 40 000 g, 1 h) wurden nicht lösliche Zelltrümmer abgetrennt. Die Überstände wurden abgenommen und die Zellsedimente in 10 mL Reinigungspuffer 1 zur Analyse auf SDS-Gelen (Kapitel 2.7.3) resuspendiert.

Für die Enzyme Eda, DgoA und EntC wurden abweichende Puffer und ein abweichender Imidazolgehalt in den einzelnen Puffern eingesetzt, um eine höhere Reinheit der gereinigten Enzyme zu erhalten (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Reinigungspuffer für Zellaufschluss und Proteinreinigung.

Komponente	MenD-Reinigungspuffer	EntC-Reinigungspuffer	Eda/DgoA-Reinigungspuffer
KH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM	-
K ₂ HPO ₄	50 mM	50 mM	-
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	-	-	50 mM
NaCl	150 mM	150 mM	300 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM	1 mM	-
ThDP	1 mM	0.1 mM	-
Imidazol ¹⁾	20 mM	0 mM	10 mM

➔ Einstellen der Puffer auf pH 8.0

¹⁾ Die Imidazolkonzentrationen im Puffer wurden für den Zellaufschluss und für die Reinigungen variiert (vgl. Tabelle 2.11); die Puffer für die Reinigung der Enzyme MenD und EntC wurden nach Kurutsch *et al.* (2009) modifiziert.

Tabelle 2.11: Imidazolgehalt der Reinigungspuffer für Gradientenelution der Proteine MenD WT, MenD I474A F475G, EntC, Eda und DgoA¹⁾.

	MenD_WT/MenD_I474A_F475G	EntC	Eda	DgoA
Reinigungspuffer 1	20 mM	0 mM	10 mM	10 mM
Reinigungspuffer 2	100 mM	20 mM	100 mM	100 mM
Reinigungspuffer 3	300 mM	250 mM	250 mM	250 mM
Reinigungspuffer 4	600 mM	500 mM	500 mM	500 mM

¹⁾ Die Zusammensetzung der Reinigungspuffer ist in Tabelle 2.10 beschrieben. Für die Reinigung wurde der Imidazolgehalt variiert. Die Elution der His-Tag-Proteine erfolgt jeweils mit Reinigungspuffer 3.

Proteinreinigung mit Ni-NTA-Säulen

Die Reinigung der Proteine als C-terminale beziehungsweise N-terminale Poly-Histidin-Fusionsproteine erfolgte über IMAC (Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie, vgl. Porath *et al.*, 1975; Hochuli *et al.*; 1987 und Janknecht *et al.*, 1991). Die Reinigung erfolgte mittels „Poly-prep Chromatographiesäulen“ (20 mL Kapazität) der Firma BioRad (München) über „Gravity flow“. Hierzu wurden 2 mL Ni-NTA-Superflow (Qiagen, Hilden) in eine Säule gefüllt und mit zehn Säulenvolumen Reinigungspuffer 1 (Tabelle 2.11) äquilibriert. Ein mL Säulenvolumen kann hierbei bis zu 50 mg Protein binden (Qiagen, Hilden). Das Zelllysate wurde auf die Säule aufgegeben. Nicht spezifisch gebundene Proteine wurden durch Spülen mit Puffer mit ansteigenden Imidazolkonzentrationen (jeweils drei Säulenvolumen Reinigungspuffer 1 (+ 20 mM Imidazol) und 2 (+ 100 mM Imidazol), Tabelle 2.11) von der Säulenmatrix verdrängt und eluiert. Das Fusionsprotein wurde mit sieben Säulenvolumen Reinigungspuffer 3 (+ 300 mM Imidazol) eluiert. Anschließend wurde noch an der Säule gebundenes Protein mit drei Säulenvolumen Reinigungspuffer 4 (+ 600 mM Imidazol) von der Säulenmatrix gelöst.

Zur Entsalzung und zur Konzentrierung der gereinigten Proteine wurden die Zentrifugationsfilter „Amicon Ultra-15, Ultracel 10 K“ der Firma Millipore (Darmstadt) verwendet. Die Ultrafiltration wurde bei einer Temperatur von 4 °C und 3 845 g nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Entsalzung wurde der entsprechende Puffer verwendet (siehe Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Puffer für die Lagerung der Enzyme und für die Aktivitätsassays.

Komponente	50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0	50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.0
K ₂ HPO ₄	50 mM	-
KH ₂ PO ₄	50 mM	-
Tris-HCl	-	50 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 mM	10 mM
ThDP	0.1 mM	-

➔ Einstellen der Puffer auf pH 8.0

Die Reinheit der Proteine wurde jeweils mittels SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.7.3) überprüft und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (Kapitel 2.7.1).

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tabelle 2.13, nach Laemmli, 1970). Die Proben wurden mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt (Tabelle 2.14) und für 5 min bei 100 °C denaturiert. Als Größenstandard wurden 5 µL „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Nippon Genetics, Düren) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 140 V 45 min in 1 x SDS-Laufpuffer (Tabelle 2.15) mit einem Mini-Protean Tetra-Cell-System mit dem Netzteil PowerPAC 300 (jeweils BioRad, München) durchgeführt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung der SDS-Trenn- und Sammelgele.

Komponente	Für 4 Trenngele (1.0 mm; 12% Acrylamid)	Für 4 Sammelgele (1.0 mm, 8% Acrylamid)
	Volumen [mL]	Volumen [mL]
H ₂ O	7.5	6.1
1.5 M Tris-HCl-Puffer, pH 8.8	5.6	-
0.5 M Tris-HCl-Puffer, pH 6.8	-	2.5
30% Acrylamid	9	1.3
10% SDS	0.15	0.1
10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0.225	0.1
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0.043	0.02

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers (5fach konzentriert¹⁾).

Komponente	Konzentration
1 M Tris-HCl-Puffer, pH 6.8	0.1% (w/v)
Glycerin	30% (w/v)
SDS	4% (w/v)
1% Bromphenolblau in H ₂ O	0.5% (w/v)
β-Mercaptoethanol	10% (v/v)

¹⁾ Auf pH 6.8 mit HCl einstellen und zu Proben im Verhältnis 1:5 zugeben

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des 10 x Tris-Glycin-Laufpuffers für SDS-Gelelektrophorese ¹⁾.

Komponente	Konzentration [g/L]
Glycin	144.1
Tris-Base	30.2
SDS	10

¹⁾ Puffer wurde für die Elektrophorese in einfacher Konzentration eingesetzt

Die Detektion der Proteinbanden in SDS-Gelen erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant Blue R250, der unspezifisch an die Seitenketten der Proteine bindet. Hierzu wurden die SDS-Gele für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2.16) inkubiert und anschließend in mehreren Schritten jeweils für 30 min in Entfärbelösung (20% (v/v) Essigsäure) bis zur Entfärbung des Hintergrundes leicht geschüttelt.

Tabelle 2.16: Coomassie-Färbelösung.

Komponente	Konzentration [% (v/v)]
Coomassie Brilliant-Blue R250	0.1
Isopropanol	40
Essigsäure	10

2.8 Enzymatische Reaktionen

Für enzymatische Reaktionen wurden gereinigte Enzyme (Reinheit > 90% nach SDS-Gelelektrophorese) eingesetzt. Nach der Reinigung wurden die Proteine in Reaktionspuffer gelagert (über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen blieben die Enzyme bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C ohne signifikanten Aktivitätsverlust aktiv).

Die Puffer zur Lagerung der Enzyme und für die Aktivitätsassays sind in Tabelle 2.17 angegeben. Auf abweichende Pufferkonzentrationen und Zusätze wird an entsprechender Stelle hingewiesen.

Tabelle 2.17: Puffer zur Lagerung der Enzyme und für Aktivitätsassays.

Enzym	Puffer
EntC	50 mM Tris-HCl-Puffer + 2 mM MgCl ₂ , pH 8.0
MenD_WT, MenD_I474A F475G	50 mM Kaliumphosphat-Puffer + 0.1 mM ThDP + 2 mM MgCl ₂ , pH 8.0
Eda, DgoA	50 mM Tris-HCl-Puffer + 10 mM MgCl ₂ , pH 8.0

Alle Reaktionen zur Quantifizierung der Produktbildung bzw. der Abnahme der Substrate wurden mindestens dreimal mit aus drei Reinigungen stammenden Enzymlösungen durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass die Bildung der Reaktionsprodukte durch die Enzyme katalysiert wurde, wurden Kontrollexperimente ohne Zugabe der entsprechenden Enzyme durchgeführt. Statt Enzymlösung wurde der entsprechende Puffer zugegeben. In keinem Fall wurde eine Substratabnahme oder Produktbildung beobachtet. Alle enzymatischen Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, 24 h bei 30 °C und 750 rpm auf einem Thermomixer TSC ThermoShaker (Analytik Jena, Jena) inkubiert. Bei keiner der in der vorliegenden Arbeit angesetzten Reaktionen wurde nach 24 h eine weitere Abnahme des Akzeptorsubstrates detektiert.

Für die Quantifizierung des Reaktionsumsatzes ist es erforderlich, dass die gebildete Produktmenge quantifiziert werden kann. Bei der Quantifizierung der Umsätze der Reaktionen ist zu berücksichtigen, dass bei den meisten in dieser Arbeit vorgestellten Reaktionen für die Produkte keine Referenzstandards erhältlich sind, die die Erstellung von Kalibriergeraden ermöglichen würden. Für die meisten in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reaktionen war der Umsatz

im präparativen Maßstab nicht möglich, so dass keine Referenzstandards erstellt werden konnten. Deswegen wird im Folgenden die Abnahme des Akzeptorsubstrates als Kriterium für den Umsatz einer enzymatisch katalysierten Reaktion herangezogen. Für keines der untersuchten Akzeptorsubstrate wurde eine signifikante Abnahme bei den Kontrollansätzen ohne Enzymzugabe beobachtet. Deshalb wird davon ausgegangen, dass die Abnahme des Akzeptorsubstrates auf die enzymatisch katalysierte Reaktion zurückzuführen ist. Die HPLC-DAD-Chromatogramme wurden integriert und die Abnahme der Peakflächen (Area) des Akzeptorsubstrates nach dem Ende der Reaktion im Vergleich zum Reaktionsbeginn bestimmt. Aus den Mittelwerten der drei biologischen Replikate wurde die Abnahme des Akzeptorsubstrates für die Reaktion berechnet. Durch Nachweis der Produktbildung mittels HPLC-DAD bzw. LC-MS wurde sichergestellt, dass Produkt gebildet wurde. Abweichend wurde Benzaldehyd (**5**) mittels Gaschromatographie (GC) quantifiziert.

2.8.1 Bildung von HOG durch die Aldolasen Eda und DgoA

Zur Bildung von 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, **2**) wurden 50 mM Pyruvat (**7**) und 100 mM Glyoxylat (**8**) mit 200 µg Aldolase (Eda bzw. DgoA) für 24 h bei 30 °C und 750 rpm in 50 mM Tris-HCl-Puffer (+ 10 mM MgCl₂, pH 8.0, v = 1 mL) inkubiert. In Vorversuchen wurde innerhalb der ersten 2 Stunden ein weitgehender Umsatz von **7** (> 90%) erzielt, womit sichergestellt wurde, dass die eingesetzte Menge an Eda (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. DgoA für weitgehende Umsätze ausreichend ist (Daten nicht dargestellt). Präparative Ansätze zeigten nach 24 h ebenfalls einen weitgehenden Umsatz von **7** (> 90%) (Daten nicht dargestellt).

2.8.2 MenD als Biokatalysator

Reaktionsansätze zur Analyse der durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G katalysierten 1,2- und 1,4-Additionsreaktionen wurden in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (+ 0.1 mM ThDP + 2 mM MgCl₂, pH 8.0, v = 2.0 mL) angesetzt und bei 30 °C und 750 rpm für 24 h inkubiert. Jeweils 20 mM Akzeptorsubstrat und 50 mM Donorsubstrat wurden mit 1.4 mg MenD (= 0.7 mg/mL) in 2 mL Reaktionsvolumen

inkubiert. Für Reaktionsansätze mit Benzaldehyd (**5**), (2-F-)Benzaldehyd, Hexanal (**6**) und Salicylaldehyd als Akzeptorsubstraten wurden jeweils 5% (v/v) Methyl-*tert*-butylether (MTBE) (Endkonzentration) zugegeben, um die Löslichkeit dieser Akzeptorsubstrate zu erhöhen. Bei „Ein-Topf-Reaktionen“ mit der Bildung von HOG (**2**) durch die Aldolasen Eda bzw. DgoA, wurden die Reaktionsansätze jeweils für 2 h bei 30 °C, 750 rpm mit 0.4 mg Aldolase (0.2 mg/mL) als Vorreaktion ohne Zugabe von MenD inkubiert. Nach Zugabe von 0.7 mg MenD_WT bzw. MenD_I474A F475G wurde der Ansatz für weitere 24 h inkubiert. Der Zeitpunkt der MenD-Zugabe wurde als Bezugspunkt für die Abnahme des Akzeptorsubstrates festgelegt. Ein beispielhaftes Pipettierschema ist in Tabelle 2.18 dargestellt.

Tabelle 2.18: Beispielhaftes Pipettierschema für die 1,4-Addition von **1 bzw. **2a** bzw. **2b** an **3** katalysiert durch MenD.**

Für Kontrollreaktionen wurde statt Enzymlösung das entsprechende Volumen des Puffers zusätzlich zugegeben.

Komponente	c Stamm [mM]	c Assay [mM]	1	2a²⁾	2b²⁾
			v [μL]	v [μL]	v [μL]
2,3-CHD (3)	100	20	400	400	400
2-Ketoglutarat (1)	500	50	200		
Pyruvat (7)	500	50		200	200
Glyoxylat (8)	10000	100		200	200
Eda	10 mg/mL	0.2 mg/mL (= 400 μg)		40	
DgoA	10 mg/mL	0.2 mg/mL (= 400 μg)			40
50 mM Kaliumphosphat-Puffer ¹⁾			1260	1020	1020
2 h Vorreaktion bei 30 °C, 750 rpm					
MenD	10 mg/mL	0.7 mg/mL (= 1.4 mg)	140	140	140
24 h Reaktion bei 30 °C, 750 rpm					

¹⁾ 50 mM Kaliumphosphat-Puffer + 0.1 mM ThDP + 2 mM MgCl₂, pH 8.0

²⁾ HOG (Eda) (**2a**), HOG (DgoA) (**2b**): gebildet in einer Vorreaktion aus **7** und **8**

Die Ansätze mit den Akzeptorsubstraten 2,3-CHD (**3**), Acrylsäure (**4**), **5** bzw. **6** wurden so berechnet, dass direkt nach MenD-Zugabe 20 mM Akzeptor und 50 mM **7** und 100 mM **8** vorlagen (bzw. die entsprechend gebildete Menge des Produktes **2** an Stelle von **7** und **8**; bei einem vollständigen Umsatz von **7** entspricht dies 0 mM **7**, 50 mM **8** und 50 mM **2**). Enzymumsätze wurden jeweils als Triplikate in verschlossenen Mikroreaktionsgefäßen angesetzt und jeder Ansatz als technisches Replikat (Triplikat) gemessen.

Der Nachweis der MenD-Reaktionen mit den anderen Akzeptor- und Donorsubstraten erfolgte analog. Die Umsätze wurden als Triplikate (jeweils drei Mikroreaktionsgefäße) angesetzt, wobei jedes Mikroreaktionsgefäß als

Einfachbestimmung gemessen wurde. Für die Reaktionen mit **2a** bzw. mit **2b** wurden die entsprechende Aldolase und MenD gleichzeitig, ohne Vorreaktion der Aldolase, zur Reaktionslösung gegeben. Auf Grund der schlechten Löslichkeit in Wasser wurden die Akzeptorsubstrate 3-Formylchromon und 2-Amino-3-formylchromon in 100% Dimethylformamid (DMF) gelöst. Nach Zugabe zum Assay ergab sich eine Konzentration des DMF im Assay von 10% (v/v).

Isochorismat als physiologisches Akzeptorsubstrat für MenD

Für die Ansätze zur Bestimmung des Umsatzes von MenD mit Isochorismat wurde die Vorgehensweise variiert, da Isochorismat instabil ist und *in situ* gebildet werden sollte. In *E. coli*-Zellen wird Isochorismat durch EntC aus Chorismat gebildet und kann als Akzeptorsubstrat für MenD für die 1,4-Additionsreaktion dienen (Emmons *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1990; Jiang *et al.*, 2007a). 1 mM Chorismat und 5 mM Donorsubstrat wurden zusammen mit EntC (0.3 mg = 0.2 mg/mL) und MenD (1.050 mg = 0.7 mg/mL) bei 30 °C und 750 rpm für 24 h inkubiert (v = 1.5 mL, 50 mM Tris-HCl-Puffer + 1 mM ThDP + 10 mM MgCl₂, pH 8.0). Um den Umsatz mit **2a** bzw. **2b** zu untersuchen, wurden an Stelle der Donorlösung 5 mM **7**, 10 mM **8** und 0.3 mg (= 0.2 mg/mL) Aldolase gleichzeitig mit EntC und MenD zugegeben.

2.8.3 HOPA als neuartiges Substrat für MenD

2-Hydroxy-4-oxopentanoat (HOPA) wurde durch Jan-Patrick Steitz zur Verfügung gestellt (Arbeitsgruppe Michael Müller, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Freiburg). Da die Konzentration von HOPA nicht bestimmt wurde, wurde für die MenD-Assays eine gesättigte HOPA-Lösung eingesetzt. Hierzu wurden 270 mg HOPA in 400 µL 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (+ 2 mM MgCl₂, pH 8.0) aufgenommen und der Überstand nach Zentrifugation (1 min, Raumtemperatur, 20 800 g) für die Reaktionsansätze mit MenD eingesetzt. Diese erfolgten in Anlehnung zum in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Verfahren mit folgenden Abweichungen: 5% (v/v) der HOPA-Lösung als Donorsubstrat, 20% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) (statt 5% (v/v) Methyl-*tert*-butylether (MTBE)) und 1.25 mg/mL MenD.

2.8.4 Putative SEPHCHC-Synthasen (= MenD)

Von Saskia Bock (Arbeitsgruppe Dörte Rother, Forschungszentrum Jülich) wurden putative SEPHCHC-Synthasen (= MenD) als gereinigte Fusionsproteine zur Verfügung gestellt (Tabelle 2.19). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Enzyme auf die SEPHCHC-Synthase-Reaktion (1,4-Addition von 2-Ketoglutarat (**1**) an Isochorismat) untersucht. Die putativen MenD wurden jeweils in 50 mM Tris-HCl-Puffer (+ 1 mM ThDP + 10 mM MgCl₂, pH 8.0) gelöst (10 mg/mL Proteinendkonzentration).

Tabelle 2.19: Putative MenD.

Code	Ursprungsorganismus	Enzym-Kurzform	Plasmid	His-Tag
MP33.1.26 ¹⁾	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	CtMenD	pET16b	N-term His-Tag
MP33.1.27	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	CtMenD	pET22b	C-term His-Tag
MP33.1.29	<i>Vibrio cholerae</i>	VcMenD	pET16b	N-term His-Tag
MP33.1.30	<i>Vibrio cholerae</i>	VcMenD	pET22b	C-term His-Tag
MP33.1.32	<i>Yersinia aldovae</i>	YaMenD	pET16b	N-term His-Tag
MP33.1.33	<i>Yersinia aldovae</i>	YaMenD	pET22b	C-term His-Tag

¹⁾ Dieses Enzym konnte nicht in aktiver Form exprimiert werden (Bock, persönliche Mitteilung).

Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben. Um auch nur geringe Enzymaktivitäten nachweisen zu können, wurde die Konzentration der eingesetzten putativen MenD (und von *EcMenD* als Positivkontrolle) auf 1 mg/mL erhöht. Die Durchführung erfolgte in $v = 0.25$ mL mit EntC (0.2 mg/mL, = 50 μ g) und MenD (1 mg/mL, = 250 μ g) als Doppelbestimmung.

2.9 Analytik

2.9.1 NMR-Analytik

Für die Messung von NMR-Spektren wurde zu den Proben 20% (v/v) D₂O gegeben. Für Proben mit aromatischen Substanzen wurden jeweils 1.5 mL Probe dreimal mit 500 μ L CDCl₃ extrahiert. NMR-Spektren wurden bei 24 °C mit dem Spektrometer „Bruker DRX 400“ der Firma Bruker (Billerica, USA) (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100.6 MHz) am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie (Universität Freiburg) aufgenommen. Angegeben werden die chemischen Verschiebungen δ in ppm. Die Spektren wurden auf das jeweilige Lösungsmittelsignal kalibriert (¹H-NMR: CDCl₃ 7.24 ppm, Wasser 4.81 ppm,

CHD_2OD 3.30 ppm, ^{13}C -NMR: CDCl_3 77.0 ppm, CD_3OD 49.0 ppm). Zur Unterstützung der Signalzuordnung wurden zusätzlich (H,H)-TOCSY-Experimente durchgeführt. Die Auswertung der Spektren wurde mit der Software ACD/NMR Processor Academic Edition von ACD/Labs (Toronto, Kanada) durchgeführt.

2.9.2 UV/Vis- und Circular dichroismus-Messungen

Der Nachweis der Bildung von enantiomeren Produkten der Aldolasen Eda bzw. DgoA für die Aldolkondensation von Pyruvat (**7**) und Glyoxylat (**8**) erfolgte mittels Circular dichroismus (CD) an der Universität Freiburg in der Arbeitsgruppe von Steffen Lüdecke (Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Michael Müller). Die CD-Spektren wurden mit einem Stickstoff-gespülten Jasco J-810 Spektrometer (Jasco International Co, Tokyo, Japan) mit folgenden Parametern aufgenommen: Länge der Quarzzelle: 2 mm (Hellma, Müllheim, Germany), Messgeschwindigkeit: 50 nm/min, Datenabstand: 1 nm, Bandbreite: 1 nm, Resonanz: 2 s, Akkumulation: 3. Gemessen wurde im Wellenlängenbereich von 200 – 500 nm. Eingesetzt wurden 5 mM Lösungen von HOG (**2**) (gelöst in 50 mM Tris-HCl-Puffer + 10 mM MgCl_2 , pH 8.0).

2.9.3 Gaschromatographie

Die Messung von Proben mittels Gaschromatographie (GC) erfolgte am Institut für Mikrobiologie (Universität Stuttgart). Der Nachweis der Produktbildung durch GC-MS erfolgte am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie (Universität Freiburg).

Zur Probenvorbereitung wurden die Proben mit Ethylacetat extrahiert (Ansäuern von 100 μL Probe mit 1% Ameisensäure (Endkonzentration); Zugabe von 200 μL Ethylacetat (mit 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Decan als internem Standard), vortexen und Zentrifugation (Raumtemperatur, 5 min, 20 800 g).

GC-Analytik

Die Abnahme von Benzaldehyd (**5**) wurde am „Agilent 7890A Series“ GC-System der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) mit Flammenionisationsdetektor (FID)-Detektor quantifiziert. Es wurde die Säule HP-5 column (Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0.320 mm, Filmdicke: 0.25 μm) der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 1 μL .

Methode: Trägergas Helium: 1.0 mL/min, konstant, Injektor im Splitmodus (1:20, 250 $^{\circ}\text{C}$), Temperaturprogramm (Ofen): $T_{0 \text{ min}} = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{3 \text{ min}} = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{14 \text{ min}} = 280 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aufheizrate: 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), $T_{18 \text{ min}} = 280 \text{ }^{\circ}\text{C}$, FID-Temperatur: 300 $^{\circ}\text{C}$. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software „ChemStation“ von Agilent Technologies (Waldbronn).

GC-MS-Analytik

GC-MS-Analysen wurden mit dem „HP 6890 N Series“ GC-System sowie dem „HP 5973 Network Mass Selective Detector“ der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) mit Elektronensprayquelle EI-MS (70 eV, EI) durchgeführt. Es wurde die Säule FS-Supreme-5 (Länge: 30 m, innerer Durchmesser: 0.25 mm, Filmdicke: 0.25 μm) der Firma CS-Chromatographie-Service (Langerwehe) eingesetzt. Das Injektionsvolumen betrug 1 μL . Abweichend zur GC-Analytik wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Injektor im Splitmodus (41.7:1, $T = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$), T_{GC} (Injektor) = 250 $^{\circ}\text{C}$, T_{MS} (Ionenquelle) = 200 $^{\circ}\text{C}$, detektierter Massenbereich für M1-300/ M1-DMSO: 50-300 amu.

2.9.4 HPLC-Analytik

Probenvorbereitung für die HPLC

Proben für die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) wurden mit 1% Ameisensäure (Endkonzentration) angesäuert und zentrifugiert (Raumtemperatur, 5 min, 20 800 g). Bei Proben für die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC-HPLC) wurde der Überstand anschließend in Acetonitril verdünnt und zentrifugiert (Raumtemperatur, 15 min, 20 800 g) um in Acetonitril unlösliche Bestandteile abzutrennen.

Eingesetzte HPLC-Systeme

Die Messung von Proben erfolgte standardmäßig an einem „Dionex Ultimate 3000“-System (Thermo Scientific, Waltham, USA) mit dem UV-Detektor (DAD: Ultimate 3000). Die Detektion der Substrate und Produkte erfolgte spektrophotometrisch bei geeigneten Wellenlängen im Bereich von 200 nm – 290 nm mittels DAD. Die Steuerung der HPLC-Anlage sowie die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit der Software „Chromeleon“ (Thermo Scientific, Waltham, USA).

HPLC-DAD-Messungen zur Quantifizierung der Abnahme der Substrate 2,3-CHD (**3**), Acrylsäure (**4**) und Hexanal (**6**) mittels HILIC-Technologie erfolgten am „Agilent 1100 HPLC“-System (Agilent Technologies, Waldbronn) und die Datenauswertung erfolgte mit der Software „ChemStation“.

LC-MS-Messungen wurden durchgeführt an einem „Agilent 1260 HPLC“-System gekoppelt mit einem Quadrupol-Massenspektrometer „Agilent 6130“ in der Abteilung für technische Biochemie (Universität Stuttgart). Die Steuerung der Anlage und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software „ChemStation“ (jeweils Agilent Technologies, Waldbronn). LC-MS/MS-Messungen erfolgten an einem „Agilent 1100 HPLC“-System (Agilent Technologies, Waldbronn) gekoppelt mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer „QTRAP 4500“ (AB Sciex, Darmstadt) am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie (Universität Freiburg). Die Auswertung erfolgte mit der Software „Analyst“ (AB Sciex, Darmstadt).

Bei den LC-MS-Messungen erfolgte die Ionisierung mittels Elektrospray-Ionisierung. Die Messung erfolgte im Scan-Modus (positiv und negativ) im Massenbereich von 50 – 400 Da. Die Parameter der Massenspektrometer für qualitative Bestimmungen sind in Tabelle 2.20 beschrieben.

Tabelle 2.20: Scan-Parameter für Massenspektrometer.

Parameter	Parameterwert
Polarität	positiv + negativ
Drying gas Flow [L/min]	3.0
Temperatur	300 °C
Spannung	+ 3000V/-3000 V

HPLC-Methoden

Der Nachweis von Substraten und Produkten erfolgte mittels verschiedener HPLC-Methoden, um eine an die jeweiligen Probensubstanzen angepasste, verbesserte Trennung zu erhalten (Tabelle 2.21). Im Anhang in Tabelle 7.3 sind die einzelnen Substanzen zusammen mit der zum Nachweis eingesetzten Methode angegeben.

Tabelle 2.21: HPLC-Methoden.

Methodenname	Luna C18	Multospher C18 a/b	HILIC 1	HILIC 2
Technologie	RP-HPLC	RP-HPLC	HILIC	
Säule	Luna C18(2) (5 µm, 250 mm * 21.2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg)	Multospher RP C18, AQ-3 µm EC (60 x 2 mm, CS- Chromatographie, Langerwehe)	XBridge Amide Säule (5 µm, 100 x 2.1 mm, Waters, Eschborn)	
Fließmittel A	H ₂ O + 0.1% Ameisensäure	H ₂ O + 0.1% Ameisensäure	10 mM NH ₄ CHO ₂ in H ₂ O (pH 6.8)	
Fließmittel B	Methanol + 0.1% Ameisensäure	Acetonitril	Acetonitril	
Gradient	t ₀ : 90:10, in 5.0 min auf 30:70, für 2.5 min 30:70, in 2.5 min auf 90:10 und für 5 min 90:10	a: t ₀ : 100:0 für 1.8 min, in 1.9 min auf 55:45, in 5.1 min auf 20:80 b: t ₀ : 100:0 für 0.9 min, in 1.0 min auf 55:45, in 2.5 min auf 20:80	t ₀ : 10:90 für 2 min, in 10 min auf 60:40, für 3 min 60:40	t ₀ : 5:95, in 2.5 min auf 60:40, für 1.1 min 60:40, in 0.6 min auf 5:95, für 1.8 min 5:95
Flussrate	0.6 mL/min	a: 0.3 mL/min b: 0.6 mL/min	0.3 mL/min	1.2 mL/min
Säulentemperatur	20 °C	20 °C	20 °C	40 °C
Auftragsvolumen	1 - 10 µL	1 - 10 µL	1 - 10 µL	

Wenn nicht anders angegeben, diente die Methode „HILIC 2“ zur Quantifizierung der Substratabnahme und die Methode „Multospher C18 b“ zum Nachweis der Produktbildung. Die Methode „Multospher C18 a“ wurde zum Nachweis der Produktbildung aus 2-Ketoglutarat (**1**) und 2,3-CHD (**3**) eingesetzt.

Für die Quantifizierung der Abnahme der Substrate 2-Formylchromon, 3-Amino-2-formylchromon und Salicylaldehyd wurde die Methode „Luna C18“ eingesetzt. Ansätze mit Chorismat wurden mit der Methode „Luna C18“ analysiert und die Produktbildung mit der Methode „Multospher C18 a“ an der LC-MS bestätigt.

2.9.5 Nachweis der Decarboxylierung durch DCPIP-Assay

Der Nachweis der Decarboxylaseaktivität von MenD erfolgte in 50 mM Triethanolaminpuffer (+ 0.1 mM ThDP + 2 mM MgSO₄, pH 8.0, vgl. Patel *et al.*, 2012). Der pH-Wert des Puffers wurde durch Zugabe von H₂SO₄ auf pH 8.0 eingestellt. Triethanolamin kann in wässriger Lösung CO₂ binden (Sada *et al.*, 1989). Deshalb wurde bei diesem Versuch Triethanolamin als Puffersubstanz eingesetzt, um das bei der Decarboxylierung des Donorsubstrates freiwerdende CO₂ zu binden und dem Reaktionsgleichgewicht zu entziehen. Da Triethanolamin auch atmosphärisches CO₂ bindet, wurde der Puffer jede Woche neu angesetzt. Für den 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP)-Assay wurden 2 mM Donorsubstrat mit 1 mM DCPIP bei 30 °C im Spektrophotometer (Varian Cary 100 Bio UV/Vis, Agilent Technologies, Waldbronn) inkubiert (v = 1 mL). Nach vier Minuten Messung der Hintergrundreaktion wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µg MenD gestartet. Die Messung der Absorption erfolgte bei der Wellenlänge 605 nm zyklisch mit Cycle 0.1. Alle Messungen wurden voneinander unabhängig dreimal durchgeführt.

2.9.6 Bestimmung der Glucosekonzentration

Bei der Kultivierung von *E. coli* KB532 zur Produktbildung in Minimalmedium diente Glucose als Kohlenstoffquelle (Kapitel 2.5.3). Mit dem Blutzuckermessgerät One Touch Vita (Life Scan Inc., Milpitas, USA) wurde die Glucosekonzentration im Medium während der Kultivierung überprüft und bei Bedarf sterile Glucoselösung (5 g/L Endkonzentration) zugegeben. Die Benutzung des Messgerätes erfolgte nach Herstellerangaben.

2.10 Reinigung der Metabolite Chorismat und 2,3-CHD

Für die Reinigung der Metabolite erfolgte die Kultivierung der Stämme *E. coli* KB532 mit den entsprechenden Plasmiden im Maßstab von 600 mL Kultur je 3-L-Schüttelkolben (Kapitel 2.5.3).

Herstellung kanamycinbasierter Plasmide zur Gewinnung von Chorismat und 2,3-CHD

Bisher wurden zur Produktion von Chorismat bzw. 2,3-CHD (**3**) die Plasmide pF112 bzw. pC20 eingesetzt, die eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker codieren. Für weiterführende Projekte zur Produktbildung mit ganzen Zellen, die auf dem zentralen Metaboliten Chorismat, oder auch auf **3** aufbauen, ist eine weitere Erhöhung der gebildeten Konzentration an Chorismat bzw. an **3** wünschenswert. Hierzu erfolgte der Einbau der Gene *aroFBL* in das kanamycinbasierte Plasmid pF81-Kan. Die Plasmide pF81-Kan, Plasmid pF112 und Plasmid pC20 wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen *Sac* II und *Mlu* I geschnitten (gleichzeitiger Verdau mit beiden Enzymen). Nach Agarosegelelektrophorese und Extraktion aus dem Gel wurden die Fragmente *aroFBL* bzw. *aroFentCBaroBL* jeweils in das Backbone des Plasmides pF81-Kan kloniert und mit T4 DNA-Ligase ligiert (Kapitel 2.6.4 und 2.6.5). Kompetente *E. coli* DH5a-Zellen wurden mit den erhaltenen Plasmiden (pF81Kmaro*FBL* bzw. pF81Kmaro*FentCBaroBL*) transformiert und einzelne Kolonien auf den Einbau der Gensequenzen durch Restriktionsverdau überprüft (Kapitel 2.5.6 und 2.6.6). Durch Kontrollverdau mit *Eco*R I (pF81Kmaro*FBL*) bzw. *Hind* III (pF81Kmaro*FentCB-aroBL*) wurde der korrekte Einbau der Gensequenzen in das Plasmid pF81-Kan bestätigt.

Die erhaltenen Ausbeuten der Kultivierungen sind in Tabelle 2.22 dargestellt.

Tabelle 2.22: Erhaltene Konzentrationen der Metabolite Chorismat bzw. **3 nach 24 und 48 h Kultivierung von *E. coli*-Zellen mit den kanamycinbasierten Plasmiden.**

Zeitpunkt [h]	24	24	48	48
	Chorismat	2,3-CHD (3)	Chorismat	2,3-CHD (3)
Plasmid	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]
pJF119EH	0.6	-		
pF112	1.5	-		
pC20	0.9	0.6		
pF81-Kan	0.2	-	0.2	-
pF81Kmaro <i>FBL</i>	2.9	-	1.6	-
pF81Kmaro <i>FentCBaroBL</i>	0.1	2.5	0.1	2.3

Minimalmedium nach Gerhardt *et al.*, 1994; 30 °C, 180 rpm, bei OD₍₆₀₀₎ = 0.5 - 0.6 [] Induktion mit IPTG (1 mM Endkonzentration); Mittelwerte aus der Dreifachbestimmung einer Kultivierung, Stämme mit den Plasmiden pJF119EH, pF112 und pC20 wurden als Vergleich kultiviert und die Kultivierung nach 24 h beendet.

Nach 24 h zeigten die Stämme mit den neuen Plasmiden höhere Produktbildung als die Vergleichsstämme (Tabelle 2.22). Bei *E. coli* KB532/pF81KmaroFentCB-aroBL war nur eine geringe Konzentration von Chorismat im Kulturüberstand. Bei der Kultivierung des Stammes *E. coli* KB532/pF81-Kan wurde qualitativ die Bildung von L-Phenylalanin bestimmt und diese Substanz mittels Vergleich mit dem Standard L-Phenylalanin nachgewiesen. Bei den anderen untersuchten Stämmen konnte die Bildung von L-Phenylalanin nicht beobachtet werden.

Produktreinigung

Das in Schüttelkolbenkultivierungen mit *E. coli* KB532 produzierte Chorismat und **3** wurde in einem zweistufigen Verfahren, modifiziert nach Hubrich *et al.* (2014), gereinigt. Der erste Schritt, die Extraktion mit dem polaren Lösungsmittel Ethylacetat und die Evaporation wurden wie bei Hubrich *et al.* (2014) beschrieben durchgeführt. Das nach der Evaporation zurückbleibende Öl wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, über Nacht lyophilisiert und bis zur chromatographischen Reinigung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Abweichend zu Hubrich *et al.* (2014) wurde folgende RP-HPLC-Methode eingesetzt. Die chromatographische Reinigung erfolgte an der FPLC („Äkta Purifier“, Amersham Bioscience/GE Healthcare, München, mit P-900 Pumpe, Frac-950 Fraktionssammler, pH/C-900 Analytik-Einheit, UV-900 Spektrophotometer und „Unicorn 5.11“-Software).

Die gefriergetrocknete Substanz wurde in 3 mL H₂O aufgenommen, 0.1% Ameisensäure (Endkonzentration) zugegeben und zentrifugiert ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, 6 009 g) um nicht lösliche Bestandteile abzutrennen und anschließend filtriert (0.2 μm -Filter). Die Probe wurde auf die präparative RP18-Säule (Luna, C18(2), 260 mm x 21.2 mm, 5 μm , Phenomenex, Aschaffenburg) aufgetragen (Injektionsvolumen: 1 mL, Flussrate: 8 mL/min, Fraktionsgröße: 2 mL). Eluiert wurde mit einem Gradienten aus Wasser + 0.1% Ameisensäure (A) und Methanol + 0.1% Ameisensäure (B) (0 min: 90:10, in 10 min auf 30:70, für 5 min auf 30:70, in 5 min auf 90:10 und für 10 min 90:10).

Die eingesetzte Reinigungsmethode erlaubte die Trennung von **3** und Chorismat in einem Lauf, so dass **3** und ebenfalls im Kulturüberstand enthaltenes Chorismat in einem Lauf getrennt und gewonnen werden konnten. Die Elution von Chorismat

und **3** wurde an Hand der Absorption bei 275 nm verfolgt. Die Chorismat- bzw. **3**-enthaltenden Fraktionen wurden in Rundkolben in flüssigem Stickstoff eingefroren und für 72 h lyophilisiert. Chorismat wurde als weiße Substanz erhalten und **3** zeigte eine mehr gelblich, bräunliche Farbe. Beide Substanzen wurden bei -70 °C gelagert.

Aus einem Liter Kulturüberstand wurden 300 mg Chorismat (Ausgangskonzentration: 1 g/L) erhalten. Das beim Zerfall von Chorismat entstehende Produkt Hydroxybenzoat (RT = 10.4 min, dieses Signal war in der Fraktion nicht nachweisbar) wurde im gereinigten Chorismat nicht nachgewiesen. Das UV-Spektrum des gereinigten Chorismates zeigte Maxima bei 202 nm, 222 nm und 281 nm. Für die erhaltene hohe Reinheit ($> 99\%$ der Peakfläche bei 290 nm, 280 nm und 275 nm) wurde eine geringe Ausbeute von ca. 30% in Kauf genommen.

Aus einem Liter Kulturüberstand wurden 200 mg/L **3** (Ausgangskonzentration: 0.6 g/L) erhalten. Das UV-Spektrum des gereinigten **3** zeigte Maxima bei 196 nm und 282 nm. Für die erhaltene hohe Reinheit (97% der Peakfläche bei 280 nm) wurde auch hier eine geringe Ausbeute von ca. 30% in Kauf genommen.

2.11 Gefriertrocknung

Zur Lyophilisierung von Proben wurde die Gefriertrocknungsanlage „Alpha I-5“ (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz) mit „DUO 5 M“-Pumpe (Pfeiffer Vacuum, Aßlar) eingesetzt.

2.12 Visualisierungs-Software

Für die Visualisierung von Strukturdaten und die Erstellung von Strukturabbildungen wurde das Programm „PyMOL“ verwendet (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. Schrödinger, LLC, New York, USA). Die Homologie-Modelle wurden mit dem „SWISS-MODEL workspace“ erstellt (Arnold *et al.*, 2006; Guex *et al.*, 2009).

3 Ergebnisse

Die Bildung von C-C-Bindungen durch enantioselektive Enzyme ermöglicht den Aufbau hochfunktionalisierter Substanzen mit der gewünschten Stereo-konfiguration. Das Produktspektrum von MenD sollte durch den Einsatz hochfunktionalisierter Donorsubstrate eingehender untersucht werden. Als Beispiel für diese neuartigen Donorsubstrate diente die Disäure 4-Hydroxy-2-oxoglutar-säure bzw. als Salz 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, **2**) als ein Analogon zum physiologischen Substrat von MenD, 2-Ketoglutarat (**1**). **2**, welches enzymatisch gewonnen werden sollte, besitzt eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C4, die in zwei Stereokonfigurationen vorliegen kann (Abbildung 3.1, vgl. Kapitel 3.3.1).

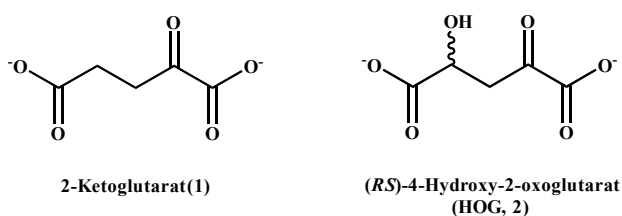


Abbildung 3.1: (*RS*)-**2** als ein neuartiger Donor für MenD und Analogon zum natürlichen Donor **1**.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

3.1 Enzymreinigungen

Für die Enzymumsätze wurden gereinigte Enzyme eingesetzt. Die Expression und Reinigung der Enzyme erfolgte wie im Material- und Methodenteil beschrieben (vgl. Kapitel 2.5.3 und 2.7.2). Die erhaltenen Ausbeuten sind in Tabelle 3.1 und die SDS-Gele im Anhang Abbildung 7.4 und Abbildung 7.5 (Schapfl *et al.*, 2018) dargestellt.

Tabelle 3.1: In der Arbeit eingesetzte Enzyme mit Laufhöhe in der SDS-Gelelektrophorese und nach Reinigung erhaltene Ausbeuten je Liter Kultur.

(Teils veröffentlicht in Schapfl *et al.*, 2018)

Enzym	Laufhöhe in der SDS-Gelelektrophorese	Berechnete Größe ¹⁾	Ausbeute
	[kDa]	[kDa]	[mg/L]
DgoA	22	22	130
Eda	22	26	200
EntC	42	46	81
MenD WT (= MenD)	62	66	170
MenD I474A F475G	62	66	290

¹⁾ berechnete Größe entspricht den Fusionsproteinen mit His-Tag

Die gereinigten Enzyme konnten bis zu 4 Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust im Kühlschrank gelagert werden.

Das Gen für die Aldolase DgoA wurde als codonoptimierte Sequenz für *E. coli* erworben. Um die Aldolase DgoA als Biokatalysator bei *in vitro*-Reaktionen im Rahmen dieser Arbeit einsetzen zu können, wurde die Gensequenz *dgoA* in das Plasmid pET_28a kloniert, in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert und als Fusionsprotein mit N-terminalem 6 x His-Tag exprimiert (vgl. Kapitel 2.6.8).

Bei Reaktionen zur Ausbildung neuer C-C-Bindungen wurde jeweils ein Überschuss eines der Substrate eingesetzt, um eine Verlagerung des Reaktionsgleichgewichtes zur Produktbildung zu erhalten. Die Umsätze wurden als Abnahme des Substrates definiert, das in der geringeren Konzentration eingesetzt wurde. Die Bestimmung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mittels RP-HPLC-DAD bei einer für das entsprechende Substrat geeigneten Wellenlänge. In Tabelle 7.3 im Anhang sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Substrate und nachgewiesenen Produkte mit der entsprechenden Nachweismethode, der Retentionszeit (RT), dem Absorptionsmaximum zur Quantifizierung (wenn vorhanden), den UV-Maxima, der Molekularmasse und dem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) zusammengestellt.

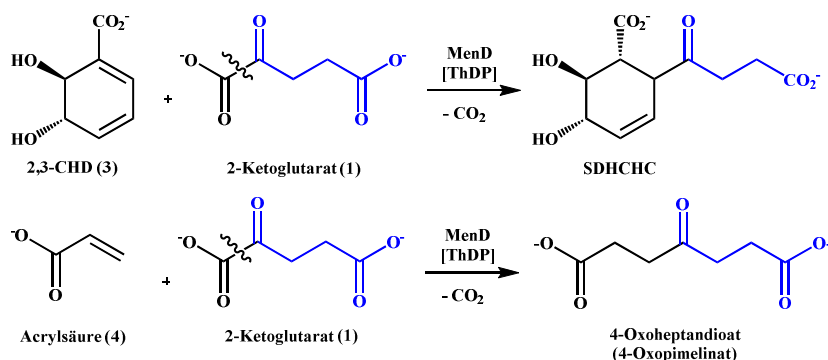
3.2 2-Ketoglutarat als physiologisches Donorsubstrat für MenD

2-Ketoglutarat (**1**) ist das physiologische Donorsubstrat von MenD und diente als Referenz-Donorsubstrat für die Etablierung von HOG (**2**) als neuem Donor für MenD. Dies sollte sicherstellen, dass MenD unter den gegebenen Reaktionsbedingungen aktiv ist. Hierzu wurden parallel zu den Ansätzen mit **2** jeweils Kontrollreaktionen mit **1** angesetzt. Isochorismat als Akzeptor für die physiologische Reaktion von MenD weist nur eine geringe Stabilität auf (Hubrich *et al.*, 2014). Um die Eignung von MenD als Katalysator für anwendungsbezogene Reaktionen zu erhöhen, wurde diese 1,4-Addition von **1** auf weitere Akzeptoren übertragen (Kurutsch *et al.*, 2009; Beigi *et al.*, 2014). (5*S*,6*S*)-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-1-carboxylat (2,3-*trans*-CHD, **3**), ein Analogon zu Isochorismat, führt zu stabilen cyclischen Produkten (Kurutsch *et al.*, 2009; Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Acrylsäure (**4**) als Akzeptorsubstrat für die 1,4-Addition

bietet die Möglichkeit, hochfunktionalisierte aliphatische Produkte zu gewinnen (Beigi *et al.*, 2013). Als Kontrollreaktionen für MenD diente die 1,4-Addition von **1** an die beiden Akzeptoren **3** bzw. **4** und die 1,2-Addition von **1** an Benzaldehyd (**5**) bzw. Hexanal (**6**) (Abbildung 3.2).

Diese Reaktionen konnten reproduziert werden, die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

1,4-Additionsreaktionen:



1,2-Additionsreaktionen:

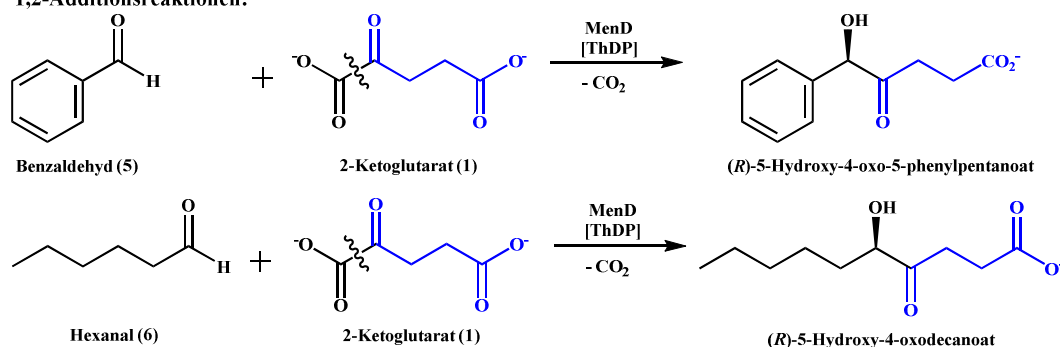


Abbildung 3.2: Kontrollreaktionen von MenD mit dem Donor 1.

(Modifiziert nach Kurutsch *et al.*, 2009)

Tabelle 3.2: Kontrollreaktionen von MenD mit dem Donor 1.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

50 mM Donor-substrat	20 mM Akzeptor-substrat	Abnahme des Akzeptors [%] nach 24 h	Umsatz des Akzeptors (Literaturdaten) [%]
1	3 ¹⁾	90	Nicht quantifiziert (Kurutsch <i>et al.</i> , 2009)
1	4 ¹⁾	> 99	> 99 (Beigi <i>et al.</i> , 2014)
1	5 ²⁾	> 99	> 99 (Kurutsch <i>et al.</i> , 2009; Westphal <i>et al.</i> , 2013a; Beigi <i>et al.</i> , 2013)
1	6 ²⁾	95	55 isolierte Ausbeute (Kurutsch <i>et al.</i> , 2009)

Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM Akzeptorsubstrat mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h.

Umsatz ist angegeben als Abnahme des Akzeptorsubstrates gemessen mit GC oder HPLC-DAD (für detaillierte Reaktionsbedingungen der GC- oder HPLC-Methoden, vgl. Kapitel 2.9.3 bzw. 2.9.4). Messungen wurden als Triplikate durchgeführt.

¹⁾ Standardreaktionsbedingungen (SRB) 1: $v = 2.0$ mL, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0 + 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ThDP, 30 °C, 750 rpm

²⁾ SRB 2: wie SRB 1, zusätzlich 5% (v/v) MTBE

Der Donor **1** wird von MenD gebunden, decarboxyliert und der entstehende aktivierte Succinylsemialdehyd auf das Akzeptorsubstrat übertragen. Im Folgenden wird vereinfachend geschrieben, dass der Donor **1** auf den Akzeptor übertragen wird.

Die 1,4-Addition des natürlichen Donors **1** an **3** wurde 2009 beschrieben und die Bildung des Produktes SDHCHC über NMR-Analytik verfolgt (Kurutsch *et al.*). Über Kurutsch *et al.* (2009) hinausgehend wurde von Schapfl *et al.* (2018) die 1,4-Addition von **1** an **3** quantifiziert und eine Abnahme von 90% für **3** bestimmt. Die Abnahme der Akzeptorsubstrate von > 99% für die Reaktionen mit **1** als Donor und den Akzeptoren **4** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **5** (Schapfl *et al.*, 2018) sind jeweils mit den Literaturdaten vergleichbar (**4**: Beigi *et al.*, 2014 bzw. **5**: Kurutsch *et al.*, 2009; Westphal *et al.*, 2013a; Beigi *et al.*, 2013).

Bei der 1,4-Addition handelt es sich um eine Stetter-ähnliche Addition des decarboxylierten **1** an eine C=C-Doppelbindung des Akzeptorsubstrates (Kurutsch *et al.*, 2009). Bei der 1,2-Addition dagegen wird das decarboxylierte **1** an die Aldehydgruppe des Akzeptors gebunden (vgl. Abbildung 1.7; Kurutsch *et al.*, 2009). Die 1,2-Addition des decarboxylierten Donorsubstrates an aliphatische oder aromatische Aldehyde führt zu einer selektiven Verlängerung des Kohlenstoffgerüsts und führt zusätzlich eine endständige Carboxylgruppe ein. Im Fall von **1** bzw. **2** als Donor ist dies eine Verlängerung um eine C₄-Einheit. Zusätzlich entsteht durch die 1,2-Addition an die Aldehydgruppe ein sogenanntes chirales α -Hydroxyketon, das einen hohen Funktionalisierungsgrad (Hydroxyketo-Funktion und endständige Carboxylgruppe) aufweist (Abbildung 3.2).

3.3 Ein-Topf-Reaktionen

3.3.1 Enzymatische Gewinnung von HOG

Die Aldolasen Eda bzw. DgoA wurden zur enzymatischen Gewinnung von HOG (**2**) aus Pyruvat (**7**) und Glyoxylat (**8**) eingesetzt. Für die Reaktion von 50 mM **7** und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda bzw. 0.2 mg/mL DgoA wurde nach 24 h Inkubation jeweils eine Abnahme des Akzeptorsubstrates **7** von > 99% (Eda, Schapfl *et al.*, 2018) bzw. > 90% (DgoA) gezeigt. Unter der Annahme, dass **7**

vollständig umgesetzt wurde, wurden 100 μMol (ca. 16 mg) **2** in einem Reaktionsvolumen von 2 mL erhalten. Diese Werte sind vergleichbar mit dem von Floyd *et al.* (1992) erzielten Umsatz von $> 95\%$ für die durch Eda katalysierte Reaktion von äquimolaren Konzentrationen von 100 mM **7** und 100 mM **8** zu **2**.

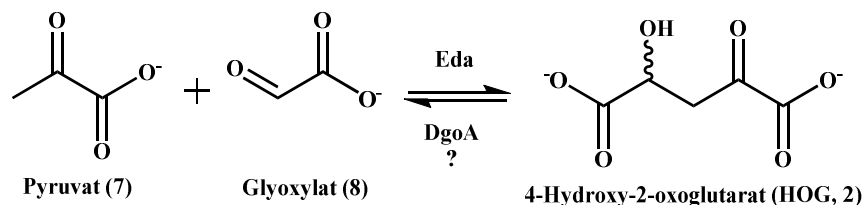


Abbildung 3.3: Enzymatische Synthese von 2 durch die Pyruvat- abhängigen Aldolasen Eda bzw. DgoA.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018; vgl. auch Floyd *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1998)

Für beide Aldolasen wurde die Bildung des Produktes **2** mittels HILIC-LC-MS bestätigt ($M = 162 \text{ g/mol}$, $m/z = 161.0$, $\text{RT} = 0.6 \text{ min}$; **2a**: Abbildung 3.4, **2b**: vgl. Anhang Abbildung 7.6).

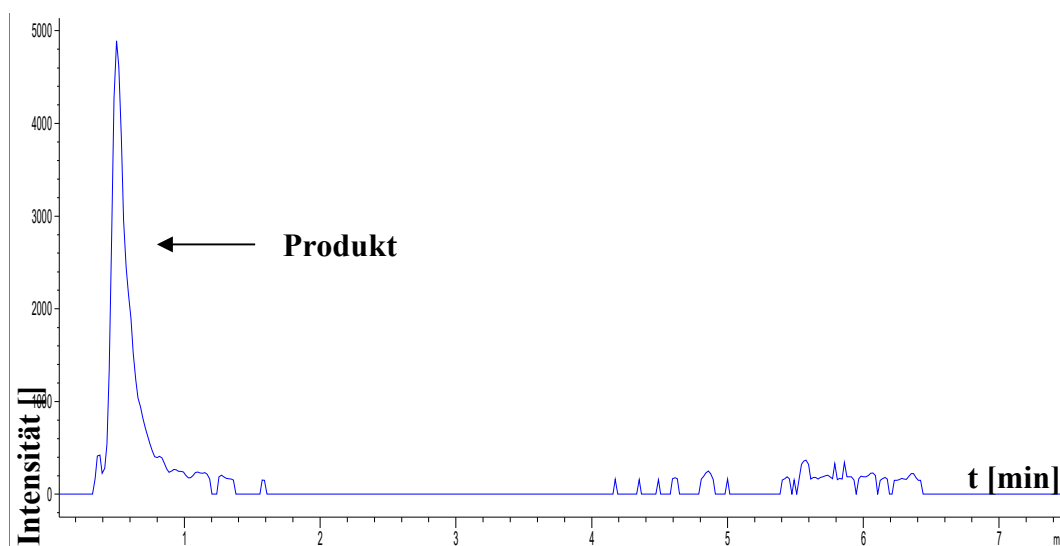


Abbildung 3.4: LC-MS-Chromatogramm mit extrahierten Ionen (m/z 161.0) nach 24 h Inkubation von 50 mM **7 und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda.**

Standardreaktionsbedingung (SRB) 3: $v = 2.0 \text{ mL}$, 50 mM Tris-HCl-Puffer + 10 mM MgCl_2 , pH 8.0, 30 $^\circ\text{C}$, 750 rpm; LC-MS: HILIC-Methode 2; putatives Produkt: $M = 162.0 \text{ g/mol}$, m/z 161.0, $\text{RT} = 0.6 \text{ min}$

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Im $^1\text{H-NMR}$ -Experiment war nach 24 h Inkubation von **7** und **8** mit Eda kein **7** (CH_3 : 2.20 – 2.40 ppm) mehr nachweisbar (Abbildung 3.5, Schapfl *et al.*, 2018). Die H-Atome am C3 des Produktes **2a** wurden durch zwei Signale bei 2.95 - 3.20

ppm (2H, CH₂) und das H-Atom am C4 bei 4.30 - 4.35 ppm (H, CHOHCO₂H) nachgewiesen (Schapfl *et al.*, 2018). Das ¹H-NMR-Spektrum des Produktes der DgoA-Reaktion ist mit diesem Spektrum vergleichbar (vgl. Anhang Abbildung 7.23). Die ¹H-NMR-Spektren bestätigen die Ergebnisse für **2** von Guérard-Hélaine *et al.* (2017).

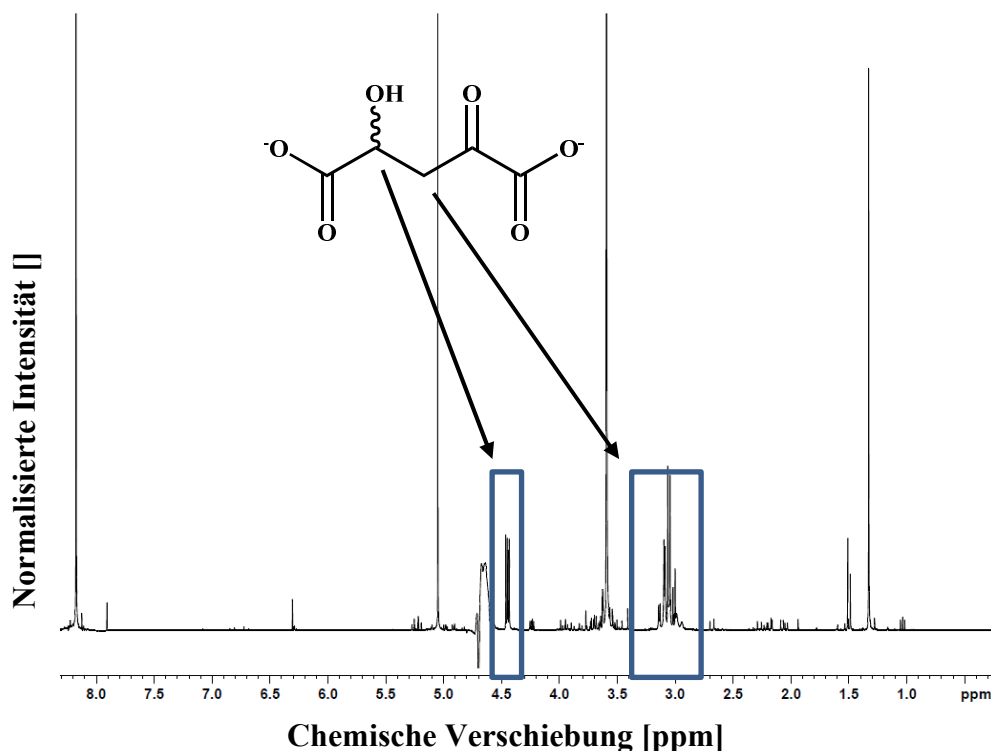


Abbildung 3.5: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O) nach 24 h Inkubation von 50 mM **7** und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda.

SRB 3, vgl. Abbildung 3.4; die für das putative Produkt erwarteten Signale sind mit einem Rechteck gekennzeichnet

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals an Hand der HILIC-LC-MS-Ergebnisse und der charakteristischen Signale im ¹H-NMR-Spektrum gezeigt, dass aus **7** und **8** durch DgoA **2** gebildet wird. Da bei beiden Aldolasen keine Nebenprodukte mittels HILIC-LC-MS und ¹H-NMR nachweisbar waren, kann auf eine hohe Chemo Selektivität für diese Reaktion geschlossen werden.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Hydroxylgruppe am C4 von **2a** bzw. **2b** erfolgte mittels Circular dichroismus (CD).

Wie oben beschrieben führten die beiden Aldolasereaktionen mit Eda bzw. mit DgoA jeweils zu einer weitgehenden Abnahme des **7**, so dass nach 24 h Reaktion in beiden Ansätzen die Konzentrationen von **7** vergleichbar waren. Ebenfalls lagen

in beiden Ansätzen vergleichbare Konzentrationen an **8** vor. Da sowohl **7** als auch **8** prochirale Substanzen sind, ist deren Einfluss auf das CD-Spektrum gering (Hesse *et al.*, 2012). Da Proteine im Bereich von 200 - 240 nm absorbieren und somit die Messung beeinträchtigen könnten, wurden die in den Ansätzen enthaltenen Enzyme durch Ansäuern gefällt und durch Zentrifugation vor der Messung entfernt.

Die erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Die CD-Spektren von **2a** und (*RS*)-**2** wurden in Schapfl *et al.* (2018) veröffentlicht.

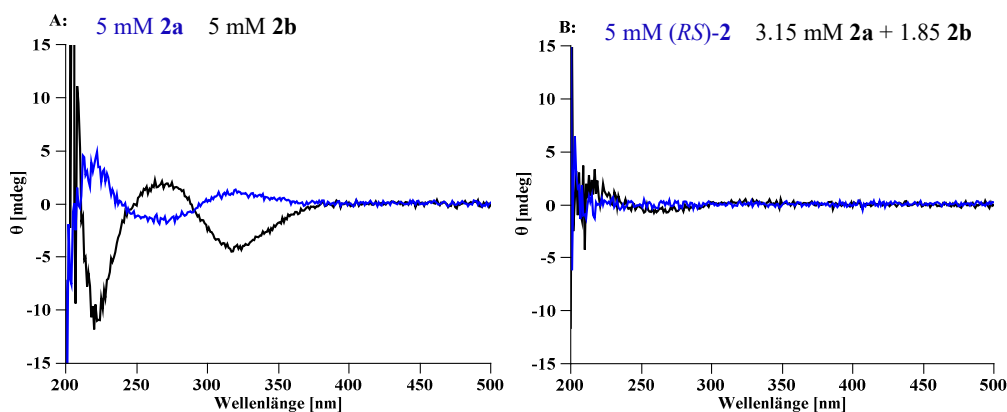


Abbildung 3.6: CD-Spektren von (A): 5 mM **2a** (blau) bzw. 5 mM **2b** (schwarz); (B): 5 mM (*RS*)-**2** (blau) bzw. der Mischung von 3.15 mM **2a** und 1.85 mM **2b** (schwarz).

2a bzw. **2b**: nach 24 h Inkubation von 50 mM **7**, 100 mM **8** und 0.2 mg/mL Eda (**2a**) bzw. DgoA (**2b**); SRB 3, vgl. Abbildung 3.4; B: Die Mischung aus den beiden Aldolaseprodukten, die zu einer weitgehenden racemischen Lösung führt, wurde an Hand von Erfahrungswerten aus den CD-Spektren der beiden Produkte abgeschätzt. Die CD-Spektren zeigen, ob racemisches **2** vorliegt oder ein Überschuss eines der beiden Enantiomeren.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Für die Aldolasereaktionen wurde die Produktkonzentration unter Annahme eines Umsatzes von **7** von 100% auf 5 mM **2a** bzw. **2b** (ca. 0 mM **7**, ca. 10 mM **8**) standardisiert. Im Spektrum des Ansatzes von 5 mM racemischem (*RS*)-**2** (Abbildung 3.6, B, blau) sind keine signifikanten Abweichungen von der Basislinie zu erkennen. Dies ist auf das äquimolare Verhältnis der beiden Enantiomere ((*R*)- und (*S*)-Enantiomer) zurückzuführen. In der Folge gleichen sich die Signale beider Enantiomere aus und somit sind im Spektrum keine Abweichungen von der Basislinie erkennbar (Hesse *et al.*, 2012).

Das Spektrum von **2a** (Abbildung 3.6, A, blau) wies bei einer Produktkonzentration von ca. 5 mM im Gegensatz zum racemischen (*RS*)-**2** (5 mM, Abbildung 3.6, B, blau) Abweichungen von der Basislinie auf (Schapfl *et al.*, 2018). Bei **2a** sind

positive Cotton-Effekte bei ca. 210 nm und bei ca. 320 nm und ein negativer Cotton-Effekt bei ca. 260 nm zu erkennen. Die Abweichungen zum racemischen (*RS*)-**2** zeigen, dass offenbar eines der Enantiomere im Überschuss vorliegt. Beim Reaktionsprodukt der Aldolase DgoA (**2b**) sind ebenfalls drei Abweichungen von der Basislinie zu erkennen, wobei die Signale – verglichen mit dem Eda-Ansatz – bei 210 nm, 260 nm und bei 320 nm in die jeweils entgegengesetzte Richtung zeigen (Abbildung 3.6, A, schwarz). Die Amplitude der Signale, d.h. das Spektrum ist für die Produkte beider Aldolasen spiegelbildlich. Dies zeigt, dass die Enzyme das jeweils andere Enantiomer im Überschuss gebildet haben und für diese Reaktion komplementär sind. Somit ist es gelungen, beide Enantiomere jeweils im Überschuss mittels der Enzyme Eda bzw. DgoA herzustellen. Wenn die beiden Aldolasen jeweils nur ein Enantiomer bilden würden, müsste man die beiden Proben im Verhältnis 1:1 mischen, um ein Racemat zu erhalten. In diesem Fall würde bei dem entstehenden Gemisch das Spektrum dann gleich dem racemischen des (*RS*)-**2** verlaufen und nicht von der Null-Linie abweichen.

An Hand von Erfahrungswerten wurde eine Mischung von 3.15 mM **2a** und 1.85 mM **2b** erstellt, um eine nahezu „racemische“ Lösung zu erhalten. Das Spektrum dieser Probe weist nur geringe Abweichungen von der Nulllinie auf und zeigt einen fast vergleichbaren Verlauf wie die racemische Lösung (*RS*)-**2**, was ein weiteres Zeichen dafür ist, dass die beiden Aldolasen entgegengesetzte Enantiomere von **2** bilden (Abbildung 3.6, B, schwarz).

Da mehr **2a** als **2b** eingesetzt werden musste, um ein „racemisches“ Signal zu erhalten, ist der Enantiomerenüberschuss im Falle der Aldolase DgoA höher als im Falle der Aldolase Eda. Zusätzlich ist bei dem Produkt der durch die Aldolase Eda katalysierten Reaktion zu berücksichtigen, dass es zu einem kinetischen Effekt gekommen sein könnte. Bei einer Reaktion, die über einen längeren Zeitraum läuft, kann dieser Effekt dazu führen, dass mit zunehmender Reaktionsdauer verstärkt auch das andere Enantiomer gebildet wird und in der Folge der Enantiomerenüberschuss sinkt (vgl. auch Kobes und Dekker, 1971).

Nach Floyd *et al.* (1992) bildet Eda L-(*S*)-**2** mit einem Enantiomerenüberschuss (ee) von > 95%. Ähnliche Werte erhielten auch Nishihara und Dekker (1972) (11 Moleküle (*S*)-**2** zu 1 Molekül (*R*)-**2**) und Gupta und Dekker (1984) (97% (*S*)-**2**). Die Stereokonfiguration des Produktes für dieselbe durch DgoA katalysierte

Reaktion wurde bisher nicht bestimmt (Henderson *et al.*, 1998). Unter der Voraussetzung, dass Eda überwiegend das (*S*)-**2** bildet, kann geschlossen werden, dass DgoA einen Überschuss an (*R*)-**2** bildet. Dies entspricht den Ergebnissen von Walters *et al.* (2008), die für DgoA und die Substrate 2-Pyridincarboxaldehyd und **7** die Bildung des (*R*)-Enantiomers mit einem $ee > 99.7\%$ gezeigt haben. Diese Ergebnisse entsprechen der Reaktion von Glycerinaldehyd-3-phosphat und **7** zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (Eda) bzw. 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogalactonat (DgoA), für die die Aldolasen Eda und DgoA komplementär sind und deren Produkte sich in der Stereokonfiguration am C4 unterscheiden (Henderson *et al.*, 1998). Die Stereoselektivität des Enzymes ist jedoch auch von dem Ursprungsorganismus abhängig. So ist die HOG-Aldolase aus der Leber von Rindern nicht-stereospezifisch für die Spaltung bzw. Synthese von **2** (Kobes und Dekker, 1971).

Die Gewinnung von (*R*)-**2** ist durch Zugabe der Aldolase Eda zu (*RS*)-**2** möglich, welche das (*S*)-**2** spaltet (Floyd *et al.*, 1992). Dieses Verfahren ist mit einem Verlust verbunden und darüber hinaus muss erst racemisches (*RS*)-**2** synthetisiert werden. Die elegantere Alternative besteht darin, wie in der vorliegenden Arbeit angewandt, das (*R*)-Enantiomer durch Zugabe von DgoA an Stelle von Eda zu bilden.

Um die absolute Konfiguration für **2a** bzw. **2b** zu bestätigen, könnte der Anteil der beiden Enantiomeren nach Kristallisation der gereinigten Produkte **2a** bzw. **2b** an Hand der Kristallstrukturen erfolgen. Alternativ ist auch der Nachweis der absoluten Konfiguration mittels Vibrational-Circular-Dichroism denkbar (Freedman *et al.*, 2003). Bei diesem Verfahren werden die erwarteten Signale für die einzelnen Konfigurationen, in denen die Produkte vorliegen können, errechnet und mit den Messwerten verglichen, um die Anteile der Produkte der einzelnen Konfigurationen zu bestimmen (Freedman *et al.*, 2003).

3.3.2 HOG als Donorsubstrat für MenD

Das enzymatisch gebildete HOG (**2a** bzw. **2b**) sollte als Donorsubstrat für MenD eingesetzt werden. Durch den 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP)-Assay kann gezeigt werden, ob **2** durch MenD gebunden wird und als Substrat für den Elektronentransfer auf DCPIP dienen kann. Er ermöglicht keine Aussage über die

Fragestellung, ob die an den Cofaktor gebundene Substanz auch im Rahmen einer Carboligationsreaktion auf einen Akzeptor übertragen werden kann.

Der DCPIP-Assay erfolgte analog zu Patel *et al.* (2012), die diesen zur Bestimmung der Aktivität der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP)-Synthase mit dem Donorsubstrat Pyruvat (**7**) eingesetzt haben. MenD zeigte im DCPIP-Assay sowohl für das physiologische Donorsubstrat 2-Ketoglutarat (**1**) als auch für das beispielhaft eingesetzte **2a** eine Reaktion. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl **1** als auch **2a** durch MenD gebunden und decarboxyliert werden können. Bei der Decarboxylierung von **1** entsteht Succinylsemialdehyd, der nach Oxidation als Succinat freigesetzt wird. Bei der Decarboxylierung von **2a** sind die analogen putativen Produkte Malylsemialdehyd und das als Säure freigesetzte Malat. Interessanterweise war die Absorptionsabnahme für die Ansätze mit **2a** höher als die für **1** als Donorsubstrat. Dies könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass **2a** am C4 statt der Methylengruppe (bei **1**) eine Hydroxyfunktion aufweist. In der Folge könnte die Abnahme der Absorption auf eine erhöhte Reaktivität von **2a** zurückzuführen sein, die auch ohne MenD-Zugabe zur Reduktion von DCPIP führt. Nachdem mit Hilfe des DCPIP-Assays gezeigt wurde, dass **2a** von MenD gebunden und decarboxyliert wird, sollte **2a** bzw. **2b** im nächsten Schritt auf seine Eignung als Donor für die durch MenD katalysierten 1,2- bzw. 1,4-Additionsreaktionen untersucht werden.

Eine chromatographische Abtrennung des gebildeten **2a** bzw. **2b** von den Edukten Glyoxylat (**8**) und **7** ist aufwendig und erscheint gerade im Hinblick auf eine spätere Anwendung nicht sinnvoll. Deshalb wurde ein Ein-Topf-System etabliert, um mehrere Reaktionsschritte nacheinander im selben Reaktionsmedium ablaufen zu lassen ohne eine aufwendige Reinigung von Zwischenprodukten durchführen zu müssen. Der erste Schritt ist die *in vitro*-Herstellung von **2a** bzw. **2b** aus den kommerziell erhältlichen Substanzen **7** und **8**.

Hierfür wurden im ersten Schritt 50 mM **7**, 100 mM **8** und 20 mM des zu untersuchenden Akzeptors für MenD zusammen mit 0.2 mg/mL der Aldolasen Eda bzw. DgoA inkubiert. Nachdem die Reaktion für beide Aldolasen nach ca. zwei Stunden das Equilibrium erreicht hatte und mehr als 90% von **7** umgesetzt waren (**2a**: Schapfl *et al.*, 2018), wurde der zweite Reaktionsschritt gestartet. Hierzu wurde MenD zugegeben und der Ansatz über Nacht für weitere 24 h inkubiert, wobei das

im Schritt 1 gebildete **2** als Donor für MenD diene. Da **2** durch die MenD-Reaktion dem Gleichgewicht entzogen wurde, kam es zu einer weiteren Umsetzung des **7** und **8** durch die Aldolasen, was zu einer weitgehenden Abnahme von **7** nach 24 h führte. Die jeweiligen Kontrollreaktionen mit **1** als Referenz wurden immer parallel angesetzt. Der Umsatz der MenD-Reaktionen wurde als Abnahme des jeweils eingesetzten Akzeptorsubstrates definiert.

3.3.3 1,4-Addition von HOG an 2,3-CHD

Als erstes wurde die 1,4-Addition von HOG (**2**) an 2,3-CHD (**3**) untersucht. Das Ausgangssubstrat **3** wurde im Ganzzellansatz *in vivo* durch einen mittels Metabolic Engineering optimierten Stamm ausgehend von Glucose als Kohlenstoffquelle hergestellt und anschließend gereinigt (vgl. Kapitel 2.5.3 und 2.10). Sowohl für die 1,4-Addition von **2a** als auch von **2b** an **3** war die Abnahme des Akzeptorsubstrates **3** bei 275 nm niedriger als bei der Vergleichsreaktion mit dem physiologischen Donorsubstrat **1** (Abnahme des Akzeptorsubstrates **3**: 90%, Schapfl *et al.*, 2018, vgl. Kapitel 3.2). Für die Reaktion mit 20 mM **3** als Akzeptor und 50 mM **2a** wurde nach 24 h Inkubation mit MenD eine Abnahme von **3** von 78% detektiert (Schapfl *et al.*, 2018) und für **2b** als Donor eine Abnahme von 23%. Für beide Reaktionen wurden mittels LC-MS zwei Produkte mit $M = 274.2$ g/mol bzw. m/z 273.0 (RT = 11.9 min bzw. RT = 12.3 min) detektiert (**2a**: Abbildung 3.7, Schapfl *et al.*, 2018, **2b**: Anhang Abbildung 7.7). In dieser Abbildung 3.7 sind beispielhaft die Ergebnisse für **2a** als Donor dargestellt.

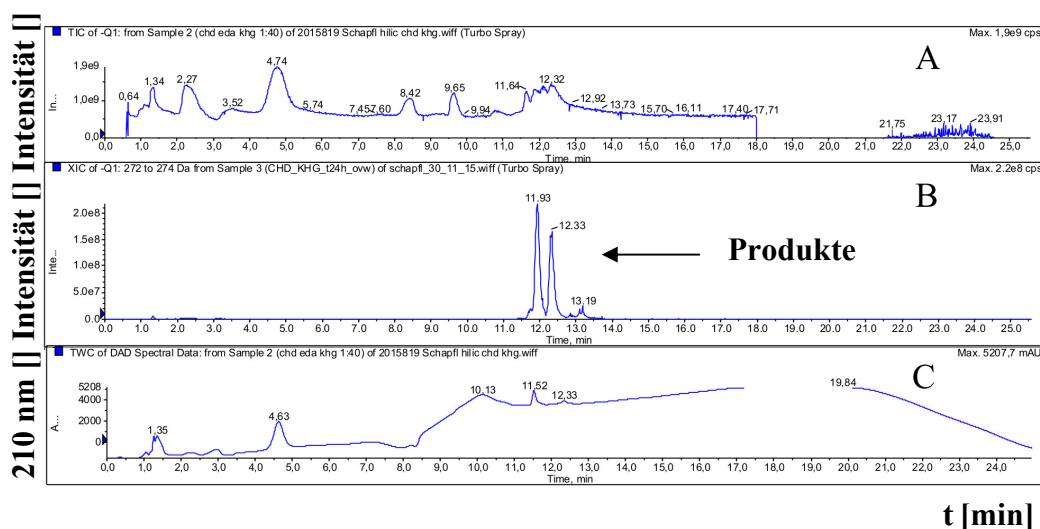


Abbildung 3.7: LC-MS/MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.

2a: gebildet in Vorreaktion aus 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL Eda, nach 2 h Zugabe von MenD und weitere 24 h Inkubation; SRB 1: $v = 2.0$ mL, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer + 0.1 mM ThDP + 2 mM $MgCl_2$, pH 8.0, 30 °C, 750 rpm); LC-MS/MS: Methode HILIC 1, A: Totalionenstrom, B: Massenspur der putativen Produkte ($M = 274.2$ g/mol, m/z 273.0) von m/z 272 – 274 [M – H], verdeutlicht die Bildung von MDHCHC ($M = 274.2$ g/mol, m/z 273.0, RT = 11.9 min) bzw. Iso-MDHCHC (RT = 12.3 min), isomerisches Produkt von MDHCHC (RT = 13.2 min) C: UV-Chromatogramm bei 210 nm

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Wie in Schapfl *et al.* (2018) beschrieben, kann in Analogie zu der Kontrollreaktion von 1 und 3 angenommen werden, dass es sich bei dem Produkt der 1,4-Addition von 2a an 3 um Maly1-DHCHC handelt [(1*R*,2*S*,5*S*,6*S*)-2-Maly1-5,6-dihydroxycyclohex-3-encarboxylat = MDHCHC]. LC-MS/MS-Messungen zeigten, dass die Substanz mit RT = 11.9 min sich zu einer neuen Substanz mit RT = 12.3 min umwandelt. Da die Grundstruktur von SDHCHC und MDHCHC, abgesehen von der zusätzlichen Hydroxylgruppe am Succinylrest, gleich ist, kann von einem vergleichbaren Umlagerungsmechanismus ausgegangen werden. Nach Erfahrungswerten mit SDHCHC ist das Regioisomer mit der höheren Retentionszeit (Iso-SDHCHC) das stabilere Isomer, das aus der Umlagerung des zuerst gebildeten SDHCHC entsteht (vgl. Kurutsch *et al.*, 2009; Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). In Analogie zu SDHCHC kann geschlossen werden, dass es sich bei der Substanz mit RT = 11.9 min um MDHCHC handelt, das zu der Substanz Iso-MDHCHC (RT = 12.3 min) isomerisiert. Die postulierte, vermutlich nicht-enzymatische, Umlagerung von MDHCHC in Iso-MDHCHC ist in Abbildung 3.8 dargestellt (Schapfl *et al.*, 2018).

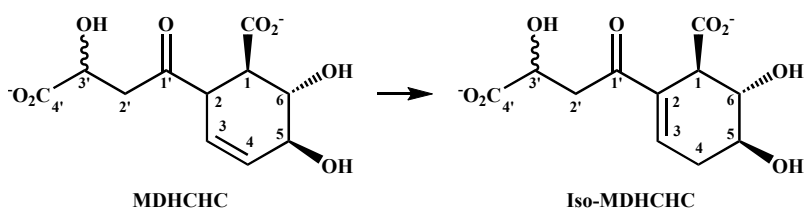


Abbildung 3.8: Postulierte (nicht enzymatische) Umlagerung von MDHCHC zu Iso-MDHCHC.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Ebenso wie bei der 1,4-Addition von **1** an **3** (Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019) wurde für beide enzymatisch gebildeten **2** als Donorsubstrate auch ein drittes Produkt mit m/z 273.0 (RT = 13.2 min) nachgewiesen, dessen Struktur noch nicht aufgeklärt werden konnte. Die im Vergleich höhere Retentionszeit dieses Enantiomers als die Retentionszeiten für MDHCHC und Iso-MDHCHC zeigt, dass diese Substanz unpolarer ist. Im Gegensatz zur 1,4-Additionsreaktion von **2a** bzw. **2b** wurde bei der Reaktion mit (*RS*)-**2** das dritte Signal mit m/z 273.0 nicht detektiert.

Im nächsten Schritt wurde zweifach-markiertes [2,3- ^{13}C]-Pyruvat ([2,3- ^{13}C]-**7**) als Substrat für die durch die Aldolase Eda katalysierte Aldoladdition eingesetzt (Schapfl *et al.*, 2018). Aus [2,3- ^{13}C]-**7** und Glyoxylat (**8**) sollte zweifach-markiertes [2,3- ^{13}C]-HOG (Eda) ([2,3- ^{13}C]-**2a**) gebildet werden (Abbildung 3.9). Dieses sollte für MenD als Donorsubstrat für die 1,4-Addition an **3** dienen und mit Hilfe der zwei markierten Kohlenstoffatome den Nachweis ermöglichen, dass [2,3- ^{13}C]-**2a** – nach Decarboxylierung – an **3** gebunden und eine neue C-C-Bindung ausgebildet wird.

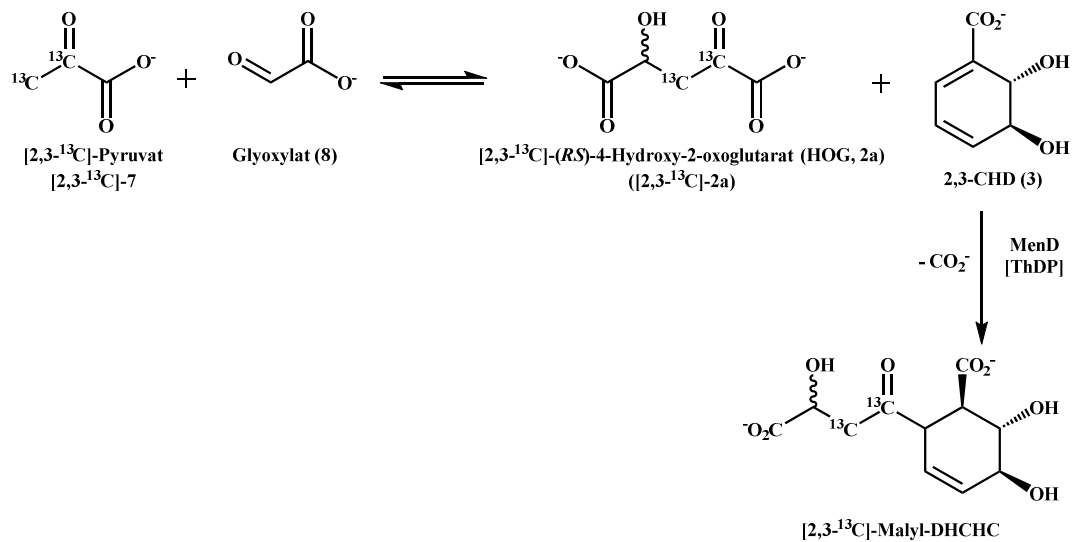


Abbildung 3.9: Einsatz von markiertem [2,3-¹³C]-7 zum Nachweis der neuen C-C-Bindung bei der durch MenD katalysierten 1,4-Addition von 2a an 3.

Die Durchführung des Assays und die LC-MS/MS-Analyse erfolgten analog zum nicht markierten 7 als Substrat. Das Fragmentierungsmuster im LC-MS/MS zeigt das Auftreten verschiedener Fragmente, die alle dem Produkt der MenD-Reaktion, [2,3-¹³C]-Malyl-DHCHC, zugeordnet werden können (Abbildung 3.10, Schapfl *et al.*, 2018).

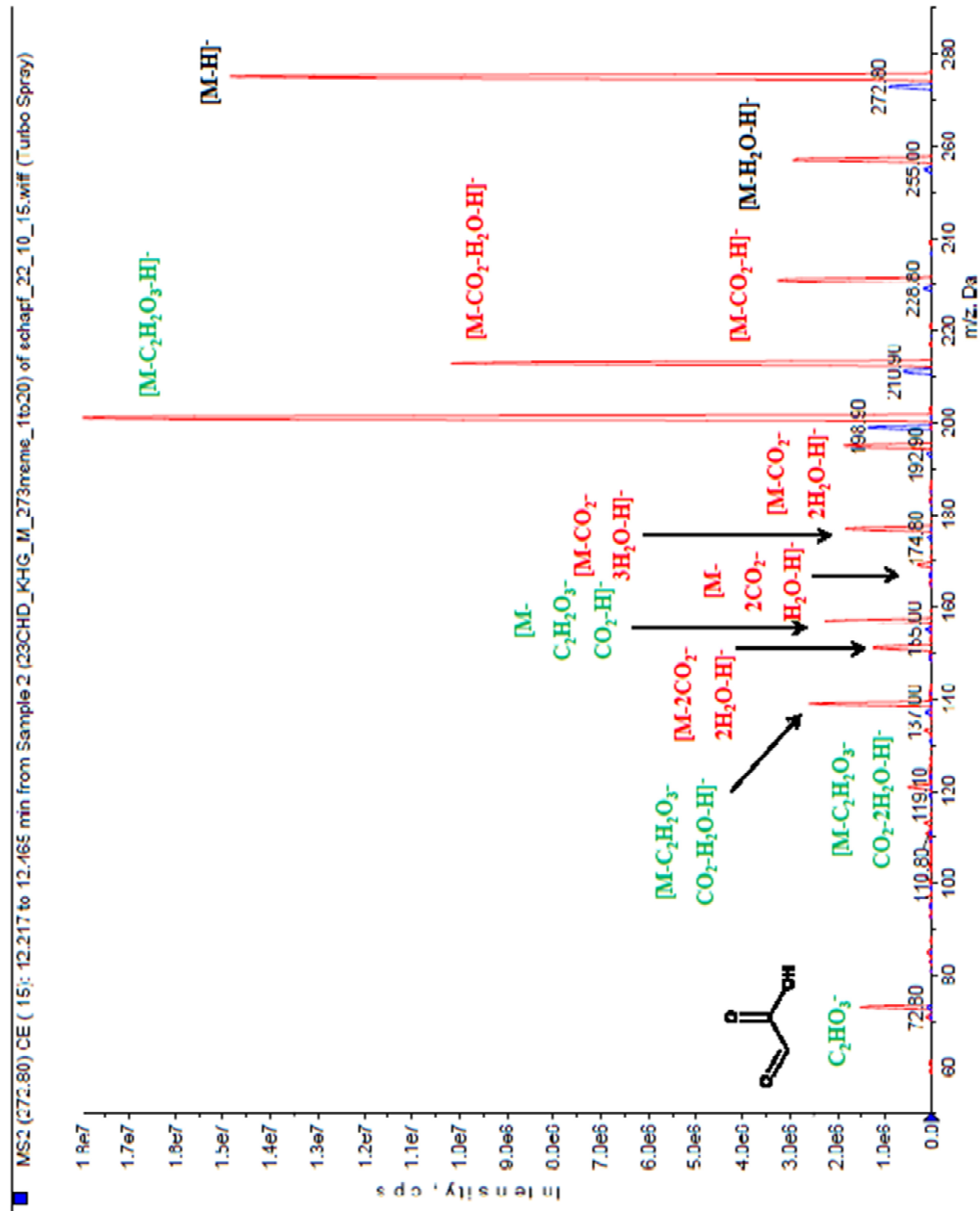


Abbildung 3.10: Fragmentierungsmuster des putativen Produktes MDHCHC. (blau: Fragmentierung von MDHCHC, rot: Fragmentierung von ^{13}C -markiertem MDHCHC).

Dargestellt ist der postulierte Fragmentierungsweg von MDHCHC in der LC-MS/MS. Die Fragmentierung des Produktes kann in zwei Wegen auftreten (in grün bzw. rot dargestellt). Den einzelnen Fragmenten sind die entsprechenden, vermuteten, Molekülsummenformeln zugeordnet (vgl. Abbildung 3.9).

Inkubation von 50 mM **7** bzw. $[2,3-^{13}C]$ -**7** + 100 mM **8** + 20 mM **3** mit 0.2 mg/mL Eda, nach 2 h Zugabe von 0.7 mg/mL MenD und Inkubation für weitere 24 h; SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; LC-MS/MS: HILIC-Methode 1, putative Produkte: Maly-DHCHC: M = 274.2 g/mol, m/z 273.0; $[2,3-^{13}C]$ -Maly-DHCHC: M = 276.2 g/mol, m/z = 275.0 (Modifiziert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Mittels LC-MS/MS wurde die Produktbildung auf Grund des erhöhten Verhältnisses von Masse zu Ladung (zurückzuführen auf das zweifach-markierte **7**) im Vergleich zum nicht-markierten **7** als Donorsubstrat eindeutig nachgewiesen (Abbildung 3.10, Schapfl *et al.*, 2018). Das LC-MS/MS-Fragmentierungsmuster bestätigte ebenfalls an Hand der Verschiebung der Massen die Bildung von $[2,3-^{13}\text{C}]$ -Malyl-DHCHC aus dem $[2,3-^{13}\text{C}]$ -markierten **2a**.

Für MDHCHC und für Iso-MDHCHC wurden in LC-MS/MS-Messungen neben dem Ausgangsanion ($m/z = 272.8$, entspricht $m/z 273.1$ in Abbildung 3.10) auch Fragmentationen mit $m/z = 255.0$ $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 228.8 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$, 210.9 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 198.9 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3-\text{H}]^-$, 192.9 $[\text{M}-\text{CO}_2-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 174.8 $[\text{M}-\text{CO}_2-3\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 166.8 $[\text{M}-2\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 155.0 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3-\text{CO}_2-\text{H}]^-$, 148.9 $[\text{M}-2\text{CO}_2-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 137.0 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$, 119.1 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3-\text{CO}_2-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ und 72.8 $[\text{C}_2\text{HO}_3]^-$ detektiert, die die Bildung der Produkte mit der erwarteten Molekülstruktur bestätigen (Schapfl *et al.*, 2018).

Dieses Fragmentierungsmuster kann durch die Bildung der Regioisomere MDHCHC und Iso-MDHCHC erklärt werden (Abbildung 3.11, Schapfl *et al.*, 2018).

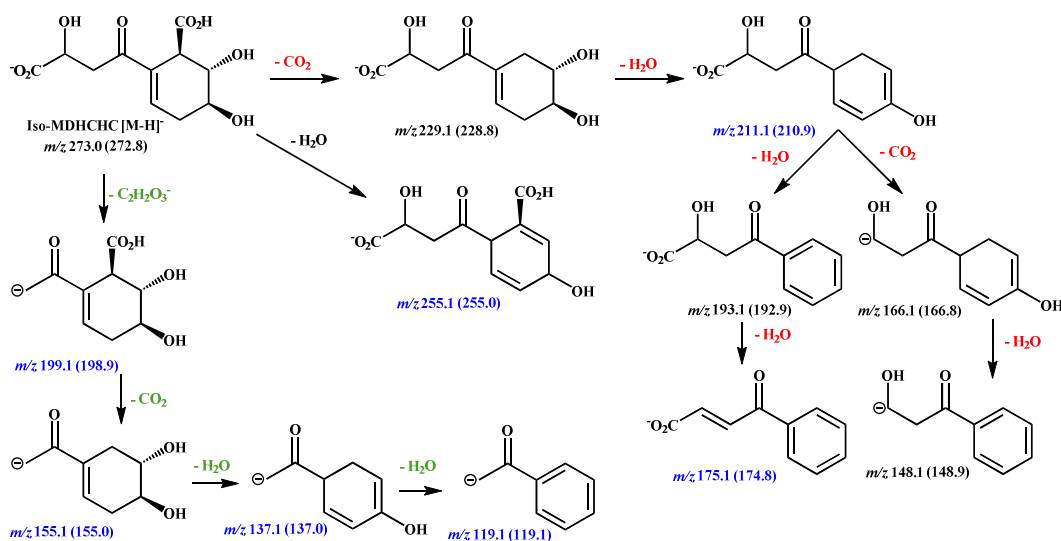


Abbildung 3.11: Postulierter Mechanismus der Fragmentierung von Iso-MDHCHC bei LC-MS/MS-Experimenten mit theoretischen Masse/Ladungsverhältnissen (m/z) und in Klammern den entsprechenden gemessenen Werten.

(Modifiziert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Der Vergleich der LC-MS/MS-Spektren von Iso-MDHCHC mit den Werten für Iso-SDHCHC und Iso-SEPHCHC (Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019) zeigt Gemeinsamkeiten. Vergleichbar ist die Decarboxylierung am Cyclohexanring als erster Schritt der Fragmentierung des deprotonierten Iso-MDHCHC bzw. Iso-SDHCHC. Weitere Fragmente lassen sich auf eine zweifache Wasserabspaltung unter Aromatisierung und auf eine hierauf folgende Decarboxylierung zurückführen. Ebenso lassen sich bei Iso-SDHCHC und Iso-MDHCHC Fragmente formal auf eine Abspaltung von zwei CO₂ und einem H₂O zurückführen. Der postulierte Fragmentierungsverlauf für Iso-MDHCHC zeigt darüber hinaus weitere Fragmente, die in Abbildung 3.11 in blauer Schrift gekennzeichnet sind.

Die LC-MS/MS-Spektren von Iso-SEPHCHC und Iso-SDHCHC weisen gemeinsame Fragmente bei m/z 177.1 und m/z 133.1 auf, was auf das (beiden Substanzen) zugrundeliegende Cyclohexangerüst mit der Succinylseitenkette zurückzuführen ist (Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Das LC-MS/MS-Spektrum von Iso-SEPHCHC ermittelt durch Fries (2015) ist vergleichbar mit dem Fragmentierungsmuster von *in vitro* gebildetem SEPHCHC, das von Jiang *et al.* (2007a) veröffentlicht wurde.

Es konnten mit LC-MS/MS weder Hinweise auf eine Selbstligation von **7** oder von **2a** noch für eine Addition von (decarboxyliertem) **7** an **3** gefunden werden. Auch eine durch MenD katalysierte oxidative Decarboxylierung von **2** zu Malat und dessen Freisetzung konnte mittels LC-MS/MS ausgeschlossen werden (Daten nicht dargestellt).

Mit Hilfe von ¹H-NMR wurde darüber hinaus gezeigt, dass es bei der 1,4-Addition von **1** bzw. von **2** an die Doppelbindung zwischen dem C5 und C6 des Cyclohexadienringes von **3** zur Bildung eines Cyclohexenringes kommt (Abbildung 3.12, Schapfl *et al.*, 2018).

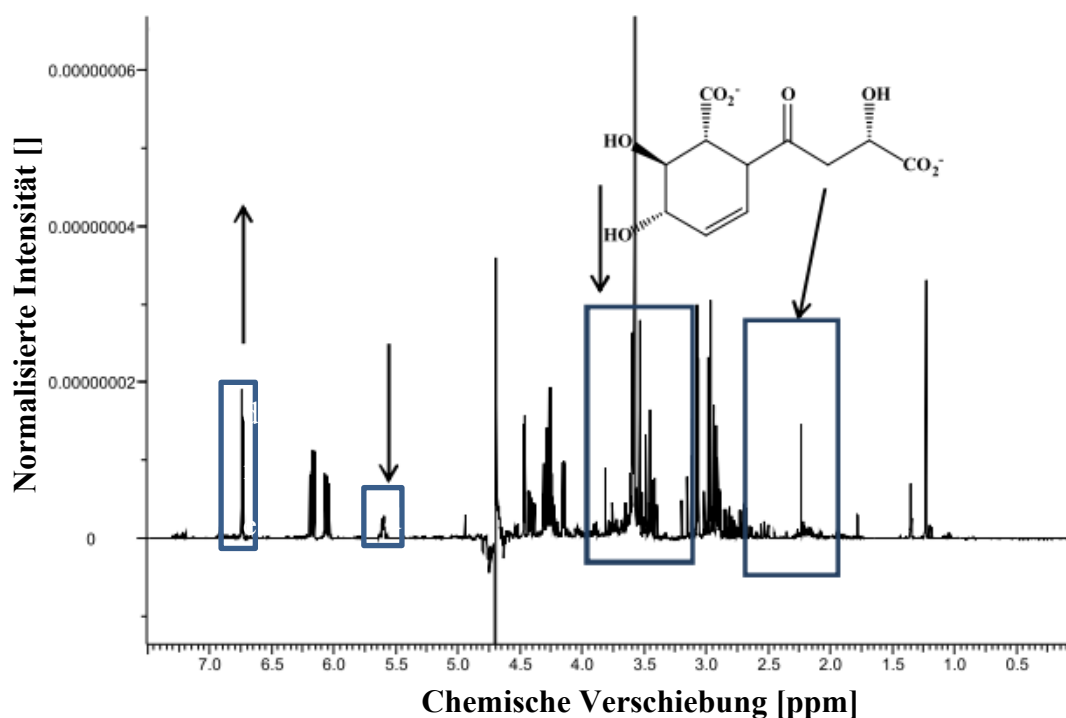


Abbildung 3.12: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 3, mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion und einer anschließenden Inkubation für eine Woche bei 4 °C.

2a und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; die für die putativen Produkte erwarteten Signale sind mit einem Rechteck gekennzeichnet; putative Produkte: MDHCHC (Carbinol-CH, Pfeil nach unten) und Iso-MDHCHC (Carbinol-CH, Pfeil nach oben)
(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Das im ¹H-NMR-Spektrum vorhandene olefinische H (5.6 ppm, 2H, CH_{olef}) zeigt an, dass es zu einer 1,4-Addition an den Cyclohexadienring gekommen ist und ein Cyclohexenring gebildet wurde (Abbildung 3.12, Schapfl *et al.*, 2018; vgl. auch Bildung von SDHCHC, Abbildung 3.13, Schapfl *et al.*, 2018, vgl. auch Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019).

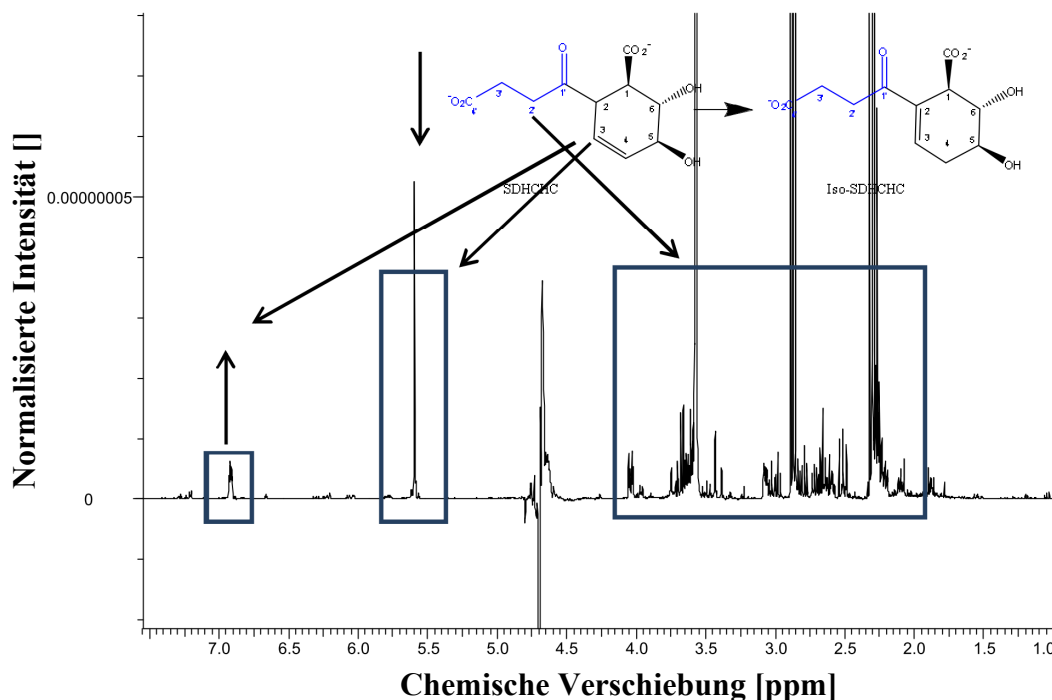


Abbildung 3.13: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) nach 24 h Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM **3** mit 0.7 mg/mL MenD.

SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; die für das putative Produkt erwarteten Signale sind mit einem Rechteck gekennzeichnet

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Beim Umsatz von **3** mit **2a** war das ^1H -NMR-Spektrum vergleichbar mit dem von SDHCHC (vgl. Abbildung 3.13, Schapfl *et al.*, 2018). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Unterschied des Signals des H-Atoms am C4 von **1** im Vergleich zur Hydroxylgruppe am C4 von **2** nur schwer zu detektieren ist. Das Signal bei 6.9 ppm ist darauf zurückzuführen, dass es wie für SDHCHC und Iso-SDHCHC beschrieben zur Umlagerung der Doppelbindung im Cyclohexenring von der Position 3,4 an die Position 2,3 gekommen ist (vgl. Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13, Kurutsch *et al.*, 2009; Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Dieses Signal bei 6.9 ppm entspricht der Bildung der neuen Methylengruppe im Ringspinsystem am C4 des entstehenden Regioisomers Iso-MDHCHC. Da in der Probe noch vorhandenes **2a** die für die Seitenkette charakteristischen Signale überlagerte, war eine Bestimmung der Struktur der Seitenkette ohne eine vorhergehende Reinigung des Produktes der 1,4-Addition nicht möglich. Da sowohl **2a** als auch MDHCHC sehr hydrophil sind, ist eine Trennung mittels Chromatographie technisch aufwendig. Der Akzeptor **3** kann durch das charakteristische Doppelsignal bei 6 ppm identifiziert werden.

Die Isomerisierung von MDHCHC zu Iso-MDHCHC wurde nach Lagerung bei 4 °C beobachtet (vgl. Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15, Schapfl *et al.*, 2018).

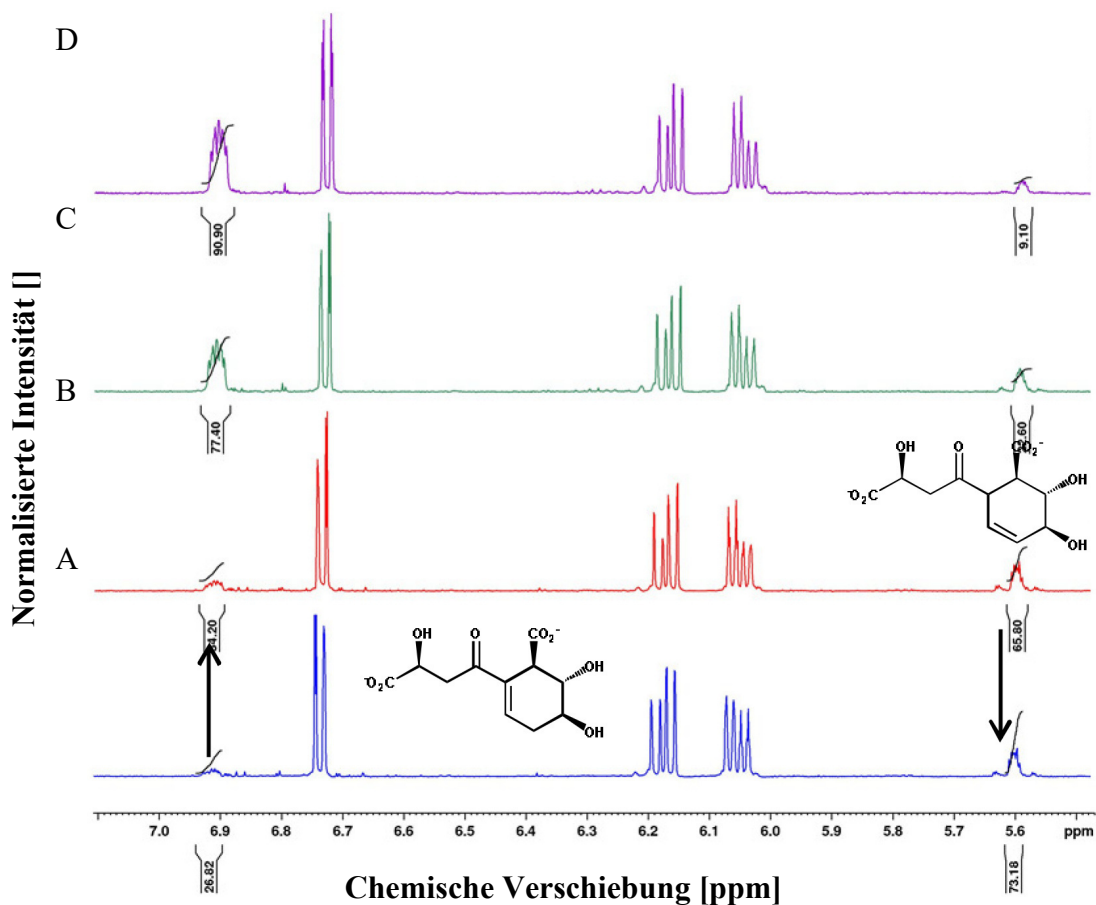


Abbildung 3.14: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, D₂O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD als Ein-Topf-Reaktion.

Aufgenommene NMR-Spektren nach weiterer Inkubation bei 4 °C (A: 0 h; B: 24 h; C: 96 h; D: 1 Woche). Erwartete Signale des gebildeten Produktes sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (MDHCHC (2 CH_{olef}, Pfeil nach unten) und Iso-MDHCHC (CH_{olef}, Pfeil nach oben))

2a und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

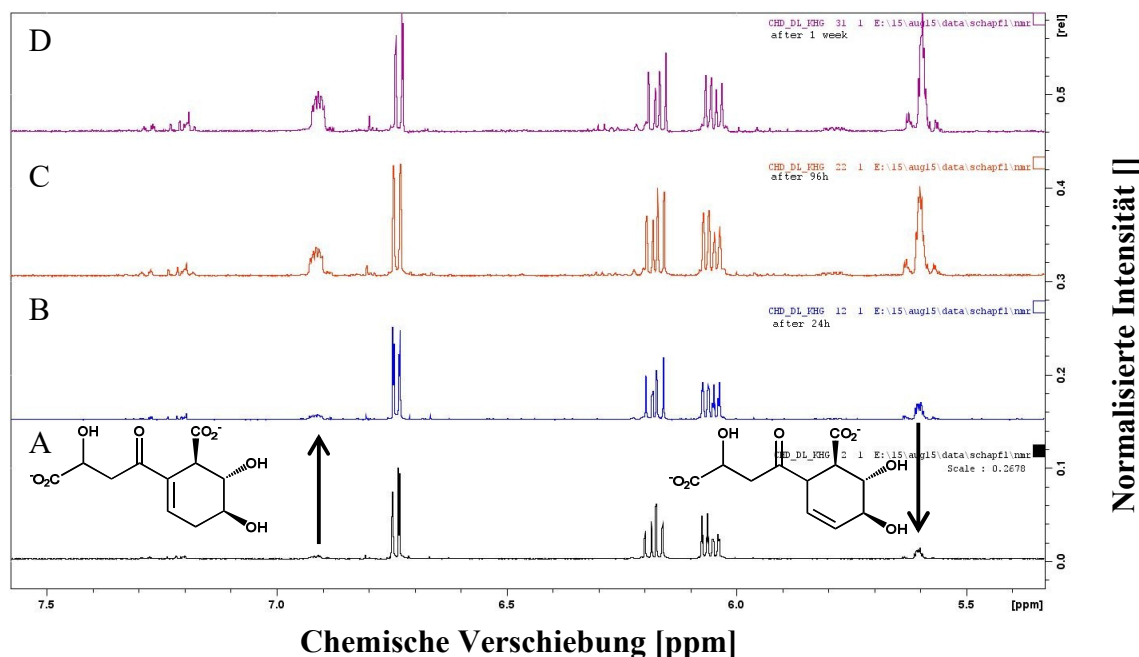


Abbildung 3.15: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) nach 24 h Inkubation von 50 mM (*RS*)-**2** (hergestellt nach Riedel *et al.*, 2011) und 20 mM **3** mit 0.7 mg/mL MenD.

Aufgenommene NMR-Spektren nach weiterer Inkubation bei 4 °C (A: 0 h; B: 24 h; C: 96 h; D: 1 Woche). Erwartete Signale des gebildeten Produktes sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (MDHCHC (2 CH_{olef} , Pfeil nach unten) und Iso-MDHCHC (CH_{olef} , Pfeil nach oben))

SRB 1: vgl. Abbildung 3.7

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Folglich wurde die in Abbildung 3.8 dargestellte putative Umlagerung von MDHCHC zu Iso-MDHCHC durch die ^1H -NMR-Experimente bestätigt.

Bei der 1,4-Addition von **1** bzw. **2** an die Doppelbindung (C2 zu C3) am Cyclohexadienring von **3** entsteht ein Cyclohexenring. Dieses Cyclohexengerüst, das sowohl bei der Bildung von SDHCHC als auch bei der Bildung von MDHCHC durch die Anlagerung der Succinyl- bzw. Malysemialdehyden an **3** entsteht, sollte durch 1D-Tocsy-Experimente nachgewiesen werden. Bei dem 1D-Tocsy-Experiment wurde das olefinische H-Atom mit der Verschiebung 5.6 ppm gezielt angeregt, um die Signale der benachbarten H-Atome zu detektieren (Abbildung 3.16, Schapfl *et al.*, 2018).

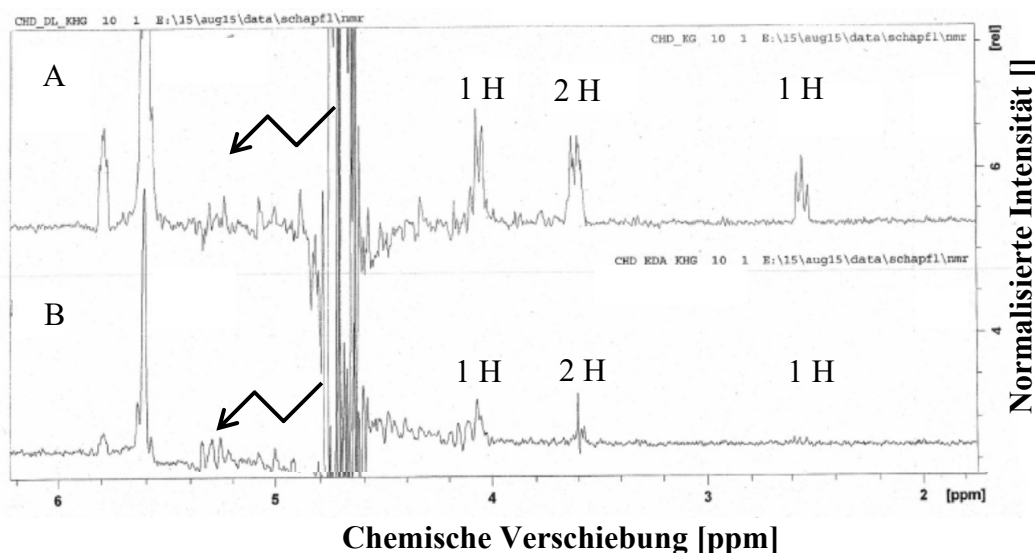


Abbildung 3.16: 1D-Tocsy-Experiment (400 MHz, D₂O) zur Anregung des olefinischen H-Atomes mit der Verschiebung 5.6 ppm zum Nachweis der Cyclohexenstruktur in den putativen Produkten der 1,4-Addition von **1 bzw. **2a** an **3** katalysiert durch MenD.**

A: nach 24 h Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM **3** mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h

B: nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **3** mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion

Nachweis der Signale mit 2.52 ppm (Triplet), 3.06 ppm (Multiplett) und 4.04 ppm (Duplett), die die 1,4-Addition an den Cyclohexadienring des **3** zeigen

2a und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; Pfeil indiziert die Anregung des olefinischen H-Atomes (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Wie in Abbildung 3.16 (Schapfl *et al.*, 2018) gezeigt, wurden beim Ansatz mit der 1,4-Addition von **1** an **3** die entsprechenden Signale der benachbarten H-Atome im Ringsystem mit 2.52 ppm (Triplet), 3.06 ppm (Multiplett) und 4.04 ppm (Duplett) beobachtet. Diese Signale bestätigen, dass **1** an die Doppelbindung des Cyclohexadienringes von **3** addiert wurde und das Produkt eine Doppelbindung enthält. Die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13, Schapfl *et al.*, 2018) zeigen, dass es bei den Ansätzen mit **1** als auch mit **2a** zu vergleichbaren Signalen kam, die bei der 1,4-Addition von **1** stärker waren als bei **2a** (Übereinstimmung mit LC-MS). Die 1D-Tocsy-Spektren für die Anregung des nach der Umlagerung von MDHCHC zu Iso-MDHCHC entstehenden olefinischen H-Atoms mit der Verschiebung 6.9 ppm bestätigen diese Ergebnisse (Abbildung 3.17, Schapfl *et al.*, 2018).

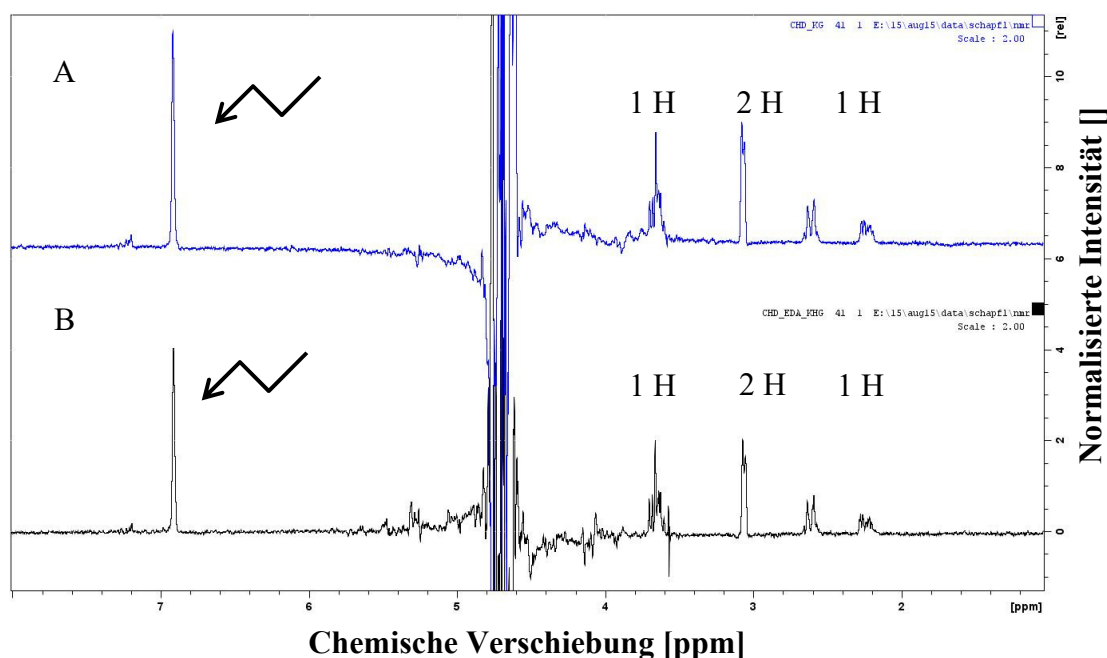


Abbildung 3.17: 1D-Tocsy-Experiment (400 MHz, D₂O) zur Anregung des olefinischen H-Atomes mit der Verschiebung 6.9 ppm zum Nachweis der Cyclohexenstruktur in den putativen Produkten der 1,4-Addition von **1 bzw. **2a** an **3** katalysiert durch MenD.**

Experimente wurden nach Lagerung der Proben bei Raumtemperatur für 1 Woche durchgeführt; A: nach 24h Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM **3** mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h; B: nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **3** mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion; Nachweis der Signale mit 2.52 ppm (Triplett), 3.06 ppm (Multiplett) und 4.04 ppm (Duplett), die die 1,4-Addition an den Cyclohexadienring des **3** zeigen

2a und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; Pfeil indiziert die Anregung des olefinischen H-Atomes (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Der Umsatz mit **1** war höher als die Umsätze mit **2**, was darauf hindeutet, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe des **2** die Reaktion negativ beeinflusst. Die unterschiedlich hohen Umsätze mit den Donoren **2**, **2a** bzw. **2b** können darauf zurückzuführen sein, dass Eda und DgoA beide HOG (**2**) bilden, allerdings jeweils das andere Enantiomer im Überschuss vorliegt (vgl. CD-Messungen, Kapitel 3.3.1). Für (*RS*)-**2** als Donorsubstrat lag der Umsatz zwischen den für **2a** (überwiegend (*S*)-konfiguriert) bzw. **2b** (überwiegend (*R*)-konfiguriert) ermittelten Werten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass (*S*)-**2** von MenD bevorzugt wird und die Stereokonfiguration am C4 entscheidend ist. Möglicherweise wird (*R*)-**2** schlechter umgesetzt, oder aber das (*R*)-konfigurierte Enantiomer des **2** inhibiert die Synthese MenD.

Auch wenn die Stereokonfiguration der Produkte nicht bestimmt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Konfiguration von MDHCHC und

Iso-MDHCHC der für SEPHCHC und Iso-SEPHCHC (1*R*,2*S*,5*S*,6*S*, Jiang *et al.*, 2007b) entspricht.

MDHCHC stellt als chirale Substanz mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen einen interessanten Ausgangsstoff für unterschiedlichste Derivatisierungen dar. Die Substanz MDHCHC weist eine sehr ähnliche Struktur wie das Endprodukt der 1,4-Addition von **1** an Isochorismat, SHCHC, auf. Der Cyclohexenring von MDHCHC enthält statt zwei Doppelbindungen wie SHCHC nur eine Doppelbindung. MDHCHC weist eine zusätzliche Diolfunktion an der Position C2, C3 und den Malyrest am C6 auf. Diese funktionellen Gruppen könnten weitere Folgereaktionen wie z.B. die Herstellung von Polyestern ermöglichen (Baerns *et al.*, 2013). Denkbar sind auch z.B. eine Oxidation der Hydroxylgruppe der Malyseitenkette zur Ketofunktion und deren anschließende reduktive Aminierung z.B. durch geeignete Glutamatdehydrogenasen. Ein mögliches Beispiel für die reduktive Aminierung ist das Enzymsystem der L-Glutamatdehydrogenase aus *Clostridium ssp.* und der NADH-Oxidase aus *Lactobacillus brevis* (Geueke *et al.*, 2003; Ödman *et al.*, 2004) wie es auch Beigi *et al.* (2013) eingesetzt haben (vgl. Abbildung 3.18).

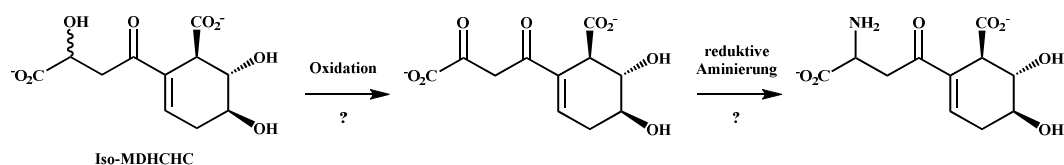


Abbildung 3.18: Mögliche Folgereaktion für Iso-MDHCHC bestehend aus einer Oxidation der Hydroxylgruppe des Malyrestes des Iso-MDHCHC und der nachfolgenden reduktiven Aminierung.

3.3.4 1,4-Addition von HOG an Acrylsäure

Wie in Kapitel 3.2 und 3.3.3 dargestellt, akzeptiert MenD die cyclischen Substrate Isochorismat und 2,3-CHD (**3**) als Akzeptoren für die 1,4-Addition. Beigi *et al.* (2014) beschreiben die Aktivität von MenD für offenkettige kurzkettige α,β -ungesättigte Säuren wie Acrylsäure (**4**) und deren Derivate als Michael-Akzeptoren für Stetter-ähnliche Reaktionen.

Nachdem der Einbau von HOG (**2**) als Donor für die 1,4-Addition an **3** gezeigt wurde, sollte der Einbau von **2** an **4** als aliphatischen Akzeptor übertragen werden (Abbildung 3.19, Schapfl *et al.*, 2018).

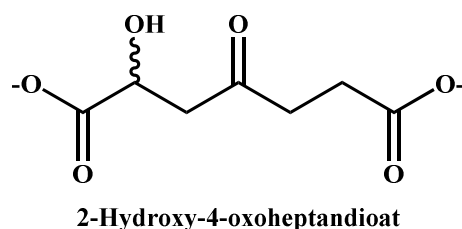


Abbildung 3.19: 2-Hydroxy-4-oxoheptandioat als postuliertes Produkt der durch MenD katalysierten 1,4-Addition von 2 an 4.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die Abnahme des Akzeptorsubstrates **4** bei 200 nm für die Reaktion mit **2a** bzw. **2b** war jeweils größer 99% und die Produktbildung wurde in beiden Fällen mittels LC-MS ($M = 190.1 \text{ g/mol}$, $m/z 189.0$, $RT = 2.2 \text{ min}$) bestätigt (**2a**: Abbildung 3.20, Schapfl *et al.*, 2018, **2b**: Anhang Abbildung 7.8). Die Abnahme von **4** war somit für alle drei Donoren > 99% (2-Ketoglutarat (**1**) + **2a**: Schapfl *et al.*, 2018, vgl. auch Kapitel 3.2 und Beigi *et al.*, 2014).

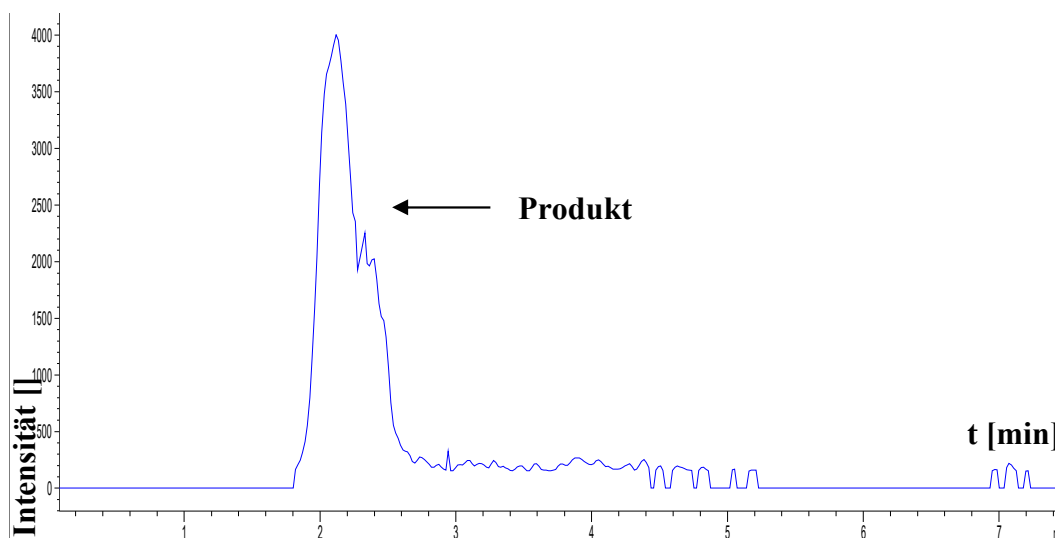


Abbildung 3.20: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.

2a und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen $m/z 189.0$; putatives Produkt: $M = 190.1 \text{ g/mol}$, $m/z 189.0$, $RT = 2.2 \text{ min}$, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.14

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Bei der 1,4-Addition mit **1** als Donorsubstrat entsteht eine symmetrisch aufgebaute nicht-chirale Disäure mit einer Ketogruppe in der Mitte des Moleküls (Abbildung 3.2, Beigi *et al.*, 2013). Beim Einbau von **2** an Stelle von **1** entsteht eine zusätzliche Hydroxylgruppe und es entsteht ein unsymmetrisch aufgebautes Molekül mit einem neuen chiralen Zentrum (vermutlich 2-Hydroxy-4-oxoheptandioat, Abbildung 3.19).

Die gebildeten Disäuren, im Fall von **2** als Donor mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in α -Position, sind mögliche Grundstoffe zur Synthese neuer Polymere oder Polyester basierend auf den beiden endständigen Carboxylgruppen (vgl. Baerns *et al.*, 2013). Daneben ermöglichen die Hydroxyl – und Ketofunktionalisierungen Crosslinking-Reaktionen.

Der Vorteil dieser 1,4-Addition von **1** bzw. **2a** bzw. **2b** an aliphatische Akzeptorsubstrate ist die Bildung von Produkten mit langen Kohlenstoffketten. Auf Grund der hohen Abnahme des Akzeptorsubstrates **4** (jeweils > 99%, **1** + **2a**: Schapfl *et al.*, 2018) bieten diese Reaktionen ein großes Potential für Anwendungen wie z.B. die Aminierung der 4-oxo-Gruppe (Abbildung 3.21).

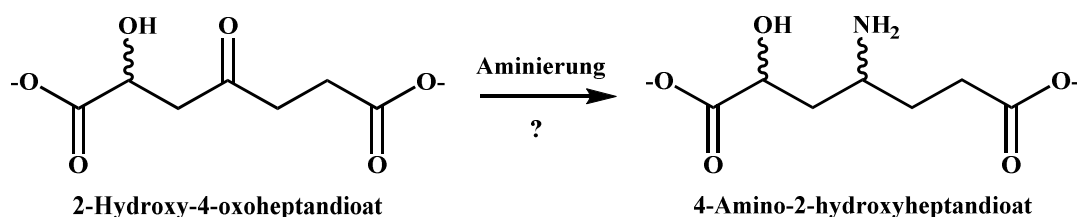


Abbildung 3.21: Mögliche Aminierung des Produktes der MenD-katalysierten 1,4-Addition von **2 an **4**.**

Der Umsatz für die 1,4-Addition von **1** an **4** mit MenD lag ebenso wie bei Beigi *et al.* (2014) bei > 99% (Schapfl *et al.*, 2018). Neben **4** haben Beigi *et al.* (2014) einige Derivate von **4** wie Methacrylsäure (Umsatz 23%) oder auch Acrylnitril (Umsatz 75%) als Michael-Akzeptoren für die 1,4-Addition von **1** etabliert. Methacrylnitril wurde dagegen nicht umgesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, dass MenD verschiedene aliphatische Akzeptoren für die 1,4-Addition akzeptiert und durch Kombination mit den in der vorliegenden Arbeit etablierten Donoren das Produktspektrum hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften der Produkte erweitert werden könnte. Um mit geringem Zeit- und Kosteneinsatz ein optimales Verhältnis von Akzeptorsubstrat und Donorsubstrat zu ermitteln, bietet sich das Prinzip des Design

of Experiments (DOE) an, wie es z.B. durch Sudar *et al.* (2018a) angewandt wurde. Die Autoren zeigten für die MenD-Reaktion von **1** und Acrylnitril, dass die höchsten Produktausbeuten erhalten werden, wenn MenD im repetitiven Batch-Ansatz wiederverwendet wird. Der Fed-Batch-Ansatz zeichnete sich ebenfalls durch hohe Ausbeuten bei einer kurzen Reaktionszeit aus. Diese Arbeiten wurden fortgeführt, um das Modell und den Prozess hinsichtlich einer industriellen, kostenoptimierten Anwendung zu verbessern (Sudar, 2018b).

3.3.5 1,2-Addition von HOG an aromatische und aliphatische Aldehyde

Neben der physiologischen 1,4-Addition katalysiert MenD auch eine 1,2-Addition des Donorsubstrates nach dessen Decarboxylierung zum aktivierten Aldehyden an die Aldehydgruppe von verschiedenen aromatischen und auch aliphatischen Aldehyden (Kurutsch *et al.*, 2009) und bildet bei dieser Reaktion funktionalisierte 2-Hydroxyketone. 2-Hydroxyketone sind wichtige chirale Vorstufen von γ - und δ -Lactonen, die ihrerseits Bestandteile vieler natürlicher Produkte und auch wichtiger Zwischenstufen in organischen Synthesereaktionen für Moleküle mit Diol- oder auch Aminoalkoholfunktionen sind (Sukumaran und Hanefeld, 2005; Kulig *et al.*, 2012; Sehl *et al.*, 2012).

Die erwarteten Produkte für die 1,2-Addition von HOG (**2a** bzw. **2b**) an Benzaldehyd (**5**) bzw. Hexanal (**6**) sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

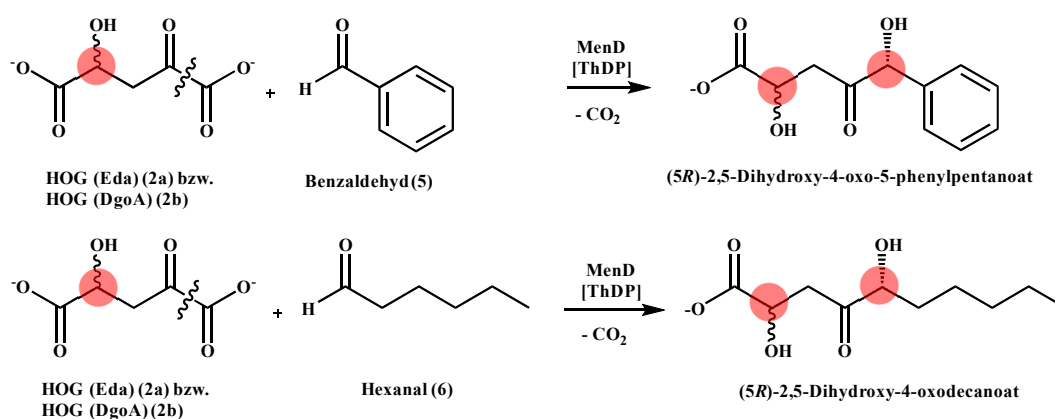


Abbildung 3.22: Postulierte 1,2-Addition von 2 an 5 bzw. an 6 katalysiert durch MenD.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Wie unter Kapitel 3.2 beschrieben führt die MenD-katalysierte 1,2-Addition von 2-Ketoglutarat (**1**) an **5** zu einer Abnahme des **5** von > 99% (Gaschromatographie; Schapfl *et al.*, 2018). Für die 1,2-Additionsreaktionen von **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **2b** und **5** katalysiert durch MenD wurde nach 24 h jeweils eine Abnahme des **5** von > 99% bestimmt. Bei beiden Reaktionen wurde wie bei der Vergleichsreaktion mit **1** als Donorsubstrat die Bildung von zwei Produktsignalen gezeigt, was vermutlich auf die Gaschromatographie-Bedingungen zurückzuführen ist. Der erste Peak entspricht vermutlich dem decarboxylierten 2-Hydroxyketon, das zum 1,2-Diketon oxidiert wurde. Der zweite Peak entspricht vermutlich der Lactonbildung der 5-Hydroxy-4-oxopentanoyleinheit (Kurutsch *et al.*, 2009). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass bei der LC-MS-Analyse keine entsprechenden Zerfallsprodukte nachgewiesen werden konnten.

Für die 1,2-Addition von **2a** an **5** zeigte das LC-MS-Chromatogramm die Bildung zweier Substanzen mit dem erwarteten Masse zu Ladungsverhältnis ($M = 224.1$ g/mol, m/z 223.0, $RT = 2.2$ min bzw. $RT = 3.4$ min, Abbildung 3.23, Schapfl *et al.*, 2018). Für **2b** wurde ebenfalls das Signal bei $RT = 2.2$ min nachgewiesen, wogegen die Intensität des zweiten Signals nahe an der Detektionsgrenze lag (vgl. Anhang Abbildung 7.9).

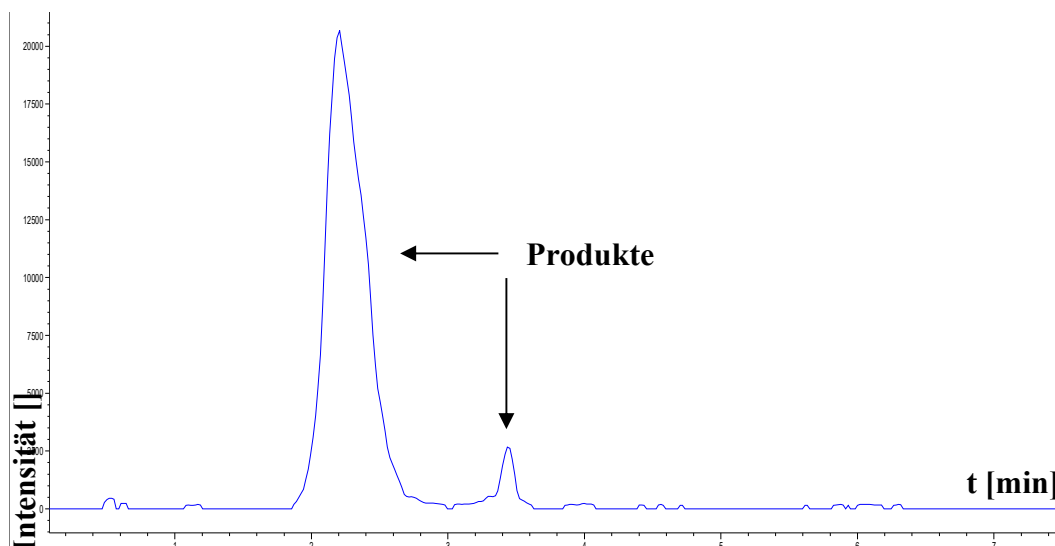


Abbildung 3.23: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a und 20 mM **5** mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.**

2a und SRB 2: $v = 2.0$ mL, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer + 0.1 mM ThDP + 2 mM $MgCl_2$, pH 8.0, 5% (v/v) MTBE, 30 °C, 750 rpm; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 223.0; putatives Produkt: $M = 224.1$ g/mol, m/z 223.0, $RT = 2.2$ min und $RT = 3.4$ min, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.15

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

In Analogie zu der durch MenD katalysierten 1,2-Addition von **1** an **5** lässt sich ableiten, dass MenD auch die 1,2-Addition von **2** an **5** mit einem Überschuss des (*R*)-konfigurierten Produktes bildet, wobei die absolute Konfiguration des Kohlenstoffes mit der vom **2** stammenden Hydroxylgruppe vom umgesetzten **2**-Enantiomer abhängt.

Bei dieser Reaktion wird das in Abbildung 3.22 dargestellte Produkt (*2RS,5R*)-2,5-Dihydroxy-4-oxo-5phenylpentanoat erwartet. Das Auftreten zweier Produktsignale kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass das eingesetzte **2a** bzw. **2b** nicht enantiomerenrein ist. In der Folge könnten zwei Diastereomere gebildet werden, die sich in der Konfiguration der Hydroxylgruppe unterscheiden. Die geringe Intensität des zweiten Produktsignals kann möglicherweise auch auf den hohen ee von **2b** zurückgeführt werden (vgl. auch Kapitel 3.3.1). Der niedrigere ee von **2a** könnte dazu führen, dass MenD vermehrt beide Enantiomere von **2** umsetzt und Diastereomere gebildet werden.

Durch ¹H-NMR wurde für die beiden 1,2-Additionen an **5** mit **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **2b** als Donor die Verschiebung von Signalen auf Grund der 1,2-Addition und die Abnahme von **5** an Hand der Aldehydgruppe gezeigt (Abbildung 3.24, Schapfl *et al.*, 2018 und Anhang Abbildung 7.24).

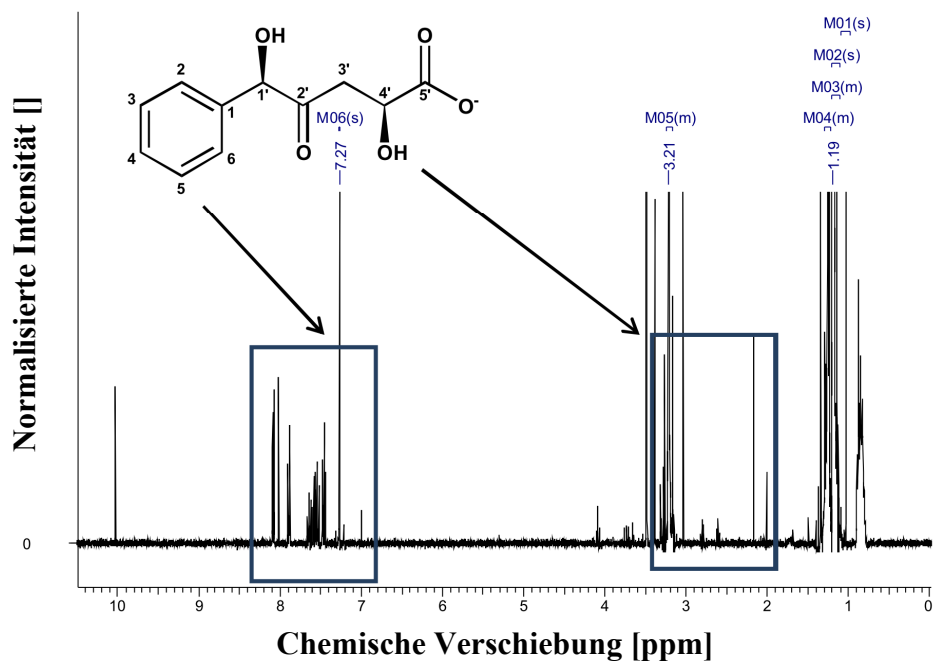


Abbildung 3.24: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **5** mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion. **2a** und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; Erwartete Signale des gebildeten Produktes sind durch ein Rechteck gekennzeichnet (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die Signale bei 2.78 - 3.06 ppm (2H, CH_2CO) und bei 7.10 - 7.26 ppm (m, 5H, CH_{Ar}) bestätigen die Bildung des erwarteten Produktes, erlauben aber keine Aussage über die Stereochemie des Produktes (Abbildung 3.24, Schapfl *et al.*, 2018 und Anhang Abbildung 7.24).

Da die Bestimmung der Konfiguration der chiralen Kohlenstoffatome der 1,2-Addition von **2** an **5** nicht erfolgreich war, wurde die Enantio- und Diastereoselektivität der MenD-katalysierten 1,2-Additionen mit 2-Flourbenzaldehyd (2F-Benzaldehyd) als Akzeptorsubstrat untersucht. Das ^1H -NMR-Spektrum für das gebildete Produkt der 1,2-Addition von (*RS*)-**2** an 2-F-Benzaldehyd ist in Abbildung 3.25 dargestellt (Schapfl *et al.*, 2018). Das für 2-F-Benzaldehyd charakteristische Signal, die Aldehydgruppe (10.3 ppm), war nur noch in Spuren nachweisbar. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Kurutsch *et al.* (2009).

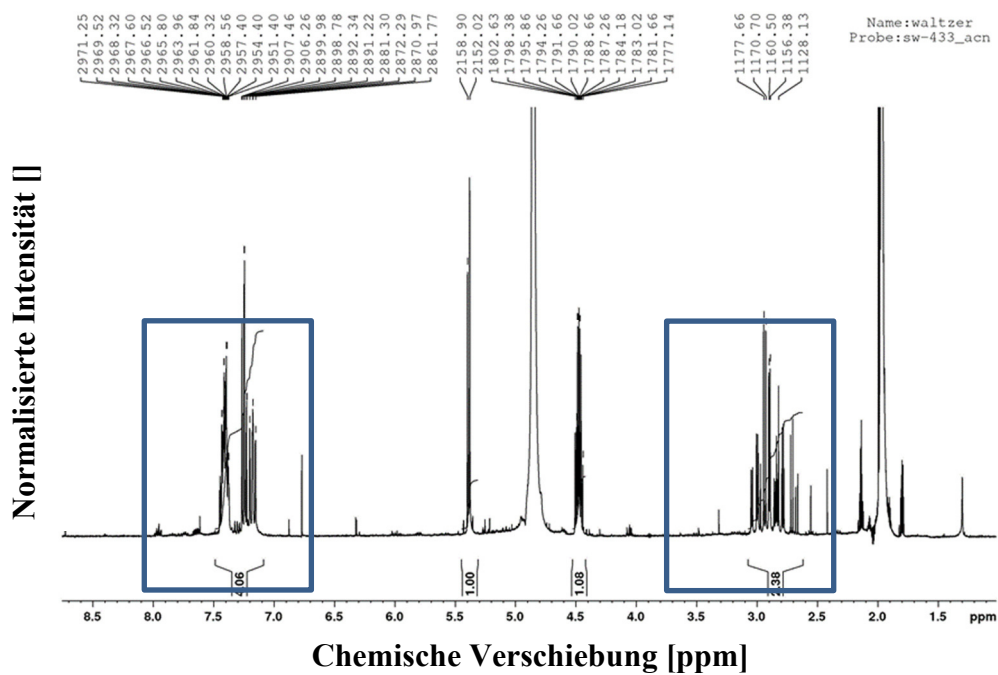


Abbildung 3.25: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) nach 24 h Inkubation von 50 mM (*RS*)-**2** und 20 mM 2-F-Benzaldehyd mit 0.7 mg/mL MenD.

$v = 1.0$ mL, 50 mM Tris-HCl-Puffer + 10 mM MgCl_2 , pH 8.0, 30 °C, 750 rpm; Erwartete Signale des gebildeten Produktes sind durch ein Rechteck gekennzeichnet (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die ^1H -NMR-Spektren der 1,2-Additionen von **2a** bzw. (*RS*)-**2** an 2-F-Benzaldehyd zeigen eine gute Trennung des Signals des Carbinol-CH (Abbildung 3.26, Schapfl *et al.*, 2018).

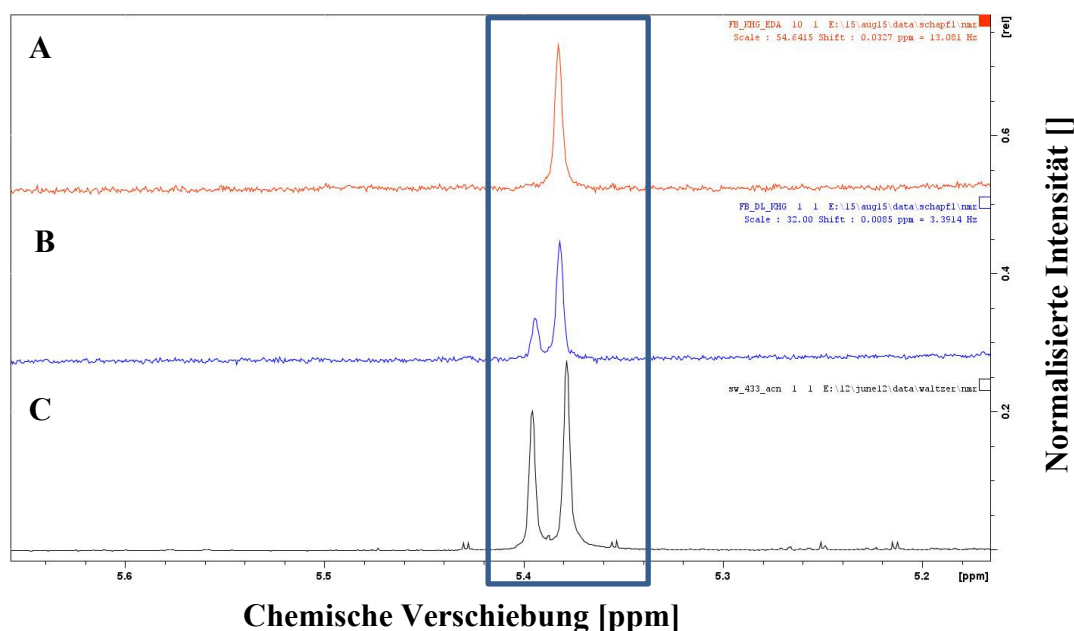


Abbildung 3.26: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM 2-F-Benzaldehyd mit 0.7 mg/mL MenD als Ein-Topf-Reaktion (A); 50 mM (*RS*)-**2** (Sigma-Aldrichs) statt **2a** (B); 50 mM (*RS*)-**2** (hergestellt nach Riedel *et al.*, 2011) statt **2a** (C).

$v = 1.0$ mL, 50 mM Tris-HCl-Puffer + 10 mM MgCl₂, pH 8.0, 30 °C, 750 rpm; Erwartete Signale des Carbinol-CH des gebildeten Produktes sind durch ein Rechteck gekennzeichnet.

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Das Produkt mit dem enzymatisch gewonnenen (*S*)-**2a** zeigt ein Singulett bei 5.38 ppm (s, 1H, CHOH), wogegen das Produkt mit (*RS*)-**2** zwei Signale bei 5.38 ppm (s, 1H, CHOH, Hauptprodukt: (*2S,5R*)-Konfiguration) und bei 5.40 ppm (s, 1H, CHOH, Nebenprodukt: (*2R,5R*)-Konfiguration) zeigt (Abbildung 3.26, Schapfl *et al.*, 2018). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass MenD diese 1,2-Additionsreaktion hoch enantioselektiv katalysiert und beide Enantiomere des **2** als Donorsubstrate akzeptiert.

Neben aromatischen Aldehyden wie **5** akzeptiert MenD auch aliphatische Aldehyde wie **6** als Akzeptor für die 1,2-Additionsreaktion mit **1** als Donorsubstrat (Kurutsch *et al.*, 2009). Die Abnahme des Akzeptorsubstrates **6** bei 200 nm betrug für die 1,2-Addition von **1** an **6** nach 24 h 95% (Kapitel 3.2). Analog zur Vorgehensweise für die 1,2-Addition an **5** wurde **2** als Donorsubstrat für die 1,2-Addition an **6** eingesetzt. Im Fall von **2** als Donor betrug die Abnahme des Akzeptorsubstrates **6** 87% (**2a**, Schapfl *et al.*, 2018) bzw. 62% (**2b**). Beide Abnahmen liegen niedriger als die mit **1**, was wie bei **3** als Akzeptor auf eine schlechtere Stabilisierung des Donors auf Grund der zusätzlichen Hydroxylgruppe hindeutet. Die Produktbildung

wurde für die Reaktionen mit **2a** ($M = 218.1$ g/mol m/z 217.1 $RT = 3.8$ min, Abbildung 3.27, Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **2b** ($M = 218.1$ g/mol, m/z 217.1, $RT = 0.6$ min, Anhang Abbildung 7.10) mittels LC-MS bestätigt.

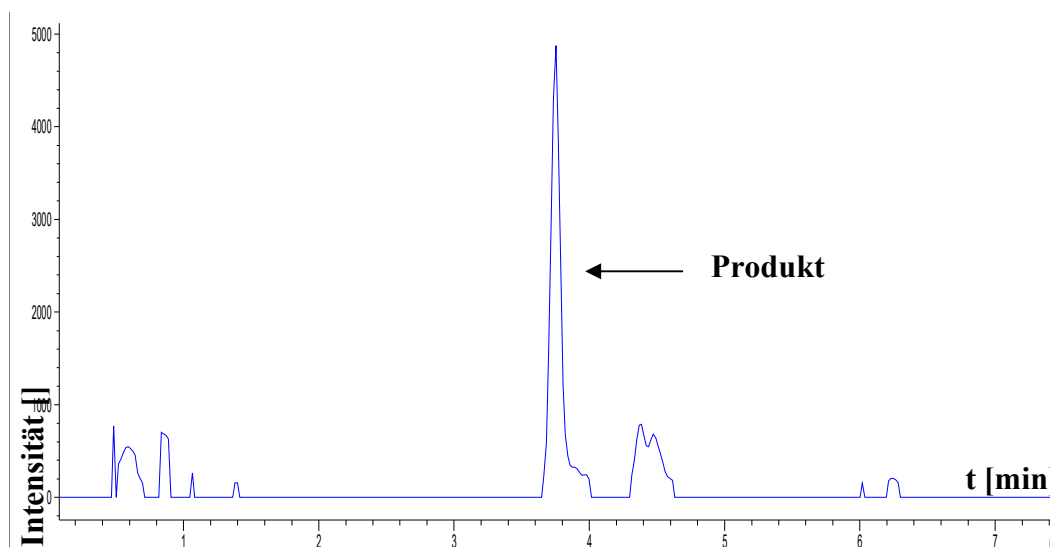


Abbildung 3.27: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a und 20 mM **6** mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.**

2a und SRB 2: vgl. Abbildung 3.23; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 217.1; putatives Produkt: $M = 218.1$ g/mol, m/z 217.1, $t = 3.8$ min, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.16

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die unterschiedlichen Retentionszeiten der Produkte mit den Donoren **2a** bzw. **2b** sprechen für die Bildung von Diastereomeren.

Bei der 1,2-Addition von **1** an **6** entsteht ein C10-Carboxylat mit einer innenliegenden δ -Hydroxy- γ -ketofunktion (Abbildung 3.2, Kapitel 3.2). Das Produkt der 1,2-Addition von **2** enthält zusätzlich eine α -Hydroxylgruppe (Abbildung 3.22). Die (*R*)-Konfiguration der δ -Hydroxylgruppe des Produktes wird hierbei von der 1,2-Addition von **1** an **5** abgeleitet, bei der das (*R*)-Enantiomer mit hohem Überschuss gebildet wird (Kurutsch *et al.*, 2009). Die (*RS*)-Konfiguration der α -Hydroxylgruppe wird dagegen vom umgesetzten **2a** bzw. **2b** abgeleitet.

Diese Produkte der 1,2-Addition können als Fettsäuren bzw. Hydroxyfettsäuren bezeichnet werden, die einen polaren Kopf mit der Carboxylgruppe und einer Hydroxyketofunktion enthalten. Das andere Ende bildet der unpolare, aliphatische gesättigte Rest der Kohlenstoffkette. Diese beiden Eigenschaften ermöglichen verschiedene potentielle Anwendungsfelder. Als Beispiel für eine mögliche

Anwendung soll das Feld der Tenside genannt werden, wo diese Produkte auf Grund ihrer bipolaren Funktion neue Möglichkeiten eröffnen könnten.

3.3.6 1,2-Addition mit der (*S*)-selektiven MenD_I474A_F475G

Die meisten ThDP-abhängigen Enzyme weisen ebenso wie MenD eine hohe Selektivität für das (*R*)-konfigurierte Produkt auf, wodurch der Zugang zu (*S*)-konfigurierten Produkten eingeschränkt ist (Wilcocks und Ward, 1992; Iding *et al.*, 2000; Kurutsch *et al.*, 2009). Wie von Kurutsch *et al.* (2009) beschrieben, ist MenD für die 1,2-Additionsreaktion von **1** an **5** spezifisch für die Bildung des (*R*)-konfigurierten Produktes mit ee > 99%. Westphal *et al.* (2013a) haben rational entworfene MenD-Varianten entwickelt, die ausgehend von 2-Ketoglutarat (**1**) und Benzaldehyd (**5**) (*S*)-konfigurierte 2-Hydroxyketone bilden. Durch Austausch der beiden Aminosäuren I474A und F475G wurde ein ee von ~75% für das (*S*)-Enantiomer erreicht (Westphal *et al.*, 2013a, b, 2014b).

In der vorliegenden Arbeit wurde die MenD-Variante MenD_I474A_F475G mit **1** und **5** für 24 h inkubiert und eine Abnahme des Akzeptorsubstrates **5** von 86% bestimmt (Nachweis mit Gaschromatographie; Schapfl *et al.*, 2018). Die Produktbildung wurde mittels LC-MS (M = 208.1, *m/z* = 207.0, RT = 3.7 min) bestätigt (Abbildung 3.28, Schapfl *et al.*, 2018).

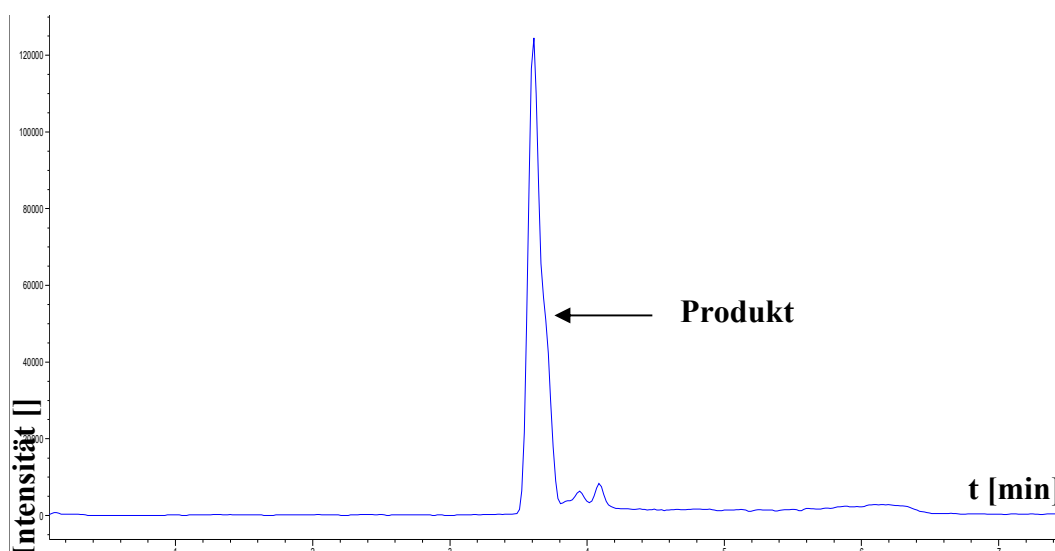


Abbildung 3.28: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **1 und 20 mM **5** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G bei 30 °C.**

SRB 2: vgl. Abbildung 3.23; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 207.1; putatives Produkt: $M = 208.1$ g/mol, m/z 207.0, RT = 3.7 min, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.17

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die erhaltene Abnahme des Akzeptorsubstrates **5** in der vorliegenden Arbeit lag deutlich höher als der von Westphal *et al.* (2013a) bestimmte Umsatz des **5** von 15%. Da die gleichen Reaktionssysteme (Substrat- und Enzymkonzentrationen, 5% (v/v) MTBE) eingesetzt wurden, sind die Unterschiede auf andere Einflüsse zurückzuführen. Prinzipiell denkbar ist, dass das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Enzym eine höhere Aktivität aufweist. Im Gegensatz zu Westphal *et al.* (2013a) wurde in der vorliegenden Arbeit kein gefriergetrocknetes, sondern frisch gereinigtes Enzym eingesetzt.

Sowohl der Umsatz der Substrate, als auch die Stereokonfiguration der Produkte hängt zu einem großen Teil von der Struktur der eingesetzten Substrate ab. Es können in der Folge die Ergebnisse, die für die 1,2-Addition von **1** an **5** erhalten wurden, nicht direkt auf die Ergebnisse für HOG (**2**) als Donorsubstrat übertragen werden. Gerade im Hinblick auf die Stereochemie kann die zusätzliche Hydroxylgruppe bei der Bindung der Substrate im aktiven Zentrum von MenD eine bedeutende Rolle spielen. Deshalb wurde **2a** bzw. **2b** als Donor für die 1,2-Additionsreaktion an **5** getestet.

Sowohl **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) als auch **2b** als Donorsubstrat für MenD_I474A_F475G führten zu einer weitgehend vollständigen Abnahme des

Akzeptorsubstrates **5** (**2a**: 94%, **2b**: 89%). Diese Werte sind vergleichbar mit denen dieser MenD-Variante für **1** als Donor (86%), liegen aber alle unterhalb der Werte des Wildtyp-Enzymes (MenD). Für MenD_WT war die Abnahme des Akzeptorsubstrates **5** für **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **2b** als Donor jeweils > 99% (Kapitel 3.3.5). Der Nachweis der Bildung der Produkte mittels LC-MS ($M = 224.0$ g/mol, m/z 223.0, RT = 2.4 min und RT = 3.4 min) war für **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **2b** als Substrate erfolgreich (Abbildung 3.29, Schapfl *et al.*, 2018 bzw. Anhang Abbildung 7.12).

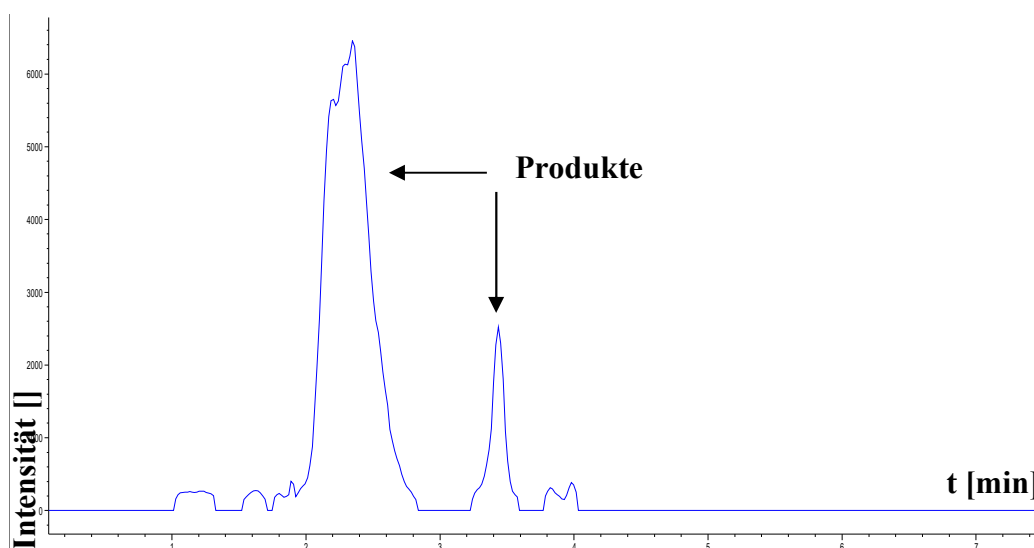


Abbildung 3.29: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.

2a und SRB 2: vgl. Abbildung 3.23; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 223.0; putatives Produkt: $M = 224.0$ g/mol, m/z 223.0, RT = 2.4 min und RT = 3.4 min, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.18 (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die Fragmentierungsmuster und Retentionszeiten waren hierbei vergleichbar mit denen der mit MenD_WT katalysierten Reaktionen. Aus den HPLC- und den LC-MS-Messdaten lassen sich keine Rückschlüsse auf die stereochemische Konfiguration der Produkte der MenD-katalysierten Reaktion ziehen. Da auch mit den durchgeführten $^1\text{H-NMR}$ -Messungen die Stereochemie der Produkte nicht aufgeklärt werden konnte, soll die Stereochemie in Analogie zu der bereits aufgeklärten 1,2-Addition von **1** an **5** erläutert werden.

Bei Einsatz der (*S*)-selektiven Variante MenD_I474A_F475G werden bei der 1,2-Addition von **1** an **5** beide Enantiomere (*5R* und *5S*) gebildet (Westphal *et al.*,

2013a). Es lässt sich annehmen, dass bei **2a** bzw. **2b** als Donor ebenfalls Produkte mit beiden Konfigurationen (*5R* und *5S*) gebildet werden (Abbildung 3.30). Eine Abschätzung bezüglich des Verhältnisses der Produkte ist an Hand der vorliegenden Messdaten nicht möglich.

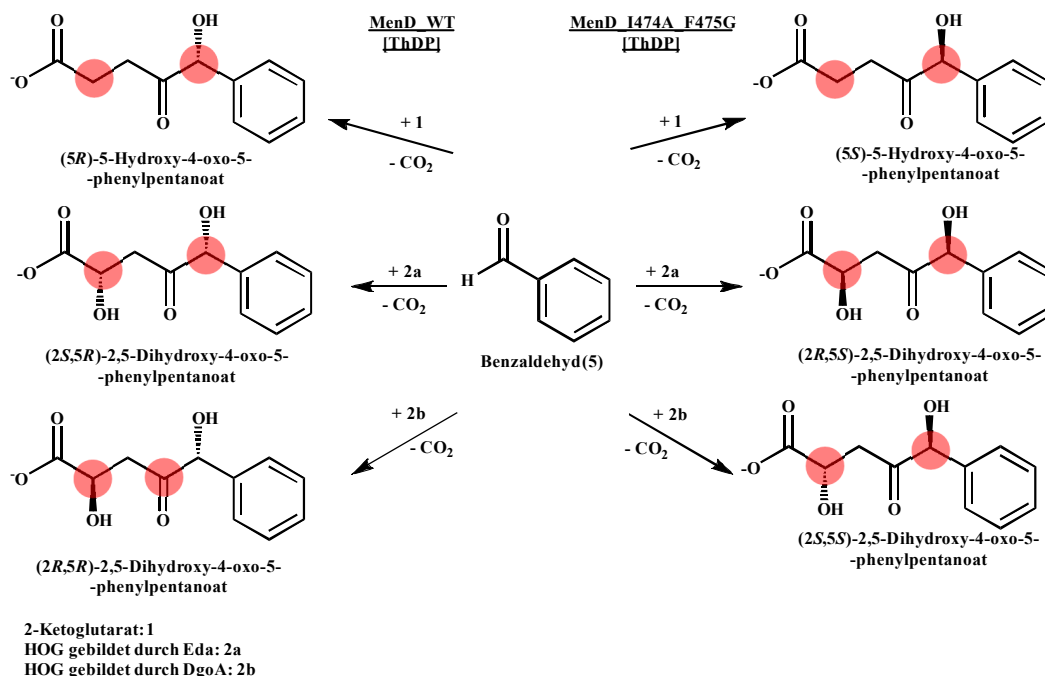


Abbildung 3.30: Postulierte Produkte der 1,2-Addition von 1, 2a bzw. 2b an 5 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.
(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Für die Konfiguration am Kohlenstoffatom mit der vom **2** stammenden Hydroxylgruppe, d.h. der Malyseitenkette, gelten die für das MenD_WT angenommenen Überlegungen. Die Stereokonfiguration des zur Carboxylfunktion benachbarten Kohlenstoffatoms ist abhängig vom eingesetzten **2** (vgl. Abbildung 3.30). Ausgehend von den Ergebnissen der CD-Messungen (Kapitel 3.3.1) kann angenommen werden, dass bei Einsatz von **2a** ein Überschuss des (*S*)-**2** vorliegt. Im Fall von **2b** sollte dementsprechend ein Überschuss des (*R*)-**2** vorliegen. Dementsprechend wird angenommen, dass bei der MenD-Reaktion vermehrt das im Überschuss vorliegende Enantiomer des **2** an **5** addiert wurde. Unter dieser Annahme wurde bei der 1,2-Addition des **2a** ein Überschuss des (*2S*)-konfigurierten Produktes erhalten (vgl. Abbildung 3.30). Vorausgesetzt, dass MenD_WT auch bei der 1,2-Addition von **2** das (*5R*)-konfigurierte Produkt im Überschuss bildet, kann von der in Abbildung 3.30 gezeigten Struktur des Produktes ausgegangen werden. Für **2b** würde entsprechend das (*2R*)-konfigurierte

Produkt im Überschuss und in Kombination mit dem Einsatz von MenD_WT überwiegend das (2*R*,5*R*)-konfigurierte Produkt gebildet werden (Abbildung 3.30). Hieraus lässt sich schließen, dass bei diesen beiden Reaktionen vermutlich Diastereomere gebildet wurden, die überwiegend (5*R*)-konfiguriert sind, sich jedoch in der Konfiguration am C2 unterscheiden. Zu berücksichtigen ist hierbei die Möglichkeit, dass MenD_WT eines der beiden Enantiomeren bevorzugt und dementsprechend eine andere Konfiguration an den asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatomen der Produkte vorliegt (Abbildung 3.30).

Die 1,2-Additionsreaktion an Hexanal (**6**) als Akzeptor wurde bisher nur für MenD_WT beschrieben. Deshalb sollte untersucht werden, ob die (*S*)-selektive MenD-Variante MenD_I474A_F475G neben der 1,2-Addition an den aromatischen Akzeptor **5** auch die 1,2-Additionsreaktion an aliphatische Akzeptoren wie **6** katalysiert. Es zeigte sich, dass auch die MenD-Variante MenD_I474A_F475G **6** für die 1,2-Addition mit **1** akzeptiert (Abnahme von **6**: 91%, Schapfl *et al.*, 2018). Die Produktbildung ($M = 202.1$ g/mol, m/z 201.1, $RT = 4.0$ min) wurde mittels LC-MS nachgewiesen (Abbildung 3.31, Schapfl *et al.*, 2018).

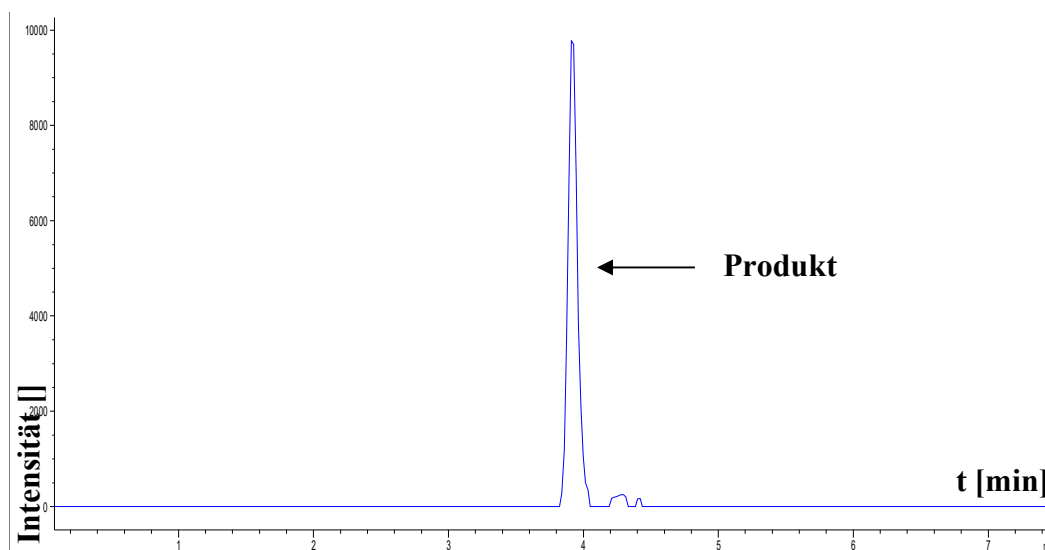


Abbildung 3.31: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **1 und 20 mM **6** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G.**

SRB 2: vgl. Abbildung 3.23; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 201.1; putatives Produkt: $M = 202.1$ g/mol, m/z 201.1, $RT = 4.0$, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.19

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Für die 1,2-Addition von **1** an **6** mit MenD_I474A_F475G war die Abnahme des Akzeptorsubstrates **6** mit 91% in etwa so hoch wie die mit MenD_WT erzielte Substratabnahme von 95% (Schapfl *et al.*, 2018). Die Produkte der Enzyme MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G sollten sich in der Konfiguration der Hydroxylgruppe am C5 unterscheiden.

Mit **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) als Donor war die Abnahme des Akzeptorsubstrates **6** durch MenD_I474A_F475G mit 63% höher als für **2b** als Donorsubstrat (40%). Diese Umsätze liegen niedriger als die für MenD_WT (vgl. Kapitel 3.3.5). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für **5** als Akzeptor führte die durch MenD_I474A_F475G katalysierte 1,2-Addition mit **2a** als Donor zu einer höheren Abnahme des Akzeptorsubstrates als mit **2b** als Donor. Für beide Enzyme ist **1** der effektivere Donor. Bei der LC-MS-Analyse wurde für das Produkt ($M = 218.1$ g/mol, m/z 217.1) der 1,2-Addition von **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. **2b** an **6** katalysiert durch MenD_I474A_F475G jeweils eine Retentionszeit von 0.6 min bestimmt (Abbildung 3.32, Schapfl *et al.*, 2018 und Anhang Abbildung 7.13).

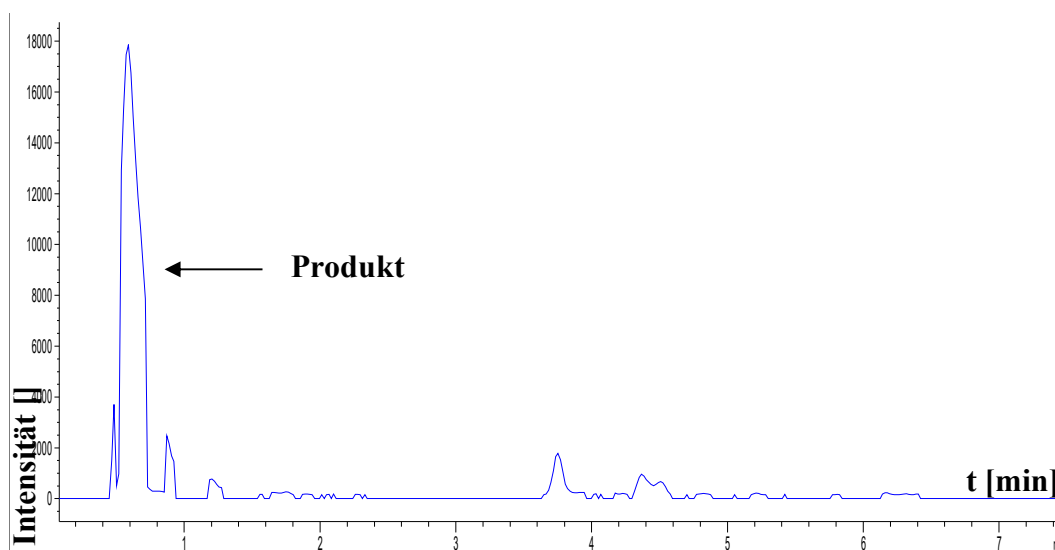


Abbildung 3.32: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a und 20 mM **6** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.**

2a und SRB 2: vgl. Abbildung 3.23; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 217.0; putatives Produkt: $M = 218.1$ g/mol, m/z 217.1, RT = 0.6 min, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.20

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die 1,2-Addition von **2a** bzw. **2b** an **6** führt in der Theorie zu vier möglichen aliphatischen Diastereomeren (Abbildung 3.33).

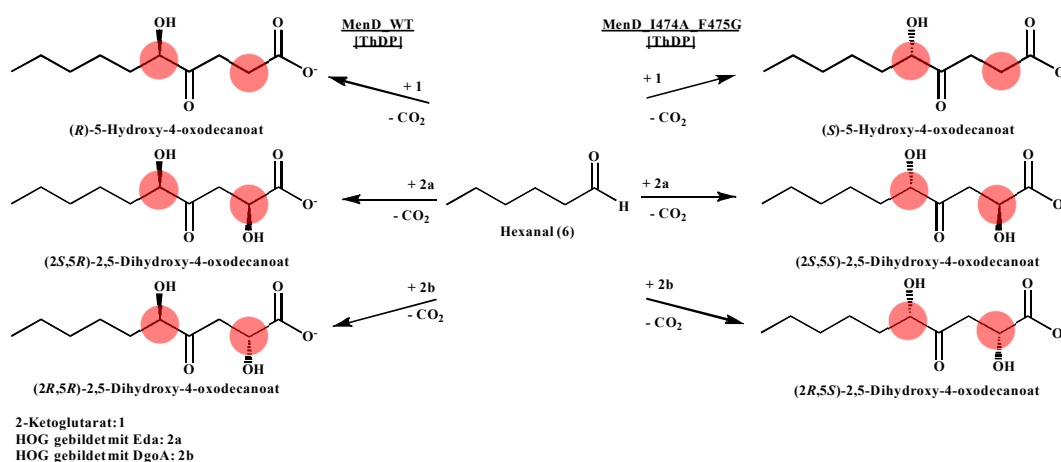


Abbildung 3.33: Postulierte Produkte der 1,2-Addition von **2a bzw. **2b** an **6** katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.**
 (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Für die Stereokonfiguration der Produkte der 1,2-Additionsreaktionen von **1** bzw. **2a** bzw. **2b** gelten die oben angestellten Überlegungen für **5** als Akzeptorsubstrat und es werden in Abbildung 3.33 dargestellte Strukturen postuliert.

3.3.7 1,4-Addition mit der (*S*)-selektiven MenD_I474A_F475G

(*S*)-Selektive MenD-Varianten wurden bisher nur für die 1,2-Additionsreaktion mit Benzaldehyd (**5**) (Westphal *et al.*, 2013a, b, 2014a, b, Kapitel 3.3.6) bzw. Hexanal (**6**) (Kapitel 3.3.6) als Akzeptor eingesetzt. Zum Nachweis einer möglichen 1,4-Additionsreaktion wurde die MenD-Variante MenD_I474A_F475G zusammen mit Isochorismat als Akzeptor (*in situ* gebildet aus Chorismat durch EntC) und den drei Donorsubstraten 2-Ketoglutarat (**1**), HOG (**2a** bzw. **2b**) inkubiert.

Zuerst wurde mit dieser MenD-Variante die physiologische Reaktion, die 1,4-Addition von **1** an Isochorismat, untersucht (Inkubation von 1 mM Chorismat und 5 mM **1**, **2a** bzw. **2b** mit 0.2 mg/mL EntC und 0.7 mg/mL MenD, Kapitel 2.8.2). Nach 24 h Inkubation der Substrate mit MenD_I474A_F475G wurde mittels HPLC Produktbildung nachgewiesen. Für **1** als Donor wies das UV-Spektrum des Produktes (RT = 8.3 min, Area = 10 mAU*min) im Gegensatz zu durch MenD_WT gebildetem SHCHC ein zusätzliches UV-Maximum bei 220 nm auf. Mit

MenD_I474A_F475G wurde auch für **2a** (Produkt: RT = 7.5 min, Area = 17.0 mAU*min) bzw. **2b** (Produkt: RT = 7.5 min, Area = 14.0 mAU*min) Produktbildung gezeigt. Beide Produkte zeigten kein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 220 nm. Dieses Ergebnis zeigt, dass diese (*S*)-selektive MenD-Variante auch die 1,4-Addition katalysiert. Dieses Ergebnis bedeutet aber nicht zwingend, dass die neue C-C-Bindung auch überwiegend (*S*)-konfiguriert ist. Für die 1,4-Addition an Isochorismat lässt sich die Stereokonfiguration nicht von der 1,2-Addition an **5** ableiten, da die Produkte der 1,4-Addition an Isochorismat zur Isomerisierung neigen, was in der Folge zu einer veränderten Stereokonfiguration der einzelnen Atome führt (Jiang *et al.*, 2007a, b und Fries, 2015).

Für das in der vorliegenden Arbeit als Standardsubstrat eingesetzte 2,3-CHD (**3**) wurde mit allen drei Donoren **1**, **2a** bzw. **2b** und der MenD-Variante MenD_I474A_F475G weder eine Abnahme von **3** noch eine Produktbildung detektiert (**1** + **2a**: Schapfl *et al.*, 2018). Bei den gleichzeitig angesetzten Kontrollreaktionen mit **1**, **2a** bzw. **2b** und **3** und MenD_WT waren die Umsätze vergleichbar mit den Ergebnissen in den Kapiteln 3.2 und 3.3.3. Somit wurde sichergestellt, dass der Assay richtig angesetzt und die nicht-nachweisbare Aktivität der MenD-Variante MenD_I474A_F475G nicht auf einen systematischen Fehler zurückzuführen war. Ebenfalls ist es denkbar, dass es bei diesen Reaktionen zu sterischen Hinderungen im aktiven Zentrum kommt, die die Geschwindigkeit der Reaktion stark verlangsamen bzw. möglicherweise die Reaktion verhindern.

Für die 1,4-Additionsreaktion von **1** an den aliphatischen Akzeptor Acrylsäure (**4**) mit MenD_I474A_F475G wurde ebenso wie für MenD_WT eine Abnahme des Akzeptorsubstrates **4** >99% bestimmt (Schapfl *et al.*, 2018, Kapitel 3.2). Der Nachweis der Produktbildung (M = 174.1 g/mol, *m/z* 173.0, RT = 0.6 min; Abbildung 3.34, Schapfl *et al.*, 2018) mittels LC-MS war positiv.

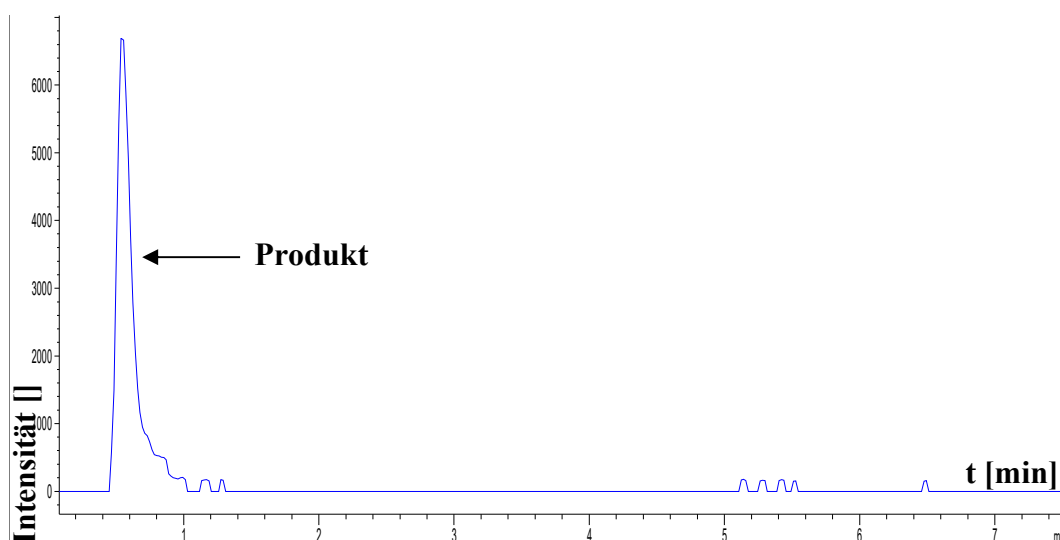


Abbildung 3.34: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **1 und 20 mM **4** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G.**

SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 173.0; putatives Produkt: $M = 174.1$ g/mol, m/z 173.0, RT = 0.6 min, MS-Spektrum: Anhang Abbildung 7.21

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Der weitgehend vollständige Umsatz für beide Enzyme könnte möglicherweise auf die aliphatische Struktur dieser beiden Akzeptoren zurückzuführen sein. Beim Einsatz von **2** als Substrat wurde zwischen **2a** (Abnahme von **4**: 76%, Schapfl *et al.*, 2018) und **2b** (Abnahme von **4**: 76%) kein signifikanter Unterschied bestimmt, womit der Einfluss der Hydroxylgruppe auf die Stereochemie bei dieser Reaktion nicht so entscheidend ist. Beide Werte liegen unterhalb von MenD_WT (> 99%, Schapfl *et al.*, 2018), was darauf hindeutet, dass das Vorhandensein der Hydroxylgruppe den Umsatz durch MenD_I474A_F475G verringert. Sowohl für **2a** (Abbildung 3.35, Schapfl *et al.*, 2018) als auch für **2b** (Anhang Abbildung 7.11) als Donorsubstrat für die 1,4-Addition an **4** wurde die Produktbildung mittels LC-MS bestätigt ($M = 190.1$, m/z 189.0, jeweils RT = 2.2 min).

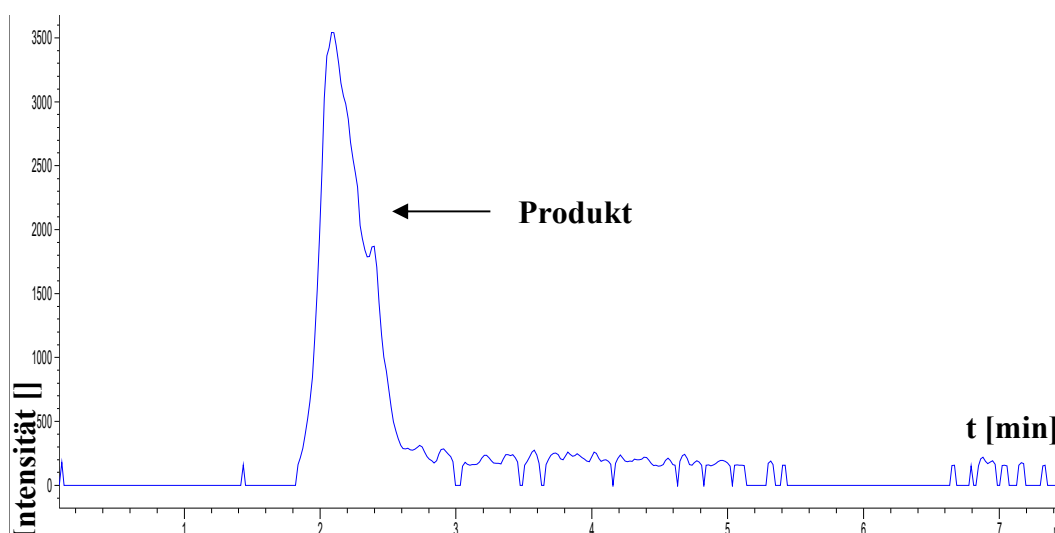


Abbildung 3.35: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2a und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.

2a und SRB 1: vgl. Abbildung 3.7; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 189.0; putatives Produkt: $M = 190.1$ g/mol, m/z 189.0, RT = 2.2 min, MS-Spektrum: Anhang: Abbildung 7.22

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Eine Betrachtung der räumlichen Struktur des Produktes der 1,4-Addition von **1** an **4** zeigt, dass bei Einsatz der (*S*)-selektiven Variante MenD_I474A_F475G die Stereokonfiguration keinen Einfluss auf die Struktur des Produktes hat (Abbildung 3.36). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der 1,4-Addition an **4** als Akzeptorsubstrat im Gegensatz zur 1,2-Addition an **5** bzw. **6** kein neues Chiralitätszentrum gebildet wird. Somit entstehen keine Chiralitätszentren und auch keine Enantiomeren bei dieser Reaktion. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die gleich hohen Umsätze mit MenD_WT und MenD_I474A_F475G sein. Dagegen entsteht bei Einsatz von **2** als Donorsubstrat für die 1,4-Additionsreaktion an **4** ein Produkt mit einem Chiralitätszentrum, dessen Konfiguration von der Konfiguration des Donorsubstrates **2** abhängt (Abbildung 3.37).

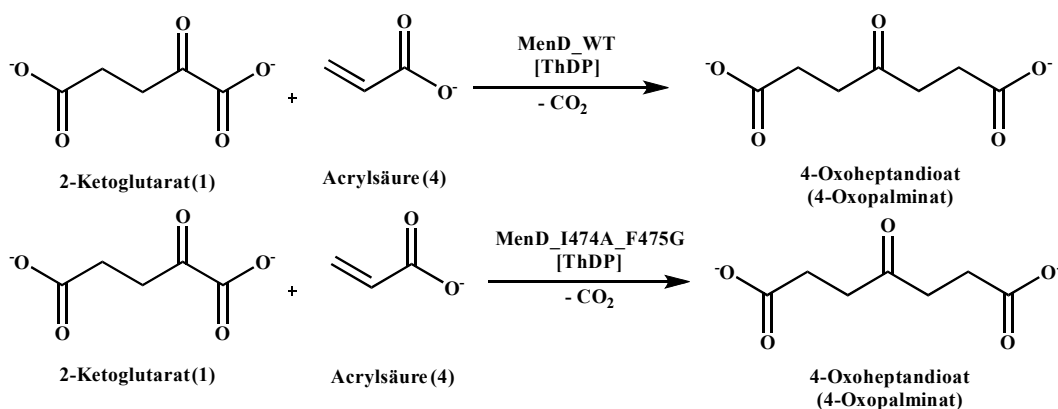


Abbildung 3.36: Postulierte Produkte der 1,4-Addition von 1 an 4 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.
(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

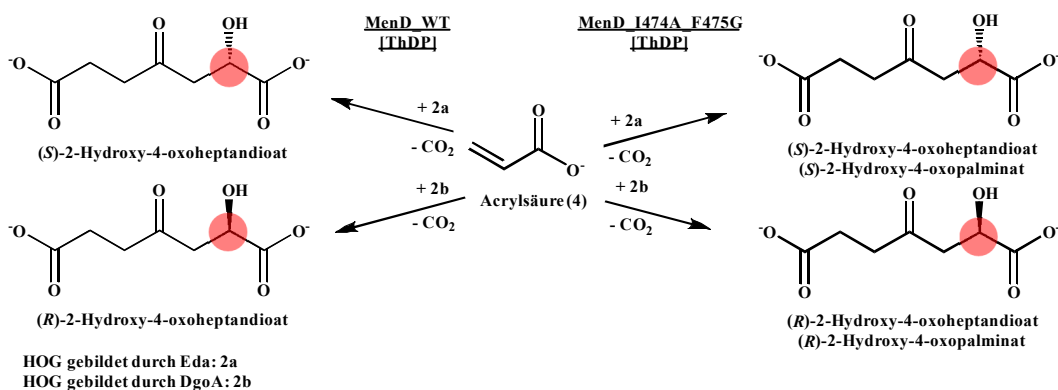


Abbildung 3.37: Postulierte Produkte der 1,4-Addition von 2a bzw. 2b an 4 katalysiert durch MenD_WT bzw. MenD_I474A_F475G.
(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Die Ergebnisse der von MenD_I474A_F475G katalysierten 1,2-Addition von 1 an 5 konnten auf 6 als Akzeptor und die Donoren 2a und 2b übertragen werden. Erstmals wurde für die 1,4-Addition mit dieser MenD-Variante Produktbildung gezeigt. Die Stereoselektivität wurde nicht aufgeklärt. MenD_I474A_F475G katalysiert die 1,4-Addition von 1, 2a und 2b an Isochorismat und an 4. Dagegen konnte für 3 als Akzeptorsubstrat keine Produktbildung nachgewiesen werden.

Durch die Einführung (S)-konfigurierter Produkte der MenD-katalysierten Reaktionen wird das Produktspektrum von MenD deutlich erweitert und theoretisch der Zugang zu verschiedenen Produkten mit neuer Stereokonfiguration ermöglicht.

3.4 Untersuchung des Substratspektrums von MenD

3.4.1 Untersuchung des Akzeptorspektrums von MenD

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit bestand darin, mit MenD hochfunktionalisierte Produkte zu generieren, die als Vorstufen für weitere Folgereaktionen dienen können. Gerade im Hinblick auf HOG (**2**) als einen hochfunktionalisierten Donor ist somit eine weitere Funktionalisierung des Akzeptorsubstrates für die MenD-Reaktionen wünschenswert. Im Folgenden sollen neuartige, bisher nicht beschriebene Akzeptoren untersucht werden (Abbildung 3.38).

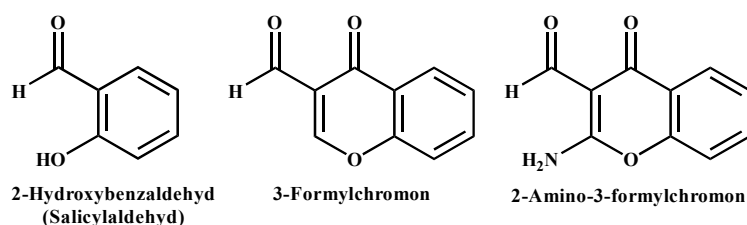
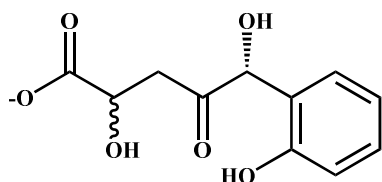


Abbildung 3.38: Putative Akzeptorsubstrate für MenD.

Die Bestimmung des Umsatzes dieser Reaktionen erfolgte jeweils an Hand der Abnahme des Akzeptorsubstrates mittels RP-HPLC-DAD. Die Verifizierung der Produktbildung erfolgte mittels RP-LC-MS, wobei die Zuordnung der Signale an Hand des UV-Spektrums erfolgte.

Als ein beispielhaftes Akzeptorsubstrat soll Salicylaldehyd als hydroxyliertes Benzaldehydderivat dienen. Für die 1,2-Additionsreaktion von 2-Ketoglutarat (**1**) an Salicylaldehyd wurde eine Abnahme des Akzeptorsubstrates Salicylaldehyd bei 254 nm von 48% bestimmt. Für die 1,2-Additionsreaktion von **2a** an Salicylaldehyd wurde ebenfalls die Bildung eines Produktes gezeigt, wobei die Abnahme des Akzeptorsubstrates mit 17% deutlich niedriger lag als für **1** als Donorsubstrat. Für die Reaktion von **2b** lag die Abnahme des Akzeptorsubstrates Salicylaldehyd unter der Nachweisgrenze. Für die putativen Produkte mit den Donoren **1** bzw. **2a** wurde eine Verschiebung der UV-Absorption beobachtet. Der Produktnachweis mit LC-MS war positiv (Tabelle 3.3). Das erwartete Produkt für die 1,2-Addition von **2a** bzw. **2b** an Salicylaldehyd ist in Abbildung 3.39 dargestellt.



(5*R*)-2,5-Dihydroxy-5-(2-hydroxyphenyl)-4-oxopentanoat

Abbildung 3.39: Postuliertes Produkt der 1,2-Addition von **2a** bzw. **2b** an Salicylaldehyd katalysiert durch MenD.

Tabelle 3.3: Produkte der MenD-katalysierten Addition von **1** bzw. **2a** bzw. **2b** an Salicylaldehyd nach 24 h.

Akzeptorsubstrat	Donor-substrat	RT (Produkt) [min]	UV-Maxima (Produkt) [nm]	RT (Produkt) LC-MS [min]	<i>m/z</i> (Produkt)
Salicylaldehyd	-	12.5	219, 256 und 326	-	-
Salicylaldehyd	1	10.0	207, 218 und 279	3.4 und 3.8	M = 224.2 g/mol, <i>m/z</i> 223.0
Salicylaldehyd	2a	10.1	201 und 279	1.4	M = 240.2 g/mol, <i>m/z</i> 239.0
Salicylaldehyd	2b	-	-	-	-

Inkubation von 50 mM Donorsubstrat und 20 mM Akzeptorsubstrat mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h
2a, 2b: gebildet aus 50 mM **7** und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda (**2a**) bzw. DgoA (**2b**)
 SRB 2: vgl. Tabelle 3.2

Salicylaldehyd weist im Gegensatz zu den bisher untersuchten Benzaldehydderivaten eine Hydroxylgruppe am C2 auf. Die Abnahme des Akzeptorsubstrates Salicylaldehyd lag deutlich unter der Abnahme des Akzeptorsubstrates Benzaldehyd (**5**) für die 1,2-Addition von **1** (Abnahme des **5** > 99%, Kapitel 3.2; Kurutsch *et al.*, 2009). Beim Vergleich mit den Umsätzen für 2,3-Dihydroxybenzaldehyd (45% Umsatz) und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (53% Umsatz) (jeweils Kurutsch *et al.*, 2009) zeigt sich, dass die Verschiebung der Hydroxylgruppe vom C4-Kohlenstoff des Benzylringes zum C2-Kohlenstoff zu einer Verringerung des Umsatzes bei der 1,2-Addition von **1** führt. Dies entspricht den Werten der monohydroxylierten Benzaldehydderivaten, wo die 1,2-Addition an 4-Hydroxybenzaldehyd (66%, Kurutsch *et al.*, 2009) zu einem höheren Umsatz führte als an 2-Hydroxybenzaldehyd (Salicylaldehyd). Im Fall von Salicylaldehyd und **2b** als Substrat konnte keine Produktbildung gezeigt werden. In diesem Fall zeigte somit womöglich die räumliche Ausrichtung der Hydroxylgruppe des **2** einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion.

Der in der vorliegenden Arbeit neu eingeführte Akzeptor 3-Formylchromon unterscheidet sich von den bisher bekannten Akzeptoren dadurch, dass er nicht aus einem Ring besteht, sondern eine bicyclische Struktur aufweist (Abbildung 3.38). Gerade im Hinblick hierauf bietet 3-Formylchromon als Akzeptorsubstrat interessante Perspektiven, da viele Naturstoffe und Wirkstoffe für die pharmazeutische Anwendung zwei und mehr miteinander verbundene Ringsysteme aufweisen.

Für die Addition von **1**, **2a** bzw. **2b** an 3-Formylchromon wurde jeweils bei 290 nm eine Abnahme des 3-Formylchromones bestimmt und die Bildung von Produkten mit Hilfe von LC-MS gezeigt (Tabelle 3.4). Die Abnahme des Akzeptors war für **2a** bzw. **2b** jeweils höher als für **1**.

Tabelle 3.4: Produkte der MenD-katalysierten Addition von 1 bzw. 2a bzw. 2b an 3-Formylchromon nach 24 h.

Akzeptor-substrat	Donor-substrat	Abnahme Akzeptor bei 290 nm [%]	RT (Produkt) HPLC [min]	RT (Produkt) LC-MS [min]	<i>m/z</i> (Produkt)
3-Formylchromon	1	65	10.6	3.7 und 3.9	M = 276.2 g/mol, <i>m/z</i> 275.0,
3-Formylchromon	2a	91	10.5	3.5	M = 292.0 g/mol, <i>m/z</i> 291.0
3-Formylchromon	2b	82	10.5	3.5	M = 292.0 g/mol, <i>m/z</i> 291.0

Inkubation von 50 mM Donorsubstrat und 20 mM Akzeptorsubstrat mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h **2a**, **2b**: gebildet aus 50 mM **7** und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda (**2a**) bzw. DgoA (**2b**)

3-Formylchromon wurde in 100% Dimethylformamid (DMF) (v/v) gelöst, ergibt im Assay 10% (v/v) DMF

SRB 1: vgl. Tabelle 3.2

Die Veränderungen im UV-Spektrum waren für die Reaktionen mit allen drei Donoren gering. Auch konnte 2-Amino-3-formylchromon als Akzeptorsubstrat eingeführt werden, ein Analogon des 3-Formylchromones, das eine zusätzliche Aminogruppe aufweist. Für die Addition von **1** und **2a** an 2-Amino-3-formylchromon wurde jeweils bei 290 nm eine Abnahme von 2-Amino-3-formylchromon bestimmt. Für **1** als Donor wurde die Produktbildung mit Hilfe von LC-MS nachgewiesen, für **2a** war sie negativ (Tabelle 3.5). Für die Reaktion mit **2b** als Donor wurde weder eine Abnahme des Akzeptorsubstrates noch Produktbildung beobachtet.

Tabelle 3.5: Produkte der MenD-katalysierten Addition von 1 bzw. 2a bzw. 2b an 2-Amino-3-formylchromon nach 24 h.

Akzeptor-substrat	Donor-substrat	Abnahme Akzeptor bei 290 nm [%]	RT (Produkt) HPLC [min]	RT (Produkt) LC-MS [min]	m/z (Produkt)
2-Amino-3-formylchromon	1	32	6.4	0.6	M = 291.3 g/mol; m/z 290
2-Amino-3-formylchromon	2a	26	6.4	-	M = 307 g/mol; m/z 306
2-Amino-3-formylchromon	2b	-	-	-	M = 307 g/mol; m/z 306

Inkubation von 50 mM Donorsubstrat und 20 mM Akzeptorsubstrat mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h
2a, 2b: gebildet aus 50 mM **7** und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda (**2a**) bzw. DgoA (**2b**)
 2-Amino-3-Formylchromon wurde in 100% Dimethylformamid (DMF) (v/v) gelöst, ergibt im Assay 10% (v/v) DMF
 SRB 1: vgl. Tabelle 3.2

Da der Produktnachweis mit **2a** als Donor mittels LC-MS nicht erfolgreich war, sind keine Rückschlüsse auf die Produktstruktur möglich. Da bei den Kontrollen mit den Substraten und ohne MenD keine Entstehung neuer Signale beobachtet wurde, lässt sich davon ausgehen, dass das Produkt auf eine MenD-katalysierte Reaktion zurückzuführen ist. Das UV-Spektrum des putativen Produktpeaks ist vergleichbar mit dem entsprechenden Signal vom Umsatz von **1** und 2-Amino-3-formylchromon. Möglicherweise ist der nicht-erfolgreiche Nachweis der Produktbildung mittels LC-MS darauf zurückzuführen, dass es durch die zusätzliche Aminogruppe bei der Ionisierung im Massenspektrometer zu weiteren Fragmentierungen gekommen ist, die den Nachweis des Produktes erschweren. Die zusätzliche Aminogruppe am Produkt der MenD-katalysierten Reaktionen ermöglicht weitere Folgereaktionen. Zu beachten ist bei beiden Akzeptorsubstraten (3-Formylchromon und 2-Amino-3-formylchromon), dass die Struktur der Produkte nicht mittels NMR bestimmt wurde und somit keine Aussagen über den Reaktionstyp (1,2- oder 1,4-Addition) gemacht werden können. Ein interessanter weiterer Ansatz ist, ausgehend von den Produkten der Additionsreaktionen an 3-Formylchromon, in weitergehenden Reaktionen Produkte zu gewinnen, die fluoreszierende Eigenschaften haben.

3.4.2 Untersuchung des Donorspektrums von MenD

Neben 2-Ketoglutarat (**1**) wurden bisher Oxalacetat und Pyruvat (**7**) als Donorsubstrate für MenD beschrieben (Kurutsch *et al.*, 2009). Daneben wurde von Shiromi Baier die 1,4-Addition weiterer Monocarbonsäuren als Donorsubstrate an Isochorismat gezeigt (persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit wurden Monocarbonsäuren als Donorsubstrate untersucht, die jeweils eine zur Carboxylgruppe benachbarte Ketogruppe und eine aliphatische Kette aufweisen (Abbildung 3.40). Darüber hinaus wurde auch die Dicarbonsäure Oxalacetat und die Monocarbonsäure Glyoxylat (**8**) als Donor getestet.

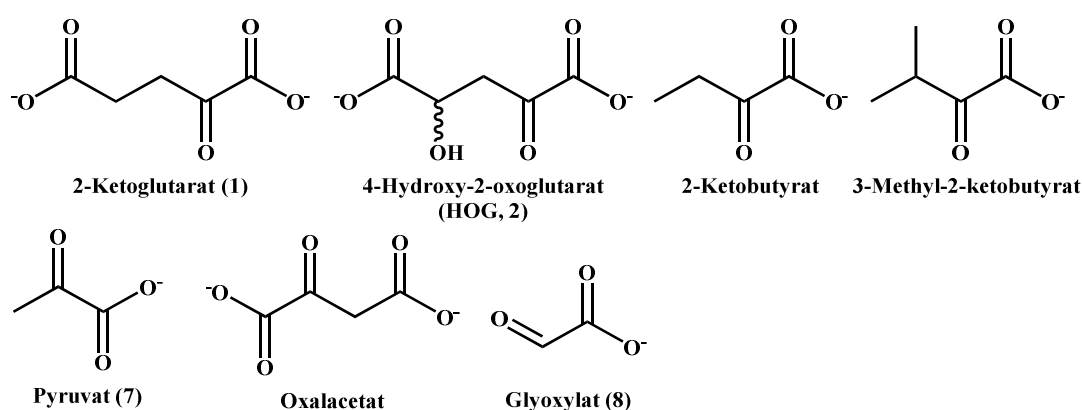


Abbildung 3.40: Potentielle Donoren für MenD-katalysierte 1,2- und 1,4-Additionsreaktionen.

1,4-Addition von 2-Ketosäuren an Isochorismat

Shiromi Baier zeigte, dass die Inkubation der Enzyme EntC und MenD mit den Substraten Chorismat und den Ketosäuren **7**, 2-Ketobutyrat, 3-Methyl-2-ketobutyrat und HOG (**2a**) zur Bildung neuer Produkte führt (persönliche Mitteilung).

In Tabelle 3.6 sind die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Umsätze (an Hand der Peakfläche der Produkte) dargestellt. Die Produktbildung wurde analog zur 1,4-Addition von **1** an Isochorismat bei 290 nm quantifiziert.

Tabelle 3.6: Umsätze von 2-Ketosäuren mit Isochorismat durch MenD nach 24 h.

(Nachweis der Produktbildung mittels HPLC-DAD)

Akzeptor	Donor	Retentionszeit (Produkt) [min]	Peakfläche (Produkt) [mAU*min]
Isochorismat	1	8.3	49
Isochorismat	2a	7.6	53
Isochorismat	2b	7.6	52
Isochorismat	2-Ketobutyrat	9.3	9
Isochorismat	3-Methyl-2-ketobutyrat	7.6	6
Isochorismat	7	7.0	6
Isochorismat	Oxalacetat	7.0	5
Isochorismat	8	8.5	5

Inkubation von 5 mM Donorsubstrat mit 1 mM Chorismat, 0.2 mg/mL EntC und 1 mg/mL MenD für 24 h

2a, 2b: gebildet aus 5 mM **7** und 10 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda (**2a**) bzw. DgoA (**2b**)

SRB 4: $v = 1.0$ mL, 50 mM Tris-HCl-Puffer + 1 mM ThDP + 10 mM MgCl₂, pH 8.0, 30 °C, 750 rpm

Es wurde für alle untersuchten Donorsubstrate Produktbildung gezeigt und die Produkte zeigten vergleichbare UV-Spektren zu SHCHC (Daten nicht dargestellt). Dies entspricht den Ergebnissen von Shiromi Baier (persönliche Mitteilung), die für die 1,4-Additionsreaktion von **7**, **1**, 3-Methyl-2-ketobutyrat und **2a** an Isochorismat Produktbildung zeigte. Die Peakflächen für MHCHC (mit **2a** als Donor), MHCHC (mit **2b** als Donor) und SHCHC sind vergleichbar (Tabelle 3.6). Die Produktflächen für die anderen Produkte waren jeweils um ca. den Faktor 10 kleiner.

Sowohl für **2a** als auch für **2b** als Donorsubstrate wurde die Bildung eines Produktes (MHCHC) gezeigt. Die UV-Maxima sind mit denen von SHCHC vergleichbar. Diese weisen im Vergleich zu Isochorismat ein zusätzliches Absorptionsmaximum auf. Der Grund hierfür ist, dass nach Abspaltung des Enolpyruvatrestes eine zusätzliche Doppelbindung im Ring entsteht und sich ein konjugiertes Elektronensystem bildet.

Dies ist der erstmalige Nachweis der Produktbildung aus **2b** und Isochorismat. Die Produkte (MHCHC: RT = 7.6 min) der 1,4-Addition von **2a** bzw. **2b** an Isochorismat zeigen die gleiche Retentionszeit, auf Grund dessen sie sich nicht unterscheiden lassen. Beide Substanzen lassen sich jedoch vom Produkt der 1,4-Addition von **1** an Isochorismat unterscheiden, das eine Retentionszeit von RT = 8.3 min (SHCHC) aufweist, was einen Nachweis mittels HPLC-DAD ermöglicht.

Die Fläche des gebildeten Produktes war für **2a** bzw. **2b** als Donor vergleichbar (Tabelle 3.6). Somit kann für diese Reaktion kein Einfluss der räumlichen Ausrichtung der Hydroxylgruppe des **2** auf die Reaktion gezeigt werden. Hinausgehend über Shiromi Baier wurde für **2a** als Donor die Bildung von MHCHC (RT = 1.4 min) an Hand des m/z 255.0 gezeigt (erwartetes Produkt nach Abspaltung des Enolpyruvatrestes (m/z 87.1)).

Erstmals wurde für **2a** als Donor die Bildung von MEPHCHC (RT = 8.0 min, M = 344.3 g/mol, m/z 343.0) durch LC-MS-Analyse gezeigt, wobei dieses Produkt eine sehr geringe UV-Absorption zeigte. Die Produkte vor Abspaltung des Enolpyruvatrestes wiesen verschiedene Retentionszeiten auf (MEPHCHC mit **2a** als Donor: RT = 8.0 min bzw. MEPHCHC mit **2b** als Donor: RT = 2.0 min). Bei beiden Produkten handelt es sich um Diastereomere mit fünf Chiralitätszentren, die sich, nach der von SEPHCHC abgeleiteten Struktur, in der Konfiguration der Hydroxylgruppe am Malylrest unterscheiden. Somit kann das veränderte Elutionsverhalten beider Produkte möglicherweise auf die Ausrichtung der Hydroxylgruppe zurückgeführt werden.

Eine Unterscheidung von MEPHCHC und Iso-MEPHCHC mittels LC-MS war nicht möglich. Fries (2015) zeigte mit LC-MS/MS und NMR-Analytik, dass SEPHCHC zu Iso-SEPHCHC isomerisieren kann. Er folgert, dass die Isomerisierung von SEPHCHC zu Iso-SEPHCHC säure- oder basenkatalysiert abläuft, was erklären könnte, dass diese Isomerisierung in den vorhergehenden Arbeiten nicht beobachtet wurde.

1,4-Addition von 2-Ketosäuren an 2,3-CHD und Acrylsäure

Im nächsten Schritt wurde die Eignung der 2-Ketosäuren 2-Ketobutyrat, 3-Methyl-2-ketobutyrat, **7** und Oxalacetat als Donoren für die 1,4-Additionsreaktionen an 2,3-CHD (**3**) bzw. Acrylsäure (**4**) untersucht. Für alle untersuchten potentiellen Donorsubstrate war der Produktnachweis für die 1,4-Additionsreaktion sowohl an **4** als auch an **3** negativ. Im Fall von **3** als Akzeptorsubstrat könnte dies möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass MenD für **3** eine deutlich verringerte Aktivität bzw. und/oder Affinität zeigt als für das physiologische Akzeptorsubstrat Isochorismat (Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Dies könnte ebenso die Erklärung dafür sein, dass mit diesen Donoren kein Umsatz mit dem Akzeptor

4 gezeigt werden konnte. Denkbar ist auch, dass die Stabilisierung der Monocarbonsäuren im aktiven Zentrum nicht so gut ist wie für **1** (vgl. Kapitel 3.5). Die Reaktionsgeschwindigkeit von MenD ist für die 1,4-Addition von **1** an **3** geringer als an Isochorismat (Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Dies ist ein Zeichen dafür, dass die Stabilisierung des Substrates **3** oder des entsprechenden Übergangszustandes im aktiven Zentrum von MenD schlechter ist als für Isochorismat (Fang *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2007 a). Wenn zusätzlich zum schlechter gebundenen Akzeptorsubstrat **3** auch Donorsubstrate wie die Monocarbonsäuren eingesetzt werden, die schlechter stabilisiert werden als der natürliche Donor **1**, kann dies möglicherweise zu einer weiteren Verringerung des Umsatzes der Reaktion führen.

1,2-Addition von 2-Ketosäuren an Benzaldehyd bzw. 2-F-Benzaldehyd

Es wurde ebenso die Eignung dieser Donoren für die 1,2-Addition untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: Umsätze von 2-Ketosäuren mit (2-F-)Benzaldehyd durch MenD.
Nachweis der Abnahme des Akzeptors mittels Gaschromatographie.

Akzeptorsubstrat	Donorsubstrat	Abnahme des Akzeptorsubstrates [%]	RT (Produkt) [min]
5	1	> 99	9.5
5	2a	> 99	viele Spaltprodukte ^{a)}
5	2b	> 99	viele Spaltprodukte ^{a)}
5	2-Ketobutyrat	> 30	6.9
5	3-Methyl-2-ketobutyrat	- b)	- b)
5	7	- b)	- b)
5	Oxalacetat	- b)	- b)
2-F-Benzaldehyd	1	> 95	6.6 und 8.8
2-F-Benzaldehyd	2a	> 37	viele Spaltprodukte ^{a)}
2-F-Benzaldehyd	2-Ketobutyrat	> 49	6.7
2-F-Benzaldehyd	3-Methyl-2-ketobutyrat	> 42	6.9
2-F-Benzaldehyd	7	> 75	5.5
2-F-Benzaldehyd	Oxalacetat	> 28	6.3

Inkubation von 50 mM Donorsubstrat und 20 mM Akzeptorsubstrat mit 0.7 mg/mL MenD für 24 h **2a**, **2b**: gebildet in Vorreaktion aus 50 mM **7** und 100 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda (**2a**) bzw. DgoA (**2b**), nach 2 h Zugabe von MenD und weitere 24 h Inkubation
SRB 1: vgl. Tabelle 3.2

^{a)} Auftreten vieler einzelner Signale, vermutlich Spaltprodukte durch Erhitzen beim Probeneinlass in die Gaschromatographie (bei LC-MS-Analyse keine Hinweise auf das Auftreten mehrerer Produkte)

^{b)} keine Abnahme des Akzeptorsubstrates und keine Produktbildung nachweisbar

Für 2-Ketobutyrat als Donor ist die Abnahme von Benzaldehyd (**5**) mit > 30% deutlich geringer als für **1**, **2a** und **2b** (Tabelle 3.7). Für alle anderen untersuchten putativen Donorsubstrate wurde keine Abnahme von **5** und keine Produktbildung nachgewiesen. Für 2-F-Benzaldehyd als Akzeptor war die Abnahme des 2-F-Benzaldehyds für alle Donoren mit Ausnahme von **1** deutlich höher als für **5** als Akzeptor. Im Gegensatz zu Kurutsch *et al.* (2009) konnte für die 1,2-Additionen von Oxalacetat bzw. von **7** an **5** keine Produktbildung gezeigt werden. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass die Umsätze bei Kurutsch *et al.* (2009) jeweils unter 5% lagen. Nach Kurutsch *et al.* (2009) war der Umsatz von 2-F-Benzaldehyd und **7** höher als der von **5** und **7**. Dies wurde in der eigenen Arbeit in der Hinsicht bestätigt, dass mit **7** und 2-F-Benzaldehyd eine Reaktion gezeigt wurde (Abnahme des Akzeptorsubstrates 2-F-Benzaldehyd > 75%), nicht aber mit **7/5**, da mit der GC-Methode die geringe Abnahme des Akzeptorsubstrates **5** nicht nachgewiesen werden kann. Die 1,2-Additionsreaktion von 2-F-Benzaldehyd führte zusammen mit den Donoren **1** (> 95%), 2-Ketobutyrat (> 49%), 3-Methyl-2-ketobutyrat (> 42%), Oxalacetat (> 28%), **2a** (> 37%) zu Produktbildung. Somit waren die Umsätze für 2-Ketobutyrat und 3-Methyl-2-ketobutyrat als Donoren ähnlich, woraus sich schließen lässt, dass der Einfluss der zusätzlichen Methylgruppe auf den Umsatz gering ist. Auffallend ist, dass 2-Ketobutyrat sowohl für die 1,2-Addition an **5** als auch an 2-F-Benzaldehyd zu vergleichbaren Abnahmen der Akzeptorsubstrate führt, wogegen für 3-Methyl-2-ketobutyrat nur für die 1,2-Addition an 2-F-Benzaldehyd eine Abnahme des Akzeptorsubstrates detektiert wurde, die dafür in der gleichen Größenordnung lag wie die für 2-Ketobutyrat. Dagegen war die Abnahme des Akzeptorsubstrates bei der Reaktion mit Oxalacetat als Donorsubstrat deutlich geringer, was bedeutet, dass die Position der zweiten Carboxylgruppe dieses Donorsubstrates die Reaktion verschlechtert.

Für die Monocarbonsäuren als Donorsubstrate wurden niedrigere Umsätze bestimmt als für die Dicarbonsäuren **1**, **2a** bzw. **2b**. Denkbar ist, dass die Stabilisierung dieser Monocarbonsäuren im aktiven Zentrum nicht so gut ist wie für die Dicarbonsäuren. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass sowohl **1** als auch **2** eine zweite Carboxylgruppe aufweisen, die durch verschiedene Aminosäurereste im aktiven Zentrum von MenD koordiniert und das Substrat hierdurch stabilisiert wird. In den Fällen von Monocarbonsäuren als Donorsubstrate

fallen diese Bindungen zur zweiten Carboxylgruppe und somit die Stabilisierung des Donorsubstrates weg, was die geringeren Umsätze erklären könnte (vgl. Kapitel 3.5).

3.4.3 Aufbau einer zweiten Ein-Topf-Reaktion mit HOPA als Donorsubstrat für MenD

Nachdem die Ein-Topf-Synthese von HOG (**2a**: Schapfl *et al.*, 2018 bzw. **2b**) durch Aldolasen aus Pyruvat (**7**) und Glyoxylat (**8**) gebildet und dessen Verwendung als Donorsubstrat für die 1,2-Addition bzw. 1,4-Addition von MenD etabliert wurde, sollte diese auf eine weitere Aldolase übertragen werden. 4-Hydroxy-2-oxopentanoat (HOPA), als Analogon zu 2-Ketoglutarat (**1**) und **2**, weist eine vergleichbare Struktur wie **2** auf, wobei die der Hydroxylfunktion benachbarte endständige Carboxylgruppe durch eine Methylgruppe substituiert ist (Abbildung 3.41).

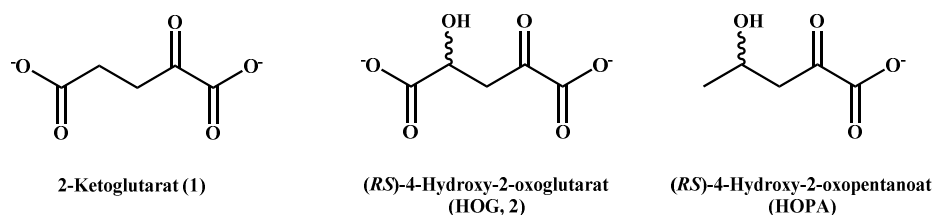


Abbildung 3.41: 1 und die Analoga 2 und 4-Hydroxy-2-oxopentanoat (HOPA).

Die Aldolase TTHB aus *Thermus thermophilus* spaltet (*S*)-HOPA in Acetaldehyd und **7** (Baker *et al.*, 2012). Dieses Enzym wurde zur Bildung von HOPA durch Jan-Patrick Steitz (Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Freiburg) eingesetzt (Steitz, 2019). Dieses neue Substrat sollte als Donor für die durch MenD katalysierte 1,2-Addition an Benzaldehyd (**5**) untersucht werden (Abbildung 3.42).

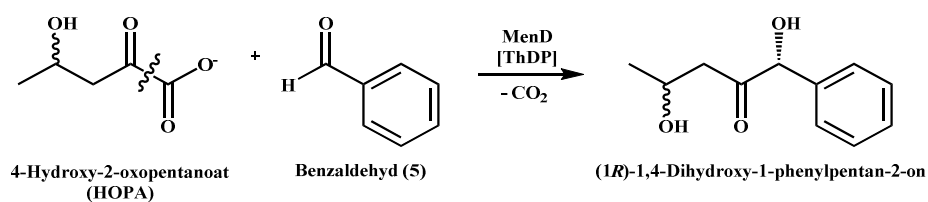


Abbildung 3.42: Postulierte 1,2-Additionsreaktion von (*S*)-HOPA an **5 katalysiert durch MenD.**

Nach 24 h Inkubation von 20 mM **5** und 5% (v/v) einer gesättigten HOPA-Lösung mit 0.7 mg/mL MenD wurde mittels GC-Analyse sowohl eine Abnahme des Akzeptorsubstrates **5** als auch die Bildung eines Produktpeaks (RT = 6.0 min) gezeigt. Mittels LC-MS wurde das vermutliche Produkt (M = 194.2 g/mol, m/z 193.0, RT = 2.3 min) nachgewiesen.

3.5 Stabilisierung der Donorsubstrate im aktiven Zentrum von MenD

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben betrug die Abnahme des Akzeptorsubstrates 2,3-CHD (**3**) bei der 1,4-Additionsreaktion von 2-Ketoglutarat (**1**) an **3** durch MenD ca. 90%. Wenn **1** durch HOG (**2**) ersetzt wurde, betrug die Abnahme des Akzeptorsubstrates **3** dagegen nur noch 78% für **2a** (Schapfl *et al.*, 2018) bzw. 23% für **2b** (Kapitel 3.3.3). Diese Unterschiede bei der Abnahme des Akzeptorsubstrates sind vermutlich auf die Struktur im aktiven Zentrum von MenD zurückzuführen. Die verringerte Abnahme des Akzeptorsubstrates beim Umsatz von **2** im Vergleich zu **1** ist vermutlich auf die zusätzliche Hydroxylfunktion am C2 von **2** zurückzuführen, da dies der einzige strukturelle Unterschied zwischen beiden Donorsubstraten ist. Die im Jahr 2016 von Song *et al.* veröffentlichten Kristallstrukturen von MenD aus *E. coli* enthalten sowohl den Donor **1** als auch den Cofaktor ThDP, wodurch erstmalig die Bindung von **1** bzw. des nach der Decarboxylierung erhaltenen Succinylaldehyds an den Cofaktor ThDP nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.43).

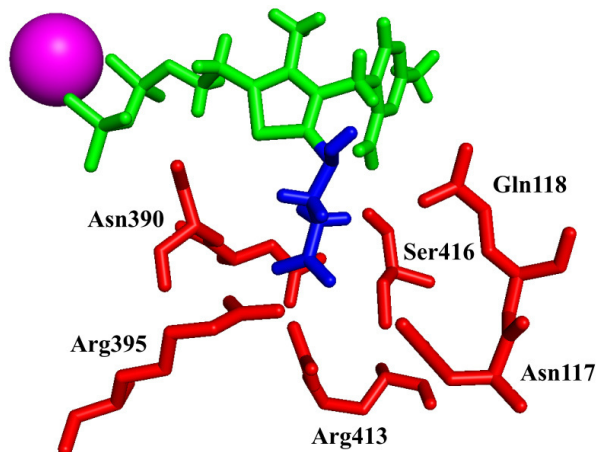


Abbildung 3.43: Aktives Zentrum von MenD mit den für die Bindung der zweiten Carboxylgruppe des Donorsubstrates **1 entscheidenden Aminosäuren.** Grün: Intermediat bestehend aus dem Cofaktor ThDP und den gebundenen Substraten Isochorismat und **1**; das decarboxylierte **1** ist blau dargestellt, Mn^{2+} : pink; Aminosäurereste: rot, Kristallstruktur: PDB 5EJA, Song *et al.*, 2016, erstellt mit PyMOL im Darstellungsmodus „sticks“

Somit können aus diesen Strukturen Rückschlüsse auf die Bindung von **1** an den Cofaktor ThDP im aktiven Zentrum von MenD gezogen werden. Die Stabilisierung von **1** im aktiven Zentrum erfolgt über verschiedene Bindungen. Die H-Atome am C4 von **1** sind in der Nähe des N-Atomes der Iminogruppe des ThDP. Der C4-Kohlenstoff von **1** liegt in unmittelbarer Nähe zum N-Atom des Glutamins 118. Die CH_2-CH_2 -Gruppe von **1** dagegen wird nicht durch Aminosäurereste stabilisiert. Die Carboxylgruppe am C5 von **1** wird, wie in Abbildung 3.44 dargestellt, durch verschiedene Aminosäurereste stabilisiert.

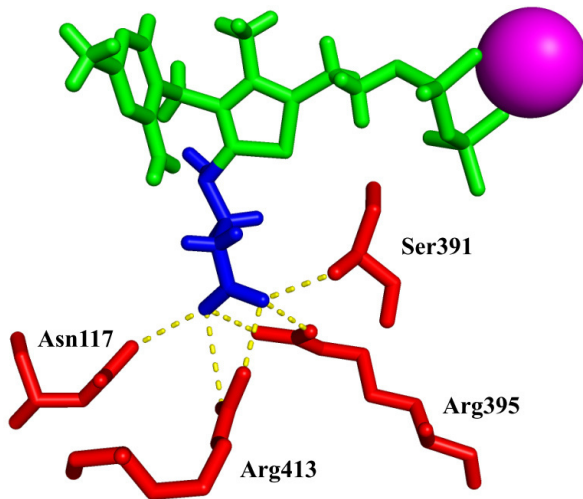


Abbildung 3.44: Stabilisierung des an ThDP gebundenen Succinylsemialdehyds im aktiven Zentrum von MenD.

Grün: Intermediat bestehend aus dem Cofaktor ThDP und den gebundenen Substraten Isochorismat und **1**; das decarboxylierte **1** ist blau dargestellt, Mn^{2+} : pink; Aminosäurereste: rot, putative polare Interaktionen sind als gelbe gestrichelte Linie gekennzeichnet, Kristallstruktur: PDB 5EJA, Song *et al.*, 2016, erstellt mit PyMOL im Darstellungsmodus „sticks“

Zur Stabilisierung der zweiten Carboxylgruppe von **1** tragen die Aminosäurereste Arg413 und Arg395 bei. Dies gilt vermutlich auch für die Aminosäurereste Asn390 und Asn117, wobei hier die Auflösung der Kristallstrukturen von *EcMenD* (Song *et al.*, 2016) und von *MtMenD* (Jirgis *et al.*, 2016) für sichere Aussagen nicht hoch genug ist. Ein Austausch dieser Aminosäuren durch kurzkettige oder auch ungeladene Aminosäuren könnte – auf Grund der hieraus resultierenden schlechteren Bindung der zweiten Carboxylgruppe des **1** – die Bindung von **1** im aktiven Zentrum verschlechtern. Um die Bindung von Substraten, die diese zweite Carboxylgruppe nicht aufweisen, durch Reduktion der Ladungen an dieser Position zu verbessern, müssten somit mehrere Aminosäuren ausgetauscht werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung des Enzymes vermutlich stark erhöht würde. Dies entspricht den Ergebnissen mit Monocarbonsäuren als Donoren, die zu geringen Umsätzen führten, was vermutlich auf Grund der fehlenden Stabilisierung der nicht-vorhandenen zweiten Carboxylgruppe zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 3.4.2).

Bei Verwendung von **2** als Donorsubstrat an Stelle von **1** kommt es zu veränderten Bindungen im aktiven Zentrum. Die Bindung von **2** wird vermutlich zusätzlich über die Hydroxylgruppe durch die Aminosäuren Ser416 und Asn117 stabilisiert. Bei

Einfügen einer Hydroxylgruppe an C4 könnte dies, je nach der räumlichen Ausrichtung der Hydroxylgruppe, auf Grund veränderter Bindungen zu einer Destabilisierung dieser Konfiguration führen. Die Konfiguration mit dem (*S*)-Enantiomer des Donorsubstrates **2a** könnte dadurch stabilisiert werden, dass bei dieser Konfiguration oben genannte Bindungen besser ausgebildet werden als bei dem (*R*)-Enantiomer von **2b**.

3.6 Annotierte SEPHCHC-Synthasen

Im Rahmen der DFG-Forschergruppe 1296 wurde im Projekt 1 „Katalytische Promiskuität von Thiamin-Enzymen“ im Forschungszentrum Jülich (Saskia Bock, Arbeitsgruppe Dörte Rother) der Zusammenhang zwischen der Aminosäuresequenz und der Enzymfunktion für die Enzyme *PfBAL* (aus *Pseudomonas fluorescens*) und *EcMenD* (aus *E. coli*) näher untersucht. Nach einer Datenbankanalyse wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe von Jürgen Pleiss (Universität Stuttgart) verschiedene putative Enzyme aus dem Sequenzraum ausgewählt, die einen möglichen Übergang von *PfBAL* zu *EcMenD* darstellen.

Drei als MenD annotierte Enzyme aus *Chloroherpeton thalassium* (*CtMenD*), *Vibrio cholerae* (*VcMenD*) und *Yersinia aldovae* (*YaMenD*) wurden als gereinigte Enzyme für weitere Versuche zur Verfügung gestellt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es sich bei diesen Enzymen um SEPHCHC-Synthasen handelt, also diese Enzyme die 1,4-Addition von 2-Ketoglutarat (**1**) an Isochorismat zu SEPHCHC katalysieren. Da der Nachweis mittels HPLC-DAD erfolgte, konnte nur das nach Freisetzung von Pyruvat (**7**) aus SEPHCHC entstehende SHCHC nachgewiesen werden.

Nach 24 h Inkubation zeigten alle annotierten MenD die Bildung des Produktsignals von SHCHC (RT = 8.4 min) analog zu *EcMenD* (Tabelle 3.8, vgl. auch Kapitel 3.4.2). Somit bilden alle untersuchten putativen MenD SEPHCHC und wurden zu Recht als MenD (SEPHCHC-Synthasen) annotiert. Alle MenD (Ausnahme *VcMenD* mit N-terminalem His-Tag) zeigten mit **1** als Donor eine höhere Produktbildung als *EcMenD*.

Tabelle 3.8: Produktbildung der annotierten SEPHCHC-Synthasen für die postulierten Produkte SHCHC und MHCHC.

(Fläche des Produktsignals bei 290 nm, SHCHC: RT = 8.4 min, MHCHC: RT = 7.6 min)

SEPHCHC-Synthase	Donor: 1	Donor: 2a
	Area [mAU*min]	Area [mAU*min]
<i>CtMenD</i> , C-terminaler His-Tag	63	68
<i>VcMenD</i> , N-terminaler His-Tag	42	70
<i>VcMenD</i> , C-terminaler His-Tag	62	69
<i>YaMenD</i> , N-terminaler His-Tag	58	65
<i>YaMenD</i> , C-terminaler His-Tag	59	59
<i>EcMenD</i> , C-terminaler His-Tag	53	56

Inkubation von 5 mM Donorsubstrat mit 1 mM Chorismat, 0.2 mg/mL EntC und 1 mg/mL MenD für 24 h

2a: gebildet aus 5 mM **7** und 10 mM **8** mit 0.2 mg/mL Eda

SRB 4: vgl. Tabelle 3.6

Darüber hinaus zeigten alle MenD für die 1,4-Addition an Isochorismat mit HOG (**2a**) höhere Produktbildung als *EcMenD* (Tabelle 3.8, vgl. auch Kapitel 3.4.2). Dies ist ein Ansatzpunkt, um in zukünftigen Arbeiten durch Modulierung und Vergleich der Strukturen der aktiven Zentren der Enzyme und anschließende Mutagenesestudien, den Umsatz mit **1** bzw. **2a** bzw. **2b** zu verbessern.

Die Bildung von SHCHC und MHCHC in vergleichbaren Anteilen wurde für alle untersuchten Enzyme mit Ausnahme von *VcMenD* (N-terminaler His-Tag) beobachtet. Letzteres bildete ca. 1.5 mal so viel MHCHC wie SHCHC (Tabelle 3.8). Dies deutet darauf hin, dass bei diesem Enzym die Position des His-Tags einen Einfluss auf die Bindung des Donorsubstrates und die Produktbildung haben könnte.

4 Diskussion

Wie für eine Vielzahl verschiedener Substrate für die 1,2-Additionsreaktionen und 1,4-Additionsreaktionen nachgewiesen (Kurutsch *et al.*, 2009; Beigi *et al.*, 2013) zeigt MenD auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Reaktionen eine exzellente Chemoselektivität. Unter den getesteten Bedingungen konnten nur die erwarteten Reaktionsprodukte in signifikanten Konzentrationen nachgewiesen werden. Es wurden mit LC-MS- bzw. ¹H-NMR-Analysen weder eine Selbstligation von 2-Ketoglutarat (**1**) bzw. 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, **2**) noch Produkte mit einer geänderten Chemoselektivität für das Akzeptor- und Donorsubstrat beobachtet. Kurutsch (2009) konnte mit MenD ebenfalls keine Selbstligationsaktivität für das Donorsubstrat **1** nachweisen. Eine mögliche Ausnahme von der exzellenten Chemoselektivität bildet die 1,4-Addition von **1** bzw. **2** an 2,3-CHD (**3**), bei denen jeweils ein drittes Isomer nachgewiesen wurde, dessen Strukturnachweis bisher erfolglos blieb (vgl. Kapitel 3.3.3, Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass **2** ebenso wie **1** gute Donorsubstrate für aromatische und aliphatische Akzeptoren für 1,2- und 1,4-Additionsreaktionen von MenD darstellen.

4.1 Substratspektrum von MenD

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Donor- und Akzeptorsubstrate für MenD eingeführt. Neben 2,3-*trans*-CHD (**3**), das in der vorliegenden Arbeit als Akzeptor eingesetzt wurde, sind auch weitere Cyclohexadiendiolcarboxylate verfügbar (vgl. Bongaerts *et al.*, 2011). Durch gezielte Variation dieser Cyclohexadiendiolcarboxylate könnten Produkte mit der entsprechenden Konfiguration, d. h. der gewünschten Positionierung und auch räumlichen Ausrichtung der Hydroxylgruppen am Cyclohexadiengerüst der Produkte verfügbar gemacht werden. Denkbare Beispiele sind der Einsatz von 2,3-*cis*-CHD oder auch von (5*S*,6*S*)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-1-carboxylat (2,3-*trans*-CHA) als Akzeptorsubstrate. 2,3-*trans*-CHA führt zu einem Produkt mit einer Aminogruppe an Stelle der Hydroxylgruppe am C2 des Cyclohexenringes (Fries, 2015; Fries *et al.*, 2019). Ein weiterer Ansatz wäre, die von Chen *et al.* (2013a) eingeführte

C-N-Knüpfungsreaktion von MenD weiterzuverfolgen, bei der das Donorsubstrat 2-Ketoglutarat (**1**) an den Stickstoff des Akzeptorsubstrates 4-Nitrozimtsäure addiert wird (Umsatz > 99%). Insbesondere bei Einsatz von HOG (**2**) oder den anderen in der vorliegenden Arbeit eingeführten Donorsubstraten würde sich eine Fülle neuer möglicher Produkte ergeben.

4.1.1 Ausbau der Enzymkaskaden

Durch eine weitere Funktionalisierung der Substrate für die Aldolasen Eda und DgoA könnten Donoren mit einem höheren Funktionalisierungsgrad für MenD erhalten werden. Insbesondere durch neuartige Donorsubstrate, die z.B. Seitenketten oder Ringstrukturen enthalten, könnte der Zugang zu neuen Substanzklassen ermöglicht werden. Darüber hinaus könnten weitere Aldolasen für die Aldolreaktion eingesetzt werden. Denkbar wäre auch, weitere Derivatisierungen wie z.B. Methylgruppen, Aminogruppen etc. einzuführen.

Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von Iminreduktasen zur reduktiven Aminierung der Produkte der MenD-katalysierten 1,2-Addition. Eine (*R*)-selektive Iminreduktase aus *Streptosporangium roseum* weist ein breites Carbonyl-Akzeptorspektrum auf (Nestl, Universität Stuttgart, persönliche Mitteilung). Neben aliphatischen und cyclischen Aldehyden und Ketonen werden auch Ketosäuren als Carbonylakzeptoren akzeptiert, jedoch mit sehr geringer Aktivität.

Grundsätzlich ist die thermodynamische Aktivität der Substrate, die auch die Wechselwirkungen zwischen Wasser-Wasser, Wasser-Substrat und Substrat-Substrat berücksichtigt, für die Substratspezifität entscheidender als die Konzentration der Substrate selbst (Pleiss, 2017).

4.1.2 *in silico*-Substratscreening

Für MenD konnten durch Kurutsch *et al.* (2009) und Beigi *et al.* (2014) und in der vorliegenden Arbeit eine Vielzahl von Donoren und Akzeptoren mit sehr unterschiedlichen Strukturen eingeführt werden (vgl. Kapitel 3.3 und 3.4). Gemeinsam war allen Arbeiten, dass ausgehend von dem jeweils bekannten Wissen über die von MenD akzeptierten Substrate weitere potentielle Substrate mit

ähnlichen Eigenschaften gesucht und untersucht wurden. Das *in silico*-Screenen von Datenbanken ermöglicht es an Hand von Modellen und Literaturdaten zum bekannten Substratspektrum der Enzyme funktionelle Eigenschaften der Substrate zu identifizieren, die für die Katalyse wichtig sind (Pertusi *et al.*, 2017). Diese Informationen werden genutzt, um weitere Moleküle zu identifizieren, die sich als Substrate eignen könnten. Pertusi *et al.* (2017) haben für MenD neue Substrate für die 1,2-Addition, aber nicht für die 1,4-Addition, vorhergesagt. Die angegebenen GC-MS-Chromatogramme lassen auf einen geringen Umsatz von MenD mit diesen Substraten schließen. Hierzu eignet sich ein Vergleich mit Fries (2015, Fries *et al.*, 2019), der mit MenD_WT für 2,3-*trans*-CHA als Akzeptorsubstrat Spuren an Umsatz und Produktbildung detektieren konnte. Um Eingang in die präparative Synthese zu finden, musste diese Reaktion verbessert werden. Ähnliches lässt sich auch für die Ergebnisse von Pertusi *et al.* (2017) schließen.

4.1.3 Ganzzellsynthesen zur Produktgewinnung

Nachdem *in vitro* das Potential von HOG (2) als Donorsubstrat sowohl für die 1,2-Addition als auch für die 1,4-Addition von MenD gezeigt wurde, könnte im nächsten Schritt diese Reaktion auf die Ganzzellsynthese übertragen werden. Für eine Anwendung im großen Maßstab ist oft der Kostenfaktor Thiamindiphosphat (ThDP) limitierend, weswegen Ganzzellansätze eine interessante Alternative sind, die auch zu hohen Produktausbeuten führen können (vgl. auch Fries *et al.*, 2019). Darüber hinaus ist im Hinblick auf eine zukünftige Anwendung der untersuchten Reaktionen der Umsatz mit Ganzzellsystemen wünschenswert, da hierdurch die Zeit- und kostenaufwendige Reinigung der Enzyme und Probleme mit der Enzymstabilität vermieden und die Bildung der Produkte ausgehend von günstigen Kohlenstoffquellen möglich gemacht werden könnte.

Die Bildung der Produkte SHCHC (Kurutsch, 2009), SDHCHC und SAHCHC (Fries *et al.*, 2015; Fries *et al.*, 2019) wurde bereits erfolgreich mit rekombinanten *E. coli*-Stämmen etabliert. Bei der *in vivo*-Synthese von SDHCHC wird als Nebenprodukt SEPHCHC gebildet (Fries, 2015). Auf Fries *et al.* (2019) aufbauend könnte die *in vivo*-Bildung von MDHCHC etabliert werden. Als Grundlage könnte der Stamm *E. coli* KB532 dienen, der bereits in der vorliegenden Arbeit zur Bildung

von Chorismat bzw. 2,3-CHD (**3**) eingesetzt wurde (Kapitel 2.10). Die Gene für die zur Bildung von Chorismat und **3** benötigten Enzyme könnten ebenso wie *menD* durch chromosomale Integration fest im Genom verankert werden. Geeignet erscheint hier z.B. der Einbau an Hand der Methode von Datsenko und Wanner (2000), die einen Resistenzmarker-freien Einbau der Gene ermöglicht. Die im Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart entwickelte Methode nach Albermann *et al.* (2010) ermöglicht die chromosomale Integration der Expressionskassetten an Stelle von Genen, die Enzyme für den Abbau von *E. coli* selten verwerteter Zucker codieren. In der Folge können die Zellen die entsprechenden Zucker nicht mehr abbauen, was ein einfaches Screening ermöglicht.

Nach dem Einbau der Gene wäre der nächste Schritt *in vivo* MDHCHC zu bilden. Voraussetzung hierfür ist, dass die Konzentration von **2** in den Zellen hoch genug ist, damit MDHCHC und nicht SDHCHC gebildet wird. Hierfür könnte es nötig sein, die Konzentration von **2** in den Zellen z.B. durch Expression der rekombinanten Aldolasen Eda bzw. DgoA zu erhöhen. Diese Arbeiten könnten an Katsumata *et al.* (1994) angelehnt werden, die eine Methode zur Gewinnung von **2** aus Pyruvat (**7**) und Glyoxylat (**8**) mit ganzen Zellen patentiert haben. Hierbei ist zu beachten, dass für die beiden Aldolasen eine Funktion im Katabolismus, genauer beim Abbau von Zuckerphosphaten, beschrieben worden ist (vgl. Kapitel 1.2.1). Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass 2-Ketoglutarat (**1**) der natürliche Donor von MenD ist. Durch Mutagenesestudien für MenD könnte versucht werden, die Anteile des Nebenproduktes SDHCHC zu reduzieren. Der Nachweis der Bildung von MDHCHC im Kulturüberstand könnte wie in der vorliegenden Arbeit mittels HILIC-MS/MS erfolgen.

Bei einer erfolgreichen Entwicklung eines solchen Stammes ergäbe sich die Möglichkeit, ausgehend von der kostengünstigen Kohlenstoffquelle Glucose den hochfunktionalisierten Stoff MDHCHC zu gewinnen, der wiederum als Ausgangsstoff für weitere Syntheseschritte dienen könnte.

5 Ausblick

Ausgehend von der *in vivo*-Herstellung von Chorismat bzw. 2,3-CHD (**3**) konnte eine *in vitro*-2-Stufen-Reaktion etabliert werden. Im ersten Schritt wurde durch Aldoladdition von Glyoxylat (**8**) und Pyruvat (**7**) 4-Hydroxy-2-oxoglutarat (HOG, **2**) gebildet (katalysiert durch die Aldolasen Eda bzw. DgoA). HOG **2** diente im zweiten Schritt als Donor für MenD-katalysierte Additionsreaktionen an verschiedene Akzeptoren. MenD besitzt aufgrund der Variationsmöglichkeiten für das Akzeptor- und das Donorsubstrat und der beiden katalysierten Reaktionstypen ein großes Potential für weitere Anwendungsmöglichkeiten. Gerade **2** und 4-Hydroxy-2-oxopentanoat (HOPA) bilden als funktionalisierte 2-Ketosäuren interessante Grundbausteine für weitere Additionsreaktionen z.B. an (5S,6S)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-1-carboxylat (2,3-*trans*-CHA). Somit könnte das Prinzip der Gewinnung eines Donorsubstrats für ein ThDP-abhängiges Enzym mittels Aldolasereaktionen auf andere Aldolasen übertragen und auf diesem Weg eine Vielzahl neuer Donorsubstrate für MenD gewonnen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adinolfi, A.; Olezza, S.; Ruffo, A. (1967): Inhibition of oxoglutarate dehydrogenase by glyoxylate and its condensation compounds. *Biochemical Journal* 104 (3), 50P–51P.
- Allen, S. T.; Heintzelman, G. R.; Toone, E. J. (1992): Pyruvate aldolases as reagents for stereospecific aldol condensation. *The Journal of Organic Chemistry* 57 (2), S. 426–427.
- Amara, P.; Fdez Galván, I.; Fontecilla-Camps, J. C.; Field, M. J. (2007): The enamine intermediate may not be universal to thiamine catalysis. *Angewandte Chemie International Edition* 46 (47), S. 9019–9022.
- Andrews, F. H.; McLeish, M. J. (2012): Substrate specificity in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Bioorganic Chemistry* 43, S. 26–36.
- Andrews, F.; Wechsler, C.; Rogers, M.; Meyer, D.; Tittmann, K.; McLeish, M. (2016): Mechanistic and Structural Insight to an Evolved Benzoylformate Decarboxylase with Enhanced Pyruvate Decarboxylase Activity. *Catalysts* 6 (12), S. 190.
- Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. (2006): The SWISS-MODEL workspace. A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (2), S. 195–201.
- Backman, K. C.; Balakrishnan, R. (1988): Controlled gene excision. USPatent (US4743546A).
- Backman, K.; O'Connor, M. J.; Maruya, A.; Rudd, E.; McKay, D.; Balakrishnan, R.; Radjai, M.; Dipasquantonio, V.; Shoda, D.; Hatch, R.; Venkatasubramanian, K. (1990): Genetic Engineering of Metabolic Pathways Applied to the Production of Phenylalanine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 589 (1 Biochemical E), S. 16–24.
- Baerns, M.; Behr, A.; Brehm, A.; Gmehling, J.; Hofmann, H.; Onken, U.; Renken, A. (2013): 19.1 Polymere, in: Technische Chemie. Zweite, erweiterte Auflage, Wiley-VCH Weinheim, S. 641-654.
- Baker, P.; Hillis, C.; Carere, J.; Seah, S. Y. K. (2012): Protein-protein interactions and substrate channeling in orthologous and chimeric aldolase-dehydrogenase complexes. *Biochemistry* 51 (9), S. 1942–1952.
- Balakrishnan, A.; Gao, Y.; Moorjani, P.; Nemeria, N.S.; Tittmann, K.; Jordan, F. (2012): Bifunctionality of the Thiamin Diphosphate Cofactor: Assignment of Tautomeric/Ionization States of the 4'-Aminopyrimidine Ring When Various Intermediates Occupy the Active Sites during the Catalysis of Yeast Pyruvate Decarboxylase. *Journal of the American Chemical Society* 134 (8), S. 3873-3885.
- Beigi, M.; Waltzer, S.; Fries, A.; Eggeling, L.; Sprenger, G. A.; Müller, M. (2013): TCA cycle involved enzymes SucA and Kgd, as well as MenD. Efficient biocatalysts for asymmetric C-C bond formation. *Organic Letters* 15 (3), S. 452–455.
- Beigi, M.; Waltzer, S.; Zarei, M.; Müller, M. (2014): New Stetter reactions catalyzed by thiamine diphosphate dependent MenD from *E. coli*. *Journal of Biotechnology* 191, S. 64-68.
- Belenky, I.; Steinmetz, A.; Vyazmensky, M.; Barak, Z.; Tittmann, K.; Chipman, D. M. (2012): Many of the functional differences between acetohydroxyacid synthase (AHAS) isozyme I and other AHASs are a result of the rapid formation and breakdown of the covalent acetolactate-thiamin diphosphate adduct in AHAS I. *The FEBS journal* 279 (11), S. 1967–1979.

- Bertani, G. (1951): Studies on Lysogenesis I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62 (3), S. 293–300.
- Berthold, C. L.; Gocke, D.; Wood, M. D.; Leeper, F. J.; Pohl, M.; Schneider, G. (2007): Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carbonylation reaction. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 63 (Pt 12), S. 1217–1224.
- Bilal, M.; Iqbal, H. M. N.; Hu, H.; Wang, W.; Zhang, X. (2018): Metabolic engineering pathways for rare sugars biosynthesis, physiological functionalities, and applications—a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 58(16), S. 2768–2778.
- Bradford, M. M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* (72), S. 248–254.
- Breslow, R. (1958): On the Mechanism of Thiamine Action. IV. 1 Evidence from Studies on Model Systems. *Journal of the American Chemical Society* 80 (14), S. 3719–3726.
- Brovetto, M.; Gamemara, D.; Méndez, P. S.; Seoane, G. A. (2011): C-C bond-forming lyases in organic synthesis. *Chemical Reviews* 111 (7), S. 4346–4403.
- Buchholz, P. C. F.; Vogel, C.; Reusch, W.; Pohl, M.; Rother, D.; Spieß, A. C.; Pleiss, J. (2016): BioCatNet. A Database System for the Integration of Enzyme Sequences and Biocatalytic Experiments. *ChemBioChem* 17 (21), S. 2093–2098.
- Buchholz, P. C. F., Ohs, R., Spiess, A. C., & Pleiss, J. (2018). Progress Curve Analysis Within BioCatNet: Comparing Kinetic Models for Enzyme-Catalyzed Self-Ligation. *Biotechnology Journal* 14 (3), 1800183.
- Buchholz, P. C. F.; Ferrario, V.; Pohl, M.; Gardossi, L.; Pleiss, J. (2019): Navigating within thiamine diphosphate-dependent decarboxylases: sequences, structures, functional positions, and binding sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatic* 87 (9), S. 774–785.
- Bunik, V. I.; Fernie, A. R. (2009): Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction. A cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. *The Biochemical journal* 422 (3), S. 405–421.
- Busto, E. (2016): Recent Developments in the Preparation of Carbohydrate Derivatives from Achiral Building Blocks by using Aldolases. *ChemCatChem* 8 (16), S. 2589–2598.
- Cayrol, C.; Petit, C.; Raynaud, B.; Capdevielle, J.; Guillemot, J. C.; Defais, M. (1995): Recovery of respiration following the SOS response of *Escherichia coli* requires RecA-mediated induction of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (25), S. 11806–11809.
- Cheriyian, M.; Toone, E. J.; Fierke, C. A. (2007): Mutagenesis of the phosphate-binding pocket of KDPG aldolase enhances selectivity for hydrophobic substrats. *Protein Science* 16 (11), S. 2368–2377.
- Chung, C. T.; Niemela, S. L.; Miller, R. H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7), S. 2172–2175.
- Clapés, P.; Fessner, W.-D.; Sprenger, G. A.; Samland, A. K. (2010): Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (2), S. 154–167.
- Clapés, P.; Garrabou, X. (2011): Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases. *Advanced Synthesis and Catalysis* 353 (13), S. 2263–2283.

- Clapés, P. (2016): Chapter 10 - Enzymatic CC Bond Formation. In: *Organic Synthesis Using Biocatalysis*, Elsevier, Amsterdam, S. 285–337.
- Conway, T. (1992): The Entner-Doudoroff pathway. History, physiology and molecular biology. *FEMS microbiology letters* 103 (1), S. 1–27.
- Costelloe, S. J.; Ward, J. M.; Dalby, P. A. (2008): Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family. *Journal of Molecular Evolution* 66 (1), S. 36–49.
- Cotterill, I. C.; Henderson, D. P.; Shelton, M. C.; Toone, E. J. (1998): The synthetic utility of KDPGal aldolase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5 (1–4), S. 103–111.
- Dai, S.; Funk, L.-M.; von Pappenheim, F. R.; Sautner, V.; Paulikat, M.; Schröder, B.; Uranga, J.; Mata, R. A.; Tittmann, K. (2019). Low-barrier hydrogen bonds in enzyme cooperativity. *Nature* 573, S. 609–613.
- Daruwala, R.; Kwon, O.; Meganathan, R.; Hudspeth, M.E.S. (1996): A new isochorismate synthase specifically involved in menaquinone (vitamin K₂) biosynthesis encoded by the *menF* gene. *FEMS microbiology letters* 140 (2–3), S. 159–163.
- Dawson, A.; Chen, M.; Fyfe, P. K.; Guo, Z.; Hunter, W. N. (2010): Structure and reactivity of *Bacillus subtilis* MenD catalyzing the first committed step in menaquinone biosynthesis. *Journal of Molecular Biology* 401 (2), S. 253–264.
- Dawson, A.; Fyfe, P. K.; Hunter, W. N. (2008): Specificity and reactivity in menaquinone biosynthesis. The structure of *Escherichia coli* MenD (2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase). *Journal of Molecular Biology* 384 (5), S. 1353–1368.
- Deacon, J.; Cooper, R. A. (1977): D-galactonate utilisation by enteric bacteria. The catabolic pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 77 (2), S. 201–205.
- Dobritzsch, D.; König, S.; Schneider, G.; Lu, G. (1998): High Resolution Crystal Structure of Pyruvate Decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of biological chemistry* 273 (32), S. 20196–20204.
- Domínguez de María, P.; Pohl, M.; Gocke, D.; Gröger, H.; Trauthwein, H.; Stillger, T.; Walter, L.; Müller, M. (2007): Asymmetric Synthesis of Aliphatic 2-Hydroxy Ketones by Enzymatic Carbonylation of Aldehydes. *European Journal of Organic Chemistry* 18, S. 2940–2944.
- Dresen, C.; Richter, M.; Pohl, M.; Lüdeke, S.; Müller, M. (2010): The enzymatic asymmetric conjugate umpolung reaction. *Angewandte Chemie International Edition* 49 (37), S. 6600–6603.
- Duggleby, R. G. (2006): Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Accounts of Chemical Research* 39 (8), S. 550–557.
- Dünelmann, P.; Kolter-Jung, D.; Nitsche, A.; Demir, A. S.; Siegert, P.; Lingen, B.; Baumann, M.; Pohl, M.; Müller, M. (2002): Development of a Donor–Acceptor Concept for Enzymatic Cross-Coupling Reactions of Aldehydes. The First Asymmetric Cross-Benzoin Condensation. *Journal of the American Chemical Society* 124 (41), S. 12084–12085.
- Egan, S. E.; Fliege, R.; Tong, S.; Shibata, A.; Wolf, R. E.; Conway, T. (1992): Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli*. Sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. *Journal of Bacteriology* 174 (14), S. 4638–4646.
- Emmons, G. T.; Campbell, I. M.; Bentley, R. (1985): Vitamin K (menaquinone) biosynthesis in bacteria. Purification and probable structure of an intermediate prior to o-succinylbenzoate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 131 (2), S. 956–960.

- Entner, N.; Doudoroff, M. (1952): Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of biological chemistry* 196 (2), S. 853–862.
- Eßer, S. (2006): Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadien-trans-diole: Optimierung der mikrobiellen Produktion, Untersuchungen zur Reaktivität und Synthese beider Enantiomere des Naturstoffs Valienon. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, online-pdf.
- Fang, M.; Langman, B. M.; Palmer, D. R. J. (2010): A stable analog of isochorismate for the study of MenD and other isochorismate-utilizing enzymes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20 (17), S. 5019–5022.
- Fang, M.; Macova, A.; Hanson, K. L.; Kos, J.; Palmer, D. R. J. (2011): Using substrate analogues to probe the kinetic mechanism and active site of *Escherichia coli* MenD. *Biochemistry* 50 (40), S. 8712–8721.
- Fesko, K.; Gruber-Khadjawi, M. (2013): Biocatalytic Methods for C-C Bond Formation. *ChemCatChem* 5 (6), S. 1248–1272.
- Fessner, W.-D. (2004): 5. Enzyme-catalyzed Aldol Additions. Modern Aldol Reactions. Vol 1, Enolates Organocatalysis, Biocatalysis and Natural Product Synthesis. Edited by Rainer Mahrwald. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KG, Weinheim; 5: Enzyme-catalyzed Aldol Additions, S. 201-272.
- Floyd, N. C.; Liebster, M. H.; Turner, N. J. (1992): A simple strategy for obtaining both enantiomers from an aldolase reaction. Preparation of L- and D-4-hydroxy-2-ketoglutarate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* (9), S. 1085.
- Frank, R. A. W.; Leeper, F. J.; Luisi, B. F. (2007): Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (7-8), S. 892–905.
- Franke, D.; Sprenger, G. A.; Müller, M. (2001): Synthesis of Functionalized Cyclohexadiene-trans-Diols with Recombinant Cells of *Escherichia coli*. *Angewandte Chemie International Edition* 40 (3), S. 555–557.
- Freedman, T. B.; Cao, X.; Dukor, R. K.; Nafie, L. A. (2003): Absolute configuration determination of chiral molecules in the solution state using vibrational circular dichroism. *Chirality* 15 (9), S. 743–758.
- Fries, A. (2015): Eröffnung neuer Biosynthesewege ausgehend von Chorismat unter Ausnutzung der Promiskuität von MenD. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, online pdf.
- Fries, A.; Mazzaferro, L.; Grüning, B.; Bisel, P.; Stibal, K.; Buchholz, P.; Pleiss, J.; Sprenger, G.; Müller, M. (2019): Alteration of the Route to Menaquinone towards Isochorismate-Derived Metabolites. *ChemBioChem* 20 (13), S. 1672-1677.
- Fürste, J. P.; Pansegrau, W.; Frank, R.; Blöcker, H.; Scholz, P.; Bagdasarian, M.; Lanka, E. (1986): Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* 48 (1), S. 119–131.
- Fullerton, S. W. B.; Griffiths, J. S.; Merkel, A. B.; Cheriyan, M.; Wymer, N. J.; Hutchins, M. J.; Fierke, C. A.; Toone, E. J.; Naismith, J. H. (2006): Mechanism of the Class I KDPG aldolase. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14 (9), S. 3002–3010.
- Gerhards, T.; Mackfeld, U.; Bocola, M.; Lieres, E. von; Wiechert, W.; Pohl, M.; Rother, D. (2012): Influence of Organic Solvents on Enzymatic Asymmetric Carbonylations. *Advanced synthesis & catalysis* 354 (14-15), S. 2805–2820.
- Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. (1994): Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C: American Society for Microbiology.

- Germer, P.; Gauchenova, E.; Walter, L.; Müller, M. (2019): Thiamine Diphosphate Dependent KdcA-Catalysed Formyl Elongation of Aldehydes. *ChemCatChem* 11, S. 4276–4280.
- Geueke, B.; Riebel, B.; Hummel, W. (2003): NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. A new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2), S. 205–211.
- Giovannini, P. P.; Bortolini, O.; Massi, A. (2016): Thiamine-Diphosphate-Dependent Enzymes as Catalytic Tools for the Asymmetric Benzoin-Type Reaction. *European Journal of Organic Chemistry* (26), S. 4441–4459.
- Guérard-Hélaine, C.; Heuson, E.; Ndiaye, M.; Gourbeyre, L.; Lemaire, M.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Petit, J.-L.; Salanoubat, M.; Berardinis, V. de; Gefflaut, T. (2017): Stereoselective synthesis of γ -hydroxy- α -amino acids through aldolase-transaminase recycling cascades. *Chemical communications (Cambridge, England)* 53 (39), S. 5465–5468.
- Guex, N.; Peitsch, M. C.; Schwede, T. (2009): Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer. A historical perspective. *Electrophoresis* 30 Suppl 1, S. 162-73.
- Rother née Gocke, D.; Graf, T.; Brosi, H.; Frindi-Wosch, I.; Walter, L.; Müller, M.; Pohl, M. (2009): Comparative characterisation of thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 (1-2), S. 30–35.
- Rother née Gocke, D.; Walter, L.; Gauchenova, E.; Kolter, G.; Knoll, M.; Berthold, C. L.; Schneider, G.; Pleiss, J.; Müller, M.; Pohl, M. (2008): Rational protein design of ThDP-dependent enzymes-engineering stereoselectivity. *ChemBioChem* 9 (3), S. 406–412.
- Gupta, S. C.; Dekker, E. E. (1980): Evidence for the identity and some comparative properties of alpha-ketoglutarate and 2-keto-4-hydroxyglutarate dehydrogenase activity. *Journal of biological chemistry* 255 (3), S. 1107–1112.
- Gupta, S. C.; Dekker, E. E. (1984): Malyl-CoA formation in the NAD-, CoASH-, and alpha-ketoglutarate dehydrogenase-dependent oxidation of 2-keto-4-hydroxyglutarate. Possible coupled role of this reaction with 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase activity in a pyruvate-catalyzed cyclic oxidation of glyoxylate. *Journal of biological chemistry* 259 (16), S. 10012–10019.
- Hailes, H. C.; Rother, D.; Müller, M.; Westphal, R.; Ward, J. M.; Pleiss, J.; Vogel, C.; Pohl, M. (2013): Engineering stereoselectivity of ThDP-dependent enzymes. *The FEBS journal* 280 (24), S. 6374–6394.
- Hecquet, L.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Lemaire, M. (2009): Enzymes Catalyzing C-C Bond Formation for the Synthesis of Monosaccharide Analogs, in: *Modern Biocatalysis*, Editoren: Fessner, W.-D.; Anthonsen, T., S. 287-298. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Henderson, D. P.; Shelton, M. C.; Cotterill, I. C.; Toone, E. J. (1997): Stereospecific Preparation of the N-Terminal Amino Acid Moiety of Nikkomycins K X and K Z via a Multiple Enzyme Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* 62 (23), S. 7910–7911.
- Henderson, D. P.; Cotterill, I. C.; Shelton, M. C.; Toone, E. J. (1998): 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate Aldolase as a Catalyst for Stereocontrolled Carbon–Carbon Bond Formation. *The Journal of Organic Chemistry* 63 (4), S. 906–907.
- Hernandez, K.; Bujons, J.; Jogle, J.; Charnock, S. J.; Domínguez de María, P.; Fessner, W. D.; Clapés, P. (2017): Combining Aldolases and Transaminases for the Synthesis of 2-Amino-4-hydroxybutanoic Acid. *ACS Catalysis* 7 (3), S. 1707–1711.

- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. (2012): 1.6 Chiroptische Methoden, in: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 8, Seite 33-38. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hintner, J.-P.; Reemtsma, T.; Stolz, A. (2004): Biochemical and molecular characterization of a ring fission dioxygenase with the ability to oxidize (substituted) salicylate(s) from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *Journal of Biological Chemistry* 279 (36), S. 37250–37260.
- Hiratsuka, T.; Furihata, K.; Ishikawa, J.; Yamashita, H.; Itoh, N.; Seto, H.; Dairi, T. (2008): An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science* 321 (5896), S. 1670–1673.
- Hochuli, E.; Döbeli, H.; Schacher, A. (1987): New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography A* 411, S. 177–184.
- Holzer, H.; Schultz, G.; Villarpalasi, C.; Juntgensell, J. (1956): Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen. *Biochemistry*. 5, S. 331–344.
- Hubrich, F.; Müller, M.; Andexer, J. N. (2014): *In vitro* production and purification of isochorismate using a two-enzyme cascade. *Journal of Biotechnology* 191, S. 93–98.
- Iding, H.; Siegert, P.; Mesch, K.; Pohl, M. (1998): Application of α -keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1385 (2), S. 307–322.
- Iding, H.; Dünnwald, T.; Greiner, L.; Liese, A.; Müller, M.; Siegert, P.; Grötzinger, J.; Demir, A. S.; Pohl, M. (2000): Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida* as Stable Catalyst for the Synthesis of Chiral 2-Hydroxy Ketones. *Chemistry - A European Journal* 6 (8), S. 1483–1495.
- Inouye, M.; Arnheim, N.; Sternglanz, R. (1973): Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Journal of biological chemistry* 248 (20), S. 7247–7252.
- Janknecht, R.; Martynoff, G. de; Lou, J.; Hipskind, R. A.; Nordheim, A.; Stunnenberg, H. G. (1991): Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (20), S. 8972–8976.
- Jiang, M.; Cao, Y.; Guo, Z.-F.; Chen, M.; Chen, X.; Guo, Z. (2007a): Menaquinone biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate as a novel intermediate and re-evaluation of MenD activity. *Biochemistry* 46 (38), S. 10979–10989.
- Jiang, M.; Chen, M.; Cao, Y.; Yang, Y.; Sze, K. H.; Chen, X.; Guo, Z. (2007b): Determination of the stereochemistry of 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate, a key intermediate in menaquinone biosynthesis. *Organic Letters* 9 (23), S. 4765–4767.
- Jiang, M.; Chen, X.; Wu, X.-H.; Chen, M.; Wu, Y.-D.; Guo, Z. (2009): Catalytic mechanism of SHCHC synthase in the menaquinone biosynthesis of *Escherichia coli*. Identification and mutational analysis of the active site residues. *Biochemistry* 48 (29), S. 6921–6931.
- Jirgis, E. N. M.; Bashiri, G.; Bulloch, E. M. M.; Johnston, J. M.; Baker, E. N. (2016): Structural Views along the *Mycobacterium tuberculosis* MenD Reaction Pathway Illuminate Key Aspects of Thiamin Diphosphate-Dependent Enzyme Mechanisms. *Structure* 24 (7), S. 1167–1177.

- Jordan, F.; Zhang, Z.; Sergienko, E. (2002): Spectroscopic Evidence for Participation of the 1',4'-Imino Tautomer of Thiamin Diphosphate in Catalysis by Yeast Pyruvate Decarboxylase. *Bioorganic Chemistry* 30 (3), S. 188–198.
- Jordan, F. (2003): Current mechanistic understanding of thiamin diphosphate-dependent enzymatic reactions. *Natural Product Reports* 20 (2), S. 184–201.
- Jordan, F.; Nemeria, N. S. (2014): Progress in the experimental observation of thiamin diphosphate-bound intermediates on enzymes and mechanistic information derived from these observations. *Bioorganic Chemistry* 57, S. 251–262.
- Kang, Y.-S.; Song, J.-A.; Han, K.-Y.; Lee, J. (2015): *Escherichia coli* EDA is a novel fusion expression partner to improve solubility of aggregation-prone heterologous proteins. *Journal of Biotechnology* 194, S. 39–47.
- Kanzaki, T.; Hayakawa, T.; Hamada, M.; Fukuyoshi, Y.; Koike, M. (1969): Mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. IV. Substrate specificities and kinetic properties of the pig heart pyruvate and 2-oxyglutarate dehydrogenase complexes. *Journal of biological chemistry* 244 (5), S. 1183–1187.
- Kasparyan, E.; Richter, M.; Dresen, C.; Walter, L. S.; Fuchs, G.; Leeper, F. J.; Wacker, T.; Andrade, S. L. A.; Kolter, G.; Pohl, M.; Müller, M. (2014): Asymmetric Stetter reactions catalyzed by thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (23), S. 9681–9690.
- Kluger, R.; Tittmann, K. (2008): Thiamin diphosphate catalysis. Enzymic and nonenzymic covalent intermediates. *Chemical Reviews* 108 (6), S. 1797–1833.
- Kobes, R. D.; Dekker, E. E. (1971): Variant properties of bovine liver 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase; its β -decarboxylase activity, lack of substrate stereospecificity, and structural requirements for binding substrate analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 250 (1), S. 238–250.
- Kovachevich, R.; Wood, W. A. (1955): carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens*. IV. Purification and properties of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. *Journal of Biological Chemistry* (213), S. 757–767.
- Kulig, J.; Simon, R. C.; Rose, C. A.; Husain, S. M.; Häckh, M.; Lüdeke, S.; Zeitler, K.; Kroutil, W.; Pohl, M.; Rother, D. (2012): Stereoselective synthesis of bulky 1,2-diols with alcohol dehydrogenases. *Catalysis Science and Technology*, S. 1580–1589.
- Kurutsch, A. (2009): Shikimatbiosyntheseweg: Mikrobielle Produktgewinnung der Metabolite Chorismat und SHCHC und Einsatz des Enzyms MenD als Biokatalysator für asymmetrische C-C-Bindungsknüpfung. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, online-pdf.
- Kurutsch, A.; Richter, M.; Brecht, V.; Sprenger, G. A.; Müller, M. (2009): MenD as a versatile catalyst for asymmetric synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 (1-2), S. 56–66.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227, S. 680–685.
- Lane, R. S.; Shapley, A.; Dekker, E. E. (1971): 2-Keto-4-hydroxybutyrate aldolase. Identification as 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase, catalytic properties, and role in the mammalian metabolism of L-homoserine. *Biochemistry* 10 (8), S. 1353–1364.
- Laties, G. G. (1967): The inhibition of citrate, isocitrate and α -ketoglutarate oxidation in aged potato slices by γ -hydroxy α -ketoglutarate. *Phytochemistry* 6 (2), S. 181–185.

- Lessmann, T.; Leuenberger, M. G.; Menninger, S.; Lopez-Canet, M.; Müller, O.; Hümmer, S.; Bormann, J.; Korn, K.; Fava, E.; Zerial, M.; Mayer, T. U.; Waldmann, H. (2007): Natural product-derived modulators of cell cycle progression and viral entry by enantioselective oxa Diels-Alder reactions on the solid phase. *Chemistry & biology* 14 (4), S. 443–451.
- Ley, J. de; Doudoroff, M. (1957): The Metabolism of D-Galactose in *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* 227, S. 745–757.
- Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Ermler, U.; Sundstrom, M. (1992): Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 °Å resolution. *The EMBO Journal* 11, S. 2373 – 2379.
- Liu, J.; Quinn, N.; Berchtold, G. A.; Walsh, C. T. (1990): Overexpression, purification and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. *Biochemistry* 29 (6), S. 1417–1425.
- López-Iglesias, M.; Méndez-Sánchez, D.; Gotor-Fernández, V. (2016): Native Proteins in Organic Chemistry. Recent Achievements in the use of non Hydrolytic Enzymes for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Current Organic Chemistry* 20 (11), S. 1204–1221.
- MacGee, J.; Doudoroff, M. (1954): A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *Journal of biological chemistry* 210 (2), S. 617–626.
- Meganathan, R.; Bentley, R. (1983): Thiamine pyrophosphate requirement for o-succinylbenzoic acid synthesis in *Escherichia coli* and evidence for an intermediate. *Journal of Bacteriology* 153 (2), S. 739–746.
- Meganathan, R. (Hg.) (1996): Biosynthesis of the isoprenoid quinones menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q). in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology (Neidhardt, F.C. (Hsg.), Curtiss R., Ingraham, J.L.; Lin, E. C.C.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W. S.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umberger H. E. (ed.). American Society for Microbiology, Washington, D.C., S. 642-656.
- Meganathan, R. (2001): Biosynthesis of menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q). A perspective on enzymatic mechanisms. In: Gerald Litwack (Hg.): Cofactor biosynthesis. A mechanistic perspective, Bd. 61. San Diego, Calif.: Acad. Press (Vitamins and hormones, 61), S. 173–218.
- Meshalkina, L. E.; Kochetov, G. A.; Hübner, G.; Tittmann, K.; Golbik, R. (2009): Steric and electronic properties of the cofactor's amino group control the lifetime of the central carbanion/enamine intermediate in transketolase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 (1-2), S. 67–72.
- Meyer, D.; Neumann, P.; Ficner, R.; Tittmann, K. (2013): Observation of a stable carbene at the active site of a thiamin enzyme. *Nature chemical biology* 9 (8), S. 488–490.
- Meyer, D.; Neumann, P.; Koers, E.; Sijts, H.; Lüdtke, S.; Sheldrick, G. M.; Ficner, R.; Tittmann, K. (2012): Unexpected tautomeric equilibria of the carbanion-enamine intermediate in pyruvate oxidase highlight unrecognized chemical versatility of thiamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (27), S. 10867–10872.
- Meyer, D.; Neumann, P.; Parthier, C.; Friedemann, R.; Nemeria, N.; Jordan, F.; Tittmann, K. (2010): Double duty for a conserved glutamate in pyruvate decarboxylase. Evidence of the participation in stereoelectronically controlled decarboxylation and in protonation of the nascent carbanion/enamine intermediate. *Biochemistry* 49 (37), S. 8197–8212.
- Miller, J. E.; Backman, K. C.; O'Connor, M. J.; Hatch, R. T. (1987): Production of phenylalanine and organic acids by phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology* 2 (3), S. 143–149.

- Mitschke, L.; Parthier, C.; Schröder-Tittmann, K.; Coy, J.; Lüdtke, S.; Tittmann, K. (2010). The Crystal Structure of Human Transketolase and New Insights into Its Mode of Action. *Journal of Biological Chemistry* 285(41), S. 31559–31570.
- Moffatt, B. A.; Studier, F.W. (1987): T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49 (2), S. 221–227.
- Morton, R. K.; Wells, J. R. E. (1964): Isocitrate-Lyase and the Formation of α -Keto γ -Hydroxyglutaric Acid. *Oxalis* 201 (4918), S. 477–479.
- Mülhardt, C. (2009): Die Klonierung von DNA-Fragmenten. in: Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 139-168.
- Müller, R.; Breuer, M.; Wagener, A.; Schmidt, K.; Leistner, E. (1996): Bacterial production of transdihydroxycyclohexadiene carboxylates by metabolic pathway engineering. *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 4), S. 1005–1012.
- Müller, U.; van Assema, F.; Gunsior, M.; Orf, S.; Kremer, S.; Schipper, D.; Wagemans, A.; Townsend, C. A.; Sonke, T.; Bovenberg, R.; Wubbolts, M. (2006): Metabolic engineering of the *E. coli* L-phenylalanine pathway for the production of D-phenylglycine (D-Phg). *Metabolic Engineering* 8 (3), S. 196–208.
- Müller, M.; Gocke, D.; Pohl, M. (2009): Thiamin diphosphate in biological chemistry. Exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis. *The FEBS journal* 276 (11), S. 2894–2904.
- Müller, M. (2012): Recent Developments in Enzymatic Asymmetric C-C Bond Formation. *Advanced Synthesis and Catalysis* 354 (17), S. 3161–3174.
- Müller, M.; Sprenger, G. A.; Pohl, M. (2013): CC bond formation using ThDP-dependent lyases. *Current Opinion in Chemical Biology* 17 (2), S. 261–270.
- Muller, Y.; Schulz, G. (1993): Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 259 (5097), S. 965–967.
- Muller, Y. A.; Lindqvist, Y.; Furey, W.; Schulz, G. E.; Jordan, F.; Schneider, G. (1993): A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* 1 (2), S. 95–103.
- Murray, E. L.; Conway, T. (2005): Multiple regulators control expression of the Entner-Doudoroff aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187 (3), S. 991–1000.
- Nemeria, N.; Baykal, A.; Joseph, E.; Zhang, S.; Yan, Y.; Furey, W.; Jordan, F. (2004): Tetrahedral intermediates in thiamin diphosphate-dependent decarboxylations exist as a 1',4'-imino tautomeric form of the coenzyme, unlike the michaelis complex or the free coenzyme. *Biochemistry* 43 (21), S. 6565–6575.
- Neumann, P.; Tittmann, K. (2014). Marvels of enzyme catalysis at true atomic resolution: distortions, bond elongations, hidden flips, protonation states and atom identities. *Current Opinion in Structural Biology* 29, S. 122–133.
- Nishihara, H.; Dekker, E. E. (1972): Purification, substrate specificity and binding, -decarboxylase activity, and other properties of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *Journal of biological chemistry* 247 (16), S. 5079–5087.
- Ödman, P.; Wellborn, W. B.; Bommarius, A. S. (2004): An enzymatic process to α -ketoglutarate from l-glutamate. The coupled system l-glutamate dehydrogenase/NADH oxidase. *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (18), S. 2933–2937.
- Pan, J. G.; Rhee, J. S.; Lebeault, J. M. (1987): Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology Letters* 9 (2), S. 89–94.

- Pang, S. S.; Duggleby, R. G.; Guddat, L. W. (2002): Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase. A target for herbicidal inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 317 (2), S. 249–262.
- Patel, H.; Nemeria, N. S.; Brammer, L. A.; Freil Meyers, C. L.; Jordan, F. (2012): Observation of thiamin-bound intermediates and microscopic rate constants for their interconversion on 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. 600-fold rate acceleration of pyruvate decarboxylation by D-glyceraldehyde-3-phosphate. *Journal of the American Chemical Society* 134 (44), S. 18374–18379.
- Patil, R. V.; Dekker, E. E. (1992): Cloning, nucleotide sequence, overexpression, and inactivation of the *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase gene. *Journal of Bacteriology* 174 (1), S. 102–107.
- Paulikat, M.; Wechsler, C.; Tittmann, K.; Mata, R. A. (2017): Theoretical Studies of the Electronic Absorption Spectra of Thiamin Diphosphate in Pyruvate Decarboxylase. *Biochemistry* 56 (13), S. 1854–1864.
- Payes, B.; Laties, G. G. (1963): The inhibition of several tricarboxylic acid cycle enzymes by γ -hydroxy- α -ketoglutarate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 10 (6), S. 460–466.
- Peekhaus, N.; Conway, T. (1998): What's for dinner? Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180 (14), S. 3495–3502.
- Pelludat, C.; Brem, D.; Heesemann, J. (2003): Irp9, Encoded by the High-Pathogenicity Island of *Yersinia enterocolitica*, Is Able To Convert Chorismate into Salicylate, the Precursor of the Siderophore Yersiniabactin. *Journal of Bacteriology* 185 (18), S. 5648–5653.
- Pohl, M.; Lingen, B.; Müller, M. (2002): Thiamin-Diphosphate-Dependent Enzymes. New Aspects of Asymmetric C-C Bond Formation. *Chemistry - A European Journal* 8 (23), S. 5288–5295.
- Pohl, M.; Sprenger, G. A.; Müller, M. (2004): A new perspective on thiamine catalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 15 (4), S. 335–342.
- Pohl, M.; Liese, A.; Editor: Patel, R. N. (2006): Industrial Processes Using Lyases for C-C, C-N and C-O Bond Formation. In: *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC Press, Boca Raton, USA, S. 661–676.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, *Nature* 258, S. 598–599.
- Prier, C. K.; Arnold, F. H. (2015): Chemomimetic biocatalysis. Exploiting the synthetic potential of cofactor-dependent enzymes to create new catalysts. *Journal of the American Chemical Society* 137 (44), S. 13992–14006.
- Priyadarshi, A.; Kim, E. E.; Hwang, K. Y. (2009a): Structural and functional analysis of Vitamin K2 synthesis protein MenD. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388 (4), S. 748–751.
- Priyadarshi, A.; Saleem, Y.; Nam, K. H.; Kim, K.-S.; Park, S.-Y.; Kim, E. E.; Hwang, K. Y. (2009b): Structural insights of the MenD from *Escherichia coli* reveal ThDP affinity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 380 (4), S. 797–801.
- Qin, M.; Song, H.; Dai, X.; Chan, C.-K.; Chan, W.; Guo, Z. (2018a). Single-Turnover Kinetics Reveal a Distinct Mode of Thiamine Diphosphate-Dependent Catalysis in Vitamin K Biosynthesis. *ChemBioChem* 19(14), S. 1514–1522.
- Qin, M.; Song, H.; Dai, X.; Chen, Y.; Guo, Z. (2018b): Two active site arginines are critical determinants of substrate binding and catalysis in MenD, a thiamine-dependent enzyme in menaquinone biosynthesis. *Biochemical Journal*, BCJ20180548.

- Ran, N.; Frost, J. W. (2007): Directed evolution of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase to replace 3-deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase. *Journal of the American Chemical Society* 129 (19), S. 6130–6139.
- Riedel, T. J.; Johnson, L. C.; Knight, J.; Hantgan, R. R.; Holmes, R. P.; Lowther, W. T. (2011): Structural and biochemical studies of human 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase. Implications for hydroxyproline metabolism in primary hyperoxaluria. *PLOS ONE* 6 (10), e26021.
- Riedel, T. J.; Knight, J.; Murray, M. S.; Milliner, D. S.; Holmes, R. P.; Lowther, W. T. (2012): 4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase inactivity in primary hyperoxaluria type 3 and glyoxylate reductase inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822 (10), S. 1544–1552.
- Rother (née Gocke), D.; Kolter, G.; Gerhards, T.; Berthold, C. L.; Gauchenova, E.; Knoll, M.; Pleiss, J.; Müller, M.; Schneider, G.; Pohl, M. (2011): S-Selective Mixed Carbonylation by Structure-Based Design of the Pyruvate Decarboxylase from *Acetobacter pasteurianus*. *ChemCatChem* 3 (10), S. 1587–1596.
- Sada, E.; Kumazawa, H.; Ikehara, Y.; Han, Z. Q. (1989): Chemical kinetics of the reaction of carbon dioxide with triethanolamine in non-aqueous solvents. *The Chemical Engineering Journal* 40 (1), S. 7–12.
- Sambrook, J. F.; Russell, D. W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Samland, A. K.; Sprenger, G. A. (2006): Microbial aldolases as C-C bonding enzymes—unknown treasures and new developments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71 (3), S. 253–264.
- Samland, A. K. (2012): Stereoselektive Knüpfung von C-C-Bindungen mit Aldolasen. *BIOspektrum* 18 (3), S. 254–256.
- Samland, A. K.; Sprenger, G. A.; Grunwald, Peter (Hg.) (2015): Chapter 21: Synthetic Potential of Dihydroxyacetone-Utilizing Aldolases, in: *Industrial biocatalysis*. Unter Mitarbeit von A. K. Samland und G. A. Sprenger. Boca Raton: Pan Stanford Publishing (Pan Stanford Series on Biocatalysis, vol. 1).
- Schapfl, M.; Baier, S.; Fries, A.; Ferlino, S.; Waltzer, S.; Müller, M.; Sprenger, G. A. (2018): Extended substrate range of thiamine diphosphate-dependent MenD enzyme by coupling of two C–C-bonding reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, S. 8359–8372.
- Schelhaas, M.; Waldmann, H. (1996): Schutzgruppenstrategien in der organischen Synthese. *Angewandte Chemie* 108 (18), S. 2192–2219.
- Schmidt, N. G.; Eger, E.; Kroutil, W. (2016): Building Bridges. Biocatalytic C-C-Bond Formation toward Multifunctional Products. *ACS Catalysis* 6 (7), S. 4286–4311.
- Schröder-Tittmann, K.; Meyer, D.; Arens, J.; Wechsler, C.; Tietzel, M.; Golbik, R.; Tittmann, K. (2013): Alternating sites reactivity is a common feature of thiamin diphosphate-dependent enzymes as evidenced by isothermal titration calorimetry studies of substrate binding. *Biochemistry* 52 (15), S. 2505–2507.
- Schörken, U.; Sprenger, G. A. (1998): Thiamin-dependent enzymes as catalysts in chemoenzymatic syntheses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1385 (2), S. 229–243.
- Schürmann, M.; Sprenger, G. A. (2001): Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *Journal of Biological Chemistry* 276 (14), S. 11055–11061.

- Schütz, A.; Golbik, R.; König, S.; Hübner, G.; Tittmann, K. (2005): Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrats. *Biochemistry* 44 (16), S. 6164–6179.
- Sehl, T.; Simon, R.; Hailes, H.; Ward, J.; Schell, U.; Pohl, M.; Rother, D. (2012): TTC-based screening assay for ω -transaminases: a rapid method to detect reduction of 2-hydroxy ketones. *Journal of Biotechnology* (159), S. 188–194.
- Seto, H.; Jinnai, Y.; Hiratsuka, T.; Fukawa, M.; Furihata, K.; Itoh, N.; Dairi, T. (2008): Studies on a new biosynthetic pathway for menaquinone. *Journal of the American Chemical Society* 130 (17), S. 5614–5615.
- Sharma, V.; Meganathan, R.; Hudspeth, M. E. (1993): Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the menC gene from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 175 (15), S. 4917–4921.
- Shelton, M. C.; Toone, E. J. (1995): Differential dye-ligand chromatography as a general purification protocol for 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolases. *Tetrahedron: Asymmetry* 6 (1), S. 207–211.
- Shelton, M. C.; Cotterill, I. C.; Novak, S. T. A.; Poonawala, R. M.; Sudarshan, S.; Toone, E. J. (1996): 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate Aldolases as Catalysts for Stereocontrolled Carbon-Carbon Bond Formation. *Journal of the American Chemical Society* 118 (9), S. 2117–2125.
- Song, H.; Dong, C.; Qin, M.; Chen, Y.; Sun, Y.; Liu, J.; Chan, W.; Guo, Z. (2016): A Thiamine-Dependent Enzyme Utilizes an Active Tetrahedral Intermediate in Vitamin K Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 138 (23), S. 7244–7247.
- Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Wiegert, W.; Grolle, S.; de Graaf, A. A.; Taylor, S. V.; Begley, T. P.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1997): Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24), S. 12857–12862.
- Sprenger, G. A.; Pohl, M. (1999): Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6 (3), S. 145–159.
- Sprenger, G. A.; Schürmann, M.; Schürmann, M.; Johnen, S.; Sprenger, G.; Sahm, H.; Inoue, T.; Schörken, U. (2007): C–C-Bonding Microbial Enzymes: Thiamine Diphosphate-Dependent Enzymes and Class I Aldolases, in: Catalytic Asymmetric Synthesis, Section 2.2; Editoren: Enders, D.; Jaeger, K.-E. In: Dieter Enders (Hg.): Asymmetric synthesis with chemical and biological methods. Weinheim: Wiley-VCH, S. 298–326.
- Steitz, J.-P. M. (2019): Characterisation of ThDP-dependent enzymes from the biosynthesis of longer-branched sugars. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, online pdf.
- Stetter, H.; Schreckenberger, M. (1973): Eine neue Methode zur Addition von Aldehyden an aktivierte Doppelbindungen. *Angewandte Chemie* 85 (2), S. 89.
- Studier, F.W. (1991): Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology* 219 (1), S. 37–44.
- Sudar, M.; Vasić-Rački, Đ.; Müller, M.; Walter, A.; Blažević, Z. F. (2018a): Mathematical model of the MenD-catalyzed 1,4-addition (Stetter reaction) of α -ketoglutaric acid to acrylonitrile. *Journal of Biotechnology* 268, S. 71–80.

- Sudar, M.; Dejanović, I.; Müller, M.; Vasić-Rački, Đ.; Blažević, Z. F. (2018b): Application of Chemical Engineering Methodology in Process Development: A Case Study of MenD-catalyzed Synthesis of 6-Cyano-4-oxohexanoic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 32 (4), S. 501-510.
- Sukumaran, J.; Hanefeld, U. (2.) y. (2005): Enantioselective C-C bond synthesis catalysed by enzymes. *Chemical Society Reviews* (34), S. 530–542.
- Tittmann, K. (2014): Sweet siblings with different faces. The mechanisms of FBP and F6P aldolase, transaldolase, transketolase and phosphoketolase revisited in light of recent structural data. *Bioorganic Chemistry* 57, S. 263–280.
- Tittmann, K.; Wille, G. (2009): X-ray crystallographic snapshots of reaction intermediates in pyruvate oxidase and transketolase illustrate common themes in thiamin catalysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 (1-2), S. 93–99.
- Turner, N. J. (2000): Applications of transketolases in organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 11 (6), S. 527–531.
- Vlahos, C. J.; Dekker, E. E. (1988): The complete amino acid sequence and identification of the active-site arginine peptide of *Escherichia coli* 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase. *The Journal of Biological Chemistry* 1988 (263), S. 11683–11691.
- Vogel, C.; Pleiss, J. (2014): The modular structure of ThDP-dependent enzymes. *Proteins* 82 (10), S. 2523–2537.
- Vogel, C.; Widmann, M.; Pohl, M.; Pleiss, J. (2012): A standard numbering scheme for thiamine diphosphate-dependent decarboxylases. *BMC Biochemistry* 13, S. 24.
- Waldmann, H.; Sebastian, D. (1994): Enzymic Protecting Group Techniques. *Chemical Reviews* 94 (4), S. 911–937.
- Walters, M. J.; Srikannathan, V.; McEwan, A. R.; Naismith, J. H.; Fierke, C. A.; Toone, E. J. (2008): Characterization and crystal structure of *Escherichia coli* KDPGal aldolase. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16 (2), S. 710–720.
- Walters, M. J.; Toone, E. J. (2007): Pyruvate aldolases in chiral carbon-carbon bond formation. *Nature Protocols* 2 (7), S. 1825–1830.
- Westphal, R.; Waltzer, S.; Mackfeld, U.; Widmann, M.; Pleiss, J.; Beigi, M.; Müller, M.; Rother, D.; Pohl, M. (2013a): (*S*)-Selective MenD variants from *Escherichia coli* provide access to new functionalized chiral α -hydroxy ketones. *Chemical communications (Cambridge, England)* 49 (20), S. 2061–2063.
- Westphal, R.; Hahn, D.; Mackfeld, U.; Waltzer, S.; Beigi, M.; Widmann, M.; Vogel, C.; Pleiss, J.; Müller, M.; Rother, D.; Pohl, M. (2013b): Tailoring the *S*-Selectivity of 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylate Synthase (MenD) from *Escherichia coli*. *ChemCatChem* 5 (12), S. 3587–3594.
- Westphal, R.; Jansen, S.; Vogel, C.; Pleiss, J.; Müller, M.; Rother, D.; Pohl, M. (2014a): MenD from *Bacillus subtilis*. A Potent Catalyst for the Enantiocomplementary Asymmetric Synthesis of Functionalized α -Hydroxy Ketones. *ChemCatChem* 6 (4), S. 1082–1088.
- Westphal, R.; Vogel, C.; Schmitz, C.; Pleiss, J.; Müller, M.; Pohl, M.; Rother, D. (2014b): A tailor-made chimeric thiamine diphosphate dependent enzyme for the direct asymmetric synthesis of (*S*)-benzoins. *Angewandte Chemie International Edition* 53 (35), S. 9376–9379.
- Widmann, M.; Radloff, R.; Pleiss, J. (2010): The Thiamine diphosphate dependent Enzyme Engineering Database. A tool for the systematic analysis of sequence and structure relations. *BMC Biochemistry* 11, S. 9.

Wilcocks, R.; Ward, O. P. (1992): Factors affecting 2-hydroxypropiophenone formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering* 39 (10), S. 1058–1063.

Windle, C. L.; Müller, M.; Nelson, A.; Berry, A. (2014): Engineering aldolases as biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 19, S. 25–33.

Wymer, N.; Buchanan, L. V.; Henderson, D.; Mehta, N.; Botting, C. H.; Pocivavsek, L.; Fierke, C. A.; Toone, E. J.; Naismith, J. H. (2001): Directed Evolution of a New Catalytic Site in 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconate Aldolase from *Escherichia coli*. *Structure* 9 (1), S. 1–9.

Zecevic, D.; Germer, P.; Walter, L.; Gauchenova, E.; Müller, M. (2018): Chemoenzymatic Access to Chiral Tetrols Produced by Thiamine Diphosphate Dependent Benzaldehyde Lyase. *European Journal of Organic Chemistry* 46, S. 6465-6468.

Zimmermann, F. T.; Schneider, A.; Schörken, U.; Sprenger, G. A.; Fessner, W.-D. (1999): Efficient multi-enzymatic synthesis of D-xylulose 5-phosphate. *Tetrahedron: Asymmetry* 10 (9), S. 1643–1646.

7 Anhang

DNA-Sequenzen

Sequenz für HOG-Aldolase Eda (*eda*):

*ATG(Startcodon)*ggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcggcgagccat*ATG(Startcodon)*aaaaactggaaaacaagtgcagaatcaatcctgaccaccggccgggtgtaccgggtatcgtggtaaaaaactggaacacgcgggtgccgatggcaaaagcgttggtgctgggtgggtgcgcggttctggaagtgactctgcgtaccgagtgagcagttgacgctatccgtgctatcgccaaagaagtgcctgaagcgattgtgggtgccgggtacgggtgctgaatccacagcagctggcagaagtcactgaagcgggtgcacagttcgcaattagcccgggtctgaccgagcggctgctgaagctgctaccgaaggactattcctctgattccggggatcagcactgtttccgaactgatgctgggtatggactacggttgaaagagttcaaatcttcccggctgaagctaacggcggcgtgaaagccctgcagcagcgcgggtccgttctcccaggtccgttctgcccagcgggtgtattctccggctaacctaccgtgactacctggcgtgaaaagcgtgctgtgcatcgggtggttctggtggtccggcagatgcgctggaagcgggcgattacgaccgcattactaagctggcgcgtgaagctgtagaaggcctaagctgTAA(Stopcodon)

Abbildung 7.1: Sequenz für das Gen *eda*, codierend die Aldolase Eda.

Das Gen wurde aus chromosomaler *E. coli*-DNA isoliert und in das Plasmid pET28a(+) mit Histidin-Tag (unterstrichen: 10×Histidin-Tag; kursiv, rot, unterstrichen: *Startcodon* des Histidin-Tag; kursiv und rot: *Startcodon* des Gens *eda*; rot: *Stopcodon*) kloniert (Baier, veröffentlicht in Schapfl *et al.*, 2018)).

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

Sequenz für Aldolase DgoA (*dgoA*)

agatct(AGATCT: BLG2)aagaaggagatat(RBS)cat *ATG(Startcodon)* (*EcoR* V: GATATC, *Nde* I: CATATG)

cagtggcaaaactaaactcccgtgatcgccattttgcgcggtattacgcccgacgagggcgtggcgcatgttggcgggtgattgacgccgggttcgacgcgggtgaaatcccgtgaattcccacaatgggagcaaaagcattcccgcattcgtgatcgctacggcgacaaggcgttgattggcgcaggtacgggtactgaaacctgaacaggtcgatgctgctgccaggtgggtgctcagctcatcgtacgcccataatccatagtgaaagtgatccgctgctgggtgggtacggcatgaccgtctgccccggctgctgcgacggcgaccgaagcctttaccgcgctcgaagcgggcgcgagggcgtgaaaatattccgtcctcggcttttggcggcaatacatcaaaagcgttaaagcgggtattgccatcggacatcgagctcttgcggttggcggcgtgacgccagaaaacctggcgcagtgatgatagacgagcgggttgagggggcgggcttaggcagcgtatctatcgcggggcaatccgtagagcaccgcgagcagggcagcagcattgttaagcgtatcgagaggcagtgcaaTGA(Stopcodon)ggatcc(*BamH* I:GGATCC)tcgag(*Xho* I:CTCGAG)aagctt(*Hind* III: AAGCTT)

Abbildung 7.2: Codonoptimierte Sequenz für das Gen *dgoA* (*dgoA/b4477*), codierend für die Aldolase DgoA.

Synthetisiert durch Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH. Die Sequenz wurde in das Plasmid pET28a(+) mit Histidin-Tag (Histidin-Tag ist im Plasmid codiert; kursiv und rot: *Startcodon* des Gens *dgoA*; rot: *Stopcodon*) kloniert.

Sequenz für MenD (*menD*):

ATG(Startcodon)ggccatcatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgacgacaagcat
ATG(Startcodon)tcagtaagcgcatttaaccgacgctggcggcgggtcattctggaagcattaacgcgtcacggcgtcag
acacatctgtatgccccaggctcgcgttctacaccgtaacgttagcggcggcggagaattccgattcattcaccacaccatt
tcgatgagcgtgggtggggcatctggcgtggggctggcgaagtcagcaagcagccggtggcgggtgattgtgacctcgg
cacggcgggtggcaaatctatccggcactgattgaagccgggtaaccggagaaaaactgattctctfaaccgccgatgccc
gccggagctaattgactgcggcgcgaatcaggcaattgccagccgggaatgttcctctcaccacgcacagatttcattg
ccgcgcccgaccagatccccgcacgttggtggttctaccatcgaccacgctctcggtagcctcatcgggggggagtc
catatcaactgccggttgctgaaccgctgtatggcgaatggacgataccgggcttagctggcaacagcgtctgggtgactggt
ggcaggacgacaaaccgtggctgcgtgaagcgcctcgtctggaaagtgaaaaacagcgcgactggttctctggcgacaaaa
gcgcggcgtggtggttggcggcgcgatgagtcgggaagaggcgaataaagtgcctgtggcgcaaaactcttgctggccg
ctgattggcgtgctgtcacaaccggcagccgctgcccgtgcccgatcttggtaggcaatgccaaagcaccagcagag
ctgacagcggcgaattgtggtgcaactgggaagcagcctgacgggaaacggctcctgcaatggcaggcaagctgtgaac
cagaagagtactggattgtgatgacattgaagggcagctgatccggcacaccatcgcgacgctccttaattgccaatattgcc
gactggctggagctgcatccggcagaaaaacgccagccctggtgctggtgaaatcccgcctggcggaacaggcaatgcag
gcggttattgcccgccgtgatgcttggcgaagcgcactggcgcacatcgcactatctgcctgaacaggggcaattgt
ttgttgtaacagcctggtggtacgtctgattgatgcgcttccgcaactccggcaggttaccgggttacagcaaccgtggggcc
agcggatcgacgggctgcttccgaccgccggcgttcagcgggcaagcggcaaacgacgctggcgattgtggcgatc
tctccgactttacgatctcaacgcgctggcgttattgctcaggttctgcgccgctggtattaattggtgtaacaacaacggcg
ggcaaatctctcgtggtgccaacgccgcaaacgagcgtgagcgttctatctgatgccaaaaacgtccattttgagcacgcc
gccgcatgctcagctgaaatatcatcgtccgcaaaactggcaggaactgaaacggcatttccgacgcctggcgcacgcc
aaccaccaggtgattgaaatggtggttaacgacaccgatggtgcgcaaacgctccagcaactctggcgcaggtgaaaccatt
aTGA(Stopcodon)

Abbildung 7.3: Sequenz von *menD*, codierend für MenD.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plasmid pET19b_*EcMenD* (Kurutsch *et al.*, 2009) eingesetzt (unterstrichen: 10×Histidin-Tag; kursiv, rot, unterstrichen: Startcodon des Histidin-Tag; kursiv und rot: *Startcodon* des Gens *menD*; rot: **Stopcodon**) (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

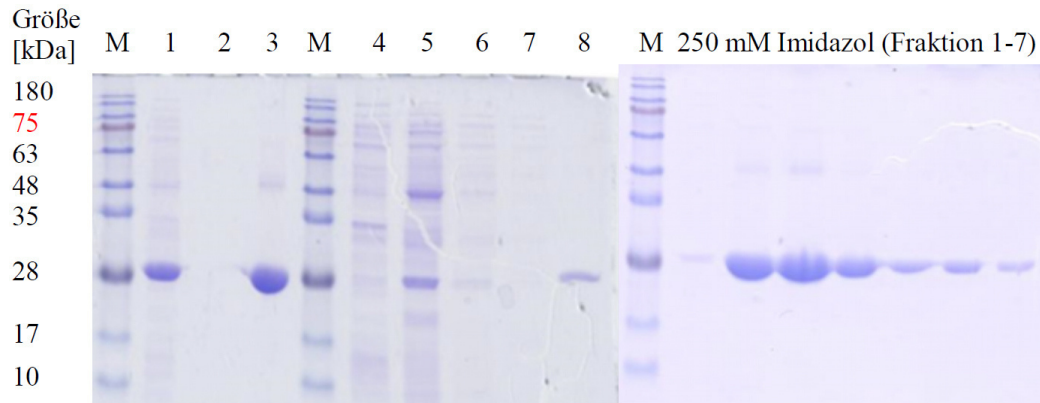
SDS-Gelelektrophorese

Abbildung 7.4: SDS-Gelelektrophorese-Analyse (12%) der Reinigung der Aldolase DgoA.

Linkes Gel: 1: Rohextrakt 2: nicht beladen, 3: reines Protein, 4: Durchlauf der Nickel-NTA-Säule nach Auftragen des Rohextraktes, 5: 10 mM, 6: 100 mM, 7: 500 mM, 8: 250 mM Imidazolhaltige-Fractionen, rechtes Gel: Reinigungsfraktionen der Elution mit 250 mM Imidazol im Reinigungspuffer. Als Größenvergleich wurde der Proteinstandard (M) BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics) verwendet.

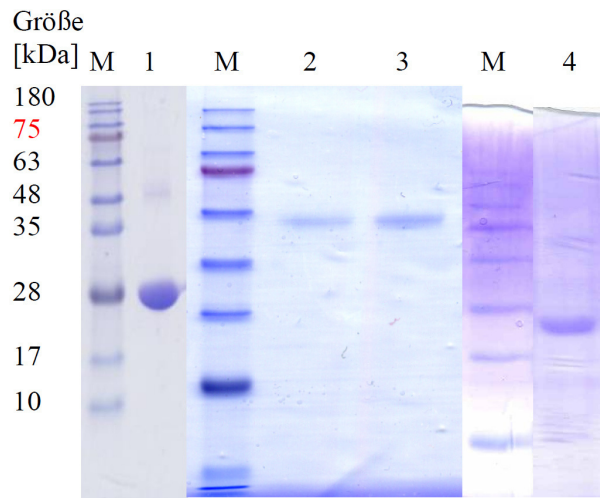


Abbildung 7.5: SDS-Gelelektrophorese-Analyse (12%) der gereinigten Enzyme Eda, EntC, MenD_WT und MenD_I474A_F475G.

1: Eda, 2: MenD_WT, 3: MenD_I474A_F475G, 4: EntC. Als Größenvergleich wurde der Proteinstandard (M) BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics) verwendet. (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

LC-MS-Chromatogramme

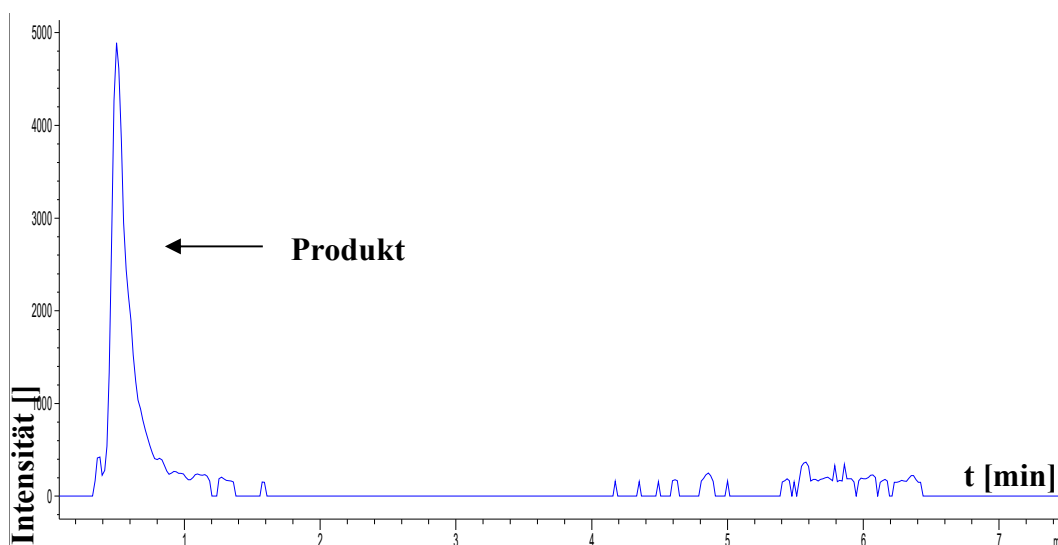


Abbildung 7.6: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL DgoA.

Standardreaktionsbedingung (SRB) 3: $v = 2.0$ mL, 50 mM Tris-HCl-Puffer + 10 mM $MgCl_2$, pH 8.0, 30 °C, 750 rpm; LC-MS, HILIC-Methode 2; extrahierte Ionen m/z 161.0; putatives Produkt: $M = 162.0$ g/mol, m/z 161.0, RT = 0.6 min

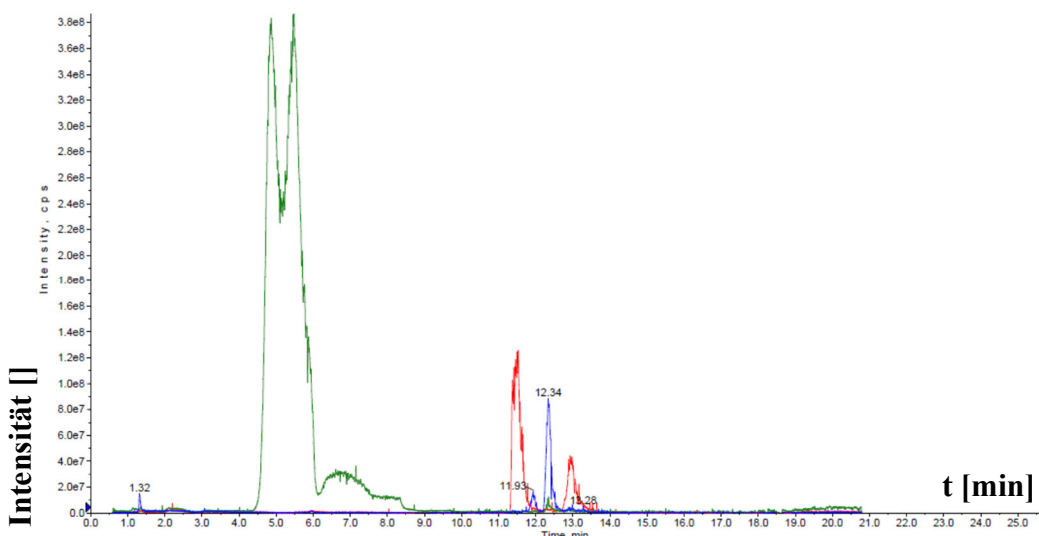


Abbildung 7.7: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 3 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: gebildet in Vorreaktion aus 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL DgoA, nach 2 h Zugabe von MenD und weitere 24 h Inkubation; SRB 1: $v = 2.0$ mL, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer + 0.1 mM ThDP + 2 mM $MgCl_2$, pH 8.0, 30 °C, 750 rpm; LC-MS: HILIC-Methode 1, extrahierte Ionen: grün: m/z 155.0 (**3**, $M = 156.0$ g/mol, RT = 5.5 min), rot: m/z 161.0 (**2b**, $M = 162.0$ g/mol, RT = 11.5 min); putative Produkte blau: m/z 273.0, $M = 274.2$ g/mol, MDHCHC (RT = 11.9 min) bzw. Iso-MDHCHC (RT = 12.3 min), isomerisches Produkt von MDHCHC (RT = 13.3 min)

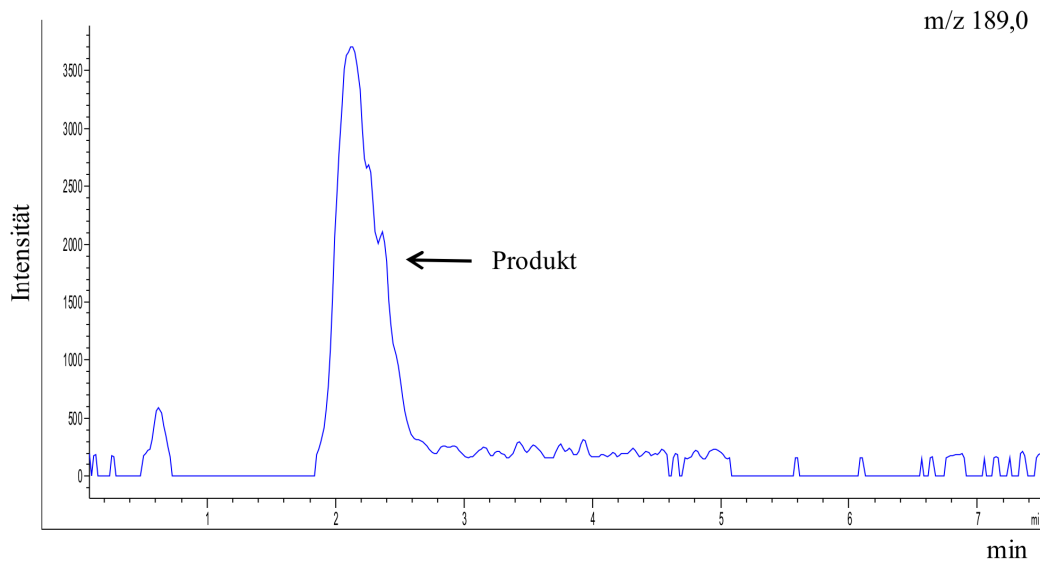


Abbildung 7.8: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 1: vgl. Abbildung 7.7; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 189.0; putatives Produkt: M = 190.1 g/mol, m/z 189.0, RT = 2.2 min

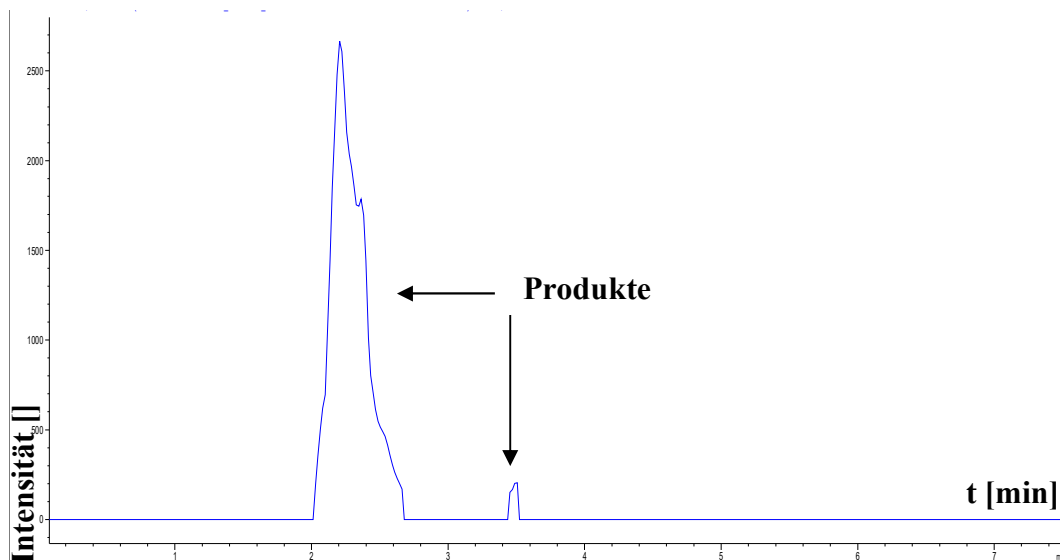


Abbildung 7.9: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 2: v = 2.0 mL, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer + 0.1 mM ThDP + 2 mM MgCl₂, pH 8.0, + 5% (v/v) MTBE, 30 °C, 750 rpm; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 223.0; putatives Produkt: M = 224.1 g/mol, m/z 223.0, RT = 2.2 min

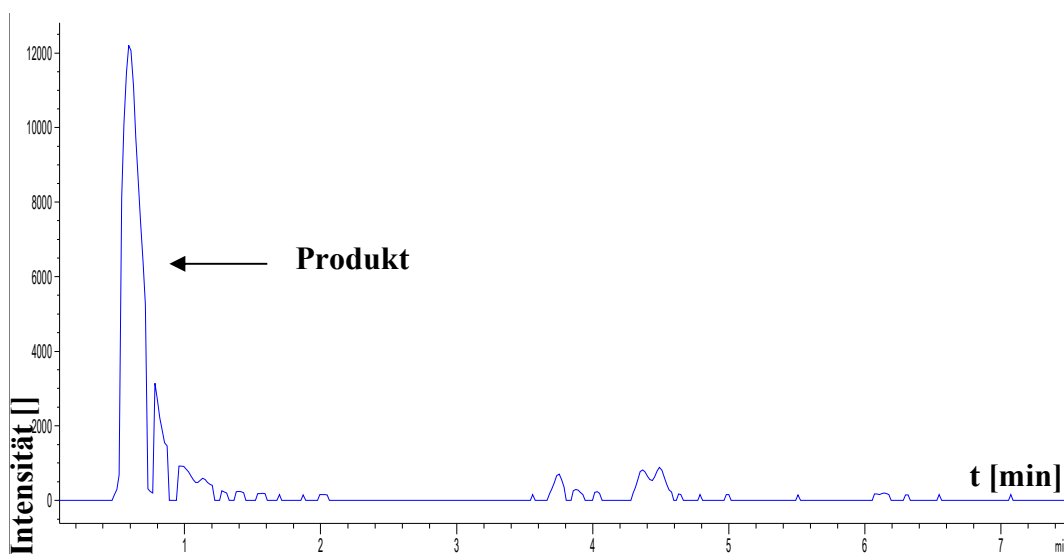


Abbildung 7.10: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 2: vgl. Abbildung 7.9; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 217.1; putatives Produkt: $M = 218.1$ g/mol, m/z 217.1, $RT = 0.6$ min

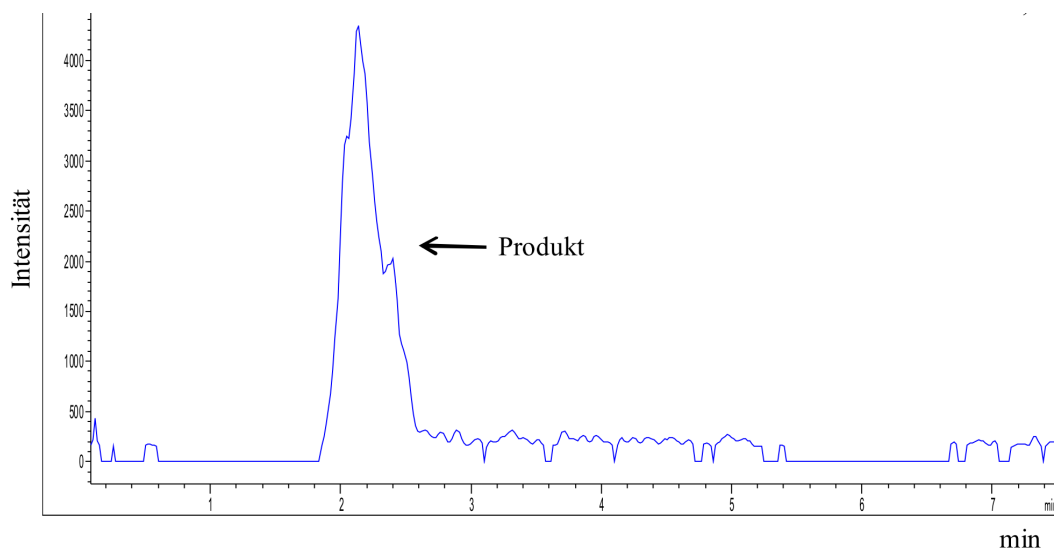


Abbildung 7.11: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 4 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 2: vgl. Abbildung 7.9; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 189.0; putatives Produkt: $M = 190.1$ g/mol, m/z 189.0, $RT = 2.2$ min

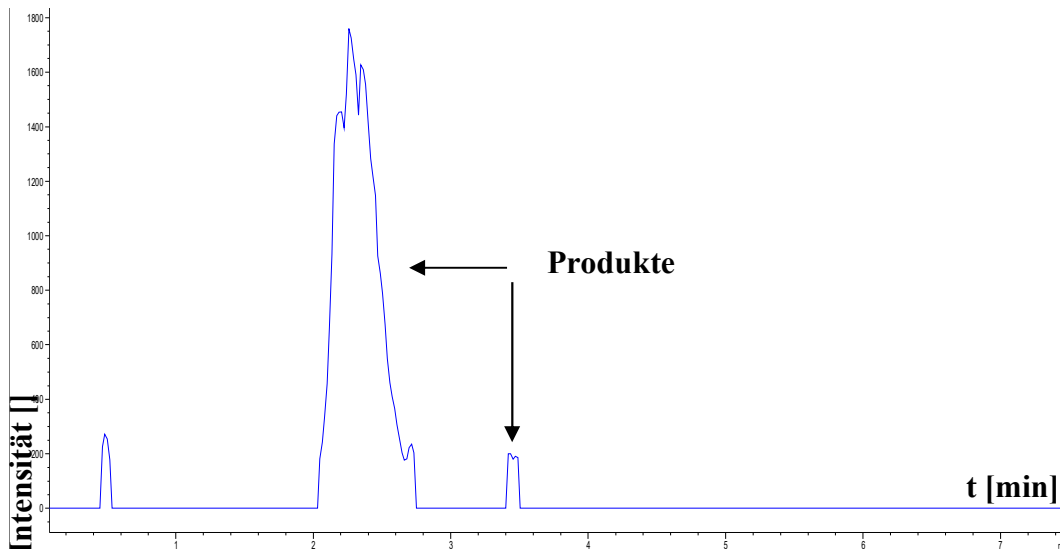


Abbildung 7.12: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 2: vgl. Abbildung 7.9; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 223.0; putatives Produkt: $M = 224.0$ g/mol, m/z 223.0, $RT = 2.4$ min und $RT = 3.4$ min

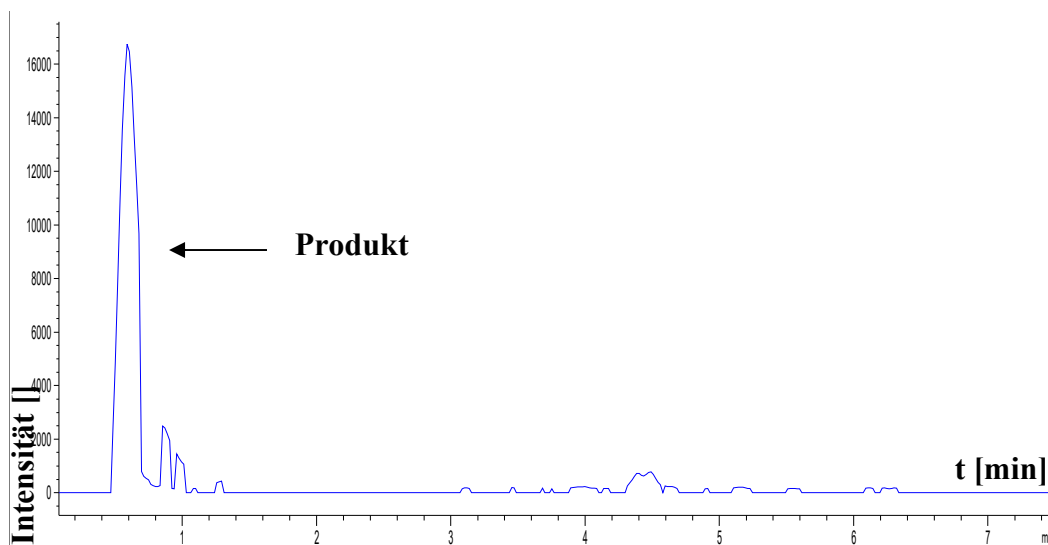


Abbildung 7.13: LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 6 mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G in einer Ein-Topf-Reaktion.

2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 2: vgl. Abbildung 7.9; LC-MS: Methode Multospher C18 b, extrahierte Ionen m/z 217.0; putatives Produkt: $M = 218.3$ g/mol, m/z 217.0, $RT = 0.6$ min

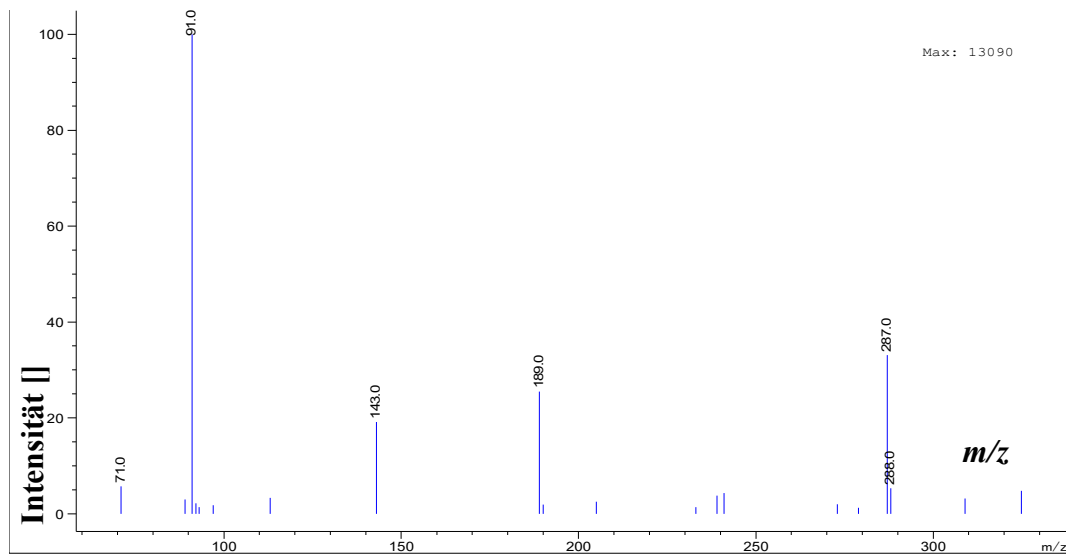
MS-Spektren

Abbildung 7.14: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.2 min aus Abbildung 3.20.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **4** mit 0.7 mg/mL MenD; Produkt: M-H 189.0

(Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

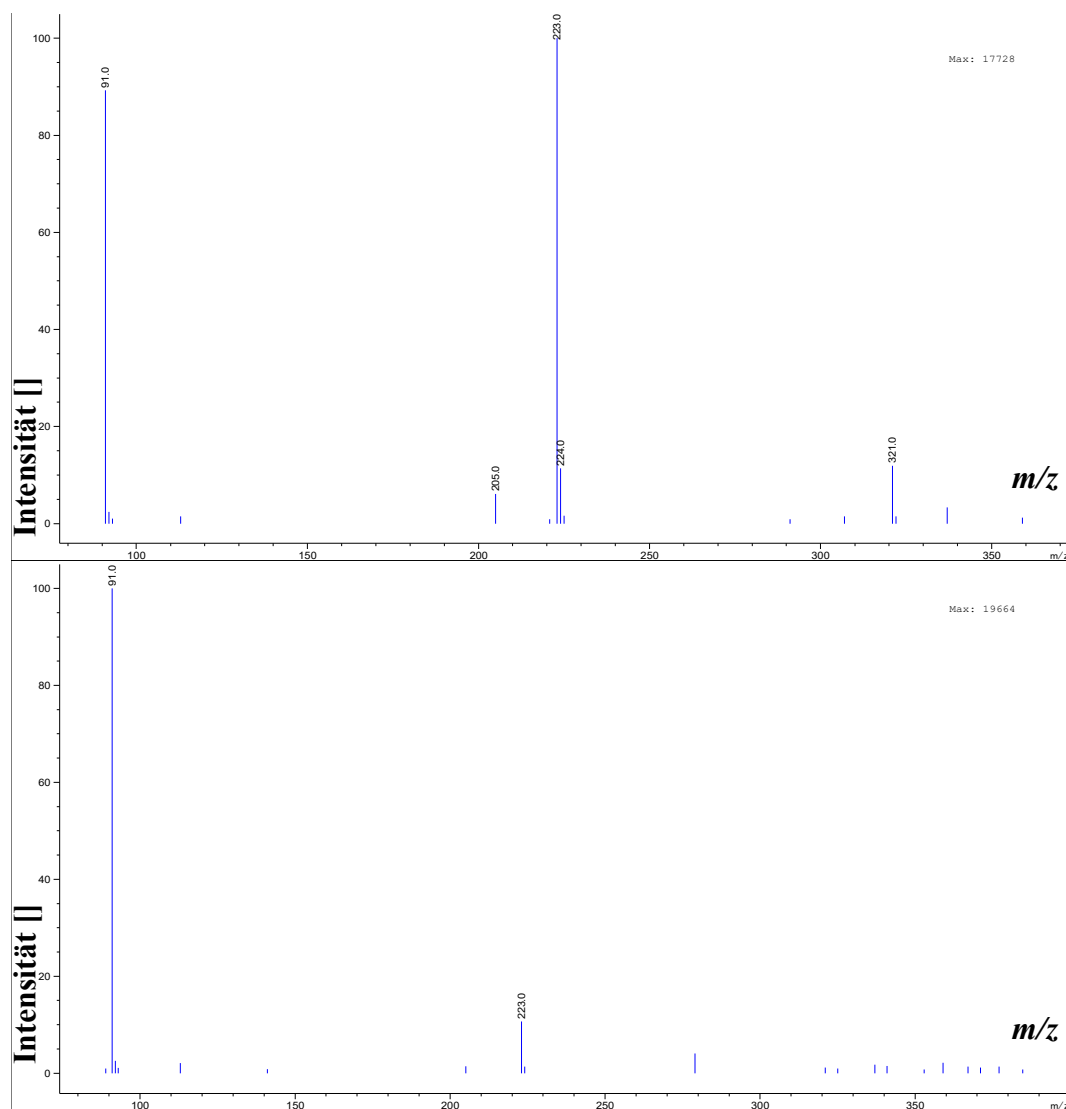


Abbildung 7.15: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.2 min (oben) bzw. mit RT = 3.4 min (unten) aus Abbildung 3.23.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **5** mit 0.7 mg/mL MenD; Produkt: M-H 223.0, M-H 224.0 (Isotopenverhältnis), M-H₂O-H 205.0 (Modifiziert und erweitert nach Schapfl *et al.*, 2018)

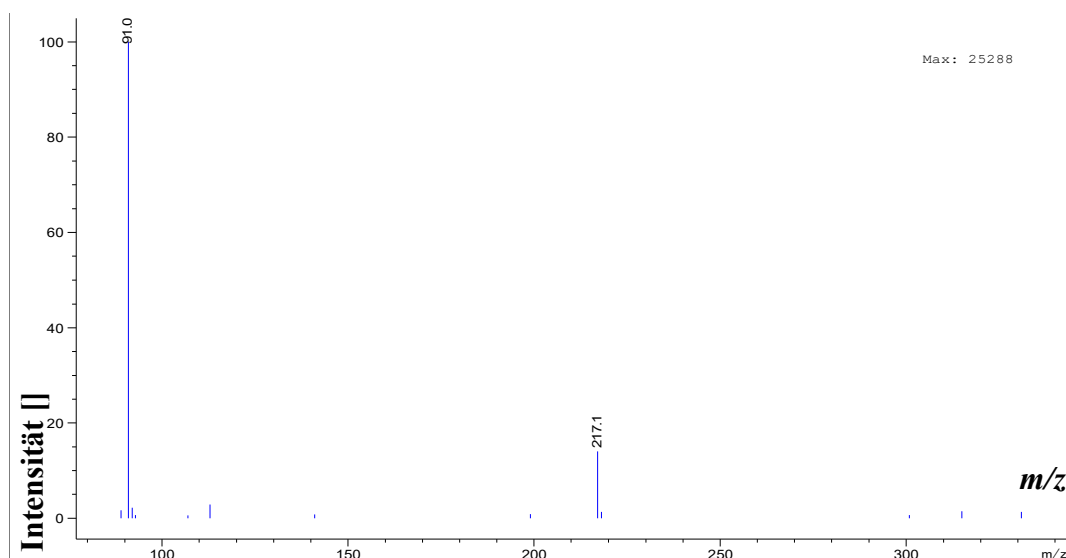


Abbildung 7.16: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 3.8 min aus Abbildung 3.27.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **6** mit 0.7 mg/mL MenD; Produkt: M-H 217.1; M-H 218.1 (Isotopenverhältnis)

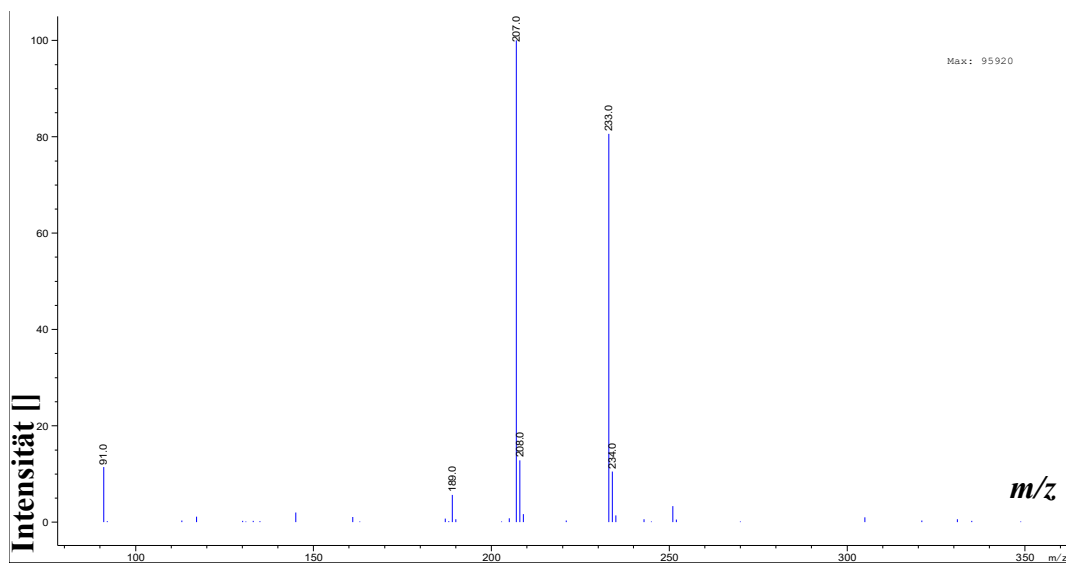


Abbildung 7.17: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 3.7 min aus Abbildung 3.28

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM **5** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G; Produkt: M-H 207.0 M-H 208.0 (Isotopenverhältnis)

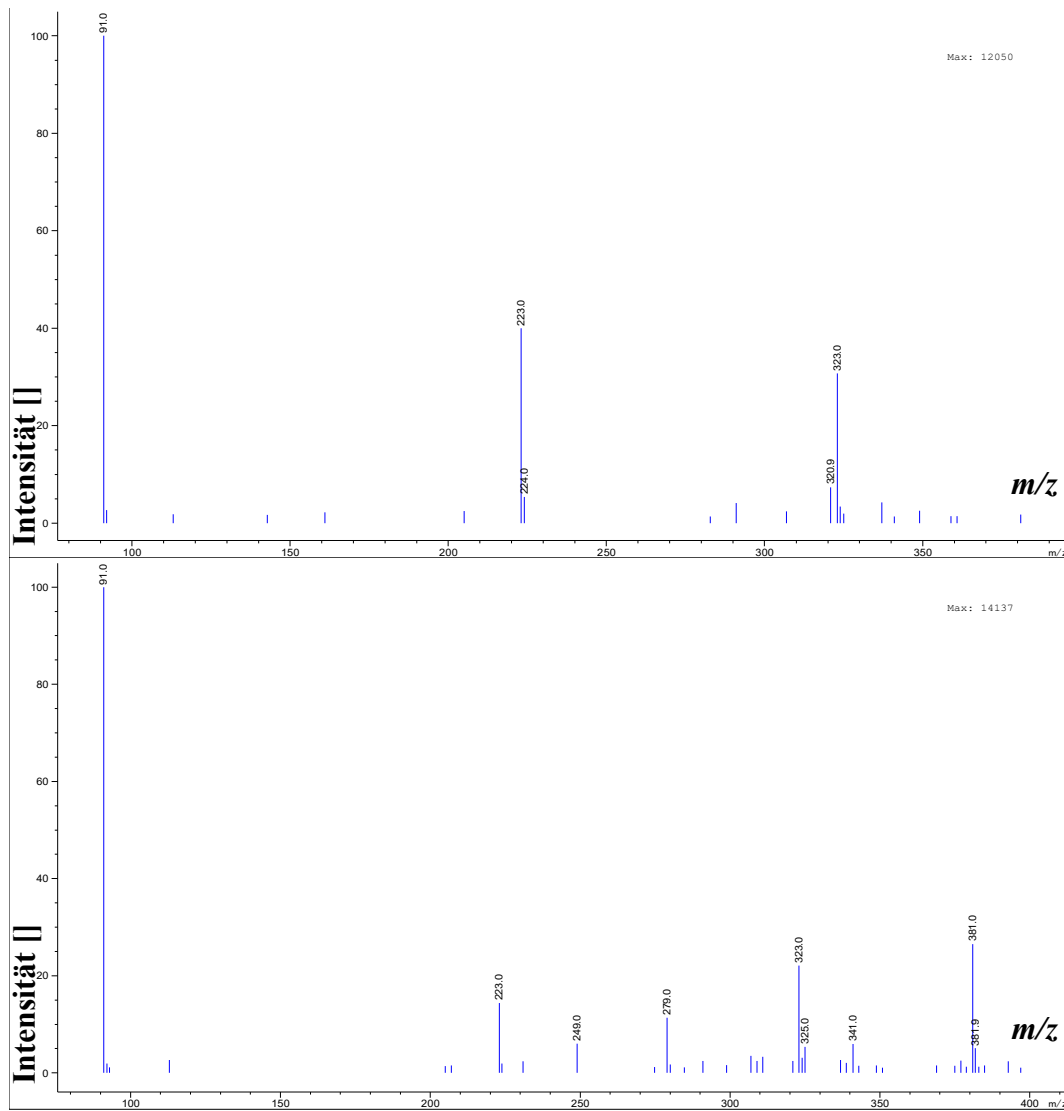


Abbildung 7.18: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.4 min (oben) bzw. mit RT = 3.4 min (unten) aus Abbildung 3.29.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **5** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G; Produkt: M-H 223.0, M-H 224.0 (Isotopenverhältnis), M-H₂O-H 205.0

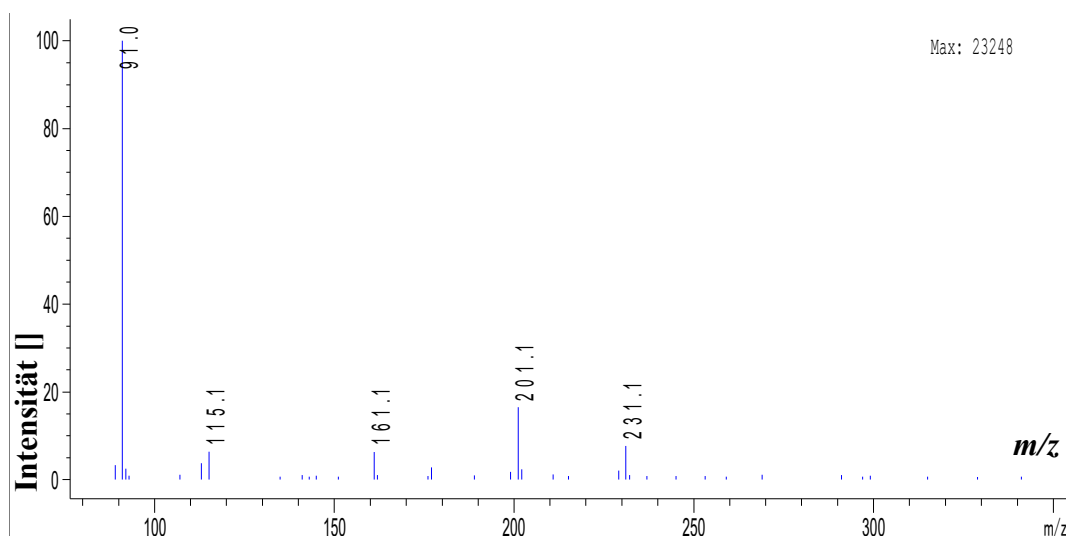


Abbildung 7.19: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 4.0 min aus Abbildung 3.31.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM **6** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G; Produkt: M-H: 201.1; M-H 202.2 (Isotopenverhältnis)

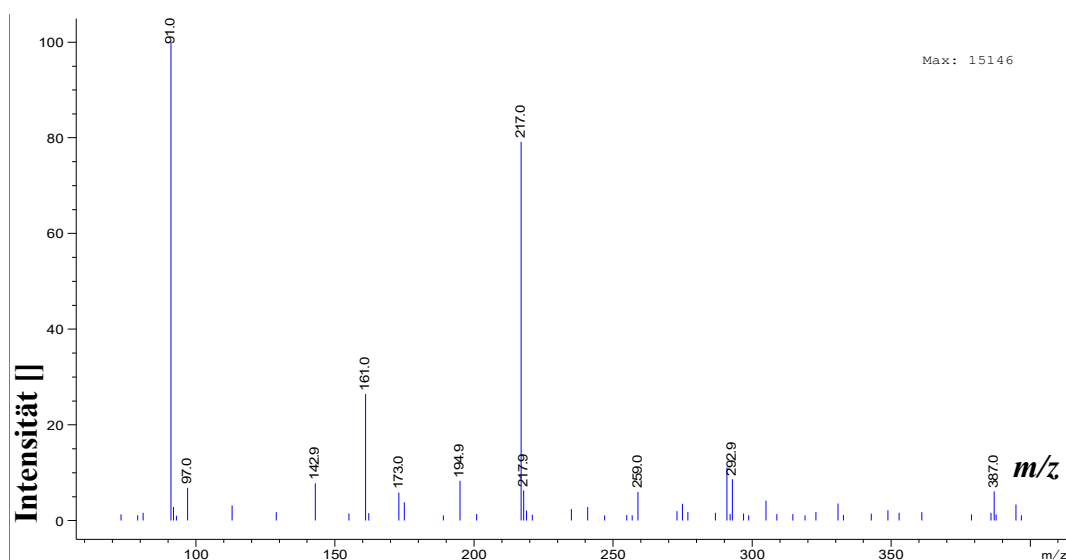


Abbildung 7.20: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 0.6 min aus Abbildung 3.32.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **6** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G (Produkt: M-H 217.0; M-H 217.9 (Isotopenverhältnis)

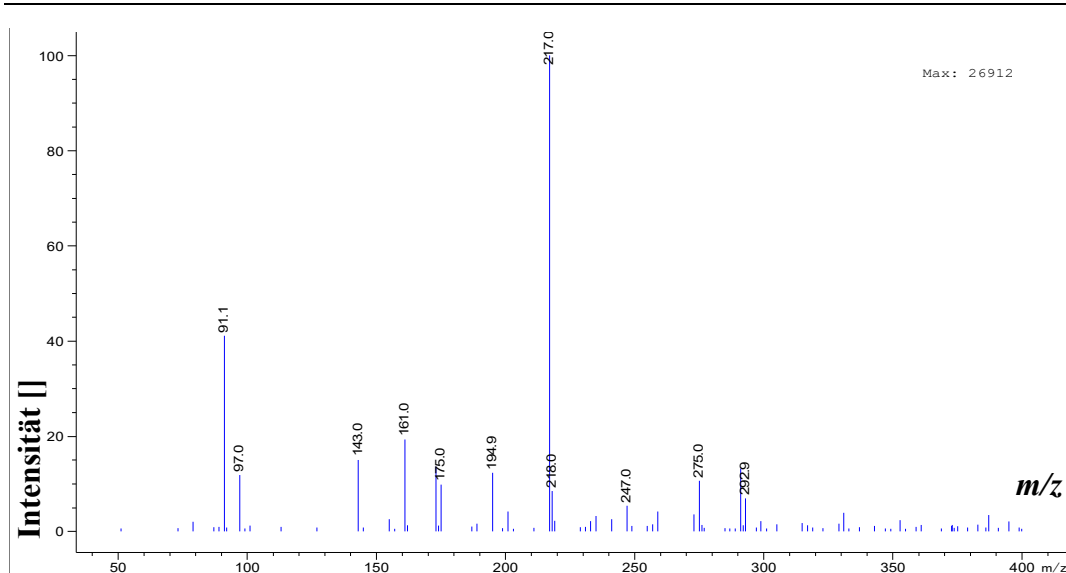


Abbildung 7.21: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 0.6 min aus Abbildung 3.34.

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **1** und 20 mM **4** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G; Produkt: M-H 173.0, M-H 174.0 (Isotopenverhältnis), M+Na-2H 194.9)

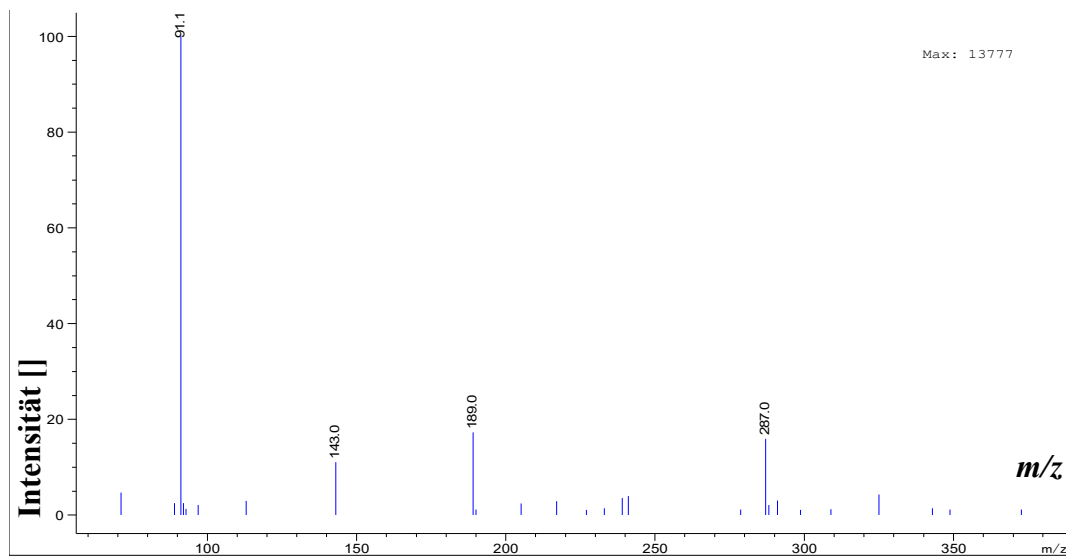


Abbildung 7.22: MS-Spektrum zum Signal mit RT = 2.2 min aus Abbildung 3.35

LC-MS-Chromatogramm nach 24 h Inkubation von 50 mM **2a** und 20 mM **4** mit 0.7 mg/mL MenD_I474A_F475G; Produkt: M-H 189.0

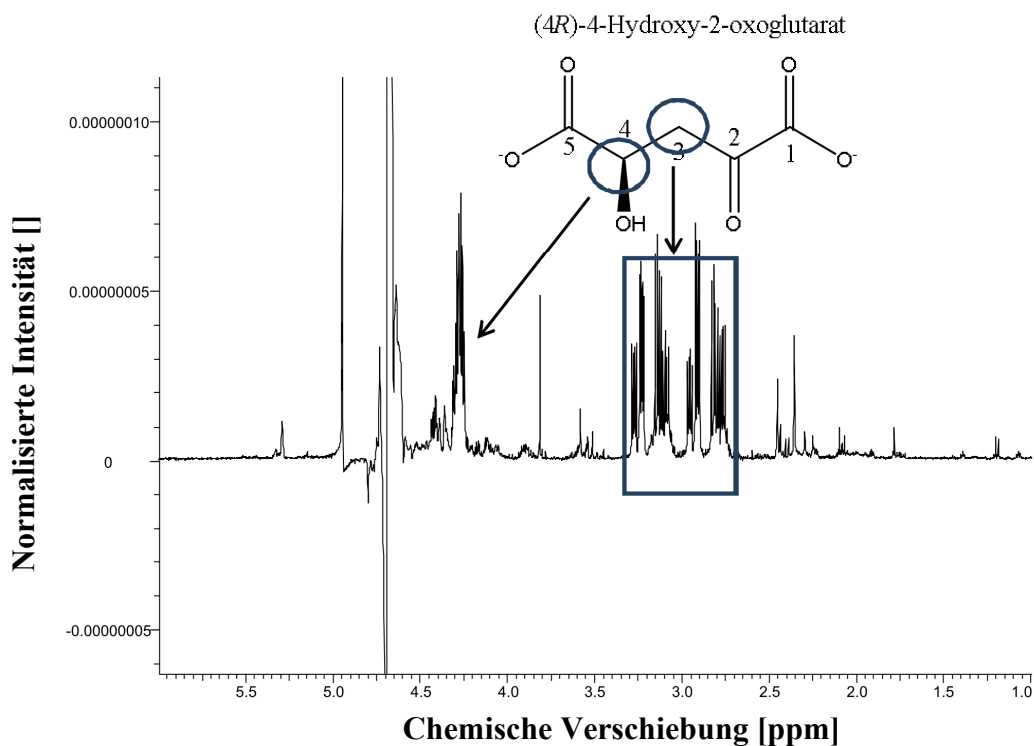
NMR-Spektren

Abbildung 7.23: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) nach 24 h Inkubation von 50 mM 7 und 100 mM 8 mit 0.2 mg/mL DgoA.

SRB 3: vgl. Abbildung 7.6

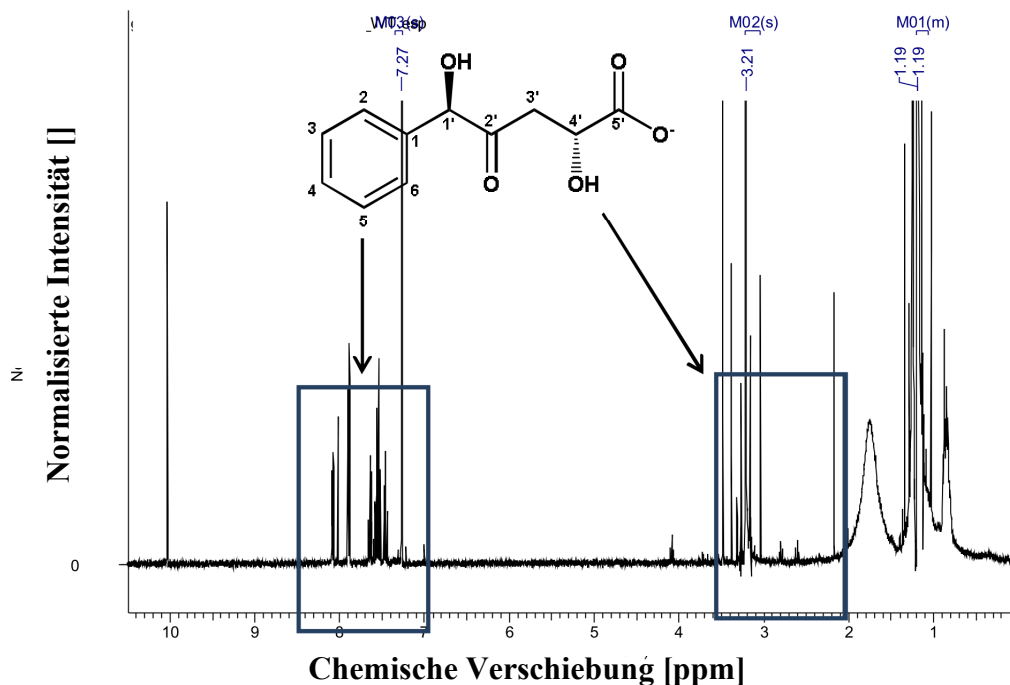


Abbildung 7.24: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) nach 24 h Inkubation von 50 mM 2b und 20 mM 5 mit 0.7 mg/mL MenD in einer Ein-Topf-Reaktion. 2b: vgl. Abbildung 7.7; SRB 2: vgl. Abbildung 7.9; Erwartete Signale des gebildeten Produktes sind durch ein Rechteck gekennzeichnet

Tabellen**Tabelle 7.1: ausgewählte ThDP-abhängige Enzyme.**

Enzym	Physiologische Funktion	Referenz
Acetohydroxysäure-Synthase I (AHAS I)	Biosynthese verzweigter Aminosäuren	Umbarger und Brown, 1958; Pang <i>et al.</i> , 2002; Duggleby <i>et al.</i> , 2003
Acetoindehydrogenase-komplex	anaerobe Acetyl-Coenzym A-Synthese	Oppermann <i>et al.</i> , 1991
Acetylacetylsynthase	Prodigiosin-Biosynthese	Williamson <i>et al.</i> , 2005
Benzaldehydlyase	Abbau von α -Hydroxyketonen	González und Vicuña, 1989; Mosbacher <i>et al.</i> , 2005
Benzoylformiat-decarboxylase (BFD)	Mandelsäureabbau	Hegeman, 1966; Polovnikova <i>et al.</i> , 2003
N ² -(2-Carboxyethyl)-Arginin-Synthase	Clavulansäuresynthese	Caines <i>et al.</i> , 2004
Cyclohexan-1,2-dionhydrolase	Katabolismus von 1,2-Diketonen	Fraas <i>et al.</i> , 2009; Loschonsky <i>et al.</i> , 2014a, b
1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP)-Synthase		Sprenger <i>et al.</i> , 1997; Schürmann <i>et al.</i> , 2002
Glyoxylatcarboligase	Metabolismus von Glyoxylat	Krakow <i>et al.</i> , 1961; Kaplun <i>et al.</i> , 2008
Indol-3-Pyruvat-decarboxylase	Metabolismus von Tryptophan	Asakawa <i>et al.</i> , 1968
“branched-chain 2-keto acid decarboxylase” KdcA	Metabolismus von Leucin	Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2007
α -Ketoglutarat-dehydrogenase	Citratzyklus	Kanzaki <i>et al.</i> , 1969; Jordan, 2003
α -Ketoisovalerat-decarboxylase	Umwandlung von α -Ketosäuren, die aus Aminosäuren entstanden, in Aldehyde	Plaza <i>et al.</i> , 2004
MenD	Menachinonbiosynthese	Meganathan und Bentley, 1983; Emmons <i>et al.</i> , 1985; Jiang <i>et al.</i> , 2007a
Phenylpyruvat-decarboxylase	Katabolismus aromatischer Aminosäuren; Auxinbildung	Asakawa <i>et al.</i> , 1968; Spaepen <i>et al.</i> , 2007
Phosphonopyruvat-decarboxylase	Bildung von Organophosphonaten, die als Antibiotika oder Herbizide dienen können	Johnen und Sprenger, 2009
Pyruvatdecarboxylase	alkoholische Gärung	Holzer <i>et al.</i> , 1956; Ullrich <i>et al.</i> , 1966; Bringer-Meyer und Sahn, 1988
Pyruvatdehydrogenase	Citratzyklus	Kanzaki <i>et al.</i> , 1969; Jordan 2003
Pyruvatferredoxinoxido-reduktase	anaerobe Acetyl-Coenzym A-Synthese	Chabrière <i>et al.</i> , 1999
Pyruvatoxidase	Acetylphosphat- bzw. Essigsäure-Synthese	Muller und Schulz, 1993
Sulphoacetaldehyd-Acetyltransferase	anaerober Taurin-Abbau	Ruff <i>et al.</i> , 2003
tertiäre Alkoholsynthase	Yersinose A-Biosynthese	Chen <i>et al.</i> , 1998; Mansoorabadi <i>et al.</i> , 2007; Lehwald <i>et al.</i> , 2010
Transketolase	Pentosephosphatweg	Schörken und Sprenger, 1998; Sprenger, 1995; Turner, 2000

Tabelle 7.2: ausgewählte Donorsubstrate ThDP-abhängiger Enzyme.

(KdcA = „branched-chain-ketosäure decarboxylase“, PDC = Pyruvatdecarboxylase, BFD = Benzoylformiat-decarboxylase, CDH = Cyclohexan-1,2-dion-hydrolase, DXP-Synthase = 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP)-Synthase, DHAS = Dihydroxyaceton-Synthase, BAL = Benzaldehydlyase, AHAS I = Acetohydroxy-säure-Synthase I)

Donorsubstrat	Enzym
Acetaldehyd	KdcA (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2007), PDC (Siegert <i>et al.</i> , 2005; Rosche <i>et al.</i> , 2001)
Benzoylformiat	BFD (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2008)
Butanal	PDC (Iding <i>et al.</i> , 1998)
Butan-2,3-dion	CDH (Loschonsky <i>et al.</i> , 2014a)
Ethanal	BFD (Iding <i>et al.</i> , 2000; Siegert <i>et al.</i> , 2005)
Hydroxypyruvat	DXP-Synthase (Sprenger <i>et al.</i> , 1997; Schürmann <i>et al.</i> , 2002), DHAS (Ro <i>et al.</i> , 1997), Transketolase (Kobori <i>et al.</i> , 1992)
Indolpyruvat	Indolpyruvatdecarboxylase (Schütz <i>et al.</i> , 2003)
Methylacetoin	Acetoin:Dichlorophenolindophenoloxidoreductase (Giovannini <i>et al.</i> , 2016a, b)
Methylketobutyrat	KdcA (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2007)
Methylpyruvat	CDH (Loschonsky <i>et al.</i> , 2014a)
2-Ketobutyrat	PigD (Dresen <i>et al.</i> , 2010)
2-Ketobutyrat	BFD (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2008), 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP) -Synthase (Sprenger <i>et al.</i> , 1997; Schürmann <i>et al.</i> , 2002), NzsH (Su <i>et al.</i> , 2016), Pyruvatdecarboxylase (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2009)
2-Ketoglutarat	MenD (Kurutsch <i>et al.</i> , 2009)
2-Ketoisocaproat	2-Ketoisovaleratdecarboxylase (Plaza <i>et al.</i> , 2004)
2-Ketomethylvalerat	2-Ketoisovaleratdecarboxylase (Plaza <i>et al.</i> , 2004)
Ketoisovalerat	2-Ketoisovaleratdecarboxylase (Plaza <i>et al.</i> , 2004)
2-Phenylpyruvat	2-Ketoisovaleratdecarboxylase (Plaza <i>et al.</i> , 2004)
2-Ketomethylthiobutyrat	2-Ketoisovaleratdecarboxylase (Plaza <i>et al.</i> , 2004)
Oxalacetat	MenD (Kurutsch <i>et al.</i> , 2009)
2-Oxoisovalerat	E1 Untereinheit der 2-Ketoglutaratdehydrogenase (Patel <i>et al.</i> , 2013)
2-Oxovalerat	E1 Untereinheit der 2-Ketoglutaratdehydrogenase (Patel <i>et al.</i> , 2013)
Phenylacetaldehyd	BAL (Sanchez-Gonzalez und Rosazza, 2003)
Phosphonopyruvat	Phosphonopyruvat-Decarboxylase (Zhang <i>et al.</i> , 2003)
Propanal	BFD (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2008), KdcA (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2007)
Pyruvat	CDH (Loschonsky <i>et al.</i> , 2014a), DXP-Synthase (Sprenger <i>et al.</i> , 1997; Schürmann <i>et al.</i> , 2002; Brammer und Meyers, 2009), EcaHAS I (Engel <i>et al.</i> , 2004), MenD (Kurutsch <i>et al.</i> , 2009), Phosphonopyruvatdecarboxylase (Zhang <i>et al.</i> , 2003), PigD (Dresen <i>et al.</i> , 2010), Pyruvatdecarboxylase (Rother née Gocke <i>et al.</i> , 2009), YerE (Lehwald <i>et al.</i> , 2010; Hampel <i>et al.</i> , 2018)
Sulfopyruvat	Phosphonopyruvatdecarboxylase (Zhang <i>et al.</i> , 2003)

Literatur zu Tabelle 7.1 und Tabelle 7.2:

- Asakawa, T.; Wada, H.; Yamano, T. (1968): Enzymatic conversion of phenylpyruvate to phenylacetate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 170 (2), S. 375–391.
- Brammer, L. A.; Meyers, C. F. (2009): Revealing substrate promiscuity of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Organic Letters* 11 (20), S. 4748–4751.
- Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. (1988): Acetoin and Phenylacetylcarbinol Formation by the Pyruvate Decarboxylases of *Zymomonas Mobilis* and *Saccharomyces Carlsbergensis*. *Biocatalysis and Biotransformation* 1 (4), S. 321–331.
- Caines, M. E. C.; Elkins, J. M.; Hewitson, K. S.; Schofield, C. J. (2004): Crystal structure and mechanistic implications of N²-(2-carboxyethyl)arginine synthase, the first enzyme in the clavulanic acid biosynthesis pathway. *Journal of biological chemistry* 279 (7), S. 5685–5692.
- Chabrière, E.; Charon, M. H.; Volbeda, A.; Pieulle, L.; Hatchikian, E. C.; Fontecilla-Camps, J. C. (1999): Crystal structures of the key anaerobic enzyme pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, free and in complex with pyruvate. *Nature structural biology* 6 (2), S. 182–190.
- Chen, H.; Guo, Z.; Liu, H.-W. (1998): Biosynthesis of Yersiniotriose. Attachment of the Two-Carbon Branched-Chain Is Catalyzed by a Thiamine Pyrophosphate-Dependent Flavoprotein. *Journal of the American Chemical Society* 120 (45), S. 11796–11797.
- Duggleby, R. G.; Pang, S. S.; Yu, H.; Guddat, L. W. (2003): Systematic characterization of mutations in yeast acetoacetyl-CoA synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *European Journal of Biochemistry* 270 (13), S. 2895–2904.
- Engel, S.; Vyazmensky, M.; Berkovich, D.; Barak, Z. 'e.; Chipman, D. M. (2004): Substrate range of acetoacetyl-CoA synthase I from *Escherichia coli* in the stereoselective synthesis of alpha-hydroxy ketones. *Biotechnology and Bioengineering* 88 (7), S. 825–831.
- Fraas, S.; Steinbach, A. K.; Tabbert, A.; Harder, J.; Ermler, U.; Tittmann, K.; Meyer, A.; Kroneck, P. M.H. (2009): Cyclohexane-1,2-dione hydrolase. A new tool to degrade alicyclic compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61 (1-2), S. 47–49.
- Giovannini, P. P.; Bortolini, O.; Massi, A. (2016a): Thiamine-Diphosphate-Dependent Enzymes as Catalytic Tools for the Asymmetric Benzoin-Type Reaction. *European Journal of Organic Chemistry* (26), S. 4441–4459.
- Giovannini, P. P.; Lerin, L. A.; Müller, M.; Bernacchia, G.; Bastiani, M. D.; Catani, M.; Di Carmine, G.; Massi, A. (2016b): (*S*)-Selectivity in Phenylacetyl Carbinol Synthesis Using the Wild-Type Enzyme Acetoin. Dichlorophenolindophenol Oxidoreductase from *Bacillus licheniformis*. *Advanced Synthesis and Catalysis* 358 (17), S. 2767–2776.
- González, B.; Vicuña, R. (1989): Benzaldehyde lyase, a novel thiamine PPI-requiring enzyme, from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Journal of Bacteriology* 171 (5), S. 2401–2405.
- Hampel, S.; Steitz, J. - P.; Baierl, A.; Lehwald, P.; Wiesli, L.; Richter, M.; Fries, A.; Pohl, M.; Schneider, G.; Dobritzsch, D.; Müller, M. (2018): Structural and Mutagenesis Studies of the Thiamine-Dependent, Ketone-Accepting YerE from *Pseudomonas protegens*. *ChemBioChem*, 19, 2283–2292.
- Hegeman, G. D. (1966): Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. 3. Isolation and properties of constitutive mutants. *Journal of Bacteriology* 91 (3), S. 1161–1167.
- Holzer, H.; Schultz, G.; Villarpalasi, C.; Juntgensell, J. (1956): Isolierung der Hefecarboxylase und Untersuchungen über die Aktivität des Enzyms in lebenden Zellen. *Biochemistry*. 5, S. 331–344.
- Jordan, F.; Nemeria, N. S.; Zhang, S.; Yan, Y.; Arjunan, P.; Furey, W. (2003): Dual catalytic apparatus of the thiamin diphosphate coenzyme. Acid-base via the 1',4'-iminopyrimidine tautomer along with its electrophilic role. *Journal of the American Chemical Society* 125 (42), S. 12732–12738.
- Kaplun, A.; Binshtein, E.; Vyazmensky, M.; Steinmetz, A.; Barak, Z. 'e.; Chipman, D. M.; Tittmann, K.; Shaanan, B. (2008): Glyoxylate carboligase lacks the canonical active site glutamate of thiamine-dependent enzymes. *Nature chemical biology* 4 (2), S. 113–118.

- Kobori, Y.; Myles, D. C.; Whitesides, G. M. (1992): Substrate specificity and carbohydrate synthesis using transketolase. *The Journal of Organic Chemistry* 57 (22), S. 5899–5907.
- Krakow, G.; Barkulis, S. S.; Hayashi, J.A. (1961): Glyoxylic acid carbonylase: an enzyme present in glycolate-grown *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 81(4), S. 509–518.
- Lehwald, P.; Richter, M.; Röhr, C.; Liu, H.-w.; Müller, M. (2010): Enantioselective intermolecular aldehyde-ketone cross-coupling through an enzymatic carbonylation reaction. *Angewandte Chemie International edition* 49 (13), S. 2389–2392.
- Loschonsky, S.; Wacker, T.; Waltzer, S.; Giovannini, P. P.; McLeish, M. J.; Andrade, S. L. A.; Müller, M. (2014a): Extended Reaction Scope of Thiamine Diphosphate Dependent Cyclohexane-1,2-dione Hydrolase. From C-C Bond Cleavage to C-C Bond Ligation. *Angewandte Chemie* 126 (52), S. 14630–14634.
- Loschonsky, S.; Waltzer, S.; Fraas, S.; Wacker, T.; Andrade, S. L. A.; Kroneck, P. M. H.; Müller, M. (2014b): Catalytic scope of the thiamine-dependent multifunctional enzyme cyclohexane-1,2-dione hydrolase. *ChemBioChem* 15 (3), S. 389–392.
- Mansoorabadi, S. O.; Thibodeaux, C. J.; Liu, H.-w. (2007): The diverse roles of flavin coenzymes—nature's most versatile thespians. *The Journal of Organic Chemistry* 72 (17), S. 6329–6342.
- Mosbacher, T. G.; Mueller, M.; Schulz, G. E. (2005): Structure and mechanism of the ThDP-dependent benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens*. *The FEBS journal* 272 (23), S. 6067–6076.
- Oppermann, F. B.; Schmidt, B.; Steinbüchel, A. (1991): Purification and characterization of acetoin, 2,6-dichlorophenolindophenol oxidoreductase, dihydrolipoamide dehydrogenase, and dihydrolipoamide acetyltransferase of the *Pelobacter carbinolicus* acetoin dehydrogenase enzyme system. *Journal of Bacteriology* 173 (2), S. 757–767.
- Patel, H.; Shim, D. J.; Farinas, E. T.; Jordan, F. (2013): Investigation of the donor and acceptor range for chiral carbonylation catalyzed by the E1 component of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Journal of molecular catalysis. B, Enzymatic* 98, S. 42–45.
- Plaza, M.; Fernández de Palencia, P.; Peláez, C.; Requena, T. (2004): Biochemical and molecular characterization of alpha-ketoisovalerate decarboxylase, an enzyme involved in the formation of aldehydes from amino acids by *Lactococcus lactis*. *FEMS microbiology letters* 238 (2), S. 367–374.
- Polovnikova, E. S.; McLeish, M. J.; Sergienko, E. A.; Burgner, J. T.; Anderson, N. L.; Bera, A. K.; Jordan, F.; Kenyon, G. L.; Hasson, M. S. (2003): Structural and kinetic analysis of catalysis by a thiamin diphosphate-dependent enzyme, benzoylformate decarboxylase. *Biochemistry* 42 (7), S. 1820–1830.
- Ro, Y. T.; Eom, C. Y.; Song, T.; Cho, J. W.; Kim, Y. M. (1997): Dihydroxyacetone synthase from a methanol-utilizing carboxydobacterium, *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803. *Journal of Bacteriology* 179 (19), S. 6041–6047.
- Rosche, B.; Sandford, V.; Breuer, M.; Hauer, B.; Rogers, P. (2001): Biotransformation of benzaldehyde into (*R*)-phenylacetylcarbinol by filamentous fungi or their extracts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (3), S. 309–315.
- Rother née Gocke, D.; Nguyen, C. L.; Pohl, M.; Stillger, T.; Walter, L.; Müller, M. (2007): Branched-Chain Keto Acid Decarboxylase from *Lactococcus lactis* (KdcA), a Valuable Thiamine Diphosphate-Dependent Enzyme for Asymmetric C-C Bond Formation. *Advanced Synthesis and Catalysis* 349 (8-9), S. 1425–1435.
- Ruff, J.; Denger, K.; Cook, A. M. (2003): Sulphoacetaldehyde acetyltransferase yields acetyl phosphate. Purification from *Alcaligenes defragrans* and gene clusters in taurine degradation. *Biochemical Journal* 369 (Pt 2), S. 275–285.
- Sanchez-Gonzalez, M.; Rosazza, J. P. N. (2003): Mixed Aromatic Acylol Condensations with Recombinant Benzaldehyde Lyase. Synthesis of α -Hydroxydihydrochalcones and Related α -Hydroxy Ketones. *Advanced Synthesis and Catalysis* 345 (67), S. 819–824.
- Schürmann, M.; Schürmann, M.; Sprenger, G. A. (2002): Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, S. 247–252.

- Schütz, A.; Golbik, R.; Tittmann, K.; Svergun, D. I.; Koch, M. H. J.; Hübner, G.; König, S. (2003): Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *European Journal of Biochemistry* 270 (10), S. 2322–2331.
- Siegert, P.; McLeish, M. J.; Baumann, M.; Iding, H.; Kneen, M. M.; Kenyon, G. L.; Pohl, M. (2005): Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Protein engineering, design & selection: PEDS* 18 (7), S. 345–357.
- Spaepen, S.; Versées, W.; Gocke, D.; Pohl, M.; Steyaert, J.; Vanderleyden, J. (2007): Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 189 (21), S. 7626–7633.
- Sprenger, G. A. (1995): Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology* 164 (5), S. 324–330.
- Su, L.; Lv, M.; Kyeremeh, K.; Deng, Z.; Deng, H.; Yu, Y. (2016): A ThDP-dependent enzymatic carbonylation reaction involved in Neocarazostatin A tricyclic carbazole formation. *Organic & biomolecular chemistry* 14 (37), S. 8679–8684.
- Ullrich, J.; Wittorf, J. H.; Gubler, C. J. (1966): Molecular weight and coenzyme content of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* 113 (3), S. 595–604.
- Umbarger, H. E.; Brown, B. (1958). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate. *Journal of biological Chemistry* 233, S. 1156–1160.
- Williamson, N. R.; Simonsen, H. T.; Ahmed, R. A. A.; Goldet, G.; Slater, H.; Woodley, L.; Leeper, F. J.; Salmond, G. P. C. (2005): Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*. Identification of a novel 2-methyl-3-n-amylo-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology* 56 (4), S. 971–989.
- Zhang, G.; Dai, J.; Lu, Z.; Dunaway-Mariano, D. (2003): The phosphonopyruvate decarboxylase from *Bacteroides fragilis*. *Journal of biological chemistry* 278 (42), S. 41302–41308.

Tabelle 7.3: Ermittelte Retentionszeiten der Substrate und Produkte für die mit MenD katalysierten Reaktionen.

Wenn nicht anders angegeben, wurde zur Katalyse der Reaktionen MenD zugegeben (HPLC-Methoden siehe Tabelle 2.21; Daten zum Teil veröffentlicht in Schapfl *et al.*, 2018)

Substanz bzw. Reaktionsprodukt	Methode	RT	M	m/z	UV-Maxima
		[min]	[g/mol]	[]	[nm]
2a	HILIC 2	0.6	162.0	161.0	
2b	HILIC 2	0.6	162.0	161.0	
Chorismat	Luna C18	10.2	226.2	225	197, 281
Chorismat	Multospher C18 a	0.8	226.2	225	197, 281
Isochorismat	Luna C18	9.5	226.2	225	194, 214, 281
Isochorismat	Multospher C18 a	6.7	226.2	225	194, 214, 281
Hydroxybenzoat	Luna C18	10.4			205, 256
SHCHC	Luna C18	8.3	240	239	196, 291
SHCHC	Multospher C18 a	1.2	240	239	196, 291
SEPHCHC	Multospher C18 a	6.5	328.3	327	-
MHCHC (gebildet aus 2a)	Luna C18	7.6	256	255	196, 292
MHCHC (gebildet aus 2a)	Multospher C18 a	1.4	256	255	196, 292
MEPHCHC (gebildet aus 2a)	Multospher C18 a	8.0	344.3	343.0	-
MHCHC (gebildet aus 2b)	Luna C18	7.6	256	255	196, 292
SHCHC MenD I474A F475G	Luna C18	8.3	240	239	194, 220, 290
MHCHC (gebildet aus 2a) MenD I474A F475G	Luna C18	7.5	256	255	209, 292
MHCHC (gebildet aus 2b) MenD I474A F475G	Luna C18	7.5	256	255	206, 292
3	Luna C18	6.5	156	155	196, 288
3	Multospher C18 a	1.0	156	155	196, 288
3	HILIC 1	4.6	156	155	196, 288
SDHCHC	Multospher C18 a	3.9	258.2	256.8	geringe UV-Absorption
Iso-SDHCHC	Multospher C18 a	2.9	258.2	256.8	geringe UV-Absorption
SDHCHC-Isomer (Struktur nicht bestimmt)	Multospher C18 a	5.0	258.2	256.8	geringe UV-Absorption
MDHCHC	HILIC 1	11.9	274.2	273.1	geringe UV-Absorption
Iso-MDHCHC	HILIC 1	12.3	274	273.0	geringe UV-Absorption
MDHCHC-Isomer (Struktur nicht bestimmt)	HILIC 1	13.2	274	273.0	geringe UV-Absorption
Isochorismat + 2-Ketobutyrat + MenD	Luna C18	9.3			200, 290
Isochorismat + 3-Methyl-2- ketobutyrat + MenD	Luna C18	7.6			199, 292
Isochorismat + 7 + MenD	Luna C18	7.0			199, 285
Isochorismat + Oxalacetat + MenD	Luna C18	7.0			199, 285
Isochorismat + 8 + MenD	Luna C18	8.5			200, 290
HOPA	Multospher C18 b	0.5	132.1	131.0	
5 + HOPA + MenD	GC	6.0			
5 + HOPA + MenD	Multospher C18 b	2.3	194.2	193.0	
Salicylaldehyd	Luna C18	12.5	122.1		219, 256, 326
Salicylaldehyd + 1 + MenD	Luna C18	10.0	224.2	223.0	207, 218, 279
Salicylaldehyd + 1 + MenD	Multospher C18 b	3.4	224.2	223.0	
Salicylaldehyd + 2a + MenD	Luna C18	10.1			201, 279
Salicylaldehyd + 2a + MenD	Multospher C18 b	1.4	240.2	239.0	
3-Formylchromon	Luna C18	11.5	174.2	175.0	223, 300
3-Formylchromon (LC-MS im positiven Messmodus)	Multospher C18 b	3.8	174.2	175.0	
3-Formylchromon + 1 + MenD	Luna C18	10.6	276.2	275.0	226, 302
3-Formylchromon + 1 + MenD	Multospher C18 b	3.7	276.2	275.0	
3-Formylchromon + 1 + MenD	Multospher C18 b	3.9	276.2	275.0	
3-Formylchromon + 2a + MenD	Luna C18	10.5			227, 301
3-Formylchromon + 2a + MenD	Luna C18	12.6			215, 254, 321
3-Formylchromon + 2a + MenD	Multospher C18 b	3.5	292.0	291.0	

3-Formylchromon + 2b + MenD	Luna C18	10.5	292	291	227, 301
3-Formylchromon + 2b + MenD	Luna C18	12.6	292	291	215, 254, 321
3-Formylchromon + 2b + MenD	Multospher C18 b		292	291	Produkt nicht nachweisbar
3-Amino-2-formylchromon	Luna C18	11.4	189.2	188	203, 235, 264
3-Amino-2-formylchromon	Multospher C18 b	3.7	189.2	188.0	203, 235, 264
3-Amino-2-formylchromon + 1 + MenD	Luna C18	6.4	291.3	290	205, 259
3-Amino-2-formylchromon + 1 + MenD	Multospher C18 b	0.6	291.3	290	205, 259
3-Amino-2-formylchromon + 2a + MenD	Luna C18	6.4	307.3		205, 259
5 + 1 + MenD	Multospher C18 b	3.7	208.1	207.0	
5 + 1 + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	3.7	208.1	207.0	
5 + 2a + MenD	Multospher C18 b	2.2	224.1	223.0	
5 + 2a + MenD	Multospher C18 b	3.4	224.1	223.0	
5 + 2a + MenD	Multospher C18 b	2.2	224.1	223.0	
5 + 2a + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	2.4	224.1	223.0	
5 + 2a + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	3.5	224.1	223.0	
5 + 2b + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	2.4	224.1	223.0	
4	HILIC 2	0.5			
4 + 1 + MenD	Multospher C18 b	1.0	174.1	173.0	
4 + 1 + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	0.6	174.1	173	
4 + 2a + MenD	Multospher C18 b	2.2	190.1	189.0	
4 + 2b + MenD	Multospher C18 b	2.2	190.1	189.0	
4 + 2a + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	2.2	190.2	189.0	
4 + 2b + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	2.2	190.2	189.0	
6	HILIC 2	0.4			
6 + 1 + MenD	Multospher C18 b	3.9	202.1	201.1	
6 + 1 + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	4.0	202.1	201.1	
6 + 2a + MenD	Multospher C18 b	3.8	218.1	217.1	
6 + 2b + MenD	Multospher C18 b	0.6	218.1	217.1	
6 + 2a + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	0.6	218.1	217.1	
6 + 2b + MenD I474A F475G	Multospher C18 b	0.6	218.1	217.1	