

Enzymatischer Zugang zu mittelkettigen Dicarbonsäuren

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

Vorgelegt von
Konrad B. Otte
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof. Dr. Bernd Plietker
Vorsitzender: Prof. Dr. Elias Klemm
Tag der Verteidigung: 06.06.2014

**Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart
2014**

Titelbild

Exemplarische Darstellung des *E. coli* Ganzzellkatalysators mit der für die Herstellung von Azelainsäure verwendeten Multienzymkaskade. Die *E. coli* Zelle wurde mit der 3D-Modellierungssoftware Blender designt, chemische Formeln mit ChemBioDraw erstellt und beide Komponenten mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP und Microsoft PowerPoint zusammengefügt. Die Abbildung wurde in Kooperation mit Marko Kirtz erstellt und wurde bereits in abgeänderter Form als Titelbild der ChemCatChem Ausgabe 04/2014 verwendet.

Layout

Das verwendete L^AT_EX-Layout beruht auf einer Vorlage (lfb2report) des Instituts für Bildschirmtechnik LFB-Stuttgart, welches mit freundlicher Genehmigung von Eugen Leis modifiziert und verwendet wurde.

Folgende Publikationen wurden im Rahmen dieser Dissertation bereits veröffentlicht:

- „**Synthesis of 9-Oxononanoic Acid, a Precursor for Biopolymers**“; K. B. Otte, M. Kirtz, B. M. Nestl, B. Hauer. *ChemSusChem* **2013**, *6*, 21492156. doi: 10.1002/cssc.201300183.
- „**Whole-Cell One-Pot Biosynthesis of Azelaic Acid**“. K. B. Otte*, J. Kittelberger*, M. Kirtz, B. M. Nestl, B. Hauer. *ChemCatChem* **2013**. doi: 10.1002/cctc.201300787.
*) Beide Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Enzymatischer Zugang zu mittelkettigen Dicarbonsäuren“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled “Enzymatic access to medium chain dicarboxylic acids” is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 30.03.2014

– Konrad B. Otte –

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart im Zeitraum von Juli 2010 bis Februar 2014 angefertigt. Die Forschung war Teil des siebten europäischen Rahmenprogramms (EU FP7) namens *Bionexgen – Developing the Next Generation of Biocatalysts for Industrial Chemical Synthesis*, bestehend aus 17 verschiedenen Institutionen aus neun unterschiedlichen EU-Ländern.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernhard Hauer für die fabelhafte Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit. Des Weiteren danke ich Dr. Bettina M. Nestl für die ausgezeichnete Mitbetreuung sowie die hilfreichen und inspirierenden Diskussionen.

Für die Bereitstellung von Materialien und die freundliche externe Unterstützung möchte ich mich herzlichst bei Dr. Eric Althoff und Dr. Daniela Grabs von Arzeda, Dr. Andreas Vogel und Dr. Sebastian Bartsch von c-LEcta, Prof. Dr. Ivo Feussner, Dr. Sabine Rosahl, Dr. Ellen Hornung, Prof. Dr. Alan Brash und Prof. Dr. Kenji Matsui bedanken.

Für die angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich zudem bei Marko Kirtz, Elena Maurer, Jens Kittelberger, Andreas Müller, Timo Mantz und Janina Preißler bedanken, die mich zu unterschiedlichsten Stadien dieses Projekts unterstützten.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Biochemie für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die wunderbare Arbeitsatmosphäre danken. Für Pausen mit Kaffee und Tee, fordernde Diskussionen sowie Abenden mit Spaß und Kultur danke ich deshalb zusätzlich Björn, Sumire, Christian, Daniel, Bernd, Sven R., H. und B., Dennis, Jule, Stephan, Chris G. und K., Sebastian, Sabrina, Mina und Melanie, Philipp und Christine, Silke sowie Per-Olof.

Für die finanzielle Förderung dieser Arbeit danke ich der Europäischen Union (Bionexgen Nr. 266025) sowie dem Land Baden-Württemberg für die Gewährung eines Stipendiums nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG).

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für deren Freundschaft, Liebe und Unterstützung bedanken.

Wenn einer allein träumt, ist es nur ein Traum. Wenn viele gemeinsam träumen, ist das der Anfang einer neuen Wirklichkeit.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungen | 11 |
| Abstract | 15 |
| Zusammenfassung | 19 |
| 1 Einleitung | 23 |
| 1.1 Erneuerbare Rohstoffe in der chemischen Industrie | 23 |
| 1.2 Biopolymere | 24 |
| 1.3 Azelainsäure Pathway | 26 |
| 1.3.1 Lipoxygenasen | 27 |
| 1.3.2 Hydroperoxid-Lyasen | 29 |
| 1.3.3 Aldehyd-Dehydrogenasen | 32 |
| 1.4 Sebacinsäure Retro-Aldol Pathway | 33 |
| 1.4.1 Alkohol-Dehydrogenasen | 35 |
| 1.4.2 Hydratasen | 37 |
| 1.4.3 Aldolasen | 39 |
| 1.4.4 <i>de novo</i> Design von Enzymen | 41 |
| 1.5 Zielsetzung | 42 |
| 2 Material und Methoden | 45 |
| 2.1 Material | 45 |
| 2.1.1 Chemikalien | 45 |
| 2.1.2 Antikörper und Marker | 45 |
| 2.1.3 Enzyme und Puffer | 46 |
| 2.1.4 Kits | 48 |
| 2.2 Plasmide und Oligonukleotide | 48 |
| 2.2.1 Plasmide | 48 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.2 | Oligonukleotide | 50 |
| 2.3 | Medien und Zellkulturen | 51 |
| 2.3.1 | Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> | 51 |
| 2.3.2 | <i>E. coli</i> Stämme | 52 |
| 2.3.3 | Zellwachstum und Dauerkulturen | 52 |
| 2.4 | Methoden | 53 |
| 2.4.1 | Agarose-Gelelektrophorese | 53 |
| 2.4.2 | Biotransformationen und Analytik | 53 |
| 2.4.3 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 56 |
| 2.4.4 | Immunoblot | 57 |
| 2.4.5 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 58 |
| 2.4.6 | Mosher-Ester-Analyse | 58 |
| 2.4.7 | Plasmidtransformation und -entfernung | 59 |
| 2.4.8 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 60 |
| 2.4.9 | Proteinexpression | 61 |
| 2.4.10 | Restriktionsverdau | 63 |
| 2.4.11 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 63 |
| 2.4.12 | Klonierung von Expressionsvektoren | 64 |
| 2.4.13 | Ligation | 65 |
| 2.4.14 | Enzymassays | 65 |
| 2.4.15 | Zellaufschluss und Proteinaufreinigung | 67 |
| 2.5 | Synthesen | 69 |
| 2.5.1 | Synthese von 9-Oxononan- und 10-Oxodecansäure | 69 |
| 2.5.2 | Synthese von 12-Oxoölsäure | 71 |
| 2.5.3 | Synthese von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure | 74 |
| 3 | Ergebnisse | 79 |
| 3.1 | <i>In vitro</i> Herstellung von Azelainsäure | 79 |
| 3.1.1 | Herstellung und Charakterisierung von Intermediaten | 80 |
| 3.1.2 | Enzymscreening für die Machbarkeitsstudie | 80 |
| 3.1.3 | Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen Aktivitätsassay | 81 |
| 3.1.4 | Untersuchung der <i>As</i> -ALDH1 Reaktion | 83 |
| 3.1.5 | Simultane Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion | 84 |
| 3.1.6 | Sukzessive Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion | 85 |
| 3.1.7 | pH-Abhängigkeit und Selektivität | 87 |
| 3.1.8 | Abhängigkeit von der Substratkonzentration | 87 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2 | <i>In vivo</i> Herstellung von Azelainsäure | 90 |
| 3.2.1 | Untersuchung der simultanen <i>St</i> -LOX1 und HPL Reaktion | 90 |
| 3.2.2 | Anpassung der Expressionslevel von <i>Cs</i> -9/13HPL | 93 |
| 3.2.3 | Untersuchung der Ganzzellreaktion | 93 |
| 3.2.4 | Konzentrationsabhängigkeit der Ganzzellreaktion | 95 |
| 3.3 | <i>In vitro</i> Herstellung von Sebacinsäure | 98 |
| 3.3.1 | Herstellung und Charakterisierung von Intermediaten | 99 |
| 3.3.2 | Oxidation von Ricinolsäure | 99 |
| 3.3.3 | Hydratisierung von 12-Oxoölsäure | 101 |
| 3.3.4 | Retro-Aldol C-C-Bindungsspaltung | 104 |
| 3.3.5 | Oxidation von 10-Oxodecansäure | 107 |
| 4 | Diskussion | 109 |
| 4.1 | <i>In vitro</i> Herstellung von Azelainsäure | 109 |
| 4.1.1 | Expression und Enzymaktivität | 110 |
| 4.1.2 | Selektivitätsaspekte der Multienzymkaskade | 111 |
| 4.1.3 | Bewertung des <i>in vitro</i> Gesamtprozesses | 113 |
| 4.2 | <i>In vivo</i> Herstellung von Azelainsäure | 114 |
| 4.2.1 | Hydroperoxid-Lyase vermittelte Inhibierung der Lipoxygenase | 114 |
| 4.2.2 | <i>E. coli</i> Ganzzellkatalyse und Bewertung | 116 |
| 4.2.3 | Massentransfer und Transport | 117 |
| 4.3 | <i>In vitro</i> Herstellung von Sebacinsäure | 119 |
| 4.3.1 | Biokatalytische Retrosynthese von Sebacinsäure | 119 |
| 4.3.2 | Die Alkohol-Dehydrogenase Reaktion | 123 |
| 4.3.3 | Die Oleat-Hydratase Reaktion | 123 |
| 4.3.4 | Die <i>de novo</i> Retro-Aldolase Reaktion | 124 |
| 4.3.5 | Die <i>As</i> -ALDH1 Reaktion | 126 |
| 4.3.6 | Bewertung der vierstufigen <i>in vivo</i> Kaskade | 127 |
| 5 | Resümee und Ausblick | 129 |
| A | Appendix | 133 |
| A.1 | Gensequenzen der verwendeten Enzyme | 133 |
| A.2 | Verwendete PCR-Programme | 146 |
| A.3 | Proteinexpression | 147 |
| A.4 | pH-Profil der <i>St</i> -LOX1 und 9/13HPL Reaktionen | 149 |
| A.5 | LOX/HPL Reaktion und Substratkonzentration | 151 |

| | | |
|-----------------------------|--|------------|
| A.6 | Klonierungsstrategie für das Dualexpressionssystem | 152 |
| A.7 | pH-Abhängigkeit der Ganzzellkatalyse | 153 |
| A.8 | pH-Optimum der <i>Em</i> -OAH1 Reaktion | 153 |
| A.9 | Ganzzellkatalyse und Substratkonzentration | 154 |
| A.10 | ADH-Screening von c-LEcta und ADH-Spezifität | 155 |
| Literaturverzeichnis | | 157 |
| Curriculum Vitae | | 175 |

Abkürzungen

| | |
|----------|---|
| μ - | <u>m</u> ikro ($\cdot 10^{-6}$) |
| 5-HMF | 5- <u>H</u> ydroxy <u>m</u> ethyl <u>f</u> urfural |
| ρ | Dichte (phys. Größe [g L^{-1}]) |
| δ | Chemische Verschiebung (phys. Größe [ppm]) |
| c_n | Stoffmengenkonzentration (phys. Größe [M oder mol L^{-1}]) |
| l | <u>L</u> änge (phys. Größe [m]) |
| m | <u>M</u> asse (phys. Größe [g]) |
| t | engl.: <u>t</u> ime (Zeit) (phys. Größe [s]) |
| V | <u>V</u> olumen (phys. Größe [L]) |
| a | Jahr (Latein: <u>a</u> nnum) |
| ADH | <u>A</u> lkohol- <u>D</u> ehydrogenase |
| ALDH | <u>A</u> ldehyd- <u>D</u> ehydrogenase |
| Amp | <u>A</u> mpicillin |
| AO | <u>A</u> lkohol- <u>O</u> xidase |
| AS | <u>A</u> minosäuren |
| ATP | <u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat |
| BCA | engl.: <u>b</u> icin <u>c</u> honinic <u>a</u> cid (Bicinchoninsäure) |
| BDH | β -Diketon-Hydrolase |
| bp | <u>B</u> asen <u>p</u> aare |
| BSTFA | <i>N,O</i> - <u>B</u> is(trimethylsilyl)trifluoro <u>a</u> ctamid |
| BVMO | <u>B</u> aeyer- <u>V</u> illiger- <u>M</u> ono <u>o</u> xxygenase |
| bzw. | <u>b</u> eziehu <u>n</u> gs <u>w</u> eise |
| cAMP | <u>C</u> yclisches <u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat |
| CDT | <u>C</u> yclododecat <u>r</u> ien |

| | |
|--------------------|--|
| CIP | <u>C</u> ahn- <u>I</u> ngold- <u>P</u> relog |
| Cm | <u>C</u> hloram <u>p</u> henicol |
| CV | engl.: <u>c</u> olumn <u>v</u> olume |
| ddH ₂ O | zweifach deionisiertes Wasser |
| DHAP | <u>D</u> ihydroxy <u>a</u> ceton <u>p</u> hos <u>p</u> hat |
| DMAB | 3-(<u>D</u> imethylamino)- <u>b</u> enzo <u>e</u> säure |
| DMSO | <u>D</u> imethylsul <u>f</u> ox <u>i</u> d |
| EDTA | <u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> acetat |
| FGI | engl.: <u>f</u> unctional <u>g</u> roup <u>i</u> nterconversion |
| FID | <u>F</u> lammenionisations <u>d</u> etektor |
| g | <u>G</u> ramm (phys. Einheit der Masse <i>m</i>) |
| GLV | engl.: <u>g</u> reen <u>l</u> eaf <u>v</u> olatiles (grüne Blattduftstoffe) |
| h | engl.: <u>h</u> our (Stunde) (phys. Einheit der Zeit <i>t</i>) |
| HODE | <u>H</u> ydroxyoctadecadi <u>e</u> n <u>sä</u> ure |
| HPL | <u>H</u> ydroperoxid- <u>L</u> yase |
| HPODE | <u>H</u> ydroperoxyoctadecadi <u>e</u> n <u>sä</u> ure |
| HRPO | <u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase |
| IAP | <u>I</u> nhibitor der <u>A</u> po <u>p</u> tose |
| IMAC | <u>I</u> mmobilisierte <u>M</u> etallaffinitäts <u>c</u> hromatographie |
| IPTG | <u>I</u> sopropyl- β - <u>D</u> - <u>t</u> hiogalactopyranosid |
| Kan | <u>K</u> anamycin |
| KDPG | 2- <u>K</u> eto-3- <u>d</u> esoxy-6- <u>p</u> hospho <u>g</u> luconat |
| L | <u>L</u> iter (phys. Einheit des Volumen <i>V</i>) |
| LB | engl.: lysogeny <u>b</u> roth |
| LOX | <u>L</u> ipoxygenase |
| M | <u>M</u> olar (phys. Einheit der Stoffmengenkonzentration <i>c_n</i>) |
| m | <u>M</u> eter (phys. Einheit der Länge <i>l</i>) |
| m- | <u>m</u> illi ($\cdot 10^{-3}$) |
| MBTH | 3- <u>M</u> ethylbenzothiazolon <u>h</u> ydrazon |
| min | <u>M</u> inute (phys. Einheit der Zeit <i>t</i>) |
| MOPS | 3-(<u>N</u> - <u>M</u> orpholino)- <u>p</u> ropansulfonsäure |
| MS | <u>M</u> assenspektrometrie |

| | |
|-------|--|
| MTBE | <u>M</u> ethyl- <u>t</u> ert- <u>b</u> utylether |
| MTPA | α - <u>M</u> ethoxy- α - <u>t</u> rifluoromethyl <u>p</u> henylessigsäure (engl.: - <u>a</u> cetic acid) |
| n- | <u>n</u> ano ($\cdot 10^{-9}$) |
| NAD | <u>N</u> icotin <u>a</u> mid <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid |
| NMR | engl.: <u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance |
| Nox | <u>N</u> ADH <u>O</u> xidase |
| OAH | <u>O</u> leat- <u>H</u> ydrtase |
| ORI | <u>o</u> ri <u>n</u> of <u>r</u> epl <u>i</u> cation |
| p- | <u>p</u> iko ($\cdot 10^{-12}$) |
| PAGE | <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> eleelektrophorese |
| PCR | engl.: <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PEG | <u>P</u> oly <u>e</u> thylenglycol |
| PEP | <u>P</u> hos <u>p</u> ho <u>e</u> no <u>l</u> pyruvat |
| PGA | engl.: <u>P</u> oly <u>g</u> lycolic <u>a</u> cid (Polyhydroxyessigsäure) |
| PHB | engl.: <u>P</u> oly <u>h</u> ydroxy <u>b</u> uttersäure |
| phys. | <u>p</u> hysik <u>a</u> lische |
| PLA | engl.: <u>P</u> oly <u>l</u> actic <u>a</u> cid (Polymilchsäure) |
| ppm | engl.: <u>p</u> arts <u>p</u> er <u>m</u> illion (phys. Einheit der Chemischen Verschiebung δ) |
| RBS | <u>R</u> ibosomen <u>b</u> indestelle |
| s | <u>S</u> ekunde (phys. Einheit der Zeit t) |
| SDS | engl.: <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate (Natriumdodecylsulfat) |
| SOB | engl.: <u>s</u> uper <u>o</u> ptimal <u>b</u> roth |
| t | <u>T</u> onne (1000 kg) |
| TAE | <u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA |
| TB | engl.: <u>t</u> errific <u>b</u> roth |
| TIM | <u>T</u> riosephosphat- <u>I</u> somerase |
| TMS- | <u>T</u> rimethyl <u>s</u> ilyl- |
| TMSH | <u>T</u> rimethyl <u>s</u> ulfonium <u>h</u> ydroxid |
| TRIS | <u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| YT | engl.: <u>y</u> east extract and <u>t</u> ryptone |
| z. B. | zum <u>B</u> eispiel |
| ü. N. | über <u>N</u> acht |

Abstract

The usage of renewable resources in the area of polymers and polymer compounds recently received increasing attention and is very attractive not only under ecological but also under economic aspects. Polymers derived from renewable resources display enhanced physico-chemical properties compared to their exclusively fossil-based counterparts. The natural functionalization of fats and oils allow potentially easy access to monomeric building blocks, which make the difference between simple plastics and high performance polymers. Especially in this regard the medium chain dicarboxylic acids, azelaic acid and sebacic acid, which serve as monomeric building blocks, are of particular interest.

Unfortunately, both dicarboxylic acids are only hard to obtain via traditional chemistry and alternatives would be desirable. The thesis at hand therefore addresses the establishment of new biotechnological routes, which enable alternative access to the desired monomeric building blocks.

Azelaic acid is produced from linoleic acid by a three-step multi-enzymatic cascade reaction, which is based on the plant oxylipin metabolism. The oxidative cleavage of linoleic acid is initialized by a 9-lipoxygenase (*St*-LOX1, *Solanum tuberosum*), which introduces molecular oxygen to generate a hydroperoxy moiety. In the second reaction the nascent hydroperoxide is cleaved by a 9/13-hydroperoxide lyase (*Cs*-9/13HPL, *Cucumis sativus*) in an aldehyde and an ω -oxoacid. In a last aldehyde dehydrogenase (*As*-ALDH1, *Acinetobacter* sp. M-1) catalyzed step the ω -oxoacid 9-oxononanoic acid is oxidized to azelaic acid. Based on the usage of two enantiocomplementary 9-lipoxygenases (*St*-LOX1 and *As*-9LOX) it could be shown that 9/13-hydroperoxide lyases are highly *S*-enantioselective, like the closely related 13-hydroperoxide lyases.

The determination of the ideal reaction conditions revealed that the coupled *St*-LOX1 and 9/13-HPL reaction can be performed over a relatively broad pH range. Unlike the lipoxygenase from *Glycin max* (*Gm*-LOX1), *St*-LOX1 does not form different regioisomers by a pH-dependent mechanism. Furthermore it was shown that the performance of the coupled lipoxygenase and hydroperoxide lyase reaction is dependent on the reaction setup. A successive setup, in which both enzymes were added consecutively, constantly resulted in a better reaction performance than the simultaneous setup, in which both enzymes were added at the same time. The whole *in vitro* cascade, including the last *As*-ALDH1 catalyzed oxidation step, could be performed with an overall yield of 69 %. In-depth investigation of the lipoxygenase activation behavior revealed that 9-hydroperoxy octadecadienoic acid is crucial for the activation of the lipoxygenase.

Consequently, in a simultaneous approach lipoxygenase and hydroperoxide lyase are competing for the same molecule. Lowering of the hydroperoxide lyase activity compared to the lipoxygenase activity ensured lipoxygenase activation and thus enabled the simultaneous reaction. Based on this observation a dual-expression system was developed, which served as foundation for an *E. coli* whole cell system. The characterization of the *E. coli* whole cell system revealed that endogenous *E. coli* aldehyde dehydrogenases are sufficient for the last oxidation step of 9-oxononanoic acid to azelaic acid. The resulting strain therefore is able to perform the direct one-pot bioconversion of linoleic acid into azelaic acid. The not optimized *E. coli* whole cell system afforded 29 mg mL^{-1} within 8 h with 34 % linoleic acid conversion and a selectivity of 47 %.

For the production of sebacic acid a retro-synthetic analysis was performed, which led to an artificial four-step multi-enzymatic cascade starting from ricinoleic acid. The central C-C cleavage reaction is hereby performed by a retro-aldol reaction. The necessary 1,3-ketol motif for the retro-aldol cleavage is formed beforehand by two enzyme catalyzed reactions. In a first step ricinoleic acid is oxidized by an alcohol dehydrogenase and subsequently converted to 10-hydroxy-12-oxostearic acid by the action of an oleate hydratase. 10-oxodecanoic acid, which emerges out of the retro-aldol reaction, is oxidized in a last step by an aldehyde dehydrogenase to sebacic acid.

As the proposed multi-enzymatic cascade represents an artificial metabolic pathway, the substrates and occurring intermediates greatly differ from natural substrates of potential enzyme candidates. Problems arising due to this difficulty were encountered by using state-of-the-art methods in biotechnology. The alcohol dehydrogenase reaction could be realized with a special commercially available alcohol dehydrogenase variant (ADH-102) from c-LEcta (Leipzig, DE). For the second step the substrate promiscuous reaction of the oleate hydratase *Em-OAH1* (*Elizabethkingia meningoseptica*) was exploited. The third reaction step was performed with a tailored *de novo* retro-aldolase from Arzeda (Seattle, US), as the target substrate differed too much from naturally occurring aldolase substrates. The presented retro-aldol reaction is not only the first reported practical application of *de novo* enzymes, beyond that the reaction showed no significant background reaction, which normally represents a requirement for *de novo* reactions. The last step, the oxidation of 10-oxodecanoic acid, can be performed with both an *E. coli* endogenous oxidoreductase and a special aldehyde dehydrogenase from *Acinetobacter* sp. M-1.

After the enzyme screening for all required reactions the proof-of-principle of the whole cascade could be successfully accomplished. Moreover, the stereopreferences of hydratase as well as retro-aldolase were investigated. The usage of the artificial substrate 12-oxooleic acid has no influence on the oleate hydratase *Em-OAH1* enantioselectivity.

No distinct enantioselectivity could be observed for the *de novo* aldolase RA 110.4. The whole four-step enzymatic cascade could be performed within 26 h with an overall yield of 10 %. Both presented multi-enzymatic cascades were realized successfully. Both pathways represent attractive biotechnological alternatives for the production of medium chain dicarboxylic acids. The shown systems do not exhibit a high productivity yet, but they show a great potential as no optimization steps of either enzymes or production strains were performed. A conclusive assessment of both systems is therefore only possible after optimization and successful upscaling, as biological systems are known to reveal their true merits and demerits. Certainly, with this work the foundation for alternative biotechnological processes for the production of medium chain dicarboxylic acids could be laid.

As concluding remark it should be mentioned here that the usage of biotechnological systems against this backdrop harbors additional advantages. Fats and oils from a natural source are built-up by a mixture of different fatty acids. Upon the usage of additional enzymes fatty acid interconversions could be performed. This would not only enhance the overall yield but also the switching to totally different starting materials or even mixtures.

Zusammenfassung

Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe im Bereich der polymeren Verbandsmaterialien ist nicht nur aus ökologischer, sondern auch aus ökonomischer Sicht sinnvoll. Die aus erneuerbaren Rohstoffen resultierenden Polymere zeichnen sich, im Vergleich zu den ausschließlich auf Erdöl basierenden Produkten, durch verbesserte physikochemische Eigenschaften aus. Durch ihre natürliche Funktionalisierung gewährleisten besonders Fette und Öle einfachen Zugang zu Monomeren, welche den Unterschied zwischen einem einfachen Kunststoff und einem Hochleistungspolymer ausmachen. In diesem Zusammenhang sind vor allem die mittelkettigen Dicarbonsäuren, Azelainsäure und Sebacinsäure von besonderem Interesse. Auf klassisch chemischem Weg sind die beiden Dicarbonsäuren nur schwierig zugänglich und Alternativen wünschenswert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit einem alternativen biotechnologischen Zugang zu den gesuchten Monomeren.

Ausgehend von Linolsäure wird Azelainsäure in einer dreistufigen Multienzymkaskade hergestellt, welche auf dem pflanzlichen Oxylinpmetabolismus basiert. Die oxidative Spaltung wird durch eine 9-Lipoxygenase (*St*-LOX1, *Solanum tuberosum*) eingeleitet, welche Linolsäure mit molekularem Sauerstoff hydroperoxidiert. In einer Folgereaktion wird das entstandene 9-Hydroperoxid durch eine 9/13-Hydroperoxid-Lyase (*Cs*-9/13HPL, *Cucumis sativus*) in ein Aldehyd und eine ω -Oxosäure gespalten. In einem letzten Aldehyd-Dehydrogenase (*As*-ALDH1, *Acinetobacter* Stamm M-1) katalysierten Schritt wird die ω -Oxosäure 9-Oxononansäure zu Azelainsäure oxidiert. In ersten *in vitro* Experimenten konnte durch die Verwendung von zwei enantiokomplementären Lipoxygenasen (*St*-LOX1 und *As*-9LOX) gezeigt werden, dass 9/13-Hydroperoxid-Lyasen, ebenso wie die verwandten 13-Hydroperoxid-Lyasen, über eine ausgeprägte *S*-Enantioselektivität verfügen.

Die Untersuchung der optimalen Reaktionsbedingungen ergaben, dass die gekoppelte *St*-LOX1 und 9/13-HPL Reaktion über einen relativ breiten pH-Bereich durchgeführt werden kann, da Regioselektivität der Lipoxygenase aus *Solanum tuberosum* im Gegensatz zu der Lipoxygenase aus *Glycin max* nicht über einen pH-abhängigen Mechanismus gesteuert wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion bei sukzessiver Zugabe beider Enzyme stets bessere Resultate lieferte als die simultane Zugabe der beiden Enzyme. Die gesamte *in vitro* Multienzymkaskade, einschließlich der *As*-ALDH1 Reaktion, konnte mit einer Gesamtausbeute von 69 % durchgeführt werden.

Eine eingehendere Untersuchung des Aktivierungsverhaltens der Lipoxygenase zeigte,

dass die 9-Hydroperoxyoctadecadiensäure für die Aktivierung der Lipoxygenase benötigt wird und in einem simultanen Reaktionsansatz folglich sowohl die Lipoxygenase als auch die Hydroperoxid-Lyase um das gleiche Molekül konkurrieren. Durch Verringerung der Hydroperoxid-Lyase Aktivität konnte die Aktivierung der Lipoxygenase gewährleistet und die simultane Reaktion realisiert werden. Auf Grundlage dieser Information wurde im Folgenden ein Dualexpressionssystem entwickelt, welches als Grundlage für ein *in vivo* *E. coli* Ganzellsystem verwendet wurde. Die Charakterisierung des *E. coli* Ganzzellkatalysators zeigte, dass endogene *E. coli* Aldehyd-Dehydrogenasen für die Oxidation von 9-Oxononansäure zu Azelainsäure verwendet werden können. Der entwickelte *E. coli* Stamm ist somit in der Lage, in einer Eintopfreaktion Linolsäure direkt zu Azelainsäure umzusetzen. Mit dem bisher nicht optimierten System konnten 34 % Linolsäure mit einer Selektivität von 47 % umgesetzt werden, was letztlich einer Produktivität von 29 mg mL^{-1} innerhalb von 8 h entspricht.

Für die Herstellung von Sebacinsäure wurde mittels einer retrosynthetischen Analyse eine vierstufige artifizielle Multienzymkaskade, ausgehend von Ricinolsäure, entwickelt. Die zentrale C-C-Bindungsspaltung dieser Kaskade erfolgt durch eine Retro-Aldolreaktion. Das für diese Reaktion benötigte 1,3-Ketolmotiv wird zuvor in einer zweistufigen Enzymkaskade bereitgestellt. In einem ersten Schritt wird Ricinolsäure mittels einer Alkohol-Dehydrogenase zu 12-Oxoölsäure oxidiert und anschließend mit einer Oleat-Hydratase zu 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure umgesetzt. Die durch die Retro-Aldolreaktion entstehende 10-Oxodecansäure wird in einem letzten Schritt analog zu der Oxidation von 9-Oxononansäure mithilfe einer Aldehyd-Dehydrogenase zu Sebacinsäure oxidiert.

Da es sich bei dem vorgeschlagenen Reaktionsweg um einen artifiziellen Stoffwechselweg handelt, weichen die Substrate von den in der Natur vorkommenden Substraten potentieller Enzyme ab. Den Schwierigkeiten die sich hierdurch ergeben, wurde mit Enzymquellen und Methoden des neusten Stands der Technik begegnet. Die Alkohol-Dehydrogenase Reaktion konnte mithilfe einer speziellen kommerziellen Enzymvariante (ADH-102) von c-LEcta (Leipzig, DE) bewerkstelligt werden. Für den zweiten Schritt der Hydratisierung wurde die substratpromiskuitive Reaktion der Oleat-Hydratase *Em-OAH1* aus *Elizabethkingia meningoseptica* ausgenutzt. In dem dritten Schritt wurde eine *de novo* maßgeschneiderte Retro-Aldolase von Arzeda (Seattle, US) verwendet, da das Zielsubstrat zu stark von allen bekannten Aldolasesubstraten abweicht. Die hier gezeigte Retro-Aldolreaktion ist nicht nur das erste praktische Anwendungsbeispiel von *de novo* Enzymen überhaupt, im Gegensatz zu anderen *de novo* Reaktionen konnte keinerlei Hintergrundreaktion beobachtet werden. Der letzte Schritt der Oxidation von 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure konnte sowohl mit *E. coli* eigenen als auch mit einer

Aldehyd-Dehydrogenase aus *Acinetobacter* Stamm M-1 durchgeführt werden.

Nach erfolgreicher Identifikation aller benötigten Enzyme konnte eine Machbarkeitsstudie durchgeführt werden. Darüber hinaus wurden die Stereopräferenzen der Hydratase und der Retro-Aldolase untersucht. Die Verwendung des künstlichen Substrats 12-Oxoölsäure hat keinerlei Einfluss auf die Enantioselektivität der Oleat-Hydratase *Em-OAH1*. Die *de novo* Aldolase RA 110.4 zeichnet sich nicht durch eine ausgeprägte Enantioselektivität aus. Die *in vitro* Multienzymkaskade konnte innerhalb von 26 h mit einer Gesamtausbeute von 10 % durchgeführt werden.

Beide vorgestellten Multienzymkaskaden konnten erfolgreich umgesetzt werden. Bei beiden Wegen handelt es sich um attraktive biotechnologische Alternativen für die Herstellung mittelkettiger Dicarbonsäuren. Die vorgestellten Systeme zeichnen sich zwar nicht durch eine hohe Produktivität aus, besitzen aber noch ein enormes Verbesserungspotential, da bisher keinerlei Optimierungen an den Enzymen noch an den Stämmen vorgenommen wurden. Eine abschließende Bewertung beider Systeme ist erst nach Optimierung und erfolgreicher Hochskalierung möglich, da biologische Systeme vor allem dort ihre wahren Stärken und Schwächen offenbaren. Allerdings konnte mit dieser Arbeit der Grundstein für alternative biotechnologische Verfahren für die Herstellung mittelkettiger Dicarbonsäuren gelegt werden.

Abschließend sollte an dieser Stelle noch angefügt werden, dass die Verwendung dieser biotechnologischen Systeme noch weitere Vorteile birgt. Fette und Öle bestehen aus einem Fettsäuregemisch. Durch die Verwendung weiterer Enzyme können Fettsäureinterkonversionen durchgeführt werden. Auf diese Weise lässt sich nicht nur die Gesamtausbeute erhöhen, es kann auch auf die Verwendung einer anderen Ausgangsverbindung umgeschwenkt werden.

1

Einleitung

Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe gewinnt in den letzten Jahren sowohl aus ökologischer als auch aus ökonomischer Sicht zunehmend an Bedeutung. Die im Kyoto-Protokoll verabschiedeten Resolutionen, die internationale Emission von Treibhausgasen zu reglementieren, wirken dem weltweiten Klimawandel entgegen, verlangen aber eine Reduktion der verwendeten fossilen Brennstoffe. Gleichzeitig trägt die Verknappung fossiler Kohlenstoffträger zu der Kostensteigerung von Naphtha und den daraus resultierenden Folgeprodukten bei.¹⁻³ Eine nachhaltige Industriegesellschaft mit effektivem Treibhausgasmanagement muss sich somit langfristig aus ihrer Erdölabhängigkeit lösen und vermehrt auf die Verwendung erneuerbarer Biomasse zurückgreifen.

1.1 Erneuerbare Rohstoffe in der chemischen Industrie

Landwirtschaftliche Anbauflächen für erneuerbare Kohlenstoffträger konkurrieren mit Anbauflächen für Nahrungs- und Futtermittel.⁴ Vor dem Hintergrund einer stetig wachsenden Weltbevölkerung müssen daher alternative Umsetzungs- und Verwendungsmöglichkeiten erschlossen werden, um zu gewährleisten, dass die Ressourcen verantwortungsvoll verwendet werden.⁵ Nur etwa 5–10 % des Rohöls werden zu Chemikalien umgesetzt, diese machen allerdings 50 % des Profits petrochemischer Unternehmen aus. Diese Zahlen offenbaren das ökonomische Potential von Biomasse, insofern diese nicht für die Energiegewinnung verwendet wird.^{6,7} In Kombination mit der Verwendung erneuerbarer Energien, welche aus Wind, Wasser, geothermischer Untergrundwärme und Sonnenstrahlung gewonnen werden, können nachhaltige ganzheitliche Konzepte entwickelt werden. Ausgehend von Biomasse existieren verschiedene Wertschöpfungsketten, mit denen Res-

sources in den Markt eingeführt werden können. Mittels der „drop-in“ Strategie wird Biomasse hierbei über die bereits vorhandene Infrastruktur in kompetitiver Weise in den Markt eingeführt. Das brasilianische Unternehmen Braskem startete beispielsweise 2010 eine Anlage, um fermentativ aus Zuckerrohr gewonnenes Ethanol mittels Dehydratisierung zu Ethylen umzusetzen. Die Anlage hat eine Kapazität von 200.000 t a^{-1} (0,17 % des weltweiten Gesamtbedarfs). Gewonnenes Ethen wird in diesem Fall direkt über die bereits vorhandene Infrastruktur zu Polyethylen (PE) umgesetzt.^{8,9}

Falls keine vorhandene Infrastruktur verwendet werden kann und kein Markt vorhanden ist, muss auf eine „emerging“ (engl.: entstehend) Strategie zurückgegriffen werden. Als Beispiel lässt sich hierfür 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) anführen, welches durch Dehydratisierung von Hexosen gewonnen wird. 5-HMF lässt sich zu Furan-2,5-dicarbonsäure, eine mögliche Alternative zu Terephthalsäure für die Polymerherstellung, oxidieren oder zu 2,5-Dimethylfuran, einem ausgezeichnetem Antiklopfmittel mit idealem Mischverhalten, reduzieren.⁹⁻¹¹

Der Übergang zu der vermehrten Nutzung nachwachsender Rohstoffe steht allerdings noch vor einigen Herausforderungen. Petrochemische Raffinerien arbeiten nach 100 Jahren steter Optimierung wesentlich effizienter als deren erneuerbare Pendanten und der Preis von erneuerbaren Produkten wird hauptsächlich von den Verarbeitungskosten von Biomasse diktiert.⁹ Der Übergang bietet aber auch viele Möglichkeiten. Neben der Entwicklung einer nachhaltigen chemischen Industrie ermöglicht die natürliche Funktionalisierung von Biomasse einfachen Zugang zu hochwertigen Produkten. Besonders im Bereich der Biopolymere stellen die resultierenden Materialien nicht nur einen einfachen Ersatz fossiler Rohstoffe dar, sondern führen zu der Entwicklung neuer Werkstoffe, welche sich im Vergleich mit rein fossilen Werkstoffen durch verbesserte Eigenschaften auszeichnen.

1.2 Biopolymere

Unter dem Begriff Biopolymere lassen sich, je nach Definition, eine ganze Reihe verschiedener Polymere zusammenfassen: a) Natürliche Biopolymere wie Stärke und Cellulose, b) bioabbaubare Kunststoffe aus fossilen Rohstoffen und c) Biopolymere aus nachwachsenden Rohstoffen.

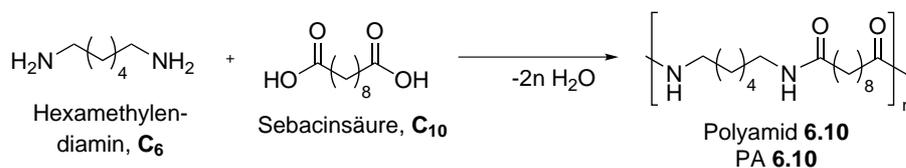
Natürliche Polymere werden schon seit circa 150 Jahren durch einfache chemische Modifikationen in industriell relevante Produkte überführt. Bereits 1870 wurde Celluloid im industriellen Maßstab von der Firma Hyatt Manufacturing mittels chemischer Modifikation von Cellulose hergestellt.^{12,13} Ausgehend von Cellulose finden sich heute verschiedene

Regeneratfasern wie Viskose, aber auch Kunststoffe wie Cellulosehydrat (Cellophan) auf dem Markt. Das Anwendungsspektrum der natürlichen Biopolymerderivate reicht hierbei von Textilien über Verpackungen bis hin zum Aufbau von Hochleistungspolymeren.^{14–16} Bioabbaubare Polymere auf Basis nachwachsender Rohstoffe wurden erstmals 1980 eingeführt und tragen seitdem zu einer Verbesserung des weltweiten Müllentsorgungsproblems bei.¹⁷ Neben aliphatischen Polyestern, Polycaprolactonen und Polyvinylalkoholen finden sich viele weitere Polymere, die mittlerweile in die meisten Bereiche des Alltagslebens Einzug gehalten haben. Prominente Polymere in diesem Zusammenhang sind z. B. Polymilchsäure (PLA), Polyglycolsäure (PGA) und Polyhydroxybuttersäure (PHB).^{18,19} Aufgrund der Vielfältigkeit bioabbaubarer Polymere finden sich diese neben der klassischen Anwendung als Verpackungsmaterial, sofern physiologisch unbedenklich, sowohl in medizinischen Produkten (künstliche Tränenflüssigkeit, synthetische Wundverbände) als auch im Lebensmittelbereich (Wurst-Kunstdärme, Getränkeflaschen).^{20–24}

Im Bereich der Hochleistungspolymere hingegen finden vor allem mittelkettige Polyamide Anwendung. Einsatzgebiete wie die Automobilindustrie, Raumfahrt, Elektronik und Photovoltaik verlangen von den eingesetzten Materialien besondere Eigenschaften sowie eine große Widerstandsfähigkeit. Die Kombination verschiedener Monomere erlaubt Zugang zu maßgeschneiderten Polymeren, welche als Ergänzung für das bestehende Produktsortiment fungieren. Polyamide wie Nylon 6 oder 6,6¹⁾ sind aufgrund der Verbreitung in Alltagsgegenständen allgemein bekannt. Die längerkettigen Homologe zeichnen sich mit steigender Kettenlänge durch verbesserte Eigenschaften wie einer erhöhten Chemo-resistenz, Flexibilität und einer geringeren Wasseraufnahme aus. Der Markt für Spezialpolymere befindet sich in stetem Wachstum und ist aus vielen Bereichen der Industrie nicht mehr wegzudenken.^{25–28}

Die Wichtigkeit mittelkettiger Polyamide wurde im März 2012 deutlich, als ein Cyclododecatrien (CDT) Reaktor auf dem Evonik Industriegelände explodierte. CDT wird über Laurolactam zu Nylon 12 umgesetzt, welches für die Herstellung von Brems- und Benzinleitungen benötigt wird. Der Unfall führte zu einem Engpass in der Dodecandicarbonsäure-Lieferkette und drohte die gesamte Automobilindustrie innerhalb

¹⁾Das Zahlensystem bezieht sich auf die Anzahl der Kohlenstoffatome in den verwendeten Monomeren. Polyamid 6.10 setzt sich beispielsweise aus Hexamethylen-diamin und 1,10-Decandisäure (Sebacinsäure) zusammen, welche durch Polykondensation unter Wasserabspaltung verknüpft werden.



weniger Wochen lahmzulegen.²⁹

Obleich mittelkettige Polyamide über ausgezeichnete Eigenschaften verfügen und den Endprodukten verbesserte Eigenschaften verleihen, ist die Verfügbarkeit monomerer Bausteine oft der limitierende Faktor. Vor allem im Bereich der Hochleistungspolymere bietet sich die Verwendung nachwachsender Rohstoffe an. Fette und Öle bieten durch ihre natürliche Funktionalisierung einfachen Zugang zu Monomeren mittlerer Kettenlänge wie Azelain- (C₉) und Sebacinsäure (C₁₀), deren Verwendung zu einer Verbesserung der Polymereigenschaften beiträgt. Der Einsatz nachwachsender Rohstoffe führt im Bereich der Hochleistungspolymere und deren Verbandmaterialien zu einer effizienteren Kombination aus Funktionalität und Ökoeffizienz.³⁰

1.3 Azelainsäure Pathway

Azelainsäure (Nonandisäure) ist eine gesättigte mittelkettige Dicarbonsäure (CAS: 123-99-9), die sowohl im Pharma- als auch im Polymerbereich Anwendung findet. Azelainsäure selbst weist bakteriostatische und teilweise auch bakterizide Eigenschaften auf, weshalb es für die Behandlung von Melasma und Acne verwendet wird.³¹⁻³³ 2-Ethylhexanolester der Azelainsäure werden als Weichmacher, die Ester anderer Alkohole als Schmieröle und hydraulische Flüssigkeiten verwendet. Das aus der Reaktion mit Hexamethyldiamin hergestellte Polyamid 6.9 wird als Lebensmittelverpackung und als Kabelummantelung verwendet. Weitere Anwendungsbeispiele finden sich in der Elektronik- und in der Automobilindustrie.^{34,35}

Das wichtigste Produktionsverfahren von Azelainsäure ist die Ozonolyse von Ölsäure. Aufgrund der intermediär gebildeten Ozonide wäre die Verwendung von sichereren und günstigeren Oxidationsmitteln wie O₂ oder H₂O₂ wünschenswert. Mögliche Alternativen zu der Ozonolyse werden ebenfalls über eine oxidative Spaltung durchgeführt. Als Reagenzien werden hierfür RuO₄, Cl₂ – RuO₂, KMnO₄ sowie verschiedene Re-, Mo- und Wo-Katalysatoren in Kombination mit O₂ oder Peressigsäure verwendet.³⁵⁻⁴⁰ Abgesehen von der enzymatischen ω -Oxidation von 9-Oxononansäure mit *Debaryomyces pfaffii* bzw. Nonan mit *Torulopsis candida* oder über den mikrobiellen Abbau von Ölsäureisobutylester mittels eines *Malassezia* Stamms (KFCC 11252) wurden keine Versuche unternommen, Azelainsäure über einen biokatalytischen Weg herzustellen.⁴¹

Eine mögliche Herangehensweise, Azelainsäure auf einem biokatalytischen Weg herzustellen, ergibt sich nach dem Vorbild der Ozonolyse von Ölsäure, bei dem über das Einbringen einer Sauerstoffspezies in eine bereits vorhandene Funktionalisierung die oxida-

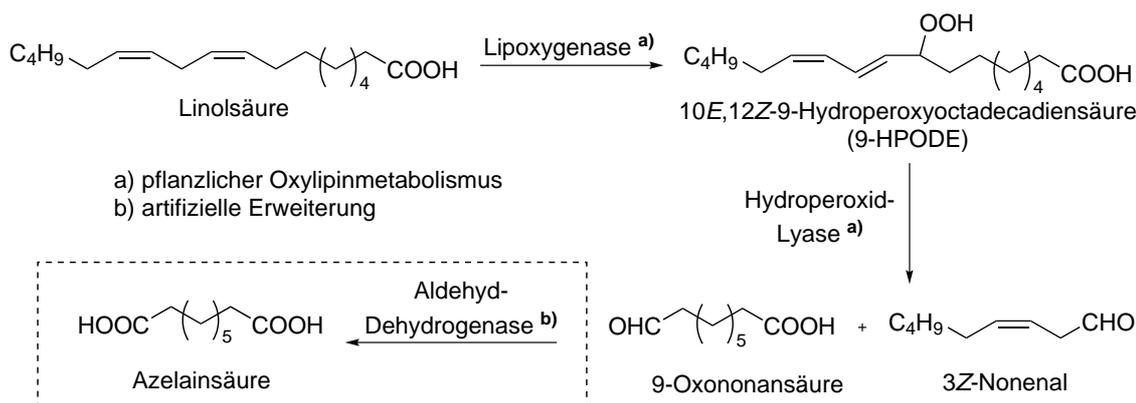


Abbildung 1.1: Biokatalytischer Ansatz zur Herstellung von Azelainsäure. Kombination des Lipoxygenasen-Stoffwechselwegs aus dem pflanzlichen Oxylinmetabolismus (a) bestehend aus einer Lipoxygenase (LOX) und einer Hydroperoxid-Lyase (HPL) sowie einer artifiziellen Erweiterung (b) durch eine Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) für die finale Oxidation zu Azelainsäure.

tive Bindungsspaltung eingeleitet wird und das entstehende C₉-Fragment zu Azelainsäure oxidiert wird.

Eine biokatalytische Entsprechung dieser oxidativen Spaltung kann dem pflanzlichen Oxylinmetabolismus entnommen werden. In dem in Abbildung 1.1a gezeigten Lipoxygenasen (LOX) Stoffwechselweg wird Linolsäure mittels einer Lipoxygenase regioselektiv oxidiert und durch eine Hydroperoxid-Lyase (HPL) in eine Oxosäure und ein Aldehyd gespalten. Um zu Azelainsäure zu gelangen, muss dieser natürliche Stoffwechselweg um ein weiteres Enzym erweitert werden, welches die Oxidation von 9-Oxononansäure zu Azelainsäure katalysiert. Dies kann beispielsweise mit einer Aldehyd-Dehydrogenase realisiert werden (Abbildung 1.1b).

1.3.1 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (LOX) sind nicht Häm eisenhaltige Dioxygenasen, die die regio- und enantioselektive Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysieren, die ein oder mehrere Z,Z-1,4-Pentadienmotive beinhalten.⁴³ Lipoxygenase-Gensequenzen finden sich in zwei von drei phylogenetischen Domänen, den Eukaryoten und Bakterien, nicht jedoch in Archaeobakterien. In Pflanzen, Pilzen und Bakterien sind Lipoxygenasen ubiquitär im Oxylinmetabolismus vertreten und erfüllen dort, je nach Stereo- und Regioselektivität, unterschiedliche physiologische Aufgaben.^{44,45} In Pflanzen und Pilzen sind Lipoxygenasen an der Biosynthese von Phytohormonen (Jasmonate, Derivate der Jasmonsäure) und grünen Blattduftstoffen (GLV, engl.: green leaf volatiles) beteiligt. In

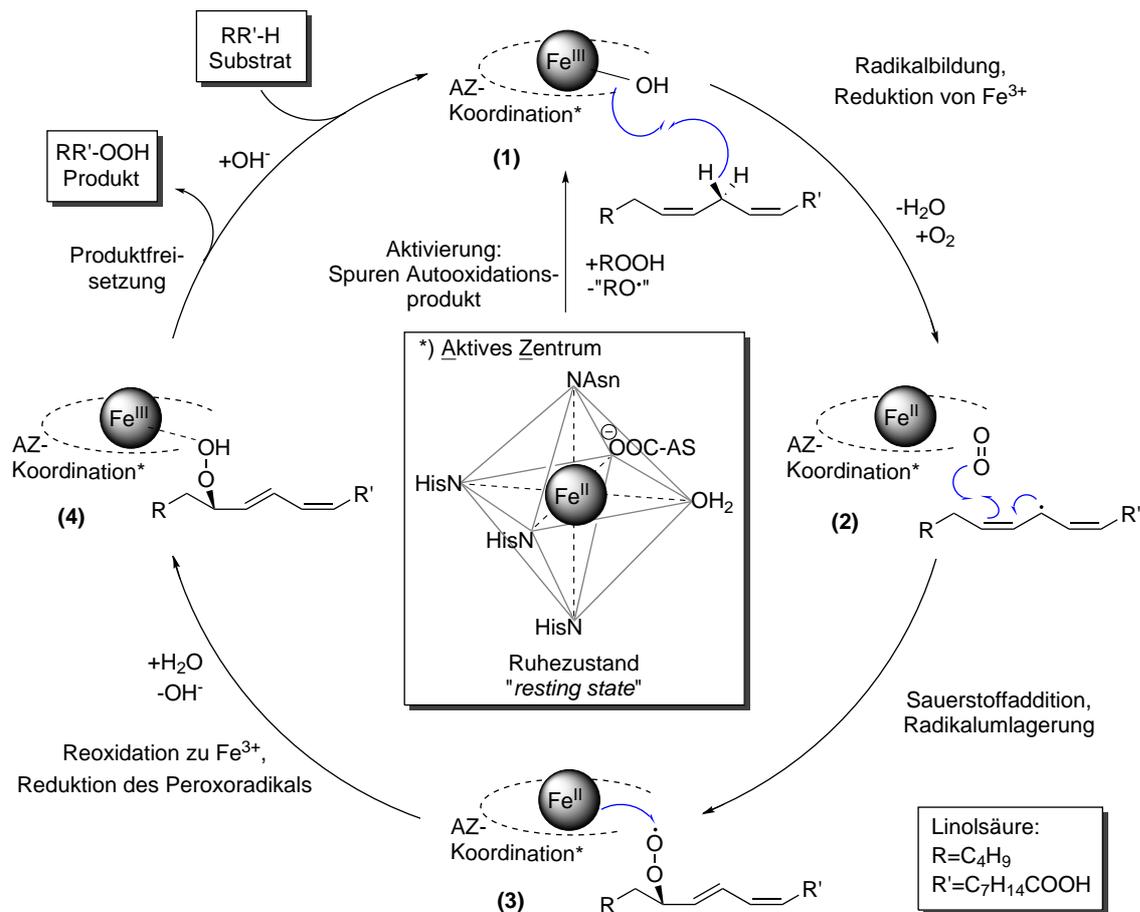


Abbildung 1.2: Allgemeiner Mechanismus der Lipoxygenasen: Ein Fe^{2+} -Kation ist im Ruhezustand typischerweise oktaedrisch von drei Histidinen, einem Asparagin, der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure (meist Isoleucin) und Wasser koordiniert. Durch Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} wird das Enzym aus dem *resting state* in die aktive Form (1) überführt. Die aktive LOX katalysiert die Bildung eines Substratradikals und wird dabei zu Fe^{2+} (2) reduziert. Sauerstoff kann nun mit dem aktivierten Substrat unter Bildung eines Hydroperoxyradikals (3) reagieren. Die spezifische Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum und eine kontrollierte Radikalumlagerung sind für die Regio- und Enantioselektivität verantwortlich. Reduktion des Hydroperoxyradikals zu einem Hydroperoxid reoxidiert das Fe^{2+} (3) wieder zu einem Fe^{3+} (4). Darstellung abgeändert von Bugg *et al.* (2003).⁴²

Wirbeltieren (Vertebrata) sind LOX an der Synthese von Leukotrienen, Lipoxinen und Eikosanoiden beteiligt.⁴⁶⁻⁴⁸

Pflanzliche LOX bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer molekularen Masse von ~100 kDa. Der großteils aus α -Helices bestehende C-Terminus beherbergt und koordiniert das katalytisch aktive Fe^{3+} -Ion, der N-Terminus weist eine β -barrel Struktur auf und ist bei der Substratakquisition und Membranwechselwirkung beteiligt.⁴⁸⁻⁵⁰

Im Ruhezustand (engl.: *resting state*) ist ein high spin Fe^{2+} -Kation von drei stark konservierten Histidinresten, einer Amidgruppe von beispielsweise Asparagin, der Carboxyl-

gruppe der C-terminalen Aminosäure (meist Isoleucin) und Wasser im aktiven Zentrum koordiniert (Abbildung 1.2).^{51,52} Um in die aktive Form überführt zu werden, muss die inaktive (Fe²⁺)-OH₂ zuvor zu einer (Fe³⁺)-OH-Spezies oxidiert werden. Dies geschieht mutmaßlich durch Spuren von Fettsäurehydroperoxiden.^{53–55} Die aktive Lipoxygenase abstrahiert im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des katalytischen Zyklus unter Radikalbildung ein Wasserstoffatom der C₁₁-Methylengruppe des Z,Z-1,4-Pentadienmotivs.^{56,57} Die aktive (Fe³⁺)-OH-Spezies wird hierbei unter Wasserabspaltung zu Fe²⁺ reduziert und somit inaktiviert. Das gebildete Pentadienylradikal ist über das gesamte Diensystem delokalisiert. Je nach Beschaffenheit des aktiven Zentrums kann Sauerstoff nun in antarafacialer Weise, relativ zu der H-Abstraktion, an C13 [+2] oder C9 [−2] unter Bildung eines Peroxylradikals addieren. Aufgrund der daraus resultierenden Regioselektivität werden pflanzliche Lipoxygenasen in zwei Klassen unterteilt, die 13-LOX und die 9-LOX.⁵⁸ Obschon das Nicht-Hämeisen direkt an der Katalyse beteiligt ist, finden sich keine Hinweise für eine Fe-O₂ oder Fe-OOH-Spezies und somit für eine direkte Sauerstoff-Eisen-Interaktion. Der katalytische Zyklus wird durch die Reduktion des Peroxylradikals zu einem Hydroperoxid und der damit verbundenen Reoxidation des Fe²⁺ zu einer aktiven Fe³⁺-Spezies komplettiert.^{59,60}

1.3.2 Hydroperoxid-Lyasen

Wie auch andere Enzyme des pflanzlichen Oxylinmetabolismus, den Allenoxid-Synthasen (AOS, CYP74A) und Divinylether-Synthasen (DES, CYP74D), sind Hydroperoxid-Lyasen (HPL) typische Vertreter der Cytochrom P450-Familie (Abbildung 1.3). Ebenso wie die Lipoxygenasen werden die Hydroperoxid-Lyasen nach ihrer Regioselektivität in zwei Klassen unterteilt: die 13-HPLs und die etwas unspezifischeren 9/13-HPLs.⁶² Im Gegensatz zu anderen Vertretern der CYP-Makrofamilie benötigen Enzyme der CYP74-Unterfamilie weder molekularen Sauerstoff noch eine NAD(P)H-abhängige Cytochrom P450-Reduktase.^{63,64}

Hydroperoxid-Lyasen sind für die Produktion von ω -Oxosäuren und kurz bis mittelketigen Aldehyden, den grünen Blattduftstoffen (GLVs) verantwortlich. Diese Aldehyde werden infolge einer Wundantwort synthetisiert, spielen eine wichtige Rolle in der Wundheilung und fungieren als Schutz gegen Schädlinge. GLVs weisen einen charakteristischen Geruch von frischem Gras auf und besitzen sowohl antimikrobielle als auch fungizide Eigenschaften.^{66–68} Aufgrund der großen Nachfrage nach natürlichen Aromen sind Aldehyde der grünen Blattduftstoffe, aber auch die korrespondierenden

Alkohole, welche durch die Reduktion mit *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen werden können, in der Aroma- und Lebensmittelindustrie weit verbreitet.⁶⁹ In den vergangenen Jahren wurde der Markt für GLVs auf 5–10 t a⁻¹ mit 3000 US\$kg⁻¹ geschätzt.⁷⁰ Für die Herstellung von C₆-Verbindungen dieser Substanzklasse wie Z-3-Hexanal werden bereits biotechnologische Verfahren, auf Basis der 13-LOX und 13-HPL Reaktion, verwendet.⁷¹ Obgleich die entsprechenden längerkettigen C₉-Derivate (Aromen wie Gurke, Reis und Bier) über ähnlich attraktive Eigenschaften verfügen, wurde vergleichsweise wenig Forschung im Bereich der regiokomplementären 9-LOX/9-HPL Reaktion unternommen.^{72–75}

Mechanistisch reagieren Hydroperoxid-Lyasen ähnlich wie die besser untersuchten Allenoxid-Synthasen und können durch einen einzelnen Aminosäureaustausch ineinander überführt werden.⁷⁶ Sowohl in HPLs als auch in AOS koordiniert der terminale Hydroperoxid-Sauerstoff das Häm-Fe³⁺-Kation (Abbildung 1.4). Durch die elektrostatische Interaktion mit Asparagin wird die homolytische O-O-Bindungsspaltung eingeleitet. Diese verläuft unter Ausbildung einer protonierten Fe⁴⁺-OH-Spezies und eines Alkoxyradikals (RO).⁷⁷ Letzteres wird über eine Wasserstoffbrücke zu Asparagin stabilisiert. Die anschließende Umlagerung des Sauerstoffradikals mit der am α-C benachbarten

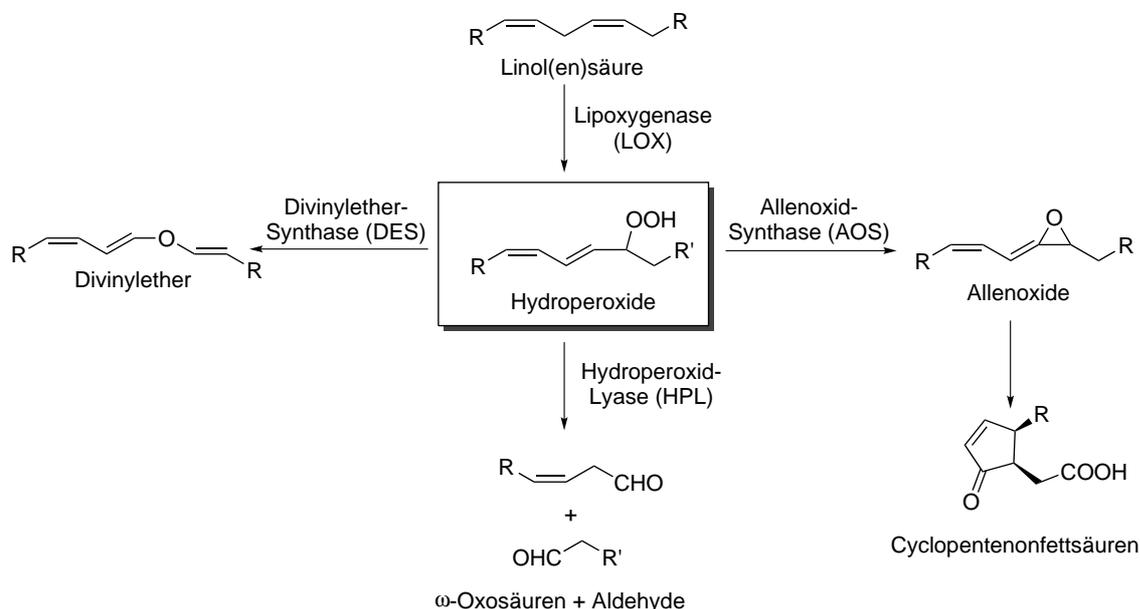


Abbildung 1.3: Pflanzlicher Oxylinmetabolismus. Ausgehend von Linol- oder Linolensäure (Reste R variieren hierbei) werden mithilfe einer Lipoxygenase Hydroperoxide als wichtige Intermediate des pflanzlichen Oxylinmetabolismus synthetisiert. Diese Hydroperoxide werden durch Divinylether-Synthasen zu Divinylethern oder durch Allenoxid-Synthase zu Allenoxiden und Cyclopentenonen umgesetzt. Mittels einer Hydroperoxid-Lyase lassen sich die Hydroperoxide zu ω-Oxosäuren und Aldehyden spalten. Darstellung abgeändert nach Itoh *et al.* (2010).⁶¹

Doppelbindung führt zu der Ausbildung eines Epoxids und eines stabileren sekundären Kohlenstoffradikals. Aufgrund des fehlenden, durch π -Interaktionen stabilisierenden Phenylrests kann an dieser Stelle das α -Epoxyradikal, im Gegensatz zu den AOS, nicht durch Fe^{4+} -OH oxidiert werden. Die fehlenden Stabilisierungsmöglichkeiten der HPL führen daher zu homolytischer C-C-Bindungsspaltung und der Rückbindung der Hydroxylgruppe der Fe^{4+} -Spezies, welche hierdurch reduziert wird.⁷⁸ Das entstehende instabile Hemiacetal zerfällt spontan zu zwei kürzerkettigen Aldehyden.^{65,79}

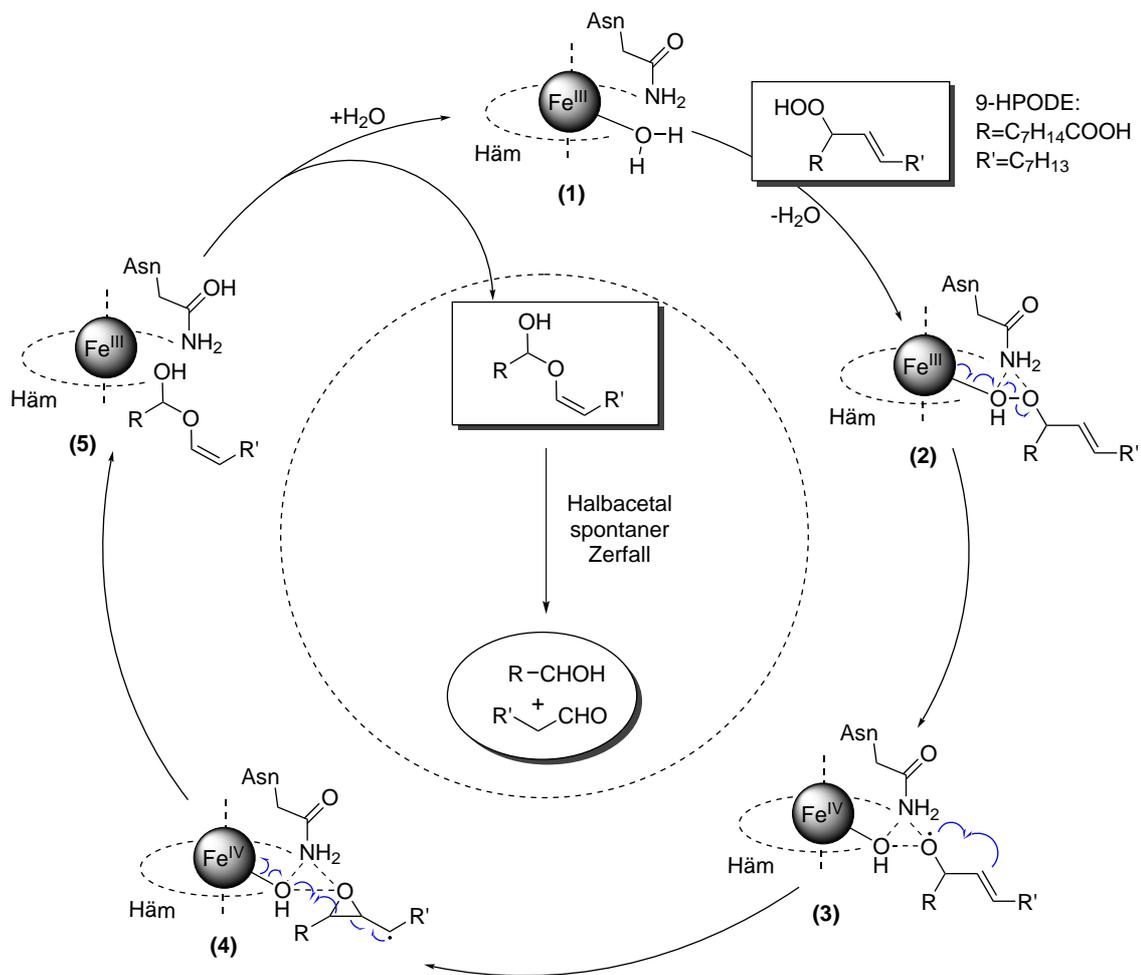


Abbildung 1.4: Mechanismus der Hydroperoxid-Lyasen. Hydroperoxide koordinieren mit dem terminalen Sauerstoff der Hydroperoxygruppe an das Häm- Fe^{3+} -Kation (1) zu (2). Durch eine homolytische O-O-Bindungsspaltung, eingeleitet durch einen Asparaginrest (2), kommt es zu der Ausbildung eines Allylalkoxyradikals (3). Durch eine Umlagerungsreaktion mit der benachbarten α -Doppelbindung wird eine α -Epoxyradikal-Spezies ausgebildet (4), welche durch Rückbindung zu einem Hemiacetal umgesetzt wird (5). Durch spontanen Zerfall des Hemiacetals werden zwei kürzerkettige Aldehyde gebildet. Darstellung abgeändert nach Lee *et al.* (2008).⁶⁵

1.3.3 Aldehyd-Dehydrogenasen

Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDHs) sind NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktasen und katalysieren die Umsetzung eines Aldehyds zu einer Carbonsäure. Vertreter der ALDH-Superfamilie finden sich in allen Domänen des Lebens und übernehmen dort zentrale Funktionen des Zellmetabolismus. 2002 waren bereits 555 verschiedene ALDH Sequenzen, davon 32 aus Archaeobakterien, 351 aus Bakterien und 172 aus Eukaryoten bekannt.⁸¹ ALDH2 ist aufgrund des vor allem in der asiatischen Bevölkerung vorkommenden Polymorphismus und des damit verbundenen Flush-Syndroms die bekannteste ALDH. Verschiedene Allele des ALDH2 Gens führen hierbei zu verminderter Oxidation und somit geringerer Detoxifikation des giftigen Acetaldehyds, welches beim Abbau von Ethanol gebildet wird.^{82,83} Medikamente wie Disulfiram, welche ALDH2 inhibieren, werden deshalb auch zur medikamentösen Behandlung von chronischem Alkoholismus eingesetzt.⁸⁴

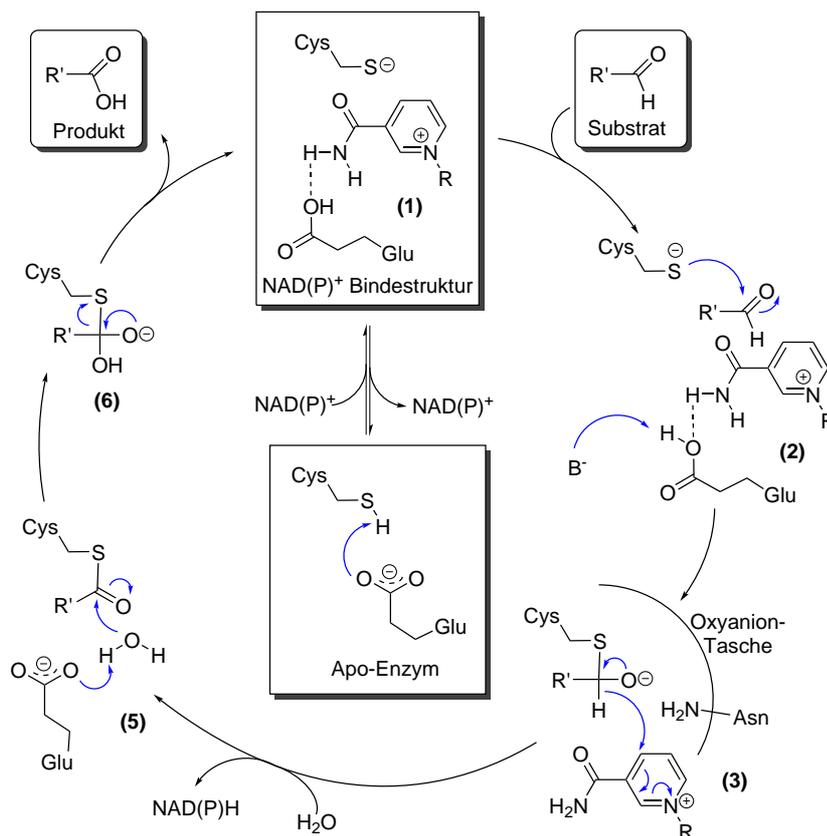


Abbildung 1.5: Mechanismus der Aldehyd-Dehydrogenasen. Durch Deprotonierung des Cysteinrests durch Glutamat und Bindung des Cofaktors NAD(P)⁺ wird das Apoenzym in das aktive Holoenzym (1) überführt. Unter Bildung eines Thiohemiacetals mit einem Cysteinrest wird das Substrat aktiviert (2). Hydridtransfer auf den Cofaktor (3) und anschließende Hydrolyse (4) des gebildeten Thioesters setzen das oxidierte Produkt frei (5). Darstellung abgeändert nach Tsybovsky *et al.* (2007).⁸⁰

Obschon ALDHs die natürlichen Aldehyd-Oxidations Katalysatoren darstellen, finden sich nur wenige präparative Anwendungen, zumal auch andere Enzyme, wie manche Alkohol-Dehydrogenasen, Xanthin-Oxidasen oder Luciferasen, in der Lage sind, Aldehyde zu oxidieren.^{85–88}

Basierend auf der 2007 aufgeklärten Kristallstruktur der 10-Formyltetrahydrofolat-Dehydrogenase wurde ein möglicher Mechanismus der Aldehyd-Dehydrogenasen vorgeschlagen. Hierbei wird im inaktiven Apoenzym durch Protonenabstraktion an einem Cysteinrest durch Glutamat ein Cysteinthiolat gebildet (Abbildung 1.5). Das Apoenzym wird im nächsten Schritt durch die Bindung des Cofaktors NAD(P)⁺ in das aktive Holoenzym überführt. Nach Bindung des Substrats kommt es zu einem nukleophilen Angriff des Thiolats an die Carbonylgruppe, welche hierdurch in ein Thiohemiacetal überführt wird. Die negative Ladung wird hierbei durch einen Asparaginrest in der Oxyanionen-Tasche stabilisiert. Hydridtransfer des Aldehyd-Hydrids auf das C4-Atom des NAD(P)⁺-Cofaktors überführt das Hemiacetal in einen Thioester. Das reduzierte Coenzym NAD(P)H verlässt das aktive Zentrum und wird durch ein Wassermolekül ersetzt. Der Glutamatrest im aktiven Zentrum hält das Wassermolekül an dieser Stelle in Position und aktiviert dieses gleichzeitig für einen weiteren nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom. Die Hydrolyse des Thioesters erfolgt über einen tetraedrischen Übergangszustand und führt letztendlich zu der Freisetzung des oxidierten Produkts. Der katalytische Zyklus wird beendet, indem das Proton des Glutamats wieder auf das durch die Hydrolyse freigewordene Thiolat übertragen wird. Darstellung abgeändert nach Tsybovsky *et al.* (2007).⁸⁰

1.4 Sebacinsäure Retro-Aldol Pathway

Sebacinsäure (Decandisäure) ist wie Azelainsäure eine gesättigte mittelkettige Dicarbonsäure (CAS: 111-20-6). Sie wird als Ausgangsmaterial für Alkyd- und Polyesterharze, Polyamide, Schmiermittel und Aromastoffe verwendet. Ester der Sebacinsäure sind wertvolle Weichmacher, da sie sich durch eine hohe Kältefestigkeit und Migrationsbeständigkeit auszeichnen.^{2,34} Polyamide der Sebacinsäure besitzen wertvolle Eigenschaften, die sie für den Gebrauch in Hochleistungsanwendungen qualifizieren, und zeichnen sich gleichzeitig durch eine verbesserte CO₂-Bilanz aus.⁸⁹ Aufgrund dieser Eigenschaften erfahren Polyamide der Sebacinsäure wachsende Aufmerksamkeit und kommen neuerdings auch, beispielsweise aufgrund ihrer Temperatur- und Wärmeformbeständigkeit, als Motorabdeckung in der neuen Mercedes-Benz A-Klasse in Großserie zum Einsatz.⁹⁰

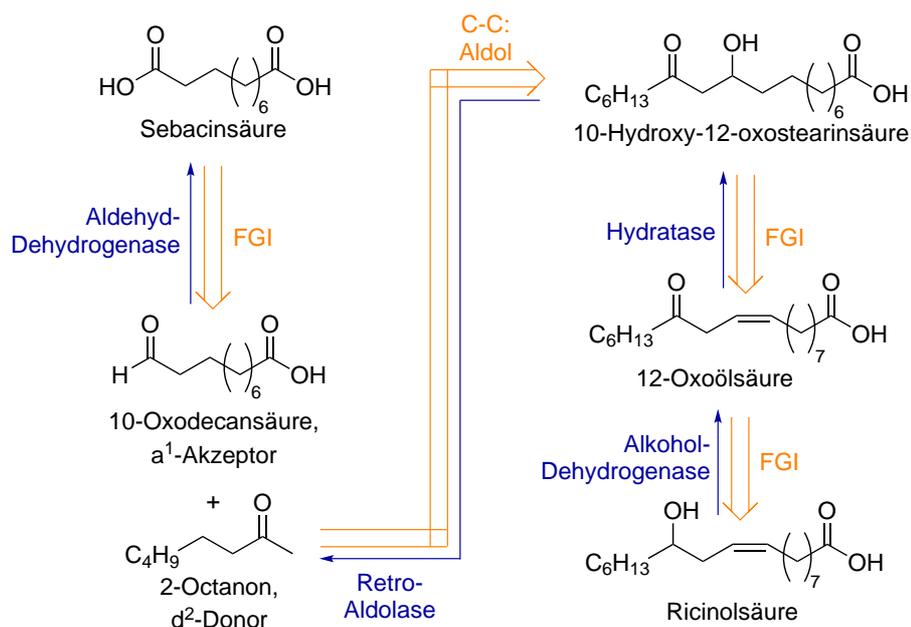


Abbildung 1.6: Biokatalytischer Ansatz zur Herstellung von Sebacinsäure. Orange: Retrosynthetische Herangehensweise. Um Sebacinsäure zu einem passenden α¹-Akzeptor umzuwandeln, bedarf es einer *functional group interconversion* (FGI). Mit einem C₈-d²-Akzeptor kann in dem Folgeschritt mittels einer Aldolreaktion das C₁₈-Grundgerüst natürlich vorkommender Fettsäuren aufgebaut werden. Zwei weitere FGI werden benötigt, um von dem 1,3-Ketolmotiv (Aldolmotiv) zu einer natürlichen Fettsäure zu gelangen. Blau: Biokatalytische Entsprechung des Retrosynthese-Wegs. Ricinolsäure soll mittels einer Alkohol-Dehydrogenase zu 12-Oxoölsäure oxidiert werden. Das 1,3-Ketolmotiv soll durch die regiospezifische Hydratisierung an der C10-Position komplettiert werden. Die eigentliche C-C-Bindungsspaltung soll durch eine Retro-Aldolase katalysiert werden. In einem letzten Schritt soll die entstehende 10-Oxodecansäure durch eine Aldehyd-Dehydrogenase zu Sebacinsäure oxidiert werden.

Darüber hinaus finden sich Polymere basierend auf Sebacinsäure auch in alltäglichen Produkten wie den neuen Universaldübeln von Fischer (UX green).⁹¹

Das wichtigste Produktionsverfahren von Sebacinsäure ist die alkalische Pyrolyse von Ricinusöl, das bis zu 89 % aus Ricinolsäure bestehen kann.^{92,93} Ricinusöl wird aus den Samen der Pflanze *Ricinus communis* gewonnen, die wegen des ungewöhnlich schnellen Wachstums Wunderbaum genannt wird. Andere Produktionsverfahren für Sebacinsäure sind die elektrolitische Dimerisierung des Adipinsäuremonomethylesters und die Oxidation von Stearinsäure mit N₂O₄.^{94,95} Da Sebacinsäure ein Intermediat der mikrobiellen β-Oxidation ist und keine toxischen *in vivo* Eigenschaften besitzt, wurden einige Fermentationsprozesse entwickelt.^{34,96–98} Hinsichtlich der Atom-Ökonomie erscheint eine katalytische C-C-Bindungsspaltung allerdings effizienter als der β-Abbau des nicht benötigten Rests. Ein möglicher Ansatz Sebacinsäure auf einem biotechnologischen Weg herzustellen, könnte daher wie in dem in Abbildung 1.6 dargestellten retrosynthetischen

Ansatz aussehen.

Die C-C-Bindungsspaltung soll hierbei, ausgehend von einer Fettsäure, durch eine Retro-Aldolreaktion erfolgen. Diese muss hierzu zuerst so modifiziert werden, dass ein 1,3-Ketolmotiv gebildet wird. In einem letzten Schritt soll die entstehende 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure oxidiert werden. Eine biokatalytische Entsprechung dieser Herangehensweise ist ebenfalls in Abbildung 1.6 in Blau dargestellt. Ricinolsäure wird in einem ersten Schritt durch eine Alkohol-Dehydrogenase zu 12-Oxoölsäure oxidiert. Das 1,3-Ketolmotiv wird anschließend durch eine regiospezifische Hydratase, die die Wasseranlagerung in der C-10 Position katalysiert, in 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure umgesetzt. Die eigentliche C-C-Bindungsspaltung kann nun durch eine Aldolasen katalysierte Retro-Aldolreaktion erfolgen. Das entstehende Produkt 10-Oxodecansäure muss anschließend noch in einem letzten Schritt zu Sebacinsäure oxidiert werden. Die Oxidation kann analog zur Herstellung von Azelainsäure mit einer Aldehyd-Dehydrogenase durchgeführt werden.

1.4.1 Alkohol-Dehydrogenasen

Die selektive Alkoholoxidation ist eine wichtige Reaktion der synthetischen organischen Chemie. Ursprünglich wurden molare Mengen von Schwermetallsalzen (z. B. Cr oder Mn) eingesetzt, um Alkohole zu oxidieren.^{99–101} Bei neueren Reaktionen, wie der Oppenauer Oxidation (Al, Zr, Ln) oder einigen Wasserstofftransferreaktionen (Ru, Rh, Ir) können diese auch in katalytischen Mengen verwendet werden.^{102,103} In der modernen organischen Chemie wurden weiterhin Reaktionen entwickelt, die gänzlich auf die Verwendung von Schwermetallen verzichten. Bei Swern- oder Pfitzner-Moffatt-Reaktionen wird ein Oxidationsmittel wie z. B. Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, welches allerdings noch durch weitere Reagenzien wie Säurechloride oder *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid aktiviert werden muss.¹⁰⁴ Diese Reaktionen werden allerdings häufig in umweltgefährlichen chlorierten Lösungsmitteln durchgeführt und verwenden feuchtigkeitsempfindliche Reagenzien. Um weitere Alternativen zu finden, wurden auch zahlreiche umweltverträgliche biokatalytische Methoden entwickelt, die mit hohen Selektivitäten großes Potential zeigen.¹⁰⁵ Viele dieser Methoden verwenden enantioselektive Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs), die hierdurch zu der industriell relevantesten Enzymklasse werden, die teilweise auch klassisch chemischen Katalysatoren vorgezogen werden.¹⁰⁶

ADHs sind meist metallabhängige Oxidoreduktasen, die einen weiteren Cofaktor wie

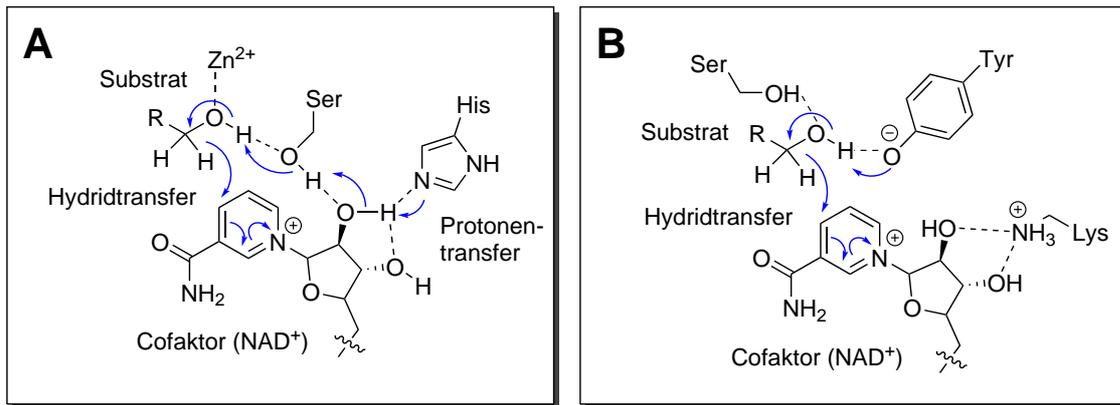


Abbildung 1.7: Allgemeiner Mechanismus im ternären Zustand von Alkohol-Dehydrogenasen. Am Beispiel von A: der Leber Alkohol-Dehydrogenase (LADH) mit Metall im aktiven Zentrum.¹⁰⁷ B: der Drosophila Alkohol-Dehydrogenase (DADH) ohne Metall im aktiven Zentrum.¹⁰⁸ Zusammengefasste Darstellung nach Agarwal *et al.* (LADH, 2000) und Benach *et al.* (DADH, 1999).^{107,108}

NAD(P)⁺ benötigen. Sie katalysieren die Umsetzung eines Alkohols zu einem Keton oder einem Aldehyd und können aus praktisch allen lebenden Organismen isoliert werden.¹⁰⁹ Mechanistisch existieren zwei Möglichkeiten, um Alkohole zu Aldehyden zu oxidieren. In beiden Fällen geht das Apo-Enzym unter NAD(P)⁺-Bindung, Wasserfreisetzung und der daraus resultierenden Konformationsänderung in den binären Zustand über. Die anschließende Bindung des Substrats unter erneuter Konformationsänderung überführt das Enzym in den aktiven ternären Zustand, welcher für beide Fälle in Abbildung 1.7 dargestellt ist. In dem ersten metallabhängigen Fall koordiniert das Substrat im aktiven Zentrum an ein Metallkation wie z. B. Zn²⁺ im Fall der Leber ADH, welche in Abbildung 1.7A als repräsentatives Beispiel benutzt wird. Mittels eines Protonentransfers über eine Histidin-

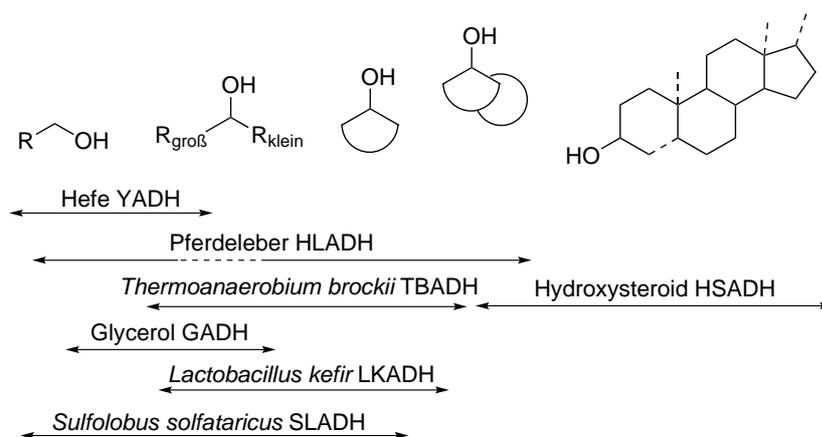


Abbildung 1.8: Schematische Übersicht über das Substratspektrum einiger kommerziell erhältlicher Alkohol-Dehydrogenasen. Abbildung abgeändert nach Kroutil *et al.* (2004).¹⁰⁵

Serin Kaskade wird das Substrat deprotoniert. Der anschließende Hydridtransfer auf den Cofaktor NAD^+ führt zu dessen Reduktion, wobei das Alkoholsubstrat unter Ausbildung einer Carbonyl-Spezies oxidiert wird.¹⁰⁷ In dem zweiten metallunabhängigen Fall (Abbildung 1.7B) wird der Hydridtransfer auf NAD(P)^+ durch eine Serin-Tyrosin-Lysin Kaskade eingeleitet, wobei die vorangehende Protonenabstraktion von einem deprotonierten Tyrosinrest durchgeführt wird.¹⁰⁸

Bei sekundären Alkoholen spielt darüber hinaus die Stereoselektivität, welche auch zu der Klassifizierung der ADHs verwendet wird, eine entscheidende Rolle. Diese Eigenschaft wird sich beispielsweise in der Deracemisierung und der Racematspaltung zunutze gemacht.¹¹⁰ Das Substratspektrum der literaturbekannten Alkohol-Dehydrogenasen umfasst nahezu alle primären und sekundären Alkohole. Abbildung 1.8 zeigt eine exemplarische Zusammenstellung über das Substratspektrum einiger kommerziell erhältlicher Alkohol-Dehydrogenasen. Bei zunehmender Größe und Sperrigkeit der die Hydroxylgruppe umgebenden Reste finden sich allerdings immer weniger Alkoholdehydrogenasen, welche sich für die Alkoholoxidation eignen.¹¹¹

1.4.2 Hydratasen

Hydratasen katalysieren die regiospezifische Addition von Wasser an C-C Doppelbindungen und werden deshalb auch als Hydro-Lyasen klassifiziert.^{112,113} Dabei kann sowohl die Addition an isolierte Doppelbindungen als auch an Michael-Systeme beobachtet werden.^{114–116} Beide Varianten sind darüber hinaus im Metabolismus von zentraler Bedeutung. Die Addition von Wasser an Michael-Systeme findet sich beispielsweise im Zitronensäurezyklus bei der Umsetzung von Fumarat zu S-Malat, während die Addition von Wasser an isolierte Doppelbindungen beim Auf- und Abbau von Terpenen und Carotinoiden eine entscheidende Rolle spielt.^{117,118}

Im Gegensatz zu der enzymatischen Hydratisierung gestaltet sich die rein chemische Hydratisierung als schwierig. Aufgrund von Nebenreaktionen ist die rein Säure katalysierte industrielle Hydratisierung auf Moleküle limitiert, welche keine Umlagerungsreaktionen eingehen können.¹²⁰ Im Labormaßstab können Hydratisierungen allerdings in zwei-stufigen Reaktionen wie der Hydroborierung und der Oxymymercurierung durchgeführt werden.^{121–123}

Mechanistisch unterscheiden sich die Hydratasen untereinander. Während bei der Fumarase (Fumarat-Hydratase) eine *anti*-Addition beobachtet werden kann, verläuft die Wasser-Addition bei der Crotonase katalysierten Reaktion (Enoyl-CoA-Hydratase) mit

einer *syn*-Stereochemie.^{124,125} Bei der Acetylen-Hydratase findet sich neben einem Wolfram-Zentralatom im aktiven Zentrum ein [4Fe-4S] Cluster. Das Enzym katalysiert im Gegensatz zu anderen wolframhaltigen Enzymen keine Redoxreaktionen.¹²⁶ Für ein besseres Verständnis des Hydratase-Mechanismus wurde die Kristallstruktur der mitochondrialen Crotonase aus der Rattenleber aufgeklärt und untersucht. Die *syn*-Addition kann demnach über zwei verschiedene Wege erfolgen, welche in Abbildung 1.9 dargestellt sind. Einerseits kann die Wasseraddition über einen konzertierten Übergangszustand, andererseits über einen E1cb-Mechanismus erfolgen.¹¹⁹ In beiden Fällen wird die gleiche katalytische Maschinerie verwendet und das gleiche Produkt gebildet. Der Mechanismus der *anti*-Addition enthält darüber hinaus einen zusätzlichen Isomerisierungsschritt.¹²⁴

Eine besondere und für den vorgestellten Reaktionsweg interessantere Klasse der Hydratase sind die seit über 50 Jahren bekannten Oleat-Hydratase. Oleat-Hydratase katalysieren die stereoselektive Addition von Wasser an Ölsäure zu 10*R*-Hydroxystearinsäure.¹²⁷ Interessanterweise zeigen Oleat-Hydratase eine große Homologie zu Myosin-kreuzreaktiven Antigenen, welche ebenfalls die Hydratisierung von Linol- und Ölsäure katalysieren.¹²⁸ Weder der genaue Mechanismus noch die Struktur

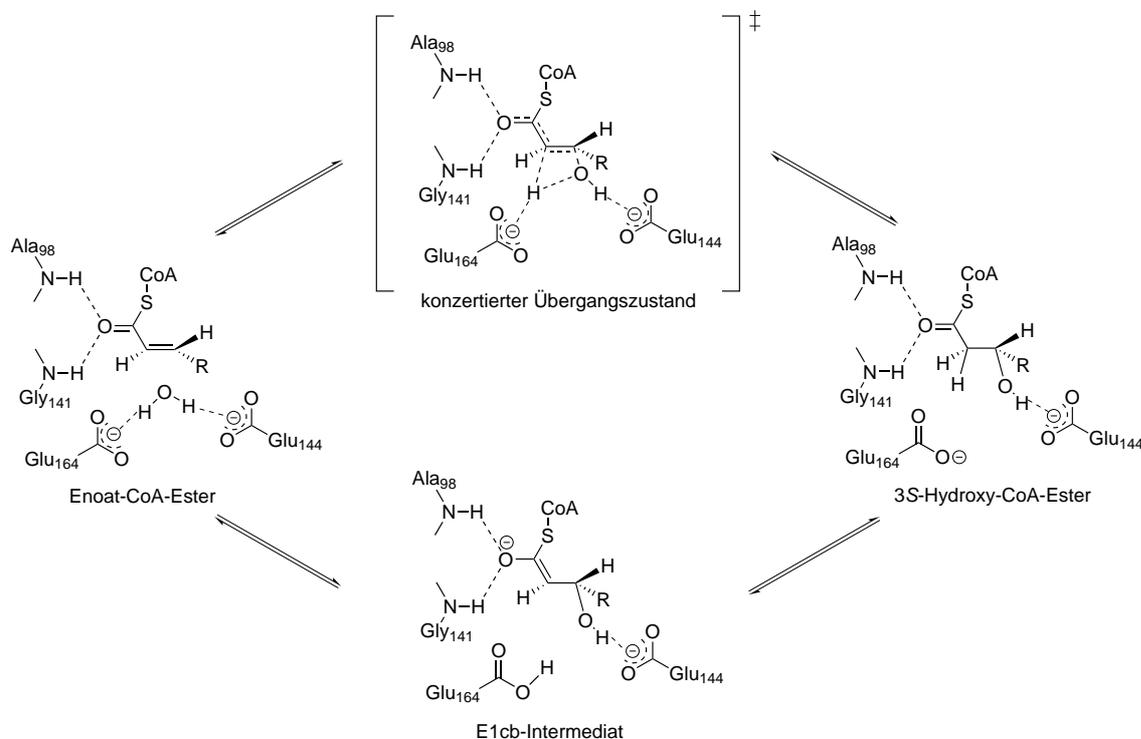


Abbildung 1.9: Mechanismus der mitochondrialen Crotonase (Enoyl-CoA-Hydratase) aus der Rattenleber. Die *syn*-Addition von Wasser kann entweder über konzertierten Übergangszustand (oben) oder über einen E1cb-Mechanismus (unten) erfolgen. Darstellung abgeändert nach Bahnson *et al.* (2002).¹¹⁹

der Oleat-Hydratasen sind bekannt, obwohl diese aufgrund der Tatsache, dass diese isolierte Doppelbindungen hydratisieren, besonders interessant sind.¹²⁹ Auch wenn bis vor Kurzem davon ausgegangen wurde, dass Oleat-Hydratasen aufgrund ihrer Selektivität nur über ein sehr begrenztes Substratspektrum verfügen, wurde von Marliere *et al.* die Umsetzung von Isobutanol zu Isobuten berichtet.¹³⁰ Die einzige zu Beginn dieser Arbeit für die heterologe Expression klonierte 73 kDa große Oleat-Hydratase stammt aus *Elizabethkingia meningoseptica* und soll deshalb in der vorgestellten Multienzymkaskade verwendet werden.¹³¹

1.4.3 Aldolasen

In der organischen Chemie spielen Aldolreaktionen als C-C-Bindungsreaktion unter Ausbildung eines Stereozentrums vor allem bei der Synthese von Kohlenhydraten und zuckerähnlichen Verbindungen eine große Rolle. Die Kontrolle der Stereochemie erfolgt hierbei entweder über die stöchiometrische Verwendung von chiralen Auxiliaren oder die katalytische Verwendung von chiralen Lewis-Säuren oder Organokatalysatoren.^{132–136}

Aldol- und Retro-Aldolreaktionen haben eine außerordentlich hohe biologische Relevanz, da diese Reaktionen in verschiedenen anabolen sowie katabolen Stoffwechselwegen zu finden sind.^{137,138} Neben der Glykolyse und Gluconeogenese findet sich die Aldolreaktion auch in sekundären Stoffwechselwegen wie beispielsweise der Isoprenoid-Biosynthese.¹³⁹

Aldolasen zählen zu einer speziellen Gruppe von Lyasen, welche die stereoselektive Addition eines Donornukleophils an ein Akzeptorelektrophil katalysieren. Sie zählen somit vor den Transketolasen, Oxynitrilasen und Thiamindiphosphat-abhängigen Enzymen zu den wichtigsten Biokatalysatoren für die asymmetrische C-C-Bindungsknüpfung.¹⁴⁰ Aufgrund ihres Mechanismus wird innerhalb der Familie der Aldolasen zwischen zwei unterschiedlichen Typen unterschieden (Abbildung 1.10). Typ 1 Aldolasen katalysieren die C-C-Bindungsbildung über die vorherige Ausbildung einer Schiff'schen Base mit dem Donornukleophil durch einen Lysinrest im aktiven Zentrum. Unter anschließender Addition an das Akzeptorelektrophil und Hydrolyse der Schiff'schen Base wird das Aldolprodukt freigegeben.¹⁴¹ Typ 2 Aldolasen sind im Gegensatz zu Typ 1 Aldolasen von einem zweiwertigen Metallkation abhängig, welches als Lewis-Säure fungiert. Neben Zn^{2+} wird auch die Inkorporation von Co^{2+} und Fe^{2+} beobachtet. Die zweiwertigen Metalle stabilisieren die Enolatform des Donors, welcher dann in analoger Weise zu Typ 1 Aldolasen mit dem Akzeptor reagieren kann.¹⁴²

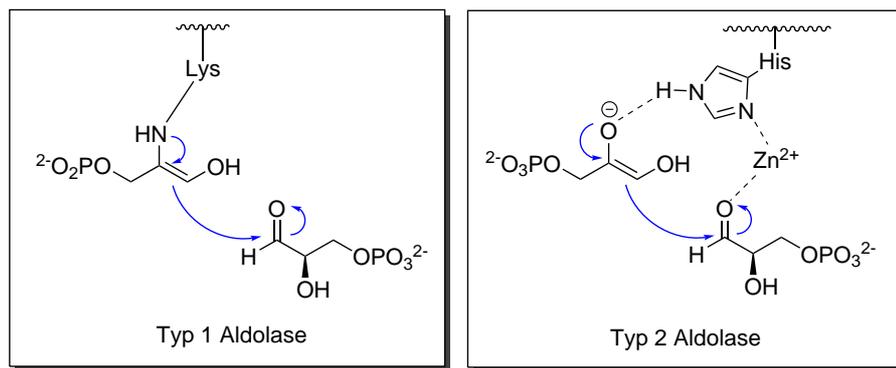


Abbildung 1.10: Mechanismus der Typ 1 und Typ 2 Aldolasen. Typ 1 Aldolasen aktivieren das Donorsubstrat über eine Schiff'sche Base mit einem katalytisch aktiven Lysinrest. In der Enaminform kann der Donor an das Akzeptorsubstrat angreifen. Typ 2 Aldolasen stabilisieren mit Metallkationen die Enolatform ähnlich der Enaminform bei Typ 1 Aldolasen, welche dann in analoger Weise an das Akzeptorsubstrat angreifen kann. Darstellung abgeändert nach Takayama *et al.* (1997) und R. B. Silverman (2002).^{141,143}

Aldolasen sind gegenüber dem Donorsubstrat außerordentlich spezifisch. Donornukleophile mit minimaler Strukturabweichung am C₃-Körper werden von den natürlichen Substraten nicht akzeptiert, weshalb Aldolasen entsprechend ihres natürlichen Substrats in vier unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: Die Dihydroxyacetonphosphat-abhängigen (DHAP) Aldolasen, die Pyruvat bzw. Phosphoenolpyruvat-abhängigen (PEP) Aldolasen, die 2-Desoxy-5-phosphat-abhängigen Aldolasen, welche Acetaldehyd als Donor verwenden, und die Glycin-abhängigen Aldolasen.¹⁴² Im Gegensatz zu den Donormolekülen akzeptieren Aldolasen ein breiteres Spektrum an Akzeptormolekülen, solange einige Grundvoraussetzungen wie das Vorhandensein einer α -Hydroxylgruppe und einer Kettenlänge kleiner gleich C₆ erfüllt sind.^{133,144}

Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Mutagenese von Aldolasen, um die Stereochemie zu ändern oder das Substratspektrum zu erweitern. So konnte beispielsweise die Stereochemie der DHAP-abhängigen Tagatose-1,6-bisphosphat-Aldolase variiert werden, um letztlich die diastereomere Fructose-1,6-bisphosphat zu erzeugen.¹⁴⁵ Mittels gerichteter Evolution konnte eine Variante der 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Aldolase (KDPG-Aldolase) identifiziert werden, welche 2-Keto-4-Hydroxybutansäure als Substrat umsetzt. Pentanal konnte somit neben Glyceraldehyd-3-phosphat als zusätzlicher Akzeptor für die KDPG-Aldolase evolviert werden.¹⁴⁶

Das im Retro-Aldol Pathway auftretende Intermediat 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure ist als Substrat für natürliche Aldolasen somit nicht geeignet. Der nach der Spaltung entstehende Akzeptor 10-Oxodecansäure ist vier C-Atome größer als jeder natürliche Akzeptor und 2-Octanon stellt darüber hinaus keinen natürlichen Donor dar. Zudem wurde in

der Literatur bisher nicht über die erfolgreiche Aufweitung der Donorspektren berichtet. Deshalb soll der Schritt der Retro-Aldolspaltung mit einer *in silico* hergestellten *de novo* Retro-Aldolase durchgeführt werden.

1.4.4 *de novo* Design von Enzymen

Das computergestützte Design von Enzymen entwickelte sich in den letzten Jahren als vielversprechende Methode zur Herstellung von maßgeschneiderten Enzymen.¹⁴⁷ Das Konzept der *de novo* Enzyme beruht, ähnlich wie bei katalytischen Antikörpern, auf der Stabilisierung der Übergangszustände der jeweiligen Reaktionen.¹⁴⁸

David Baker (Seattle, US), der Entwickler des Software Pakets Rosetta, und Stephen Mayo (Pasadena, US), Entwickler von ORBIT, sind als die Pioniere auf diesem Gebiet aufzuführen.^{1) 150–154} Mithilfe der entwickelten Pakete und besonders den Algorithmen, die der Software zugrunde liegen, lassen sich aktive Zentren von Enzymen um realistische Übergangszustandsmodelle herum gestalten. Deren Strukturen können weitaus komplexer sein als die katalytischer Antikörper und benötigen darüber hinaus keinerlei biologische Entsprechung.^{147,155}

In frühen Arbeiten von Bolon *et al.* konnte bereits eine artifizielle primitive Esterase durch Einbringung eines Histidinrests in eine Einbuchtung in der Proteinoberfläche hergestellt

¹⁾Die Arbeiten der beiden Pioniere unterscheiden sich nach eigenen Angaben. David Baker beschäftigt sich mit dem kompletten Neudesign, während Stephen Mayo dem Redesign von bekannten Enzymen zugeordnet wird.

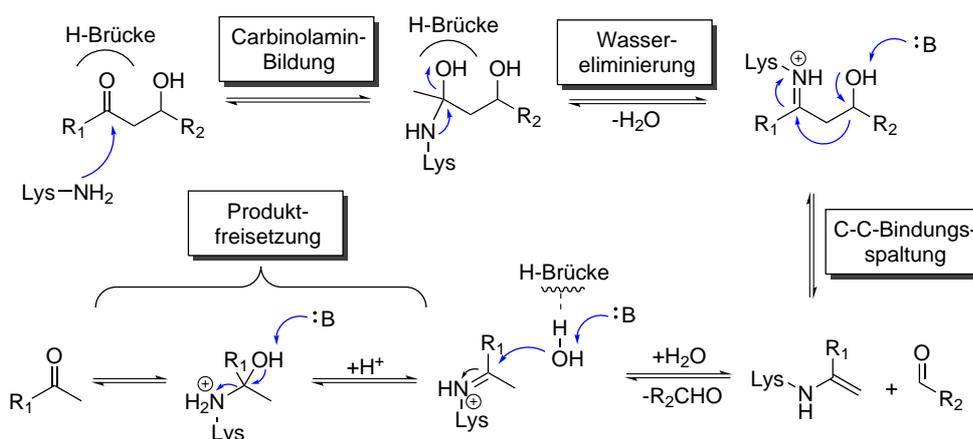


Abbildung 1.11: Vereinfachter möglicher Mechanismus der Retro-Aldol Spaltung. Neben einem aktiven Lysin benötigt die Retro-Aldol Spaltung weitere Reste, die eine Säure-Base Katalyse ermöglichen. Für das Design des aktiven Zentrums wurden vier relevante überlagerte Übergangszustände identifiziert, nach denen die Aldolasen designt wurden. Darstellung abgeändert nach Jiang *et al.* (2008).¹⁴⁹

werden.¹⁵³ Neben der Entwicklung eines semi-synthetischen Metalloenzym mit Rh^{3+} im aktiven Zentrum konnte bereits an einigen Beispielen das komplette *de novo* Design des aktiven Zentrums gezeigt werden.¹⁵⁶ Dazu gehören eine Ester-Hydrolase, eine Kemp-Eliminase, eine bimolekulare Diels-Alderase, aber auch eine Retro-Aldolase.^{149,157–159} Das *de novo* Design von Enzymen beruht auf der Wahl einer Reaktion und des dazugehörigen Mechanismus sowie der Identifikation der entsprechenden Übergangszustände. Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer *de novo* Reaktion ist allerdings das Vorhandensein einer geringen, aber nachweisbaren natürlichen Hintergrundreaktion. Abbildung 1.11 zeigt eine exemplarische Darstellung des Retro-Aldolmechanismus und die jeweiligen Übergangszustände, der Carbinolamin-Bildung, der Wassereliminierung, der C-C-Bindungsspaltung und der Produktfreisetzung. Für die Stabilisierung jedes Übergangszustands wird die optimale Aminosäureumgebung errechnet und anschließend durch Überlagerung ein theoretisches kombiniertes aktives Zentrum errechnet. Nach Maximierung der Übergangszustandsstabilisierung unter Berücksichtigung quantenmechanischer Parameter werden diese sogenannten „Theozyme“ in verschiedene Enzymgerüste gedockt. Die hieraus resultierenden Strukturen werden daraufhin *in silico* durch eine kombinatorische Variation hin auf die ideale Bindung des überlagerten Übergangszustands optimiert. Hierbei werden zuerst Reste berücksichtigt, welche den Übergangszustand direkt koordinieren und später auch Aminosäure, welche sich in zweiter Sphäre um das aktive Zentrum herum befinden. Die verschiedenen *de novo* Enzyme werden anschließend hinsichtlich der katalytischen Geometrie und der Bindungsenergie bewertet. Nach diesem computerbasierten Bewertungsverfahren werden die vielversprechendsten Varianten exprimiert und experimentell charakterisiert.^{147,149} Im Beispiel der Retro-Aldolasen zeigten Motive, die explizit ein Wassermolekül im aktiven Zentrum berücksichtigen, stets die höchste Aktivität.¹⁴⁹ Auf Grundlage dieser Arbeit wurden bereits erste Mutageneseexperimente für die gezielte Optimierung der Aldolase Aktivität durchgeführt, bei denen Aktivitätssteigerungen um das $4400\times$ erzielt werden konnten.¹⁶⁰

1.5 Zielsetzung

Die Nutzung nachwachsender Rohstoffe gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Biopolymere zeichnen sich nicht nur durch eine gesteigerte Ökoeffizienz, sondern auch durch ausgezeichnete Eigenschaften aus. Letztere sind vor allem von den verwendeten Monomeren abhängig. In diesem Zusammenhang sind deshalb besonders

mittelkettige Dicarbonsäuren interessant, die auf traditionell chemischem Weg nur schwer zugänglich sind.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine biokatalytische Möglichkeit zu finden, Fettsäuren in mittelkettige Dicarbonsäuren zu spalten. Da die Umsetzung nicht mit einem einzigen Enzym realisiert werden kann, ist es Gegenstand dieser Arbeit, eine entsprechende biokatalytische Multienzymkaskade zu entwickeln. Der Fokus in dieser Arbeit wird auf die Herstellung der beiden Dicarbonsäuren Azelainsäure und Sebacinsäure gelegt. Zu Beginn dieser Arbeit wurde für beide Dicarbonsäuren separate Strategien entwickelt.

Azelainsäure soll ausgehend von Linolsäure über die in Abbildung 1.1 (S. 27) dargestellte dreistufige Multienzymkaskade hergestellt werden. Linolsäure soll hierbei mit einer Lipoxygenase hydroperoxidiert und anschließend mit einer Hydroperoxid-Lyase gespalten werden. Die durch die Hydroperoxid-Lyase Reaktion gebildete 9-Oxononansäure soll in einem letzten Schritt zu Azelainsäure oxidiert werden. Ziel ist die Identifikation aller benötigten Enzyme, die Charakterisierung der gesamten Kaskade und die Durchführung einer Machbarkeitsstudie. Besonderes Augenmerk soll darüber hinaus auf die Untersuchung der Enantioselektivität der Hydroperoxid-Lyasen gelegt werden, da sowohl pflanzliche *S*-selektive als auch mikrobielle *R*-selektive Lipoxygenasen zur Auswahl stehen. Falls möglich soll die gesamte *in vitro* Kaskade exemplarisch in ein *in vivo* System übertragen werden.

Sebacinsäure soll über die in Abbildung 1.6 (S. 34) gezeigte vierstufige Multienzymkaskade bereitgestellt werden. Als Ausgangsprodukt soll hierbei Ricinolsäure verwendet werden. Das für die Retro-Aldolspaltung benötigte 1,3-Ketolmotiv soll mittels einer Alkohol-Dehydrogenase und einer Hydratase bereitgestellt werden. Nach der eigentlichen Retro-Aldolase katalysierten C-C-Bindungsspaltung soll die entstehende 10-Oxodecansäure mit einer Aldehyd-Dehydrogenase zu Sebacinsäure oxidiert werden. Da diese Kaskade im Gegensatz zu der Herstellung von Azelainsäure nicht dem pflanzlichen Oxylinmetabolismus entnommen ist, sondern eine komplett artifizielle Kaskade darstellt, die auf Grundlage einer Retrosynthese entwickelt wurde, soll sich dieser Teil der Arbeit auf die Identifikation geeigneter Enzyme und der Durchführung einer Machbarkeitsstudie beschränken.

Bei beiden vorgestellten Multienzymkaskaden muss für jeden Reaktionsschritt nicht nur ein entsprechendes Enzym gefunden, sondern auch eine passende Analytik etabliert werden. Nicht vorhandene Substrate oder Produkte, welche für eine Quantifizierung oder Untersuchung der Reaktion benötigt werden, sollen darüber hinaus synthetisiert werden.

2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden stets in der höchstmöglichen Reinheit von Alfa-Aesar (Ward Hill, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH), Macherey-Nagel (Düren, DE) und Sigma-Aldrich (St. Louis, US) bezogen. Nicht kommerziell erhältliche Verbindungen wie 12-Oxoölsäure und 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure wurden selbst synthetisiert (2.5, S. 69).

2.1.2 Antikörper und Marker

| | | | |
|---|-----------|---------------|------------------|
| Maus α (HIS) ₆ | 1 : 10000 | Sigma-Aldrich | St. Louis, US |
| Hase α Maus IgG (HRPO konjugiert) | 1 : 2000 | Sigma-Aldrich | St. Louis, US |
| PageRuler TM Prestained Protein Ladder | | Fermentas | St. Leon-Rot, DE |
| PageRuler TM Unstained Protein Ladder | | Fermentas | St. Leon-Rot, DE |
| 1 Kbp-DNA-Ladder | | Carl Roth | Karlsruhe, DE |

2.1.3 Enzyme und Puffer

| | | |
|--|-------------------|---------------|
| <i>Bam</i> HI | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Bgl</i> I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Cl</i> aI | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Eco</i> 81I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Hind</i> III | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Nco</i> I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Nde</i> I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Nru</i> I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Sac</i> I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Xho</i> I | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>PfuUltra</i> II-Polymerase | Thermo Scientific | Waltham, US |
| <i>Taq</i> -Polymerase | Thermo Scientific | Waltham, US |
| Alkalische Phosphatase (Rinderdarmschleimhaut) | Thermo Scientific | Waltham, US |
| Alkohol-Dehydrogenase 102 (ADH-102) | c-LEcta | Leipzig, DE |
| Lipase 1 (CRL1, <i>Candida rugosa</i>) | c-LEcta | Leipzig, DE |
| Lipase B (CALB, <i>Candida antarctica</i>) | c-LEcta | Leipzig, DE |
| Lipoxidase (<i>Gm</i> -LOX1, <i>Glycine max</i>) | Sigma-Aldrich | St. Louis, US |
| NADH-Oxidase 2 (Nox-02) | c-LEcta | Leipzig, DE |
| 10× Orange Puffer | Thermo-Scientific | Waltham, US |
| 10× <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer | Thermo-Scientific | Waltham, US |
| 10× T4 DNA-Ligase Puffer | Thermo-Scientific | Waltham, US |
| 10× Tango Puffer | Thermo-Scientific | Waltham, US |
| 10× <i>Taq</i> -Polymerase Puffer | Thermo-Scientific | Waltham, US |

| | | | |
|---------------------------------------|-----------|---------------------------------------|-----------|
| Kaliumphosphatpuffer (50 mM) | | TBS Puffer (10×, pH 7,4) | |
| KH ₂ PO ₄ | 3,40 g | TRIS-HCl | 78,8 g |
| K ₂ HPO ₄ | 4,36 g | NaCl | 87,66 g |
| ddH ₂ O | ad 1 L | ddH ₂ O | ad 1 L |
| pH mit HCl bzw. KOH einstellen | | pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | |
| TFBI Puffer (pH 5,8) | | TFBII Puffer (pH 6,5) | |
| Kaliumacetat | 0,59 g | MOPS | 0,21 g |
| Rubidiumchlorid | 2,42 g | Rubidiumchlorid | 1,1 g |
| Calciumchlorid | 0,29 g | Calciumchlorid | 0,12 g |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 2,0 g | Glycerin | 15 mL |
| Glycerin | 30 mL | ddH ₂ O | ad 100 mL |
| ddH ₂ O | ad 200 mL | steril filtrieren (0,2 µm Porengröße) | |
| steril filtrieren (0,2 µm Porengröße) | | Transferpuffer (10×, pH 8,3) | |
| TAE-Puffer (50×, pH 8,5) | | TRIS | 30,3 g |
| TRIS | 242,0 g | Glycin | 144,1 g |
| Kaliumacetat | 57,1 g | Methanol | 200 mL |
| 0,5 M EDTA pH 8 | 100 mL | ddH ₂ O | ad 1 L |
| ddH ₂ O | ad 1 L | pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | |
| pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | | Lysispuffer (pH 7,4) | |
| SDS-Probenpuffer (5×) | | TRIS-HCl | 5,06 g |
| 1,5 M TRIS-HCl (pH 6,8) | 4 mL | Glycerol | 100 mL |
| Glycerin | 10 mL | Tween-20 | 1 mL |
| β-Mercaptoethanol | 5 mL | Natriumchlorid | 29,25 g |
| SDS | 2 g | ddH ₂ O | 900 mL |
| 1 % Bromphenolblau | 1 mL | pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | |

| SDS-Laufpuffer (10×, pH 8,3) | | DNA-Probenpuffer (6×) | |
|-------------------------------------|---------|------------------------------|-------|
| TRIS | 30,3 g | Glycerin | 10 mL |
| Glycin | 144,1 g | 40 mM TAE pH 8,5 | 10 mL |
| SDS | 10 g | 1 % Bromphenolblau | 4 mL |
| ddH ₂ O | ad 1 L | | |
| pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | | | |

| Bindepuffer (pH 7,5) | | Elutionspuffer (pH 7,5) | |
|---------------------------------|--------|---------------------------------|--------|
| TRIS | 3,0 g | TRIS | 3,0 g |
| Imidazol | 0,7 g | Imidazol | 27,2 g |
| NaCl | 17,5 g | NaCl | 17,5 g |
| ddH ₂ O | ad 1 L | ddH ₂ O | ad 1 L |
| pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | | pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | |

2.1.4 Kits

| | | |
|--|-------------------|-------------|
| Pierce BCA Protein Assay Kit | Thermo Scientific | Waltham, US |
| Pierce Protein Concentrator, 9K MWCO | Thermo Scientific | Waltham, US |
| Zymoclean DNA Clean & Concentrator Kit | Zymo Research | Irvine, US |
| Zymoclean Gel DNA Recovery Kit | Zymo Research | Irvine, US |
| Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit | Zymo Research | Irvine, US |

2.2 Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 Plasmide

Die verwendeten Plasmide werden sowohl in isolierter Form sowie in *E. coli* Dauerkulturen bei -80 °C gelagert. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Gene finden sich im Anhang (A.1, S. 133). Die Klonierungen der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektoren sind in Kapitel 2.4.12 (S. 64) beschrieben.

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide

| ITB-Nr. | Box | Name | Insert | UniProt. | Quelle |
|---------|------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|
| ..1) | ..2) | pQE-30 | - | - | Quiagen |
| ..1) | ..2) | pQE-31 | - | - | Quiagen |
| ..1) | ..3) | pREP4 | - | - | Quiagen |
| ..1) | 1-B1 | pET-28a(+) | - | - | Novagen |
| ..1) | 1-A1 | pET-22b(+) | - | - | Novagen |
| ..1) | 1-A2 | pCOLADuet-1 | - | - | Novagen |
| pITB407 | 5-F1 | pColaAlkLp450 ⁴⁾ | <i>Ma</i> -CYP153A <i>Po</i> -AlkL | - Q00595 | Sumire Honda ¹⁶¹ |
| pITB856 | 8-B7 | pQE-9LOXIF | <i>Cs</i> -LOX1 | Q42710 | Hornung <i>et al.</i> ¹⁶² |
| pITB857 | 8-B8 | pQE-13HPL | <i>Ca</i> -13HPL | Q9ARH7 | Delcarte <i>et al.</i> ¹⁶³ |
| pITB858 | 8-B9 | pQE-9/13HPL | <i>Cs</i> -9/13HPL | Q9M5J2 | Matsui <i>et al.</i> ¹⁶⁴ |
| pITB859 | 8-C1 | pET-9MeloHPL | <i>Cm</i> -9/13HPL | Q93XR3 | Tijet <i>et al.</i> ¹⁶⁵ |
| pITB860 | 8-C2 | pMK-9LOXM | <i>As</i> -9LOX | Q8YK97 ⁵⁾ | Diese Arbeit ⁶⁾ |
| pITB861 | 8-C3 | pET-9LOXMH6 | <i>As</i> -9LOX | Q8YK97 ⁵⁾ | Diese Arbeit ⁶⁾ |
| pITB862 | 8-C4 | pMK-r9LOX | <i>Os</i> -LOX | Q76I22 | Diese Arbeit ⁶⁾ |
| pITB863 | 8-C5 | pET-r9LOX | <i>Os</i> -LOX | Q76I22 | Diese Arbeit ⁶⁾ |
| pITB864 | 8-C6 | pET-r9LOXMH6 | <i>Os</i> -LOX | Q76I22 | Diese Arbeit ⁶⁾ |
| pITB865 | 8-C7 | pQE-StLOX1 | <i>St</i> -LOX1 | Q41238 | Andreou <i>et al.</i> ¹⁶⁶ |
| pITB866 | 8-C8 | pMK-OAH1 | <i>Em</i> -OAH1 | C7DLJ6 | Diese Arbeit ⁶⁾ |
| pITB867 | 8-C9 | pUC-ALDH1 | <i>As</i> -ALDH1 | Q9FDS1 | Ishige <i>et al.</i> ¹⁶⁷ |
| pITB868 | 8-D1 | pET-OAH1(C) | <i>Em</i> -OAH1 | C7DLJ6 | E. Maurer |
| pITB869 | 8-D2 | pET-OAH1(N) | <i>Em</i> -OAH1 | C7DLJ6 | E. Maurer |
| pITB870 | 8-D3 | pET-OAH1(-) | <i>Em</i> -OAH1 | C7DLJ6 | Diese Arbeit |
| pITB871 | 8-D4 | pET-ALDH1(C) | <i>As</i> -ALDH1 | Q9FDS1 | Diese Arbeit |
| pITB872 | 8-D5 | pET-IST 1001 | IST 1001 | - (<i>de novo</i>) | Arzeda ¹⁴⁹ |
| pITB873 | 8-D6 | pET-IST 1002 | IST 1002 | - (<i>de novo</i>) | Arzeda ¹⁴⁹ |
| pITB874 | 8-D7 | pET-RA 60.2 | RA 60.2 | - (<i>de novo</i>) | Arzeda ¹⁴⁹ |
| pITB875 | 8-D8 | pET-RA 95.4 | RA 95.4 | - (<i>de novo</i>) | Arzeda ¹⁴⁹ |
| pITB876 | 8-D9 | pET-RA 95.5 | RA 95.5 | - (<i>de novo</i>) | Arzeda ¹⁴⁹ |
| pITB877 | 8-E1 | pET-RA 110.4 | RA 110.4 | - (<i>de novo</i>) | Arzeda ¹⁴⁹ |
| pITB878 | 8-E2 | pREP-Cs9/13HPL | <i>Cs</i> -9/13HPL | Q9M5J2 | J. Kittelberger ¹⁶⁸ |
| pITB879 | 8-E3 | pCOLA-OAH1 | <i>Em</i> -OAH1 | C7DLJ6 | E. Maurer ¹⁶⁹ |
| pITB880 | 8-E4 | pOAH1-AlkL | <i>Em</i> -OAH1 <i>Po</i> -AlkL | C7DLJ6 Q00595 | E. Maurer ¹⁶⁹ |

1) Für Grundplasmide sind keine ITB-Nummern verfügbar.

2) Plasmide wurden von Sandra Facey (ITB Stuttgart) aus einer separaten Sammlung bezogen.

3) pREP4 kann direkt aus dem Stamm *E. coli* SG13009 isoliert werden (ITB208 Box3-F1).

4) Vollständige Bezeichnung: pCola-Duet1: CYp153A M. aq.(G307A)-CPR + alkL.

5) Nicht UniProt, sondern Cyanobase Nr. (Gamma Plasmid, locus tag all8020).

6) Plasmide wurden direkt von GeneArt (Regensburg, DE) bezogen.

2.2.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, DE) bezogen.

Tabelle 2.2: Verwendete Primer

| Nr. | Name | Sequenz |
|-----|-----------------|---|
| 1 | IF-9LOX_mid-FWD | 5'-GTG GAA TTT GAG AGG AGA TG-3' |
| 2 | IF-9LOX_mid-REV | 5'-GAG ACA GCA ATA ATC CTG TAC-3' |
| 3 | StLOX1-SeqFWD | 5'-CTTGAAGATGTCAGACTTCC-3' |
| 4 | StLOX1-SeqREV | 5'-GTCCTCAACTGCTACTCCCC-3' |
| 5 | OAH1-FWD | 5'-GGA ATT CCA TAT GAC CAT GGG AAT GAA TCC GAT TAC CAG C-3' |
| 6 | OAH1-REV | 5'-CGC GGA TCC TTA GCC ACG AAT GCC TTT AAC CC-3' |
| 7 | OAH1-reALT | 5'-CCG CTC GAG GCC ACG AAT GCC TTT AAC CC-3' |
| 8 | SeqFWD2 | 5'-CAG CGA ATC CTT CCT GAA AAG C-3' |
| 9 | ALDH1-SeqFWD | 5'-GGATGTGCTGCAAGGCGATT-3' |
| 10 | ALDH1-SeqREV | 5'-ACTCATTAGGCACCCCAGGC-3' |
| 11 | ALDH1-fwd1 | 5'-GGG CAT ATG CAC TAT GTT GAT CCG AAT CAA TCT GG-3' |
| 12 | ALDH1-rev+his | 5'-CTC AAG CTT GAA AAA GCC CAT GGC TTT GG-3' |
| 13 | ALDH1Seq-Fwd | 5'-TTG ATG GCG GCA TGG AAA CT-3' |
| 14 | HPLpREP4-FWD | 5'-AAC CAA TGC ATT CCC TCA GGC GGC TCG AGA AAT CAT AAA AAA T-3' |
| 15 | HPLpREP4-REV | 5'-CGT ATG CAT CAG CTT CGC GAC CAT GGT TGG ATT CTC ACC AAT AAA AAA-3' |
| 16 | pREPF (A5) | 5'-GTT AGC GCG AAT TGT CGA CC-3' |
| 17 | pREPR (A6) | 5'-GAC CAA GCG ACG CCC AAC CT-3' |
| 18 | HPLmid (A7) | 5'-CAT CCC TCT GTT TCG AAG CT-3' |
| 19 | pREPF2 (A8) | 5'-GAA GCC AAT GGG GCA AGT TG-3' |
| 20 | Cola-FWD | 5'-CGA CAG TGC CAT GGG AAT GAA TCC GA-3' |
| 21 | Cola-REV | 5'-AAG GCA TTC GTG GCT AAG AGC TCG GTT CTG CAT-3' |

2.3 Medien und Zellkulturen

2.3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Bei der Herstellung der Wachstums- und Nährmedien wurde ausschließlich ddH₂O verwendet. Die aufgeführten Prozentangaben geben bei Flüssigkeiten den VV^{-1} - oder bei Feststoffen den mV^{-1} -Quotienten an. Feste Medien (Agarplatten) enthielten neben den angegebenen Komponenten 1,5 % Agar Agar. Alle Medien wurden vor der Verwendung 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für die Selektion auf bestimmte Marker wurden den Medien bestimmte Antibiotika zugegeben. Diese wurden in folgenden Endkonzentrationen verwendet: Ampicillin (Amp, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Kanamycin (Kan, 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und Chloramphenicol (Cm, 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

| LB-Medium (<i>lysogeny broth</i> , pH 7) | | | TB-Medium (<i>terrific broth</i> , pH 7,2) | | |
|---|-----------|--------|--|--------|-------|
| Trypton | 10 g | 1,0 % | Trypton | 12 g | 1,2 % |
| Hefeextrakt | 5 g | 0,5 % | Hefeextrakt | 24 g | 2,4 % |
| NaCl | 5 g | 1,0 % | Glycerin | 5 ml | 0,5 % |
| ddH ₂ O | ad 1 L | | ddH ₂ O | 900 mL | |
| pH mit HCl bzw. NaOH einstellen | | | pH mit 10 × TB-Puffer einstellen ¹⁾ | | |
| SOC-Medium (pH 7) | | | YT-Medium (2×, pH 7,2) | | |
| Trypton | 20 g | 2,0 % | Trypton | 16 g | 1,6 % |
| Hefeextrakt | 5 g | 0,5 % | Hefeextrakt | 10 g | 1,0 % |
| NaCl | 0,5 g | 0,05 % | NaCl | 5 ml | 0,5 % |
| 250mM KCL | 10 ml | 1,0 % | ddH ₂ O | 900 mL | |
| ddH ₂ O | ad 990 mL | | pH mit 10 × TB-Puffer einstellen | | |
| MgCl ₂ und Glukose zugeben ²⁾ | | | | | |

¹⁾Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 60 °C 100 mL des steril filtrierten 10 × TB-Phosphatpuffers zugeben (0,17 M KH₂PO₄, 0,72 M K₂HPO₄)

²⁾Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf Raumtemperatur 10 mL 10 mM sterile MgCl₂-Lösung zugeben (SOB-Medium, engl.: super optimal broth). Für die Herstellung von SOC-Medium 20 mL steril filtrierte 1 M Glukoselösung zugeben.

2.3.2 *E. coli* Stämme

Tabelle 2.3: Verwendete *E. coli* Stämme (−80 °C Dauerkulturen)

| Stamm | Genotyp | Quelle |
|------------|--|------------------|
| BL21 (DE3) | F [−] ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B [−] m _B [−]) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) | ITB Stuttgart |
| BW25113 | F [−] , DE(araD-araB)567, lacZ4787(del)::rrmB-3, LAM [−] , rph-1, DE(rhaD-rhaB)568, hsdR514 | ITB Stuttgart |
| C41 (DE3) | F [−] basierend auf <i>E. coli</i> BL21(DE3): ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B [−] m _B [−]) (DE3) + eine uncharakterisierte Mutation | ITB Stuttgart |
| DH5α | F [−] endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _k [−] m _k ⁺), λ- | ITB Stuttgart |
| JM109 | endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] hsdR17(r _k [−] m _k ⁺) | ITB Stuttgart |
| M15 | basierend auf <i>E. coli</i> K12: F'proA+B+ lacI ^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5 + pREP4 ¹⁾ | Quiagen |
| MC1061 | F [−] Δ(ara-leu)7697 [araD139] _{B/r} Δ(codB-lacI)3 galK16 galE15 λ [−] e14 [−] mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hsdR2(r [−] m ⁺) | ITB Stuttgart |
| Origami B | basierend auf <i>E. coli</i> K12: F'proA+B+ lacI ^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5 ¹⁾ | ITB Stuttgart |
| SG13009 | basierend auf <i>E. coli</i> K12: F'proA+B+ lacI ^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5 ¹⁾ + pREP4 | Quiagen |

¹⁾ M15, SG13009 und Origami B werden kommerziell vertrieben. Der genaue Genotyp ist nicht einsehbar.

2.3.3 Zellwachstum und Dauerkulturen

Um ausreichend Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben angezogen, deren Volumen dem fünffachen Eigenvolumen der Zellkultur entspricht. Flüssigkulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Festkulturen wurden bei 37 °C inkubiert. Um auf den Erhalt von Plasmiden selektionieren zu können, wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert (2.3.1, S. 51). Das Zellwachstum wurde mittels Absorptionsmessung bei 600 nm (OD₆₀₀) in einem Ultraspec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) verfolgt. Für die Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen wurde eine ü. N.-Flüssigkultur in sterilem Glycerin (Endkonz.: 50 %) suspendiert und bei −80 °C gelagert.

2.4 Methoden

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Innerhalb einer Gelmatrix werden bei der Agarose-Gelelektrophorese Nukleinsäure-Stränge in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch GelRed (Biotium, Hayward, US) Einlagerung werden diese unter UV-Licht (302 nm) sichtbar und können mit einem Standard verglichen werden.^{170,171}

Verwendet wurden horizontale Agarose/TAE-Gele (1 % Agarose in 1 × TAE [10 mM EDTA, 40 mM TRIS-Acetat pH 8,5], 0,5 µL mL⁻¹ GelRed). Die DNA-Proben wurden mit einem Fünftel des Probenvolumens an 6 × DNA-Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 20 mM TAE pH 8,5) versetzt und in einer Flachbett-Elektrophoresekammer (Mini Sub Cell GT, Bio-Rad, Hercules, US) in 1 × TAE elektrophoretisch (120 V, PowerPac 300, Bio-Rad, Hercules, US) getrennt. Als Längenstandard wird ein 1 kbp Standard (2.1.2, S. 45) verwendet.

2.4.2 Biotransformationen und Analytik

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Substrate und Produkte mit unterschiedlichen analytischen Methoden untersucht. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten, werden im Folgenden typische Reaktionsansätze zusammen mit der durchgeführten Analytik analog der Gliederung im Hauptteil geordnet. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe von Kalibrationskurven authentischer Standards. Abweichungen von den im Folgenden beschriebenen Standardvorschriften werden an den entsprechenden Stellen separat kenntlich gemacht. Ausgenommen bei dem Lipoxygenaseassays (2.4.14, S. 65) wurden die Substrate in Form von Dimethylsulfoxid-Stammlösungen hinzugegeben, sodass eine Dimethylsulfoxid-Endkonzentration von 2 % nicht überschritten wurde.

***In vitro* Herstellung von Azelainsäure**

Biotransformationen mit *St*-LOX1 (50 µg mL⁻¹), *As*-9LOX (15 µg mL⁻¹) und *Cs*- sowie *Cm*-9/13HPL (à 25 µg mL⁻¹) mit 250 µM Linolsäure wurden typischerweise in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen (500 µL Gesamtvolumen) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6) durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von entsprechenden Zelllysaten gestartet und bei Raumtemperatur und 180 Upm (Thermomixer comfort, Ep-

pendorf, Hamburg, DE) inkubiert. Bei Experimenten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (3.1.8, S. 87) wurden die *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Konzentrationen auf jeweils $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ erhöht. Die *As*-ALDH1 wird bei der *in vivo* Herstellung von Sebacin säure beschrieben.

Für die Analytik von 9/13-HPODE wurden die Reaktionen durch die Zugabe einer Natriumborhydrid-Suspension (10 % in Dimethylformamid) gequencht, um das Hydroperoxid zu einem Alkohol zu reduzieren. Nach 1 h wurde die Mischung mit 50 μL einer 1 M Salzsäurelösung angesäuert. Die Mischung wurde anschließend mit 750 μL Methyl-*tert*-butylether extrahiert. 200 μL der organischen Phase wurden verdampft (EZ-2 Plus, GeneVac, Ipswich, UK) und der Rückstand mit 40 μL *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid mit 1 % Trimethylsilylchlorid derivatisiert. 9- und 13-HPODE wurden auf einem GC-MS (Shimadzu GC-2010, AOC-500, Kyōto, JP) analysiert, welches mit einer DB-5 MS Säule ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$, Agilent, Santa Clara, US) ausgestattet war. Die Temperatur des Injektors betrug $250 \text{ }^\circ\text{C}$, die der Ionenquelle $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Probe wurde mit einem Split von 1:20 eingespritzt. Als Trägergas wurde Argon mit einer Lineargeschwindigkeit von 30 cm min^{-1} verwendet. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: $180 \text{ }^\circ\text{C}$ (für 2 min), Erhitzen auf $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (10 K min^{-1}) und Ausheizen für 2 min. Die Bestimmung der Regioisomerenverhältnisse zwischen 9- und 13-HPODE erfolgte durch Vergleich der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse m/z zwischen 225 : 440 und 173 : 440 der korrespondierenden reduzierten Trimethylsilylderivate (A.7, S. 150).

Der Linolsäureumsatz und die 9-Oxononansäureausbeute wurden bestimmt, indem die Reaktion direkt mit 1 M Salzsäurelösung gequencht und anschließend mit 750 μL Methyl-*tert*-butylether extrahiert wurde. 200 μL der organischen Phase wurden verdampft und der Überstand mit 40 μL Trimethylsulfoniumhydroxid (0,2 M in Methanol) derivatisiert. Die Quantifizierung erfolgte auf einem GC-FID (Shimadzu GC-2010 Plus, AOC-20i/s), welches mit einer ZB-FFAP ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$, Torrance, US) ausgestattet war. Die Injektortemperatur betrug $250 \text{ }^\circ\text{C}$, die des Detektors $320 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurde ein 1:10 Split und Wasserstoff als Trägergas mit einer Lineargeschwindigkeit von 30 cm min^{-1} verwendet. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: $150 \text{ }^\circ\text{C}$, Erhitzen auf $210 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 K min^{-1}) und weiteres Erhitzen auf $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (20 K min^{-1}). Bei der Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration wurde das Gesamtvolumen auf 200 μL reduziert und es wurde zweimal mit 200 μL Methyl-*tert*-butylether extrahiert.

Da die Komplettierung der *in vitro* Reaktionskaskade erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt, wurde die *As*-ALDH1 katalysierte Oxidation von 9-Oxononansäure zu Azelain säure in gleicher Weise analysiert wie die ebenfalls *As*-ALDH1 katalysierte Oxidation

von 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure. Die Beschreibung der Reaktionsparameter und Analytik findet sich deshalb unter 2.4.2 (S. 55).

***In vivo* Herstellung von Azelainsäure**

E. coli-Ganzzellreaktionen mit *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL wurden 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6) im 400 μL Maßstab in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 50 mg mL^{-1} (Zellfeuchtmasse) durchgeführt. Typischerweise wurde mit einer Substratkonzentration von 250 μM gearbeitet. Pro Reaktionsansatz wurden 50 mg mL^{-1} Zellen verwendet. Bei zweiphasigen Reaktionen wurde der Standardreaktionsansatz mit 80 μL Cyclohexan überschichtet. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Substrat gestartet und mit 50 μL einer 1 M Salzsäurelösung gequenchet. Es wurde zweimal mit 400 μL Methyl-*tert*-butylether extrahiert, die organische Phase wurde verdampft und der Überstand mit 40 μL *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid und 1 % Trimethylsilylchlorid derivatisiert. Linolsäure, 9-Oxononansäure und Azelainsäure wurden an einem GC-FID (Shimadzu GC-2010 Plus, AOC-20i/s, Kyōto, JP) quantifiziert, welches mit einer DB-5 Säule (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm , Agilent, Santa Clara, US) ausgestattet war. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet (30 cm min^{-1} Lineargeschwindigkeit). Die Injektortemperatur betrug 250 $^{\circ}\text{C}$, die des Detektors 320 $^{\circ}\text{C}$. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 50 $^{\circ}\text{C}$ (für 2 min), Erwärmen auf 100 $^{\circ}\text{C}$ (10 K min^{-1}), schnelles Erhitzen auf 200 $^{\circ}\text{C}$ (30 K min^{-1}), langsames Erhitzen auf 240 $^{\circ}\text{C}$ (10 K min^{-1}), letztlich Ausheizen bei 300 $^{\circ}\text{C}$ (40 K min^{-1}) für 3 min.

***In vitro* Herstellung von Sebacinsäure**

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Reaktionen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) in 200 μL Maßstab mit 250 μM Substrat bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und 180 Upm in einem Schüttelinkubator (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, DE) durchgeführt. Die Quantifizierung aller Reaktionen erfolgte mittels GC-FID (Shimadzu GC-2010 Plus, AOC-20i/s, Kyōto, JP), welches mit einer DB-5 Säule (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm , Agilent, Santa Clara, US) ausgestattet war. Als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet (30 cm min^{-1} Lineargeschwindigkeit). Die Injektortemperatur betrug 250 $^{\circ}\text{C}$, die des Detektors 320 $^{\circ}\text{C}$. Da sich bei den einzelnen Reaktionen die genauen Reaktionszusammensetzungen und GC Temperaturprogramme unterscheiden, werden nur diese im Folgenden aufgelistet. Der Alkohol-Dehydrogenase ADH-102 Reaktion (2,5 mg mL^{-1}) wurden zu-

sätzlich $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ NADH Oxidase (NOX), 2 mM Magnesiumchlorid und $1,25 \text{ mM}$ NAD^+ zugesetzt. Die Reaktionen wurden mit folgendem Temperaturprogramm analysiert: $180 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), Erhitzen auf $240 \text{ }^\circ\text{C}$ (15 K min^{-1}), Halten für 6 min, Erhitzen auf $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (20 K min^{-1}) und für weitere 2 min Ausheizen. Die Biotransformationen der Oleat-Hydratase *Em*-OAH1 (1 mg mL^{-1}), der Aldolasen insbesondere RA 110.4 (4 mg mL^{-1}) und der Aldehyd-Dehydrogenase *As*-ALDH1 ($0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ und $1,25 \text{ mM}$ NAD^+) wurden alle mit demselben Temperaturprogramm analysiert: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), Erhitzen auf $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (10 K min^{-1}), weiter Erhitzen auf $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (30 K min^{-1}), dann langsamer auf $240 \text{ }^\circ\text{C}$ (10 K min^{-1}) und letztlich auf $300 \text{ }^\circ\text{C}$ (40 K min^{-1}), wobei anschließend noch für 3 min ausgeheizt wurde.

Im Vergleich zu der Kalibriergerade von reiner 12-Oxoölsäure konnte bei Anwesenheit von Protein nicht die gesamte 12-Oxoölsäure erfasst werden. Besonders bei geringen Substratkonzentrationen ($250 \text{ } \mu\text{M}$) war dieser Effekt am deutlichsten und macht hier auch bei den entsprechenden Negativkontrollen bis zu 42,4 % aus. Aus diesem Grund sind sowohl die ADH-102 Reaktion als auch die *Em*-OAH1 Reaktion betroffen. Da weder Ricinolsäure noch 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure von diesem Verhalten betroffen waren, wurden ausschließlich für 12-Oxoölsäure Korrekturfaktoren verwendet. Dieser war im Fall der ADH-102 Reaktion 1,6, da bei dieser Reaktion eine stete Zunahme vermessen wurde. Da bei der *Em*-OAH1 Reaktion eine stete Abnahme beobachtet wurde, wurden 42,4 % hinzuaddiert, um die Reaktion rein rechnerisch bei 100 % Substrat zu starten.

2.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Im Laufe der Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Typen von kompetenten Zellen gearbeitet. Chemokompetente Zellen wurden hergestellt, indem eine 100 mL Hauptkultur mit einer 5 mL LB-Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft wurde. Nach Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,7 wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 g_N , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min) steril geerntet und das Pellet in 30 mL eiskaltem TFB1-Puffer (2.1.3, S. 46) resuspendiert. Nach 90 min auf Eis wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 4 mL eiskaltem TFB2-Puffer (2.1.3, S. 46) resuspendiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die resuspendierten Zellen in 50 μL Aliquots bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen wurde bis zu dem Resuspendierungsschritt analog verfahren. Anstelle von 30 mL TFB1-Puffer wurde das Pellet in 5 mL eiskaltem, sterilem ddH_2O resuspendiert. Die Suspension wurde $20\times$ mit sterilem ddH_2O

verdünnt und anschließend erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in 5 mL des Überstandes resuspendiert und anschließend $10\times$ verdünnt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 5 mL eiskaltem sterilem 10 %igem Glycerol resuspendiert, anschließend $5\times$ verdünnt und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden abschließend in 5 mL eiskaltem, sterilen 10 %igem Glycerol resuspendiert und analog zu der Herstellung chemokompetenter Zellen aliquotiert.

2.4.4 Immunoblot

Der Immunoblot ist eine Nachweismethode für Proteine, die mittels SDS-PAGE (2.4.11, S. 63) aufgetrennt worden sind. Diese werden hierzu auf eine Membran übertragen und in einer zweistufigen Antikörperreaktion detektiert. Ein primärer, monoklonaler Antikörper bindet direkt an das gesuchte Protein. Der sekundäre polyklonale Antikörper ist mit einer Peroxidase (horseradish peroxidase, HRPO) konjugiert und bindet an den primären Antikörper. HRPO katalysiert unter anderem die Umsetzung von Luminol mit H_2O_2 . Die bei der Umsetzung entstehende Chemolumineszenz kann detektiert werden.

Die Übertragung wurde in einem Semi-Dry-Blotter (Trans-Blot SD, Bio-Rad, Hercules, US) durchgeführt. In die Apparatur wurden auf der Anodenseite sukzessive drei Bio-Rad Gel Dryer Filterpapiere, BioTraceNitrocellulosemembran (Pall Life Sciences, Port-Washington, US), das SDS-Polyacrylamidgel und nochmals drei Bio-Rad Gel Dryer Filterpapiere luftblasenfrei gestapelt. Alle Komponenten wurden zuvor 5 min in $1\times$ Transfer Puffer äquilibriert (2 mM TRIS, 15 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3). Bei konstanter Spannung $U = 15$ V (PowerPac 300, Bio-Rad, Hercules, US) wurde 45 min geblottet. Nach dem Transfer wurden die freien, unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran 1 h mit 5 %igem Milchsäurepulver in TBS Puffer (65 mM, 150 mM NaCl, pH 7,4) geblockt. Die Membran wird 1h bei RT mit dem in TBS Puffer verdünnten primären Antikörper unter Schütteln inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen für 5 min mit TBS Puffer mit 0,1 % Tween-20 wurde die Membran auf analoge Weise mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wird die Membran mit dem Amersham ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) analysiert.

2.4.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zu der Isolierung von Plasmid-DNA wurde das ZyppyPlasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, US) verwendet. Das Kit basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen und wurde stets nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden direkt von Zymo Research oder einen Zwischenhändler bezogen. Die DNA-Konzentration wurde mittels Extinktionsmessung bei 260 nm mit dem NanoDrop 1000 (Agilent, Santa Clara, US) ermittelt.

2.4.6 Mosher-Ester-Analyse

Die Mosher-Ester-Analyse ist eine Methode zur Ermittlung der absoluten Konfiguration oder zur Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen. Mithilfe der Mosher-Säure MTPA (engl.: α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid) können im NMR nicht unterscheidbare Enantiomere (Alkohole oder Amine) in im NMR unterscheidbare Diastereomere überführt werden.^{173–175} Ausgehend von einem Ausgangsenantiomer werden zwei verschiedene Diastereomere mit den zwei verschiedenen Mosher-Enantiomeren hergestellt (Abb. 2.1A). Durch die α -Phenylgruppe kommt es zu einer Abschirmung des benachbarten Rests, was zu einer Hochfeldverschiebung in einer ^1H -NMR-Analyse führt (Abb. 2.1B).¹⁷² Durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der beiden Diastereomere kann auf die absolute Konfiguration und bei genügend hoher Auflösung auf den

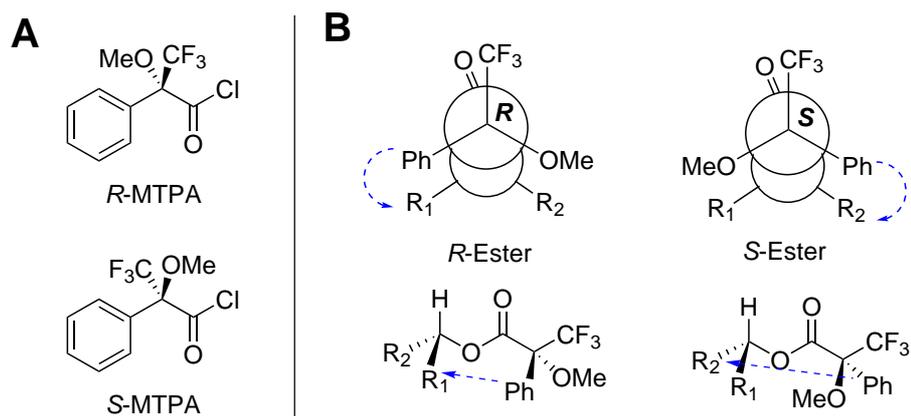


Abbildung 2.1: Mosher-Ester-Analyse. A: *R*- und *S*-Enantiomere des α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetylchlorids. B: Zwei unterschiedliche Diastereomere, welche aus der Reaktion mit den beiden Mosher-Säurechloriden gewonnen werden. Deutlich zu erkennen in der Newman-Projektion – die Abschirmung der Seitenketten durch den Phenylrest und der damit verbundenen Hochfeldverschiebung.¹⁷²

Enantiomerenüberschuss geschlossen werden.¹⁷²

Die Mosher-Ester-Analyse wurde verwendet, um die Enantiospezifität der *Em*-OAH1 katalysierten Hydratisierung von 12-Oxoölsäure zu 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure zu untersuchen. Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde eine Probe aus einer von Elena Maurer (Diplomarbeit, ITB 2014) durchgeführten größeren Biotransformation (Gesamtvolumen: 1,25 L, 500 μM 12-Oxoölsäure, 0,75 g L^{-1} *Em*-OAH1, 25 °C, 16 h, 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5) verwendet.¹⁶⁹ Um Komplikationen mit der freien Carboxylgruppe zu vermeiden, wurde die Säure zu dem entsprechenden Methylester derivatisiert. 40 mg 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure (0,13 mmol) wurden mit 1 mL Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH, 0,2M in Methanol) für 1 h bei 40 °C derivatisiert. Überschüssiges TMSH wurde durch die Zugabe von 26 μL Ameisensäure (0,07 mmol) entfernt. Leicht flüchtige Komponenten wurden unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer abgenommen. 6,5 mg 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure (0,02 mmol) wurden in einem 2 mL GC-Rollrandglasfläschchen in 1 mL trockenem Deuteriochloroform gelöst. Nach der Zugabe von 32 μL trockenem Pyridin (0,4 mmol) und 59,2 μL *R*-(-)-MTPA-Cl (0,32 mmol) wurde das GC-Rollrandglasfläschchen verschlossen und die Mischung 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung ohne weitere Aufarbeitung direkt in ein NMR-Probenröhrchen überführt und mittels ^1H -NMR (Bruker Avance 500 Mhz, Billerica, US) vermessen. Für die Herstellung des zweiten Diastereomers wurde in analoger Weise mit *S*-(+)-MTPA-Cl verfahren. Die absolute Konfiguration wurde nach dem Protokoll von Hoye *et al.* durch Vergleich der $\Delta\delta^{\text{SR}}$ -Werte ermittelt.¹⁷²

2.4.7 Plasmidtransformation und -entfernung

Für die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet. Die Doppeltransformation wurde analog dem Protokoll für Einfachtransformation durchgeführt mit dem Unterschied, dass die doppelte Menge Plasmid-DNA verwendet wurde. 10 μL chemokompetenter Zellen wurden mit 1 μL Plasmid-DNA in einem sterilen 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für genau 45 s bei 42 °C. Vor der Zugabe von 80 μL sterilem SOC-Medium wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Nach 1 h bei 30 °C wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Für die Transformation von Ligationsprodukten wurde analog mit einem 10 \times größeren Ansatz verfahren. Nach der Zugabe von 800 μL sterilem SOC-Medium und Inkubation

bei 37 °C wurden zwei unterschiedliche Verdünnungen ausplattiert. Nachdem die ersten 100 µL ausplattiert wurden, wurde der Ansatz mittels Zentrifugation (13 000 Upm, 1 min) aufkonzentriert und separat ausplattiert.

Die Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompente Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurden 50 µL kompetenter Zellen mit 5 µL Plasmid-DNA vermischt und in einer Elektroporationsküvette in einem Gene Pulser (2,5 mV, Bio-Rad, Hercules, US) transformiert. Nach Überführung der Zellen in 1 mL steriles SOC-Medium wurde die Suspension 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend analog zu der Transformation von chemokompetenten Zellen ausplattiert.

Um Plasmide aus *E. coli* Zellen zu entfernen, wurde das Protokoll von Whithers *et al.* verwendet.¹⁷⁶ Das Protokoll entspricht dem Protokoll für die Transformation von elektrokompenten Zellen, nur dass keine Plasmid-DNA verwendet wurde und die Zellen letztlich auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika ausplattiert wurden. Die Selektion auf von Plasmid-DNA befreiten Klonen erfolgte über Vergleich mit den entsprechenden Replikplatten mit Antibiotika.¹⁷⁶

2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der gezielten, enzymatisch katalysierten Amplifikation von DNA-Fragmenten. Durch sich wiederholende Zyklen aus Hitzedenaturierung der DNA, Primer-Bindung (Annealing) und Polymerisation (Elongation) durch DNA-Polymerasen in 5'→3' Richtung kommt es pro Zyklus zu einer Verdopplung des zwischen den Primern liegenden DNA-Fragments.¹⁷⁷ Im ersten Schritt des Zyklus, der Denaturierung bei 95 °C, werden die beiden komplementären Stränge der Templat-DNA aufgetrennt. Durch das anschließende Senken der Temperatur auf 65 °C (abhängig vom Schmelzpunkt der Pri-

Tabelle 2.4: Standardzusammensetzung von PCR-Ansätzen bei der Verwendung von *Pfu*-Polymerase.

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|--|---------|---------------------|
| 10× <i>Pfu</i> -Puffer (-MgCl ₂) | 5 µL | 1× |
| MgCl ₂ | 3 µL | 1,5 mM |
| Vorwärts-Primer (10 mM) | 1 µL | 200 µM |
| Rückwärts-Primer (10 mM) | 1 µL | 200 µM |
| dNTPs (à 10 mM) | 1 µL | à 200 µM |
| Templat-DNA (10 ng µL ⁻¹) | 1 µL | 10 ng |
| <i>Pfu</i> -Polymerase (1 U µL ⁻¹) | 1 µL | 1 U |
| ddH ₂ O | 37 µL | 50 µL Gesamtvolumen |

mer) wird die Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die nun einzelsträngigen Templat-DNA ermöglicht. Im nächsten Schritt des Zyklus wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase von 72 °C erhöht. Die Polymerase verlängert nun die Primer, bis wieder doppelsträngige DNA vorliegt.¹⁷⁸

Bei der Kolonie-PCR können anstelle isolierter DNA ganze Zellen als Templat verwendet werden. Hierbei wurden einige wenige Zellen mithilfe einer sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte in 30 µl 0,02 M NaOH in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß suspendiert. Die suspendierten Zellen wurden 10 min bei 95 °C im Heizblock getempert. Nach 1 min Zentrifugation (13 000 Upm) wurde 1 µL der gelösten DNA abgenommen und als Templat verwendet.

Es wurden ausschließlich die Thermocycler Mastercycler gradient und ep gradient (Eppendorf, Hamburg, DE) verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene PCR-Experimente durchgeführt. Im Anhang befindet sich eine ausführliche Zusammenstellung der verschiedenen PCR-Programme (A.2, S. 146), welche im Kapitel 2.4.12 „Klonierung von Expressionsvektoren“ (S. 64) detailliert aufgeschlüsselt werden. Soweit nicht anders angegeben, bestand ein typischer Reaktionsansatz mit *Pfu*-Polymerase aus den in Tabelle 2.4 aufgeführten Komponenten. Andere Polymerasen werden analog nach Herstellerangaben verwendet (2.1.3, S. 46). Abweichung von dem Standardreaktionsansatz werden an den entsprechenden Stellen kenntlich gemacht (2.4.12, S. 64). Vor weiterer Verwendung wurden die amplifizierte DNA-Fragmente stets mit Zymoclean Gel DNA Gel Recovery Kit (Zymo Research, Irvine, US) aufgereinigt (2.1.4, S. 48).

2.4.9 Proteinexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich bakterielle Expressionssysteme verwendet. Es wurde stets mit neu transformierten Zellen gearbeitet, da besonders im Fall der Lipoxygenasen sonst keine Induktion der Expression möglich war. Dieser Abschnitt beschreibt exemplarisch die Expression der Lipoxygenase von *As-9LOX*. Abweichende Parameter für die Expression weiterer Zielgene sind in Tabelle 2.5 gelistet. Eine 5 mL LB-Übernachtskultur (30 µg mL⁻¹ Kanamycin) wurde direkt von einer LB-Agarplatte (30 µg mL⁻¹ Kanamycin) angeimpft und nach Inkubation ü. N. bei 37 °C (180 Upm) dazu verwendet, eine 400 mL TB-Hauptkultur (30 µg mL⁻¹ Kanamycin) anzuimpfen. Vor dem Temperaturwechsel auf die Expressionstemperatur von 20 °C wurde die Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C inkubiert (180 Upm). Nach 1 h bei 20 °C und 180 Upm wurde die Expression mit der Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach 24 h wurden

die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (10820 g_N , 4 °C, 30 min) und entweder direkt aufgeschlossen (2.4.15, S. 67) oder bis zu der weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Einige der verwendeten Parameter finden sich so oder auf leicht abgeänderte Weise in der Originalpublikation. Dies wird in Tabelle 2.5 durch die Angabe der entsprechenden Literaturstellen kenntlich gemacht. Für alle Aldolasen wurden dieselben, in Tabelle 2.5 gelisteten Expressionsbedingungen wie für RA 110.4 verwendet. Für anfängliche Screening-Experimente wurden Parameter 1 für die späten eigentlichen Experimente Parameter 2 verwendet.

Eine größere Menge der Oleat-Hydratase *Em*-OAH1 wurde darüber hinaus in Zusammenarbeit mit Elena Maurer und Sven Richter mittels Fermentation hergestellt. Eine 100 mL TB-Vorkultur (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin) wurde verwendet, um eine 5 L TB-Hauptkultur (30 mg L^{-1} Kanamycin, 0,5 mL L^{-1} Antifoam 204) in einem Fermenter (Infors, Bottmingen, CH) auf eine Start OD_{600} von 0,1 anzuimpfen. Nach Inkubation bei 37 °C, 800 Upm, pH 6 und einer Belüftung von 8 L min^{-1} bis zu einer OD_{600} von 11 wurde die Temperatur auf 30 °C abgesenkt und mit 1 mM IPTG induziert. Über den Zeitraum der letzten 15 h wurde eine lineare Fütterungsstrategie mit 5,9 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ mit 86 %igem Glycerin verfolgt. Während der gesamten Fermentation wurde der pH-Wert mit einer 28 %igen Ammoniumhydroxid-Lösung und 10 %iger Phosphorsäure konstant gehalten. 13 h nach Induktion wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet (10820 g_N , 4 °C, 30 min).

Tabelle 2.5: Verwendete Parameter für die Biosynthese von Zielproteinen.

| Enzym | Plasmid | <i>E. coli</i> | Medium | Marker | IPTG | Temp. | Dauer |
|------------------------------------|---------------------------|----------------|--------|----------|--------|-------|-------|
| <i>St</i> -LOX1 ^{166,179} | pQE- <i>St</i> LOX1 | SG13009 | LB | Kan, Amp | 0,1 mM | 16 °C | 48 h |
| <i>As</i> -9LOX | pET-9LOXMH6 | BL21(DE3) | TB | Kan | 0,1 mM | 20 °C | 24 h |
| <i>Cs</i> -9/13HPL ¹⁶⁴ | pQE- <i>Cs</i> 9/13HPL | M15 | TB | Amp | 1 mM | 16 °C | 24 h |
| <i>Cm</i> -9/13HPL ¹⁶⁵ | pET-9MeloHPL | BL21(DE3) | TB | Amp | – | 24 °C | 24 h |
| <i>St</i> -LOX1 | pQE- <i>St</i> LOX1 | SG13009 | LB | Kan, Amp | 0,1 mM | 16 °C | 48 h |
| <i>Cs</i> -9/13HPL | pREP4- <i>Cs</i> -9/13HPL | | | | | | |
| <i>Em</i> -OAH1 | pET-OAH1(C) | BL21(DE3) | TB | Kan | 0,1 mM | 30 °C | 16 h |
| 1. RA 110.4 ¹⁴⁹ | pET-RA110.4 | BL21(DE3) | LB | Kan | 0,5 mM | 20 °C | 4 h |
| 2. RA 110.4 | pET-RA110.4 | BL21(DE3) | TB | Kan | 0,5 mM | 20 °C | 24 h |
| <i>As</i> -ALDH1 | pET-ALDH1 | BL21(DE3) | TB | Kan | 1 mM | 20 °C | 24 h |

2.4.10 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche innerhalb einer DNA-Doppelhelix spezifische Palindrome erkennen und den DNA-Strang verdauen. Je nach Enzym befinden sich die Schnitte in der DNA-Doppelhelix entweder direkt übereinander („blunt ends“) oder versetzt zueinander („sticky ends“).

Für den Kontroll-Verdau wurden 3 μL Plasmid-Lösung, 0,5 μL Endonuklease ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL $10\times$ Inkubationspuffer und 5,5 μL ddH₂O in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt, für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.4.1, S. 53).

Für den Verdau von Inserts und Vektoren für Klonierungsansätze wurden stets die idealen Reaktionsbedingungen von den von Thermo Scientific (Waltham, US) vorgeschlagenen Protokollen verwendet. Zusätzlich wurde dem Reaktionsansatz 1 μL alkalische Phosphatase hinzugefügt, um spontane Religation zu vermeiden. Vor dem eigentlichen Klonierungsansatz wurden die Inserts mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.4.1, S. 53) und Gelaufreinigung (2.1.4, S. 48) aufbereitet.

2.4.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen.¹⁸⁰ Aufgrund der Korrelation der relativen Aufspaltung der zu trennenden Proteine mit ihrer molaren Masse können diese nach ihrer Größe getrennt werden.¹⁸¹ Mit der aliphatischen Seitenkette lagert sich SDS als anionisches Tensid an Proteine an und denaturiert diese durch coulombsche Abstoßung der Sulfatgruppen. Disulfidbrücken werden durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert. Da sich je nach Proteingröße mehrere Hundert SDS-Moleküle an das Protein anlagern, kann die Eigenladung vernachlässigt werden. Um eine bessere Auftrennung zu erhalten, wird die SDS-PAGE diskontinuierlich durchgeführt. In einem großporigen Sammelgel sammeln sich die Proteine zu einer schmalen Lauffront und durchwandern darauf ein feinporiges Trenngel. Die Porengröße wird über die Polyacrylamid-Konzentration eingestellt. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich außerdem noch in ihrem pH-Wert (Sammelgel-Puffer: 1 M TRIS-HCl, 0,7 % SDS, pH 6,8; Trenngel-Puffer: 1,5 M TRIS-HCl, 0,38 % SDS, pH 8,8). Die verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden entsprechend der Angaben des Standardwerks von Sambrook und Russell hergestellt.¹⁸² Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden 8 % – 16 %ige Gele verwendet. Pro Polyacrylamid-Gel werden 5 mL des noch flüssigen Trenngels in eine Vorrichtung (Dual Gel Caster SE245, Hoefer, Holliston, US) gegos-

sen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit 2 mL noch flüssigem Sammelgel überschichtet. Vor der Polymerisation des Sammelgels wird ein Probenkamm für die Ausformung von Proben-taschen eingesetzt.

Eine 80 µL Probe wurde mit 20 µL 5× SDS-Probenpuffer (25 % TRIS-HCl, 10 % SDS, 25 % β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Taschen des Polyacrylamid-Gels wurden mit 10 µL Probe beladen. Als Standard wurden 1,5 µl Protein-Ladder (2.1.2, S. 45) aufgetragen. Nach dem Befüllen der Elektrophoresekammer (Mini-Vertical Unit SE250, Hoefer, Holliston) mit SDS-Laufpuffer (200 mM Glycin, 25 mM TRIS, 0,1 % SDS) wurde die Elektrophorese bei 110 mV (PowerPac, Bio-Rad, Hercules, US) gestartet. Nach Durchlaufen des Trenngels wurde die Spannung auf 150 mV erhöht. Die Elektrophorese wurde nach Austritt der Bromphenolblau-Bande beendet.

2.4.12 Klonierung von Expressionsvektoren

Für die Klonierung von Expressionsvektoren wurden die in Tabelle 2.6 gelisteten Templat-Gene als Inserts mit den entsprechenden Oligonukleotiden (2.2.2, S. 50) amplifiziert (2.4.8, S. 60 und A.2, S. 146). Sowohl Zielvektor Plasmid-DNA als auch die Insert-DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (2.4.10, S. 63), anschließend ligiert (2.4.13, S. 65), transformiert (2.4.7, S. 59) und mittels Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft (GATC, Konstanz, DE).

Tabelle 2.6: Klonierung von Expressionsvektoren.

| Vektor | Templat-DNA | Plasmid-DNA | Primer | Nukleasen | PCR |
|----------------|-------------|----------------|---------|------------------------------|-----|
| pET-OAH1(C) | pMK-OAH1 | pET-28a(+) | 5 + 7 | <i>NcoI</i> + <i>XhoI</i> | 1 |
| pET-OAH1(N) | pMK-OAH1 | pET-28a(+) | 5 + 6 | <i>NdeI</i> + <i>BamHI</i> | 1 |
| pET-OAH1(-) | pMK-OAH1 | pET-28a(+) | 5 + 6 | <i>NcoI</i> + <i>BamHI</i> | 1 |
| pET-ALDH1(C) | pUC-ALDH1 | pET-22b(+) | 11 + 12 | <i>NdeI</i> + <i>HindIII</i> | 2 |
| pREP-Cs9/13HPL | pQE-9/13HPL | pREP4 | 14 + 15 | <i>Bsu36I</i> + <i>NruI</i> | 3 |
| pCOLA-OAH1 | pMK-OAH1 | pCOLADuet-1 | 20 + 21 | <i>NcoI</i> + <i>SacI</i> | 4 |
| pOAH1-AlkL | pMK-OAH1 | pCOLA-AlkL-Maq | 20 + 21 | <i>NcoI</i> + <i>SacI</i> | 4 |

Tabelle 2.7: Standardzusammensetzung von Ligationsansätzen.

| Komponente | Volumen | Endkonzentration |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|
| Vektor-DNA | 2 μ L | 1 \times (20–100 ng) |
| Insert-DNA | 10 μ L | 3 \times –5 \times |
| 10 \times T4 DNA-Ligase Puffer | 2 μ L | 1 \times |
| 50 % PEG 4000 ¹⁾ | 2 μ L | - |
| T4 DNA-Ligase | 1 μ L | 5 U |
| ddH ₂ O | 3–5 μ L 1) | 50 μ L Gesamtvolumen |

¹⁾ PEG 4000 wurde nur bei der Klonierung von pREP4-Cs9/13HPL verwendet.

2.4.13 Ligation

Alle Ligationen wurden nach der Vorschrift für glatte Enden nach dem Protokoll von Thermo Scientific durchgeführt.¹⁸³ Ein Ligationsansatz bestand aus den in Tabelle 2.7 angeführten Komponenten. Insert-DNA wurde stets in 3–5 \times Überschuss zur Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation wurde ü. N. bei 4 °C durchgeführt und die ligierte Plasmid-DNA anschließend in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert (2.4.7, S.59).

2.4.14 Enzymassays

Je nach Zweck wurden zwei verschiedene Lipoxygenasenassays und ein Dehydrogenasenrelevanter NAD⁺-Assay verwendet. Der 235 nm-Dienassay ermöglicht die Verfolgung der Hydroperoxidspezies in Echtzeit. Der 235 nm Dienassay beruht auf der Bildung des konjugierten Diensystems, welches bei 235 nm absorbiert und bei der Insertion von molekularem Sauerstoff in Linolsäure entsteht. Der zweite Indamin-Farbstoffassay kann zwar ausschließlich für eine Endpunktbestimmung verwendet werden, erlaubt aber einen deutlich höheren Durchsatz. In Anwesenheit von Hydroperoxiden und eines Häm-Katalysators wird bei dem Indamin-Farbstoffassay aus MBTH (3-Methylbenzothiazolonhydrazon) und DMAB (3-(Dimethylamino)-benzoesäure) durch oxidative Kupplung ein Farbstoff gebildet, welcher bei 590 nm absorbiert.^{184,185} Obwohl der Indamin-Farbstoffassay nur für anfängliche Screening-Experimente verwendet wurde, wird er aufgrund seines Potentials bei der weiteren Verwendung in Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Mutagenese-Experimenten aufgeführt.

25 mM Linolsäure-Stammlösungen wurden hergestellt, indem 155 μ L Linolsäure (140 mg) und 257 μ L Tween 20 (280 mg) in 5 mL ddH₂O emulgiert wurden. Die Emulsion wurde durch die Zugabe von 300 μ L 2 M Natriumhydroxid-Lösung geklärt

und anschließend auf 20 mL verdünnt, 10 min mit Stickstoff gespült und anschließend in Form von 1 mL Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Messung der Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenase Aktivität wurde ein Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid NAD^+/NADH -Assay verwendet, da beide Enzyme NAD^+ als Cosubstrat verwenden.

235 nm Dienassay

Zu 1 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer in einer 1 mL Quarzglasküvetten (Typ Nr. 6040-UV, Hellma, Müllheim, DE) wurden je nach Proteinkonzentration typischerweise 20 μL Zelllysat hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 μL 25 mM Linolsäure-Stammlösung (50 μM) gestartet und die Änderung der Absorption in einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) aufgezeichnet. Für die Untersuchung der Hydroperoxid-Lyasen Aktivität wurde zunächst mithilfe der Lipoxygenase *Gm*-LOX1 eine reproduzierbare Menge des 13-Hydroperoxids gebildet und anschließend nach Zugabe der Hydroperoxid-Lyase die Abnahme der Absorption im Photometer verfolgt. Für die Berechnung der 9- und 13-HPODE Konzentration wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{235} = 23\,000\text{ L mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ verwendet.^{186,187}

Indamin-Farbstoffassay

Für die Durchführung des Indamin-Farbstoffassays wurden 500 μL Assaylösung A (10 mL 20 nM DMAB, 0,4 mL 25 mM Linolsäure, 9,6 mL ddH₂O) in einer 1 mL Plastikküvette mit 10 μL Lysat versetzt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 500 μL Assaylösung B (0,4 mL 10 mM MBTH, 2 mg Häm, 19,2 mL ddH₂O) hinzugegeben und der Ansatz für weitere 5 min inkubiert. Durch die Zugabe von 50 μL 1 %igem SDS wurde die Reaktion gequencht. Die Empfindlichkeit des Assays kann für Proben mit geringer Lipoxygenase Aktivität erhöht werden, indem die 10 \times Menge Lysat eingesetzt

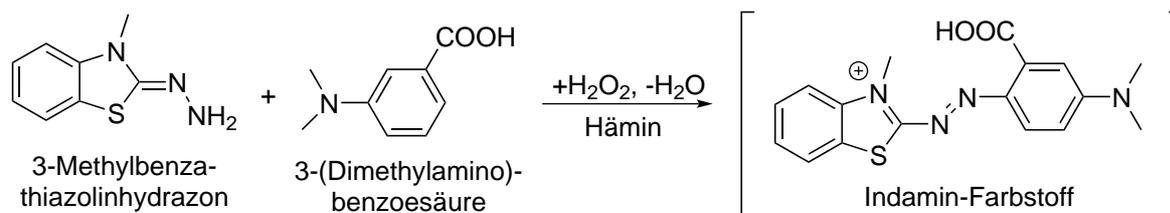


Abbildung 2.2: Hydroperoxid medierte Herstellung eines Indamin-Farbstoffs mittels oxidativer Kupplung von MBTH (3-Methylbenzothiazolonhydrazon) und DMAB (3-(Dimethylamino)-benzoesäure).^{184,185}

wird und die Inkubationszeit nach der Zugabe von Assaylösung B auf 20 min verlängert wird. Für die Berechnung der HPODE Konzentration wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{590} = 18700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.^{184,185}

NAD⁺/NADH-Assay

Sowohl die oxidierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid Cofaktors NAD⁺ als auch die reduzierte Form NADH zeigen ein gemeinsames Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei der Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen katalysierten Oxidation von Alkoholen oder Aldehyden wird das Cosubstrat NAD⁺ zu NADH reduziert, welches durch die Ausbildung eines chinoiden Systems bei 340 nm absorbiert ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Enzymkonzentrationen wurden so angepasst, dass zwischen 20 und 60 s eine lineare Steigung bei der Zunahme der Absorption beobachtet werden konnte.

Die nachfolgende Versuchsdurchführung beschreibt den exemplarischen Aktivitätstest mit *As*-ALDH1, die verwendete Proteinkonzentration wurde bei Bedarf angepasst. In einer 1 mL Halbmikro Polystyrolküvette (Ratiolab, Dreieich, DE) wurden zu 943,4 μL TRIS-HCl (pH 8,8) 25 μL NAD⁺ (100 mM in TRIS-HCl pH 8,8), 11,6 μL *As*-ALDH1 Lysat (0,5 mg mL⁻¹ Gesamtprotein-Endkonzentration) hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 μL Substrat (25 mM in Dimethylsulfoxid) gestartet und die Änderung der Extinktion am Photometer aufgezeichnet.

2.4.15 Zellaufschluss und Proteinaufreinigung

Der Aufschluss von Zellen erfolgte mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250, Output: 4, duty cycle: 35 %, Danbury, US). Aufzuschließende Zellpellets wurden in 10 mL g⁻¹ Lysispuffer resuspendiert und in 4 \times 2 min Zyklen aufgeschlossen. Zwischen den Zyklen wurden die Zellen 1 min auf Eis gekühlt. Kleinere Proben \sim 1 mL wurden mit 2 Zyklen à 45 s aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (30310 g_N, 4 °C, 1 h). Lysatproben wurden bei 4 °C gelagert und vor der Verwendung steril filtriert. Die Proteinaufreinigung der Enzyme RA 95.5, RA 110.4, *As*-ALDH1 und *Em*-OAH1 erfolgte über immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) mit einer 1 mL HisTrapHP Säule (GE Healthcare, Solingen, DE) an einem ÄKTAexplorer 100 System (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE). Die Proben RA 95.5, RA 110.4 und *As*-ALDH1 wurden nach Sterilfiltration mit einem Fluss von 1 mL min⁻¹ Bindepuffer (2.1.3, S. 46)

auf die Säule gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 12 Säulenvolumen (CV, engl.: column volume) Bindepuffer gewaschen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten über 8 CV auf 100 % Elutionspuffer (2.1.3, S. 46). Anstelle eines linearen Gradienten erfolgte die Aufreinigung von *Em-OAH1* mit einem Stufengradienten. Nach 12 CV wurde der Anteil an Elutionspuffer auf 15 % erhöht, nach weiteren 7 CV auf 30 % und letztlich nach weiteren 7 CV auf 60 %. Fraktionen mit Zielprotein wurden vereint, mittels PD-10 Säulen (SephadexG25M, GE Healthcare, Solingen, DE) auf Lysispuffer umgepuffert und vor der Verwendung mit 7 mL Pierce9K MWCO Concentrator Säulen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) aufkonzentriert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit, welches entsprechend den Herstellerangaben verwendet wurde.

2.5 Synthesen

Kommerziell nicht erhältliche Verbindungen wurden selbst synthetisiert. Einerseits, um diese als authentische Standards für die Quantifizierung und andererseits, um diese als Substrate für Biotransformationen verwenden zu können. Dieser Abschnitt beschreibt die verwendete Synthesestrategien der einzelnen Verbindungen. Im Folgenden finden sich darüber hinaus die genauen Versuchsdurchführungen sowie die Auswertung der mittels ^1H - und ^{13}C -NMR durchgeführten Analysen.

2.5.1 Synthese von 9-Oxononan- und 10-Oxodecansäure

Sowohl 9-Oxononan- als auch 10-Oxodecansäure konnten mittels Ozonolyse in nur einer Stufe hergestellt werden.¹⁸⁸ Als Substrat für die Synthese von 9-Oxononansäure wurde Ölsäure verwendet (Abbildung 2.3A). 10-Oxodecansäure hingegen wurde aus 10-Undecensäure hergestellt (Abbildung 2.3B). Um den Verlauf der Ozonolyse verfolgen zu können, wurde Sudan III verwendet, ein roter Farbstoff, der im Verlauf der Reaktion ebenfalls ozonisiert wird. Um die Ozonolyse auf der Stufe der ω -Oxocarbonsäuren anhalten zu können und um eine Überoxidation zu vermeiden, wurden die Reaktionen mit Triphenylphosphin aufgearbeitet. Obschon bei der Ozonolyse von 10-Undecensäure das leicht abtrennbare Formaldehyd entsteht, wurden beide Reaktionen mittels Säulenchromatografie aufgearbeitet, um überschüssiges Triphenylphosphin und das ebenfalls entstandene Triphenylphosphinoxid abzutrennen.

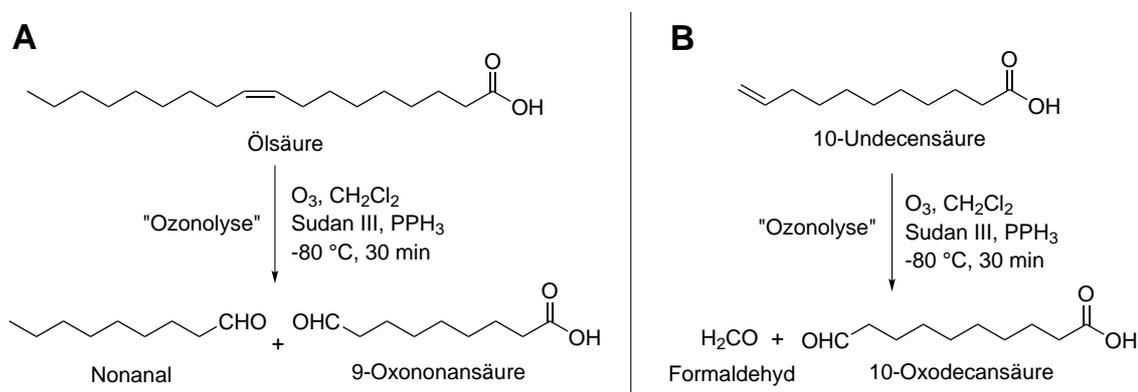
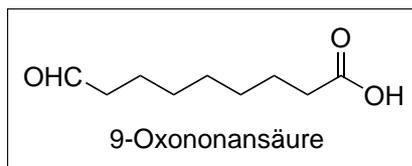
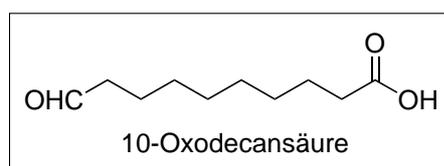


Abbildung 2.3: Herstellung von 9-Oxononan- und 10-Oxodecansäure mittels Ozonolyse. A: Ozonolyse von Ölsäure. B: Ozonolyse von 10-Undecensäure.



9-Oxononansäure wurde mittels Ozonolyse von Ölsäure hergestellt. Eine Lösung aus 1,44 g Ölsäure (5,1 mmol) und einer Spatelspitze Sudan III in 80 mL Dichlormethan wurde unter Rühren in einem 250 mL Rundkolben auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die Lösung wurde für 10 min mit reinem Sauerstoff gespült. Daraufhin wurde für weitere 30 min Ozon durch das Reaktionsgemisch geleitet, bis die Färbung durch den Farbstoff vollständig verschwunden war. Nach der Zugabe von 2 g Triphenylphosphan (7,63 mmol) wurde die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 12 h gerührt.¹⁸⁸ Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und das Produkt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Cyclohexan : Diethylether / 60 : 40). 9-Oxononansäure: $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9,76 (-CHO, 1 H, t, $J = 1,77$; 1,77 Hz); 2,43 (-CH₂-CHO, 2 H, dt, $J = 7,35$; 7,31; 1,75 Hz); 2,35 (-CH₂-COOH, 2 H, t, $J = 7,43$; 7,43 Hz); 1,74-1,54 (Alkyl, 4 H, m); 1,32 (Alkyl, 6 H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 203,00 (C=O, Aldehyd); 180,12 (COOH, Carboxyl); 43,84 (-H₂C-CHO); 34,00 (-H₂C-COOH); 28,97; 28,90; 28,80; 24,55; 21,96.



10-Oxodecansäure wurde in analoger Weise zu der Synthese von 9-Oxononansäure allerdings aus 10-Undecensäure hergestellt. 1 g 10-Undecensäure (5,43 mmol) und eine Spatelspitze Sudan III wurden in einem 250 mL Rundkolben in 80 mL Dichlormethan gelöst und unter Rühren auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die Lösung wurde für 10 min mit reinem Sauerstoff gespült, bevor 30 min lang Ozon durch das Reaktionsgemisch geleitet wurde, bis die Rotfärbung vollständig verschwunden war. Nach der Ozonolyse wurden 2,68 g Triphenylphosphan (8,68 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur aufgewärmt.¹⁸⁸ Nach weiteren 12 h wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen und 10-Oxodecansäure mittels Säulenchromatographie isoliert (Cyclohexan : Diethylether : Dichlormethan / 43 : 43 : 14).

10-Oxodecansäure: $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9,76 (-CHO, 1 H, t, $J = 1,82$;

1,82 Hz); 2,43 (-CH₂-CHO, 2 H, dt, $J = 7,37; 7,32; 1,80$ Hz); 2,35 (-CH₂-COOH, 2 H, t, $J = 7,46; 7,46$ Hz); 1,62 (Alkyl, 4 H, m); 1,31 (Alkyl, 8 H, m). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 203,07 (C=O, Aldehyd); 180,17 (COOH, Carboxyl); 43,87 (-H₂C-CHO); 34,03 (-H₂C-COOH); 29,12; 29,06; 29,01; 28,94; 24,60; 22,02.

2.5.2 Synthese von 12-Oxoölsäure

12-Oxoölsäure wurde mittels Swern-Oxidation über den entsprechenden Methylester hergestellt (Abbildung 2.4). Versuche, die freie Säure mittels Swern- oder Cr⁶⁺-Oxidation umzusetzen, führten hauptsächlich zu der Bildung von Nebenprodukten, zudem konnten die Methylester leichter voneinander getrennt werden als die entsprechenden Carbonsäuren.^{189–191} Ricinolsäure wurde in einem ersten Schritt säurekatalytisch verestert und anschließend mit Oxalylchlorid und Dimethylsulfoxid umgesetzt. In einem letzten Schritt musste der entstandene 12-Oxoölsäuremethylester hydrolysiert werden. Allerdings neigt auch diese Reaktion unter Verwendung zu harscher Reaktionsbedingungen zu der Bildung von Nebenprodukten. Weder basenkatalytisch bei 130 °C noch unter Verwendung der zweifach molaren Menge Kaliumhydroxid konnte der Ester selektiv hydrolysiert werden.^{192,193} Unter Verwendung der Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) konnte 12-Oxoölsäure selektiv allerdings mit geringen Ausbeuten hydrolysiert werden. Um die Hydrolyse weiter zu verbessern, wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Elena Maurer weitere Lipasen getestet. Hierbei wurden neben der Verwendung von freien und immobilisierten Enzymen auch verschiedene Cosolventien untersucht. Die besten Resultate

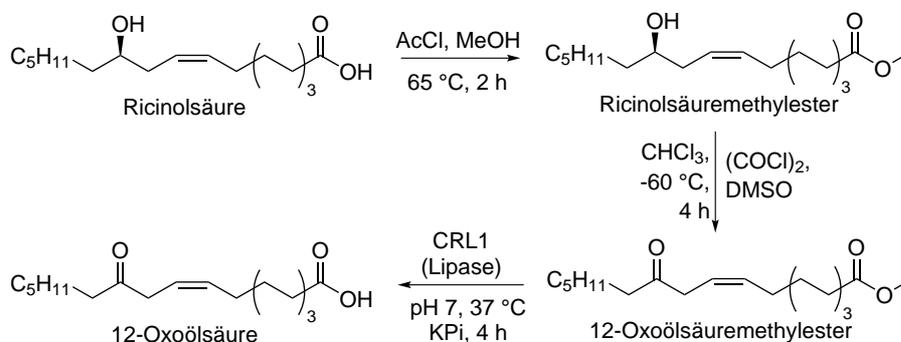
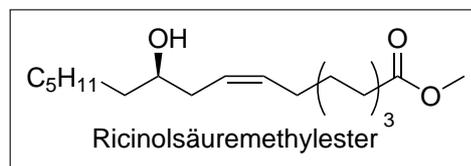


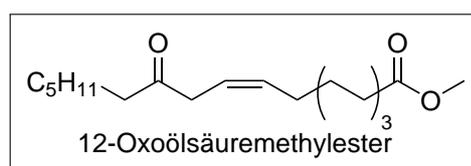
Abbildung 2.4: Herstellung von 12-Oxoölsäure mittels Swern-Oxidation von Ricinolsäure über den korrespondierenden Methylester und anschließender *Candida rugosa* Lipase 1 katalysierter Hydrolyse.

konnten schließlich mit der Lipase 1 aus *Candida rugosa* und der Verwendung von Isopropanol als Cosolvent erzielt werden.¹⁶⁹



Ricinolsäuremethylester wurde mittels Säure katalysierter Veresterung von Ricinolsäure hergestellt. Hierzu wurden 19,6 mL Ricinolsäure (61,6 mmol) in einem 100 mL Rundkolben in 50 mL Methanol gelöst. Nach der Zugabe von 5 mL Acetylchlorid (70,3 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 2 h bei 65 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 mL ddH₂O gequencht und dreimal mit 30 mL Methyl-*tert*-butylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend unter Vakuum aufkonzentriert. Die Aufreinigung von Ricinolsäuremethylester erfolgte mittels Säulenchromatografie unter Verwendung eines binären Gradienten (Hexan : Methyl-*tert*-butylether / 90 : 10 bis 80 : 20).^{194,195}

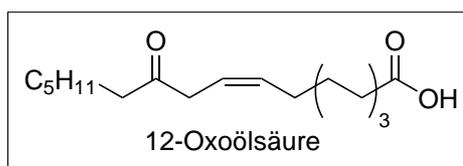
Ricinolsäuremethylester: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 5,59-5,51 (-CH=HC-, 1 H, m); 5,44-5,36 (-CH=HC-, 1 H, m); 3,67 (-COOCH₃, 3 H, s); 3,64-3,57 (HC-OH, 1 H, m); 2,30 (-CH₂-COOMe, 2 H, t, *J* = 7,55; 7,55 Hz); 2,21 (2 H, t, *J* = 6,61; 6,61 Hz); 2,05 (2 H, q, *J* = 7,08; 6,90; 6,90 Hz); 1,66-1,55 (2 H, m); 1,53-1,40 (aliphatische, 2 H, m); 1,30 (aliphatische, 16 H, s); 0,88 (-CH₃, 3 H, t, *J* = 6,82; 6,82 Hz). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 174,32 (-COOMe, Carboxyl); 133,37 (sp²-C); 125,24 (sp²-C); 71,50 (C-OH, Alkohol); 51,46 (-OCH₃, Ester); 36,87; 35,37; 34,09; 31,85; 29,58; 29,37; 29,13; 29,09; 27,38; 25,73; 24,93; 22,63; 14,10.



12-Oxoölsäuremethylester wurde mittels Swern-Oxidation aus Ricinolsäuremethylester hergestellt. Hierzu wurde 1 mL Oxalylchlorid (11 mmol) in 12,5 mL Dichlormethan in einem 50 mL Rundkolben bei -60 °C gelöst. 1,7 mL Dimethylsulfoxid (24 mmol)

wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst und mit einem Tropftrichter langsam dem Reaktionsgemisch zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 15 min bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, bevor 1,56 g Ricinolsäuremethylester (5 mmol) gelöst in 5 mL Dichlormethan hinzugegeben wurden. Vor der Zugabe von 3,48 mL Triethylamin (25 mmol) wurde die Reaktionslösung für 30 min gerührt. Nach weiteren 30 min bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde das Reaktionsgemisch über einen Zeitraum von 4 h auf Raumtemperatur aufgewärmt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 25 mL Wasser gequenchet und dreimal mit 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingedunstet. 12-Oxoölsäuremethylester wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan : Methyl-*tert*-butylether / 90 : 10) aufgereinigt.^{189,196}

12-Oxoölsäuremethylester: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, d_6 – DMSO) δ /ppm: 5,54-5,44 (-CH=HC-, 2 H, m); 3,58 (-OCH₃, 3 H, s); 3,21-3,14 (CO-CH₂-CH, 2 H, m); 2,43 (CH₂-CO-, 2 H, t, $J = 7,28; 7,28$ Hz); 2,28 (CH₂-COOMe, 2 H, t, $J = 7,37; 7,37$ Hz); 1,98 (-CH-CH₂-, 2 H, dd, $J = 12,67; 6,45$ Hz); 1,54-1,39 (aliphatische, 4 H, m); 1,35-1,15 (aliphatische, 14 H, m); 0,85 (3 H, t, $J = 6,88, 6,88$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, d_6 – DMSO) δ /ppm: 208,34 (C=O, Keton); 173,30 (-COOMe, Carboxyl); 132,32 (sp^2 -C); 121,84 (sp^2 -C); 51,12 (O-CH₃, Ester); 41,42; 40,83; 33,21; 31,02; 28,67; 28,46; 28,37 (2C), 28,18; 26,77; 24,36; 23,07; 21,93; 13,85.



12-Oxoölsäure wurde durch Hydrolyse aus dem korrespondierenden Methylester hergestellt. Hierzu wurden 16 mL 12-Oxoölsäuremethylester (100 mM in Isopropanol; 1,6 mmol) in 146 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) gelöst. Nach Zugabe von 830 mg *Candida rugosa* Lipase 1 (CRL1) wurde das Reaktionsgemisch für 4 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mL 1 M H₂SO₄ gequenchet. Die Mischung wurde dreimal mit 50 mL Methyl-*tert*-butylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend unter vermindertem Druck aufkonzentriert. 12-Oxoölsäure wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohex-

an : Methyl-*tert*-butylether / 70 : 30 und 0,1 % Eisessig) aufgereinigt.

12-Oxoölsäure: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 5,69-5,44 (-CH=HC-, 2 H, m); 3,15 (-CO-CH₂-CH=, 2 H, d, $J = 6,47$ Hz); 2,43 (-CH₂-CO-, 2 H, t, $J = 7,47$; 7,47 Hz); 2,35 (-CH₂-COOH, 2 H, t, $J = 7,52$; 7,52 Hz); 2,02 (2 H, q, $J = 6,83$; 6,82; 6,82 Hz); 1,71-1,52 (aliphatische, 4 H, m); 1,41-1,21 (aliphatische, 14 H, m); 0,88 (-CH₃, 3 H, t, $J = 6,84$; 6,84 Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 209,48 (C=O, Keton); 179,89 (COOH, Carboxyl); 133,55 ($\text{sp}^2\text{-C}$); 121,02 ($\text{sp}^2\text{-C}$); 42,38; 41,67; 34,01; 31,60; 29,25; 29,09; 29,04; 28,98; 28,90; 27,46; 24,64; 23,79; 22,50; 14,04.

2.5.3 Synthese von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure

Für die Synthese von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure mit dem 1,3-Ketolmotiv wurde eine Alternative zu der Aldolreaktion gewählt (Abbildung 2.5). Einerseits, um eine Reaktion mit kinetischer Reaktionskontrolle zu vermeiden und andererseits, weil die Verwendung von Bleiche (NaOCl) besonders bei dem Aufbau von länger-kettigen Systemen bereits beschrieben wurde. Um die Enantioselektivität der *de novo* Aldolasen in Kombination mit dem reinen Enantiomer der Oleat-Hydratase Reaktion untersuchen zu können, wurde die Synthese bewusst so gewählt, dass ein racemisches Gemisch entsteht.

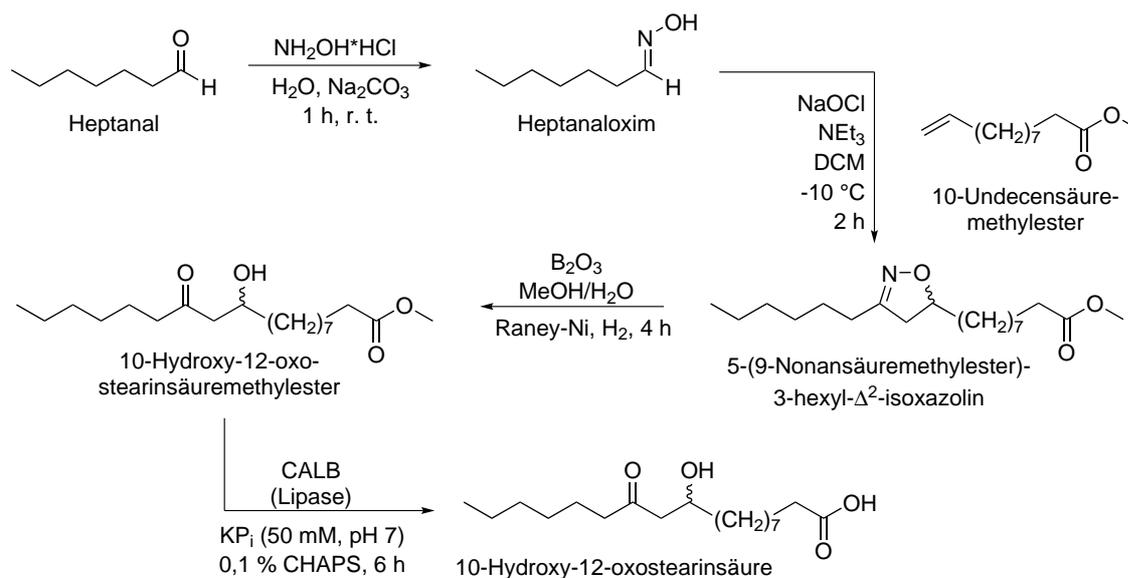
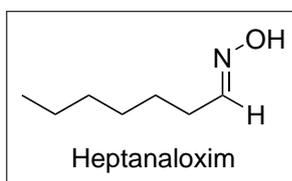
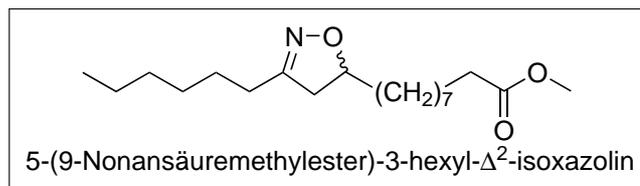


Abbildung 2.5: Herstellung von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure über eine Δ^2 -Isoxazolin Zwischenspezies.

In einem ersten Schritt wird Heptanal mit Hydroxylamin zu dem entsprechenden Oxim umgesetzt. Heptanaloxim wird anschließend mit Bleiche (NaOCl) aktiviert und mittels einer selektiven 1,3-dipolaren Cycloaddition an 10-Undecensäuremethylester addiert. Bei dieser Reaktion wird nur die Bildung des 3',5'-substituierten Δ^2 -Isoxazolins beobachtet. Dieses wird anschließend unter Verwendung von Wasserstoff und Raney-Nickel als Hydrierkatalysator zu dem 10-Hydroxy-12-oxostearinsäuremethylester umgesetzt, welches in einem letzten Schritt noch hydrolysiert werden muss. Da bei der Synthese von 12-Oxoölsäure gute Erfahrungen mit der Verwendung von Lipasen gemacht wurden, wurde hier ebenfalls eine Lipase (CALB) verwendet. Die Hydrolyse bei 52 °C kann annähernd quantitativ durchgeführt werden, da 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure bei dieser Temperatur als Feststoff ausfällt.

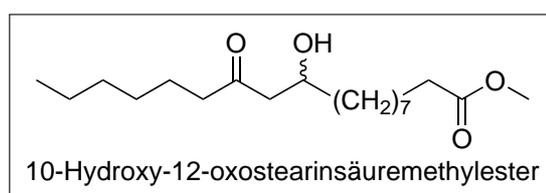


Heptanaloxim wurde synthetisiert, indem 32,33 g Hydroxylaminhydrochlorid (465 mmol) und 42,5 g Heptanal (372 mmol) zu 56 mL eiskaltem Wasser in einem 250 mL Dreihalskolben gegeben wurden. Eine Lösung aus 24,66 g Natriumcarbonat (233 mmol) in 47 mL kaltem Wasser wurde langsam mit einem Tropftrichter hinzugeben, sodass eine Temperatur von 45 °C nicht überschritten wurde. Nach vollendeter Zugabe der Natriumcarbonat-Lösung wurde die Mischung für 1 h heftig bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die organische Phase abgenommen und mit Wasser gewaschen. Nach der Destillation bei 103 – 107 °C bei 8,33 mbar wurde Heptanaloxim durch Rekristallisation aus 60 % Ethanol gewonnen und mittels ^1H - und ^{13}C -NMR analysiert.¹⁹⁷ Heptanaloxim: ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 8,64 (breit, 1 H, s); 6,72 (-HC=N-, 1 H, t, $J = 5,47$; 5,47 Hz); 2,38 (2 H, dt, $J = 7,64$; 7,57; 5,65 Hz); 1,53-1,45 (2 H, m); 1,40-1,22 (6 H, m); 0,92-0,86 (- CH_3 , 3 H, m). ^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 153,08 (-HC=NOH); 31,51; 29,05; 26,03; 24,95; 22,54; 14,05 (- CH_3).



5-(9-Nonansäuremethylester)-3-hexyl- Δ^2 -isoxazolin wurde durch 1,3-dipolare Cycloadition von Heptanaloxim and 10-Undecensäuremethylester hergestellt. Hierzu wurden 8,42 mL 10-Undecensäuremethylester (37 mmol) und 0,53 mL Triethylamin (4 mmol) in 42 mL Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 60,8 mL einer 10 %igen wässrigen Natriumhypochloritlösung (81,6 mmol) wurde die Mischung bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Über einen Zeitraum von 25 min wurde eine Lösung aus 5 g Heptanaloxim (39 mmol) in 21 mL Dichlormethan mit einem Tropftrichter hinzugefügt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Temperatur nicht über $5\text{ }^\circ\text{C}$ stieg. Die Mischung wurde daraufhin heftig für 2 h bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und dann langsam über einen Zeitraum von weiteren 2 h auf Raumtemperatur gebracht. Die organische Phase wurde von der wässrigen getrennt und die wässrige Phase dreimal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. 5-(9-Nonansäuremethylester)-3-hexyl- Δ^2 -isoxazolin wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan : Methyl-*tert*-butylether / 80 : 20) aufgereinigt.¹⁹⁸

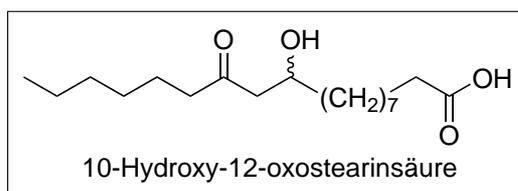
5-(9-Nonansäuremethylester)-3-hexyl- Δ^2 -isoxazolin: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 4,54-4,46 (1 H, m); 3,67 (3 H, s); 2,95 (1 H, dd, $J = 16,80; 10,10$ Hz); 2,52 (1 H, dd, $J = 16,75; 8,11$ Hz); 2,31 (4 H, td, $J = 12,48; 7,58; 7,58$ Hz); 1,68-1,46 (6 H, m); 1,35 (16 H, m); 0,89 ($-\text{CH}_3$, 3 H, t, $J = 6,75; 6,75$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 174,32 (C=O); 158,98 (C=N); 80,03 (C-O); 51,46 (O- CH_3); 42,11; 35,27; 34,09; 31,48; 29,38; 29,31; 29,14; 29,10; 28,92; 27,86; 26,40; 25,57; 24,92; 22,51; 14,04 ($-\text{CH}_3$).



Um 10-Hydroxy-12-oxostearinsäuremethylester herzustellen, wurden 2 g 5-(9-Nonansäuremethylester)-3-hexyl- Δ^2 -isoxazolin (6,14 mmol) und 0,92 g Bortrioxid (13,2 mmol) in 70 mL 83,4 %igem Methanol gelöst. Nach der Zugabe von 0,21 g

aktiviertem Raney-Nickel wurde der Kolben mit einem Septum ausgestattet und die Atmosphäre des Kolbens mit Wasserstoff ersetzt. Hierzu wurde der Kolben abwechselnd zehnmal evakuiert und mit Wasserstoff gespült. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Die Wasserstoffatmosphäre wurde aufrechterhalten, indem der Kolben mit einem mit Wasserstoff gefüllten Ballon versehen wurde. Nach 22 h unter heftigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Mischung durch eine Glasfritte gefiltert und anschließend mit 100 mL Wasser verdünnt. Die Mischung wurde dreimal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Rotationsverdampfer eingengt. 10-Hydroxy-12-oxostearinsäuremethyl ester wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan : Methyl-*tert*-butylether : Dichlormethan / 60 : 20 : 20) aufgereinigt.¹⁹⁹

10-Hydroxy-12-oxostearinsäuremethyl ester: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 4,02 (breit, 1 H, m); 3,67 (3 H, s); 3,06 (breit, 1 H, s); 2,60 (1 H, dd, *J* = 17,52; 2,61 Hz); 2,49 (1 H, dd, *J* = 17,54; 9,22 Hz); 2,42 (2 H, t, *J* = 7,44; 7,44 Hz); 2,30 (2 H, t, *J* = 7,53; 7,53 Hz); 1,59 (4 H, m); 1,53-1,45 (1 H, m); 1,45-1,35 (2 H, m); 1,33-1,25 (15 H, m); 0,88 (-CH₃, 3 H, t, *J* = 6,80; 6,80 Hz). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 212,70 (C=O, Keton); 174,34 (C=O, Ester); 67,62 (-H₂C-OH); 51,46 (-OMe); 48,92; 43,70; 36,42; 34,10; 31,57; 29,47; 29,35; 29,10; 29,11; 28,83; 25,43; 24,93; 23,59; 22,48; 14,03 (-CH₃).



10-Hydroxy-12-oxostearinsäure wurde durch die Lipase katalysierte Hydrolyse des entsprechenden Methyl esters hergestellt. 500 mg 10-Hydroxy-12-oxostearinsäuremethyl ester (1,52 mmol) wurden in 50 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7 mit 0,1 % Tween-20) suspendiert. Nach der Zugabe von 250 mg *Candida antarctica* Lipase B wurde die Mischung für 6 h bei 52 °C gerührt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet. Die Reaktion wurde mit 5 mL 1 M Salzsäure gequenchet und anschließend dreimal mit 25 mL Methyl-*tert*-butylether

extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter Kochsalzlösung und Wasser gewaschen, mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum verdampft. 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan : Methyl-*tert*-butylether / 80 : 20 und 0,1 % Eisessig) aufgereinigt.

10-Hydroxy-12-oxostearinsäure: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 4,09-3,98 (breit, 1 H, m); 2,60 (1 H, dd, $J = 17,49; 2,62$ Hz); 2,50 (1 H, dd, $J = 17,52; 9,11$ Hz); 2,42 (2 H, t, $J = 7,43; 7,43$ Hz); 2,34 (2 H, t, $J = 7,48; 7,48$ Hz); 1,67-1,53 (Alkyl, 4 H, m); 1,52-1,38 (Alkyl, 2 H, m); 1,38-1,21 (Alkyl, 16 H, m); 0,88 ($-\text{CH}_3$, 3 H, t, $J = 6,72; 6,72$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 212,81 (C=O, Keton); 179,44 (C=O, Ester); 67,69 ($-\text{H}_2\text{C-OH}$); 48,89; 43,70; 36,37; 34,00; 31,57; 29,44; 29,31; 29,13; 29,01; 28,84; 25,41; 24,66; 23,59; 22,48; 14,04 ($-\text{CH}_3$).

3

Ergebnisse

Die beiden Enzymkaskaden für die biotechnologische Herstellung von Azelainsäure aus Linolsäure und Sebacinsäure aus Ricinolsäure werden im Folgenden separat behandelt.

3.1 *In vitro* Herstellung von Azelainsäure

Azelainsäure soll auf dem in Abbildung 3.1 dargestellten Reaktionsweg hergestellt werden. In einem ersten Schritt soll Linolsäure mittels einer Lipoxygenase (LOX) hydroperoxidiert werden. Die C-C-Bindungsspaltung soll anschließend an der entstehenden 10*E*,12*Z*-9-Hydroperoxyoctadecadiensäure (9-HPODE) mit einer Hydroperoxid-Lyase (HPL) durchgeführt werden. Produkte dieser Spaltungsreaktion sind 3*Z*-Nonenal und 9-Oxononansäure. In einem letzten Schritt soll 9-Oxononansäure mit einer Aldehyd-Dehydrogenase zu Azelainsäure oxidiert werden.

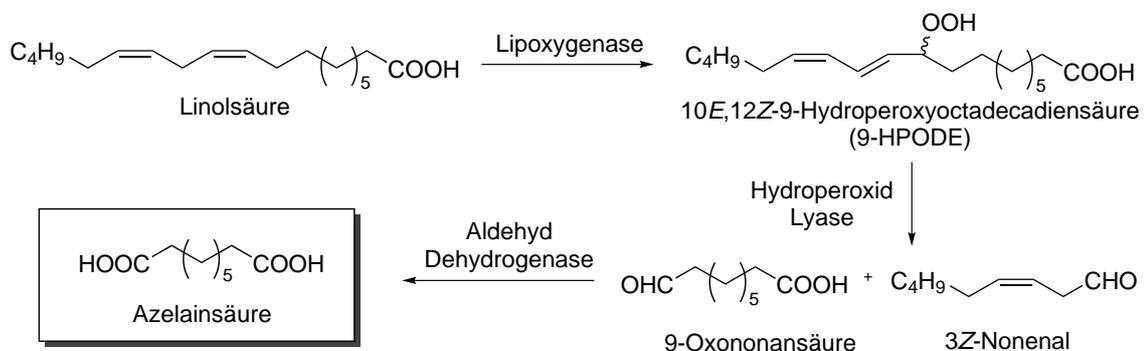


Abbildung 3.1: Vorgeschlagene Enzymkaskade für die biotechnologische Herstellung von Azelainsäure.

3.1.1 Herstellung und Charakterisierung von Intermediaten

Für die Quantifizierung und Charakterisierung der durchgeführten Biotransformationen wurde das relevante Intermediat 9-Oxononansäure synthetisiert (2.5.1, S. 69). Verschiedene 9-HPODE und 13-HPODE Zusammensetzungen wurden mit der kommerziell erhältlichen *Gm*-LOX1 hergestellt (2.4.14, S. 65).²⁰⁰

3.1.2 Enzymscreening für die Machbarkeitsstudie

Für die Durchführung der Lipoxygenasen Reaktion wurden die in Tabelle 3.2 aufgelisteten, literaturbekannten, charakterisierten und bereits mikrobiell exprimierten Enzyme ausgewählt. Die C-C-Bindungsspaltung soll an der C9-Position mit einer 9/13-Hydroperoxid Lyase (9/13-HPL) durchgeführt werden, deshalb wird für den ersten Schritt der Hydroperoxydierung eine C9-selektive Lipoxygenase ausgewählt. 9/13-HPLs katalysieren im Gegensatz zu reinen 13-HPLs, welche eine ausgeprägte *S*-Enantioselektivität aufweisen, sowohl die Spaltung von 9- als auch von 13-Hydroperoxiden der Linolsäure.^{201–203} Um zu überprüfen, ob die unselektiveren 9/13-HPLs ebenfalls eine *S*-Enantioselektivität aufweisen, wurden für die Durchführung der vorhergehenden Lipoxygenasen Reaktion zwei enantiokomplementäre Enzyme ausgewählt. Als einzige *R*-selektive Lipoxygenase wurde die mikrobielle Lipoxygenase aus *Anabaena* sp. PCC 7120 *As*-9LOX ausgewählt.²⁰⁴ Des Weiteren wurden drei 9*S*-selektive, pflanzliche Lipoxygenasen aus *Solanum tuberosum* (Kartoffel), *Cucumis sativus* (Gurke) und *Oryza sativa* (Reis) ausgesucht.^{166,162,179,205} Als Positivkontrolle wurde die einzig bereits kommerziell erhältliche Lipoxygenase aus *Glycine max* (*Gm*-LOX1, Sojabohne) verwendet. Für die zweite Reaktion wurden ebenfalls pflanzliche Enzyme ausgewählt, eine 9/13-HPL aus *Cucumis sativus* (Gurke) und eine aus *Cucumis melo* (Melone).^{164,165} Als Aldehyd-Dehydrogenase wurde die mikrobielle *As*-ALDH1 aufgrund ihrer Spezifität für längerkettige Substrate ausgewählt.¹⁶⁷ Die Expression aller in Tabelle 3.2 gelisteten Gene wurde mittels SDS-PAGE überprüft (2.4.11, S. 63) und die Gene auf Richtigkeit sequenziert (GATC, Konstanz, DE). Die Aktivität der Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen wurde in den Lysaten der aufgeschlossenen Zellen mittels des Indamin-Farbstoffassays bestätigt (2.4.14, S. 66). Die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase aus *Acinetobacter* Stamm M-1 wurde mittels NAD⁺-Assay bestätigt (2.4.14, S. 67). Bis auf die Lipoxygenase aus Reis *Os*-LOX1 konnten alle Gene in löslicher Form exprimiert werden (2.4.9, S. 61). Die Sequenzierung von *Cs*-LOX1

Tabelle 3.1: Enzymscreening für die Machbarkeitsstudie.

| Enzym | Vektor | Selektivität | Expr./Lösl. [‡] | Vermerk | Aktivität |
|--------------------|--|---------------|--------------------------|------------------|-----------|
| <i>Os</i> -LOX1 | pET-r9LOX | 9 / <i>S</i> | ++ / – | Codon-optimiert | – |
| <i>As</i> -9LOX | pET-9LOXMH6 | 9 / <i>R</i> | ++ / +++ | Codon-optimiert | +++ |
| <i>St</i> -LOX1 | pQE- <i>St</i> LOX1 | 9 / <i>S</i> | + / ++ | – | ++ |
| <i>Cs</i> -LOX1 | pQE-9LOXIF | 9 / <i>S</i> | ++ / – | H608V-Mutante | – |
| <i>Gm</i> -LOX1 | NH ₄ SO ₄ -Fällung | 13 / <i>S</i> | +++ / +++ | Positivkontrolle | +++ |
| <i>Cs</i> -9/13HPL | pQE-9/13HPL | 9 / 13 | + / ++ | – | ++ |
| <i>Cm</i> -9/13HPL | pET-9MeloHPL | 9 / 13 | + / ++ | – | ++ |
| <i>As</i> -ALDH1 | pUC-ALDH1 | – | +++ / +++ | – | +++ |

[‡]) Expr.: Expression; Lösl.: Löslichkeit der Proteinzelfraktion.
+/-Bewertung von nicht vorhanden (–) bis sehr gut (+++).

offenbarte neben der gesuchten H608V¹⁾-Mutation vier weitere Mutationen, wovon eine zu einer Leserasterverschiebung führte. Obgleich Lysate der *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL exprimierenden Zellen eine ausgeprägte Enzymaktivität in den verwendeten Lysaten zeigten, konnte weder in der SDS-PAGE noch in dem korrespondierenden Western-Blot eine Überexpression beobachtet werden. Enzyme, die sich für eine genauere Untersuchung und die Etablierung der gesamten Reaktionskaskade anbieten, sind somit: *St*-LOX1 und *As*-9LOX für die Herstellung enantiokomplementärer 9-HPODE-Intermediate — *Cs*- und *Cm*-9/13HPL für die Spaltung von HPODE in 9-Oxononansäure und 3Z-Nonenal und *As*-ALDH1 für die Oxidation von 9-Oxononansäure zu Azelainsäure.

3.1.3 Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen Aktivitätsassay

Um eine quantitative Aussage der Lipoxygenasen sowie der Hydroperoxid-Lyasen Aktivität machen zu können, wurden diese in einem photometrischen Assay untersucht. Dieser beruht auf der Lipoxygenasen katalysierten Bildung und Hydroperoxid-Lyasen katalysierten Zerstörung eines konjugierten Dien-Systems, welches bei 235 nm absorbiert (2.4.14, S. 66). Die im Folgenden gezeigten Biotransformationen wurden mit Rohextrakten ganzer Zellen durchgeführt und bilden das arithmetische Mittel einer Dreifachbestimmung. Abbildung 3.3 zeigt die Aktivität der Rohextrakte der 9*R*-selektiven Lipoxygenase aus *Anabaena* sp. PCC 7120 *As*-9LOX (*E. coli* BL21[DE3]) sowie der enantiokomplementären 9*S*-selektiven Lipoxygenase aus *Solanum tuberosum* *St*-LOX1 (*E. coli* SG13009) in verschiedenen Kombinationen mit unterschiedlichen 9/13-Hydroperoxid-Lyasen. Auf-

¹⁾Notation beschreibt den Aminosäureaustausch an bestimmten Positionen. H608V beschreibt beispielsweise den Austausch eines Histidinrests in Position 608 durch einen Valinrest.

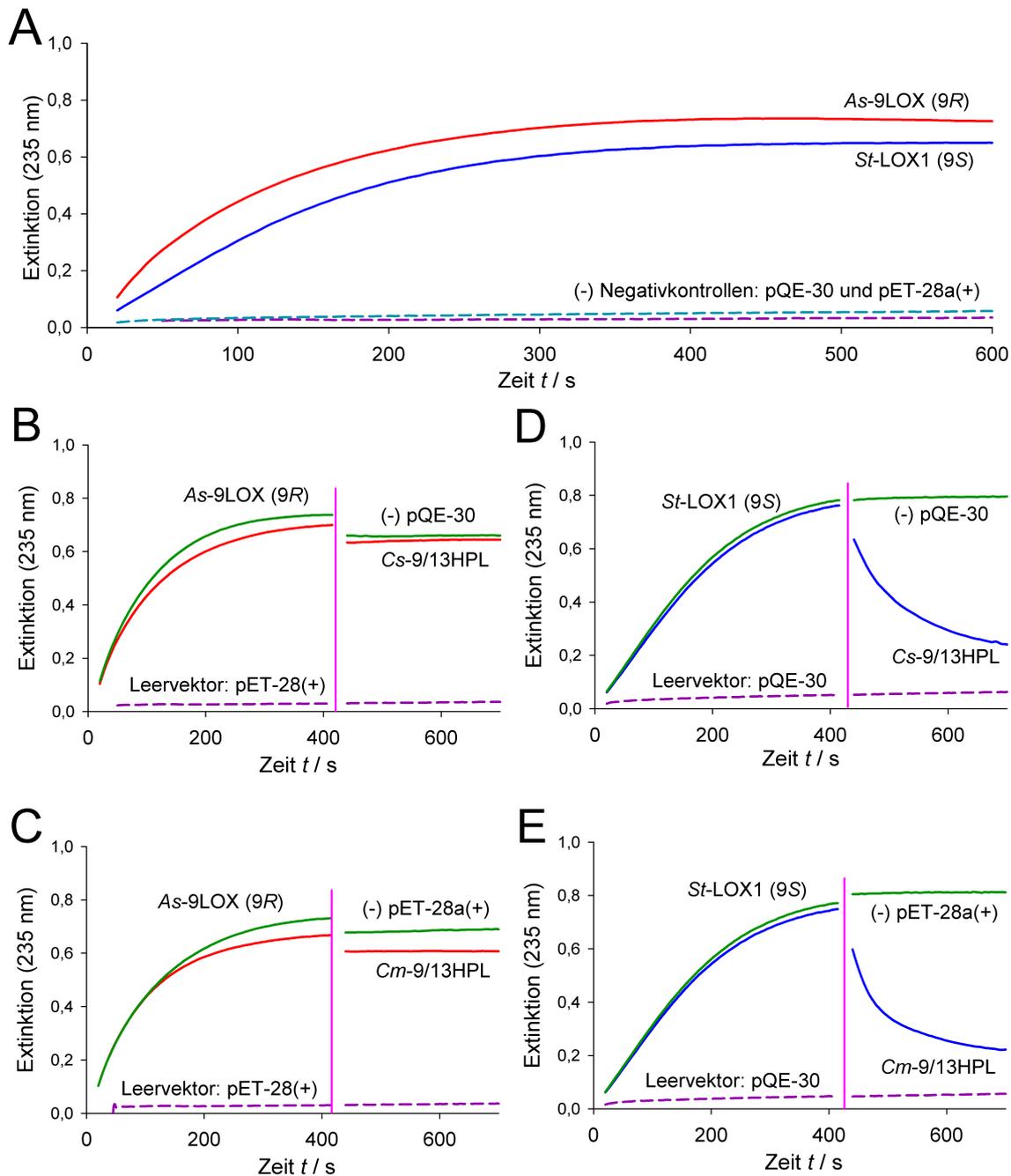


Abbildung 3.2: Spektrophotometrischer 235 nm Dienassay mit verschiedenen Kombinationen von Lipoxygenase (LOX) und Hydroperoxid-Lyase (HPL) Lysat Kombinationen mit $50\mu\text{M}$ Linolsäure in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6. **A**) Aktivität von *St*-LOX1 ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) und *As*-9LOX ($15\mu\text{g mL}^{-1}$), ohne die Zugabe von HPL sowie die der entsprechenden Negativkontrollen. **B–E**) Sukzessive Reaktionen von LOX und HPL und den entsprechenden Negativkontrollen. Die pinkle Linie markiert den Zeitpunkt der HPL Zugabe, jeweils $25\mu\text{g mL}^{-1}$. **B**) Sukzessive Reaktion von *As*-9LOX und *Cs*-9/13HPL. **C**) Sukzessive Reaktion von *As*-9LOX und *Cm*-9/13HPL. **D**) Sukzessive Reaktion von *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL. **E**) Sukzessive Reaktion von *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

grund unspezifischer Nebenreaktionen mit NAD^+ bzw. NADH wurde die Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase *As*-ALDH1 mittels GC-FID bestimmt (2.4.2, S. 55). Abbildung 3.3A zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung von 9-Hydroperoxy-10*E*,12*Z*-octadecadiensäure mit $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ *As*-9LOX und $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ *St*-LOX1 Gesamtproteinkonzentration der eingesetzten Rohextrakte. Daraus ergeben sich spezifische Aktivitäten von $0,83 \text{ U mg}^{-1}$ für *As*-9LOX und $0,15 \text{ U mg}^{-1}$ für *St*-LOX1. Bei den korrespondierenden Negativkontrollen, Rohextrakte von Zellen, welche nur mit Leervektor transformiert wurden, pET-28a(+) und pQE-30 kann keine Reaktion beobachtet werden. Die messbare Konjugation des Doppelbindungssystems ist somit nur auf die Expression der beiden Lipoxygenasen zurückzuführen. Abbildung 3.3B–E zeigen sukzessive Reaktionen von *St*-LOX1 (B+C) und *As*-9LOX (D+E) mit den beiden 9/13-Hydroperoxid-Lyasen. Bei der Verwendung der 9*R*-selektiven Lipoxygenase *As*-9LOX konnte weder bei der sukzessiven Reaktion von *Cs*-9/13HPL (B) noch von *Cm*-9/13HPL (C) eine Zerstörung des konjugierten Diensystems beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung der 9*S*-selektiven Lipoxygenase *St*-LOX1 nach Zugabe beider Hydroperoxid-Lyasen eine Abnahme der Extinktion und somit eine Zerstörung des Diensystems beobachtet werden. Die spezifischen Aktivitäten der beiden HPL-Lysate ergeben sich bei der eingesetzten Gesamtproteinkonzentration von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu $0,4 \text{ U mg}^{-1}$ für *Cs*-9/13HPL und $0,51 \text{ U mg}^{-1}$ für *Cm*-9/13HPL.

3.1.4 Untersuchung der *As*-ALDH1 Reaktion

Aufgrund von Nebenreaktionen mit NAD^+ bzw. NADH wurde die *As*-ALDH1 Aktivität auf 9-Oxononansäure mittels GC-FID bestimmt. Links in Abbildung 3.1.4 ist der zeitlichen Verlauf der *As*-ALDH1 katalysierten Umsetzung von 9-Oxononansäure zu Azelainsäure dargestellt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ *As*-ALDH1 Rohextrakt gestartet. Die spezifische Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenase *As*-ALDH1 ergibt sich somit zu $0,83 \text{ U mg}^{-1}$. Die dazugehörigen Negativkontrollen werden in Abbildung 3.1.4 rechts gezeigt. Aus der Negativkontrolle ist ersichtlich, dass endogene *E. coli* Dehydrogenasen ebenfalls in der Lage sind, die Oxidation von 9-Oxononansäure zu katalysieren. Aufgrund der deutlich geringeren unspezifischen Aktivität der pET-28a(+) Kontrollreaktion wurde die Gesamtproteinkonzentration auf $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ erhöht. Während die *As*-ALDH1 Reaktion mit einer Proteinkonzentration von $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ sich nach 1 h bei annähernd Vollumsatz mit einer Ausbeute von $97,4 \pm 1,9 \%$ im Gleichgewicht befindet, zeigt der korrespondierende Rohextrakt

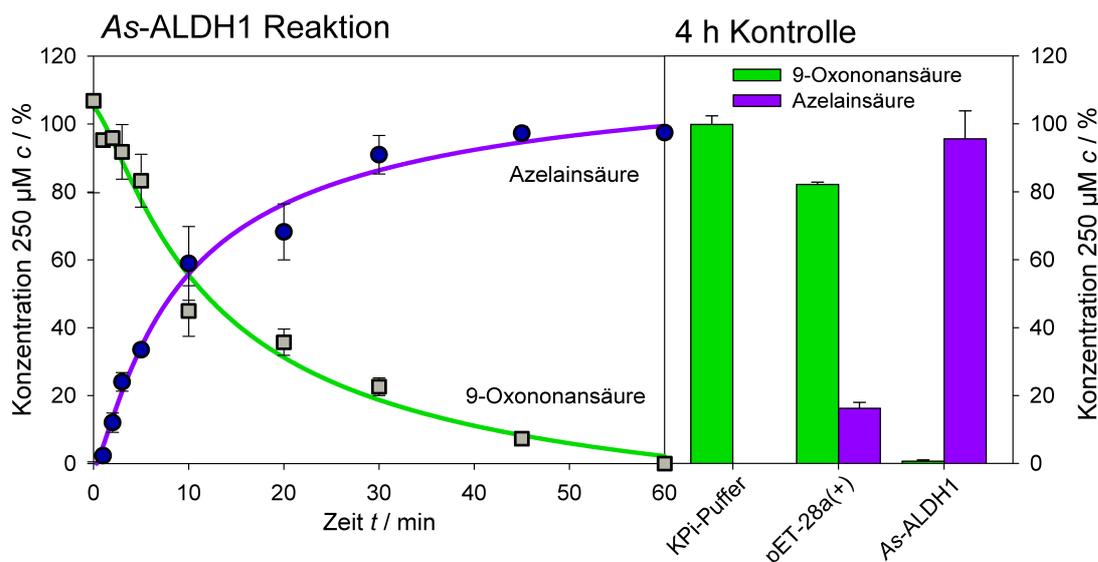


Abbildung 3.3: *As*-ALDH1 Reaktion: Der zeitliche Verlauf der *As*-ALDH1 Biotransformation in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7. Links: Zeitlicher Verlauf über 60 min mit $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ Gesamtprotein. Rechts: Kontrollreaktionen mit $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ Gesamtproteinkonzentration. Vergleich der doppelten Negativkontrolle in reinem Puffer, der pET-28a(+)-Negativkontrolle und der korrespondierenden Vergleichsreaktion mit *As*-ALDH1 nach 4 h.

in $10\times$ höherer Konzentration ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) ohne *As*-ALDH1 nach 4 h lediglich einen Substratumsatz von 17,8 %.

3.1.5 Simultane Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion

Um die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion qualitativ und quantitativ zu untersuchen bzw. Intermediate zu identifizieren, wurden verschiedene Reaktionsansätze mittels GC-FID und GC-MS untersucht. Die Existenz von 9-Hydroperoxy-10*E*,12*Z*-octadecadiensäure wurde sowohl nach der Reaktion von *St*-LOX1 als auch von *As*-9LOX mittels GC-MS bestätigt. Der Linolsäureumsatz und die 9-Oxononansäureausbeute wurden durch Vergleiche mit authentischen Standards quantifiziert. Aufgrund von verschiedenen Vorteilen simultaner Reaktionen, wie der reduzierten Reaktionszeit und der Verschiebung des chemischen Gleichgewichts durch die anschließende Folgereaktion, wurde die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion simultan durchgeführt.²⁰⁷

Abbildung 3.4 zeigt das Ergebnis der simultanen *St*-LOX1 und *As*-9LOX Reaktion mit den beiden Hydroperoxid-Lyasen *Cs*- und *Cm*-9/13HPL sowie den dazugehörigen Negativkontrollen. Nur in Anwesenheit von Lipoxygenase kann der Umsatz von Linol-

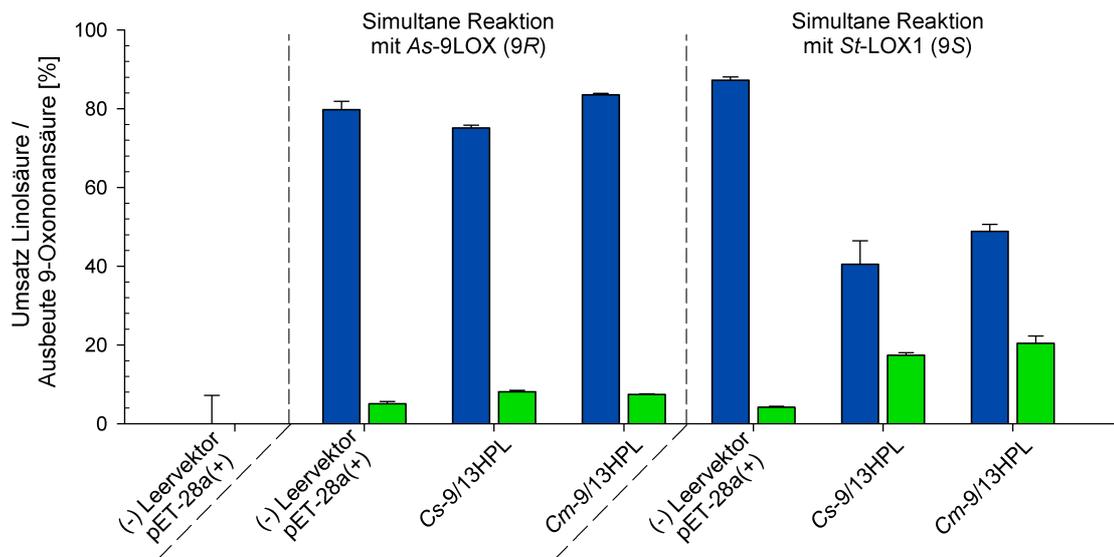


Abbildung 3.4: Simultane Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktionen (2 h in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6). Die blauen Balken geben den Umsatz von Linolsäure (250 μM), die grünen Balken die Ausbeute von 9-Oxononansäure an. Links: Negativkontrolle der Lipoxygenase Reaktion mit 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Leervektor pET-28a(+). Mitte: HPL-Negativkontrolle (nur *As*-9LOX), simultane Reaktion von 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *As*-9LOX und den Hydroperoxid-Lyasen (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Rechts: HPL-Negativkontrolle (nur *St*-LOX1), simultane Reaktion von 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *St*-LOX1 und den Hydroperoxid-Lyasen (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

säure beobachtet werden. Dieser fällt bei allen HPL-Negativkontrollen beispielsweise $87,3 \pm 0,3$ % bei *St*-LOX1 und pET-28a(+) vergleichbar hoch aus, wie die der simultanen *As*-9LOX und 9/13-HPL Reaktionen ($83,5 \pm 0,4$ %; *As*-9LOX und *Cm*-9/13HPL). Bei den simultanen *St*-LOX1 und 9/13HPL Reaktionen fällt der Substratumsatz mit beispielsweise $48,8 \pm 1,8$ % allerdings deutlich geringer aus. Ein nahezu umgekehrtes Verhalten lässt sich dafür bei der 9-Oxononansäureausbeute beobachten. In Fällen der simultanen *St*-LOX1 und 9/13HPL Reaktionen kann eine größere 9-Oxononansäureausbeute ($20,4 \pm 1,9$ % *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL) als mit den entsprechenden *As*-9LOX und 9/13HPL Reaktionen ($7,4 \pm 0,2$ %; *As*-9LOX und *Cm*-9/13HPL) beobachtet werden.

3.1.6 Sukzessive Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion

Nach den, verglichen mit dem durchgeführten Aktivitätsassay, unerwartet geringen Aktivitäten der simultanen Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion wurden die gekoppelten Reaktionen, wie bei der Durchführung des Aktivitätsassays, auf sukzessive Weise durchgeführt. Nach der Zugabe von Lipoxygenase wurde der Reaktionsansatz 2 h bei Raumtemperatur vor der Zugabe von Hydroperoxid-Lyase inkubiert. Bei der Be-

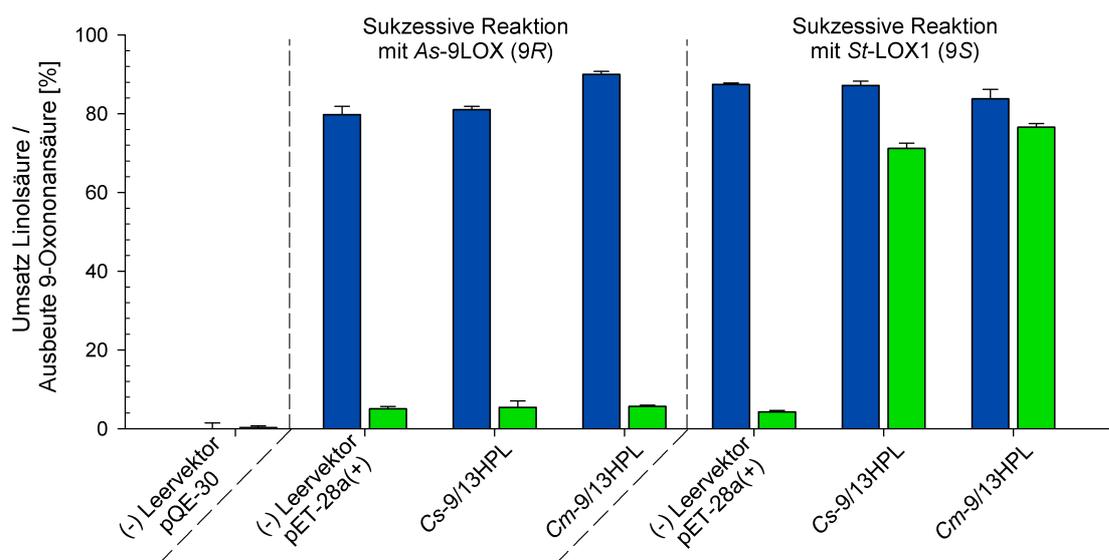


Abbildung 3.5: Sukzessive Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktionen (2 h + 0,5 h Reaktionszeit in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6. Die blauen Balken geben den Umsatz von Linolsäure (250 μM), die grünen Balken die Ausbeute von 9-Oxononansäure an. Links: Negativkontrolle der Lipoxygenase Reaktion mit 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Leervektor pQE-30. Mitte: HPL-Negativkontrolle (nur *As*-9LOX), sukzessive Reaktion von 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *As*-9LOX und den Hydroperoxid-Lyasen (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Rechts: HPL-Negativkontrolle (nur *St*-LOX1), sukzessive Reaktion von 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *St*-LOX1 und den Hydroperoxid-Lyasen (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

schreibung von Abbildung 3.5 werden bei vergleichbaren Werten nur die Größten herangezogen.

Ebenso wie bei der simultanen Durchführung der gekoppelten Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion zeigen die sukzessiven HPL-Negativreaktionen ein vergleichbares Verhalten zu den sukzessiven *As*-9LOX und 9/13HPL Reaktionen. Bei der sukzessiven *St*-LOX1 und HPL-Negativkontrolle kann ein Linolsäureumsatz von $87,4 \pm 0,4 \%$ und bei der sukzessiven *As*-9LOX und 9/13HPL Reaktion $90 \pm 0,8 \%$ beobachtet werden. Allerdings liefert die sukzessive *St*-LOX1 und 9/13HPL Reaktion im Vergleich mit der simultanen Reaktionsdurchführung deutlich höhere Umsätze und Ausbeuten. In Kombination von *St*-LOX1 mit *Cs*-9/13HPL konnten $87,3 \pm 1,1 \%$ Linolsäureumsatz und $71,2 \pm 1,3 \%$ 9-Oxononansäureausbeute bestimmt werden. Bei der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Reaktion konnten $83,8 \pm 2,4 \%$ Umsatz und eine Ausbeute von $76,5 \pm 1,0 \%$ beobachtet werden.

3.1.7 pH-Abhängigkeit und Selektivität

Es wurde gezeigt, dass die sukzessive Durchführung der gekoppelten Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase zu besseren Umsätzen und höheren Ausbeuten führt. Um die Reaktion weiter zu verbessern, wurde das pH-Profil der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cs*- sowie *Cm*-9/13HPL Reaktion untersucht. Das pH-Optimum der einzelnen Enzyme wurde bereits in den ursprünglichen Veröffentlichungen untersucht. *St*-LOX1 weist zwischen pH 5,5 und pH 7 eine relativ gute Aktivität auf, das Optimum liegt jedoch bei pH 6,5.¹⁷⁹ *Cs*-9/13HPL hat die höchste Aktivität bei pH 5,5 und *Cm*-9/13HPL bei pH 7,5.^{164,165} Die sukzessive Reaktion von *St*-LOX1 mit *Cm*-9/13HPL lieferte durchweg leicht bessere Ergebnisse als die mit *Cs*-9/13HPL. Das pH-Optimum der gekoppelten *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Reaktion wurde zu pH 7 bestimmt, das von der korrespondierenden *Cs*-9/13HPL Reaktion zu pH 7,5. Beide Reaktionen waren deshalb über einen relativ breiten pH-Bereich durchführbar (A.5, S. 149).

Durch Vergleiche der MS-Fragmentierungsmuster der Trimethylsilylesterderivate bzw. der Masse-zu-Ladung-Verhältnisse m/z zwischen 9-H(P)ODE (225 : 440) und 13-H(P)ODE (173 : 440) konnte gezeigt werden, dass die Regioselektivität der Hydroperoxydierung im Gegensatz zu *Gm*-LOX1 nicht über einen pH-abhängigen Mechanismus funktioniert (A.7, S. 150).²⁰⁰

Sowohl bei der Reaktion von *As*-9LOX (*R*-selektiv) als auch bei der Reaktion von *St*-LOX1 (*S*-selektiv) konnte die Bildung von 9-HPODE mittels GC-MS nachgewiesen werden. Da in Kombination der *R*-selektiven Lipoxygenase mit einer der beiden Hydroperoxid-Lyasen weder in dem sukzessiven noch in dem simultanen Reaktionsaufbau die Bildung von 9-Oxononansäure beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass 9/13-Hydroperoxid-Lyasen über eine ausgeprägte *S*-Enantioselektivität verfügen.

3.1.8 Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Das bisher beste Reaktionsverhalten wurde bei der sukzessiven Verwendung der Lipoxygenase *St*-LOX1 in Kombination mit der Hydroperoxid-Lyase *Cm*-9/13HPL bei pH 7 erzielt. Bei der Durchführung weiterer Versuche wurden daher ausschließlich diese Reaktionsparameter verwendet. Um den Titer der Reaktion zu erhöhen, wurde die Abhängigkeit der Substratkonzentration untersucht. Bei konstanter Enzymkonzentration benötigt der Umsatz höherer Substratkonzentrationen länger als bei niedrigen Konzentrationen. Im Folgenden wurden deshalb nicht nur die Reaktionszeit der Lipoxygenase, sondern auch die Reaktionszeit der Hydroperoxid-Lyase erhöht. Nach einer variablen

St-LOX1 Reaktionszeit wurde das zweite Enzym *Cm*-9/13HPL hinzugegeben und die Gesamtreaktionszeit um weitere 25 % der anfänglichen Reaktionszeit verlängert. Die Reaktionszeit der x-Achse in Abbildung 3.6 bezieht sich nur auf die ursprüngliche Lipoxygenase Reaktionszeit, um nicht natürliche Zahlen (\mathbb{N}) zu vermeiden.

Abbildung 3.6 zeigt die Abhängigkeit der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Reaktion von der Substratkonzentration (0,25 mM – 1 mM). Ergebnisse zu Experimenten mit weiteren Konzentrationen (2 mM – 5 mM) finden sich zudem im Appendix (A.8, S. 151). Die anfängliche Lipoxygenase Reaktion verlief bei allen Konzentrationen relativ schnell. Bei Substratkonzentrationen von 0,25 mM und 0,5 mM konnte bereits nach 2 h annähernd quantitativer Umsatz beobachtet werden. Die entsprechende Ausbeute an 9-Oxononansäure war hierbei nach 2 h mit $65,6 \pm 6,7\%$ bei einer Substratkonzentration von 0,25 mM am höchsten. Die höchste 9-Oxononansäureausbeute konnte allerdings bereits nach 15 min bei einer Substratkonzentration von 0,25 mM beobachtet werden. Einerseits lieferten höhere Substratkonzentrationen geringere Umsätze und Ausbeuten, andererseits waren bei höheren Konzentrationen sowohl die Selektivitäten als auch die Titer der jeweiligen Reaktion höher. Bei höheren Konzentrationen konnten nach 2 h Titer von $0,09 \text{ gL}^{-1}$ (1 mM) und $0,11 \text{ gL}^{-1}$ (2 mM) bestimmt werden. Dabei wurden

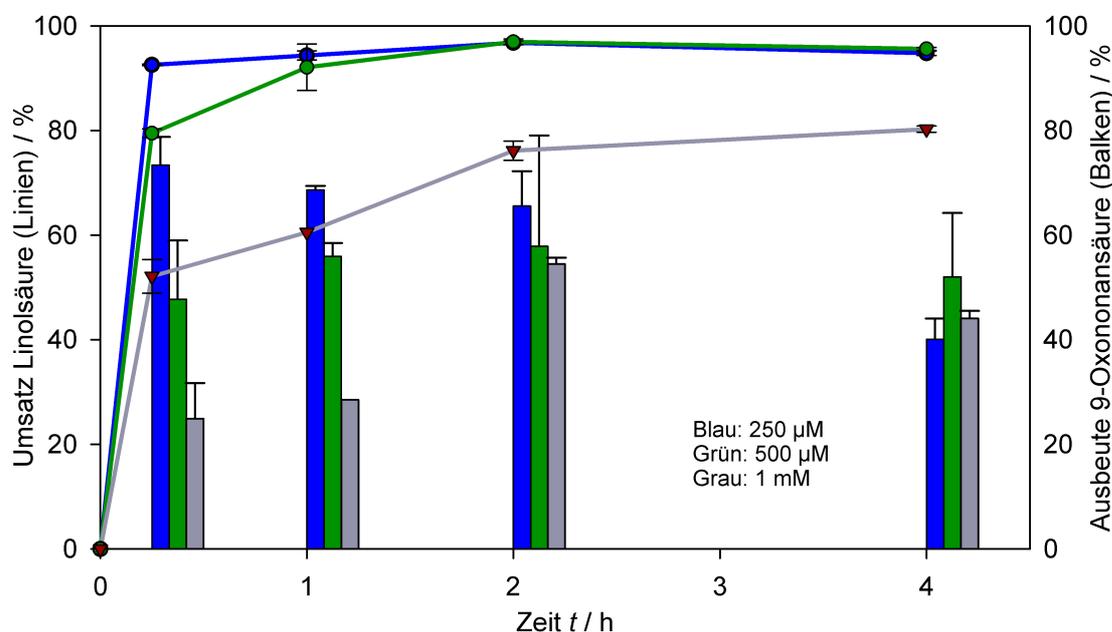


Abbildung 3.6: Abhängigkeit der sukzessiven *St*-LOX1 ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) und *Cm*-9/13HPL ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (0,25 mM – 1 mM) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6. Der Linolsäureumsatz wird durch durchgezogene Linien und der 9-Oxononansäureausbeute durch vertikale Balken dargestellt. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

Selektivitäten von 72 % (1 mM) und 53 % (2 mM) erreicht. In allen Fällen führte eine Verlängerung der Reaktionszeit von 4 h auf 10 h nicht zu einer signifikanten Steigerung der Gesamtausbeute und der Selektivität (A.8, S. 151).

Hohe Substratkonzentrationen ab 5 mM führten in den einphasigen Reaktionsansätzen zu der Bildung einer Emulsion. Es konnte eine deutliche Trübung der Ansätze beobachtet werden, welche mit einem Aktivitätsverlust einherging und somit unter anderem auf die Denaturierung der Enzyme zurückzuführen ist. Bei allen Konzentrationen konnte zudem beobachtet werden, dass nach kurzer Zeit (15 – 120 min), je nach Substratkonzentration, relativ hohe 9-Oxononansäureausbeuten erhalten wurden. Im weiteren Verlauf der Reaktion kam es zu einem Abfall der Ausbeute (bis 4 h), gefolgt von einem sehr langsamen Anstieg über die nächsten 6 h (A.8, S. 151). Dieser Effekt konnte bei allen Substratkonzentrationen beobachtet werden, nahm jedoch mit steigender Substratkonzentration ab. Die beste Reaktionsperformance wurde mit 1 mM Substratkonzentration nach 2 h mit einer Selektivität von 72 %, 54 % Ausbeute und einem Titer von 94 mgL^{-1} beobachtet.

3.2 *In vivo* Herstellung von Azelainsäure

Nach erfolgreicher Durchführung der Machbarkeitsstudie für die *in vitro* Herstellung von Azelainsäure und Identifikation aller benötigten Enzyme, soll die Kaskade nun in ein *in vivo* Ganzzellsystem übertragen werden. Die folgenden experimentellen Daten der *in vivo* Herstellung von Azelainsäure wurden von Jens Kittelberger im Rahmen seiner Diplomarbeit produziert. Um die Multienzymkaskade in ein Einkomponenten-Ganzzellsystem zu übertragen, gibt es zwei Möglichkeiten: 1. die Kompartimentierung der Reaktion in verschiedene Zellkompartimente und 2. die simultane Durchführung der Kaskade. Da die simultane Durchführung bisher deutlich schlechtere Resultate lieferte als die sukzessive, wurde sie im Folgenden eingehend untersucht. Um in diesem Teil der Arbeit ein einheitliches Expressionssystem zu verwenden, wurde aufgrund des nahezu identischen Reaktionsverhaltens von *Cs-9/13HPL* und *Cm-9/13HPL* fortan mit der Hydroperoxid-Lyase aus *Cucumis sativus Cs-9/13HPL* gearbeitet.

3.2.1 Untersuchung der simultanen *St-LOX1* und HPL Reaktion

Während der photometrischen Untersuchung der *St-LOX1* Reaktion mit einer kleineren Enzymkonzentration von $26,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ konnte eine signifikante Latenzzeit beobachtet werden, wie sie auch schon für andere Lipoxygenasen berichtet wurde (Abbildung 3.7A).⁵³ Andere Arbeiten berichten, dass die Latenzzeit durch die Erhöhung der Lipoxygenase Konzentration oder die Zugabe des Hydroperoxyprodukts HPODE vermindert werden kann.⁵³ Man geht davon aus, dass Spuren von HPODE für die Lipoxygenase Aktivierung erforderlich sind.^{53,208,209} Das beschriebene Verhalten konnte durch die Zugabe von 50 pM HPODE verifiziert werden, welches die Latenzzeit von 4 min auf 2 min halbierte und gleichzeitig die Initialgeschwindigkeit V_{ini} von 4,63 % auf 59,84 % von V_{max} ($4,4 \text{ nmol min}^{-1}$) steigerte (Abbildung 3.7A). Die Wichtigkeit von HPODE bei der Lipoxygenase Reaktion konnte somit bestätigt werden.

Nachdem HPODE aber auch gleichzeitig Substrat der Hydroperoxid-Lyase ist und nur in ausreichender Menge zu einer messbaren Verminderung beiträgt, wurde die These aufgestellt, dass bei einer zu hohen Hydroperoxid-Lyase Aktivität HPODE zu schnell aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird und eine Aktivierung der Lipoxygenase damit verlangsamt bzw. verhindert wird. Um diese These zu überprüfen, wurde die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion mit verschiedenen Aktivitätsverhältnissen zwischen *St-LOX1* und *Cs-9/13HPL* durchgeführt. Abbildung 3.7B zeigt die simulta-

Tabelle 3.2: Einfluss der Hydroperoxid-Lyase auf die Lipoxygenase Aktivität. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen. Tabelle abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²¹⁰

| LOX / HPL Verhältnis | A_{LOX} [U mg ⁻¹] | A_{HPL} [U mg ⁻¹] | erwartete A_{LOX} [U mg ⁻¹] | gemessene A_{LOX} [U mg ⁻¹] |
|-------------------------|---|---|---|---|
| 1/0 | 0,164 | 0,000 (0 %) | 0,164 (100 %) | 0,164 (100 %) |
| 20/1 | 0,164 | 0,008 (5 %) | 0,156 (95 %) | 0,102 (62 %) |
| 2/1 | 0,164 | 0,082 (50 %) | 0,082 (50 %) | 0,018 (11 %) |

ne Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion bei verschiedenen HPL-Aktivitäten. Bei einer Mischung von 20 : 1 LOX:HPL in Bezug auf die jeweiligen Aktivitäten kann bereits ein 38 %iger Rückgang der gemessenen Lipoxygenase Aktivität beobachtet werden. Bei einem 2 : 1 Verhältnis wurde die gemessene Lipoxygenase Aktivität bereits um 89 % vermindert.

Die gemessenen und die erwarteten Aktivitäten der Lipoxygenase sind in Tabelle 4.1 gegenübergestellt. Da die Hydroperoxid-Lyase für die Spaltung des konjugierten Diensystems verantwortlich ist, sollte die gemessene Lipoxygenase Aktivität bei einer 2 : 1 Mischung von LOX zu HPL folglich nur um 50 % sinken. Bei beiden Mischverhältnissen weicht die gemessene Lipoxygenase Aktivität deutlich von der erwarteten ab. Allerdings lässt sich beobachten, dass die simultane Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion realisiert werden kann, wenn die Aktivität der Hydroperoxid-Lyase im Vergleich zu der Lipoxygenase deutlich vermindert wird.

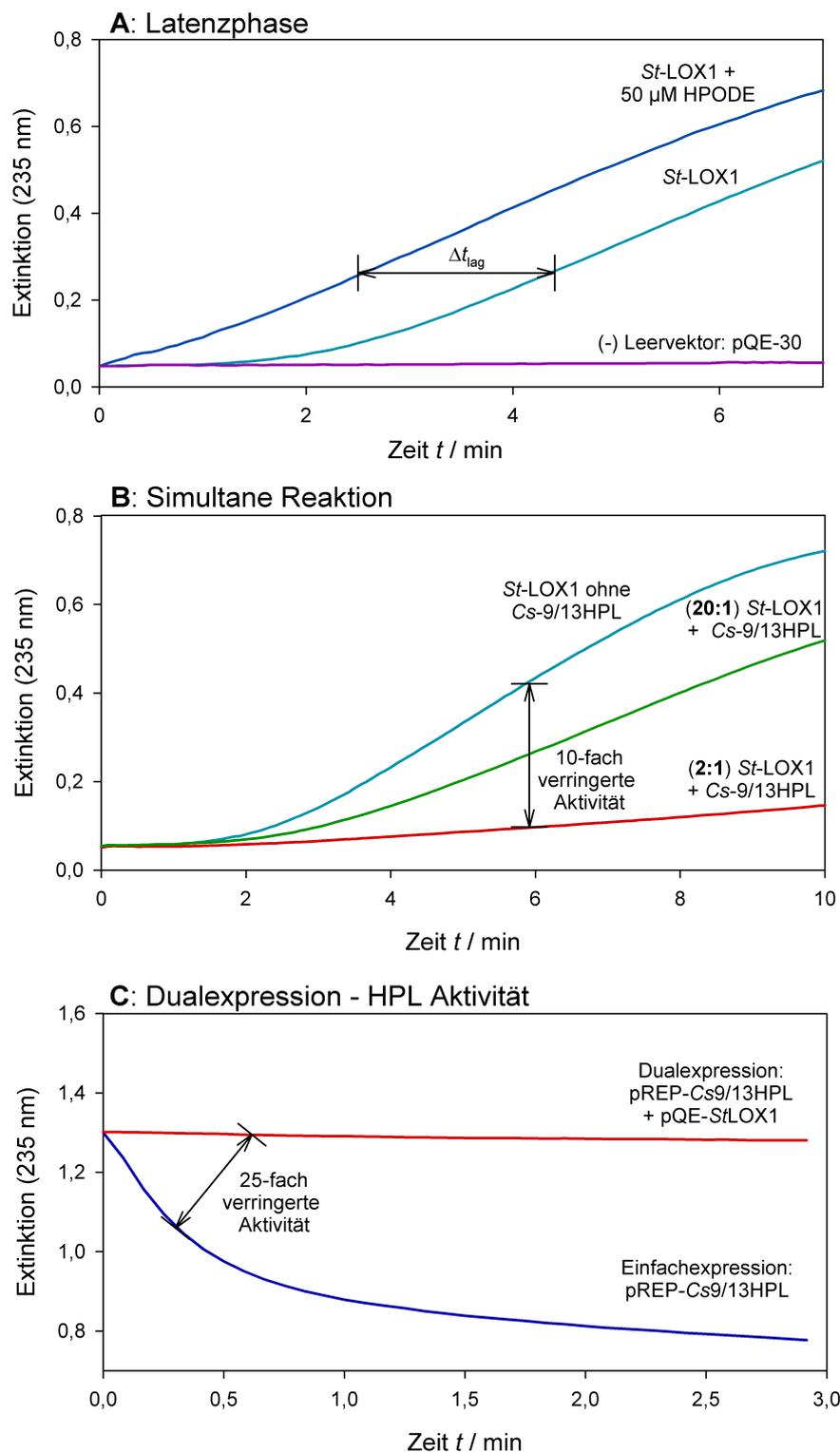


Abbildung 3.7: Spektrophotometrische Untersuchung der simultanen *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL Reaktion in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6. **A:** Beobachtung einer Latenzphase bei der *St*-LOX1 Reaktion ($26,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), die durch die Zugabe von 50 μM HPODE minimiert werden konnte. **B:** Simultane *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL Reaktion. Bei einem Aktivitätsverhältnis von LOX zu HPL 20 : 1 kommt es bereits zu einer 2 \times verringerten Zunahme der Extinktion, bei einem Verhältnis von 2 : 1 sogar zu einer 10 \times verringerten Zunahme. **C:** Vergleich der *Cs*-9/13HPL Aktivität nach Einfachexpression und nach Dualexpression mit *St*-LOX1 in SG13009.

3.2.2 Anpassung der Expressionslevel von *Cs-9/13HPL*

Nachdem gezeigt wurde, dass die simultane Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion durch eine Verringerung der HPL-Aktivität durchgeführt werden kann, soll dies in ein Ganzellsystem übertragen werden, indem das Aktivitätsverhältnis auf genetischer Ebene kontrolliert wird. Das bisher verwendete pQE-basierte Expressionssystem für *St-LOX1* war eines der ersten kommerziell erhältlichen Expressionssysteme (Qiagen, Hilden, DE). Der *E. coli* Stamm SG13009 trägt neben dem eigentlichen pQE-Expressionsvektor ein zusätzliches Plasmid pREP4, welches für die konstitutive trans-Expression des *lacI* Repressorgens verantwortlich ist. Die Anwesenheit von LacI dient als zusätzliche Absicherung des Systems, um die unerwünschte Expression vor Induktion zu verhindern.²¹¹ Ein Vergleich der Sequenzen des jeweiligen Replikationsursprungs (ORI, engl.: Origin of Replication) zeigt, dass pQE-30 mit dem ColE1 ORI in einer hohen Kopierzahl und pREP mit dem p15A ORI in einer niedrigen Kopierzahl vorliegt. pQE-30 ist demnach pro Zelle um einen Faktor von $\sim 10^2$ häufiger vertreten.

Im Vergleich mit dem *St-LOX1* Expressionslevel sollte die Integration der gesamten Expressionskassette von *Cs-9/13HPL* (Promotor — RBS Bindestelle — *Cs-9/13HPL* Gen — Terminator) in das Plasmid pREP4 zu einer deutlichen Verminderung des *Cs-9/13HPL* Expressionslevels führen und somit die simultane *in vivo* Reaktion ermöglichen. Eine Übersicht der hierfür verfolgten Klonierungsstrategie ist im Anhang unter A.6 (S. 152) einzusehen. Interessanterweise war die spezifische *Cs-9/13HPL* Aktivität bei der Einfachexpression von pREP4 mit $1,28 \text{ U mg}^{-1}$ $3,2\times$ höher als bei der Expression von pQE-30 ($1,28 \text{ U mg}^{-1}$). Bei der Dualexpression von *St-LOX1* (pQE) und *Cs-9/13HPL* (pREP4) war die spezifische HPL-Aktivität mit $0,05 \text{ U mg}^{-1}$ jedoch $25\times$ geringer als bei der *Cs-9/13HPL* (pQE) Einfachexpression (Abbildung 3.7C).

3.2.3 Untersuchung der Ganzzellreaktion

Die Verminderung der Hydroperoxid-Lyase Aktivität ermöglichte in *in vitro* Experimenten die simultane Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion. Nach der entsprechenden Anpassung der Expressionslevel in einem Ganzzellkatalysator (*E. coli* SG13009(-) + pREP-*Cs9/13HPL* + pQE-*StLOX1*) wurde die Umsetzung von Linolsäure untersucht. Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der Umsetzung von $250 \mu\text{M}$ Linolsäure mit 50 mg mL^{-1} Zellen in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6 sowie die der entsprechenden Negativkontrollen. Nach 1 h Reaktionszeit konnte trotz eines Substratumsatzes von $37,6 \pm 3,3 \%$ kaum Produktbildung detektiert werden. Nach 2 h stieg der Um-

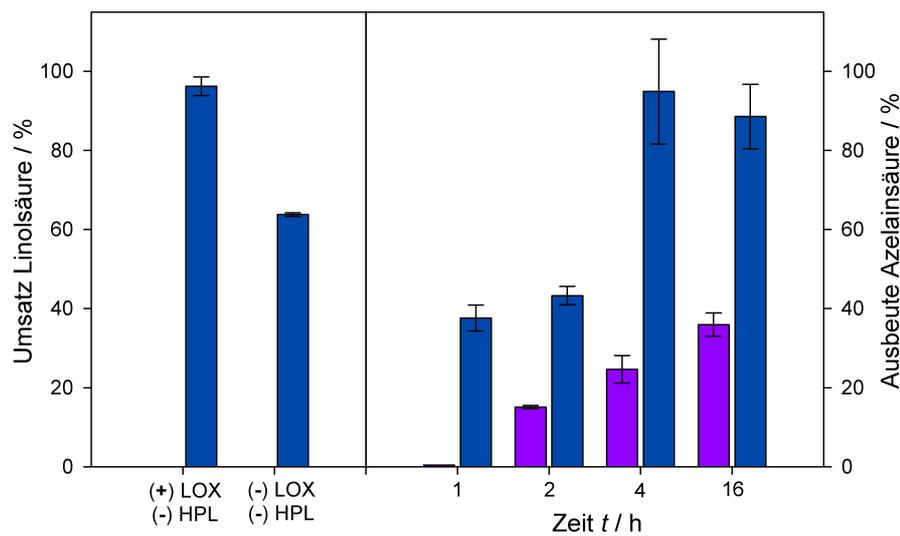


Abbildung 3.8: Untersuchung der Reaktionszeit der Ganzzellbiotransformation (50 mg mL^{-1} Zellfeuchtmasse) von Linolsäure in Azelainsäure (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6). Rechts: Zeitabhängigkeit der Linolsäureumsetzung bei Dualexpression von *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL. Links: Negativkontrollen, bei denen entweder nur Lipoxygenase oder keines der beiden Gene exprimiert wurde. Der Linolsäureumsatz wird in Blau und die Azelainsäureausbeute in Pink dargestellt. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

satz nur um weitere $5,7 \pm 2,3 \%$, die Produktausbeute stieg jedoch auf $15,1 \pm 0,4 \%$. Bei den hier gezeigten Ganzzellumsetzungen von Linolsäure konnte das Intermediat 9-Oxononansäure nicht detektiert werden. Das einzig messbare Produkt wurde direkt in Form von Azelainsäure gebildet. Nach 16 h Reaktionszeit wurden $88,5 \pm 8,2 \%$ Linolsäure bei einer Azelainsäureausbeute von $36,0 \pm 3,0 \%$ umgesetzt.

Die Negativkontrollen nach 16 h zeigen, dass auch ohne die Anwesenheit von Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase $63,8 \pm 0,5 \%$ Substratumsatz beobachtet werden kann. In dem Ansatz mit Zellen, die nur Lipoxygenase exprimieren, werden $96,2 \pm 2,4 \%$ Substrat umgesetzt. In beiden Negativkontrollen konnte weder die Bildung von Azelainsäure noch von 9-Oxononansäure festgestellt werden.

Die Ganzzellreaktion wurde darüber hinaus mit verschiedenen extrazellulären pH-Werten durchgeführt (A.7, S.153). Bei einem pH 6 konnte sowohl der höchste Linolsäureumsatz als auch die höchste Linolsäureausbeute beobachtet werden.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Fettsäuren im wässrigen Reaktionsmedium und der einfacheren Substrat- und Produktaufarbeitung wurde darüber hinaus überprüft, ob eine zweite, organische Phase einen positiven Einfluss auf die Reaktion hat. Als organische Phase wurde Cyclohexan als nicht toxisches Standardlösungsmittel verwendet. Die Lösungsmittelabhängigkeit wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationen miteinander verglichen. In Abbildung 3.9 sind die Produktausbeute und der Substratumsatz bei $0,25 \text{ mM}$

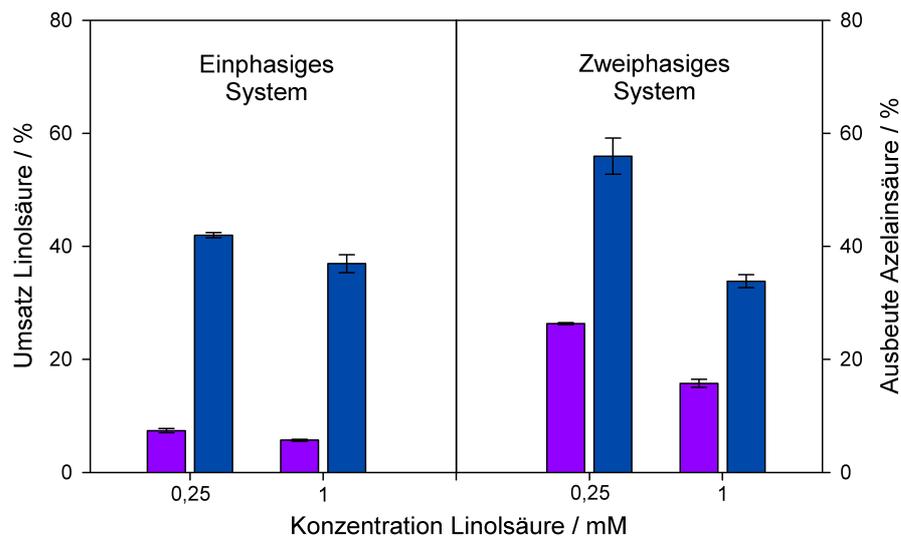


Abbildung 3.9: Vergleich des Ganzzellumsatzes von Linolsäure zu Azelainsäure bei einphasigen (links) und zweiphasigen (rechts) Reaktionsbedingungen. Es wurden zwei verschiedenen Substratkonzentrationen untersucht (0,25 mM und 1 mM). Der Linolsäureumsatz wird in Blau und die Azelainsäureausbeute in Pink dargestellt. Als zweite Phase wurde Cyclohexan (20 % Endkonzentration) verwendet. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

und 1 mM sowohl unter einphasigen als auch unter zweiphasigen Bedingungen gegenübergestellt. Bei beiden Konzentrationen wurde in dem zweiphasigen Versuchsaufbau eine deutlich höhere Produktausbeute festgestellt. Bei einer Konzentration von 0,25 mM war dieser Effekt mit einer Azelainsäureausbeute von $26,3 \pm 0,2$ % im zweiphasigen gegenüber $7,4 \pm 0,5$ % im einphasigen am stärksten ausgeprägt. Obschon im zweiphasigen System mit $56,0 \pm 3,2$ % gegenüber $42,0 \pm 0,4$ % ein leicht gesteigerter Substratumsatz beobachtet werden konnte, zeigte sich vor allem bei der Produktausbeute der 0,25 mM Reaktion ein deutlicher Unterschied. Im Zweiphasigen konnte hier mit $26,0 \pm 0,2$ % eine 3,5-fache Erhöhung der Produktausbeute gegenüber $7,4 \pm 0,4$ % beobachtet werden.

3.2.4 Konzentrationsabhängigkeit der Ganzzellreaktion

Es wurde gezeigt, dass die sukzessive *in vitro* Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase auf geringe Substratkonzentrationen limitiert sind (Abschnitt 3.1.8, S. 87 sowie Abbildung A.8, S.151). Nach Ermittlung einiger Reaktionsparameter wie pH-Optimum und Einfluss einer zweiten Phase der entsprechenden *in vivo* Reaktion sollte hier in analoger Weise der Einfluss der Substratkonzentration untersucht werden. Aufgrund der höher erwarteten Ausbeuten im Gegensatz zu den einphasigen Reaktionen wurden die Reaktionen unter Verwendung einer zweiten Phase durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10

dargestellt.

Nach 2 h wurde ein relativ zügiger Verlauf der Reaktion beobachtet. Mit einer Substratkonzentration von 250 μM wurden nach 2 h bereits $32,6 \pm 2,1$ % Linolsäure umgesetzt und $62,2 \pm 2,8$ μM Azelainsäure gebildet ($24,9 \pm 2,1$ % Ausbeute). Eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte trotz zunehmendem Linolsäureumsatz die Ausbeute nicht weiter erhöhen. Die Verwendung höherer Linolsäurekonzentrationen von 1 mM und 5 mM führte über die gesamte Reaktionszeit von 32 h zu einer steten Zunahme an Azelainsäure. Interessanterweise konnte zudem in beiden Ansätzen (1 mM und 5 mM) ein sehr ähnlicher Produkttiter detektiert werden. Nach 2 h wurden im 1 mM Ansatz $91,7 \pm 3,4$ μM und im 5 mM Ansatz $85,0 \pm 3,6$ μM gebildet. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 32 h ergab $200,6 \pm 8,0$ μM im 1 mM Ansatz und $210,7 \pm 5,4$ μM im 5 mM Ansatz. Bei der 1 mM Reaktion wurden nach 32 h $48,7 \pm 2,2$ % Substrat umgesetzt und bei der 5 mM Reaktion $31,7 \pm 0,0$ %. Die hieraus resultierende höhere Selektivität der 1 mM gegenüber der 5 mM Reaktion führt bei den *in vivo* Experimenten ebenso wie bei *in vitro* Experimenten zu einer besseren Reaktionsperformance für niedrigere Substratkonzentrationen.

In allen Fällen repräsentierte der Wert um ~ 200 μM einen oberen Schwellenwert bei der Bildung von Azelainsäure. Über diesem Schwellenwert wurde zusätzlich gebildetes

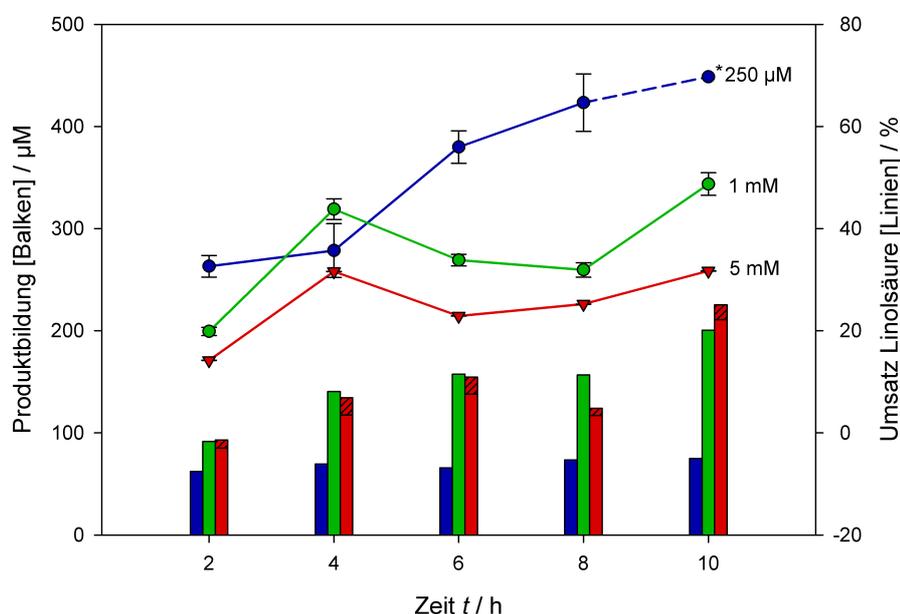


Abbildung 3.10: Untersuchung der Ganzzellbiotransformation von Linolsäure in Azelainsäure in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (0,25 – 1 mM) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6. Die Linolsäureumsätze sind als durchgezogene Linien und die Konzentration der gebildeten Produkte als Balken dargestellt. Azelainsäure wird hierbei von blanken und 9-Oxononansäure von schraffierten Balken repräsentiert. *) Der Messpunkt wurde extrapoliert. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

Produkt in Form von 9-Oxononansäure gebildet. Nach 32 h wurden bei der 5 mM Reaktion zusätzlich zu Azelainsäure $14,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$ 9-Oxononansäure detektiert. Dieser Effekt lässt sich bei allen Konzentrationen $\geq 5 \text{ mM}$ beobachten und nimmt mit steigender Substratkonzentration zu (Abbildung A.12A + B, S.154).

Die beste Reaktionsperformance im Hinblick auf Selektivität und Produktivität hatte die Reaktion mit 1 mM Substratkonzentration nach 8 h mit einem Substratumsatz von $33,8 \pm 1,1 \%$ und einer Produktausbeute von $15,8 \pm 0,72 \%$. Mit einer Selektivität von 47 % konnten somit innerhalb von 8 h 29 mgL^{-1} Azelainsäure gebildet werden.

3.3 *In vitro* Herstellung von Sebacinsäure

Nach retrosynthetischer Analyse der verschiedenen biokatalytischen Herstellungsmöglichkeiten soll Sebacinsäure auf dem in Abbildung 3.11 dargestellten Reaktionsweg hergestellt werden. Eine komplette Übersicht der verschiedenen möglichen Synthesewege wird ausführlich diskutiert (4.3.1, S. 119). In einem ersten Schritt soll Ricinolsäure mit einer Alkohol-Dehydrogenase zu 12-Oxoölsäure oxidiert werden. Durch Hydratasen katalysierte Wasseranlagerung an 12-Oxoölsäure soll 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure mit dem gesuchten 1,3-Ketolmotiv erhalten werden. Die eigentliche C-C-Bindungsspaltung soll mittels einer Retro-Aldolreaktion erfolgen. Die hierbei entstehende 10-Oxodecansäure soll in einem letzten Schritt mit einer Aldehyd-Dehydrogenase zu Sebacinsäure oxidiert werden.

Alle für die Charakterisierung und Quantifizierung benötigten Intermediate wurden vor Beginn der molekularbiologischen und biokatalytischen Arbeiten synthetisiert (2.5, S. 69). Ziel der ersten Untersuchungen war der erfolgreiche Abschluss einer Machbarkeitsstudie und somit der Etablierung eines rein artifiziellen Stoffwechselweges, basierend auf rein chemischen Überlegungen. Alle Teilreaktionen wurden unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt (30 °C, 250 µM Substrat, 180 Upm, 50 mM

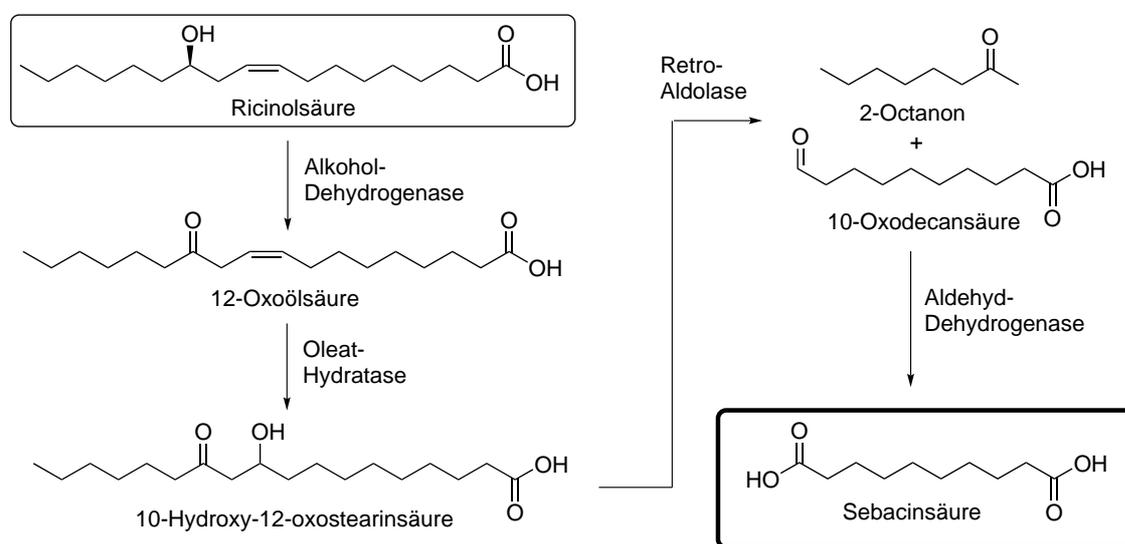


Abbildung 3.11: Multienzymkaskade für die biotechnologische Herstellung von Sebacinsäure. Ausgehend von der natürlich vorkommenden Fettsäure Ricinolsäure soll Sebacinsäure in vier Schritten hergestellt werden. Die Schritte beinhalten eine Oxidation mit einer Alkohol-Dehydrogenase, eine Hydratisierung mit einer Oleat-Hydratase, einer C-C-Bindungsspaltung welche durch eine *de novo* Retro-Aldolase katalysiert wird, sowie einer finalen Oxidation des C-C-Spaltprodukts zu Sebacinsäure mit einer Aldehyd-Dehydrogenase.

Kaliumphosphatpuffer) und werden im Folgenden separat behandelt. Die Parameter repräsentieren die optimalen Bedingungen der Retro-Aldolase und entsprechen gleichzeitig den physiologischen Bedingungen von *E. coli* für die leichtere Etablierung eines Ganzzellkatalysators.

3.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Intermediaten

Für die Quantifizierung und Charakterisierung der durchgeführten Biotransformationen, wurden relevante Intermediate selbst synthetisiert. 10-Oxononansäure wurde mittels Ozonolyse von 10-Undecensäure hergestellt (2.5.1, S.69). 12-Oxoölsäure wurde mittels Swern-Oxidation des Ricinolsäuremethylester und anschließender Hydrolyse hergestellt (2.5.2, S. 71). Die Synthese von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure erfolgte über eine 1,3-dipolare Cycloaddition zu einem Δ^2 -Isoxazolinmethylester und anschließender Hydrierung zu einer Ketolesterspezies, welche in einem letzten Schritt analog zu der Synthese von 12-Oxoölsäure hydrolysiert wurde (2.5.3, S. 74).

3.3.2 Oxidation von Ricinolsäure

Obleich zahlreiche Alkohol-Dehydrogenasen kommerziell erhältlich sind und ein relativ breites Substratspektrum akzeptieren, sind diese meist auf primäre Alkohole und subterminale Hydroxylgruppen wie etwa $\omega - 1$ bis $\omega - 3$ limitiert. Wenige Gegenbeispiele dieser „schwierigen“ Oxidation in rein aliphatischer Umgebung lassen leider die gewünschte C-12 Regioselektivität vermissen.^{212,105}

Mittlerweile zählen spezielle Biotechnologieunternehmen neben dem selbst unternommenen Enzymscreening und -engineering zu den modernen Quellen für neue Enzyme. Aus diesem Grund wurde für die Identifikation einer geeigneten Alkohol-Dehydrogenase mit c-LEcta (Leipzig, DE) zusammengearbeitet. Diese ist unter anderem auf Alkohol-Dehydrogenasen spezialisiert. c-LEcta screente über 70 Alkohol-Dehydrogenasen auf NAD^+ -Verbrauch mit dem Zielsubstrat Ricinolsäure. Die Sammlung bestand aus literaturbekannten Enzymen, Enzymen der Biodiversität und genetisch optimierten Mutanten. Vier der besten Varianten wurden anschließend mittels GC-FID auf den direkten Umsatz von Ricinolsäure untersucht. Eine Übersicht des von c-LEcta geleisteten Screenings findet sich im Anhang (A.13, S. 155).

Unter Geheimhaltung der Primärstruktur wurde die beste Variante ADH-102 von c-LEcta

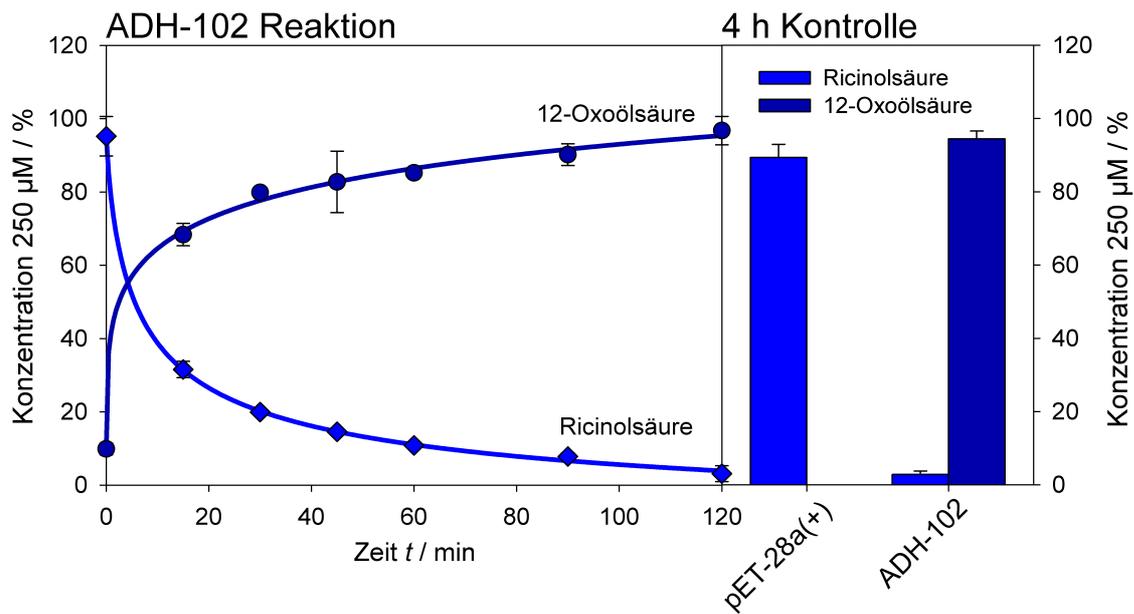


Abbildung 3.12: ADH-102 Reaktionen. Links: Zeitlicher Verlauf der ADH-102 Reaktion mit Ricinolsäure über 120 min. Rechts: Kontrollreaktion mit pET-28a(+) Leervektor nach 4 h. Die Reaktionen wurden jeweils in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit 250 μM Ricinolsäure, 2,5 mg mL^{-1} ADH-102, 2 mM Magnesiumchlorid, 1,25 mM NAD^+ bei 30 °C und 180 Upm sowie 2,5 mg mL^{-1} NADH-Oxidase für die Cofaktorregenerierung durchgeführt. Für die Berechnung der Konzentration von 12-Oxoölsäure wurde ein Korrekturfaktor verwendet (2.4.2, S. 56).

für die Machbarkeitsstudie der Herstellung von Sebacinsäure zur Verfügung gestellt. Durch den Vergleich mit dem selbst hergestellten authentischen Standard konnte nicht nur der Umsatz von Ricinolsäure festgestellt, sondern darüber hinaus die Bildung von 12-Oxoölsäure mittels GC-MS nachgewiesen werden.

Abbildung 3.12 zeigt den zeitlichen Verlauf der ADH-102 Reaktion. Mit der eingesetzten Enzymkonzentration von 2,5 mg mL^{-1} ADH-102 und 2,5 mg mL^{-1} NADH-Oxidase für die Cofaktorregenerierung konnte bereits nach 120 min ein Ricinolsäureumsatz (250 μM) von $96,9 \pm 2,1 \%$ bei einer 12-Oxoölsäureausbeute von $96,8 \pm 3,9 \%$ festgestellt werden. Die ADH-102 wurde in Form von lyophilisiertem Lysat eingesetzt. Die korrespondierende Negativkontrolle, Abbildung 3.12 rechts, zeigt selbst nach 4 h keine signifikante Aktivität gegenüber dem Zielsubstrat. Weiterhin konnte in der Negativkontrolle keine Produktbildung von 12-Oxoölsäure beobachtet werden. ADH-102 besitzt demnach eine hohe Aktivität für das Zielsubstrat Ricinolsäure. Weiterhin wurde die Aktivität gegenüber dem darauffolgenden Reaktionsintermediat 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure untersucht – ebenso wie bei der Negativkontrolle konnte keine signifikante Aktivität festgestellt werden (Anhang A.14, S. 155).

3.3.3 Hydratisierung von 12-Oxoölsäure

Für den nächsten Reaktionsschritt der Hydratisierung von 12-Oxoölsäure wurde, basierend auf einer Literaturrecherche, eine regioselektive Oleat-Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* *Em-OAH1* gewählt. *Em-OAH1* katalysiert die Hydratisierung von Ölsäure und anderen Fettsäuren, welche eine Unsatigung in C9-Position in *Z*-Konfiguration aufweisen. Das Oleat-Hydratasegen wurde als Codon-optimierte Variante vor der Verwendung in einen Expressionsvektor kloniert (Methoden 2.4.12, S. 64). Die N- und die C-terminal markierten Varianten von *Em-OAH1* wurden zudem von Elena Maurer während ihrer Studienarbeit hergestellt (Material 2.2.1, S. 48).²¹³

Abbildung 3.13 zeigt den zeitlichen Verlauf der *Em-OAH1* Reaktion unter den standardisierten Reaktionsbedingungen. Nach 15 h wurden mit einer Enzymkonzentration von 1 mg mL^{-1} bereits $47,0 \pm 1,1 \%$ 12-Oxoölsäure mit einer Ausbeute von $43,5 \pm 4,9 \%$ 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure umgesetzt. Nach 15 h zeigte eine deutliche Trübung des Reaktionsansatzes die Denaturierung des Zelllysats an und fortan konnte weder Substrat noch Produkt extrahiert werden. In Abbildung 3.13 ist die Negativkontrolle der eigentlichen Enzymreaktion gegenübergestellt. Nach 6 h konnte kein signifikanter Substratumsatz und keine Produktbildung beobachtet werden.

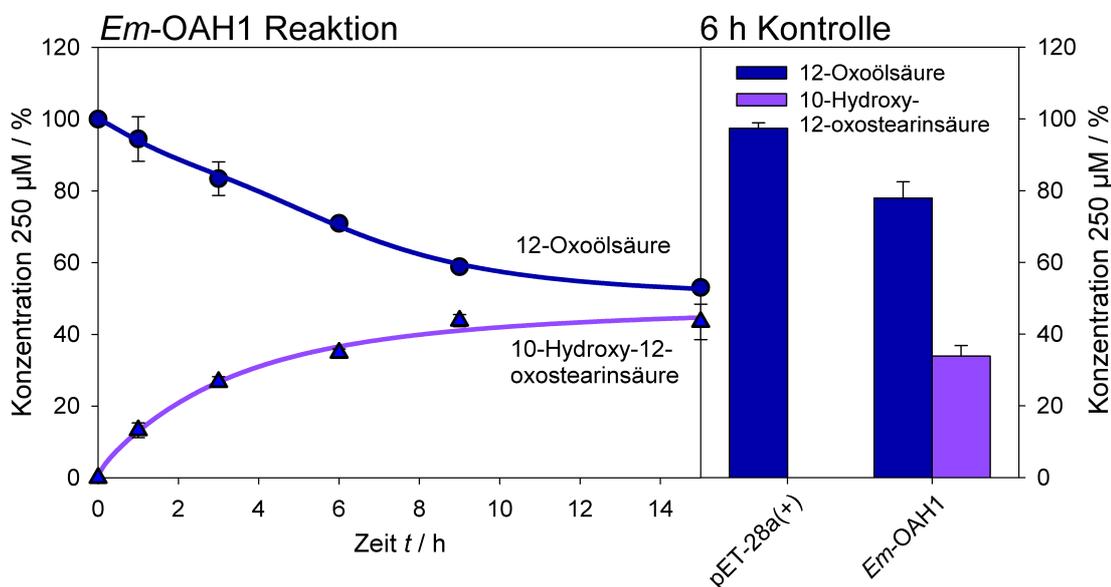


Abbildung 3.13: *Em-OAH1* Reaktionen. Links: Zeitlicher Verlauf der *Em-OAH1* Reaktion mit 12-Oxoölsäure über 15 h. Rechts: Kontrollreaktion mit pET-28a(+) Leervektor nach 6 h. Die Reaktionen wurden jeweils in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit $250 \mu\text{M}$ 12-Oxoölsäure, 1 mg mL^{-1} *Em-OAH1* bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 Upm durchgeführt. Für die Berechnung der Konzentration von 12-Oxoölsäure wurde ein Korrekturfaktor verwendet (2.4.2, S. 56).

Um zu überprüfen, ob die Wasseraddition von der gleichen Seite wie bei dem natürlichen Substrat Ölsäure stattfindet, wurde eine Mosher-Ester-Analyse durchgeführt (Methoden 2.4.6, S. 58). Das hierfür benötigte Produkt wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Elena Maurer in einer größeren Biotransformation hergestellt und aufgereinigt (Methoden 2.4.6, S. 58).¹⁶⁹ Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht der im $^1\text{H-NMR}$ ermittelten chemischen Verschiebungen der korrespondierenden *R*- und *S*-Mosher-Ester und den daraus resultierenden Differenzwerten, welcher für die Bestimmung der absoluten Konfiguration verwendet werden kann.

Abbildung 3.14 zeigt die Auswertung der Mosher-Ester-Analyse. Die Abschirmung der Phenylgruppe führt zu einer Hochfeldverschiebung des abgeschirmten Rests. Ein positiver $\Delta\delta^{SR}$ -Wert gibt somit an, welcher Rest beim Übergang des *S*-Ester auf den *R*-Ester abgeschirmt wird. Ein negativer $\Delta\delta^{SR}$ -Wert zeigt im Umkehrschluss eine Entschirmung an. Protonen im $^1\text{H-NMR}$ der C-Atome > 10 des Zielmoleküls zeigen einen positiven $\Delta\delta^{SR}$ -Wert, Protonen der C-Atome ≤ 10 einen negativen Wert (Tabelle 3.3). Der von der Phenylgruppe abgeschirmte Rest im korrespondierenden *R*-Mosher-Ester ist demnach der R_1 -Rest. Unter Berücksichtigung der Cahn-Ingold-Prelog-Regeln (CIP-Regeln) liegt 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure in der *S*-Konfiguration vor.

Tabelle 3.3: Mosher-Ester-Analyse von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure. Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die gemessenen chemischen Verschiebungen der *S*- und *R*-Mosher-Ester Derivate. Der Differenzwert der chemischen Verschiebungen gibt Aufschluss über die absolute Konfiguration.

| | δ <i>S</i> -Ester (ppm) | δ <i>R</i> -Ester (ppm) | $\Delta\delta^{SR}(= \delta^S - \delta^R)$ | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--------------|
| | | | ppm | Hz (500 Mhz) |
| C ₁₄ -CH ₂ | 1,45 | 1,38 | 0,07 | 34 |
| C ₁₁ -CHH | 2,53 | 2,47 | 0,06 | 29 |
| C ₁₁ -CHH | 2,76 | 2,70 | 0,05 | 27 |
| C ₁₃ -CH ₂ | 2,36 | 2,36 | 0,00 | 0 |
| C ₁₈ -CH ₃ | 0,79 | 0,79 | 0,00 | 0 |
| C ₉ -CH ₂ | 1,57 | 1,58 | -0,01 | -7 |
| C ₁₀ -CHR | 5,45 | 5,46 | -0,02 | -8 |

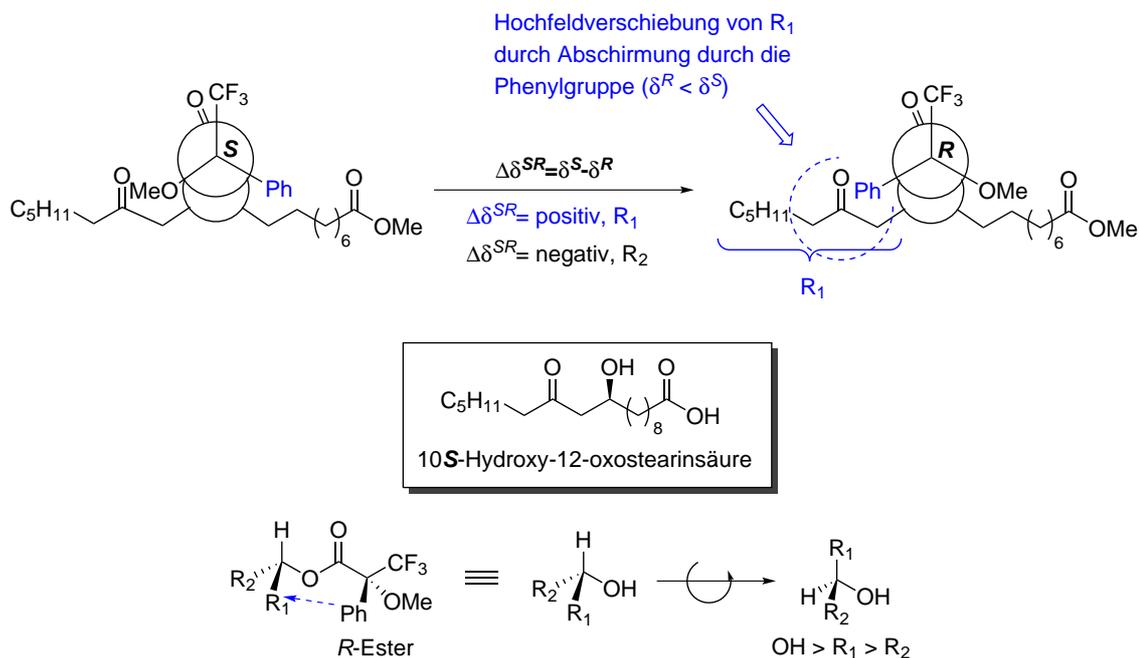


Abbildung 3.14: Auswertung der Mosher-Ester-Analyse. Durch Vergleich der chemischen Verschiebung des *S*- und *R*-Mosher-Esters kann auf die absolute Konfiguration geschlossen werden. Die Änderung der chemischen Verschiebungen basiert auf einer elektronischen Abschirmung spezifischer Reste durch eine Phenylgruppe im Reagenz. Durch die ermittelten chemischen Verschiebungen an bekannten Resten kann im Fall der 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure die Konfiguration zu *S* bestimmt werden.

3.3.4 Retro-Aldol C-C-Bindungsspaltung

Nachdem in einer zweistufigen Enzymkaskade ein 1,3-Ketolmotiv erstellt werden konnte, soll die eigentliche C-C-Bindungsspaltung mit einer Retro-Aldolreaktion durchgeführt werden. Da sich natürliche Substrate literaturbekannter Aldolasen deutlich von dem Zielsubstrat 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure unterscheiden, soll in diesem Schritt auf eine artifizielle *de novo* Aldolase zurückgegriffen werden.¹⁴² In Arbeiten von Jiang *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass Retro-Aldolasen auch *in silico* gestaltet werden können.¹⁴⁹ Das hierbei verwendete Substrat unterschied sich ebenfalls stark von den natürlichen Substraten verschiedener Aldolasen. Im Laufe der Arbeit von Jiang *et al.* wurden bereits verschiedene Aldolase-Varianten hergestellt, welche mittlerweile über das *Startup*-Unternehmen Arzeda (Seattle, US) verfügbar gemacht wurden. Arzeda als Kooperationspartner führte eine computerbasierte Vorauswahl auf das Zielsubstrat 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure durch und identifizierte sechs Gensequenzen möglicher Retro-Aldolasekandidaten.

Die Gene wurden exprimiert und die Genprodukte auf Aktivität getestet (Anhang A.3, S. 61). Tabelle 3.4 zeigt das Ergebnis des Aktivitätstest der verschiedenen *de novo* Retro-Aldolasen. IST 1001 und 1002 konnten nur sehr schwach exprimiert werden und zeigen keinerlei Aktivität gegenüber dem Zielsubstrat. RA 60.2 weist nur einen sehr geringen Substratumsatz auf. Bei RA 95.4 und RA 95.5 konnte in ersten Testreaktionen ein vergleichbarer Substratumsatz beobachtet werden. Der beste Substratumsatz zeigte sich bei RA 110.4. Allerdings kann die Bildung von 10-Oxodecansäure (oder sonstigen detektierbaren Produkten) nur bei der Verwendung von RA 95.5 und RA 110.4 festgestellt

Tabelle 3.4: Übersicht über das durchgeführte Screening der verschiedenen *de novo* Retro-Aldolasen. Neben Expression, Substratumsatz und Produktbildung sind zusätzlich das Motiv des ursprünglichen Proteinrückgrats sowie das Molekulargewicht gelistet.

| | Expression (3/3) | Umsatz Substrat | Bildung Produkt | Proteinstruktur- Motiv (PDB) | Molekulargewicht |
|----------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|------------------|
| IST 1001 | + | - | - | 1LBL ¹⁾ | 30 kDa |
| IST 1002 | + | - | - | 1LBL ¹⁾ | 30 kDa |
| RA 60.2 | + | > 25 % | - | 1M4W ²⁾ | 23 kDa |
| RA 95.4 | ++ | > 50 % | - | 1LBL ¹⁾ | 30 kDa |
| RA 95.5 | ++ | > 50 % | + | 1LBL ¹⁾ | 30 kDa |
| RA 110.4 | +++ | > 75 % | + | 1OHO ³⁾ | 15 kDa |

1) TIM-(β/α)₈-fassartige Struktur (Triosephosphat-Isomerase)

2) Jelly Roll Struktur

3) NTF2-ähnliche Struktur (Kerntransport-Faktor 2)

werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde fortan nur mit RA 110.4 weitergearbeitet. Die Expressionsdauer in ersten Experimenten betrug 4 h (LB-Medium). Sowohl bei der Verwendung von Zelllysate als auch bei der Verwendung von aufgereinigtem Enzym konnte nach 24 h Reaktionszeit nur eine maximale Ausbeute an 10-Oxodecansäure von $6,8 \pm 0,5 \%$ festgestellt werden. Auch die Verlängerung der Reaktionszeit auf 5 d konnte die maximale Produktausbeute nicht erhöhen. Neben 10-Oxodecansäure wurden keine weiteren Produkte gefunden. Die besten Parameter konnten zu pH 7,5 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bestimmt werden.

Die Veränderung der Expressionsparameter führte zu einer Veränderung des Reaktionsverhaltens des verwendeten Zelllysats. Die Verwendung von Lysat, bei welchem RA 110.4 für 24 h in TB-Medium exprimiert wurde, führte zu einer Beschleunigung der Reaktion und zu der Bildung weiterer Produkte wie Sebacinsäure und α,ω -Decandiol. Abbildung 3.15 zeigt den zeitlichen Verlauf der RA 110.4 Reaktion mit $250 \mu\text{M}$ 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure. Nach 12 h konnte ein Maximum bei der Bildung von 10-Oxodecansäure mit einer Ausbeute von $14,6 \pm 0,0 \%$ festgestellt werden. Allerdings fanden sich neben 10-Oxodecansäure noch $8,4 \pm 0,8 \%$ α,ω -Decandiol sowie $17,7 \pm 0,9 \%$ Sebacinsäure ($40,7 \pm 1,7 \%$ Summe aller C_{10} -Produkte bei $46,9 \pm 2,6 \%$ Umsatz). Ebenso wie bei der Herstellung von Azelainsäure sind endogene *E. coli* En-

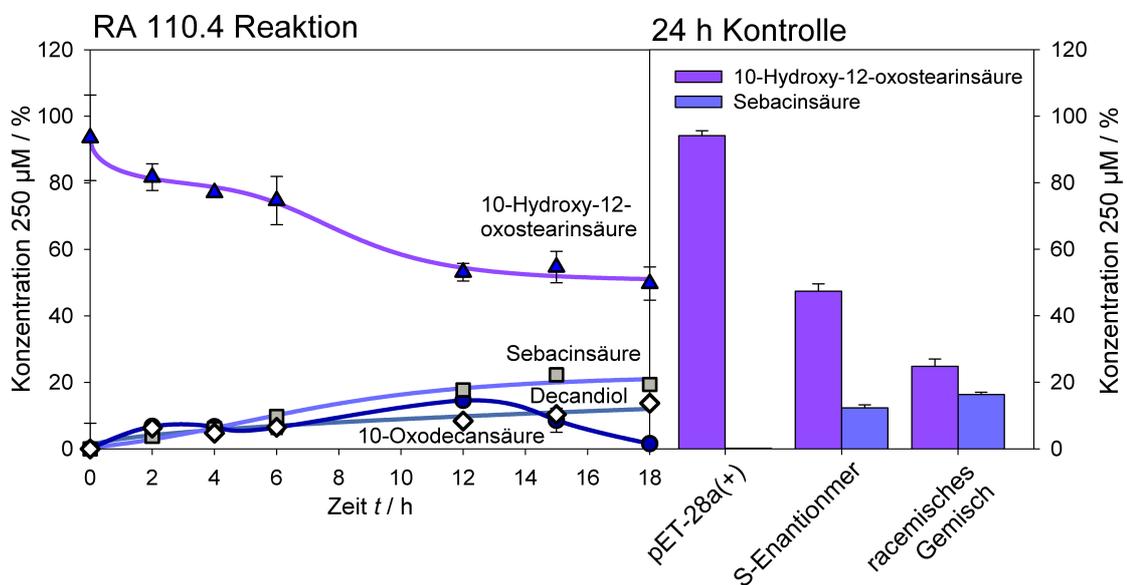


Abbildung 3.15: RA 110.4 Reaktionen. Links: Zeitlicher Verlauf der RA 110.4 Reaktion mit 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure über 18 h. Rechts: Kontrollreaktion mit pET-28a(+) Leervektor nach 24 h sowie ein Vergleich der Umsetzung des reinen S-Enantiomers mit dem racemischen Gemisch. Die Reaktionen wurden jeweils in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit $250 \mu\text{M}$ 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure, 4 mg mL^{-1} RA 110.4 bei 30°C und 180 Upm durchgeführt.

zyme demnach in der Lage, den letzten Oxidationsschritt von 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure durchzuführen. Bei den hier gezeigten Biotransformationen wurde auf die zusätzliche Zugabe von Cofaktor verzichtet. Im weiteren Reaktionsverlauf wird 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure und α,ω -Decandiol disproportioniert. Nach 15 h konnten nur noch $8,6 \pm 3,6$ % 10-Decansäure, dafür aber $22,3 \pm 0,5$ % Sebacinsäure und $10,4 \pm 1,3$ % α,ω -Decandiol detektiert werden ($41,3 \pm 5,4$ % C₁₀-Produkte bei $54,3 \pm 4,7$ % Umsatz). Eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit vermochte die Ausbeute an C₁₀-Verbindungen nicht weiter zu erhöhen. Vielmehr konnte analog zu der *Em*-OAH1 Reaktion eine Denaturierung des Zelllysats beobachtet werden, welches die Ausbeute und die Selektivität drastisch verringerte.

Abbildung 3.15 rechts zeigt zudem die Negativkontrolle nach 24 h. Im Gegensatz zu anderen Reaktionen mit *de novo* Enzymen kann bei der Retro-Aldolspaltung von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure keine signifikante Hintergrundreaktion beobachtet werden.¹⁴⁹ Darüber hinaus wurde die Umsetzung des synthetisch hergestellten racemischen Gemisches mit dem reinen aus der *Em*-OAH1 Biotransformation isolierten *S*-Enantiomer verglichen. Obgleich im Falle der racemischen Mischung ein wenig mehr Substrat umgesetzt und geringfügig mehr Produkt gebildet wurde, kann nicht von einer ausgeprägten Stereopräferenz von RA 110.4 gesprochen werden.

3.3.5 Oxidation von 10-Oxodecansäure

Es konnte bereits gezeigt werden, dass endogene *E. coli* Oxidoreduktasen in der Lage sind, die Oxidation von 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure zu katalysieren. In diesem Abschnitt wird analog zu der *in vitro* Herstellung von Azelainsäure überprüft, ob mit der zusätzlichen Expression von As-ALDH1 eine Verbesserung bzw. Beschleunigung der Oxidationsreaktion erreicht werden kann.

Abbildung 3.16 zeigt den zeitlichen Verlauf der As-ALDH1 katalysierten Oxidation von 10-Oxodecansäure zu Sebacinsäure. Mit der geringen Gesamtproteinkonzentration von $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ As-ALDH1 konnte bereits nach 10 min annähernd Vollumsatz mit einer Sebacinsäureausbeute von $81,8 \pm 9,8 \%$ beobachtet werden. Abbildung 3.16 (rechts) zeigt einen zusätzlichen Vergleich mit einer Negativkontrolle mit $10\times$ höherer Proteinkonzentration sowie einer Doppelnegativkontrolle ohne Protein in reinem Puffer. Die Reaktionsdauer der Kontrollreaktionen betrug 4 h. Nach 4 h Inkubationszeit konnten aus dem Ansatz ohne Enzym $89,7 \pm 0,49 \%$ 10-Oxodecansäure extrahiert werden. Während bei der As-ALDH1 Reaktion annähernd Vollumsatz mit einer Sebacinsäureausbeute von $90,6 \pm 2,2 \%$ beobachtet werden konnte, zeigte die pET28a(+)-Lysatprobe einen Umsatz von $43,4 \pm 0,9 \%$ mit $22,0 \pm 0,9 \%$ Ausbeute.

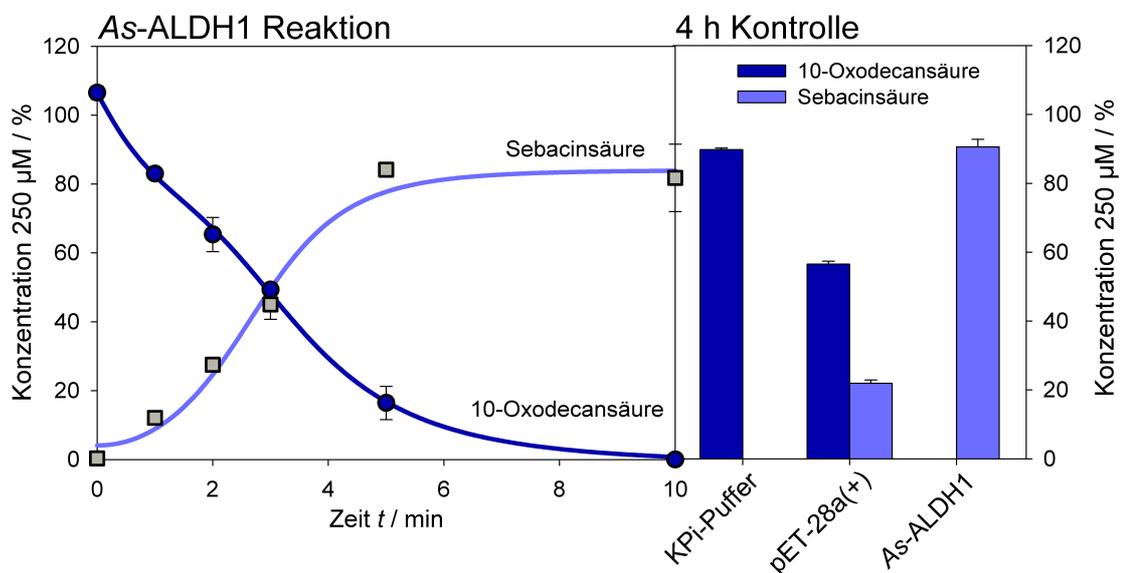


Abbildung 3.16: As-ALDH1 Reaktionen. Links: Der zeitliche Verlauf der As-ALDH1 Biotransformation über 10 min. Rechts: Kontrollreaktion mit pET-28a(+) Leervektor nach 4 h ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ Gesamtprotein) sowie einer doppelten Negativkontrolle in reinem Puffer. Die Reaktionen wurden jeweils in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit $250 \mu\text{M}$ 10-Oxodecansäure, $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ As-ALDH1 bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 Upm durchgeführt.

4

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, alternative biotechnologische Zugangsmöglichkeiten zu mittelkettigen Dicarbonsäuren zu erschließen. Im Fokus standen dabei die C₉-Dicarbonsäure Azelainsäure und die C₁₀-Dicarbonsäure Sebacinsäure. Azelainsäure konnte aus Linolsäure mit einem heterolog exprimierten natürlich vorkommenden Stoffwechselweg des pflanzlichen Oxylinmetabolismus zu Azelainsäure umgesetzt werden. Eine genauere Untersuchung der Multienzymkaskade ermöglichte daraufhin die erfolgreiche Etablierung eines entsprechenden *E. coli* Ganzzellkatalysators. Sebacinsäure konnte hingegen aus Ricinolsäure über eine rein artifizielle Multienzymkaskade hergestellt werden, welcher ausschließlich rein chemisch retrosynthetische Annahmen zugrunde lagen.

Aufgrund der klaren Abgrenzung der Ergebnisse in drei Themenblöcke wird diese Gliederung im Folgenden für die Diskussion übernommen.

4.1 *In vitro* Herstellung von Azelainsäure

Im ersten Teil der Arbeit lag besonderes Augenmerk auf der gekoppelten Enzymreaktion der Lipoxygenase, welche die Hydroperoxidierung von Linolsäure katalysiert, und der Hydroperoxid-Lyase, die für die anschließende Spaltung des Hydroperoxids in 3Z-Nonenal und 9-Oxononansäure verantwortlich ist. Da gezeigt werden konnte, dass endogene *E. coli* Oxidoreduktasen in der Lage sind, 9-Oxononansäure zu oxidieren, wird in diesem Abschnitt nicht gesondert auf die Reaktion der Aldehyd-Dehydrogenase As-ALDH1 eingegangen.

4.1.1 Expression und Enzymaktivität

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die pflanzlichen Lipoxygenasen deutlich schwieriger in einem prokaryotischen System exprimieren lassen als die ebenfalls pflanzlichen Hydroperoxid-Lyasen. Bei dem zu Beginn durchgeführten Enzymscreening wurde bei zu starker Expression nur die Bildung von Einschlusskörperchen¹⁾ beobachtet, wie etwa bei der Codon-optimierten *Os*-LOX1 oder aber auch der *St*-LOX1 bei Expressionstemperaturen über 16 °C. Die Neigung zu der Bildung von Einschlusskörperchen bei der Expression von Lipoxygenasen wurde schon mehrfach in anderen Arbeiten beschrieben.^{217,218} Im Rahmen der Diplomarbeit von Jens Kittelberger wurden vor dem Hintergrund der Etablierung eines Dualexpressionssystems zwei weitere Expressionssysteme getestet, die ebenfalls zu der Bildung von Einschlusskörperchen führten. Darunter ein T7-Promotor basiertes Expressionssystem (pET) und ein mit pQE vergleichbares auf dem T5-Promotor basiertes pBAD Expressionssystem.^{219,220,168}

Bei der Expression der Lipoxygenase *St*-LOX1 konnten in dem T5-Promotor basierten pQE-System allerdings gute Resultate erzielt werden. Im Gegensatz zu der Lipoxygenase aus *Anabaena* sp. PCC 7120 *As*-9LOX war bei der Expression von *St*-LOX1 keine Überexpression zu erkennen. Die erhaltenen Lysate zeigten allerdings eine starke Lipoxygenase Aktivität von 0,15 U mL⁻¹, welche $\sim 2,5 \times$ höher ist als andere in der Literatur beschriebenen Lipoxygenase Aktivitäten aus anderen Expressionssystemen (Tabelle 4.1).

¹⁾engl.: inclusion bodies: Proteinaggregate aus unvollständig oder fehlgefalteten Proteinen.

Tabelle 4.1: Vergleich verschiedener spezifischer Enzymaktivitäten aus verschiedenen Quellen und Expressionssystemen. (Abgeänderte Version von Otte *et al.*²⁰⁶)

| Enzym | Enzymquelle | Expressions-system | spezifische Aktivität | Referenz |
|--------------------------------|-------------|--------------------|--------------------------|--|
| <i>As</i> -9LOX | bakteriell | bakteriell (pET) | 0,83 U mg ⁻¹ | Diese Arbeit |
| <i>St</i> -LOX1 | pflanzlich | bakteriell (pQE) | 0,15 U mg ⁻¹ | Diese Arbeit |
| <i>Cs</i> -9/13HPL | pflanzlich | bakteriell (pQE) | 0,40 U mg ⁻¹ | Diese Arbeit |
| <i>Cs</i> -9/13HPL | pflanzlich | bakteriell (pREP) | 1,30 U mg ⁻¹ | Otte <i>et al.</i> ²¹⁰ |
| <i>Cm</i> -9/13HPL | pflanzlich | bakteriell (pET) | 0,51 U mg ⁻¹ | Diese Arbeit |
| <i>Gm</i> -LOX2 ^{a)} | pflanzlich | hefebasiert | 0,028 U mg ⁻¹ | Buchhaupt <i>et al.</i> ²¹⁴ |
| <i>Gm</i> -LOX2 ^{a)} | pflanzlich | pflanzlich | 0,043 U mg ⁻¹ | Fukushige <i>et al.</i> ²¹⁵ |
| <i>Cl</i> -13HPL ^{b)} | pflanzlich | hefebasiert | 1,19 U mg ⁻¹ | Buchhaupt <i>et al.</i> ²¹⁴ |
| <i>Cl</i> -13HPL ^{b)} | pflanzlich | pflanzlich | 1,47 U mg ⁻¹ | Fukushige <i>et al.</i> ²¹⁶ |
| <i>As</i> -ALDH1 | bakteriell | bakteriell (pET) | 0,83 U mg ⁻¹ | Diese Arbeit |

^{a)} *Gm*-LOX2: Lipoxygenase aus *Glycin max.*

^{b)} *Cl*-13HPL: Hydroperoxid-Lyase aus *Citrullus lanatus.*

Die Aktivität von *As*-9LOX haltigen Lysaten war aufgrund der deutlich besseren Expression mit $0,83 \text{ U mL}^{-1}$ $5,5 \times$ höher als die von *St*-LOX1.

Wie bei der Expression von *St*-LOX1 konnte bei der Expression der beiden Hydroperoxid-Lyasen *Cs*-9/13HPL und *Cm*-9/13HPL keine Überexpression festgestellt werden. Im Gegensatz zu *St*-LOX1 zeigen die beiden Hydroperoxid-Lyasen eine $\sim 3 \times$ geringere Aktivität als in anderen Expressionssystemen. Durch die Umklonierung von einem pQE-basierten Expressionsvektor in einen pREP4-basierten Vektor konnte ein vergleichbares Expressionslevel erreicht werden.¹⁶⁸

Die Vergleiche der spezifischen Aktivitäten können hier allerdings nur als Richtwerte verwendet werden, da es sich nicht nur um Enzyme aus unterschiedlichen Arten handelt, sondern die Enzymassays auch unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden. Es kann jedoch festgehalten werden, dass die verwendeten Expressionssysteme geeignet sind, aktive Enzyme in derselben Größenordnung wie in anderen Expressionssystemen herzustellen.

4.1.2 Selektivitätsaspekte der Multienzymkaskade

Die Untersuchung der geeignetsten Reaktionsparameter offenbarte einige interessante Selektivitätsaspekte der gekoppelten Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion, aber auch der einzelnen Enzymreaktionen. Die Lipoxygenase der Sojabohne (*Glycin max*) *Gm*-LOX1 bildet je nach pH verschiedene Zusammensetzungen der unterschiedlichen Regioisomere der Hydroperoxyoctadecadiensäure (9- und 13-HPODE) über einen pH-abhängigen Mechanismus.²⁰⁰ Im Gegensatz hierzu bildete die Lipoxygenase aus *Solanum tuberosum* *St*-LOX1 über den gesamten getesteten Bereich pH 4,5–8 fast ausschließlich das 9-Regioisomer (Anhang A.7, S. 150). Die Suche nach dem optimalen pH-Wert der gekoppelten *St*-LOX1 und Hydroperoxid-Lyase Reaktion orientierte sich deshalb nicht an der höchsten 9-Regioselektivität der Lipoxygenase Reaktion, sondern an der maximalen Gesamtausbeute des Hydroperoxid-Lyasen Produkts 9-Oxononansäure. Das pH-Optimum der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Reaktion stellte mit pH 7 den Mittelwert der beiden Einzelenzymreaktionen von pH 6,5 (*St*-LOX1) und pH 7,5 (*Cm*-9/13HPL) dar.^{166,165,179} Das pH-Optimum der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL Reaktion deckte sich bei pH 7,5 mit dem pH-Optimum der reinen *Cs*-9/13HPL Reaktion. Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass bei beiden Varianten eine annähernd gleiche 9-Oxononansäure beobachtet wurde, ist *Cs*-9/13HPL

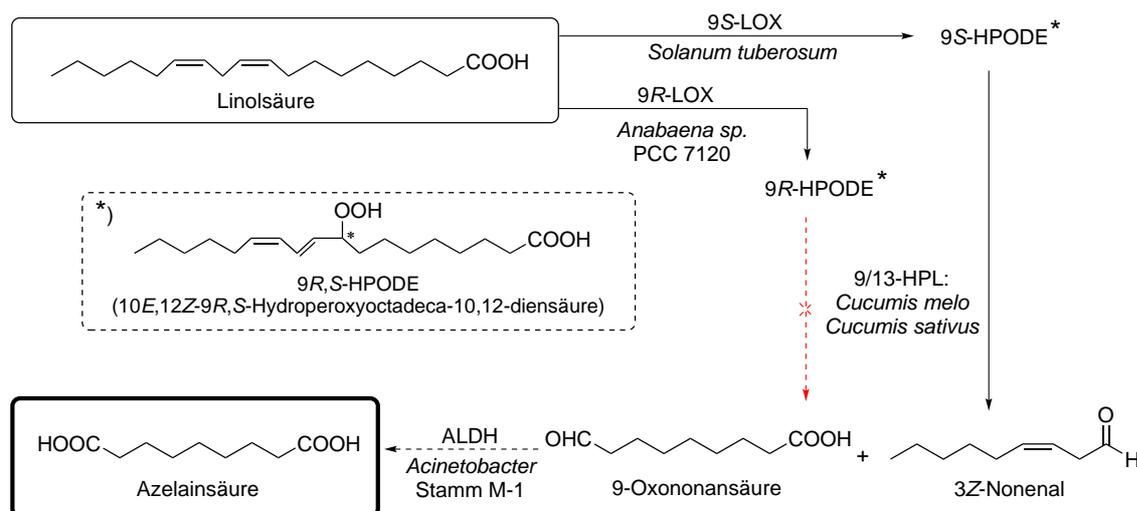


Abbildung 4.1: Modifiziertes Reaktionsschema für die Multienzymkaskade der Herstellung von Azelainsäure. Da sich 9/13-Hydroperoxid-Lyasen über eine ausgeprägte *S*-Selektivität auszeichnen, lässt sich die Route nur über das entsprechende 9*S*-Hydroperoxid durchführen. Die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion kann daher nur mit *St*-LOX1 und nicht mit *As*-9LOX durchgeführt werden.

für die Etablierung eines *E. coli* Ganzzellsystems aufgrund des physiologisch intrazellulären pH-Werts von pH 7,5 vorzuziehen.

Durch die Verwendung der beiden enantiokomplementären Lipoxygenasen konnte zudem die Enantioselektivität der beiden Hydroperoxid-Lyasen untersucht werden. Die Lipoxygenase aus *Anabaena* Stamm M-1 *As*-9LOX bildet fast ausschließlich das 9*R*-Enantiomer.²⁰⁴ Weder *Cm*- noch *Cs*-9/13HPL waren in der Lage, das gebildete Enantiomer in einer sukzessiven Reaktion zu spalten. Beide Enzyme zeigten allerdings eine starke Aktivität gegenüber dem 9*S*-Enantiomer, welches durch *St*-LOX1 gebildet wird. Eine *S*-Selektivität ist für die spezifischeren verwandten 13-Hydroperoxid-Lyasen beschrieben, welche nur die Spaltung von 13-HPODE, nicht aber die von 9-HPODE katalysieren.^{201–203} Durch diese Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass diese *S*-Selektivität auch bei den etwas unspezifischeren 9/13-Hydroperoxid-Lyasen zu finden ist. Diese Beobachtung führte zu der in Abbildung 4.1 gezeigten erweiterten Multienzymkaskade, nach welcher die Gesamtreaktion nur über das entsprechende *S*-Enantiomer ablaufen kann.

Eine weitere Auffälligkeit der gekoppelten Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion zeigte sich im Verlauf der Reaktionen bezüglich der Abhängigkeit von der Substratkonzentration (3.1.8, S. 87). In den ersten 2 h konnte ein schneller Reaktionsverlauf beobachtet werden. Allerdings konnte bei längerer Retentionszeit ein Rückgang der 9-Oxononansäureausbeute beobachtet werden. Zwischen 2 h und 4 h wurde in fast allen

Ansätzen das Umsatzmaximum von Linolsäure erreicht. Gleichzeitig konnte aber bei der 9-Oxononansäure ein Minimum beobachtet werden. Nach Erreichen des Minimums konnte im weiteren Verlauf ein langsamer Anstieg der 9-Oxononansäure erreicht werden. Dieser Effekt war bei geringen Substratkonzentrationen am deutlichsten ausgeprägt und nahm mit steigender Substratkonzentration ab (A.8, S. 151). Zwischen 4 h und 10 h kann fast keine Änderung des erreichten Linolsäureumsatzes, aber ein leichter Anstieg der 9-Oxononansäure beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Isomerisierung des *E,Z*-9-HPODE-Intermediats zu *E,E*-9-HPODE, welche bereits in anderen Arbeiten mit *Gm*-LOX1 beobachtet werden konnte.^{200,221} Die Isomerisierung wird unter anderem antioxidativen Prozessen zugeschrieben, die durch die Zersetzung von Peroxy-Radikalen ausgelöst werden.^{221–223} Darüber hinaus wurde berichtet, dass die Lipoxygenasen selbst einen Teil der thermodynamisch benachteiligten *E* zu *Z* Isomerisierung katalysieren.^{221,224} Für 13-Hydroperoxid-Lyasen wurde berichtet, dass *E,E*-13-HPODE im Gegensatz zu *Z,E*-13-HPODE kein Substrat ist.²²⁵ Der langsame Anstieg würde sich folglich durch eine langsame Zersetzung von *E,E*-9-HPODE erklären lassen.²²⁶ Hydroperoxide sind instabile Moleküle, da sie vor allem in Anwesenheit von Übergangsmetallen zu der Bildung freier Alkoxy- und Peroxyradikale neigen.^{227–230} Im Gegensatz zu der Enzym katalysierten Hydroperoxid-Lyase Reaktion ist die Autodekomposition unspezifisch, führt aber zu den gleichen Produkten wie bei enzymatischer Zersetzung durch Hydroperoxid-Lyasen.²²⁶

4.1.3 Bewertung des *in vitro* Gesamtprozesses

Es wurde gezeigt, dass die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion stark von der eingesetzten Substratkonzentration und der Reaktionszeit der beiden Einzelschritte abhängt. Sowohl die höchste 9-Oxononansäureausbeute von 73 % als auch die höchste Selektivität von 79 % wurden bei einer Reaktionszeit von 15 min und einer Substratkonzentration von 250 μM erzielt. Huang *et al.* berichteten über eine analoge Durchführung einer Lipoxygenasen (*Nicotiana benthamiana*) und Hydroperoxid-Lyasen (*Cucumis melo*) Kaskadenreaktion basierend auf einem Hefe-Expressionssystem.⁷⁵ Ziel dieser Arbeit war die Herstellung verschiedener Nonenal-Isomere. Mit dem Hefe-System konnte unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen eine Gesamtausbeute von 64 % aller Nonenal-Isomere erzielt werden.⁷⁵ Im Vergleich zu der Arbeit von Huang *et al.* konnte somit in dieser Arbeit eine 9 % höhere Ausbeute erzielt werden. Andere Arbeiten, die sich

mit einer Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen Kaskade beschäftigen, zielen auf die Herstellung von grünen Blattduftstoffen wie 3Z-Hexenal bzw. 3Z-Hexenol ab. Die hierfür eingesetzten Enzyme weisen beide eine C13-Selektivität auf. Typische Ausbeuten der aus der oxidativen Spaltung mit verschiedenen Enzymquellen und Expressionssystemen gewonnenen C₆-Verbindungen bewegen sich zwischen 37 % und 76 %.^{215,231–233} Relativ zu anderen 13-LOX und 13-HPL Kombinationen findet sich die hier erzielte Ausbeute im oberen Bereich der bisher erzielten Ausbeuten wieder.

Möglichst hohe Titer an 9-Oxononansäure von 0,11 gL⁻¹ konnten mit einer Substratkonzentration von 2 mM mit 32 % Ausbeute und 53 % Selektivität hergestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit der sukzessiven Lipoxygenase- und Hydroperoxid-Lyase Reaktion hohe Ausbeuten erzielt werden können. Aufgrund der Instabilität der freien Enzyme in den verwendeten Zelllysaten war das System jedoch auf geringe Substratkonzentrationen limitiert. Darüber hinaus waren die erreichten Ausbeuten stark von der Reaktionszeit der Einzelreaktionen abhängig. Dies setzt in Folge eine exakte Kontrolle der Einzelreaktionen voraus. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde im Folgenden versucht, das System auf ein Ganzzellsystem zu übertragen, um die angesprochenen Limitierungen zu umgehen.

As-ALDH1 zeigte sich in *in vitro* Reaktionen als idealer Kandidat für die Komplettierung der gesamten Reaktionskaskade. Mithilfe der dreistufige *in vitro* Multienzymkaskade kann Azelainsäure ausgehend von Linolsäure mit einer Ausbeute von 71 % hergestellt werden.

4.2 *In vivo* Herstellung von Azelainsäure

In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass sich die gekoppelte Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion nur sukzessiv und nicht simultan durchführen lässt. Um ein Ganzzellsystem zu etablieren, wurde dieser Sachverhalt untersucht und die gewonnenen Ergebnisse dazu verwendet, einen Ganzzellkatalysator zu entwickeln, welcher anschließend untersucht wurde.

4.2.1 Hydroperoxid-Lyase vermittelte Inhibierung der Lipoxygenase

Während der Untersuchung der simultanen Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion wurde eine Latenzzeit bei der Aktivierung der Lipoxygenase beobachtet (3.2, S.

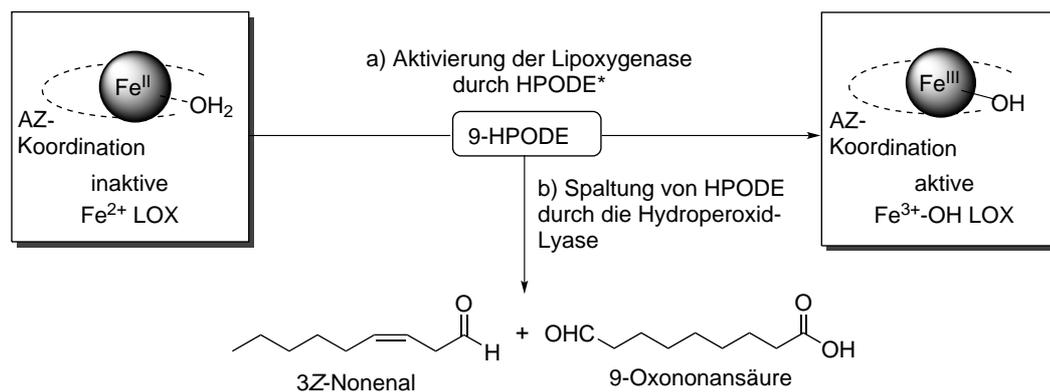


Abbildung 4.2: Konkurrenz um das von der Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase gemeinsame Reaktionsintermediat HPODE. a) Für die Aktivierung der Lipoxygenase von einer inaktiven Fe²⁺ zu einer aktiven Fe³⁺-OH-Spezies wird HPODE benötigt. b) HPODE stellt allerdings gleichzeitig das natürliche Substrat der Hydroperoxid-Lyase dar.

91). Die Latenzphase wurde bereits in anderen Studien gezeigt.^{208,209} Zudem wurde berichtet, dass eine Zugabe des Produkts der Lipoxygenase Reaktion HPODE oder eine Erhöhung der Lipoxygenasekonzentration zu einer Verminderung der Latenzzeit führt.⁵³ In dem katalytischen Zyklus der Lipoxygenasen treten zwei unterschiedliche Eisenspezies auf, eine inaktive Fe²⁺- und eine aktive Fe³⁺-OH-Spezies. Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Lipoxygenase durch Spuren des eigenen Reaktionsprodukts HPODE, welches natürlich durch autooxidative Prozesse entsteht, aktiviert wird.^{53-55,234}

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass HPODE bei der Aktivierung der Lipoxygenase eine wichtige Rolle spielt (3.7, S. 92). In einer simultanen Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion stehen beide Enzyme somit in direkter Konkurrenz um das Reaktionsintermediat HPODE, wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Sollte die Hydroperoxid-Lyase katalysierte Spaltung von HPODE (Abbildung 4.2 b) schneller ablaufen als die Aktivierung der Lipoxygenase (Abbildung 4.2 a), wäre keine vollständige Aktivierung möglich. Bei ausreichend hoher Hydroperoxid-Lyase Aktivität würde die Latenzzeit praktisch auf unendlich verlängert. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits von Lands *et al.* gemacht werden.²³⁵ Es wurde die Inaktivierung einer Lipoxygenase berichtet, HPODE wurde hierbei durch eine Glutathion-Oxidase in Gegenwart von Glutathion reduziert.²³⁵

Die aus diesem Umstand resultierende Notwendigkeit der Reduktion der Hydroperoxid-Lyase Aktivität musste sich allerdings auch innerhalb eines schmalen Rahmens bewegen, da zu hohe HPODE Konzentrationen zu einer irreversiblen Hemmung der Hydroperoxid-Lyase führen.^{236,237} Das Aktivitätsverhältnis zwischen Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase konnte somit als kritischer Faktor identifiziert werden. Weitere Faktoren, die bei der

simultanen Reaktion zu Problemen führen, sind die Produkte der Hydroperoxid-Lyase, welche ihrerseits die Lipoxygenase inhibieren können.^{238,239} Da endogene Oxidoreduktasen in der Lage sind diese Produkte umzusetzen und aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen, fällt dieser Faktor bei *in vivo* Experimenten deutlich weniger ins Gewicht als bei *in vitro* Experimenten.

4.2.2 *E. coli* Ganzzellkatalyse und Bewertung

Die Ganzzellkatalyse ist der Katalyse mit isolierten Enzymen in einigen Fällen vorzuziehen, darunter finden sich vor allem mehrstufige und Cofaktor-abhängige Reaktionen. Darüber hinaus ist ein Ganzzellsystem meist robuster und es können deutlich höhere Substratkonzentrationen verwendet werden.^{240–242} Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine 20-fache Verringerung der Hydroperoxid-Lyase Aktivität die Durchführung der simultanen Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion ermöglichte (Abbildung 3.7B, S. 92). Basierend auf dieser Beobachtung wurde ein Dualexpressionssystem konzipiert, indem die Lipoxygenase von einem *high-copy* Vektor und die Hydroperoxid-Lyase von einem *low-copy* Vektor exprimiert wurden (A.9, S. 152).

Interessanterweise konnte bei der Einfachexpression der Hydroperoxid-Lyase von dem *low-copy* Vektor eine $3,2\times$ höhere Aktivität als bei der Einfachexpression von einem *high-copy* erzielt werden. Die Tatsache, dass diese wie erwartet in dem Dualexpressionssystem $25\times$ geringer war, zeigt, dass für die Entwicklung eines Ganzzellsystems noch weitere Faktoren berücksichtigt werden müssen. Die durch die Verwendung des *low-copy* Vektors relativ zu dem *high-copy* Vektor geringe Expression führte zu einer höheren Enzymaktivität. Mithilfe des vektorbasierten Dualexpressionssystems konnte zwar eine Machbarkeitsstudie durchgeführt werden, eine systematische Verbesserung des Systems setzt allerdings eine genauere Kontrolle der Expression beider Enzyme voraus. Im Gegensatz zu der Kontrolle über die Kopierzahl der verwendeten Plasmide sollte die Expressionsstärke über den Promotor geregelt werden.^{243,244} Die Ermittlung der Expressionsstärke der Gene relativ zueinander und einzeln bei der Verwendung unterschiedlicher Promotoren für beide Gene sollte zu einer signifikanten Verbesserung der Gesamtaktivität führen, da hiermit das Aktivitätsverhältnis konstant präzise eingestellt werden kann.

Buchhaupt *et al.* berichteten 2012 über einen hefebasierten (*Saccharomyces cerevisiae*) Ganzzellkatalysator. Mittels der Coexpression einer 13-Lipoxygenase und einer 13-Hydroperoxid-Lyase konnten mit diesem System, ausgehend von Linolsäure, $63,1 \text{ mg mL}^{-1}$ verschiedener flüchtiger C_6 -Verbindungen mit einer Ausbeute von 58 %

hergestellt werden.²¹⁴ Trotz der guten Anfangsaktivität büßte das System schnell an Umsatz ein, da Linolsäure auf *S. cerevisiae* toxisch wirkt. Das *E. coli* System ist deshalb klar vorzuziehen, da *E. coli* mindestens 5 gL^{-1} toleriert.^{214,245–247} Azelainsäure zeigt zwar gegenüber *E. coli* bakteriostatische Eigenschaften, dies stellt aber bei der Prozessentwicklung kein Problem dar, da das Substrat auch erst nach Erreichen der gewünschten Zelldichte hinzugegeben werden kann.^{33,248}

Bei der Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter wurde neben der Bestimmung des pH-Optimums der Einfluss einer zweiten Phase untersucht. Ohne auf die $\log P_{\text{oct}}$ -Werte zu achten, wurde Cyclohexan als Standardlaborlösungsmittel verwendet, nachdem ohnehin keine direkte Korrelation zwischen Lösungsmittel und Enzymaktivität besteht und eine Optimierung in jedem Fall ein exzessives Lösungsmittelscreening voraussetzt.^{249,250}

Nachdem ein positiver Effekt beobachtet werden konnte, wurde Cyclohexan bei allen weiteren Experimenten als Kontrolle mitverwendet.

Der beste Umsatz konnte in einem Puffer mit pH 6 festgestellt werden. Nach der Formel von Slonczewski *et al.* berechnet sich der intrazelluläre homöostatisch regulierte *E. coli* pH zu 7,46.²⁵¹ Neben den reinen pH-Optima der Einzelenzyme muss aber auch die Löslichkeit von Linolsäure berücksichtigt werden, welche bei niedrigeren pH-Werten schnell abnimmt.²⁵²

Mit den besten Reaktionsbedingungen konnten innerhalb von 8 h 34 % Linolsäure zu Azelainsäure, mit einer Ausbeute von 16 %, umgesetzt werden. Der hiermit erreichte Produkttiter von 29 mgL^{-1} ist geringer als der der *in vitro* Reaktion. Der *in vivo* ist dem *in vitro* Gesamtprozess auf jeden Fall vorzuziehen, da alle Reaktionen simultan in einem Schritt durchgeführt werden können und darüber hinaus weiteres Verbesserungspotential existiert.

4.2.3 Massentransfer und Transport

Interessanterweise konnte bei allen Experimenten eine deutliche Diskrepanz zwischen gemessenem Umsatz und Ausbeute festgestellt werden. Diese Diskrepanz ist bei hohen Substratkonzentrationen besonders deutlich. Eine Abnahme des Produkts kann auch bei den Negativkontrollen beobachtet werden, wird aber durch die Expression der Lipoxygenase zusätzlich verstärkt (Abbildung 3.9, S. 95). Bei der Ganzzellreaktion mit 50 mM Substrat wurde mit einem Umsatz von 30 % zwar die höchste Produktmenge von $505 \text{ } \mu\text{M}$ 9-Oxononansäure und Azelainsäure erzielt, dies entspricht allerdings nur einer Ausbeute von 1 % (Abbildung A.12, S. 154). Aufgrund dieser Beobachtung ist anzunehmen, dass es

sich um einen Blindumsatz handelt, welcher in direktem Zusammenhang mit den *E. coli* Zellen steht.

Einerseits könnte dieser Blindumsatz auf eine hydrophobe Interaktion des Substrats mit lipophilen Membranbestandteilen zurückgeführt werden, da aber allein die Expression der Lipoxygenase den Umsatz um 32,5 % steigerte, ist davon auszugehen, dass ein Großteil des Substrats bereits intrazellulär vorliegt (Abbildung 3.9, S. 95). Der einzige natürliche *E. coli* Stoffwechselweg, der für den Metabolismus von Linolsäure verantwortlich sein kann, ist die β -Oxidation, die interessanterweise auch gleichzeitig für den aktiven Import von Fettsäuren verantwortlich ist. Die Tatsache, dass bei einer Substratkonzentration von 250 μM auch nach 32 h Substrat nachgewiesen kann, zeigt, dass Linolsäure keine geeignete Energiequelle darstellt. Somit ist zwar der gerichtete Import limitiert, es wird aber auch der vollständige Abbau verhindert.

Aufgrund der Membranbeschaffenheit der Lipiddoppelschicht der *E. coli* Membran ist die Diffusion von freien Fettsäuren nahezu ausgeschlossen.²⁵³ Freie Fettsäuren werden über ein Transportprotein FadL durch die äußere Membran hindurch in das Periplasma transportiert.²⁵⁴ Nach Protonierung können diese reversibel in die innere Membran zwischen Cytosol und Periplasma *flippen*.^{255,256} Mittels der vektorialen Acylierung durch FadD werden die freien Fettsäuren auf der cytosolischen Membranseite an Acyl-Carrier Proteine gebunden und so der Transport aktiv gesteuert. Die energieabhängige Veresterungsreaktion ist gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Fettsäureimports.^{257–259}

Eine vergleichsweise hohe Aktivität des periplasmatischen Importers FadL, verglichen mit dem für den cytosolischen Import verantwortlichen FadD bzw. eines der Folgeenzyme der β -Oxidation wie z. B. FadE, würde zu einer Akkumulation von Linolsäure im Periplasma und in der periplasmatischen Membran führen.²⁶⁰ Auf diese Weise kann wenig Linolsäure im Medium detektiert und generell wenig Produkt gebildet werden, da der Import in das Cytosol zu gering ist. Die Tatsache, dass Linolsäure nicht zusätzlich zu der Energiegewinnung genutzt werden kann, behindert den energieabhängigen Import zusätzlich, da benötigte Energieäquivalente nicht regeneriert werden können.²⁵⁴ Die Supplementierung anderer Nährstoffe zu Energiegewinnungszwecken kann aber auch negative Auswirkungen auf den Fettsäureimport haben, da dieser noch von weiteren Faktoren wie dem osmotischen Druck (OmpR), der Sauerstoffverfügbarkeit (AraA-P), der Anwesenheit von Glukose (cAMP) und der Konzentration freier Fettsäuren (FadR) abhängt.^{261–264}

4.3 *In vitro* Herstellung von Sebacinsäure

Die Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase katalysierte oxidative Spaltung von Linolsäure zur Herstellung von Azelainsäure wurde direkt aus der Natur *en bloc* in das Labor übertragen. Im Gegensatz hierzu wurde bei der Herstellung von Sebacinsäure eine andere Strategie verfolgt. Für die Wahl der Synthesestrategie von Sebacinsäure wurde eine biokatalytische Retrosynthese durchgeführt. Im Gegensatz zu der bei der klassischen Retrosynthese angewandten strukturellen Vereinfachung wurde allerdings auf eine Annäherung zu natürlichen Ressourcen abgezielt.

4.3.1 Biokatalytische Retrosynthese von Sebacinsäure

Das Konzept der Retrosynthese wurde von E. J. Corey eingeführt, der aufgrund dessen 1990 mit dem Chemie Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Durch die systematische Anwendung iterativer chemischer Rückreaktionen, welche aus Interkonversion funktioneller Gruppen (FGI: *functional group interconversion*) und C-C-Bindungsspaltungen bestehen, werden strukturell vereinfachte Ausgangsverbindungen gefunden und eine Vielzahl verschiedener Synthesestrategien entwickelt.²⁶⁵ Abbildung 4.3 zeigt eine Übersicht über vier ausgewählte retrosynthetische Strategien für Sebacinsäure. Alle vier Strategien (A–D) haben gemeinsam, dass das Sebacinsäure C₁₀-Synthon¹⁾ in dem C-C-Bindungsknüpfungsschritt mit einem C₈-Baustein verknüpft wurde, da die meisten natürlich vorkommenden pflanzlichen Fettsäuren eine Kettenlänge von 18 C-Atomen aufweisen. Sebacinsäure wurde bei allen gezeigten Strategien als a¹-Akzeptor-Synthon verwendet, da andere Strategien, in denen das Sebacinsäure-Synthon als d¹- oder d²-Donor verwendet wurde, entweder mehr Stufen benötigen oder die benötigten Reaktionen nicht im Repertoire bekannter Enzyme zu finden sind.

In Strategie A wird die C-C-Bindungsspaltung bei der β -Diketonverbindung mittels einer Retro-Claisen-ähnlichen Reaktion durchgeführt. Diese Reaktion kann enzymatisch mit einer β -Diketon-Hydrolase (BDH) realisiert werden.²⁶⁶

¹⁾Synthon: konzeptionelles Syntheseäquivalent der Retrosynthese.

Die erfolgreiche Durchführung der Reaktion würde allerdings ein Screening verschiedener β -Diketon-Hydrolasen voraussetzen, da die Reste R_1 und R_2 von verschiedenen BDHs sowohl als Akzeptor als auch als Donor erkannt werden können und somit anstelle von Sebacinsäure auch 10-Oxoundecansäure entstehen kann.^{267,268}

Für die Bildung der β -Diketonspezies und somit für die Durchführung der kompletten Strategie werden drei weitere Enzyme benötigt. Die Oxidationen können entweder mit einer selektiven Alkohol-Dehydrogenase (ADH) oder mit einer unselektiven Alkohol-Oxidase (AO) durchgeführt werden, da ohnehin beide Hydroxylgruppen oxidiert werden müssen.¹⁰⁵ Sowohl Alkohol-Oxidasen als auch β -Diketon-Hydrolasen können in Polyvinylalkohol abbauenden Stämmen gefunden werden.²⁶⁹ Die Hydratisierung kann mit einer regioselektiven Hydratase durchgeführt werden. Das nächste natürliche Substrat für diese Strategie ist somit Ricinolsäure, der Hauptbestandteil des Rizinusöls aus den Samen des Wunderbaums *Ricinus communis*. Verschiedene Alkohol-Oxidasen und β -Diketon-Hydrolasen wurden bereits für die heterologe Expression kloniert und charakterisiert.^{267,270} Prinzipiell sollte die Realisierung dieser Strategie möglich sein. Die Zielsubstrate haben mit den natürlichen Substraten der benötigten Enzyme eine große Ähnlichkeit und es kann auf eine Vielzahl proteinbiochemischer Methoden wie die gerichtete Evolution zurückgegriffen werden, um die Reaktionen zu realisieren.

Strategie B bedient sich der Hemiacetal-Synthase vermittelten Umlagerungsreaktion als zentralen C-C-Bindungsspaltungsschritt. Das hierfür benötigte Enzym wird auch als Hydroperoxid-Lyase bezeichnet und wurde in dieser Arbeit bereits im Rahmen der Herstellung von Azelainsäure verwendet. Hydroperoxid-Lyasen benötigen neben einer oder mehreren Unsättigungen eine Hydroperoxygruppe, welche durch eine Lipoxygenase eingeführt werden kann. Obwohl Lipoxygenasen im Stoffwechsel praktisch aller höheren Organismen eine Rolle spielen, finden sich Enzyme mit der benötigten C10-Regioselektivität nur in dem Reich der Pilze (*Fungi*). Wie bereits beschrieben, benötigen Lipoxygenasen ein 1Z-4Z-Pentadienmotiv. Aus diesem Grund bieten sich Linolsäure oder Linolensäure als Substrat an. Der Zerfall des Hemiacetals erfolgt spontan, die hierbei entstehende Oxosäure hat allerdings noch eine Doppelbindung in α -Position zu der Carbonylgruppe. Obwohl pflanzliche Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen gut charakterisierte Enzyme sind, existieren keine für die heterologe Expression klonierte Varianten der benötigten Pilz-Lipoxygenasen. Die Problematik der mikrobiellen Expression eukaryotischer Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen wurde bereits diskutiert. Nach der Spaltungsreaktion werden zwei weitere Reaktionen benötigt, um die ungesättigte Oxosäure zu Sebacinsäure umzusetzen. In einem ersten Schritt muss hierfür die Doppelbindung mit einer Enoat-Reduktase reduziert und in einem zweiten Schritt die Carbonyl- zu einer

Carboxylgruppe oxidiert werden. Die für die Durchführung der beiden Reaktionsschritte benötigten Cofaktoren können hierbei gegenseitig regeneriert werden.

Strategie C wurde 2013 bereits von Song *et al.* realisiert.²⁷¹ Die zentrale C-C-Bindungsspaltung erfolgt hierbei über eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase (BVMO). In einem ersten Schritt wird die Wasseraddition an Ölsäure mittels einer Hydratase aus *Stenotrophomonas maltophilia* katalysiert.¹¹³ Die hierbei entstehende Hydroxylgruppe wird mit einer unspezifischen Alkohol-Dehydrogenase aus *Micrococcus luteus* oxidiert.²¹² Das Kernproblem ist hier vergleichbar mit Strategie A. Unterschiedliche BVMOs können Sauerstoff sowohl auf R₁- als auch auf R₂-Seite einfügen. Alle verwendeten Enzyme wurden bereits charakterisiert und die Strategie stellt somit einen neuen interessanten Zugang zu Sebacinsäure dar.

Die letztlich umgesetzte Strategie D verwendet als eigentliche C-C-Bindungsspaltungsreaktion die Retro-Aldolreaktion der 1,3-Ketolspezies. Ausgehend von Ricinolsäure kann hier in einer zweistufigen Reaktion mit einer Alkohol-Dehydrogenase und einer Hydratase das Aldolmotiv hergestellt werden. Nach der Retro-Aldolspaltung muss die entstehende 10-Oxodecansäure mit einer Aldehyd-Dehydrogenase zu Sebacinsäure oxidiert werden. Die Hauptherausforderung bei dieser Strategie lag bei der Durchführung der Retro-Aldolreaktion, da sich das Zielsubstrat 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure stark von natürlichen Substraten unterscheidet.^{142,140} Eine weitere Herausforderung ist die selektive Oxidation der Hydroxylgruppe in C12-Position. Die anderen beiden benötigten Enzymaktivitäten sind bereits in anderen Studien beschrieben und die Zielsubstrate weisen eine große Ähnlichkeit gegenüber den natürlichen Substraten der Enzyme auf.

Alle vier vorgestellten Strategien benötigen genau vier enzymatisch katalysierte Schritte. Welche dieser Ansätze sich letztendlich als der beste herausstellt, kann erst nach Identifikation der Engpässe und der systematischen Abarbeitung dieser gesagt werden. Letztendlich wurde Strategie D gewählt, weil diese ebenso vielversprechend wie die anderen ist, darüber hinaus aber Technologien erfordert, die vor einigen Jahren noch nicht zur Verfügung standen. Diese Technologien umfassen das *in silico* Design von Enzymen und den Zugriff auf professionelle Datenbanken, die mittlerweile als moderne Quelle für Enzyme gehandelt werden. Der Einsatz von *de novo* Enzymen in dieser Kaskade stellt somit das erste praktische Anwendungsbeispiel von *de novo* Enzymen dar. Mit der Wahl von Strategie D kann somit nicht nur ein komplett neuer artifizieller Stoffwechselweg entwickelt werden, sondern es können zudem auch Methoden auf dem neusten Stand der Technik evaluiert werden.

4.3.2 Die Alkohol-Dehydrogenase Reaktion

Durch das Screening von c-LEcta konnte die ADH-102 als bester Kandidat für die Oxidationsreaktion von Ricinolsäure zu 12-Oxoölsäure identifiziert werden. Gegenüber dem Zielsubstrat konnte eine hohe spezifische Aktivität von $3,9 \text{ U mg}^{-1}$ gemessen werden. Leider unterliegen alle Daten bezüglich der Struktur, Expression, Herkunft und Sequenz der Geheimhaltung, weshalb an dieser Stelle nicht darauf eingegangen werden kann. Die ADH-102 verfügt allerdings über die nötige Selektivität und Aktivität, um die Zielreaktion, die Oxidation von Ricinolsäure zu 12-Oxoölsäure, selektiv durchzuführen, und stellt somit ein ideales erstes Enzym bei der Durchführung der Multienzymkaskade dar. Durch die vergleichbar hohe Aktivität bei den verwendeten Reaktionsparametern eignet sich das Enzym auch ohne weitere Verbesserung für die Verwendung in einem Ganzzellsystem.

4.3.3 Die Oleat-Hydratase Reaktion

Ein gemeinsames Motiv der Substrate von den meisten literaturbekannten Oleat-Hydratasen ist eine Doppelbindung in C9-Position relativ zu einer Carboxylgruppe. Neben Ricinol- und Linolsäure konnte auch schon Linolensäure umgesetzt werden.^{113,272,127} 1971 untersuchten Wallen *et al.* die Substratspezifität der *Em*-OAH1 mittels Ganzzellkatalyse des Originalstamms *Elizabethkingia meningoseptica*, da das Gen erst 2009 kloniert wurde. Unter anderem wurde in dieser Publikation auch die Umsetzung von 12-Oxoölsäure und 12,13-Epoxyölsäure (Vernolsäure) getestet und falsifiziert.²⁷³ In dieser Arbeit konnte im Fall der 12-Oxoölsäure das Gegenteil gezeigt werden, da nicht mit ganzen Zellen, sondern mit Zellhomogenaten gearbeitet wurde. Die Beobachtungen von Wallen *et al.* sind somit höchstwahrscheinlich auf den mangelnden Import des Substrats in die Zelle zurückzuführen.

Die Oleat-Hydratase wurde von Elena Maurer während ihrer Diplomarbeit (ITB 2014) genauer untersucht. Das pH-Optimum der Hydratase *Em*-OAH1 liegt, wie bei anderen bekannten Hydratasen, sowohl bei dem natürlichen Substrat Ölsäure als auch bei 12-Oxoölsäure bei pH 6,5 (A.11, S. 153).^{274,275,169} Die Reaktionsgeschwindigkeit der 12-Oxoölsäure-Umsetzung ist allerdings um einen Faktor $\sim 10\times$ geringer.¹⁶⁹ Am deutlichsten macht sich allerdings die pH-Wert-Verschiebung hin zu den standardisierten Reaktionsbedingungen bemerkbar. Nach dem Wechsel von pH 6,5 auf pH 7,5 können in etwa nur noch 10 % Restaktivität detektiert werden (A.11, S. 153).¹⁶⁹ Mittels der Hydratase *Em*-OAH1 konnte somit exemplarisch gezeigt werden, dass die Umsetzung von 12-Oxoölsäure zu 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure durchgeführt werden kann. Die

Aktivität des Enzyms ist gegenüber dem Zielsubstrat, verglichen mit der Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat Ölsäure aber nicht befriedigend. Um die Aktivität zu verbessern, müssen gleichzeitig zwei Faktoren berücksichtigt werden, die Aktivität gegenüber dem Zielsubstrat und das pH-Optimum. Da bislang keine Kristallstruktur einer Oleat-Hydratase aufgeklärt wurde, kann nur auf eine gerichtete Evolution mittels Zufallsmutagenese zurückgegriffen werden. Die größte Herausforderung solcher Methoden besteht in der Etablierung eines geeigneten Enzymassays. Hiseni *et al.* entwickelten ein neues Screening speziell für Hydratasen, welches auf der spektrophotometrischen Detektion von Alkylnitriten beruht, welche über die Reaktion der Substrat-Hydroxylgruppe mit salpetriger Säure (HNO_2) gebildet wird.²⁷⁶ Dieses Assay könnte z. B. für die gerichtete Evolution der Oleat-Hydratase verwendet werden.

Mittels der Mosher-Ester-Analyse konnte gezeigt werden, dass die formale Übertragung einer Hydroxylgruppe (und eines Protons) von der gleichen prochiralen Seite her stattfindet. Die Chiralität der 10-Hydroxylgruppe des Zielprodukts wurde zu *S* bestimmt, während die der Hydroxylgruppe in 10-Hydroxystearinsäure eine *R*-Konfiguration aufweist. Da das Zielsubstrat in C12-Position eine Carbonylgruppe aufweist, ändern sich die Prioritäten nach Cahn-Ingold-Prelog (CIP). Bei einer vergleichbaren Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum aufgrund der starken ionischen Wechselwirkungen durch die Carboxylgruppe werden beide Substrate vermutlich nach dem gleichen Mechanismus umgesetzt.

4.3.4 Die *de novo* Retro-Aldolase Reaktion

Für die eigentliche C-C-Bindungsspaltungsreaktion von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure wurde aufgrund des großen Unterschieds des Zielsubstrats gegenüber natürlichen Aldolase-Substraten auf eine *in silico* designte Aldolase zurückgegriffen. Für die Realisierung dieser Reaktion wurde daher mit Arzeda als Kooperationspartner zusammengearbeitet. Mitarbeiter von Arzeda waren in jüngerer Vergangenheit maßgeblich an der Entwicklung der Retro-Aldolasen beteiligt.¹⁴⁹ Mittels computerbasierten Dockingexperimenten wurde von Arzeda eine Vorauswahl der möglichen Enzymkandidaten erstellt. Zwei der sechs Kandidaten zeigten eine signifikante Aldolase Aktivität. Im Gegensatz zu anderen Reaktionen, die mit *de novo* Enzymen katalysiert werden, konnte bei der Umsetzung von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure keine nennenswerte Hintergrundreaktion beobachtet werden.

Nach ersten Screening-Experimenten wurde mit der Variante RA 110.4 weitergearbeitet. RA 95.5 zeigte ebenfalls eine annähernd vergleichbare Aldolase Aktivität. Interessanterweise reicht ein einziger Aminosäureaustausch von RA 95.5 zu RA 95.4 (RA 95.5 S53E), um den Umsatz deutlich zu verringern und die Bildung von 10-Oxodecansäure gänzlich zu verhindern. Abbildung 4.4 zeigt einen möglichen Einfluss der Position 53 auf das katalytisch aktive Lysin 83. Durch die S53E Mutation von RA 95.5 zu RA 95.4 verkleinert sich der Abstand der Aminosäure in Position 53 zu Lysin 83. Die hieraus resultierende sterische und elektronische Situation kann zweifelsfrei einen Einfluss auf die Katalyse in RA 95.4 haben, da hierdurch eine produktive Bindung in dieser Konformation verhindert werden kann. Zudem kann die S53E Mutation einen zusätzlichen Einfluss auf die Loop-Flexibilität haben, die Einfluss auf die Katalyse haben kann, wie schon in Arbeiten von Sabrina Reich mit ihrer Arbeit an Enoat-Reduktasen gezeigt wurde.²⁷⁷

Verglichen mit anderen *de novo* Enzym katalysierten Reaktionen zeigt RA 110.4 eine erstaunlich hohe Aktivität, die sich im Bereich der substratpromiskuitiven Oleat-Hydratase Reaktion (*Em*-OAH1) bewegt. Aufgrund der geringsten Enzymaktivität wurden alle anderen Reaktionsparameter der gesamten Multienzymkaskade auf die optimalen Reaktionsbedingungen der Aldolase angepasst.

Im Gegensatz zu den ersten durchgeführten Testreaktionen konnte die Ausbeute an 10-Oxodecansäure gesteigert werden. Gleichzeitig konnten Nebenreaktionen beobachtet werden, durch welche 10-Oxodecansäure in α, ω -Decandiol und Sebacinsäure umgesetzt wird. Diese Oxidoreduktasen vermittelten Nebenreaktionen konnten durch eine IMAC-Aufreinigung nicht entfernt werden. Somit kann leider keine Aussage darüber getroffen

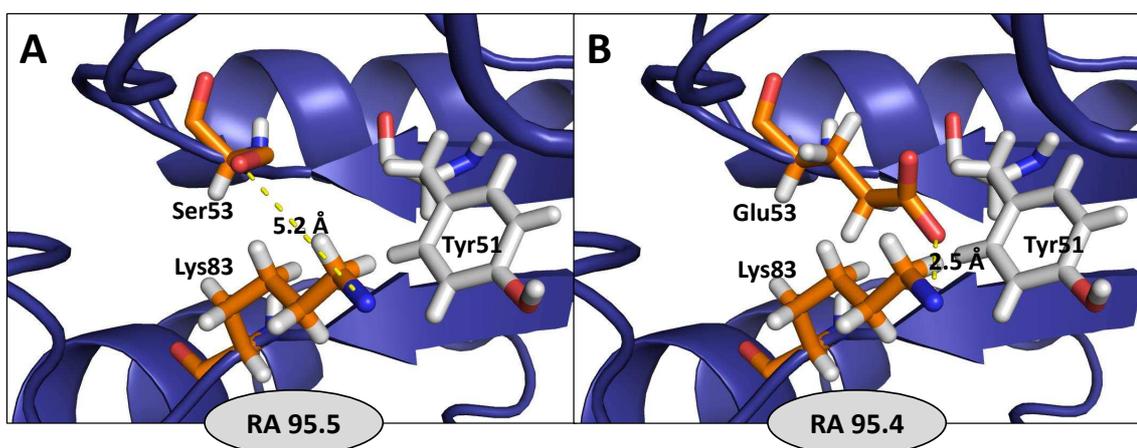


Abbildung 4.4: Vergleich der aktiven Zentren von A) RA 95.5 und B) RA 95.4. Durch den Aminosäureaustausch S53E von RA 95.5 zu RA 95.4 kommt es zu einer veränderten sterischen und elektronischen Konfiguration, durch welche die produktive Bindung mit dem Zielsubstrat 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure verhindert werden kann. Die Kristallstruktur basiert auf RA 95.5 (PDB-Nr. 4A2S).¹⁶⁰

werden, ob die Erhöhung der Aldolase Aktivität auf eine stabilere Expression oder einer Beeinflussung des chemischen Gleichgewichts basiert. Die Änderung der Expressionsparameter führte zwar einerseits zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität, allerdings auch zu einer Verminderung der Enzymstabilität.

Eine mögliche Erklärung der Erhöhung der Gesamtaktivität könnte aber auch vor allem an der Entfernung der reaktiven Carbonylspezies aus dem Reaktionsgleichgewicht liegen. Das Design der Typ 1 Aldolase sieht eine kovalente Bindung des Lysinrests durch die Bildung einer Schiff'schen Base mit dem Substrat vor. Aufgrund der höheren Aktivität von Aldehyden gegenüber Ketonen könnten somit beide potentiellen Substrate um die Bindung im aktiven Zentrum konkurrieren. Im Falle einer Abreaktion des Aldehyds wird die Wahrscheinlichkeit der Bindungsausbildung mit der Ketonspezies ungleich höher.

Obwohl RA 110.4 für die Durchführung der Retro-Aldolreaktion gewählt wurde, könnte in weiterführenden Arbeiten allerdings durchaus wieder auf RA 95.5 bzw. eine verbesserte Variante zurückgegriffen werden. Nach drei Runden Zufallsmutagenese konnten Giger *et al.* (2013) die Aktivität der Aldolase gegenüber dem Substrat *S*-Methodol um das 60-fache steigern.¹⁶⁰

4.3.5 Die *As*-ALDH1 Reaktion

Der letzte Schritt in beiden Enzymkaskaden bei der Herstellung von Azelainsäure und Sebacinsäure ist die Oxidation einer Oxosäure zu einer Dicarbonsäure. Die Negativkontrollen der *As*-ALDH1 zeigen, dass auch endogene *E. coli* Oxidoreduktasen in der Lage sind, diese Reaktionen zu katalysieren. Die reinen *As*-ALDH1 *in vitro* Reaktionen und die dazugehörigen Negativkontrollen wurden mit einem Überschuss an NAD⁺-Reduktionsäquivalenten supplementiert. Im Gegensatz zur oxidativen Nebenreaktion bei der Retro-Aldolreaktion, welche durch endogene Oxidoreduktasen katalysiert wird, kann bei *As*-ALDH1 Reaktionen deshalb ausschließlich die Oxidation und keine Reduktion beobachtet werden. Interessanterweise können auch bei der *in vivo* Herstellung von Azelainsäure mittels *E. coli* nur Oxidationsprodukte und keine Reduktionsprodukte beobachtet werden, da andere, auf Hefe basierte Arbeiten bei der gleichen Kaskade ausschließlich eine Reduktion beobachten.²⁷⁸ Die Arbeiten an *As*-ALDH1 zeigen, dass das Enzym eine sehr gute Ergänzung für die jeweiligen Multienzymkaskaden darstellt, da die Reaktionsprodukte um ein Vielfaches schneller umgesetzt und somit aus dem Reaktionsgleichgewicht der vorausgegangenen Reaktion gezogen werden können. Die *in vivo* Reaktionen zeigen allerdings, dass eine Beeinflussung des Gleichgewichts nicht der

einzig entscheidende Faktor ist, da vor allem auf eine ausreichende Cofaktorregenerierung geachtet werden muss. Hierfür könnte möglicherweise auf die Verwendung von Cosubstraten wie beispielsweise Aceton zurückgegriffen werden.²⁷⁹

4.3.6 Bewertung der vierstufigen *in vivo* Kaskade

Neben etablierten Enzymquellen, wie öffentlichen Datenbanken und der Biodiversität, werden spezialisierte Biotechnologiefirmen wie c-LEcta und Evocatal als moderne Quellen für Enzyme angesehen. Gleichzeitig erlauben neue Techniken eine gezielte Veränderung oder sogar ein komplettes *de novo* Design von Enzymen. Der vorgestellte Reaktionsweg vereint zwei moderne Enzymquellen in einer Multienzymkaskade und erlaubt somit eine Bewertung beider Technologien in einem anwendungsbezogenen Beispiel.

Die Machbarkeitsstudie konnte erfolgreich durchgeführt werden. Abbildung 4.5 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden angesprochenen Durchführungsmöglichkeiten der vierstufigen Enzymkaskade. Bei der separaten Durchführung aller vier Einzelreaktionen konnte nach 51 h eine Gesamtausbeute von 2 % erzielt werden. Durch die simultane

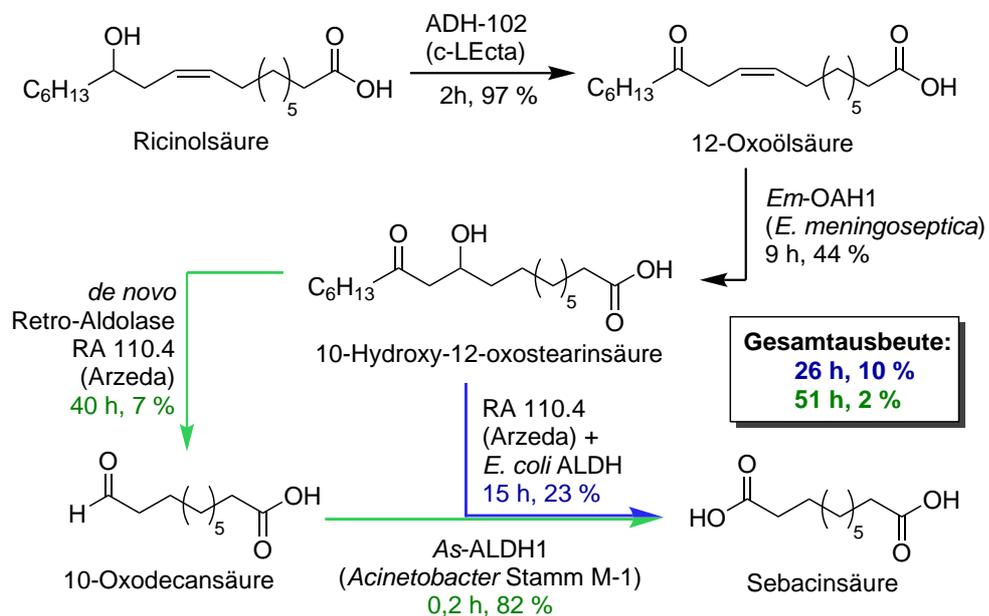


Abbildung 4.5: Zusammenfassung der Multienzymkaskade für die Herstellung von Sebacinsäure. Die vierstufige Reaktion kann je nach Expressionsbedingung der Retro-Aldolase über zwei unterschiedliche Reaktionswege durchgeführt werden. Während sich die ersten beiden Schritte nicht unterscheiden (schwarz), kann die Oxidation des Aldehyds entweder direkt mit der endogenen *E. coli* ALDH (blau) oder sukzessiv mit As-ALDH1 (grün) durchgeführt werden.

Durchführung der letzten beiden Reaktionsschritte in einem Ansatz konnte die Gesamtausbeute auf 10 % erhöht und gleichzeitig die Reaktionszeit auf 26 h verringert werden. Grund hierfür war die Beeinflussung der Retro-Aldolreaktion.

Auch wenn die hier vorgestellte Kaskade noch lange nicht mit dem bisher industriell durchgeführten Prozess konkurrieren kann, konnte durch die Anwendung neuer Methoden eine Alternative mit vergleichbar wenig Screening-Aufwand gefunden werden. Das *de novo* Enzym zeigt eine unerwartet hohe Aktivität in derselben Größenordnung der promiskuitiven Oleat-Hydratase Reaktion. Auch wenn beide Reaktionen momentan die Engpässe in der Kaskade darstellen, stehen einige Methoden für die biokatalytische Optimierung zur Verfügung. Eine endgültige Bewertung der Multienzymkaskade kann somit nicht im Reagenzglasmaßstab, sondern erst nach erfolgreicher Hochskalierung erfolgen, da sich dort erst die wahren Stärken und Schwächen der verschiedenen Prozesse offenbaren.

5

Resümee und Ausblick

Für die biokatalytische *in vitro* Herstellung von Azelainsäure und Sebacinsäure konnte in beiden Fällen eine erfolgreiche Machbarkeitsstudie durchgeführt werden. Die dreistufige Multienzymkaskade für die Herstellung von Azelainsäure wurde darüber hinaus erfolgreich in ein Ganzzell *in vivo* System übertragen. Während der Durchführung der experimentellen Arbeiten und der Auswertung der daraus gewonnenen Resultate konnten einige interessante Punkte für die weitere Optimierung der Systeme gefunden und auch neue, über das Thema hinausgehende Fragestellungen identifiziert werden.

Bei der *in vitro* Herstellung von Azelainsäure konnte die Expression der pflanzlichen *S*-selektiven Lipoxygenase *St*-LOX1 als kritischer Faktor identifiziert werden. Obgleich die mikrobielle Lipoxygenase *R*-selektive *As*-9LOX eine deutlich bessere Expression zeigte, wurde aufgrund der *S*-Selektivität der 9/13-Hydroperoxid-Lyasen nur mit der pflanzlichen Lipoxygenase gearbeitet. Durch Methoden wie der gerichteten Evolution könnte eine Inversion der Enantioselektivität bei einem der beiden Enzyme bewirkt werden.²⁸⁰ Da bei den Lipoxygenasen neben der Enantio- auch die Regioselektivität eine große Rolle spielt, würde sich für dieses Vorhaben die Mutagenese der Hydroperoxid-Lyase anbieten. Die erfolgreiche Inversion der Enantioselektivität konnte bereits an mehreren Beispielen gezeigt werden.^{281,282} Mit dem vorgestellten Indamin-Farbstoffassay (2.4.14, S. 66) würde bereits ein einfaches mikrotiterplattenbasiertes Screening-System zu Verfügung stehen. Durch die erfolgreiche Durchführung könnte durch die bessere Expression eine Erhöhung der Gesamtaktivität erzielt werden, welche auch für die weitere Optimierung des *in vivo* Systems von großem Nutzen wäre.

Für das *in vivo* System zur Herstellung von Azelainsäure ergeben sich auch weitere Fragestellungen, die für eine weiterführende Optimierung des Systems unerlässlich sind. Da gezeigt werden konnte, dass das Aktivitätsverhältnis von Lipoxygenase zu

Hydroperoxid-Lyase eine entscheidende Rolle spielt, muss dieses z. B. mittels mRNA-Analyse genau bestimmt werden.^{283,284} Dies würde sich aber erst nach der genomischen Integration beider Gene anbieten.^{285,286} Darauf aufbauend könnte mit einer Promotorbibliothek für beide Gene das optimale Aktivitätsverhältnis zwischen Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase ermittelt werden.²⁸⁷ Durch die Coexpression der *As*-ALDH1 Aldehyd-Dehydrogenase könnte zudem das Gleichgewicht schneller auf die Produktseite verschoben werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass nach einer gewissen Konzentration nur noch 9-Oxononansäure und keine Azelainsäure mehr gebildet wird, muss auf ein Cofaktorregenerierungssystem zurückgegriffen werden. Hierfür könnte einerseits ein Cosubstrat wie beispielsweise Aceton eingesetzt werden oder ein Isomerase/Enoat-Reduktase-System, welches das Nebenprodukt 3Z-Nonenal unter der Bildung von NAD⁺ zu 1-Nonanol umsetzt, entwickelt werden.^{288–290} Darüber hinaus könnte das System mit *in silico* systembiotechnologischen Methoden untersucht werden und somit der Kohlenstofffluss und das Metabolitprofil analysiert werden, deren Optimierung zu einer weiteren Verbesserung der Umsetzung führen würde.^{291,292} Bei der anschließenden Hochskalierung würden sich weitere Optimierungsmöglichkeiten ergeben, da zusätzlich mit maßgeschneiderten Medien und verschiedenen Fermentationsparametern gearbeitet werden kann.^{293,294}

Die Arbeiten mit dem *in vivo* System machten darüber hinaus deutlich, wie wichtig ein funktionierendes Importsystem für die Umsetzung der Fettsäuresubstrate ist. Der Transport in die Zelle stellt definitiv einen limitierenden Faktor dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die zusätzliche Expression des Membranimporterproteins AlkL zu keinerlei Verbesserung des Fettsäureimports führt.¹⁶⁹ Eine mögliche Vorgehensweise wäre eine Modifizierung des FadL-Importersystems durch Entkopplung von FadL aus dem Fad-Regulon und gleichzeitiger Coexpression einer FadL-Variante mit verändertem Signalpeptid für die Integration in die innere Membran. Ziel dieser FadL Doppelexpression wäre die direkte Einschleusung der Fettsäuren in das Cytosol ohne den Umweg über weitere Proteine der β -Oxidation oder den langsamen Import durch die cytosolische Membran. Die Verbesserung des Fettsäureimports wäre auch für die Weiterentwicklung der Multienzymkaskade für die Herstellung von Sebacinsäure von Interesse, da auch in diesem Fall das *in vitro* System in ein Ganzellsystem übertragen werden kann. Anfallende Reaktionsintermediate könnten durch die Folgereaktion direkt aus dem Gleichgewicht gezogen werden und anfallende reaktive Zwischenprodukte wie 10-Oxodecansäure würden direkt umgesetzt. Da beide Dehydrogenasen ADH-102 und *As*-ALDH1 bereits eine sehr gute Aktivität zeigen, könnten diese direkt genomisch integriert werden. Sowohl für die Oleat-Hydratase als auch für die *de novo* Aldolase sollte vor der *in vivo* Verwendung ei-

ne Optimierung hin zu höheren Substratumsätzen durchgeführt werden. Deshalb würde sich für die Integration und das Screening der beiden Enzyme ein Dualexpressionssystem, basierend auf zwei Vektoren, empfehlen. Eine Möglichkeit hier wäre beispielsweise die Verwendung des pBAD-Systems von Guzman und Mitarbeitern.²¹⁹

Da in dem Arbeitskreis von Prof. Donald Hilvert bereits seit einiger Zeit mit ebendiesen *de novo* Aldolasen gearbeitet wird, wäre für diesen Schritt eine Kooperation am sinnvollsten.¹⁶⁰ Experimentelle Arbeiten sollten sich vor allem auf die sehr interessante Oleat-Hydratase fokussieren. Einerseits, um die Hydratisierung von 12-Oxoölsäure zu verbessern, und andererseits aber auch, um das Substratspektrum besonders hin zu kleineren Molekülen zu erweitern.¹²⁹

Sowohl bei der Herstellung von Azelainsäure als auch bei der Herstellung von Sebacinsäure wurde das Hauptaugenmerk auf die Herstellung der Hauptprodukte gelegt. Bei beiden Reaktionswegen fallen darüber hinaus noch weitere interessante Nebenprodukte an. Das bei der Herstellung von Azelainsäure anfallende 3Z-Nonenal kann entweder direkt oder in reduzierter Form in der Aroma- und Geschmacksstoffindustrie eingesetzt oder in einer weiteren Reaktionskaskade in ein weiteres Äquivalent Azelainsäure überführt werden. Das bei der Herstellung von Sebacinsäure entstehende 2-Octanon findet in der Parfümerie oder in Nitrocellulose-Lacken Verwendung, könnte aber auch selektiv zu 2-Octanol als optisch aktiven Pharmabaustein reduziert werden.³⁴

Im weiteren Verlauf von Arbeiten an *in vivo* Systemen könnten die Zellen mit weiteren Enzymen des Fettsäurestoffwechsels ausgestattet werden, um einerseits unabhängig von den eingesetzten Substraten zu werden und andererseits, um die maximal erreichbaren Ausbeuten zu erhöhen. Die wichtigsten hierbei zu erwähnenden Enzymklassen sind die pflanzlichen Desaturasen, Hydratasen und Hydroxylasen.^{295–298}

Die in dieser Arbeit durchgeführten Machbarkeitsstudien der entwickelten Multienzymkaskaden repräsentieren nicht nur eine vielversprechende Möglichkeit, um mittelkettige Dicarbonsäure herzustellen, mit ihnen konnte der Grundstein für einen alternativen biotechnologischen Zugang gelegt werden. Probleme und Verbesserungsmöglichkeiten konnten gleichermaßen gefunden werden. Hiermit werden weitere Forschungen angestoßen, die mit zukünftigen Forschungsvorhaben letztlich zu der Entwicklung eines kompetitiven Prozesses für die biotechnologische Herstellung von mittelkettigen Dicarbonsäuren beitragen.



Appendix

Im Anhang finden sich neben Aufzeichnungen bezüglich der gentechnischen Arbeiten weitere experimentelle Daten und Informationen.

A.1 Gensequenzen der verwendeten Enzyme

Os-LOX1 2601 bp 866 AS 97, 7 kDa

```

1  ATGGGCCATATGCTGGGTGGTCTGAAAGATAAACTGACCGGTAAAAACGG  50
51  CAACAAAATCAAAGGTCTGGCAGTTCTGATGAGCCGTAAACTGCTGGACC  100
101 CTCGTGATTTTACCGCAAGCCTGCTGGATAATGTTTCATGAAGTTTTTGGC  150
151 AACAGCATTACCTGTCAGCTGGTTAGCGCAACCGTTGCAGATCAGAATAA  200
201 TGAAGGTCGTGGTATTGTTGGTAGCGAAGCAAATCTGGAACAGGGTCTGA  250
251 CCGATCTGCCGAGCGTTAGCCAGGGTGAAAGCAAACCTGACCGTTCGTTTT  300
301 AATTGGGAGATGGATAAACATGGTGTTCGGGTGCCATTATCATCAAAAA  350
351 TCATCATAGCACCAAATTCTTTCTGAAAACCATCACCTGCATGATGTTC  400
401 CAGGTTGTGATAACCATTGTTTTTGTGCAAACAGCTGGATTTATCCGGTG  450
451 GGCAAATATCATTACAATCGCATCTTTTTTCGCCAACATTAGCTATCCGCC  500
501 TAGCCAGATGCCGGAAGCACTGCGTCCGTATCGTGAAGATGAACTGCGTT  550
551 ATCTGCGTGGTGAAGATCGTCAGGGTCCGTATCAAGAACATGATCGTATT  600
601 TATCGCTATGACGTGTATAATGATCTGGGTGAACCTGATCGTGATAATCC  650
651 GCGTCCGGTTCTGGGTGGTAGCCAGAAACATCCGTATCCGCGTCGTGGTC  700
701 GTACCGGTCGTATTCCGACCAAAAAAGATCCGAATAGCGAAAGCCGTCTG  750
751 AGTCTGCTGGAACAAATTTATGTTCCGAGTGATGAACGTTTTTGCCCATCT  800
801 GAAAATGAGCGATTTTGCCGGTTATAGCATTAAAGCAATTGTGCAGGGTA  850

```

851 TTCTGCCTGCAATTCGTACCTATGTTGATCTGACACCGGGTGAATTTGAT 900
901 AGCTTTGAAGATATCCTGAAACTGTATCGTGGTGGCCTGAAACTGCCGAG 950
951 CATTCCGGCACTGGAAGAAGCTGCGTAAAAGCTTTCCGGTTCAGCTGATTA 1000
1001 AAGATCTGCTGCCGGTTGGTGGTAGCTATCTGCTGAAATTTCCGAAACCG 1050
1051 GATATTATCAAAGAAAATGAAGTTGCATGGCGCACCGATGAAGAGTTTGC 1100
1101 ACGTGAAATTCTGGCAGGTCTGAATCCGATGGTTATTCGTCGTCTGACCG 1150
1151 AATTTCCGCCTAAAAGCACCCCTGGACCCGAGCAAATATGGTGATCAGACC 1200
1201 AGCACCATTACACCGGCACATATTGAAAAAATCTGGAAGGTCTGAGCGT 1250
1251 TCAGCAGGCACTGGATAGCAATCGTCTGTATATTCTGGATCACCACGATC 1300
1301 ATTTTATGCCGTTTCTGATCGATATCAATAGCCTGGATGGCATTTTTACC 1350
1351 TATGCAACCCGTACCCTGCTGTTTCTGCGTGATGATGATACCCTGAAACC 1400
1401 GCTGGCAATTGAACTGAGCCTGCCGCATATTGAAGGTAATCTGACCAGCG 1450
1451 CAAAAGCAAAGTTTCATACACCGGCAAGCAGCGGTATTGAAAGCTGGGTT 1500
1501 TGGCAGCTGGCAAAAGCCTATGTTGCAGTTAATGATAGCGGTTGGCGTCA 1550
1551 GCTGATTAGCCATTGGCTGAATACCCATGCAGTTATGAAACCGTTTGTGA 1600
1601 TTGCAACCAATCGTCAGCTGAGCGTTACCCATCCGGTTTATAAACTGCTG 1650
1651 CAGCCGCATTATCGTGATAACCATGACCATTAATGCACTGGCACGTCAGAC 1700
1701 CCTGATTAATGGTGGTGGTATTTTTGAACAGACCGTTTTTCCGGGTAAAC 1750
1751 ATGCACTGGCAATGAGCAGCGCAGTGTATAAAAACTGGAATTTTGCAGAA 1800
1801 CAAGGCCTGCCGGATGATCTGATTAACGTGGTATTGCAATCAAAGATCC 1850
1851 GAGCAGCCCGAGCAAAGTTAAACTGCTGATCAAAGATTATCCGTATGCAA 1900
1901 CCGATGGTCTGGCAATTTGGCAGGCAATTGAACAGTGGGTTACCGAATAT 1950
1951 TGCGCAATTTACTATCCGAATGATGGTGTCTGCAGGGTGATGTTGCACT 2000
2001 GCAGGCATGGTGGAAAGAAGTTCGCGAAGTTGGTCATGGTGATCTGAAAG 2050
2051 ATGCAGATTGGTGGCCGAAAATGCAGAGCCTGCCGGAAGTACCAGCAAGCA 2100
2101 TGTACCACCATTATTTGGATTGCAAGCGCACTGCATGCAGCAGTTAATTT 2150
2151 TGGTCAGTATCCGTATGCCGGTTATCTGCCGAATCGTCCGACCATTAGCC 2200
2201 GTCGTCCGATGCCGGAACCGGGTAGCAAAGAATATAACCGAACTGGATGAA 2250
2251 AATCCGGAAAAATTCCTTTATTCGCACCATCACCAGCCAGTTTCAGACCAT 2300
2301 TCTGGGTGTTAGCCTGATTGAAATTCTGAGCAAACATAGCGCAGATGAAA 2350
2351 TTTATCTGGGTCAGCGTGATACACCGGAATGGACCAGCGATCCGAAAGCA 2400
2401 CTGGAAGCATTTAACGTTTTAGCCGTCAGCTGGTTGAAATTGAAAGCAA 2450
2451 AGTGCTGAATATGAACAAAGATCCGCTGCTGAAAAATCGTGTGGTCCGG 2500
2501 CAAATTTTCCGTATACCCTGATGTTTCCGAATACCAGCGATAATAAAGGT 2550
2551 GCAGCCGAAGGTATTACCGCACGTGGTATTCCGAATAGCATTAGCATCTA 2600
2601 A 2602

Cs-LOX1 627 bp 71, 2 kDa (Leserasterverschiebung)

| | | |
|------|---|------|
| 1 | ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATATGTTTGGAAATTGGGAAGAA | 50 |
| 51 | CATCATTGAAGGGGCCTTGAATACAACCTGGAGATCTTGCAGGTTCTGTTA | 100 |
| 101 | TCAATGCTGGTGGTAACATTTTAGATAGAGTTTCCAGTCTTGGAGGAAAC | 150 |
| 151 | AAAATCAAAGGGAAAGTGATTCTTATGAGAAGCAATGTTTTGGATTTTAC | 200 |
| 201 | TGAATTTTCATTCCAATCTTCTTGATAACTTCACTGAGCTCTTGGGTGGTG | 250 |
| 251 | GTGTTTCTTCCAACTCATTAGTGCCACTCATACTTCAAATGACTCAAGA | 300 |
| 301 | GGGAAAGTTGGGAACAAGGCATATTTGGAGAGGTGGCTAACTTCAATCCC | 350 |
| 351 | ACCACTGTTTGGCTGGAGAATCAGTGTTCCAAATCAACTTTCAATGGGATG | 400 |
| 401 | AAAATTTTGGATTTCCAGGAGCTTTCTTCATAAAAAATGGACATACAAGT | 450 |
| 451 | GAATTCCTTCTCAAATCTCTCACTCTTGATGATGTTCTGGCTATGGCAG | 500 |
| 501 | AGTCCATTTTGGATTGCAATTCTTGGGTTTACCCTTCTGGAAGATACAAGA | 550 |
| 551 | AAGATCGCATTTTCTTTGCCAATCATGTTTATCTTCCAAGTCAAACACCA | 600 |
| 601 | AACCCTCTTCGTAAGTATAGAGAGGAAGAATTGTGGAATTTGAGAGGAGA | 650 |
| 651 | TGGAACAGGAGAAAAGAAAGGAATGGGATAGAATTTATGACTATGATGTTT | 700 |
| 701 | ATAATGACATTGCTGACCCTGATGTTGGTGATCATCGTCCTATTCTCGGT | 750 |
| 751 | GGGACGACCGAATATCCTTACCCTCGTAGGGGAAGAACAGGACGACCACG | 800 |
| 801 | ATCAAGAAGAGACCACAATTATGAGAGCAGATTGTCACCAATAATGAGCT | 850 |
| 851 | TAGACATCTATGTACCAAAAGATGAAAACCTTTGGGCATTTGAAGATGTCA | 900 |
| 901 | GATTTCTTGGTTATACATTTAAAGCACTTTTCGATATCAATCAAACCAGG | 950 |
| 951 | ACTTCAATCCATATTTGATGTAACCTCAAATGAATTTGACAATTTTAAAG | 1000 |
| 1001 | AAGTTGATAATCTCTTTGAGAGAGGTTTTCCATTCCATTTAATGCTTTT | 1050 |
| 1051 | AAGACCCTCACTGAGGACCTCACTCCACCTTTGTTCAAAGCACTCGTGAG | 1100 |
| 1101 | GAATGATGGTGAAAAATTCCTCAAATTTCTACTCCCGAAGTTGTCAAAG | 1150 |
| 1151 | ATAATAAAATAGGATGGAGCACTGATGAAGAATTTGCAAGAGAAATGTTA | 1200 |
| 1201 | GCAGGACCCAATCCTCTATTGATTCGTCTGTTGAAGCTTTTCCACCAAC | 1250 |
| 1251 | AAGTAAGCTTGACCCAATGTTTATGGGAATCAAACAGTACCATCACTG | 1300 |
| 1301 | AAGAACACATAAAGCATGGTTTAGATGGTCTTACGGTTGATGAGGCAATG | 1350 |
| 1351 | AAGCAAAACAGGCTCTACATAGTGGATTTCCATGATGCATTAATGCCCTA | 1400 |
| 1401 | TCTTACAAGGATGAATGCAACATCAACAAAAACATATGCCACAAGAACAT | 1450 |
| 1451 | TGCTTCTTTTGAAGATGATGGGACTTTGAAGCCATTGGTTATTGAGTTA | 1500 |
| 1501 | AGCTTGCCACATCCTCAAGGAGATCAACTTGGTGCCATTAGCAAACATA | 1550 |
| 1551 | CTTCCAGCTGAAAATGGAGTTCAAAAATCCATTTGGCAATTGGCTAAAG | 1600 |
| 1601 | CTTATGTAACGTGTTAATGATGTTGGCTACCATCAACTTATTAGTCATTGG | 1650 |
| 1651 | TTGCATACTCATGCTGTACTTGAGCCATTTGTGATTGCAACACATAGACA | 1700 |
| 1701 | ATTGAGCGTGCTTCATCCAATCCATAAGTTGCTTGTTCCTCATTACAAAG | 1750 |
| 1751 | ACACTATGTTTATAAATGCATCTGCAAGACAAGTTTTGATCAATGCCAAT | 1800 |

1801 GGTCTTATCGAAACAACCGTTTACCCGAGCAAATATTCAATGGAGTTGGT 1850
 1851 CATCTATCTTGTACAAGGATTGGACCTTCCCTGATCAAGCATTACCTAAT 1900
 1901 AATCTCATGAAGAGAGGACTAGCTGTGGAGGACTCAAGTGCCCCCATGG 1950
 1951 ACTTAGATTGCTAATAAATGATTATCCATTTGCTGTTGATGGTCTTGACA 2000
 2001 TTTGGTCAGCCATTA AACATGGGTACAGGATTATTGCTGTCTCTACTAC 2050
 2051 AAAGATGACAATGCAGTACAAAATGACTTTGAACTCCAATCTTGGTGGAA 2100
 2101 TGAGCTAAGAGAGAAAGGCCACGCTGACAAGAAACATGAACCATGGTGGC 2150
 2151 CAAAAATGCAAACTTTAAGTGAATTAATCGAATCCTGCACTACAATTATA 2200
 2201 TGGATTGCTTCAGCTCTTCATGCCGCAGTTAACTTTGGACAATATCCCTA 2250
 2251 CGGAGGCTATATTCTCAATCGACCAACTACAAGTCGTAGGTTTCATGCCTG 2300
 2301 AAGTTGGCACGGCTGAGTACAAAGA ACTGGAATCGAATCCCGAAAAAGCT 2350
 2351 TTCTTGAGAACAATATGTT CAGAATTACAAGCACTTGTTAGTATTTCAAT 2400
 2401 TATTGAAATCTTGTCAAAGCATGCTTCTGATGAAGTTTATCTTGGACAAA 2450
 2451 GAGCTTCAATTGATTGGACTTCAGATAAAAATTGCATTGGAAGCATTGAG 2500
 2501 AAATTTGGGAAAAATTTATTTGAAGTTGAGAATAGGATCATGGAAAGGAA 2550
 2551 TAAAGAGGTGAATTTGAAGAATAGATCTGGACCTGTTAATTTGCCTTATA 2600
 2601 CTCTACTTGTTCCATCAAGTAACGAAGGACTCACTGGAAGAGGAATTCCT 2650
 2651 AATAGTATTTCTATCTAA 2668

St-LOX1 2511 bp 836 AS 94, 5 kDa

1 ATGATGAAGAAAAATGCTCTAGATTTTACTGATCTTGCTGGTTCTTTGAC 50
 51 TGATAAAATCTTTGAGGCCCTTGCCAAAAGGTTTCTTTTCAATTAATTA 100
 101 GTTCTGTTCAAAGTGATCCTGCAAATGGTTTACAAGGGAAACACAGCAAT 150
 151 CCAGCTTATTTGGAGA ACTTTCTCTTTACTCTAACACCATTAGCAGCAGG 200
 201 TGAAACAGCCTTTGGTGT CACATTTGATTGGAATGAGGAGTTTGGAGTTC 250
 251 CAGGTGCATTTATCATCAAAAATACGCATATCAATGAGTTCTTTCTCAAG 300
 301 TCACTCACACTTGAAGATGTGCCTAATCATGGCAAGGTCCATTTTGT TTG 350
 351 CAATTCTTGGGTTTATCCATCTTTTAGATAACAAGTCAGATCGAATTTTCT 400
 401 TTGCAAATCAGCCATATCTCCAAGTGAAACACCAGAGCTTTTGC GCAA 450
 451 TACAGAGAAAATGAATTA CTAACATTAAGAGGAGATGGA ACTGGAAAGCG 500
 501 CGAGGCGTGGGATAGGATTTACGACTATGATGTCTACAATGACTTAGGTA 550
 551 ATCCTGATCAAGGTGAACAAAATGTTAGAACTACCTTAGGAGGTTCTGCT 600
 601 GACTACCCGTATCCTCGGAGAGGAAGAACTGGTAGACCACCAACACGAAC 650
 651 AGATCCTAAAAGTGAAAGCAGGATTCCACTTATTCTGAGCTTAGACATCT 700
 701 ATGTACCGAGAGATGAGCGTTTTGGTCACTTGAAGATGTCAGACTTCCTA 750
 751 ACATATGCTTTGAAATCCATTGTTCAATTCATCCTCCCTGAATTACATGC 800
 801 CCTGTTTGATGGTACCCCTAACGAGTTCGATAGTTTTGAGGATGTACTTA 850

851 GACTATATGAAGGAGGGATCAAACCTCCTCAAGGACCTTTATTTAAGGCT 900
901 CTCACTGCTGCTATACCTCTGGAGATGATGAAAGAACTCCTTCGAACAGA 950
951 CGGTGAAGGAATATTGAGATTTCCAACCTCCTCTAGTGATTAAAGATAGTA 1000
1001 AAACCGCATGGAGGACTGATGAAGAATTCGCAAGAGAAATGCTAGCTGGA 1050
1051 GTTAATCCTATCATAATTAGTAGACTTCAAGAATTTCTCCAAAAGCAA 1100
1101 GCTAGATCCCGAAGCATATGGAAATCAAACAGTACAATTAAGTGCAGAAC 1150
1151 ACATAGAGGATAAGCTGGATGGACTAACGGTTGATGAGGCGATGAACAAT 1200
1201 AATAAACTTTTCATTTTGAACCATCATGATGTTCTTATACCATATTTGAG 1250
1251 GAGGATAAACTACAACAACGAAAACATATGCCTCGAGAACTTTGCTCT 1300
1301 TCTTGCAAGATAATGGATCTTTGAAGCCACTAGCAATTGAATTGAGTTG 1350
1351 CCACATCCAGATGGAGATCAATTTGGTGTATTAGTAAAGTGTATACTCC 1400
1401 AAGTGATCAAGGTGTTGAGAGCTCTATCTGGCAATTGGCCAAAGCTTATG 1450
1451 TTGCGGTGAATGACTCTGGTGTTCATCAACTAATTAGTCATTGGTTGAAT 1500
1501 ACACATGCGGTGATTGAGCCATTTGTGATTGCAACAAACAGGCAACTAAG 1550
1551 TGTGCTTCACCCTATTCATAAGCTTCTATATCCTCATTTCCGGGACACAA 1600
1601 TGAATATTAATGCTATGGCAAGACAGATCCTAATCAATGCTGGTGGGGTT 1650
1651 CTTGAGAGTACAGTTTTTCCATCCAAATTTGCCATGGAAATGTCAGCTGT 1700
1701 CGTTTACAAAGATTGGGTTTTCCCTGATCAAGCCCTTCCGGCTGATCTTG 1750
1751 TTAAAAGGGGAGTAGCAGTTGAGGACTCGAGTTCTCCTCATGGTGTTCGT 1800
1801 TTACTGATAGAGGACTATCCATACGCTGTTGATGGCTTAGAAAATATGGTC 1850
1851 TGCAATCAAAGTTGGGTGACAGACTACTGCAGCTTCTACTATGGATCGG 1900
1901 ACGAAGAGATTCTGAAAGACAATGAACTCCAAGCCTGGTGGAAAGGAACTC 1950
1951 CGAGAAGTGGGACATGGTGACAAGAAAAATGAACCATGGTGGCCTGAAAT 2000
2001 GGAAACACCACAAGAGCTAATCGATTCATGTACCACCATCATATGGATAG 2050
2051 CTTCTGCACTTCATGCAGCAGTTAATTTTGGGCAATATCCTTATGCAGGT 2100
2101 TACCTCCCAAATCGCCCCACAGTAAGTCGAAGATTCATGCCTGAACCAGG 2150
2151 AACTCCTGAATATGAAGAGCTAAAGAAAAACCCCGATAAGGCGTTCTTGA 2200
2201 AAACAATCACAGCTCAATTACAAACATTGCTTGGTGTTCCTCATAGAG 2250
2251 ATATTGTCAAGGCATACTACAGATGAGATTTACCTCGGACAACGAGAGTC 2300
2301 TCCTGAATGGACAAAGGACAAAGAACCACTTGCTGCTTTTCGACAAATTTG 2350
2351 GAAAGAAGTTGACAGACATTGAAAAACAGATTATACAGAGGAATGGTGAC 2400
2401 AACATATTGACAAACAGATCAGGCCCGTTAACGCTCCATATACGTTGCT 2450
2451 TTTCCCAACAAGTGAAGGTGACTTACAGGCAAAGGAATTCCCAACAGTG 2500
2501 TGTCAATATAG 2511

As-9LOX 1356 bp 451 AS 51, 5 kDa

| | | |
|------|---|------|
| 1 | ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCG | 50 |
| 51 | CGGCAGCCATATGAAAGATGATCTGCCTGGTAAACCGGTTTATTTTCCGC | 100 |
| 101 | TGCCGGTTACCGAAATTCCGAGCAAACGTTTTCTGTTTCTGCTGGAAAA | 150 |
| 151 | TACAACTTCCTGACCGATAATTCCTATCCGAGTGATGGTGAACACGATAA | 200 |
| 201 | AATTGAAGCACTGGTTAGCGCAATGCCGACCACCGCACTGGATCTGGCAG | 250 |
| 251 | TTGGCACCACCGATCCGACCGATATTCGGATAGCTATTTTCTGGAACGT | 300 |
| 301 | CGTCTGAATGGTTATAATCCGGGTGCAATTCGTGAAAGCAGCGGTCAAGA | 350 |
| 351 | AGGTTGGACCCACGAACTGACCCATAATCTGGCAAAATATGACATTAAC | 400 |
| 401 | CGGGTCTGCACTTTCCGGATTTTGTTCAGTGTCTGTTTGTGGATAAA | 450 |
| 451 | CAGAATGGTGTAAACTGCATAGCATTAAAATCGATGACCATGAAATTAC | 500 |
| 501 | CCCGTGTCAAGAACAGTGGCAGTATGCAAAACGTACCTATCTGCAGGCAG | 550 |
| 551 | AATTTCTGAGCCAAGAAGTAACTGAACTGCATCTGGCACGTTGCCATTTCAAC | 600 |
| 601 | ATTGAACAGTATGTGATGGCCATTAACGTCGTCTGGCACCGACCCATCC | 650 |
| 651 | GGTTCGTGCCTTTATTAACCCGCATCTGGAAGGTCTGATTTTTATCAATA | 700 |
| 701 | GCAGCGCAGTGCCGAAAATTATCGGTAGCACCGGTTTTATTCCGATTGCA | 750 |
| 751 | AGCATGCTGACCCAGGGTAGCATTGTTGATGTGATGAAAAACGAACTGAG | 800 |
| 801 | CAAAGTGAAGTATATGTGGAATCCGATTGCAGATCTGCCTCGTGATATTC | 850 |
| 851 | CGGGTGACCTGTTTACACCGGCAGCAACCGCATATTGGGAAGTCTGAAT | 900 |
| 901 | AACTATGTTGAACAGGGTCTGCTGCAGCCGTTTGAAGATGAACTGCGTAC | 950 |
| 951 | CGAAGTTAATGCAATTCAGGTTGATGAACTGTTTGCCGAACTGAAAGAAC | 1000 |
| 1001 | GTAGCCTGTATAGCGGTGATCAGCCTCCGAAATATGATAGCAGCGAACTG | 1050 |
| 1051 | AAAAGCCTGCTGATGTATATCATCTATCACAGCAGCTTTCTGCATAGCTG | 1100 |
| 1101 | GGCAAACCTTTAAACAGTATGATGATGCCGGTAATCCGAATCATGTTAGCA | 1150 |
| 1151 | TGGGTGATTATAGCCAGTATGATCAGCAGACCCAGGATAAAAATTCGTTTT | 1200 |
| 1201 | AGCCAGCGTAGCCTGACCTGGGTTCTGAGCAGCATTTCGTTATAATAGCGT | 1250 |
| 1251 | TGCAGTTTATGGTAGCGATCTGCTGAAACAGCTGATTCGTGAAAAAGCA | 1300 |
| 1301 | GCATTCTGGAACCTGGTCTGCCGCTGGAAGATCTGATGATGAGCATTAAC | 1350 |
| 1351 | ATCTAA 1356 | |

Cs-9/13HPL 1437 bp 478 AS 53, 9 kDa

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | ATGGCTTCTTCCCTCCCCTGAACTTCTCTCAAACCCATTCCCGGTGGCTA | 50 |
| 51 | TGGCTTCCCCTTCCCTCGGTCCCATCAAAGACCGTTACGATTACTTCTATT | 100 |
| 101 | TCCAAGGTAGAGACGAATTCCTCCGTTCCCGAATTACCAAATACAACCTCC | 150 |
| 151 | ACCGTCTTCCACGCCAACATGCCACCGGGCCCTTCATCTCCTCCGATTC | 200 |
| 201 | CAGAGTCGTTGTCCTCCTCGATGCCCTCAGTTTTCCCATCCTCTTCGACA | 250 |
| 251 | CCACCAAAGTCGAGAAACGCAACATTCTCGACGGAACCTTACATGCCCTCC | 300 |

301 TTGTCCTTCACCGGCGGCATTTCGCACCTGTGCTTATTTGGACCCATCGGA 350
 351 AACAGAGCACACTGTTCTCAAACGCCTCTTTCTCTCCTTTCTCGCTTCTC 400
 401 ACCATGACAGGTTTCATCCCTCTGTTTCGAAGCTCCTTGTCTGAGATGTTT 450
 451 GTTAAGCTTGAAGATAAACTCGCCGACAAAAATAAGATCGCTGATTTCAA 500
 501 CTCGATTAGTGATGCCGTGTCGTTTGATTATGTTTTCCGTTTATTCTCCG 550
 551 ATGGAACCCCTGATTCGACATTAGCTGCTGATGGACCTGGAATGTTTCGAT 600
 601 TTATGGCTTGGGCTTCAACTTGCCCCATTGGCTTCCATTGGCCTTCCCAA 650
 651 AATTTTCTCTGTTTTTTGAAGATCTCATTATTCACACCATTCCCCTGCCTT 700
 701 TCTTCCCAGTCAAGAGTCGTTACAGGAAGCTTTATAAAGCGTTTTACTCC 750
 751 TCCTCTGGCTCATTCTAGACGAAGCAGAGAAACAGGGGATAGACAGAGA 800
 801 GAAAGCATGTACAATTTAGTGTTTCTTGCTGGATTCAACGCATACGGGG 850
 851 GAATGAAAGTCCTTTTTTCCCACTATACTGAAATGGGTCGGCACCGGTGGC 900
 901 GAGGATCTCACCGTAAACTGGCGGAGGAAGTGAGGACAACCGTGAAGGA 950
 951 AGAAGGGGGACTGACTTTCTCCGCCTTGGAGAAAATGAGTCTGCTGAAGT 1000
 1001 CGGTCGTGTACGAAGCTCTGAGGATCGAACCGCCGGTGCCGTTCCAGTAC 1050
 1051 GGGAAAGCGAAGGAGGATATCGTGATTCAGAGCCACGATTCTTGTTTTCAA 1100
 1101 GATCAAAAAGGGGAGACGATTTTTTGGTTATCAGCCGTTTGCTACTAAAG 1150
 1151 ATCCGAAGATTTTTTAAGGACTCGGAGAAGTTCGTGGGCGATAGGTTTCGTG 1200
 1201 GGAGAAGAAGGGGAGAAGCTTTTTGAAGTATGTTTACTGGTCAAATGAGCG 1250
 1251 GGAGACGGTGGAGCCGACGGCGGAGAACAAGCAGTGTCCGGGGAAGAATC 1300
 1301 TGGTGGTGATGATGGGCAGGATTATTGTGGTGGAAATCTTCCCTCCGTTAT 1350
 1351 GATACGTTCACTGTGGACGTCGCAGATTTGGCGCTGGGCCCGGCGGTGAA 1400
 1401 GTTCAAGTCCTTGACCAGAGCCACCGCTTCGGTTTTAG 1437

***Cm-9/13HPL* 1464 bp 487 AS 55, 2 kDa**

1 ATGGCTACTCCTTCTTCCCTCCTCCCCTGAACTTCCTCTCAAACCAATTCC 50
 51 CGGTGGCTATGGCTTCCCCTTCCCTCGGTCCCATCAAAGACCGTTACGATT 100
 101 ACTTCTATTTCCAAGGTAGAGACGAATTCTTCCGTTCCCGGATTACCAAAA 150
 151 TACAACCTCCACCGTCTTCCGCGCCAACATGCCACCGGGCCCCTTCATTTT 200
 201 CTCCGATTCCAGAGTCGTTGTCCTTCTCGATGCCCTCAGTTTTCTCTATCC 250
 251 TCTTCGACACAGCCAAAGTCGAGAAACGCAACATTCTCGACGGAACCTTAC 300
 301 ATGCCCTCCTTGTCTTCCACCGCAACATTTCGCACCTGTGCTTATTTGGA 350
 351 CCCATCGGAAACAGAGCACTCTGTTCTCAAACGCCTCTTCCCTCTCCTTTC 400
 401 TCGCTTCCCGCCATGACAGTTTCATCCCTCTGTTTCGAAGCTCCTTGTCT 450
 451 GAGATGTTTGTAAAGCTTGAAGATAAACTTTCCGAGAAAAAGAAGATCGC 500
 501 TGATTTCAACTCGATCAGCGATTCCATGTCGTTTGATTATGTTTTCCGTT 550
 551 TACTCTCCGATGGAACCCCTGATTCGAAATTAGCTGCTGAGGGACCTGGA 600

601 ATGTTTCGATCTGTGGCTTGTGTTTCAACTCGCCCCATTGGCTTCCATTGG 650
 651 CCTTCCCAAATTTTCTCTGTTTTTGAAGATCTCGTCATTCACACCATTTC 700
 701 CCCTGCCTTTCTTCCCAGTCAAGAGTGGTTACAGGAAGCTTTATGAAGCG 750
 751 TTTTACTCCTCTTCTGGCTCATTTCTAGACGAAGCAGAGAAACAGGGGAT 800
 801 AGACAGGGAGAAAGCATGTCACAATTTAGTGTTCGCTGGATTCAACG 850
 851 CATA CGGGGAATGAAAGTCCTTTTTCCCACTTTACTGAAATGGGTCCGGC 900
 901 ACCGCCGGCGAGGATCTCCACCGGAAACTCGCCGAGGAAGTCAGGACAAC 950
 951 CGTGAAGGAAGAAGGGGGACTGACTTTCTCCGCCTTGGAGAAAATGAGTC 1000
 1001 TGCTGAAGTCCGTCGTGTACGAAGCACTCAGGATCGAACCGCCGGTGCCG 1050
 1051 TTCCAGTACGGGAAAGCGAAGGAGGATATCGTGATTCAGAGCCACGATTTC 1100
 1101 TTCTTTCAAGATCAAAAAAGGGGAGACGATTTTTTGGTTATCAGCCGTTTG 1150
 1151 CTAATAAGATCCGAAGATTTTTAAGGATTCGGAGAAGTTCGTGGGCGAT 1200
 1201 AGGTTTCGTGGGAGAGGAAGGGGAGAAGCTTTTGAAGTATGTTTACTGGTC 1250
 1251 AAATGAGCGGGAGACAGTGGAGCCGACGGCGGAGAACAAGCAGTGTCCGG 1300
 1301 GGAAGAATCTGGTGGTGTGATAGGTAGGATTATGGTGGTGGAAATCTTC 1350
 1351 CTTTCGTTATGATACGTTCCACCGTGGAGGTTCGAGATTTGCCGCTGGGTCC 1400
 1401 GGCAGTGAAGTTCAAGTCCTTAACCAGAGCAACCGATATGGTTTCATCACC 1450
 1451 ATCACCATCACTAA 1464

As-ALDH1 1512 bp 503 AS 55, 5 kDa

1 ATGCACTATGTTGATCCGAATCAATCTGGTTCAAAAATCCATTTTAAAGA 50
 51 CCAATATGAAAACCTTTATTGGTGGACAGTGGGTTGCCCTGTAAAGGAG 100
 101 TCTACTTCGACAATATTTCTCCTGTCGATGGCAAAAGTTTTACTCGTATT 150
 151 CCACGCTCGAGTGCAGAAGATATTGAATTGGCGCTAGATGCCGCCACAA 200
 201 AGCCAAGAAAGAATGGAATAAATCGTCTCCAACCACACGATCTAATTTAT 250
 251 TACTTAAAATTGCTGACCGTATGGAAGCCAATTTGAAAATGTTGGCGGTT 300
 301 GCTGAACTTGGGATAATGGTAAACCGGTCCGTGAAACGCTAGCGGCGGA 350
 351 TATCCCTTTGGCCATAGATCATTTCCGTTATTTTGCAGGCTGTATTTCGCG 400
 401 CACAGGAAGGTGGTATTTCTGAGATAGACGAAGATACCATTGCCTATCAT 450
 451 TTTCATGAACCACTCGGCGTGGTTGGACAAATCATCCCTTGGAACTTCCC 500
 501 GATTTTGTGATGGCGGCATGGAAACTGGCACCGGCATTGGCAGCGGGCAACT 550
 551 GCGTCGTGATCAAACCTGCGGAGCAAACACCTGTTGGGATCTTATTGGTG 600
 601 GCTGAACTGATACAGGACCTATTACCTGCGGGTGTACTCAATATCGTCAA 650
 651 TGGTTACGGTGCCGAAGTTGGCCGCCCACTGGCAACCAGTCCACGTATTG 700
 701 CCAAAATTGCGTTTACCGGTTCAACCCAAGTTGGGCAATTGATCATGCAA 750
 751 TATGCCACCGAAAACATCATTCCAGTGACTTTGGAGCTCGGCGGGAAATC 800
 801 ACCAAATGTGTTCTTTGCCGATGTGATGGATCATGACGATGATTTTCTGG 850

851 ATAAAACCCCTTGAAGGTTTTGCCATGTTTTGCGCTGAATCAAGGTGAAGTC 900
 901 TGCACCTGCCCATCGCGTGCCTTGATTCAGGAAAGTATTGCTGATCAGTT 950
 951 TATGGAAAAAGCCATTGAACGGGTCAAACGCATCAAACCTGGACATCCCC 1000
 1001 TCGATACTGACACCATGGTTCGGTTCGCAAGCATCTTTAGAACAAACAAGAG 1050
 1051 AAAATCCTGCGTTGTATTGATACAGGCCGACAAGAAGGTGCTGAAGTGCT 1100
 1101 ATTGGGTGGGCATGGTTCGCAAGAGGTCGGCAATGGATACTACATCGAAC 1150
 1151 CGACCATCTTTAAAGGTCATAACAACATGCAAGTGTTTCAGGAAGAAATC 1200
 1201 TTTGGCCCTGTGCTGTTCGGTAACCACATTCAAGGACTTTGATGAAGCCAT 1250
 1251 TCAGATTGCCAATGACACCATGTATGGCTTAGGTGCTGGGGTCTGGTCAC 1300
 1301 GTTCAACCATAACCGCCTATCGTGCAGGTCGTGCCATTGAAGCGGGTCGT 1350
 1351 GTTTGGACCAATTGTTACCACATCTACCCTGCTCATGCTGCATTTGGAGG 1400
 1401 CTATAAAAAGTCAGGTGTTCGGTCGTGAAAACCATAAAAATGATGCTCGATC 1450
 1451 ATTATCAACAAACCAAAAACCTTGTTGGTGAGCTATTCAACCAAAGCCATG 1500
 1501 GGCTTTTTCTAA 1512

Em-OAH1 1962 bp 653 AS 74, 3 kDa

1 ATGGCGCGCCCCATGGGCCATATGAATCCGATTACCAGCAAATTTGATAA 50
 51 AGTGCTGAATGCCAGCAGCGAATATGGTCATGTTAATCATGAACCGGATA 100
 101 GCAGCAAAGAACAGCAGCGTAATACACCGCAGAAAAGCATGCCGTTTAGC 150
 151 GATCAGATTGGTAATTATCAGCGCAATAAAGGTATTCCGGTGCAGAGCTA 200
 201 TGATAACAGCAAAAATTTACATTATCGGCAGCGGTATTGCAGGTATGAGCG 250
 251 CAGCATACTATTTTATCCGTGATGGCCATGTTCCGGCAAAAAACATTACC 300
 301 TTTCTGGAACAGCTGCATATTGATGGTGGTAGCCTGGATGGTGCAGGTAA 350
 351 TCCGACCGATGGTTATATCATTTCGTGGTGGTTCGTGAAATGGATATGACCT 400
 401 ATGAAAATCTGTGGGACATGTTTCAGGATATTCGGGCACTGGAAATGCCT 450
 451 GCACCGTATAGCGTTCTGGATGAATATCGTCTGATCAATGATAACGACAG 500
 501 CAACTATAGCAAAGCCCGTCTGATTAATAACAAAGGCGAGATCAAAGATT 550
 551 TTAGCAAATTCGGCCTGAATAAAAATGGATCAGCTGGCAATTATTCGCCTG 600
 601 CTGCTGAAAAACAAAGAAGAACTGGACGATCTGACCATCGAAGATTATTT 650
 651 CAGCGAATCCTTCCTGAAAAGCAACTTTTGGACCTTTTGGCGTACCATGT 700
 701 TTGCCTTTGAAAATTGGCATAGCCTGCTGGAACCTGAACTGTATATGCAT 750
 751 CGTTTTCTGCATGCCATTGATGGTCTGAATGATCTGAGCAGCCTGGTTTT 800
 801 TCCGAAATACAACCAGTATGACACCTTTGTTACACCGCTGCGCAAATTT 850
 851 TGCAAGAAAAAGGCGTTAACATCCATCTGAATACCCTGGTTAAAGATCTG 900
 901 GACATTCACATTAACACCGAAGGTAAAGTGGTGGAAAGGCATTATTACCGA 950
 951 ACAGGATGGTAAAGAAGTGAAAATTCGGTTGGCAAAAACGATTATGTGA 1000
 1001 TTGTTACCACCGGTAGCATGACCGAAGATACCTTTTATGGCAATAACAAA 1050

1051 ACCGCACCGATCATTGGTATCGATAATAGCACCAGCGGTCAGAGCGCAGG 1100
 1101 TTGGAAACTGTGGAAAAATCTGGCAGCAAAAAGCGAAATTTTCGGCAAAC 1150
 1151 CGGAAAAATTCTGCTCCAACATTGAAAAAGCGCATGGGAAAGCGCAACC 1200
 1201 CTGACCTGTAAACCGAGCGCACTGATTGATAAACTGAAAGAATATAGCGT 1250
 1251 GAACGATCCGTATAGTGGTAAAACCGTTACCGGTGGCATTATCACCATTA 1300
 1301 CCGATAGCAATTGGCTGATGAGCTTTACCTGTAATCGTCAGCCGCATTTT 1350
 1351 CCGGAACAGCCGGATGATGTTCTGGTTCTGTGGGTTTATGCACTGTTTAT 1400
 1401 GGATAAAGAGGGCAATTATATCAAAAAACCATGCTGGAATGCACCGGTG 1450
 1451 ATGAAATTCTGGCAGAACTGTGTTATCATCTGGGTATTGAAGATCAACTG 1500
 1501 GAAAACGTGCAGAAAAATACCATTGTTTCGTACCGCATTTCATGCCGTATAT 1550
 1551 TACCTCAATGTTTATGCCTCGTGCCAAAGGTGATCGTCCGCGTGTTGTGC 1600
 1601 CGGAAGGTTGTAAAAACCTGGGTCTGGTTGGTCAGTTTGTGGAAACCAAT 1650
 1651 AATGATGTGGTGTTCACAATGGAAAGCAGCGTGCGTACCGCACGTATTGC 1700
 1701 CGTGTATAAACTGCTGAACCTGAACAAACAGGTGCCGGATATTAATCCGC 1750
 1751 TGCAGTATGATATTCGGCATCTGCTGAAAGCAGCCAAAACCTGAATGAT 1800
 1801 GATAAACCGTTTGTGGTGAAGGTCTGCTGCGTAAAGTTCTGAAAGGCAC 1850
 1851 CTATTTTGAACATGTGCTGCCTGCCGGTGCAGCCGAAGAAGAAGAACACG 1900
 1901 AAAGCTTTATTGCCGAACACGTGAACAAATTTTCGCGAATGGGTTAAAGGC 1950
 1951 ATTCGTGGCTAA 1962

IST 1001 780 bp 259 AS 29, 7 kDa

1 ATGGCTCCGCGTTATCTGAAAGGCTGGTTAAAGGATGTGGTTCAGTTGAG 50
 51 CCTTCGCCGGCCATCTTTTAGAGCGAGTCGACAACGTCCTATTATCTCAC 100
 101 TCAATGAACGCATACTGGAGTTCAACAAACGTAATATTACCGCCATCATT 150
 151 GCAGGTTACGACCGCAAATCCCCCTCGGGGCTGGATGTCGAACGGGACCC 200
 201 GATCGAGTATAGCAAGTTTATGGAACGTTACGCTGTAGGATTATCTATAA 250
 251 CGACTGAAGAGAAATATTTCAACGGCAGTTACGAAACATTGCGCAAATTT 300
 301 GCGTCATCCGTGTCGATCCCAATTCCTTATGGCCGATTTTATAGTTAAGGA 350
 351 GAGCCAGATCGACGATGCATATAATCTGGGTGCTGATAACCGTCGCGCTCA 400
 401 TTGTAAAAATCCTGACGGAAAGAGAATTAGAGTCTCTGTTGGAATACGCC 450
 451 CGAAGTTATGGGATGGAGCCTCTTATTAATAAATAAACGACGAAAATGATCT 500
 501 GGACATCGCACTCCGTATTGGAGCTCGCTTCATAGGCATCGTGTGAGCGG 550
 551 ATTGGGAAACTTTAGAGATTAACAAGGAAAATCAACGGAAACTGATTTCC 600
 601 ATGATCCCGTTCGAACGTTGTCAAAGTGGCCTCCTTTGGTATTAGCGAGCG 650
 651 TAATGAAATAGAAGAGTTGCGCAAGCTTGGCGTAAACGCTTTCTCTATCC 700
 701 ATAGTTCACTGATGCGTAATCCCGAAAAAATTAAGAATTTATCTTAGGC 750
 751 AGCCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA 780

IST 1002 780 bp 259 AS 29, 7 kDa

```
1  ATGGCTCCGCGTTATCTGAAAGGCTGGCTGAAAGACGTGGTTCAGCTGAG 50
51  CCTGCGCCGTCCATCTTTTCGCGCGAGTCGTCAACGCCCTATTATCTCAC 100
101 TGAACGAACGTATTCTGGAGTTCAACAAACGCAATATCACCGCTATTATC 150
151 GCACTGTATATGCGTAAATCCCCGTGGGGTCTGGACGTGCAACGCGATCC 200
201 AATTGAGTATTCGAAATTTATGGAACGTTACGCTGTAGGGCTGAGCATCA 250
251 CGACTGAAGAGAAAATACGCGAACGGATCTTACGAAACACTGCGCAAAATT 300
301 GCCAGTTCAGTGTCCATCCCTATTCTGATGGCAGACTTCATCGTTAAAGA 350
351 GTCGCAGATTGATGACGCTTATAATCTGGGCGCGGATACCGTCGCCCTGA 400
401 TCGTAAAAAATTCTGACGGAACGTGAACTGGAGAGCCTGCTGGAATACGCA 450
451 CGCAGTTACGGGATGGAGCCGCTGATCAAAATTAACGACGAAAACGACCT 500
501 GGATATTGCTCTGCGTATCGGGGCGCGCTTTATTGGAATCGTGAGTCGTG 550
551 ACTGGGAAACTCTGGAGATTAACAAAGAAAATCAACGAAACTGATCTCA 600
601 ATGATTCCGTCCAACGTTGTCAAAGTGGCCTCGTACGGAATCAGCGAGCG 650
651 TAATGAAATTGAAGAGCTGCGCAAACTGGGTGTAAACGCTTTCTCTATCG 700
701 GCAGTTCACTGATGCGTAATCCAGAAAAAATTAAGAATTTATCCTGGGC 750
751 AGCCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA 780
```

RA 60.2 624 bp 207 AS 23, 1 kDa

```
1  ATGGATACTACAATCACCCAGAATCAAACCGGCTATGACAACGGTACTT 50
51  TTATAGCTTCTGGACAGATGCACCGGGTACGGTGTCTATGACTCTGCATA 100
101 GTGGCGGTTCATACTCCACATCGTGGCGTAATACCGGGTGGTTTAAAGCC 150
151 GGCAAGGGTTGGAGCACGGGCGGTCTGCGCACCGTTACTTATAACGCATC 200
201 TTTCAATCCGAGTGGGACAGCTTATCTGACGCTGTACGGCTGGACCCGCA 250
251 ACCCGCTGGTATGGTATTCCATCGTAGAATCGTGGGGTACTTACCGTCCG 300
301 ACAGGGACGTATAAAGGTACGGTAACCACTGACGGGGGCACATACGATAT 350
351 TTACGAGTATTGGTGGTACAACGCTCCGTCCATCGAGGGCACCCGCACCT 400
401 ACCAATCTTTTTGGAGTGTTTCGTCAACAGAAACGCACTTCAGGGACAATT 450
451 ACGATCGGCAACCACTTCGACGCCTGGGCACGTGCTGGTATGAATCTGGG 500
501 CTCCCATGATTACCAGATTATGGCTACTATTGGTCATCAATCGAGCGGGT 550
551 CTAGTACTGTGTCAATCTCCGAGGGCGGTAACCCGGGCAATCCGGGCAGC 600
601 CTCGAGCACCACCACCACCACCTGA 624
```

RA 95.4 777 bp 258 AS 29, 7 kDa

```

1  ATGCCGCGTTATCTGAAAGGCTGGCTGGAGGACGTAGTCCAGCTGTCTCT  50
51 GCGCCGTCCTAGCGTCCGCGCGAGCCGCCAACGTCCGATTATTTCTCTGA  100
101 ACGAACGTATCCTGGAATTTAACAAACGCAATATTACAGCAATCATCGCG  150
151 TATTATGAACGCAAATCGCCGTCAGGTCTGGATGTTGAGCGTGATCCGAT  200
201 TGAATATGCGAAATTCATGGAGCGTTACGCGGTTGGCCTGTCTATTAAGA  250
251 CAGAAGAAAAATACTTTAATGGCAGCTATGAAACGCTGCGTAAAATTGCT  300
301 AGCAGTGTCAGTATTCCAATTCTGATGAGCGATTTTATCGTGAAAGAAAG  350
351 CCAGATTGATGATGCCTATAACCTGGGCGCGGATACCGTGCTGCTGATCG  400
401 TTAAAATCCTGACGGAGCGTGAAGTGGAGTCTCTGCTGGAATACGCGCGC  450
451 AGTTATGGTATGGAACCGCTGATTCTGATTAACGATGAAAATGATCTGGA  500
501 TATCGCTCTGCGTATCGGTGCGCGTTTTATTGGCATCTTCTCAATGAATT  550
551 TTGAAACGGGTGAAATTAACAAAGAAAATCAGCGTAAACTGATTTCTATG  600
601 ATTCCGTCAAACGTGGTGAAAGTCGCGAAACTGGGCATTAGTGAGCGCAA  650
651 TGAAATTGAAGAACTGCGTAAACTGGGGGTGAATGCATTTCTGATTTCTT  700
701 CGTCGCTGATGCGCAATCCGGAAAAGATTAAGAATTAATCGAGGGATCA  750
751 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA  777

```

RA 95.5 777 bp 258 AS 29, 7 kDa

```

1  ATGCCGCGTTATCTGAAAGGCTGGCTGGAGGACGTAGTCCAGCTGTCTCT  50
51 GCGCCGTCCTAGCGTCCGCGCGAGCCGCCAACGTCCGATTATTTCTCTGA  100
101 ACGAACGTATCCTGGAATTTAACAAACGCAATATTACAGCAATCATCGCG  150
151 TATTATTCACGCAAATCGCCGTCAGGTCTGGATGTTGAGCGTGATCCGAT  200
201 TGAATATGCGAAATTCATGGAGCGTTACGCGGTTGGCCTGTCTATTAAGA  250
251 CAGAAGAAAAATACTTTAATGGCAGCTATGAAACGCTGCGTAAAATTGCT  300
301 AGCAGTGTCAGTATTCCAATTCTGATGAGCGATTTTATCGTGAAAGAAAG  350
351 CCAGATTGATGATGCCTATAACCTGGGCGCGGATACCGTGCTGCTGATCG  400
401 TTAAAATCCTGACGGAGCGTGAAGTGGAGTCTCTGCTGGAATACGCGCGC  450
451 AGTTATGGTATGGAACCGCTGATTCTGATTAACGATGAAAATGATCTGGA  500
501 TATCGCTCTGCGTATCGGTGCGCGTTTTATTGGCATCTTCTCAATGAATT  550
551 TTGAAACGGGTGAAATTAACAAAGAAAATCAGCGTAAACTGATTTCTATG  600
601 ATTCCGTCAAACGTGGTGAAAGTCGCGAAACTGGGCATTAGTGAGCGCAA  650
651 TGAAATTGAAGAACTGCGTAAACTGGGGGTGAATGCATTTCTGATTTCTT  700
701 CGTCGCTGATGCGCAATCCGGAAAAGATTAAGAATTAATCGAGGGATCA  750
751 CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA  777

```

RA 110.4 426 bp 141 AS 16,0 kDa

```
1  ATGAACCTGCCGACCGCCCAGGAAGTCCAGGGTCTGATGGCGCGTTTTAT 50
51  TGAACTGGTCGATGTGGGCGACATTGAAGCAATTGTGCAGATGTACGCGG 100
101  ACGATGCGACCGTTGAAAGCCCGTTTGGTCAACCACCGATTCATGGCCGT 150
151  GAACAGATTGCGGCGCACTACCGTCAGTGGCTGGGCGGGGGTAAATTTTCG 200
201  TGTTTGCCTGACCGGTCCAGTGCCTGCTAGTCATAACGGCTGCGGCGCGA 250
251  TGCCGTTGCGTAAAGAGTGGGTTTGGGAATGGTCAGCCTTGCGCACTGGAT 300
301  GTTATTCTGGTTATGCGCTTCGATGAACACGGTCGCATCCAGACCGAACA 350
351  GCGCTATTGGAGCGAAGTGAATCTGAGTGTACGCGAACCGCAGGGCAGTC 400
401  TCGAGCACCACCACCACCACCACTGA 426
```

A.2 Verwendete PCR-Programme

Im Laufe dieser Arbeit wurden vier verschiedene PCR-Programme verwendet. Diese sind im Folgenden gelistet.

Tabelle A.1: PCR-Programm Nr. 1

| Schritt | t / min | $T / ^\circ\text{C}$ | Zyklen |
|-------------------|------------------|----------------------|--------|
| Initialisierung | 5 | 95 | 1× |
| Denaturierung | 0,5 | 95 | |
| Hybridisierung | 0,5 | 62 | 30× |
| Elongation | 4,5 | 75 | |
| finale Elongation | 4,5 | 70 | 1× |
| Halten | - | 8 | |

Tabelle A.2: PCR-Programm Nr. 2

| Schritt | t / min | $T / ^\circ\text{C}$ | Zyklen |
|-------------------|------------------|----------------------|--------|
| Initialisierung | 5 | 95 | 1× |
| Denaturierung | 0,5 | 95 | |
| Hybridisierung | 0,5 | 65 | 30× |
| Elongation | 3,5 | 72 | |
| finale Elongation | 10 | 72 | 1× |
| Halten | - | 8 | |

Tabelle A.3: PCR-Programm Nr. 3: *Pfu/Taq*-Polymerase (2 U/8 U)

| Schritt | t / min | $T / ^\circ\text{C}$ | Zyklen |
|-------------------|------------------|----------------------|--------|
| Initialisierung | 2 | 94 | 1× |
| Denaturierung | 0,33 | 95 | |
| Hybridisierung | 0,16 | 50–62 | 10× |
| Hybridisierung | 0,16 | 45–62 | |
| Elongation | 2,5 | 60 | |
| Denaturierung | 0,33 | 95 | |
| Hybridisierung | 0,16 | 65–62 | 20× |
| Hybridisierung | 0,16 | 60–62 | |
| Elongation | 2,5 | 72 | |
| finale Elongation | 5 | 72 | 1× |
| Halten | - | 8 | |

Tabelle A.4: PCR-Programm Nr. 4

| Schritt | t / min | $T / ^\circ\text{C}$ | Zyklen |
|-------------------|------------------|----------------------|--------|
| Initialisierung | 2 | 95 | 1× |
| Denaturierung | 0,5 | 95 | |
| Hybridisierung | 0,5 | 64 | 30× |
| Elongation | 3 | 72 | |
| finale Elongation | 10 | 72 | 1× |
| Halten | - | 8 | |

A.3 Proteinexpression

Insofern eine Expression erkennbar ist und die erfolgreiche Expression nicht nur durch einen Aktivitätstest bestätigt wurde, wird dies im Folgenden exemplarisch durch ein SDS-Gel gezeigt.

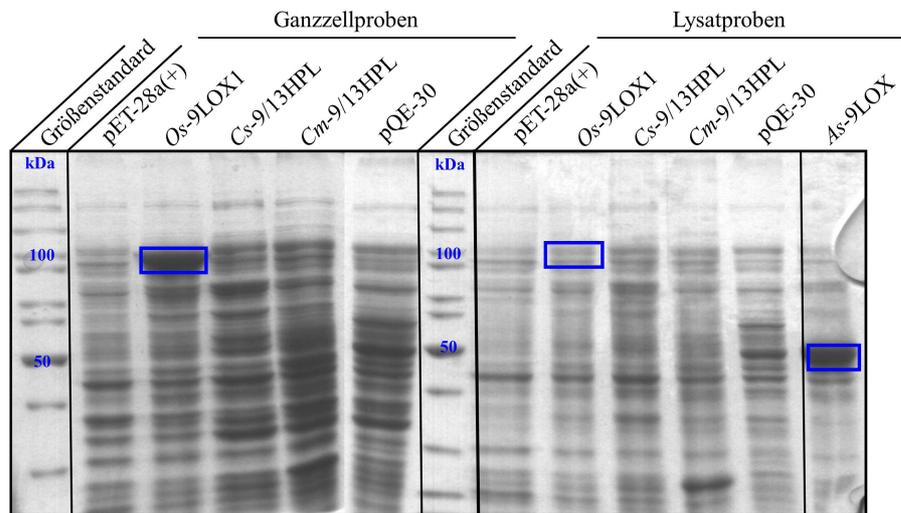


Abbildung A.1: Zusammenstellung verschiedener SDS-PAGE-Analysen von verschiedenen Lipoxygenasen und Hydroperoxid-Lyasen. Links: Ganzzellproben. Rechts: Lysatproben.

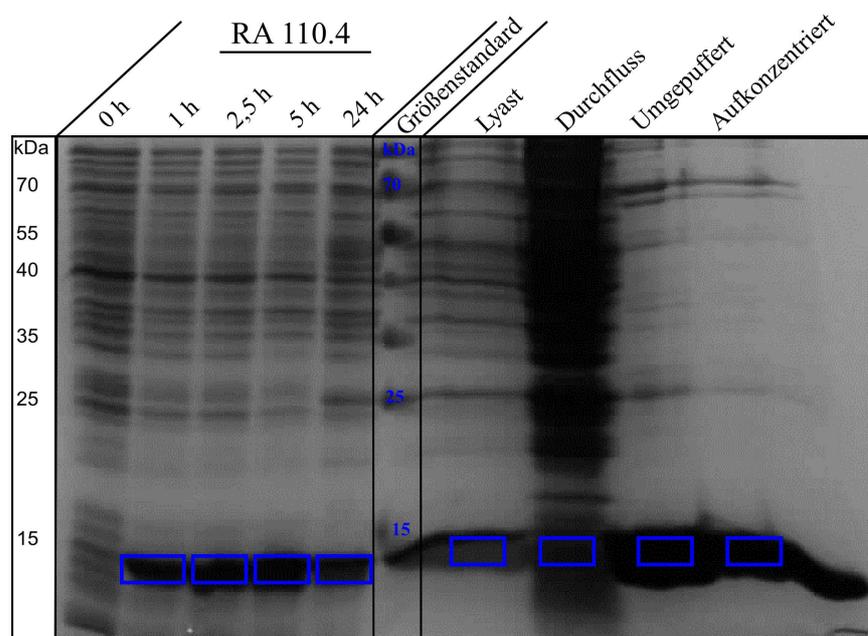


Abbildung A.2: Expression von RA 110.4. Links: Expressionsstudie zu verschiedenen Zeitpunkten. Rechts: Ganzzell- und Lysatproben sowie anschließende Aufreinigung mittels IMAC.

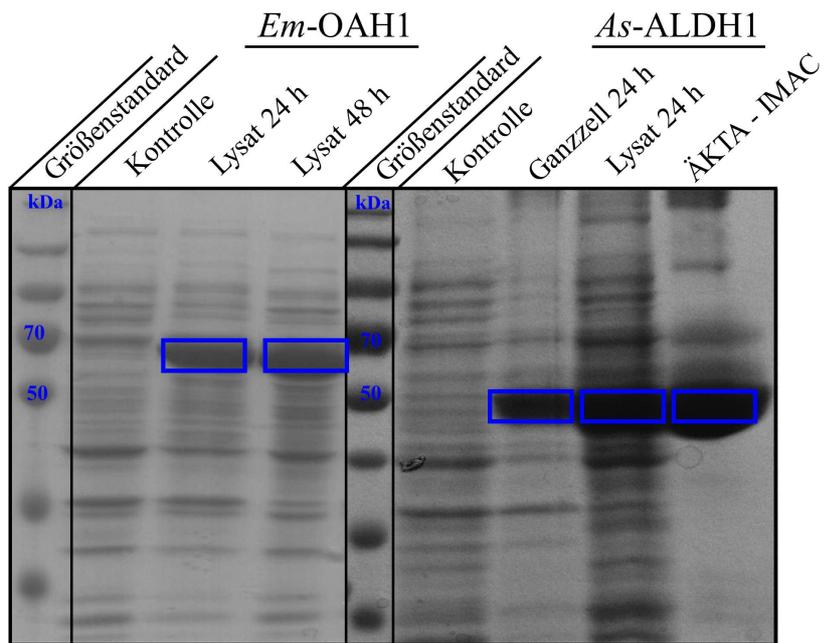


Abbildung A.3: SDS-PAGE-Analyse von *Em-OAH1* und *As-ALDH1*. Links: Testexpression der unmarkierten *Em-OAH1* Variante nach 24 h und 48 h. Rechts: Expression von *As-ALDH1* und anschließende Aufreinigung mittels IMAC.

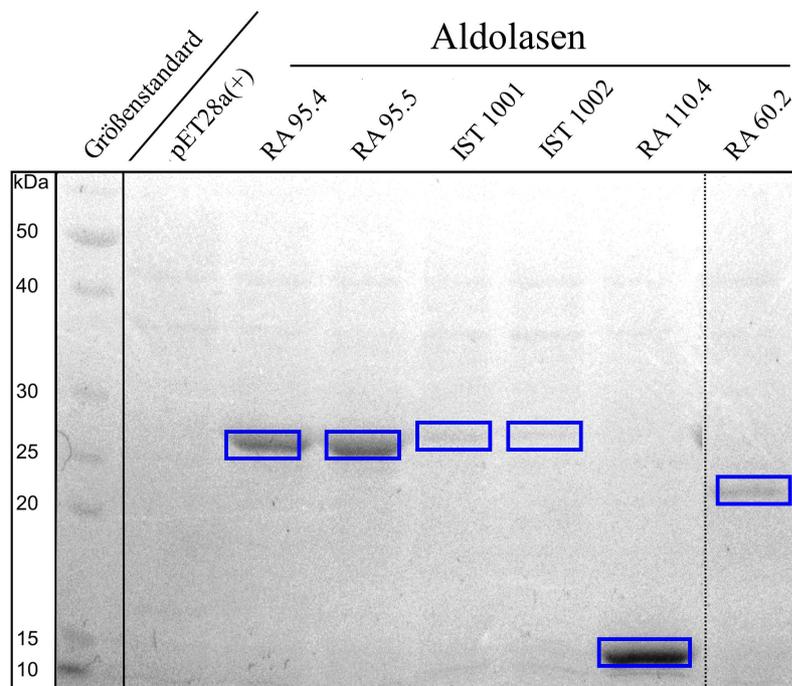


Abbildung A.4: SDS-PAGE-Analyse der verschiedenen Aldolasen. Die Expressionen der einzelnen Gene wurden unter den Assaybedingungen durchgeführt.

A.4 pH-Profil der *St*-LOX1 und 9/13HPL Reaktionen

Bei der Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurde unter anderem der optimale pH-Wert der gekoppelten Lipoxygenase und Hydroperoxid-Lyase Reaktion bestimmt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob *St*-LOX1 unterschiedliche HPODE Regioisomere (9- und 13-Hydroperoxyoctadecadiensäure) nach einem pH-abhängigen Mechanismus bildet.

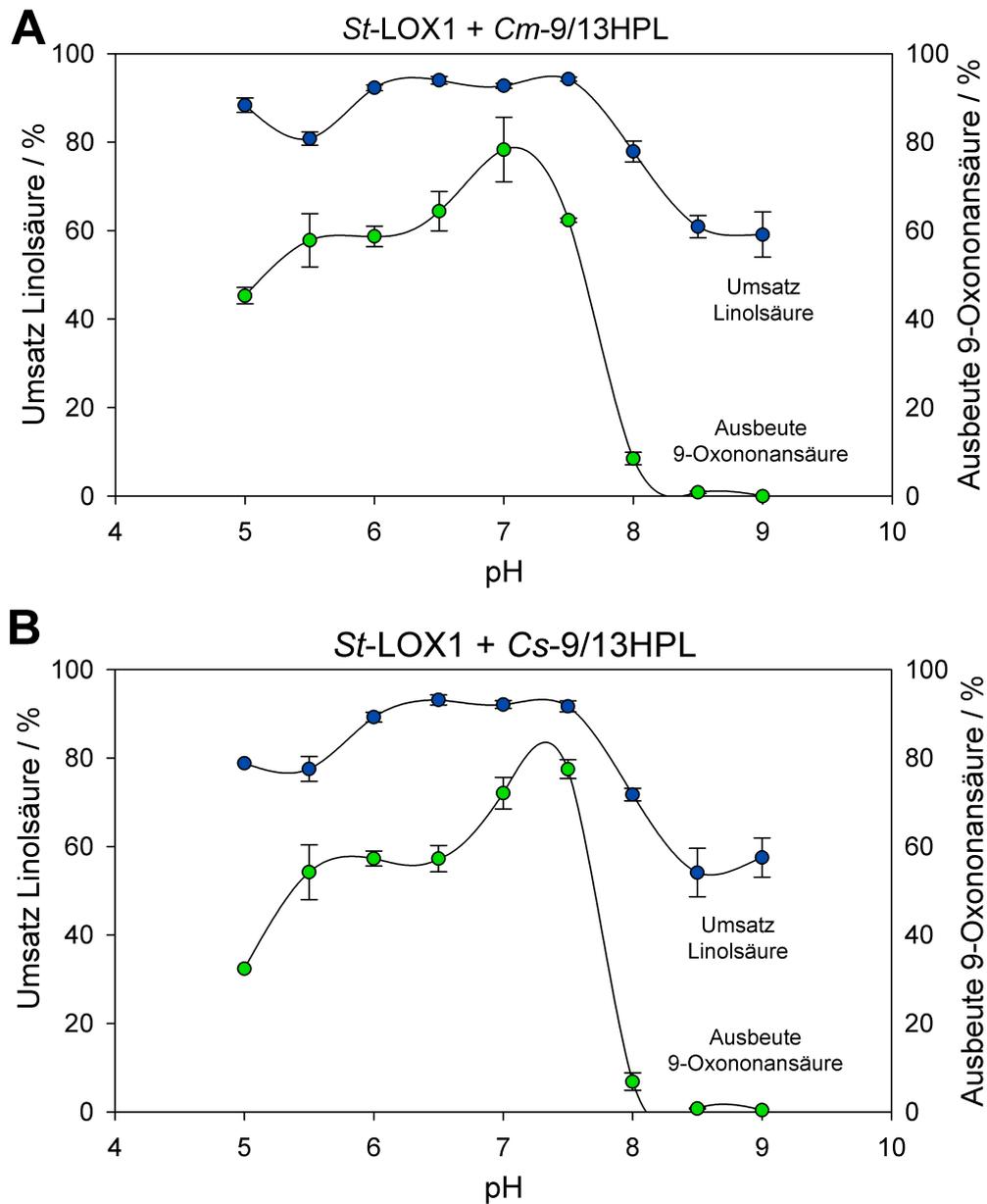


Abbildung A.5: pH-Profil der sukzessiven *St*-LOX1 und 9/13HPL Reaktion. A: Profil der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Reaktion. B: Profil der sukzessiven *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL Reaktion.

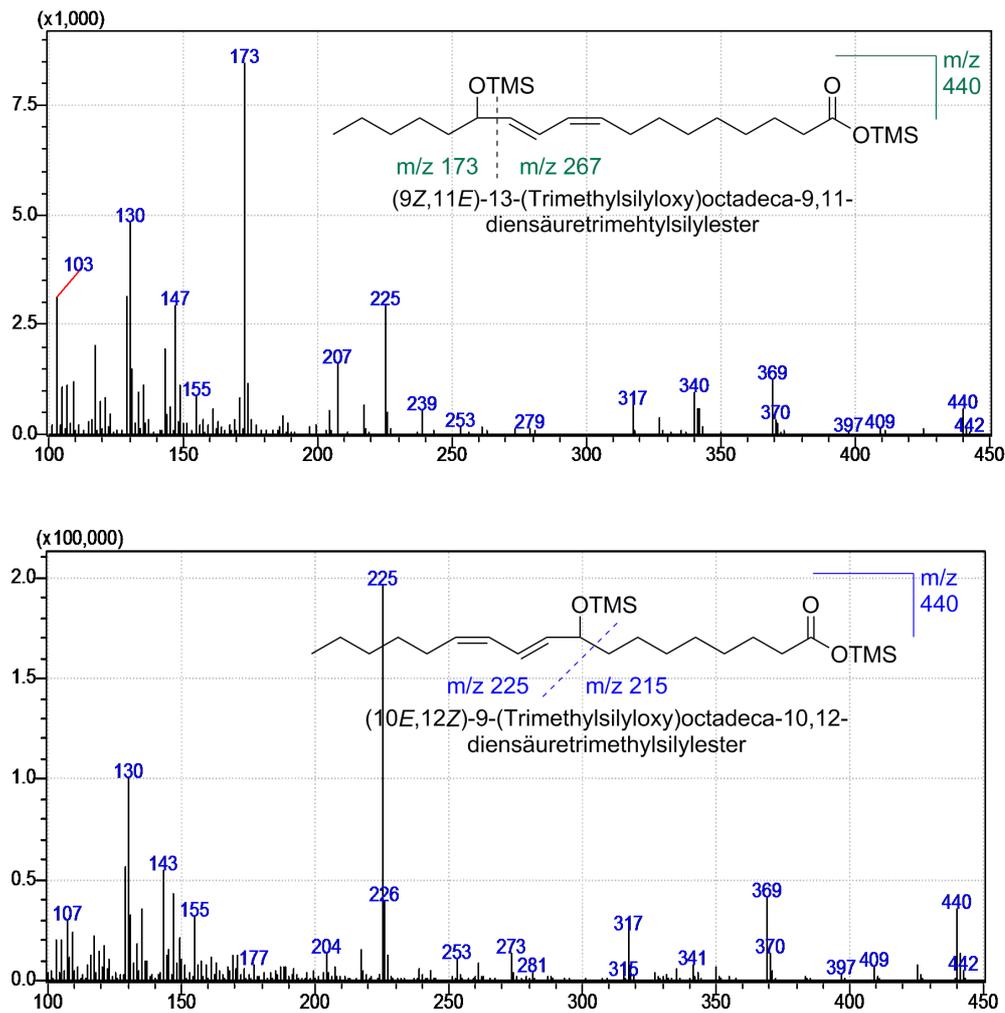


Abbildung A.6: MS-Fragmentierungsmuster der TMS-Derivate von 13-H(P)ODE (oben: *Gm*-LOX1, pH 6)²⁰⁰ und 9-H(P)ODE (unten: *St*-LOX1, pH 6)¹⁶⁶. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

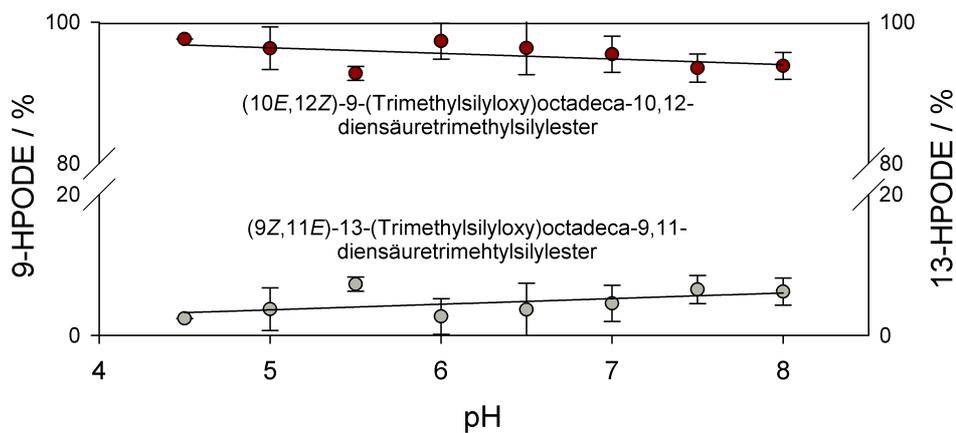


Abbildung A.7: Regioselektivität von *St*-LOX1 in Abhängigkeit des pH-Werts. Im Gegensatz zu der Lipoxygenase aus *Glycin max* *Gm*-LOX1 kann bei *St*-LOX1 keine merkliche Änderung des Regioisomerenverhältnisses beobachtet werden. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

A.5 LOX/HPL Reaktion und Substratkonzentration

Abbildung A.5 zeigt Zusatzdaten von Experimenten, in denen die sukzessive *St*-LOX1 und *Cm*-9/13HPL Reaktion in Abhängigkeit der Substratkonzentration untersucht wurde. Die Daten sind hier um die 2 mM und die 5 mM Messreihe erweitert.

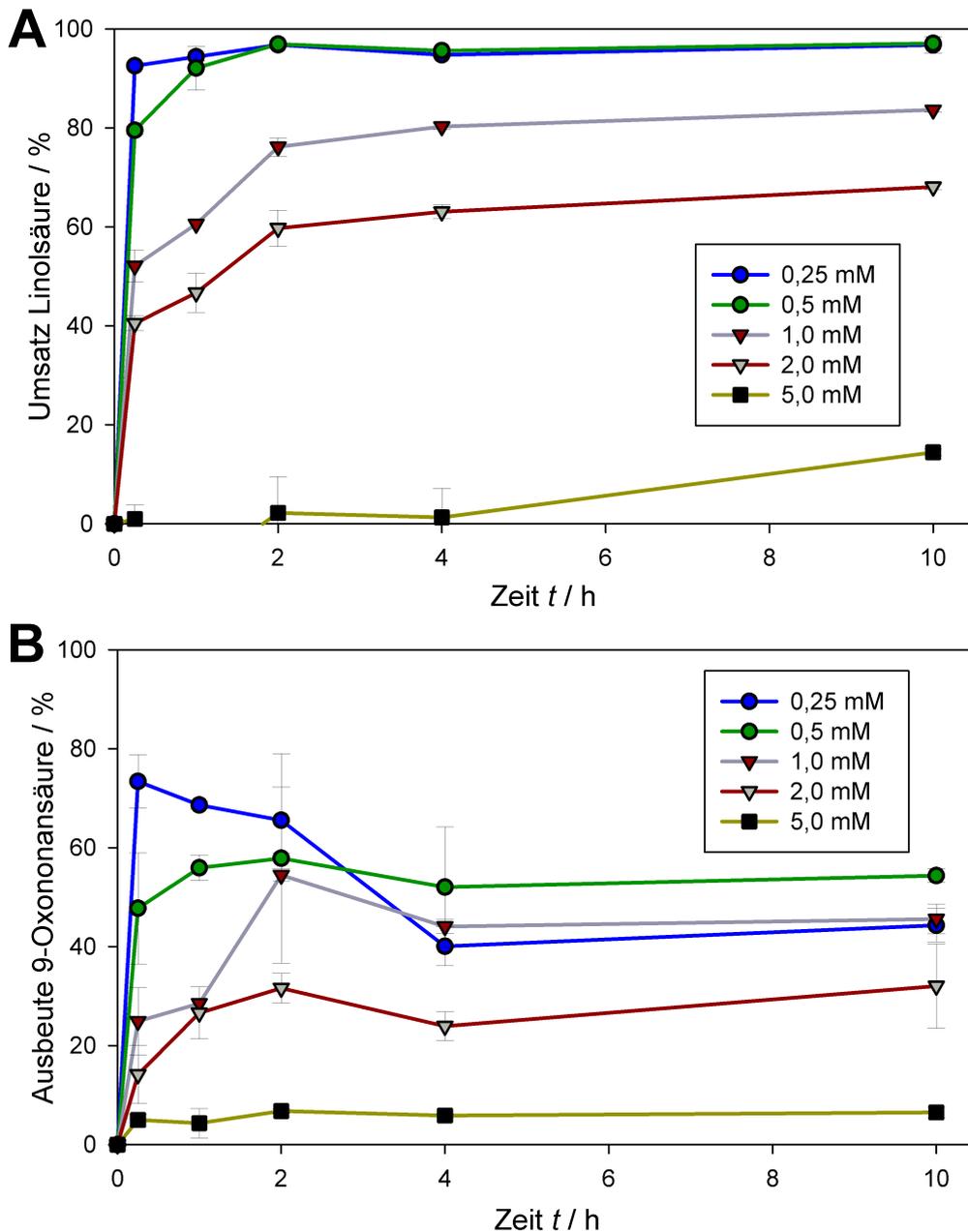


Abbildung A.8: Abhängigkeit der sukzessiven *St*-LOX1 ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) und *Cm*-9/13HPL ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) Reaktion in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (0,25 mM – 5 mM). Der Linolsäureumsatz (A) und die 9-Oxononansäureausbeute (B) werden in separaten Schaubildern dargestellt. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²⁰⁶

A.6 Klonierungsstrategie für das Dualexpressionssystem

Für die Expression von *St*-LOX1 wurde das pQE-System von Qiagen (Hilden, DE) verwendet. Der Expressionsstamm trägt zusätzlich das Plasmid pREP4, welches für die konstitutive Expression des Lac-Repressorgens *lacI* verantwortlich ist. LacI sorgt für eine bessere Kontrolle des Zielgens, welches sich hinter dem in dem System verwendeten T5-Promotor befinden. Mittels Elektroporation wurde pREP4 aus *E. coli* SG13009 entfernt.¹⁷⁶ Die gesamte Expressionskassette von *Cs*-9/13HPL wurde inklusive Promotor, Ribosomenbindungsstelle (RBS), Zielgen und Terminator in pREP4 kloniert. *E. coli* SG13009 ohne pREP4 konnte daraufhin mit beiden Vektoren pREP4-*Cs*9/13HPL (niedrige Kopierzahl, p15A ORI) und pQE-*St*LOX1 (hohe Kopierzahl, ColE1 ORI) transformiert werden. Nach Induktion mit IPTG konnten beide Gene in einem Stamm exprimiert werden.

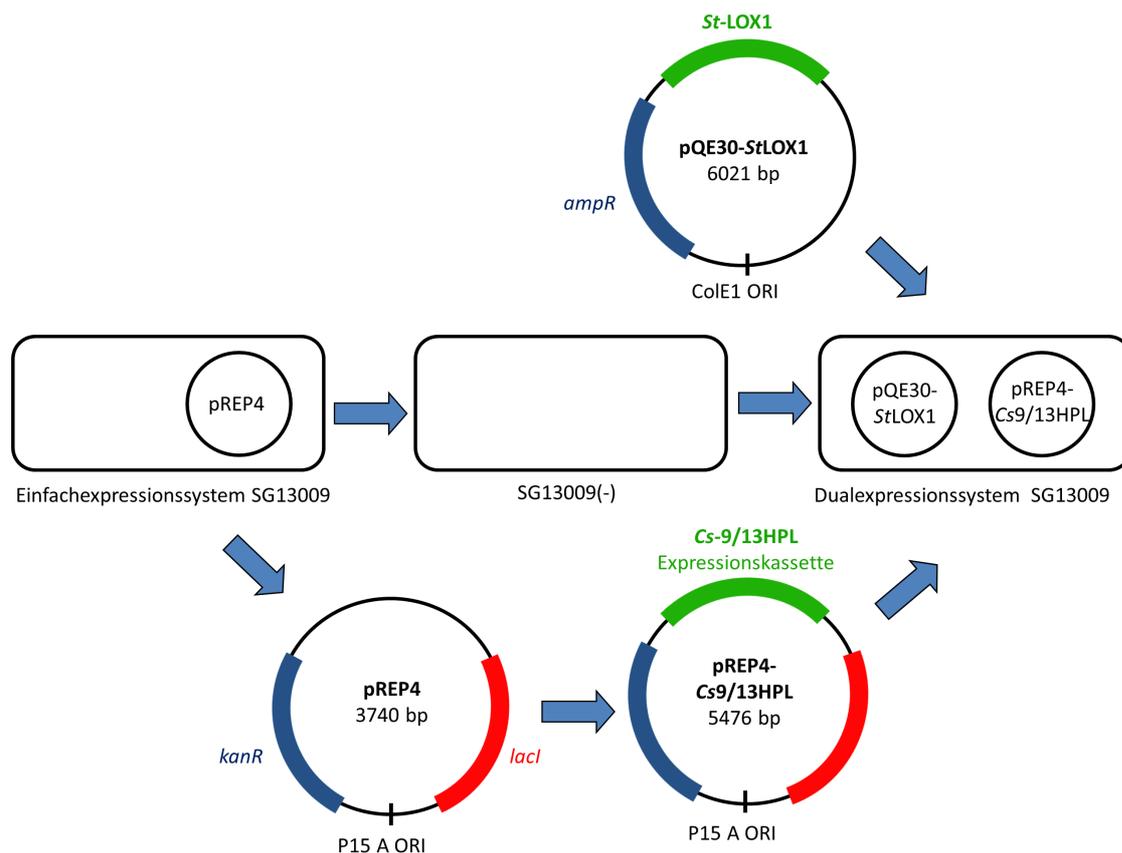


Abbildung A.9: Klonierungsstrategie für die Entwicklung eines Dualexpressionssystems für *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL. Das Plasmid pREP4 wurde mittels Elektroporation aus *E. coli* SG13009 entfernt. Die gesamte *Cs*-9/13HPL Expressionskassette wurde in den pREP4-Vektor mit niedriger Kopierzahl kloniert. Nach Transformation von pQE-*St*LOX1 und pREP4-*Cs*9/13HPL konnten sowohl LOX und HPL gleichzeitig exprimiert werden. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²¹⁰

A.7 pH-Abhängigkeit der Ganzzellkatalyse

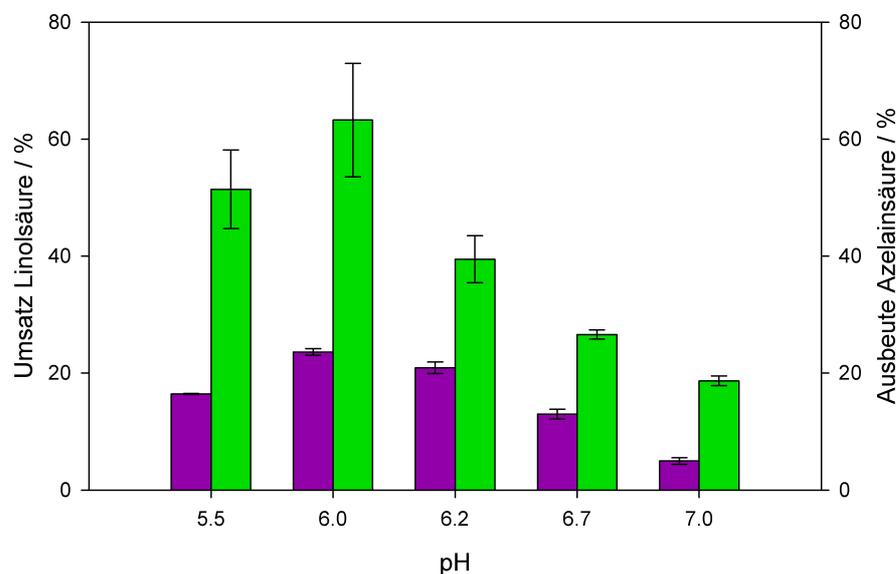


Abbildung A.10: pH-Profil der *E. coli* Ganzzellkatalyse. Bei der Ganzzellreaktion handelt es sich um die direkte Umsetzung von Linolsäure zu Azelainsäure. Der Linolsäureumsatz ist in Grün und die Azelainsäureausbeute in Lila dargestellt. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²¹⁰

A.8 pH-Optimum der *Em*-OAH1 Reaktion

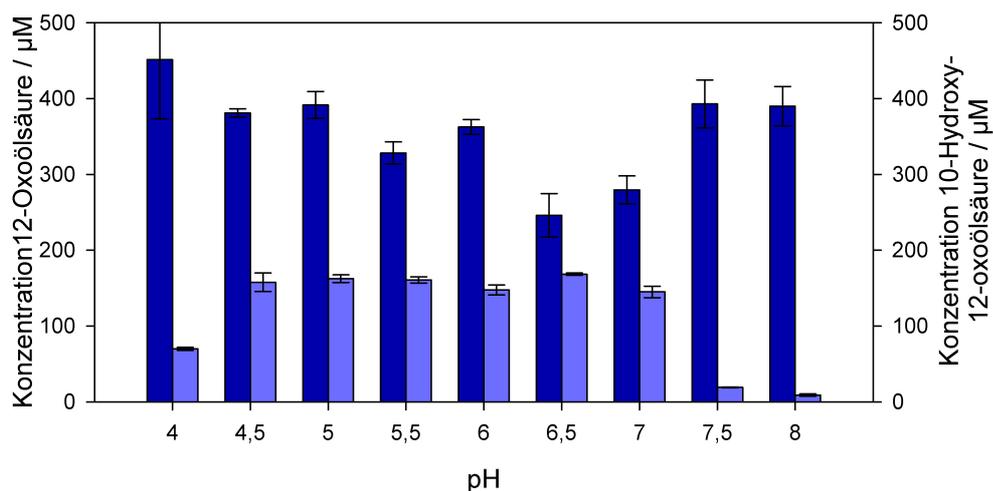


Abbildung A.11: pH-Profil der *Em*-OAH1 katalysierten Umsetzung von 12-Oxoölsäure zu 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure (pH 4 – 8). Die Konzentration von 12-Oxoölsäure ist in Dunkelblau, die von 10-Hydroxy-12-oxoölsäure in Hellblau dargestellt. Abbildung abgeändert von Elena Maurer (Diplomarbeit ITB, 2014).¹⁶⁹

A.9 Ganzzellkatalyse und Substratkonzentration

Bei hohen Konzentrationen ist der Trend deutlich zu erkennen, dass über 200 μM gebildetes Produkt nur als 9-Oxononansäure und nicht in Form von Azelainsäure anfällt. Dieser Umstand macht sich vor allem unter einphasigen Bedingungen bemerkbar.

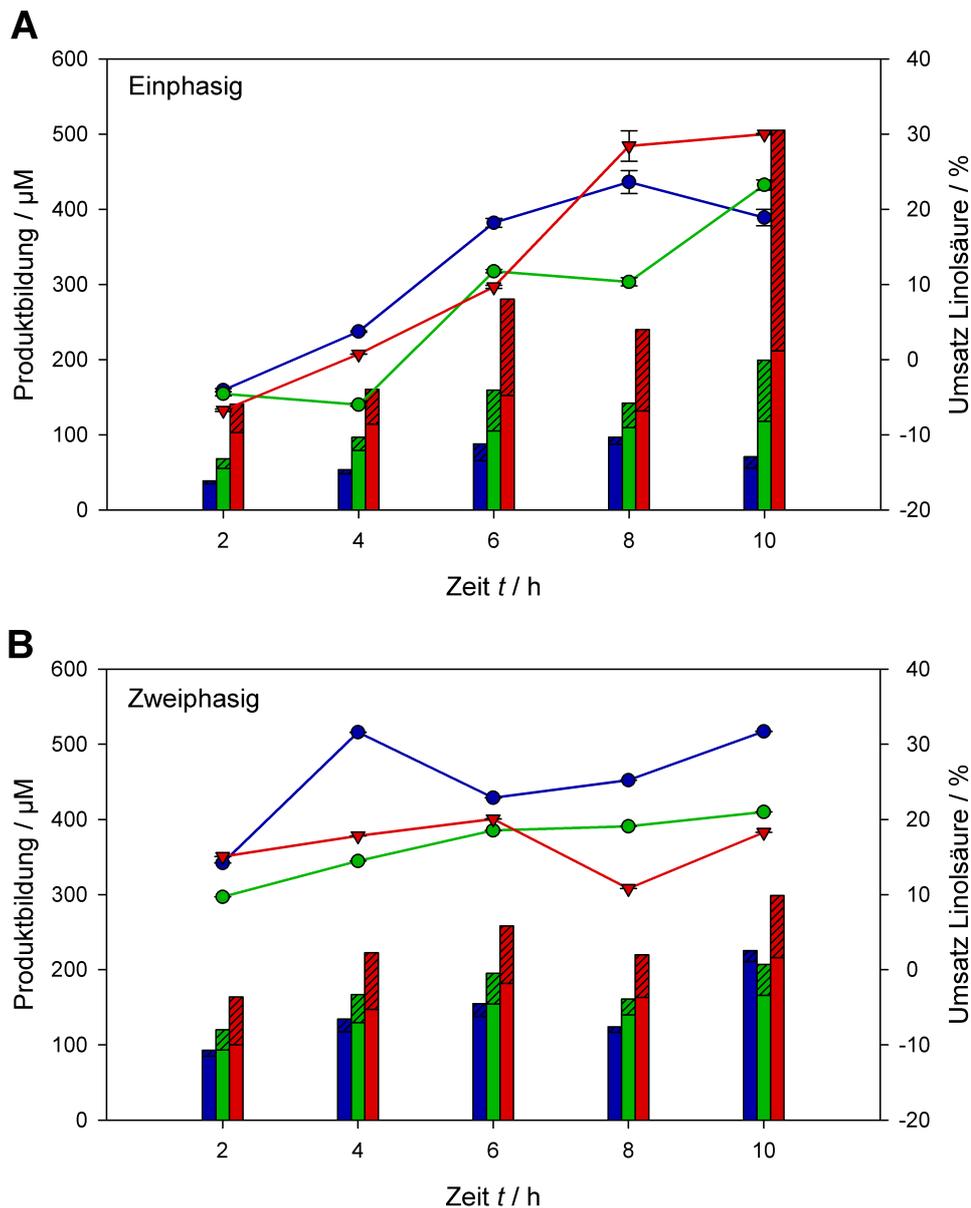


Abbildung A.12: Ganzzellbiotransformationen von Linolsäure mit Zellen, welche *St*-LOX1 und *Cs*-9/13HPL exprimieren. Der Umsatz von Linolsäure wird in Form von Punkten und die Produktausbeute in Balken dargestellt. Die Farben der verschiedenen Konzentrationen werden wie folgt dargestellt: 5 mM in Blau, 20 mM in Grün und 50 mM in Rot. Verlauf der Reaktion über 32 h unter A) einphasigen und B) zweiphasigen Bedingungen. Abbildung abgeändert nach Otte *et al.* (2013).²¹⁰

A.10 ADH-Screening von c-LEcta und ADH-Spezifität

c-LEcta screenete mehr als 70 Enzyme ihrer ADH-Bibliothek auf Aktivität gegenüber Ricinolsäure. In der Bibliothek fanden sich neben literaturbekannten Enzymen auch gänzlich neue Enzyme aus der Biodiversität und optimierte ADH-Mutanten. Abbildung A.13A zeigt die Zusammenfassung des spektrophotometrischen Multititerplatten basierten NAD^+ -Assays. Die vier aktivsten Varianten wurden mittels GC-FID auf Substratumsatz untersucht (Abbildung A.13B).

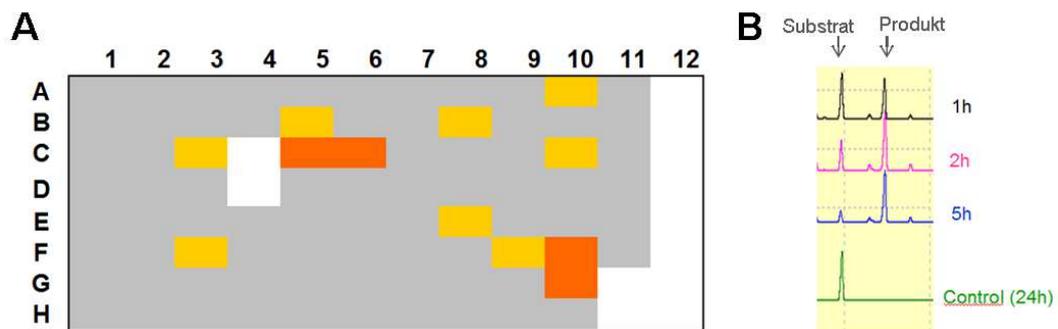


Abbildung A.13: ADH-Screening von c-LEcta. A) Multititerplatten basierter photometrischer NAD^+ -Assay. Die besten Varianten sind in Gelb und Orange dargestellt. B) GC-FID basierte Evaluierung des Ricinolsäureumsatzes. Die Abbildung wurde von c-LEcta mit freundlicher Genehmigung von Dr. Andreas Vogel bereitgestellt.

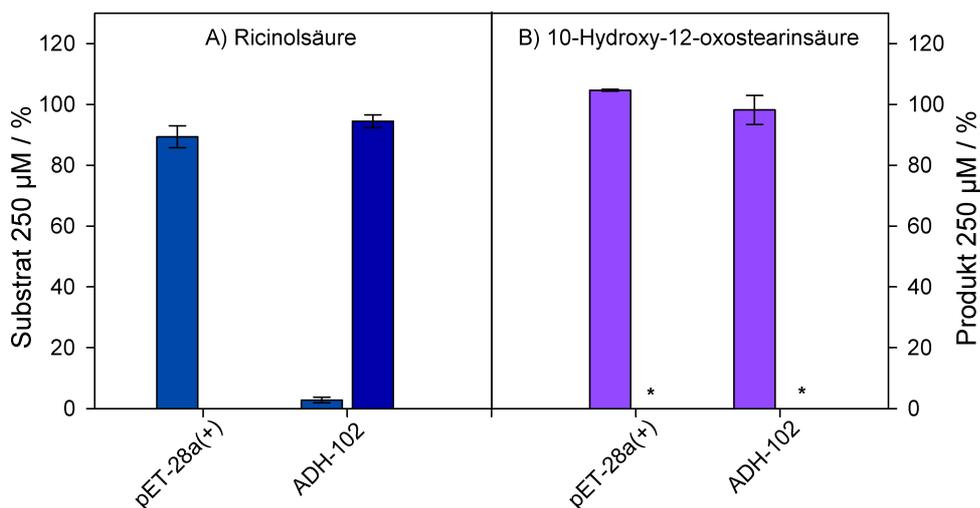


Abbildung A.14: Untersuchung der Selektivität der ADH-102 Reaktion mit 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure als mögliches Substrat. Die Vergleichsreaktion zeigt, dass die ADH-102 Enzympräparation nur die Umsetzung von Ricinolsäure (A) und nicht die Umsetzung von 10-Hydroxy-12-oxostearinsäure (B) katalysiert. *) Die Entstehung eines neuen Produkts kann nicht beobachtet werden. Substrat (linke Balken) und Produkt (rechte Balken) sind paarweise abgebildet.

Literaturverzeichnis

- [1] A. J. Ragauskas, C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, T. Tschaplinski, *Science* **2006**, *311*(5760), 484–489.
- [2] A. Corma, S. Iborra, A. Velty, *Chem. Rev.* **2007**, *107*(6), 2411–2502.
- [3] C. H. Christensen, J. Rass-Hansen, C. C. Marsden, E. Taarning, K. Egeblad, *ChemSusChem* **2008**, *1*(4), 283–289.
- [4] S. Srinivasan, *Renew. Energ.* **2009**, *34*(4), 950–954.
- [5] J. E. Cohen, *Science* **2003**, *302*(5648), 1172–1175.
- [6] R. Rinaldi, F. Schüth, *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*(6), 610–626.
- [7] J. Rass-Hansen, H. Falsig, B. Jørgensen, C. H. Christensen, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*(4), 329–333.
- [8] Braskem, „Annual and Sustainability Report“, **2010**.
- [9] P. N. R. Vennestrøm, C. M. Osmundsen, C. H. Christensen, E. Taarning, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*(45), 10502–10509.
- [10] X. Tong, Y. Ma, Y. Li, *Appl. Catal., A.* **2010**, *385*(1–2), 1–13.
- [11] A. Gandini, *Macromolecules* **2008**, *41*(24), 9491–9504.
- [12] K. Basler, L. Hoppe, T. Eichler, M. Wendel, A. Astheimer, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. Aufl., VCH, Weinheim, **1986**, 419–459.
- [13] D. Klemm, B. Heublein, H.-P. Fink, A. Bohn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*(22), 3358–3393.
- [14] M. A. Del Nobile, P. Fava, L. Piergiovanni, *J. Food Eng.* **2002**, *53*(4), 295–300.

- [15] S. E. Artemenko, L. G. Glukhova, S. G. Kononenko, T. S. Pershina, V. T. Razumovskii, A. V. Zlokazov, V. Lobadin, *Fibre Chem.* **1995**, 27(2), 113–116.
- [16] Evonik Industries, *Pressemitteilung – Keine Kompromisse: Viskosefaser-verstärkte Biopolyamide bieten hohen Biogehalt und gutes Verstärkungspotential*, **2012**.
- [17] A. K. Mohanty, M. Misra, G. Hinrichsen, *Macromol. Mater. Eng.* **2000**, 276–277(1), 1–24.
- [18] Y. Tokiwa, B. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72(2), 244–251.
- [19] K. Van de Velde, P. Kiekens, *Polym. Test.* **2002**, 21(4), 433–442.
- [20] P. Bordes, E. Pollet, L. Avérous, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34(2), 125–155.
- [21] C. Keßler, *Spekt. Augenheilkd.* **1991**, 5(2), 70–76.
- [22] A. R. Webb, J. Yang, G. A. Ameer, *Expert. Opin. Biol. Ther.* **2004**, 4(6), 801–812.
- [23] R. Loos, D. Mijolovic, J. Heimann, Z. J. Szarka, *Polyesters based on 2-methylsuccinic acid*, BASF SE, US Patent Nr. 8546472 B2, **2012**.
- [24] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, M. D. Rosa, *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, 19(12), 634–643.
- [25] BASF Plastics, *Ultramid Balance* **2010**, KT / K, F 204.
- [26] BASF Plastics, *Ultramid, Ultradur und Ultraform* **2010**, KT / K, F 204.
- [27] P. Gaillard, A. Korzhenko, P. Poulin, N. E. E. Bounia, *Multilayer conductive fiber and method for producing the same by coextrusion*, Centre National De La Recherche Scientifique, Arkema France, US Patent Nr. 20120077403 A1, **2012**.
- [28] M. Vogt, D. Jousset, S. Bizet, J.-J. Flat, *Photovoltaic modules with a backsheet film comprising a polyamide-grafted polymer and manufacturing process and use thereof*, Arkema France, Solutia Solar GmbH, EP Patent Nr. 2196489 B1, **2008**.
- [29] A. H. Tullo, *Chem. Eng. News* **2013**, 91(7), 28–30.
- [30] V. Reimer, A. Künkel, S. Philipp, *Kunststoffe* **2008**, 49(0), 32–36.
- [31] L. M. Baliña, K. Graupe, *Int. J. Dermatol.* **1991**, 30(12), 893–895.

- [32] M. Nazzaro-Porro, S. Passi, M. Picardo, A. Breathnach, R. Clayton, G. Zina, *Br. J. Dermatol.* **1983**, *109*(1), 45–48.
- [33] Q. H. Nguyen, T. P. Bui, *Int. J. Dermatol.* **1995**, *34*(2), 75–84.
- [34] H. Römpf, J. Falbe, M. Regitz, *Römpf Lexikon Chemie*, Bd. 10, Thieme, Stuttgart, **1996**.
- [35] B. Cornils, P. Lappe, „Dicarboxylic Acids, Aliphatic“ in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**.
- [36] Y. Nakano, T. A. Foglia, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1982**, *59*(4), 163–166.
- [37] I. Garti, E. Avni, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*(8), 840–841.
- [38] U. Biermann, W. Friedt, S. Lang, W. Lühs, G. Machmüller, J. O. Metzger, M. Klaas, H. J. Schäfer, M. P. Schneider, *Angew. Chem.* **2000**, *112*(13), 2292–2310.
- [39] M. Rüscher, G. Klaas, P. Bavaj, S. Warwel, *Lipid-Fett* **1995**, *97*(10), 359–367.
- [40] A. Köckritz, A. Martin, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 812–824.
- [41] A. Köckritz, A. Martin, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*(1), 83–91.
- [42] T. D. H. Bugg, *Tetrahedron* **2003**, *59*(36), 7075–7101.
- [43] P. Schreier, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, *55*, 51–72.
- [44] I. Ivanov, D. Heydeck, K. Hofheinz, J. Roffeis, V. B. O’Donnell, H. Kuhn, M. Walther, *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *503*(2), 161–174.
- [45] I. Feussner, C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 275–297.
- [46] A. Grechkin, *Prog. Lipid. Res.* **1998**, *37*(5), 317–352.
- [47] C. N. Serhan, *Prostaglandins* **1997**, *53*(2), 107–137.
- [48] A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(34), 23679–23682.
- [49] M. Hammel, M. Walther, R. Prassl, H. Kuhn, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*(4), 917–929.
- [50] M. Maccarrone, M. L. Salucci, G. van Zadelhoff, F. Malatesta, G. Veldink, J. F. G. Vliegthart, A. Finazzi-Agrò, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *40*(23), 6819–6827.

- [51] S. A. Gillmor, A. Villasenor, R. Fletterick, E. Sigal, M. F. Browner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*(12), 1003–1009.
- [52] W. Minor, J. Steczko, B. Stec, Z. Otwinowski, J. T. Bolin, R. Walter, B. Axelrod, *ACS Biochem.* **1996**, *35*(33), 10687–10701.
- [53] W. L. Smith, W. E. M. Lands, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*(4), 1038–1047.
- [54] M. J. Schilstra, G. A. Veldink, J. Verhagen, J. F. G. Vliegthart, *ACS Biochem.* **1992**, *31*(33), 7692–7699.
- [55] R. C. Scarrow, M. G. Trimitsis, C. P. Buck, G. N. Grove, R. A. Cowling, M. J. Nelson, *ACS Biochem.* **1994**, *33*(50), 15023–15035.
- [56] C. C. Hwang, C. B. Grissom, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(2), 795–796.
- [57] M. H. Glickman, J. S. Wiseman, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(2), 793–794.
- [58] A. Liavonchanka, I. Feussner, *J. Plant Physiol.* **2006**, *163*(3), 348–357.
- [59] M. J. Knapp, J. P. Klinman, *ACS Biochem.* **2003**, *42*(39), 11466–11475.
- [60] C. Schneider, D. A. Pratt, N. A. Porter, A. R. Brash, *Chem. Biol.* **2007**, *14*(5), 473–488.
- [61] A. Itoh, G. A. Howe, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(5), 3620–3627.
- [62] K. Matsui, *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2006**, *9*(3), 274–280.
- [63] M. A. Noordermeer, G. A. Veldink, J. F. Vliegthart, *ChemBioChem* **2001**, *2*(7–8), 494–504.
- [64] D. R. Nelson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *369*(1), 1–10.
- [65] D. S. Lee, P. Nioche, M. Hamberg, C. S. Raman, *Nature* **2008**, *455*(7211), 363–368.
- [66] A. Hatanaka, *Phytochem.* **1993**, *34*(5), 1201–1218.
- [67] K. P. C. Croft, F. Jüttner, A. J. Slusarenko, *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 13–24.
- [68] Z. Long, X. Kong, C. Zhang, Y. Hua, *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*(5), 729–34.

- [69] A. Hausler, K. Lerch, A. Muheim, N. Silke, *Hydroperoxide lyases*, Givaudan Roure SE, US Patent Nr. 6238898 B1, **1999**.
- [70] J. Schrader, M. M. W. Etschmann, D. Sell, J. Hilmer, J. Rabenhorst, *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 463–472.
- [71] B. Muller, A. Gautier, C. Dean, J.-C. Kuhn, *Enzymatic method of forming aliphatic alcohols and aldehydes*, Firmenich, S.A., Firmenich S.A., WO Patent Nr. 024644, **1993**.
- [72] M. Gargouri, M.-D. Legoy, *Biotechnol. Lett* **1998**, *20*(1), 23–26.
- [73] H. Kuroda, T. Oshima, H. Kaneda, M. Takashio, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*(8), 1545–54.
- [74] C. Gigot, M. Ongena, M.-L. Fauconnier, J.-P. Wathelet, P. Du Jardin, P. Thonart, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2010**, *14*(3), 451–460.
- [75] F.-C. Huang, W. Schwab, *BMC Biotech.* **2011**, *11*(1), 30.
- [76] Y. Y. Toporkova, Y. V. Gogolev, L. S. Mukhtarova, A. N. Grechkin, *FEBS Lett.* **2008**, *582*(23-24), 3423–3428.
- [77] R. E. White, M. J. Coon, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*(1), 315–356.
- [78] D. M. Smith, A. Nicolaidis, B. T. Golding, L. Radom, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(39), 10223–10233.
- [79] A. N. Grechkin, M. Hamberg, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1636*(1), 47–58.
- [80] Y. Tsybovsky, H. Donato, N. I. Krupenko, C. Davies, S. A. Krupenko, *ACS Biochem.* **2007**, *46*(11), 2917–2929.
- [81] N. A. Sophos, V. Vasiliou, *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *143–144*(0), 5–22.
- [82] S. Harada, D. P. Agarwal, H. W. Goedde, S. Tagaki, B. Ishikawa, *Lancet* **1982**, *320*(8302), 827.
- [83] V. Vasiliou, A. Pappa, *Pharmacology* **2000**, *61*(3), 192–198.
- [84] N. H. Azrin, R. W. Sisson, R. Meyers, M. Godley, *J. Behav. Ther. Exp. Psy.* **1982**, *13*(2), 105–112.
- [85] K. Velonia, I. Smonou, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, *0*(14), 2283–2287.

- [86] A. Nuñez, T. A. Foglia, G. J. Piazza, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, 29(3), 207–212.
- [87] R. Hille, T. Nishino, *FASEB J.* **1995**, 9(11), 995–1003.
- [88] C. T. Walsh, Y.-C. J. Chen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, 27(3), 333–343.
- [89] Evonik Industries, *Vestamid Terra Application Brochure*, **2012**.
- [90] Daimler Technicity, *Materialforschung: Von der Bohne zum fertigen Produkt*, **2013**.
- [91] Fischer, *Fischer Universal Plug UX Green*, Waldachtal, **2013**.
- [92] D. S. Ogunniyi, *Bioresour. Technol.* **2006**, 97(9), 1086–1091.
- [93] D. D. Nanavati, *J. Sci. Ind. Res.* **1976**, 35(3), 163.
- [94] K. Yamataka, Y. Matsuoka, T. Isoya, *Process for producing sebacic acid*, Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha, US Patent Nr. 4237317 A, **1980**.
- [95] W. N. Alexander, *Liquid phase oxidation of organic compounds*, Gen Aniline & Film Corp, US Patent Nr. 2821534 A, **1958**.
- [96] Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard, R. Langer, *Nat. Biotech.* **2002**, 20(6), 602–606.
- [97] N. Gregersen, S. Kølvråa, P. Brøbech Mortensen, K. Rasmussen, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* **1982**, 42(161), 15–27.
- [98] J. Tamada, R. Langer, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1992**, 3(4), 315–353.
- [99] D. G. Lee, R. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86(15), 3051–3056.
- [100] J. Muzart, *Chem. Rev.* **1992**, 92(1), 113–140.
- [101] E. F. Pratt, J. F. Van De Castle, *J. Org. Chem.* **1961**, 26(8), 2973–2975.
- [102] R. Noyori, T. Ohkuma, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40(1), 40–73.
- [103] C. F. de Graauw, J. A. Peters, H. van Bekkum, J. Huskens, *Synthesis* **1994**, 1994(10), 1007–1017.
- [104] T. T. Tidwell, *Synthesis* **1990**, 1990(10), 857–870.

- [105] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125–142.
- [106] S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*(4), 272–279.
- [107] P. K. Agarwal, S. P. Webb, S. Hammes-Schiffer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(19), 4803–4812.
- [108] J. Benach, S. Atrian, R. González-Duarte, R. Ladenstein, *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*(2), 335–355.
- [109] O. De Smidt, J. C. Du Preez, J. Albertyn, *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*(7), 967–978.
- [110] C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*(14), 1789–1805.
- [111] S. M. A. D. Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*(12), 1260–1266.
- [112] J. Jin, U. Hanefeld, *Chem. Commun.* **2011**, *47*(9), 2502–2510.
- [113] Y.-C. Joo, E.-S. Seo, Y.-S. Kim, K.-R. Kim, J.-B. Park, D.-K. Oh, *J. Biotech.* **2012**, *158*(1–2), 17–23.
- [114] M. J. van der Werf, W. J. J. van den Tweel, J. Kamphuis, S. Hartmans, J. A. M. de Bont, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*(3), 95–103.
- [115] T. M. Kuo, A. C. Lanser, L. K. Nakamura, C. T. Hou, *Curr. Microbiol.* **2000**, *40*(2), 105–109.
- [116] D. Brodkorb, M. Gottschall, R. Marmulla, F. Lüddecke, J. Harder, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*(40), 30436–30442.
- [117] R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *176*(3), 497–508.
- [118] D. Umeno, A. V. Tobias, F. H. Arnold, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2005**, *69*(1), 51–78.
- [119] B. J. Bahnson, V. E. Anderson, G. A. Petsko, *ACS Biochem.* **2002**, *41*(8), 2621–2629.
- [120] H.-D. Hahn, G. Dämbkes, N. Rupprich, H. Bahl, „Butanols“ in *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2000**.
- [121] X. Feng, J. Yun, *ACS Biochem.* **2010**, *16*(46), 13609–13612.

- [122] H. C. Brown, P. Geoghegan, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89(6), 1522–1524.
- [123] H. C. Brown, B. C. S. Rao, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78(21), 5694–5695.
- [124] I. A. Rose, J. V. B. Warms, R. G. Yuan, *ACS Biochem.* **1993**, 32(33), 8504–8511.
- [125] P. Willadsen, H. Eggerer, *Eur. J. Biochem.* **1975**, 54(1), 247–252.
- [126] G. B. Seiffert, G. M. Ullmann, A. Messerschmidt, B. Schink, P. M. H. Kroneck, O. Einsle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104(9), 3073–3077.
- [127] A. Kisic, Y. Miura, G. J. Schroepfer Jr., *Lipids* **1971**, 6(8), 541–545.
- [128] B. Yang, H. Chen, Y. Song, Y. Chen, H. Zhang, W. Chen, *Biotechnol. Lett.* **2013**, 35(1), 75–81.
- [129] B. Leeuwen, A. Wulp, I. Duijnste, A. Maris, A. Straathof, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93(4), 1377–1387.
- [130] P. Marliere, *Method for producing an alkene comprising the step of converting an alcohol by an enzymatic dehydration step*, Philippe Marliere, WO Patent Nr. 2011076691 A1, **2011**.
- [131] L. E. Bevers, M. W. Pinkse, P. D. Verhaert, W. R. Hagen, *J. Bacteriol.* **2009**, 191(15), 5010–5012.
- [132] D. A. Evans, J. Bartroli, T. L. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103(8), 2127–2129.
- [133] T. D. Machajewski, C.-H. Wong, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39(8), 1352–1375.
- [134] C. Palomo, M. Oiarbide, J. M. García, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33(2), 65–75.
- [135] P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43(39), 5138–5175.
- [136] C. V. Hanson, Y. Nishiyama, S. Paul, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16(6), 631–636.
- [137] B. Siebers, P. Schönheit, *Curr. Opinion Microbiol.* **2005**, 8(6), 695–705.
- [138] M. D. Scamuffa, R. M. Caprioli, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 614(2), 583–590.
- [139] T. Bach, *Lipids* **1995**, 30(3), 191–202.
- [140] P. Clapés, W.-D. Fessner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14(2), 154–167.

- [141] S. Takayama, G. J. McGarvey, Wong, Chi-Huey, *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*(1), 285–310.
- [142] S. M. Dean, W. A. Greenberg, C.-H. Wong, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*(8–9), 1308–1320.
- [143] R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Enzyme Catalyzed Reactions*, 2. Aufl., Academic Press, London, **2002**.
- [144] I. A. Rose, E. L. O’Connell, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*(1), 126–134.
- [145] G. J. Williams, S. Domann, A. Nelson, A. Berry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*(6), 3143–3148.
- [146] J. S. Griffiths, M. Cheriyan, J. B. Corbell, L. Pocivavsek, C. A. Fierke, E. J. Toone, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*(15), 4067–4074.
- [147] H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*(2), 221–228.
- [148] D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*(1), 751–793.
- [149] L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Rothlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas 3rd, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science* **2008**, *319*(5868), 1387–1391.
- [150] A. Zanghellini, L. Jiang, A. M. Wollacott, G. Cheng, J. Meiler, E. A. Althoff, D. Röthlisberger, D. Baker, *Protein Sci.* **2006**, *15*(12), 2785–2794.
- [151] F. Richter, A. Leaver-Fay, S. D. Khare, S. Bjelic, D. Baker, *PLOS ONE* **2011**, *6*(5), e19230.
- [152] J. Meiler, D. Baker, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2006**, *65*(3), 538–548.
- [153] D. N. Bolon, S. L. Mayo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*(25), 14274–14279.
- [154] J. K. Lassila, H. K. Privett, B. D. Allen, S. L. Mayo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*(45), 16710–16715.
- [155] V. Nanda, R. L. Koder, *Nat. Chem.* **2010**, *2*(1), 15–24.
- [156] T. K. Hyster, L. Knörr, T. R. Ward, T. Rovis, *Science* **2012**, *338*(6106), 500–503.

- [157] F. Richter, R. Blomberg, S. D. Khare, G. Kiss, A. P. Kuzin, A. J. T. Smith, J. Gallaher, Z. Pianowski, R. C. Helgeson, A. Grjasnow, R. Xiao, J. Seetharaman, M. Su, S. Vorobiev, S. Lew, F. Forouhar, G. J. Kornhaber, J. F. Hunt, G. T. Montelione, L. Tong, K. N. Houk, D. Hilvert, D. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*(39), 16197–16206.
- [158] D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, *453*(7192), 190–195.
- [159] J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St.Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael, D. Baker, *Science* **2010**, *329*(5989), 309–313.
- [160] L. Giger, S. Caner, R. Obexer, P. Kast, D. Baker, N. Ban, D. Hilvert, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*(8), 494–498.
- [161] S. Honda, *Substrate characterization and protein engineering of bacterial cytochrome P450 monooxygenases for the bio-based synthesis of omega-hydroxy aliphatic compounds*, Dissertation, ITB Stuttgart **2013**.
- [162] E. Hornung, M. Walther, H. Kuhn, I. Feussner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*(7), 4192–4197.
- [163] J. Delcarte, M. Fauconnier, P. Jacques, K. Matsui, P. Thonart, M. Marlier, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2003**, *786*(1–2), 229–236.
- [164] K. Matsui, C. Ujita, S. Fujimoto, J. Wilkinson, B. Hiatt, V. Knauf, T. Kajiwara, I. Feussner, *FEBS Lett.* **2000**, *481*(2), 183–188.
- [165] N. Tijet, C. Schneider, B. L. Muller, A. R. Brash, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *386*(2), 281–289.
- [166] A. Z. Andreou, E. Hornung, S. Kunze, S. Rosahl, I. Feussner, *Lipids* **2009**, *44*(3), 207–215.
- [167] T. Ishige, A. Tani, Y. Sakai, N. Kato, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*(8), 3481–3486.
- [168] J. Kittelberger, *Prokaryotische in vivo Synthese von Azelainsäure*, Diplomarbeit, ITB Stuttgart **2013**.

- [169] E. Maurer, *Vervollständigung der Retrobiosynthese von Sebacinsäure – die OAH1 Reaktion*, Diplomarbeit, ITB Stuttgart **2014**.
- [170] F. Mao, W.-Y. Leung, *Methods of using dyes in association with nucleic acid staining or detection and associated technology*, Biotium, Inc., US Patent Nr. 8232050 B2, **2012**.
- [171] S. Adkins, M. Burmeister, *Anal. Biochem.* **1996**, 240(1), 17–23.
- [172] T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao, *Nat. Protoc.* **2007**, 2(10), 2451–2458.
- [173] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90(14), 3732–3738.
- [174] J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, 34(9), 2543–2549.
- [175] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95(2), 512–519.
- [176] H. Withers, „Direct Plasmid Transfer Between Bacterial Species and Electrocurving“ in *Electroporation Protocols for Microorganisms SE – 3, Band 47*, Humana Press, New Jersey, **1995**, 47–54.
- [177] K. B. Mullis, F. A. Faloona, „Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction“ in *Recombinant DNA Part F*, Academic Press, San Diego, **1987**, 335–350.
- [178] C. Mühlhardt, *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*, 5. Aufl., Elsevier, München, **2006**.
- [179] A. Geerts, D. Feltkamp, S. Rosahl, *Plant Physiol.* **1994**, 105, 269–277.
- [180] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227(5259), 680–685.
- [181] K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.* **1969**, 244(16), 4406–4412.
- [182] J. Sambrook, D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2000**.
- [183] Thermo Scientific, *T4 DNA Ligase - Product Information*, Waltham, **2012**.
- [184] T. T. Ngo, H. M. Lenhoff, *Anal. Biochem.* **1980**, 105(2), 389–397.
- [185] G. E. Anthon, D. M. Barrett, *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49(1), 32–37.
- [186] C. Ingram, A. Brash, *Lipids* **1988**, 23(4), 340–344.

- [187] M. J. Gibian, P. Vandenberg, *Anal. Biochem.* **1987**, *163*(2), 343–349.
- [188] C. Gastl, S. Laschat, *Synthesis* **2010**, (15), 2643–2651.
- [189] A. J. Mancuso, D. Swern, *Synthesis* **1981**, *1981*(03), 165,185.
- [190] E. J. Corey, J. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*(31), 2647–2650.
- [191] J. Nichols, E. Schipper, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*(21), 5705–5710.
- [192] G. O. Becker, G. Domschke, E. Fanghänel, M. Fischer, W. Berger, K. Gewalt, R. Gluch, D. Pavel, E. S. K. Schwetlick, *Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum*, 20. Aufl., J. A. Barth Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [193] J. M. Khurana, S. Chauhan, G. Bansal, *Monatsh. Chem.* **2004**, *135*(1), 83–87.
- [194] S. M. P. Meneghetti, M. R. Meneghetti, C. R. Wolf, E. C. Silva, G. E. S. Lima, L. de Lira Silva, T. M. Serra, F. Cauduro, L. G. de Oliveira, *Energy Fuels* **2006**, *20*(5), 2262–2265.
- [195] W. W. Christie, *Lipid Analysis*, 3. Aufl., The Oily Press, Bridgewater, **2003**, 207f.
- [196] S.-I. Ohsugi, K. Nishide, K. Oono, K. Okuyama, M. Fudesaka, S. Kodama, M. No-de, *Tetrahedron* **2003**, *59*(42), 8393–8398.
- [197] E. W. Bousquet, *Org. Synth.* **1943**, *2*, 313.
- [198] J. A. Kenar, S. Z. Erhan, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, (9), 1–6.
- [199] J. A. Kenar, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2002**, (1), 351–356.
- [200] H. W. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1001*(3), 274–281.
- [201] T. Matoba, H. Hidaka, K. Kitamura, N. Kaizuma, M. Kito, *J. Agric. Food. Chem.* **1985**, *33*(5), 856–858.
- [202] A. N. Grechkin, *Prostag. Oth. Lip. M.* **2002**, *68-69*(0), 457–470.
- [203] T. Kajiwara, J. Sekiya, M. Asano, A. Hatanaka, *Agr. Biol. Chem. Tokyo* **1982**, *46*(12), 3087–3088.
- [204] Y. Zheng, W. E. Boeglin, C. Schneider, A. R. Brash, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*(8), 5138–5147.

- [205] K. Mizuno, T. Iida, A. Takano, M. Yokoyama, T. Fujimura, *Plant Cell Physiol.* **2003**, 44(11), 1168–1175.
- [206] K. B. Otte, M. Kirtz, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemSusChem* **2013**, 6, 2149–2156.
- [207] E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353(13), 2239–2262.
- [208] J. L. Haining, B. Axelrod, *J. Biol. Chem.* **1958**, 232(1), 193–202.
- [209] A. P. Kulkarni, A. Mitra, J. Chaudhuri, J. Z. Byczkowski, I. Richards, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 166(1), 417–423.
- [210] K. B. Otte, J. Kittelberger, M. Kirtz, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemCatChem* **2013**.
- [211] P. J. Farabaugh, *Nature* **1978**, 274(5673), 765–769.
- [212] J. K. Huang, J. Lamer, L. Wen, *FASEB J.* **2004**, 18(C15).
- [213] E. Maurer, *Klonierung und Charakterisierung der mikrobiellen Dehydrathase OAH1 aus Elizabethkingia meningoseptica*, Studienarbeit, ITB Stuttgart **2012**.
- [214] M. Buchhaupt, J. Guder, M. Etschmann, J. Schrader, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93(1), 159–168.
- [215] H. Fukushige, D. F. Hildebrand, *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, 53(17), 6877–6882.
- [216] H. Fukushige, D. F. Hildebrand, *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, 53(6), 2046–2051.
- [217] J. G. Thomas, F. Baneyx, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(19), 11141–11147.
- [218] Y. Shirano, D. Shibata, *FEBS Lett.* **1990**, 271(1&2), 128–130.
- [219] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, *J. Bacteriol.* **1995**, 177(14), 4121–4130.
- [220] A. H. Rosenberg, B. N. Lade, C. Dao-shan, S.-W. Lin, J. J. Dunn, F. Studier, *Gene* **1987**, 56(1), 125–135.
- [221] V. Nikolaev, P. Reddanna, J. Whelan, G. Hildenbrandt, C. Reddy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 170(2), 491–496.
- [222] H. W.-S. Chan, G. Levett, J. Matthew, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, (17), 756–757.

- [223] N. A. Porter, D. G. Wujek, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*(9), 2626–2629.
- [224] M. O. Funk, J. C. Andre, T. Otsuki, *ACS Biochem.* **1987**, *26*(21), 6880–6884.
- [225] Y. Shibata, K. Matsui, T. Kajiwara, *Plant Cell Physiol.* **1995**, *36*(1), 147–156.
- [226] J. Delcarte, P. Jacques, M. L. Fauconnier, P. Hoyaux, K. Matsui, M. Marlier, P. Thonart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*(1), 28–32.
- [227] H. W. Gardner, *J. Agr. Food Chem.* **1975**, *23*(2), 129–136.
- [228] F. Guéraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P. M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems, K. Uchida, *Free Radical Res.* **2010**, *44*(10), 1098–1124.
- [229] B. Halliwell, *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 715–725.
- [230] Z. Cheng, Y. Li, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 748–766.
- [231] A. S. Németh, J. S. Márczy, Z. Samu, A. Hágner-Veress, B. Szajáni, *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*(7), 667–672.
- [232] M. A. Noordermeer, W. van der Goot, A. J. van Kooij, J. W. Veldsink, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*(15), 4270–4274.
- [233] F.-C. Huang, C. Studart-Witkowski, W. Schwab, *Plant Biotechnol. J.* **2010**, *8*(7), 783–795.
- [234] M. C. Feiters, R. Aasa, B. G. Malmström, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *873*(2), 182–189.
- [235] W. Lands, R. Lee, W. Smith, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1971**, *180*(1), 107–122.
- [236] M. P. Santiago-Gómez, C. Vergely, C. Policar, J.-M. Nicaud, J.-M. Belin, L. Rochette, F. Husson, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*(1–2), 13–18.
- [237] C. N. S. P. Suurmeijer, M. Pérez-Gilabert, D.-J. van Unen, H. T. W. M. van der Hijden, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, *Phytochem.* **2000**, *53*(2), 177–185.
- [238] F.-C. Huang, W. Schwab, *Plant Biotechnol. J.* **2012**, *10*(9), 1099–1109.
- [239] H. Gardner, N. Deighton, *Lipids* **2001**, *36*(6), 623–628.
- [240] R. León, P. Fernandes, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*(7–8), 483–500.

- [241] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, 409(6817), 258–268.
- [242] A. Schmid, F. Hollmann, J. B. Park, B. Bühler, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13(4), 359–366.
- [243] K. Hammer, I. Mijakovic, P. R. Jensen, *Trends Biotechnol.* **2006**, 24(2), 53–55.
- [244] A. Zaslaver, A. Bren, M. Ronen, S. Itzkovitz, I. Kikoin, S. Shavit, W. Liebermeister, M. G. Surette, U. Alon, *Nat. Meth.* **2006**, 3(8), 623–628.
- [245] T. Q. Do, J. R. Schultz, C. F. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, 93(15), 7534–7539.
- [246] E. Skřivanová, M. Marounek, V. Benda, P. Brezina, *Vet. Med.-Czech* **2006**, 51(3), 81.
- [247] M. Marounek, E. Skřivanová, V. Rada, *Folia Microbiol. (Prague, Czech Repub.)* **2003**, 48(6), 731–735.
- [248] J. P. Leeming, K. T. Holland, R. A. Bojar, *Br. J. Dermatol.* **1986**, 115(5), 551–556.
- [249] G. Carrea, *Trends Biotechnol.* **1984**, 2(4), 102–106.
- [250] M. G. Wubbolts, O. Favre-Bulle, B. Witholt, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 52(2), 301–308.
- [251] J. L. Slonczewski, B. P. Rosen, J. R. Alger, R. M. Macnab, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78(10), 6271–6275.
- [252] A. Mabrouk, L. R. Dugan Jr., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1961**, 38(1), 9–13.
- [253] D. Clark, *J. Bacteriol.* **1981**, 148(2), 521–526.
- [254] P. N. Black, C. C. DiRusso, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2003**, 67(3), 454–472.
- [255] F. Kamp, D. Zakim, F. Zhang, N. Noy, J. A. Hamilton, *ACS Biochem.* **1995**, 34(37), 11928–11937.
- [256] F. Kamp, J. A. Hamilton, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2006**, 75(3), 149–159.
- [257] J. E. Schaffer, *Am. J. Physiol. Endocrinol.* **2002**, 282(2), 239–246.

- [258] K. Kameda, Y. Imai, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 832(3), 343–350.
- [259] K. Kameda, W. D. Nunn, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256(11), 5702–5707.
- [260] S. H. Iram, J. E. Cronan, *J. Bacteriol.* **2006**, 188(2), 599–608.
- [261] B.-K. Cho, E. M. Knight, B. O. Palsson, *Microbiol.* **2006**, 152(8), 2207–2219.
- [262] G. Pauli, R. Ehring, P. Overath, *J. Bacteriol.* **1974**, 117(3), 1178–1183.
- [263] M. F. Henry, J. E. Cronan Jr., *Cell* **1992**, 70(4), 671–679.
- [264] A. Higashitani, Y. Nishimura, H. Hara, H. Aiba, T. Mizuno, K. Horiuchi, *Mol. Gen. Genet.* **1993**, 240(3), 339–347.
- [265] E. J. Corey, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, 30(5), 455–465.
- [266] E. Siirola, A. Frank, G. Grogan, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355(9), 1677–1691.
- [267] G. Grogan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19–20(0), 73–82.
- [268] Y. Kawagoshi, M. Fujita, *World. J. Microb. Biot.* **1998**, 14(1), 95–100.
- [269] M. Shima, T. Tamogami, S. Kishida, S. Harayama, *Microbiol.* **2000**, 146(3), 649–657.
- [270] R. Hirota-Mamoto, R. Nagai, S. Tachibana, M. Yasuda, A. Tani, K. Kimbara, F. Kawai, *Microbiol.* **2006**, 152(7), 1941–1949.
- [271] J.-W. Song, E.-Y. Jeon, D.-H. Song, H.-Y. Jang, U. T. Bornscheuer, D.-K. Oh, J.-B. Park, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52(9), 2534–2537.
- [272] M.-H. Seo, K.-R. Kim, D.-K. Oh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97(20), 8987–8995.
- [273] L. L. Wallen, E. N. Davis, Y. V. Wu, W. K. Rohwedder, *Lipids* **1971**, 6(10), 745–750.
- [274] Y.-C. Joo, K.-W. Jeong, S.-J. Yeom, Y.-S. Kim, Y. Kim, D.-K. Oh, *Biochimie* **2012**, 94(3), 907–915.
- [275] C. Hou, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, 72(11), 1265–1270.

- [276] A. Hiseni, R. Medici, I. W. C. E. Arends, L. G. Otten, *Biotechnol. J.* **2014**, Vorab Online Version.
- [277] S. Reich, *Semi-rational and rational design of variable surface loop regions of the α -glucosidase NCR from *Zymomonas mobilis* and their influence on enzyme properties*, Dissertation, ITB Stuttgart **2013**.
- [278] M.-L. Fauconnier, A. Mpambara, J. Delcarte, P. Jacques, P. Thonart, M. Marlier, *Biotechnol. Lett.* **1999**, *21*(7), 629–633.
- [279] W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*(4), 369–384.
- [280] N. J. Turner, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*(11), 474–478.
- [281] M. Ivancic, G. Valinger, K. Gruber, H. Schwab, *J. Biotech.* **2007**, *129*(1), 109–122.
- [282] O. May, P. T. Nguyen, F. H. Arnold, *Nat. Biotech.* **2000**, *18*(3), 317–320.
- [283] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, *Genome Biol.* **2002**, *3*(7), 1–11.
- [284] M. Marone, S. Mozzetti, D. Ritis, L. Pierelli, G. Scambia, *Biol. Proced. Online* **2001**, *3*(1), 19–25.
- [285] K. Murphy, K. Campellone, *BMC Mol. Biol.* **2003**, *4*(1), 11.
- [286] D. L. Court, J. A. Sawitzke, L. C. Thomason, *Annu. Rev. Genet.* **2002**, *36*(1), 361–388.
- [287] H. Alper, C. Fischer, E. Nevoigt, G. Stephanopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*(36), 12678–12683.
- [288] H. Kuroda, H. Kojima, H. Kaneda, M. Takashio, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*(9), 1661–1668.
- [289] D. R. Phillips, J. A. Matthew, J. Reynolds, G. Fenwick, *Phytochem.* **1979**, *18*(3), 401–404.
- [290] R. Stürmer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*(2), 203–213.
- [291] S. Y. Lee, D.-Y. Lee, T. Y. Kim, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*(7), 349–358.

- [292] N. Schauer, D. Steinhauser, S. Strelkov, D. Schomburg, G. Allison, T. Moritz, K. Lundgren, U. Roessner-Tunali, M. G. Forbes, L. Willmitzer, A. R. Fernie, J. Kopka, *FEBS Lett.* **2005**, 579(6), 1332–1337.
- [293] Z. Wei, Y. Xingju, Y. Quan, *Biotechnol. Tech.* **1993**, 7(5), 379–384.
- [294] C. J. Paddon, P. J. Westfall, D. J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D. R. Polichuk, K. H. Teoh, D. W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Diola, G. Dorin, K. W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S. P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, H. Jiang, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L. F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievens, P. S. Covello, J. D. Keasling, K. K. Reiling, N. S. Renninger, J. D. Newman, *Nature* **2013**, *advance on*.
- [295] E. Sakuradani, M. Kobayashi, T. Ashikari, S. Shimizu, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 261(3), 812–820.
- [296] E. Sakuradani, M. Kobayashi, S. Shimizu, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 260(1), 208–216.
- [297] D. C. Knipple, C.-L. Rosenfield, S. J. Miller, W. Liu, J. Tang, P. W. K. Ma, W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95(26), 15287–15292.
- [298] F. J. van de Loo, P. Broun, S. Turner, C. Somerville, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 6743–6747.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Konrad B. Otte
 Geburtsdatum/-ort: 06.06.1984 in Stuttgart, Deutschland
 Nationalität: deutsch
 Anschrift: Böblinger Straße 44, 70199 Stuttgart
 E-Mail: Konrad.Otte@gmx.de

Hochschul- und Schulbildung

07.2010 – 06.2014: **Promotion bei Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart**
Dissertation: Enzymatischer Zugang zu mittelkettigen Dicarbonsäuren

10.2004 – 05.2010: **Diplomstudium Chemie Universität Stuttgart**
Diplomarbeit: Das Fehlen des ER-Membranproteins Dfm1 führt zu Kex1 Protease vermittelter Apoptose

10.2007 – 03.2008: **Fortgeschrittenes Synthesepraktikum in Organischer Chemie University of Leicester, Großbritannien**
Pinacol Coupling Reactions with Cyclopropylketons

09.1990 – 07.2004: **Abitur am Württemberg-Gymnasium, Stuttgart**

Praktische Erfahrung und Stipendien

07.2011 – 06.2014: **Dissertationsstipendium**
Stipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetzes (LGFG)

10.2007 – 03.2008: **Auslandsstipendium**
ERASMUS-Stipendium der Europäischen Union

10.2006 – 04.2009: **Übungstutor für Physikalische Chemie**
Thermodynamik

10.2006 – 04.2007: **Praktikumsassistent für Anorganische Chemie**
Qualitative Analyse