

Zur Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklenen als chirale Brønsted-Säuren in der asymmetrischen Katalyse

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

Vorgelegt von
Stephan C. Hammer
aus Kandel

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Bernd Plietker
Vorsitzende:	Prof. Dr. Cosima Stubenrauch
Tag der mündlichen Prüfung:	15.12.2014

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

- 2014 -

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer in der Zeit von September 2010 bis Oktober 2014 am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

Hammer, S.C., Marjanovic, A., Dominicus, J.M., Nestl, B.M. & Hauer, B. "Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis." *Nature Chemical Biology* **2015**, *11*, 121-126.

Syrén, P.-O., **Hammer, S.C.**, Claasen, B. & Hauer, B. "Entropy is key to the formation of pentacyclic terpenoids by enzyme-catalyzed polycyclization." *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 4845-4849.

Nestl, B.M., **Hammer, S.C.**, Nebel, B.A. & Hauer, B. "New generation of biocatalysts for organic synthesis." *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 3070-3095.

Faber, K., Glück, S.M., **Hammer, S.C.**, Hauer, B. & Nestl, B.M. "Emerging Enzymes" *Science of Synthesis, Biocatalysis in Organic Synthesis 3*, Thieme (Stuttgart), **2014**, 547-578.

Hammer, S.C., Syrén, P.-O., Seitz, M., Nestl, B.M. & Hauer, B. "Squalene hopene cyclases: Highly promiscuous and evolvable catalysts for stereoselective C-C and C-X bond formation." *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 293-300.

Hammer, S.C., Nestl, B.M. & Hauer, B. „Schlummerndes Synthesepotenzial in Enzymen: Wie können wir es wecken?“ *BIOspektrum* **2013**, *19*, 574-576.

Hammer, S.C., Dominicus, J.M., Syrén, P.-O., Nestl, B.M. & Hauer, B. "Stereoselective Friedel-Crafts alkylation catalyzed by squalene hopene cyclases." *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7624-7629.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Zur Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklasen als chirale Brønsted-Säuren in der asymmetrischen Katalyse*“ 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 „*Applicability of squalene-hopene-cyclases as chiral Brønsted acids in asymmetric catalysis*“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, 24.01.2015

Stephan C. Hammer

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung dieses faszinierenden Themengebiets, die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie die ausgezeichnete Betreuung und großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Bernd Plietker danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und Frau Prof. Dr. Cosima Stubenrauch danke ich für die freundliche Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Bettina Nestl für die ausgezeichnete Betreuung sowie die wertvollen Ratschläge und spannenden Diskussion, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich bedanke mich besonders bei Herrn Dr. Bernd Nebel für die sehr hilfreichen Diskussionen und Ratschläge vor allem im Bereich der analytischen Chemie und darüber hinaus für die selbstlose und uneigennützig Instandhaltung und Pflege des analytischen Equipments, wodurch ein effizienter Laborbetrieb ermöglicht wurde. Beiden danke ich ganz herzlich für die großzügige Unterstützung auf verschiedenen Ebenen sowie die vielen kulinarischen Abende, welche in besonderer Erinnerung bleiben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Sandra Facey für die vielen hilfreichen Tipps bei den molekularbiologischen Arbeiten sowie für die Bereitstellung des besten Arbeitsplatzes am Institut.

Ich bedanke mich sehr herzlich für die tolle Zusammenarbeit bei allen Bachelor- Master- und Diplomstudenten. Ich danke Christine Gally für ihre hervorragende Leistung und den unermüdlichen Einsatz, welche einen schnellen Einstieg in das Projekt ermöglichten, Jörg Dominicus für die exzellente Unterstützung bei zahlreichen organischen Synthesen, Jens Schmid und Miriam Kuhn für ihre erstklassige Hilfe bei der Synthese unterschiedlicher Modellsubstrate sowie Antonija Marjanovic für ihre ausgezeichnete Performance bei der Erstellung der Mutantenbibliothek sowie beim *screening* unterschiedlicher Modellsubstrate.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich herzlich für das vergnügliche Arbeitsklima, dies gilt besonders für Sandra Notonier, Juliane Stahmer und Dennis Wetzl. Darüber hinaus danke ich ganz herzlich Mihaela Antonovici, Silke Bastian, Jennifer Bolsinger, Dominique Darimont, Thorsten Henkes, Lars Hinner, Sara Hoffmann, Dr. Sumire Honda, Pipo Inhibitore & Toto Noncatalytico, Marko Kirtz, Tobias Klaus, Dr. Janosch Klebensberger, Jan Klenk, Nico Kress, Lisa Kühnel, Sebastian Löw, Dr. Konrad Otte, Dr. Sabrina Reich, Schronk Ribery, Sven Richter, Ondrej Reznicek, Philipp Scheller, Dr. Daniel Scheps, Dr. Miriam Seitz, Philipp Trauzettel, Elaine Udrei, Dr. Sandra Vlahovic und Dr. Martin Weissenborn.

Ich danke Dr. Per-Olof Syrén für die spannende und fruchtbare Zusammenarbeit und wünsche ihm weiterhin viel Erfolg.

Mein besonderer Dank gilt Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss und Dr. Michael Widmann für die Unterstützung bei den bioinformatischen Arbeiten, Dr. Birgit Claasen für die freundliche Unterstützung bei den NMR Experimenten, Dr. Eric Kervio für die freundliche Unterstützung bei der Polarimetrie sowie Dr. Michael Breuer für die Bereitstellung des *AacSHC*-Plasmids.

Ich danke dem Fonds der chemischen Industrie für die großzügige Unterstützung im Rahmen eines Kekulé-Stipendiums sowie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) für die großzügige finanzielle Unterstützung bei Tagungsreisen.

Zum Abschluss möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie und in dem Zusammenhang besonders bei Yvonne Ackermann für die stetige Unterstützung bedanken.

Für Yvonne Christine Ackermann,

Danke.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	16
ZUSAMMENFASSUNG	18
ABSTRACT	21
1. EINLEITUNG	24
2. STAND DER FORSCHUNG	25
2.1. Biokatalyse	25
2.1.1. Das Reaktionsspektrum der Biokatalyse	25
2.1.2. Identifizierung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren	27
2.2. Brønsted-Säure-Katalyse	30
2.2.1. Chirale Brønsted-Säuren in der homogenen Katalyse	31
2.2.2. Allgemeine und spezifische Brønsted-Säure-Katalyse bei Enzymen	33
2.3. Squalen-Hopen-Zyklasen	34
2.3.1. Funktion und Struktur	35
2.3.2. Die Protonierungsmaschinerie	37
2.3.3. Umsetzungen von nicht-natürlichen Substraten	38
3. FRAGESTELLUNG	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1. Die Protonase-Superfamilie	43
4.2. Klonierung, Expression und Charakterisierung der <i>AacSHC</i>	46
4.3. Polyzyklisierungen funktionalisierter isoprenoider Polyene	49
4.3.1. Stereoselektive Friedel-Crafts-Alkylierung	50
4.3.2. Stereoselektive Hydroamidierung	52
4.3.3. C-S-Bindungsknüpfung mit Thiolen	55
4.4. Die reaktive Konformation: Auswirkung und Adressierung	57
4.4.1. Stabilisierung der reaktiven Konformation durch <i>substrate engineering</i>	57

4.4.2.	Design und Charakterisierung der <i>Aac</i> SHC-Mutantenbibliothek	60
4.5.	Monozyklisierungen durch Aktivierung von Prenylgruppen	63
4.6.	Monozyklisierungen durch Aktivierung von Epoxiden.....	68
4.7.	Prins/En-Reaktion durch Aktivierung von Carbonylen.....	71
4.8.	Michael-Addition und Nazarov-Zyklisierung	77
5.	DISKUSSION	79
5.1.	Protonasen in der asymmetrischen Brønsted-Säure-Katalyse	79
5.1.1.	Nicht-natürliche Polyzyklisierungsreaktionen	79
5.1.2.	Erweiterung des Reaktionsspektrums	82
5.1.3.	Vergleich zu chiralen Brønsted-Säuren aus der Organokatalyse	84
5.2.	Limitierende Faktoren für ein größeres Reaktionsspektrum	85
5.3.	<i>Enzyme engineering</i> mit Protonasen.....	88
5.3.1.	Hydrophobe Substitution als Mutationsstrategie	88
5.3.2.	Funktionsweise der identifizierten positiven Mutationen	90
5.4.	Reaktionsmechanismen-gesteuertes Enzymdesign.....	91
6.	AUSBLICK	94
7.	MATERIAL UND METHODEN	98
7.1.	Material	98
7.1.1.	Chemikalien	98
7.1.2.	Enzyme für molekularbiologische Arbeiten	98
7.1.3.	Molekularbiologische Kits	98
7.1.4.	Primer	98
7.1.5.	Plasmide	101
7.2.	Medien und Zellkulturen	104
7.2.1.	<i>E. coli</i> Stämme	104
7.2.2.	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	104
7.2.3.	Zellwachstum und Dauerkulturen	104
7.3.	Molekularbiologische Methoden	105
7.3.1.	Polymerase-Kettenreaktion	105
7.3.2.	Agarose-Gelelektrophorese.....	105

7.3.3.	Klonierung von Plasmiden	106
7.3.4.	Hydrolytische Spaltung von DNA	106
7.3.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	106
7.3.6.	Transformation von Plasmid-DNA	107
7.3.7.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	107
7.3.8.	Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Sequenzierung	108
7.3.9.	Ortsgerichtete Mutagenese	108
7.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	110
7.4.1.	Proteinexpression	110
7.4.2.	Proteinaufreinigung.....	110
7.4.3.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	113
7.4.4.	Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	114
7.5.	Chemisch-analytische Methoden.....	115
7.5.1.	Gaschromatographie.....	115
7.5.2.	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR).....	116
7.5.3.	Weitere Methoden	116
7.6.	Chemische Synthesen	117
7.6.1.	Synthese verschiedener prenylierter Alkohole.....	117
7.6.2.	Synthese weiterer Substrate	119
7.7.	Enzymatische Synthesen.....	126
7.7.1.	Analytische Biotransformationen.....	126
7.7.2.	Präparative Biotransformationen.....	126
7.8.	Bioinformatische Methoden.....	131
	LITERATURVERZEICHNIS	132
	ANHANG.....	157
	CURRICULUM VITAE	160

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro (10^{-6})
δ	chemische Verschiebung
AacSHC	Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DC	Diterpen-Zyklase
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
<i>de</i>	Diastereomerenüberschuss
DIAD	Azodicarbonsäurediisopropylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
eq	Äquivalent
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEX	Ionenaustausch-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	Masse
M	Molar
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanz

OSC	Oxidosqualen-Zyklase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Base</i>
ppm	<i>parts per million</i>
psi	<i>pound per square inch</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SC	Squalen-Zyklase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	TRIS Acetat EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Handelsname für (<i>p-tert</i> -Ocytlphenoxy)-polyethoxyethanol
UpM	Umdrehungen pro Minute
<i>ZmoSHC1</i>	Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus <i>Zymomonas mobilis</i>
z. B.	zum Beispiel

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung von Enzymen und Mikroorganismen als Katalysatoren in der organischen Synthese hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten als eine ernsthafte Ergänzung zur rein chemischen Katalyse etabliert. Jedoch ist die Bandbreite an biokatalytisch durchführbaren Reaktionen sehr gering. Für eine Vielzahl an synthetisch wertvollen Reaktionen wurden entsprechende Enzyme von der Natur nicht evolviert oder bisher nicht entdeckt. Die Entwicklung solcher Enzyme für die Katalyse nicht-physiologischer chemischer Transformationen ist ein zum größten Teil unerforschtes Arbeitsgebiet. Ein Ansatzpunkt ist die Nutzbarmachung bereits vorhandener enzymatischer Katalysezentren. Dies ist auch von besonders großer Bedeutung, da viele der in der organischen Chemie divers eingesetzten Aktivierungsmodi Bestandteil des enzymatischen Repertoires sind. Jedoch werden diese hoch-entwickelten enzymatischen Katalysezentren von der Natur häufig nur sehr spezialisiert eingesetzt und im Labor nur selten gezielt für nicht-natürliche Reaktionen entwickelt. In diesem Grenzgebiet, zwischen der organischen Synthesechemie und dem Enzymdesign, befindet sich der Fokus der hier vorliegenden Arbeit. Ziel war die Entwicklung einer Plattform für die enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse. Dies ermöglicht einen potentiellen biokatalytischen Zugang zu einer Vielzahl an nicht-physiologischen, jedoch synthetisch wertvollen chemischen Transformationen, da die chirale Brønsted-Säure-Katalyse in der organischen Chemie zur Durchführung einer Vielzahl an wichtigen C-C-bindungsknüpfenden Reaktionen verwendet wird. Dieser Ansatz verbindet die leistungsstarke Brønsted-Säure-Katalyse mit den Vorteilen der Biokatalyse, namentlich den oft exzellenten Selektivitäten zusammen mit hohen Aktivitäten basierend auf einer Synthese in Wasser als „grüneres“ Lösungsmittel. Biokatalysatoren sind genetisch kodiert und lassen sich somit mikrobiell synthetisieren und einfach durch genetische Manipulation optimieren

Während die allgemeine Brønsted-Säure-Katalyse bei Enzymen eine wichtige Rolle spielt (z. B. bei der Stabilisierung von Übergangszuständen durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen) ist die enzymatische, spezifische Brønsted-Säure-Katalyse nicht beschrieben. Eine Ausnahme bilden hier die Squalen-Hopen-Zyklasen (SHCs), welche die kationische Polyzyklisierung von Squalen zu den pentazyklischen Produkten Hopen und Hopanol katalysieren. Zur Protonierung der terminalen C=C-Bindung des Substrates nutzen SHCs eine Asparaginsäure mit biologisch ungewöhnlich hoher Acidität. Während dieser Doktorarbeit wurde das katalytische Potential dieser einzigartigen Protonierungsmaschinerie studiert.

In einem ersten Teil der Arbeit wurde das natürliche Reaktionsspektrum dieses katalytischen Zentrums (ausgestattet mit der hoch-aciden Asparaginsäure) untersucht. Durch die Verwendung verschiedener bioinformatischer Methoden wurden Proteinsequenzen evolutionär verwandter Enzyme ermittelt. Somit wurde eine Superfamilie an protonierenden Enzymen (Protonasen) identifiziert und bezüglich deren beschriebener Funktionen analysiert. Diese Studien zeigen, dass sich das Reaktionsspektrum dieser Protonase-Superfamilie in der Natur auf die Polyzyklisierung einiger weniger linearer Terpene beschränkt, ganz im Gegensatz zu der enormen Diversität Brønsted-Säure-katalysierter Reaktionen in der organischen Chemie.

Das Substratspektrum der SHCs und dabei besonders des Enzymes aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) wurde in der Vergangenheit mehrfach adressiert, wobei sich die Studien auf Polyzyklisierungen Squalen-artiger Substratanaloga beschränkten. In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Substratspektrum für Polyzyklisierungsreaktionen auf funktionalisierte Polyprenoide erweitert. Insbesondere wurde gezeigt, dass Aromaten und Amide als Nucleophile in der kationischen Polyzyklisierung verwendet werden können, um die Reaktionen zu terminieren. Somit sind formal die stereoselektive Friedel-Crafts-Alkylierung sowie die Hydroamidierung Bestandteil des Reaktionsportfolios der SHCs. Neben der AacSHC wurde in diesem Teil der Arbeit auch eine weitere SHC aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1) verwendet, wobei sich beide Enzyme nur minimal in ihren Funktionen unterscheiden.

Das Substratspektrum der SHCs ist bezüglich der Substratgröße beschränkt. Während sich mittelgroße Sesqui- und Diterpen-Derivate selektiv und mit guter Aktivität zu bi- und trizyklischen Verbindungen umsetzen lassen, werden Monoterpen-Derivate von den Wildtyp-Enzymen nicht zu den entsprechenden chiralen Cyclohexanoiden zyklisiert. Synthetisierte Modellsubstrate wurden in einem dritten Teil dieser Arbeit verwendet, um diese Limitierung zu untersuchen. Hierzu wurden die Aktivitäten bei enzymatischen Umsetzungen mit molekulardynamischen Simulationen verglichen. Somit wurde ein Zusammenhang zwischen der Substratbindung in einer reaktiven Konformation und der jeweiligen Aktivität aufgezeigt. Daraus lässt sich ableiten, dass vermutlich nicht die katalytische Maschinerie die SHCs auf die Polyzyklisierungschemie beschränkt, sondern die Struktur des hochselektiven aktiven Zentrums. Dieses aktive Zentrum diskriminiert nicht-natürliche Substrate durch die limitierte Fähigkeit diese in einer reaktiven Konformation zu binden.

Um SHCs zu „Protonasen“ für unterschiedliche nicht-natürliche Reaktionen zu entwickeln, ist deshalb ein breites Set an unterschiedlichen Geometrien des aktiven Zentrums nötig.

Dementsprechend lassen sich potentielle Substrate für unterschiedliche Reaktionstypen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in einer reaktiven Konformation binden. Jedoch sind die aktiven Zentren der SHCs und auch verwandter Triterpen-Zyklasen hochkonserviert. Die nötige Diversität an Enzymen lässt sich somit nicht aus dem natürlichen Pool an Katalysatoren rekrutieren. Aus diesem Grund wurde in einem vierten Teil der Arbeit eine Mutantenbibliothek der *AacSHC* erstellt. Mit einer rationalen Mutationsstrategie (hydrophobe Substitution) wurde die *AacSHC* zu einem Set an hochselektiven „Protonasen“ entwickelt und damit die Anwendbarkeit als chirale Brønsted-Säure in der asymmetrischen Katalyse untersucht. Die erzeugten Varianten zeigten Aktivitäten für unterschiedliche chemische Transformationen bei gleichzeitiger Protonierung verschiedener funktioneller Gruppen (Alken, Epoxid und Carbonyl). Dies ermöglichte die Darstellung interessanter Cyclohexanoide mit guten Aktivitäten und exzellenten Stereoselektivitäten (>99 % *ee/de*). Die praktische Anwendbarkeit wurde in semi-präparativen Umsetzungen aufgezeigt. So wurde zum Beispiel 512 mg Geraniol mit der Variante *AacSHC* G600F zu einem Cyclohexanoid umgesetzt (32 % isolierte Ausbeute). Demzufolge wurde durch die Einführung einer Punktmutation ein beinahe inaktives Wildtyp-Enzym zu einem praktisch anwendbaren Katalysator evolviert. Verdeutlicht werden die exzellenten Selektivitäten (Regio-, Stereo- und Produktselektivitäten) durch die exklusive Umsetzung von (*S*)-6,7-Epoxygeraniol aus dem entsprechenden Racemat (inklusive der regioselektiven Deprotonierung des Carbokation-Intermediates), die hochstereoselektive Synthese (>99 % *de*) von (-)-*iso*-Isopulegol aus (*S*)-Citronellal oder durch die stereoselektive Wasseraddition an das Carbokation-Intermediat der Zyklisierung von Geraniol. Der Ursprung der hohen Selektivitäten liegt in der Geometrie des aktiven Zentrums. Ausgehend von unterschiedlichen reaktiven Konformationen (welche zu unterschiedlichen Produkten führen können), werden die Substrate von den „Protonasen“ selektiv in einer bestimmten reaktiven Konformation gebunden und dadurch selektiv aktiviert.

Zusammenfassend wurde die einzigartige Protonierungsmaschinerie der SHCs von der Polyzyklisierungschemie befreit und für nicht-natürliche Reaktionen in die asymmetrische Katalyse eingeführt. Darüber hinaus leistet diese Arbeit einen methodischen Beitrag in der Entwicklung neuer Biokatalysatoren, da sie aufzeigt, dass Enzyme und deren Katalysezentren systematisch für nicht-physiologische Reaktionen entwickelt werden können. Dies ist interessant für die Etablierung neuer Biosynthesewege sowie für die Erweiterung der Reaktionsportfolios in der organischen Synthese (Stichwort: chirale Brønsted-Säure-Katalyse in Wasser).

ABSTRACT

The application of enzymes as biocatalysts in asymmetric synthesis has received steadily increasing attention over the past decades. However, the field is restricted since many enzymes on the synthetic chemist's *wish list* are not evolved by nature or at least not yet discovered. The development of such desired non-natural functions in enzymes is so far an unexplored area in biocatalysis. An often overlooked approach to generate non-natural enzyme function is to utilize and engineer catalytic machineries that already exist in nature. This is of outstanding significance since many of the generic activation modes which are applied by chemists can be found in enzyme's catalytic repertoire. However, nature often uses these highly developed catalytic centres of enzymes in a very specialized way and scientists only rarely target them to catalyze non-natural reactions. This thesis focuses on the frontier between organic synthesis and enzyme engineering with the objective to generate a platform for enzymatic Brønsted acid catalysis. This has the potential to provide access to various non-natural chemical transformations since chiral Brønsted acid catalysis is heavily applied in organic synthesis to catalyze a myriad of important C-C bond-forming reactions. This connects Brønsted acid catalysis as a powerful synthetic strategy with the key advantages of enzymes, namely excellent selectivities and high activities in a protecting group free synthesis based on water as a greener solvent.

While general acid/base catalysis features prominently in enzyme-catalyzed reactions, for example by stabilizing a transition state via hydrogen bonding, enzymes are so far not considered as strong Brønsted acid catalysts. This is due to the relatively low acidity of their proton sources, which as a result are inefficient in activating various functional groups. One exception to this are squalene hopene cyclases (SHCs), which catalyze the cationic polycyclization of squalene to the pentacyclic products hopene and hopanol. The reaction is initiated through demanding C=C bond protonation by an aspartic acid with biologically unusual acidic strength. In the course of this PhD thesis the catalytic potential of this unique protonation machinery was studied.

In the first part, the natural reaction scope within this enzyme family was studied. Therefore, various bioinformatics methods were used to identify amino acid sequences of related enzymes in public databases. This revealed a superfamily of protonating enzymes (protonases) which were analyzed with respect to their described natural function.

This studies showed that the reaction scope of this enzymes and thus of this unique protonation machinery is limited to polycyclization chemistry within the terpene biosynthesis. This is in contrast to the diversity of Brønsted acid catalyzed reactions in organic chemistry.

The substrate scope of SHCs and especially of the enzyme from *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*) was studied recently, with the focus on polycyclization reactions using close analogs of squalene. In the second part of this thesis the reaction scope of SHCs could be extended. Functionalized polyprenoids bearing different nucleophiles (aromatic ring and amide) for the termination of the polycyclization were successfully converted. Hence Friedel-Crafts alkylations and hydroamidations are part of SHCs reaction scope. Next to *AacSHC* also a SHC from *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC1*) was studied, however, only minor differences were observed with both enzymes.

The substrate scope of SHCs is limited with respect to the substrate size. While sesqui- and diterpenes are selectively cyclized to bi- and tricyclic products with good activities, the wildtype enzyme does not convert monoterpenes to the corresponding chiral cyclohexanoids. To analyze this limitation in more detail, several model compounds were synthesized and studied in the third part of this PhD thesis. Enzymatic conversions of these model substrates were compared with stabilities of the reactive conformations as determined by molecular dynamic simulations. These experiments revealed that small substrates suffer from binding in a non-reactive conformation. Based on these results, it is less the catalytic machinery which restricts SHCs to polycyclization chemistry, but more the selectivity of the active site shape. The latter discriminates non-natural substrates by its limited ability to bind these molecules in a reactive conformation.

To evolve SHCs towards “protonases” able to perform a wide range of non-natural reactions, a high diversity of different active site shapes is needed. This will increase the chance to bind potential substrates (for different chemical transformations) in a reactive conformation. However, the active sites of SHCs and related enzymes are highly conserved in nature. Thus, the required diversity cannot easily be recruited from the natural pool of catalysts. For this reason, an *AacSHC* mutant library was created in the fourth part of this thesis. By applying a very rational mutagenesis strategy, *AacSHC* was evolved to a set of highly selective “protonases” which were used as chiral Brønsted acids in asymmetric synthesis. The generated variants showed activities in the catalysis of different chemical transformations, protonating various functional groups (alkene, epoxide as well as carbonyl). This allowed the synthesis of interesting cyclohexanoid building blocks with moderate to good activities and excellent selectivities (>99 % *ee/de*).

Synthetic utility of these non-natural transformations was demonstrated by preparative conversions. For instance, an upscaled conversion of 512 mg geraniol with the variant G600F of AacSHC generated 182 mg of cyclogeraniol hydrate (32% isolated yield). One point mutation was sufficient to convert an almost inactive wildtype enzyme into a practically useful catalyst. Additionally, excellent selectivities (regio-, stereo- and product-selectivities) were exemplified by the exclusive conversion of (*S*)-6,7-epoxygeraniol from racemic starting material (including regioselective deprotonation of the carbocationic intermediate), the highly selective synthesis of the energetically unfavored isomer (-)-*iso*-isopulegol from (*S*)-citronellal as well as the stereoselective addition of water to the carbocationic intermediate in the cyclization of geraniol. These excellent selectivities find their origin in the precise active site geometry. From different reactive conformations of the same substrate (which often lead to different product molecules), “protonases” selectively bind and protonate only one specific reactive conformation.

Overall, by applying enzyme engineering, the unique protonation machinery of SHCs was uncoupled from polycyclization chemistry and implemented into asymmetric Brønsted acid catalysis. Further, this work contributes methodologically to the field of enzyme design, since it demonstrates that biocatalytic machineries can be systematically evolved for non-natural reactions. As this approach can easily be applied to other enzymes and activation modes, it will most likely direct future enzyme engineering efforts. This is interesting since it opens the door to novel biosynthetic pathways and expands the reaction scope in chemical synthesis (keyword: highly selective chiral Brønsted acid catalysis in water).

1. EINLEITUNG

*The ultimate goal of organic synthesis is to assemble a given organic compound from readily available starting materials and reagents in the most efficient way.*¹

K.C. Nicolaou, *Classics in Total Synthesis*

Dieses ultimative Ziel ist die Triebkraft vieler Anstrengungen für die Entwicklung neuer chemischer Synthesen und Katalysatoren. Bei den Zielverbindungen handelt es sich häufig um chirale Moleküle, weshalb der enantioselektiven Synthese eine besondere Bedeutung zukommt. Eine effiziente Methode für die Darstellung chiraler Moleküle ist die asymmetrische Katalyse, welche in der Vergangenheit durch rein chemische Katalysatoren dominiert wurde.

Die Anwendung von Enzymen und Mikroorganismen als Biokatalysatoren in der chemischen Synthese hat sich während der letzten beiden Dekaden im Labor und besonders auch in der Industrie etabliert.²⁻⁵ Enzyme sind mit ihrer hohen katalytischen Aktivität und ihren ausgezeichneten Selektivitäten (Chemo-, Regio- und Stereoselektivitäten) eine oftmals umweltfreundlichere Alternative zur rein chemischen Katalyse. Darüber hinaus sind Biokatalysatoren genetisch kodiert. Somit lassen sie sich mikrobiell synthetisieren und einfach durch genetische Veränderung manipulieren und optimieren.⁶⁻¹⁰

Aus synthetischer Sicht ist die Biokatalyse jedoch nur begrenzt einsetzbar, da für eine große Anzahl synthetisch wichtiger Reaktionen bisher keine entsprechenden Enzyme zur Verfügung stehen. Obwohl ursprüngliche Limitierungen, wie die häufig geringe Enzymstabilität sowie die hohe Substratspezifität, heute aufgrund Methoden der gerichteter Evolution größtenteils behoben sind, bleibt die mit Enzymen katalysierbare geringe Reaktionsvielfalt weiterhin ein stark einschränkender Faktor. Somit ist die (wie in dieser Arbeit beschriebene) Entdeckung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren ein aktueller Forschungsschwerpunkt und gleichzeitig Grenzgebiet in der Biokatalyse sowie dem *enzyme engineering*. Neue Biokatalysatoren für die asymmetrische Synthese liefern einen Beitrag für eine „grünere“ Chemie und öffnen zugleich eine Tür für neue artifizielle Biosynthesewege.

2. STAND DER FORSCHUNG

2.1. Biokatalyse

Enzyme sind hochattraktive Katalysatoren für die enantioselektive Synthese, da sie gute katalytische Aktivitäten mit äußerst hohen Selektivitäten kombinieren.¹¹ Eine breitere Anwendung der Biokatalyse wird jedoch durch das geringe Reaktionsspektrum enzymatisch zugänglicher Reaktionen deutlich erschwert.

2.1.1. Das Reaktionsspektrum der Biokatalyse

Während anfänglich hauptsächlich Hydrolasen aufgrund ihrer Stabilität, Substratbreite und hohen Selektivität eine bedeutsame Rolle in der chiralen Synthese spielten, sind gegenwärtig unterschiedliche Enzyme für ein breiteres Reaktionsspektrum verfügbar (**Abb. 1**). Acyltransferasen wie z. B. Lipasen, Amidasen, Acylasen und Esterasen werden meistens in der chiralen Synthese von Carbonsäuren, Aminosäuren, Amidien, Alkoholen und Aminen eingesetzt.¹² Darüber hinaus stehen mittlerweile besonders aufgrund von Fortschritten im *enzyme engineering* und in der Cofaktor-Regenerierung ein breites Spektrum an Enzymen für Redoxreaktionen zur Verfügung. Hervorzuheben ist die Darstellung chiraler sekundärer Alkohole durch Reduktion von Carbonylgruppen (Ketoreduktasen)¹³⁻¹⁵, die Synthese chiraler sekundärer Amine durch reduktive Aminierung (Transaminasen)^{16,17} sowie die Reduktion aktivierter Doppelbindungen (Enoat-Reduktasen)¹⁷⁻¹⁹. Des Weiteren besitzen Cytochrom P450 Monooxygenasen, aufgrund ihrer Fähigkeit regio- und stereoselektiv nicht-aktivierte Kohlenwasserstoffe zu oxidieren, ein enormes synthetisches Potential.^{20,21} Neben diesen Biokatalysatoren sind noch einige C-C-bindungsknüpfende Enzyme Bestandteil der biokatalytischen Toolbox. Hier sind besonders die Aldolasen und Thiamindiphosphat-abhängigen Lyasen im Fokus der Forschung.²²⁻²⁴ Erstere katalysieren die Aldol-Reaktion und letztere eine formale Acyloin-Kondensation zwischen einem Aldehyd und einem adäquaten Donor zu α -Hydroxyketonen. Darüber hinaus sind Enzyme zum Aufbau von Molekülen durch C-C-Bindungsknüpfung wenig etabliert.^{25,26}

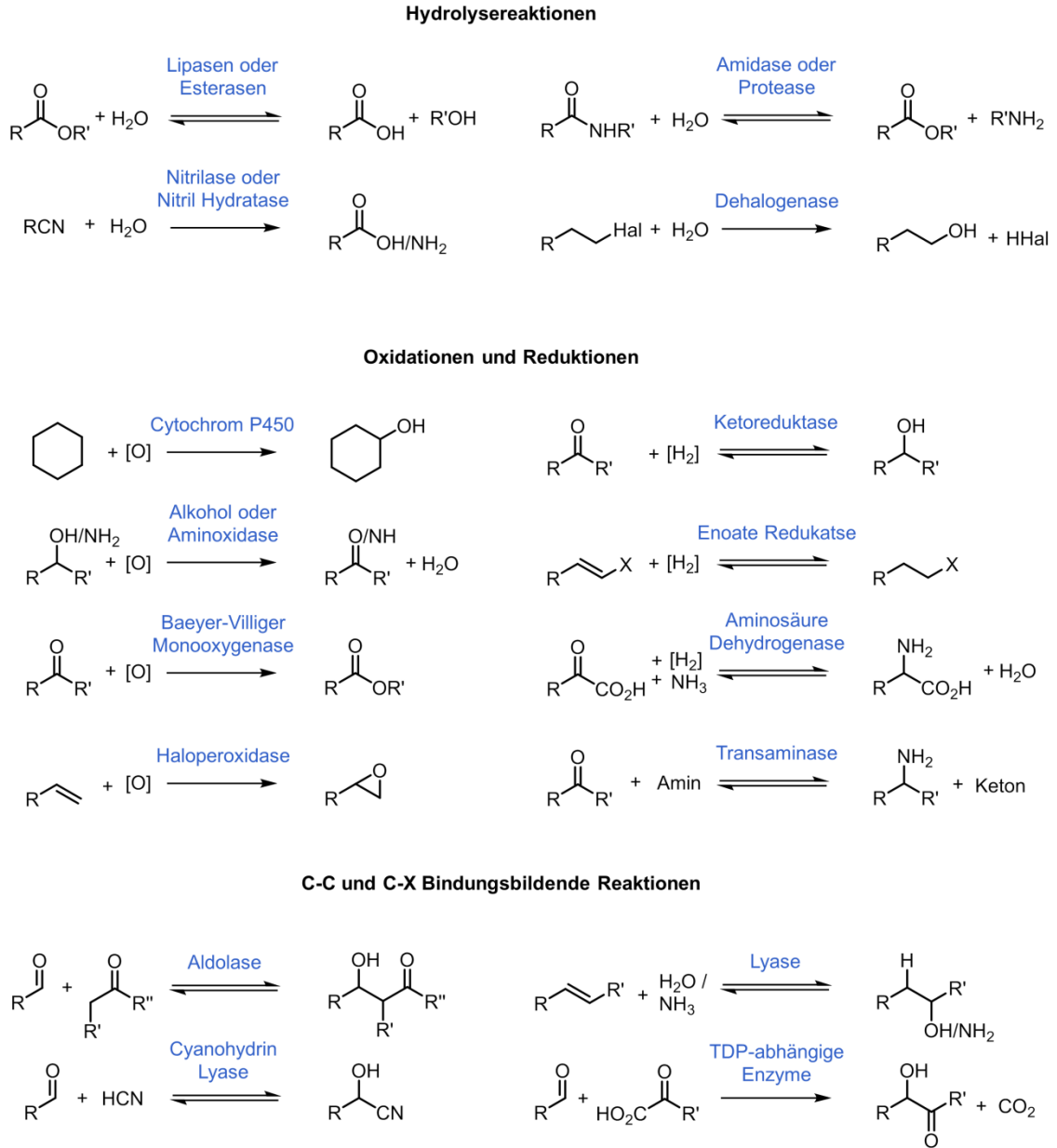


Abb. 1: Auswahl an zugänglichen Biokatalysatoren für die organische Synthese. Zur übersichtlicheren Darstellung sind einige Cosubstrate und Cofaktoren nicht dargestellt. Somit sind einige Reaktionen keine Gleichungen (keine gleiche Anzahl an Atomen auf beiden Seiten der Reaktion). Die Abbildung soll einen Überblick über die möglichen enzymatischen Stoffumwandlungen geben. Für die Synthese chiraler Alkohole, Amine, Ketone, Aldehyde, Carbonsäuren und Aminosäuren stehen unterschiedlichste Enzyme zur Verfügung. Ein Großteil der etablierten Enzyme sind Hydrolasen. Außerdem sind verschiedene Redoxenzyme etabliert, welche unter Verbrauch eines Cofaktors Oxidations- und Reduktionsreaktionen katalysieren. Darüber hinaus ist das katalytische Repertoire eher beschränkt. So gibt es neben den eher eingeschränkten Aldolasen und Thiamindiphosphat (TDP)-abhängigen Enzymen kaum vielfältige Biokatalysatoren für die C-C-Bindungs knüpfung. Abbildung nach Turner *et al.*²⁷ X = Elektronenziehende Gruppe, Hal = Halogen und TDP = Thiamindiphosphat.

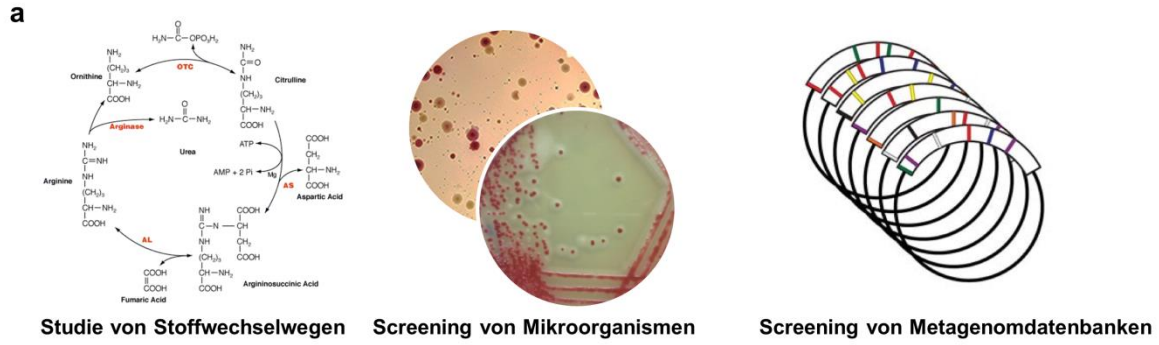
2.1.2. Identifizierung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren

Die Entdeckung und Entwicklung synthetisch interessanter Biokatalysatoren lässt sich hauptsächlich mit drei unterschiedlichen Strategien ermöglichen: (i) Die Suche nach natürlichen Enzymen, (ii) die *de novo* Darstellung neuer Enzyme mit artifiziellen katalytischen Zentren oder (iii) das *enzyme engineering* natürlicher Enzyme unter Nutzung der bereits vorhandenen katalytischen Maschinerien.

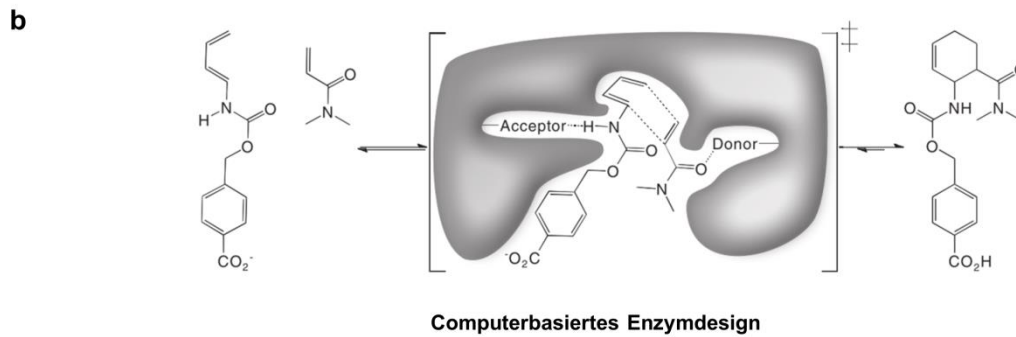
Ein Großteil der Biokatalysatoren wird durch die erste Strategie (i) identifiziert (**Abb. 2a**). In Studien von Stoffwechselwegen sowie entsprechenden enzymologischen Untersuchungen werden viele neue Enzyme beschrieben. Darüber hinaus werden Mikroorganismen und Metagenomdatenbanken auch gezielt nach neuen Biokatalysatoren durchforstet.^{28,29} Häufig werden ausgehend von ersten Enzymen mittels bioinformatischer Analysen ganze Enzymfamilien *in silico* identifiziert und vielversprechende Kandidaten anschließend biokatalytisch charakterisiert. Mit diesen Strategien kürzlich neu beschriebene Biokatalysatoren sind zum Beispiel die (S)-Norcoclaurin Synthase und verwandte Enzyme, welche hochselektive Pictet-Spengler-Reaktionen katalysieren^{30,31}, oder Imin-Reduktasen^{32,33}, die in der stereoselektiven Reduktion von Iminen Verwendung finden.^{34,35} Auf diesem Weg lassen sich bevorzugt Biokatalysatoren entdecken, deren Reaktion eine Funktion in der Natur besitzt. Jedoch sind Enzyme für viele synthetisch wertvolle Reaktionen nicht in der Natur vorhanden oder zumindest bis jetzt nicht bekannt.

Die Entwicklung von Biokatalysatoren für nicht-natürliche Reaktionen erfolgt häufig über (ii) die *de novo* Generierung eines katalytischen Zentrums auf Basis reaktionsmechanistischer Überlegungen (**Abb. 2b**). Ein Hauptaugenmerk liegt auf dem computerbasierten *de novo* Enzymdesign.³⁶ Berechnete Übergangszustände werden hierbei *in silico* durch Aminosäuren stabilisiert und dieses Konstrukt (*theozyme*) anschließend in bereits bekannte Proteingerüste modelliert. Somit erzeugte und optimierte Proteinsequenzen werden anschließend auf Aktivität untersucht. Dies ermöglichte einen enzymatischen Zugang zu unterschiedlichen nicht-natürlichen Reaktionen, unter anderem zur stereoselektiven Diels-Alder-Reaktion.³⁷⁻³⁹ Auch wenn erste Varianten für diese nicht-natürlichen, chemischen Transformationen nur eine sehr geringe Aktivität zeigten, wurden mittels gerichteter Evolution Katalysatoren erzeugt, welche katalytische Effizienzen vergleichbar mit natürlichen Enzymen besitzen.⁴⁰⁻⁴³

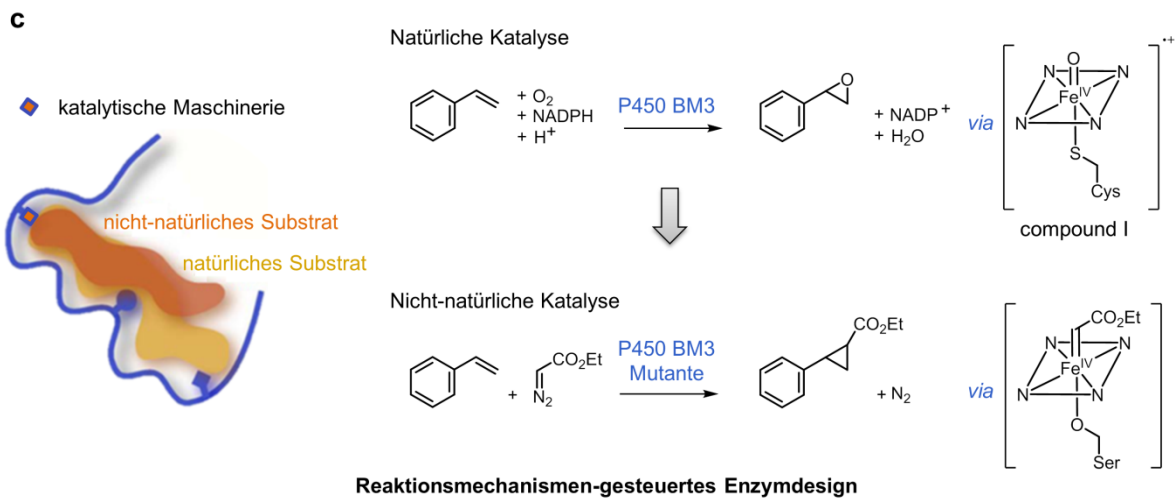
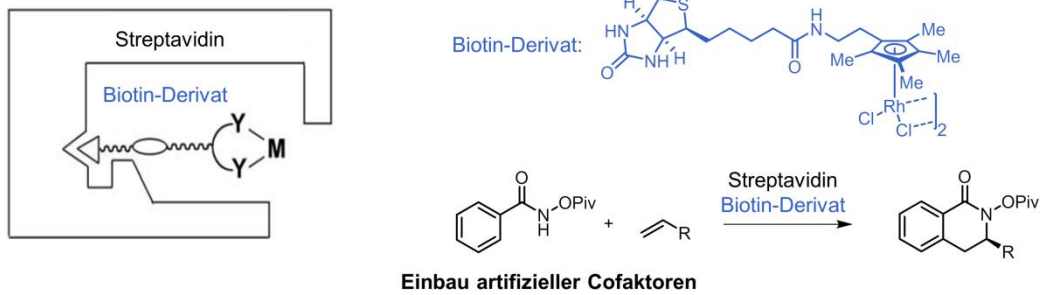
2. STAND DER FORSCHUNG



Bevorzugt natürliche Funktion



Bevorzugt nicht-natürliche Funktion



Bevorzugt nicht-natürliche Funktion

Abb. 2: Identifizierung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren. **(a)** Enzyme mit synthetisch nützlichen Aktivitäten werden häufig durch die Studie von interessanten Biosynthesewegen identifiziert. Darüber hinaus lassen sich bevorzugt natürliche Enzymfunktionen auch über das Screening von Mikroorganismen sowie Metagenomdatenbanken auffinden. **(b)** Nicht in der Natur vorkommende chemische Transformationen werden häufig durch die Generierung neuer katalytischer Zentren erzeugt. Ein Hauptaugenmerk liegt auf dem computerbasierten Enzymdesign, bei dem ein berechneter Übergangszustand *de novo* durch ein artifizielles aktives Zentrum stabilisiert und dieses Konstrukt in ein Proteingerüst integriert wird. Somit erzeugte *de novo* Enzyme werden anschließend im Labor auf Aktivität untersucht. In dem gezeigten Beispiel wurde ein *de novo* Enzyme für eine stereoselektive Diels-Alder-Reaktion entwickelt.³⁹ Darüber hinaus ist auch der Einbau von artifiziiellen Cofaktoren in Proteine ein attraktiver Weg um nicht-natürliche Enzymaktivität zu generieren. Hierbei ist die Verwendung der Streptavidin-Biotin Bindungspartner ein häufig verwendeter Startpunkt. Chemische Katalysatoren werden kovalent mit dem Biotin verbunden und ermöglichen somit in der Bindetasche des mutierten Streptavidin-Proteins eine Katalyse in chiraler Umgebung. Dies wurde unter anderem für asymmetrische C-H-Bindungsaktivierungen genutzt.⁴⁴ **(c)** Das Reaktionsmechanismen-gesteuerte Enzymdesign nutzt bereits vorhandene katalytische Maschinerien aus, um auf Basis mechanistischer Überlegungen mit nicht-natürlichen Substraten nicht-natürliche Reaktionen zu katalysieren. Im Beispiel ist gezeigt, wie der natürliche Fe-Häm-Cofaktor eines Cytochrom P450 (hier P450 BM3) genutzt wird, um eine nicht-natürliche Cyclopropanierung zu katalysieren. Cytochrom P450 BM3 (CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*) katalysiert in der Natur die NADPH-abhängige Aktivierung von Sauerstoff und ermöglicht somit die oxidative C-H-Aktivierung ($R-H \rightarrow R-OH$). Dieser radikalische Prozess wird durch das katalytisch aktive Intermediat „*compound I*“ eingeleitet. Darüber hinaus ist auch die Epoxidierung von Olefinen möglich. Hierbei wird das Oxen des reaktiven Intermediates direkt auf die olefinische π -Bindung übertragen. In Analogie dazu, wurde kürzlich der Fe-Häm-Cofaktor von P450 BM3 verwendet um synthetische Carben- und Nitren-Vorläufer zu aktivieren. In der Abbildung ist die Cyclopropanierung mit Diazoessigsäureethylester gezeigt. Für den Carben-Transfer wurde das entsprechende Analogon zur „*compound I*“ genutzt. Eine Serin-Mutation am proximalen Cystein-Liganden zeigte hierbei eine signifikante Erhöhung der Aktivität.⁴⁵

Darüber hinaus ermöglicht der Einbau von artifiziiellen Cofaktoren in bekannte Proteingerüste einen weiteren enzymatischen Zugang zu nicht-natürlichen Reaktionen.⁴⁶ Hervorzuheben ist hier der Einbau eines biotinylierten Rhodium(III)-Komplexes in ein entwickeltes Streptavidin-Protein und die damit katalysierte asymmetrische C-H-Bindungsaktivierungen.⁴⁴

Neben **(i)** der Identifizierung neuer, natürlicher Enzyme und **(ii)** dem *de novo* Design von Biokatalysatoren mit artifiziiellen Reaktionszentren ist **(iii)** die Nutzung bereits existierender katalytischer Maschinerien eine weitere mögliche Strategie, um neue Enzyme zu entwickeln (**Abb. 2c**).^{47–50} Hierbei werden basierend auf reaktionsmechanistischen Überlegungen neue Reaktivitäten bereits vorhandener katalytischer Zentren erprobt und entdeckt. Jedoch findet dieses Vorgehen in der biokatalytischen Forschung bisher nur begrenzt Anwendung. Erwähnenswert sind hier die jüngst entwickelten Cytochrom P450-katalysierten Carben- und Nitren-Transfer-Reaktionen.^{45,51–54} Normalerweise katalysieren Cytochrom P450 Enzyme die Sauerstoff-abhängige C-H-Aktivierung durch Verwendung eines Fe-Häm-Cofaktors.⁵⁵ Eingeleitet wird diese Reaktion durch ein katalytisch aktives Intermediat (*compound I*), welches auch die Epoxidierung von Olefinen ermöglicht. Hierbei wird der Sauerstoff von *compound I* auf das π -System der Doppelbindung übertragen.

In den neu vorgestellten Arbeiten^{45,51-54} wurde P450 BM3 (CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*) genutzt, um anstatt des natürlichen Oxens nicht-natürliche Carbene und Nitrene zu transferieren. Hierzu wurden synthetische Carben- und Nitren-Vorläufer mittels des Fe-Häm-Cofaktors aktiviert. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass schon alleine das Wildtyp-Enzym (P450 BM3) eine geringe Aktivität für die Cyclopropanierung von Styrol mittels Diazoessigsäureethylester besitzt (**Abb. 2c**). Die anfänglich geringe Stereoselektivität wurde durch *enzyme engineering* optimiert, wobei innerhalb von kürzester Zeit eine große Vielfalt an P450 BM3 Varianten für die Cyclopropanierung verschiedener Moleküle beschrieben wurde. Die Reaktionen finden in Wasser bei Umgebungstemperatur statt, wobei die Katalysatoren katalytische Produktivitäten von mehreren 10000 besitzen. Bemerkenswert sind Mutationen am proximalen Cystein-Liganden des Fe-Häm-Cofaktors (z. B. eine Cystein zu Serin Mutation), welche das Fe^{III}-Fe^{II}-Redoxpotential erhöhen und somit eine Reduktion des katalytisch inaktiven Fe^{III} (im Ruhezustand) zur katalytisch aktiven Fe^{II}-Spezies *in vivo* ermöglichen. Unter der Verwendung von ganzen Zellen als Katalysatorsystem wurden Cyclopropanierungen von Styrol und andere Verbindungen im Gramm-Maßstab durchgeführt. Hierbei zeigten sich katalytische Produktivitäten von über 60000, vergleichbar mit den aktivsten klassisch-chemischen Rhodium-Katalysatoren.^{51,52} Dies zeigt, wie individuelle reaktive Zentren von Enzymen genutzt werden können, um einen enzymatischen Zugang für klassisch-chemische Transformationen zu ermöglichen. Dieses Reaktionsmechanismen-gesteuertes Enzymdesign beruht auf der inhärenten Reaktivität katalytischer Zentren.

2.2. Brønsted-Säure-Katalyse

Während ursprünglich die Brønsted-Säure-Katalyse meist auf bestimmte Reaktionstypen limitiert war (Hydrolyse, Estersynthese, u. a.), werden heute chirale Methoden für eine nahezu endlose Zahl an C-C-Bindungsknüpfungen beschrieben.⁵⁶⁻⁶⁵ Den Ursprung dieser Reaktionsdiversität findet die Brønsted-Säure-Katalyse in der effizienten Aktivierung einer großen Anzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen wie zum Beispiel Imine, Carbonyle, α,β ungesättigte Carbonyle, Alkene, Alkohole und Epoxide.

2.2.1. Chirale Brønsted-Säuren in der homogenen Katalyse

Die Protonierung einer funktionellen Gruppe verstärkt im Allgemeinen deren Elektrophilie und damit die Reaktivität gegenüber Nucleophilen. Abhängig vom Reaktionsmechanismus wird in die allgemeine sowie die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse unterschieden. Während eine allgemeine Brønsted-Säure als Wasserstoffbrücken-Donor fungiert, handelt es sich bei einer spezifischen Brønsted-Säure um einen Protonen-Donor. Somit stabilisieren allgemeine Brønsted-Säuren den Übergangszustand durch Wasserstoffbrückenbindungen, wohingegen spezifische Brønsted-Säuren das Substrat in einem vorgelagerten Gleichgewicht protonieren. Abhängig sind diese beiden Extreme von der Acidität der Säure sowie der Basizität des Substrats. Besonders in der letzten Dekade haben sich chirale Brønsted-Säuren in der homogenen Katalyse etabliert (**Abb. 3**).^{56–65} Ein erstes Beispiel für allgemeine chirale Brønsted-Säure-Katalyse wurde 1998 von Jacobsen und Mitarbeitern beschrieben.^{66–68} Dabei wurden Peptid-basierte Thioharnstoff-Derivate als chirale Wasserstoffbrücken-Donoren für die Strecker-Reaktion verwendet. Als eine weitere fundamentale Arbeit kann die 2003 durch Rawal und Mitarbeiter berichtete enantioselektive Hetero-Diels-Alder-Reaktion angesehen werden.⁶⁹ Hierbei wurde TADDOL ($\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -Tetraaryl-1,3-dioxalan-4,5-dimethanol) als chiraler Wasserstoffbrücken-Donor verwendet.

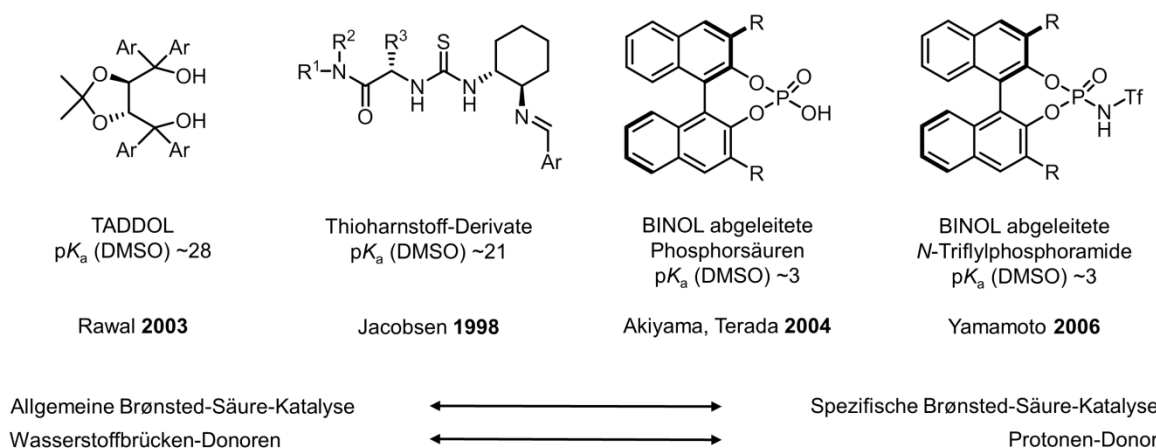


Abb. 3: Etablierte chirale Homogen-Katalysatoren für die allgemeine und spezifische Brønsted-Säure-Katalyse. Die allgemeine sowie die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse stellen „nur“ die beiden Extreme dar. In manchen Fällen kann nicht eindeutig zwischen beiden unterschieden werden.

Grundsätzlich besitzen solche chiralen Wasserstoffbrücken-Donoren jedoch nur eine vergleichsweise geringe Acidität (pK_a in DMSO ca. 15-30) und können somit nur eine begrenzte Anzahl an Substraten effektiv aktivieren.^{70,71} Eine bedeutend größere Acidität besitzen die von BINOL(1,1'-Bi-2-naphthol) abgeleiteten Phosphorsäuren (pK_a in DMSO ca. 2-4).⁷² Im Jahr 2004 wurden diese BINOL Hydrogenphosphate von Akiyama *et al.* und Terada *et al.* mittels indirekten und direkten Mannich-Reaktionen in die asymmetrische Synthese eingeführt.^{73,74} Noch acidere Verbindungen, von BINOL abgeleitete *N*-Triflylphosphoramide, wurden 2006 als Katalysatoren in asymmetrischen Transformationen eingesetzt. Diese Phosphoramide besitzen in DMSO einen vergleichbaren pK_a -Wert, jedoch zeigen Messungen in Acetonitril deutlich niedrigere pK_a -Werte (~ 6) im Vergleich zu den BINOL Hydrogenphosphaten (~ 12).⁷⁵ Somit können mit von BINOL abgeleiteten *N*-Triflylphosphoramiden noch unreaktivere Substrate aktiviert werden.

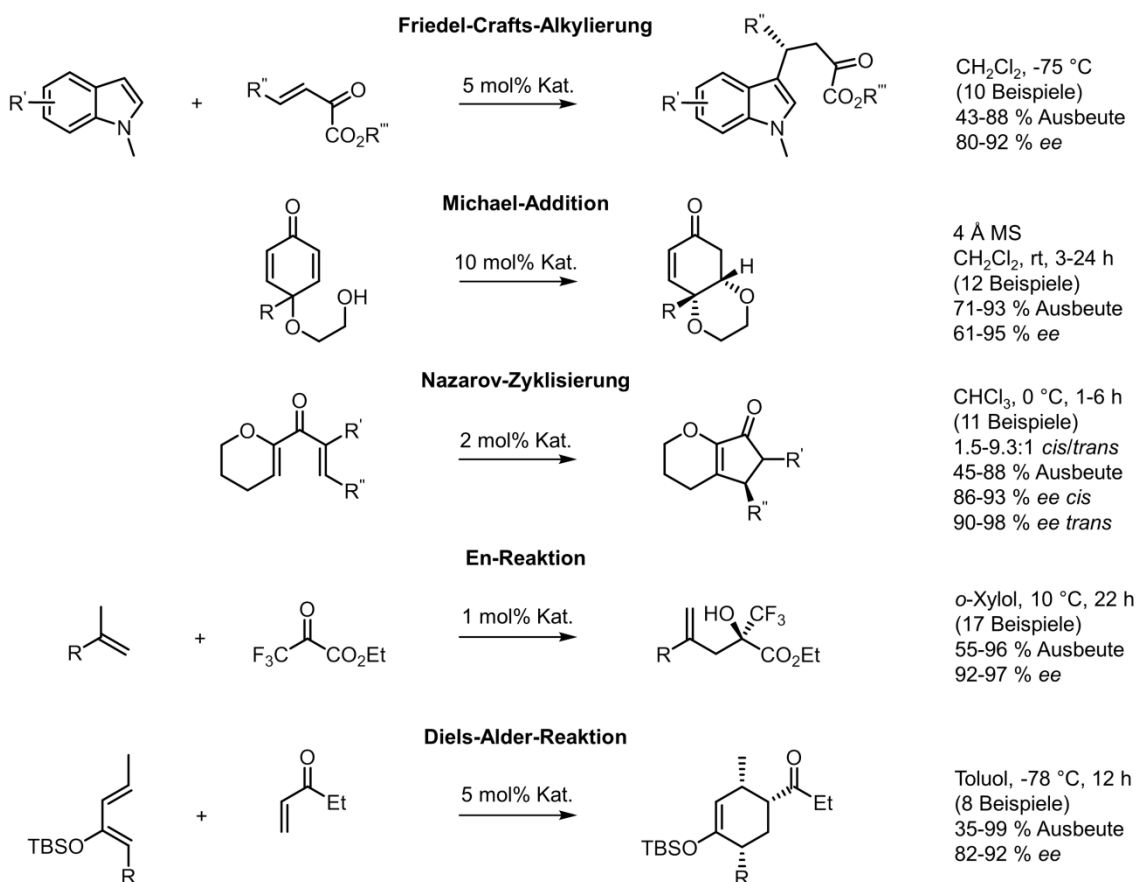


Abb. 4: Ausgewählte asymmetrische Synthesen katalysiert mit BINOL abgeleiteten Phosphorsäuren und *N*-Triflylphosphoramiden. Gezeigt ist je ein Beispiel zur Friedel-Crafts-Alkylierung⁷⁶, Michael-Addition⁷⁷, Nazarov-Zyklisierung⁷⁸, En- Reaktion⁷⁹ und Diels-Alder-Reaktion⁸⁰. Rechts sind die jeweiligen Bedingungen und Ergebnisse im Überblick zusammengefasst.

Im Jahr 2006 beschrieben Yamamoto *et al.* mit diesen Phosphoramiden erstmalig eine asymmetrische Synthese, in diesem Fall eine Diels-Alder-Reaktion.⁸⁰ Diese von BINOL abgeleiteten Phosphorsäuren und *N*-Triflylphosphoramide haben sich mittlerweile als eine neue Klasse von Organokatalysatoren etabliert.⁵⁶⁻⁶³ Eine Vielzahl an enantioselektiven Reaktionen, wie zum Beispiel Friedel-Crafts-Alkylierungen^{81,82}, Michael-Additionen⁷⁷, Nazarov-Zyklisierungen^{78,83}, En-Reaktionen⁷⁹ und Diels-Alder-Reaktionen^{80,84,85} wurden durchgeführt (**Abb. 4**).

2.2.2. Allgemeine und spezifische Brønsted-Säure-Katalyse bei Enzymen

Die Brønsted-Säure-Katalyse spielt auch in der Enzymkatalyse eine sehr wichtige Rolle. Viele Enzyme beschleunigen die Reaktion, indem sie den Übergangszustand durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren.^{86,87} Dies findet in der Regel dann statt, wenn während der Reaktion die Basizität des Substrates durch Bindungsknüpfung oder -bruch verstärkt wird. In diesem Fall kann die Bildung einer Wasserstoffbrücke, vermittelt durch eine allgemeine Brønsted-Säure, zur Reduzierung der freien Energie des aktivierten Komplexes führen. Ein Beispiel ist die HIV-Protease-katalysierte Hydrolyse von Amid-Bindungen (**Abb. 5a**).⁸⁸ Durch eine Wasserstoffbrückenbindung wird hierbei das tetraedrische Intermediat stabilisiert. Des Weiteren findet auch die simultane Aktivierung mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen in vielen Enzymen Anwendung. Vergleichbar zu den Thioharnstoff-Derivaten und den TADDOLen der Homogenkatalyse (**Abb. 3**) wird die allgemeine Brønsted-Säure-Katalyse auch durch das sogenannte *oxyanion hole* durchgeführt. Dieses ist Bestandteil vieler hydrolytischer Enzyme wie zum Beispiel den Hydrolasen, Lipasen, Proteasen und Esterasen (**Abb. 5b**).¹² Während die allgemeine Brønsted-Säure-Katalyse bei Enzymen ein fester Bestandteil ist, wird die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse mit Biokatalysatoren kaum beschrieben. Dies ist vermutlich auf die geringe Acidität der Protonenquellen zurückzuführen, welche normalerweise nicht in der Lage sind, anspruchsvolle Substrate durch Protonierung zu aktivieren. Aufgrund der großen Reaktionsvielfalt, welche die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse ermöglicht, ist ein enzymatischer Zugang jedoch von größtem Interesse.

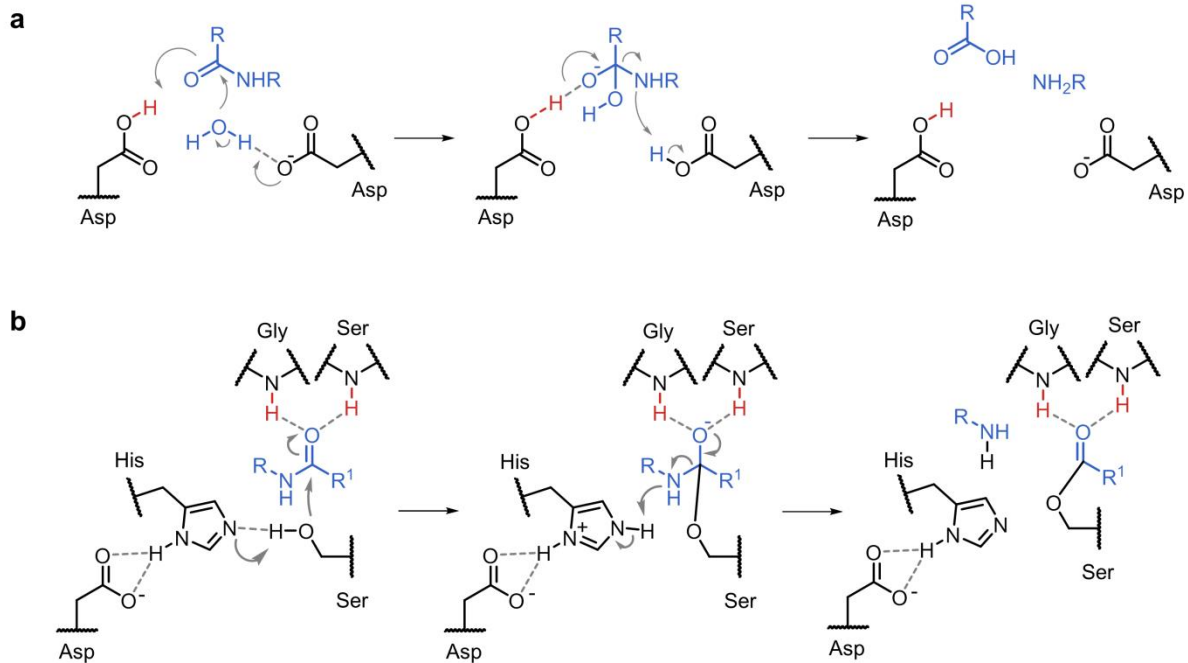


Abb. 5: Allgemeine Brønsted-Säure-Katalyse in der Enzymkatalyse. **(a)** Die HIV-Protease katalysiert die Hydrolyse einer Amid-Bindung.⁸⁸ Das Substrat (blau) bindet in die aktive Tasche und ein koordiniertes Wassermolekül (blau) wird für den nukleophilen Angriff aktiviert. Hierfür fungiert ein Aspartat als Base. Das tetraedrische Intermediat wird mittels Wasserstoffbrückenbindung durch eine Asparaginsäure stabilisiert. **(b)** Die Serin-Protease katalysiert ebenfalls die Hydrolyse von Amid-Bindungen, jedoch über einen zweistufigen Mechanismus mit einem kovalenten Enzym-Substrat-Komplex. Zwei Wasserstoffe des Protein-Rückgrats (Gly und Ser) bilden hierbei das sogenannte *oxyanion hole*, welches als allgemeine Brønsted-Säure die Carbonylgruppe des Substrates (blau) positioniert und aktiviert. Ein weiterer Bestandteil ist die katalytische Triade aus einem Aspartat, einem Histidin und einem Serin. Diese Triade dient zur Aktivierung des Serins, welches als Nukleophil am Carbonyl angreift und mit dem Substrat ein tetraedrisches Intermediat bildet. Dieses wird über die zwei Wasserstoffbrückenbindungen (*oxyanion hole*) stabilisiert und reagiert anschließend weiter zum Acyl-Enzym-Intermediat. Daraufhin verlässt das Amin die aktive Tasche und ein Wassermolekül wird aktiviert, um das Acyl-Enzym-Intermediat zu hydrolysieren (nicht gezeigt). Erneut dient das sogenannte *oxyanion hole* als allgemeine Brønsted-Säure. Anmerkung: Eine genauere Betrachtung zeigt die *syn*-Orientierung der Carbonsäure-Protonen (Vergleich **Abb. 7**)

2.3. Squalen-Hopen-Zyklenen

Squalen-Hopen-Zyklenen (SHCs) und verwandte Triterpen-Zyklenen sind bezüglich ihrer katalytischen Maschinerie sehr bemerkenswerte Enzyme, deren Funktion Chemiker sowie Biochemiker bereits über 50 Jahre fasziniert und fordert.^{89–95} Eine detaillierte Betrachtung der Funktionsweise von SHCs zeigt, dass diese Enzyme als spezifische Brønsted-Säuren betrachtet werden können.⁹⁶

2.3.1. Funktion und Struktur

Seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur⁹⁷ im Jahr 1998 dient die SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Aac*SHC) als eines der Modellsysteme zum mechanistischen Verständnis der Triterpen-Zyklasen.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Die *Aac*SHC katalysiert die Polyzyklisierung von Squalen (**1**) zu den pentazyklischen Produkten Hopan (**2**) und Hopanol (**3**) (Abb. 6a). Die Kaskade wird durch die Protonierung der terminalen C=C-Bindung des Substrates initiiert, wodurch ein reaktives Carbokation-Intermediat entsteht.

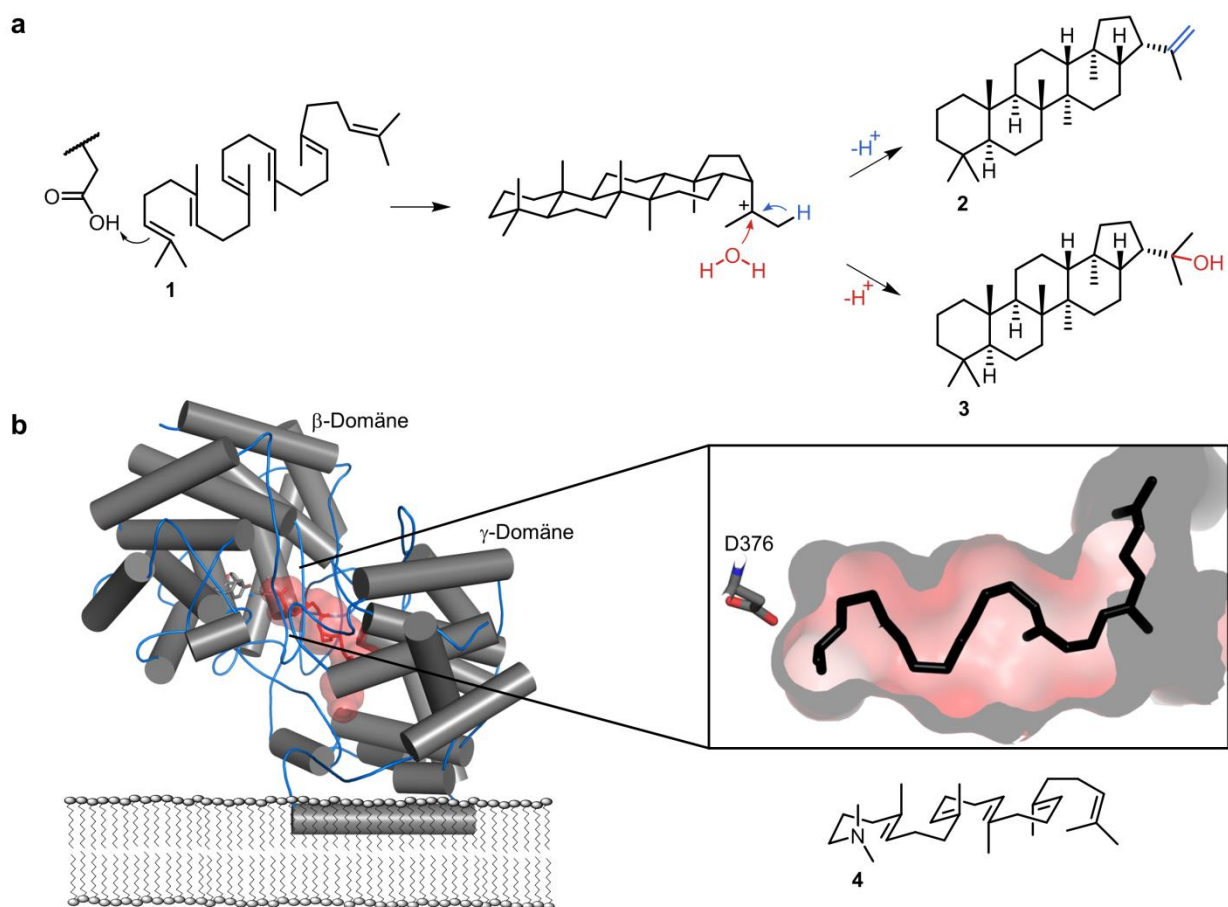


Abb. 6: Funktion und Struktur der *Aac*SHC. **(a)** Die *Aac*SHC katalysiert die Polyzyklisierung von Squalen (**1**) zu den pentazyklischen Produkten Hopan (**2**) und Hopanol (**3**). Die Polyzyklisierungskaskade wird durch die Protonierung der terminalen C=C-Bindung initiiert. Das finale Carbokation-Intermediat deprotoniert zum Hauptprodukt Hopan (**2**, blauer Reaktionspfad) oder reagiert mit einem Wassermolekül zum entsprechenden Alkohol (**3**, roter Reaktionspfad). Für die *Aac*SHC entstehen die beiden Produkte in einem 5:1 Verhältnis. **(b)** SHCs sind monotopische Membranproteine und binden somit in die Zellmembran. Zu sehen ist die Kristallstruktur der *Aac*SHC zusammen mit dem co-kristallisierten Substratanalogon 2-Azasqualen (**4**). Das aktive Zentrum (rot) befindet sich in der Mitte zwischen beiden Protein-Domänen. Am Ende des aktiven Zentrums befindet sich die katalytisch aktive Asparaginsäure (D376). Das co-kristallisierte Substratanalogon 2-Azasqualen (**4**) bindet in einer der reaktiven Konformation ähnlichen Orientierung.

Dieses Carbokation-Intermediat attackiert kaskadenartig jeweils das π -System der benachbarten C=C-Bindung, wobei die Polyzyklisierung zum größten Teil in einer konzertierten Reaktion abläuft.^{101,102} Das finale Carbokation wird entweder durch Deprotonierung oder durch die Reaktion mit einem Wassermolekül gequencht. SHCs und die verwandten Triterpen-Zyklasten gehören zu den Klasse II Terpen-Zyklasten, da sie die Polyzyklisierungskaskade durch Protonierung einer C=C-Bindung initiieren. Im Vergleich dazu generieren Klasse I Terpen-Zyklasten (hauptsächlich Mono-, Sesqui- und Diterpen-Zyklasten) die Carbokationen durch Mg^{2+} -abhängige Abspaltung einer Diphosphat-Gruppe (Lewis-Säure-Katalyse).^{103–105}

Die AacSHC besteht aus zwei Protein-Domänen (β - und γ -Domäne), welche jeweils eine $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass-Struktur einnehmen (**Abb. 6b**).^{97,106–108} Die äußeren α -Helices werden dabei größtenteils durch sogenannte QW-Sequenzmotive miteinander verbunden. Dies sind innerhalb der SHCs hochkonservierte Aminosäuresequenzen mit der typischen Sequenz QxxDGGWG oder QxxDGSWG. Diese QW-Motive besitzen eine charakteristische *loop*-Struktur und sind vermutlich als Faltungshelfer (*foldons*) aktiv. Die γ -Domäne bindet mit einer α -Helix in die Zellmembran, womit SHCs den monotopischen Membranproteinen zuzuordnen sind. An dieser α -Helix befindet sich ein hydrophober Kanal, welcher als Eingang für das hydrophobe Squalen sowie als Ausgang für die pentazyklischen Produkte dient. SHCs rekrutieren das hydrophobe Substrat aus der Zellmembran und geben das Produkt höchstwahrscheinlich wieder in die Zellmembran ab. Der Substrateingangskanal verbindet die Zellmembran mit einer großen hydrophoben aktiven Tasche, welche sich zwischen den beiden Protein-Domänen befindet. Am Ende der hydrophoben aktiven Tasche ist eine katalytisch aktive Asparaginsäure (D376 in AacSHC) lokalisiert. Diese ist Bestandteil eines, innerhalb der Squalen-Zyklasten, hochkonservierten DxDD-Sequenzmotivs. Die mittlere Asparaginsäure dieses Motivs (D376 in AacSHC) stellt das Proton für die Aktivierung der C=C-Bindung zur Verfügung.^{107,109,110} Darüber hinaus ist das aktive Zentrum zum größten Teil mit hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren ausgestattet, welche Squalen in eine reaktive Bindung forcieren. Dabei ermöglicht die Freisetzung von Wassermolekülen durch spezifische Kanäle die Vorfaltung des Substrats in der reaktiven Konformation.¹¹¹ Diese bringt Atome und Orbitale in die passende Ausrichtung, übereinstimmend mit dem Reaktionsmechanismus der Polyzyklisierung. Bestätigt wurde dies durch eine Kristallstruktur mit dem co-kristallisierten Substratanalogon 2-Azasqualen (**4**), welches in einer für die Zyklisierung notwendigen Konformation in das aktive Zentrum bindet (**Abb. 6b**).¹⁰⁸

Das aktive Zentrum wirkt dabei als Schablone, um das flexible Substrat in einer präzisen Konformation zu binden und die reaktiven Intermediate vor einer vorzeitigen Reaktion mit Wasser zu schützen. Die Carbokation-Intermediate werden dabei vermutlich durch Interaktionen mit den π -Elektronen der aromatischen Aminosäuren stabilisiert.¹¹² Nach der Veröffentlichung der Kristallstruktur wurde in einer Reihe von Mutationsstudien die Rolle einzelner Aminosäuren bezüglich ihrer Stabilisierung der Carbokation-Intermediate untersucht.^{98,99,113,114} Zusammengefasst bestätigen diese Studien die stabilisierende Wirkung von aromatischen Aminosäuren für Carbokation-Intermediate.

Neben der *AacSHC* sind unterschiedliche Squalen-Zyklasten beschrieben, von denen die meisten Hopan als Hauptprodukt bilden.^{115–117} Darüber hinaus sind einige Squalen-Zyklasten bekannt, welche andere polyzyklische Triterpene synthetisieren.^{118–120} Interessant ist in diesem Zusammenhang die Anwesenheit von zwei SHC-Genen in einigen Mikroorganismen. So werden zum Beispiel in *Zymomonas mobilis* zwei Gene beschrieben, welche SHC-Aktivität besitzen (*ZmoSHC1* und *ZmoSHC2*).^{121–123} Obwohl sich diese SHCs in ihrer Sequenz deutlich unterscheiden (34 % Sequenzidentität), zeigen beide eine Umsetzung von Squalen zu Hopan/Hopanol, jedoch in unterschiedlicher Aktivität (*ZmoSHC1* ist weniger aktiv als *ZmoSHC2*). Eine biologische Funktion für die Anwesenheit zweier SHC-codierender Gene in einem Organismus ist bisher nicht bekannt.

2.3.2. Die Protonierungsmaschinerie

SHCs katalysieren eine anspruchsvolle Aktivierung einer C=C-Bindung. Die Protonierung erfolgt erstaunlicherweise durch eine Asparaginsäure, welche eine biologisch ungewöhnlich hohe Acidität aufweist. Diese Acidität findet ihren Ursprung in dem Transfer eines *anti*-orientierten Protons. Protonen in *anti*-Konformation sind vermutlich bis zu 10^4 -fach acider als die biologisch relevanten Protonen in *syn*-Konformation (**Abb. 7a**).^{124,125} Realisiert wird die acidere *anti*-Konformation innerhalb der *AacSHC* durch ein spezialisiertes Aminosäure-Netzwerk (**Abb. 7b**). Somit besitzen SHCs eine Protonierungsmaschinerie, welche bezüglich des Mechanismus sowie hinsichtlich des pK_a -Wertes als spezifische Brønsted-Säure beschrieben werden kann. Während der pK_a -Wert der katalytisch aktiven Brønsted-Säure (D376 in *AacSHC*) nicht bekannt ist, zeigt ein Vergleich mit literaturbekannten Werten, dass extrem acide Carbonsäuren in Proteinen nicht ungewöhnlich sind. Für mehrere Asparaginsäuren wurden pK_a -Werte < 2 ermittelt.¹²⁶

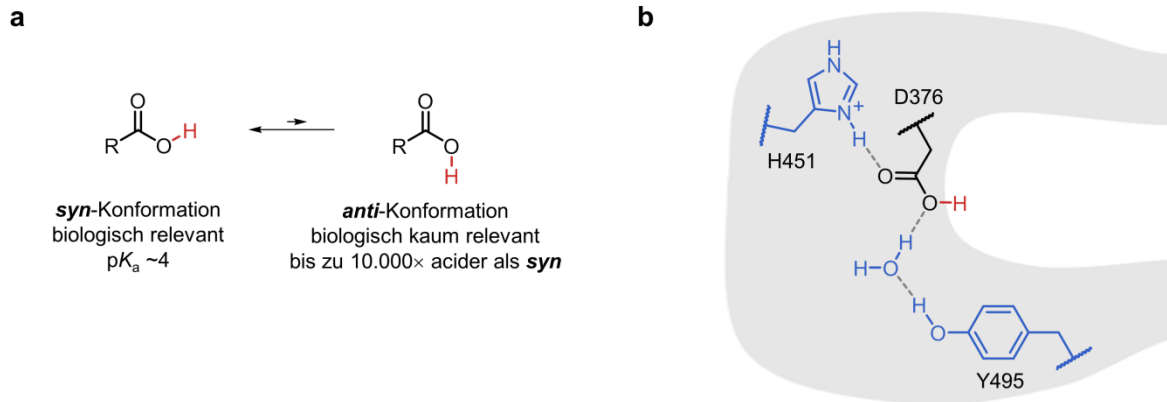


Abb. 7: Die Protonierungsmaschinerie der AacSHC. (a) Im Allgemeinen besitzt die Hydroxylgruppe von Carbonsäuren zwei bevorzugte Konformationen, *syn* und *anti* zur Carbonylgruppe. Diese Konformationen unterscheiden sich in ihrer Energie, wobei die *syn*-Konformation um 6-8 kcal/mol stabiler ist als die *anti*-Konformation.^{127,128} Dies findet vermutlich seinen Ursprung in Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, welche die *syn*-Konformation bevorzugen. Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Konformationen in ihrer Acidität. Während das *syn*-orientierte Proton normalerweise den für Carbonsäuren typischen pK_a -Wert von ~ 4 besitzt, wird dem *anti*-orientierten Protonen eine bis zu 10^4 -fach größere Acidität zugeordnet.^{124,125} Vermutlich aufgrund der energetischen günstigeren Orientierung finden in Enzymen Transfer und Abstraktion der Protonen standardmäßig über die *syn*-Konformation statt (siehe Beispiele **Abb. 5**).¹²⁴ (b) Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden die SHCs. Die anspruchsvolle Protonierung der C=C-Bindung des Substrats erfolgt über das wesentlich aciderere *anti*-orientierte Proton der katalytisch aktiven Asparaginsäure (D376).^{98,99} Dieses wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Histidin (H451) und über ein Wassermolekül zu einem Tyrosin (Y495) aktiviert und positioniert.

2.3.3. Umsetzungen von nicht-natürlichen Substraten

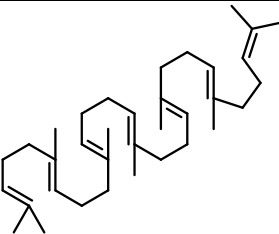
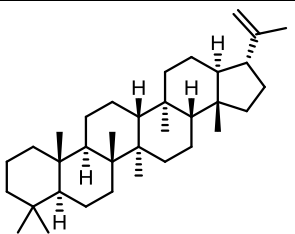
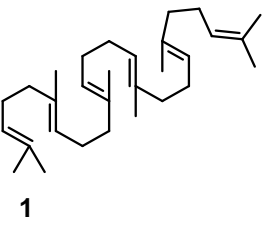
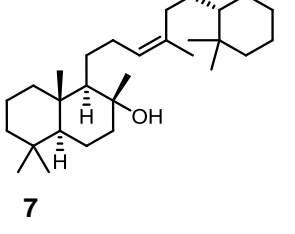
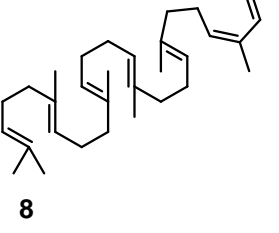
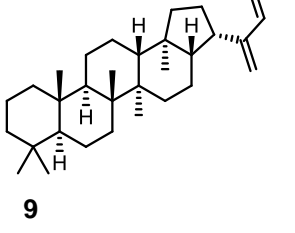
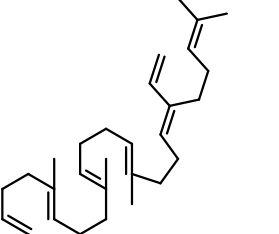
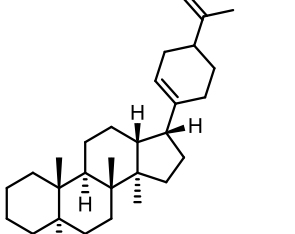
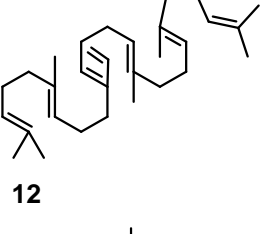
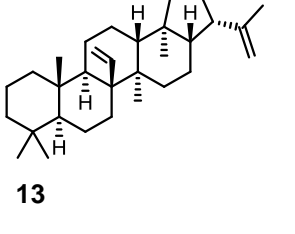
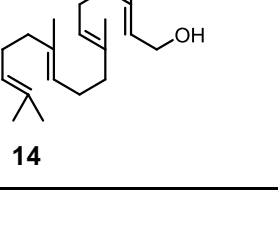
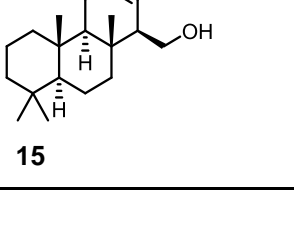
SHCs besitzen ein relativ breites Substratspektrum (siehe Substrate in **Tabelle 1**). Neben der AacSHC ist besonders die SHC1 aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1) zu erwähnen, welche in umfangreichen Studien ebenfalls eine hohe Substratbreite zeigte.^{122,129} Interessanterweise akzeptiert die AacSHC neben dem natürlichen Substrat Squalen auch ein um eine Isopren-Einheit verlängertes Substrat (**5**) und zyklisiert dies stereoselektiv zum nicht-natürlichen C₃₅-Polyprenoid (**6**).¹³⁰ Darüber hinaus wurde eine AacSHC Mutante zusammen mit einer Squalen-Zyklase aus *Bacillus megaterium* (BmeTC) verwendet um (+)-Ambrein (**7**) zu synthetisieren.¹³¹ Hierbei wurde Squalen von beiden Termini unterschiedlich zyklisiert um (+)-Ambrein zu erhalten (**Tabelle 1**, Zeile 2). Abe und Mitarbeiter zyklisierten unterschiedliche Methylenfunktionalisierte Squalen-Analoga (**8**, **10** und **12**).^{132,133} Mechanistisch interessant ist die Umsetzung von **10**, da die Polyzyklisierungskaskade eine allylische Alkylierung beinhaltet. Verkürzte Squalen-Analoga (**14**, **16** und **19**) wurden auch im Detail untersucht.¹³⁴

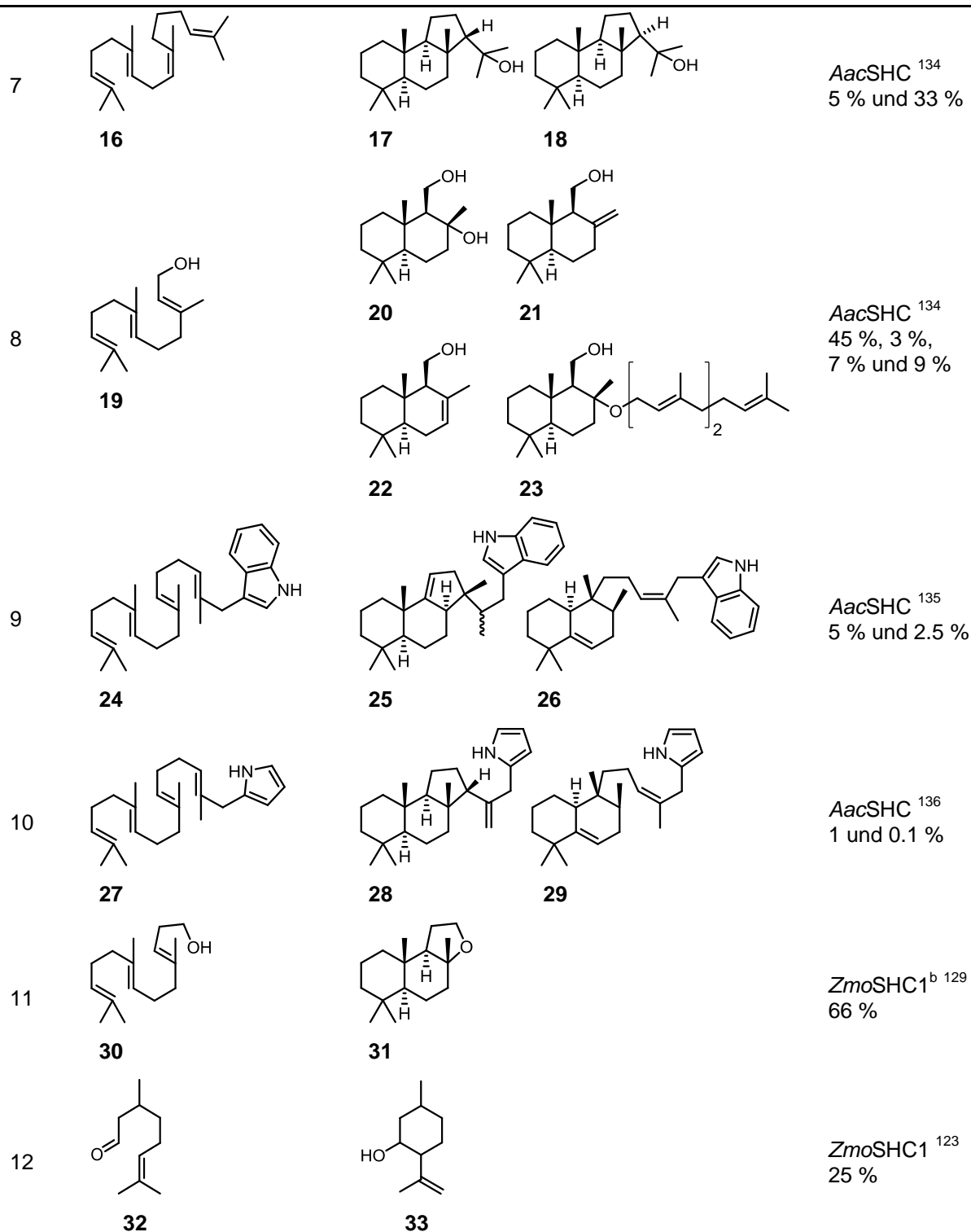
Diese Studien zeigen, dass SHCs neben dem natürlichen C₃₀ Substrat Squalen auch verkürzte Moleküle (C₁₅-C₂₅) akzeptieren und stereoselektiv umsetzen. Auffällig ist die Produkt-Vielfalt bei manchen dieser Umsetzungen. So wird zum Beispiel das Sesquiterpen Farnesol (**19**) zu vier Hauptprodukten umgesetzt. Alle Produkte entstehen aus dem gleichen Carbokation-Intermediat, welches entweder über eine Reaktion mit Wasser (**20**), über Deprotonierung (**21** und **22**) oder durch Reaktion mit der Hydroxy-Gruppe eines zweiten Farnesol-Moleküls abreagiert (**23**). Darüber hinaus wurden auch alternative Nukleophile für die Termination der Polyzyklisierung getestet. Während Indol (**24**) und Pyrrol (**27**) nicht als Nukleophile in die Zyklisierungskaskade eingebaut werden konnten (**Tabelle 1**, Zeile 9 und 10),^{135,136} gelang es Alkohole als Nukleophile zu verwenden.^{106,137,138} Ein kommerziell interessantes Beispiel ist die *Zmo*SHC1-katalysierte Umsetzung von Homofarnesol (**30**) zum wertvollen Duftstoff Ambroxan (**31**).^{106,122,129,139} Bemerkenswerterweise verlaufen die meisten der hier gezeigten SHC-katalysierten Reaktionen nur mit moderaten und selten mit guten Umsetzungen. Grund hierfür ist vermutlich das etwas aufwendigere Reaktions-Setup. SHCs sind membrangebundene Enzyme und benötigen Detergenzien für *in vitro* Umsetzungen. Diese Detergenzien haben einen großen Einfluss auf die jeweilige Aktivität. Daher können SHC-katalysierte Reaktionen erheblich durch die Wahl und Konzentration des Detergens optimiert werden. Auf diesem Weg wurde für die Ambroxan-Synthese ein Verfahren mit der *Zmo*SHC1 entwickelt, welches eine Darstellung im 10 g/L-Maßstab ermöglicht.¹³⁹

Neben den Polyzyklisierungen von Squalen-artigen Substraten wurde in bemerkenswerten Studien auch die Prins/En-Reaktion von Citronellal (**32**) untersucht.^{122,123,140} Diese verläuft über die Protonierung einer Carbonylgruppe. Während für unterschiedliche SHCs (auch *Aac*SHC) keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigt die *Zmo*SHC1 eine Umsetzung von Citronellal (**32**) zu Isopulegol (**33**) (**Tabelle 1**, Zeile 12).¹²³ Erstaunlicherweise ist diese Umsetzung wenig selektiv. Aus bisher unbekanntem Gründen bilden sich Mischungen aus unterschiedlichen Isopulegol-Isomeren und somit ähneln diese Reaktionen Umsetzungen in achiraler Umgebung.

2. STAND DER FORSCHUNG

Tabelle 1: SHC-katalysierte Umsetzungen nicht-natürlicher Substrate.

Zeile	Substrat	Produkt	Enzym ^{Lit} Ausbeute
1	 5	 6	<i>AacSHC</i> ¹³⁰ 10 %
2	 1	 7	<i>BmeTC</i> ^a und <i>AacSHC</i> <i>D377C</i> ¹³¹ 3.4 %
3	 8	 9	<i>AacSHC</i> ¹³² 35 %
4	 10	 11	<i>AacSHC</i> ¹³³ 10 %
5	 12	 13	<i>AacSHC</i> ¹³³ 3 %
6	 14	 15	<i>AacSHC</i> ¹³⁴ 12 %

^a Tetraprenyl- β -curcumen Zyklastase aus *Bacillus megaterium* (*BmeTC*)^b Squalen-Hopen-Zyklastase 1 aus *Zymomonas mobilis* (*ZmoSHC1*)

3. FRAGESTELLUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine biokatalytische Plattform für die chirale Brønsted-Säure-Katalyse entwickelt werden.

Die Brønsted-Säure-Katalyse zeichnet sich durch ihre vielseitige Verwendbarkeit aus. Somit werden neben Friedel-Crafts-Alkylierungen zum Beispiel auch Nazarov-Zyklisierungen Prins/En-Reaktionen und Diels-Alder-Reaktionen katalysiert. Obwohl einige wenige Enzyme für solche Reaktionen beschrieben sind, ist deren biokatalytische Nutzung außerordentlich begrenzt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die entsprechenden Enzyme meistens auf hochspezifischen katalytischen Maschinerien (Aktivierungsmodi) beruhen und häufig von synthetisch anspruchsvollen, aktivierten Substraten abhängen.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Ein biokatalytischer Ansatz für die Brønsted-Säure-Katalyse ist deswegen ein äußerst attraktives Ziel, da somit ein allgemeingültiger enzymatischer Zugang zu vielen wertvollen chemischen Transformationen ermöglicht wird.

Mit den Squalen-Hopen-Zyklen steht ein vielversprechender Startpunkt zur Verfügung. Diese Enzyme besitzen eine einzigartige Protonierungsmaschinerie, welche mit einer spezifischen Brønsted-Säure vergleichbar ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklen als chirale Brønsted-Säuren in der asymmetrischen Katalyse zu studieren.

4. ERGEBNISSE

4.1. Die Protonase-Superfamilie

Die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse wird in der organischen Synthese genutzt, um eine Vielzahl an Reaktion zu katalysieren (Kapitel 2.2.1, Seite 25). Im Vergleich dazu ist diese in der enzymatischen Synthese kaum beschrieben. Während die allgemeine Säure/Base-Katalyse bei Enzymen eine wichtige Rolle spielt,^{86,87} zum Beispiel mittels Stabilisierung des Übergangszustand einer Reaktion durch den Transfer eines Protons, werden Biokatalysatoren nicht als starke Brønsted-Säure-Katalysatoren betrachtet. Dies lässt sich wahrscheinlich auf den relativ hohen pK_a -Wert der natürlichen Protonenquellen zurückführen. Solche Brønsted-Säuren sind nur wenig geeignet um unterschiedliche funktionelle Gruppen durch Protonierung zu aktivieren. Eine Ausnahme bilden die SHCs. Sie besitzen eine bemerkenswerte Maschinerie, welche es erlaubt anspruchsvolle C=C-Bindung zu protonieren. Dies wird durch den Transfer eines wesentlich acideren *anti*-orientierten Protons ermöglicht (Kapitel 2.3.2, Seite 37), wodurch SHCs als spezifische Brønsted-Säure-Katalysatoren angesehen werden können.

Um die natürliche Vielfalt an enzymatischen, spezifischen Brønsted-Säure-katalysierten Reaktionen zu bestimmen, wurde anhand der Aminosäuresequenzen von beschriebenen SHCs nach verwandten Proteinen gesucht und diese bezüglich ihrer annotierten Funktion analysiert. Hierzu wurden Hidden Markov Modelle (HMM) bekannter SHCs erstellt und damit unbekannte Sequenzen in Sequenzdatenbanken (z. B. UniProt-Datenbank) bezüglich ihrer Verwandtschaft sortiert (Kapitel 7.8, Seite 131). HMM sind statistische Modelle von multiplen Sequenz-alignments (MSA). Es handelt sich um Sequenzprofile, die angeben mit welcher Wahrscheinlichkeit die 20 Aminosäuren sowie Insertionen und Deletionen an jeder Aminosäureposition der verwendeten Sequenzen vorkommen. Unbekannte Sequenzen können anhand der HMM bewertet werden. Sequenzen mit einer relativ hohen Ähnlichkeit der konservierten Bereiche bekommen somit einen relativ hohen Vergleichswert.

SHCs bestehen aus zwei $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass Protein-Domänen (Kapitel 2.3.1, Seite 35). Die γ -Domäne besitzt die Membranbindestelle (α -Helix) und den Substrat-Zugangskanal zur aktiven Tasche. Die β -Domäne besitzt die Protonierungsmaschinerie sowie mehrere *loop*-Strukturelemente, welche einen Großteil der aktiven Tasche bilden.

Neben diesen Merkmalen, welche auf Sequenzebene stark konserviert sind, besitzen beide Domänen sogenannte QW-Motive, welche vermutlich zur Stabilität der Proteinfaltung beitragen.¹⁴⁵ Um nach SHC-verwandten Enzymen zu suchen, wurden ausschließlich HMM der β -Domäne erstellt. Die α -Domäne wurde nicht berücksichtigt, da sie theoretisch nicht für die Protonierung anderer Substrate und somit für die Katalyse anderer Reaktionen notwendig ist. Als Startpunkt wurden die SHC-Sequenzen einer Datenbank (*Triterpene Cyclase Database*) verwendet.¹¹⁶ Ein multiples Sequenzalignment der β -Domäne aller SHCs der Datenbank wurde erstellt. Daraus generierte HMM wurden genutzt, um die UniProt-Datenbank nach entfernten Verwandten zu durchforsten. Eine erste Runde und eine darauffolgende Analyse ergab fast ausschließlich Proteinsequenzen, welche der Terpen-Biosynthese zugeordnet werden können. Neben SHCs wurden Oxidosqualen-Zyklasten (OSC) und Klasse II Diterpen-Zyklasten (DC) identifiziert. In einem nächsten Schritt wurden HMM der β -Domäne der OSCs sowie der DCs erstellt. Diese zeigten kaum weitere Sequenzen. Erfolgreicher waren gemischte HMM aus Sequenzen der β -Domäne aller beschriebener Terpen-Zyklasten (SHC, OSC und DC).

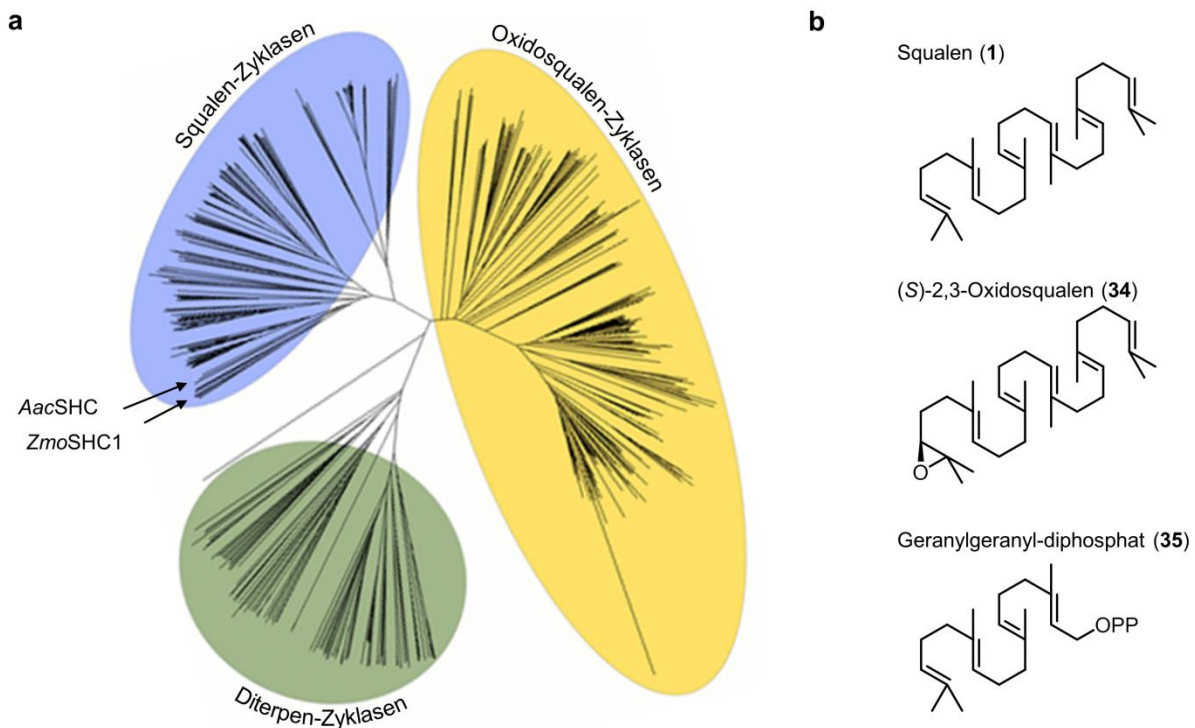


Abb. 8: Natürliche Diversität der Protonase-Superfamilie. (a) Phylogenetische Darstellung der identifizierten Sequenzen, welche sich in Squalen-Zyklasten, Oxidosqualen-Zyklasten und Diterpen-Zyklasten gruppieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme (*AacSHC* und *ZmoSHC1*) sind markiert. (b) Die Protonase-Superfamilie lässt sich abhängig von ihrem Substrat in drei Gruppen einteilen. Als Substrat dienen die beiden Triterpene Squalen (1) und (*S*)-2,3-Oxidosqualen (34) sowie das Diterpen Geranylgeranyl-diphosphat (35).

Eine Suche mit diesen HMM-Modellen identifizierte Prenyltransferasen¹⁴⁴ und Glycodextranasen¹⁴⁶. Jedoch besitzen beide Enzymklassen nicht die Protonierungsmaschinerie der SHCs, sondern beruhen auf einem anderen Mechanismus. Die verwandtschaftliche Beziehung in diesen Enzymen beruht auf der gleichen $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass Proteinfaltung und der damit einhergehenden Existenz der QW-Motive. Interessanterweise konnten keine verwandten Enzyme entdeckt werden, welche diese Protonierungsmaschinerie nutzen, um weitere Reaktionen zu katalysieren. Somit beschränken sich die Enzyme der Protonase-Superfamilie auf die Terpen-Biosynthese (**Abb. 8**). Insgesamt wurden ca. 700 nicht-repetitive Aminosäuresequenzen identifiziert. Von den ungefähr 200 Squalen-Zyklasen, etwa 300 Oxidosqualen-Zyklasen und etwa 200 Klasse II Diterpen-Zyklasen wurden bisher 5 bis 10 % der Proteine biochemisch charakterisiert und somit deren vorhergesagte Funktion bestätigt (SC^{118,120–122,147–153}, OSC^{151,154–188}, DC^{189–208}).

Zur Bildung einer Plattform für enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse wurden für diese Arbeit OSCs sowie DCs nicht weiter berücksichtigt. Eine genaue Betrachtung der Kristallstruktur der *Homo sapiens* OSC (*HsaOSC*)²⁰⁹ zeigt einen geänderten Aufbau der Protonierungsmaschinerie (**Abb. 9**). Während bei der *AacSHC* die katalytisch aktive Asparaginsäure ein acideres *anti*-orientiertes Proton (Kapitel 2.3.2, Seite 37) auf das Substrat überträgt, ist die äquivalente Asparaginsäure (D455) der *HsaOSC* nicht auf diese Weise in der aktiven Tasche lokalisiert. D455 besitzt eine Orientierung, welche auf den Transfer eines *syn*-orientierten Protons schließen lässt. Dies ist im Einklang mit der Aktivierung des basischeren und somit reaktiveren Epoxids, welches als Substrat der OSCs Verwendung findet. Des Weiteren wurde gezeigt, dass OSCs Squalen nicht als Substrat akzeptieren.^{95,210} Somit lässt sich rückschließen, dass die Acidität der OSCs vermutlich geringer und diese Enzyme somit weniger als starke Brønsted-Säuren geeignet sind. Im Gegensatz dazu besitzen die DCs ein katalytisches Zentrum mit Transfer eines *anti*-orientiertes Protons (**Abb. 9**).^{211,212} Jedoch sind DC sehr spezifisch in Bezug auf die Diphosphat-Gruppe des Substrats und daher kaum geeignet, um als Brønsted-Säure-Katalysator unterschiedliche Substrate zu aktivieren. Diese Spezifität lässt sich auf eine Substrat-induzierte Struktur-Änderung zurückführen, welche durch die Bindung der Diphosphat-Gruppe ausgelöst wird.²¹²

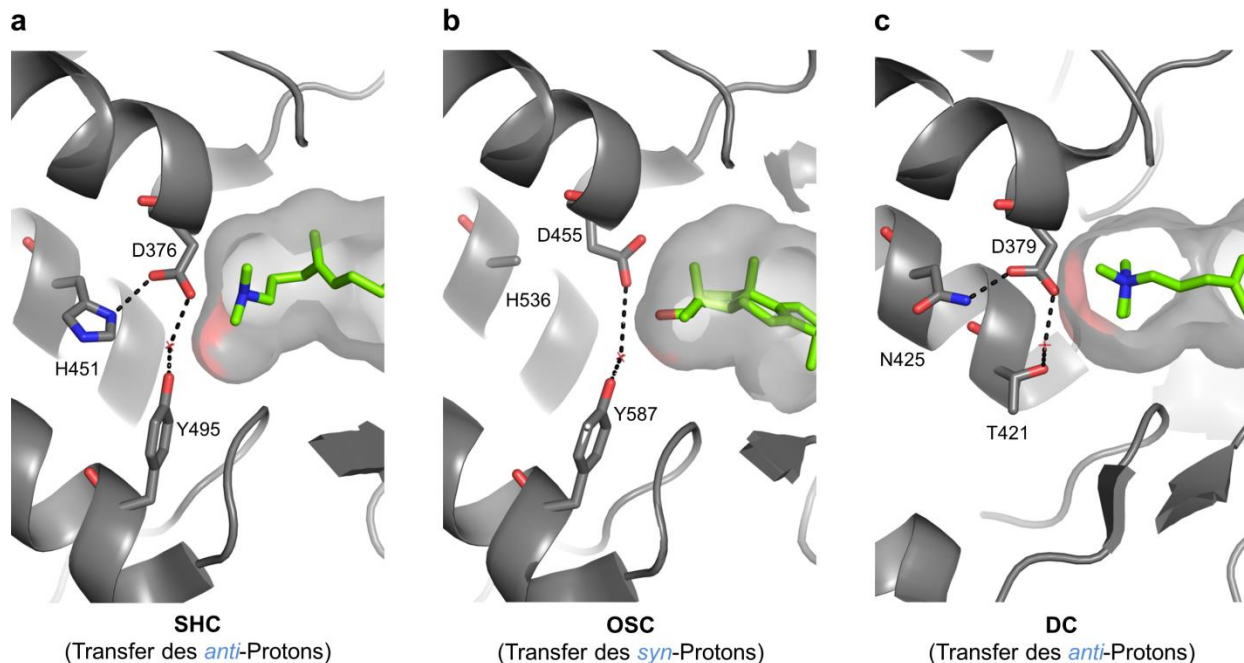


Abb. 9: Protonierungsmaschinerien der Mitglieder der Protonase-Superfamilie. **(a)** Die katalytisch aktive Asparaginsäure der *AacSHC* (D376) wird durch ein Histidin (H451) sowie über ein Wassermolekül zu einem Tyrosin (Y495) lokalisiert. Dies ermöglicht den Transfer eines *anti*-orientierten Protons auf das Substrat. In der aktiven Tasche ist das Substratanalogon 2-Azasqualen (grün) abgebildet (pdb 1UMP)⁹⁷. **(b)** Im Gegensatz dazu ist das katalytisch aktive D455 der *HsaOSC* für den Transfer eines *syn*-orientierten Protons positioniert. Das H451 der *AacSHC* ist bei der *HsaOSC* gegen ein Alanin substituiert. In der aktiven Tasche ist das Produkt der Zyklisierung (Lanosterol, grün) zu sehen (pdb 1W6K)²⁰⁹. **(c)** Analog zur *AacSHC* transferiert die DC (*Arabidopsis thaliana* ent-Copolyldiphosphat Synthase) ein *anti*-orientiertes Proton. Die Aktivierung von D379 erfolgt durch ein Asparagin (N425) sowie über ein Wassermolekül zu einem Threonin (T421). In der aktiven Tasche ist ein Teil des co-kristallisierten Substratanalogons (*S*)-15-Aza-14,15-dihydrogeranylgeranyl-thiolodiphosphat in grün zu sehen (pdb 3PYA)²¹¹.

4.2. Klonierung, Expression und Charakterisierung der *AacSHC*

Ausgehend von der großen Anzahl an SHCs in Proteindatenbanken wurde nach einer geeigneten SHC gesucht. Am vorteilhaftesten erschien es die Arbeit auf die *AacSHC* auszurichten, da diese SHC als Modell-Enzym in der Literatur Verwendung findet und darüber hinaus thermophilen Ursprungs ist. Die Kristallstruktur wurde bereits gelöst und diverse Mutationsstudien durchgeführt.^{97,107,108,113} Somit lassen sich Mutationen für das *protein engineering* leichter identifizieren und deren Effekte einfacher erklären. Der thermophile Charakter der *AacSHC* bietet praktische Vorteile in der Enzym-Aufreinigung (Hitzenaturierung der *E. coli* Proteine) und vermittelt darüber hinaus Robustheit gegenüber Mutationen. Dies ist wichtig, da eingeführte Mutationen meistens eine destabilisierende Wirkung haben.²¹³

Somit besitzen Enzyme mit marginaler Stabilität nur eine geringe Toleranz gegenüber Mutationen und sind daher limitiert in ihrer Evolvierbarkeit. Das Gen der *AacSHC* wurde von Michael Breuer (BASF SE, Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt. Die vorhandenen Abweichungen in der Aminosäuresequenz (zwischen der BASF-Variante und der kristallisierten Variante¹⁰⁸) wurden durch ortsgerichtete Mutagenese behoben (Kapitel 7.1.5, Seite 101). Anschließend wurde das Gen in einen pET-22b(+) Vektor kloniert. Erste Expressionsstudien orientierten sich an den Expressionsbedingungen der *ZmoSHC1* (IPTG-Induktion, 0.2 mM IPTG, 4 h bei 37 °C).¹²² Eine Absenkung der Temperatur bei gleichzeitiger Erhöhung der IPTG-Konzentration zeigte eine leichte Verstärkung der *AacSHC*-Bande in der SDS-PAGE Analyse (1.0 mM IPTG, 4 h bei 30 °C). Neben der IPTG-Induktion, wurde auch eine Autoinduktion²¹⁴ als Expressionsmethode erarbeitet (Kapitel 7.4.1, Seite 110). Diese hat den Vorteil, dass im Vergleich zur IPTG-Induktion eine deutlich höhere Ausbeute aufgrund einer höheren Zelldichte erzielt wird. Darüber hinaus beansprucht die Autoinduktion einen deutlich geringeren Zeitaufwand (keine Messung der Zelldichte, keine Zugabe eines Induktors) und ermöglicht dadurch die parallele Expression einer Vielzahl an Mutanten/Varianten. Die etablierte Enzympräparation¹²² ausgehend von einem Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0) und darauffolgende Mischung mit einem Citratpuffer (50 mM, pH 6.0) wurde durch ein einfacheres Einpuffersystem (60 mM Citratpuffer, pH 6.0) ersetzt. Dieser Puffer wurde für alle Präparationsschritte verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass in der finalen Reaktionsmischung keine unterschiedlichen Puffersysteme mit unterschiedlichen pH-Werten gemischt werden müssen, um einen definierten pH-Wert zu erreichen. Ein einfaches Protokoll für die Enzymbereinigung der *AacSHC* wurde erarbeitet, welches im Wesentlichen aus einer Hitze-Denaturierung der *E. coli* Proteine sowie aus einer Ionenaustauschchromatographie besteht (Kapitel 7.4.2, Seite 110). Erste Aktivitätstests der *AacSHC* zeigten Umsatz von Squalen (**1**) zu Hopan (**2**) und Hopanol (**3**) und bestätigten somit die natürliche Aktivität (**Abb. 10**).²¹⁵ Auch das nicht-natürliche Substrat Farnesol (**19**) konnte entsprechend der Literatur¹³⁴ zu den vier beschriebenen Produkten umgesetzt werden (**Tabelle 1** Zeile 8, weitere Details siehe Diplomarbeit von Christine Gally²¹⁶). Beide Substrate zeigten unter Standardbedingungen (2 mM Substrat, 20 h, 60 °C, pH 6.0, ~1 mg/mL aufgereinigte *AacSHC*, 0.2 % Triton X-100) einen vollständigen Umsatz.

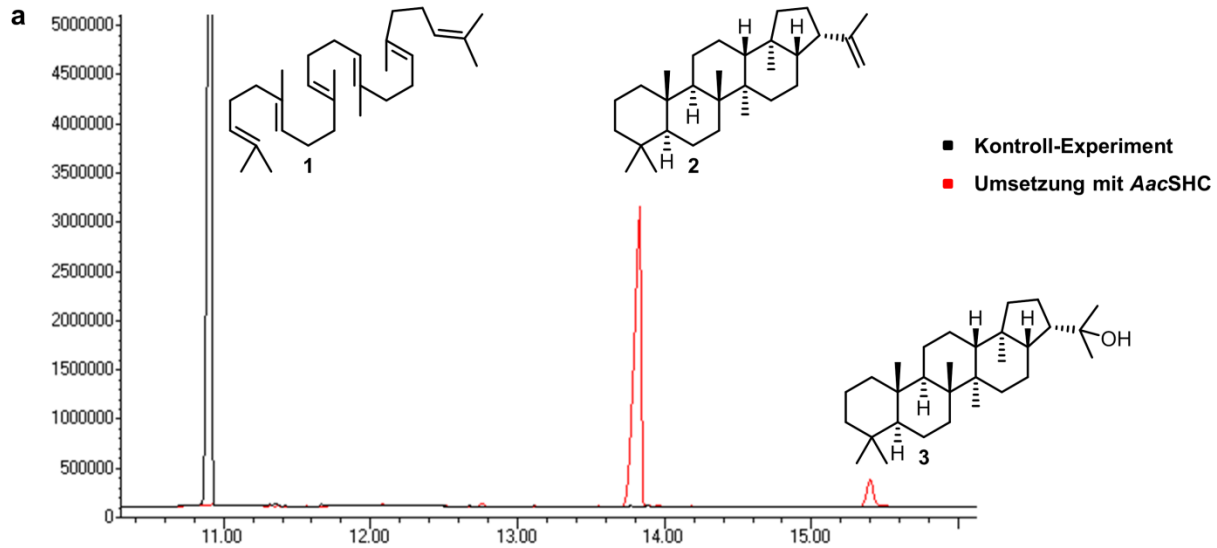


Abb. 10: Aktivitätstest der AacSHC mit dem natürlichen Substrat Squalen. Zu sehen sind die GC-Chromatogramme im Vergleich. Das Kontroll-Experiment (schwarz) zeigt nur Squalen (1), während die Umsetzung mit AacSHC (rot) Hopene (2) und Hopanol (3) bildet. Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 20 h, 60 °C, pH 6.0, ~1 mg/mL aufgereinigte AacSHC, 0.2 % Triton X-100.

Des Weiteren wurden die Reaktionsparameter optimiert. Hier zeigten sich geringe Mengen an Detergens (bis 0.2 % Triton X-100 und CHAPS) vorteilhaft.²¹⁶ Um in den analytischen Umsetzungen (1 mL) wasserunlösliches, hydrophobes Substrat reproduzierbar zugeben zu können, wurden der Einfluss verschiedener wasserlöslicher organischer Lösungsmittel getestet (**Abb. 11a**). DMSO im Bereich von 1 % zeigte keinen Einfluss auf den Umsatz von Farnesol (19). Dies ermöglichte die reproduzierbare Zugabe der hydrophoben Substrate als eine DMSO-Stammlösung (10 µL einer 200 mM Stammlösung pro mL Reaktionsgemisch). Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Schüttelgeschwindigkeit des Thermomixers analysiert. Die 1 mL analytischen Ansätze wurden in 2 mL Probengläsern in einen Thermomixer geschüttelt. Die Farnesol-Umsetzung in Abhängigkeit der Schüttelgeschwindigkeit zeigte eine deutliche Zunahme des Umsatzes mit erhöhter Drehzahl (**Abb. 11b**). Dieses bei enzymatischen Reaktionen unübliche Phänomen ist wahrscheinlich auf die Inhomogenität der Reaktionsmischung zurückzuführen. Das hydrophobe Substrat ist nicht gleichmäßig in der Reaktionsmischung verteilt, sondern bevorzugt in den Mizellen des Detergens gelöst. Es ist somit denkbar, dass die Diffusion des Substrates durch die Diffusion der Mizellen limitiert ist. Demzufolge ist die Interpretation kinetischer Daten nur erschwert möglich. Dies wurde in der Arbeit dadurch berücksichtigt, indem standardmäßig eine mittlere Schüttelgeschwindigkeit von 800 UpM verwendet wurde.

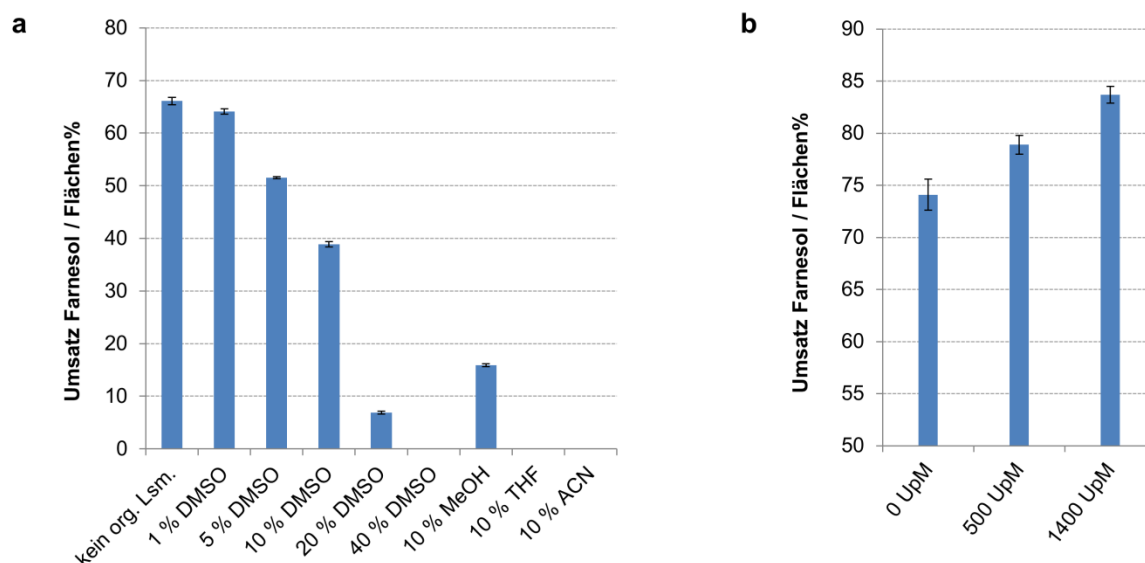


Abb. 11: *AacSHC*-Aktivität bei verschiedenen Lösungsmittelzusätzen und unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten. **(a)** Umsatz von Farnesol mit *AacSHC* unter Standardbedingungen und verschiedenen Mengen unterschiedlicher, wasserlöslicher organischer Lösungsmittel. 1 % DMSO zeigt kaum einen Einfluss auf die Aktivität der *AacSHC*. **(b)** Umsatz von Farnesol mit *AacSHC* bei unterschiedlichen Drehzahlen des Thermomixers. Eine erhöhte Drehzahl steigert den Umsatz messbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Diffusion des Substrates vermutlich durch die Diffusion der Mizellen limitiert ist. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

4.3. Polyzyklisierungen funktionalisierter isoprenoider Polyene

Polyen-Zyklisierungen der SHCs sind elektrophiler Natur. Bei der Umsetzung des natürlichen Substrats Squalen reagieren Carbokation-Intermediate mit den π -Elektronen benachbarter C=C-Bindungen. Dies lässt sich theoretisch mit unterschiedlichen Nukleophilen kombinieren, wodurch ein enzymatischer Zugang zu Polyen-Zyklisierungen von funktionalisierten isoprenoiden Polyenen möglich ist. Dies wird dadurch unterstützt, dass bereits unterschiedliche gekürzte und verlängerte Squalen-Derivate durch SHCs zyklisiert wurden (**Tabelle 1**, Seite 40). In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Neumann *et al.* besonders hervorzuheben.¹⁰⁶ Hier wurde gezeigt, dass neben C=C-Bindungen auch Alkohole als Nukleophile während der SHC-katalysierten Zyklisierung verwendet werden können. Als eine Weiterführung dieser Studien wurde in einem Teil der hier vorliegenden Arbeit die enzymatische Zyklisierung von funktionalisierten isoprenoiden Polyenen untersucht. Neben der stereoselektiven C-C-Bindungsknüpfung mit Aromaten (Friedel-Crafts-Alkylierung) wurden die C-N- sowie die C-S-Bindungsknüpfung mit Wildtyp-SHCs (*AacSHC* und *ZmoSHC1*) studiert.

4.3.1. Stereoselektive Friedel-Crafts-Alkylierung

Für die C-C-Bindungsknüpfung mit einem Aromaten als Teilschritt der Polyen-Zyklisierung wurden verschiedene Modell-Substrate synthetisiert. Insgesamt wurden vier Verbindungen studiert: Geranylphenylether **36**, Geranyl-3-bromophenylether **37**, Farnesylphenylether **38** sowie der Geranylgeranylphenylether **39** (**Abb. 12**). Die Verbindungen wurden mittels Williamson-Ethersynthese hergestellt, um SHC-katalysierte, intramolekulare Friedel-Crafts-Alkylierung nachzuweisen. Ein Teil der Synthesen sowie erste enzymatische Umsetzungen wurde im Rahmen einer betreuten Diplomarbeit (J. M. Dominicus) durchgeführt.²¹⁷ Biotransformationen mit *ZmoSHC1* und *AacSHC* zeigten Aktivität für jedes der Substrate (**36** bis **39**). GC/MS-Analysen und Vergleiche mit Kontroll-Experimenten (Enzympräparation aus *E. coli* mit Leervektor) bestätigten die identifizierten Aktivitäten. Daraufhin wurden präparative Umsetzungen (150-300 mg) durchgeführt, die Hauptprodukte isoliert und deren Struktur per ^1H und ^{13}C -NMR ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY) sowie IR-Spektroskopie bestimmt. Für zwei Substrate (**36** und **38**) konnte die stereoselektive Friedel-Crafts-Alkylierung nachgewiesen werden, da die entsprechenden Produkte (**40** und **42**) als Hauptprodukte identifiziert wurden (**Abb. 12a**).²¹⁸ Hierzu wurde unter anderem die 2D-NMR Spektroskopie verwendet und somit die Struktur mittels $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY- und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Experimenten bestätigt (**Abb. 12a**). Interessanterweise zeigten die beiden SHCs keine größeren Unterschiede in Bezug auf die Aktivität und die Produktselektivität. Die Quantifizierung der Reaktion wurde mit *ZmoSHC1* durchgeführt. Die Umsetzung von **36** führte selektiv zum Friedel-Crafts-Alkylierungsprodukt **40**. Im Gegensatz dazu zeigte die verwandte Brom-Verbindung **37** kaum Aktivität. Ziel war die Produktselektivität des Alkylierungsschritts (*ortho* oder *para* zum Brom) zu untersuchen. Vermutlich verhindert die Größe des Brom-Substituenten eine produktive Bindung des Substrats **37**. Darüber hinaus konnte auch für den Farnesylphenylether **38** eine stereoselektive Alkylierung des Aromaten zum Produkt **42** nachgewiesen werden. Jedoch zeigte diese Reaktion auch noch ein weiteres Hauptprodukt (Alken **41**), welches durch eine regioselektive Deprotonierung des Carbokation-Intermediates entsteht. Die Zyklisierung von **39** offenbarte noch eine geringere Produktspezifität (zwei Haupt- und vier Nebenprodukte). Diese Produktvielfalt ist auf unterschiedliche produktive Bindungen des Substrats zurückzuführen.

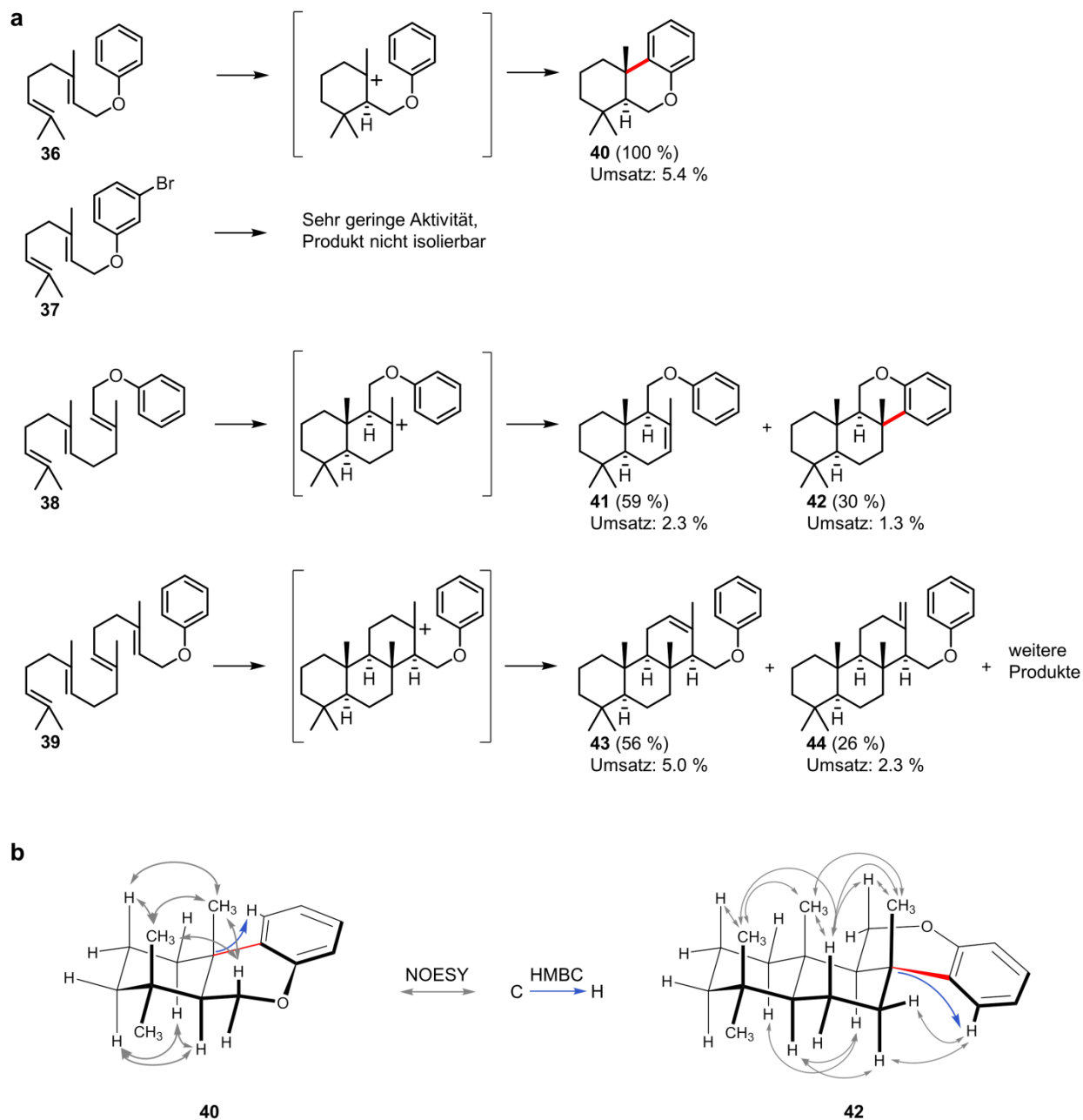


Abb. 12: SHC-katalysierte Friedel-Crafts-Alkylierung. (a) Umsetzung der Polyprenylphenylether (**36** bis **39**) mit der *Zmo*SHC1. Die Angaben für den Umsatz entsprechen quantifizierten Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen. Die Werte in Klammern beschreiben den Anteil des jeweiligen Produktes an insgesamt gebildetem Produkt. Zur Bestimmung der Aktivität wurden folgende Bedingungen gewählt: 2 mM Substrat, 3 mg/mL aufgereinigte *Zmo*SHC1, 20 h, 30 °C, 0.2 % Triton X-100. Für zwei der Substrate (**36** und **38**) wurden die entsprechenden Friedel-Crafts-Alkylierungsprodukte (**40** und **42**) isoliert. (b) Gezeigt sind die für die Strukturlösung wichtigen NOE und HMBC Signale der Friedel-Crafts-Alkylierungsprodukte (**40** und **42**).

Für die Synthese eines einzigen Produkts ist eine optimale Vorfaltung des Substrates in der aktiven Tasche notwendig. Während **36** selektiv in einer einzigen reaktiven Konformation gebunden wird, scheint **39** in verschiedenen reaktiven Konformationen in die aktive Tasche zu binden. Dies führt im Laufe der Polyzyklisierung zu unterschiedlichen Produkten. In diesem Kontext spielen auch Wassermoleküle eine entscheidende Rolle, da deren Anwesenheit während der Zyklisierung vermutlich zu einem Zyklisierungsabbruch durch einen nukleophilen Angriff des Wassers oder durch Deprotonierung des Carbokation-Intermediates führen kann. Die produktive Bindung der nicht-natürlichen Substrate muss somit unter Ausschluss von Wassermolekülen erfolgen.

Insgesamt weisen diese Studien darauf hin, dass die hydrophobe aktive Tasche der SHCs eine gewisse Formbarkeit/Flexibilität besitzt, da nicht-natürliche Substrate, in diesem Fall mit einer räumlich anspruchsvollen Phenylgruppe produktiv und unter Ausschluss von Wasser gebunden werden. Somit imitiert die aktive Tasche der SHCs ein inertes organisches Lösungsmittel. Zusammenfassend zeigt sich, dass SHCs Friedel-Crafts-Alkylierungen katalysieren. Dies ist von synthetischem Interesse, da die daraus resultierenden polyzyklischen Verbindungen Grundgerüste für eine Reihe von wertvollen Verbindungen wie zum Beispiel (+)-Totarol darstellen.^{219–224}

4.3.2. Stereoselektive Hydroamidierung

Polyzyklische Verbindungen auf Basis der *trans*-Decahydrochinoline sind eine strukturell begrenzte, jedoch funktional sehr interessante Klasse an Verbindungen.^{225–227} Eine stereoselektive Synthese von terpenoiden *trans*-Decahydrochinolinen ist durch Zyklisierung der entsprechenden linearen Moleküle denkbar. Allerdings sind Amine als Nukleophil nicht zu benutzen, da sie als Inhibitoren der SHCs beschrieben sind. Für unterschiedliche Amine wurde gezeigt, dass diese mit der katalytisch aktiven Asparaginsäure ein Salz bilden und somit die katalytische Maschinerie sowie die aktive Tasche blockieren.^{108,228} Aus diesem Grund wurde für die Termination der Reaktion das Amid als Nukleophil verwendet. Amide sind im Vergleich zu den Aminen viel schwächere Basen. Als geeignetes Substrat wurde das Acetamid *rac*-**44** gewählt, welches über reduktive Aminierung aus dem entsprechenden Keton sowie anschließender Acetylierung hergestellt wurde. Synthesen und erste enzymatische Umsetzungen wurden in einer betreuten Bachelorarbeit (J. Schmid) durchgeführt.²²⁹

Diese ersten Experimente zeigten SHC-Aktivität für *rac-44*, wobei *AacSHC* im Vergleich zur *ZmoSHC1* einen signifikant höheren Umsatz vorwies. Neben einem Hauptprodukt wurde ein Nebenprodukt (Verhältnis ~ 20:1) nachgewiesen, welche beide in einem Kontroll-Experiment (Enzympräparation aus *E. coli* mit Leervektor) nicht gebildet wurden. Auch ein entsprechendes Kontrollexperiment mit dem Knockout der katalytisch aktiven Asparaginsäure (*AacSHC D376C*) zeigte keine Zyklisierungsaktivität. Für die Charakterisierung des unbekanntes Produkts wurde ein präparativer enzymatischer Ansatz durchgeführt, wobei 160 mg des Substrats *rac-44* eingesetzt wurden. Nach 2 Tagen Reaktionszeit wurden 19.0 mg des Hauptproduktes isoliert. Das Produkt wurde durch ^1H und ^{13}C -NMR ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY) sowie IR-Spektroskopie charakterisiert und als das *trans*-Decahydrochinolin **45** identifiziert. Dies beweist, dass Amide als Nukleophile in der SHC-katalysierten Polyenzym-Zyklisierung verwendet werden können, um *N*-heterozyklische Verbindungen zu generieren.

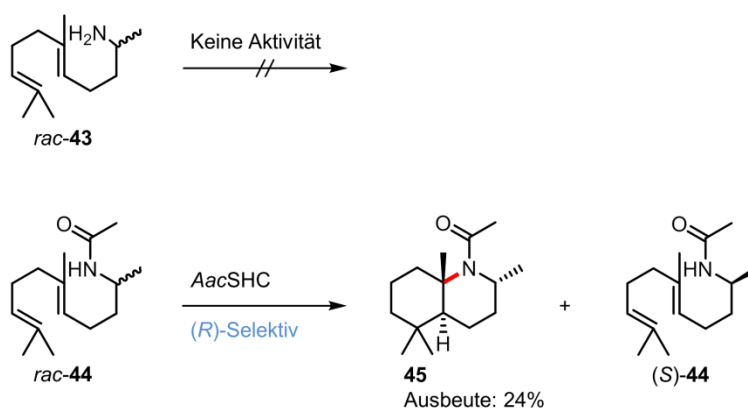


Abb. 13: Umsetzung von *N*-funktionalisierten linearen Terpenoiden mit *AacSHC*. Während das racemische Amin *rac-43* keine Aktivität zeigte, konnte das racemische Amid *rac-44* in einer (*R*)-selektiven Reaktion zum *trans*-Decahydrochinolin **45** umgesetzt werden.

Während das (*R*)-Enantiomer umgesetzt wird, ist (*S*)-**44** kein Substrat für *AacSHC* (**Abb. 13**). Dieser Rückschluss ergibt sich aus dem NOESY-Spektrum von **45**, welches die relative Stereochemie der Methylgruppe aufklärt. Um diese bemerkenswerte Selektivität besser zu verstehen, wurden beide Enantiomere von **44** in ihrer reaktiven Konformation in die aktive Tasche der *AacSHC* modelliert. Hierfür wurde die Kristallstruktur mit dem co-kristallisierten Squalen-Analogon 2-Azasqualen (**4**) (pdb 1UMP) verwendet.¹⁰⁸ Dieses Substratanalogon bindet in der aktiven Tasche in einer reaktiven Konformation (Vergleich **Abb. 6b**, Seite 35).

Es ist realistisch anzunehmen, dass Squalen-ähnliche Substrate in der gleichen reaktiven Konformation binden. Die durchgeführte Modellierung ergab, dass die für die Stereochemie verantwortliche Methylgruppe eine wesentliche Rolle bei der produktiven Bindung spielt (**Abb. 14**). Während das (*R*)-Enantiomer (*R*)-**44** entsprechend dem 2-Azasqualen in die aktive Tasche binden kann, ist dies für das (*S*)-Enantiomer (*S*)-**44** nicht möglich. Der Abstand zwischen der Methylgruppe von (*S*)-**44** und der Hydroxygruppe der Aminosäure Y420 ist kürzer als der van-der-Waals-Abstand der Atome. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass zumindest die ersten zwei Ringschlüsse der Squalen-Zyklisierung konzertiert ablaufen, wodurch eine Herabsetzung der Aktivierungsenergie ermöglicht wird.^{102,108} Somit ist eine Substratbindung in einer reaktiven Konformation zwingend erforderlich. Die reaktive Konformation bringt Atompaaire (Orbitale) in eine Orientierung, welche mit den Bindungsknüpfungen übereinstimmen. Während (*R*)-**44** vergleichbar dem 2-Azasqualen in der aktiven Tasche binden kann, ist diese reaktive Konformation für (*S*)-**44** nicht direkt erreichbar.

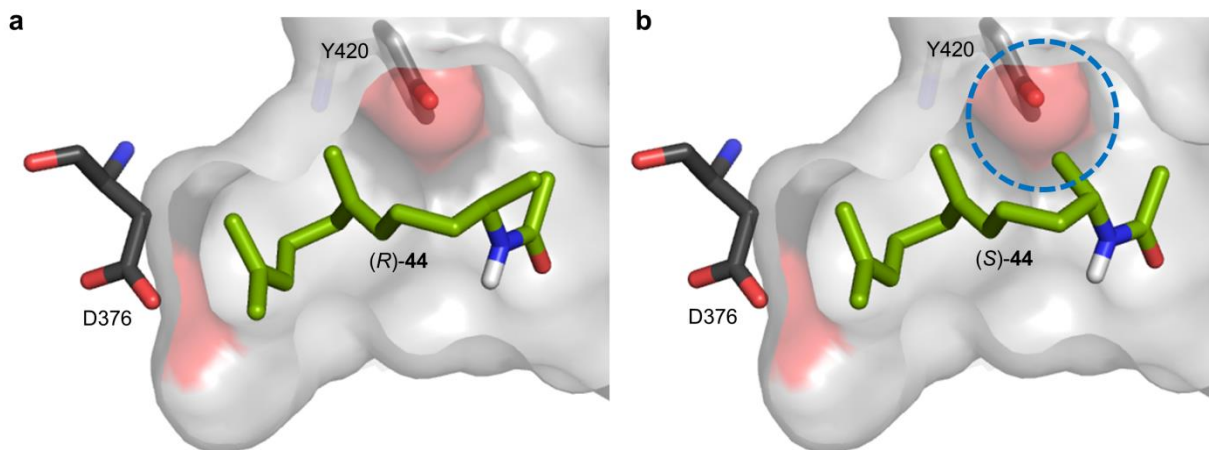


Abb. 14: Modellierung beider Substrat-Enantiomere in die aktive Tasche der AacSHC basierend auf den kristallographischen Daten des Squalen-Analogons 2-Azasqualen (pdb 1UMP).¹⁰⁸ (a) Das (*R*)-Enantiomer (*R*)-**44** kann ohne sterischen Konflikt entsprechend dem 2-Azasqualen in die aktive Tasche modelliert werden. (b) Dies ist für das (*S*)-Enantiomer (*S*)-**44** nicht möglich, da die Methylgruppe des Substrats mit der Hydroxygruppe des Tyrosins (Y420) zusammen stößt (blauer Kreis).

4.3.3. C-S-Bindungsknüpfung mit Thiolen

Neben Aromaten und *N*-Nucleophilen wurden auch *S*-Nucleophile für die Termination der Polyen-Zyklisierung studiert. Vergleichbar zu Alkoholen (**Tabelle 1**, Seite 40) könnten Thiole als Nucleophile dienen, um *S*-heterozyklische Verbindungen stereoselektiv zu synthetisieren. Als Testsubstrat wurde das Thiol *rac*-**49** gewählt (**Abb. 15**). Dieses wurde chemisch in einer Dreistufensynthese aus dem entsprechenden Keton **46** dargestellt.²²⁹ Aufgrund der Instabilität der Verbindung konnte das Thiol *rac*-**49** nur mittels GC/MS nachgewiesen werden. Eine Isolierung des Thiols *rac*-**49** gelang nicht. Um der Instabilität entgegenzuwirken, wurde eine enzymatische Kaskade entwickelt (**Abb. 15**). Diese Zweistufen-Reaktion beinhaltet eine Lipase-katalysierte Hydrolyse des Thiolesters *rac*-**48** gefolgt von einer *Aac*SHC-katalysierten Zyklisierung des Thiols *rac*-**49**.

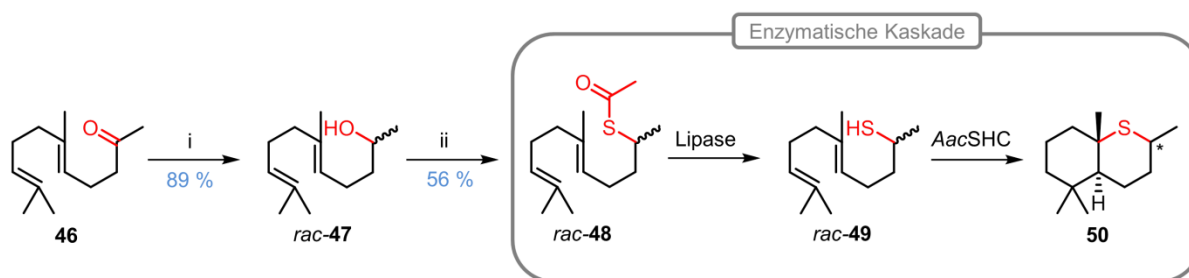


Abb. 15: Syntheseroute zur Darstellung des *trans*-Thiadecalins **50**. (i) Diethylether, LiAlH₄, 25 °C, 12 h. (ii) THF, Triphenylphosphan, DIAD, Thioessigsäure, -20 °C bis 0 °C. Aufgrund der Instabilität des Thiols *rac*-**49** wurde eine enzymatische Kaskade als Eintopfreaktion entwickelt. Im ersten Schritt wird der Thiolester *rac*-**48** mittels der Lipase (CalB) hydrolysiert. Im zweiten Schritt wird das entstandene instabile Thiol *rac*-**49** *in situ* mittels *Aac*SHC zyklisiert.

In einem ersten Schritt wurden verschiedene Lipasen bezüglich der Hydrolyse von *rac*-**48** getestet (Bachelorarbeit X. Moser).²³⁰ Während einige Lipasen selektiv ein Enantiomer des Racemats hydrolysierten, katalysierte die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) die gewünschte unselektive Hydrolyse beider Enantiomere des Thiolesters (*rac*-**48**). Folgestudien bestätigten die Aktivität von CalB unter den Reaktionsbedingungen der *Aac*SHC-Reaktion (60 mM Citratpuffer, pH 6.0, 0.2 % Triton X-100). Da die *Aac*SHC mit dem Thiolester *rac*-**48** keine Umsetzung zeigte, konnten beide Enzyme parallel eingesetzt werden. Dies führte zur Bildung von zwei neuen Molekülen **P1** und **P2** (**Abb. 16**), welche in der GC/MS-Analyse die gleiche Masse wie das Thiol *rac*-**48** zeigten. Darüber hinaus bildeten sich diese Verbindungen (**P1** und **P2**) nur in Anwesenheit beider Enzyme (CalB und *Aac*SHC).

4. ERGEBNISSE

Eine Kaskade mit CalB und *AacSHC* D376C zeigte nur die CalB-katalysierte Hydrolyse. Die *AacSHC* Variante D376C mutiert die katalytisch aktive Asparaginsäure zum katalytisch inaktiven Cystein. Zusammen mit den entsprechenden Massenspektren weist dies darauf hin, dass es sich bei den Produkten (**P1** und **P2**) um Zyklisierungsprodukte handelt. Anschließend wurden mehrere präparative Ansätze durchgeführt. Aufgrund der Instabilität des Thiols *rac-49* konnten dabei aber die analytischen Ansätze nicht reproduziert werden. Die Instabilität des Thiols *rac-49* wurde dabei mittels GC-Analyse bestimmt. Weil auch die Durchführung der Reaktion unter Schutzgas-Atmosphäre nicht erfolgreich war, wurde das Projekt an dieser Stelle vorerst nicht weiter bearbeitet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *AacSHC* die Thiolverbindung *rac-49* als Substrat akzeptiert und zyklisiert. Die Strukturen der Zyklisierungsprodukte **P1** und **P2** konnte nicht bestimmt werden.

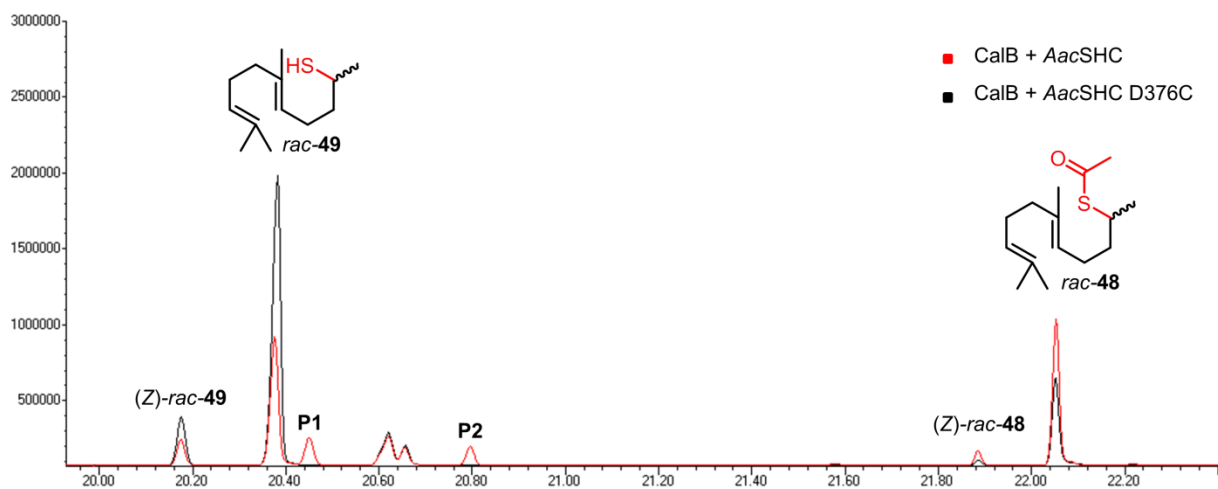


Abb. 16: GC-Analyse der enzymatischen Kaskade. Eine Umsetzung des Thioesters *rac-48* in einer Kaskade aus CalB und *AacSHC* (rot) ist als Vergleich mit der Kaskade aus CalB und *AacSHC* D376C (schwarz) dargestellt. Die Lipase (CalB) hydrolysiert den Thioester *rac-48* zum Thiol *rac-49*. Die beiden Verbindungen (*Z*)-*rac-48* und (*Z*)-*rac-49* sind die entsprechenden (*Z*)-Isomere der Doppelbindung, welche als Nebenprodukte in der Synthese des Thioesters *rac-48* (mit (*E*)-konfigurierter Doppelbindung) entstanden. Während die Anwesenheit der inaktiven *AacSHC* D376C kein weiteres Produkt aus dem Thiol *rac-49* generierte, bildete die aktive *AacSHC* zwei unbekannte zyklische Produkte (**P1** und **P2**). Diese Moleküle entsprechen nach der GC/MS-Analyse Zyklisierungsprodukten des Thiols *rac-49*. Diese konnten jedoch nicht im präparativen Maßstab generiert werden. Der Doppelpeak bei 20.6 min entspricht Zerfallsprodukten, welche durch die Instabilität des Thiols *rac-49* entstehen.

4.4. Die reaktive Konformation: Auswirkung und Adressierung

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, besitzen SHCs eine große Toleranz bezüglich nicht-natürlicher Substrate. Verschiedene terminal funktionalisierte, isoprenoide Polyene werden zu den entsprechenden Polyzyklen umgesetzt.⁹⁶ Vorhergehende Studien sowie auch während dieser Arbeit durchgeführte Experimente (Kapitel 4.5, Seite 63) zeigen jedoch, dass diese Akzeptanz bei kurzkettigen Molekülen (wie z. B. Monoterpenen) endet.^{106,129,134} Bisher konnten keine kurzkettigen Squalen-Derivate in Monozyklisierungsreaktionen umgesetzt werden. In diesem Teil der Arbeit wurden solche Reaktionen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die nicht vorhandene bzw. geringe Aktivität gegenüber relativ kleinen Substraten auf eine schwache Bindung der reaktiven Konformation zurückzuführen ist und dass diese mittels *substrate engineering* begünstigt werden kann (Kapitel 4.4.1). Des Weiteren wurde diese Limitierung der Wildtyp-SHC mittels *protein engineering* adressiert und eine Mutantenbibliothek ausgehend von der *AacSHC* erstellt und charakterisiert (Kapitel 4.4.2).

4.4.1. Stabilisierung der reaktiven Konformation durch *substrate engineering*

Substratbindung in einer *near-attack*-Konformation ist ein essentieller Bestandteil der SHC-katalysierten Polyzyklisierung (Kapitel 2.3.1, Seite 35). Ursache hierfür ist der konzertierte Charakter dieser Reaktion.¹⁰² SHC-Aktivität gegenüber nicht-natürlichen Substraten wird somit maßgeblich durch die Fähigkeit bestimmt, Substrate in der reaktiven Konformation zu binden. Besonders bei relativ kleinen Molekülen sollten jedoch zur reaktiven Konformation viele nicht-reaktive Bindungsmodi in Konkurrenz stehen und so die Aktivität herabsenken. Dies gilt zum Beispiel für das verkürzte Squalen-Analogon Geraniol (**51**), ein Monoterpen welches laut Literatur von der *AacSHC* nicht als Substrat akzeptiert wird.^{106,134} Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass bei erhöhten Enzymkonzentrationen (1.5 mol%) sowie verlängerten Reaktionszeiten (60 h) ein geringer Umsatz von Geraniol detektierbar ist (**Abb. 17**). Ein Vergleich mit analytischen Standards (Retentionszeit und Massenspektrum der GC/MS-Analyse) identifizierte das Reaktionsprodukt als (*S*)- γ -Cyclogeraniol (**52**) mit ausgesprochen hohem Enantiomerenüberschuss (>99 % *ee*). Das Carbokation-Intermediat wird somit selektiv zum exozyklischen Alken **52** deprotoniert. Darüber hinaus zeigte der Knockout der katalytisch aktiven Asparaginsäure (*AacSHC* D376C) keine Umsetzung. Dies bestätigt, dass die Aktivität über die Protonierungsmaschinerie vermittelt wird.

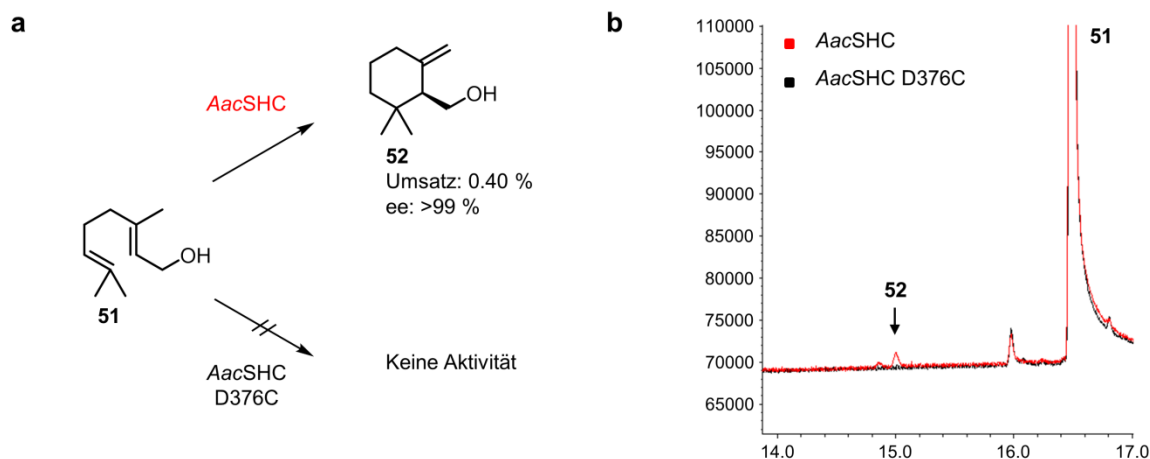


Abb. 17: (a) *AacSHC*-katalysierte Zyklisierung von Geraniol (**51**) zu (*S*)- γ -Cyclogeraniol (**52**). Im Gegensatz dazu zeigte der entsprechende Knockout der katalytisch aktiven Asparaginsäure (*AacSHC* D376C) keine Umsetzung. (b) GC-Chromatogramm der Umsetzungen von Geraniol. Vergleich der *AacSHC* Reaktion (rot) mit dem Kontroll-Experiment mittels *AacSHC* D376C (schwarz). Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 1.5 mol% aufgereinigtes Enzym, 50 °C, 60 h.

Um den Ursprung der geringen Aktivität gegenüber Geraniol zu studieren, wurden Geraniol-Derivate als Substrate verwendet. Hierfür wurden verschiedene Geranylalkylether (**53** bis **55**) mittels Williamson-Ethersynthese dargestellt (Kapitel 7.6.1, Seite 117). Grundidee war die Stabilisierung der Geranylgruppe in der reaktiven Konformation (sesselförmige Bindung) durch hydrophobe Interaktion der Alkylkette mit den hydrophoben Aminosäuren der aktiven Tasche. Aktivitätsbestimmungen der einzelnen Substrate (**53** bis **55**) offenbarten einen signifikanten Umsatzanstieg mit steigender Alkylkettenlänge (**Abb. 18a** und **b**). Dies ist theoretisch damit zu erklären, dass die längeren Alkylgruppen eine Bindung der Geranylgruppe in einer reaktiven Konformation stabilisieren. Um dies weiter zu bestätigen, wurden in einer Kooperation mit Dr. Per-Olof Syrén molekulardynamische Simulationen durchgeführt. Hierfür wurden das kaum aktive Geraniol (**51**) und der deutlich aktivere Geranyloctylether (**55**) analog zum ersten Ring der Squalen-Zyklisierung in einer reaktiven (sesselförmigen) Konformation in die aktive Tasche modelliert und die Dynamik der Substrate simuliert (MD-Simulationen von 10 ns wurden von P.-O. Syrén durchgeführt). Während Geraniol unmittelbar zu einer nicht-reaktiven Konformation entfaltete, verharrte der Geranyloctylether in der reaktiven Bindung (**Abb. 18c**). Dies unterstreicht den Zusammenhang zwischen der Stabilisierung des Substrates in einer reaktiven Konformation und dessen Aktivität. Darüber hinaus zeigen diese Experimente auch, dass ein *substrate engineering* neben der Mutagenese eine interessante Alternative ist, um die Aktivität sowie die Selektivität eines Enzymes zu kontrollieren.

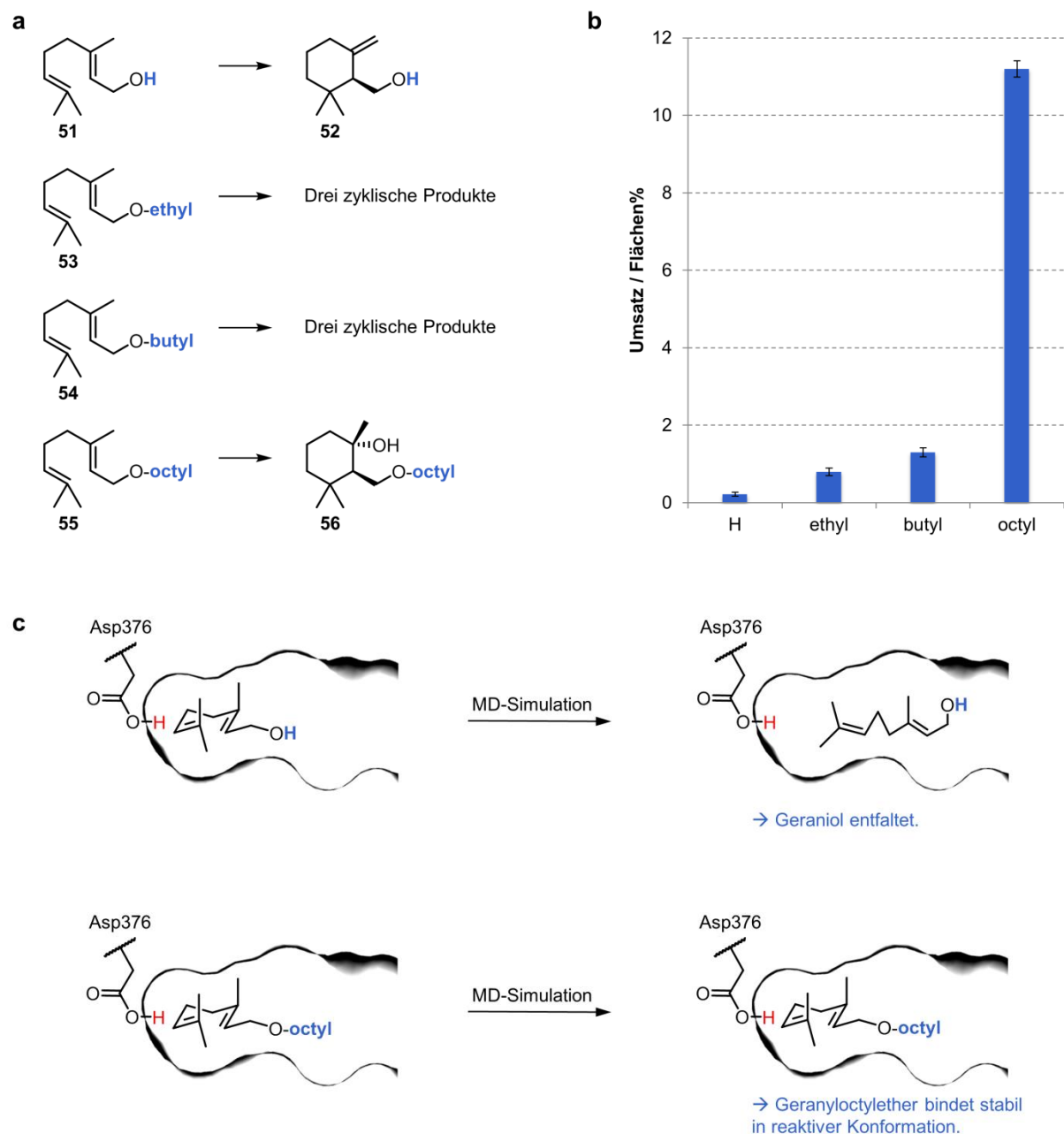


Abb. 18: Umsetzung von Geraniol und verschiedener Geranylalkylether mit *AacSHC*. **(a)** Studiert wurde neben Geraniol **51** auch Geranylethylether **53**, Geranylbutylether **54** und Geranyloctylether **55**. Alle Geraniol-Derivate wurden cyclisiert, wobei unterschiedliche Produkte entstanden. Während das Carbokation-Intermediat von **51** zum exozyklischen Alken **52** deprotoniert wurde, ermöglichte ein selektiver Angriff eines Wassermoleküls an das Carbokation-Intermediat der Cyclisierung von **55** die Darstellung des Diols **56**. Die Geranylalkylether **53** und **54** bildeten mehrere (vermutlich zyklische) Produkte. **(b)** Das Diagramm zeigt den *AacSHC*-katalysierten Umsatz von Geraniol (**51**) und der Geranylalkylether (**53** bis **55**). Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 1.0 mol% aufgereinigtes Enzym, 40 h, 0.2 % Triton X-100. **(c)** Darstellung der Ergebnisse molekular-dynamischer Studien (durchgeführt von Dr. P.-O. Syrén). Diese zeigen, dass der Geranyloctylether (**55**) wesentlich stabiler in einer reaktiven Konformation bindet (unten) als das weniger aktive Geraniol (**51**) (oben).

Abhängig vom jeweiligen Geranylalkylether wurden unterschiedliche Produkte gebildet (**Abb. 18a**). Während das Carbokation-Intermediat von Geraniol (**51**) selektiv zu (*S*)- γ -Cyclogeraniol (**52**) deprotoniert wurde, reagierte der Geranyloctylether (**55**) ausschließlich zum Diol (**56**). Letzteres verläuft über den selektiven nukleophilen Angriff eines Wassermoleküles an das intermediäre Carbokation. Die beiden anderen Geraniol-Derivate (**53** und **54**) bildeten mehrere, nicht vollständig charakterisierte, zyklische Produkte.

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass SHCs bezüglich neuer Reaktionen durch eine fehlende Substratbindung in einer reaktiven Konformation limitiert sind. Die hydrophobe aktive Tasche der Wildtyp *AacSHC* kann für kleine Substrate nur erschwert die Rolle eines Templats zur Stabilisierung der reaktiven Konformation übernehmen. Prinzipiell müssen nicht-natürliche Substrate somit nicht nur in einer reaktiven Konformation in die aktive Tasche passen, sondern diese reaktive Konformation muss durch eine geeignete Templat-Struktur des aktiven Zentrums bevorzugt gebunden werden.

4.4.2. Design und Charakterisierung der *AacSHC*-Mutantenbibliothek

SHCs besitzen eine hydrophobe, relative große aktive Tasche, welche im Laufe der Evolution optimiert wurde, um Squalen in einer reaktiven (*near-attack*) Konformation zu binden. Um dies für nicht-natürliche Substrate zu ermöglichen, ist in den meisten Fällen eine andere Form der aktiven Tasche notwendig. Jedoch sind die Aminosäuren der aktiven Tasche hochkonserviert.¹¹⁶ Somit besitzen diese in allen SHCs eine ähnliche Form sowie theoretisch vergleichbare Bindungseigenschaften für nicht-natürliche Substrate. Um Zugang zu neuer Protonase-Aktivität (z. B. Monozyklisierung von Geraniol) zu erhalten, wurde deswegen eine fokussierte *AacSHC*-Mutantenbibliothek erstellt. Somit konnte die produktive Bindung direkt adressiert werden. Um die Mutantenbibliothek zu erzeugen, wurden alle Aminosäuren der ersten Sphäre der aktiven Tasche in einem Abstand von 15 Å zur katalytisch aktiven Asparaginsäure ausgewählt. Von diesen 24 Aminosäuren wurden acht ausgeschlossen, hauptsächlich um die katalytisch aktive Asparaginsäure (D376) in der acideren *anti*-Orientierung zu belassen (**Abb. 19a**). Die restlichen 16 Positionen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauscht. Um die hydrophobe Natur der aktiven Tasche zu erhalten, wurden diese nur mit hydrophoben Aminosäuren substituiert.

Um einen maximalen Effekt in Bezug auf die Form der aktiven Tasche zu erzeugen, wurde jede Position mit einer relative großen (Phenylalanin und Tryptophan) sowie einer relativ kleinen Aminosäure (Glycin oder Alanin) substituiert. Dadurch wurde ein diverses Set an chiralen, hydrophoben Reaktionszentren erzeugt, jedes ausgestattet mit einer definierten starken Brønsted-Säure zur Aktivierung unterschiedlicher funktioneller Gruppen (**Abb. 19b**).

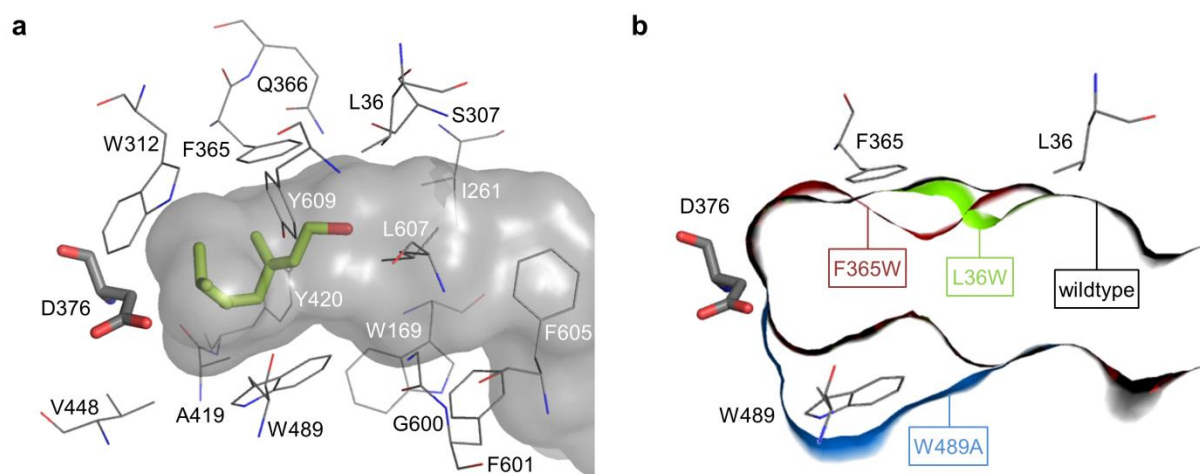


Abb. 19: (a) Die Form der aktiven Tasche des *AacSHC* Wildtyp-Enzyms ist in grau dargestellt. Die katalytisch aktive Brønsted-Säure (D376) ist als *sticks* (in grau) gezeigt. Alle Aminosäuren, welche in der Mutantenbibliothek mutiert wurden sind als graue *lines* zu sehen. Ein Modell von Geraniol (**51**) ist in grün abgebildet. (b) Die Abbildung veranschaulicht das Konzept der fokussierten Mutantenbibliothek durch Überlagerung von Querschnitten der aktiven Tasche ausgewählter Varianten: Wildtyp (schwarz), L36W (grün), F365W (rot) und W489A (blau). Durch die Erzeugung eines Sets an diversen, hydrophoben Geometrien der aktiven Tasche wurde die produktive Bindung adressiert.

Nach der Mutagenese (Kapitel 7.3.9, Seite 108) wurde die gewünschte Mutation durch Sequenzierung des gesamten Gens bestätigt. Die Mutantenbibliothek (Kapitel 7.1.5, Seite 101) umfasste final 33 Varianten, inklusive dem *AacSHC* Wildtyp sowie dem Knockout *AacSHC* D376C und wurde durch aus anderen (unpublizierten) Studien bereits vorhandenen Mutanten ergänzt (F365C, Y420C). Ein großer Teil der Mutanten wurde in einer betreuten Diplomarbeit (A. Marjanovic) generiert (**Tabelle 8**, Seite 102).²³¹ Für die parallele Expression der gesamten Mutantenbibliothek wurde das entwickelte Autoinduktions-Protokoll verwendet (Kapitel 7.4.1, Seite 110). Somit konnte die Expression mit deutlich verringertem Zeitaufwand durchgeführt werden. Erste Charakterisierungen der Mutantenbibliothek verdeutlichten, dass die *AacSHC* sehr robust gegenüber Mutationen im aktiven Zentrum ist.

4. ERGEBNISSE

Dies zeigte sich durch ein nahezu identisches Expressionslevel aller Mutanten (SDS-PAGE, **Abb. 20a** und **b**) und darüber hinaus durch einen ersten Aktivitätstest mit dem natürlichen Substrat Squalen (**1**). Obwohl die Form der aktiven Tasche signifikant geändert wurde, waren fast alle Varianten gegenüber dem natürlichen Substrat aktiv (**Abb. 34**, Seite 157). Jedoch bildeten diese neben Hopen (**2**) und Hopanol (**3**) eine Vielzahl an unterschiedlichen mono- bis tetrazyklischen Verbindungen (**Abb. 20c** und **d**). Diese Produktvielfalt spiegelt unterschiedliche produktive Bindungsmodi von Squalen wieder und ist somit ein Maß für die Qualität der fokussierten Bibliothek. Diese stellt dementsprechend einen idealen Startpunkt für das Screening nach neuen Enzymfunktionen dar.

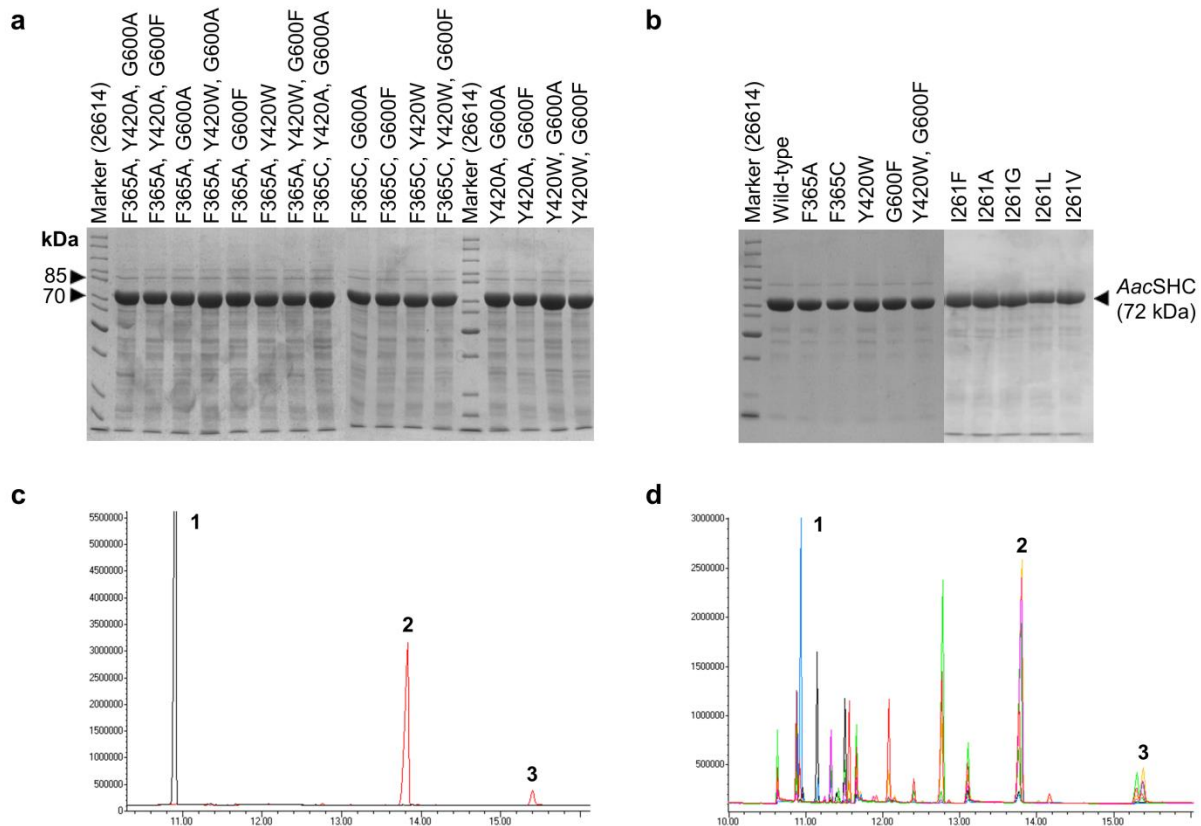


Abb. 20: (a) SDS-PAGE verschiedener *AacSHC* Mutanten. Proben der Expression und der Aufreinigung wurden standardmäßig analysiert. Alle Varianten zeigten dabei eine vergleichbare Expression in der Analyse der SDS-PAGE. Dies demonstriert eine gewisse Robustheit des Enzyms gegenüber Mutationen in der aktiven Tasche. Dies wurde auch für Doppel- und Dreifach-Mutanten festgestellt, welche im Laufe der Arbeit erstellt wurden. Das Gel zeigt die Analyse dieser Mutanten. Eine vergleichbare Expression ist zu sehen. (b) Dieses Gel der SDS-PAGE zeigt die Qualität der aufgereinigten Mutanten, welche im Laufe der Arbeit charakterisiert wurden. Nach der Expression und während der Aufreinigung zeigten alle erzeugten Mutanten eine vergleichbare Konzentration. (c) GC-Analyse der Umsetzung von Squalen (**1**) zu Hopen (**2**) und Hopanol (**3**) mit *AacSHC* (rot) und im Vergleich die Kontrolle mit *AacSHC* D376C (schwarz). (d) GC-Analyse der Squalen-Umsetzung mit ausgewählten Mutanten: V448F (dunkelgrün), F365A (schwarz), F601A (orange), L36W (blau), W169A (hellgrün), Y420C (magenta) und Y609W (rot). Die Varianten bildeten eine Vielzahl an unterschiedlichen Zyklisierungsprodukten.

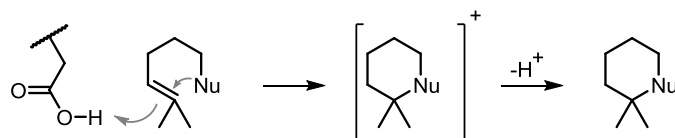
4.5. Monozyklisierungen durch Aktivierung von Prenylgruppen

Kurzkettige isoprenoide Polyene wie Geraniol (**51**) sind interessante Substrate für Monozyklisierungen, da deren Produkte (cyclohexanoide Monoterpene) wichtige Schlüsselmoleküle in der chemischen Synthese darstellen.²³² Neben Geraniol (**51**) sind Monozyklisierungsreaktionen mit einer Vielzahl an Prenyl-Derivaten denkbar. In diesem Zusammenhang wurde ein Satz von Molekülen ausgewählt bzw. entworfen, um Monozyklisierungsreaktionen im Detail zu studieren (**Tabelle 2**). Alle Substrate haben gemeinsam, dass eine Prenylgruppe protoniert wird, vergleichbar zum natürlichen Substrat Squalen. Neben C=C-Bindungen (**51**, **57** und **58**) wurden Alkohole (**59** bis **61**), Amide (**62**) sowie Aromaten (**63**) als Nukleophil für die Monozyklisierung adressiert. Ein Teil der Substrate wurde in betreuten Bachelor- und Diplomarbeiten erfolgreich synthetisiert.^{217,233}

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, katalysiert die *AacSHC* die hochselektive (>99 % *ee*) Monozyklisierung von Geraniol (**51**), wenn auch mit sehr geringer Aktivität (**Abb. 17**). Eine vergleichbare Aktivität wurde für die *ZmoSHC1* bestimmt. Interessanterweise konnte mit den Wildtyp-SHCs (*AacSHC* und *ZmoSHC1*) für keines der anderen Substrate (**57** bis **63**, **Tabelle 2**) ein Umsatz detektiert werden. Für mehrere Reaktionsprodukte wurde eine Nachweisgrenze von 0.001 % bestimmt (MS-Detektor mit *single ion monitoring*). Dieser Wert kann als Größenordnung für alle Substrate angenommen werden. Die geringe Aktivität der Wildtyp-SHCs gegenüber diesen Substraten ist vermutlich auf eine fehlende Bindung der Moleküle in einer reaktiven Konformation zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde die Mutantenbibliothek erstellt (Kapitel 4.4.2, Seite 60), welche durch semi-rationales Design produktive Bindung als Templat-Eigenschaft adressiert. Eine Auswahl der Substrate (**51**, **58**, **59** und **63**) wurde mit der Mutantenbibliothek auf Aktivität untersucht, teilweise als Bestandteil einer betreuten Diplomarbeit (A. Marjanovic).²³¹ GC-Analysen nach der Umsetzung mit den aufgereinigten Varianten ergaben mehrere Treffer für unterschiedliche Substrate.

4. ERGEBNISSE

Tabelle 2: Übersicht über die studierten Substrate zur SHC-katalysierten Monozyklisierung mittels Protonierung der C=C-Bindung.



Substrat	Name ^a (Nr.)	Synthese ^b	Wildtyp Umsatz ^c / % (SHC)	Bibliothek (AacSHC) Umsatz ^c / % (Variante)
	Geraniol (51)	--	0.40 ± 0.03 (Aac) 0.88 ± 0.1 (Zmo1)	15 ± 0.7 (F365C) 68 ± 3.1 (G600F)
	Myrcen (57)	--	N/D	N/A
	Pseudojonon (58)	Bachelorarbeit M. Kuhn ²³³	N/D	N/D
	Linalool (59)	--	N/D	~ 1.0 (G600F)
	(-)- α -Bisabolol (60)	--	N/D	N/A
	6-Methylhept- 5-en-2-ol (61)	--	N/D	N/A
	N-(6-Methylhept- 5-en-2-yl)acetamid (62)	Diplomarbeit J. Dominicus ²¹⁷	N/D	N/A
	(4-Methylpent- 3-en-1-yl)benzol (63)	Diplomarbeit J. Dominicus ²¹⁷	N/D	N/D

^{a)} Trivialname oder systematische Benennung.

^{b)} Mit Doppelstrich gekennzeichnete Substrate sind käuflich erwerblich.

^{c)} Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 1.5 mol% aufgereinigtes Enzym, 50 °C, 60 h Reaktionszeit, 0.2 % CHAPS. Umsätze wurden per Dreifachbestimmung analysiert und sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

N/D: nicht bestimmbar (unterhalb der Nachweisgrenze von ~ 0.001 % Umsatz).

N/A: nicht analysiert.

Während für **58** und **63** keine aktive Variante identifiziert wurde, konnten mehrere positive Mutanten für die Zyklisierung von Geraniol (**51**) bestimmt werden (**Abb. 21a**). Hervorzuheben sind zwei Mutanten (F365C und G600F), welche eine ausgesprochen hohe Aktivität gegenüber Geraniol (**51**) zeigten (**Abb. 21b**). Darüber hinaus wurden von beiden Varianten zwei unterschiedliche Produkte gebildet. Während F365C Geraniol (**51**) mit exzellenter Stereoselektivität (>99 % *ee*, **Abb. 21c**) zum (*S*)- γ -Cyclogeraniol (**52**) umsetzte, generierte G600F das Cyclogeraniol-Hydrat (**64**), welches zwei Stereozentren besitzt. Letztere Reaktion erfolgt durch den selektiven Angriff eines Wassermoleküls auf das Carbokation-Intermediat. Innerhalb des kompletten Screenings aller Substrate, akkumulierten positive Mutanten an den Positionen F365, Y420 und G600 (**Abb. 34**, Seite 157). Infolgedessen wurde eine zweite Bibliothek erstellt, welche Doppel- und Trippelmutanten dieser Positionen vereinigt (ITB-Plasmid-Nr.: pITB1063-pITB1080, **Tabelle 8**, Seite 102). Das Durchforsten der Doppel- und Trippelmutanten identifizierte die Variante Y420W/G600F. Diese Doppelmutante war in der Aktivität mit G600F vergleichbar, jedoch bildeten sich Cyclogeraniol-Hydrat (**64**) und (*S*)- γ -Cyclogeraniol (**52**) in einer 2:1 Produktmischung.

Um den Ursprung der erhöhten Aktivität besser zu verstehen, wurde das Substrat (**51**) in seiner reaktiven Konformation in die aktive Tasche der *AacSHC* modelliert. Aufgrund der Analogie zu dem natürlichen Substrat Squalen, wurde angenommen, dass Geraniol (**51**) vergleichbar in die aktive Tasche bindet. Für das Squalen-Analogon 2-Azasqualen wurde die Substratbindung in einer reaktiven Konformation per Kristallstrukturanalyse bestimmt (**Abb. 6b**, Seite 35).¹⁰⁸ Diese Koordinaten wurden als Startpunkt für die Modellierung verwendet. Die Analyse zeigte deutlich, dass die aktivste Variante (G600F) eine sterische Hinderung am Hydroxy-terminalen Ende des Geraniols (**51**) einführt (**Abb. 21d**). Somit wurde die Form der aktiven Tasche optimiert, um das relativ kleine Substrat in einer reaktiven Konformation zu binden.

Darüber hinaus wurde ein präparativer Ansatz durchgeführt, um die synthetische Nützlichkeit aufzuzeigen. Hierfür wurden 500 mg Geraniol mit der Mutante *AacSHC* G600F (0.4 mol%) umgesetzt und 182 mg Cyclogeraniol-Hydrat (**64**) isoliert (32 % Ausbeute). Dies veranschaulicht, dass eine Punktmutation ausreichend ist, um aus einem beinahe inaktiven Wildtyp einen synthetisch nützlichen Katalysator zu generieren.

4. ERGEBNISSE

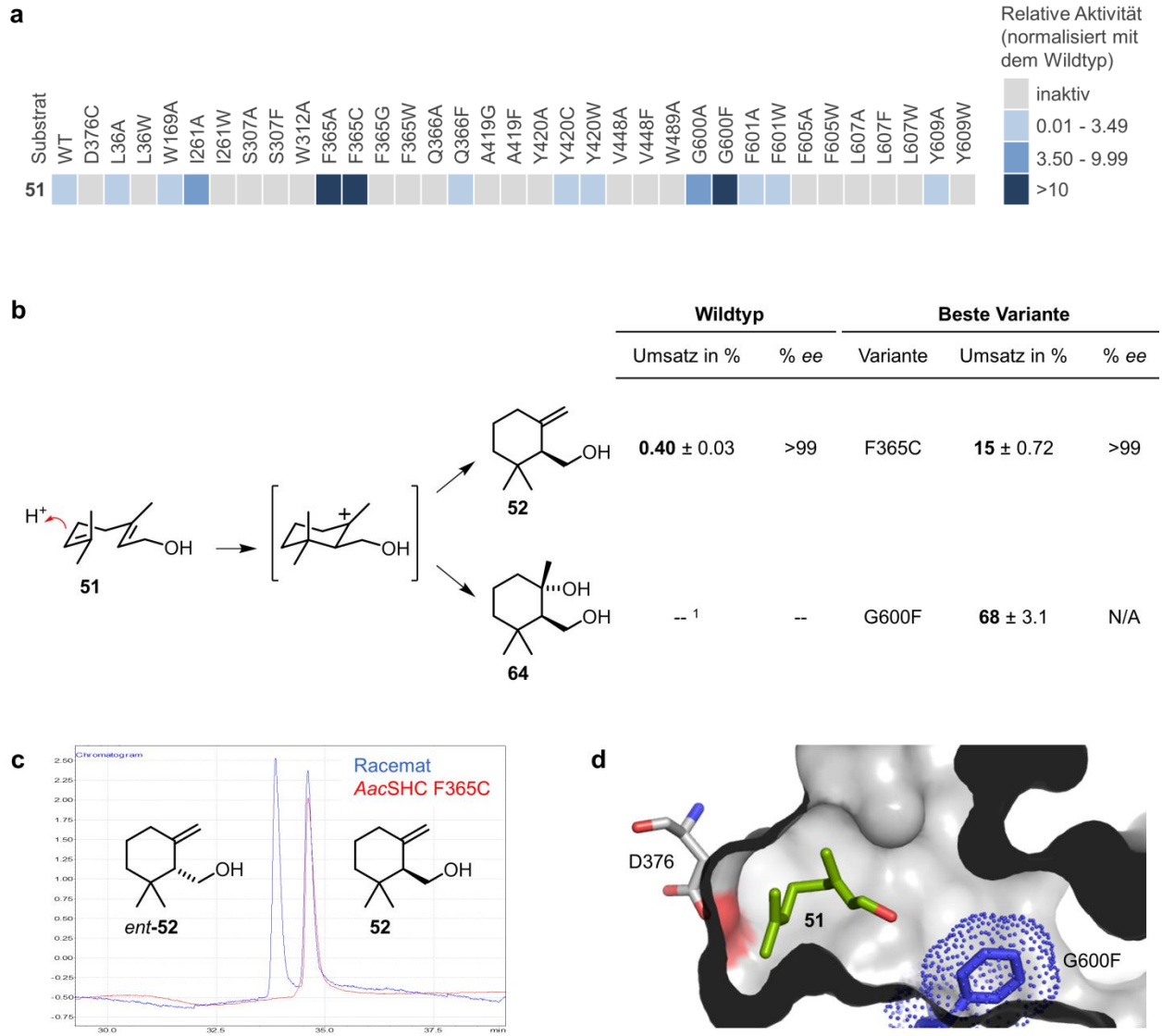


Abb. 21: (a) Screening von Geraniol (**51**) mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek. Der Umsatz der einzelnen Mutanten wurde mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms normiert. Die relativen Aktivitäten sind farbkodiert. Eine hellgraue Kennzeichnung bedeutet, dass keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. (b) Ausgewählte positive Mutanten der Umsetzung von Geraniol (**51**). Die Tabelle zeigt die Umsetzungen und Selektivitäten des Wildtyp-Enzyms im Vergleich mit den positiven Mutanten. ¹ Der *AacSHC* Wildtyp zeigte keine Umsetzung zum Cyclogeraniol-Hydrat (**64**). N/A = nicht analysiert. (c) GC-Chromatogramm zur Bestimmung des *ee*-Werts für die Darstellung von (*S*)- γ -Cyclogeraniol mit der Variante *AacSHC* F365C. Das chemisch synthetisierte Racemat (blau) ist als Vergleich zur enzymatischen Synthese (rot) dargestellt. (d) Geraniol (**51**) wurde in der reaktiven Konformation in die aktive Tasche der *AacSHC* modelliert (pdb 1UMP). Geraniol ist in grün gezeigt. Die aktivste Variante (G600F, gezeigt als blaue Punkte) fügt sterische Hinderung am Hydroxy-terminalen Ende ein. Dies stabilisiert die Bindung von Geraniol in einer reaktiven Konformation.

Neben Geraniol (**51**) wurde auch eine Aktivität für Linalool (**59**) nachgewiesen. Während der Wildtyp sowie alle anderen Varianten nicht aktiv sind, zeigt G600F eine reproduzierbare Aktivität für Linalool (**Abb. 22a** und **b**). Aufgrund der geringen Umsetzung (~1 % Umsatz) konnte das Produkt nicht isoliert werden. Auch eine detaillierte GC/MS-Analyse ergab keinen Hinweis auf die exakte Struktur. Obwohl eine Monozyklisierung analog zu Geraniol mit der Hydroxygruppe als Nukleophil am wahrscheinlichsten ist, sind mehrere Brønsted-Säure-katalysierte Reaktionen denkbar (**Abb. 22c**). Neben der Monozyklisierung könnte Linalool (**59**) auch durch eine Dehydratisierung oder eine Tsuji-Trost-artige Allylierung reagieren. Die Struktur des Produktes konnte im Verlauf der Arbeit nicht bestimmt werden.

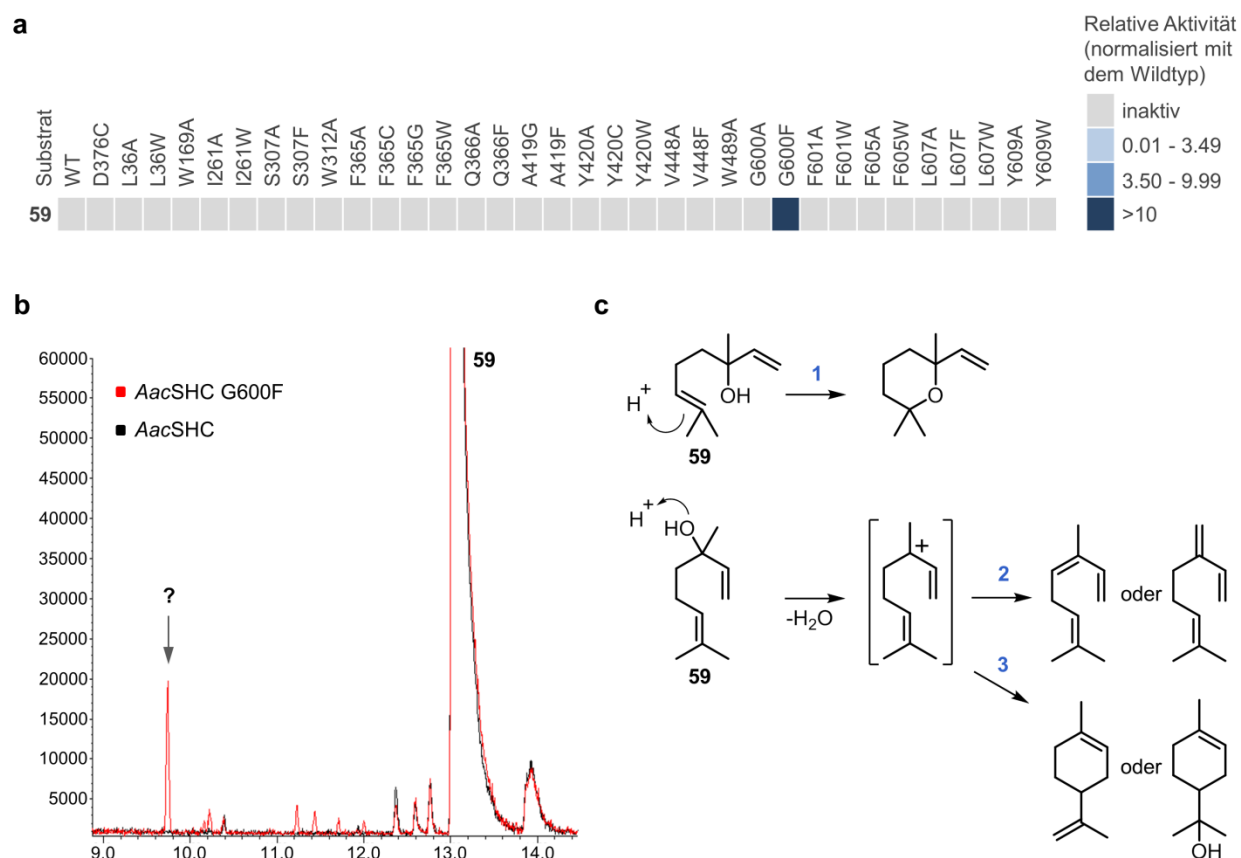
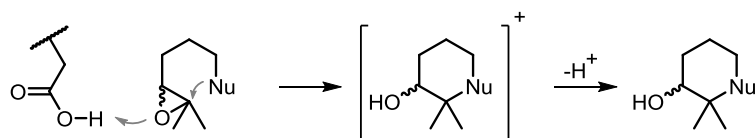


Abb. 22: (a) Screening von Linalool (**59**) mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek. Der Umsatz der einzelnen Mutanten wurde mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms normiert. Die relativen Aktivitäten sind farbkodiert. Eine hellgraue Kennzeichnung bedeutet, dass keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. (b) GC-Chromatogramm der Linalool-Umsetzung mit dem Wildtyp (schwarz) im Vergleich zur Mutante G600F (rot). Reproduzierbar wird ein unbekanntes Produkt (9.8 min) gebildet, welches in der GC/MS-Analyse auf ein Linalool-Derivat schließen lässt. (c) Während die Monozyklisierung analog zu Geraniol am wahrscheinlichsten ist (Reaktion 1), sind für Linalool (**59**) auch andere Brønsted-Säure-katalysierte Reaktionen denkbar. Eine Protonierung des Allylalkohols verläuft nach Wasserabspaltung über ein relativ stabiles Carbokation-Intermediat, welches insgesamt entweder in einer Dehydratisierung (Reaktion 2) oder einer Tsuji-Trost-artigen Allylierung (Reaktion 3) abreagieren kann. Die exakte Struktur des Reaktionsproduktes konnte im Laufe dieser Arbeit nicht bestimmt werden.

4.6. Monozyklisierungen durch Aktivierung von Epoxiden

Die intramolekulare Epoxidöffnung ist als Reaktion an sich bereits Bestandteil der Protonase-Superfamilie (Kapitel 4.1, Seite 43). Die mit den SHCs verwandten OSCs katalysieren die Zyklisierung von (*S*)-2,3-Oxidosqualen, welche über die Protonierung/Aktivierung eines Epoxids abläuft.²⁰⁹ Darüber hinaus wurde gezeigt, dass SHCs auch 2,3-Oxidosqualen umsetzen.^{145,234} Während jedoch OSCs spezifisch das (*S*)-2,3-Oxidosqualen aktivieren, akzeptieren SHCs beide Enantiomere als Substrat. Als potentielle Substrate für die Monozyklisierung wurden die beiden racemischen Epoxide (*rac*-**65** und *rac*-**66**) gewählt (**Tabelle 3**), welche aus den entsprechenden Alkenen dargestellt wurden. Interessanterweise wurde auch im Fall der Epoxidöffnung das Molekül mit dem Phenylring als Nukleophil (*rac*-**66**) nicht als Substrat akzeptiert (analog zu Molekül **63**). Im Gegensatz dazu wurde 6,7-Epoxygeraniol (*rac*-**65**) von beiden Wildtyp-SHCs (*Aac*SHC und *Zmo*SHC1) als Substrat akzeptiert und mit geringer Aktivität zyklisiert.

Tabelle 3: Übersicht über die studierten Substrate zur SHC-katalysierten Monozyklisierung durch Epoxidöffnung.



Substrat	Name ^a (Nr.)	Synthese	Wildtyp Umsatz ^b / % (SHC)	Bibliothek (<i>Aac</i> SHC) Umsatz ^b / % (Variante)
	6,7-Epoxygeraniol (<i>rac</i> - 65)	Diese Arbeit	0.57 ± 0.1 (<i>Aac</i>) 5.5 ± 0.3 (<i>Zmo</i> 1)	54 ± 0.4 (Y420W) 78 ± 2.1 (Y420W/G600F)
	2,2-Dimethyl- 3-phenethyloxiran (<i>rac</i> - 66)	Diese Arbeit	N/D	N/D

^a) Trivialname oder systematische Benennung.

^b) Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 1.5 mol% aufgereinigtes Enzym, 30 °C, 60 h Reaktionszeit, 0.2 % CHAPS. Umsätze wurden per Dreifachbestimmung analysiert und sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Der Umsatz wurde berechnet für das (*S*)-Enantiomer als Substrat. Die Umsetzungen waren alle (*S*)-selektiv.

N/D: nicht bestimmbar (unterhalb der Nachweisgrenze von ~ 0.001 % Umsatz).

Während die *AacSHC* nur das exozyklische Alken (**67**) als Produkt bildete, erzeugte die *ZmoSHC1* neben *cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol (**67**) auch das *cis*-2-Hydroxy- α -cyclogeraniol (**68**) in einer 2:1 Produktmischung (**Abb. 23**). Somit deprotoniert die *AacSHC* das intermediäre Carbokation selektiv an der Methylgruppe. Im Vergleich dazu finden bei der *ZmoSHC1* zwei unterschiedliche Deprotonierungsreaktionen statt. Kontroll-Experimente mit den jeweiligen Knockouts der katalytisch aktiven Asparaginsäure (*AacSHC* D376C und *ZmoSHC1* D439A) zeigten keine Umsetzung. Dies bestätigt, dass die reaktiven Epoxide ausschließlich durch die entsprechenden Protonierungsmaschinerien aktiviert werden.

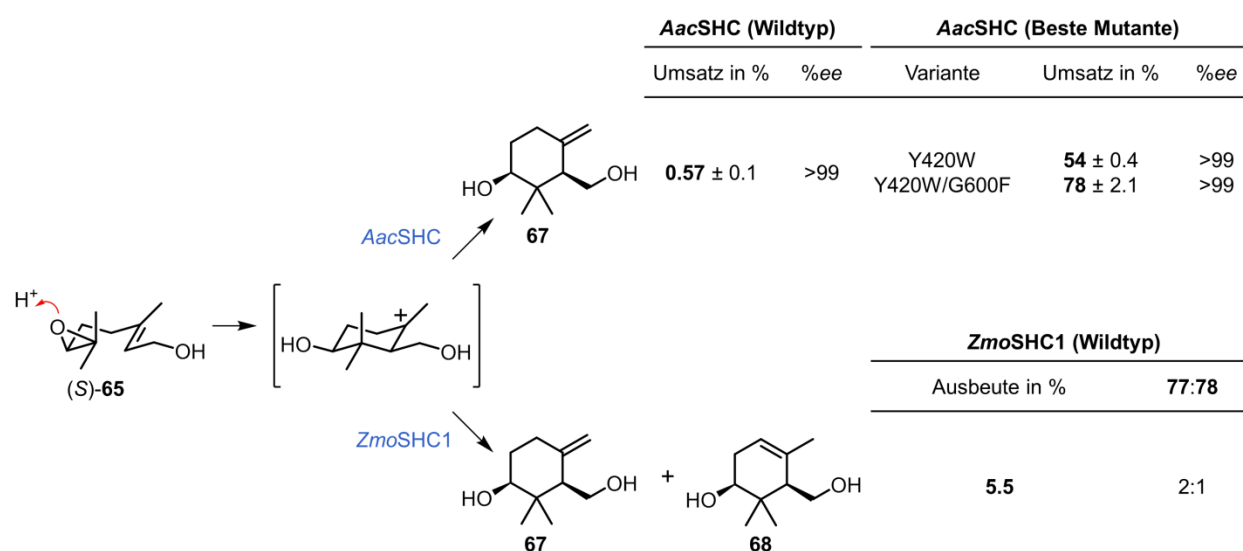


Abb. 23: SHC-katalysierte Epoxidöffnung von 6,7-Epoxygeraniol (*rac*-**65**). Während *AacSHC* das Carbokation-Intermediat selektiv zum *cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol **67** deprotoniert, bildet *ZmoSHC1* eine Mischung aus dem γ - und α -Cyclogeraniol-Derivat (**67** und **68**). Die Tabellen zeigen die Aktivitäten und Selektivitäten der Wildtyp-SHCs (*AacSHC* und *ZmoSHC1*) sowie ausgewählter *AacSHC*-Varianten.

Für beide Epoxide (*rac*-**65** und *rac*-**66**) wurde auch die Mutantenbibliothek (Kapitel 4.4.2, Seite 60) auf Aktivität durchforstet, teilweise in einer betreuten Diplomarbeit (A. Marjanovic)²³¹. Während für die Epoxidöffnung mittels Aromat (*rac*)-**66** keine positive Mutante gefunden wurde, zeigten sich mehrere Treffer mit erhöhter Aktivität für die Zyklisierung von 6,7-Epoxygeraniol (**Abb. 24a**). Y420W wurde hierbei als die aktivste Variante identifiziert (**Abb. 23**). Interessanterweise bildeten alle aktiven *AacSHC*-Varianten das identische exozyklische Alken (**67**). Weitere chirale GC-Analysen zeigten, dass ausschließlich das (*S*)-Enantiomer von (*rac*)-**65** umgesetzt wurde. Vergleichbar zu Geraniol wurden gute Umsätze und exzellente *ee*-Werte (>99 %) erzielt.

4. ERGEBNISSE

Wie bereits schon erwähnt, akkumulierten innerhalb des kompletten Screenings aller Substrate positive Mutanten an den Positionen F365, Y420 und G600 (**Abb. 34**, Seite 157). Infolgedessen wurde eine zweite Bibliothek erstellt, welche Doppel- und Trippelmutanten dieser Positionen vereinigt (ITB-Plasmid-Nr.: pITB1063-pITB1080, **Tabelle 8**, Seite 102). Auf diese Weise wurde die Doppelmutante Y420W/G600F isoliert, welche (*S*)-**65** noch besser umsetzte (**Abb. 23**) und dabei eine 130-fach höhere Aktivität (im Vergleich zum Wildtyp-Enzym) bei vergleichbarer Selektivität zeigte (>99 % *ee*, **Abb. 24b**). Ein präparativer Ansatz mit Y420W/G600F und 323 mg (*rac*)-**65** ergab 88 mg des enantiomerenreinen *cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniols (**67**). Dies entspricht einer isolierten Ausbeute von 54 % (berechnet für (*S*)-6,7-Epoxygeraniol).

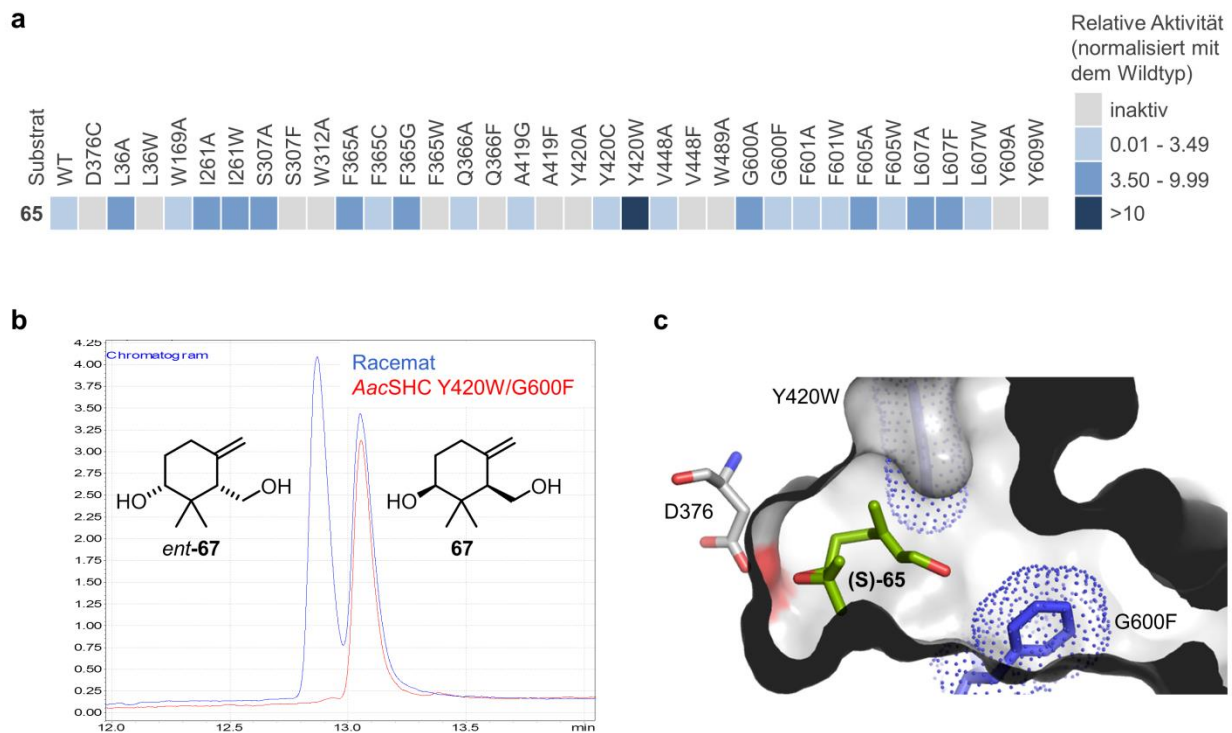


Abb. 24: (a) Screening von *rac*-6,7-Epoxygeraniol (**65**) mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek. Der Umsatz der einzelnen Mutanten wurde mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms normiert. Die relativen Aktivitäten sind farbkodiert. Eine hellgraue Kennzeichnung bedeutet, dass keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. (b) Chirale GC-Analyse von *cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol (**67**) im Vergleich: In blau das chemisch synthetisierte Racemat und in rot das Reaktionsprodukt der Synthese mit der Mutante *AacSHC* Y420W/G600F als Katalysator. (c) Die Modellierung in die aktive Tasche zeigt, dass positive Mutationen (Y420W und G600F) die Struktur der aktiven Tasche für eine produktive Bindung des Substrats optimieren.

Modellierungen von 6,7-Epoxygeraniol in die aktive Tasche der *AacSHC* deuten an, dass die aktivsten Varianten eine sterische Hinderung am Hydroxy-terminalen Ende des Substrats einführen (**Abb. 24c**). Somit optimieren die positiven Mutanten die Struktur der aktiven Tasche, um die Substratbindung in der reaktiven Konformation zu stabilisieren. Darüber hinaus zeigt der zum 2-Azasqualen vergleichbare Bindungsmodus auch den Ursprung für die (*S*)-Selektivität in der Epoxidöffnung. Während der Sauerstoff des (*S*)-Enantiomers in Richtung der Brønsted-Säure (D376) orientiert ist, zeigt für das (*R*)-Enantiomer der Sauerstoff von der Säure weg und kann in diesem Bindungsmodus somit nicht protoniert werden. Im Vergleich dazu wird die Protonierung des (*R*)-2,3-Oxidosqualens durch die Bindung des ersten Rings in einer Boot-Konformation, anstatt der üblichen Sessel-Konformation ermöglicht.²³⁴

4.7. Prins/En-Reaktion durch Aktivierung von Carbonylen

Die Prins/En-Reaktion von Citronellal (*rac*-**32**) ist eine bekannte Säure-katalysierte Reaktion.²³⁵ Die Protonierung der Carbonyl-Gruppe ermöglicht die Darstellung verschiedener Isopulegol-Isomere. Ursprung dieser Produktvielfalt sind unterschiedliche reaktive Konformationen, welche den Angriff der Alken-Gruppe an die aktivierte Carbonyl-Gruppe ermöglichen (**Abb. 25**). Diese reaktive Konformationen unterscheiden sich in ihren Energien und somit kann die Produktverteilung in einer achiralen Umgebung mit der Boltzmann-Verteilung beschrieben werden.²³⁶ Für Standardbedingungen berechnet, beträgt diese 0.77; 0.15; 0.07; 0.01 für Isopulegol, *neo*-Isopulegol, *iso*-Isopulegol und *neoiso*-Isopulegol (**69** bis **72**). Dies entspricht auch experimentell beobachteten Produktverteilungen bei einer Reaktion in achiraler Umgebung.²³⁶ Die Energiedifferenzen zwischen den sesselförmigen reaktiven Konformationen finden ihren Ursprung in unterschiedlich stark ausgeprägten 1,3-diaxialen Wechselwirkungen. Wie in der Einleitung beschrieben, wurde für *ZmoSHC1* bereits Aktivität für die Citronellal-Zyklisierung nachgewiesen.^{122,123} Jedoch zeigen diese Umsetzungen aus bisher unbekanntem Gründen Produktselektivitäten, welche einer Reaktion in achiraler Umgebung ähneln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch eine sehr geringe Aktivität für die Citronellal-Reaktion für *AacSHC* nachgewiesen werden (**Tabelle 4**, Seite 76). Dieser Widerspruch zu Literatur^{122,123} kann vermutlich auf optimierte Reaktionsbedingungen zurückgeführt werden.

4. ERGEBNISSE

Während in früheren Arbeiten bevorzugt Ganzzell-Katalysatorsysteme Verwendung fanden, wurden in dieser Arbeit aufgereinigte Enzympräparationen eingesetzt. Somit wurden unerwünschte Neben- und Hintergrundreaktionen minimiert, welche durch Verunreinigungen bei Ganzzellsystemen mit der SHC-katalysierten Reaktion in Konkurrenz standen. Als Ergebnis konnte diese Reaktion mit einer viel besseren Auflösung untersucht werden.

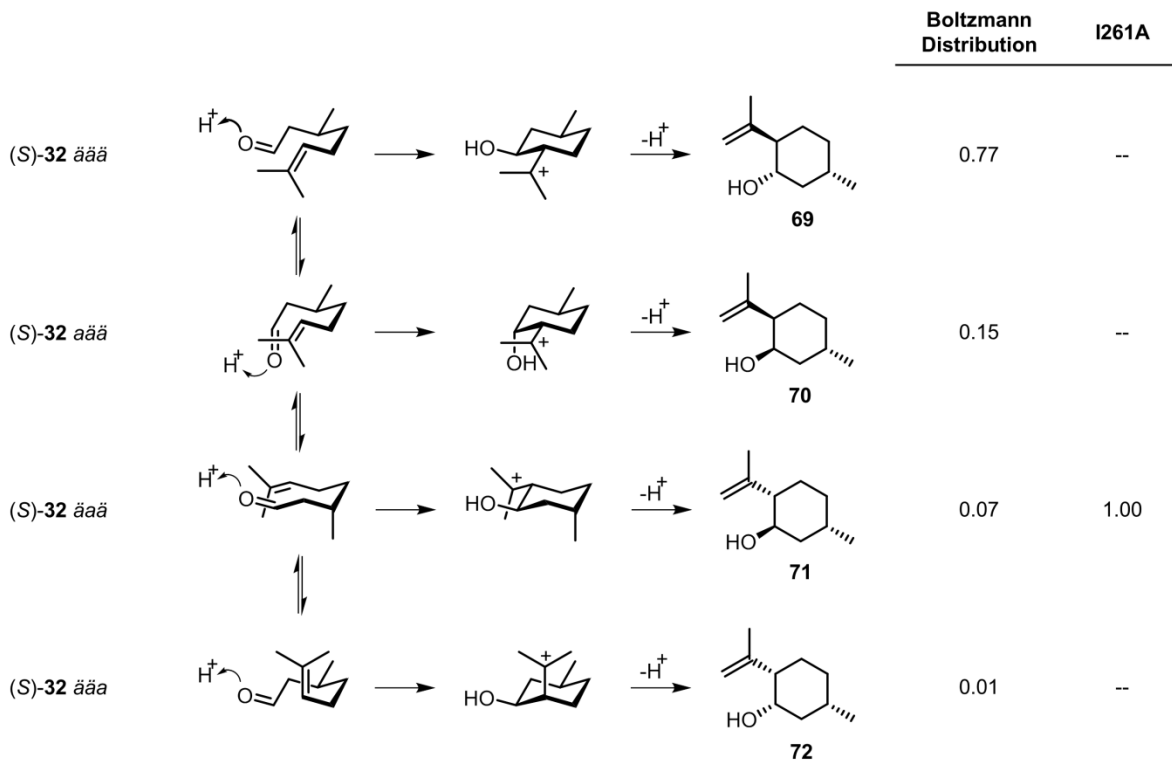


Abb. 25: Zu sehen sind die energetisch bevorzugten, sesselförmigen reaktiven Konformationen von (*S*)-Citronellal (*S*)-32. Diese lassen sich den Reaktionsprodukten (+)-Isopulegol (**69**), (-)-*neo*-Isopulegol (**70**), (-)-*iso*-Isopulegol (**71**) und (-)-*neoiso*-Isopulegol (**72**) zuordnen. Die Buchstaben a und ä kennzeichnen die axiale oder äquatoriale Stellung der Substituenten in folgender Reihenfolge: Carbonyl-Gruppe, Methyl-Gruppe und Isopropyl-Gruppe. Die Tabelle auf der rechten Seite zeigt die Boltzmann-Verteilung der relativen Energien für die individuellen reaktiven Konformationen bei Standardbedingungen. Dies entspricht der beobachteten Stereoselektivität der Produkte bei einer Reaktion in achiraler Umgebung.²³⁶ Im Vergleich dazu bildet *AacSHC* I261A exklusiv (-)-*iso*-Isopulegol (**71**).

Um die Citronellal-Reaktion im Detail zu studieren, wurde die *AacSHC* Bibliothek (Kapitel 4.4.2, Seite 60) auf aktivere Mutanten durchforstet. Unterschiedliche Varianten mit einer deutlich erhöhten Aktivität wurden identifiziert (**Abb. 26a**). Hierbei wurden I216A und Y420C als aktivste Varianten identifiziert. Um die Aktivität mit der Protonierungsmaschinerie zu verknüpfen, wurden die korrespondierenden Brønsted-Säure-Knockouts (*AacSHC* I261A/D376C und *AacSHC* I261A/D376C) generiert.

Beide Doppelmutanten zeigten in vergleichbaren Experimenten keine Aktivität und waren mit dem Kontroll-Experiment in reinem Puffer (60 mM Citrat, pH 6.0) vergleichbar (**Abb. 26b** und **c**). Dies beweist erstmalig, dass die Carbonyl-Aktivierung und somit die nicht-natürliche Prins/En-Reaktion über die Protonierungsmaschinerie vermittelt wird. Während Y420C zwei Isopulegol-Isomere erzeugte, bildete I261A selektiv *iso*-Isopulegol. Folgestudien zeigten, dass I261A hoch substratselektiv ist und nur (*S*)-Citronellal (*S*)-**32** akzeptiert, was somit zu (-)-*iso*-Isopulegol (**71**) als Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Die außerordentlich hohe Produktselektivität (>99 % *de*) demonstriert die Kontrolle über die Substratbindung in einer definierten reaktiven Konformation, welche die Methyl-Gruppe in eine energetisch ungünstige axiale Orientierung zwingt.

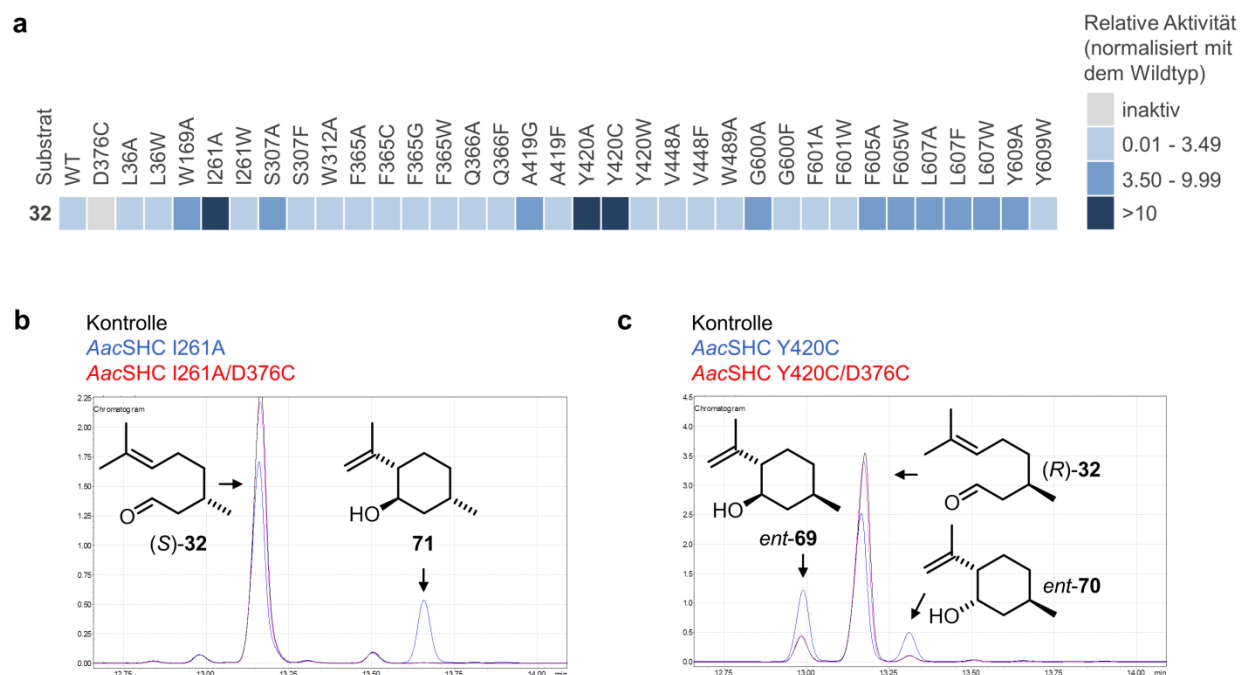


Abb. 26: (a) Screening von *rac*-Citronellal (**32**) mit der AacSHC-Mutantenbibliothek. Der Umsatz der einzelnen Mutanten wurde mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms normiert. Die relativen Aktivitäten sind farbkodiert. Eine hellgraue Kennzeichnung bedeutet, dass keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. (b) GC-Analyse der (*S*)-Citronellal-Umsetzung von AacSHC I261A (blau) mit dem korrespondierenden Knockout der katalytisch aktiven Asparaginsäure AacSHC I261A/D376C (rot). In schwarz ist ein Kontroll-Experiment im Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) zu sehen. AacSHC I261A bildet exklusiv das energetisch ungünstigere (-)-*iso*-Isopulegol (**71**). (c) GC-Analyse der (*R*)-Citronellal-Umsetzung von AacSHC Y420C (blau) mit dem korrespondierenden Knockout der katalytisch aktiven Asparaginsäure AacSHC Y420C/D376C (rot). In schwarz ist ein Kontroll-Experiment im Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) zu sehen. AacSHC Y420C ist selektiv für (*R*)-Citronellal und bildet eine Mischung aus (-)-Isopulegol *ent*-(**69**) und (+)-*neo*-Isopulegol *ent*-(**70**).

4. ERGEBNISSE

Interessanterweise befindet sich die Position I261 relativ weit entfernt (14 Å) von der Brønsted-Säure D376. Darüber hinaus zeigt der Austausch zum kleineren Alanin (I261A) eine Erhöhung der Aktivität, während der Austausch gegen das größere Tryptophan (I261W) keinen Effekt auf die Aktivität für Citronellal zeigte (**Abb. 26a**). Somit kann eine Erhöhung der Aktivität mit I261A nicht mit der Einführung von einer sterisch anspruchsvollen Aminosäure und der damit verbundenen Stabilisierung der reaktiven Konformation erklärt werden. Aus diesem Grund wurden weitere hydrophobe Aminosäuren mit unterschiedlichen sterischen Anspruch (Glycin, Valin, Leucin und Phenylalanin) an der Stelle I261 eingeführt und deren Aktivität bestimmt. Dies offenbarte einen Zusammenhang zwischen der Größe der Aminosäuren-Seitenkette und der Aktivität bezüglich (*S*)-Citronellal. Während ein Erhalt oder eine Vergrößerung der Seitenkette (I261L, I261V, I261F und I261W) keinen Effekt auf die Aktivität zeigte, bewirkte eine Verkleinerung der Aminosäure (I261A und I261G) eine Erhöhung der Aktivität (**Abb. 27a**), wobei alle getesteten Mutanten die gleiche Substrat- und Produktselektivität zeigten. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass Mutationen an Position 261 Strukturänderungen wie zum Beispiel eine Umorientierung benachbarter Aminosäureseitenketten auslösen.

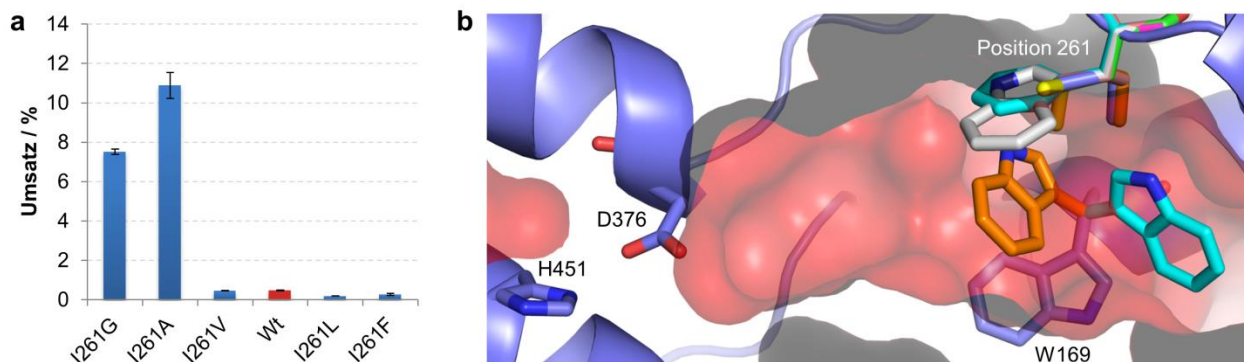


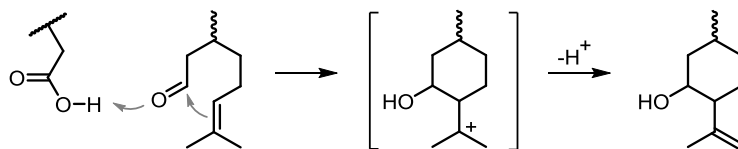
Abb. 27: (a) Das Diagramm zeigt die Quantifizierung (Mittelwert der Triplikate mit Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt) der Umsetzung von (*S*)-Citronellal zu (*-*)-*iso*-Isopulegol der einzelnen I261 Varianten. Die Experimente wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (2 mM Substrat, 1.5 mol% aufgereinigtes Enzym, 0.2 % CHAPS, 60 h Reaktionszeit, 30 °C). Nur die sehr kleinen Aminosäuren (G und A) zeigen eine erhöhte Aktivität für diese Umsetzung. (b) Zu sehen ist ein Strukturalignment der unterschiedlichen I261 Varianten und das korrespondierende Rotamer für W169, berechnet mit SCWRL²³⁷. Die Form der aktiven Tasche (*Aac*SHC Wildtyp) ist in rot, die Sekundärstruktur als Cartoon in blau dargestellt. Die W169 Rotamere für die individuellen I261-Mutanten wurden in Abhängigkeit einer Proteinrückgrat-abhängigen Rotamer-Bibliothek mittels SCWRL untersucht. Die Analyse zeigt, dass das bevorzugte Rotamer abhängig von der Aminosäure an der Position 261 ist. Farbcode: Wildtyp (pdb 1UMP, blau), I261G (pink), I261A (grün), I261V (orange), I261L (gelb), I261F (hellblau) und I261W (grau).

Eine Analyse aller benachbarten Aminosäuren zeigte, dass I261 hauptsächlich von kleinen Aminosäuren mit relativ unflexiblen Seitenketten umgeben ist (A306, G260, S307), wobei W169 eine auffällige Ausnahme bildet. Aus diesem Grund wurde die Konformation der Aminosäure-Seitenkette von W169 für die unterschiedlichen Varianten (Wildtyp, I261G, I261A, I261V, I261L, I261F und I261W) studiert. Hierfür wurde die SCWRL Applikation (Version 4)²³⁷ verwendet. Diese fest etablierte Software ermöglicht eine Analyse der Aminosäure-Seitenketten-Rotamere. Als Eingabe-Datei wurde eine Liganden-freie Version der *AacSHC* Wildtyp Struktur verwendet (pdb 1UMP)¹⁰⁸. Das bevorzugte Rotamer für W169 wurde anschließend für jede Variante berechnet, wobei hier angemerkt werden muss, dass es sich bei dieser Methode um keine quantitative Bestimmung handelt (besonders unter der Berücksichtigung, dass die Berechnungen in Abwesenheit des Substrats durchgeführt wurden). Die Studie wurde genutzt, um einen Einfluss der Aminosäure an Position I261 auf die Rotamere von W169 zu identifizieren. Die Analyse zeigte, dass die bevorzugte Orientierung von W169 tatsächlich von der Aminosäure an Position 261 abhängig ist (**Abb. 27b**). Daher ist es vernünftig zu vermuten, dass positive Mutanten an Position 261 (I261A und I261G) die Aktivität durch Strukturänderungen im Protein beeinflussen. In diesem Fall vermutlich durch die Änderung der Aminosäure-Seitenkettenkonformation von W169. Der Einbau kleiner Aminosäuren (A und G) an Position 261 generiert somit den nötigen Platz, um für W169 vorher unzugängliche Rotamere zugänglich zu machen.

Um die SHC-katalysierte Aktivierung von Carbonylen weiter zu studieren, wurden darüber hinaus noch weitere Substrate ausgewählt (**73** bis **84**) und synthetisiert (**Tabelle 4**). Alle Substrate wurden mit beiden Wildtyp-SHCs (*AacSHC* und *ZmoSHC1*) untersucht. Des Weiteren wurde, teilweise in einer betreuten Diplomarbeit (A. Marjanovic)²³¹, die *AacSHC*-Bibliothek (Kapitel 4.4.2, Seite 60) auf Aktivität für die Substrate **85**, **86** und **87** durchforstet, jedoch konnte für keines der Moleküle eine Aktivität nachgewiesen werden (Nachweisgrenze ~ 0.001 % Umsatz).

4. ERGEBNISSE

Tabelle 4: Übersicht über die studierten Substrate zur SHC-katalysierten Monozyklisierung mittels Prins/En-Reaktion.



Substrat	Name ^a (Nr.)	Synthese ^b	Wildtyp Umsatz ^c / % (SHC)	Bibliothek (AacSHC) Umsatz ^c / % (Variante)
	Citronellal (<i>rac</i> -32)	--	0.59 ± 0.1 (AacSHC) N/A (<i>Zmo</i> SHC1)	11 ± 0.01 (I261A)
	6-Methylhept- 5-enal (73)	Diese Arbeit	N/D	N/D
	3-Phenylpropanal (74)	--	N/D	N/D
	4-Phenylbutanal (75)	Diese Arbeit	N/D	N/D
	4-(<i>p</i> -Tolyl)butanal (76)	Diese Arbeit	N/D	N/A

^a) Trivialname oder systematische Benennung.

^b) Mit Doppelstrich gekennzeichnete Substrate sind käuflich erwerblich.

^c) Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 1.5 mol% aufgereinigtes Enzym, 30 °C, 60 h Reaktionszeit, 0.2 % CHAPS. Umsätze wurden per Dreifachbestimmung analysiert und sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Der Umsatz wurde berechnet für das (*S*)-Enantiomer als Substrat. Die Umsetzungen waren alle (*S*)-selektiv.

N/A: nicht analysiert. Die Zyklisierung von Citronellal mit *Zmo*SHC1 wurde in früheren Arbeiten ausführlich studiert.^{122,123}

N/D: nicht bestimmbar (unterhalb der Nachweisgrenze von ~ 0.001 % Umsatz).

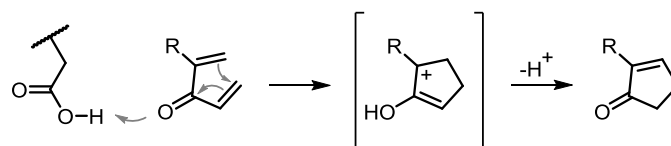
4.8. Michael-Addition und Nazarov-Zyklisierung

Die Aktivierung von α,β -ungesättigten Carbonylen ermöglicht eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen.²³⁸ Schwerpunktmäßig wurde in dieser Arbeit die SHC-katalysierte Nazarov-Zyklisierung und Michael-Addition untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Substrate, teilweise in einer betreuten Bachelorarbeit (M. Kuhn)²³³ synthetisiert (**Tabelle 5**). Die Reaktivität der Substrate sowie deren sterischer Anspruch wurden bei der Auswahl berücksichtigt. Letzteres dadurch, dass potentielle Substrate in einer reaktiven Konformation in das aktive Zentrum modelliert und bezüglich sterischer Hinderung analysiert wurden. Alle verwendeten Substrate (**77** bis **82**) können ohne sterische Hinderung in einer reaktiven Konformation in das aktive Zentrum modelliert werden. Die ausgewählten Substrate wurden mit den beiden Wildtyp-SHCs (*AacSHC* und *ZmoSHC1*) sowie der *AacSHC*-Mutantenbibliothek (Kapitel 4.4.2, Seite 60) auf Aktivität untersucht. Das Screening der Substrate **77** und **78** mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek wurde von A. Marjanovic durchgeführt.²³¹ Für keines der Substrate konnte eine Umsetzung nachgewiesen werden (Nachweißgrenze ~ 0.001 % Umsatz). Dies lässt sich vermutlich mit einer fehlenden produktiven Bindung im aktiven Zentrum erklären. Die verwendeten Substrate können zwar in einer reaktiven Konformation in das aktive Zentrum modelliert werden, jedoch bedeutet dies nicht, dass diese Konformation in Wirklichkeit gebunden/stabilisiert wird. Darüber hinaus lässt sich daraus schlussfolgern, dass die mit der Mutantenbibliothek erzeugte Diversität zu gering ist, um strukturell stark vom natürlichen Substrat abweichende Substrate produktiv zu binden. Für manche Substrate/Reaktionen könnte auch eine ungenügende Acidität der enzymatischen Brønsted-Säure relevant sein, wobei zum Beispiel für Substrat **82** die Michael-Addition von Wasser als nicht-enzymatische Hintergrund-Reaktion beobachtet wurde.

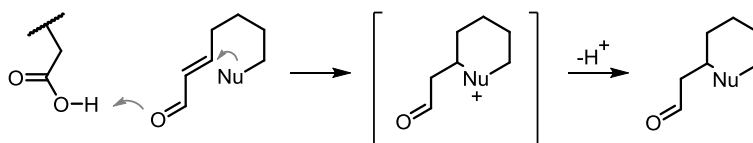
4. ERGEBNISSE

Tabelle 5: Übersicht über die studierten Substrate zur SHC-katalysierten Nazarov-Zyklisierung (**77** bis **79**) und intramolekularen Michael-Addition (**80** bis **82**).

Nazarov-Zyklisierung



Michael-Addition



Substrat	Name ^a (Nr.)	Synthese ^b	Wildtyp Umsatz ^c / %	Bibliothek (AacSHC) Umsatz ^c / %
	β -Damascon (77)	--	N/D	N/D
	1-(3,4-Dihydro-2H-pyran-6-yl)-2-methylprop-2-en-1-on (78)	Diese Arbeit	N/D	N/D
	(<i>E</i>)-1-Phenylpenta-1,4-dien-3-on (79)	Diese Arbeit	N/D	N/A
	(<i>E</i>)-4-Hydroxy-4-methyl-1-phenylpent-1-en-3-on (80)	Bachelorarbeit M. Kuhn ²³³	N/D	N/D
	(<i>E</i>)-5-Phenylpent-2-enal (81)	Bachelorarbeit M. Kuhn ²³³	N/D	N/D
	(<i>E</i>)-6-Phenylhex-3-en-2-on (82)	Bachelorarbeit M. Kuhn ²³³	N/D	N/D

^a) Trivialname oder systematische Benennung.

^b) Mit Doppelstrich gekennzeichnete Substrate sind käuflich erwerblich.

^c) Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 1.5 mol% aufgereinigtes Enzym, 30 °C, 60 h Reaktionszeit, 0.2 % CHAPS.

N/D: nicht bestimmbar (unterhalb der Nachweisgrenze von ~ 0.001 % Umsatz).

N/A: nicht analysiert.

5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nach einem enzymatischen Zugang für die spezifische Brønsted-Säure-Katalyse gesucht werden. Aus Sicht der Biokatalyse schöpft dieses Projekt seine Attraktivität durch den daraus möglichen, enzymatischen Zugang zu einer Vielzahl an nicht-natürlichen, jedoch synthetisch wertvollen, chemischen Transformationen. Als Startpunkt wurden SHCs identifiziert, da deren katalytische Maschinerie (*anti*-orientiertes Proton) mit einer spezifischen Brønsted-Säure vergleichbar ist (Kapitel 2.3.2, Seite 37).⁹⁶

5.1. Protonasen in der asymmetrischen Brønsted-Säure-Katalyse

Die zu Beginn der Arbeit durchgeführten, bioinformatischen Studien zeigten, dass die Protonierungsmaschinerie dieser Enzymfamilie in der Natur nur für Polyzyklisierungsreaktionen genutzt wird (Kapitel 4.1, Seite 43). Darüber hinaus sind diese Enzyme als Bestandteil der Terpenbiosynthese auf einige wenige Substrate beschränkt. Im Vergleich dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SHCs und besonders deren Varianten als hochselektive, spezifische Brønsted-Säuren-Katalysatoren für unterschiedlichste Reaktionen eingesetzt werden können. Da diese Varianten Squalen bevorzugt nicht mehr zu Hopan umsetzen, ist eine Benennung als SHCs irreführend. Somit werden diese Enzyme im Einklang mit der Nomenklatur der Biochemie als Protonasen bezeichnet (Transfer eines Protons auf das Substrat).

5.1.1. Nicht-natürliche Polyzyklisierungsreaktionen

Kationische Zyklisierungen konformativ flexibler Substrate sind schwer zu kontrollieren, da zahlreiche Reaktionsverläufe mit geringer Aktivierungsenergie in Konkurrenz zueinander stehen.⁹⁸ Dies kann somit zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Produkten führen. Um solche Reaktionen zu katalysieren, wurden unterschiedliche biomimetische Katalysatoren (*artificial cyclases*) entwickelt und damit eine Vielzahl an Substraten polyzyklisiert.^{239,240} Synthetisch attraktiv sind diese Reaktionen unter anderem dadurch, da in einem einzigen Schritt eine große molekulare Komplexität aufgebaut wird.

Allgemeine und spezifische Brønsted-Säuren wie in **Abb. 3** (Seite 31) gezeigt, wurden bislang fast immer mit geeigneten funktionellen Gruppen bei der Initiierung der Polyzyklisierung kombiniert.^{241,242} Die Polyzyklisierung wurde jedoch nicht mit der Aktivierung von anspruchsvollen C=C-Bindungen durchgeführt. Hierfür wurden bisher Lewis-Säure-unterstützende Brønsted-Säuren als Katalysatoren beschrieben. Diese Reaktionen verlaufen mit bemerkenswerten Enantioselektivitäten (~90 % *ee*), besonders im Vergleich zur strukturellen Komplexität der Enzyme.^{243–246} Während SHCs ein großes Set aus primären und sekundären Aminosäuren im aktiven Zentrum benötigen, um das Polyen zu positionieren und zu aktivieren, sind „artifizielle Zyklasten“ strukturell weitaus weniger anspruchsvoll. Oft zeigen die biomimetischen Katalysatoren jedoch aufgrund mangelnder Kontrolle der Substratbindung eine geringe Produktselektivität. Polyzyklisierungen mit Ausbeuten von ~90 % pro Ringschluss werden diesbezüglich als exzellent beschrieben.²⁴⁶

Im Vergleich dazu zeigen Protonase-katalysierte Reaktionen oft bessere Produktselektivitäten in einer enantiomerenreinen Synthese. Während die natürliche Funktion der Protonasen auf die Polyzyklisierung weniger (in der Natur vorhandener) Substrate beschränkt ist (Squalen, 2,3-Oxidosqualen und Geranylgeranyl-diphosphat siehe **Abb. 8**, Seite 44), wurden mittlerweile im Labor eine Vielzahl an nicht-natürlichen Substraten erfolgreich umgesetzt. Somit können Protonasen und besonders SHCs als allgemeine Polyzyklisierungskatalysatoren angesehen werden.⁹⁶ Ursprünglich wurden hauptsächlich Squalen-Analoga als Substrate studiert (**Tabelle 1**, Seite 40). Diese hier vorgestellte Arbeit und parallel durchgeführte Studien beweisen jedoch, dass auch komplexer funktionalisierte lineare Polyene hochselektiv zyklisiert werden (**Abb. 28**). Schon seit 1986 ist bekannt, dass die *Aac*SHC Homofarnesol als Substrat akzeptiert und zum wertvollen Duftstoff Ambroxan zyklisiert (**Tabelle 1**, Zeile 11).¹⁰⁶ Nach erfolgreicher Enzym- und Prozessoptimierung erfolgte die hochselektive Darstellung auch mit guten Aktivitäten (10 g/L-Maßstab).¹³⁹ Darüber hinaus wurden kürzlich weitere *O*-Nukleophile genutzt, um die Zyklisierungskaskade zu terminieren. Neben phenolischen Alkoholen wurden Carbonsäuren und Ketone verwendet.^{129,247,248} Im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit wurde das Spektrum weiter vergrößert. Adressiert wurden Aromaten und Amide als Nukleophile und somit Friedel-Crafts-Alkylierungen und Hydroamidierungen zur Termination der Polyzyklisierungsreaktionen (Kapitel 4.3, Seite 49). Zusammenfassend ergibt sich somit ein enzymatischer Zugang zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Terpenoiden und Meroterpenoiden.

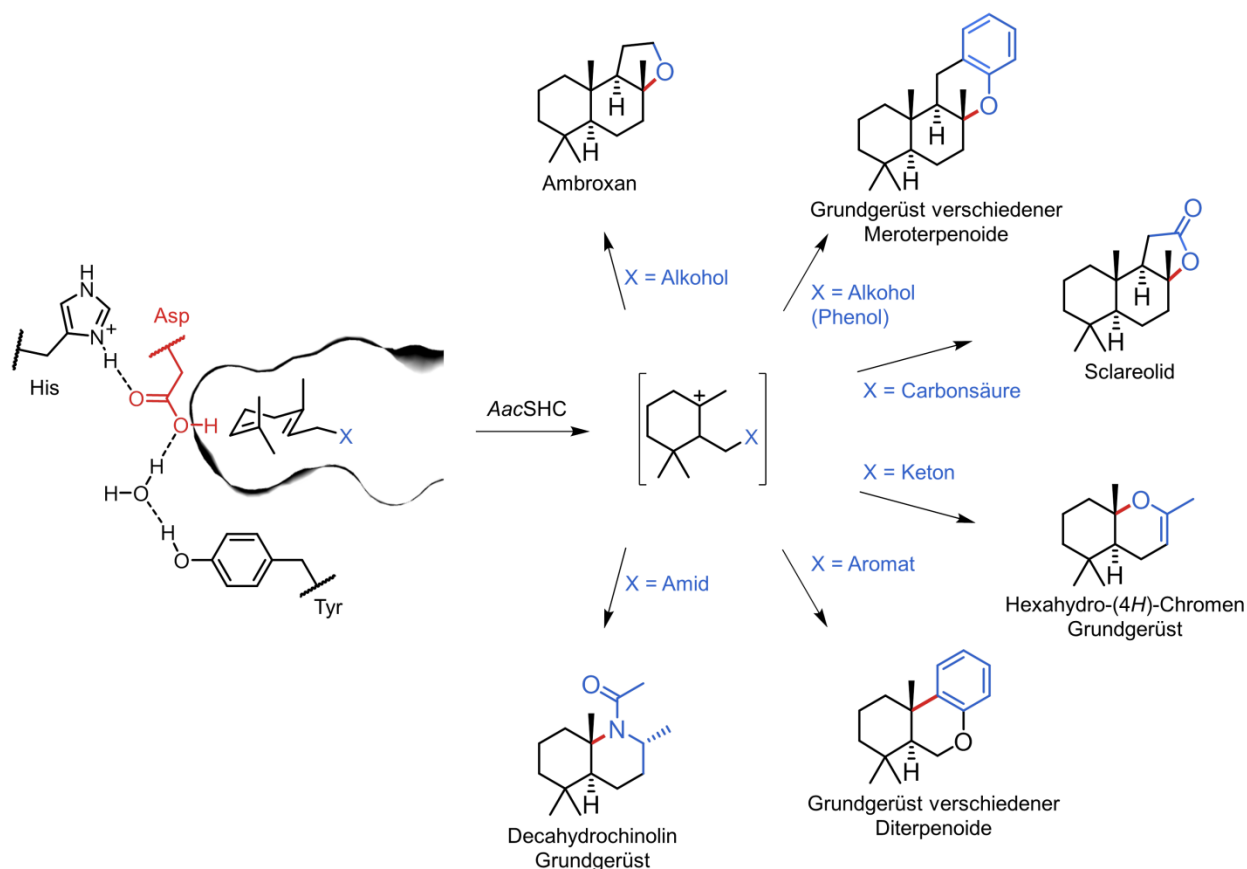


Abb. 28: Substratspektrum der Protonasen bezüglich der Polyzyklisierung nicht-natürlicher funktionalisierter linearer Polyene. Unterschiedliche Nucleophile in der Termination der Reaktion ermöglichen die stereoselektive Synthese wertvoller polyzyklischer Verbindungen. Während die Verwendung diverser *O*-Nucleophile kürzlich beschrieben wurde,^{129,247} konnten in einem Teil dieser Arbeit Aromaten und Amide als Nucleophile mittels Friedel-Crafts-Alkylierungen und Hydroamidierung in die Kaskade eingebaut werden.

Diese Verbindungen sind ökonomisch interessant, da sie als Duft- und Geschmacksstoffe, Fungizide, Bakterizide, Entzündungshemmer oder Zytostatika beschrieben und teilweise in Anwendung sind.^{220,222,223,249} Beispiele sind der bereits erwähnte Duftstoff (-)-Ambroxan oder das Antimikrobiotikum (+)-Totarol.^{221,250–252} Insgesamt ist bemerkenswert, dass all diese Reaktionen allein durch das AacSHC-Wildtyp-Enzym katalysiert werden. Dies überrascht, weil das aktive Zentrum der AacSHC perfekt auf die reaktive Bindung des natürlichen Substrates (Übergangszustandes) abgestimmt sein muss. In der Umsetzung von Squalen zu Hopan werden neun Stereozentren mit präziser Stereospezifität gebildet.^{97,107,108} Umso erstaunlicher ist die Substratbreite des Wildtyp-Enzyms. Dies weist auf eine gewisse Flexibilität und Dynamik der Aminosäuren (bzw. Seitenketten) in der hydrophoben, aktiven Tasche hin, wodurch auch nicht-natürliche Substrate wie sterisch-anspruchsvolle prenylierte Aromaten produktiv gebunden und umgesetzt werden können.

5.1.2. Erweiterung des Reaktionsspektrums

Funktionalisierte langkettige Polyprenoide werden von Wildtyp-SHCs stereoselektiv zu den entsprechenden Polyzyklen umgesetzt (siehe Kapitel 5.1.1). Diese Akzeptanz erreicht eine Grenze bei relativ kleinen Molekülen, welche potentiell Monozyklisierungsreaktionen durchführen können.^{106,129,134,218} Für Geraniol (**51**) und eine Vielzahl an Derivaten konnte bisher keine Aktivität nachgewiesen werden. Dies kann durch eine fehlende produktive Bindung dieser relativ kleinen Substrate in der aktiven Tasche erklärt werden (Kapitel 4.4.1, Seite 57). Deshalb wurde eine Mutantenbibliothek generiert, welche durch Änderung der Struktur des hydrophoben aktiven Zentrums produktive Bindung adressiert (siehe Diskussion, Kapitel 5.3.1, Seite 88). Mit der resultierenden Enzym-Bibliothek wurde ein größeres Set an kurzkettigen Substraten durchforstet (Kapitel 4.5 bis 4.8), wobei auch die Aktivierung/Protonierung verschiedener funktioneller Gruppen und somit unterschiedliche Reaktionstypen studiert wurden. Als Resultat wurden hochselektive Protonasen für unterschiedliche chemische Transformationen identifiziert (**Abb. 29**). Neben Monozyklisierungen durch die Protonierung unterschiedlicher funktioneller Gruppen (Alken und Epoxid) konnte auch die Aktivierung von Carbonylgruppen in Prins/En-Reaktionen mit Citronellal (**32**) durchgeführt werden. Dies zeigt, dass unterschiedliche funktionelle Gruppen mit den Protonasen aktiviert werden können. Entsprechende Mutanten (Knockouts) der katalytisch aktiven Asparaginsäure (D376C-Mutation) waren komplett inaktiv und bestätigten die Aktivierung durch die Protonierungsmaschinerie. Darüber hinaus konnte im Vergleich zu früheren Arbeiten^{122,123,140} die Prins/En-Reaktion von Citronellal (**32**) hochselektiv durchgeführt werden. Bisher durchgeführte Studien erzeugten Reaktionsmischungen, welche mit Umsetzungen in achiraler Umgebung vergleichbar sind. Aus chemischer Sicht wurden somit Protonasen als spezifische Brønsted-Säuren (für diverse Reaktionen außerhalb der Polyzyklisierung) in die asymmetrischen Katalyse eingeführt.²⁵³

Die studierten Reaktionen zeigten beeindruckende Selektivitäten (Regio-, Stereo- und Produktselektivität). Verdeutlicht wird dies durch die exklusive Umsetzung von (*S*)-6,7-Epoxygeraniol (*S*)-**65** aus dem entsprechenden Racemat (inklusive der regioselektiven Deprotonierung des Carbokation-Intermediates), die hochstereoselektive Synthese (> 99 % *de*) von (-)-*iso*-Isopulegol (**71**) aus (*S*)-Citronellal (*S*)-**32** oder durch die stereoselektive Wasseraddition an das Carbokation-Intermediat der Zyklisierung von Geraniol (**51**) (**Abb. 29**).

Der Ursprung der hohen Selektivität liegt in der Geometrie des aktiven Zentrums. Ausgehend von unterschiedlichen reaktiven Konformationen (welche zu unterschiedlichen Produkten führen können), werden die Substrate selektiv in einer bestimmten reaktiven Konformation gebunden und somit selektiv aktiviert (siehe **Abb. 25**, Seite 72). Dies ermöglichte die Darstellung von unterschiedlichen chiralen cyclohexanoiden Monoterpenen (Cyclogeraniole und Isopulegole), die wichtige Bausteine in der Synthese von zum Beispiel Duft- und Geschmacksstoffen darstellen.^{232,235} Die synthetische Anwendbarkeit wurde in präparativen Umsetzungen untersucht (Kapitel 7.7.2, Seite 126). So wurden zum Beispiel bei einer Umsetzung von 512 mg Geraniol (**51**) mit der Variante *AacSHC* G600F, 182 mg Cyclogeraniol-hydrat (**64**) erhalten (isolierte Ausbeute 32 %). Dementsprechend war eine Mutation ausreichend, um aus einem beinahe inaktiven Wildtyp-Enzym einen praktisch anwendbaren Katalysator zu erzeugen. Dies verdeutlicht die hohe Evolvierbarkeit der SHCs zu Protonasen für unterschiedliche chemische Transformationen.

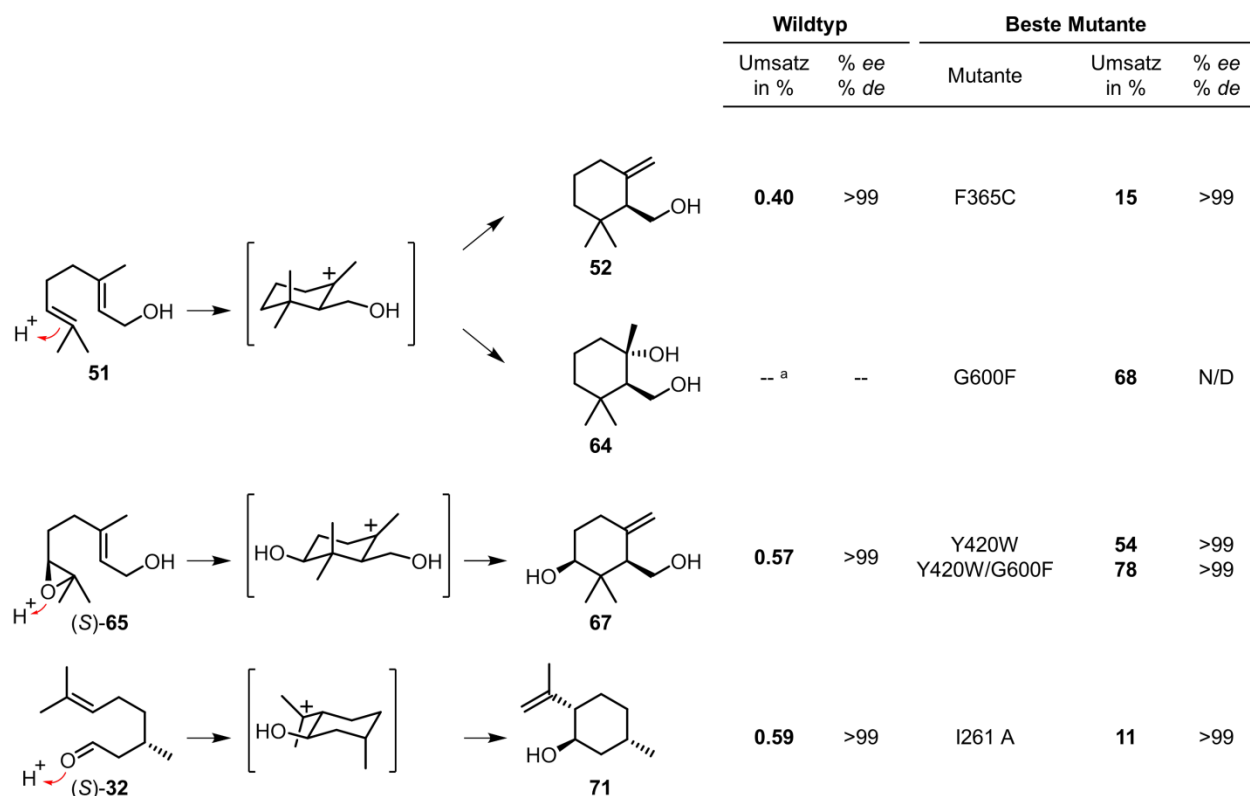


Abb. 29: Protonasen in der asymmetrischen Katalyse. Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit identifizierten katalytischen Aktivitäten. Hervorzuheben sind die Aktivierungen unterschiedlicher funktioneller Gruppen sowie die ausgezeichneten Selektivitäten. Im Gegensatz zur Literatur^{106,134,140} konnten minimale katalytische Aktivitäten bereits mit dem *AacSHC*-Wildtyp-Enzym nachgewiesen werden. Eine erstellte Mutantenbibliothek wurde anschließend durchforstet und Mutanten mit deutlich erhöhten Aktivitäten wurden identifiziert. Im Vergleich ist eine Auswahl der besten Mutanten zu sehen. Standardabweichungen der Umsetzungen können **Tabelle 2**, **Tabelle 3** und **Tabelle 4** im Ergebnisteil entnommen werden.

5.1.3. Vergleich zu chiralen Brønsted-Säuren aus der Organokatalyse

Protonasen komplementieren Brønsted-Säuren der Organokatalyse (**Abb. 3**, Seite 31) auf unterschiedliche Weise. Durch das tief in das Enzym eingebettete aktive Zentrum wird nicht nur die Aktivierung des Substrats asymmetrisch induziert, sondern es kann auch die Termination der Reaktion hochselektiv durchgeführt werden. Dies zeigte sich zum Beispiel an den selektiven Deprotonierungen der Carbokation-Intermediate von **51** und (*S*)-**65**, welche exklusiv zu den exozyklischen Alkenen **52** und **67** führen (**Abb. 29**, Seite 83). Im Vergleich dazu sind für die regioselektive Termination in klassisch-chemischen (biomimetischen) Zyklisierungsreaktionen clever ausgewählte Abgangsgruppen notwendig.²⁴² So werden etwa bei der chemischen Synthese von **52** und **67** spezielle Allylsilane als Vorläufer zur Zyklisierung synthetisiert, um selektiv die exozyklischen Alkene zu erhalten (siehe chemische Synthese von *rac*-**52** und *rac*-**67** im Anhang **Abb. 35**, Seite 158).^{232,254} Bei Abwesenheit der Allylsilan-Gruppe bilden sich Produktmischungen mit einem endozyklischen Alken als Hauptprodukt. Die selektive Darstellung der exozyklischen Alkene **52** und **67** mittels Protonasen ist vermutlich durch die passende Positionierung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum zu erklären. Dieses fungiert als Base und abstrahiert das Proton an der entsprechenden Methylgruppe (**Abb. 29**, Seite 83). Im Gegensatz dazu positioniert die Mutante G600F bei der Umsetzung von Geraniol (**51**) ein Wassermolekül ideal für den Angriff des Carbokation-Intermediates von der *Si*-Seite. Somit lässt sich aufgrund der Struktur des aktiven Zentrums der Protonasen die Termination einer Reaktion lenken, wenn auch zum jetzigen Zeitpunkt nicht vorhersagen oder gezielt designen.

Darüber hinaus stellen die Protonasen eine spannende Ergänzung bezüglich des verwendbaren Lösungsmittels dar. Die asymmetrische Brønsted-Säure-Katalyse wird standardmäßig in wasserfreien organischen Lösungsmitteln durchgeführt (**Abb. 4**, Seite 32). Die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel ist diesbezüglich unvorteilhaft und äußerst anspruchsvoll. Dies ist auf die Protonierung des Wassers (durch die spezifische Brønsted-Säure) und der daraus resultierenden unselektiven Aktivierung des Substrats zurückzuführen. Dementsprechend ist Wasser als Medium in der asymmetrischen Brønsted-Säure-Katalyse kaum beschrieben, wobei einzelne Studien auch nur moderate Stereoselektivitäten zeigen.^{255,256} Im Vergleich dazu katalysieren Protonasen die asymmetrische Brønsted-Säuren-Katalyse in Wasser mit höchsten Selektivitäten. Ermöglicht wird dies durch ein sehr hydrophobes aktives Zentrum, welches ein inertes organisches Lösungsmittel imitiert.

Hinsichtlich der Aktivität sind die bisher entwickelten Protonasen eher als moderat einzustufen. Im Vergleich zu den chiralen Brønsted-Säuren der Homogenkatalyse sind hohe Katalysatorkonzentrationen erforderlich (**Abb. 4**, Seite 32), wobei bei den Protonasen bisher Reaktionszeiten von mehreren Tagen benötigt werden, um synthetisch nützliche Umsätze zu erhalten. Letzteres wird durch die enorme Stabilität der Protonasen in den *in vitro*-Reaktionssystemen begünstigt.²⁴⁸ Jedoch handelt es sich bei den hier vorgestellten Biokatalysatoren keinesfalls um optimierte Enzyme, sondern um Varianten mit ein bis maximal zwei Punktmutationen. Eine deutliche Aktivitätssteigerung ist bei entsprechendem *enzyme engineering* zu erwarten. Protonasen sind genetisch kodiert und deren Aktivität kann in Evolutionsexperimenten dirigiert werden.

5.2. Limitierende Faktoren für ein größeres Reaktionsspektrum

Insgesamt konnte in dieser Arbeit nur ein geringer Anteil der potentiellen Substrate umgesetzt werden (**Tabelle 2** bis **Tabelle 5**). Während für manche Reaktionen (Nazarov-Zyklisierung und Michael-Addition) überhaupt kein Umsatz detektiert werden konnte, zeigten andere Reaktionen ein sehr beschränktes Substratspektrum. So konnte für mehrere Analoga, welche sich strukturell nur gering von funktionierenden Substraten unterscheiden, keine oder nur eine geringe Aktivität nachgewiesen werden. Ein Beispiel ist Linalool (**59**), welches im Gegensatz zu Geraniol (**51**) nur in einem sehr geringen Maße umgesetzt wird (**Tabelle 2**, Seite 64). Dabei bezieht sich dieses Ergebnis nicht auf das Wildtyp-Enzym, sondern auf die Diversität der ganzen Bibliothek (Vergleich **Abb. 34**, Seite 157).

Der Ursprung dieser Limitierung findet sich vermutlich in der Struktur des aktiven Zentrums, welches als hydrophobes Templat fungiert. Dementsprechend selektioniert es potentielle Substrate bezüglich der Geometrie der reaktiven Konformation. Hier ist anzumerken, dass es sich bei der hier beschriebenen, reaktiven Konformation nicht um jede Substratkonformation handelt, welche eine Protonierung ermöglicht. Sondern es ist die „protonierungsfähige“ Orientierung gemeint, welche dem Übergangszustand der Reaktion ähnelt und somit Atome und Orbitale für die Reaktion günstig positioniert (*near-attack conformation*).^{257,258} Somit werden nicht alle Moleküle umgesetzt, sondern nur der Anteil, dessen reaktive Konformation stabil gebunden werden kann.

Dies zeigt sich zum Beispiel durch die Studien unterschiedlicher Geranylalkylether. Mittels molekuldynamischer Simulation (durchgeführt von Dr. P.-O. Syrén) konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Bindung in einer reaktiven Konformation aufgezeigt werden (**Abb. 18**, Seite 59). Die Wichtigkeit und Empfindlichkeit der Bindung in einer reaktiven Konformation zeigt sich auch durch die stark unterschiedlichen Aktivitäten einzelner Mutanten bei der Umsetzung von **51** und (*S*)-**65**. Beide Substrate sind sich in ihrer sesselförmigen reaktiven Konformation sehr ähnlich (**Abb. 29**). Jedoch korreliert das nicht mit der Aktivität ihrer besten Varianten (vergleiche G600F und Y420W in **Abb. 34**, Seite 157).

Aufgrund des kleinen Anteils der erfolgreich umgesetzten Substrate lässt sich schlussfolgern, dass die erzeugte Mutantenbibliothek eine viel zu geringe Diversität aufweist, um die adressierten Reaktionen zu katalysieren. Die mit der Bibliothek abgebildeten Template (Geometrien des aktiven Zentrums) sind somit nicht ausreichend, um unterschiedlichste reaktive Konformationen zu binden. Potentielle Substrate wie zum Beispiel Moleküle für die Nazarov-Zyklisierung (**Tabelle 5**, Seite 78) unterscheiden sich in ihrer Übergangszustands-Geometrie viel deutlicher von Squalen als zum Beispiel Geraniol (**51**) oder (*S*)-6,7-Epoxygeraniol (*S*)-**65**. Vermutlich scheitert die Umsetzung der meisten Substrate einfach daran, dass deren Bindung in einer reaktiven Konformation nicht gefördert wird und somit das Substrat in beliebig vielen nicht-reaktiven Konformationen im aktiven Zentrum verweilt. Neben der sehr sensiblen reaktiven Bindung sind weitere Faktoren zu beachten, welche das Reaktionsspektrum der Mutantenbibliothek und eventuell auch der Protonasen im Allgemeinen limitieren. (i) Die begrenzte Acidität der Brønsted-Säure (D376 in *AacSHC*), (ii) die fehlende Stabilisierung auftretender Carbokation-Intermediate sowie (iii) die inhibierende Wirkung bestimmter funktioneller Gruppen.

(i) Der pK_a -Wert der Protonierungsmaschinerie von SHCs und verwandten Enzymen ist nicht bekannt. Aufgrund der *anti*-Orientierung des transferierten Protons (**Abb. 7**, Seite 38) sowie der Gegebenheit, dass anspruchsvolle C=C-Bindungen protoniert werden können, ist jedoch die Aktivierung eines breiten Spektrums an funktionellen Gruppen (Epoxyde, Carbonyle, α,β -ungesättigte Carbonyle, Imine usw.) zu erwarten. Dies ermöglicht einen Zugang zu einer großen Vielfalt an nicht-natürlichen Reaktionen. Jedoch ist dies durch die (bisher nicht bekannte) Acidität der Protonierungsmaschinerie eingeschränkt.

Diese Einschränkung bezieht sich jedoch nicht auf einen gewissen Reaktionstyp, sondern wie folgendes Beispiel zeigt auf die Reaktivität der individuellen Moleküle. Eine Aktivierung reaktiver tertiärer Allylalkohole ist höchstwahrscheinlich denkbar, in Gegensatz dazu wird sich eine Dehydratisierung von 1-Butanol als sehr schwierig erweisen. Dies ist damit zu erklären, dass die Alkohol-Aktivierung tertiärer Allylalkohole zu einem stabilisierten Carbokation führt, während bei der Reaktion von 1-Butanol ein sehr instabiles primäres Carbokation entsteht. Zukünftige Studien werden zeigen, auf welche Funktionalitäten und Reaktivitäten die Acidität der Protonasen limitiert ist.

(ii) Der Fokus lag bisher auf der Diversifizierung der Geometrien des aktiven Zentrums (Template). Dies berücksichtigt jedoch nur indirekt die Stabilisierung reaktiver Intermediate (z. B. Carbokationen). Das aktive Zentrum dient als Templat und bindet das Substrat in einer reaktiven Konformation. Jedoch stellt es darüber hinaus (für die natürliche Umsetzung von Squalen) auch Aromaten zur Verfügung, welche transiente Carbokation-Intermediate durch Kation- π -Interaktion stabilisieren.^{112,114} Somit beschleunigt die richtige Positionierung von Aromaten innerhalb des Templates die gewünschte Reaktion. Für die natürliche Reaktion der Triterpenzyklen (SHCs und OSCs) ist die Protonierung der Substrate Bestandteil des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts.^{111,259–261} Die Protonierung wird erschwert, wenn Carbokation-Intermediate weniger stabilisiert werden. Daher ist nicht nur die Struktur/Geometrie des Templates von Bedeutung, sondern auch die entsprechende Positionierung von Kation- π -interagierender Aminosäureseitenketten innerhalb eines Templates.

(iii) Zuletzt wird das Funktionsspektrum von Protonasen auch durch Inhibitoren begrenzt. Bisher sind Amine als Inhibitoren beschrieben, da sie mit der katalytisch aktiven Asparaginsäure ein Salz bilden und somit die katalytische Maschinerie blockieren.^{108,217,228} Diese Limitierung kann jedoch durch die Verwendung der weniger basischen *N*-acylierten Analoga aufgehoben werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, eignen sich Amide als *N*-Nukleophile (Kapitel 4.3.2, Seite 52). Das gleiche Prinzip könnte auch bei der Protonierung/Aktivierung von Iminen angewendet werden. Die Aktivierung von Iminen, wie zum Beispiel Reaktionen von Iminiumionen mit Nukleophilen, führen in der Regel zu dem entsprechenden Amin und somit zu potentiellen Inhibitoren. Deswegen wurden solche Reaktionen bisher nicht in das Reaktionsspektrum aufgenommen. Jedoch könnten *N*-Acyl-Imine zur Aktivierung genutzt werden, welche zu nicht-inhibierenden Amidinen führen.²¹⁷ Damit wäre ein Zugang zur Iminiumionen-Chemie über die entsprechenden *N*-Acyl-Imine denkbar.²⁶²

5.3. *Enzyme engineering* mit Protonasen

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Protonierungsmaschinerie der SHC eine spezifische Brønsted-Säure für die asymmetrische Katalyse darstellt. Jedoch ist das Reaktionsspektrum der damit potentiell katalysierbaren Reaktionen aktuell durch die geringe strukturelle Diversität der aktiven Zentren der Enzyme begrenzt. Bei vielen Biokatalysatorsystemen wird dies dadurch behoben, dass die natürliche Diversität der jeweiligen Enzyme durchforstet wird.^{18,35,263,264} Dies ist aufgrund der limitierten natürlichen Vielfalt der Protonasen (SHCs, OSCs und DC) jedoch nur begrenzt möglich (Kapitel 4.1, Seite 43). Obwohl eine große Anzahl an putativen Proteinsequenzen in Datenbanken beschrieben werden, sind innerhalb der Enzymfamilie viele Aminosäuren des aktiven Zentrums mit > 90 % Häufigkeit hochkonserviert.¹¹⁶ Die nötige Diversität an Enzymen lässt sich somit nicht aus dem natürlichen Pool an Katalysatoren rekrutieren. Um das Reaktionsspektrum der Protonasen zu erweitern, muss die Protonierungsmaschinerie aus den hochkonservierten aktiven Zentren befreit werden. Für die Diversifizierung der aktiven Zentren wurde in dieser Arbeit eine Mutationsstrategie entwickelt, welche die produktive Bindung als Eigenschaft adressiert (Kapitel 4.4.2, Seite 60).

5.3.1. **Hydrophobe Substitution als Mutationsstrategie**

Als Mutationsstrategie wurde eine hydrophobe Substitution im aktiven Zentrum (Templat) genutzt. Hierzu wurden alle Aminosäuren substituiert, welche primär an der Gestaltung des aktiven Zentrums beteiligt sind und sich in einem Abstand von 15 Å zur katalytisch aktiven Asparaginsäure befinden (**Abb. 19**, Seite 61). Um den hydrophoben Charakter des aktiven Zentrums zu erhalten, wurden die entsprechenden Aminosäuren „nur“ gegen hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht. Letztendlich wurden 16 Positionen variiert, wobei sich die finale Bibliothek aus 33 Varianten zusammensetzte (nur Ein-Punkt-Mutationen).

Mutationen in Proteinen führen häufig zum Funktionsverlust. Bei der zufälligen Substitution von Aminosäuren in Enzymen ist der Anteil an vorteilhaften Mutationen relativ klein (in der Größenordnung von 10^{-3}), wobei die Rate an funktionszerstörenden Mutationen relativ groß ist ($\geq 30\%$). Deshalb wird ein bemerkenswerter Forschungsaufwand betrieben, um sogenannte fokussierte Mutanten-bibliotheken zu entwickeln.^{7,265,266}

Das Ziel dabei ist, den Anteil an funktionszerstörenden Mutationen zu minimieren und gleichzeitig die Anzahl an nötigen Sequenzen, welche für die gewünschte Aktivität durchforstet werden müssen, zu reduzieren. In diesem Zusammenhang sind die Resultate der *AacSHC*-Mutantenbibliothek erstaunlich. Alle erzeugten Varianten sind aktive Brønsted-Säure-Katalysatoren (**Abb. 34**, Seite 157). Eine katalytische Aktivität für mindestens ein Substrat konnte für jede einzelne Mutante nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die Varianten keinen signifikanten Unterschied im Expressionslevel. Dies unterstreicht die außerordentliche Stabilität gegenüber Mutationen bei der hydrophoben Substitution.

Die hohe Erfolgsrate der hydrophoben Substitution als Mutationsstrategie lässt sich vermutlich auf zwei Eigenschaften zurückführen. Erstens, innerhalb der *AacSHC* wird die Protonierungsmaschinerie räumlich sehr gut vom aktiven Zentrum abgetrennt.⁹⁷ Die durchgeführten Mutationen wurden zum größten Teil in variableren *loop*-Bereichen durchgeführt, während die Aminosäuren der Protonierungsmaschinerie als Bestandteil der β -Domäne in einem stabilen Proteingerüst eingebaut sind (**Abb. 6**, Seite 35). Somit haben Mutationen, welche die Struktur des aktiven Zentrums variieren, vermutlich kaum einen Einfluss auf die räumlich abgetrennte Protonierungsmaschinerie. Zweitens, die Hydrophobizität selbst besitzt vorteilhafte Eigenschaften. Die hydrophobe Interaktion ist räumlich unabhängig und bedarf deshalb keiner bestimmten Orientierung (Vergleich: Wasserstoffbrückenbindung). Somit werden bei der hydrophoben Substitution die relativ schwachen van-der-Waals Interaktionen nur minimal gestört. Dies verbessert die Robustheit gegenüber Mutationen.²¹ Die Richtungsunabhängigkeit der hydrophoben Interaktion erleichtert auch Konformationsänderungen im Protein. Dies ist ein Vorteil, da eine größere Flexibilität im aktiven Zentrum die reaktive Bindung nicht-natürlicher Substrate erleichtert. Strukturelle Vielfalt fördert katalytische Flexibilität.²⁶⁷ Zuletzt ist die hydrophobe Bindung auch vorteilhaft in der Enzym-Substrat Interaktion. Aufgrund der weniger diskriminierenden Interaktion können potentielle Substrate leichter reaktive Bindungsmodi erreichen.²⁶⁸

Zusammenfassend zeigt sich, dass die hier vorgestellte/verwendete hydrophobe Substitution eine interessante Mutationsstrategie darstellt, weil sie die Stabilität gegenüber Mutationen sowie die konformative Flexibilität unterstützt.

5.3.2. Funktionsweise der identifizierten positiven Mutationen

Das *enzyme engineering* adressiert sehr häufig die Vergrößerung des aktiven Zentrums, um ein sperrigeres Substrat zu binden.^{269,270} Die dafür nötigen Veränderungen können regelmäßig durch einen Vergleich des aktiven Zentrums mit dem Substrat abgeschätzt werden. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit relativ kleine Substrate verwendet, welche bevorzugt in nicht-reaktiven Konformationen in das aktive Zentrum binden. Die Herausforderung war, vorteilhafte Mutationen zu identifizieren, welche die Bindung von kleinen, flexiblen, hydrophoben Substraten in einer reaktiven Konformation stabilisieren. Da solche Mutationen schwerer vorherzusagen sind, wurde in dieser Arbeit eine Mutantenbibliothek erstellt und diese auf Aktivität durchforstet. Die identifizierten positiven Varianten (z. B. G600F und Y420W/G600F) führen eine sterische Hinderung in das aktive Zentrum ein (**Abb. 21d** und **Abb. 24c**). Daher wird vermutlich eine Bindung der Substrate in der reaktiven Konformation stabilisiert. Dies ist konsistent mit der Bedeutsamkeit der Stabilisierung der reaktiven Konformation. Es ist nicht ausreichend, wenn potentielle Substrate in der reaktiven Konformation in das aktive Zentrum „passen“, sondern deren Bindung in dieser Konformation muss stabilisiert sein.

Insgesamt ist dies eine äußerst statische Darstellung der Substratbindung. Wie Mutationen an der Position I261 für die Umsetzung von (*S*)-Citronellal zeigen, spielen dynamische Prozesse vermutlich eine bedeutende Rolle (**Abb. 27**, Seite 74). Die Position I261 ist zu weit entfernt, damit Mutationen an dieser Stelle einen direkten Einfluss auf die reaktive Bindung von (*S*)-Citronellal ausüben können. Vermutlich führen Mutationen an I261 zu Konformationsänderungen an Seitenketten benachbarter Aminosäuren, wie zum Beispiel W169, welche die Bindung des Substrates direkter beeinflussen. Dies ist im Einklang mit der erhöhten strukturellen Diversität hydrophober, aktiver Zentren. Vorteilhafte Mutationen die sich deutlich entfernt vom aktiven Zentrum befinden (und somit keinen direkten Einfluss haben können), werden regelmäßig beschrieben.^{271,272} Jedoch ist deren Funktion oft schwer zu verstehen, da diese entfernten Mutationen die Geometrie sowie elektrostatische und/oder dynamische Eigenschaften des aktiven Zentrums über komplexe Mechanismen beeinflussen.²⁷³

5.4. Reaktionsmechanismen-gesteuertes Enzymdesign

Die große Diversität an chemischen Reaktionen in der organischen Chemie lässt sich auf eine relativ geringe Anzahl an vielseitig einsetzbaren Aktivierungsmodi reduzieren (z. B. Aminokatalyse, Katalyse durch Wasserstoffbrücken-Donoren, Lewis-Säure-Katalyse, Metalloporphyrin-Katalyse usw.). Diese Vielfältigkeit findet ihren Ursprung in der Strategie der Chemiker, die inhärente Reaktivität einzelner katalytischer Zentren basierend auf reaktionsmechanistischen Überlegungen zu erproben und dadurch immer neue Reaktivitäten zu entdecken. Viele dieser katalytisch attraktiven, allgemeingültigen Aktivierungsmodi sind Bestandteil des enzymatischen Repertoires.²⁷⁴⁻²⁷⁶ Jedoch wird ein Großteil der damit potentiell katalysierbaren Reaktionen von der Natur nicht durchgeführt.

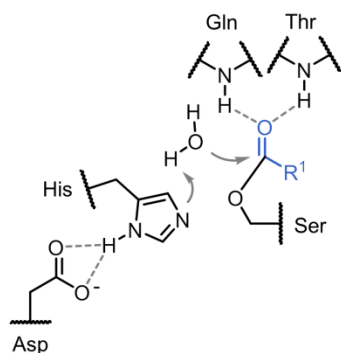
Neben dem *enzyme engineering* wird in der biokatalytischen Forschung ein Zugang zu nicht-natürlichen Enzymfunktionen häufig durch die Generierung neuer katalytischer Maschinerien ermöglicht, wie zum Beispiel durch das computerbasierte *de novo* Enzymdesign³⁹ oder durch den Einbau artifizieller Cofaktoren⁴⁴ (Kapitel 2.1.2, Seite 27). Hierbei wird jedoch das Potential bereits existierender katalytischer Maschinerien übersehen. Die allgemeine Fähigkeit von Enzymen nicht-natürliche chemische Transformationen zu katalysieren, ist schon länger bekannt und wird regelmäßig mit der etwas irreführenden Bezeichnung *catalytic promiscuity* beschrieben.^{47-49,268,277,278} Hierbei wird vielfach der Eindruck vermittelt, als wäre es ein Phänomen, dass Enzyme nicht-natürliche Reaktionen katalysieren und somit „andere“ Bindungen bilden und brechen können (im Vergleich zur natürlichen Reaktion). Jedoch werden in der organischen Chemie die gleichen Aktivierungsmodi genutzt, um häufig eben genau solche und viele weitere Reaktionen zu katalysieren. Aus dieser Sicht ist es somit nicht überraschend, dass die katalytischen Maschinerien der Enzyme ein breites Reaktionsspektrum besitzen, da diese katalytische Vielfalt eine inhärente Eigenschaft vieler Aktivierungsmodi ist. Deshalb stellt sich vielleicht auch weniger die Frage, welche Faktoren ein Enzym „promiskuitiv“ machen,²⁶⁸ sondern vielmehr was einen allgemeingültigen Aktivierungsmodus in einem Enzym daran hindert katalytisch vielfältig zu sein. Als Resultat dieser Arbeit ist es das hochspezifische und stark diskriminierende aktive Zentrum, welches nur ausgewählte Substrate reaktiv bindet. Vermutlich steht nur diesen Substraten die Protonierungsmaschinerie der Protonasen zur Verfügung. Hier ist anzumerken, dass Protonasen aufgrund der hohen Hydrophobizität des aktiven Zentrums bereits als vergleichsweise wenig diskriminierend einzustufen sind.

Die katalytische Flexibilität (*catalytic promiscuity*) von Enzymen wurde schon mehrfach als Quelle zur Identifizierung nicht-natürlicher Enzymfunktionen vorgestellt und diskutiert.^{47–49} Jedoch wird das inhärente Potential der aktiven Zentren vergleichsweise selten gezielt abgefragt. Diesbezüglich wegweisende Arbeiten sind die Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung von Aminen durch selektive Acetylierung (**Abb. 30a**),²⁷⁹ die Halohydrin Dehalogenase-katalysierten Epoxidöffnungsreaktionen mit diversen nicht-natürlichen Nukleophilen (**Abb. 30b**)^{280–282} sowie die Cytochrom P450-katalysierten Carben- und Nitren-Transferreaktionen (**Abb. 2c**, Seite 29).^{45,52–54} Die hier vorgestellten Brønsted-Säure-katalysierten Reaktionen, vermittelt durch die Protonierungsmaschinerie der Protonasen, reihen sich in diese Arbeiten ein (**Abb. 29**, Seite 83).

Zusammenfassend zeigen diese Beispiele, dass die Entwicklung nicht-natürlicher Enzymfunktionen „relativ einfach“ durch die Nutzung bereits vorhandener enzymatischer Katalysezentren möglich ist. Dies basiert auf Fortschritten in der mechanistischen Enzymologie und auf dem detaillierten Verständnis von Reaktionsmechanismen in der organischen Chemie. Somit lassen sich Aktivierungsmodi oder gemeinsame katalytische Prinzipien identifizieren und für das Enzymdesign ausnutzen. Dieser Ansatz besitzt aufgrund seiner Allgemeingültigkeit ein bedeutsames Potential, um den limitierten natürlichen Reaktionsraum der Biokatalyse auf viele nicht-natürliche Reaktionen zu erweitern. Folgende einfache Leitlinien dienen abschließend als Anregungen für zukünftige Arbeiten: **(i)** Grundlage ist die Identifizierung eines katalytischen Prinzips, das für eine gewünschte Reaktion essentiell ist und von einem enzymatischen Katalysezentrum durchgeführt werden kann. **(ii)** Die Auswahl eines geeigneten Enzyms ist ein Schlüsselschritt. Zu berücksichtigen ist hier zum Beispiel die natürliche Funktion des Enzyms innerhalb der Superfamilie, die Stabilität des Proteins gegenüber Mutationen oder die Beschaffenheit des aktiven Zentrums (Ziel: minimale Diskriminierung der Bindung nicht-natürlicher Substrate). Und **(iii)** das Screening der potentiellen Kandidaten mit clever ausgewählten Substraten. Vorteilhaft sind Moleküle, welche eine große inhärente Aktivität für die nicht-natürliche Zielreaktion besitzen (z. B. ist es für ein nicht-optimiertes Enzym sicherlich einfacher einen tertiären Allylalkohol säurekatalytisch zu aktivieren als einen weniger reaktiven sekundären Alkohol).

a

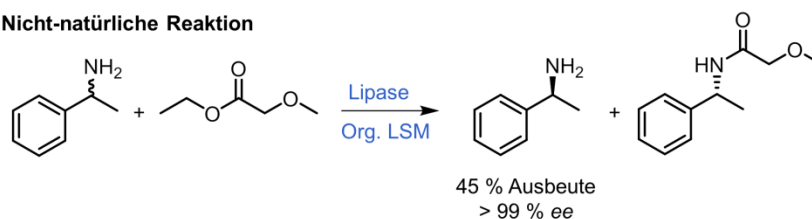
Katalytische Maschinerie



Natürliche Reaktion

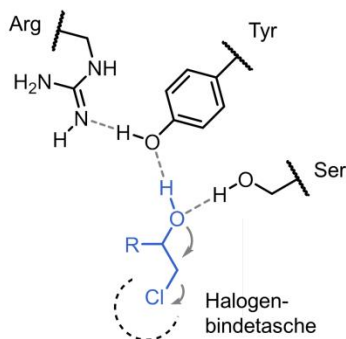


Nicht-natürliche Reaktion

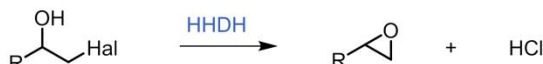


b

Katalytische Maschinerie



Natürliche Reaktion



Nicht-natürliche Reaktion

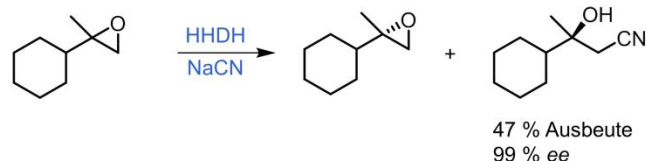


Abb. 30: Wegweisende Arbeiten zum Reaktionsmechanismen-gesteuerten Enzymdesign. (a) Lipasen katalysieren in der Natur die Hydrolyse von Triacylglyceriden zu den entsprechenden Fettsäuren und Alkoholen. Hierzu wird eine katalytische Asp-His-Ser-Triade benutzt, welche die Nucleophilie des Serins verstärkt und somit den Angriff am Carboxyl-Kohlenstoff der Esterfunktion des Substrats ermöglicht. Es bildet sich ein kovalent-gebundenes Enzym-Substrat-Intermediat, welches in der Abbildung zu sehen ist. In der natürlichen Reaktion wird dieses Intermediat (Substrat ist blau markiert) hydrolysiert, wobei Wasser als Nucleophil verwendet wird. In den entwickelten nicht-natürlichen Reaktionen wird in organischen Lösungsmitteln (Org. LSM) gearbeitet, wodurch Amine als Nucleophile verwendet werden können. Dies ermöglicht einen Zugang zu chiralen Aminen durch die kinetische Racematspaltung.²⁷⁹

(b) Halohydrin Dehalogenasen (HHDH) katalysieren die Darstellung von Epoxiden aus den entsprechenden Halohydrinen (blau). Diese reversible Reaktion wird durch eine Halogenbindetasche beschleunigt, welche die Abgangsgruppeneigenschaft des Halogens verstärkt. Darüber hinaus wird die Nucleophile des Alkohols durch gleichzeitige Deprotonierung mittels einer Tyr-Arg-Diade erhöht. Bei der Umkehrreaktion wird die Abgangsgruppeneigenschaft des Alkohols durch Wasserstoffbrücken-Donoren erhöht. In der nicht-natürlichen Reaktion werden unterschiedliche Pseudohalogene wie zum Beispiel das Cyanid in der Halogenbindetasche gebunden und somit das Epoxid selektiv geöffnet.²⁸⁰⁻²⁸²

6. AUSBLICK

Squalen-Hopen-Zyklasen lassen sich durch die Einführung weniger Mutationen „relativ einfach“ zu hochselektiven Protonasen für unterschiedliche nicht-natürliche chemische Reaktionen evolvieren. Dabei ist die Stabilisierung der reaktiven Bindung alternativer Substrate der Schlüsselschritt. Dies setzt auch die aktuelle Limitierung im Reaktionsspektrum der Protonasen. Eine deutlich breitere Anwendung dieser Enzyme für viele nicht-natürliche Reaktionen scheint im Moment hauptsächlich durch die Diversität der aktiven Zentren der Protonasen beschränkt zu sein. In der Natur sind die aktiven Zentren hochkonserviert¹¹⁶ und im Labor stehen aktuell ungefähr nur 60 Varianten zu Verfügung, wobei es sich dabei meistens um einfache Punktmutationen handelt (**Tabelle 8**, Seite 102). Um eine artifizielle Protonase-Superfamilie zu erzeugen, welche ein breites Spektrum an nicht-natürlichen Reaktionen katalysiert, müssen die Enzyme weiter evolviert werden. Folgende Strategien erscheinen aus jetziger Sicht sinnvoll um eine größere Diversität an Templaten (Geometrien des aktiven Zentrums) zu erzeugen. **(i)** Bisher wurden hauptsächlich Einpunktmutationen verwendet. Die systematische Generierung von Doppel- und Tripple-Mutanten ist somit eine logische Erweiterung. **(ii)** Um eine minimale Bibliothek zu erzeugen, wurde in dieser Arbeit hauptsächlich nur mit Alanin, Phenylalanin und Tryptophan substituiert. Die Einführung anderer hydrophober Aminosäuren (Glycin, Prolin, Isoleucin, Leucin, Valin und Methionin) wird die Diversität weiter erhöhen. Der Einbau von polaren Aminosäuren sollte wegen der potentiellen Reaktion der polaren Seitenkette mit reaktiven Intermediaten (z. B. Carbokation-Intermediate) vielleicht „nur“ ausgewählt erfolgen. **(iii)** In dieser Arbeit wurden „nur“ Aminosäuren im Abstand bis 15 Å zur katalytisch aktiven Brønsted-Säure adressiert. Mutationen können auf weitere Aminosäure des aktiven Zentrums ausgeweitet werden. Diese induzieren eventuell dynamische Strukturänderungen im aktiven Zentrum. **(iv)** Neben den Aminosäuren der ersten Schale des aktiven Zentrums, sollten auch Aminosäuren der zweiten Schale substituiert werden, da sie maßgeblichen Einfluss auf die Struktur des aktiven Zentrums von Terpen-Zyklasen haben.²⁸³ **(v)** Neben der Struktur des aktiven Zentrums könnte auch die Säurestärke variiert werden. Die katalytische Brønsted-Säure (D376 in *AacSHC*) wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Histidin aktiviert (**Abb. 7**, Seite 38). Die Einführung von unterschiedlich starken Wasserstoffbrückenbindungen sollte die Acidität von D376 beeinflussen. Dies ist interessant, da die Umsetzung von Squalen einen kinetischen Isotopeneffekt zeigt.¹¹¹

Somit ist vermutlich die Protonierung des Substrates oder die Reprotonierung der Säure (D376) Bestandteil des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts. Für aktivierte Substrate (z. B. Epoxide) sind theoretisch weniger acide Säuren nötig. Eine Erhöhung des pK_a -Wertes von D376 könnte somit zu einer schnelleren Reprotonierung und damit zu einem höheren Umsatz beitragen.

Neben der hier vorgeschlagenen Strategien um die hydrophobe Substitution auszudehnen, stehen viele weitere Methoden zur Verfügung, um Diversität bei den Protonasen zu erzeugen.²⁶⁵ Darüber hinaus könnte der natürliche Pool protonierender Enzymen auch deutlich diverser sein als bisher angenommen. So wird zum Beispiel ein analoger Brønsted-Säure-katalysierter Mechanismus bei den Carotenoid-1,2-Hydratase vermutet.²⁸⁴ Deswegen könnte neben Mutationsstrategien auch ein erweiterter natürlicher Enzym-Pool durchforstet werden. Bei all diesen Methoden kann eine Vorselektionierung *in silico* erfolgen. Docking Experimente des Substrates in der reaktiven Konformation und Stabilitätsuntersuchungen der Bindung dieser Konformation mittels molekulardynamischen Simulationen könnten in diesem Zusammenhang genutzt werden (siehe **Abb. 18c**, Seite 59). Bei der bisherigen Substratauswahl wurde die Struktur der reaktiven Konformationen berücksichtigt. Somit wurden Substrate bevorzugt studiert, deren reaktive Konformation „sicher“ in das aktive Zentrum binden kann. Zukünftige Arbeiten sollten darüber hinaus auch untersuchen ob diese reaktive Konformation auch stabil gebunden wird.

Die Verwendung von diverseren Protonase-Bibliotheken wird einen breiteren enzymatischen Zugang zur Brønsted-Säure-Katalyse ermöglichen. Wie in der Einleitung aufgezeigt, können durch Protonierung verschiedener funktioneller Gruppen unterschiedlichste Reaktionen katalysiert werden (**Abb. 31**). Neben der Adressierung weiterer nicht-natürlicher Reaktionen (z. B. Nazarov-Zyklisierung) sind folgende Projekte naheliegend. **(i)** Protonasen ermöglichen die Zyklisierung funktionalisierter isoprenoide Polyene, wobei unterschiedliche Nukleophile in der Termination verwendet werden können. In diesem Zusammenhang könnten in einem nächsten Schritt unterschiedliche Zielsubstrate synthetisiert werden. Spannend wäre zum Beispiel die Darstellung von (+)-Totarol. Dieses Meroterpenoid findet als Bakteriozid Anwendung, wobei es als Naturstoff isoliert wird.²²¹ (+)-Totarol und besonders seine Derivate^{251,252} bilden eine vielversprechende Wirkstoffklasse, deren stereoselektive Synthesen elegant durch Protonasen katalysiert werden könnten. Spannend ist in diesem Zusammenhang auch die regioselektive Zyklisierung polyprenylierter Verbindungen wie zu Beispiel den polyzyklischen polyprenylierten Acylphloroglucine.^{285,286}

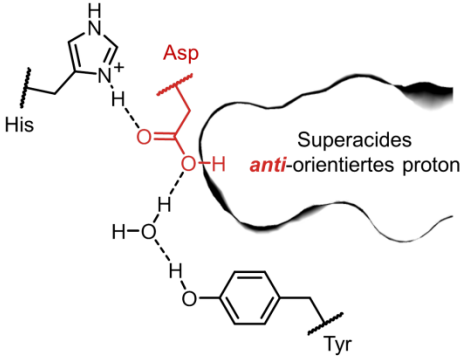



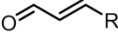

Katalytische Maschinerie	Funktionelle Gruppen	Reaktionsraum (kleine Auswahl)
		<ul style="list-style-type: none"> • Regioselektive Poly- und Monozyklisierungen • Selektive Wagner-Meerwein Umlagerungen
		<ul style="list-style-type: none"> • Epoxidöffnungs-reaktionen • Selektive Semipinacol Umlagerungen
		<ul style="list-style-type: none"> • Prins/En-Reaktionen • Friedel-Crafts Alkylierung
		<ul style="list-style-type: none"> • Michael-Additionen • Nazarov-Zyklisierungen
		<ul style="list-style-type: none"> • Selektive Dehydratisierung • Selektive Pinacol Umlagerungen

Abb. 31: Auswahl an adressierbaren Brønsted-Säure-katalysierten Reaktionen. Das aktive Zentrum der Protonasen kann neben Alkenen, Epoxiden und Carbonylen vermutlich zur Aktivierung weiterer funktioneller Gruppen genutzt werden. Daraus ergibt sich eine enorme Vielfalt an potentiell durchführbaren Reaktionen. Eine kleine Auswahl des möglichen Reaktionsraums ist hier aufgezählt.

(ii) Prins/En-Reaktionen sind in der organischen Chemie weit verbreitet.^{287,288} Das Substratspektrum der Protonase-katalysierten Prins/En-Reaktion sollte in zukünftigen Studien adressiert werden, wobei sich die Reaktionen nicht auf intramolekulare Umsetzungen beschränken müssen. Intermolekulare Reaktionen werden dadurch erschwert, dass zwei Substrate gleichzeitig in einer reaktiven Konformation gebunden werden müssen. Intermolekulare Reaktionen wurden schon als Nebenreaktion bei der *AacSHC*-katalysierten Polyzyklisierung von Farnesol beschrieben (**Tabelle 1**, Zeile 8).¹³⁴ (iii) Die Aktivität für Monozyklisierungen zum Beispiel für Geraniol (**57**) konnte durch die Einführung einer Mutation drastisch gesteigert werden. In einem weiteren Projekt könnte die Protonase-katalysierte Substratbreite für Monozyklisierungen untersucht werden. Neben unterschiedlichen Substraten für Monozyklisierung (Beispiele siehe **Tabelle 2**, Seite 64) ist auch die gezielte Termination der Reaktion (Regioselektive Deprotonierung der Carbokation-Intermediate) ein ansprechendes Ziel. Somit könnte zum Beispiel die stereoselektive Darstellung unterschiedlicher Cyclogeraniol-Isomere ausgehend von der Zyklisierung von Geraniol (**57**) gelingen (α -, β - und γ -Doppelbindungs-Isomere). Diese Doppelbindungs-Isomere sind chirale Bausteine in der Synthese unterschiedlicher Duftstoffe wie Damascone und Ionone.²⁸⁹

Diese ausgewählten Beispiele naheliegender zukünftiger Arbeiten zeigen das enorme Potential der Protonasen als eine neue Klasse von Biokatalysatoren. Dies leistet einen Beitrag zu einer potentiell grüneren Synthese organischer Moleküle. Darüber hinaus ist dies spannend für die Etablierung neuer Biosynthesewege sowie für die Erweiterung der Reaktionsportfolios in der organischen Synthese (Stichwort: chirale Brønsted-Säure-Katalyse in Wasser).

7. MATERIAL UND METHODEN

7.1. Material

7.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Alfa-Aesar (Ward Hill, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH) und Sigma-Aldrich (St. Louis, US). Ein Großteil der verwendeten Substrate wurde chemisch synthetisiert und analysiert (Kapitel 7.6, Seite 117).

7.1.2. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Für die Klonierung der Plasmide wurden Enzyme (*NdeI*, *SacI*, *PfuUltra II Fusion HS*, T4 DNA Ligase) sowie deren zugehörigen Pufferlösungen von Thermo-Scientific (Waltham, US) bezogen.

7.1.3. Molekularbiologische Kits

Für die DNA-Aufreinigung (*Zymoclean DNA Clean & Concentrator Kit*), die DNA-Extraktion aus Agarosegelen (*Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*) sowie die Plasmidpräparation (*ZyppyTM Plasmid Miniprep Kit*) wurden molekularbiologische Kits von Zymo Research (Irvine, US) verwendet.

7.1.4. Primer

Für die ortsspezifische Mutagenese (**Tabelle 6**) sowie die DNA-Sequenzierung (**Tabelle 7**) wurden synthetische Oligonukleotide (Primer) von der Firma Metabion (Martinsried, DE) bezogen.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese.

Nr.	Name/Mutante	Sequenz von 5` - nach -3` (Primer forward / Primer reverse)
1	<i>Aac</i> _PY→H	GCTATCAGAAACTGAGCGTGCATCCGTTTCGCCGCG / CCAGATAAAAATCGCCCGGGAACCCGGTGCCGGTATAATACGG
2	<i>Aac</i> _AS→GF	CCGTATTATACCGGCACCGGTTCCCGGGCGATTTTTATCTGG / CCAGATAAAAATCGCCCGGGAACCCGGTGCCGGTATAATACGG
3	<i>Aac</i> _L36A	GGCTATTGGTGGGGCCCGGCGCTGAGCAACGTG / CACGTTGCTCAGCGCCGGGCCCCACCAATAGCC
4	<i>Aac</i> _L36W	GGCTATTGGTGGGGCCCGTGGCTGAGCAACGTG / CACGTTGCTCAGCCACGGGCCCCACCAATAGCC
5	<i>Aac</i> _W169A	CTGAACATTTATGAATTTGGCAGCGCGGCGCGCG / CGCGCGCCGCGCTGCCAAATTCATAAATGTTTCAG
6	<i>Aac</i> _I261A	CCAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCGCGCAGCCGCCGTGGTT TTATGCG / GCGGCTGCGCGCCGCCCCAGCTGCCATC
7	<i>Aac</i> _I261F	CAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCTTTCAGCCGCCGTGGTTTT ATGCG / GCGGCTGAAAGCCGCCCCAGCTGCCATC
8	<i>Aac</i> _I261G	CAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCGGTCAGCCGCCGTGGTTTT ATGCG / GCGGCTGACCGCCGCCCCAGCTGCCATC
9	<i>Aac</i> _I261L	CAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCCTTCAGCCGCCGTGGTTTT ATGCG / GCGGCTGAAGGCCGCCCCAGCTGCCATC
10	<i>Aac</i> _I261V	CAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCGTTCAGCCGCCGTGGTTTT ATGCG / GCGGCTGAACGCCGCCCCAGCTGCCATC
11	<i>Aac</i> _I261W	CCAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCTGGCAGCCGCCGTGGTTT TATGCG / GCGGCTGCCAGCCGCCCCAGCTGCCATC
12	<i>Aac</i> _S307A	GGCTGGATGTTTCAGGCGGCGATTAGCCCGGTGTGG / CCACACCGGGCTAATCGCCGCCTGAAACATCCAGCC
13	<i>Aac</i> _S307F	GGCTGGATGTTTCAGGCGTTCATTAGCCCGGTGTGG / CCACACCGGGCTAATGAACGCCTGAAACATCCAGCC
14	<i>Aac</i> _W312A	AGCATTAGCCCGGTGGCGGATACCGGCCTGGCG / CGCCAGGCCGGTATCCGCCACCGGGCTAATGCT
15	<i>Aac</i> _F365A	CCGGGCGGCTTTGCGGCGCAGTTTGATAACGTG / CACGTTATCAAACCTGCGCCGCAAAGCCGCCCGG
16	<i>Aac</i> _F365C	CCGGGCGGCTTTGCGTGCCAGTTTGATAACGTG / CACGTTATCAAACCTGGCACGCAAAGCCGCCCGG
17	<i>Aac</i> _F365G	CCGGGCGGCTTTGCGGGCCAGTTTGATAACGTG / CACGTTATCAAACCTGGCCCGCAAAGCCGCCCGG
18	<i>Aac</i> _F365W	CCGGGCGGCTTTGCGTGCCAGTTTGATAACGTG / CACGTTATCAAACCTGCCACGCAAAGCCGCCCGG
19	<i>Aac</i> _Q366A	CCGGGCGGCTTTGCGTTTTGCGTTTTGATAACGTGTATTATCCGG / CCGGATAATACAGTTATCAAACGCAAACGCAAAGCCGCCCGG
20	<i>Aac</i> _Q366F	CCGGGCGGCTTTGCGTTTTTCTTTGATAACGTGTATTATCCGG / CCGGATAATACAGTTATCAAAGAAAAACGCAAAGCCGCCCGG
21	<i>Aac</i> _D376C	AACGTGTATTATCCGGATGTGTGCGATACCGCGGTGGTGG / CCACCACCGCGGTATCGCACACATCCGGATAATACAGTT
22	<i>Aac</i> _A419F	CGGCGGCTGGGGCTTCTATGATGTGGATAACACCAGCG / CGCTGGTGTATCCACATCATAGAAGCCCCAGCCGCCG
23	<i>Aac</i> _A419G	CGGCGGCTGGGGCGGCTATGATGTGGATAACACCAGCG / CGCTGGTGTATCCACATCATAGCCGCCCCAGCCGCCG

7. MATERIAL UND METHODEN

24	<i>Aac_Y420A</i>	GCTGGGGCGCGGCGGATGTGGATAACACCAG / CTGGTGTATCCACATCCGCCGCGCCCCAGC
25	<i>Aac_Y420C</i>	CGGCTGGGGCGCCTGTGATGTGGATAACACC / GGTGTATCCACATCACAGGCGCCCCAGCCG
26	<i>Aac_Y420W</i>	GCTGGGGCGCGTGGGATGTGGATAACACCAG / CTGGTGTATCCACATCCCACGCGCCCCAGC
27	<i>Aac_V448A</i>	CGCCGAGCGAAGATGCGACCGCGCATGTGCTG / CAGCACATGCGCGGTGCGCATCTTCGCTCGGCG
28	<i>Aac_V448F</i>	CGCCGAGCGAAGATTTACCGCGCATGTGCTG / CAGCACATGCGCGGTGAAATCTTCGCTCGGCG
29	<i>Aac_W489A</i>	AGCTGGTTTGGCCGCGCGGGCGTGAACCTATCTG / CAGATAGTTCACGCCCGCGCGGCCAAACCAGCT
30	<i>Aac_G600A</i>	GGATGAACCGTATTATACCGGCACCGCGTTCCCGGGCG / CGCCCGGGAACGCGGTGCCGGTATAATACGGTTCATCC
31	<i>Aac_G600F</i>	GGATGAACCGTATTATACCGGCACCTTCTTCGCGGGCG / CGCCCGGGAAGAAGGTGCCGGTATAATACGGTTCATCC
32	<i>Aac_F601A</i>	CGGCACCGGGGCGCCGGGCGATTTTTATCTG / CAGATAAAAATCGCCCGCGCCCCGGTGCCG
33	<i>Aac_F601W</i>	CGGCACCGGGTGGCCGGGCGATTTTTATCTG / CAGATAAAAATCGCCCGGCCACCCGGTGCCG
34	<i>Aac_F605A</i>	CGGGTTCCCGGGCGATGCGTATCTGGGCTATACC / GGCGATACATGGTATAGCCCAGATACGCATCGCCC
35	<i>Aac_F605W</i>	CGGGTTCCCGGGCGATTGGTATCTGGGCTATACC / GGCGATACATGGTATAGCCCAGATACCAATCGCCC
36	<i>Aac_L607A</i>	GGGTTCCCGGGCGATTTTTATGCGGGCTATACCATGTATC / GATACATGGTATAGCCCGCATAAAAATCGCCCGGGAACCC
37	<i>Aac_L607F</i>	GGGTTCCCGGGCGATTTTTATTTTCGGCTATACCATGTATC / GATACATGGTATAGCCGAAATAAAAATCGCCCGGGAACCC
38	<i>Aac_L607W</i>	GGGTTCCCGGGCGATTTTTATTGGGGCTATACCATGTATC / GATACATGGTATAGCCCAATAAAAATCGCCCGGGAACCC
39	<i>Aac_Y609A</i>	CGGGCGATTTTTATCTGGGCGCGACCATGTATCGC / GCGATACATGGTCCGCGCCAGATAAAAATCGCCCCG
40	<i>Aac_Y609W</i>	CGGGCGATTTTTATCTGGGCTGGACCATGTATCGC / GCGATACATGGTCCAGCCCAGATAAAAATCGCCCCG
41	<i>Zmo1_D439A</i>	GCTATCCCGATACCGCTGATACCGCCGTCG / CGACGGCGGTATCAGCGGTATCGGGATAGC

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer für die Sequenzierung.

Nr.	Name	Sequenz von 5' - nach -3
1	T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
2	<i>AacSHC_InR</i>	CCAGCCACATGCGGGTAAACACGC
3	<i>AacSHC_In</i>	CGCTGAGCATTGTGATGAGCCGC
4	<i>AacSHC_In2</i>	GCGTGAACCTATCTGTATGGCACCGGCG
5	pET RP	GCAATTAACCCTCACTAAAGG
6	<i>ZmoSHC1_In</i>	CCGTGTCTTTACCCGTTATTGGC

7.1.5. Plasmide

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Plasmide verwendet. Neben der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) wurde das verwandte Enzyme aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1) verwendet. Das AacSHC-kodierende Gen wurde freundlicherweise von Michael Breuer (BASF SE, Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt. Im Vergleich zur kristallisierten Variante der AacSHC^{97,107} zeigte die BASF-Variante drei Mutationen (H234Y, G600A, F601S) sowie eine Insertion (P vor H243). Durch ortsspezifische Mutagenese wurde ein Gen erstellt, welches für die kristallisierte Variante der AacSHC kodiert (Uniprot *accession number* P33247). Das resultierende Gen wurde mittels der Schnittstellen *NdeI* und *SacI* in einen pET-22b(+) Vektor kloniert. Das Plasmid für ZmoSHC1 für die SHC aus *Zymomonas mobilis* wurde von Dr. Miriam Seitz²⁴⁸ übernommen (Uniprot *accession number* Q5NM88) und ist ebenfalls in einen pET-22b(+) Vektor kloniert. Standardmäßig wurde der Vektor pET-22b(+) verwendet. Die Transkription erfolgt durch die T7-RNA Polymerase und wird durch den *lac*-Repressor kontrolliert.²⁹⁰ Der Repressor bindet an den *lac*-Operator, welcher sich im Promotorbereich des Zielgens befindet. Die Repression kann durch die Zugabe von IPTG gelöst werden. Außerdem steht die Expression des Zielgens unter Kontrolle des T7*lac*-Promotors, welcher ebenfalls durch den *lac*-Repressor und IPTG kontrolliert wird.²⁹¹ Die für das gewünschte Protein kodierende DNA-Sequenz wurde über die Schnittstellen in der *multiple cloning site* eingebaut. Der Vektor besitzt einen pBR322-Origin und vermittelt eine Ampicillin-Resistenz. Die Gensequenzen sind im Anhang zu dieser Arbeit enthalten (Seite 157), Vektorkarten sind in **Abb. 32** abgebildet und eine Auflistung aller verwendeten Plasmide befindet sich in **Tabelle 8**.

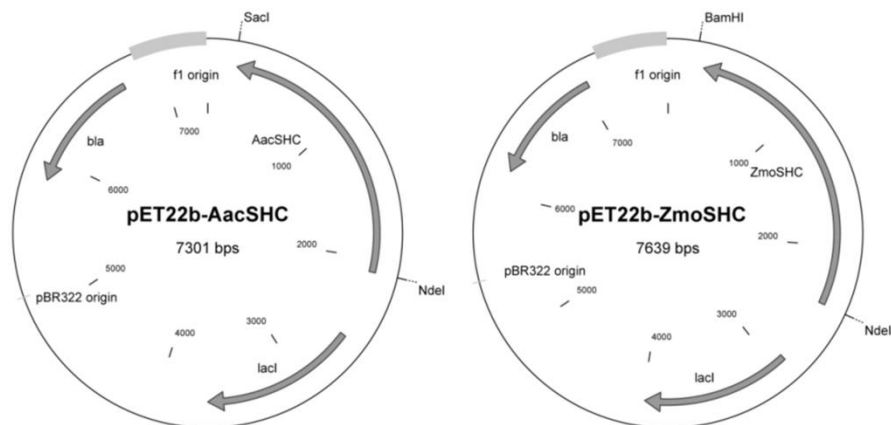


Abb. 32: Vektorkarten der verwendeten Plasmide.

Tabelle 8: pET-22b(+) Plasmide, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

ITB-Nr.	Insert (Uniprot)	Variante	Quelle
pITB1024	<i>AacSHC</i> (P33247)	Wt ¹	Diese Arbeit
pITB1025	<i>AacSHC</i> (P33247)	L36A ¹	A. Marjanovic
pITB1026	<i>AacSHC</i> (P33247)	L36W ¹	A. Marjanovic
pITB1027	<i>AacSHC</i> (P33247)	W169A ¹	A. Marjanovic
pITB1028	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261A ¹	A. Marjanovic
pITB1029	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261F	Diese Arbeit
pITB1030	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261G	Diese Arbeit
pITB1031	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261L	Diese Arbeit
pITB1032	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261V	Diese Arbeit
pITB1033	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261W ¹	A. Marjanovic
pITB1034	<i>AacSHC</i> (P33247)	S307A ¹	A. Marjanovic
pITB1035	<i>AacSHC</i> (P33247)	S307F ¹	A. Marjanovic
pITB1036	<i>AacSHC</i> (P33247)	W312A ¹	A. Marjanovic
pITB1037	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A ¹	C. Geinitz ²
pITB1038	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C ¹	C. Geinitz ²
pITB1039	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365G ¹	C. Geinitz ²
pITB1040	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365W ¹	A. Marjanovic
pITB1041	<i>AacSHC</i> (P33247)	Q366A ¹	A. Marjanovic
pITB1042	<i>AacSHC</i> (P33247)	Q366F ¹	A. Marjanovic
pITB1043	<i>AacSHC</i> (P33247)	D376C ¹	A. Marjanovic
pITB1044	<i>AacSHC</i> (P33247)	A419F ¹	A. Marjanovic
pITB1045	<i>AacSHC</i> (P33247)	A419G ¹	A. Marjanovic
pITB1046	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420A ¹	A. Marjanovic
pITB1047	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420C ¹	Diese Arbeit
pITB1048	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420W ¹	A. Marjanovic
pITB1049	<i>AacSHC</i> (P33247)	V448A ¹	A. Marjanovic
pITB1050	<i>AacSHC</i> (P33247)	V448F ¹	A. Marjanovic
pITB1051	<i>AacSHC</i> (P33247)	W489A ¹	A. Marjanovic
pITB1052	<i>AacSHC</i> (P33247)	G600A ¹	A. Marjanovic
pITB1053	<i>AacSHC</i> (P33247)	G600F ¹	A. Marjanovic
pITB1054	<i>AacSHC</i> (P33247)	F601A ¹	A. Marjanovic
pITB1055	<i>AacSHC</i> (P33247)	F601W ¹	A. Marjanovic
pITB1056	<i>AacSHC</i> (P33247)	F605A ¹	A. Marjanovic
pITB1057	<i>AacSHC</i> (P33247)	F605W ¹	Diese Arbeit

pITB1058	<i>AacSHC</i> (P33247)	L607A ¹	A. Marjanovic
pITB1059	<i>AacSHC</i> (P33247)	L607F ¹	Diese Arbeit
pITB1060	<i>AacSHC</i> (P33247)	L607W ¹	A. Marjanovic
pITB1061	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y609A ¹	A. Marjanovic
pITB1062	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y609W ¹	A. Marjanovic
pITB1063	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/Y420A/G600A	Diese Arbeit
pITB1064	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420A/G600A	Diese Arbeit
pITB1065	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/Y420W/G600A	Diese Arbeit
pITB1066	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/Y420A/G600F	Diese Arbeit
pITB1067	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420A/G600F	Diese Arbeit
pITB1068	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420W/G600A	Diese Arbeit
pITB1069	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/Y420W/G600F	Diese Arbeit
pITB1070	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420W/G600F	Diese Arbeit
pITB1071	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/Y420A/G600A	Diese Arbeit
pITB1072	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/Y420A/G600F	Diese Arbeit
pITB1073	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/Y420W/G600A	Diese Arbeit
pITB1074	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/Y420W/G600F	Diese Arbeit
pITB1075	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/Y420W	Diese Arbeit
pITB1076	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/Y420W	Diese Arbeit
pITB1077	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/G600F	Diese Arbeit
pITB1078	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365A/G600A	Diese Arbeit
pITB1079	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/G600F	Diese Arbeit
pITB1080	<i>AacSHC</i> (P33247)	F365C/G600A	Diese Arbeit
pITB1081	<i>AacSHC</i> (P33247)	I261A/D376C	Diese Arbeit
pITB1082	<i>AacSHC</i> (P33247)	Y420C/D376C	Diese Arbeit
pITB0280	<i>ZmoSHC1</i> (Q5NM88)	Wt	Dr. M. Seitz
pITB1083	<i>ZmoSHC1</i> (Q5NM88)	D439A	Diese Arbeit

¹) Varianten, welche als Bestandteil der Protonase-Bibliothek verwendet wurden.

²) Plasmide wurden von C. Geinitz generiert und vor der Verwendung durch Sequenzierung bestätigt.

7.2. Medien und Zellkulturen

7.2.1. *E. coli* Stämme

Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem *E. coli* Stamm DH5 α . Dieser Stamm besitzt mehrere Eigenschaften, welche ihn für die Plasmidgewinnung auszeichnen. Neben der hohen Replikationsrate besitzt der Stamm eine *recA* Mutation, welche die homologe Rekombination reduziert. Die *endA1* Mutation inaktiviert eine intrazelluläre Endonuklease, welche die Plasmid-DNA während der Präparation verdauen würde. Die *hsdR17* Mutation eliminiert eine Restriktionsendonuklease, die für den Abbau nicht-methylierter DNA verantwortlich ist. Genotyp DH5 α : *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

Für die Proteinexpression wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet. Dem Stamm fehlen die *OmpT*- sowie die *Lon*-Protease, welche das gewünschte Protein während der Isolierung degradieren könnten. Durch den Hte-Phänotyp wird die Transformationseffizienz gesteigert. Genotyp BL21(DE3): F- *ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-)_*(DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]).

7.2.2. Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Als Kulturmedium wurde neben dem LB (*lysogeny broth*)-Medium²⁹² auch TB (*terrific broth*)-Medium²⁹³ verwendet. Das LB-Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl) wurde mit NaOH (10 %-ig) auf pH 7.0 eingestellt. Beide Medien (LB und TB) wurden zur Sterilisation 30 min bei 121 °C und 1.5 bar autoklaviert. Der für das TB-Medium (12 g/L Trypton, 24 g/L Hefe-Extrakt, 4 g/L Glycerin) notwendige Phosphatpuffer (0.17 M KH₂PO₄ und 0.72 M K₂HPO₄) wurde getrennt autoklaviert und anschließend mit dem TB-Medium im Verhältnis 1:10 gemischt. Für LB-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar zugefügt.

7.2.3. Zellwachstum und Dauerkulturen

Flüssigkulturen wurden standardmäßig bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Startkulturen wurden mit einer Kolonie einer LB-Agarose-Platte oder 2 μ L einer Dauerkultur (Glycerin-Stocks) inokuliert. Das Zellwachstum wurde durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum

Medium selektioniert. Die Zelldichte wurde durch eine Absorptionsmessung bei 600 nm (OD_{600}) mittels eines Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) analysiert. Für die Lagerung von *E. coli* Zellkulturen wurden Glycerin-Stocks bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zur Herstellung der Glycerin-Stocks wurde die Flüssigkultur 1:1 mit einer sterilen Glycerinlösung (65 % (v/v) Glycerin, 0.1 M MgSO_4 , 25 mM TRIS·HCl pH 8.0) vermischt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

7.3. Molekularbiologische Methoden

7.3.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) ist eine *in vitro* Methode um DNA-Templates gezielt zu vervielfältigen.^{294–296} Hierzu werden wiederholende Zyklen aus Hitzedenaturierung der DNA, *Annealing* (Primerhybridisierung) und *Elongation* (Amplifikation) genutzt, um das Zielfragment mittels DNA-Polymerase und synthetischer Nukleotide zu synthetisieren. Während der Hitzedenaturierung bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ trennen sich die komplementären DNA-Stränge des Templates. Eine anschließende Abkühlung ermöglicht die Hybridisierung der synthetischen Oligonukleotide. Die *Annealing*-Temperatur ist dabei abhängig vom Schmelzpunkt der Primer. Anschließend wird die Temperatur auf die optimale Temperatur der DNA-Polymerase erhöht und somit werden die Primer von 5' - in 3'-Richtung verlängert bis das DNA-Templat wieder doppelsträngig ist. Anschließend wird der Zyklus beginnend mit der Hitzedenaturierung wiederholt.

7.3.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten bezüglich ihrer Größe. Die negativ geladene DNA wird mittels einer angelegten Spannung durch die Poren einer Agarosegelmatrix transportiert, wobei kleinere Fragmente eine höhere Mobilität aufzeigen. Mit TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat, 10 mM EDTA, pH 8.5) überschichtete Agarosegele (1 % (w/v) in TAE-Puffer, 0.1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ GelRed) wurden für die Elektrophorese verwendet. Die jeweiligen Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit DNA-Probenpuffer (GelPilot DNA Loading Dye 5 \times , Qiagen, Hilden, DE) homogenisiert. Als

Standard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0333, Fermentas, St. Leon-Rot, DE) verwendet.

7.3.3. Klonierung von Plasmiden

Die Klonierung beschreibt molekularbiologische Methoden zur identischen Vervielfältigung von DNA. Durch den Einbau eines DNA-Fragments in einen Vektor (z. B. ein Plasmid) kann dieses Fragment *in vivo* reproduziert werden. Bestandteil der Plasmid-Klonierung von DNA-Fragmenten ist die Restriktion, die Ligation, die Transformation sowie die Plasmidpräparation. Der erste Schritt ist ein Restriktionsverdau des gewünschten DNA-Fragments (z. B. aus der PCR) und des Vektors. Das Restriktionsenzym erzeugt komplementäre Enden an Vektor und amplifizierter DNA. Nach Aufreinigung des Vektors sowie der amplifizierten DNA werden die hybridisierten Fragmente mittels DNA-Ligase kovalent verknüpft. Mit diesem Konstrukt werden kompetente Bakterienzellen transformiert. Aus kultivierten Kolonien können größere Mengen des erzeugten Konstrukts (Plasmids) isoliert werden.

7.3.4. Hydrolytische Spaltung von DNA

Die spezifische, hydrolytische Spaltung von Phosphodiesterbindungen der DNA wird als Restriktion oder Restriktionsverdau bezeichnet. Besonders geeignet sind hierfür Restriktionsendonukleasen, welche bestimmte palindromische Tetra- oder Hexanukleotidsequenzen erkennen und diese hydrolytisch spalten. Abhängig von der jeweiligen Endonuklease entstehen Schnittstellen mit vollständig gepaarten Basen (*blunt ends*) oder mit überhängenden Einzelsträngen (*sticky ends*). Für den präparativen Restriktionsverdau wurden die entsprechenden Enzyme im jeweiligen Puffer mit der DNA vorsichtig durchmischt und bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme hitzeinaktiviert.

7.3.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Um die Anzahl an positiven Transformanden während der Ligation zu erhöhen, wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt. Hierzu wurde die Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Maßstab durchgeführt. Anschließend wurden die gewünschten Banden aus dem Gel geschnitten und die DNA aus der Gelmatrix isoliert (*Zymoclean Gel DNA recovery kit*). Die Ligation zwischen den beiden aufgereinigten Fragmenten (Vektorfragment und gewünschtes Gen) wurde

mit der T4-DNA-Ligase (Thermo-Scientific, Waltham, US) durchgeführt. Diese katalysiert ATP-abhängig die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat und der 3'-OH Gruppe. Für die Ligation wurden 15 fmol des Vektorfragments mit der dreifachen Menge des gewünschten Inserts versetzt. Durch vorsichtiges Mischen der T4-DNA-Ligase (1 μ L, 20 U/ μ L), dem entsprechenden Puffer (2 μ L, 10 \times) und bidest. H₂O wurde ein 20 μ L Ansatz angesetzt. Die Mischung wurde eine Stunde bei 22 °C inkubiert und anschließend in chemisch kompetente Zellen transformiert.

7.3.6. Transformation von Plasmid-DNA

In der Mikro-, Zell- und Molekularbiologie beschreibt die Transformation die Aufnahme von extrazellulärer (freier) DNA in kompetente Bakterienzellen. Während viele Bakterien Mechanismen für eine natürliche Kompetenz besitzen,²⁹⁷ ist *E. coli* nicht in der Lage extrazelluläre DNA aufzunehmen. Im Labor können jedoch *E. coli* Zellen mit artifizieller Kompetenz erzeugt werden. Bei einer der gebräuchlichsten Methoden werden chemisch kompetente Zellen verwendet, welche bei einem Hitzeschock die Aufnahme von extrazellulärer DNA erlauben.²⁹⁸ Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid- sowie der Calciumchlorid-Methode hergestellt.^{298,299} Für den Hitzeschock wurden 50 μ L chemisch kompetenter Zellen mit 2 μ L DNA-Lösung 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 950 μ L LB-Medium wurden die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert, auf Selektiv-Medium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C gelagert.

7.3.7. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (Rubidiumchlorid) erfolgte nach einem Standardprotokoll.³⁰⁰ Hierzu wurden 100 mL LB-Medium mit den jeweiligen *E. coli* Zellen (BL21(DE3) oder DH5 α) inokuliert und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0.5 wurden die Zellen mit Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (4 °C, 10 min, 4000 UpM). Das Zellpellet wurde in 40 mL TbfI-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 4000 UpM). Nach wiederholtem Resuspendieren des Pellets in 5 mL TbfII-Puffer wurden die Zellen 15 min bei 0 °C

gelagert, in 100 µL-Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

TbfI-Puffer: 30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, Essigsäure (1M, zum Einstellen auf pH 5.8).

TbfII-Puffer: 100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, 1 M Kaliumhydroxid (zum Einstellen auf pH 6.5).

7.3.8. Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Sequenzierung

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurde das ZyppyTM Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, US) verwendet. Dieses Kit beruht auf der selektiven alkalischen Denaturierung zur Abtrennung von chromosomaler DNA.³⁰¹ Die Isolierung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers mittels pH- und salzabhängiger Bindung von Plasmid-DNA an eine Matrix. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem Nanodrop 1000 (Agilent, Santa Clara, US). Für die Sequenzierung wurden ungefähr 600 ng Plasmid-DNA an GATC Biotech (Konstanz, DE) versendet. Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind in Kapitel 7.1.4 beschrieben. Die Sequenzierung erfolgte durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger³⁰² in Gegenwart fluoreszenz-markierter ddNTPs.

7.3.9. Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht den Austausch einzelner Aminosäuren durch die gezielte Änderung der DNA-Sequenz des Gens.^{303,304} Der *in vitro* Austausch von Nukleinbasen an gezielten Stellen in der Plasmid-DNA kann im Wesentlichen in zwei Schritte unterteilt werden. Der erste Schritt ist die Amplifizierung der Plasmid-DNA unter Anwendung der PCR. Hierfür werden zum DNA-Abschnitt komplementäre Primer verwendet, welche die gewünschte Mutation besitzen. Während der Elongation werden die Primer durch die DNA-Polymerase erweitert, wodurch mutierte Plasmid-DNA mit zwei Einzelstrangbrüchen entsteht. Somit werden während der Amplifikation der DNA synthetische Primer mit der gewünschten Mutation in das Plasmid eingebaut. Der zweite Schritt beinhaltet den Verdau von methylierter Templat-DNA durch *DpnI*, ein Restriktionsenzym das spezifisch methylierte DNA schneidet. Dieser Verdau ist

notwendig, um noch vorhandene parentale Plasmid-DNA abzubauen. Die Ligation der Einzelstrangbrüche erfolgt *in vivo* in den *E. coli* Zellen nach der Transformation (Kapitel 7.3.6). Für die Mutagenese-PCR wurde die *PfuUltra* II Fusion HS Polymerase verwendet (Thermo-Scientific, Waltham, US). Andere getestete Polymerasen zeigten bei den relativ großen Genen den Einbau von unerwünschten Punktmutationen. Die Durchführung erfolgte analog **Tabelle 9** und **Tabelle 10**. Das Design der Primer sowie der *DpnI*-Verdau erfolgte nach dem Standardprotokoll des *QuickChange*[®] *site-directed mutagenesis kit* (Stratagene). Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 6** aufgelistet.

Tabelle 9: PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese.

Substanz	Volumen / μL	Endkonzentration
ddH ₂ O	38.75	
PfuUltra II Fusion Buffer (10 \times)	5	1 \times
dNTPs (10 mM pro NTP)	1.25	250 μM (pro NTP)
DNA-Templat	2	0.5 - 5 ng/ μL
Primer <i>forward</i>	1	0.2 μM
Primer <i>reverse</i>	1	0.2 μM
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS Polymerase	1	

Tabelle 10: Typisches Temperaturprofil der Mutagenese-PCR.

Schritt	Temperatur / $^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 s	
Hybridisierung ^a	55-60	30-60 s	22
Elongation ^b	72	30s / kb	
Finale Elongation	72	7 min	1

^{a)} Die Temperatur bei der Hybridisierung ist abhängig von den jeweiligen Primern.

^{b)} Die Elongationszeit ist abhängig vom jeweiligen DNA-Templat.

7.4. Proteinbiochemische Methoden

7.4.1. Proteinexpression

Zur Expression der jeweiligen Gene wurde die entsprechenden Vektoren (**Tabelle 8**, Seite 102) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(*DE3*) transformiert und als Glycerin-*Stocks* gelagert. Zwei unterschiedliche Methoden für die Expression der Gene wurden entwickelt. Neben der IPTG-Induktion wurde auch die Autoinduktion als Expressionsmethode genutzt.^{214,290,291,305} Die Zugabe von IPTG aktiviert die Expression der T7 RNA-Polymerase im modifizierten *E. coli* Genom von BL21(*DE3*). Die T7 RNA-Polymerase ist für die Transkription des Zielgens auf dem Plasmid notwendig. Das Zielgen selbst wird auch durch ein IPTG-kontrolliertes *lac*-Repressor System kontrolliert. Im Gegensatz zur kontrollierten Induktion durch IPTG-Zugabe, verläuft die Autoinduktion selbstständig durch die Änderung des Metabolismus von *E. coli* bei Nährstoffmangel. Bei Verbrauch der Glucose im Nährmedium wird vorhandene Lactose metabolisiert, welche im ersten Schritt durch β -Galactosidase zur Allolactose umgesetzt wird. Allolactose ist der natürliche Induktor und aktiviert somit die Expression durch Bindung an den *lac*-Repressor. Dies ermöglicht die Synthese der T7 RNA-Polymerase sowie des Zielproteins.

Für die IPTG-Induktion wurde eine 5 mL Vorkultur (LB-Medium, 100 μ g/mL Ampicillin) mit 5 μ L des Glycerin-*stocks* inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 4 mL dieser Übernachtskultur wurden 500 mL LB-Medium (100 μ g/mL Ampicillin) inokuliert ($OD_{600} \sim 0.05$). Das Zellwachstum erfolgte in 2 L-Erlenmeyerkolben (mit Schikane) bei 37 °C und 120 UpM. Bei einer Zelldichte von OD_{600} 0.5 bis 0.7 wurden durch Zugabe von IPTG induziert (1 mM). Nach 4 h bei 30 °C wurden die Zellsuspension zentrifugiert (16.900 \times g, 14 min, 4 °C), das Zellpellet mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -78 °C gelagert.

Die Autoinduktion erfolgte analog zur IPTG-Induktion, jedoch wurden 500 mL TB-Medium (Kapitel 7.2.2) als Nährmedium verwendet. Dieses wurde mit 4 mL der Übernachtskultur inokuliert und für 18 h bei 37 °C und 120 UpM inkubiert. Analog zur IPTG-Induktion wurden die Zellen zentrifugiert, eingefroren und bis zur Verwendung bei -78 °C gelagert.

7.4.2. Proteinaufreinigung

SHCs binden monotopisch an die Zellmembran. Dies bedeutet, dass sie nicht die Zellwand durchspannen, sondern lediglich mit einem Teil in die Membran binden. Im Falle der SHCs wird

vermutet, dass eine α -Helix im Bereich des Substrateingangskanals in der Zellmembran verankert ist.^{97,107,108} Daher befinden sich diese Enzyme nach dem Zellaufschluss nicht im Zytosol, sondern binden an die Zellwandfragmente. Mittels wässrigen Detergenzienlösungen können die Enzyme in Lösung gebracht und *in vitro* studiert werden. Als Detergenzien wurden in dieser Arbeit ausschließlich Triton X-100 und CHAPS verwendet. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergens, welches aus einem *p-tert*-Octylphenol-Derivat mit einer Polyethylenglycol-Seitenkette besteht. Die Molekülmischung besitzt im Durchschnitt 9-10 Ethylenoxid-Einheiten in der Seitenkette und besitzt eine kritische Mizellenkonzentration (CMC) von ~0.2 % (w/v).³⁰⁶ Die kritische Mizellenkonzentration beschreibt die Konzentration eines Tensids, ab der sich definierte Mizellen bilden. CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) ist ein zwitterionisches Detergens und besitzt eine CMC von ~0.5 % (w/v).³⁰⁷ Während CHAPS-Mizellen als klein (Aggregation von 10 Molekülen) und dynamisch beschrieben werden, gelten Mizellen von Triton X-100 als relativ wenig dynamisch. So lässt sich Triton X-100, dessen Mizellen sich aus über 100 Molekülen zusammensetzen, nur sehr schwer dialysieren.

Abhängig von der SHC, dem Experiment und der Reaktivität des eingesetzten Substrates wurde die Enzympräparationen auf verschiedenen Wegen durchgeführt (**Abb. 33**). Im Allgemeinen wurden die eingefrorenen Zellen in einem Lysepuffer (3 mL pro Gramm Zellpellet) suspendiert und mittels eines Gewebehomogenisators (Radnor, PA, USA) homogenisiert. Der Aufschluss erfolgte durch zweimalige Behandlung mit einem Hochdruckhomogenisator (EmulsiFlex-C5, Avestin, Ottawa, CAN). Die resultierende Suspension wurde zentrifugiert (38700 × g, 45 min, 4 °C), das Pellet mit Waschpuffer (3 mL pro Gramm Zellpellet) gewaschen, erneut zentrifugiert (38700 × g, 45 min, 4 °C) und das daraus resultierende Pellet mit Solubilisationspuffer resuspendiert (1 mL pro Gramm Zellpellet). Der Solubilisationspuffer enthielt entweder Triton X-100 oder CHAPS als Detergens um die Membran-assoziierte SHC in Lösung zu bekommen. Diese Suspension wurde entweder mind. 1 h oder maximal über Nacht inkubiert und anschließend zentrifugiert (38700 × g, 45 min, 4 °C). Die überstehende Lösung wurde im Fall der *ZmoSHC1* direkt für Biotransformationen verwendet. Im Fall der *AacSHC* wurden geringe Mengen an *E. coli* Protein durch einen Hitzeschock (15 min bei 50 °C) präzipitiert und durch Zentrifugation (38700 × g, 45 min, 4 °C) abgetrennt. Enzympräparationen der *AacSHC* wurden an dieser Stelle für Biotransformationen verwendet oder bei Bedarf weiter aufgereinigt.

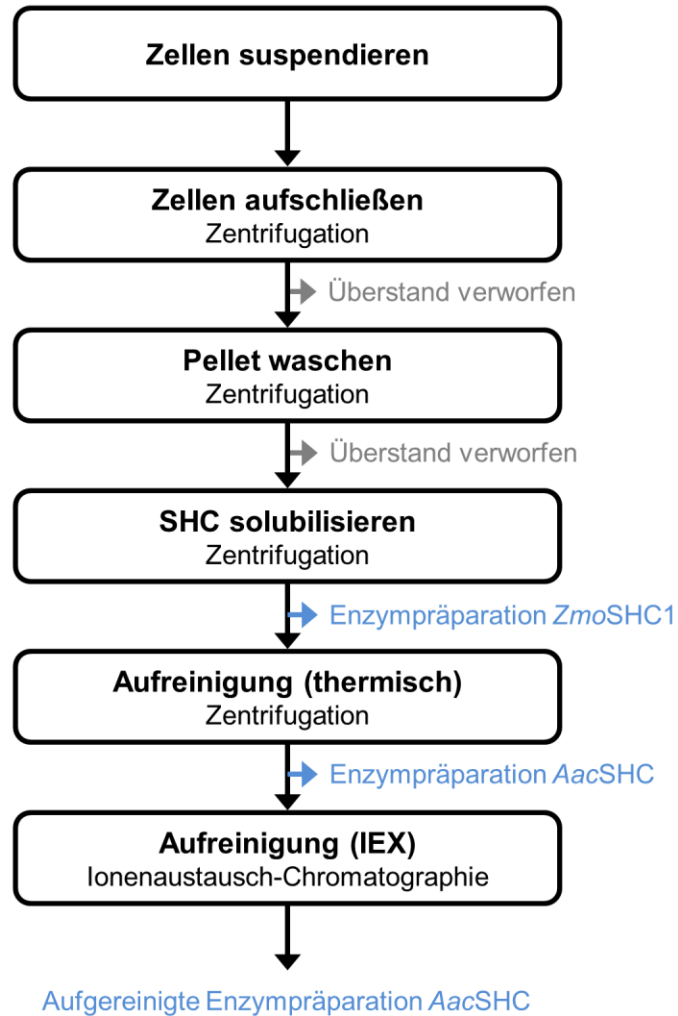


Abb. 33: Schematische Darstellung der etablierten Enzympräparation von *AacSHC* sowie *ZmoSHC1*.

Mittels Ionenaustauschchromatographie (Diethylaminoethyl-Sephacel[®], Sigma Aldrich, St. Louis, US) konnten weitere Verunreinigungen abgetrennt werden. Hierzu wurde die Enzympräparation 1:5 mit ddH₂O verdünnt (~ 12 mM Natriumcitrat als finale Konzentration) und an die Anionenaustausch-Matrix gebunden. Anschließend wurde die Matrix mit einem IEX-Waschpuffer gewaschen (2 Säulenvolumen) und die *AacSHC* mit dem IEX-Elutionspuffer eluiert und die Säule mit dem Regenerationspuffer regeneriert. Die Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie sowie alle anderen verwendeten Enzympräparationen wurden durch SDS-PAGE (Kapitel 7.4.3) und die Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford (Kapitel 7.4.4) analysiert. Alle hergestellten Enzympräparationen wurden auf Eis gelagert und zeigten eine hohe Stabilität mit nur einem minimalen Aktivitätsverlust innerhalb von Wochen bis Monaten.

Lysepuffer: 200 mM Natriumcitrat, 1 mM PMSF, DNase, pH 6.0.

Waschpuffer: 60 mM Natriumcitrat, pH 6.0.

Solubilisationspuffer: 60 mM Natriumcitrat, 1 % (w/v) Detergens, pH 6.0.

IEX-Waschpuffer: 12 mM Natriumcitrat, 0.2 % (w/v) Detergens, pH 6.0.

IEX-Elutionspuffer: 12 mM Natriumcitrat, 0.2 % (w/v) Detergens, 200 mM NaCl, pH 6.0.

IEX-Regenerationspuffer: 12 mM Natriumcitrat, 0.2 % (w/v) Detergens, 1 M NaCl, pH 6.0.

7.4.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis*, SDS-PAGE) wurde zur qualitativen Analyse der Proteinlösungen angewendet.^{308,309} Die Zugabe von überschüssigem SDS zu Proteinlösungen führt zur Denaturierung der Proteine. Die Anwesenheit von β -Mercaptoethanol im Probenpuffer dient der Reduktion von Disulfidbrücken im Protein. Die proportionale Anlagerung von negativ-geladenem SDS an die Aminosäureketten führt zu einem Zusammenhang zwischen Proteinladung und Proteingröße. Proteingemische können somit im elektrischen Feld aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität in einer Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Auftrennung in der SDS-PAGE wird durch ein diskontinuierliches Verfahren erzielt. Die Proteine wandern zuerst in einem Sammelgel mit neutralem pH-Wert und werden anschließend in einem feinporigeren Trenngel mit basischen pH-Wert aufgetrennt. Im Sammelgel orientieren sich die Proteine in einer scharfen Bande zwischen den schnellen Chlorid-Ionen und den langsameren Glycinat-Ionen. Durch das Konzentrieren der Proteine in einer scharfen Bande besitzen alle zu trennenden Moleküle den gleichen Startpunkt beim Übergang in das feinporige Trenngel. Durch die pH-Wert Änderung im Trenngel wird das Glycinat bevorzugt deprotoniert und wandert nun als schnelles Ion zusammen mit dem Chlorid vor den Proteinen durch die Gelmatrix. Die Proteine bewegen sich im Gel annähernd proportional zu ihrer Größe.

Für die Elektrophorese wurden Polyacrylamidgele nach Laemmli³⁰⁹ entsprechend eines Standardwerks³¹⁰ hergestellt. Die radikalische Polymerisation von Acrylamid und dem Quervernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid (Rotiphorese[®] 30) wurde analog der Vorschrift mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet und durch TEMED katalysiert. Es wurden Gele mit

einem Acrylamidgehalt von 10 % im Trenngel und 4 % im Sammelgel verwendet. Das fertige Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur (Mini-Vertical Unit SE250, Hoefer, Holliston) eingebaut und mit Laufpuffer überschichtet. Probelösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit dem SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Abhängig von der Probenkonzentration wurden 1 bis 20 µL der Probe direkt in die Taschen des Gels pipettiert. Als Vergleich dienten 5 µL eines Molekulargewichtstandards (PageRuler™, #SM0661, Fermentas, St. Louis, US). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel eingefärbt. Dazu wurde es zuerst in Färbelösung und anschließend in Entfärbelösung inkubiert. Die Einwirkzeit wurde durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle minimiert.

Sammelgel-Puffer: 1 M TRIS·HCl, pH 6.8, 0.7 % (w/v) SDS

Trenngel-Puffer: 1.5 M TRIS·HCl, pH 8.8, 0.38 % (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer: 100 mM TRIS·HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 4 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) Glycerin, 0.01 % (w/v) Bromphenolblau.

10× Elektrophoresepuffer: 0.25 M TRIS·HCl, 1.92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS.

Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250, 10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 60 % ddH₂O.

Entfärbelösung: 10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 60 % ddH₂O.

7.4.4. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die kolorimetrische Bestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliantblau an Proteine und der damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm.³¹¹ Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration der Probe. Als Reagenz wurde die Bradford Ultra Lösung von Expedeon (Harston, UK) verwendet, welche die Protein-Konzentrationsbestimmung in Gegenwart von bis zu 1 % Detergens ermöglicht. Kalibriergeraden wurden mit BSA (Bovines Serumalbumin) im Bereich 0.0 bis 0.4 mg/mL erstellt. Die Proben wurden dementsprechend verdünnt.

7.5. Chemisch-analytische Methoden

7.5.1. Gaschromatographie

Für die Gaschromatographie wurde eine Shimadzu GC-2010 (Kyōto, JP) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) und einer DB-5 Kapillarsäule (30 m × 250 μm × 0.25 μm, Agilent, Santa Clara, US) verwendet. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s. Des Weiteren wurde ein Agilent 7890A GC/MS (Santa Clara, US) mit einem kombinierten Flammenionisationsdetektor sowie einem massenselektivem Detektor (Agilent 5975 Series MSD, Santa Clara, US) genutzt. Die parallele Analyse mit beiden Detektoren erfolgte über die Teilung des Gasflusses direkt nach der Trennung in der Kapillarsäule (HP-5MS, 30 m × 250 μm × 0.25 μm, Agilent, Santa Clara, US). Helium wurde bei diesem System als Trägergas verwendet (konstanter Druck 17.937 psi). Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 250 °C, Injektionsvolumen 1 μL, Split-Verhältnis 5:1 sowie einer FID-Temperatur von 320 °C. Quantifizierungen wurden mit 1-Decanol als internen Standard durchgeführt.

Die entwickelten Methoden wurden an beiden Gaschromatographen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Analysen mit einer Standard-Methode mit folgendem Temperaturprogramm analysiert: 50 °C (3 min), Erhitzen auf 120 °C (6 °C/min), Erhitzen auf 150 °C (10 °C/min), Erhitzen auf 170 °C (15 °C/min), Erhitzen auf 200 °C (20 °C/min), Erhitzen auf 250 °C (25 °C/min) und Erhitzen auf 310 °C (30 °C/min) mit einer Haltezeit von 5 min.

Für die GC-Analyse von Squalen (**1**) und den Reaktionsprodukten der enzymatischen Umsetzungen wurde eine Methode mit folgendem Temperaturprofil verwendet: 120 °C (3 min) und Erhitzen auf 320 °C (30 °C/min) mit einer Haltezeit von 15 min.

Die chirale GC-Analyse von 6,7-Epoxygeraniol (**65**) wurde mit einer Hydrodex β-TBDAC Kapillarsäule (25 m × 250 μm × 0.25 μm, Macherey-Nagel, Düren, DE) am Shimadzu GC-2010 durchgeführt. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 200 °C, Injektionsvolumen 1 μL, Split-Verhältnis 5:1 sowie einer FID-Temperatur von 300 °C. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 110 °C (3 min), Erhitzen auf 160 °C (2 °C/min) und Erhitzen auf 230 °C (40 °C/min) mit einer Haltezeit von 8 min.

Die chirale GC-Analyse von *cis*-2-Hydroxy-γ-cyclogeraniol (**67**) wurde mit einer ChiraSil-Dex CB Kapillarsäule (25 m × 250 μm × 0.25 μm, Agilent, Santa Clara, US) am Shimadzu GC-2010

durchgeführt. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 200 °C, Injektionsvolumen 1 µL, Split-Verhältnis 25:1 sowie einer FID-Temperatur von 300 °C. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 155 °C (3 min), Erhitzen auf 180 °C (1.5 °C/min) und Erhitzen auf 220 °C (40 °C/min) mit einer Haltezeit von 3 min.

Die chirale GC-Analyse von γ -Cyclogeraniol (**52**) wurde mit einer Hydrodex β -6TBDM Kapillarsäule (25 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, Macherey-Nagel, Düren, DE) am Shimadzu GC-2010 durchgeführt. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 200 °C, Injektionsvolumen 1 µL, Split-Verhältnis 25:1 sowie einer FID-Temperatur von 300 °C. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 75 °C (1 min), Erhitzen auf 94 °C (0.5 °C/min) und Erhitzen auf 245 °C (40 °C/min) mit einer Haltezeit von 5 min.

7.5.2. Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Zur Charakterisierung der synthetisierten Moleküle wurde die NMR-Spektroskopie genutzt. ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 500.15 und 125.76 MHz vermessen. Die chemische Verschiebung (δ) in *parts per million* (ppm) wurde bezogen auf den Standard Tetramethylsilane ($\delta=0$ ppm). Zur Zuordnung komplexerer Signale wurden 2D-NMR-Methoden verwendet. Neben dem $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (*Correlated Spectroscopy*)-Experiment wurden $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)- sowie $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*)-Experimente durchgeführt.

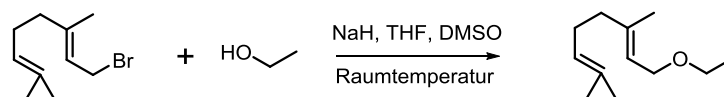
7.5.3. Weitere Methoden

IR-Spektren wurden an einem Bruker Vector 22 FT-IR *Spectrometer* aufgenommen. Die Proben wurden entweder als Flüssigkeitsfilm zwischen zwei Natriumchloridplatten oder als Kaliumbromid-Pressling analysiert. Die Messwerte sind in der Wellenzahl (cm^{-1}) angegeben. Hochauflösende Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT 95 bestimmt. Die Drehwertbestimmung erfolgte an einem Perkin Elmer Model 341.

7.6. Chemische Synthesen

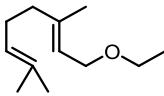
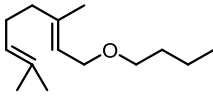
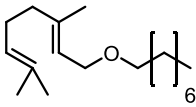
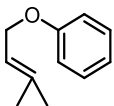
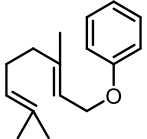
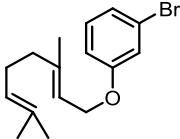
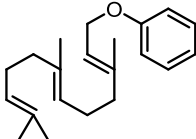
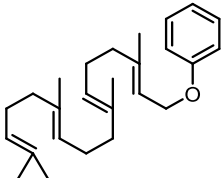
7.6.1. Synthese verschiedener prenylierter Alkohole

Durch die Williamson-Ethersynthese wurde verschiedene Alkohole prenyliert. Somit konnten unterschiedliche Prenyl-, Geranyl-, Farnesyl- und Geranylgeranylether als Substrate synthetisiert werden. Eine allgemeine Synthesevorschrift ist anhand der Darstellung des Geranylethylethers (**53**) beschrieben. Die weiteren Synthesen sind in **Tabelle 11** dargestellt.



Die Synthese erfolgte in einer angepassten Form nach Nakamura *et al.*³¹² Natriumhydrid (60 %ige Dispersion, 0.352 g, 8.8 mmol, 1.1 eq) wurden in wasserfreiem THF (20 mL) vorgelegt. Anschließend wurde eine Mischung aus Ethanol (0.37 g, 8.0 mmol, 1.0 eq) und wasserfreiem THF (5 mL) innerhalb von 5 min zugetropft. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde eine Lösung aus Geranyl bromid (1.39 g, 6.4 mmol, 0.8 eq) in wasserfreiem DMSO (5 mL) innerhalb von 5 min zugegeben und die Mischung für 20 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Eiswasser hydrolysiert und dreimal mit Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Dichlormethan 2:1) aufgereinigt. Es wurde der Geranylethylether (**52**) (0.29 g, 1.6 mmol, 25 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. *R_f* = 0.4 (*n*-Hexan:Dichlormethan 1:1). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.36 (t, *J* = 6.45 Hz, 1H), 5.10 (t, *J* = 6.74 Hz, 1H), 3.98 (d, *J* = 6.50 Hz, 2H), 3.48 (q, *J* = 6.90 Hz, 2H), 2.10 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 139.8, 131.6, 124.1, 121.0, 67.1, 65.4, 39.6, 26.4, 25.7, 17.7, 16.4, 15.3. HREIMS *m/z* 182.1666 (berechnet für C₁₂H₂₂O⁺ 182.1665).

Tabelle 11: Mit Williamson-Ethersynthese hergestellte prenylierte Alkohole.

Produkt	Masse / g	Ausbeute / %	Herkunft	
	Geranylethylether (53)	0.29	25	Diese Arbeit
	Geranylbutylether (54)	0.73	39	Diese Arbeit
	Geranyloctylether (55)	0.81	47	Diese Arbeit
	Prenylphenylether	1,30	65	J. Dominicus ²¹⁷
	Geranylphenylether (36)	1,50	70	J. Dominicus ²¹⁷
	Geranyl-3-bromophenylether (37)	1.80	67	Diese Arbeit
	Farnesylphenylether (38)	0,54	43	J. Dominicus ²¹⁷
	Geranylgeranylphenylether (39)	0,19	77	J. Dominicus ²¹⁷

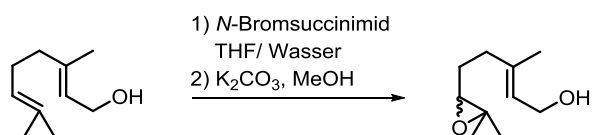
Geranylbutylether (54): Säulenchromatographie: *n*-Hexan:Dichlormethan 1.5:1. Es wurde Geranylbutylether (0.73 g, 3.5 mmol, 39 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. $R_f = 0.35$ (*n*-Hexan:Dichlormethan 1.5:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 5.35 (t, $J = 6.47$ Hz, 1H), 5.10 (t, $J = 6.47$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 6.70$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.71$ Hz, 2H), 2.10 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.57 (quin, $J = 6.85$ Hz, 2H), 1.38 (sex, $J = 6.75$ Hz, 2H), 0.91 (t, $J = 7.39$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 139.8, 131.6, 124.1, 121.1, 70.0, 67.3, 39.6, 31.9, 26.4, 25.7, 19.4, 17.7, 16.5, 14.0.

Geranyloctylether (55): Säulenchromatographie: *n*-Hexan:Dichlormethan 2:1. Es wurde Geranyloctylether (0.81 g, 3.0 mmol, 47 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. $R_f = 0.3$ (*n*-Hexan:Dichlormethan 2:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 5.35 (t, $J = 6.40$ Hz, 1H), 5.10 (t, $J = 6.70$ Hz, 1H), 3.97 (d, $J = 6.67$ Hz, 2H), 3.40 (t, $J = 6.67$ Hz, 2H), 2.10 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.56 (m, 2H), 1.28 (m, 10H), 0.88 (t, $J = 6.94$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 139.7, 131.6, 124.1, 121.1, 70.3, 67.3, 39.6, 31.8, 29.8, 29.5, 29.3, 26.4, 26.3, 25.7, 22.7, 17.7, 16.5, 14.4. HREIMS m/z 266.2614 (berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}^+$ 266.2604).

Geranyl-3-bromophenylether (37): Säulenchromatographie: *n*-Hexan:Dichlormethan 5:1. Es wurde Geranyl-3-bromophenylether (1.80 g, 5.8 mmol, 67 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. $R_f = 0.45$ (*n*-Hexan:Dichlormethan 5:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.12 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.07 (m, 2H), 6.84 (dd, $J = 0.88$ und 8.02 Hz, 1H), 5.45 (t, $J = 6.34$ Hz, 1H), 5.09 (t, $J = 6.72$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 6.53$ Hz, 2H), 2.12 (m, 2H), 2.09 (m, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.61 (s, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 159.7, 141.7, 131.9, 130.5, 123.7, 123.6, 122.7, 118.9, 117.9, 113.8, 65.1, 39.5, 26.3, 25.7, 17.7, 16.7.

7.6.2. Synthese weiterer Substrate

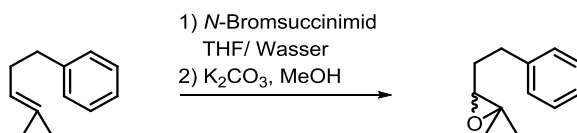
6,7-Epoxygeraniol (65)



Die Synthese erfolgte nach Tsangarakis *et al.*³¹³ Geraniol (2 g, 13.0 mmol) wurden in einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Wasser (5:1, 30 mL) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (2.88 g, 16.2 mmol) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt (Reaktionskontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie). Anschließend wurden Diethylether (20 mL) und gesättigte Natriumchlorid-Lösung (20 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von Kaliumcarbonat (2.15 g, 15.6 mmol) wurde die Mischung

20 min bei Raumtemperatur gerührt und danach das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat (35 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gelöst und extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylacetat 1:2) aufgereinigt. Es wurde 6,7-Epoxygeraniol (**65**) (0.91 g, 5.3 mmol, 41 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. $R_f = 0.35$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 1:2). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.46 (dt, $J = 1.0$ Hz, 6.9 Hz, 1H), 4.16 (d, $J = 6.75$ Hz, 2H), 2.71 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 2.11-2.24 (m, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.64-1.70 (m, 2H), 1.31 (s, 3H), 1.27 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 138.6, 124.0, 64.0, 59.3, 58.4, 36.2, 27.2, 24.9, 18.8, 16.3. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^{313,314} HREIMS m/z 170.1306 (berechnet für C₁₀H₁₈O₂⁺ 170.13013).

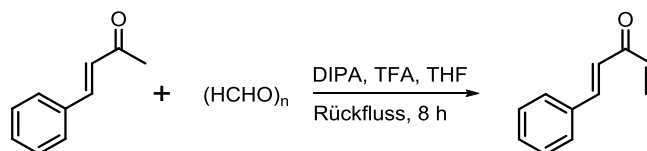
1-Phenyl-4-methyl-3,4-epoxypentan (**66**)



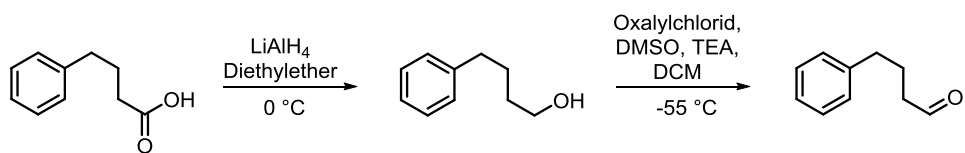
Die Synthese erfolgte nach einer abgewandelten Vorschrift von Tsangarakis *et al.*³¹³ 1-Phenyl-4-methylpent-3-en (1.03 g, 6.4 mmol) wurde in einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Wasser (5:1, 20 mL) gelöst und *N*-Bromsuccinimid (1.44 g, 8.1 mmol) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt (Reaktionskontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie). Anschließend wurden Diethylether (50 mL) und gesättigte Natriumchlorid-Lösung (50 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde in Methanol (30 mL) aufgenommen. Nach Zugabe von Kaliumcarbonat (1.1 g, 7.96 mmol) wurde die Mischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt und danach das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit Ethylacetat (35 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) gelöst und extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylacetat 25:1) aufgereinigt. Es wurde 1-Phenyl-4-methyl-3,4-epoxypentan (**66**) (0.67 g, 3.8 mmol, 59 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. $R_f = 0.25$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 25:1). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.29 (m, 2H), 7.20 (m, 3H), 2.84 (m, 1H), 2.77 (m, 1H), 2.71 (m, 1H), 1.90 (m,

1H), 1.80 (m, 1H), 1.27 (s, 3H), 1.12 (s, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 141.4, 128.5 (2 \times), 128.4 (2 \times), 126.0, 63.9, 58.6, 32.8, 30.8, 24.8, 18.6. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^{315,316}

(E)-1-Phenylpenta-1,4-dien-3-on (79)

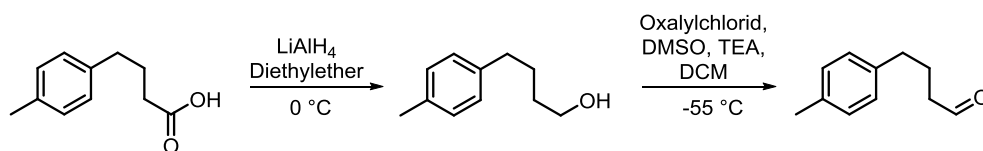


Die Synthese erfolgte nach Bugarin *et al.*³¹⁷ (*E*)-4-Phenyl-3-buten-2-on (99 %, 5 g, 33.9 mmol), Paraformaldehyd (95 %, 2,03 g, 67.7 mmol), Diisopropylamin-trifluoroacetat (DIPA·TFA, 100 %, 7.29 g, 33.9 mmol), Diisopropylamin (99 %, 1.71 g, 16.7 mmol) und 40 mL Tetrahydrofuran (THF) wurden 2 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde Paraformaldehyd (95 %, 2.03 g, 67.7 mmol) zugegeben und erneut 6 h unter Rückfluss gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in Diethylether (40 mL) aufgenommen und in der Reihenfolge mit Salzsäure (1 M, 20 mL), Natriumhydroxid-Lösung (1 M, 20 mL) sowie gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylacetat 95:5) aufgereinigt. Es wurde (*E*)-1-Phenylpenta-1,4-dien-3-on (**79**) (1.1 g, 7.0 mmol, 21 % Ausbeute) als hellgelbe Flüssigkeit erhalten. $R_f = 0.3$ (*n*-Hexan:Ethylacetat 95:5). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.67 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.41 (m, 3H), 7.01 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.71 (dd, $J = 17.5, 10.7$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 5.88 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 189.5, 144.0, 135.4, 134.6, 130.6, 129.0 (2 \times C), 128.6, 128.4 (2 \times C), 124.1. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.³⁰⁹

4-Phenylbutanal (75)

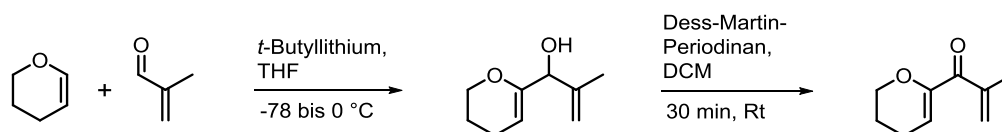
Die Synthese erfolgte in zwei Stufen. In der ersten Stufe wurde Diethylether (wasserfrei, 30 mL) zusammen mit Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH₄, 0.92 g, 24.3 mmol) vorgelegt. 4-Phenylbutansäure (2 g, 12.2 mmol) wurde bei 0 °C portionsweise zugegeben und das Gemisch anschließend 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges LiAlH₄ wurde mit Schwefelsäure (1 M) neutralisiert und die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit Diethylether (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. 4-Phenylbutanol (1.85 g, 12.3 mmol, 100 % Ausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.27 (m, 2H), 7.17 (m, 3H), 4.37 (t, *J* = 5.1 Hz, OH), 3.40 (m, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.43 (m, 2H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 142.3, 128.25 (2×C), 128.17 (2×C), 125.6, 60.5, 35.0, 32.1, 27.5.

In einer zweiten Stufe wurden Oxalylchlorid (1.14 g, 8.95 mmol) und wasserfreies Dichlormethan (DCM, 35 mL) vorgelegt. Bei -55 °C wurde eine Mischung aus Dimethylsulfoxid (1.37 g, 17.6 mmol) und 7.5 mL DCM zugetropft. Anschließend wurde 4-Phenylbutanol (1.2 g, 7.99 mmol) in 7.5 mL DCM gelöst und zugetropft. Nach weiteren 15 min bei -55 °C wurde Triethylamin (4.04 g, 40.0 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Zugabe einer Salzsäurelösung (1M, 50 mL) wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit DCM (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, anschließend das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylacetat 10:1.5) aufgereinigt. Es wurde 4-Phenylbutanal (**75**) (0.82 g, 5.5 mmol, 69 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. *R_f* = 0.4 (*n*-Hexan:Ethylacetat 10:1.5). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.75 (t, *J* = 1.58 Hz, 1H), 7.28 (m, 2H), 7.19 (m, 3H), 2.66 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.45 (dt, *J* = 1.6 Hz, 7.2 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 202.3, 141.2, 128.5 (4×C), 126.1, 43.1, 35.0, 23.6. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^{318,319}

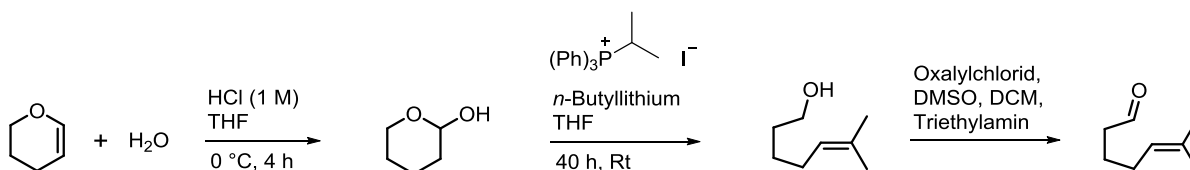
4-(*p*-Tolyl)-butanal (76)

Die Synthese erfolgte in zwei Stufen. In der ersten Stufe wurde Diethylether (wasserfrei, 30 mL) zusammen mit Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH₄, 0.85 g, 22.4 mmol) vorgelegt. 4-(*p*-Tolyl)-butansäure (1.8 g, 10.1 mmol) wurde bei 0 °C portionsweise zugegeben und das Gemisch anschließend 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges LiAlH₄ wurde mit Schwefelsäure (1 M) neutralisiert und die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit Diethylether (50 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. 4-(*p*-Tolyl)-butanol (1.65 g, 10.0 mmol, 99 % Ausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 7.06 (s, 4H), 4.36 (t, *J* = 5.25 Hz, OH), 3.39 (m, 2H), 2.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.41 (m, 2H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 139.1, 134.4, 128.7 (2×C), 128.1(2×C), 60.5, 34.5, 32.1, 27.5, 20.6.

In einer zweiten Stufe wurden Oxalylchlorid (1.04 g, 8.19 mmol) und wasserfreies Dichlormethan (DCM, 35 mL) vorgelegt. Bei -55 °C wurde eine Mischung aus Dimethylsulfoxid (1.26 g, 16.1 mmol) und 7.5 mL DCM zugetropft. Anschließend wurde 4-(*p*-Tolyl)-butanol (1.2 g, 7.31 mmol) in 7.5 mL DCM gelöst und zugetropft. Nach weiteren 15 min bei -55 °C wurde Triethylamin (3.7 g, 36.6 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach der Zugabe einer Salzsäurelösung (1M, 50 mL) wurde das Reaktionsgemisch dreimal mit DCM (50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, anschließend das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (*n*-Hexan:Ethylacetat 10:1.5) aufgereinigt. Es wurde 4-(*p*-Tolyl)-butanal (**76**) (0.82 g, 5.5 mmol, 69 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. *R_f* = 0.4 (*n*-Hexan:Ethylacetat 10:1.5). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 9.65 (t, *J* = 1.58 Hz, 1H), 7.08 (m, 4H), 2.52 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.41 (dt, *J* = 1.4 Hz, 7.2 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.79 (m, 2H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 203.2, 138.3, 134.7, 128.9 (2×C), 128.2 (2×C), 42.4, 33.9, 23.5, 20.6. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.³¹²

1-(3,4-dihydro-2H-pyran-6-yl)-2-methylprop-2-en-1-on (78)

Die Darstellung von 1-(3,4-dihydro-2H-pyran-6-yl)-2-methylprop-2-en-1-on (**78**) erfolgte in einer zweistufigen Synthese nach Kokubo *et al.*³²⁰ Die erste Stufe wurde von M. Kuhn durchgeführt.²³³ Die zweite Stufe wurde zum großen Teil von A. Marjanovic ausgeführt.²³¹ Hierzu wurden 1-(3,4-Dihydro-2H-pyran-6-yl)-2-methylprop-2-en-1-ol (350 mg, 2.27 mmol, 1.0 eq) zusammen mit Dichlormethan (8 mL) und Dess-Martin-Periodinan (1.0 mg, 2.38 mmol, 1.05 eq) gemischt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt und anschließend dreimal mit Dichlormethan (15 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Ethylacetat 50:1) aufgereinigt. Es wurde 1-(3,4-dihydro-2H-pyran-6-yl)-2-methylprop-2-en-1-on (**78**) (160 mg, 1.05 mmol, 46 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 5.86 (t, *J* = 4.19 Hz, 1H), 5.66 (m, 2H), 4.13 (t, *J* = 5.23 Hz, 2H), 2.22 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 1.89 (m, 2H). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 192.7, 150.9, 142.8, 123.9, 114.0, 66.4, 21.5, 20.9, 19.0. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.³²⁰

6-Methylhept-5-enal (73)

Die Darstellung von 6-Methylhept-5-enal erfolgte in drei Stufen in einer abgewandelten Form nach Banwell *et al.*³²¹ In der ersten Stufe wurde 3,4-Dihydro-2H-pyran (0.93 g, 11.0 mmol) zusammen mit Tetrahydrofuran (10 mL) bei 0 °C vorgelegt und wässrige HCl (1 M, 2.0 mL) wurde zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei 0 °C gerührt und anschließend mit Natriumhydroxid (1 M) neutralisiert (pH 7.0, Indikatorpapier). Nach Zugabe von 25 mL ddH₂O wurde die Reaktionsmischung dreimal mit Diethylether (25 mL) extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung (25 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde

anschließend über Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Tetrahydro-2*H*-pyran-2-ol (1 g) wurde ohne weitere Aufreinigung direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

In der zweiten Stufe wurden Isopropyltriphenylphosphoniumiodid (4.23 g, 9.8 mmol) und wasserfreies Tetrahydrofuran (15 mL) bei Raumtemperatur vorgelegt und anschließend *n*-Butyllithium (1.6 M in *n*-Hexan, 9.8 mmol) zugetropft. Nach 15 min wurde eine Lösung aus Tetrahydro-2*H*-pyran-2-ol (1.0 g, 9.8 mmol) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (5 mL) zugegeben und die Mischung 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wurde über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel des Filtrats wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) aufgereinigt. Es wurde 6-Methylhept-5-en-1-ol (240 mg, 1.9 mmol, 19 % Ausbeute) als hellgelbes Öl erhalten. $R_f = 0.4$ (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 5.12 (t, $J = 7.16$ Hz, 1H), 3.64 (m, 2H), 2.01 (q, $J = 7.28$ Hz, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.58 (m, 2H), 1.39 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 131.7, 124.4, 63.0, 32.4, 27.7, 26.0, 25.7, 17.7. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.³¹⁴

In der letzten Stufe wurden Dimethylsulfoxid (448 mg, 5.73 mmol, 3.1 eq) und wasserfreies Dichlormethan (25 mL) vorgelegt und auf -78 °C abgekühlt. Oxalylchlorid (262 mg, 2.07 mmol, 1.1 eq) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung 15 min gerührt. Anschließend wurde 6-Methylhept-5-en-1-ol (240 mg, 1.87 mmol, 1.0 eq) zugetropft und die Reaktionsmischung 30 min nachgerührt. Zuletzt wurde Triethylamin (1.33 g, 13.1 mmol, 7.0 eq) zugegeben, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (40 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Ethylacetat 8:1) aufgereinigt. Es wurde 6-Methylhept-5-enal (**73**) (91 mg, 0.72 mmol, 39 % Ausbeute) als farbloses Öl erhalten. $R_f = 0.5$ (Cyclohexan:Ethylacetat 8:1). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.76 (t, $J = 1.82$ Hz, 1H), 5.08 (t, $J = 7.21$ Hz, 1H), 2.42 (dt, $J = 7.29$ Hz, 1.82 Hz, 2H), 2.03 (q, $J = 7.21$ Hz, 2H), 1.69 (m, 5H), 1.59 (s, 3H) $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 202.9, 132.9, 123.3, 43.4, 27.3, 25.7, 22.3, 17.7. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.³¹⁴

7.7. Enzymatische Synthesen

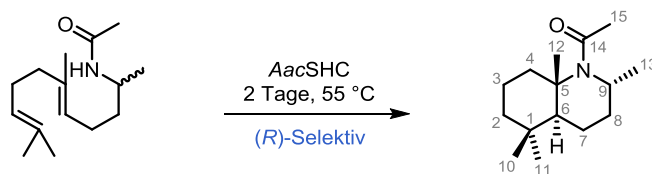
7.7.1. Analytische Biotransformationen

Analytische Biotransformationen wurden in 2 mL Glasfläschchen durchgeführt. Das Substrat wurde als DMSO-Lösung (200 mM) zur Reaktionslösung zugegeben. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 790 μL Citrat-Puffer (60 mM, pH 6.0), 200 μL Enzympräparation und 10 μL der DMSO-Substrat-Lösung. Somit ergab sich final folgende Standardzusammensetzung: 2 mM Substrat, 1 mg/mL Enzym, 60 mM Citrat-Puffer pH 6.0, 0.2 % Detergens, 1 % DMSO. Das Detergens für die Enzympräparation wurde üblicherweise abhängig vom Substrat gewählt. Für das natürliche Substrat Squalen wurde Triton X-100 verwendet, für fast alle anderen Substrate wurde CHAPS verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 20, 40 oder 60 h bei 30, 50 oder 60 $^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Die Temperatur richtete sich nach der Substratstabilität im Reaktionspuffer. Als Schüttelgeschwindigkeit wurden 800 Upm gewählt. Als Negativkontrolle dienten standardmäßig ein Kontrollexperiment in Citrat-Puffer (60 mM, pH 6.0) sowie ein Ansatz mit dem Knockout der katalytisch aktiven Asparaginsäure (*AacSHC* D376C bzw. *ZmoSHC1* D439A). Nach der Reaktion wurden die Ansätze zweimal mit 800 μL Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mittels Na_2SO_4 getrocknet und per Gaschromatographie analysiert.

Für die Kaskade aus Lipase und Squalen-Hopen-Zyklase (Kapitel 4.3.3) wurden die Ansätze vergleichbar durchgeführt, dem Reaktionsansatz wurden jedoch 5 mg Lipase (CalB, C-Lecta) zugegeben.

7.7.2. Präparative Biotransformationen

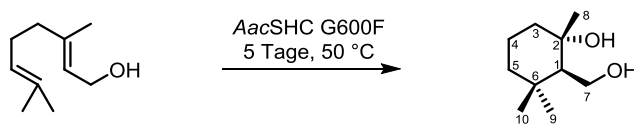
Decahydrochinolin-Derivat (45)



80 g eines *E. coli* Zellpellets (nach Expression von *AacSHC*) wurden in Lysepuffer (3 mL pro Gramm Zellpellet, 200 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 6.0) resuspendiert und mittels Gewebehomogenisator homogenisiert. Nach der Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid

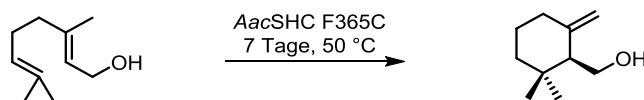
(1 mM) und DNase (ca. 10 µg/mL) wurden die Zellen durch einen Hochdruck-Homogenisator (EmulsiFlex-C5, Avestin, 100 MPa) aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde zentrifugiert ($38700 \times g$, 45 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit Waschpuffer (3 mL pro Gramm Zellpellet, 60 mM Citrat, pH 6.0) resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert ($38700 \times g$, 45 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit Solubilisationspuffer (1 mL pro Gramm Zellpellet, 1 % CHAPS, 60 mM Citrat, pH 6.0) resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert ($38700 \times g$, 45 min, 4 °C). Der Überstand wurde nach einem Hitzeschock (15 min, 60 °C) und anschließender Zentrifugation ($38700 \times g$, 45 min, 4 °C) als Enzympräparation verwendet.

Für die Reaktion wurden ~80 mL der Enzympräparation mit 420 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 160 mg (*E*)-*N*-(6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-yl)acetamid (**44**) für 2 Tage bei 55 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Das Substrat wurde als DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase aus vier Extraktionen wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Dichlormethan 1:3.3, *R_f* (Edukt): 0.15, *R_f* (Produkt): 0.3). Nach der Säulenchromatographie wurden 19.0 mg des Decahydrochinolin-Derivats (**45**) als farbloses Öl isoliert (23.8 % Ausbeute, berechnet für das *R*-Enantiomer). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 0.89 (s, 3H, H-11), 0.90 (s, 3H, H-10), 1.10-1.14 (m, 1H, H-4), 1.18-1.21 (m, 1H, H-2), 1.37 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-13), 1.40 (s, 3H, H-12), 1.40 (m, 1H, H-2), 1.47-1.49 (m, 2H, H-3), 1.50-1.54 (m, 1H, H-7), 1.69-1.74 (m, 1H, H-8), 1.79-1.83 (m, 2H, H-6 & H-7), 1.95-2.01 (m, 1H, H-8), 2.08 (s, 3H, H-15), 3.46 (m, 1H, H-4), 3.82 (m, 1H, H-9). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm) 14.6 (C-7), 18.9 (C-12), 19.9 (C-3), 21.1 (C-10), 23.2 (C-13), 25.3 (C-15), 25.4 (C-8), 33.1 (C-11), 34.3 (C-1), 38.7 (C-4), 41.8 (C-2), 46.3 (C-6), 49.6 (C-9), 61.3 (C-5), 170.7 (C-14). IR: (Film): ν (cm⁻¹) 2926, 2866, 1727, 1638, 1458, 1392, 1379, 1356, 1340. HREIMS *m/z* 237.2089 (berechnet für C₁₅H₂₇NO: 237.20926).

(1R,2S)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexan-methanol (Cyclogeraniol-hydrat) (64)

133 g eines *E. coli* Zellpellets (nach Expression von AacSHC G600F) wurden in Lysepuffer (3 mL pro Gramm Zellpellet, 200 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 6.0) resuspendiert und mittels Gewebehomogenisator homogenisiert. Nach der Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM) und DNase (ca. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wurden die Zellen durch einen Hochdruck-Homogenisator (EmulsiFlex-C5, Avestin, 100 MPa) aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde zentrifugiert ($38700 \times g$, 45 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), der Überstand verworfen und das Pellet mit Waschpuffer (3 mL pro Gramm Zellpellet, 60 mM Citrat, pH 6.0) resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert ($38700 \times g$, 45 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), der Überstand verworfen und das Pellet mit Solubilisationspuffer (1 mL pro Gramm Zellpellet, 1 % CHAPS, 60 mM Citrat, pH 6.0) resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend zentrifugiert ($38700 \times g$, 45 min, 4 $^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde nach einem Hitzeschock (15 min, 55 $^{\circ}\text{C}$) und anschließender Zentrifugation ($38700 \times g$, 45 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) als Enzympräparation verwendet.

Für die Reaktion wurden ~ 130 mL der Enzympräparation (~ 8 mg/mL, entspricht ~ 0.4 mol% Katalysator) mit 530 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 512 mg Geraniol (**51**) für 5 Tage bei 50 $^{\circ}\text{C}$ in einem Rundhalskolben inkubiert. Das Substrat wurde als DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase aus vier Extraktionen wurde mit Na_2SO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 1:1). Nach der Säulenchromatographie wurden 182 mg (1R,2S)-2-Hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexan-methanol (**64**) als hellgelber Feststoff isoliert (32 % Ausbeute). Die relative Stereochemie wurde durch ein NOESY-NMR-Experiment verifiziert. Die NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.³²² ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.77 (s, 3H, H-10), 1.02 (s, 3H, H-9), 1.26-1.33 (m, 2H, H-5), 1.34 (s, 3H, H-8), 1.41-1.52 (m, 2H, H-4_{eq}, H-3_{ax}), 1.53 (m, 1H, H-4_{ax}), 1.62 (m, 1H, H-1), 1.77 (m, 1H, H-3_{eq}), 3.26 (br, 2H, C2-OH, C7-OH), 3.90 (m, 2H, H-7). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 20.2 (C-4), 21.6 (C-10), 23.5 (C-8), 32.9 (C-9), 33.5 (C-6), 42.2 (C-5), 43.2 (C-3), 56.0 (C-1), 62.0 (C-7), 74.9 (C-2). $[\alpha]_{546}^{25} = -3.4^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 2.0$). Literatur $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 0^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 0.5$).³²²

(S)- γ -Cyclogeraniol (52)

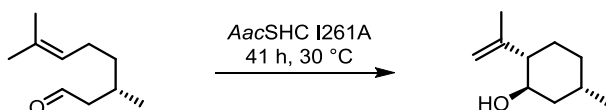
Das Enzympräparations-Protokoll ist vergleichbar zum Protokoll für *AacSHC G600F*. Für *AacSHC F365C* wurde ein *E. coli* Zellpellet von 91 g verwendet und eine Enzympräparation von ~90 mL erhalten. Diese (~8 mg/mL, entspricht ~0.4 mol% Katalysator) wurde zusammen mit 360 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 347 mg Geraniol (**51**) gemischt und für 7 Tage bei 50 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Das Substrat wurde als DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Ethylacetat/ *n*-Hexan (1:1) extrahiert. Die vereinigte organische Phase aus vier Extraktionen wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/ Cyclohexan 1:6). Nach der Säulenchromatographie wurden 17.2 mg (*S*)- γ -Cyclogeraniol (**52**) als farbloses Öl isoliert (5.0 % Ausbeute). Die NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.²⁵⁴ ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 0.87 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.25-1.35 (m, 2H), 1.39-1.44 (m, 1H), 1.55-1.60 (m, 2H), 2.04 (dd, *J* = 10.9, 4.7 Hz, 1H), 2.11 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H), 3.69-3.72 (m, 1H), 4.76 (br s, 1H), 4.95 (br s, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 62.8 MHz) δ 23.1, 26.6, 28.5, 31.8, 33.9, 36.3, 56.4, 59.6, 111.8, 147.5. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +11^\circ$ (CHCl₃, *c* = 0.2) bestätigte das (*S*)-Enantiomer für γ -Cyclogeraniol (>99 % *ee* in der chiralen GC). Literatur $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20.1^\circ$ (CHCl₃, *c* = 2).³²³

(2*S*,6*R*)-(+)-*cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol (67)

Das Enzympräparations-Protokoll ist vergleichbar zum Protokoll für *AacSHC G600F*, jedoch mit Triton X-100 als Detergens. Für *AacSHC Y420W/G600F* wurde ein *E. coli* Zellpellet von 165 g verwendet und eine Enzympräparation von ~165 mL erhalten. Um die nicht-enzymatische Hydrolyse des Epoxids (**65**) zu minimieren, wurde die Enzympräparation durch Ionenaustausch-Chromatographie weiter aufgereinigt (Kapitel 7.4.2). 190 mL der finalen Enzympräparation (~7 mg/mL, entspricht ~1.0 mol% Katalysator) wurden zusammen mit 760 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 323 mg 6,7-Epoxygeraniol (**65**) gemischt und für 60 Stunden bei

30 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Das Substrat wurde als DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase aus vier Extraktionen wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/ Cyclohexan 1:6). Nach der Säulenchromatographie wurden 87.5 mg (2*S*,6*R*)-(+)-*cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol (**67**) als farbloses Öl isoliert (54 % Ausbeute, berechnet für das (*S*)-Enantiomer). Die NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.²⁵⁴ ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 0.95 (s, Me), 1.00 (s, Me), 1.65 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.99 (dd, *J* = 3.3, 7.21 Hz, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 3.0 (br s, 2 \times -OH), 3.45 (dd, *J* = 3.45, 5.67 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 3.33, 10.9 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 7.20, 10.9 Hz, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.94 (s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 20.9, 27.6, 29.3, 30.9, 38.8, 54.9, 62.3, 74.7, 110.6, 147.7. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20} = + 35.1^\circ$ (CHCl₃, *c* = 1.0) bestätigte (2*S*,6*R*)-(+)-*cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol (**67**) als Produkt der Reaktion (>99 % *ee* in der chiralen GC). Literatur $[\alpha]_D^{20} = + 46.6^\circ$ (CHCl₃, *c* = 1.02).²⁵⁴

(-)-*iso*-Isopulegol (**71**)



Das Enzympräparations-Protokoll ist vergleichbar zum Protokoll für AacSHC G600F, jedoch mit Triton X-100 als Detergens. Für AacSHC I261A wurde ein *E. coli* Zellpellet von 24 g verwendet und eine Enzympräparation von ~24 mL erhalten. Die Enzympräparation wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie weiter aufgereinigt (Kapitel 7.4.2). 40 mL der aufgereinigten Enzympräparation (~7 mg/mL, entspricht ~1.6 mol% Katalysator) wurden zusammen mit 37.2 mg (*S*)-Citronellal (*S*)-**32** gemischt und für 41 Stunden bei 30 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Das Substrat wurde als DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase aus vier Extraktionen wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/ Cyclohexan 1:8). Nach der Säulenchromatographie wurden 10.2 mg (-)-*iso*-Isopulegol (**71**) als farbloses Öl isoliert (27 % Ausbeute). Die NMR-Daten und der spezifische Drehwert entsprechen der Literatur.^{324,325} ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 1.02 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.40-1.55 (m, 5H), 1.73 (s, 3H), 2.13 (m,

1H), 1.87-1.93 (m, 2H), 3.70 (dt, $J = 4.3, 10.4$ Hz, 1H), 4.86 (br s, 1H), 4.90 (br s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 18.6, 19.4, 24.7, 28.3, 30.9, 39.5, 54.8, 66.4, 112.6, 146.7. Spezifischer Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6.5^\circ$ (CHCl_3 , $c = 0.2$). Literatur $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 7.9^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1.0$) für (+)-*iso*-Isopulegol.

7.8. Bioinformatische Methoden

Multiple Sequenzalignments wurden mit *ClustalW2* erstellt. Hidden Markov Modelle (HMM) wurden mit *hmmbuild* generiert und die UniProt-Datenbank wurde mittels *hmmsearch* durchforstet. Beide Programme (*hmmbuild* und *hmmsearch*) sind Bestandteil der HMMER Software.^{326–329} HMM sind statistische Modelle von Multiplen Sequenzalignments. Es handelt sich um ein Sequenzprofil, das angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit die 20 Aminosäuren sowie Insertionen und Deletionen an jeder Position der Sequenzen vorkommen. Mit erstellten HMM lassen sich Datenbanken wie die UniProt-Datenbank nach verwandten Enzymen durchforsten und diese anhand einer Bewertung (in Bezug auf das HMM) einstufen. Aminosäuresequenzen können mithilfe eines HMM bezüglich ihrer Übereinstimmung bzw. Verwandtschaft bewertet werden.

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

HMMER: <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::hmmsearch>

LITERATURVERZEICHNIS

1. Nicolaou, K.C. & Snyder, S.A. *Classics in Total Synthesis II*. 1–658 (Wiley-VCH, 2003).
2. Schmid, A. *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258–268 (2001).
3. Bornscheuer, U.T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194 (2012).
4. Nestl, B.M., Nebel, B.A. & Hauer, B. Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 187–193 (2011).
5. Huisman, G.W. & Collier, S.J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 284–292 (2013).
6. Arnold, F.H. Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.* **31**, 125–131 (1998).
7. Bershtein, S. & Tawfik, D.S. Advances in laboratory evolution of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 151–158 (2008).
8. Jäckel, C. & Hilvert, D. Biocatalysts by evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 753–759 (2010).
9. Reetz, M.T. Laboratory evolution of stereoselective enzymes: A prolific source of catalysts for asymmetric reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 138–174 (2011).
10. Turner, N.J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 567–573 (2009).
11. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 1–436 (Springer, 2011).
12. Bornscheuer, U.T. & Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 1–368 (Wiley-VCH, 2006).
13. Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G. & Riva, S. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chem. Rev.* **111**, 4111–4140 (2011).
14. Hall, M. & Bommarius, A.S. Enantioenriched compounds via enzyme-catalyzed redox reactions. *Chem. Rev.* **111**, 4088–4110 (2011).
15. Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K. & Faber, K. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 120–126 (2004).

16. Mathew, S. & Yun, H. ω -Transaminases for the production of optically pure amines and unnatural amino acids. *ACS Catal.* **2**, 993–1001 (2012).
17. Nestl, B.M., Hammer, S.C., Nebel, B.A. & Hauer, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 3070–3095 (2014).
18. Stuermer, R., Hauer, B., Hall, M. & Faber, K. Asymmetric bioreduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 203–213 (2007).
19. Winkler, C.K., Tasnádi, G., Clay, D., Hall, M. & Faber, K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. *J. Biotechnol.* **162**, 381–389 (2012).
20. O'Reilly, E., Köhler, V., Flitsch, S.L. & Turner, N.J. Cytochromes P450 as useful biocatalysts: Addressing the limitations. *Chem. Commun.* **47**, 2490–2501 (2011).
21. Jung, S.T., Lauchli, R. & Arnold, F.H. Cytochrome P450: Taming a wild type enzyme. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 809–817 (2011).
22. Windle, C.L., Müller, M., Nelson, A. & Berry, A. Engineering aldolases as biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 25–33 (2014).
23. Brovetto, M., Gamemara, D., Méndez, P.S. & Seoane, G.A. C-C bond-forming lyases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **111**, 4346–4403 (2011).
24. Müller, M., Sprenger, G.A. & Pohl, M. C-C bond formation using ThDP-dependent lyases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 261–270 (2013).
25. Breuer, M. & Hauer, B. Carbon–carbon coupling in biotransformation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 570–576 (2003).
26. Resch, V., Schrittwieser, J.H., Siirola, E. & Kroutil, W. Novel carbon-carbon bond formations for biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 793–799 (2011).
27. Turner, N.J. & Reilly, E.O. Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 285–288 (2013).
28. Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. & Eck, J. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: Accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 572–577 (2002).
29. Lorenz, P. & Eck, J. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 510–516 (2005).
30. Bonamore, A. *et al.* An enzymatic, stereoselective synthesis of (S)-norcoclaurine. *Green Chem.* **12**, 1623–1627 (2010).

31. Ruff, B.M., Bräse, S. & O'Connor, S.E. Biocatalytic production of tetrahydroisoquinolines. *Tetrahedron Lett.* **53**, 1071–1074 (2012).
32. Mitsukura, K. *et al.* Purification and characterization of a novel (R)-imine reductase from *Streptomyces* sp. GF3587. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1778–1782 (2011).
33. Mitsukura, K. *et al.* A NADPH-dependent (S)-imine reductase (SIR) from *Streptomyces* sp. GF3546 for asymmetric synthesis of optically active amines: Purification, characterization, gene cloning and expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8079–8086 (2013).
34. Rodríguez-Mata, M. *et al.* Structure and activity of NADPH-dependent reductase Q1EQE0 from *Streptomyces kanamyceticus*, which catalyses the R-selective reduction of an imine substrate. *ChemBioChem* **14**, 1372–1379 (2013).
35. Scheller, P.N. *et al.* Enzyme toolbox: Novel enantiocomplementary imine reductases. *ChemBioChem* **15**, 2201–2204 (2014).
36. Kiss, G., Çelebi-Ölçüm, N., Moretti, R., Baker, D. & Houk, K.N. Computational enzyme design. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 5700–5725 (2013).
37. Röthlisberger, D. *et al.* Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* **453**, 190–195 (2008).
38. Jiang, L. *et al.* De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science* **319**, 1387–1391 (2008).
39. Siegel, J.B. *et al.* Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science* **329**, 309–313 (2010).
40. Khersonsky, O. *et al.* Optimization of the in-silico-designed kemp eliminase KE70 by computational design and directed evolution. *J. Mol. Biol.* **407**, 391–412 (2011).
41. Khersonsky, O. *et al.* Bridging the gaps in design methodologies by evolutionary optimization of the stability and proficiency of designed Kemp eliminase KE59. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 10358–10363 (2012).
42. Preiswerk, N. *et al.* Impact of scaffold rigidity on the design and evolution of an artificial Diels-Alderase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 8013–8018 (2014).
43. Blomberg, R. *et al.* Precision is essential for efficient catalysis in an evolved Kemp eliminase. *Nature* **503**, 418–421 (2013).
44. Hyster, T.K., Knörr, L., Ward, T.R. & Rovis, T. Biotinylated Rh(III) complexes in engineered streptavidin for accelerated asymmetric C-H activation. *Science* **338**, 500–503 (2012).

45. Coelho, P.S., Brustad, E.M., Kannan, A. & Arnold, F.H. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science* **339**, 307–310 (2013).
46. Dürrenberger, M. & Ward, T.R. Recent achievements in the design and engineering of artificial metalloenzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 99–106 (2014).
47. Bornscheuer, U.T. & Kazlauskas, R.J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 6032–6040 (2004).
48. Humble, M.S. & Berglund, P. Biocatalytic promiscuity. *Eur. J. Org. Chem.* 3391–3401 (2011).
49. Kazlauskas, R.J. Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 195–201 (2005).
50. Toscano, M.D., Woycechowsky, K.J. & Hilvert, D. Minimalist active-site redesign: Teaching old enzymes new tricks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 3212–3236 (2007).
51. Coelho, P.S. *et al.* A serine-substituted P450 catalyzes highly efficient carbene transfer to olefins in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 485–487 (2013).
52. Wang, Z.J. *et al.* Improved cyclopropanation activity of histidine-ligated cytochrome P450 enables the enantioselective formal synthesis of levomilnacipran. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 6810–6813 (2014).
53. McIntosh, J.A. *et al.* Enantioselective intramolecular C-H amination catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes in vitro and in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 9309–9312 (2013).
54. Farwell, C.C., McIntosh, J.A., Hyster, T.K., Wang, Z.J. & Arnold, F.H. Enantioselective imidation of sulfides via enzyme-catalyzed intermolecular nitrogen-atom transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8766–8771 (2014).
55. Munro, A.W., Girvan, H.M., Mason, A.E., Dunford, A.J. & McLean, K.J. What makes a P450 tick? *Trends Biochem. Sci.* **38**, 140–150 (2013).
56. Akiyama, T., Itoh, J. & Fuchibe, K. Recent progress in chiral Brønsted acid catalysis. *Adv. Synth. Catal.* **348**, 999–1010 (2006).
57. Akiyama, T. Stronger Brønsted acids. *Chem. Rev.* **107**, 5744–5758 (2007).
58. Terada, M. Binaphthol-derived phosphoric acid as a versatile catalyst for enantioselective carbon-carbon bond forming reactions. *Chem. Commun.* 4097–4112 (2008).

59. Zamfir, A., Schenker, S., Freund, M. & Tsogoeva, S.B. Chiral BINOL-derived phosphoric acids: Privileged Brønsted acid organocatalysts for C-C bond formation reactions. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 5262–5276 (2010).
60. Terada, M. Chiral phosphoric acids as versatile catalysts for enantioselective carbon-carbon bond forming reactions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83**, 101–119 (2010).
61. Cheon, C.H. & Yamamoto, H. Super Brønsted acid catalysis. *Chem. Commun.* **47**, 3043–3056 (2011).
62. Rueping, M., Nachtsheim, B.J., Jeawsuwan, W. & Atodiresei, I. Modulating the acidity: Highly acidic Brønsted acids in asymmetric catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 6706–6720 (2011).
63. Parmar, D., Sugiono, E., Raja, S. & Rueping, M. Complete Field Guide to Asymmetric BINOL-Phosphate Derived Brønsted Acid and Metal Catalysis: History and Classification by Mode of Activation; Brønsted Acidity, Hydrogen Bonding, Ion Pairing, and Metal Phosphates. *Chem. Rev.* **114**, 9047–9153 (2014).
64. Taylor, M.S. & Jacobsen, E.N. Asymmetric catalysis by chiral hydrogen-bond donors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1520–1543 (2006).
65. Doyle, A.G. & Jacobsen, E.N. Small-molecule H-bond donors in asymmetric catalysis. *Chem. Rev.* **107**, 5713–5743 (2007).
66. Sigman, M.S. & Jacobsen, E.N. Schiff base catalysts for the asymmetric strecker reaction identified and optimized from parallel synthetic libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4901–4902 (1998).
67. Reaction, S., Sigman, M.S., Vachal, P. & Jacobsen, E.N. A general catalyst for the asymmetric strecker reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 1279–1281 (2000).
68. Vachal, P. & Jacobsen, E.N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10012–10014 (2002).
69. Huang, Y., Unni, A.K., Thadani, A.N. & Rawal, V.H. Single enantiomers from a chiral-alcohol catalyst. *Nature* **424**, 146 (2003).
70. Bordwell, F.G. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. *Acc. Chem. Res.* **21**, 456–463 (1988).
71. Jakab, G., Tancon, C., Zhang, Z., Lippert, K.M. & Schreiner, P.R. (Thio)urea organocatalyst equilibrium acidities in DMSO. *Org. Lett.* **14**, 1724–1747 (2012).

72. Christ, P. *et al.* pKa values of chiral Brønsted acid catalysts: Phosphoric acids/amides, sulfonyl/sulfuryl imides, and perfluorinated TADDOLs (TEFDDOLs). *Chem. Eur. J.* **17**, 8524–8528 (2011).
73. Akiyama, T., Itoh, J., Yokota, K. & Fuchibe, K. Enantioselective Mannich-type reaction catalyzed by a chiral Brønsted acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 1566–1568 (2004).
74. Uraguchi, D. & Terada, M. Chiral Brønsted acid-catalyzed direct Mannich reactions via electrophilic activation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5356–5357 (2004).
75. Kaupmees, K., Tolstoluzhsky, N., Raja, S., Rueping, M. & Leito, I. On the acidity and reactivity of highly effective chiral Brønsted acid catalysts: Establishment of an acidity scale. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 11569–11572 (2013).
76. Rueping, M., Nachtsheim, B.J., Moreth, S.A. & Bolte, M. Asymmetric Brønsted acid catalysis: Enantioselective nucleophilic substitutions and 1,4-additions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 593–596 (2008).
77. Gu, Q., Rong, Z.-Q., Zheng, C. & You, S.-L. Desymmetrization of cyclohexadienones via Brønsted acid-catalyzed enantioselective oxo-Michael reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4056–4057 (2010).
78. Rueping, M., Ieawsuwan, W., Antonchick, A.P. & Nachtsheim, B.J. Chiral Brønsted acids in the catalytic asymmetric Nazarov cyclization - The first enantioselective organocatalytic electrocyclic reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2097–2100 (2007).
79. Rueping, M., Theissmann, T., Kuenkel, A. & Koenigs, R.M. Highly enantioselective organocatalytic carbonyl-ene reaction with strongly acidic, chiral Brønsted acids as efficient catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 6798–6801 (2008).
80. Nakashima, D. & Yamamoto, H. Design of chiral N-triflyl phosphoramidate as a strong chiral Brønsted acid and its application to asymmetric Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9626–9627 (2006).
81. Uraguchi, D., Sorimachi, K. & Terada, M. Organocatalytic asymmetric aza-Friedel-Crafts alkylation of furan. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11804–11805 (2004).
82. Rowland, G.B., Rowland, E.B., Liang, Y., Perman, J.A. & Antilla, J.C. The highly enantioselective addition of indoles to N-acyl imines with use of a chiral phosphoric acid catalyst. *Org. Lett.* **9**, 2609–2611 (2007).
83. Raja, S., Ieawsuwan, W., Korotkov, V. & Rueping, M. Asymmetric Brønsted acid-catalyzed Nazarov cyclization of acyclic α -alkoxy dienones. *Chem. Asian J.* **7**, 2361–2366 (2012).
84. Shen, J. & Tan, C.-H. Brønsted-acid and Brønsted-base catalyzed Diels-Alder reactions. *Org. Biomol. Chem.* **6**, 3229–3236 (2008).

85. Tian, X., Hofmann, N. & Melchiorre, P. Asymmetric vinylogous Diels-Alder reactions catalyzed by a chiral phosphoric acid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 2997–3000 (2014).
86. Schowen, K.B., Limbach, H.H., Denisov, G.S. & Schowen, R.L. Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 43–62 (2000).
87. Fersht, A.R. *Structure and Mechanism in Protein Science*. 1–650 (Freeman, 1999).
88. Torbev, Y.V. *et al.* Protein conformational dynamics in the mechanism of HIV-1 protease catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 20982–20987 (2011).
89. Woodward, R.B. & Bloch, K. The cyclization of squalene in cholesterol synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2023–2024 (1953).
90. Stork, G. & W., B.A. The stereochemistry of polyene cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5068–5077 (1955).
91. Eschenmoser, A., Ruzicka, L., Jeger, O. & Arigoni, D. Eine stereochemische Interpretation der biogenetischen Isoprenregel bei den Triterpenen. *Helv. Chim. Acta* **275**, 1890–1904 (1955).
92. Maudgal, R.K., Tchen, T.T. & Bloch, K. 1,2-Methyl shifts in the cyclization of squalene to lanosterol. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2589–2590 (1957).
93. Cornforth, J.W. *et al.* The migration and elimination of hydrogen during biosynthesis of cholesterol from squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3224–3228 (1965).
94. Corey, E.J., Russey, W.R. & Montellano, P.R.O. de. 2,3-Oxidosqualene, an intermediate in the biological synthesis of sterols from squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **168**, 4750–4751 (1966).
95. Abe, I., Rohmer, M. & Prestwich, G.D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.* **93**, 2189–2206 (1993).
96. Hammer, S.C., Syrén, P.-O., Seitz, M., Nestl, B.M. & Hauer, B. Squalene hopene cyclases: Highly promiscuous and evolvable catalysts for stereoselective C-C and C-X bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 293–300 (2013).
97. Wendt, K.U., Poralla, K. & Schulz, G.E. Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **277**, 1811–1815 (1997).
98. Wendt, K.U., Schulz, G.E., Corey, E.J. & Liu, D.R. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 2812–2833 (2000).
99. Wendt, K.U. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: New pieces of the puzzle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 3966–3971 (2005).

100. Gao, Y., Honzatko, R.B. & Peters, R.J. Terpenoid synthase structures: A so far incomplete view of complex catalysis. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1153–1175 (2012).
101. Hess, B.A. & Smentek, L. Concerted nature of AB ring formation in the enzymatic cyclization of squalene to hopenes. *Org. Lett.* **6**, 1717–1720 (2004).
102. Smentek, L. & Hess, B.A. Compelling computational evidence for the concerted cyclization of the ABC rings of hopene from protonated squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17111–17117 (2010).
103. Christianson, D.W. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* **106**, 3412–3442 (2006).
104. Lesburg, C.A., Caruthers, J.M., Paschall, C.M. & Christianson, D.W. Managing and manipulating carbocations in biology: Terpenoid cyclase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 695–703 (1998).
105. Davis, E.M. & Croteau, R.B. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Top. Curr. Chem.* **209**, 53–95 (2000).
106. Neumann, S. & Simon, H. Purification, partial characterization and substrate specificity of a squalene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367**, 723–729 (1986).
107. Wendt, K.U., Lenhart, A. & Schulz, G.E. The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **286**, 175–187 (1999).
108. Reinert, D.J., Balliano, G. & Schulz, G.E. Conversion of squalene to the pentacarboxylic hopene. *Chem. Biol.* **11**, 121–126 (2004).
109. Feil, C., Süßmuth, R., Jung, G. & Poralla, K. Site-directed mutagenesis of putative active-site residues in squalene-hopene cyclase. *Eur. J. Biochem.* **242**, 51–55 (1996).
110. Sato, T. & Hoshino, T. Functional analysis of the DXDDTA motif in squalene-hopene cyclase by site-directed mutagenesis experiments. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1–10 (1999).
111. Syrén, P.-O., Hammer, S.C., Claasen, B. & Hauer, B. Entropy is key to the formation of pentacyclic terpenoids by enzyme-catalyzed polycyclization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 4845–4849 (2014).
112. Dougherty, D.A. Cation- π interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**, 163–168 (1996).
113. Hoshino, T. & Sato, T. Squalene-hopene cyclase: Catalytic mechanism and substrate recognition. *Chem. Commun.* 291–301 (2002).

114. Morikubo, N. *et al.* Cation- π interaction in the polyolefin cyclization cascade uncovered by incorporating unnatural amino acids into the catalytic sites of squalene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13184–13194 (2006).
115. Siedenburg, G. & Jendrossek, D. Squalene-hopene cyclases. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3905–3915 (2011).
116. Racolta, S., Juhl, P.B., Sirim, D. & Pleiss, J. The triterpene cyclase protein family: A systematic analysis. *Proteins* **80**, 2009–2019 (2012).
117. Frickey, T. & Kannenberg, E.L. Phylogenetic analysis of the triterpene cyclase protein family in prokaryotes and eukaryotes suggests bidirectional lateral gene transfer. *Environ. Microbiol.* **11**, 1224–1241 (2009).
118. Saar, J., Kader, J.-C., Poralla, K. & Ourisson, G. Purification and some properties of the squalene-tetrahymanol cyclase from *Tetrahymena thermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **93**–101 (1991).
119. Giner, J.-L., Rocchetti, S., Neunlist, S., Rohmer, M. & Arigoni, D. Detection of 1,2-hydride shifts in the formation of euph-7-ene by the squalene-tetrahymanol cyclase of *Tetrahymena pyriformis*. *Chem. Commun.* 3089–3091 (2005).
120. Shinozaki, J., Shibuya, M., Masuda, K. & Ebizuka, Y. Dammaradiene synthase, a squalene cyclase, from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai. *Phytochemistry* **69**, 2559–2564 (2008).
121. Reipen, I.G., Poralla, K., Sahml, H. & Sprenger, G.A. *Zymomonas mobilis* squalene hopene cyclase (shc): Cloning, DNA sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* **141**, 155–161 (1995).
122. Seitz, M. *et al.* Substrate specificity of a novel squalene-hopene cyclase from *Zymomonas mobilis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **84**, 72–77 (2012).
123. Siedenburg, G. *et al.* Activation-independent cyclization of monoterpenoids. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1055–1062 (2012).
124. Gandour, R.D. On the importance of orientation in general base catalysis by carboxylate. *Bioorg. Chem.* **10**, 169–176 (1981).
125. Gao, J. & Pavelites, J.P. Aqueous basicity of the carboxylate lone pairs and the C-O barrier in acetic acid: A combined quantum and statistical mechanical study. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1912–1914 (1992).
126. Forsyth, W.R., Antosiewicz, J.M. & Robertson, A.D. Empirical relationships between protein structure and carboxyl pKa values in proteins. *Proteins* **48**, 388–403 (2002).
127. Wang, X. & Houk, K.N. Theoretical elucidation of the origin of the anomalously high acidity of meldrum's acid. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1870–1872 (1988).

128. Allinger, N.L. & Chang, S.H.M. Conformational analysis: Carboxylic acids and esters in force field calculations. *Tetrahedron* **33**, 1561–1567 (1977).
129. Seitz, M. *et al.* Synthesis of heterocyclic terpenoids by promiscuous squalene-hopene cyclases. *ChemBioChem* **14**, 436–439 (2013).
130. Abe, I., Tanaka, H. & Noguchi, H. Enzymatic formation of an unnatural hexacyclic C35 polyprenoid by bacterial squalene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14514–14515 (2002).
131. Ueda, D., Hoshino, T. & Sato, T. Cyclization of squalene from both termini: Identification of an onoceroid synthase and enzymatic synthesis of ambrein. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18335–18338 (2013).
132. Tanaka, H., Noguchi, H. & Abe, I. 1-Methylidenesqualene and 25-methylidenesqualene as active-site probes for bacterial squalene hopene cyclase. *Org. Lett.* **6**, 803–806 (2004).
133. Tanaka, H., Noguchi, H. & Abe, I. Enzymatic cyclization of 26- and 27-methylidenesqualene to novel unnatural C31 polyprenoids by squalene hopene cyclase. *Tetrahedron Lett.* **45**, 3093–3096 (2004).
134. Hoshino, T., Kumai, Y., Kudo, I., Nakano, S. & Ohashi, S. Enzymatic cyclization reactions of geraniol, farnesol and geranylgeraniol, and those of truncated squalene analogs having C20 and C25 by recombinant squalene cyclase. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2650–2657 (2004).
135. Tanaka, H., Noguchi, H. & Abe, I. Enzymatic formation of indole-containing unnatural cyclic polyprenoids by bacterial squalene hopene cyclase. *Org. Lett.* **7**, 5873–5876 (2005).
136. Tanaka, H., Noma, H., Noguchi, H. & Abe, I. Enzymatic formation of pyrrole-containing novel cyclic polyprenoids by bacterial squalene hopene cyclase. *Tetrahedron Lett.* **47**, 3085–3089 (2006).
137. Abe, T. & Hoshino, T. Enzymatic cyclizations of squalene analogs with threo- and erythro-diols at the 6,7- or 10,11-positions by recombinant squalene cyclase. Trapping of carbocation intermediates and mechanistic insights into the product and substrate specificities. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3127–3139 (2005).
138. Hoshino, T., Yonemura, Y., Abe, T. & Sugino, Y. Production of epoxydammaranes by the enzymatic reactions of (3R)- and (3S)-2,3-squalene diols and those of 2,3:22,23-dioxidosqualenes with recombinant squalene cyclase and the mechanistic insight into the polycyclization reactions. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 792–801 (2007).
139. Breuer, M., Hörster, A. & Hauer, B. Biocatalytic production of ambroxan. WO Patent 2010/139719 A2 (2010).

140. Siedenburg, G., Breuer, M. & Jendrossek, D. Prokaryotic squalene-hopene cyclases can be converted to citronellal cyclases by single amino acid exchange. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1571–1580 (2013).
141. Jiang, J., He, X. & Cane, D.E. Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 711–715 (2007).
142. Kim, H.J., Rusczycky, M.W. & Liu, H.-W. Current developments and challenges in the search for a naturally selected Diels-Alderase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 124–131 (2012).
143. Stecher, H. *et al.* Biocatalytic Friedel-Crafts alkylation using non-natural cofactors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 9546–9548 (2009).
144. Metzger, U. *et al.* The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 14309–14314 (2009).
145. Sato, T. & Hoshino, T. Kinetic studies on the function of all the conserved tryptophans involved inside and outside the QW motifs of squalene-hopene cyclase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1171–1180 (1999).
146. Mizuno, M. *et al.* Structural insights into substrate specificity and function of glucodextranase. *J. Biol. Chem.* **279**, 10575–10583 (2004).
147. Ochs, D., Kaletta, C., Entian, K.-D., Beck-Sickinger, A. & Poralla, K. Cloning, expression, and sequencing of squalene-hopene cyclase, a key enzyme in triterpenoid metabolism. *J. Bacteriol.* **174**, 298–302 (1992).
148. Kleemann, G., Kellner, R. & Poralla, K. Purification and properties of the squalene-hopene cyclase from *Rhodopseudomonas palustris*, a purple non-sulfur bacterium producing hopanoids and tetrahymanol. *Biochim. Biophys. Acta* 317–320 (1994).
149. Perzl, M., Muller, P., Poralla, K. & Kannenberg, E.L. Squalene-hopene cyclase from *Bradyrhizobium japonicum*: Cloning, expression, sequence analysis and comparison to other triterpenoid cyclases. *Microbiology* **143**, 1235–1242 (1997).
150. Tippelt, A., Jahnke, L. & Poralla, K. Squalene-hopene cyclase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): A bacterium producing hopanoids and steroids. *Biochim. Biophys. Acta* 223–232 (1998).
151. Shinozaki, J., Shibuya, M., Masuda, K. & Ebizuka, Y. Squalene cyclase and oxidosqualene cyclase from a fern. *FEBS Lett.* **582**, 310–318 (2008).
152. Shinozaki, J., Shibuya, M., Takahata, Y., Masuda, K. & Ebizuka, Y. Molecular evolution of fern squalene cyclases. *ChemBioChem* **11**, 426–433 (2010).

153. Sato, T., Hoshino, H., Yoshida, S., Nakajima, M. & Hoshino, T. Bifunctional triterpene/sesquiterpene cyclase tetraprenyl- β -curcumene cyclase is also squalene cyclase in *Bacillus megaterium*. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17540–17543 (2011).
154. Buntel, C.J. & Griffin, J.H. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the oxidosqualene cyclase from *Candida albicans*. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9711–9713 (1992).
155. Corey, E.J., Matsuda, S.P.T. & Bartel, B. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11628–11632 (1993).
156. Corey, E.J., Matsuda, S.P.T. & Bartel, B. Molecular cloning, characterization and overexpression of ERG7, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding lanosterol synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2211–2215 (1994).
157. Baker, C.H., Matsuda, S.P.T., Liu, D.R. & Corey, E.J. Molecular cloning of the human gene encoding lanosterol synthase from a liver cDNA library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 154–160 (1995).
158. Abe, I. & Prestwich, G.D. Molecular cloning, characterization, and functional expression of rat oxidosqualene cyclase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9274–9278 (1995).
159. Corey, E.J., Matsuda, S.P.T., Baker, C.H., Ting, A.Y. & Cheng, H. Molecular cloning of a *Schizosaccharomyces pombe* cDNA encoding lanosterol synthase and investigation of conserved tryptophan residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 327–331 (1996).
160. Morita, M., Shibuya, M., Lee, M.-S., Sankawa, U. & Ebizuka, Y. Molecular cloning of pea cDNA encoding cycloartenol synthase and its functional expression in yeast. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 770–775 (1997).
161. Kushiro, T., Shibuya, M. & Ebizuka, Y. Beta-amyrin synthase-cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* **256**, 238–244 (1998).
162. Hayashi, H. *et al.* Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 231–234 (2000).
163. Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. & Ebizuka, Y. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). *Eur. J. Biochem.* **267**, 3453–3460 (2000).
164. Godzina, S.M. *et al.* Cloning and characterization of the *Dictyostelium discoideum* cycloartenol synthase cDNA. *Lipids* **35**, 249–255 (2000).

165. Buckner, F.S., Nguyen, L.N., Joubert, B.M. & Matsuda, S.P.T. Cloning and heterologous expression of the Trypanosoma brucei lanosterol synthase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**, 399–403 (2000).
166. Segura, M.J.R., Meyer, M.M. & Matsuda, S.P.T. Arabidopsis thaliana LUP1 converts oxidosqualene to multiple triterpene alcohols and a triterpene diol. *Org. Lett.* **2**, 2257–2259 (2000).
167. Abe, I., Naito, K., Takagi, Y. & Noguchi, H. Molecular cloning, expression, and site-directed mutations of oxidosqualene cyclase from Cephalosporium caerulens. *Biochim. Biophys. Acta* **1522**, 67–73 (2001).
168. Husselstein-Muller, T., Schaller, H. & Benveniste, P. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualene-triterpenoid cyclases from Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* **45**, 75–92 (2001).
169. Haralampidis, K. *et al.* A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoprotectants in monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13431–13436 (2001).
170. Kawano, N., Ichinose, K. & Ebizuka, Y. Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding oxidosqualene cyclases from Costus speciosus. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 477–482 (2002).
171. Wu, T.-K. *et al.* Purification, tandem mass characterization, and inhibition studies of oxidosqualene-lanosterol cyclase enzyme from bovine liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **421**, 42–53 (2004).
172. Shibuya, M., Adachi, S. & Ebizuka, Y. Cucurbitadienol synthase, the first committed enzyme for cucurbitacin biosynthesis, is a distinct enzyme from cycloartenol synthase for phytosterol biosynthesis. *Tetrahedron* **60**, 6995–7003 (2004).
173. Kim, O.-T., Kim, M.-Y., Hwang, S.-J., Ahn, J.-C. & Hwang, B. Cloning and molecular analysis of cDNA encoding cycloartenol synthase from Centella asiatica. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 16–22 (2005).
174. Xiong, Q., Wilson, W.K. & Matsuda, S.P.T. An Arabidopsis oxidosqualene cyclase catalyzes iridal skeleton formation by Grob fragmentation. *Angew. Chem.* **118**, 1307–1310 (2006).
175. Xiang, T. *et al.* A new triterpene synthase from Arabidopsis thaliana produces a tricyclic triterpene with two hydroxyl groups. *Org. Lett.* **8**, 2835–2838 (2006).
176. Basyuni, M. *et al.* Molecular cloning and functional expression of a multifunctional triterpene synthase cDNA from a mangrove species Kandelia candel (L.) Druce. *Phytochemistry* **67**, 2517–2524 (2006).

177. Basyuni, M., Oku, H., Tsujimoto, E. & Baba, S. Cloning and functional expression of cycloartenol synthases from mangrove species *Rhizophora stylosa* Griff. and *Kandelia candel.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1788–1792 (2007).
178. Nakano, C., Motegi, A., Sato, T., Onodera, M. & Hoshino, T. Sterol Biosynthesis by a prokaryote: First in vitro identification of the genes encoding squalene epoxidase and lanosterol synthase from *Methylococcus capsulatus.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2543–2550 (2007).
179. Lodeiro, S. *et al.* An oxidosqualene cyclase makes numerous products by diverse mechanisms: A challenge to prevailing concepts of triterpene biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11213–11222 (2007).
180. Shibuya, M. *et al.* Origin of structural diversity in natural triterpenes: Direct synthesis of seco-triterpene skeletons by oxidosqualene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1450–1455 (2007).
181. Kolesnikova, M.D., Wilson, W.K., Lynch, D.A., Obermeyer, A.C. & Matsuda, S.P.T. Arabidopsis camelliol C synthase evolved from enzymes that make pentacycles. *Org. Lett.* **9**, 5223–5226 (2007).
182. Shibuya, M., Sagara, A., Saitoh, A., Kushiro, T. & Ebizuka, Y. Biosynthesis of baccharis oxide, a triterpene with a 3,10-oxide bridge in the A-ring. *Org. Lett.* **10**, 5071–5074 (2008).
183. Morlacchi, P. *et al.* Product profile of PEN3: The last unexamined oxidosqualene cyclase in *Arabidopsis thaliana.* *Org. Lett.* **11**, 2627–2630 (2009).
184. Kim, O.-T. *et al.* Characterization of a dammarenediol synthase in *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 998–1002 (2009).
185. Shang, C.-H., Shi, L., Ren, A., Qin, L. & Zhao, M.-W. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a lanosterol synthase gene from *Ganoderma lucidum.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 974–978 (2010).
186. Wang, Z., Yeats, T., Han, H. & Jetter, R. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: Enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids. *J. Biol. Chem.* **285**, 29703–29712 (2010).
187. Sawai, S. *et al.* Molecular characterization of an oxidosqualene cyclase that yields shionone, a unique tetracyclic triterpene ketone of *Aster tataricus.* *FEBS Lett.* **585**, 1031–1036 (2011).
188. Ito, R. *et al.* Triterpene cyclases from *Oryza sativa* L.: cycloartenol, parkeol and achilleol B synthases. *Org. Lett.* **13**, 2678–2681 (2011).

189. Sun, T. & Kamiya, Y. The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **6**, 1509–1518 (1994).
190. Bensen, R.J. *et al.* Cloning and characterization of the maize An1 gene. *Plant Cell* **7**, 75–84 (1995).
191. Kawaide, H., Imai, R., Sassa, T. & Kamiya, Y. ent-Kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. *J. Biol. Chem.* **272**, 21706–21712 (1997).
192. Toyomasu, T. *et al.* Cloning of a full-length cDNA encoding ent-Kaurene synthase from *Gibberella fujikuroi*: Functional analysis of a bifunctional diterpene cyclase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 660–664 (2000).
193. Schepmann, H.G., Pang, J. & Matsuda, S.P.T. Cloning and characterization of Ginkgo biloba levopimaradiene synthase which catalyzes the first committed step in ginkgolide biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **392**, 263–269 (2001).
194. Peters, R.J., Ravn, M.M., Coates, R.M. & Croteau, R.B. Bifunctional abietadiene synthase: Free diffusive transfer of the (+)-copalyl diphosphate intermediate between two distinct active sites. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8974–8978 (2001).
195. Dairi, T. *et al.* Eubacterial diterpene cyclase genes essential for production of the isoprenoid antibiotic terpentecin. *J. Bacteriol.* **183**, 6085–6094 (2001).
196. Toyomasu, T. *et al.* Cloning of a gene cluster responsible for the biosynthesis of diterpene aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase alpha. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 146–152 (2004).
197. Pristic, S., Xu, M., Wilderman, P.R. & Peters, R.J. Rice Contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol.* **136**, 4228–4236 (2004).
198. Nakano, C., Okamura, T., Sato, T., Dairi, T. & Hoshino, T. Mycobacterium tuberculosis H37Rv3377c encodes the diterpene cyclase for producing the halimane skeleton. *Chem. Commun.* 1016–1018 (2005).
199. Hayashi, K.-I. *et al.* Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Lett.* **580**, 6175–6181 (2006).
200. Bömke, C., Rojas, M.C., Gong, F., Hedden, P. & Tudzynski, B. Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5325–5339 (2008).
201. Toyomasu, T. *et al.* Identification of diterpene biosynthetic gene clusters and functional analysis of labdane-related diterpene cyclases in *Phomopsis amygdali*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1038–1047 (2008).

202. Toyomasu, T. *et al.* Cloning and characterization of cDNAs encoding ent-copalyl diphosphate synthases in wheat: Insight into the evolution of rice phytoalexin biosynthetic genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 772–775 (2009).
203. Morrone, D. *et al.* Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Lett.* **583**, 475–480 (2009).
204. Keeling, C.I. *et al.* Identification and functional characterization of monofunctional ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in white spruce reveal different patterns for diterpene synthase evolution for primary and secondary metabolism in gymnosperms. *Plant Physiol.* **152**, 1197–1208 (2010).
205. Falara, V., Pichersky, E. & Kanellis, A.K. A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant Physiol.* **154**, 301–310 (2010).
206. Mafu, S., Hillwig, M.L. & Peters, R.J. A novel labda-7,13e-dien-15-ol-producing bifunctional diterpene synthase from *Selaginella moellendorffii*. *ChemBioChem* **12**, 1984–1987 (2011).
207. Zerbe, P. *et al.* Bifunctional cis-abienol synthase from *Abies balsamea* discovered by transcriptome sequencing and its implications for diterpenoid fragrance production. *J. Biol. Chem.* **287**, 12121–12131 (2012).
208. Günnewich, N. *et al.* A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8R)-hydroxy-copalyl diphosphate. *Phytochemistry* **91**, 93–99 (2013).
209. Thoma, R. *et al.* Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* **432**, 118–122 (2004).
210. Barton, D.H.R. *et al.* Investigations on the biosynthesis of steroids and terpenoids. Part XII. Biosynthesis of 3beta-hydroxy-triterpenoids and -steroids from (3S)-2,3-epoxy-2,3-dihydrosqualene. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1134–1138 (1975).
211. Köksal, M., Hu, H., Coates, R.M., Peters, R.J. & Christianson, D.W. Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 431–433 (2011).
212. Zhou, K. *et al.* Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 6840–6850 (2012).
213. Soskine, M. & Tawfik, D.S. Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 572–582 (2010).

214. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Express. Purif.* **41**, 207–234 (2005).
215. Ochs, D., Tappe, C.H., Gärtner, P., Kellner, R. & Poralla, K. Properties of purified squalene-hopene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* **194**, 75–80 (1990).
216. Gally, C. Effect of detergents on substrate conversion by squalene-hopene cyclases. *Diplomarbeit* 1–68 (2011).
217. Dominicus, J.M. Enzymatische Synthese von neuartigen Heterozyklen mit Triterpenzyklen. *Diplomarbeit* 1–90 (2011).
218. Hammer, S.C., Dominicus, J.M., Syrén, P.-O., Nestl, B.M. & Hauer, B. Stereoselective Friedel-Crafts alkylation catalyzed by squalene hopene cyclases. *Tetrahedron* **68**, 7624–7629 (2012).
219. Gao, J. & Han, G. Cytotoxic abietadiene diterpenoids from *Caryopteris Incana*. *Phytochemistry* **44**, 759–761 (1997).
220. Zambrano, J.L., Rosales, V. & Nakano, T. First formal synthesis of (+)-nimbiol. Synthesis, X-ray structure and anticancer activity of a novel ring C aromatic diterpene: Dimethyl(+)-podocarpa-8,11,13-triene-12,13-dicarboxylate. *Tetrahedron Lett.* **44**, 1859–1862 (2003).
221. Miyake, T., Kigoshi, H. & Akita, H. Chemoenzymatic synthesis of (+)-totarol, (+)-podototarol, (+)-semperviol, and (+)-jolkinolides E and D. *Tetrahedron Asymmetr.* **18**, 2915–2922 (2007).
222. Mackenzie, L. *et al.* SHIP1 modulators and methods related thereto. WO Patent 2011/069118 A1 (2011).
223. Frija, L.M.T., Frade, R.F.M. & Afonso, C.A.M. Isolation, chemical and biotransformation routes of labdane-type diterpenes. *Chem. Rev.* **111**, 4418–4452 (2011).
224. Gan, Y., Li, A., Pan, X., Chan, A.S.C. & Yang, T. Stereoselective synthesis of (–)-6,7-dehydroferruginyl methyl ether. *Tetrahedron Asymmetr.* **11**, 781–787 (2000).
225. Michael, J.P. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **14**, 11–20 (1997).
226. Sturm, E. & Vogel, C. Substituted 2-azabicycloalkanes as selective herbicides. US Patent 3936458 (1976).
227. Daly, J.W. *et al.* Decahydroquinoline alkaloids: Noncompetitive blockers for nicotinic acetylcholine receptor-channels in pheochromocytoma cells and *Torpedo* electroplax. *Neurochem. Res.* **16**, 1207–1212 (1991).

228. Lenhart, A. *et al.* Binding structures and potencies of oxidosqualene cyclase inhibitors with the homologous squalene-hopene cyclase. *J. Med. Chem.* **46**, 2083–2092 (2003).
229. Schmid, J. Biokatalytische Synthese von Heterozyklen mittels Squalen-Hopen-Zyklasten. *Bachelorarbeit* 1–50 (2012).
230. Moser, X. Biokatalytische Bildung von schwefelhaltigen Verbindungen. *Bachelorarbeit* 1–63 (2012).
231. Marjanovic, A. Evolvierbarkeit und Veränderung des Substratspektrums der Squalen-Hopen Cyclase von *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Diplomarbeit* 1–112 (2014).
232. Merlini, V., Luparia, M., Porta, A., Zanoni, G. & Vidari, G. Biomimetic cyclization of geraniol derivatives, a useful tool in the total synthesis of bioactive monocyclic terpenoids. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 465–476 (2011).
233. Kuhn, M. Synthese und Charakterisierung von Modellsubstraten zur Untersuchung des katalytischen Potentials von Squalen-Hopen Zyklasten. *Bachelorarbeit* 1–65 (2013).
234. Hoshino, T., Nakano, S., Kondo, T., Sato, T. & Miyoshi, A. Squalene-hopene cyclase: Final deprotonation reaction, conformational analysis for the cyclization of (3R,S)-2,3-oxidosqualene and further evidence for the requirement of an isopropylidene moiety. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 1456–1470 (2004).
235. Lenardão, E.J., Botteselle, G. V., de Azambuja, F., Perin, G. & Jacob, R.G. Citronellal as key compound in organic synthesis. *Tetrahedron* **63**, 6671–6712 (2007).
236. Mäki-Arvela, P. *et al.* Cyclization of citronellal over zeolites and mesoporous materials for production of isopulegol. *J. Catal.* **225**, 155–169 (2004).
237. Wang, Q., Canutescu, A.A. & Dunbrack, R.L. SCWRL and MolIDE: Computer programs for side-chain conformation prediction and homology modeling. *Nat. Protoc.* **3**, 1832–1847 (2008).
238. Rueping, M., Kuenkel, A. & Atodiresei, I. Chiral Brønsted acids in enantioselective carbonyl activations-activation modes and applications. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 4539–4549 (2011).
239. Yoder, R.A. & Johnston, J.N. A case study in biomimetic total synthesis: Polyolefin carbocyclizations to terpenes and steroids. *Chem. Rev.* **105**, 4730–4756 (2005).
240. Yamamoto, H. & Futatsugi, K. “Designer acids”: Combined acid catalysis for asymmetric synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 1924–1942 (2005).
241. Knowles, R.R., Lin, S. & Jacobsen, E.N. Enantioselective thiourea-catalyzed cationic polycyclizations. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5030–5032 (2010).

242. Brunoldi, E., Luparia, M., Porta, A., Zanoni, G. & Vidari, G. Biomimetic cyclizations of functionalized isoprenoid polyenes: A cornucopia of synthetic opportunities. *Curr. Org. Chem.* **10**, 2259–2282 (2006).
243. Ishihara, K., Nakamura, S. & Yamamoto, H. The first enantioselective biomimetic cyclization of polyprenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4906–4907 (1999).
244. Ishihara, K., Ishibashi, H. & Yamamoto, H. Enantioselective biomimetic cyclization of homo(polyprenyl)arenes. A new entry to (-)-Tetracyclic Polyprenoid of sedimentary origin. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1505–1506 (2001).
245. Ishibashi, H., Ishihara, K. & Yamamoto, H. A new artificial cyclase for polyprenoids: Enantioselective total synthesis of (-)-chromazonarol, (+)-8-epi-puupehedione, and (-)-11'-deoxytaondiol methyl ether. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11122–11123 (2004).
246. Surendra, K. & Corey, E.J. Highly enantioselective proton-initiated polycyclization of polyenes. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11992–11994 (2012).
247. Yonemura, Y., Ohyama, T. & Hoshino, T. Chemo-enzymatic syntheses of drimane-type sesquiterpenes and the fundamental core of hongoquercin meroterpenoid by recombinant squalene-hopene cyclase. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 440–446 (2012).
248. Seitz, M. Characterization of the substrate specificity of squalene-hopene cyclases. *Dissertation* 1–176 (2012).
249. Geris, R. & Simpson, T.J. Meroterpenoids produced by fungi. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1063–1094 (2009).
250. Schäfer, B. Ambrox®. *Chem. Unserer Zeit* **45**, 374–388 (2011).
251. Evans, G.B., Furneaux, R.H., Gravestock, M.B., Lynch, G.P. & Scott, G.K. The synthesis and antibacterial activity of totarol derivatives. Part 1: Modifications of ring-C and pro-drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1953–1964 (1999).
252. Tacon, C., Guantai, E.M., Smith, P.J. & Chibale, K. Synthesis, biological evaluation and mechanistic studies of totarol amino alcohol derivatives as potential antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 893–902 (2012).
253. Hammer, S.C., Marjanovic, A., Dominicus, J.M., Nestl, B.M. & Hauer, B. Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 121–126.
254. Beszant, S., Giannini, E., Zanoni, G. & Vidari, G. Enantioselective synthesis of both enantiomers of γ -ionone, γ -damascone, karahana lactone and karahana ether. *Tetrahedron Asymmetr.* **13**, 1245–1255 (2002).

-
255. Kleiner, C.M. & Schreiner, P.R. Hydrophobic amplification of noncovalent organocatalysis. *Chem. Commun.* 4315–4317 (2006).
256. Rueping, M. & Theissmann, T. Asymmetric Brønsted acid catalysis in aqueous solution. *Chem. Sci.* **1**, 473–476 (2010).
257. Cannon, W.R. & Benkovic, S.J. Solvation, reorganization energy, and biological catalysis. *J. Biol. Chem.* **273**, 26257–26260 (1998).
258. Rajagopalan, P.T.R. & Benkovic, S.J. Preorganization and protein dynamics. *Chem. Rec.* **2**, 24–36 (2002).
259. Rajamani, R. & Gao, J. Balancing kinetic and thermodynamic control: The mechanism of carbocation cyclization by squalene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12768–12781 (2003).
260. Tian, B.-X. & Eriksson, L.A. Catalytic mechanism and product specificity of oxidosqualene-lanosterol cyclase: A QM/MM study. *J. Phys. Chem. B* **116**, 13857–13862 (2012).
261. Major, D.T., Freud, Y. & Weitman, M. Catalytic control in terpenoid cyclases: Multiscale modeling of thermodynamic, kinetic, and dynamic effects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **21**, 25–33 (2014).
262. Zhang, J., Wei, C. & Li, C. Cu(I)Br mediated coupling of alkynes with N-acylimine and N-acyliminium ions in water. *Tetrahedron Lett.* **43**, 5731–5733 (2002).
263. Höhne, M., Schätzle, S., Jochens, H., Robins, K. & Bornscheuer, U.T. Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 807–813 (2010).
264. Kotik, M., Archelas, A. & Wohlgemuth, R. Epoxide hydrolases and their application in organic synthesis. *Curr. Org. Chem.* **16**, 451–482 (2012).
265. Goldsmith, M. & Tawfik, D.S. Enzyme engineering by targeted libraries. *Methods Enzym.* **523**, 257–283 (2013).
266. Ruff, A.J., Dennig, A. & Schwaneberg, U. To get what we aim for - Progress in diversity generation methods. *FEBS J.* **280**, 2961–2978 (2013).
267. Tokuriki, N. & Tawfik, D.S. Protein dynamism and evolvability. *Science* **324**, 203–207 (2009).
268. Babbie, A., Tokuriki, N. & Hollfelder, F. What makes an enzyme promiscuous? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 200–207 (2010).
269. Savile, C.K. *et al.* Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. *Science* **329**, 305–309 (2010).

270. Sandström, A.G., Wikmark, Y., Engström, K., Nyhlén, J. & Bäckvall, J.-E. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 78–83 (2012).
271. Arnold, F.H. How proteins adapt: Lessons from directed evolution. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **74**, 41–46 (2009).
272. Tracewell, C.A. & Arnold, F.H. Directed enzyme evolution: Climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 3–9 (2009).
273. Jiménez-Osés, G. *et al.* The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 431–436 (2014).
274. Breslow, R. Biomimetic chemistry: Biology as an inspiration. *J. Biol. Chem.* **284**, 1337–1342 (2009).
275. Knowles, R.R. & Jacobsen, E.N. Attractive noncovalent interactions in asymmetric catalysis: Links between enzymes and small molecule catalysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 20678–20685 (2010).
276. Bernardi, L., Fochi, M., Comes Franchini, M. & Ricci, A. Bioinspired organocatalytic asymmetric reactions. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 2911–2922 (2012).
277. Copley, S.D. Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265–272 (2003).
278. O'Brien, P.J. & Herschlag, D. Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem. Biol.* **6**, R91–R105 (1999).
279. Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. & Ladner, W. Optically active amines via lipase-catalyzed methoxyacetylation. *J. Prakt. Chem.* **339**, 381–384 (1997).
280. De Jong, R.M. *et al.* Structural basis for the enantioselectivity of an epoxide ring opening reaction catalyzed by halo alcohol dehalogenase HheC. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13338–13343 (2005).
281. Hasnaoui-Dijoux, G., Majerić Elenkov, M., Lutje Spelberg, J.H., Hauer, B. & Janssen, D.B. Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening. *ChemBioChem* **9**, 1048–1051 (2008).
282. Fox, R.J. *et al.* Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nat. Biotechnol.* **25**, 338–344 (2007).
283. Greenhagen, B.T., O'Maille, P.E., Noel, J.P. & Chappell, J. Identifying and manipulating structural determinates linking catalytic specificities in terpene synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 9826–9831 (2006).

-
284. Hiseni, A. Study towards carotenoid 1,2-hydratase and oleate hydratase as novel biocatalysts. *Dissertation* 1–151 (2014).
285. Ciochina, R. & Grossman, R.B. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chem. Rev.* **106**, 3963–3986 (2006).
286. Richard, J.-A., Pouwer, R.H. & Chen, D.Y.-K. The chemistry of the polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 4536–4561 (2012).
287. Oppolzer, W. & Snieckus, V. Intramolekulare En-Reaktion in der organischen Synthese. *Angew. Chem.* **90**, 506–516 (1978).
288. Mikami, K. & Shimizu, M. Asymmetric ene reactions in organic synthesis. *Chem. Rev.* **92**, 1021–1050 (1992).
289. Schäfer, B. *Naturstoffe der chemischen Industrie*. 1–544 (Spektrum Akademischer Verlag, 2006).
290. Studier, F.W. & Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
291. Dubendorff, J.W. & Studier, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**, 45–59 (1991).
292. Bertani, G. Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300 (1951).
293. Tartoff, K.D. & Hobbs, C.A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**, 12 (1987).
294. Mullis, K.B. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273 (1986).
295. Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzym.* **155**, 335–350 (1987).
296. Saiki, R.K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
297. Chen, I. & Dubnau, D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 241–249 (2004).
298. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28 (1990).

299. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
300. Promega. Transforming Bacteria: Modified RbCl Method. *Subcloning Notebook* 43–48 (2004).
301. Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
302. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977).
303. Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Jahnke, P. & Smith, M. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* **253**, 6551–6560 (1978).
304. Ling, M.M. & Robinson, B.H. Approaches to DNA mutagenesis: An overview. *Anal. Biochem.* **254**, 157–178 (1997).
305. Grabski, A., Mehler, M. & Drott, D. The overnight express autoinduction system: High-density cell growth and protein expression while you sleep. *Nat. Methods* **2**, 233–235 (2005).
306. Ruiz, C.C., Molina-Bolivar, J.A. & Aguiar, J. Thermodynamic and structural studies of Triton X-100 micelles in ethylene glycol-water mixed solvents. *Langmuir* **17**, 6831–6840 (2001).
307. Hjelmeland, L.M., Nebert, D.W. & Osborne, J.C. Sulfobetaine derivatives of bile acids: Nondenaturing surfactants for membrane biochemistry. *Anal. Biochem.* **130**, 72–82 (1983).
308. Weber, K. & Osborn, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406–4412 (1969).
309. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
310. Gallagher, S.R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 10**, Unit 10.2A (2006).
311. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **254**, 248–254 (1976).
312. Nakamura, S., Ishihara, K. & Yamamoto, H. Enantioselective biomimetic cyclization of isoprenoids using Lewis acid-assisted chiral Brønsted acids: Abnormal claisen rearrangements and successive cyclizations. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8131–8140 (2000).

313. Tsangarakis, C., Raptis, C., Arkoudis, E. & Stratakis, M. Zeolite NaY-promoted monocyclization of epoxy polyene terpenes: A unique route for the direct synthesis of incompletely cyclized naturally occurring terpenols. *Adv. Synth. Catal.* **350**, 1587–1600 (2008).
314. Surendra, K. & Corey, E.J. Rapid and enantioselective synthetic approaches to germanicol and other pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8865–8869 (2008).
315. Mitchell, J.M. & Finney, N.S. New molybdenum catalysts for alkyl olefin epoxidation. Their implications for the mechanism of oxygen atom transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 862–869 (2001).
316. Mordini, A. *et al.* Superbase-promoted rearrangement of oxiranes to cyclopropanes. *Tetrahedron* **61**, 3349–3360 (2005).
317. Bugarin, A., Jones, K.D. & Connell, B.T. Efficient, direct alpha-methylenation of carbonyls mediated by diisopropylammonium trifluoroacetate. *Chem. Commun.* **46**, 1715–1717 (2010).
318. Ozaki, S., Yoshinaga, H., Matsui, E. & Adachi, M. Synthesis of cyclic ketones by electrochemical reduction of S-(2-methoxycarbonyl)phenyl thioesters. *J. Org. Chem.* **66**, 2503–2505 (2001).
319. Zhu, Y., Zhao, B. & Shi, Y. Highly efficient Cu(I)-catalyzed oxidation of alcohols to ketones and aldehydes with diaziridinone. *Org. Lett.* **15**, 992–995 (2013).
320. Kokubo, M. & Kobayashi, S. Nazarov-type reactions in water. *Chem. Asian J.* **4**, 526–528 (2009).
321. Banwell, M.G., Hockless, D.C.R. & McLeod, M.D. Chemoenzymatic total syntheses of the sesquiterpene (-)-patchoulene. *New. J. Chem.* **27**, 50–59 (2003).
322. Oritani, T. & Yamashita, K. Synthesis and absolute stereochemistry of chiral γ -ionone and dihydro- γ -ionone. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1271–1275 (1987).
323. Serra, S., Gatti, F.G. & Fuganti, C. Lipase-mediated resolution of the hydroxy-cyclogeraniol isomers: Application to the synthesis of the enantiomers of karahana lactone, karahana ether, crocusatin C and γ -cyclogeraniol. *Tetrahedron Asymmetr.* **20**, 1319–1329 (2009).
324. Schulte, K.H. & Ohloff, G. Über eine aussergewöhnliche Stereospezifität bei der Hydroborierung der diastereomeren (1R)-Isopulegole mit Diboran. *Helv. Chim. Acta* **1**, 153–165 (1967).
325. Jacob, R.G., Perin, G., Loi, L.N., Pinno, C.S. & Lenardao, E.J. Green synthesis of (-)-isopulegol from (+)-citronellal: Application to essential oil of citronella. *Tetrahedron Lett.* **44**, 3605–3608 (2003).

326. Eddy, S.R. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**, 755–763 (1998).
327. Eddy, S.R. A probabilistic model of local sequence alignment that simplifies statistical significance estimation. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000069 (2008).
328. Eddy, S.R. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Inform.* **23**, 205–211 (2009).
329. Finn, R.D., Clements, J. & Eddy, S.R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucl. Acids Res.* **39**, W29–W37 (2011).

ANHANG

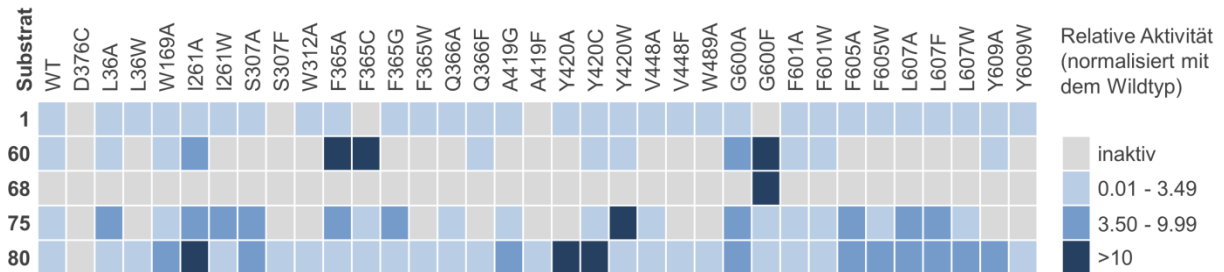


Abb. 34: Relative Aktivitäten der *AacSHC*-Mutantenbibliothek für verschiedene Substrate. Der Umsatz der einzelnen Mutanten wurde mit der Aktivität des Wildtyp-Enzyms normiert. Die relativen Aktivitäten sind farbkodiert. Eine hellgraue Kennzeichnung bedeutet, dass kein Umsatz detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu steht eine dunkelblaue Kennzeichnung für eine mind. 10-fach höhere Umsetzung im Vergleich zum Wildtyp. Aufgelistet sind die Ergebnisse für das Screening mit Squalen (**1**), Geraniol (**60**), Linalool (**68**), *rac*-6,7-Epoxygeraniol (**75**) und *rac*-Citronellal (**80**).

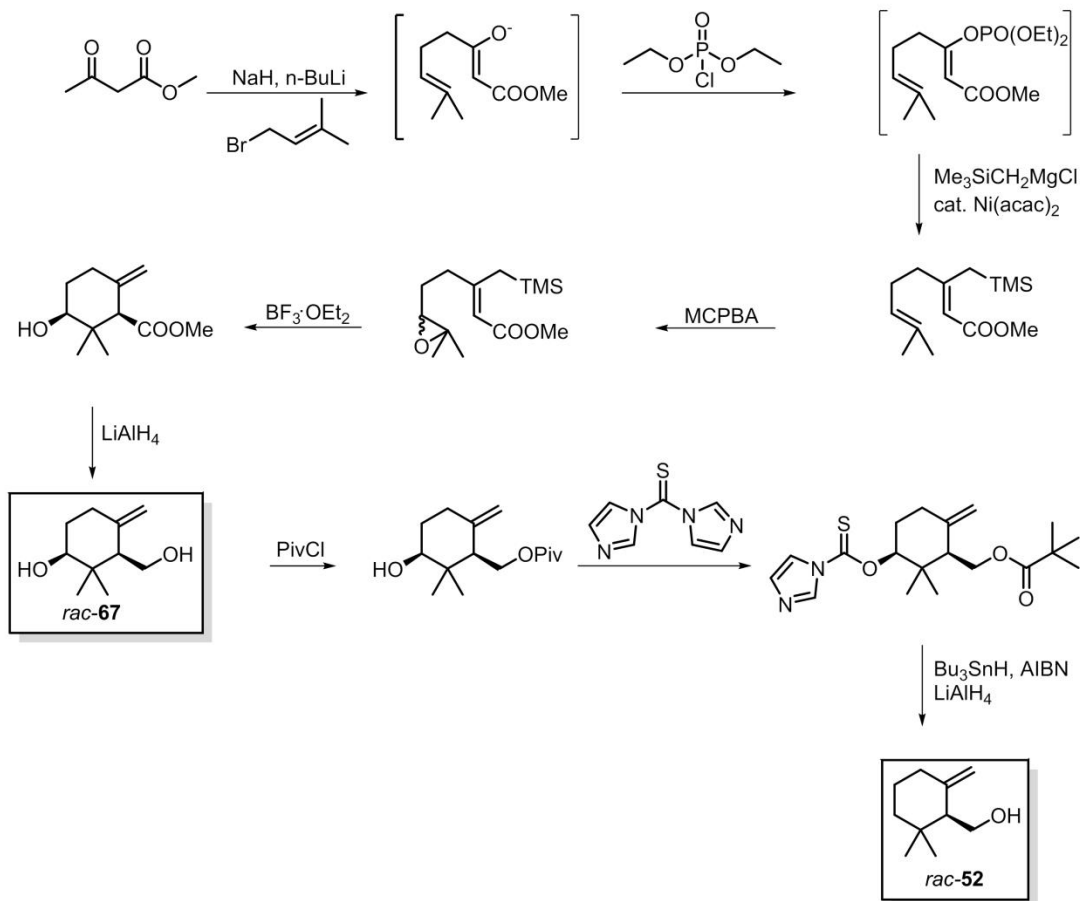


Abb. 35: Chemische Synthese von racemischen γ -Cyclogeraniol (**rac-52**) und *cis*-2-Hydroxy- γ -cyclogeraniol (**rac-67**). Beide Racemate wurden im Rahmen dieser Arbeit von Jörg Dominicus als analytische Standards synthetisiert, um die Enantiomerenüberschüsse der enzymatischen Synthesen von **52** und **67** zu bestimmen. Im allgemeinen wird die biomimetische Zyklisierung von linearen Isoprenoiden durch eine clevere Auswahl an Initiierungs- (z. B. Epoxid) und Terminationsgruppen (z. B. Allyltrimethylsilylgruppe) ermöglicht.²⁴² Die regioselektive Deprotonierung wird durch die Termination der Reaktion mit der Allyltrimethylsilylgruppe ermöglicht. Die Synthese von **rac-52** wird dann durch die Deoxygenierung von **rac-67** ermöglicht.^{232,253,254}

Gensequenzen der SHCs

Squalen-Hopen-Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) Uniprot: P33247

ATGGCGGAACAGCTGGTGAAGCGCCGGCGTATGCGCGCACCTGGATCGCGCGGTGGAATATCTGCTGAGCTGCCAGAAAGATGAA
 GGCTATTGGTGGGGCCCGCTGCTGAGCAACGTGACCATGGAAGCGGAATATGTGCTGCTGTGCCATATTCTGGATCGCGTGGATCGC
 GATCGCATGGAAAAATTCGCCGCTATCTGCTGCATGAACAGCGCGAAGATGGCACCTGGGCGCTGTATCCGGGCGGCCCGCCGGAT
 CTGGATACCACCATGAAGCGTATGTGGCGCTGAAATATATTGGCATGAGCCGCGATGAAGAACCGATGCAGAAAGCGCTGCGCTTT
 ATTCAGAGCCGGCGGGCATTGAAAGCGATCCATGATCGCCTGGTGAAGCGGGCGAATGGCTGGATCGCCAGATTACCGTGGAAAAAGTG
 CCGATGGTGCCGCCGAAATTTATGTTTCTGGGCAAACGCATGCCGCTGAACATTTATGAATTTGGCAGCTGGGCGCGCGACCGTG
 GTGGCGCTGAGCATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCTGCCGGAACCGCGCGCGCTGCCGGAATGTATGAAACCGATGTG
 CCGCCGCGCCCGCGCGCGGAAAGCGCGCGGCGGCTGGATTTTGTATGCGCTGGATCGCGCGCTGCATGGCTATCAGAAACTGAGC
 GTGCATCCGTTTTCCGCGCGCGCGGAAATTCGCGCGCTGGATTGGCTGCTGGAACGCCAGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCATT
 CAGCCGCGTGGTTTTATGCGCTGATTGCGCTGAAAATTTCTGGATATGACCCAGCATCCGGCGTTTTATTAAGGCTGGGAAGGCGCTG
 GAACTGTATGGCGTGAACCTGGATTATGGCGGCTGGATGTTTCAGGCGAGCATTAGCCCGGTGTGGGATACCGGCTGCGCGTGTG
 GCGCTGCGCGCGGGCGGCTGCCGCGGATCATGATCGCCTGGTGAAGCGGGCGAATGGCTGGATCGCCAGATTACCGTGGCCCG
 GCGATTGGGCGGTGAACCGCCGAACTGAAACCGGGCGGCTTTCGTTTTAGTTGATAACGTGTATTATCCGGATGTGGATGAT
 ACCGCGGTGGTGGTGGGCGCTGAACACCTGCGCCTGCCGATGAACGCCCGCGCGATGCGATGACCAAAGGCTTTCGCTGG
 ATTGTGGGCATGCAGAGCAGCAACGGCGGCTGGGGCGCTATGATGTGGATAACACCAGCGATCTGCCGAACCATATTCGGTTTTG
 GATTTTGGCGAAGTGACCGATCCGCCGAGCGAAGATGTGACCCGCGATGTGCTGGAATGCTTTGGCAGCTTTGGCTATGATGATGCG
 TGGAAAGTGATTCGCCGCGCGGTGGAATATCTGAAACCGCAACAGAAACCGGATGGCAGCTGGTTTGGCCGCTGGGGCGTGAAC
 CTGTATGGCACCGCGCGGTGGTGAAGCGCGCTGAAAGCGGTGGCATTGATACCCGCGAACCCTATATTAGAAAGCGCTGGATTGG
 GTGGAACAGCATCAGAACC CGGATGGCGGCTGGGGCGAAGATTGCCGAGCTATGAAGATCCGGCGTATGCCGGCAAAGCGCGGAGC
 ACCCCGAGCCAGACCGCTGGGCGCTGATGGCGCTGATTGCGGGCGCGCGCGAAAGCGAAGCGGCGCGCGCGGCGTGCAGTAT
 CTGGTGGAAACCAGCGCCCGGATGGCGGCTGGGATGAACCGTATTATACCCGACCGGGTCCCGGGCGATTTTTATCTGGGCTAT
 ACCATGTATCGCCATGTGTTTCCGACCCTGGCGCTGGGCCGCTATAAACAGGCGATTGAACGCCGCTAA

Squalen-Hopen-Zyklase 1 aus *Zymomonas mobilis* (ZmoSHC1) Uniprot: Q5NM88

ATGGGTATTGACAGAATGAATAGCTTAAAGTCGCTTGTAAATGAAGAAGATTTTCGGGGCTGAAAAACCTCGTATAAACCGGCTTCC
 GATACCATAATCGAACCGGATACCTGAAAAGACCGAACCGCGGCTGAACCGACGGCAAAAGTCGACAAAACGATATTCAAGACT
 ATGGGAATAGTCTGAATAATACCTTGTTCAGCCTGTGACTGGTTGATCGGACAACAAAAGCCCGATGGTCAATGGGTCGGTGCC
 GTGGAATCCAATGCTTCGATGGAAGCAGAATGGTGTCTGGCCTTGTGGTTTTTGGGTCTGGAAGATCATCCGCTTCGTCCAAGATTG
 GGCAATGCTCTTTTGGAAATGCAGCGGGAAGATGGCTCTTGGGAGTCTATTTCCGCGCTGGAAATGGCGATATCAATGCCACGGTT
 GAAGCCTATGCGGCTTGCGGTCTTTGGGGTATCTGCCGATAATCCTGTTTTGAAAAAGCGGCAGCATGGATTGCTGAAAAAGGC
 GGATTAAAAAATATCCGTGCTTTACCCGTTATTGGCTGGCGTTGATCGGGGAATGGCCTTGGGAAAAGACCCCTAACCTTCCCCCT
 GAAATATCTGGTTCCCTGATAATTTTGTCTTTTCGATTTATAATTTTGCCCAATGGGCGCGGGCAACCATGGTGGCGATTTGCTATT
 CTGTCGCGAGACGACCAAGCCCGCGCTGCGCCCTCAAGACCGATTGGATGAACTGTTTTCCAGAAGGCCGCGCTCGCTTTGATTAT
 GAATTTGCCGAAAAAAGAGGCATCGATCTTTGGTCGCAATTTTCCGAACCACTGACCGTGGATTACATTGGGTTTCAGTCCAATCTG
 TTAAGCGCAATAGCTTGCCTGAAGCCGCTATCCGTCATGTTTTGGAATGGATTATCCGGCATCAGGATGCCGATGGCGGTTGGGGT
 GGAATTCAGCCACCTTGGGTCTATGGTTTGTATGGCGTTACATGGTGAAGGCTATCAGCTTTATCATCCGGTGTATGGCCAAGGCTTTG
 TCGGCTTTGGATGATCCCGTTGGCGACATGACAGAGGCGAGTCTTCTGGATACAGGCCACCAATAGTCCGGTATGGGATACAATG
 TTGGCCTTGATGGCGTTAAAAGACGCCAAGGCCGAGGATCGTTTTACGCCGGAATGGATAAGGCCGCGGATTGGCTTTTGGCTCGA
 CAGGTCAAAGTCAAAGCGGATTGGTCAATCAAACGCCCCGATGTTGAACCGGTGGATGGCATTTGAATATGCCAATGATCGCTAT
 CCCGATACCGATGATACCGCCTCGCTTTGATCGCCCTTTCCCTTATCGTGTAAAGGAGGATGGCAAAGAAAGGCGTTGAGGAC
 GCCATTACCCGTGGGGTTAATGGTTGATCGCCATGCAAAGCGAATGTGGCGGTTGGGGAGCCTTTGATAAGGATAATAACAGAAGT
 ATCCTTTCCAAAATTCCTTTTTGTGATTTCCGAGAATCTATTGATCCGCCTTCAGTCGATGTAACGGCGCATGTTTTAGAGGCCTTT
 GGCACCTTGGGACTGTCCCGGATATGCCGGTCAACAAAAGCGATCGACTATGTCGGTTCCGAACAGGAAGCCGAAGGCGCGTGG
 TTTGGTCTTTGGGCGTTAATTTATCTATGGCACCGGTTGCGGTTCTGCCTGCTTTGGCGGCGATCGGTGAAGATATGACCCAGCCT
 TACATCACAAGGCTTGCATTTGGCTGGTTCGCACATCAGCAGGAAGACGGCGGTTGGGGCGAAAGCTGCTCTTCCATATGGAGATT
 GATCCATTGGGAAGGGCCCAACCAGCCGCTCCAGACTGCTTGGGCTTTGATGGGTTGATCGCGGCAATCGTCCCAGAGATTAT
 GAAGCCATTGCCAAGGGATTTATCTGATTGATCGCCAAGAGCAGGATGGTAGCTGGAAAGAAAGAATTTCACCGGACCGGGA
 TTTCCCGGTTATGGCGTGGGTGACAGGATCAAGTTGGATGATCCGGCTTTATCGAAACGATTGCTTCAAGGCGCTGAACTGTCACGG
 GCGTTTATGCTGCGTTATGATTTTTATCGGCAATTTCTCCCGATTATGGCGTTAAGTCGGGCGAGAGACTGATTGATTTGAATAAT
 TGA

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name Stephan Christian Hammer
Geburtsdaten 28.04.1981 in Kandel
Nationalität Deutsch

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

09/2010 – 12/2014 *Universität Stuttgart*
Doktorarbeit: Zur Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklasen als chirale Brønsted-Säuren in der asymmetrischen Katalyse.
Betreuer: Professor Dr. Bernhard Hauer.

09/2009 – 05/2010 *Philipps-Universität Marburg*
Diplomarbeit: Der Blaulichtrezeptor YtvA und seine Interaktion mit dem Stressosom (Note 1.0).
Betreuer: Professor Dr. Lars-Oliver Essen.

09/2008 – 03/2009 *University of Cambridge, UK*
Research project: Identification and characterization of small molecules that bind to a destabilized p53 mutant.
Betreuer: Professor Dr. Sir Alan Fersht.

10/2005 – 08/2009 *Philipps-Universität Marburg*
Studium Chemie (Abschlussnote: 1.1).

BERUFLICHE UND SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/2001 – 06/2005 *Kerschensteiner Bildungszentrum Ludwigshafen*
Ausbildung: Staatlich geprüfter Techniker (Fachrichtung Chemietechnik).

02/2001 – 09/2005 *BASF SE Ludwigshafen*
Beschäftigt als Chemielaborant. (Tätigkeitsfeld: Prozessentwicklung neuer Wirkstoffe im Bereich Pflanzenschutz).

09/1997 – 01/2001 *BASF SE Ludwigshafen*
Ausbildung: Chemielaborant.

09/1992 – 08/1997 *Alfred-Grosser Realschule Bad Bergzabern*

STIPENDIEN

03/2011 – 02/2014 *Kekulé-Stipendium (Fonds der Chemischen Industrie)*
09/2008 – 03/2009 *ERASMUS-Stipendium (University of Cambridge)*