

Studie zur Entwicklung eines neuen Biokatalysators zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen

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

vorgelegt von
Juliane Stahmer
aus Halle/Saale

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Mitberichter: Prof. Dr. Albert Jeltsch

Vorsitzender: Prof. Dr. Bernd Plietker

Tag der Verteidigung: 17. Juni 2015

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2011 bis November 2014 am Institut für Technische Biochemie unter der Leitung von Prof. Bernhard Hauer angefertigt.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel *Studie zur Entwicklung eines neuen Biokatalysators zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen* selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Juliane Stahmer

Stuttgart, 28. März 2015

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled *Study of the development of novel enzymes for the preparation of vicinal amino alcohols* is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Juliane Stahmer

Stuttgart, March, 28th 2015

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei Personen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt und motiviert haben.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Hauer bedanken, der es mir ermöglicht hat, mich mit einem sehr spannenden und herausfordernden Thema im Rahmen meiner Dissertation zu beschäftigen. Zusätzlich bedanke mich für die von ihm hervorbrachte Möglichkeit einen Forschungsaufenthalt in Seattle zu verbringen.

Anschließend möchte ich mich bei Dr. Bettina Nestl bedanken, die mich tatkräftig unterstützt hat und immer aufmunternde Worte für mich übrig hatte. Vielen Dank für die vielen nützlichen Tipps und Hinweise, das stets offene Ohr und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Auch bei meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. David Baker und Dr. Sinisa Bjelic möchte ich mich für die Unterstützung im Bereich des computerbasierten *de novo* Enzymdesigns bedanken. Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Kästner für die Berechnung der Übergangszustände und Dr. Birgit Claasen für die Unterstützung bei der Aufnahme von STD-NMR-Spektren.

Für das Übernehmen des Zweitgutachtens und des Vorsitz meiner Prüfung bedanke ich mich bei Prof. Dr. A. Jeltsch und Prof. Dr. B. Plietker.

Ich bedanke mich bei Dr. Bernd Nebel für die großartige Hilfe im Analytikbereich, für das Instandhalten der Geräte und für all die organisatorischen Dinge, die er für die Gruppe regelt. Ein ganz besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Dr.

Danksagungen

Stephan Hammer, der immer an mich geglaubt hat und mich immer wieder dazu ermuntert hat diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit mit der Limonenepoxidhydrolase bedanke ich mich bei meinen zwei Studenten Timo Bässler und Stefanie Zgorzelski. Bei Valerie Frideres bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit am *de novo* Projekt.

Sandra et Capitano Stephan, merci beaucoup pour les super moments passés ensemble, les dîners ainsi que les soirées. Cheers *! Aber auch ohne Christine, Daniel, Dennis, Jenny, Konrad, Lisa, Maike, Martin, Philipp, Philipp, Sandra, Sara, Sebastian, Silke, Sumi und all die anderen im Labor wäre die Zeit nur halb so schön, lustig und entspannt gewesen. Danke!

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich während meines Studiums und meiner Doktorandenzeit unterstützte. Abschließend möchte ich mich auch bei Bastian bedanken, der mich mit viel Geduld unterstützt hat.

Für Bastian.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Abkürzungen	xi
Zusammenfassung	xiii
Abstract	xv
1 Einleitung	1
1.1 Entwicklung neuer Biokatalysatoren	1
1.1.1 <i>Protein engineering</i> bestehender Enzyme	2
1.1.2 Artificielle Biokatalysatoren	3
1.2 Vicinale Aminoalkohole	9
1.2.1 Chemische Darstellung	10
1.2.2 Enzymatische Darstellung	13
1.3 Enzymkatalysierte Epoxidringöffnungsreaktionen	14
1.3.1 Epoxidhydrolasen	16
1.3.2 Limonen-1,2-epoxidhydrolase	17
1.3.3 Halohydrindehalogenasen	19
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien und Kits	23
2.1.2 Primer	23
2.1.3 Plasmide	24
2.2 Medien zum Kultivieren von <i>E. coli</i> -Zellen	27

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	<i>E. coli</i> Stämme	27
2.2.2	Medien	28
2.2.3	Zellwachstum und Dauerkulturen	28
2.3	Methoden	28
2.3.1	Plasmid Transformation	28
2.3.2	Herstellung chemischkompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen und Sequenzierung	29
2.3.4	Modifizierung eines Gens mittels QC™-Mutagenese	30
2.3.5	Klonierung von Plasmiden	31
2.3.6	Agarosegelelektrophorese	32
2.3.7	Proteinexpression	32
2.3.8	Zellaufschluss und Proteinaufbereitung	33
2.3.9	Diskontinuierliche SDS-PolyAcrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.3.10	Proteinkonzentrationsbestimmung	36
2.3.11	Immobilisation der LEH	36
2.4	Biotransformationen und Synthesen	37
2.4.1	Biotransformationen	37
2.4.2	Synthese von 3-Nitrostyroloxid (1b)	38
2.4.3	Synthese von 4-Methoxybenzamid (17b)	39
2.4.4	Synthese von <i>N</i> -(4-Methoxyphenyl)acetamide (18)	40
2.4.5	Synthese von 2-(3-Chloro-4-methoxyphenyl)amino)-2-(3-nitrophenyl)- ethanol (22a) und 2-(3-Chloro-4-methoxyphenyl)amino)-1-(3-nitro- phenyl)ethanol (22b)	41
2.4.6	Synthese von 3-Nitrostyrolldiol (23)	42
2.4.7	Synthese verschiedener β -Hydroxyetherderivate	43
2.4.8	Synthese verschiedener Aminoalkoholderivate	44
2.5	Analytik	44
2.5.1	Gaschromatographie (GC)	44
2.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	45
2.5.3	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	46

3 Ergebnisse	49
3.1 Strategie 1: Halohydrindehalogenase aus <i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1	49
3.2 Strategie 2: Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>	
DCL14	52
3.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung der LEH	53
3.2.2 Rationales Design der aktiven Tasche	57
3.2.3 Immobilisation der LEH-Wildtyp	58
3.3 Strategie 3: Computerbasierte <i>de novo</i> Epoxidlyasen	61
3.3.1 Design einer bimolekularen Reaktion	61
3.3.2 Entwicklung einer Analytikmethode	64
3.3.3 Optimierung der Reaktionsparameter ohne Enzym	66
3.3.4 Proteindesign	67
3.3.5 Expression und Charakterisierung der Proteine	72
3.3.6 Hydrolyseaktivität der ELs	80
3.3.7 Alkohole als alternative Nukleophile	81
4 Diskussion	83
4.1 Nukleophile Epoxidringöffnungsreaktionen	83
4.2 Stickstoffhaltige Nukleophile	86
4.3 Nutzung vorhandener katalytischer Zentren	89
4.4 Computerbasierte <i>de novo</i> Epoxidlyasen	93
4.4.1 Design einer bimolekularen Reaktion	93
4.4.2 Evaluation der Designs	95
Literaturverzeichnis	109
Anhang	121
Curriculum Vitae	133

Abkürzungen

°C	Grad Celsius (Einheit der Temperatur)
μ-	mikro ($\cdot 10^{-6}$)
δ	chemische Verschiebung [ppm]
c_n	Stoffmengenkonzentration [$M = \text{mol L}^{-1}$]
m	Masse [g]
V	Volumen [L]
Amp	Ampicillin
BCA	engl.: biconchonic acid (Biconchonsäure)
bp	Basenpaaren
bzw.	beziehungsweise
dH ₂ O	einfach deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	zweifach deionisiertes Wasser
DAD	engl. diode array detector
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Epoxidlyase
engl.	englisch
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm (Einheit der Masse)
GC	Gaschromatographie
h	engl. hour (Stunde, Einheit der Zeit)
HheC	Halohydrindehalogenase
HPLC	engl. High-Performance Liquid Chromatographie

Abkürzungen

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	kilo Dalton
L	Liter (Einheit des Volumens)
LB	engl.: lysogeny broth
LEH	Limonenepoxidhydrolase
M	Molar (Einheit der Stoffmengenkonzentration)
m	Meter (Einheit der Länge)
m-	milli ($\cdot 10^{-3}$)
min	Minute (Einheit der Zeit)
MS	Massenspektrometrie
n-	nano ($\cdot 10^{-9}$)
n.d.	nicht detektierbar
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
p-	piko ($\cdot 10^{-12}$)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
ppm	engl.: parts per million (Einheit der Chemischen Verschiebung δ)
RBS	Ribosomenbindestelle
s	Sekunde (Einheit der Zeit)
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
STD-NMR	engl. Saturation-Transfer Difference-NMR
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB	engl.: terrific broth
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ü.N.	über Nacht
ÜZ	Übergangszustand

Zusammenfassung

Das Ziel der Biokatalyse ist der Einsatz von Enzymen in der chemischen Industrie, um großtechnische Verfahren nachhaltiger und umweltfreundlicher zu gestalten. Oft werden zur Herstellung von Bausteinen für Pharmazeutika oder Kosmetika metallabhängige oder Organokatalysatoren eingesetzt, die in ihrer Herstellung meist teuer und toxisch sind. Obwohl es bereits einige Enzyme gibt, die Anwendung finden, gibt es noch sehr viele Reaktionen, für die es noch kein enzymkatalysiertes Pendant gibt. Die Aufgabe der modernen Biokatalyse besteht also darin, Enzyme für neue nicht-natürliche Reaktionen zu entwickeln. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher die Entwicklung eines neuen Biokatalysators für die Epoxidringöffnungsreaktion mit Aminen untersucht und studiert. Die dabei resultierenden vicinalen Aminoalkohole sind wichtige Zwischenprodukte für verschiedene Anwendungsgebiete der chemischen Industrie. Ihre chemische Herstellung basiert auf der Verwendung von teuren und toxischen Katalysatoren oder sie laufen nicht genügend selektiv ab.

Eine Möglichkeit der Entwicklung neuer Enzyme für nicht-natürliche Reaktionen stellt die Nutzung bereits vorhandener katalytischer Zentren dar. Dies ist eine gute Option, da viele in der organischen Synthese verwendeten Aktivierungstriebkräfte, wie zum Beispiel Säurekatalyse, auch in Enzymen auffindbar sind. Die organische Chemie und das Enzymdesign finden so einen Kontaktpunkt, der im Zuge dieser Arbeit ausgenutzt werden soll. So wurden drei Ansätze entwickelt, von denen zwei auf der Nutzung bereits vorhandener katalytischer Zentren beruhen und die dritte auf dem computerbasierten *de novo* Enzymdesign.

Es wurden zwei Enzyme ausgewählt, die bereits ein aktives katalytisches Zentrum zur Epoxidringöffnung mit Nucleophilen, wie Wasser oder Halogeniden, besitzen. Zum einen wurde die Halohydrindehalogenase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 ausgewählt, um das vorhandene Nucleophilspektrum um *NH*-Nucleophile, wie Amide, Ami-

dine oder Harnstoff zu erweitern. Zum Anderen sollte das Nukleophilspektrum der Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14 um primäre und sekundäre Amine erweitert werden. Die bestehende Konkurrenz eines neuen nicht-natürlichen Nukleophils zum Wassernukleophil sollte durch gezieltes Ändern der aktiven Taschen mittels *site-directed mutagenesis* und durch Immobilisationstechniken abgeschwächt oder unterdrückt werden. Allerdings führten die Reaktionen der Varianten der genannten Enzyme mit verschiedenen Epoxiden und den genannten *NH*-Nukleophilen nicht zum gewünschten Erfolg. Als dritter Ansatz diente die Verwendung der Rosetta Methode, die in Zusammenarbeit mit Dr. Sinisa Bjelic (University of Washington, Seattle, USA) benutzt wurde, um Enzymmodelle *in silico* zu erstellen, welche gewünschte Eigenschaften für die bimolekulare Epoxidringöffnungsreaktion enthielten. Die gewählten Substrate 3-Nitrostyroxid und 3,4-Chloromethoxyanilin zeigten bereits eine geringe unselektive Hintergrundreaktion, deren Aktivität und Selektivität durch die Verwendung von *de novo* Enzymen gesteigert werden sollte. Sechs der 13 synthetischen *de novo* Gene konnten exprimiert und aufgereinigt werden. Gegenüber der Wunschreaktion zeigten sie allerdings keine Aktivität. Mittels STD-NMR konnte gezeigt werden, dass die gewählten Substrate an eines der Enzyme binden, allerdings konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob sie in der aktiven Tasche binden. Eine anschließende Untersuchung der verwendeten Übergangszustände gab Aufschluss über die nicht vorhandene Aktivität.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit die auftretenden Schwierigkeiten des Enzymdesigns für neue nicht-physiologische Reaktionen gezeigt werden. Es konnte zwar kein neuer Biokatalysator für die Epoxidringöffnungsreaktion mit Aminen entwickelt werden, jedoch zeigten die Untersuchungen die Schwachstellen auf, die nun in zukünftigen Arbeiten in diesem Gebiet umgangen werden können.

Abstract

The goal of the biocatalysis is the application of enzymes in chemical industry, to make larger-scale processes sustainable and more environmentally friendly. Often metal dependent or organo catalysts are used for the manufacturing of building blocks for pharmaceuticals or cosmetics. These are usually expensive or toxic in their production. Although there are certain enzymes already used in industry, this field is restricted since there are many reactions which don't have an enzymatic pendant. Therefore the assignment of biocatalysis is the development of enzymes for new non-physiological reactions. Within this work the development of a new biocatalyst for the epoxid ring opening reaction with amines is to be examined and studied. The ring opening reaction with amines give vicinal amino alcohols, moieties used as a key structure in a large group of molecules, like alkaloids, chiral auxiliaries or pharmaceuticals. These amino alcohols are prepared by various synthetic approaches. However, these are generally carried out with large excess of amines at elevated temperatures and are often accompanied by poor selectivity. Although several modified procedures have been reported for the ring opening of epoxides with amines, no enzymatic activity towards this reaction has been described yet.

One possibility of the development of enzymes for new non-natural reactions is the utilization of already existing enzymatic centers. Although this possibility is not used very often yet it is a plausible option since used forces for activation in chemistry, like acid catalysis, can also be found in enzymes. This connection between enzyme design and organic synthesis is outlined within this work. Two approaches are based on the utilization of existing catalytical centers and a third approach is based on the computational *de novo* enzyme design.

Two enzymes are chosen which already have an existing catalytical center for the epoxide ring opening reaction with different nucleophiles like water, halides or pseu-

dohalides. On the one hand the halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 was chosen to enlarge its nucleophile spectrum by *NH*-nucleophiles like amides, amidines or urea. On the other hand also the nucleophile spectrum of the limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 was to be expanded by primary and secondary amines. The active site was targeted specifically by site-directed mutagenesis and an immobilisation technique was used to weaken or avoid the existing dominance of water, which acts as natural nucleophile. The usage of the stated *NH*-nucleophiles with different kinds of epoxides was for both enzymes not successful. As a third approach the Rosetta methodology was used in collaboration with Dr. Sinisa Bjelic (University of Washington, Seattle, USA) to design *in silico* enzyme models containing active sites with the desired properties for the epoxide ring opening. The chosen substrates 3,4-chloromethoxy aniline and 3-nitrostyrene oxide already show a low non-selective background conversion, whose activity and selectivity should be increased by the usage of the *de novo* designed enzyme. Although six out of 13 ordered synthetic *de novo* genes could be purified none of them showed any activity towards the desired reaction. Further characterization by STD-NMR showed that both substrates are binding to one chosen enzyme but it was not clear if it bound to the right position. The examination of the used transition state gave information about a possible reason for the missing activity.

As concluding remark this work shows the difficulties of the enzyme design for new non-natural reactions. Although there was no new biocatalyst for the epoxide ring opening with amines weak points could be shown which now can be avoided in future work in this area.

1 Einleitung

Mehr als 80% aller großtechnischen Prozesse in der chemischen Industrie werden durch Katalysatoren gesteuert.^[1] Neben Nachhaltigkeit und Umweltfreundlichkeit stehen zusätzlich enantioselektive Stoffumwandlungen im Fokus, da viele Medikamente oder Pflanzenschutzmittel chiral sind. Die dafür eingesetzte asymmetrische Katalyse beruht auf metallabhängigen und organokatalytischen Methoden, die oftmals aufwendig und teuer in ihrer Herstellung sind oder ihre effiziente Wirkung erst in organischen Lösungsmitteln oder bei hohen Temperaturen entfalten. Der Einsatz von Enzymen als Biokatalysatoren stellt eine nachhaltigere Alternative dar, da es sich um umweltfreundlichere, hochleistungsfähige Katalysatoren handelt, die bei niedrigen Temperaturen in wässrigen Lösungen enantio-, stereo- und chemoselektive Umsetzungen von wertvollen Substanzen katalysieren.

1.1 Entwicklung neuer Biokatalysatoren

Die Biokatalyse hat ihren jetzigen Stand in der Industrie durch mehrere Fortschritte in (bio)technologischen Verfahren erhalten. Über mehrere Stufen, wie die Stabilisierung durch Immobilisation von Enzymen oder erstes *protein engineering*, konnten Enzyme neue Eigenschaften, wie verbesserte Stabilität, Substratspezifität oder Enantioselectivität, gegeben werden.^[2-4] Auch die Erweiterung der Reaktionen, die durch Enzyme katalysiert werden können oder maßgeschneiderte Enzyme für bestimmte Eigenschaften, konnte durch *enzyme engineering* erhalten werden. Trotz dieser Fortschritte ist der Einsatz von Enzymen in der großtechnischen Anwendung limitiert, da es für viele wichtige Reaktionen bislang noch keine geeigneten Enzyme gibt. Aus diesen Gründen liegt der Forschungsschwerpunkt der heutigen Biokatalyse sowie der dieser Arbeit auf der Entwicklung neuer Biokatalysatoren. In den letzten Jahren ist

der Einsatz von Enzymen zunehmend interessanter geworden, um sie für Synthesen wichtiger Verbindungen einzusetzen. Daraus ist eine Reihe an Strategien entstanden, die neue Biokatalysatoren mit den genannten Eigenschaften hervorrufen. Das sind zum Beispiel rationales Proteindesign, gerichtete Evolution oder computerbasiertes Proteindesign.^[5-7]

1.1.1 Protein engineering bestehender Enzyme

In den 1980-1990er Jahren wurde das erste *protein engineering* durchgeführt, welches typischerweise auf strukturbasierten Techniken beruhte.^[5] Das sogenannte rationale Proteindesign beginnt in der Regel damit, dass Mutationen basierend auf der Proteinstruktur computersgestützt geplant und mittels *site-directed mutagenesis* durchgeführt werden.^[8] Dies erfordert ein hohes Verständnis über das Verhältnis zwischen Funktion und Struktur.^[5,9] Nach dem Transformieren in den gewünschten Wirtsorganismus, beispielsweise *E. coli*, können die Varianten exprimiert, aufgearbeitet, analysiert und evaluiert werden. Erst kürzlich zeigten Hammer *et al.*, dass sie die Protonierungsmaschinerie einer Squalen-Hopen-Zyklase nutzen konnten, um enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse durchzuführen. Durch rationales Proteindesign veränderten sie die aktive Tasche so, dass sie nicht auf polyzyklische Reaktionen, was ihrer natürlichen Funktion entspricht, limitiert ist, sondern sie dadurch eine nicht-natürliche Funktion in ein existierendes Enzym generieren konnten.^[10] Coelho *et al.* konnten durch rationales Design Cytochrom P450_{BM3} Varianten erstellen, die eine diastereo- und enantioselektive Cyclopropanierung von Styrolen über einen mutmaßlichen Carbentransfer katalysieren können.^[11]

Erste Arbeiten von Frances Arnold und Willem Stemmer Ende der 1990er Jahre zeigten erste Modifikationen von Enzymen mittels einer *in vitro* Version der darwinistischen Evolution, welche heute als gerichtete Evolution beschrieben wird.^[2] Gerichtete Evolution startet mit der Generierung von Mutantenbibliotheken durch zufällige Mutagenese, die meistens mit PCR-basierten Methoden, wie *error prone* PCR, oder durch rekombinante Methoden, wie das DNA *shuffling*, durchgeführt wird. Anschließend folgt die Expression in einem gewünschten Wirtsorganismus, woraus in der Re-

gel eine Bibliothek von über 10000 Varianten entsteht, die mit einer guten Screeningmethode mit verschiedenen Selektionsparametern auf die gewünschte Eigenschaft untersucht werden. Durch anschließende Proteincharakterisierung und Produktanalyse können positive und negative Mutanten aussortiert werden.^[5,12,13] Ein Beispiel stellt die zufällige Mutagenese einer Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* dar, deren Enantioselektivität mehr als verdoppelt werden konnte.^[14]

Die beiden Methoden des rationalen und nicht-rationalen Designs können solange durchgeführt oder miteinander kombiniert werden bis die gewünschte Eigenschaft optimiert wurde. Bioinformatische Werkzeuge, wie computergestütztes Modellieren, können ebenfalls genutzt werden, um das *protein engineering* zu unterstützen.

1.1.2 Artificielle Biokatalysatoren

Neben den natürlich vorkommenden Enzymen, die durch das *protein engineering* modifiziert werden können, gibt es auch die artifiziiellen Biokatalysatoren, die spezifisch für eine gewünschte Eigenschaft entwickelt wurden. Dazu gehören katalytische Antikörper, artifiziielle Metalloenzyme und die computerbasierten *de novo* Enzyme.

Bei katalytischen Antikörpern handelt es sich um katalytisch aktive Proteine, die die katalytische Fähigkeit von Enzymen mit Antikörpern vereinen. Da sie Enzymen sehr ähnlich sind, werden sie auch Abzyme genannt. Anstatt Proteinstrukturen von Grund auf neu zu gestalten, kann das Immunsystem genutzt werden, um maßgeschneiderte Substratbindetaschen zu erstellen. Diese Bindetaschen dienen zur Stabilisierung von Analoga von Übergangszuständen, die im ersten Schritt für die gewünschte Reaktion quantenmechanisch berechnet werden, um daraus ein Analogon - ein sogenanntes Hapten - zu entwerfen.^[15,16] Durch die Bildung eines Hapten-Antigen-Komplexes, wird ein Antikörper gebildet, welcher nicht nur das Hapten sondern auch den gewünschten Übergangszustand binden kann. Durch das Binden des Übergangszustandes wird die Aktivierungsenergie herabgesetzt und dadurch die Umsatzrate im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion in Lösung erhöht.^[17] Katalytische Antikörper sind zwar hoch selektiv, sind aber mit ihren vergleichsweise geringen Aktivitäten ein

schlechter Ersatz für natürlich vorkommende Enzyme (Abb. 1.1 und Tabelle 1.1.2, S. 8).

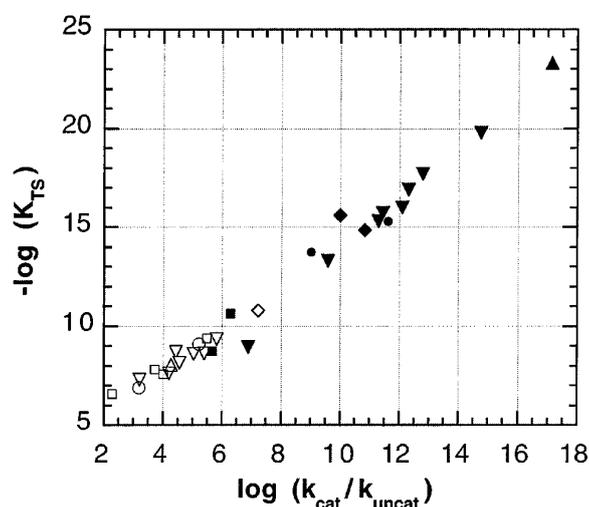


Abbildung 1.1: Der Vergleich von chemischen Kompetenzen ($-\log(K_{TS})$) und Reaktionsgeschwindigkeiten (k_{cat}/k_{uncat}) für verschiedene Reaktionen, die durch Enzyme (ausgefüllte Symbole) und Antikörper (leere Symbole) katalysiert werden. Umlagerungsreaktionen (■, □), Hydrolyse (▼, ▽), Decarboxylierungen (▲, △), Deprotonierungsreaktionen (●, ○) und Retro-Aldolreaktionen (◆, ◇) werden verglichen.^[16]

In Abbildung 1.4, S. 9 sind Beispiele für Reaktionen gezeigt, die auch von katalytischen Antikörpern katalysiert werden können. So beschrieben Hilvert und Mitarbeiter 1989 einen Antikörper, der die Diels-Alder-Reaktion zwischen Tetrachlorthiophen und *N*-Ethylmaleimid katalysiert (Abb. 1.4 c).^[18] Sechs Jahre später veröffentlichten Thorn *et al.* einen katalytischen Antikörper für die Kemp-Eliminierung (Abb. 1.4 a) und Wagner *et al.* entwickelten einen Antikörper für die Retro-Aldolreaktion (Abb. 1.4 b).^[19–21] Im Vergleich zu den besten natürlich vorkommenden Enzymen sind die gezeigten Antikörper allerdings um ein 1000faches schwächer in ihren katalytischen Effizienzen (Tab. 8, S. 8).^[22]

Artifizielle Metalloenzyme sind Hybridkatalysatoren, die die Eigenschaften von homogenen und enzymatischen Katalysatoren vereinigen.^[23] Die Vorteile von Metallkatalysatoren im Vergleich zu Enzymen liegen darin, dass sie oftmals eine nicht so hohe Substratspezifität besitzen, wodurch sie z. B. toleranter gegenüber der Größe von Substraten sind. Enzyme und Metallkatalysatoren sind in vielen Bereichen komplementär,

1.1 Entwicklung neuer Biokatalysatoren

so bevorzugen Metallkatalysatoren eher unpolare Substanzen (H_2 , CO und Olefine) und Enzyme eher polare Substanzen (Kohlenhydrate, Säurederivate oder Biopolymere).^[24,25] Solche Hybridkatalysatoren können entweder über einen kovalenten oder einen nicht-kovalenten Einbau eines metallhaltigen Coenzym in ein Proteingerüst hergestellt werden, wodurch das breitere Substratspektrum der Metallkatalysatoren mit den hohen Selektivitäten der Enzyme miteinander vereint wurden (Abb. 1.2). Bos *et al.* entwickelten eine enantioselektive Kupfer(II)-katalysierte Diels-Alder-Reaktion, die *ee*-Werte bis zu 97 % erzielte. Dazu konstruierten sie ein artifizielles Metalloenzym, mit einer aktiven Tasche auf einer Dimeroberfläche des Transkriptionsfaktors LmrR (Abb. 1.2).^[26]

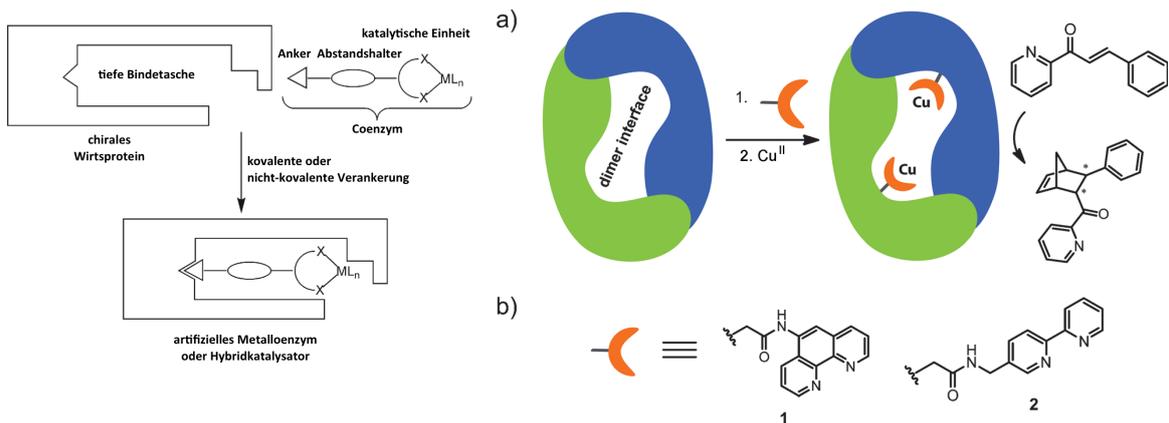


Abbildung 1.2: links: Verankerung eines aktiven Katalysators in ein chirales Wirtspolypeptid zur Herstellung eines Hybridkatalysators. rechts: a) Schematische Darstellung des beabsichtigten artifizielles Metalloenzym, in welches ein Kupfer(II)-Komplex auf eine Dimeroberfläche eines Proteins gepropft wurde. b) Liganden, die für das Propfen auf der Dimeroberfläche genutzt wurden.^[26]

Ein weitere Beispiel für artifizielle Enzyme sind computerbasierte *de novo* Enzyme, welche sich in den letzten Jahren rasant entwickelt haben. Computerbasiertes *de novo* Enzymdesign ist ein starkes Werkzeug, um maßgeschneiderte Enzyme für spezifische Anwendungen herzustellen. Bei dem *de novo* Design neuer Funktionen stellt sich die Herausforderung gleichzeitig die Substratbindetasche und die notwendige katalytische Maschinerie in ein Proteingerüst einzubauen. Eine weitere Möglichkeit ist das Redesign existierender Enzyme, bei dem bereits vorhandene passende katalytische

Maschinerien an die Wunschreaktion angepasst werden.^[27]

Das Design von *de novo* Enzymen mittels des Rosetta-Algorithmus ist im Allgemeinen in vier Schritte unterteilbar (Abb. 1.3).^[7,28]

1. Auswahl eines Reaktionsmechanismus

Der erste Schritt für das Design von *de novo* Enzymen ist die Auswahl eines Reaktionsmechanismus und den dazugehörigen Übergangszustand. Anhand des Übergangszustands werden Aminosäureseitenketten gewählt, die diesen stabilisieren. Diese theoretisch aktive Tasche wird als Theozym bezeichnet.

2. Identifizieren von Proteingerüsten

Mithilfe von RosettaMatch werden Proteingerüste gesucht, in denen das hypothetische Theozym platziert werden kann. Dazu wird eine Liste an möglichen Proteingerüsten benötigt, die RosettaMatch verwenden kann. Für jedes einzelne Proteingerüst versucht RosettaMatch das Theozym zu platzieren. Dadurch wird eine Bibliothek von verschiedenen *matches* erstellt, die für die Schritte 3 und 4 weiter verwendet werden können.

3. Design der gefundenen aktiven Taschen

Die gefundenen *matches* werden in einem anschließenden Schritt mithilfe von RosettaDesign optimiert. Dazu wird zunächst bestimmt, welche Aminosäureseitenketten verändert und welche umgepackt werden sollen. Im anschließenden Schritt werden die katalytischen Interaktionen optimiert, um im letzten Schritt mehrere Zyklen zu durchlaufen, in denen die aktive Tasche optimiert wird.

4. Evaluation der Designs

Im letzten Schritt müssen die Hundert bis Tausend Designs, die in Schritt 3 entstanden sind, evaluiert werden.

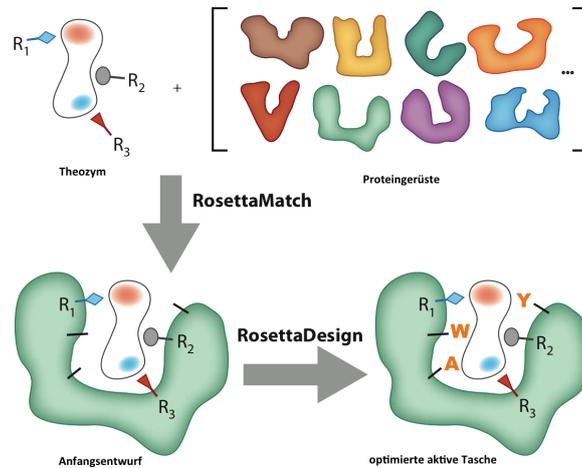


Abbildung 1.3: Computerbasiertes Enzymdesign. Ein idealisiertes Model der gewünschten aktiven Tasche (Theozym) wird entwickelt und in existierende Proteingerüste mithilfe von RosettaMatch gedockt. Die ausgewählten Bindetaschen werden anschließend computergestützt umgepackt (RosettaDesign), um die Interaktionen zwischen Substrat und Wirtsprotein zu optimieren. Die Designs werden anschließend bewertet und experimentell getestet.^[22]

Im Jahr 2008 veröffentlichten Röthlisberger *et al.* eine erste Kemp-Eliminase, die mittels computerbasierten Design entwickelt wurde.^[29] Die Kemp-Eliminierung ist eine gut untersuchte Reaktion, bei der die Ringöffnung durch die Abstraktion eines Protons eingeleitet wird. Die entwickelten Theozyme, die ein Aspartat oder Glutamat bzw. eine Histidin-Aspartat/Glutamat-Diade als allgemeine Base enthielten.^[29] Mit diesen zwei Theozymen erhielten sie 59 mögliche Designs in 17 verschiedenen Proteingerüsten von denen acht Enzyme Aktivität gegenüber der Kemp Eliminierung zeigten (Abb. 1.4 **a**). Drei dieser aktiven Enzyme konnten durch anschließende gerichtete Evolution optimiert werden. Khersonsky *et al.* zeigten später eine weitere Optimierung der Variante KE59, die nach 16 Runden an Mutationen und Selektionen in der katalytischen Effizienz um das 2000fache verbessert werden konnte.^[30] Ein weiteres Beispiel stellt die Retro-Aldolase dar, die 2014 von Bjelic *et al.* verbessert werden konnte.^[31] Die Retro-Aldolase katalysiert die Retro-Aldolreaktion von 4-Hydroxy-4-(6-methoxy-2-naphthyl)-2-butanon zu 6-Methoxy-2-naphthylaldehyd und Aceton (Abb. 1.4 **b**). Ein nukleophiles Lysin bildet ein Schiff'sche-Base-Intermediat, wodurch die C-C-Bindung des β -Hydroxyketons gespalten werden kann. Dies wird durch ein Glutamat unter-

stützt. Fünf aus sieben Designs zeigten vergleichbare katalytische Effizienzen zu den von katalytischen Antikörpern. Weiteres Optimieren durch *site directed mutagenesis* und computerbasiertem Umgestalten einiger *loops* und *yeast display* Selektion konnte die Variante RA 114 um das 1000fache verbessert werden. Eine größere Herausforderung stellt die bimolekulare Diels-Alder Reaktion dar. Siegel *et al.* präsentierten 2012 ein computerbasiertes Design zur biokatalysierten Diels-Alder Reaktion, welches hohe Stereoselektivität und hohe Substratspezifität zeigte (Abb. 1.4 **d**).^[32] Sie wurden inspiriert durch frühere Arbeiten an katalytischen Antikörpern in denen Asparagin, Aspartat und Tyrosin die katalytische Anordnung bilden. Sie erhielten zwei aktive Designs: DA20 und DA42. Durch computerbasierte Evaluation (quantenmechanische und molekular dynamische Berechnungen) konnte DA20.10 mit einer vergleichbaren katalytischen Effizienz zu den katalytischen Antikörpern erstellt werden (Tab. 1.1.2). Die gezeigten Beispiele zeigen, dass computerbasiertes Design Enzyme mit mäßiger Aktivität hervorbringt und diese einen guten Startpunkt ergeben, um sie durch zusätzliche anschließende Mutagenese verbessern zu können.

Tabelle 1.1: Katalytische Effizienzen von natürlichen Enzymen (Eintrag 1), katalytischen Antikörpern (Eintrag 2) und de novo Enzymen (Eintrag 3) im Vergleich.

	Reaktion	Biokatalysator	k_{cat}/K_M [$M^{-1} s^{-1}$]
1		Ketosteroidisomerase ^[33]	$3,0 \cdot 10^8$
2	Diels-Alder-Reaktion ^{[18] a)}	1E9	$5,2 \cdot 10^1$
	Kemp-Eliminierung ^[19]	34E4	$5,5 \cdot 10^3$
	Retro-Aldol-Reaktion ^[21]	84G3	$2,5 \cdot 10^3$
3	Diels-Alder-Reaktion ^{[32] a)}	DA 20.10	$0,6 \cdot 10^1$
	Kemp-Eliminierung ^[30]	KE 59.13	$6,0 \cdot 10^4$
	Retro-Aldol-Reaktion ^[31]	RA 114.4	$1,3 \cdot 10^2$

a) Änderung der Einheit zu k_{cat}/K_M [$M^{-1} M^{-1} s^{-1}$].

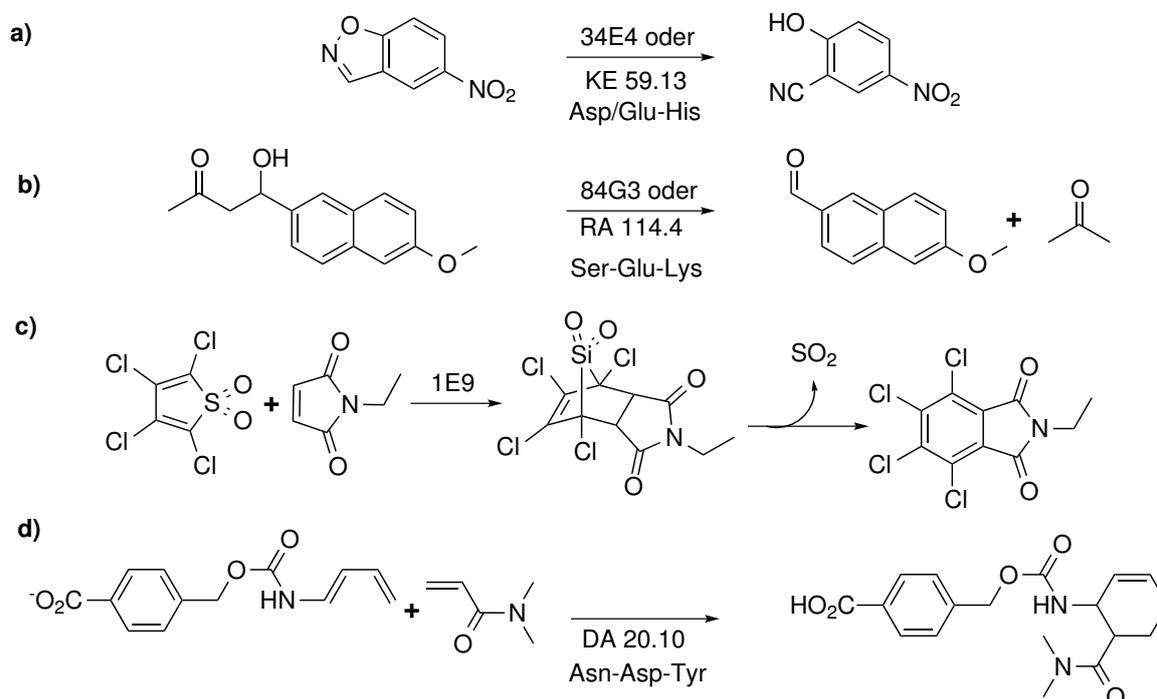


Abbildung 1.4: Verschiedene Reaktionsschemata von Reaktionen, die von katalytischen Antikörpern und computerbasierten de novo Enzymen katalysiert werden können. **a:** Kemp-Eliminierung, **b:** Retro-Aldol-Reaktion, **c:** Diels-Alder-Reaktion (katalysiert durch einen Antikörper) und **d:** Diels-Alder-Reaktion (katalysiert durch ein computerbasiertes de novo Enzym).

1.2 Vicinale Aminoalkohole

Vicinale Aminoalkohole, die auch 1,2-Aminoalkohole oder β -Aminoalkohole genannt werden, sind wichtige Bausteine und Zwischenprodukte der chemischen Synthese. 1,2-Aminoalkohole kommen in der Natur als Aminosäuren, wie Serin oder Threonin vor. Natürlich vorkommende Aminoalkohole sind außerdem Arzneimittel wie Bestatin, Norephedrin oder Cathin (Abb. 1.5). Bestatin ist ein Aminopeptidase Inhibitor und wird in der Chemotherapie während der Krebsbehandlung eingesetzt.^[34] Norephedrin und Cathin gehören zu den Amphetaminen und hemmen den Appetit oder werden als Erkältungsmittel eingesetzt.^[35] Synthetisch hergestellte Aminoalkohole, wie Saquinavir, welches als Proteaseinhibitor in der HIV Behandlung Anwendung findet, sind meist Analoga der natürlich vorkommenden Aminoalkohole.^[36] Eine weitere

1 Einleitung

Anwendung finden 1,2-Aminoalkohole als chirale Auxiliare. Über ihre Heteroatome können sie als Liganden in zyklischen und azyklischen Varianten Metalle komplexieren. Eingesetzt werden sie in der Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen, bei der asymmetrischen Reduktion von Carbonylen und bei der Racematspaltung von Enolaten.^[37]

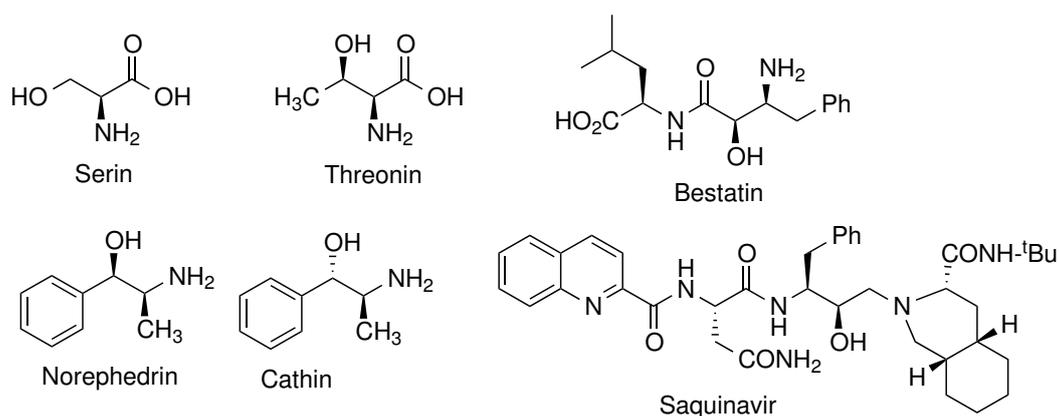


Abbildung 1.5: Beispiele vicinaler Aminoalkohole: Es sind natürlich vorkommende und synthetische Aminoalkohole gezeigt.^[34]

1.2.1 Chemische Darstellung

Es existieren verschiedene Syntheserouten von 1,2-Aminoalkoholen gezeigt:^[37] i) Kupplungsreaktionen, ii) Aminohydroxylierungen und iii) der gezielte Austausch funktioneller Gruppen 1.6.

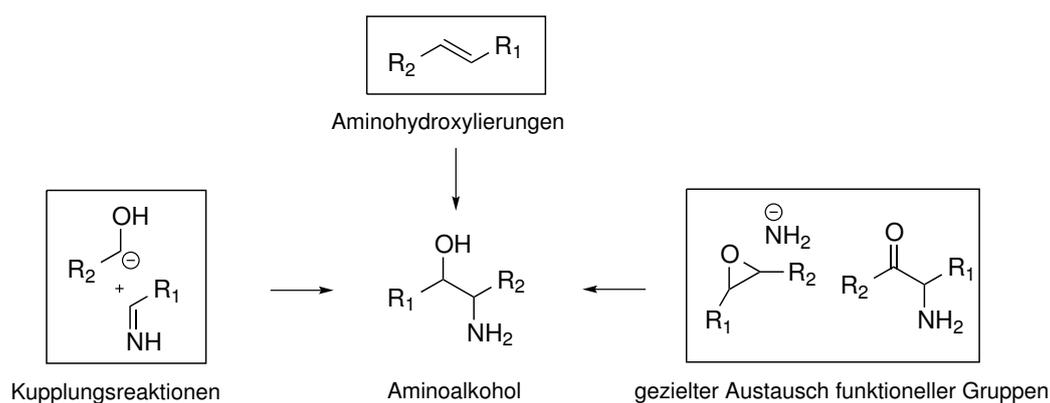


Abbildung 1.6: Verschiedene chemische Syntheserouten zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen: Kupplungsreaktion, Aminohydroxylierung und das gezielte Austauschen funktioneller Gruppen.^[37]

Ein chirales Beispiel für eine Kupplungsreaktion, um 1,2-Aminoalkohole darzustellen, ist die Aldol-artige Reaktion einer Schiff'schen Base mit einem Aldehyd, die durch ein Cinchonidin abgeleitetes Difluoridsalz katalysiert wird (Abb. 1.7).^[38]



Abbildung 1.7: Asymmetrische Aldol-artige Reaktion einer Schiff'schen Base mit einem Aldehyd zur Darstellung des syn-Aminoalkohols.^[38]

Eine zweite Möglichkeit zur Darstellung von Aminoalkoholen ist die von Sharpless etwas abgewandelte metallkatalysierte Dihydroxylierungsreaktion.^[39] Hierbei verhilft ein chiraler Aminligand dazu, ein Amid und eine Hydroxygruppe gegenüber einer Doppelbindung asymmetrisch zu addieren (Abb. 1.8).

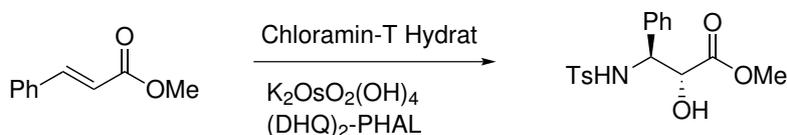


Abbildung 1.8: An ein Zimtsäuremethylester wird ein Amid und eine Hydroxygruppe addiert, wodurch in Aminoalkohol resultiert.^[39]

Der gezielte Austausch funktioneller Gruppen ist eine Variante zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen, die am häufigsten Anwendung findet. Forscher von der Firma Degussa zeigten Anfang der 1990er eine Möglichkeit Aminoalkohole im Tonnenmaßstab darzustellen. Durch die Reduktion von Aminosäuren mit Natriumborhydrid und mit Hilfe eines Aktivators wie Iod oder Schwefelsäure erzeugten sie enantiomerenreine Aminoalkohole (Abb. 1.9 **a**). Das Stereozentrum der Aminosäure bleibt bei dieser Variante erhalten, so dass die Produkte in guten Ausbeuten isoliert werden konnten.^[40,41] Ein drittes und viertes Beispiel (Abb. 1.9 **b** und **c**) zeigt die nukleophile Ringöffnung eines Epoxids. Das Epoxid wurde durch eine Katsuki-Sharpless Epoxidierung hergestellt und im nächsten Schritt durch die Umsetzung mit einem Benzhy-

1 Einleitung

drylamin zu einem Aminoalkohol umgesetzt (Abb. 1.9 **b**).^[42] In Abbildung 1.9c wird die Ammonolyse eines Epoxids dargestellt und repräsentiert den direktesten Weg, um einen vicinalen Aminoalkohol zu erhalten. Ein latentes Problem bei dieser nukleophilen Epoxidringöffnung ist die Regioselektivität, die nicht gegeben ist. Im letzten Beispiel gibt es ein zusätzliches Problem, da der entstandene Aminoalkohol das bessere Nukleophil im Vergleich zum Ammoniak ist und es daher eher zur Dimerisierung des Produktes kommt als zur Ringöffnung des Edukts.^[43] In der Synthese wird dieses Problem umgangen, indem ein hoher Überschuss an Ammoniak eingesetzt wird. Obwohl diese Lösung in der großtechnischen Synthese wenig Anwendung findet, ist die Ammonolyse eine interessante Methode, die durch chirale Katalysatoren an Selektivität und Aktivität gewinnen kann.

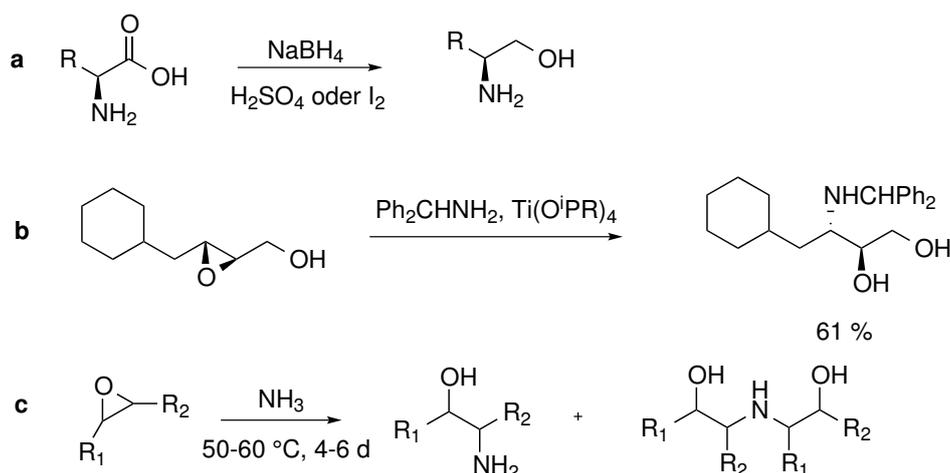


Abbildung 1.9: Der gezielte Austausch funktioneller Gruppen ist die am meisten genutzte Variante, um vicinale Aminoalkohole darzustellen. **a** Aminosäuren können mit Natriumborhydrid zu 1,2-Aminoalkoholen reduziert werden. Da das Stereozentrum der Aminosäure erhalten bleibt, können die Produkt in hoher Reinheit isoliert werden. **b** Das Epoxid wird durch ein Benzhydrylamin geöffnet, woraus eine Aminoalkohol entsteht. **c** Dieses Beispiel zeigt die Ammonolyse eines Epoxids, welches trotz kleiner Nachteile - wie das Fehlen an Regioselektivität oder den Einsatz an hohen Überschuss von Ammoniak, eine interessante Methode und den direktesten Weg zur Herstellung von Aminoalkoholen darstellt.^[40-44]

Ein gutes Verfahren, um Epoxide regioselektiv mit NH-Nukleophilen zu öffnen, ist beispielsweise der Einsatz eines organokatalytischen Thioharnstoffderivats (Abb.1.10). Das Thioharnstoffderivat ist ein doppelter Wasserstoffbrückendonator und kann durch

seine elektronischen Eigenschaften Epoxide gegenüber nukleophilen Angriffen aktivieren.^[45]

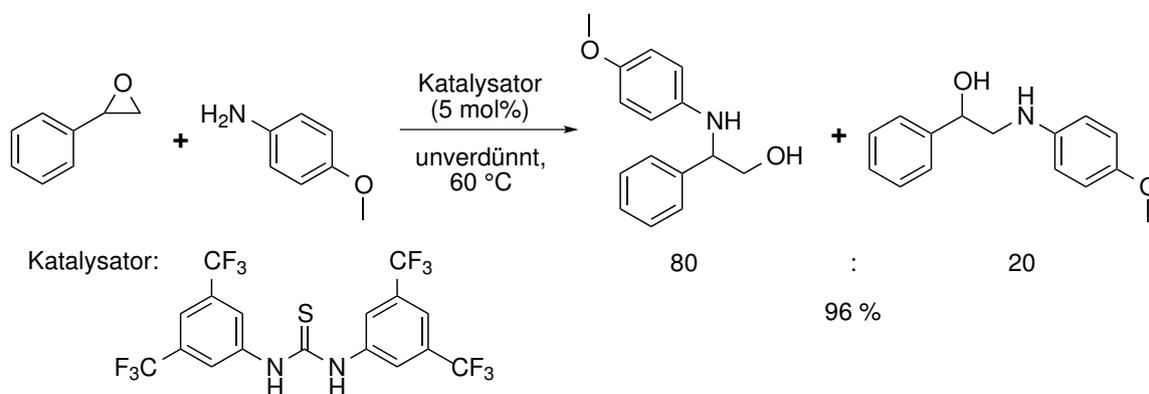


Abbildung 1.10: Die regioselective Aminolyse katalysiert durch ein Thioharnstoffderivat.

1.2.2 Enzymatische Darstellung

Neben der genannten chemischen Verfahren zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen, sind zusätzlich auch enzymatische Methode beschrieben. In einer dreistufigen Synthese wird ein β -Ketocarbonsäureester durch *Saccharomyces cerevisiae* zum enantiomerenreinen Hydroxybutanoat reduziert, welches bei der Hydrazinolyse zum Hydrazid umgesetzt wird. Im letzten Schritt erfolgt eine Curtius Umlagerung, um den entsprechenden enantiomerenreinen Aminoalkohol zu erhalten (Abb. 1.11 a).^[46] Die Firma BASF zeigte Mitte der 1990er Jahre ebenfalls eine enzymkatalysierte Methode zur Darstellung von Aminoalkoholen.^[47] Die kinetische Racematspaltung des Benzylethers ergab durch den Einsatz einer Lipase das enantiomerenreine Amin und ein Amid (Abb. 1.11 b). Sehl *et al.* beschrieben kürzlich einen ein-Topf-zwei-Stufen Mechanismus, um Norephedrin bzw. Cathin enzymatisch und enantiomerenrein darzustellen.^[48] Ausgehend von Benzaldehyd und Pyruvat entsteht (*R*)-Phenylacetylcarbinol durch das Einsetzen einer (*R*)-selektiven Carboligase (AHAS-I), welches im Anschluss mit (*S*)- α -Methylbenzylamin und einer (*S*)-selektiven Transaminase (Cv-(*S*)-TA) zu (1*R*,2*S*)-Norephedrin umgesetzt wird (Abb. 1.11 c).

1 Einleitung

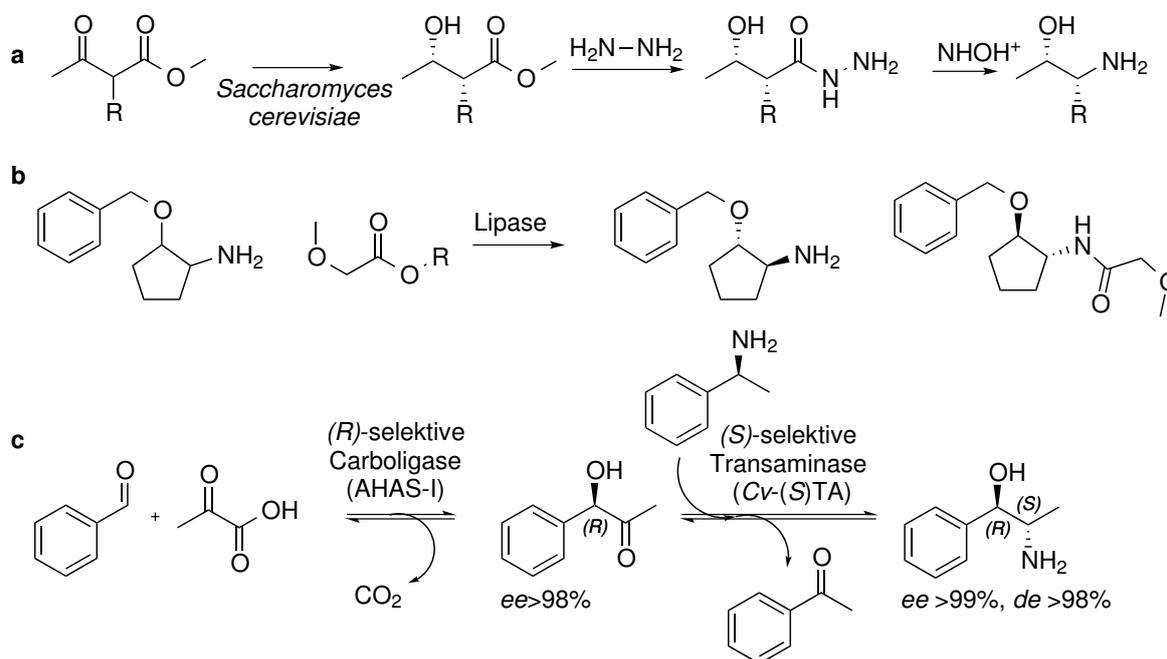


Abbildung 1.11: **a** Enzymkatalysierter mehrstufiger Prozess, in dem ein β -Ketoester zu einem Aminoalkohol umgesetzt wird. **b** Lipasekatalysierte kinetischen Racematspaltung eines Benzylether zum gewünschten Aminoalkohol. **c** Der zweistufige Mechanismus zur Darstellung von Norephedrin.^[46-48]

Die gezeigten Möglichkeiten vicinale Aminoalkohole darzustellen, verlaufen unter dem Einsatz von teuren bzw. toxischen Katalysatoren, die auf Osmium, Natrium oder Titan basieren oder sie benötigen extreme Temperaturen. Bei den gezeigten enzymatischen Reaktionen ist es zwar möglich selektiv Aminoalkohole darzustellen, aber es handelt sich bei allen Darstellungen um mehrstufige Schritte, deren Ausbeute dadurch geschwächt wird. Die direkteste Methode der Epoxidringöffnungsreaktion mit einem NH -Nukleophil verläuft unter chemischen Bedingungen nicht selektiv. Diese Reaktion mittels eines Enzyms zu katalysieren, wäre deshalb eine effektive und „grünere“ Möglichkeit selektiv Aminoalkohole darzustellen.

1.3 Enzymkatalysierte Epoxidringöffnungsreaktionen

In der Literatur wurden in der Vergangenheit bereits drei Enzyme beschrieben, die eine Epoxidringöffnung mit Wasser oder Halogeniden als Nukleophile katalysieren

1.3 Enzymkatalysierte Epoxidringöffnungsreaktionen

können. Diese Enzyme werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität sind Epoxide nützliche Intermediate in der Herstellung von Chemikalien, wie Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Sie werden mittels asymmetrischen *in situ*-Verfahren nach Sharpless und/oder Jacobsen synthetisiert.^[49,50] Auf biologischem Wege können sie über die Epoxidierung von Kohlenstoffdoppelbindungen mittels Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs) gewonnen werden.^[51] Durch die Vielseitigkeit der Oxirangruppe können Epoxide relativ leicht derivatisiert werden. Sie gehen Reaktionen mit Nucleophilen, wie Halogenide, Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel ein (Abb. 1.12).^[52] Allerdings sind viele dieser Reaktionen schwermetallabhängig oder nicht selektiv, so dass es bereits mehrere biokatalytische Ansätze gibt, wie die enzymkatalysierte Hydrolyse und nukleophile Ringöffnung von Epoxiden, um diesen Umstand zu umgehen.^[53,54]

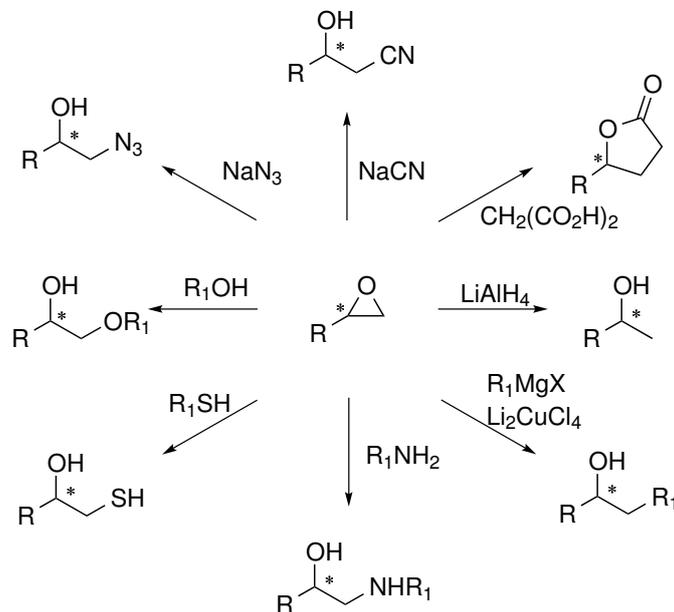


Abbildung 1.12: Epoxide sind wichtige Zwischenprodukte in der pharmazeutischen und landwirtschaftlichen Industrie. Sie sind sehr reaktiv und können daher leicht derivatisiert werden. Hier sind verschiedene Nucleophile gezeigt, die Epoxide öffnen können.^[40,52,55]

1.3.1 Epoxidhydrolasen

Mittels Epoxidhydrolasen (EHs, EC 3.3.2.3) können die hoch reaktiven Epoxide im Körper zu Diolen umgesetzt werden, welche über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden werden können.^[56] EHs sind ubiquitär und spielen im Körper eine wichtige Rolle beim Abbau von Xenobiotika, so dass sie einen wichtigen Bestandteil des körpereigenen Entgiftungssystems darstellen. Die erste EH wurde 1973 von Franz Oesch in der Leber von Säugetieren gefunden.^[55] Mittlerweile gibt es verschiedene EHs aus verschiedenen Mikroorganismen, wie *Agrobacterium radiobacter*, *Aspergillus niger*, *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus erythropolis* etc.^[56] Epoxide können sehr leicht zu ihren korrespondierenden Diolen umgesetzt werden, indem das Epoxid durch ein Wassernukleophil geöffnet wird. Diese Reaktion ist energetisch favorisiert und hat nur Wasser als Cosubstrat, ist Cofaktor-unabhängig und benötigt weder prosthetische Gruppen noch Metallionen.^[57] Die EHs gehören zu der Familie der Enzyme, die eine α,β -Hydrolasefaltung besitzen. Zu dieser Familie gehören unter anderem auch Lipasen und Esterasen. Charakteristisch dieser Familie ist die katalytische Nukleophil-Histidin-Säure Triade und der zweistufige Mechanismus mit einem intermediären kovalenten Enzym-Substrat-Komplex.^[55] Das Epoxid gelangt in die aktive Tasche und es kommt zu einem nukleophilen Angriff eines Aspartats. Dadurch wird ein Hydroxylalkyl-Enzym Zwischenprodukt gebildet, welches unter Hydrolyse zum gewünschten Diol gespaltet wird. Die Hydrolyse findet durch ein basisches Wassermolekül statt, welches von einem Histidin-Aspartat/Glutamat-Paar aktiviert wurde (Abb. 1.13).^[58] Durch den zweistufigen Mechanismus können EHs nur Wasser als Nukleophile verwenden. Dennoch spielen sie eine wichtige Rolle in der organischen Synthese, da sie aus racemischen Epoxiden durch kinetische Racematspaltung chirale Epoxide und chirale 1,2-Diole hervorbringen.^[59] Ihr Substratspektrum reicht von monosubstituierten Epoxiden, wie Styroloxid- oder Arylglycidoletherderivaten, zu 2,2-disubstituierte Epoxiden, wie Spiroepoxiden.^[57,60]

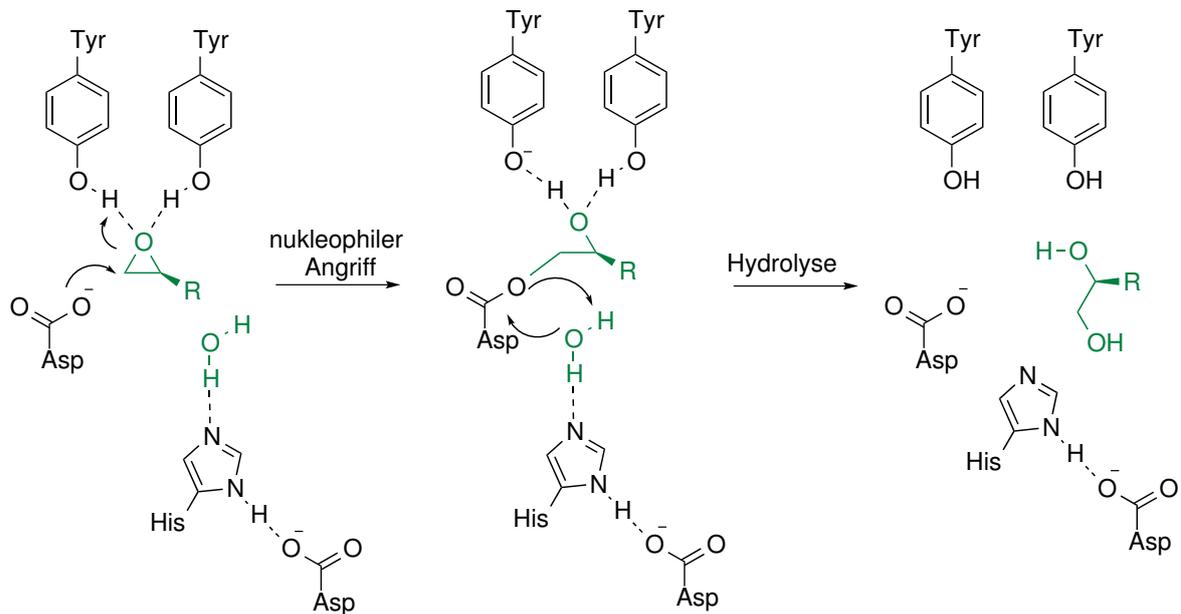


Abbildung 1.13: Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus der EH aus *Agrobacterium radiobacter* besteht aus zwei Schritten. Im ersten Schritt kommt es zu einem nukleophilen Angriff eines Aspartats gewöhnlich am sterisch weniger gehinderten Kohlenstoffatom, wodurch sich ein Michaelis Komplex bildet, der im zweiten Schritt durch Hydrolyse als Diol abgespalten wird.^[55, 58]

1.3.2 Limonen-1,2-epoxidhydrolase

Ein weiteres Enzym, welches die Hydrolyse eines Epoxids katalysiert, ist die Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14 (LEH, EC 3.3.2.8).^[61, 62] Im Gegensatz zu den EHs katalysiert die LEH die Hydrolyse von Limonen-1,2-epoxid in einem einstufigen Mechanismus ohne Enzym-Substrat-Zwischenprodukt. Sie gehört nicht zu der Familie der Enzyme mit α, β -Hydrolasefaltung und ist mit ihren 16 kDa relativ klein. Bei dem einstufigen Mechanismus der Hydrolyse von Limonen-1,2-epoxid handelt es sich um eine allgemeine Säure-Basenkatalyse, in der das Epoxid durch ein Aspartat, welches als Protonendonator dient, aktiviert wird. Durch diese Förderung der Epoxidöffnung, kann ein durch ein weiteres Aspartat aktiviertes Wassermolekül das Epoxid nukleophil öffnen, wodurch ein Limonen-1,2-diol resultiert. Die aktive Tasche der LEH ist durch ein Netzwerk von Aminosäuren aufgebaut, so dass Ladungen stabilisiert und das Substrat fixiert werden kann (Abb. 1.14).^[63] Ihr Substratspektrum reicht

von aliphatischen Substraten, wie Limonen-1,2-epoxid, Cyclohexenoxidderivaten oder Cyclopentenoxidderivaten, zu aromatischen Substraten, wie Styroloxid, Phenylpropylenoxid oder Arylglycidoether.^[64]

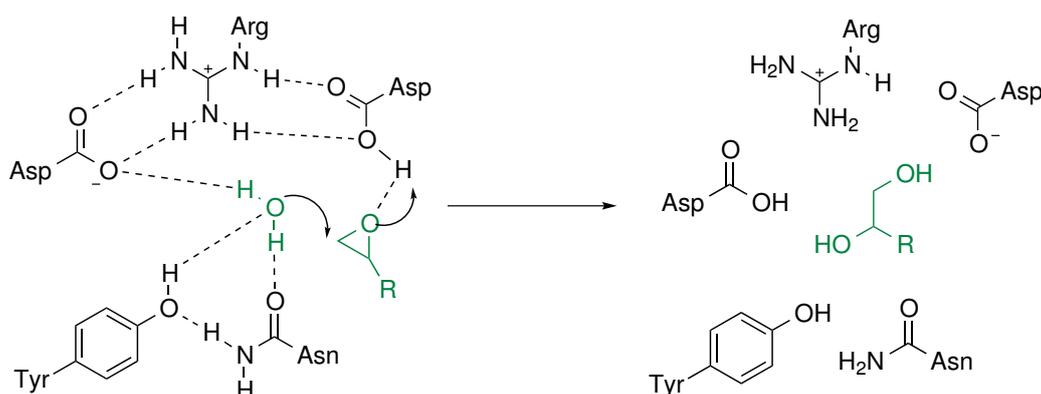


Abbildung 1.14: Der einstufige Reaktionsmechanismus der LEH aus *Rhodococcus erythropolis*, in dem das Wassermolekül durch ein Tyrosin und ein Asparagin in eine gute Stellung für den nukleophilen Angriff positioniert wird. Für die Protonierung und Deprotonierung ist während der Reaktion eine Aspartat-Arginin-Aspartat-Triade beteiligt.^[63, 65]

Die LEH und EHs unterscheiden sich nicht nur in ihren Reaktionsmechanismen, sondern auch in ihren Regioselektivitäten. Werf *et al.* untersuchten in ihren Arbeiten die Regioselektivität der LEH anhand der Hydrolyse von 1-Methylcyclohexenoxid und stellten fest, dass die Epoxidöffnung immer am höher substituierten Kohlenstoffatom stattfindet (Abb. 1.15 **a**).^[66] Die EHs hingegen öffnen das Epoxid am weniger substituierten Kohlenstoffatom. Bei der Untersuchung der Regioselektivität anhand der Hydrolyse von Limonenepoxid konnte gezeigt werden, dass die Öffnung nicht immer am höher substituierten Kohlenstoffatom stattfindet. In Abbildung 1.15 **b** ist gezeigt, dass (1*S*,2*R*,4*S*)- und (1*R*,2*S*,4*R*)-Limonenepoxid am höher substituierten C-Atom geöffnet wird und (1*R*,2*S*,4*S*)- und (1*S*,2*R*,4*R*)-Limonenepoxid am niedriger substituierten C-Atom geöffnet wird. Hopmann *et al.* begründeten diese Tatsache damit, dass die Isopropylengruppe am Limonenepoxid konformellen Einfluss auf die Regioselektivität hat, da die Ausbildung einer sesselartigen Konformation eingeschränkt wird.^[63]

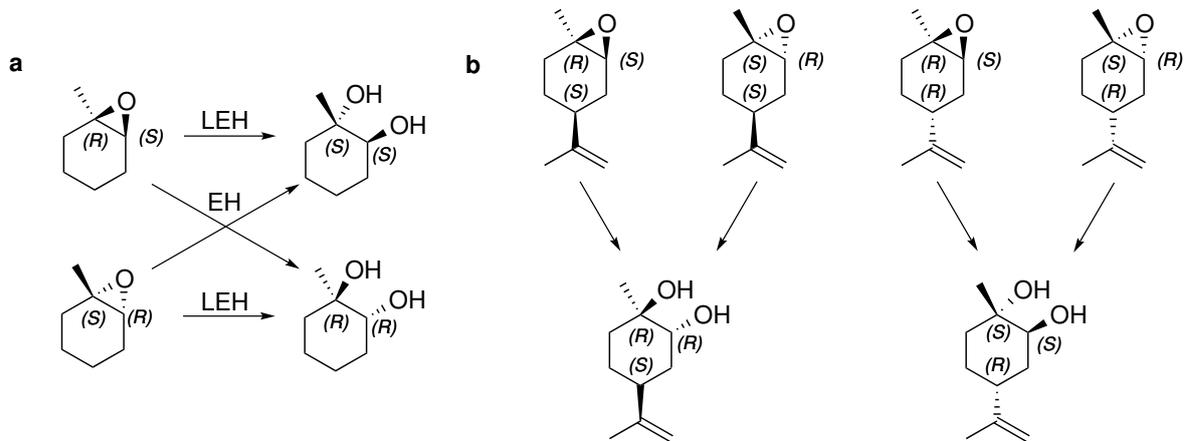


Abbildung 1.15: Die Selektivität der LEH und der EH gezeigt an Methylcyclohexenoxid (a) und Limonenepoxid (b). a Die LEH greift das Methylcyclohexenoxid am höher substituierten C-Atom an, wohingegen die EH das Methylcyclohexenoxid am niedriger substituierten angreift. b Am Beispiel des Limonenepoxids ist zu sehen, dass die LEH nicht immer am höher substituierten C-Atom angreift. Hier es ist abhängig von der Richtung der Isopropylgruppe, da diese konformellen Einfluss hat, in dem die Ausbildung der sesselartigen Konformation eingeschränkt wird.^[63, 66]

1.3.3 Halohydrindehalogenasen

Halohydrindehalogenasen (EC 4.5.1.-) sind bakterielle Enzyme, die den biologischen Abbau einiger halogener organischer Verbindungen, wie 1,3-Dichloro-2-propanol oder Epichlorohydrin, katalysieren. Das Enzym wurde von Castro und Bartnicki 1968 entdeckt und 1991 das erste Mal von van den Wijngaard *et al.* aufgereinigt.^[67, 68] Halohydrindehalogenasen können in drei Gruppen, die 24-32% Sequenzidentität teilen, unterteilt werden: i) aus *Arthrobacter* sp. AD2 (HheA), ii) aus *Mycobacterium* sp. GP1 (HheB) und iii) aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC).^[69, 70] Von der homotetramerischen HheC bestehend aus 32 kDa großen Untereinheiten gibt es eine Kristallstruktur und einen dadurch aufgeklärten Reaktionsmechanismus.^[71] Die HheC katalysiert den reversiblen Ringschluss von vicinalen Halogenalkoholeinheiten zum Epoxid und Halogenid. Sie ist ein sehr vielversprechendes biokatalytisches Werkzeug, da sie eine hohe Enantioselektivität, eine hohe Akzeptanz an nicht-natürlichen Nukleophilen aufweist und Cofaktor-unabhängig ist.^[72] So akzeptieren HheC nicht nur Halogenide sondern auch kleine lineare negativ geladene Ionen, wie Azide, Cyanide oder Nitrite.^[73] Dadurch werden interessante Bausteine wie β -Azidoalkohole, β -Nitroalkohole

1 Einleitung

oder β -Hydroxynitrile zugänglich (Abb. 1.16).^[74] Es wird beschrieben, dass es unter anderem keine Umsetzung mit nichtanionischen (primäre Alkohole oder Amine) oder schwefelenthaltige (H_2S oder SO_4^{2-}) Nukleophilen gibt.^[74]

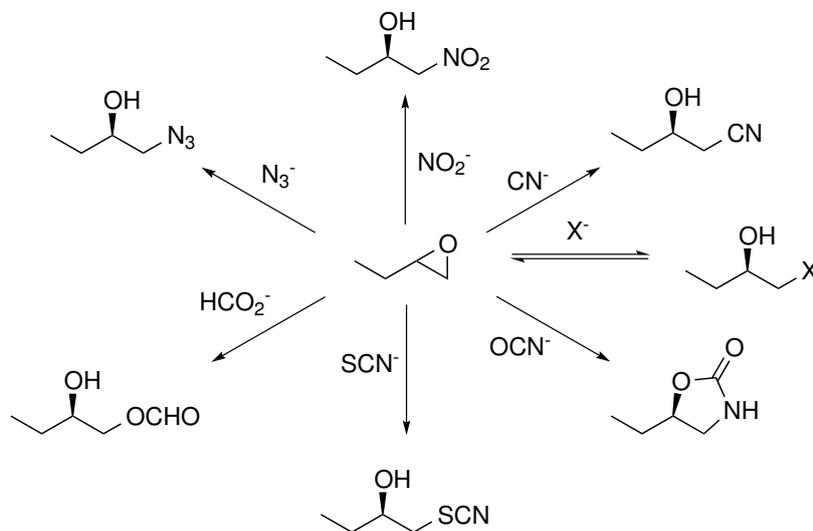


Abbildung 1.16: Kleine geladene Nukleophile, die von der HheC akzeptiert werden.^[74]

Der Reaktionsmechanismus findet durch eine Serin-Tyrosin-Arginin-Triade statt. Es wird beschrieben, dass ein Arginin ein Proton von einem Tyrosin abstrahiert, welches wiederum ein Proton von dem Halogenalkohol abspaltet. Dadurch kommt es zum einem Ringschluss (Abb. 1.17). Das freie Halogenid wird durch verschiedene Interaktionen in der Halogenidbindetasche stabilisiert.

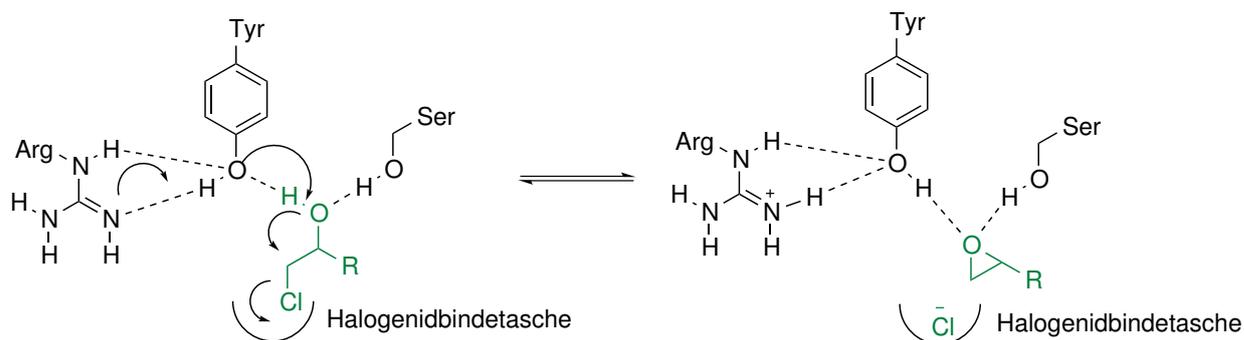


Abbildung 1.17: Der reversible Reaktionsmechanismus der HheC. Ein Arginin abstrahiert ein Proton eines Tyrosins, welches im Anschluss ein Proton vom Halogenalkansubstrat abstrahieren kann. Es kommt zu einem Ringschluss, wodurch ein Epoxid erhalten wird.^[72]

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Studie zur Entwicklung eines neuen Biokatalysesystems zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen durchgeführt werden.

Die Entwicklung neuer Biokatalysatoren für neue Reaktionen oder mit neuen Eigenschaften ist ein wichtiger Baustein für die chemische und pharmazeutische Industrie, da sie Reaktionen unter hohen Aktivitäten und Selektivitäten katalysieren können. Mittels rationalen Design, gerichteter Evolution oder computerbasierten *de novo* Enzymdesigns konnten in den letzten Jahren Fortschritte gemacht werden, die neue Enzyme thermostabil oder gegenüber Lösungsmittel stabil machten. Auch die Erweiterung von Substrat- oder Reaktionsspektren konnte durch *enzyme engineering* erzielt werden.

Im Fokus dieser Arbeit liegt die selektive Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen, die wichtige Bausteine und Intermediate der chemischen Industrie bilden. Unter der Verwendung von teuren und toxischen Metallkatalysatoren oder Organokatalysatoren ist es bereits möglich chirale Aminoalkohole darzustellen. Die direkteste Methode stellt die Ammonolyse von Epoxiden dar, die allerdings unter schlechten Ausbeuten und geringen Selektivitäten abläuft. So gibt es zwar mehrstufige enzymkatalysierte

1 Einleitung

Synthesen von Aminoalkoholen, aber es gibt keine beschriebene Methode der enzymkatalysierten Epoxidringöffnung zur Darstellung von 1,2-Aminoalkoholen.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden bereits beschriebene katalytische Zentren von epoxidöffnenden Enzymen gezielt verändert, so dass auf einem direkten Weg selektiv Aminoalkohole entstehen könnten. In einem weiteren Schritt wurde versucht bereits vorhandenen katalytische Zentren in Proteingerüste einzubauen, um mittels computerbasierten *de novo* Enzymen die Darstellung von Aminoalkoholen durch die Epoxidringöffnungsreaktion zu katalysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Kits

Standardchemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von folgenden Firmen bezogen: Alfa-Aesar (Ward Hill, MA, USA), Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) und VWR (Radnor, PA, USA). Einige Substrate wurden synthetisiert und charakterisiert (siehe Kapitel 2.4).

Das molekularbiologische Kit zur Plasmidpräparation (Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit) wurde von Zymo Research (Irvine, CA, USA) bezogen. Das Kit zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) wurde von ThermoScientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

2.1.2 Primer

Von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) wurden synthetische Oligonukleotide (Primer) für die ortsspezifische Mutagenese bezogen. In Tabelle 2.1 sind die *forward* Primer aufgelistet, die dazugehörigen *reverse* Primer sind umgekehrt komplementär dazu.

Tabelle 2.1: Verwendete Primer für die ortsspezifische Mutagenese.

Name/Mutation	Sequenz von 5'- nach 3'-Ende
HheC::T134A	CTTTATTACCTCTGCAACGCCCTTCGGGCC
HheC::C153S	GCCCGAGCAGGTGCATGCACCTTGGCAAATGCC
LEH_6His::D142A	GGGCAAGATTACGGGTTGGCGTGCCTACTTCGATCTGCG
LEH_6His::D142T	CGGGTTGGCGTACCTACTTCGATCTGCGCG

2 Material und Methoden

LEH_6His::D142S	CGGGTTGGCGTTCCTACTTCGATCTGCGCG
LEH_6His::D142N	CGGGTTGGCGTACCTACTTCGATCTGCGCG
LEH_6His::Y63F	GCAGAAGACACGATGTTCCAGAACATG CCACTCCCC
LEH_6His::N65A	GACACGATGTACCAGGCCATGCCACTCCCCC
LEH_6His::N65D	GACACGATGTACCAGGACATGCCACTCCCCC
LEH_6His::Y63F,N65A	GCAGAAGACACGATGTTCCAGGCCATGCCACTCCCCCCTGC
LEH_6His::Y63F,N65D	GCAGAAGACACGATGTTCCAGGACATGCCACTCCCCCCTGC
EL10::H81A	CCGATAATGTTGCTGGCGAAAGCGGTCTGG

2.1.3 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurde mit mehreren Plasmiden gearbeitet. Zum Einen wurden drei Plasmide für die Halohydrindehalogenase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC) von Prof. Dr. Dick Janssen bereitgestellt. Der Wildtyp wurde mittels QC™-Mutagenese zurück gewonnen. Das Gen der HheC befand sich auf dem pBAD-Vektor, der einen Promotor aus dem *E. coli* Operon besitzt. Gene, die sich hinter diesem Promoter befinden, werden während der Expression durch den AraC Aktivator gesteuert. Durch die Zugabe von Arabinose kann die Expression gesteuert werden. Es handelt sich um ein Plasmid mit einer Ampicillinresistenz.

Das Gen der Limonen-1,2-epoxidhydrolase wurde als synthetisches Gen von GeneArt (Regensburg, Deutschland) in einem Standardvektor (pMA-T) bezogen. Das Gen wurde durch Restriktionsenzyme aus dem Plasmid geschnitten und per Ligation in einen pET-22b(+)-Vektor zwischen die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* kloniert. Der pET-22b(+)-Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz. Die LEH besitzt einen N-terminalen His₆-Tag.

Es wurden 13 verschiedene Plasmide der *de novo* Epoxidlyasen von der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen. Die Sequenzen waren bereits in den pET-28a(+)-Vektor kloniert, so dass die daraus resultierenden Proteine entweder einen N- oder C-terminalen His₆-Tag besitzen (Tab. 2.2). Je nach Lage des His₆-Tags wurden die Gene zwischen die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* (C-terminal) oder zwischen *NdeI* und

*Xho*I (N-terminal) platziert.

Wie alle pET-Vektoren beruhen pET-28a(+) und pET-22b(+) auf dem T7-Expressionssystem. Die Expression des auf dem Vektor liegenden Gens wird durch die Zugabe von IPTG gesteuert. Die Transkription erfolgt durch die T7-RNA Polymerase. Der *lac*-Repressor bindet an den *lac*-Operator und bindet im Promotorbereich des Gens. Durch die Zugabe von IPTG wird der Repressor vom Operator gelöst und die Polymerase kann exprimiert werden. Anschließend bindet diese an den auf dem Plasmid gelegenen Promotor, wodurch das Zielgen transkribiert werden kann.

Tabelle 2.2: *Verwendete Plasmide in der vorliegenden Arbeit.*

ITB-Nr.	Name	His ₆ -Tag	Quelle
pITB1101	pBAD_HheC	-	ITB Stuttgart
pITB1102	pBAD_HheC::C153S,W249F	-	Prof. Dr. D. Janssen
pITB1103	pBAD_HheC::T134A,C153S	-	Prof. Dr. D. Janssen
pITB1104	pBAD_HheC::T134A,C153S,W249F	-	Prof. Dr. D. Janssen
pITB1105	pBAD_HheC::C153S	-	ITB Stuttgart
pITB1106	pMA-T_LEH	N-terminal	GeneArt
pITB1107	pET-22b(+)_LEH	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1108	pET-22b(+)_LEH::D142S	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1109	pET-22b(+)_LEH::D142T	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1110	pET-22b(+)_LEH::D142A	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1111	pET-22b(+)_LEH::D142N	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1112	pET-22b(+)_LEH::Y63F	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1113	pET-22b(+)_LEH::N65A	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1114	pET-22b(+)_LEH::N65D	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1115	pET-22b(+)_LEH::Y63F,N65A	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1116	pET-22b(+)_LEH::Y63F,N65D	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1117	pET-22b(+)_LEH::Y63F,N65L	N-terminal	ITB Stuttgart
pITB1118	pET-28a(+)_EL01	N-terminal	GenScript
pITB1119	pET-28a(+)_EL03	C-terminal	GenScript

2 Material und Methoden

pITB1120	pET-28a(+)_EL04	N-terminal	GenScript
pITB1121	pET-28a(+)_EL05	N-terminal	GenScript
pITB1122	pET-28a(+)_EL06	C-terminal	GenScript
pITB1123	pET-28a(+)_EL07	N-terminal	GenScript
pITB1124	pET-28a(+)_EL08	N-terminal	GenScript
pITB1125	pET-28a(+)_EL09	N-terminal	GenScript
pITB1126	pET-28a(+)_EL10	C-terminal	GenScript
pITB1127	pET-28a(+)_EL10::H81A	C-terminal	ITB Stuttgart
pITB1128	pET-28a(+)_EL11	N-terminal	GenScript
pITB1129	pET-28a(+)_EL12	N-terminal	GenScript
pITB1130	pET-28a(+)_EL13	C-terminal	GenScript
pITB1131	pET-28a(+)_EL14	C-terminal	GenScript

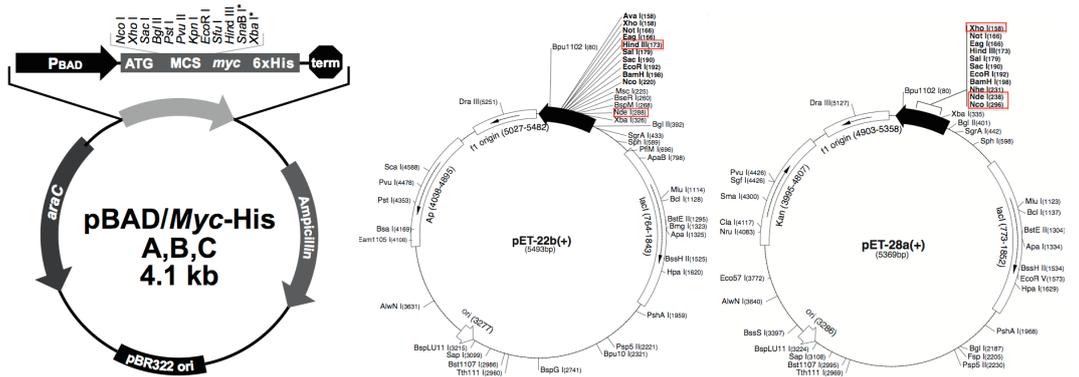


Abbildung 2.1: Vektorkarten der Plasmide pBAD/myc-His A (links) für die HhcC, deren Gen zwischen *NcoI* und *PstI* kloniert wurde, pET-22b(+) für die LEH, deren Gen zwischen *NdeI* und *HindIII* kloniert wurde (rote Markierungen, mittig) und pET28-a(+) für die de novo Designs, deren Gene entweder zwischen *NdeI* und *XhoI* oder *NcoI* und *XhoI* kloniert wurden (rote Markierungen, rechts).

2.2 Medien zum Kultivieren von *E. coli*-Zellen

2.2.1 *E. coli* Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden vier verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet. Der *E. coli*-Stamm DH5 α wird zur Plasmidherstellung verwendet, da dieser Stamm u.a. eine hohe Replikationsrate besitzt. Die *E. coli*-Stämme MC1061, BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) werden zur Proteinexpression verwendet. Während die *E. coli*-Stämme BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) chemischkompetente Zellen sind, handelt es sich bei dem Stamm MC1061 um elektrokompente Zellen. Bei den beiden Stämmen C41(DE3) und C43(DE3) handelt es sich um die sogenannten Walker-Stämme, die Mutanten des BL21(DE3) Stamms sind. Sie zeigten verbesserte Eigenschaften, wie geringere toxische Effekte von Fremdproteinen sowie eine erhöhte Stabilität der transformierten Plasmide.^[75]

Tabelle 2.3: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 realA1 gyrA96 deoR nupG ϕ 80dlac Δ ZM15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r $_k^-$ m $_k^+$), λ^-	ITB Stuttgart
MC1061	F- Δ (ara-leu)7697 [araD139] _{B/r} Δ (codB-lacI)3 galK16 gal E15 λ^- e14 $^-$ mcrA0 relA1 rpsL150(strR) spoT1 mcrB1 hasdR2 (r $^-$ m $^+$)	ITB Stuttgart
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdS _B (r $_B^-$ m $_B^-$) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 indl sam7 nin5])	ITB Stuttgart
C41(DE3)	Mutante von BL21(DE3)	ITB Stuttgart
C43(DE3)	Mutante von BL21(DE3)	ITB Stuttgart

2.2.2 Medien

Nährmedien wurden mit ddH₂O angesetzt und vor Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Es wurden LB-Medium (10 g/L Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, pH 7,0) und TB-Medium (12 g/L Trypton, 24 g/L Hefe-Extrakt, 4 g/L Glycerin) verwendet. Für das TB-Medium wurde der benötigte 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) getrennt vom Medium autoklaviert und anschließend im Verhältnis 1:10 gemischt. LB-Agarplatten enthielten neben den genannten Komponenten noch zusätzlich 1,5 % Agar Agar. Zur Selektion von Transformanden wurden den Medien nach dem Autoklavieren bestimmte Antibiotika hinzugegeben: Ampicillin (100 µg/mL) oder Kanamycin (30 µg/mL).

2.2.3 Zellwachstum und Dauerkulturen

In einem Erlenmeyerkolben wurden TB-Flüssigkulturen angezogen. Deren Volumen entsprach 20 % des Eigenvolumen vom Kolben. Dadurch wurde eine genügend gute Sauerstoffversorgung erhalten. Die Anzucht der Flüssig- und Festkulturen erfolgte bei 37 °C. Flüssigkulturen wurden zusätzlich bei 180 UpM geschüttelt. Das Zellwachstum wurde mittels Absorptionsmessung bei 600 nm (OD₆₀₀) in einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) verfolgt. Zur Herstellung von *E. coli* Dauerkulturen wurden LB-Übernachtflüssigkulturen Proben von 750 µL entnommen, mit einem sterilem Glycerin-Puffer-Gemisch (65 % Glycerin, 35 % 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4)) versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.3 Methoden

2.3.1 Plasmid Transformation

Zur Transformation chemischkompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA wurde die Hitzeschockmethode verwendet. 50 µL chemischkompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2 µL Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock (42 °C, 45 s) ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation elektrokompeter *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA wurde die Elektroporationsmethode angewendet. 40 µL Zell-

suspension und 1,5 μ L Plasmid wurden in eine vorgekühlte Pulser®Cuvette (BioRad, Hercules, CA, USA) gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Durch einen kurzen elektrischen Puls, der durch einen Kondensator erzeugt wurde (25 μ F, 200 Ω , 4,2-4,5 ms, 2 kV, 10 kV/cm), wurden die Zellen mit Plasmid-DNA transformiert.

Nach der Zugabe von 500 μ L sterilem LB-Medium wurden die Zellen 60 min bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (13000 UpM, 1 min) und der Überstand bis auf 100 μ L verworfen. Das Pellet wurde im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C über Nacht.

2.3.2 Herstellung chemischkompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von chemischkompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Rubidiumchloridmethode angewendet. Dazu wurden 100 mL Hauptkultur mit einer 5 mL LB-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 180 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (4000 g_N, 4 °C, 10 min) steril geerntet. Das Zellpellet wurde in 40 mL TbfI-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (4000 g_N, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in TbfII-Puffer (100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,5) aufgenommen und resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen in 50 μ L Aliquots mit Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen und Sequenzierung

Aus einer 5 mL LB-Übernachtskultur konnte mittels des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kits der Firma ZymoResearch, Plasmid-DNA isoliert werden. Die anschließende Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte an einem NanoDrop 1000 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde zur Firma GATC Biotech nach Köln geschickt. Diese sequenzierte Plasmid-

DNA nach der Didesoxy-Methode nach Sanger.^[76] Die Standardprimer T7 und pET-RP, die zur Sequenzierung von pET-Vektoren dienen, wurden von GATC Biotech zur Verfügung gestellt.

2.3.4 Modifizierung eines Gens mittels QC™-Mutagenese

Ein Gen kann durch verschiedene Methoden gezielt modifiziert werden, u.a. durch die ortsgerichtete Mutagenese. Um dies zu ermöglichen wurde die QuikChange™-Methode, wie sie im Herstellerprotokoll des QuikChange™ *Site-Directed Mutagenesis* Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) beschrieben wurde, angewendet. Bei diesem Verfahren wurde eine Punktmutation durch ein PCR-ähnliche Methode direkt in das klonierte Gen eingeführt, indem DNA-Abschnitte komplementärer Oligonukleotide (Primer) verwendet wurden, die die gewünschte Mutation enthielten. Durch die Erweiterung der Primer während der Elongation mit Hilfe der DNA-Polymerase *Pfu* (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) entsteht Plasmid-DNA mit den gewünschten Mutationen. Durch anschließende methylierungsabhängige Restriktion mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde die Plasmid-DNA des unveränderten Ausgangsplasmid zerstört.

Tabelle 2.4: QC™-PCR Ansatz.

Substanz	Volumen (µL)	Endkonzentration
<i>Pfu</i> -Buffer (10x)	5	1x
Plasmid-DNA (Templat)	1	0,5-5 ng/µL
Primer <i>forward</i>	1	0,2 µL
Primer <i>reverse</i>	1	0,2 µL
dNTP-Mix (10 mM pro NTP)	1	250 µM (pro NTP)
<i>Pfu</i> Polymerase	1	
ddH ₂ O	40	

Tabelle 2.5: Temperaturprofil für die QC™-PCR.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95	1 min	1
Denaturierung	95	2 min	
<i>Annealing</i> ¹⁾	50 – 70	1 min	16
Elongation ²⁾	72	12,5 min	
Elongation	72	3 min	

¹⁾ *Annealing*-Temperatur ist abhängig von den Primern.

²⁾ Elongationszeit ist abhängig von der Größe des DNA Templats.

2.3.5 Klonierung von Plasmiden

Das Klonieren besteht aus drei Schritten: Restriktion, Ligation und Transformation. Das Klonieren ist der Einbau eines Gens oder eines DNA-Fragments in einen gewünschten Vektor. Im ersten Schritt der Restriktion werden spezifisch Phosphordiesterbindungen in der DNA hydrolytisch gespaltet. Für diesen Schritt gibt es Restriktionsendonukleasen, die palindromische Nukleotidsequenzen erkennen und spalten können. Durch die Spaltung entstehen entweder je nach Restriktionsenzym *blunt ends* (glatte Enden) oder *sticky ends* (klebrige Enden). Die entsprechenden Restriktionsenzyme im dazugehörigen Puffer werden mit der Plasmid-DNA vermischt, 2 h bei 37 °C inkubiert und durch einen Hitzeschock inaktiviert. Es erfolgt eine Aufreinigung des Restriktionsansatzes mittels präparativer Agarosegelelektrophorese, um die die Anzahl an positiven Fragmenten während der Ligation zu erhöhen. Die gewünschte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert (Zymoclean™ *Gel DNA recovery kit*). Es wurden zwei aufgereinigte Fragmente erhalten (Vektor und Gen), deren Konzentrationen am NanoDrop bestimmt wurden. Die Ligation beider Fragmente erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphordiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat und der 3'-Hydroxygruppe. Das gewünschte Gen wur-

de in einem drei- bis fünffachen Überschuss zum Vektor eingesetzt. 20 U/ μ L T4-DNA-Ligase wurden mit dem dazugehörigen Puffer und den beiden Fragmenten durchmischt und 1 h bei 22 °C inkubiert und durch einen Hitzeschock inaktiviert. *E. coli* DH5 α Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Es folgte die Isolierung der Plasmid-DNA und anschließende Sequenzierung (Kapitel 2.3.3, S. 29).

2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente im analytischen und präparativen Maßstab bezüglich ihrer Größe getrennt werden. Durch das Anlegen einer Spannung kann die negativ geladene DNA durch die Poren einer Agarosematrix (1 % Agarose in TAE Puffer mit 0,1 μ L/mL GelRed) transportiert werden. Die kleineren Fragmente sind mobiler, wodurch sie als erstes durch die Matrix transportiert werden. Das Agarosegel wird mit TAE-Puffer (40 mM TRIS-Acetat, 10 mM EDTA, pH 8,5) überschichtet. Die Proben werden mit 6X DNA Probepuffer (GelPilot DNA Loading Dye 6X, Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und in die Kammern des Gels gefüllt. Ebenso wurde ein DNA-Standard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, #SM0333, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) auf das Gel aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 120V angelegt, so dass nach Beendigung der Elektrophorese die Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht werden konnten.

2.3.7 Proteinexpression

Zur Expression der HheC wurde eine 20 mL TB-Übernachtskultur (100 μ g/mL Ampicillin) von einer LB-Agarplatte angeimpft und bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Die komplette Vorkultur wurde in 200 mL TBPS-Medium gegeben und 24 h bei 30 °C inkubiert. Es erfolgte die Ernte mittels Zentrifugation (8000 g_N , 4 °C, 15 min).

Das Verfahren zur Expression der LEH und *de novo* Enzyme war das gleiche, so dass eine 5 mL LB-Übernachtskultur (100 μ g/mL Ampicillin bzw. 30 μ g/mL Kanamycin) direkt von einem Glycerol-Stock angeimpft wurde und nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C (180 UpM) dazu verwendet wurde, eine 400 mL TB-Hauptkultur (100 μ g/mL Ampicillin bzw. 30 μ g/mL Kanamycin) anzupflanzen. Die Animpf-OD₆₀₀ betrug 0,05 und

wurde durch Inkubation bei 37 °C (180 UpM) erhöht auf 0,5. Es erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG und einem Temperaturwechsel zu 30 °C. Nach 24 h wurden die Zellen mittels Zentrifugation (8000 g_N, 4 °C, 15 min) geerntet und bis zum weiteren Bedarf in Form eines Zellpellets bei -80 °C gelagert.

2.3.8 Zellaufschluss und Proteinaufbereitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene mechanische Zellaufschlussmethoden verwendet. Zum einen wurden die Zellen mittels Ultraschall im Sonifier (Branson Sonifier W250) aufgeschlossen und zum anderen wurden die Zellen mittels Hochdruck mit einem Emulsiflex-C5 (Avestin, Ottawa, Kanada) aufgeschlossen. Für beide Methoden wurden die *E. coli* Zellpellets mit 5 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) pro Gramm Pellet resuspendiert. Der Zellaufschluss durch Ultraschall erfolgte bei 80 W und einem Arbeitsintervall von 20 % auf Eiswasser viermal je eine Minute mit einer Minute Pause dazwischen. Der Zellaufschluss mittels Hochdruck wurde zunächst mittels eines Gewebehomogenisators (Radnor, PA, USA) homogenisiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss durch viermalige Behandlung durch einen Hochdruckhomogenisator. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (18000 UpM, 4 °C, 30 min) vom löslichen Überstand getrennt.

Die verwendeten Gene der LEH und der *de novo* Enzyme enthielten einen His₆-Tag (C- oder N-terminal), wodurch das exprimierte Gen über Co-Affinitätschromatographie aufgearbeitet werden konnte. Die Aufarbeitung erfolgte mittels Talon® Metallaffinitätsäulen (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Die stationäre Phase dieser Säulen besteht aus einem vierzähligen Chelatkomplex, der mit Cobalt beladen ist. Dieser Chelatkomplex hat eine hohe Affinität und Spezifität zu Polyhistidinsequenzen und dient somit zur Abtrennung der gewünschten Proteine vom Zelllysate. Die Säulen wurden im ersten Schritt mit 10 mL Bindepuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 300 mM NaCl, pH 7,4) äquilibriert. Anschließend wurden 10 mL Lysat auf die Säule gebracht. Die Säule mit dem enthaltenden Protein wurde mit Waschpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 300 mM NaCl und 5 mM Imidazol, pH 7,4) gespült und mit Elutionspuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 300 mM NaCl und 150 mM Imidazol, pH 7,4) von

der Säule gewaschen. Um das Imidazol aus der Enzymlösung zu bekommen, wurden zwei Verfahren angewendet. Zum Einen wurden SpinColumns (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) verwendet. Diese SpinColumns bestehen aus zwei Kammern, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. In die obere Kammer wird die Enzymlösung gegeben und zentrifugiert ($4000 g_N$, 4°C , 15 min). Alle Moleküle, die kleiner sind als 10 kDa gehen durch die Membran durch, so dass in der oberen Kammer nahezu reine Enzymlösung erhalten bleibt. Die obere Kammer wird nach je 15 min wieder mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt. Zum Anderen wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurden 4 L an dem gewünschten Puffer angesetzt. In eine Schlauch, der aus einer semipermeablen Membran besteht, wurde die Enzymlösung eingefüllt und in die 4 L Puffer gegeben. Bei 4°C wurde die Pufferlösung gerührt, so dass das Imidazol aufgrund von Osmose in die Pufferlösung überging, bis ein Gleichgewicht herrschte. Die Pufferlösung wurde nach 4 h erneuert und über Nacht ein weiteres Mal bei 4°C gerührt. Die Dialyse wurde gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer (75,3 % K_2HPO_4 und 24,7 % KH_2PO_4 , pH 7,4), Citratpuffer (15,1 % Zitronensäure und 84,9 % Natriumcitrat, pH 6,0) oder Acetatpuffer (34,9 % Essigsäure und 65,1 % Natriumacetat, pH 5,0) durchgeführt.

Die HheC hat keinen Polyhistidintag und kann somit nicht über Affinitätschromatographie aufgearbeitet werden. Die Aufarbeitung erfolgte über drei FPLC (*fast protein liquid chromatography*)-Schritte an einem ÄKTA-System. Der erste Schritt geschieht über eine Anionenaustauschsäule. Das Lysat wurde auf eine Q-Sepharose Säule geladen. Die Flussrate lag dabei bei 10 mL/min. Als Puffer A wurde TEMG-Puffer (10 mM Tris- SO_4 pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 Mercaptoethanol, 10 % Glycerol) und als Puffer B wurde TEMG-Puffer mit 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet. Zunächst wurden innerhalb von 15 mL von 0 % Puffer B auf 15 % gespült, anschließend wurde so lange mit 15 % Puffer B gespült, bis das Enzym von der Säule eluiert ist. Innerhalb von 100 mL wurde der Anteil von Puffer B auf 45 % erhöht, um diesen anschließend auf 100 % innerhalb von 35 mL zu erhöhen. Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt und die Flussrate betrug 5 mL/min. Der zweite Schritt war ebenfalls eine Anionenaustauschschritt. Die Fraktionen aus dem ersten Schritt wurden filtriert und auf eine Säule mit Resource Q als

stationäre Phase geladen. Zunächst wurden innerhalb von 15 mL von 0 % Puffer B auf 15 % gespült, anschließend wurde so lange mit 15 % Puffer B gespült, bis das Enzym von der Säule eluiert ist. Innerhalb von 100 mL wurde der Anteil von Puffer B auf 45 % erhöht, um diesen anschließend auf 100 % innerhalb von 35 mL zu erhöhen. Es wurden 5 mL Fraktionen gesammelt und die Flussrate betrug 5 mL/min. Der letzte Schritt beruht auf hydrophober Interaktionschromatographie über Phenylsepharose. Das Protein wurde auf die Säule geladen. Dem Puffer B wurde Ammoniumsulfat hinzugefügt, so dass es eine Konzentration von 1,5 M hatte. Das Protein wurde innerhalb von 20 mL in einem Gradienten von 1,5 zu 0 M Ammoniumsulfat von der Säule mit einem Fluss von 0,5 mL/min in 0,5 mL-Fractionen gespült. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE ermittelt.

2.3.9 Diskontinuierliche SDS-PolyAcrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewichtes.^[76] SDS lagert sich als anionisches Tensid an Proteine an und denaturiert diese durch Abstoßung der Sulfatgruppen. Durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken reduziert. Die Eigenladung der Proteine kann vernachlässigt werden, da sich je nach Proteingröße mehrere Hundert SDS-Moleküle an das Protein anlagern. Im ersten Schritt werden die Proteine in einer schmalen Lauffront in einem großporigen Sammelgel gesammelt, um anschließend durch das Durchlaufen eines feinporigeres Trenngels getrennt zu werden.

Pro PolyAcrylamid-Gel wurden 5 mL des noch flüssigen Trenngels (1,3 mL 30 % Acrylamid Mix, 1,0 mL 1,5 M Tris, 0,04 mL 10 % SDS, 0,04 mL 10 % APS, 0,0016 mL TEMED, 1,5 mL ddH₂O) in die Vorrichtung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (0,17 mL 30 % Acrylamid Mix, 0,13 mL 1,0 M Tris, 0,01 mL 10 % SDS, 0,01 mL 10 % APS, 0,001 mL TEMED, 0,68 mL ddH₂O) oben drüber gegossen. Vor der Polymerisation des Sammelgels wurde ein Probenkamm für die Ausformung von Probenaschen eingesetzt. Pro Tasche wurden 8-10 ng Protein (10-20 μ L) aufgetragen. Das Protein wurde zunächst mit 1X Ladepuffer (6X: 350 mM Tris-HCl, 600 mM DTT, 30 % Glycerin, 10 %

SDS, 0,12 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Standard wurden 5 µL PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas) in einer extra Tasche aufgetragen. Nach Befüllen der Elektrophorese Kammer mit 1X SDS-Laufpuffer (10X: 30,2 g Tris, 144 g Glycerin, 10 g SDS, 1000 mL ddH₂O) wurden die Elektrophorese bei 25 A gestartet. Nach Durchlaufen des Trenngels wurde die Stromstärke auf 50 A erhöht. Die fertigen Gele wurde anschließend in einer Coomassie-Färbung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 1 g/L Coomassie-Brilliantblau R-250, 60 % ddH₂O) über Nacht gefärbt und in einer Entfärbelösung (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 60 % ddH₂O) entfärbt. Die dadurch sichtbaren Banden konnten nun photographiert werden.

2.3.10 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels des BCA Protein Assay Kits von ThermoScientific (Waltham, MA, USA) bestimmt. Das Prinzip beruht auf der entwickelten Methode von Smith *et al.* Es dient dazu Proteinkonzentrationen unbekannter Proben zu bestimmen.^[77] Cu²⁺-Ionen werden zu Cu⁺-Ionen im alkalischen Medium reduziert. Die einwertigen Ionen werden von zwei Molekülen Bichinonsäure (BCA) komplexiert, so dass die Menge an gebildeten Cu⁺-Ionen proportional zur Menge des gebildeten Komplexes ist. Da die Menge an reduziertem Kupferionen proportional zu der in der Probe enthaltenden Proteinmenge ist, kann eine Aussage über die Proteinkonzentration anhand der Menge des gebildeten Komplexes getroffen werden. Diese Menge kann photometrische bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden.

Für eine Kalibriergerade wurden bestimmte Konzentrationen (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/mL) an *Bovines Rinderserumalbumin* (BSA) vermessen. Das Verfahren wurde durchgeführt, wie im Herstellerprotokoll angegeben. Die Absorption wurde nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C bei 562 nm gemessen. Die Konzentrationen der unbekannt Probe konnten anhand der Kalibriergeraden bestimmt werden.

2.3.11 Immobilisation der LEH

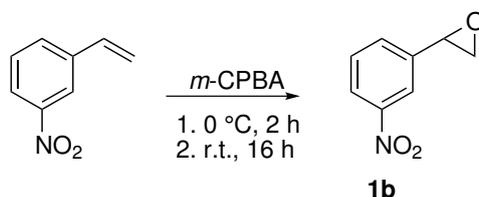
Die LEH wurde wie in Abschnitt 2.3.8 aufgearbeitet und dessen Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 2.3.10) bestimmt. Es wurden 1 mg/mL LEH in 50 mM Kaliumphos-

phatpuffer gelöst und 10 mg Eupergit®C dazu gegeben. Die entstandene Suspension wurde bei 25 °C für 3-24 h bei 120 UpM geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (8000 g_N , 4 °C, 15 min) und der Überstand in einem Falcon gesammelt. Das Eupergit®C wurde in 40 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 0,1 M Ethanolamin aufgenommen und weitere 30 min bei 25 °C und 120 UpM geschüttelt, um die verbleibenden freien Bindestellen am Eupergit®C zu blockieren. Diese Suspension wurde anschließend durch eine Vakuumfritte filtriert und das Filtrat in einem Falcon gesammelt. Der Filterkuchen wurde mit 80 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer und 3x mit je 80 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 M NaCl gespült. Jedes Filtrat wurde in einem extra Falcon gesammelt, um anschließend den Proteingehalt jeder einzelnen Fraktion zu bestimmen, um die Menge an immobilisiertem Enzym zu berechnen.

2.4 Biotransformationen und Synthesen

2.4.1 Biotransformationen

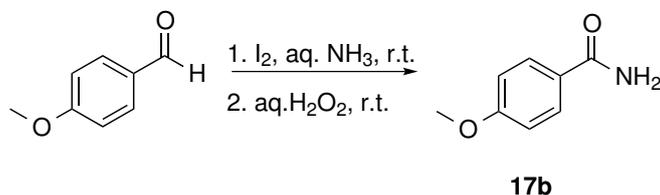
In diesem Abschnitt wird die allgemeine Vorgehensweise von Biotransformationen beschrieben. In einem 2 mL-Eppendorfgefäß wurde aufgearbeitete Enzymlösung vorgelegt, die Substrate in Form einer Acetonitril- oder eine DMSO-Stammlösung hinzugegeben (0-2 % Endkonzentration an Acetonitril bzw. DMSO) und mit Puffer auf 1 mL aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei einer bestimmten Temperatur für eine bestimmte Zeit bei 650 UpM geschüttelt. Je nach Enzym wurde der Reaktionsansatz entweder mit 2x mit je 500 μ L Essigsäureethylester extrahiert und anschließend über Na_2SO_4 getrocknet oder der Reaktionsansatz wurde mit 90 mM H_2SO_4 versetzt und 15 min bei 80 °C erhitzt, um die Reaktion zu quenchen. Es erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation (16000 g_N , 4 °C) und das Überführen in Glasvials, die mit 180 mM NaOH gefüllt waren. Es folgte eine Analyse per GC oder HPLC.

2.4.2 Synthese von 3-Nitrostyroxid (**1b**)

	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
3-Nitrostyrol	149,2	13,4	1,87	2	1
<i>m</i> -CPBA (70 %)	172,2	14,8	-	3,6	1,1

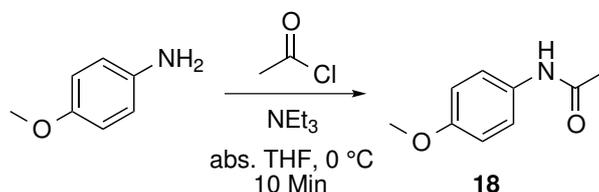
3-Nitrostyrol wurden in 40 mL Dichlormethan gegeben und gekühlt. Nachdem *m*-CPBA hinzugegeben wurde. Nach 2 h rühren bei 0 °C wurde das Eisbad entfernt und weitere 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und die ausgefallene Benzoesäure filtriert. Das Filtrat wurde mit 200 mL Natriumhydrogencarbonat (10 %) gewaschen. Die vereinigte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingeeengt. Es erfolgte eine Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat: 3/1) und das Produkt konnte als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 2,2 g (62 %) erhalten werden. $R_f=0,54$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,16 (2H, m), 7,62 (2H, m), 3,98 (1H, m), 2,32 (1H, m), 2,81 (1H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 148,5, 140,1, 131,5, 129,6, 123,1, 126,9, 51,5. Die gemessenen Werte stimmen mit der Literatur überein.^[78]

2.4.3 Synthese von 4-Methoxybenzamid (17b)



	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
Anisaldehyd	136,1	5	0,608	-	1
Iod	126,9	5,5	-	0,98	1,1
Ammoniak (25 %)	17	-	32	-	-
Wasserstoffperoxid (35 %)	34	-	3	-	-

Anisaldehyd und Iod wurden in wässriger Ammoniaklösung und 5 mL THF bei Raumtemperatur gelöst. Die schwarze Lösung verfärbte sich orange nachdem das Iod vollständig gelöst war. Zu dieser Lösung wurden anschließend wässriges Wasserstoffperoxid hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert und dreimal mit je 20 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingedunstet. 500 mg wurden mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan: 3/1). Es wurden 250 mg (33 %) des Produkts als weißes Pulver erhalten. R_f -Wert=0,3. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,78 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 6,94 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 3,86 (3H, s). Die gemessenen Werte stimmen mit der Literatur überein.^[79]

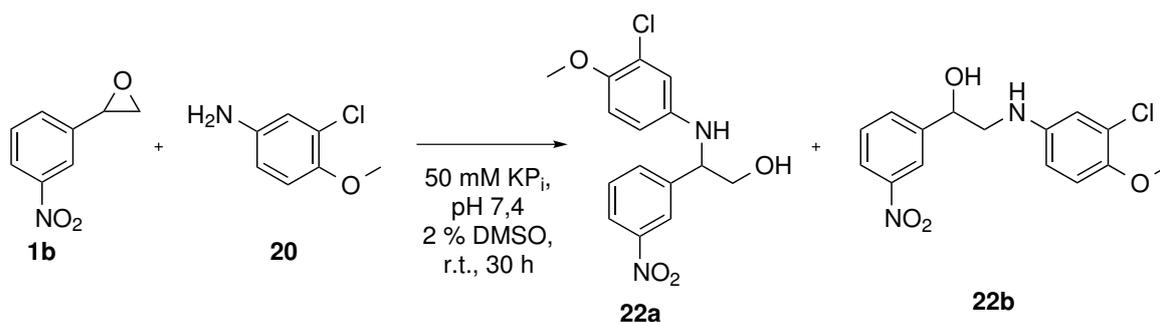
2.4.4 Synthese von *N*-(4-Methoxyphenyl)acetamide (**18**)

	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
<i>p</i> -Anisidin	123,2	9	-	1,11	1
Acetylchlorid	78,5	9,9	0,70	0,78	1,1
Triethylamin	101,2	10,8	1,5	1,09	1,2

Unter Stickstoffatmosphäre wurden *p*-Anisidin und Triethylamin in 30 mL wasserfreiem THF vorgelegt und in einem Eisbad gekühlt. Acetylchlorid wurde langsam hinzugegossen und 10 min gerührt. Der dabei entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingedunstet und mittels Säulenchromatographie aufgearbeitet (Cyclohexan/Ethylacetat: 1/3). Es wurden 885 mg (60 %) des Produkts als weißen Feststoff erhalten. R_f -Wert=0,4. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,39 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 6,86 (2H, d, $J = 7,4$ Hz), 3,79 (3H, s), 2,15 (3H, s). Die gemessenen Werte stimmten mit der Literatur überein.^[80]

2.4.5 Synthese von

2-(3-Chloro-4-methoxyphenyl)amino)-2-(3-nitrophenyl)ethanol (22a)
und 2-(3-Chloro-4-methoxyphenyl)amino)-1-(3-nitrophenyl)ethanol (22b)



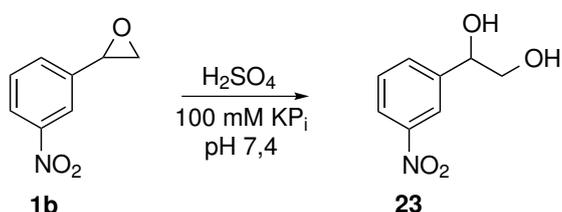
	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
3-Nitrostyroxid	165,1	3	-	0,50	1
3,4-Chloromethoxyanilin	157,6	3	-	0,47	1

3-Nitrostyroxid und 3,4-Chloromethoxyanilin wurden in 2 mL DMSO und 100 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 h wurde der Reaktionsansatz dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert und dreimal mit je 30 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingedunstet. Die Produkte wurden nach Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat: 3/1) als oranges Öl (**22a**) bzw. roten Feststoff (**22b**) erhalten. Zur Charakterisierung wurden ^1H -, ^{13}C -, HSQCTM-, HMBC-NMR und MS-Analytik durchgeführt. Aus diesen Daten konnten die Produkte eindeutig bestimmt werden. (**22a**) $R_f=0,44$. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,24 (1H, m), 8,15 (1H, m), 7,73 (1H, m), 7,53 (1H, t, $J = 7,9$ Hz), 6,72 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,38 (1H, dd, $J = 8,7, 2,8$ Hz), 4,5 (dd, 1H, $J = 6,9, 4,2$ Hz), 4,0 (m, 1H), 3,78 (s, 3H). ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 148,7, 148,0, 142,6, 141,2, 133,0, 129,9, 123,4, 122,9, 121,8, 116,2, 113,9, 112,9, 66,7, 59,9, 56,8. HRMS (ESI+, m/z) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 345,0898, gefunden 345,0633.

2 Material und Methoden

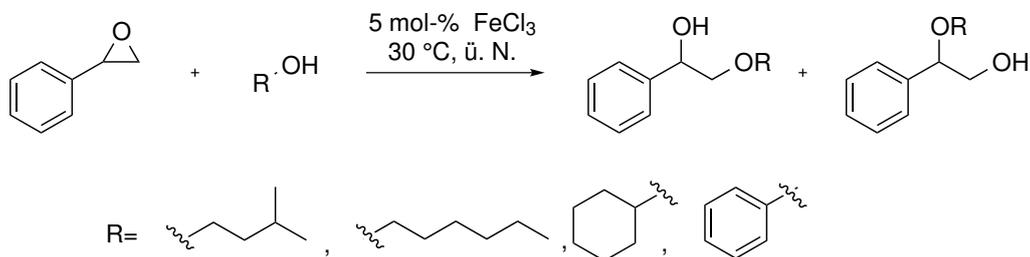
(**22b**) $R_f=0,5$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,28 (1H, m), 8,17 (1H, m), 7,74 (1H, d, $J = 7,8$), 7,56 (1H, t, $J = 15,8$ Hz), 6,82 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), 6,74 (1H, d, $J = 2,9$ Hz), 6,56 (dd, 1H, $J = 8,7, 2,9$ Hz), 5,0 (dd, 1H, $J = 8,5, 3,6$ Hz), 3,83 (s, 3H), 3,4-3,2 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 148,4, 148,2, 144,1, 142,1, 131,9, 129,6, 123,5, 122,9, 120,9, 116,1, 114,1, 112,9, 71,4, 56,9, 52,5. HRMS (ESI+, m/z) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 345,0898, gefunden 345,0627.

2.4.6 Synthese von 3-Nitrostyroidiol (**23**)



	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
3-Nitrostyroxid	165,1	0,1	-	0,02	1
Schwefelsäure (conc.)	98,1	1,8	0,1	0,18	18

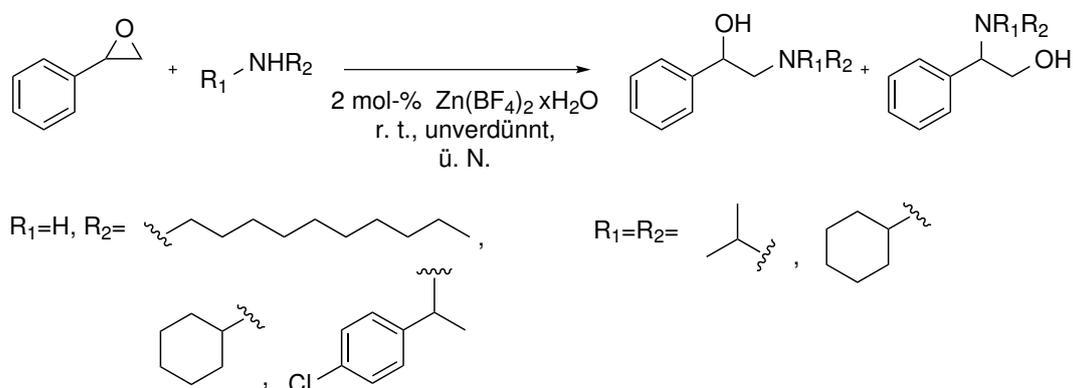
3-Nitrostyroxid wurde in 50 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst. Nach der Zugabe von Schwefelsäure wurde der Ansatz 12 h bei 30 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde dreimal mit je 10 mL Essigsäureethylester extrahiert und dreimal mit je 10 mL Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingedunstet. Die Produkte wurden durch Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat: 1/1) aufgearbeitet und mittels $^1\text{H-NMR}$ charakterisiert. $R_f=0,27$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,17 (1H, m), 7,73 (1H, d, $J = 7,7$ Hz), 7,6 (1H, m), 4,9 (1H, m), 3,86 (1H, m), 3,67 (1H, m).

2.4.7 Synthese verschiedener β -Hydroxyetherderivate

	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
Styroloxid	120,1	1	0,142	0,12	1
Eisen(III)chlorid	162,2	0,05	-	0,081	0,05

In einem Rundkolben wurde Styroloxid in 5 mL des gewünschten Alkohols gelöst und FeCl_3 hinzugefügt. Nach Rühren bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht wurde die Probe dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und wurde in Essigsäureethylester verdünnt direkt in die GC/MS eingespritzt. Es konnte kein Produkt für die Kombination Phenol und Styroloxid detektiert werden. Auf das vollständige Aufarbeiten mittels Säulenchromatographie wurde verzichtet, da diese Reaktion lediglich dazu diente, eine Analytikmethode mittels HPLC zu entwickeln.

2.4.8 Synthese verschiedener Aminoalkoholderivate



	M [g/mol]	n [mmol]	V [mL]	m [g]	eq
Styroxid	120,1	2,5	0,142	0,12	1
Amine	verschieden	2,5	verschieden	verschieden	1
Zn(BF ₄) ₂ · xH ₂ O			-	0,018	0,02

In einem Rundkolben wurde Styroxid mit dem gewünschten Amin vorgelegt und Zn(BF₄)₂ · xH₂O hinzugefügt. Nach Rühren bei Raumtemperatur für vier Stunden wurde die Lösung in 10 mL Essigsäureethylester aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und wurde in Essigsäureethylester verdünnt direkt in die GC/MS eingespritzt. Es konnte kein Produkt für die Kombination Diisopropylamin, Decanamin oder 1,4-Chlorphenylethanamin und Styroxid detektiert werden. Auf das vollständige Aufarbeiten mittels Säulenchromatographie wurde verzichtet, da diese Reaktion lediglich dazu diente, eine Analytikmethode mittels HPLC zu entwickeln.

2.5 Analytik

2.5.1 Gaschromatographie (GC)

Eine Variante der Analyse der Biotransformationen oder Synthesen stellt die Gaschromatographie dar. Es wurde eine Shimadzu GC-2010 (Kyōto, Japan) mit einem Flamme-

nionisationsdetektor (FID) und einer DB-5 Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent, Santa Clara, CA, USA) oder eine ZB-FFAP Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) verwendet. Wasserstoff wurde als Trägergas verwendet und wurde mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s eingesetzt. Ferner wurde auch ein Gaschromatograph kombiniert mit einem FID-Detektor und einem Massenspektrometer der Firma Agilent (Agilent 7890A GC/MS bzw Agilent 5975 Series MSD, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Als Säule diente die Kapillarsäule HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Helium mit einem konstanten Druck von 17,937 psi wurde als Trägergase verwendet. Bei 250 °C wurde 1 µL der Probe injiziert. Die FID-Temperatur betrug 320 °C. Die folgenden entwickelten Methoden wurden an allen Geräten verwendet. Als Standardprogramm wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 60 °C 3 min halten, in 10 °C/min auf 100 °C erhitzen, in 50 °C/min auf 250 °C erhitzen 2 min halten und anschließend in 50 °C/min auf 320 °C erhitzen und für 2 min halten. Um Styroloxid zu analysieren wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 60 °C 2,5 min halten, in 30 °C/min auf 120 °C erhitzen 1 min halten, in 5 °C/min auf 160 °C erhitzen 1 min halten und anschließend in 50 °C/min auf 320 °C erhitzen und für 2 min halten. Zur Analyse von 3-Nitrostyroloxid: 140 °C 1 min halten, in 10 °C/min auf 250 °C erhitzen 3 min halten und anschließend in 20 °C/min auf 320 °C erhitzen. Zur Analyse von Limonenepoxid und Cyclohexanoxid wurde folgendes Programm auf der ZB-FFAP Säule verwendet: 35 °C 4 min halten, in 15 °C/min auf 150 °C erhitzen und anschließend in 30 °C/min auf 300 °C erhitzen und für 2 min halten.

2.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde eine Agilent Technologies 1200 Series (Santa Clara, CA, USA) mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) und einer Zorbax SB-C18 *reversed phase* Säule (Agilent, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus bidest. Wasser und Acetonitril. Des Weiteren wurde eine Agilent Technologies 1260 Infinity (Santa Clara, CA, USA) für die Flüssigkeitschromatographie kombiniert mit einem Massenspektrometer (LC-MS)

und einem Diodenarray-Detektor verwendet.

Alle entwickelten Methoden wurden an beiden Geräten verwendet. Zur Detektion der Produkte zwischen 3-Nitrostyroloxid und 3,4-Chloromethoxyanilin wurde folgende Methode verwendet: Das Laufmittel war ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril im Verhältnis 70:30. Nach 20 min hat sich das Verhältnis zu 50:50 geändert, um nach weiteren 2 min auf 5:95 zu steigen. In einer Nachlaufzeit von 3 min wurde wieder das Anfangsverhältnis von 70:30 erreicht. Die Temperatur des Säulenofens beträgt 20 °C. Der Diodenarray-Detektor nahm ein Chromatogramm bei 250 und 270 nm auf. Für die Hydrolyseaktivität wurde das genannte Programm etwas verkürzt, so dass der Gradient bereits nach 12 min gestoppt wurde und anschließend während der Nachlaufzeit von 3 min das Anfangsverhältnis von 70:30 wieder zu erreichen. Zur Detektion neuer Reaktionen, bei denen andere Nukleophile verwendet wurden, sind die Programme in Tabelle 2.13 gezeigt.

Tabelle 2.13: Programm zur Detektion von Produkten, die durch aminhaltige Nukleophile entstanden sind.

Amine als Nukleophile			Alkohole als Nukleophile		
Zeit (min)	ddH ₂ O	Acetonitril	Zeit (min)	ddH ₂ O	Acetonitril
0	60 %	40 %	0	60 %	40 %
15	50 %	50 %	15	50 %	50 %
22	40 %	60 %	20	5 %	95 %
25	5 %	95 %	22	5 %	95 %
35	5 %	95 %			

Nachlaufzeit: 3 min

2.5.3 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Synthetisierte Moleküle wurden mittels NMR-Spektroskopie analysiert. ¹H und ¹³C-NMR Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer (Billerica, MA,

USA) bei 500,15 und 125,76 MHz aufgenommen. Als Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet. TMS wurde auf die Verschiebung $\delta=0$ ppm (*parts per million*) normiert. Um komplexere Moleküle zu charakterisieren wurden zusätzlich 2D-NMR Spektren aufgenommen, wie $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)- oder $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)-NMR aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Strategie 1: Halohydrindehalogenase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1

Die Halohydrindehalogenase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC) ist ein Enzym, welches beschrieben wird die Epoxidringöffnungsreaktion mit kleinen Nukleophilen katalysieren zu können (Kapitel 1.3.3, S. 19). Durch den Einsatz von Amidinen als alternative Nukleophile sollte das Substratspektrum erweitert werden (Abb. 3.1). Prof. Dr. D. Janssen der Universität Groningen, Niederlande, stellte drei Varianten der HheC zur Verfügung. Dabei handelte es sich entweder um Doppelmutanten (C153S,W249F und T134A,C153S) oder einer Dreifachmutante (T134A,C153S,W249F), die als besonders stabil, selektiv oder aktiv beschrieben wurden.^[81,82] Das *hhec* Gen wurde in Vorarbeiten durch PCR in pGEF_HheC amplifiziert und anschließend in einen pBAD/Myc-HisA Vektor zwischen die Schnittstellen *Nco*I und *Pst*I kloniert. Durch QC™ *site-directed mutagenesis* (Kapitel 2.3.4, S. 30) konnte die Doppelmutante T134A,C153S zum Wildtyp zurück mutiert werden, wodurch das Portfolio nicht nur um den Wildtyp sondern auch um die Variante HheC::C153S erweitert werden konnte.

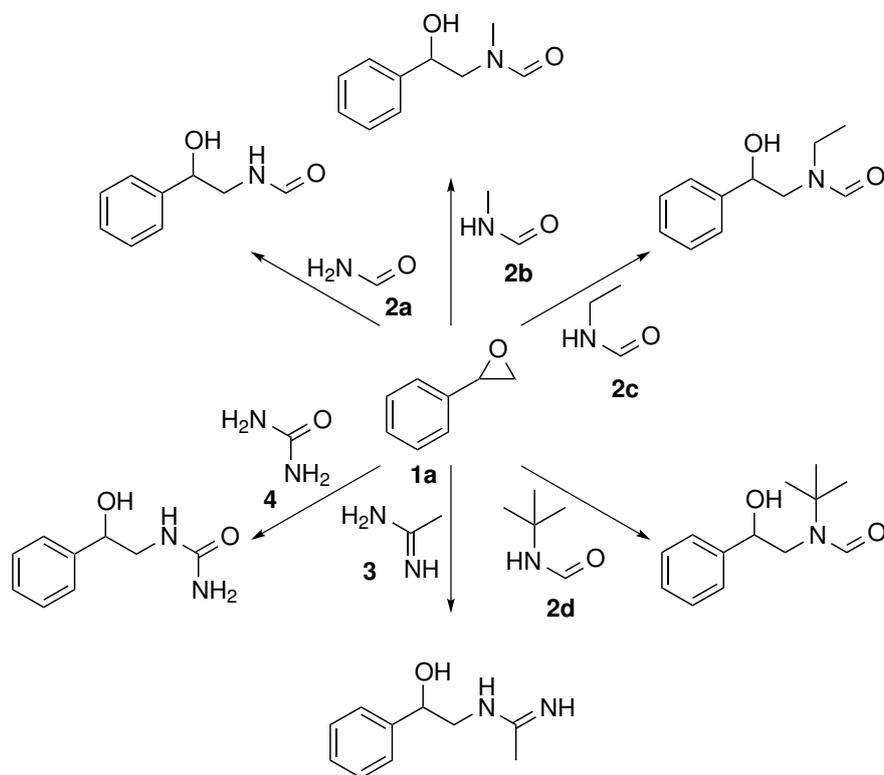


Abbildung 3.1: Vorgeschlagene Reaktionen für die biotechnologische Herstellung von vicinalen Aminoalkoholen, die mit Hilfe der HheC und dessen Varianten katalysiert werden sollten.

Expression und Charakterisierung der HheC-Varianten

Die HheC und ihre Varianten wurden nach einem Protokoll von Mitarbeitern aus Prof. Janssens Gruppe exprimiert (Arabinoseinduktion, 0,02 % Arabinose, 24 h bei 30 °C) und als frisches Lysat für erste Aktivitätstests eingesetzt.^[83] Diese zeigte nach 3 h vollständigen Umsatz von Styroloxid (**1a**) und Natriumazid (**5**) zum Azidoalkohol (**6**) und bestätigten somit die von Hasnaoui-Dijoux *et al.* beschriebene Aktivität (Abb. 3.2).^[74] Die Enantioselektivität wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Der nächste Schritt beinhaltete das Einsetzen von Amidderivaten als Nukleophile (**2a-4**) mit dem Epoxid (**1a**). Die hier genannten Reaktionen verliefen unter Standardbedingungen (5 mM Epoxid, 200 mM Nukleophil, 30 °C, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, ca. 1 mg/mL Enzymlysate, 24 h). Alle folgenden Reaktionen mit den Varianten der HheC wurden als Triplikate durchgeführt. Als Kontrollversuche wurden die gleichen Reak-

3.1 Strategie 1: Halohydrindehalogenase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1

tionen ohne Enzym angesetzt. Neben einer geringen Hydrolyseaktivität von unter 5 %, die der in den Kontrollversuchen entsprach, konnte kein neues Produkt detektiert werden. Auch der Einsatz von einem drei- bis hundertfachen Überschuss an Nukleophil erbrachte nicht den gewünschten Erfolg.

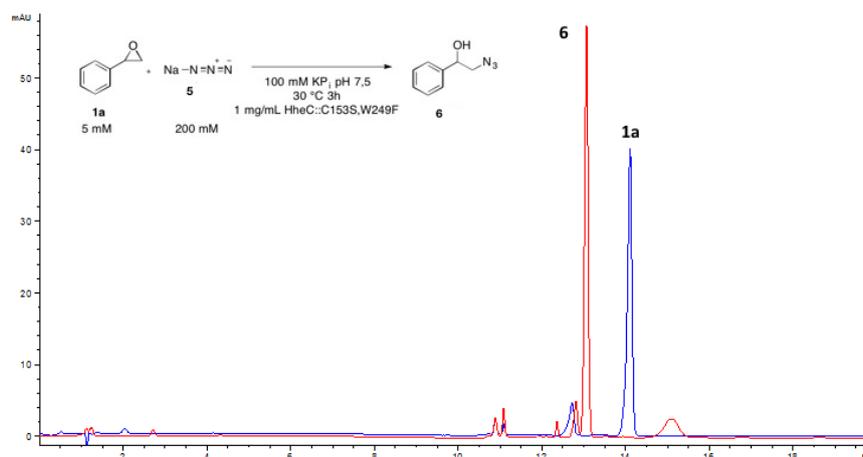


Abbildung 3.2: Die Reaktion von Styroloxid (**1a**) mit Natriumazid (**5**) zum entsprechenden Azidoalkohol (**6**) mit HheC::C153S,W249F. Im dazugehörigen Diagramm ist die Reaktion in rot gezeigt und Styroloxid als Vergleich in blau. Der Peak nach 13 min (rot) konnte dem Azidoalkohol (**6**) zugeordnet werden und der Peak nach 14,1 min (blau) konnte dem Styroloxid (**1a**) zugeordnet werden.

Das Protokoll der etablierten Methode zur Enzymherstellung beschrieb, dass die HheC als aufgereinigtes Enzym stabiler sei als das entsprechende Enzymlysat. Die Autoren beschrieben eine dreistufige Methode zur Aufreinigung der HheC, die auf dem Ionenaustauschprinzip und auf hydrophoben Interaktionen basierte (Kapitel 2.3.8, S. 33). Mithilfe dieses Protokolls wurde die stabilste Variante HheC::C153S,W249F aufgereinigt. Es war möglich das Enzym zu 90 % aufzureinigen (Abb. 3.3) und es mit einer Konzentration von 1,5 mg/mL zu erhalten.

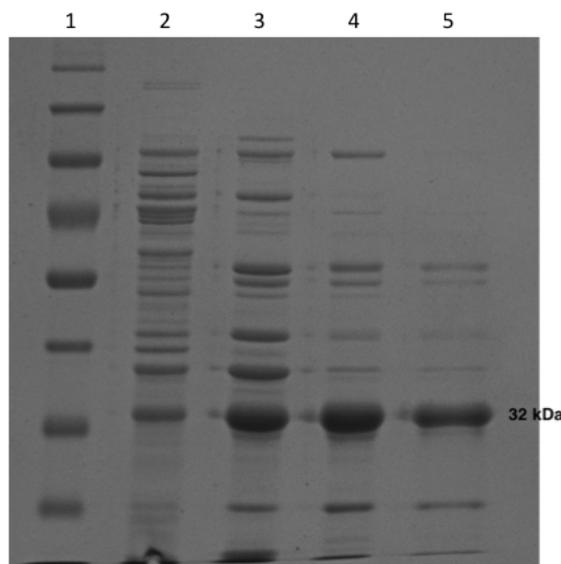


Abbildung 3.3: SDS-Gel der einzelnen Aufarbeitungsschritte der HheC::C153S,W249F (32 kDa): 1: Marker, 2: Lysat, 3: Probe nach dem ersten Aufarbeitungsschritt mit Q-Sepharose, 4: Probe nach dem zweiten Aufarbeitungsschritt mit Resource-Q, 5: Probe nach dem dritten Aufarbeitungsschritt mit Phenylsepharose. Die Reinheit nach dem dritten Schritt betrug ungefähr 90% und die Konzentration lag bei 1,5 mg/mL.

1,0 mg/mL Enzym wurden unter Standardbedingungen auf Aktivität getestet. Nach 24 h konnte für die Reaktion von **1a** mit **5** vollständiger Umsatz gezeigt werden. Die Reaktion von **1a** mit den Amiden (**2a-2d**) bzw. Acetamidin (**3**) zeigte nach 24 h Reaktionszeit nur die Hydrolyse des Epoxids **1a** (< 5%). Es konnte kein neuer Produktpeak detektiert werden, so dass diese Strategie nicht weiter bearbeitet wurde. Als Kontrollversuch wurden die unkatalysierten Reaktionen nur in Puffer durchgeführt.

3.2 Strategie 2: Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14

Die Limonen-1,2-epoxidhydrolase (LEH) wird als epoxidringöffnendes Enzym beschrieben (Kapitel 1.3.2, S. 17), die die Hydrolyse von Limonen-1,2-epoxid (**7**) zu Limonen-1,2-diol (**8**) katalysiert (Abb. 3.4 a). In der Literatur ist kein anderes Nukleophil als Wasser beschrieben, so dass es das Ziel dieser Strategie war, das Nukleophilspektrum um stickstoffhaltige Nukleophile zu erweitern. Dazu sollte die aktive Tasche gezielt

3.2 Strategie 2: Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14

geändert werden (Abb. 3.4 **b**). Als Nukleophile wurden verschiedene Amine (**10-14**) gewählt, die Cyclohexenoxid (**9**) öffnen sollten. Das Epoxid **9** wird als natürliches Substrat beschrieben, welches allerdings eine geringere Aktivität (4 % der Aktivität mit **7**, 3 μ M aufgereinigte LEH, 25 mM Substrat, 30 °C, 1 h) zeigte.^[62] Es wurde als Elektrophil gewählt, da die Reaktion mit Aminen die interessanteren Aminoalkohole erzielen würde als die Reaktion von **7** mit Aminen.

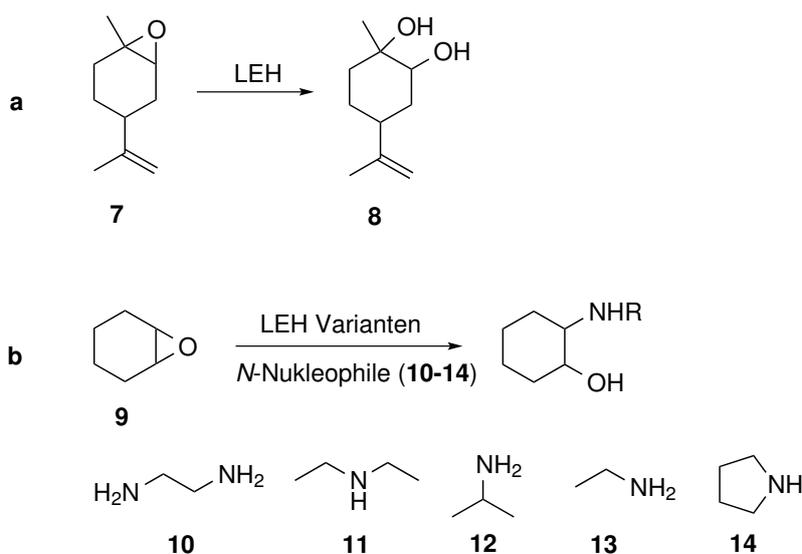


Abbildung 3.4: **a:** Die LEH katalysiert die Hydrolyse von Limonen-1,2-epoxid (**7**) zum Diol (**8**). **b:** Vorgeschlagene Reaktionen für die Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen mit Cyclohexenoxid (**9**) und verschiedenen Aminen (**10-14**), die mit Hilfe der LEH und dessen Varianten katalysiert werden sollten.

3.2.1 Klonierung, Expression und Charakterisierung der LEH

Die LEH wurde als synthetisches Gen von der Firma GeneArt (Regensburg, Deutschland) bezogen. Das Gen besitzt einen N-terminalen His₆-Tag und war in einem Standardvektor der Firma GeneArt kloniert. Es konnte durch den Einsatz der Restriktionsenzyme *Nde*I und *Hind*III aus dem Standardvektor in den pET-22b(+)-Vektor gebracht werden. Um eine anschließende Expressionsstudie¹ durchzuführen, wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pET-22b(+)_LEH transformiert, verschiedene Bedingungen gewählt (Temperaturen: 30 und 37 °C, IPTG-Konzentrationen: 0, 0,5

¹Bei der Expressionsstudie wurde ich von Timo Bäßler in einem sechswöchigem Forschungspraktikum unterstützt.

3 Ergebnisse

und 1 mM) und über verschiedene Zeitpunkte getestet. Das beste Ergebnis konnte mit den Bedingungen 1 mM IPTG bei 30 °C über Nacht erreicht werden (Abb. 3.5).

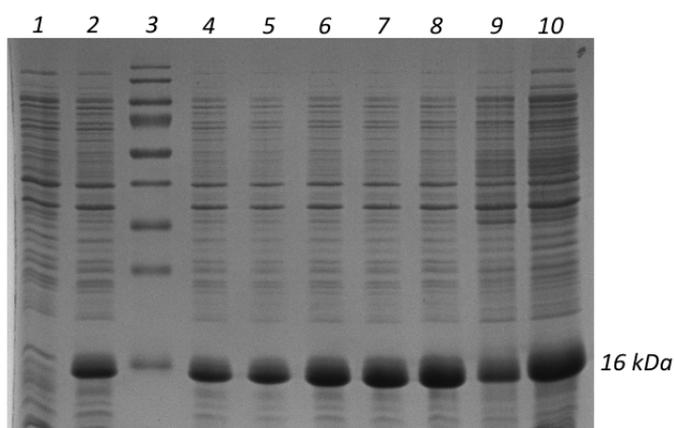


Abbildung 3.5: Expressionsstudie über verschiedene Zeitpunkte bei den Bedingungen 1 mM IPTG bei 30 °C. **1** u **2:** Proben nach 0 h bzw. 2 h, **3:** Marker, **4-8:** Proben nach 3-7 h, **9:** Probe nach 21 h und **10:** Probe nach 24 h.

Alle folgenden Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt, falls nicht anders beschrieben. Erste Aktivitätstests der mittels Co-Affinitätschromatographie aufgereinigten LEH zeigten nach 3 h vollständigen Umsatz von Limonen-1,2-epoxid (**7**) zum Diol (**8**) und bestätigten somit die natürliche Aktivität.^[84] Auch die weiteren Substrate Cyclohexenoxid (**9**) und Styroloxid (**1a**) konnten entsprechend der Literatur zu den beschriebenen Hydrolyseprodukten umgesetzt werden (Abb. 3.6-3.8).^[62, 64, 85]

3.2 Strategie 2: Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14

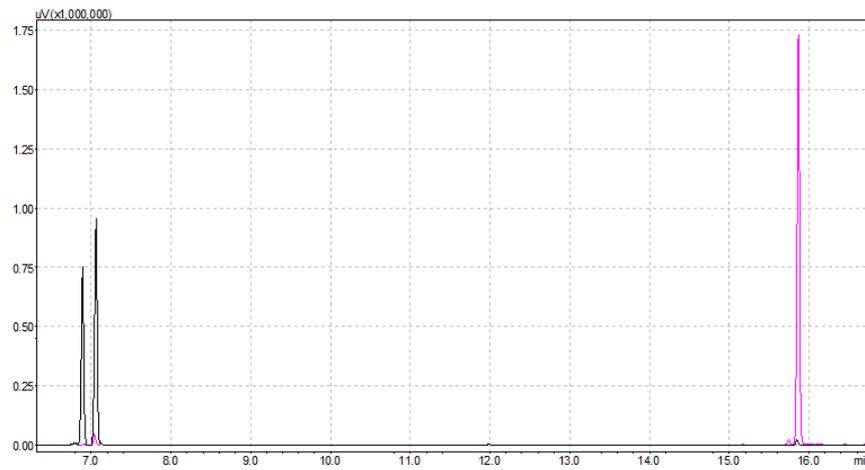


Abbildung 3.6: Die pinke Kurve zeigt die Reaktion von Limonen-1,2-epoxid (**7**, 7 min) zu Limonen-1,2-diol (**8**, 15,8 min). Schwarz zeigt die Referenz des Substrats **7**.

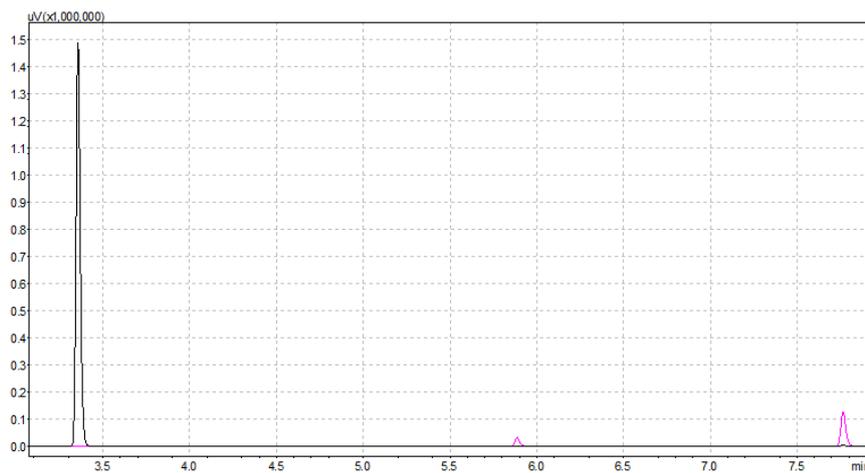


Abbildung 3.7: Die pinke Kurve zeigt die Reaktion von Cyclohexenoxid (**9**, 3,4 min) zu Cyclohexandiol (7,8 min). Schwarz zeigt die Referenz des Substrats **9**.

3 Ergebnisse

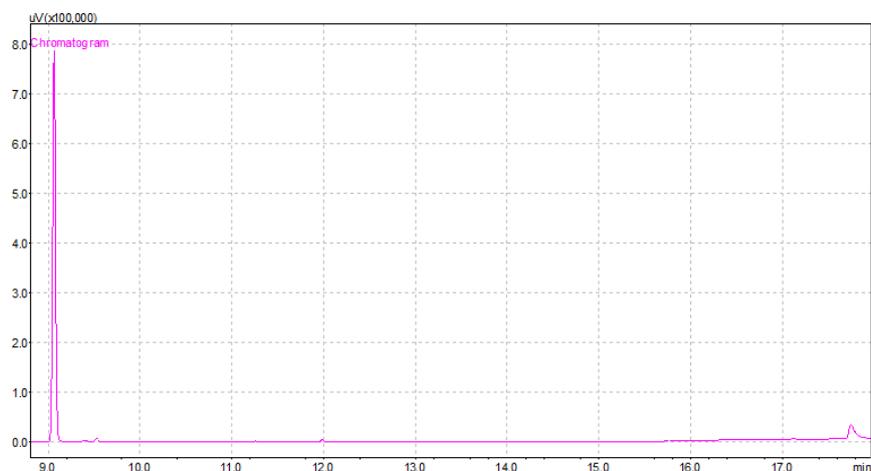


Abbildung 3.8: Die pinke Kurve zeigt die Reaktion von Styroloxid (**1a**, 9 min) zu Phenylethandiol (17,8 min).

Die beste Aktivität konnte mit **7** und **9** erzielt werden (Abb. 3.6, 3.7), die nahezu vollständigen Umsatz (>98 %) nach 3 h zeigten. Das Epoxid **7** ist ein Gemisch aus dem *cis*- und *trans*-Isomer, wodurch es zwei Peaks im GC-Chromatogramm zeigte. Es ist zu sehen, dass die LEH selektiv ist, da die Abnahme des linken der zwei Peaks schneller ist als die Abnahme des rechten Peaks (Abb. 3.6). Um welches Isomer es sich handelt, wurde nicht untersucht, da das Limonen-1,2-epoxid nur als *cis*-/*trans*-Gemisch kommerziell erhältlich ist. In der Literatur wird nur auf die Enantioselektivität der LEH eingegangen.^[62] Das Produkt konnte mit dieser Analytikmethode nur als ein einzelner Peak dargestellt werden.

Die LEH stellte für die Hydrolyse von **1a** einen schwachen Katalysator dar (Abb. 3.8), was auch in Arbeiten von Zheng *et al.* beschrieben wurde.^[64] Für diese Tests wurden Standardbedingungen gewählt: 3 μ M aufgereinigte LEH, 10 mM Substrat, 3 h, 30 °C. Als Vergleich wurde das Epoxid mittels konzentrierter Schwefelsäure hydrolysiert. Als Kontrollexperimente dienten die Reaktionen nur in Puffer ohne Enzym, die Hydrolyseaktivität unter 2 % zeigten.

3.2.2 Rationales Design der aktiven Tasche

Ziel der hier durchgeführten Mutationen ist die Unterdrückung der Wasseraktivierung, so dass die Hydrolyse gehemmt wird. Durch das Einschränken der Hydrolyse sollte ermöglicht werden, dass andere neue Nukleophile akzeptiert werden. Für die Wasseraktivierung sind die Seitenketten Aspartat132, Tyrosin53 und Asparagin55 zuständig (Kapitel 1.3.2, S. 17).^[58] Arand und Mitarbeiter zeigten bereits ein paar Mutationen, die die Aktivität der LEH um bis zu 93 % erniedrigten.^[61] Für das rationale Design wurden die Positionen D132, Y53 und N55 adressiert und im Rahmen einer Bachelorarbeit von Stefanie Zgorzelski durchgeführt.^[86] Diese Positionen wurden mittels QC™ *site-directed mutagenesis* so verändert, dass daraus Einfach- und Doppelmутanten resultierten. Es wurden verschiedene Aminosäuren, wie Alanin, Asparagin, Serin, Threonin, Aspartat, Phenylalanin und/oder Leucin, als Mutationen gewählt (Tab. 3.1). Durch Expression und Aktivitätstests wurden die Mutanten charakterisiert und unter Standardbedingungen mit Cyclohexenoxid **9** als Substrat auf Aktivität getestet (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1: Vorhandene Varianten der LEH, dazugehörige Proteinkonzentrationen und Aktivitäten gegenüber der Hydrolyse.

LEH-Variante		Proteinkonz. ^{a)} [μ M]	Aktivität [%]
LEH Wildtyp		500	99,7 \pm 0,0
LEH::D132A	literaturbekannt ^[61]	keine Expression	-
LEH::D132N	literaturbekannt ^[61]	100	1,3 \pm 0,3
LEH::D132S	S. Zgorzelski ^[86]	15	1,7 \pm 0,2
LEH::D132T	S. Zgorzelski ^[86]	keine Expression	-
LEH::N55A	literaturbekannt ^[61]	310	42,6 \pm 2,1
LEH::N55D	literaturbekannt ^[61]	24	3,4 \pm 0,1
LEH::Y53F	literaturbekannt ^[61]	130	59,7 \pm 4,1
LEH::Y53F,N55A	S. Zgorzelski ^[86]	30	31,8 \pm 2,5
LEH::Y53F,N55L	S. Zgorzelski ^[86]	480	5,8 \pm 0,6
LEH::Y53F,N55D	S. Zgorzelski ^[86]	26	40,6 \pm 6,6

^{a)} Durchschnittswerte der aufgereinigten Enzyme

Der nächste Schritt beinhaltete den Test an neuen Nucleophilen. In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob Amine auf die LEH inhibierend wirken. Es wurden zur normalen Hydrolysereaktion verschiedene Konzentrationen an Aminen **10**, **11**, **13** und **14** als Beispielsubstrate hinzugeben. Um eindeutige Effekte zu sehen, wurden Reaktionsbedingungen gewählt, bei der die LEH keine 100 % Umsatz zeigte (3 μ M LEH, 30 °C, 15 min und 25 mM Limonenepoxid). Ab 60 mM Amin wurde die Aktivität der LEH verringert, so dass in den anschließenden Reaktionen maximal 50 mM Amin (**10-14**) eingesetzt wurden. Bei diesen Versuchen konnte keine Produktbildung außer die des Diols festgestellt werden. 2,5 mM Epoxid **9** und 25-50 mM **10-14** wurden mit 3 μ M aufgereinigter LEH-Varianten bei 30 °C für 4 h eingesetzt. Die Proben wurden mit Essigsäureethylester extrahiert und per GC-FID analysiert. Es konnte keine Entstehung eines neuen Produktpeaks detektiert werden. Als Kontrollversuche dienten wieder die gleichen Reaktionen ohne Enzym, die ebenfalls keine Produktbildung neben der geringen Diolbildung aufwiesen.

3.2.3 Immobilisation der LEH-Wildtyp

Durch das Immobilisieren von Enzymen, werden Enzyme stabilisiert und können theoretisch in organisches Lösemittel gebracht werden. Die LEH sollte deshalb immobilisiert und in organisches Lösungsmittel gebracht werden, um die Konkurrenz zwischen Wasser und einem weiteren Nucleophil unterdrücken zu können. Als Protokoll diente eine Vorlage von Knežević-Jugović und Mitarbeitern, die 2011 eine Methode beschrieben *Candida rugosa* Lipase Typ VII kovalent auf Eupergit®C (Fluka, Buchs, Schweiz) zu immobilisieren. Eupergit®C ist ein Polymer, welches Epoxidgruppen enthält, über die Enzyme kovalent binden können (Abb. 3.9).^[87]

3.2 Strategie 2: Limonen-1,2-epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14

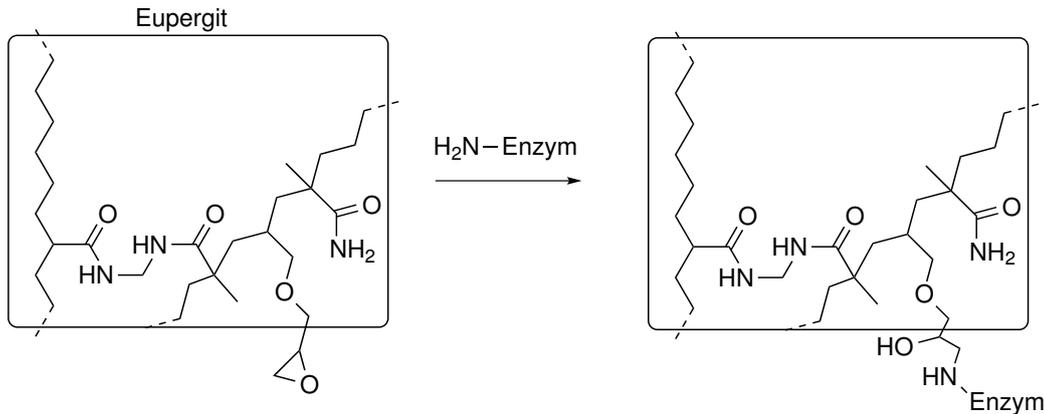


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Enzymimmobilisation auf Eupergit® über Epoxidgruppen.

Der Wildtyp der LEH wurde für 3, 8 und 24 h mit Eupergit®C inkubiert, um anschließend zu bestimmen wie viel aktive LEH immobilisiert werden konnte. Nach jedem Schritt des Immobilisierens wurden Proben genommen, um die Menge an immobilisierter LEH durch die Bestimmung der Konzentration zu ermitteln (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Menge an Enzym während der LEH Immobilisation in Einfachbestimmungen.

	3 h ^{a)}	8 h ^{a)}	24 h ^{a)}	BSA 24 h ^{a)}
eingesetzte LEH	45 mg			
Überstand nach Inkubation	27 mg	20 mg	7 mg	45 mg
Filtrat nach Blockieren mit Ethanolamin	0 mg	0 mg	0 mg	0 mg
Waschflüssigkeit nach Waschung 1	0 mg	0 mg	0 mg	0 mg
Waschflüssigkeit nach Waschung 2	0 mg	0 mg	0 mg	0 mg
immobilisiertes Enzym	18 mg	25 mg	38 mg	0 mg
	40 %	55 %	85 %	0 %

^{a)} Inkubationsdauer bei 25 °C.

Es war möglich die LEH so auf Eupergit®C zu immobilisieren, dass diese Aktivität gegenüber ihrer natürlichen Reaktion in Puffer zeigte (Abb. 3.10). Die Aktivität der LEH ist allerdings um 40 % abgeschwächt im Vergleich zu der gleichen Menge an gelöster

3 Ergebnisse

LEH. Es gibt keinen Unterschied an Aktivität zwischen der 8 und 24 h Probe, obwohl mehr als 80% der LEH immobilisiert werden konnten, so dass 8 h Inkubation ausreichen. Als Kontrollversuche wurde die gleiche Reaktion ohne Enzym, Eupergit®C und Eupergit®C, welches mit BSA inkubiert wurde, verwendet. Durch die Verwendung von reinen Eupergit®C konnte ausgeschlossen werden, dass die Hydrolyse durch dieses Material katalysiert wurde. Aus dem selben Grund wurde auch Eupergit®C mit BSA behandelt, um zu zeigen, dass die Hydrolyse nicht durch Inhaltsstoffe (Ethanolamin oder Natriumchlorid), die durch die Immobilisation herrühren, katalysiert wurde. BSA wurde als unabhängiges Protein gewählt, um auszuschließen, dass die Reaktion an der Proteinoberfläche stattfand.

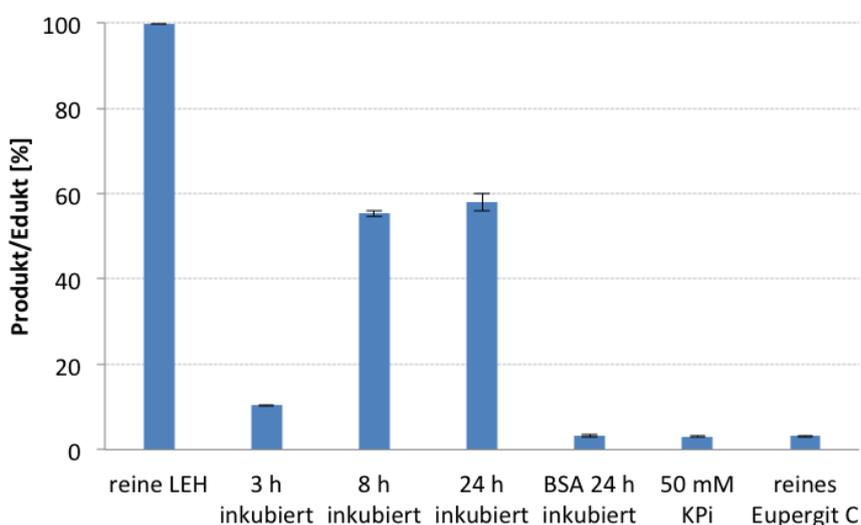


Abbildung 3.10: Aktivitätstests und Menge an immobilisierten Enzym im Vergleich. Es ist der Vergleich mit immobilisierten BSA, nur Puffer und reines Enzym gezeigt. Es wurden $5\ \mu\text{M}$ reines und immobilisiertes Enzym eingesetzt. $25\ \text{mM}$ Limonen-1,2-epoxid (7) wurden 4 h bei 30°C inkubiert und per GC analysiert.

Während die immobilisierte LEH Aktivität zeigte, sollte im anschließenden Schritt herausgefunden werden, ob die LEH auch in organischen Lösungsmitteln aktiv ist. Dazu wurden die unpolaren und wasserfreien Lösungsmittel Cyclohexan und Toluol verwendet. In wasserfreiem Cyclohexan und Toluol befinden sich laut Herstellerangabe (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) noch je $90\ \mu\text{M}$ Restwasser. Laut Luck *et al.* kann Cyclohexan mit $2,9\ \text{mM}$ und Toluol mit $18\ \text{mM}$ Wasser gesättigt werden.^[88]

Die Lösungsmittel wurden in gesättigter Form, als wasserfreie Form und mit Werten dazwischen eingesetzt. Die Aktivität sollte anhand der natürlichen Hydrolyse von Limonen-1,2-epoxid (**7**) getestet werden. Um einen guten Überblick zu erhalten wurden verschiedene Mengenverhältnisse Wasser im Lösungsmittel und Substrat eingesetzt (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 50, 1 : 100 und 1 : 200 Limonen-1,2-epoxid : Wassermenge im organischen Lösemittel). Als Kontrollversuche wurde die gleiche Reaktion ohne Enzym in den entsprechenden Lösungsmitteln verwendet. Weder in den Kontroll- noch in den Enzymversuchen konnten das Hydrolyseprodukt detektiert werden. Da gegebenenfalls nur die Hydrolyse inaktiv war, wurden verschiedene Mengen an **10**, **11**, **12** und **14** (50 mM) mit dem Epoxid **9** (5 mM) eingesetzt. Als Lösungsmittel wurden gesättigtes Cyclohexan und Toluol verwendet. Nach 15 h bei 30 °C zeigte die Analyse per GC-FID weder eine Abnahme des Epoxids noch die Entstehung neuer Produktpeaks.

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

In Kooperation mit Dr. Sinisa Bjelic aus dem Labor von Prof. Dr. David Baker der University of Washington in Seattle, USA sollte im Rahmen dieser Dissertation ein computerbasiertes *de novo* Enzym entwickelt werden. Die Schritte dieser Entwicklung werden im folgenden beschrieben und erläutert.

3.3.1 Design einer bimolekularen Reaktion

Es sollte eine bimolekulare Reaktion zwischen einem Epoxid mit einem stickstoffhaltigen Nukleophil (*NH*-Nukleophil) durch eine *de novo* Epoxidlyase (ELs) katalysiert werden. Dazu musste im ersten Schritt eine geeignete Reaktion gefunden werden. Die Anforderungen an eine geeignete Reaktion sind, dass sie unkatalysiert keinen Umsatz höher als 20% zeigen, dass deren Substrate groß sind und zusätzliche Ankerpunkte, wie z. B. Substituenten für Wasserstoffbrückenbindungen, für die aktive Tasche besitzen. Das Epoxid **1b** und das aromatische Amin **20** erfüllten diese Anforderungen und stellten somit die zu katalysierende Reaktion dar (Abb. 3.11). Diese Reaktion resultierte nicht nur in die gewünschten Aminoalkohole **22a** und **22b**, sondern zusätzlich in das entsprechende Diol **23**, welches durch die Hydrolyse als Nebenreaktion herrühr-

3 Ergebnisse

te. Es wurde ein präparativer Ansatz durchgeführt, um die drei möglichen Produkte zu isolieren und zu charakterisieren. Zur Differenzierung der zwei Regioisomere wurden HSQC- und HMBC-NMR durchgeführt (Kapitel 2.4, S. 37). Für das computerbasierte Enzymdesign wurde **22a** als Zielprodukt ausgewählt, da eine regioselektive Ringöffnung am höher substituierten Kohlenstoffatom des Epoxids adressiert werden sollte.

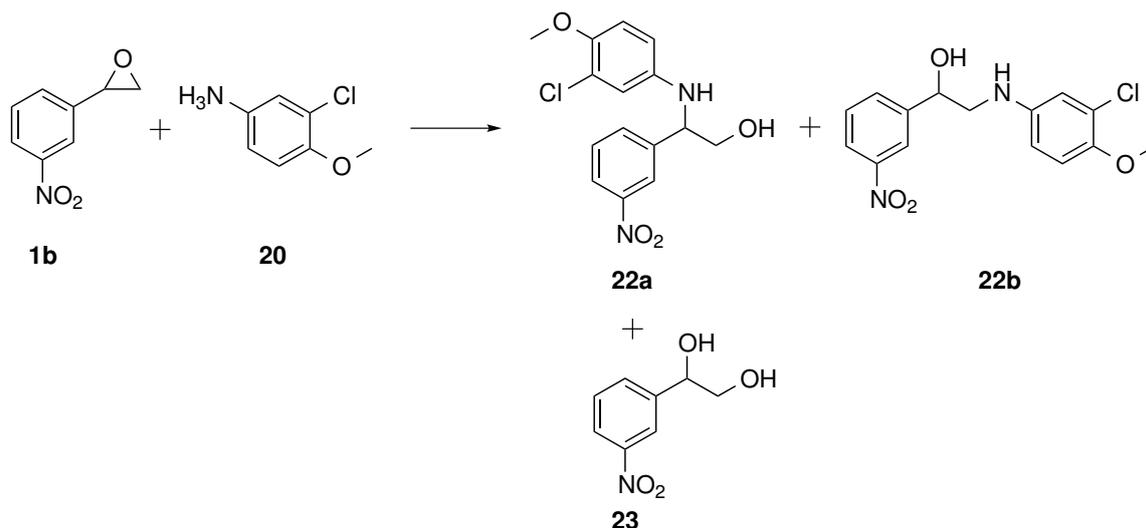


Abbildung 3.11: Die gewählte Reaktion für das Entwickeln einer theoretisch aktiven Tasche. 3,4-Chloromethoxyanilin (**20**) greift das 3-Nitrostyroxid (**1b**) nukleophil an. Dabei entstanden die zwei Aminoalkohole (**22a** und **b**) und als Nebenprodukt das Diol (**23**).

Um diese Reaktion zu erhalten, wurden im Vorfeld *NH*-Nukleophile (**2**, **3**, **15-21**) gewählt, die bei einem nukleophilen Angriff an die Epoxide (**1a** und **1b**) in vicinale Aminoalkohole resultieren (Abb. 3.12). Die Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen getestet: 5 mM Epoxid mit 50 mM Nukleophil in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 20 °C über Nacht. Alle Substrate bis auf 3-Nitrostyroxid (**1b**), 4-Methoxybenzamid (**17b**) und *N*-(4-Methoxyphenyl)acetamid (**18**) konnten käuflich erworben werden. **1b**, **17b** und **18** wurden synthetisiert und charakterisiert (Kapitel 2.4, S. 37). Die Ansätze wurden mit Essigsäureethylester extrahiert und mittels GC untersucht. Bis auf Morpholin (**16**) zeigten die Amine, Amidin und Amide keine Reaktion. Im Vergleich dazu zeigten Aniline vielversprechende Ergebnisse, da sie durch die Wahl der unterschiedlichen Substituenten entweder inaktiv oder zu aktiv waren (Tab. 3.3).

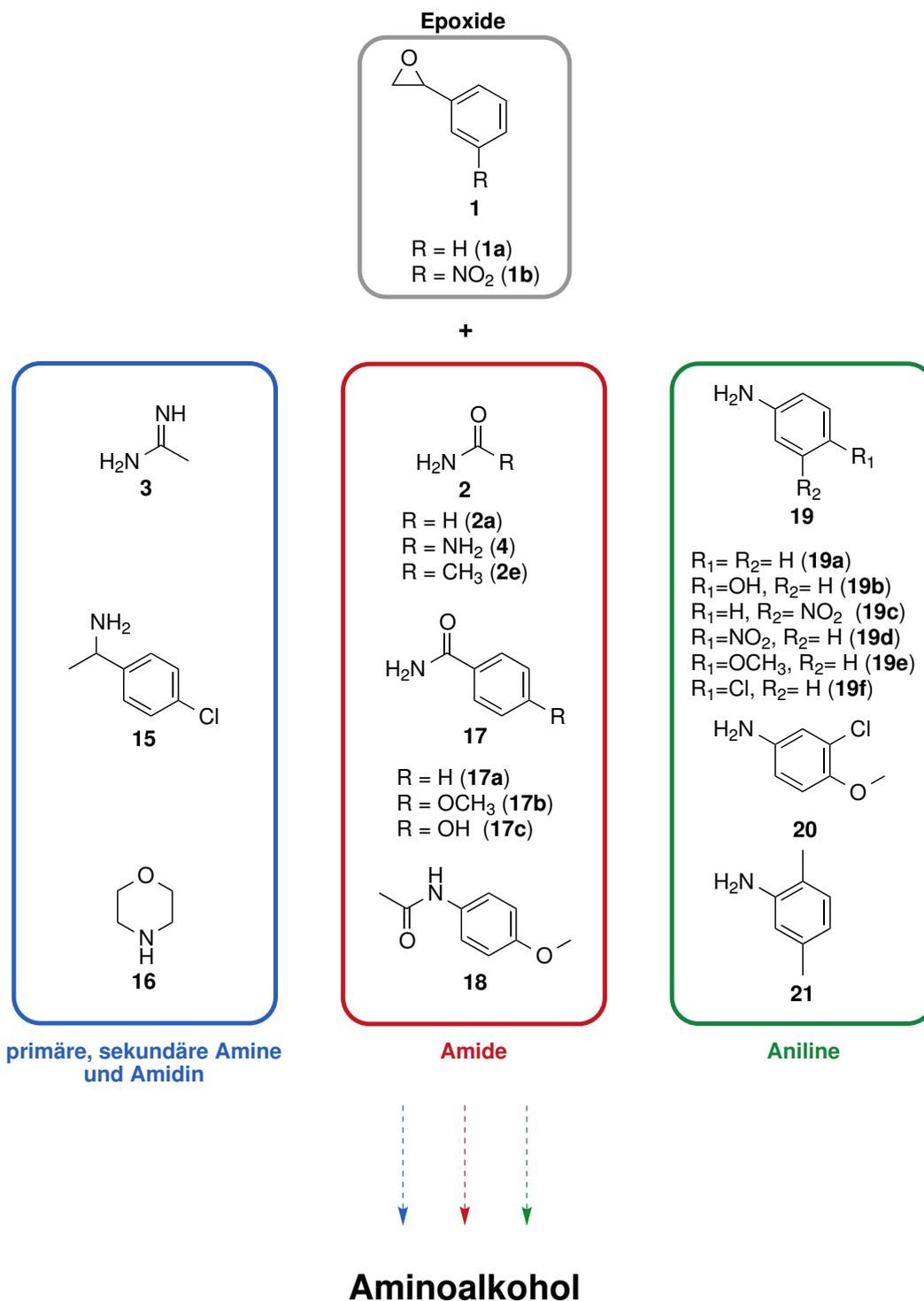


Abbildung 3.12: Es wurden verschiedene Reaktionen zwischen Epoxiden und stickstoffhaltigen Nukleophilen getestet. Es wurde entweder Styroloxid (**1a**) oder 3-Nitrostyroloxid (**1b**) mit einem Nukleophil aus den gezeigten Gruppen (Amine, Amidin, Amide oder Aniline) eingesetzt und auf Umsatz getestet.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Hintergrundreaktionen über Nacht bei 20°C.

Elektrophil	Nukleophil	Umsatz	Elektrophil	Nukleophil	Umsatz
	Amine			Amidin	
1a	15	n.d.	1a	3	n.d.
	16	+++			
	Amide			Amide, Harnstoff	
1a	2a,e	n.d.	1a	18	n.d.
	17a-c	n.d.		4	n.d.
	Aniline			Aniline	
1a	19a	+++	1a	19d	+
	19b	n.d.		19e	+++
	19c	++		19f	+
	20	+	1b	19f	+
	21	+++		20	+

n.d.: nicht detektierbar, +: Umsatz < 20%, ++: Umsatz 20-50%, +++: Umsatz > 50%

3.3.2 Entwicklung einer Analytikmethode

Zum Testen der möglichen Proteine musste eine Analytikmethode entwickelt werden, die fünf Substrate (zwei Edukte und drei Produkte) auftrennen kann. Für die anschließenden Versuche wurden die synthetisierten Substrate (**1b**, **22a**, **22b** und **23**) und das mittels Säulenchromatographie aufgereinigte Anilin **20** verwendet. Bei der Analytik mittels GC-FID stellte sich heraus, dass die Produkte zu hohe Siedepunkte (> 300°C) besitzen, um diese per GC zu analysieren, so dass eine Methode per HPLC mit Diodenarray-Detektor entwickelt wurde. Diese Methode basierte auf Umkehrphasen-HPLC, bei der als unpolare stationäre Phase eine XDB-C18-Säule der Firma Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA) und eine polare mobile Phase (Acetonitril-Wasser-Gemisch) verwendet wurde. Bei der Durchführung mehrerer Reaktionen nur im Puffer (Hintergrundreaktion) stellte sich heraus, dass es nicht möglich war

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

reproduzierbare Ergebnisse zu erzeugen. Bei der verwendeten Aufarbeitungsmethode der Proben gab es zu viele Schritte bei denen Substrate und Produkte verloren gehen konnten. Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, um die Aufarbeitungsschritte zu verringern. Die Reaktion wurde deshalb mit Schwefelsäure und durch 15-minütiges Erhitzen bei 80 °C gequenchet. Durch die Zugabe von Schwefelsäure und dem anschließenden Erhitzen wurde das Epoxid zum Diol hydrolysiert und dadurch dem Reaktionsgleichgewicht entzogen. Um eine vollständige Hydrolyse zu garantieren, wurden verschiedene Dauern an Erhitzen getestet. Bei diesen Tests wurde 500 μ M Epoxid **1b** mit 90 mM Schwefelsäure versetzt und für verschiedene Dauern bei 80 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktion 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, mit 180 mM Natriumhydroxid versetzt und per HPLC analysiert. Es wurden Einfachmessungen durchgeführt. Nach 15 Minuten erhitzen, war die Hydrolyse vollständig abgelaufen (Abb. 3.13).

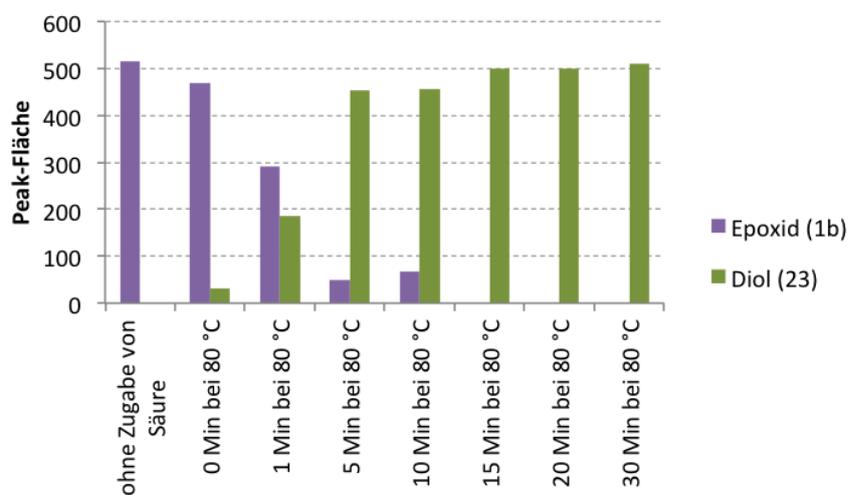


Abbildung 3.13: Quenchingversuche zur Hydrolyse von **1b** zu **23**. Nach 15 Min Erhitzen bei 80 °C ist **1b** vollständig hydrolysiert und somit dem eigentlichen Reaktionsgleichgewicht entzogen.

Diese Aufarbeitung der Proben wurde in fünffachen Ansätzen wiederholt, wodurch gezeigt werden konnte, dass dies zu reproduzierbaren Ergebnissen führte. Weder das Anilin noch die Produkte wurden durch die Zugabe von Säure verändert. Durch dieses

Verfahren kann nicht nur die Reaktion gestoppt, sondern auch das Enzym denaturiert werden, so dass es als Rückstand im Reaktionsgefäß blieb.

3.3.3 Optimierung der Reaktionsparameter ohne Enzym

Um die optimalen Bedingungen der Reaktion zunächst ohne Enzym zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Temperaturen und drei verschiedene pH-Werte untersucht. Da die Hydrolyse des Epoxids **1b** säurekatalysiert werden kann, stellte sich die Frage wie weit der pH-Wert erniedrigt werden kann, bevor es zu einer vollständigen Hydrolyse von **1b** kommt. In 0,2-Schritten wurden zwischen pH 7,4 und 5,0 500 μM Epoxid **1b** eingesetzt und bei 20 °C für 18 h geschüttelt. Als Puffer wurden 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,4-6,2) oder 50 mM Citratpuffer (pH 6,0-5,0) verwendet. Ohne Aufarbeitung wurden die Proben direkt in die HPLC injiziert. Der gleiche Versuchsaufbau wurde mit der Reaktion zwischen dem Epoxid **1b** und dem Anilin **20** (2,5 mM) durchgeführt und anschließend wie beschrieben gequencht. Es gibt einen maximalen Umsatz bei pH 6,0, welcher bei ca. 20% (**22a**) liegt, so dass damit gezeigt werden konnte, dass die Reaktion zwischen pH 7,4 und 5,0 durchgeführt werden kann (Abb. 3.14). Die Diolbildung (**23**) steigt mit der pH-Wert Erniedrigung an, liegt aber maximal bei 5% (pH 5,0).

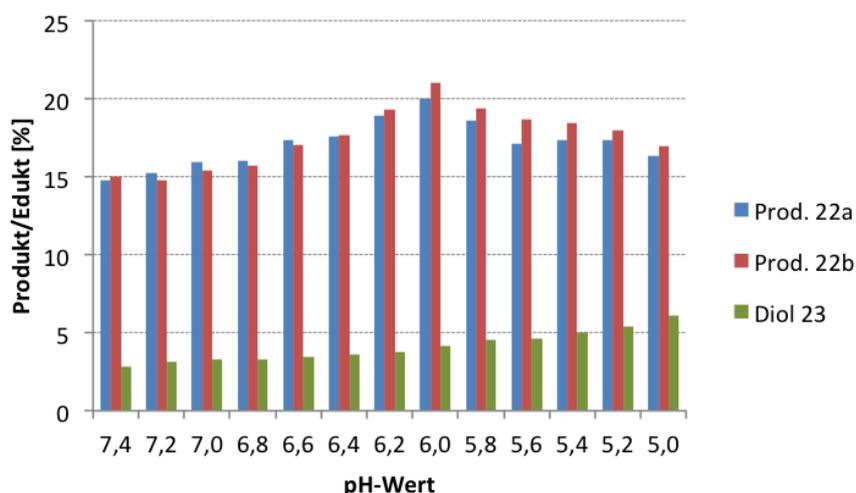


Abbildung 3.14: Es ist die Bildung der Produkte und des Hydrolyseprodukts (**22a**, **22b** bzw. **23**) in Abhängigkeit des pH-Werts gezeigt.

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

Bei pH 5,0, 6,0 und 7,4 wurden die Temperaturen 20, 25 und 30 °C für 18 h getestet. Es wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie bei der Aufnahme der pH-Werte. Die Bildung der Produkte stieg mit der Temperatur leicht an. Bei 30 °C ist das Epoxid **1b** nach 18 h zu ca. 50 % umgesetzt, so dass diese durch die Reaktionsdauer in folgenden Experimenten reguliert werden musste (Abb. 3.15).

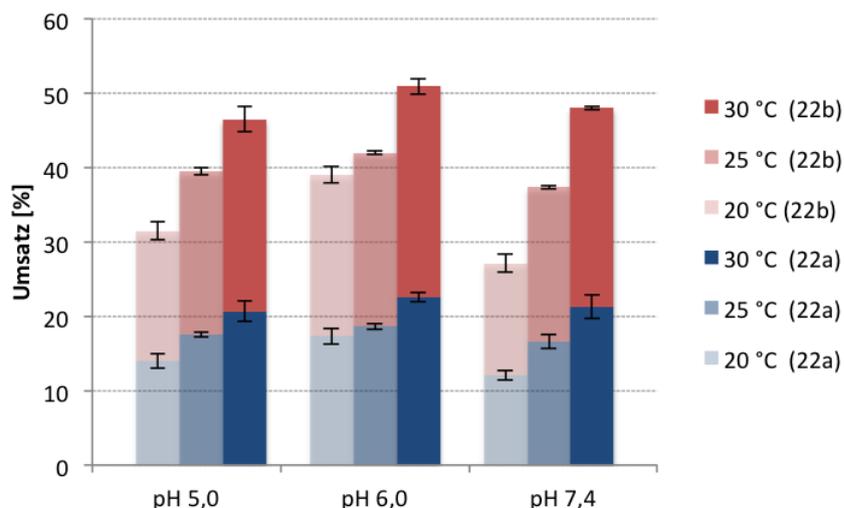


Abbildung 3.15: Bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Temperaturen wurde die Bildung der Produkte **22** nach 18 h analysiert. Die Daten der Hydrolyseaktivität sind hier nicht gezeigt. Sie steigen ebenso mit der Temperatur und mit sinkendem pH-Wert an. Die Hydrolyseaktivität lag zwischen 1,4 % (pH 7,4, 20 °C) und 6,1 % (pH 5,0, 30 °C).

3.3.4 Proteindesign

Etwas abweichend vom beschriebenen Rosetta-Protokoll (Kapitel 1.1.2, S. 3) zum computerbasierten *de novo* Enzymdesign wurden in Kooperation mit Dr. Sinisa Bjelic aus dem Labor von Prof. Dr. David Baker Proteine entwickelt. Der Großteil wurde in diesem Abschnitt von Dr. Sinisa Bjelic übernommen, so dass hier nicht im Detail auf alle Werte und Einstellungen eingegangen wird. Es wurde sich dafür entschieden, dass bereits vorhandene Proteine aus der *protein data bank* (*pdb*) mit einem formähnlichen Liganden bezüglich der Reaktion zu optimieren. Der Aminoalkohol **22a** wurde als Zielprodukt gewählt und dazu eingesetzt eine passende aktive Tasche zu entwickeln. **22a** resultierte aus dem nukleophilen Angriff von **20** an das benzyliche Kohlenstoffatom

3 Ergebnisse

des Epoxids **1b**. Zur Vereinfachung wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dieser Reaktion, um eine Reaktion mit produktähnlichem Übergangszustand handelt. Deswegen wurde für das Proteindesign **22a** als Ligand gewählt, welcher stabilisiert werden sollte.

Um Proteinstrukturen mit formähnlichen Liganden in der *pdb* zu finden, wurden Bausteine von **22a** generiert (Abb. 3.16). Bei diesen Bausteinen wurden bestimmte Teile von **22a** als gesetzt vorgegeben. Dazu gehörte z. B. die Hydroxylgruppe, die als Ankerpunkt für die Epoxidaktivierung und -fixierung dienen musste, da diese aus dem Epoxid resultierte. Die Positionen, die mit einem Sternchen markiert sind, waren variabel.

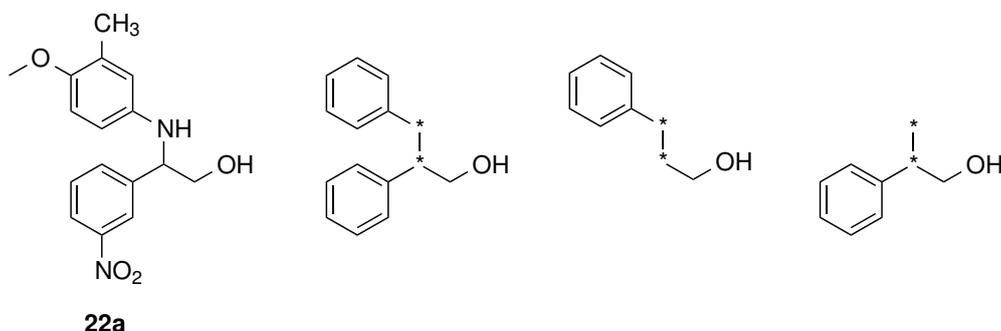


Abbildung 3.16: Es sind Bausteine des gewünschten Liganden (**22a**) dargestellt. Bei den gezeigten Bausteine handelt es sich um Moleküle, die in ihrer Form ähnlich sind zum erwünschten Liganden. Die Hydroxylgruppe war immer gesetzt, da diese aus dem Epoxid stammt und zur Aktivierung und Fixierung des Epoxids dienen sollte. * bedeutet, dass an dieser Stelle jedes beliebige Atom sitzen kann.

Mittels eines *Online-tools* des National Cancer Institutes (NCI, Bethesda, Maryland, USA) konnten die genannten Bausteine in sogenannte *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (SMILES) übersetzt werden.² Als SMILES können beliebige Moleküle als Zeichenkette wiedergegeben werden und konnten als Textformat in die Suchleiste der *pdb* eingegeben werden, wodurch die Resultate nur Proteinstrukturen enthielten, deren Liganden diesen Bausteinen entsprachen.

Bevor der gewünschte Ligand in die gefundenen Proteinstrukturen gelegt und dessen aktive Tasche umgepackt werden konnte, wurden von **22a** alle möglichen Rotamere

²Online SMILES Translator: cactus.nci.nih.gov/translate/.

erstellt (Abb. 3.17). Dazu wurde die Software OMEGA von OpenEye Scientific Software (Santa Fe, New Mexico, USA) verwendet, welches Multikonformere oder Rotamere von Molekülstrukturen erstellen kann.^[89]



Abbildung 3.17: Links ist eines der Rotamere aus einem Strauß an Rotameren (rechts) von **22a** gezeigt. Aus diesen verschiedenen Rotameren wählt RosettaDesign das geeignetste Rotamere für die aktive Tasche aus.

RosettaDesign verwendete diese erstellten Rotamere dazu, um diese in die aktive Tasche zu legen und anschließend das anhand der Bindeenergie passendste Rotamer auszuwählen. Da dieses Verfahren auf einem Algorithmus basiert, kamen bei jedem Lauf Varianten heraus, die sich minimal unterschieden. Dabei wurde die aktive Tasche anhand eines für RosettaDesign guten Rotamers von **22a** umgepackt und anschließend optimiert. Daraus entstanden 400 mögliche Proteingerüste. 3D-Strukturen von Proteinen, die nicht in *E. coli* exprimiert wurden, die ursprüngliche Proteasen oder die metallabhängige Proteine waren, wurden verworfen. Auch Strukturen, die nicht mittels RosettaDesign optimiert werden konnten, wurden verworfen. Im Mittelpunkt der Optimierung stand das Einbringen eines Motivs zur Epoxidaktivierung und -fixierung. In einem Abstand von 3-4 Å wurde die Umgebung der Hydroxylgruppe so gewählt, dass diese Wasserstoffbrücken mit Histidinen, Serinen, Threoninen oder Tyrosinen bilden konnten (Abb. 3.18 und Tab. 3.4). Als Vorlage der Motive dienten bereits funktionierende Katalysatoren, die die Epoxidringöffnung katalysieren (LEH, HheC, EHs und Thioharnstoffderivate).

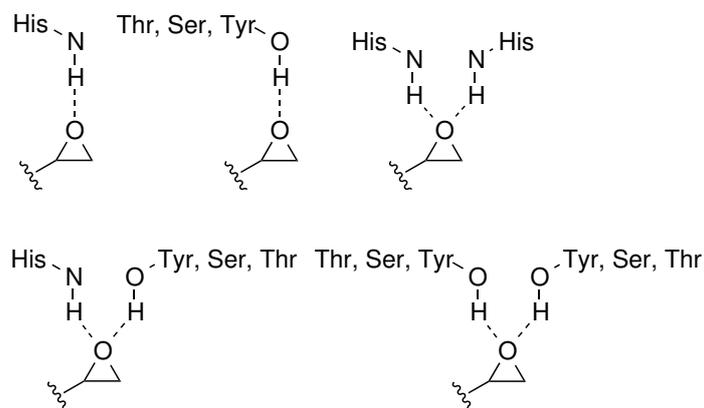


Abbildung 3.18: Mögliche Motive für das Proteindesign, um das Epoxid zu aktivieren und fixieren.

Neben dem Einbringen des gewollten Motivs wurden die aktiven Taschen auch bezüglich ihrer Größen optimiert. Sind während des Umpackens und Optimierens großen Lücken entstanden, wurden diese durch das Einführen von großen Aminosäureseitenketten wie Phenylalanin gefüllt. Auch die Überlappung von Aminosäureseitenketten mit dem Liganden konnten durch den Austausch mit kleineren Aminosäureseitenketten behoben werden. In *Abbildung 3.19* ist ein Beispiel einer aktiven Tasche gezeigt (EL11), in denen zwei Histidine (an Position 117 und 243) die Wasserstoffbrückendonoren darstellen.

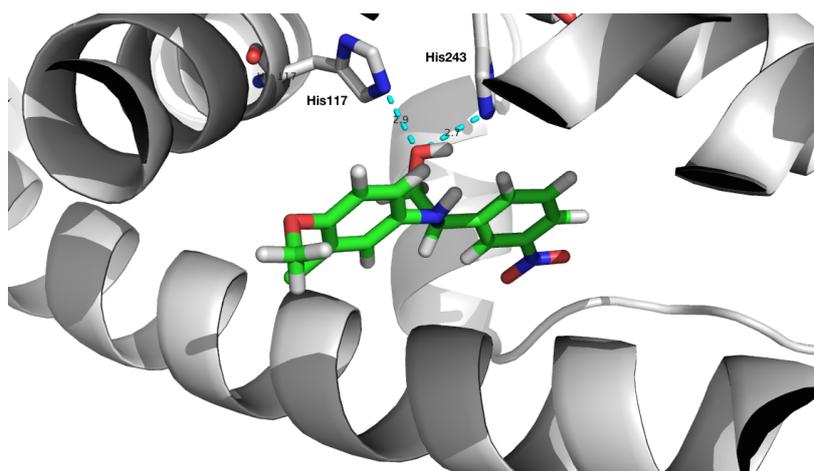


Abbildung 3.19: Die aktive Tasche von EL11 mit zwei Histidinen (graue Stäbchen) als Wasserstoffbrückendonoren mit dem Liganden **22a** (grüne Stäbchen).

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

Ein abschließendes Evaluieren erbrachte 44 Designs. Diese wurden ein weiteres Mal durch MD-Simulationen begutachtet, wodurch im Endeffekt 13 Designs entwickelt wurden, die als synthetische Gene bei der Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA) bezogen wurden. Die Gene waren bereits in einen pET-28a(+)-Vektor kloniert und besaßen je nach Schnittstelle einen N- oder C-terminalen His₆-Tag (Tab. 2.2, S. 26). Bei den gewählten Designs handelte es sich um beschriebene Proteine verschiedener Klassen (Tab. 3.4), die im nächsten Schritt weiter charakterisiert wurden.

Table 3.4: Übersicht der 13 Designs und deren ursprünglichen Nutzung, wie sie in der *pdb* beschrieben sind. Zusätzlich sind die Wasserstoffbrückendonoren/en in den jeweiligen Proteinen aufgelistet. Die gewählte Proteine wurden als in *E. coli*-exprimierbar beschrieben.

Proteinklasse	Name	<i>pdb</i> -Code	ursprüngliche Nutzung	H-Brückendonoren
Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren	EL01 (5) ^a	1GWX ^[90]	PPAR delta LBD ^b)	T83, H267
	EL05 (5) ^a	2REW ^[91]	PPAR alpha LBD	Y102, Y252
	EL07 (3) ^a	2ZNQ ^[92]	PPAR delta LBD	H108, Y111
	EL08 (2) ^a	3B3K ^[93]	PPAR gamma LBD	S96, Y290
	EL11 (8) ^a	3GBK ^[94]	PPAR gamma LBD	H117, H243
	EL12 (6) ^a	3R8I ^[95]	PPAR gamma LBD	H117, Y367
Hydrolasen	EL09 (7) ^a	3B9X ^[96,97]	<i>E. coli</i> Pyrimidin-nukleosidase	Y231
	EL10 (7) ^a	3G5I ^[98]	<i>E. coli</i> RihA Pyrimidinnukleosidase	H81
Transferasen	EL04 (4) ^a	2OJJ ^[99]	Extrazellulär-signal-regulierte Kinase (ERK)	Y38
	EL14 (4) ^a	4FV5 ^[100]	ERK	S145
Lyasen	EL06 (3) ^a	2XB9 ^[101,102]	<i>Helicobacter pylori</i> Typ II Dehydroquinase	H82, H102
	EL13 (3) ^a	4B6P ^[103]	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Typ II Dehydroquinase	T80, H101

3 Ergebnisse

Synthetase	EL03 (3) ^{a)}	1SJD ^[104]	<i>o</i> -Succinylbenzoat-synthetase	S293
------------	------------------------	-----------------------	--------------------------------------	------

a) Anzahl der mittels Rosetta eingeführten Veränderungen.

b) LBD: Ligandenbindedomäne.

3.3.5 Expression und Charakterisierung der Proteine

Die Gene wurden durch Sequenzierung überprüft, um anschließend *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden zu transformieren. In ersten Expressionsversuchen unter Standardbedingungen (IPTG-Induktion, 1 mM IPTG, 24 h bei 30 °C) konnten sechs der 13 Gene (EL06, EL08, EL09, EL10, EL11 und EL13) überexprimiert werden (Abb. 3.20, Tab. 3.5). Diese sechs exprimierten Enzyme wurden mittels Co-Affinitätschromatographie aufgereinigt, per SDS-Gelelektrophorese analysiert und anschließend in Aktivitätstests eingesetzt. Im Rahmen einer Bachelorarbeit von Valerie Frideres wurden die übrigen sieben Epoxidlyasen (ELs) in einer Expressionsstudie auf Expression getestet (EL01, EL03, EL04, EL05, EL07, EL12 und EL14).^[105] V. Frideres testete verschiedene Temperaturen (30 und 37 °C), verschiedene IPTG-Konzentrationen (0,5 und 1 mM) und verschiedene *E. coli*-Stämme (BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3)). Neben SDS-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse wurden verschiedene Aufschlussmethoden miteinander verglichen, um auszuschließen, dass die Proteine bei der Aufarbeitung verloren gingen. Dennoch war es nicht möglich die sieben verbliebenen Gene so zu exprimieren, dass genügend Enzym (min. 50 µM Enzym) für Aktivitätstests vorhanden war, so dass diese nicht für weitere Charakterisierungen verwendet wurden (Tab. 3.5). Die Menge an Enzym (50 µM) wurde gesetzt, da dies die Mindestmenge an Enzym war, die bei den gut exprimierbaren sechs ELs eingesetzt werden konnte. Die sieben genannten schlechter exprimierbaren Enzyme lagen bei Konzentrationen unter 20 µM. Aufgrund vermuteter starkert Hintergrundreaktionen wurden die Experimente nur mit aufgereinigtem Enzym durchgeführt. Es gab keine Tests mit Zelllysat.

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

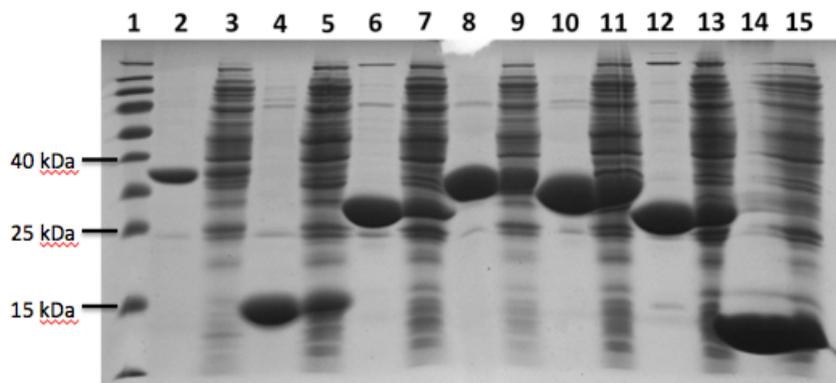


Abbildung 3.20: 15%-iges SDS-Gel nach ersten Expressionsversuchen. Hier sind sieben der 13 Gene gezeigt von denen sechs überexprimiert werden konnten. **1:** Marker, **2:** pure EL03 (40 kDa), **3:** Lysat von EL03, **4:** pure EL06 (18 kDa), **5:** Lysat von EL06, **6:** pure EL08 (32 kDa), **7:** Lysat von EL08, **8:** pure EL09 (34 kDa), **9:** Lysat von EL09, **10:** pure EL10 (34 kDa), **11:** Lysat von EL10, **12:** pure EL11 (31 kDa), **13:** Lysat von EL11, **14:** pure EL13 (16 kDa), **15:** Lysat von EL13.

Tabelle 3.5: Zusammenfassende Übersicht der exprimierbaren und nicht-exprimierbaren ELs.

Enzym	Expressionsbedingungen		Proteinkonz. [μM] ^{a)}
EL01	nicht exprimierbar	V. Frideres ^[105]	-
EL03	0,5 mM IPTG, 4 h, 37 °C	V. Frideres ^[105]	12
EL04	0,5 mM IPTG, 24 h, 37 °C	V. Frideres ^[105]	14
EL05	0,5 mM IPTG, 24 h, 30 °C	V. Frideres ^[105]	8
EL06	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	300
EL07	0,5 mM IPTG, 24 h, 37 °C	V. Frideres ^[105]	9
EL08	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	140
EL09	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	180
EL10	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	270
EL10::H81A	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	110
EL11	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	280
EL12	0,5 mM IPTG, 24 h, 37 °C	V. Frideres ^[105]	14
EL13	1 mM IPTG, 24 h, 30 °C	diese Arbeit	360
EL14	0,5 mM IPTG, 24 h, 37 °C	V. Frideres ^[105]	9

^{a)} Durchschnittswerte aus allen Expressionen.

3 Ergebnisse

Für alle folgenden Umsetzungen wurden Triplikate angesetzt. Die Aktivitätstests dienten dazu anfängliche Aktivität zu untersuchen, um bei gegebenen Aktivitäten in weiteren folgenden Schritten die Enantioselektivitäten zu ermitteln. Für den ersten Aktivitätstest wurden die Enzyme im größeren Maßstab exprimiert und aufgereinigt. Es wurden 500 μM Epoxid (**1b**), 2,5 μM Anilin (**20**) und 50 μM Enzym eingesetzt. Der erste Test fand in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,4 bei 20 °C für 15 h statt. Als Vergleich wurde die Reaktion ohne Enzym nur im Puffer und mit 50 μM Rinder *Bovines Serumalbumin* (BSA) angesetzt. Es konnte keine Aktivität über der Hintergrundreaktion oder Selektivität eines der Enzym detektiert werden (Abb. 3.21). Die Vergleichsreaktion mit BSA zeigte sogar verminderte Aktivität.

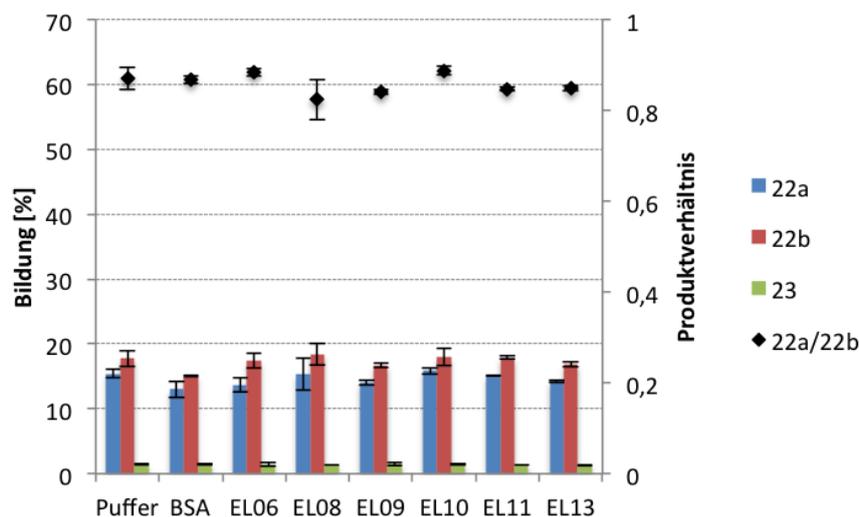


Abbildung 3.21: Erste Aktivitätstest bei 20 °C für 15 h. In blau, rot bzw. grün ist die Bildung der Produkte (**22**) und (**23**) und in schwarz ist das Produktverhältnis **22a/22b** gezeigt. Es wurden je 50 μM Enzym bzw. BSA eingesetzt. BSA und Phosphatpuffer dienten als Negativkontrolle.

Die Aktivitäten sollten zusätzlich bei verschiedenen pH-Werten getestet werden, so dass die Enzyme zunächst bei pH 7,4 aufgereinigt und anschließend in die entsprechenden Puffer mittels Dialyse umgepuffert wurden. Als Puffer für die verschiedenen pH-Werte wurden je 50 mM Kaliumphosphatpuffer für pH 7,4 und Citratpuffer für pH 6,0 und 5,0 verwendet. Abweichend von dem ersten durchgeführten Aktivitätstest wurde in diesem Versuch maximal an Enzym eingesetzt, d.h. 2 % des Ansatzes

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

waren die Acetonitril-Stammlösungen der Substrate, welches mit Enzymlösung aufgefüllt wurde. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen lagen zwischen 140 und 350 μM . Es wurden 500 μM des Epoxids **1b** und 2,5 mM des Anilins **20** eingesetzt. Je nach Temperatur liefen die Reaktionen für 15 h (20 °C) oder für 6 h (30 °C) ab. Da nur EL10 und EL11 bei pH 5,0 stabil waren, konnte nur diese bei pH 5,0 getestet werden. Es konnte keine erhöhte Aktivität gegenüber der Hintergrundreaktion festgestellt werden (Abb. 3.22-3.27). Die einzige Ausnahme bildete EL10 bei pH 5 und 30 °C.

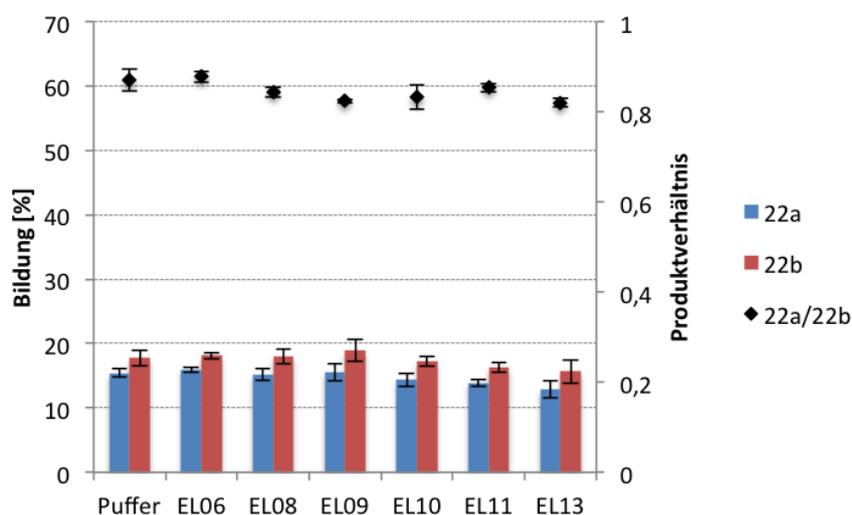


Abbildung 3.22: Aktivitätstests bei pH 7,4 bei 20 °C nach 15 h. Neben der Produktbildung (blau: **22a**, rot: **22b**) werden auch die Produktverhältnisse gezeigt (schwarz: **22a/22b**). Die unkatalysierte Reaktion nur in Phosphatpuffer diente als Negativkontrolle. Die Hydrolyseaktivität lag in allen Messreihen bei ca. 5% und ist hier nicht gezeigt.

3 Ergebnisse

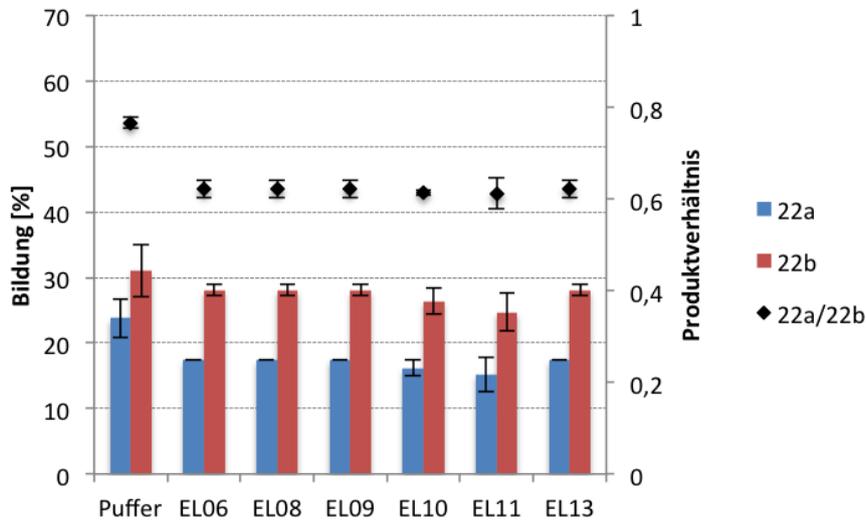


Abbildung 3.23: Aktivitätstests bei pH 7,4 bei 30°C nach 6 h. Neben der Produktbildung (blau: **22a**, rot: **22b**) werden auch die Produktverhältnisse gezeigt (schwarz: **22a/22b**). Die unkatalysierte Reaktion nur in Phosphatpuffer diente als Negativkontrolle. Die Hydrolyseaktivität lag in allen Messreihen bei ca. 5% und ist hier nicht gezeigt.

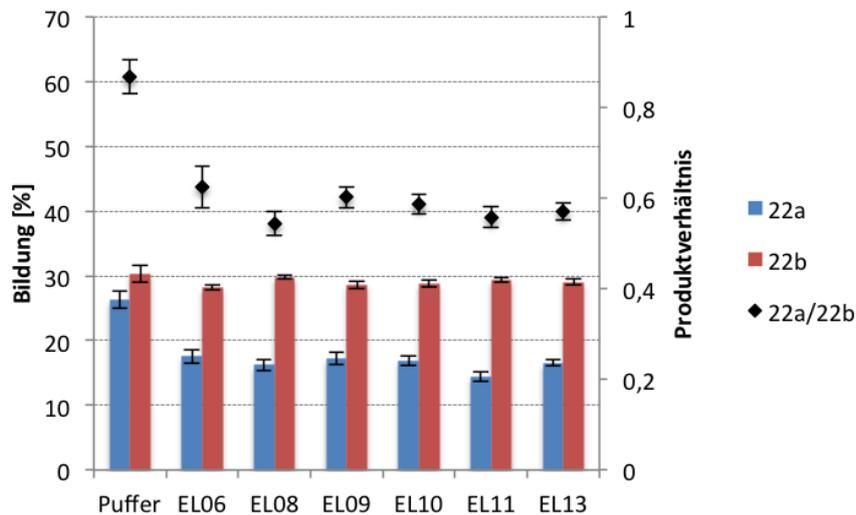


Abbildung 3.24: Aktivitätstests bei pH 6,0 bei 20°C nach 15 h. Neben der Produktbildung (blau: **22a**, rot: **22b**) werden auch die Produktverhältnisse gezeigt (schwarz: **22a/22b**). Die unkatalysierte Reaktion nur in Citratpuffer diente als Negativkontrolle. Die Hydrolyseaktivität lag in allen Messreihen bei ca. 5% und ist hier nicht gezeigt.

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

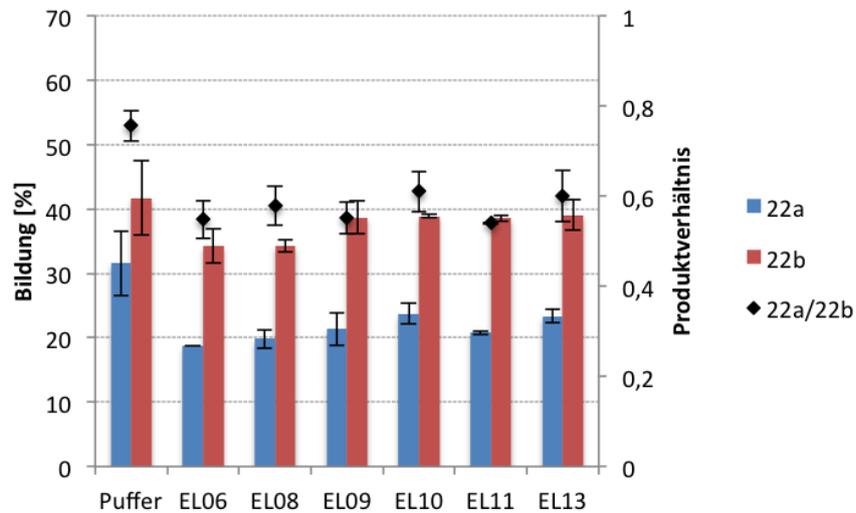


Abbildung 3.25: Aktivitätstests bei pH 6,0 bei 30°C nach 6 h. Neben der Produktbildung (blau: **22a**, rot: **22b**) werden auch die Produktverhältnisse gezeigt (schwarz: **22a/22b**). Die unkatalysierte Reaktion nur in Citratpuffer diente als Negativkontrolle. Die Hydrolyseaktivität lag in allen Messreihen bei ca. 5% und ist hier nicht gezeigt.

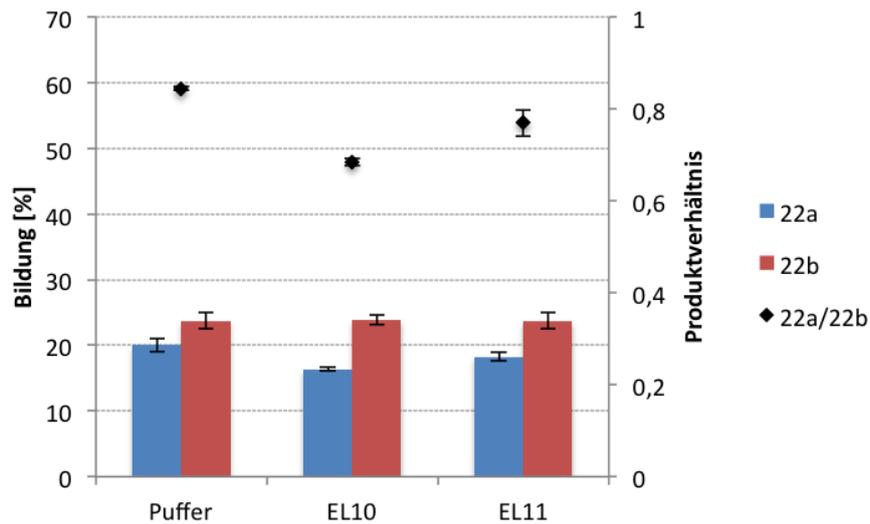


Abbildung 3.26: Aktivitätstests bei pH 5,0 bei 20°C nach 15 h. Neben der Produktbildung (blau: **22a**, rot: **22b**) werden auch die Produktverhältnisse gezeigt (schwarz: **22a/22b**). Die unkatalysierte Reaktion nur in Citratpuffer diente als Negativkontrolle.

3 Ergebnisse

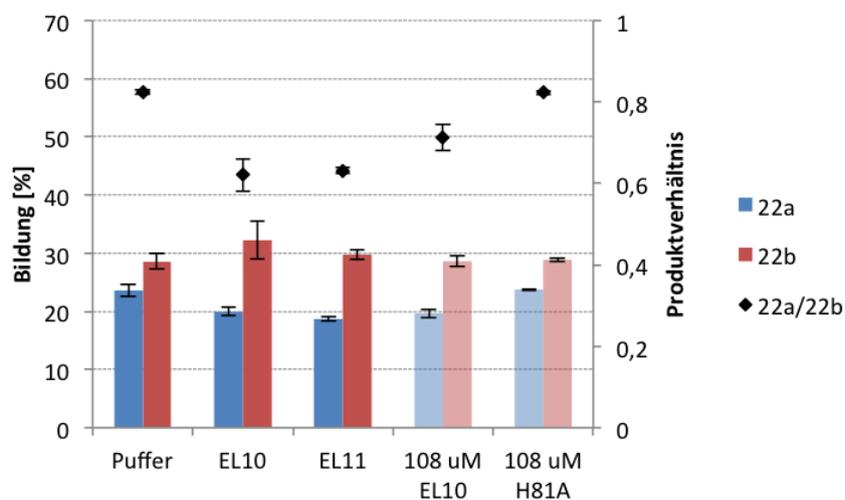


Abbildung 3.27: Aktivitätstests bei pH 5,0 bei 30 °C nach 6 h. Neben der Produktbildung (blau: **22a**, rot: **22b**) werden auch die Produktverhältnisse gezeigt (schwarz: **22a/22b**). In hellblau und hellrot sind die Produktbildungen unter dem Einsatz von 108 µM EL10 und EL10::H81A gezeigt. Das Verhalten ihrer Aktivität ist für beide Varianten identisch. Die unkatalysierte Reaktion nur in Citratpuffer diente als Negativkontrolle.

Für die Bedingungen pH 5,0 bei 30 °C für 6 h konnte für EL10 eine leichte erhöhte Aktivität gegenüber der Hintergrundreaktion festgestellt werden. Um dieses Indiz zu verstärken wurde von EL10 eine *Knock-Out* Mutante erstellt und unter den gleichen Bedingungen getestet. Von EL10 wurde per QCTM-*site-directed mutagenesis* ein Histidin an Position 81 gegen ein Alanin ausgetauscht, da das Histidin als Wasserstoffbrückendonor fungieren sollte (Tab. 3.4, S. 72). Anschließend wurde die Mutante genauso exprimiert und aufgereinigt wie EL10. Nach der Expression und Aufreinigung konnten nur 40% EL10::H81A des Wildtyps-EL10 erhalten werden, so dass für die Aktivitätstests die Menge an Enzym angepasst wurde. Es wurden 108 µM EL10 und EL10::H81A mit den beschriebenen Bedingungen getestet (hellblau und hellrot in Abb. 3.27). Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Varianten festgestellt werden und ihre Aktivität lag auch nicht über der Hintergrundreaktion.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte ermittelt werden, warum die Designs keine Aktivität zeigten. Aus diesem Grund wurden zusätzlich aliphatische Amine (**24**, **25**) und Phenylpropylenoxid **1c** in das Substratspektrum mitaufgenommen (Abb. 3.28).

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

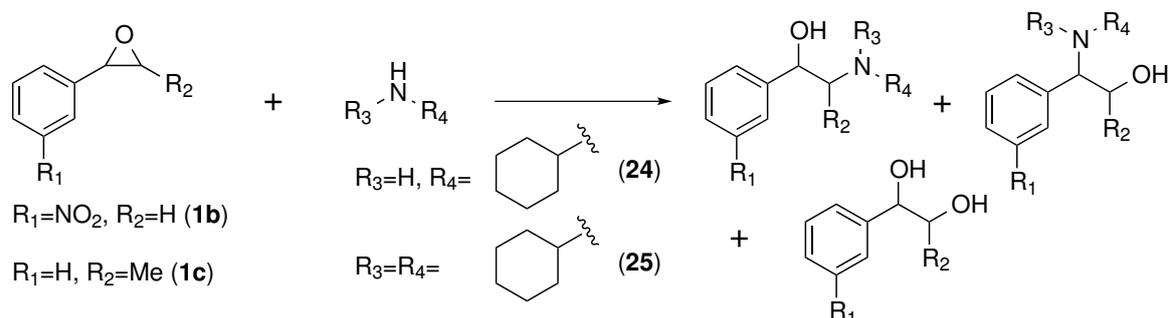


Abbildung 3.28: Reaktion zwischen den Epoxiden **1b** und **1c** mit den Aminen **24** und **25** bei den pH-Werten 5, 6, und 7,4 bei 30 °C für 15 h.

Erneut wurden die möglichen Produkte synthetisch hergestellt, um mit ihnen eine Analytikmethode zu entwickeln. Für die Reaktionen wurden maximal Enzym (140 und 350 μM) mit 500 μM Epoxid (**1b**, **1c**) und 2,5 mM Amin (**24** und **25**) bei 30 °C für 15 h bei verschiedenen pH-Werten getestet. Es wurden hier 15 h als Zeitraum gewählt, da in vorangehenden Tests bereits gezeigt werden konnte, dass es keine Reaktion ohne Enzym gab. Alle Reaktionen wurden als Triplikate angesetzt. Neben der Hydrolyse konnte keine weitere Umsetzung festgestellt werden (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Übersicht weiterer Substrate, die bei 30 °C für 15 h bei verschiedenen pH-Werten getestet wurden. Je nach pH-Wert wurden 50 mM Phosphat- oder Citratpuffer gewählt.

Enzyme	Elektrophil	Nukleophil	pH 7,4	pH 6,0	pH 5,0
Puffer	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	k. R.
EL06	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	n. d.
EL08	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	n. d.
EL09	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	n. d.
EL10	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	k. R.
EL11	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	k. R.
EL13	1b, 1c	24, 25	k. R.	k. R.	n. d.

k. R.: keine Reaktion.

n. d.: nicht detektiert, da die Enzyme bei pH 5 denaturierten.

3.3.6 Hydrolyseaktivität der ELs

Um zu testen, ob es sich bei den ELs um Hydrolasen handelte, wurde das Epoxid **1b** bei den pH-Werten 5, 6 und 7,4 bei den Temperaturen 20 und 30 °C getestet. Die Reaktionsdauer betrug 6 h. Die Reaktion wurde nicht gequenchet, da dadurch die Hydrolyse des Epoxids erzwungen wird, diese aber untersucht werden sollte. Um die Triplikate untereinander vergleichbar zu haben, wurden die Ansätze in 15-Minuten-Abständen angesetzt, da dieses der HPLC-Messzeit entsprach. In Triplikaten wurden maximal Enzym (140 und 350 μM) und 500 μM Epoxid **1b** verwendet. Als Kontrollversuch wurde die Reaktion ohne Enzym durchgeführt. Es konnte keine Hydrolyseaktivität über der Kontrollreaktion festgestellt werden (Abb. 3.29-3.31).

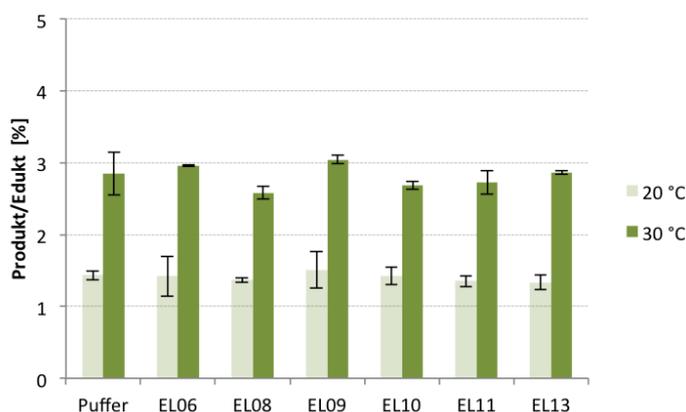


Abbildung 3.29: Hydrolyseaktivität der Epoxidlyasen. Es wird die Bildung des Diols **23** bei den Temperaturen 20 und 30 °C bei pH 7,4 nach 6 h gezeigt. Keine der Reaktion zeigte Aktivität oberhalb der der Kontrollreaktion ohne Enzym in Kaliumphosphatpuffer.

3.3 Strategie 3: Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

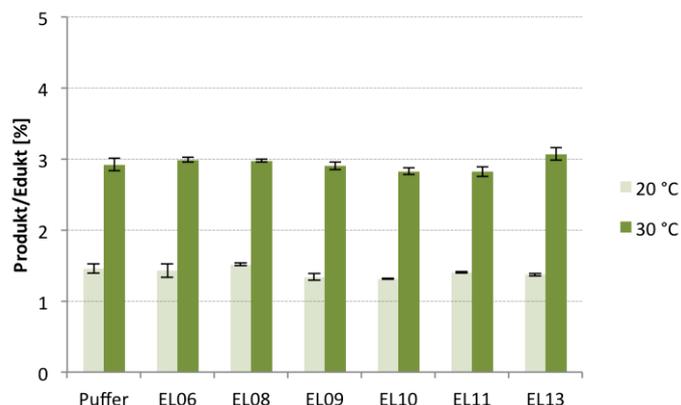


Abbildung 3.30: Hydrolyseaktivität der Epoxidlyasen. Es wird die Bildung des Diols **23** bei den Temperaturen 20 und 30 °C bei pH 6 nach 6 h gezeigt. Keine der Reaktion zeigte Aktivität oberhalb der der Kontrollreaktion ohne Enzym in Citratpuffer.

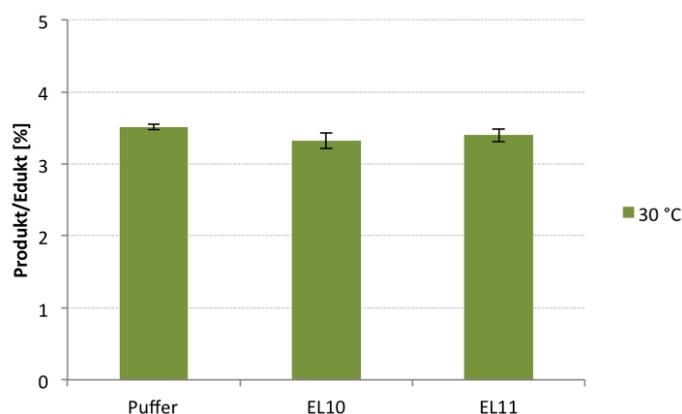


Abbildung 3.31: Hydrolyseaktivität der Epoxidlyasen. Es wird die Bildung des Diols **23** bei 30 °C bei pH 5 nach 6 h gezeigt. Keine der Reaktion zeigte Aktivität oberhalb der Kontrollreaktion ohne Enzym in Citratpuffer.

3.3.7 Alkohole als alternative Nukleophile

Obwohl Alkohole weniger nukleophil sind als Amine, haben sie den Vorteil, dass sie zwei freie Elektronenpaare zur Verfügung haben, weniger basisch sind und somit bei physiologischen pH-Wert nicht vollständig protoniert vorliegen. Das sollte genutzt werden, um zu bestimmen, ob die ELs Aktivität mit Alkoholen zeigen. Es wurden die Epoxide **1b** und **1c** mit 3-Methyl-1-butanol (**26**) und Cyclohexanol (**27**) getestet (Abb.

3 Ergebnisse

3.32). Dazu wurden die Produkte im Vorfeld synthetisiert, um eine Analytikmethode zu entwickeln.

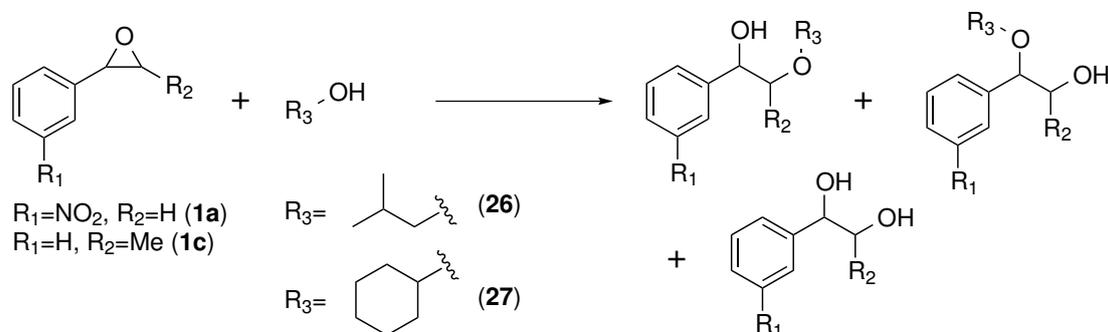


Abbildung 3.32: Reaktion zwischen den Epoxiden **1b** und **1c** mit den Alkoholen **25** und **26** bei den pH-Werten 5, 6, und 7,4 bei 30 °C für 15 h.

Für die Reaktionen wurden maximal Enzym (140-350 μM) mit 500 μM Epoxid (**1b**, **1c**) und 2,5 mM Alkohol (**26** und **27**) bei 30 °C für 15 h bei verschiedenen pH-Werten getestet. Es wurden hier 15 h als Zeitraum gewählt, da in vorangehenden Tests bereits gezeigt werden konnte, dass es keine Reaktion ohne Enzym gab. Alle Reaktionen wurden als Triplikate angesetzt. Neben der Hydrolyse konnte keine weitere Umsetzung festgestellt werden (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Übersicht weiterer Substrate, die bei 30 °C für 15 h bei verschiedenen pH-Werten getestet wurden. Je nach pH-Wert wurden 50 mM Phosphat- oder Citratpuffer gewählt.

Enzyme	Elektrophil	Nukleophil	pH 7,4	pH 6,0	pH 5,0
Puffer	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	k. R.
EL06	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	n. d.
EL08	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	n. d.
EL09	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	n. d.
EL10	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	k. R.
EL11	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	k. R.
EL13	1b, 1c	26, 27	k. R.	k. R.	n. d.

k. R.: keine Reaktion.

n. d.: nicht detektiert, da die Enzyme bei pH 5 denaturierten.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Studie zur Entwicklung eines Biokatalysesystems zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen, die eine wichtige Rolle als Zwischenprodukte in der pharmazeutischen und chemischen Industrie spielen. Es gibt bereits metallabhängige oder organokatalytische Methoden, deren Prozesse teuer und toxisch sind. Eine weitere Methode stellt die Epoxidringöffnungsreaktion mit Ammoniak dar, die den direktesten Weg repräsentiert, ist aber unkatalysiert nicht selektiv und führt zu geringen Ausbeuten (Kapitel 1.2, S. 9). In der Natur ist bisher kein System bekannt, welches Epoxide selektiv zu Aminoalkoholen umsetzen kann, so dass das Entwickeln eines Biokatalysators solch einer Reaktion, ein großer Fortschritt für die Biokatalyse darstellt.

4.1 Nukleophile Epoxidringöffnungsreaktionen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die säurekatalysierte Epoxidringöffnungsreaktion mit Enzymen untersucht werden. Chemisch gesehen handelt es sich bei der Epoxidringöffnungsreaktion um eine Art nukleophile Substitution (S_N), bei der das Epoxid durch ein Nukleophil angegriffen wird und ein Alkoholat die Abgangsgruppe bildet. Die Ringöffnungsreaktion kann entweder unter sauren oder basischen Bedingungen stattfinden. Unter sauren Bedingungen ist es nicht eindeutig, ob die Reaktion über einen S_N1 oder S_N2 -artigen Mechanismus abläuft. Im ersten Schritt wird das Epoxid protoniert, wodurch das Alkoholat zu einer besseren Abgangsgruppe wird und das Epoxid sich beginnt zu öffnen. An eines der Kohlenstoffatome bildet sich eine partiell positive Ladung aus, die am höher substituierten Kohlenstoffatom besser stabilisiert werden kann. Diese partiell positive Ladung im sogenannten losen S_N2 Übergangszustand, die einem Carbokation ähnelt, wird durch ein Nukleophil abgefangen. Der nukleophi-

le Angriff am höher substituierten Kohlenstoffatom verläuft etwas schneller als am weniger substituierten Kohlenstoffatom, dennoch gibt es Reaktionen mit Halogeniden als Nukleophil, bei denen der nukleophile Angriff unter sauren Bedingungen am weniger substituierten Kohlenstoffatom stattfindet. Der einstufige Mechanismus der unter Retention der Stereochemie abläuft, verläuft also über einen Mechanismus, der zwischen S_N1 und S_N2 liegt (Abb. 4.1).^[106] Wird die Reaktion unter basischen Bedingungen durchgeführt, verläuft die Reaktion über einen S_N2 -artigen Mechanismus ab. Die Protonierung des Epoxids entfällt, wodurch das Alkoholat eine schlechte Abgangsgruppe bildet und vom angreifenden Nukleophil angeschoben werden muss, damit es zur Öffnung des Epoxids kommen kann. Aufgrund von sterischen Effekten findet der nukleophile Angriff am weniger substituierten Kohlenstoffatom von der Rückseite des Epoxids und deshalb unter Inversion der Stereochemie statt (Abb. 4.1).^[106,107]

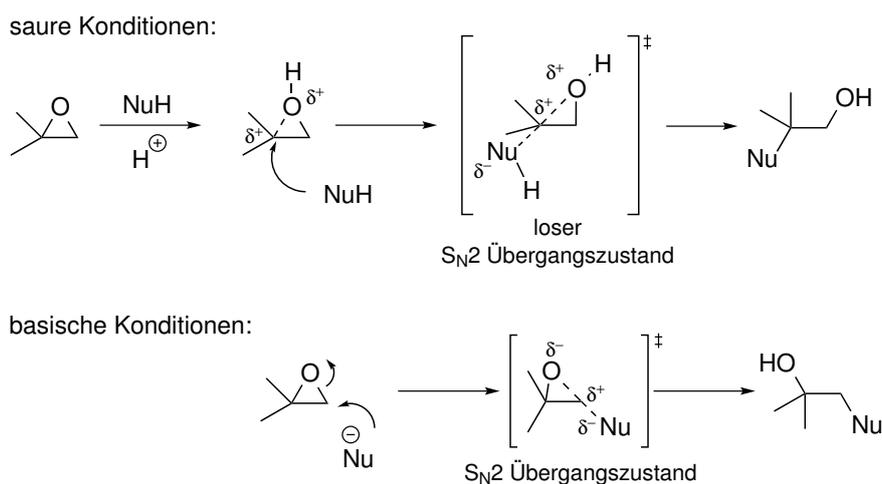


Abbildung 4.1: Epoxidöffnungsreaktionen unter basischen und sauren Bedingungen. Unter basischen Konditionen findet der Angriff am weniger substituierten Kohlenstoffatom statt. Unter sauren Bedingungen findet der Angriff hier am höher substituierten Kohlenstoffatom statt.

Die Regioselektivität dieser Reaktion ist unter sauren Bedingungen nicht vorhersagbar. Die partielle Ladung, die sich während des Carbokation-ähnlichem Übergangszustand bildet, kann zwar besser an höher substituierten Kohlenstoffatomen stabilisiert werden, wodurch dort der nukleophile Angriff bevorzugt wird, dennoch werden Epoxide am weniger substituierten Kohlenstoffatom geöffnet, wenn es sich um kleine

4.1 Nukleophile Epoxidringöffnungsreaktionen

Nukleophile, wie Halogenide handelt.^[107] Bei der Verwendung von großen und/oder aromatischen Epoxiden und Nukleophilen beeinflussen Sterik und Resonanzeffekte ebenfalls die Regioselektivität. Unter basischen Bedingungen wird immer das Produkt, bei dem der Angriff am weniger substituierten Kohlenstoffatom stattfand, gebildet.

In der chemischen Synthese werden metallabhängige Katalysatoren, wie Salen-Cr(III)-Komplexe, zur enantioselektiven Epoxidringöffnung eingesetzt.^[108] Chirale Salen-Metal-Komplexe werden bereits als Katalysatoren für die enantioselektive Epoxidierung eingesetzt. Martinez *et al.* konnten 1995 zeigen, dass sie diese chiralen Komplexe auch für die enantioselektive Epoxidringöffnung verwendet werden können. Die Öffnung von Epichlorohydrin mit Trimethylsilylazid unter der Verwendung des Salen-Cr(III)-Komplexes ergab den entsprechenden Azidoalkohol mit einer Ausbeute von 80 % und einem *ee*-Wert von 97 %.^[108] Um selektive Epoxidringöffnungen nachhaltigere durchzuführen, sollten Biokatalysatoren zum Einsatz kommen. Anfang der 1990er Jahre beschrieben Kamal *et al.* eine Variante einer Epoxidringöffnungsreaktion mit 2-Propylamin in Gegenwart einer Lipase, welche (S)-Propanolamine erbrachte (Abb. 4.2).^[109,110] Diese Reaktion wurde in organischen Lösungsmitteln wie Hexan, Toluol THF oder Ethylacetat durchgeführt. Nach zwei bis drei Tagen bei 20-40 °C und dem Einsatz von 2,5 g/L Enzym konnten abhängig vom eingesetzten Substrat Ausbeuten von 29-43 % und *ee*-Werten von 80-99 % erhalten werden. Auch wenn diese Reaktion hohe *ee*-Werte erzielte, ist der Einsatz dieser hohen Enzymmengen und diese langen Reaktionszeiten eher als limitierende Faktoren zu betrachten.

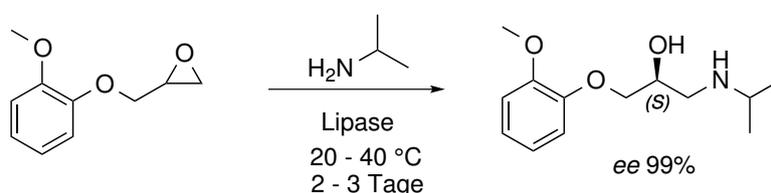


Abbildung 4.2: Epoxidringöffnung eines Arylglycidolether mit 2-Propanolamin in Gegenwart einer Lipase zur Darstellung des korrespondierenden Aminoalkohols.^[109,110]

Zur Darstellung von Aminoalkoholen aus Epoxiden ist kein weiteres biokatalytisches System bekannt, dennoch gibt es Enzyme, die die Ringöffnung mit Nucleophilen wie Wasser oder (Pseudo)Halogeniden katalytisch öffnen können: Epoxidhydrolasen (EHs), die Limonen-1,2-epoxidhydrolase (LEH) und die Halohydrindehalogenase (HheC). Diese Enzyme werden als enantio- bzw. regioselektiv beschrieben, so dass diese als Vorbild für die hier durchgeführte Studie dienten.^[63,111]

4.2 Stickstoffhaltige Nucleophile

Zur enzymkatalysierten Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen sollte die Reaktion der Epoxidringöffnung durch stickstoffhaltige Nucleophile untersucht werden. Zu den stickstoffhaltigen Nucleophilen gehören unter anderem *NH*-Nucleophile, wie z. B. Amine oder Amide, oder Pseudohalogenide, wie z. B. Azide. Im Falle der Epoxidringöffnung mit einem Azid würde dies in einen vicinalen Azidoalkohol resultieren, der in einem weiteren Schritt zu einem Aminoalkohol reduziert werden müsste. Die enzymatische Adzidolyse von Epoxiden konnte bereits von Elenkov *et al.* 2007 gezeigt werden. Ein racemisches Gemisch eines Epoxids wurde durch die Zugabe von Natriumazid HheC-katalysiert selektiv am terminalen Kohlenstoffatom zum (*R*)-Azidoalkohol umgesetzt (Abb. 4.3).^[112] Der Azidoalkohol konnte im nächsten Schritt zu einem Aminoalkohol reduziert werden.^[54]

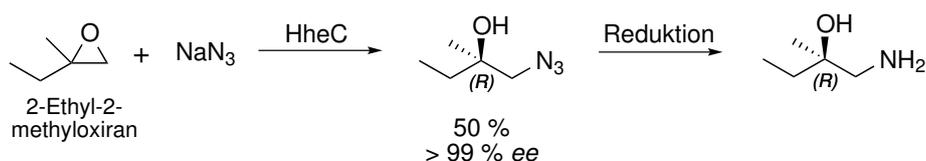


Abbildung 4.3: Kinetische Racematspaltung eines 2,2-disubstituierten Epoxids katalysiert durch die HheC ergibt selektiv den (*R*)-Azidoalkohol. Es folgt die Reduktion zum entsprechenden Aminoalkohol.

Um Aminoalkohole in einem Schritt darzustellen, kommen daher nur *NH*-Nucleophile in Frage. *NH*-Nucleophile sind aliphatische und aromatische Amine, Amide und Amidine. Amine können in drei Gruppen unterteilt werden: primär, sekundär und tertiär. Tertiäre Amine stehen allerdings als Nucleophile nicht zur Diskussion, da sie kein

freies Elektronenpaar für den nukleophilen Angriff besitzen. Sekundäre und primäre Amine sind starke Basen (pK_S ca. 11).^[113] Aufgrund ihrer hohen Basizität liegen sie in wässrigen Lösungen bei pH 7,4 vollständig protoniert vor, wodurch ihre Nucleophilie stark herabgesetzt wird.^[114] In der Biokatalyse wird typischerweise in einem pH-Wertbereich zwischen 5 und 8 gearbeitet.^[115] Das bedeutet, dass Amine mit hoher Wahrscheinlichkeit protoniert vorliegen. Dies gilt aber nicht unbedingt für die aktive Tasche eines Enzyms. So kann der eingesetzte Puffer bspw. bei pH 7 liegen, aber die Umgebung der aktiven Tasche kann dennoch ganz anders sein, wodurch der Einsatz von Aminen als Nucleophil in enzymkatalytischen Reaktionen nicht zwangsläufig erfolglos bleiben muss. Transaminasen sind ein gutes Beispiel für den erfolgreichen Einsatz von Aminen bei einem physiologischen pH-Wert.^[116] Sie werden zur Umsetzung von Ketonen zu enantiomerenreinen Aminen eingesetzt. Im ersten Schritt dieser Reaktion wird ein Amindonor nukleophil an den Pyridoxol-5'-phosphat-Cofaktor addiert, wodurch Pyridoxamin entsteht. Im zweiten Schritt wird die Aminogruppe vom Pyridoxamin auf das Akzeptormolekül übertragen, wodurch der Pyridoxol-5'-phosphat-Cofaktor zurückgewonnen und ein Amin erhalten wird.^[117,118]

Amide sind schwache Basen, deren Stickstoffatom weniger nukleophil ist als die von Aminen. Die Ursache liegt darin, dass das freie Elektronenpaar des Stickstoffs durch die benachbarte Carbonylgruppe des Amids resonanzstabilisiert wird. Durch die Delokalisierung des Elektronenpaars resultiert der niedrige pK_S -Wert von 0 bis -1 für die konjugierte Base (Protonierung am Sauerstoffatom).^[107] Amide können im wässrigen oder protischen Lösungsmitteln sowohl als Protonenakzeptor (Sauerstoff) als auch als Protonendonator (Stickstoff) fungieren. Das hat zur Folge, dass Amide weniger nukleophil sind als Amine. Durch Zugabe einer starken Base wie Natriumhydrid kann der Stickstoff deprotoniert werden, wodurch die Nucleophilie deutlich gesteigert werden kann. Die Deprotonierung des Stickstoffs durch Natriumhydrid kann aber nicht im wässrigen durchgeführt werden, da es mit Wasser zu Natronlauge und molekularem Wasserstoff reagiert. Formamid wurde beispielsweise als stickstoffhaltiges Nucleophil für eine Michael-Addition an Nitroalkenen eingesetzt. Der Stickstoff wird dabei im ersten Schritt durch *tert*-Butanolat deprotoniert und kann dann die Michael Addition an dem Alken durchführen.^[119] Hammer *et al.* konnten in einer intramolekularen

Reaktion unter dem Einsatz einer Squalen-Hopen-Zyklase zeigen, dass Amide durchaus genügend nukleophil sein können, um einen Ringschluss über ein Carbokation-Intermediat durchzuführen.^[120] Eine Alternative zu Amididen stellen Amidine dar, die die etwas stärkeren Basen im Vergleich zu Aminen oder Amididen sind (pK_S ca. 13). Sie stellen das Stickstoffäquivalent zu den Amididen dar, da sie anstatt der Carbonylgruppe eine Iminogruppe besitzen.^[107] Amidine haben ein sp^3 - und sp^2 -hybridisiertes Stickstoffatom, von denen nur das sp^2 -hybridisierte protoniert werden kann, da nur dann die positive Ladung über beide Stickstoffatome delokalisiert werden kann.^[121]

Aniline sind aromatische Amine. Aufgrund des elektronenschiebenden Effekts der Phenylgruppe, sind aromatische Amine im Allgemeinen viel schwächere Basen als aliphatische. Nicht nur der induktive Effekt des elektronegativen sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatoms sondern auch der Resonanzeffekt resultieren in einer schwächeren Basizität (pK_S -Wert 4,6).^[113] Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs ist partiell in das π -System des Phenylringes delokalisiert. Diese Eigenschaft macht sie zu recht guten Nucleophilen, weshalb sie zur Epoxidringöffnung eingesetzt werden können. Azizi *et al.* konnten zeigen, dass Anilin in einem 1,2-fachen Überschuss das Styroloxid in guten Ausbeuten mit hohen Regioselektivitäten in Wasser nukleophil öffnen konnten (Abb. 4.4).^[122] Die Autoren beschrieben nicht, wie sich Anilinderivate oder Styroloxidderivate verhielten. Azizi *et al.* verwendeten neben Anilin zusätzlich auch aliphatische Amine, wie Butylamin, Isopropylamin, Cyclohexylamin oder Morpholin in wässriger Umgebung und konnten dabei hohe Ausbeuten und Regioisomerenüberschüsse erzielen.^[122] Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur die Ergebnisse für Morpholin und Anilin als Nucleophil reproduziert werden, der nukleophile Angriff von aliphatischen Aminen konnte hier nicht gezeigt werden.

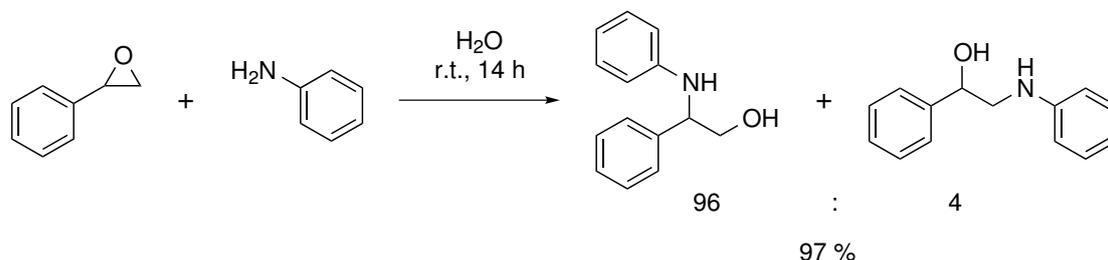


Abbildung 4.4: Regioselektive Epoxidringöffnung mit Anilin in wässrige Umgebung bei pH 7,0.^[122]

Die Wahl an Nucleophilen spielte eine Rolle bei der Erweiterung des Nucleophilenspektrums der Halohydrindehalogenase (HheC), der Limonen-1,2-epoxidhydrolase (LEH) und bei dem Design einer Reaktion für das computerbasierte *de novo* Enzymdesign.

4.3 Nutzung vorhandener katalytischer Zentren

Die ersten zwei Strategien zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen durch enzymkatalysierte Epoxidringöffnungsreaktionen basierten darauf, vorhandene katalytische Zentren so zu verändern, dass daraus neue katalytische Eigenschaften entstehen. Die HheC ist ein gut beschriebenes Enzym und katalysiert die Epoxidringöffnungsreaktion mit kleinen linearen Nucleophilen, wie z. B. Halogenide, die normalerweise eine negative Ladung tragen (Kapitel 1.3.3, S. 19). Epoxidhydrolasen (EHs) und die LEH sind ebenfalls Enzyme, die solch ein katalytisches Zentrum besitzen (Kapitel 1.3.2, S. 17). Die LEH ist eine ungewöhnliche EH, da sie zum Einen keine α,β -Hydrolasefaltung und zum Anderen keinen zweistufigen Reaktionsmechanismus besitzt. Bei EHs greift normalerweise ein Aspartat das Epoxid nucleophil an und bildet ein stabiles Enzym-Substrat-Intermediat. Dies ist der geschwindigkeits- und stereochemiebestimmende Schritt. Im Vergleich dazu greift bei LEHs ein gut-positioniertes und aktiviertes Wassermolekül das Epoxid direkt an. Diese drei Enzyme (HheC, EHs, LEH) besitzen als Gemeinsamkeit, dass das Epoxid durch Interaktionen mit einer sauren Gruppe (z. B. Protonierung) aktiviert wird und es durch den Angriff einer Base an eines der Kohlenstoffatome zur Ringöffnung kommt.^[63,66,84,123] Da bei den EHs der nucleophile Angriff durch ein Aspartat erfolgt, resultiert die zusätzliche Hydroxygrup-

pe des Diols vom Aspartat. Aus diesem Grund kann das Nukleophilspektrum nicht so einfach erweitert werden (Abb. 1.13, S. 17), so dass die EHs nicht geeignet sind.

Prof. Dr. Dick Janssen stellte drei Varianten der HheC zur Verfügung. Es handelte sich um Doppel- und Dreifachmutanten, die in seinen vorangehenden Arbeiten als stabiler und aktiver als der Wildtyp beschrieben wurden.^[124,125] Aus einer der Varianten konnte durch QC™-*site-directed mutagenesis* der Wildtyp zurückgewonnen und eine Einfachmutante (HheC::C153S) erhalten werden. Es sind eine Reihe an möglichen Nukleophilen (Azid, Chlorid, Bromid, Cyanid, Thiocyanat etc.) beschrieben, die negativ geladene lineare Moleküle sind.

Bei dem Einsatz von Aminen als Nukleophile konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.^[74] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen aus diesem Grund Amide (**2**), Acetamidin (**3**) und Harnstoff (**4**) als stickstoffhaltige Nukleophile zum Einsatz. Es wurden die Varianten der HheC als frisches Lysat und die stabilste Variante (HheC::C153S, W249F) als aufgereinigtes Enzym verwendet. Allerdings konnte nur die bereits publizierte Reaktion zwischen Styroloxid (**1a**) und Natriumazid (**5**) nachgewiesen werden. Eine Reaktion zwischen **1a** und den eingesetzten Amiden (**2**), Acetamidin (**3**) und Harnstoff (**4**) konnte nicht gezeigt werden. Dies zeigte, dass das Stickstoffatom der Amide nicht genügend nukleophil war bzw. das Epoxid nicht genügend aktiviert wurde, um unter der Verwendung der HheC-Varianten Aminoalkohole darzustellen.

Das synthetische Gen der LEH, welches von GeneArt, Regensburg (Deutschland) bezogen wurde, konnte erfolgreich in den pET-22b(+)-Vektor kloniert werden und in hohen Ausbeuten (500 µM aus 400 mL Medium) exprimiert und aufgereinigt werden. Dies stand im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Werten.^[61] Die aktive Tasche der LEH besteht aus einer Aspartat-Arginin-Aspartat-Triade, welche für die Epoxid- und Wasseraktivierung zuständig ist (Abb. 1.14, S. 18). Es handelt sich um einen allgemeinen Säure-Base-Mechanismus, bei dem das Aspartat an Position 101 als Säure dient, wodurch das Epoxid protoniert und aktiviert wird. Das Aspartat an Position 132 dient als Base und kann durch die Abspaltung eines Protons das Wasser aktivieren, damit es nukleophil an das aktivierte Epoxid angreifen kann. Bei der ge-

4.3 Nutzung vorhandener katalytischer Zentren

nannten Triade handelt es sich um ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen, um Ladungen zu stabilisieren. Das Tyrosin an Position 53 und das Asparagin an Position 55 dienen zur richtigen Positionierung des Wassermoleküls (Abb. 4.5).^[63] Durch rationales Design sollte die aktive Tasche so verändert werden, dass die Wasseraktivierung unterdrückt wird, um andere Nukleophile einzusetzen. Aus diesem Grund wurden für das gezielte Ändern die Positionen 132 (Aspartat), 55 (Asparagin) und 53 (Tyrosin) adressiert.

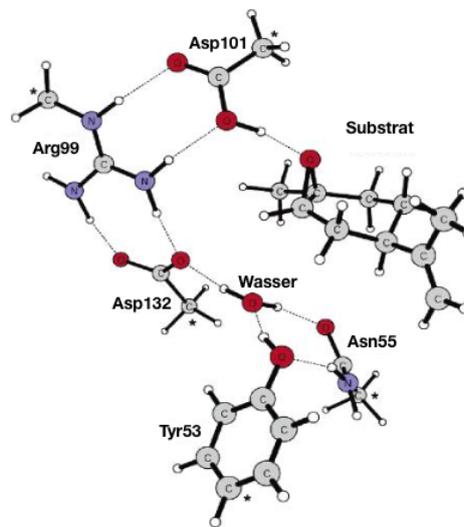


Abbildung 4.5: Die aktive Tasche der LEH mit (1S,2R,4R)-Limonen-1,2-epoxid als Substrat.^[63]

Arand *et al.* beschrieben, dass diese Positionen an der Reaktion beteiligt sind, da die Aktivität der LEH deutlich verringert wurde als diese Positionen verändert wurden.^[61] Diese Ergebnisse stimmen auch mit den hier präsentierten Ergebnissen überein. Es gab eine Abweichung bei der Mutante D132A, die sich im Rahmen dieser Arbeit nicht exprimieren ließ (Tab. 3.1, S. 57). Alle exprimierbaren Mutanten zeigten um 98-57% verringerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Es ist möglich, dass durch den Austausch des Aspartats an Position 132 das Netzwerk zur Ladungsstabilisierung entfallen war, wodurch die gesamte aktive Tasche kollabiert sein könnte und dadurch keine Aktivität mehr detektierbar war. Bei den Mutanten D132S und D132N lagen die Aktivitäten im Bereich der Hintergrundreaktion (Reaktion nur im Puffer ohne Enzym), was die These des Kollabierens der aktiven Tasche unterstreichen würde. Da

bei den Einfach- und Doppelmutanten an den Positionen 53 und 55 noch ein wenig Restaktivität vorhanden war, ist es möglich, dass diese Positionen das Netzwerk zur Ladungsstabilisierung nicht beeinflussen und das Wassermolekül einfach nicht mehr richtig positioniert werden konnte. Nichtsdestotrotz wurden alle exprimierbaren Mutanten auf Aktivität von **9** mit den Aminen (**10**)-(**14**) getestet. Es konnten keine neuen Produktpeaks detektiert werden. Für die nicht vorhandene Aktivität gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum Einen könnte es sein, dass das Tyrosin und das Asparagin an den Positionen 55 bzw. 53 noch immer ein Wassermolekül positionierten, welches aber durch die fehlende Base nicht mehr aktiviert werden konnte. Somit würde Wasser die Aminosäuren zur passenden Positionierung des Nucleophils (Amins) blockieren. Zum Anderen könnte es sein, dass Amine ebenso wie Wasser, eine Art Aktivierung und Positionierung benötigen, um Epoxide nucleophil öffnen zu können.

Eine weitere Möglichkeit die Wasser Konkurrenz zu umgehen, ist der Einsatz von organischen Lösungsmitteln anstelle von wässrigen Puffern. Um Enzyme in organische Lösungsmittel zu bringen, müssen sie entweder lyophilisiert oder immobilisiert werden. Immobilisation hat den Vorteil gegenüber Lyophilisation, dass das Enzym zusätzlich noch stabilisiert wird. Nach erfolgreicher Immobilisation zeigte die LEH noch 60% der Aktivität mit aufgereinigter gelöster LEH. Der Aktivitätsverlust kann daher rühren, dass das aufgereinigte Enzym 8 bzw. 24 h bei 25 °C inkubiert wurde und die LEH nicht genügend stabil war, um diesen Zeitraum bei dieser Temperatur zu überstehen. Für die immobilisierte LEH wurden Toluol und Cyclohexan mit verschiedenen Wassergehalten (90 µM - Sättigung) gewählt und mit verschiedenen Mengen an **7** auf Aktivität getestet. Es konnte keine Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden. Es gibt zwei mögliche Gründe für die nicht vorhandene Hydrolyseaktivität: Die LEH ist trotz Immobilisation nicht genügend stabil und denaturierte in organischen Lösungsmitteln. Dies stimmt mit Annahmen von Wijma und Floor überein, die mit der computergestützten Methode FRESCO die LEH stabiler machen wollen.^[126,127] Die richtige Faltung von Enzymen ist auch abhängig von der Solvatisierung. Der letzte Schritt der Immobilisierung ist gefriertrocknen, um das restliche Wasser zu entfernen. Durch die verschiedenen Mengen an eingesetztem Wasser in den organischen Lösungsmitteln sollte gewährleistet werden, dass genügend Wasser für das erneute Solvatisieren der

LEH vorhanden ist und es sollte zusätzlich als Nukleophil dienen. Es könnte sein, dass nicht genügend Wasser zur Verfügung stand, damit es als Nukleophile dienen konnte. Wäre das der Fall, wäre die Wasser Konkurrenz für den nukleophilen Angriff ausgeschaltet. Um das zu überprüfen wurden in mit Wasser gesättigten Lösungsmitteln das Epoxid **9** mit den Aminen (**10-14**) auf neue Aktivität getestet. Allerdings konnte kein Hydrolyseprodukt und keine Eduktabnahme detektiert werden.

4.4 Computerbasierte *de novo* Epoxidlyasen

Es war nicht möglich bereits vorhandene katalytische Zentren so zu optimieren, dass durch die Epoxidringöffnungsreaktionen mit stickstoffhaltigen Nukleophilen vicinale Aminoalkohole gebildet werden können. Daraufhin wurde eine dritte Strategie, die das computerbasierte Enzymdesign beinhaltet, entwickelt.

4.4.1 Design einer bimolekularen Reaktion

Die Voraussetzungen für eine Reaktion für das computerbasierte *de novo* Enzymdesign sind, dass es sich bei den Substraten, um große Moleküle handelt, die Verankerungsmöglichkeiten für die aktive Tasche besitzen. Substituierte Phenylringe bieten sich für das Enzymdesign an, da sie recht groß sind und über π - π -Wechselwirkungen in die aktive Tasche gebunden werden können. Als Substituenten an diesen Phenylringen können z. B. Hydroxy-, Methoxy- und Aminogruppen verwendet werden, da diese über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden werden können (Abb. 4.6). Ziel war es eine Reaktion zu finden, die bereits ein wenig Umsatz zeigte, so dass die Hintergrundaktivität nicht über 20% lag. Dies konnte durch die Wahl der Reaktionspartner und den Reaktionsparameter beeinflusst werden.

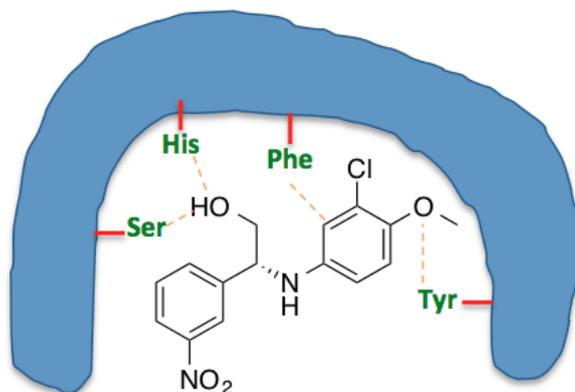


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung einer aktiven Tasche (blau) mit einem Liganden, der Substituenten für Ankerpunkte mit Aminosäureseitenketten (grün) besitzt.

Es wurden verschiedene aliphatische und aromatische Amine, verschiedene Amide und Amidin als Nukleophil getestet und als Elektrophil wurden zwei verschiedene Styroloxidderivate getestet (Abb. 3.12, S. 63). 3-Nitrostyroxid **1b** kam in Frage, da es die gewünschten Eigenschaften enthielt. Die Nitrogruppe wurde gewählt, weil diese einen -M und -I-Effekt auf den Phenylring ausübt, wodurch sie stark elektronenziehend wirkt. Dieser elektronenziehende Effekt kann auf das Epoxid übertragen werden, wodurch die Epoxidgruppe elektrophiler wird. Durch die *meta*-Position ist die elektronenziehende Wirkung auf das Epoxid allerdings abgeschwächt. Die Nitrogruppe hat den Vorteil als Ankerpunkt für Serin dienen zu können und ist durch ihre elektronische Eigenschaft ein Antiauxochrom, wodurch sie für Hochdurchsatzscreenings eingesetzt werden könnten. Die Verwendung von Amidin (**2**, **17** und **18**) und Acetamidin (**4**) zeigte keine Reaktion in wässriger Lösung (Tab. 3.3, S. 64). Dies unterstützt die in Abschnitt 4.2 (S. 86) aufgestellte These, dass Amide nicht genügend nukleophil sind, um Epoxide zu öffnen. Wie das Amid handelt es sich bei dem Amidin um ein ambidenten Nukleophil, so dass zum einen der Sauerstoff oder der Stickstoff (Amid) zum anderen der sp^2 - oder sp^3 -hybridisierte Stickstoff (Amidin) nukleophil angreifen könnten. Aber weder das eine noch das andere Produkt konnte detektiert werden. Der Einsatz von aliphatischen Aminen (**10-14**) zeigten bereits in den Hintergrundreaktionen der LEH keine Reaktion, so dass diese bereits von vornherein entfielen. Dies galt auch für das Amin **15**. Die Begründung dafür ist wie bereits erwähnt, dass die Amine

in wässriger Lösung bei pH 7,4 protoniert vorliegen. Eine Ausnahme stellte das zyklische Morpholin (**16**) dar. Der Stickstoff besitzt durch seinen +M-Effekt eine hohe Elektronendichte, wodurch die Nukleophilie gesteigert wird. Allerdings ist die Reaktion so gut, dass sie quasi vollen Umsatz zeigte, so dass es sich um keine geeignete Wahl handelte (Tab. 3.3, S. 64). Auch die Verwendung von Anilin (**19a**) zeigte mit Styroloxid **1a** einen sehr hohen Umsatz. Durch die Wahl geeigneter Substituenten konnte der Umsatz verringert werden (Tab. 3.3, S. 64). So konnte durch das Anfügen einer Nitrogruppe in *para*- (**19d**) bzw. *meta*-Position (**19c**) der Umsatz deutlich verringert werden, was ebenfalls durch die elektronenziehende Eigenschaft der Nitrogruppe erklärbar ist. Durch diese werden der Aminogruppe Elektronen entzogen, wodurch die Nukleophilie sinkt. Der Umsatz mit 3-Nitroanilin (*meta*) ist etwas höher als mit 4-Nitroanilin (*para*), da die *para*-Position die negative Ladung am Stickstoffatom der Aminogruppe besser stabilisiert. Die zwei genannten Aniline konnte allerdings nicht verwendet werden, weil eine weitere Voraussetzung für das Substratdesign die Unterscheidbarkeit war. Da 3-Nitrostyroloxid bereits als Elektrophil diente, konnte das Nukleophil keine Nitrogruppe tragen. Infolgedessen wurde 3,4-Chloromethoxyanilin (**20**) gewählt, welches ebenso eine geringe Aktivität mit 3-Nitrostyroloxid zeigte (Tab. 3.3, S. 64). Die genannten Effekte und Umsätze sind in Übereinstimmung mit den Resultaten von Chimni *et al.*, die Thioharnstoffderivate als Katalysator einsetzten, um die Aminolyse von Epoxiden zu katalysieren.^[45]

4.4.2 Evaluation der Designs

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich sechs der 13 Designs exprimieren und aufreinigen ließen und keines dieser exprimierten Proteine Aktivität gegenüber der gewünschten Reaktion zeigte. Ein Proteindesign für eine bimolekulare Reaktion zu entwickeln, ist nicht trivial. Zwei Substrate müssen in einer aktiven Tasche so angeordnet werden, dass ihre Orbitale so überlappen können, dass es zu einem produktiven Bindungsschluss kommen kann. Die erste bimolekulare Reaktion, die mit Hilfe eines computergestützten *de novo* Enzyms katalysiert werden konnte, ist die Diels-Alderase. In Abbildung 4.7 ist der durch eine aktive Tasche stabilisierte Übergangszu-

stand schematisch dargestellt. Es ist zu sehen, wie akkurat die beiden Substrate in der aktiven Taschen angeordnet sein müssen, dass es zu einem Bindungschluss kommen kann.^[32]

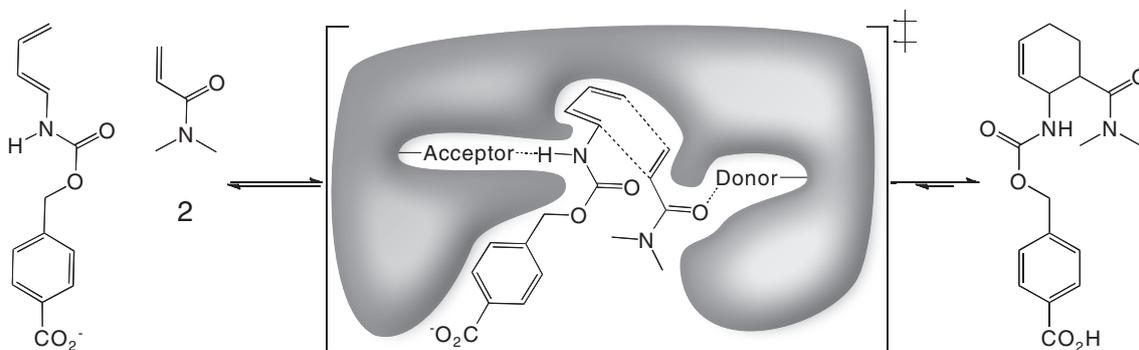


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des Übergangszustandes der Diels-Alder-Reaktion, der durch eine passende aktive Tasche stabilisiert wird.

Bei der bimolekularen Reaktion zur Epoxidringöffnung kommt zusätzlich hinzu, dass das Epoxid so binden muss, dass es aktiviert werden kann. Ausserdem muss die Umgebung dieser aktiven Taschen eher hydrophob sein, da es sich um ein recht großes unpolares Produkt handelt. Die Größe des Produkts rührt daher, dass Substrate für computergestütztes *de novo* Enzymdesign groß sein sollten. Die Erfolgsrate für monomolekulare Reaktionen ist dadurch sehr viel größer als die für bimolekulare Reaktionen.^[27] Normalerweise besteht der erste Schritt des computerbasierten Enzymdesigns aus der Berechnung von Übergangszuständen, für die Theozyme generiert werden. Diese verwendet RosettaMatch, um passende Proteingerüste in der *pdb* zu finden (Kapitel 1.1.2, S. 3). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteingerüste gewählt, die einen in der Form ähnlichen Liganden zu dem gewünschten Produkt **22a** besaßen. In diese Proteingerüste wurde ein passendes Rotamer von **22a** gelegt und umgepackt. Mittels RosettaDesign wurden der aktiven Tasche Maschinerien zur Epoxidaktivierung gegeben. Die nukleophile Epoxidringöffnungsreaktion sollte säurekatalysiert stattfinden, so dass in die Proteingerüste Aminosäureseitenketten designt werden mussten, die mittels Wasserstoffbrückenbindungen das Epoxid aktivieren können. Durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Sauerstoff des Epoxids und

einem Donor wird die C-O-Bindung des Epoxids geschwächt und der nukleophile Angriff erleichtert. Zusätzlich kann das Epoxid an die vorgesehene Position in der aktiven Tasche fixiert werden. Es wurden bereits funktionierende katalytische Zentren der EHs, HheC und Thioharnstoffderivaten als Vorlage verwendet (Abb. 4.8).^[45] Als Wasserstoffbrückendonoren kommen Serin, Tyrosin, Threonin, Histidin und Tryptophan in Frage. Es ist möglich RosettaDesign die genauen Positionen in der aktiven Tasche zu nennen, die zu den gewünschten Aminosäureseitenketten geändert werden sollen.

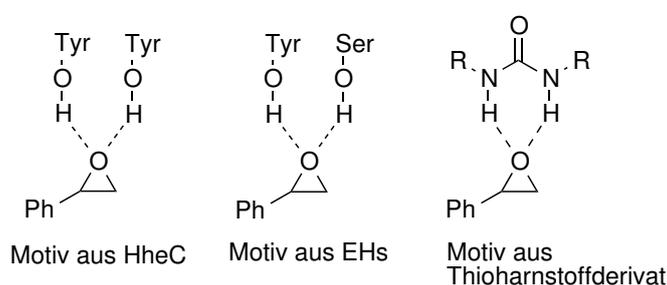


Abbildung 4.8: Vorlagen für die Motive der Epoxidaktivierung.

Histidin ist eine amphotere Aminosäure, d. h. es kann je nach pH-Wert als Säure oder Basen dienen. Der Imidazolring des Histidins besitzt eine pK_S -Wert von 6,1, so dass die stärkste Säureeigenschaft in einem pH-Bereich unter 6,0 liegt. Sie liegen nach Henderson-Hasselbalch bei pH 7,4 zu 98 % deprotoniert vor, bei pH 6,0 sind Histidine bereits zu 50 % protoniert und bei pH 5,0 zu 99 %.^[114,128] Niedrigere pH-Werte erhöhen also die Wahrscheinlichkeit, dass Histidine als Protonendonoren dienen können.

Bei der Optimierung der aktiven Taschen wurde darauf geachtet, dass der Ligand nicht mit der Sekundärstruktur kollidiert oder dass große Löcher entstehen. Aminosäuren, die nicht in der aktiven Taschen oder mitten in einem *loop* lagen, wurden nicht verändert, da durch jede eingefügte Mutation die Wahrscheinlichkeit stieg, dass die Proteine nicht mehr exprimierbar sind und Einschlusskörperchen bilden könnten. Durch diese Optimierungen und Evaluation konnten aus 400 möglichen Proteingerüsten 44 Designs ermittelt werden. Diese wurden einem weiteren Evaluationsschritt (MD-Simulation) unterzogen, um schlussendlich 13 Designs zu erhalten, die als synthetische Gene bestellt werden sollten. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die De-

signs zu evaluieren. Die Rosetta interne Bewertung der Designs beinhaltet die Passgenauigkeit der Liganden in der aktiven Tasche und berücksichtigt dabei Bindungen und Interaktionen zwischen Ligand und den Aminosäureseitenketten. Weiterhin bewertet Rosetta die Designs nach Packung der aktiven Tasche, genutzte und ungenutzte Wasserstoffbrückenbindungen und die Anzahl der Interaktionen zwischen Ligand und Aminosäureseitenketten und unter den Aminosäureseitenketten.^[28] Dabei ist zu beachten, dass dies nur Richtwerte sind, Rosetta kann keine Aussage über Stabilität oder Aktivität treffen. Die MD-Simulation der Designs wurden mit den Ursprungspoteinen verglichen, um zu sehen, ob die Sekundärstruktur noch erhalten war oder ob zu viele Aminosäuren ausgetauscht wurden und das Protein kollabierte.

Die synthetischen Gene wurden von der Firma GenScript (Piscataway, New Jersey, USA) bezogen. Zur Zeitersparnis waren die Gene bereits in einen pET-28a(+)-Vektor kloniert. Infolge der Wahl der passenden Restriktionsstellen konnte zwischen N- und C-terminalen His₆-Tags für die Proteinaufreinigung unterschieden werden. Die Auswahl basierte auf der in der Literatur beschriebenen Terminii (Tab. 3.4, S. 72).

Sechs der 13 Gene konnten unter Standardbedingungen überexprimiert und aufgereinigt werden (EL06, EL08, EL09, EL10, EL11 und EL13). Bei den sieben verbleibenden Genen (EL01, EL03, EL04, EL05, EL07, EL12 und EL14) stellte sich nach einer Expressionsstudie im Rahmen einer Bachelorarbeit von V. Frideres heraus, dass sie nicht so einfach zu exprimieren waren, so dass diese für weitere Charakterisierungen aus dem Portfolio fielen.^[105] Um die Proteine EL06, EL08, EL09, EL10, EL11 und EL13 untereinander zu vergleichen, wurden sie im ersten Aktivitätstest (pH 7,4, 15 h, 20 °C) mit der gleichen Endkonzentration von 50 µM eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten nur Puffer und BSA mit der gleichen Konzentration. BSA wurde eingesetzt, um bei einer gegebenen Aktivität, ausschließen zu können, dass die Proteinoberfläche als Katalysator diene. Es gab keine detektierbare Aktivität über der der Hintergrundreaktion (Puffer ohne Enzym). Auffällig ist hier, dass BSA eine niedrigere Aktivität aufwies als die Hintergrundreaktion oder der Einsatz der Proteine. Ein Grund hierfür kann sein, dass ein Teil des Epoxids kovalent an die Proteinoberfläche des BSA gebunden hat, und somit der Reaktion nicht mehr zur Verfügung stand.

In weiteren Experimenten wurden für die Aktivitätstests bei verschiedenen pH-Werten

und Temperaturen maximal Enzym eingesetzt, um einen möglichen Effekt zu sehen. Eine Idee bestand auch darin Ganzzellkatalyse zu betreiben, da dadurch gewährleistet wäre, dass kein exprimiertes Enzym verloren gehen würde. Allerdings konnte in anfänglichen Tests kein Epoxid mehr und kein neues Produkt per HPLC detektiert werden. Es konnte ausschließlich das Anilin detektiert werden, welches vor und nach der Reaktion in gleicher Menge vorhanden war. Die Ursache dafür war vermutlich, dass das Epoxid kovalent an eines oder mehrere der *E. coli*-eigenen Proteine bindete und somit nicht mehr für eine Reaktion zur Verfügung stand.

Zum Vergleich wurden die Enzyme auch bei 30 °C auf Aktivität getestet. Da die Edukte in der Hintergrundreaktion bei 30 °C nach 15 h bereits weitestgehend reagiert hatten, musste die Reaktionsdauer auf 6 h gesenkt werden. Bis auf EL10 bei 30 °C (pH 5,0) konnte keine Aktivität über der Hintergrundreaktion gezeigt werden. In EL10 war ein Histidin für die Epoxidaktivierung zuständig. Um auszuschließen, dass die Aktivität durch eine andere undefinierte Aminosäure stattfand, wurde eine sogenannte *Knock-Out*-Mutante erstellt. Es wurde das Histidin an Position 81 gegen ein Alanin ausgetauscht. Diese Punktmutation resultierte in einem Expressionsverlust, da nur 110 µM Enzym erhalten werden konnte, anstelle von 270 µM (Wildtyp-EL10) (Tab. 3.5, S. 73). Daraus lässt sich schließen, dass die EL10 nicht sehr stabil gegenüber Veränderungen ist. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass EL10 nicht dem ursprünglichen Protein entspricht (Tab. 3.4, S. 72), sondern bereits sieben Veränderungen trug. Um EL10 mit EL10::H81A vergleichen zu können, wurde die gleiche Menge an Enzym verwendet. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Aktivität festgestellt werden. Bezüglich der Selektivitäten (**22a/22b**) fiel auf, dass diese bei pH 7,4 und 20 °C bei ca. 0,8 liegt, dass also **22b** ein wenig bevorzugt gebildet wurde. Eine Erhöhung der Temperatur erzeugte bereits bei dem Einsatz von Proteinen eine Verlagerung des Produktverhältnisses (0,6). Dieser Effekt trat bei allen Tests außer bei den Bedingungen pH 7,4, 20 °C, 15 h auf. Bei der Reaktion mit EL10::H81A ist das Produktverhältnis vergleichbar mit der Hintergrundreaktion. Die Produktbildung von **22b** ist in allen Reaktionen vergleichbar, nur die Produktbildung von **22a** nahm ab, wodurch die Verschiebung der Produktverhältnisse zustande kam. Eine Vermutung für diese Verschiebung könnte sein, dass **21a** als Inhibitor wirkt und in die aktive Tasche der Enzyme

bindet und nicht wieder abgespaltet wird.

Das gewählte Nukleophil ist das Anilin **20**, welches durch die aromatischen Eigenschaften in seiner geometrischen Flexibilität eingeschränkt ist. Die Aminogruppe ist benachbart zu einem sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatom, wodurch sie partiell sp^2 -hybridisiert ist und partiell in das konjugierte System des Phenylrings mit eingebunden ist (Abb. 4.9). Damit es zu einer Bindungsbildung kommen kann, muss es zu einer produktiven Orbitalüberlappung kommen. Im Fall des Epoxids muss das freie Elektronenpaar des Stickstoffs am Anilin mit dem σ^* -Orbital des Epoxids überlappen (Abb. 4.9).

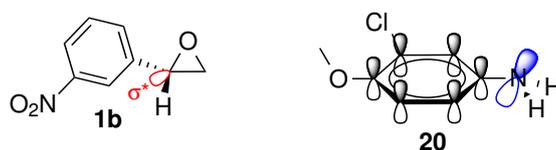


Abbildung 4.9: Links ist das Epoxid **1b** mit seinem σ^* -Orbital (rot) zu sehen und rechts ist das Anilin **20** mit dem Stickstoff, dessen freie Elektronenpaar (blau) partiell in das konjugierte System des Phenylrings eingebunden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Übergangszustände für diese Reaktion von Prof. Dr. Johannes Kästner des Instituts für Theoretische Chemie der Universität Stuttgart berechnet. Die Übergangszustände wurden für den nukleophilen Angriff am benzyli-schen Kohlenstoffatom (höher substituiertes C-Atom) des Epoxids **1b** mit dem Anilin **20** berechnet. Dabei kommen zwei mögliche Übergangszustände in Frage, die sich in der Position des Anilins unterscheiden. Je nach dem welches H-Atom auf das Epoxid von der Aminogruppe übertragen wird, gibt es zwei verschiedene Stellungen des Anilins relativ zum Epoxid (Abb. 4.10 und 4.11). Hierbei ist zu beachten, dass es sich bei den simulierten Übergangszuständen, um eine Simulation in der Gasphase handelte. Hier wird die Übertragung eines Protons vom Stickstoff auf das Epoxid gezeigt, da die Reaktion aber säurekatalysiert stattfinden soll, würde das Proton in einem Enzym von einer Aminosäureseitenkette übertragen werden. Somit kann der Reaktionsweg und die Geometrie des Übergangszustands in einem Enzym deutlich anders sein. Al-

lerdings zeigte die Simulation die Schwierigkeit passende Übergangszustände für das *de novo* Enzymdesign zu finden.

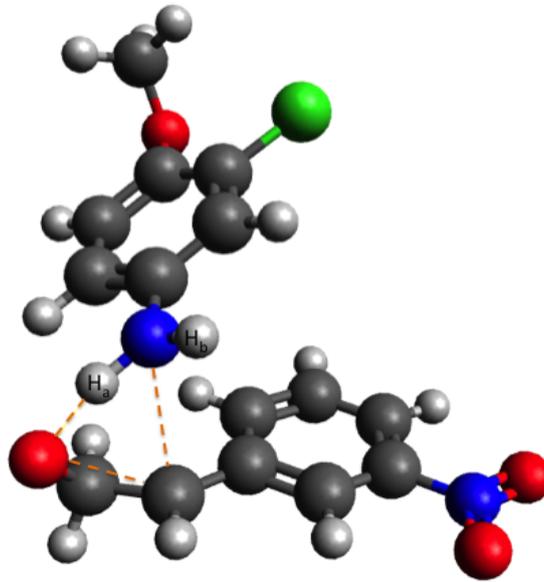


Abbildung 4.10: Einer der zwei berechneten Übergangszustände, die sich in der Position des Anilins (**20**) unterscheiden. Die gestrichelten orangen Linien kennzeichnen den Übergangszustand. Hier wird das H_a des Stickstoffatoms des Anilins auf das Epoxid (**1b**) übertragen.

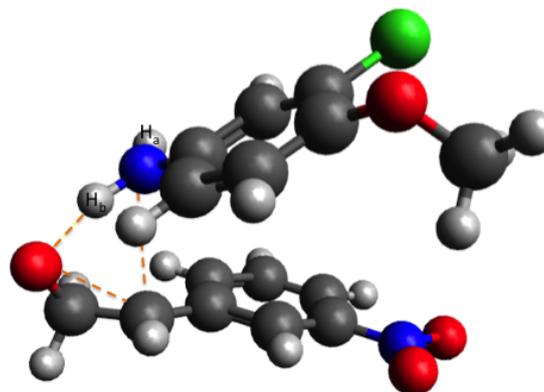


Abbildung 4.11: Einer der zwei berechneten Übergangszustände, die sich in der Position des Anilins (**20**) unterscheiden. Die gestrichelten orangen Linien kennzeichnen den Übergangszustand. Hier wird das H_b des Stickstoffatoms des Anilins auf das Epoxid (**1b**) übertragen.

Die Stereochemie des höher substituierten Kohlenstoffatoms blieb bei den Simulationen erhalten und es entstand dort eine partiell positive Ladung, so dass dieser Übergangszustand einem S_N1 -artigen Mechanismus entspricht. Die berechneten Übergangszustände unterscheiden sich von dem eingesetzten Liganden **22a**, der den Übergangszustand dieser Reaktion repräsentieren sollte. Während die beiden Substrate in den berechneten Übergangszuständen eher übereinander liegen, liegen sie bei dem verwendeten Liganden **22a** eher nebeneinander (Abb. 4.12).

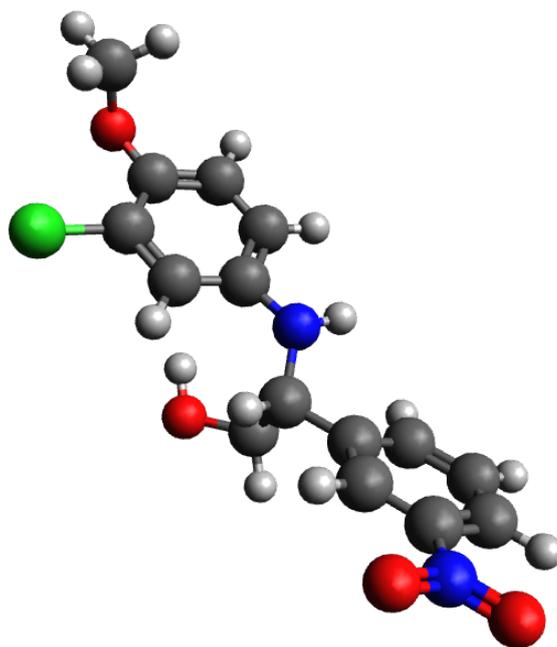


Abbildung 4.12: Ein Rotamer von **22a**, welches als Ligand für das *de novo* Enzymdesign verwendet wurde.

Für den gewählten Liganden wäre eine aktive Tasche notwendig, die eher schlauchförmig ist, während für die berechneten Übergangszustände eher eine kugel- bzw. ellipsenförmige aktive Tasche notwendig wäre. Alle exprimierbaren Designs wurden mit den berechneten Übergangszuständen verglichen, in dem die berechneten Übergangszustände in die Designs mithilfe von PyMol gelegt wurden. Dafür wurden die Epoxideinheit mit dem Befehl *pair fitting* an die vorgesehene Stelle in der aktiven Tasche gelegt. In Abbildung 4.13 ist ein Beispieldesign gezeigt, in welchem zu erkennen ist, dass die Anilinheit des berechneten Übergangszustands mit der Sekundärstruktur

tur des Proteins kollidierte. Dies war für die beiden berechneten Übergangszustände der Fall. In grauen Stäbchen ist der doppelte Wasserstoffbrückendonator, der aus zwei Histidinen besteht, gezeigt. Wie bereits beschrieben, geben die berechneten Übergangszustände in diesem Fall nur einen Anhaltspunkt. Sie sind für die Gasphase ohne enzymatische Interaktionen berechnet. In der Praxis sollte allerdings ein Enzym die Reaktion in wässriger Lösung katalysieren, wodurch ein Proton aus dem Enzym auf das Epoxid übertragen werden sollte. Für den Fall der berechneten Übergangszustände wird ein Proton von dem Anilin auf das Epoxid übertragen. Die aktiven Taschen sind für die berechneten Übergangszustände nicht optimal und sollten per *QCTM-site-directed mutagenesis* gezielt verändert werden. Die berechneten Übergangszustände kollidieren nicht nur mit Aminosäureseitenketten sondern auch mit der Sekundärstruktur.

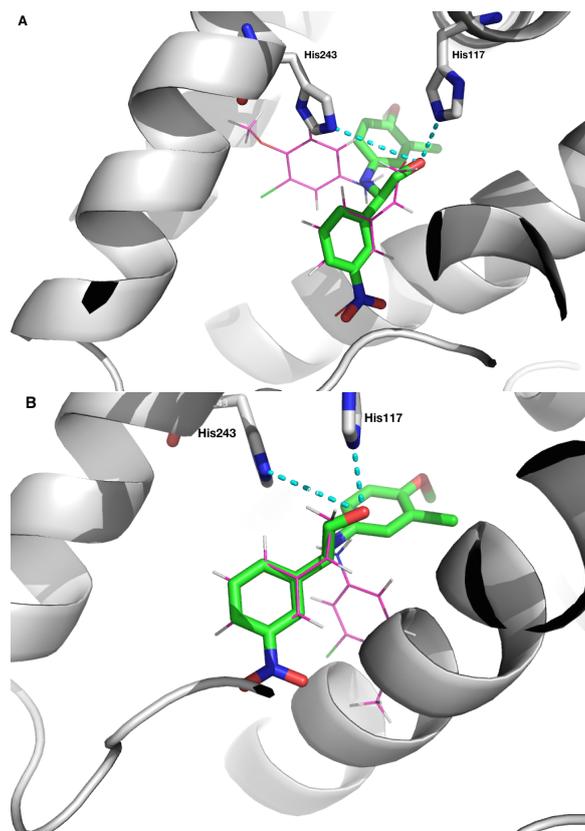


Abbildung 4.13: Anhand von EL11 wird gezeigt, dass die berechneten Übergangszustände (pinke Linien) im Gegensatz zum verwendeten Liganden (grüne Stäbchen) mit der Sekundärstruktur des Proteins kollidieren. Zwei Histidine (graue Stäbchen) sind die Wasserstoffbrückendonoren. Es sind die zwei verschiedenen Übergangszustände (**A** und **B**) gezeigt.

Um die strenge Geometrie der Epoxid-Anilin-Stellung etwas zu entschärfen, sollten weitere Nucleophile getestet werden, die etwas flexibler in ihrer Anordnung zum Epoxid sind. Es wurden Alkohole und aliphatische Amine gewählt. Aliphatische Amine sind nicht partiell in ein π -System konjugiert und damit flexibler in ihren Positionen zum Epoxid. Sie liegen in wässriger Lösung bei niedrigen pH-Werten allerdings protoniert vor. Alkohole sind in polar protischen Lösungsmitteln die besseren Nucleophile als Amine, da sie weniger solvatisiert vorliegen. Die Reaktionen wurden bei 30 °C für 15 h durchgeführt. Es konnte für keines der Nucleophile eine Produktbildung oder Eduktabnahme detektiert werden. Die Hintergrundreaktionen zeigten ebenfalls keine Produktbildung. Chemisch werden die resultierenden Aminoalkohole und β -Hydroxyether

unter dem Einsatz von Eisen(III)chlorid bzw. Zinktetrafluoroborat dargestellt.^[129,130] Es ist also notwendig gute Katalysatoren für diese Reaktionen einzusetzen, damit es zu einer Reaktion kommen kann. Die hier verwendeten angenommenen Biokatalysatoren sind als nicht optimal für diese Reaktionen.

Parallel wurde die Hydrolyseaktivität der ELs bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten untersucht. Obwohl die Reaktionen alle in wässriger Lösung verliefen und Wasser als Nukleophil im hohen Überschuss vorhanden war, konnte keine Hydrolyseaktivität über der unkatalysierten Reaktion nur in Puffer festgestellt werden. Die Ursache könnte darin liegen, dass Wasser ein recht schwaches Nukleophil in polar protischen Lösungen bildet und deshalb eine Aktivierung durch Protonierung bedarf. Diese Aktivierung ist z. B. in EHs oder LEHs durch ein Histidin bzw. einem Aspartat gegeben. In den hier vorliegenden computerbasierten *de novo* Enzymen war so eine Aktivierung nicht vorgesehen.

Eine weitere Möglichkeit der Evaluation der Strukturen stellt die STD-NMR dar. Mittels *saturation-transfer difference*-NMR können mögliche Bindungen zwischen Ligand und Protein festgestellt werden, um anschließend eine Bindungskinetik zu erhalten. Durch eine Kaskade an Gaußpulsen wird das Protein außerhalb des spektralen Bereiches der zu untersuchenden Liganden (-1 ppm) selektiv gesättigt. Bindet der zu untersuchende Ligand an das Protein, kann diese Sättigung auf den Liganden übertragen werden. Durch anschließende Dissoziation wird diese Sättigung in die Lösung übertragen, wo sie detektiert werden kann. Dieses Experiment wird als *on-resonance*-Spektrum bezeichnet. Als zweites Experiment wird ein sogenanntes *off-resonance*-Spektrum aufgenommen, welches einem ganz normalen ¹H-NMR entspricht. Das Subtrahieren des *on*- vom *off-resonance*-Spektrums ergibt ein Differenzspektrum, welches nur noch die Signale der Protonen enthält, die durch den Sättigungstransfer abgeschwächt wurden (Abb. 4.14).^[131-134]

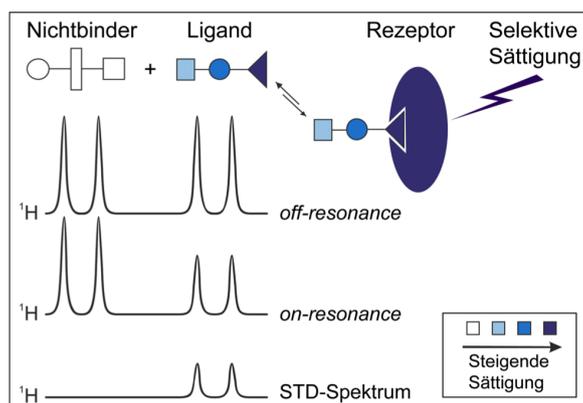


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der STD-NMR.^[134]

In ersten Versuchen mit der Unterstützung von Dr. Birgit Claasen des Instituts für Organische Chemie, Universität Stuttgart, konnte eine Bindung der beiden Substraten **1b** und **22a** mit dem Protein EL11 festgestellt werden. Allerdings lässt sich bei diesen Ergebnissen noch keine Aussagen darüber treffen, an welcher Position am oder im Protein die Bindung stattgefunden hat. Da es kein signifikantes Signal gab, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass es sich um unspezifische Bindungen irgendwo am/im Protein handelte.

Das computerbasierte *de novo* Enzymdesign besitzt noch viele Limitierungen und Herausforderungen, die verstanden werden müssen, um sie überwältigen zu können. Die bereits entwickelten *de novo* Enzyme zeigen im Vergleich zu natürlich vorkommenden Enzymen recht niedrige Aktivitäten, die im allgemeinen auch nicht höher sind als die von katalytischen Antikörpern. Für die Inaktivität von Designs kann es verschiedene Ursachen geben. Bei dem *de novo* Enzymdesign werden idealisierte theoretisch aktive Taschen in vorhandene Proteingerüste eingefügt. Diese idealisierte theoretische aktive Tasche kann entweder mechanistisch oder strukturell falsch sein. Strukturell falsch kann bedeuten, dass das Theozym in den gewählten Proteingerüsten nicht realisierbar ist. Mechanistisch falsch bedeutet, dass der angenommene Übergangszustand zu keiner produktiven Bindung führt. Diese zwei Möglichkeiten resultieren dann in inaktiven Designs. Ein weiterer wichtiger Faktor stellt das Rückgrat und die Umgebung der aktiven Tasche des Proteins dar. Sind zum Beispiel weitrei-

chende elektrostatische oder dynamische Eigenschaften nicht kompatibel mit den gewünschten katalytischen Eigenschaften, bleibt ein positives Resultat aus.^[135] Präzises Design der Aminosäureseitenketten in der aktiven Tasche, *loop* Anordnungen und die richtige Orientierung des Übergangszustands in der aktiven Taschen müssen mit elektrostatischen Interaktionen und Entropieverlust unter einen Hut gebracht werden. Die richtige Berechnung dieser genannten Faktoren ist essentiell für das computerbasierte *de novo* Enzymdesign.^[135] Das Feststellen der Ursache für ausbleibende Aktivitäten ist wichtig, um für zukünftige *de novo* Enzymdesigns Fehlern vorbeugen zu können. Dazu können entweder mechanistische oder strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden. Durch mechanistische Untersuchungen kann der Anteil der designten Interaktionen am katalytischen Mechanismus bestimmt werden. Diese könnten gegebenenfalls mit denen in natürlich vorkommenden Enzymen verglichen werden. Strukturelle Untersuchungen erbringen Informationen über die Faltung des Enzyms. Durch den Vergleich mit dem designten Protein können Rückschlüsse über mögliche Folgen und Probleme gezogen werden, um diese in einer neuen Runde an computerbasierten Methoden weiter zu optimieren. Wurden aktive Designs gefunden, können diese durch zufällige Mutagenese weiter optimiert werden. So konnte eine computerbasierte *de novo* Retro-Aldolase durch das zufällig Einbringen eines zweiten Lysins, welches das Schiff'sche Base Intermediat aktiviert, um mehr als das 4000-fache in ihrer katalytischen Effizienz gesteigert werden.^[136] Viele beschriebene computerbasierte *de novo* Enzyme konnten durch anschließendes *protein engineering* um ein Vielfaches optimiert werden, so dass die zufällige Mutagenese im Fall der hier vorliegenden Epoxidlyasen auch eine Möglichkeit wäre, aktive Enzyme zu erhalten.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Braun, O. Teichert, and A. Zweck, *VDI, e. V., Technik und Wissenschaft* **57** (2010).
- [2] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, and K. Robins, *Nature* **485**, 185 (2012).
- [3] R. J. Kazlauskas and U. T. Bornscheuer, *Nature Chemical Biology* **5**, 526 (2009).
- [4] F. H. Arnold, *Nature* **409**, 253 (2001).
- [5] U. T. Bornscheuer and M. Pohl, *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 137 (2001).
- [6] M. T. Reetz, *Angewandte Chemie* **123**, 144 (2011).
- [7] G. Kiss, N. Çelebi Ölçüm, R. Moretti, D. Baker, and K. N. Houk, *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 2 (2013).
- [8] F. Cedrone, A. Ménez, and E. Quéméneur, *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 405 (2000).
- [9] G. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, and U. T. Bornscheuer, *Advanced Synthesis and Catalysis* **353**, 2191 (2011).
- [10] S. C. Hammer, A. Marjanovic, J. M. Dominicus, B. M. Nestl, and B. Hauer, *Nature Chemical Biology*, in press (2014).
- [11] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, and F. H. Arnold, *Science* **339**, 307 (2012).
- [12] O. Kuchner and F. H. Arnold, *Trends in Biotechnology* **15**, 523 (1997).

- [13] F. H. Arnold, *Accounts of Chemical Research* **31**, 125 (1998).
- [14] M. T. Reetz, C. Torre, A. Eipper, R. Lohmer, M. Hermes, B. Brunner, A. Maichele, M. Bocola, M. Arand, A. Cronin, Y. Genzel, A. Archelas, and R. Furstoss, *Organic letters* **6**, 177 (2004).
- [15] P. Wentworth Jr and K. D. Janda, *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 138 (1998).
- [16] D. Hilvert, *Annual Review of Biochemistry* **69**, 751 (2000).
- [17] Y. Xu, N. Yamamoto, and K. D. Janda, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **12**, 5247 (2004).
- [18] D. Hilvert, K. W. Hill, K. D. Nared, and M. T. M. Auditor, *Journal of the American Chemical Society* **111**, 9261 (1989).
- [19] S. N. Thorn, R. G. Daniels, M.-T. M. Auditor, and D. Hilvert, *Nature* **373**, 228 (1995).
- [20] J. Wagner, R. A. Lerner, and C. F. Barbas, *Science* **270**, 1797 (1995).
- [21] G. Zhong, R. A. Lerner, and C. F. Barbas, *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 3738 (1999).
- [22] D. Hilvert, *Annual Review of Biochemistry* **82**, 447 (2013).
- [23] M. Dürrenberger and T. R. Ward, *Current Opinion in Chemical Biology* **19**, 99 (2014).
- [24] C. M. Thomas and T. R. Ward, *Chemical Society reviews* **34**, 337 (2005).
- [25] Y. Li and P. C. Cirino, *Biotechnology and Bioengineering* **111**, 1273 (2014).
- [26] J. Bos, F. Fusetti, A. J. M. Driessen, and G. Roelfes, *Angewandte Chemie International Edition* **51**, 7472 (2012).
- [27] A. Zanghellini, *Current Opinion in Biotechnology* **29C**, 132 (2014).

- [28] F. Richter, A. Leaver-Fay, S. D. Khare, S. Bjelic, and D. Baker, *PloS one* **6**, e19230 (2011).
- [29] D. Röthlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, and D. Baker, *Nature* **453**, 190 (2008).
- [30] O. Khersonsky, G. Kiss, D. Röthlisberger, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. Baker, and D. S. Tawfik, *PNAS* **109**, 10358 (2012).
- [31] S. Bjelic, Y. Kipnis, L. Wang, Z. Pianowski, S. Vorobiev, M. Su, J. Seetharaman, R. Xiao, G. Kornhaber, J. F. Hunt, L. Tong, D. Hilvert, and D. Baker, *Journal of Molecular Biology* **426**, 256 (2014).
- [32] J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. St Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael, and D. Baker, *Science* **329**, 309 (2010).
- [33] H. Jukes, S. J. Gould, A. Radzicka, and R. Wolfenden, *Science* **267**, 90 (1995).
- [34] D. J. Ager, I. Prakash, and D. R. Schaad, *Chemical Reviews* **96**, 835 (1996).
- [35] W. N. Kernan and C. M. Viscoli, *England Journal of Medicine* **343**, 1826 (2000).
- [36] Y. Ohta and I. Shinkai, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **5**, 639 (1997).
- [37] S. C. Bergmeier, *Tetrahedron* **56**, 2561 (2000).
- [38] M. Horikawa, J. Busch-Petersen, and E. J. Corey, *Tetrahedron Letters* **40**, 3843 (1999).
- [39] G. Li, H. T. Chang, and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **35**, 451 (1996).
- [40] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stürmer, and T. Zelinski, *Angewandte Chemie International Edition* **43**, 788 (2004).

- [41] A. I. P. D. Meyers, K. P. D. Drauz, M. D. Schwarm, and M. Mckennon, Verfahren zur Reduktion von Carbonsäuren oder Carbonsäurederivaten sowie neue Verbindungen, 1994.
- [42] M. Pasto, A. Moyano, M. A. Perica, and A. Riera, *Journal of Organic Chemistry* **3263**, 6033 (1996).
- [43] Y. Kaburagi and Y. Kishi, *Tetrahedron letters* **48**, 8967 (2007).
- [44] T. Laïb, J. Chastanet, and J. Zhu, *The Journal of Organic Chemistry* **3263**, 1709 (1998).
- [45] S. S. Chimni, N. Bala, V. A. Dixit, and P. V. Bharatam, *Tetrahedron* **66**, 3042 (2010).
- [46] J. D. Rozzell, Stereospecific rearrangement biosynthesis by microorganism, 1998.
- [47] F. Balkenhohl, K. Ditrich, and C. Nuebling, Racemate separation of primary and secondary heteroatom-substituted amine by enzyme-catalysed acylation, 1996.
- [48] T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, U. Menyese, M. Pohl, and D. Rother, *Green Chemistry* **16**, 3341 (2014).
- [49] H. C. Kolb, M. S. Van Nieuwenhze, and K. B. Sharpless, *Chemical Reviews* **94**, 2483 (1994).
- [50] M. Tokunaga, *Science* **277**, 936 (1997).
- [51] N. Kasai, K. Tsujimura, K. Unoura, and T. Suzuki, *Journal of Industrial Microbiology* **10**, 37 (1992).
- [52] A. Archelas and R. Furstoss, *Annual Reviews in Microbiology* **51**, 491 (1997).
- [53] E. N. Jacobsen, *Accounts of Chemical Research* **33**, 421 (2000).
- [54] E. De Vries and D. Janssen, *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 414 (2003).
- [55] E. Y. Lee, *Biotechnology and Bioengineering* **98**, 318 (2007).

- [56] C. Morisseau and B. D. Hammock, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**, 311 (2005).
- [57] M. T. Reetz and H. Zheng, *ChemBiochem* **12**, 1529 (2011).
- [58] M. Widersten, A. Gurell, and D. Lindberg, *Biochimica et Biophysica Acta* **1800**, 316 (2010).
- [59] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, and B. Hauer, *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 3070 (2014).
- [60] W. Krenn, I. Osprian, W. Kroutil, G. Braunegg, and K. Faber, *Biotechnology Letters* **21**, 687 (1999).
- [61] M. Arand, B. M. Hallberg, J. Zou, T. Bergfors, F. Oesch, M. J. van der Werf, J. A. M. de Bont, T. A. Jones, and S. L. Mowbray, *The EMBO Journal* **22**, 2583 (2003).
- [62] M. J. Werf, *Journal of Bacteriology* **180**, 5052 (1998).
- [63] K. H. Hopmann, B. M. Hallberg, and F. Himo, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 14339 (2005).
- [64] H. Zheng, D. Kahakeaw, J. P. Acevedo, and M. Reetz, *ChemCatChem* **2**, 958 (2010).
- [65] M. E. S. Lind and F. Himo, *Angewandte Chemie* **125**, 1 (2013).
- [66] M. J. van der Werf, J. A. M. de Bont, and H. J. Swarts, *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 4225 (1999).
- [67] C. E. Castro and E. W. Bartnicki, *Biochemistry* **7**, 3213 (1968).
- [68] A. J. van den Wijngaard, P. T. Reuvekamp, and D. B. Janssen, *Journal of Bacteriology* **173**, 124 (1991).
- [69] M. M. Elenkov, B. Hauer, and D. B. Janssen, *Advanced Synthesis and Catalysis* **348**, 579 (2005).

- [70] M. Elenkov, L. Tang, B. Hauer, and D. B. Janssen, *Organic letters* **8**, 4227 (2006).
- [71] G. Hasnaoui, J. H. Lutje Spelberg, E. de Vries, L. Tang, B. Hauer, and D. B. Janssen, *Tetrahedron: Asymmetry* **16**, 1685 (2005).
- [72] K. H. Hopmann and F. Himo, *Biochemistry* **47**, 4973 (2008).
- [73] J. H. Spelberg, L. Tang, M. van Gelder, R. M. Kellogg, and D. B. Janssen, *Tetrahedron: Asymmetry* **13**, 1083 (2002).
- [74] G. Hasnaoui-Dijoux, M. M. Elenkov, J. H. L. Spelberg, B. Hauer, and D. B. Janssen, *ChemBioChem a European Journal of Chemical Biology* **9**, 1048 (2008).
- [75] B. Miroux and J. E. Walker, *Journal of Molecular Biology* **260**, 289 (1996).
- [76] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463 (1977).
- [77] P. K. Smith, R. I. Krohn, and G. T. Hermanson, *Analytical Biochemistry* **150**, 76 (1985).
- [78] S. M. N. Efange, D. C. Mash, A. B. Khare, and Q. Ouyang, *Journal of Medical Chemistry* **41**, 4486 (1998).
- [79] J. J. Shie and J. M. Fang, *The Journal of Organic Chemistry* **68**, 1158 (2003).
- [80] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Spectral Database for Organic Compounds.
- [81] D. B. Janssen, M. Majeri, G. Hasnaoui, B. Hauer, and J. H. L. Spelberg, *Biochemical Society Transactions* **34**, 291 (2006).
- [82] L. Tang, X. Zhu, H. Zheng, R. Jiang, and M. Majeric Elenkov, *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 2631 (2012).
- [83] D. Janssen, *Not published* .

- [84] M. J. Werf, H. J. Swarts, and A. M. De Jan, *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2092 (1999).
- [85] H. Zheng and M. T. Reetz, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 15744 (2010).
- [86] S. Zgorzelski, *Epoxidhydrolase katalysierte Ringöffnungsreaktionen*, Bachelorarbeit, 2013.
- [87] Z. D. Knežević-Jugović, D. I. Bezbradica, D. v. Mijin, and M. G. Antov, The immobilization of enzyme on Eupergit supports by covalent attachment, in *Enzyme Stabilization and Immobilization*, edited by S. D. Minter, volume 679 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 99–111, Springer, Totowa, NJ, 2011.
- [88] W. A. P. Luck, *Pure & Appl. Chem.* **59**, 1215 (1987).
- [89] P. C. D. Hawkins, A. G. Skillman, G. L. Warren, B. A. Ellingson, and M. T. Stahl, *Journal of Chemical Information and Modeling* **50**, 572 (2010).
- [90] H. E. Xu, M. H. Lambert, and V. G. Montana, *Molecular Cell* **3**, 397 (1999).
- [91] W. Wang, P. Devasthale, D. Farrelly, L. Gu, A. Peters, T. Harrity, M. Cap, C. Chu, L. Kunselman, N. Morgan, R. Ponticiello, R. Zebo, L. Zhang, K. Locke, J. Lippy, K. O'Malley, V. Hosagrahara, P. Kadiyala, C. Y. Chang, and J. Muckelbauer, *To be Published*.
- [92] T. Oyama, K. Toyota, T. Waku, Y. Hirakawa, N. Nagasawa, J. I. Kasuga, Y. Hashimoto, H. Miyachi, and K. Morikawa, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **65**, 786 (2009).
- [93] R. Montanari, F. Saccoccia, E. Scotti, M. Crestani, C. Godio, F. Gilardi, F. Loiodice, G. Fracchiolla, A. Laghezza, P. Tortorella, A. Lavecchia, E. Novellino, F. Mazza, M. Aschi, and G. Pochetti, *Journal of Medical Chemistry* **51**, 7768 (2008).
- [94] C. H. Lin and Y. H. Peng, *Journal of Medicinal Chemistry* **52**, 2618 (2009).

- [95] L. Porcelli, F. Gilardi, A. Laghezza, L. Piemontese, N. Mitro, A. Azzariti, F. Altieri, L. Cervoni, G. Fracchiolla, M. Giudici, U. Guerrini, A. Laccchia, R. Montanari, C. Giovanni, A. Paradiso, G. Pochetti, G. M. Simone, P. Tortorella, M. Crestani, and F. Loiodice, *Journal of Medicinal Chemistry* **55**, 37 (2011).
- [96] B. Giabbai and M. Degano, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 524 (2004).
- [97] E. Iovane, B. Giabbai, L. Muzzolini, V. Matafora, A. Fornili, C. Minici, F. Gianese, and M. Degano, *Biochemistry* **47**, 4418 (2008).
- [98] G. Garau, L. Muzzolini, P. Tornaghi, and M. Degano, *To be Published* .
- [99] A. M. Aronov, C. Baker, G. W. Bemis, J. Cao, G. Chen, P. J. Ford, U. A. Germann, J. Green, M. R. Hale, M. Jacobs, J. W. Janetka, F. Maltais, G. Martinez-Botella, M. N. Namchuk, J. Straub, Q. Tang, and X. Xie, *Journal of Medicinal Chemistry* **50**, 1280 (2007).
- [100] Y. N. Kang, J. A. Stuckey, and X. Xie, *To be Published* .
- [101] D. G. Gourley, J. R. Coggins, N. W. Isaacs, J. D. Moore, I. G. Charles, and A. R. Hawkins, *Journal of Molecular Biology* **241**, 488 (1994).
- [102] A. Peón, J. M. Otero, L. Tizón, V. F. V. Prazeres, A. L. Llamas-Saiz, G. C. Fox, M. J. van Raaij, H. Lamb, A. R. Hawkins, F. Gago, L. Castedo, and C. González-Bello, *ChemMedChem* **5**, 1726 (2010).
- [103] E. Lence, L. Tizon, J. M. Otero, A. Peon, V. Prazeres, A. L. Llamas-Saiz, G. C. Fox, M. J. van Raaij, H. Lamb, A. R. Hawkins, and G. B. Concepción, *ACS Chemical Biology* **8**, 568 (2012).
- [104] J. B. Thoden, E. A. T. Ringia, and J. B. Garrett, *Biochemistry* **43**, 5716 (2004).
- [105] V. Frideres, *Optimierung einer de novo Epoxidlyase*, Bachelorarbeit, 2014.
- [106] S. Bonollo, D. Lanari, and L. Vaccaro, *European Journal of Organic Chemistry* , 2587 (2011).

- [107] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, 2009.
- [108] L. E. Martinez, J. L. Leighton, D. H. Carsten, and E. N. Jacobsen, *Journal of the American Chemical Society* **117**, 5897 (1995).
- [109] A. Kamal and M. V. Rao, *Tetrahedron: Asymmetry* **5**, 1881 (1994).
- [110] A. Kamal, Y. Damayanthi, and M. V. Rao, *Tetrahedron: Asymmetry* **3**, 1361 (1992).
- [111] M. Elenkov, I. Primožič, T. Hrenar, A. Smolko, I. Dokli, B. Salopek-Sondi, and L. Tang, *Organic and Biomolecular Chemistry* **10**, 5063 (2012).
- [112] M. M. Elenkov, H. W. Hoeffken, L. Tang, B. Hauer, and D. B. Janssen, *Advanced Synthesis and Catalysis* **349**, 2279 (2007).
- [113] D. H. Ripin and D. A. Evans, *pKa's of Inorganic and Oxo-Acids*, 2010.
- [114] L. J. Henderson, *American Journal of Physiology* **21**, 465 (1908).
- [115] T. Johannes, M. R. Simurdiak, and H. Zhao, Biocatalysis, in *Encyclopedia of Chemical Processing*, pp. 101–110, 2006.
- [116] R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, and W. Kroutil, *ACS Catalysis* **4**, 129 (2014).
- [117] D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, and W. Kroutil, *Trends in Biotechnology* **28**, 324 (2010).
- [118] D. Zhu and L. Hua, *Biotechnology Journal* **4**, 1420 (2009).
- [119] A. Kamimura, A. Kadowaki, Y. Nagata, and H. Uno, *Tetrahedron Letters* **47**, 2471 (2006).
- [120] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, M. Seitz, B. M. Nestl, and B. Hauer, *Current Opinion in Chemical Biology* **17**, 293 (2013).
- [121] A. A. Aly and A. M. Nour-El-Din, *Arkivoc* **1**, 153 (2008).

- [122] N. Azizi and M. R. Saidi, *Organic letters* **7**, 3649 (2005).
- [123] M. Arand, A. Cronin, M. Adamska, and F. Oesch, *Methods in Enzymology* **400**, 569 (2005).
- [124] L. Tang, J. E. T. van Hylckama Vlieg, J. H. L. Spelberg, M. W. Fraaije, and D. B. Janssen, *Enzyme and Microbial Technology* **30**, 251 (2002).
- [125] R. J. Fox, S. C. Davis, E. C. Mundorff, L. M. Newman, V. Gavrilovic, S. K. Ma, L. M. Chung, C. Ching, S. Tam, S. Muley, J. Grate, J. Gruber, J. C. Whitman, R. A. Sheldon, and G. W. Huisman, *Nature Biotechnology* **25**, 338 (2007).
- [126] H. J. Wijma, R. J. Floor, P. A. Jekel, D. Baker, S. J. Marrink, and D. B. Janssen, *Protein Engineering, Design&Selection* **27**, 49 (2014).
- [127] R. Floor, H. Wijma, P. Jekel, A. Terwisscha van Scheltinga, B. Dijkstra, and D. Janssen, *To be Published* .
- [128] A. Parrill, Amino Acid Structures.
- [129] B. Pujala, S. Rana, and A. K. Chakraborti, *Journal of Organic Chemistry* **76**, 8768 (2011).
- [130] N. Iranpoor and P. Salehi, *Synthesis* **11**, 1152 (1994).
- [131] M. Mayer and B. Meyer, *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 1784 (1999).
- [132] M. Mayer and B. Meyer, *Journal of the American Chemical Society* **123**, 6108 (2001).
- [133] B. Meyer and T. Peters, *Angewandte Chemie* **115**, 890 (2003).
- [134] B. Claasen, *Synthese und Charakterisierung von peptidischen Liganden des zellulären , humanen Prionproteins: Inhibition der Aggregation des Prionproteins*, PhD thesis, 2005.
- [135] D. Baker, *Protein Science* **19**, 1817 (2010).

- [136] L. Giger, S. Caner, R. Obexer, P. Kast, D. Baker, B. Nenad, and D. Hilvert, *Nature Chemical Biology* **9**, 494 (2013).

Anhang

Nukleotidsequenzen

Wildtyp HheC

1 ATGTC AACCG CAATT GTAAC AAACG TTAAG CATTT TGGGG GAATG GGGTC TGCAC
56 TTCGT CTCTC GGAAG CAGGA CATAc AGTGG CTTGC CACGA TGAAA GCTTC AAACA
111 AAAGG ACGAA CTTGA AGCCT TTGCC GAAAC CTATC CACAA CTCAA ACCAA TGTCG
166 GAACA AGAAC CAGCG GAACT CATCG AGGCA GTTAC CTCCG CTTAT GGTCA AGTTG
221 ATGTA CTTGT GAGCA ACGAC ATATT CGCAC CAGAG TTCCA ACCCA TAGAT AAATA
276 CGCTG TAGAG GACTA TCGCG GTGCG GTCGA GCGCG TACAA ATTAG ACCAT TTGCA
331 CTGGT CAACG CCGTT GCAAG TCAAA TGAAG AAGCG CAAAA GCGGA CATAT TATCT
386 TTATT ACCTC TGCAA CGCCC TTCGG GCCTT GGAAG GAACT TTCTA CCTAC ACGTC
441 AGCCC GAGCA GGTGC ATGCA CCTTG GCAAA TGCCC TTTCG AAGGA ACTCG GTGAA
496 TACAA CATTc CGGTG TTCGC AATAG GACCC AATTA TCTTC ACAGT GAAGA TAGTC
551 CCTAC TTCTA CCCCc CAGAA CCGTG GAAAA CGAAT CCAGA ACACG TTGCC CATGT
606 CAAAA AAGTC ACTGC GCTCC AGCGG TTAGG TACAC AGAAA GAATT GGGAG AACTC
661 GTCGC GTTTC TCGCG TCTGG TAGTT GTGAC TATCT GACCG GCCAG GTGTT CTGGT
716 TGGCC GGCGG ATTCC CAATG ATCGA GCGTT GGCCT GGTAT GCCCG AGTAG

Wildtyp LEH

1 TATGC ACCAT CATCA CCACC ATGCA GCGGG GGGAA CATCA AAGAT CGAAC AACCT
56 CGCTG GGCCT CCAAG GACAG TGCCG CCGGC GCTGC CTCGA CTCCG GACGA AAAGA
111 TCGTT CTGGA GTTCA TGGAC GCACT GACCA GTAAT GATGC TGCAA AACTC ATTGA
166 GTACT TTGCA GAAGA CACGA TGTAC CAGAA CATGC CACTC CCCCC TGCAT ACGGC
221 CGCGA CGCCG TCGAG CAAAC TCTGG CTGGC CTGTT CACCG TCATG AGCAT CGATG
276 CGGTG GAGAC GTTCC ATATC GGCTC GAGTA ACGGA CTTGT GTACA CCGAA CGTGT
331 CGATG TCCTA CGCGC ACTAC CCACC GGCAA GAGCT ACAAC CTGTC AATCC TCGGA
386 GTCTT CCAGC TCACC GAGGG CAAGA TTACG GGTTG GCGTG ACTAC TTCGA TCTGC
441 GCGAA TTCGA AGAAG CTGTC GACCT TCCCC TCCGC GGCTA AAAGC TT

EL01

1 CATAT GCAAG TCGCA GACCT GAAGG CGTTT AGCAA GCACA TCTAT AATGC GTACC
56 TGAAG AACTT TAACA TGACG AAGAA GAAAG CCCGT AGCAT TCTGA CGGGC AAAGC
111 CAGTC ATACC GCACC GTTTG TTATT CACGA TATTG AAACC CTGTG GCAGG CTGAA
166 AAAGG CCTGG TGTGG AAGCA ACTGG TTAAC GGTCT GCCGC CGTAT AAAGA AATTT
221 CAGTG CATGT TGCCG GTCGT ATCCA GTGCA CGGCA GTCGA AACCG TGCGC GAACT
276 GACGG AATTT GCAAA AAGTA TTCCG TCCTT TAGCT CTCTG TTCCT GAATG ATCAA
331 GTCAC CCTGC TGAAA TACGG CGTGC TGGAA GCAAT GATGG CTATG TGGGC GAGCA
386 TCGTT AACAA GGACG GTTTT CTGGT CGCCA ATGGC TCTGG TTTTG TGACC CGTGA
441 ATTTT TCGCT TCACT GCGCA AAGTT TTCTC GGATA TTATG GAACC GGCTT TTGAA
496 TTTGC GGTCA AGTTT AACGC CCTGG AACTG GATGA CAGCG ATCTG GCACT GTTCA
551 TCGCG GCCAT TATCC TGTGT GGCGA CCGTC CGGGT CTGAT GAACG TTCCG CGCGT
606 CGAAG CTATT CAGGA CACGA TCCTG CGCGC GCTGG AATTT CATCT GCAAG CCAAT
661 CACCC GGATG CACAA TACCT GTTTC CGAAA CTGCT GCAAA AGATG GCGGA CCTGC
716 GTCAA CTGGT GACCG AACTG GCTCA GATGT GGCAA CGCGC GAAAA AGACC GAAAC
771 GAAAA CCAGC TTTCA CCCGC TGCTG CAAGA AATCT ATAAA GATAT GTACT AACTC
826 GAG

EL03

1 CCATG GGCAA GCTGT CGGGT GTTGA ACTGC GTCGC GTCCA GATGC CGCTG GTTGC
56 GCCGT TTCGC CTGAG TCATG GTACG ATGTC GGTGA AGGAA CTGCT GCTGC TGCCT
111 GCTGT GACCC CGGCG GGC GA AGGTT GGGGT GAATG CATGA CGGCG GCCGG CCCGT
166 GGTAT AGCTC TGAAT ACAAC GACGG TGCAG AACAT GTTCT GCGTC ACTAT CTGAT
221 TCCGG CGCTG CTGGC AGCTG AAGAT ATTAC CGCGG CAAA GTCAC GCCGC TGCTG
276 GCAAA ATTTA AGGGC CATCG CATGG CCAAG GGTGC ACTGG AAATG GCCGT GCTGG
331 ACGCA GAACT GCGTG CTCAC GAACG CAGTT TCGCA GCTGA ACTGG GCAGC GTCCG
386 TGATT CTGTG CCGTG TGGCG TCTCC GTGGG TATTA TGGAT ACCAT CCCGC AACTG
441 CTGGA CGTGG TTGGC GGTTA TCTGG ATGAA GGCTA CGTTC GTATT AAATG GGCCA
496 TCGAA CCGGG TTGGG ACGTT GAACC GGTCC GCGCA GTGCG TGAAC GCTTT GCGCA
551 TGACG TTCTG CTGCA AGTCG ATGCT AACAC CGCGT ACACG CTGGG TGACG CACCG
606 CAACT GGCAC GTCTG GACCC GTTCG GTCTG CTGCT GATTG AACAG CCGCT GGAAG
661 AAGAA GATGT GCTGG GTCAT GCCGA ACTGG CACGT CGCAT TCAA CCCC ATCTG
716 CCTGG ACGAA TCAAT TGTTT CGGCG CGTGC GGC GG CGGAT GCAAT CAAAC TGGGC
771 GCTGT TCAGA TTGTC AATAT CAAGC CGGGT CGCGT TGGCG GTTAT CTGGA AGCCC
826 GTCGC GTGCA TGATG TTTGC GCTGC GCACG GCATT CCGGT CTGGT GTGGC GGTAT
881 GGAAG AAACC GGTCT GGGTC GTGCA GCAAA CGTGG CTCTG GCGAG CCTGC CGAAT
936 TTTAC CCTGC CGGGT GATAC GAGTG CGTCC GACCG CTTTT ACAA ACCGA TATTA
991 CGGAA CCGTT CGTCC TGTCT GGC GG TCACC TGCCG GTGCC GACGG GTCCG GGCCT
1046 GGGTG TTGCA CCGAT TCCGG AACTG CTGGA TGAAG TGACC ACGGC CAAGG TTTGG
1101 ATCGG TAGCC TCGAG

EL04

1 CATAT GGTGC GTGGT CAGGT TTTTG ACGTT GGTCC GCGTT ACACG AATCT GTCAT
56 ACTTT GGCGA AGGTG CATA C GGCAT GGTTT GTTCA GCATA TGATA ACGTG AATAA
111 AGTGC GTGTT TACAT TAAAA AGATC AGTCC GTTTG AACAT CAGAC CTATT GCCAA
166 CGTAC GCTGC GCGAA ATTAA AATCC TGCTG CGTTT CCGCC ACGAA AACAT TATCG
221 GCATT AATGA CATT TCCGT GCGCC GACCA TCGAA CAGAT GAAAG ATGTC TATAT
276 TGTGC AAGAC CTGAT GAAAA CCGAT CTGTA CAAGC TGCTG AAAAC GCAGC ATCTG
331 TCTAA TGACC ACATT TGTTA TTTTC TGTAC CAAAT CCTGC GTGGT CTGAA GTATA
386 TTCAT TCAGC CAATG TCCTG CACCG CGATC TGTAC CCGAG CACCC TGCTG CTGAA
441 CACCA CGTGC GACCT GAAAA TCTGT GATTT TGGCC TGGCG CGTGT TGCCG ATCCG
496 GACCA TGATC ACACC GGTTT CCTGA CGGAA TATGT CGCGA CCCGT TGGTA TCGTG
551 CGCCG GAAAT TATGC TGAAC AGTAA GGGCT ATACG AAAAG TATTG ATATT TGGTC
606 CGTTG GTTGC ATCCT GGCAG AAATG CTGTC CAATC GCCCG ATTTT TCCGG GCAAA
661 CATT CCTGG ACCAG CTGAA CCACA TTCTG GGCAT CCTGG GTAGC CCGTC TCAGG
716 AAGAC CTGAA CTGTA TCATC AACCT GAAGG CTCGT AACTA TCTGC TGAGC CTGCC
771 GCATA AAAAC AAGGT GCCGT GGAAT CGCCT GTTTC CGAAC GCAGA TTCTA AGGCT
826 CTGGA CCTGC TGGAT AAAAT GCTGA CCTTC AACCC GCATA AACGT ATCGA AGTTG
881 AACAG GCGCT GGCCC ACCCG TATCT GGAAC AATAT TACGA CCCGT CAGAT GAACC
936 GATTG CAGAA GCTCC GTTTA AATTC GATAT GGAAC TGGAT GACCT GCCGA AGGAA
991 AAGCT GAAGG AACTG ATCTT CGAAG AAACG GCGCG TTTCC AGCCG GGTTA CCGCT
1046 CGTAA CTCGA G

EL05

1 CATAT GGAAG ACAGT GAAAC GGCAG ACCTG AAGAG CCTGG CGAAA CGCAT TTACG
56 AAGCC TACCT GAAGA ACTTT AACAT GAATA AGGTG AAGGC ACGTG TTATT CTGTC
111 AGGCA AAGCG AGCAA CAATC CGCCG TTTGT CATCC ACGAT ATGGA AACCC TGTGC
166 ATGGC AGAAA AAACG CTGGT TGCAA AGCTG GTCGC TAACG GTATT CAGAA TAAAG
221 AAGCT GAAGT GCGCA TCACC CATTG CTGGG CATGT ACGGC TGTCG AAACC GTGAC
276 GGAAC TGACC GAATT TGCGA AGGCC ATTCC GGGCT TCGCG AACCT GGATC TGAAT
331 GACCA AGTGA CGCTG CTGAA ATATG GTGTT CTGGA AGCGG CGATG GCGAT GTGGA
386 GCAGC GTGAT GAACA AGGAT GGCAT GCTGG TTGCG TATGG CAATG GTTTT ATTAC
441 CCGTG AATTT CTGAA ATCCC TGCGC AAGGG TTTCT GTGAT ATTGC CGAAC CGGTC
496 TTTGA CTTCG CGATG AAATT TAACG CCCTG GAACT GGATG ACAGT GATAT TTCCC
551 TGTTT GTGGC AGCTA TTATC TGCTG TGGCG ACCGT CCGGG TCTGC TGAAC GTTGG
606 CCACA TTGAA AAAAT GCAGG AAGGT ATCGT GCATG TTCTG CGCCT GCACC TGCAA
661 AGCAA TCATC CGGAT GACAT CTTTC TGTTT CCGAA ACTGC TGCAA AAGAT GCGCG
716 ATCTG CGTCA ACTGG TTACC GAACA CGCGC AGATG GCCCA AATTC TGAAA AAGAC
771 GGAAT CTGAT ATGGC CATGC ATCCG CTGCT GCAAG AAATC TATCG CGACA TGTAC
826 TAACT CGAG

EL06

1 CCATG GGCAA GATTC TGGTG ATTCA AGGTC CGTTT ACCAA TATGC TGGGC CACCG
56 TGACC CGCGC CTGTT CGGCA TGGTT ACCCT GGATC AGATT CATGA AATCA TGCAG
111 ACCTT TGTCA AACAA GGCAA CCTGG ATGTG GAACT GGAAT TTTTC CAGAC GAACT
166 TCGAA GGTGA AATCA TCGAT AAGAT CCAAG AAAGC GTGGG CTCTG ACTAT GAAGG
221 TATTA TCATT CAGCC GGGTG CGTTT AGTCA TACCA GCATC GCAAT TGCTG ACGCG
276 ATCAT GCTGG CAGGT AAACC GGTGA TCGAA GTTCA CCTGA CCAAC ATTCA GCGCG
331 GTGAA GAATT TCTGA AGAAT AGCTA TACGG GTGCA GCATG CGGCG GTGTT ATCAT
386 GGGCT TCGGT CCGCT GGGTT ACAAC ATGGC CCTGA TGGCA ATGGT CAATA TTCTG
441 GCTGA AATGA AAGCG TTCCA GGAAG CCCAA AAGAA CAATC CGAAC GGCAG CCTCG
496 AG

EL07

1 CATAT GCCGC AAGTC GCAGA CCTGA AAGCA TTTAG CAAGC ACATC TATAA CGCCT
56 ACCTG AAGAA CTTTA ACATG ACGAA GAAGA AAGCC CGTAG CATTG TGACG GGCAA
111 AGCCT CTCAT ACCGC ACCGT TTGTT ATTCA CGATA TTGAA ACCCT GTGGC AGGCT
166 GAAAA AGGCC TGGTG TGGAA GCAAC TGGTT AACGG TCTGC CGCCG TACAA GGAAA
221 TTAGC GTGCA TGTGT TTTAT CGTGT CCAGT GCACC ACGGT CGAAA CGGTG CGCGA
276 ACTGA CCGAA TTTGC CAAGA GTATC CCGTC CTTTA GCTCT CTGTT CCTGA ATGAT
331 CAAGT CACGC TGCTG AAATA TGGCG TGCAC GAAGC ATACT TTGCT ATGCT GGCGA
386 GTATT GTTAA CAAGG ACGGT CTGCT GGTCG CGAAT GGCTC CGGTT TTGTG ACCCG
441 TGAAT TTCTG CGTTC ACTGC GCAAA CCGTT CTCGG ATATT ATCGA ACCGA AGTTC
496 GAATT TGCTG TTAAG TTCAA CGCGC TGGAA CTGGA TGACA GCGAT CTGGC GCTGT
551 TCATC GCGGC CATTG TCCTG TGTGG CGACC GTCCG GGTCT GATGA ACGTT CCGCG
606 CGTCG AAGCT ATTCA GGACA CGATC CTGCG CGCGC TGGAA TTTCA TCTGC AAGCC
661 AATCA CCCGG ATGCA CAATA CCTGT TTCCG AAAGT GCTGC AAAAG ATGGC CGACC
716 TCGGT CAACT GGTGA CCGAA CATGC ACAGA TGCTG CAACG CATTG AAAAG ACCGA
771 AACGG AAACC TCTCT GCACC CGCTG GGTCA GGAAA TCTAT AAAGA TATGT ACTAA
826 CTCGA G

EL08

1 CATAT GGCCG AAATC TCAAG CGACA TCGAC CAACT GAACC CGGAA AGTGC GGACC
56 TGCGT GCCCT GGCGA AGCAT CTGTA CGACA GCTAC ATCAA ATCAT TTCCG CTGAC
111 CAAAG CGAAG GCCCG TGCAA TCCTG ACGGG CAAGA CCACG GATAA AAGTC CGTTT
166 GTGAT TTATG ACATG AACTC CCTGA TGATG GGTGA AGATA AGATC AAGTT CAAGC
221 ATATC ACCCC GCTGC AAGAA CAATC GAAAG AAGTT GCGAT CCGTA TTACG CAGGG
276 CCTGC AATTT CGCAG TGTCG AAGCT GTGCA GGAAA TCACC GAATA TGCGA AATCC
331 ATTCC GGGCT TCGTC AACCT GGATC TGAAT GACCA GGTGA CCCTG CTGAA GTACG
386 GTGTG GTTGA AATTA TCATT ACGAT GATGG CGTCA CTGAT GAACA AAGAT GGCAT
441 GCTGA TCTCG GAAGG CCAGG GTTTT ATGAC CCGTG AATTT CTGAA GAGTC TGCGC
496 AAACC GTTTG GCGAC CTGTT TGAAC CGGTG TTTGA ATTTG CCGTT AAATT TAATG
551 CACTG GAACT GGATG ACAGC GATCT GGCTA TCTTC ATTGC GGTTA TCATT CTGTC
606 TGGCG ACCGT CCGGG TCTGC TGAAC GTCAA GCCGA TCGAA GATAT TCAGG ACAAC
661 CTGCT GCAAG CGCTG GAACT GCAAC TGAAA CTGAA TCATC CGGAA AGCTC TCAAC
716 TGTTT GCAAA GCTGC TGCAA AAAAT GACCG ATCTG CGCCA AATCG TTACG GAACT
771 GGTCC AGATG ATGCA AGTGA TTA AAAGAC CGAAA CGGAT ATGTC TTTCC ACCCG
826 CTGCT GCAAG AAATT TACAA AGACC TGTA CTCTCGA G

EL09

1 CATAT GGAAA AGCGT AAGAT CATTG TGGAC TCGCA TCCGG GTCAC GACGA CGCTA
56 TTGCG ATTAT GATGG CGGCG AAGCA TCCGG CGATT GACCT GCTGG GTATT ACCAT
111 CGTCG CCGGC AACCA GACGC TGGAT AAAAC CCTGA TTAAC GGTCT GAATG TTTGC
166 CAAAA GCTGG AAATC AATGT CCCGG TGTAT GCCGG TATGC CGCAG CCGAT TATGC
221 GTCAG CAAAT CGTCG CCGAT ACCAC GCATG GCGAT ACCGG TCTGG ACGGT CCGGT
276 GTTCG AACCG CTGAC GCGCC AAGCA GAAAG CACCC ACGCT GTTAA ATACA TTATC
331 GACAC GCTGA TGGCA AGCGA TGGTG ACATT ACCCT GGTTC CGGTC GGCCC GCTGT
386 CTAAC ATTGC AGTGG CTATG CGTAT GCAGC CGGCA ATCCT GCCGA AGATT CGCGA
441 AATCG TTCTG ATGGG CGGTG CTTAT GGCAC GGGTA ACTTC ACCCC GTCAG CGGAA
496 TTTAA TATCT TCGCC GATCC GGAAG CGGCC CGTGT GGTTT TTACC TCGGG TGTGC
551 CGCTG GTTAT GATGG GCCTG GATCT GACCA ACCAA ACGGT TTGCA CCCC GACGT
606 CATTG CACGT ATGGA ACGTG CGGGC GGTCC GGCCG GTGAA CTGTT TAGTG ATATT
661 ATGAA CTTCA CGCTG AAGAC CTAAT TTGAA TCCCT GGGTC TGGCA GGCCG TCCGG
716 TGCAT GATGC TACGT GTATT GGTTA CCTGA TCAAC CCGGA CGGCA TTAAG ACCCA
771 GGAAA TGTAT GTGGA AGTTG ATGTC AATAG TGGTC CGTGC TACGG CCGTA CGGTG
826 TGTGA CGAAC TGGGT GTTCT GGGCA AACCG GCCAA TACCA AAGTG GGTAT TACGA
881 TCGAT ACCGA CTGGT TTTGG GGTCT GGTCG AAGAA TGTGT GCGCG GCTAC ATTAA
936 AACCC ACCTG TAACT CGAG

EL10

1 CCATG GGCTC TGCCC TGCCG ATTCT GCTGG ACTGC GCGCC GGGTC ACGAC GATGC
56 GATTG CGATT GTGCT GGCCC TGGCT TCACC GGAAC TGGAT GTGAA AGCTA TCACC
111 AGCTC TGCGG GCAAC CAGAC CCCGG AAAAG ACGCT GCGTA ATGTT CTGCG CATGC
166 TGACG CTGCT GAACC GTACC GACAT TCCGG TGGCC GCGCG TGCAG TTAAA CCGCT
221 GATGC GCGAA CTGAT TATCG CCGAT AATGT TCATG GCGAA AGCGG TCTGG ACGGT
276 CCGGC TCTGC CGGAA CCGAC GTTTG CGCCG CAGAA CTGCA CCGCC GTGGA ACTGA
331 TGGCA AAAAC GCTGC GTGAA TCAGC AGAAC CGGTC ACCAT TGTGA GCACC GGTCC
386 GCAAA CCAAC GTTGC GCTGC TGCTG AATAG TCATC CGGAA CTGCA CTCCA AGATC
441 GCTCG CATTG TCATC AGTGG CGGTG CGATG GGCCT GGGTA ACTGG ACCCC GCGCG
496 CGGCG TTTAA TATTT ACGTC GATCC GGAAG CTGCG GAAAT TGTGT TCCAG TCCGG
551 CATCC CGGTG GTTAT GGCCG GTCTG GATGT CGTGC ATAAA GCACA AATCC ACGTT
606 GAAGA CACGG AACGT TTTCG CGCGA TTGGC AATCC GGTTA GCACC ATCGT CGCCG
661 AACTG CTGGA TTTCT TTCTG GAATA TCACA AAGAC GAAAA GTGGG GTTTT GTCGG
716 CGCTC CGCTG TTCAG CCCGT GTACC ATTGC ATGGC TGCTG AAGCC GGAAC TGTTT
771 ACGTC TGTGG AACGT TGGGT GGGTG TTGAA ACCCA GGGCA AATAC ACGCA GGGTA
826 TGACC GTTGT CGATT ATTAC TATCT GACGG GTAAC AAGCC GAATG CGACC GTCAT
881 GGTGG ATGTT GACCG TCAGG GCTTT GTGGA TCTGC TGGCC GACCG CCTGA AATTC
936 TATGC AGGTT CTCTC GAG

EL11

1 CATAT GGAAT CGGCG GACCT GCGTG CCCTG GCGAA ACACC TGTAC GATAG CTACA
56 TCAAG TCGTT CCCGC TGACG AAAGC CAAGG CCCGT GCGAT TCTGA CCGGC AAGAC
111 CACGG ATAAA TCACC GTTTG TCATC TATGA CATGA ACTCG CTGAT GATGG GTGAA
166 GATAA GATCA AGTTC AAGCA TATCA CCCC GCTGCA AGAAC AAAGC AAAGA AGTGG
221 CAATT CGTAT TCTGC AATAT CTGCA ATTTT GCAGT GTGGA AGCGG TTCAG GAAAT
276 TACGG AATAC GCCAA ATCCA TTCCG GGCTT CGTTA ACCTG GATCT GAATG ACCAG
331 GTTAC CCTGC TGAAG TACGG TGTCC ACGAA ATTAT GATGA CGATG AGTGC CTCCC
386 TGATG AACAA AGATG GCGTC CTGAT CAGCG AAGGC CAGGG TTTTA TGACC CGTGA
441 ATTTT TGAAG TCTCT GCGCA AACCG TTTGG TGATT TCATG GAACC GATGT TCGAA
496 TTTGC AGTGA AGTTC AACGC TCTGG AACTG GATGA CAGCG ATCTG GCGAT TTTCA
551 TCGCC GTGAT TATCC TGTCT GGCGA CCGTC CGGGT CTGCT GAACG TTAAG CCGAT
606 TGAAG ATATT CAGGA CAACC TGCTG CAAGC GCTGG AACTG CAACT GAAAC TGAAT
661 CATCC GGAAA GCTCT CAACT GTTTG CTAAG CTGCT GCAAA AAATG ACCGA TCTGC
716 GCCAA ATTGT CACGG AACAC GTGCA GATGC TGCAA GTTCT GAAAA AGACC GAAAC
771 GGATA TGCAT CCGCA CCCGC TGTTT CAGGA AATTT ATAAA GACCT GTACT AACTC
826 GAG

EL12

1 CATAT GGC GG AAATC AGCAG CGACA TTGAC CAACT GAACC CGGAA AGTGC GGACC
56 TCGCT GCCCT GGCGA AGCAT CTGTA CGATA GCTAC ATTAA ATCTT TTCCG CTGAC
111 CAAAG CGAAG GCCCG TGCAA TTCTG ACGGG CAAGA CCACG GATAA ATCAC CGTTT
166 GTCAT CTATG ACATG AACTC GCTGA TGATG GGTGA AGATA AGATC AAGTT CAAGC
221 ATATC ACCCC GCTGC AAGAA CAATC TAAAG AAGTG GCTAT TCGCA TCGCG CAGGG
276 CTTTC AATTC TGGTA TGTGG AAGCC GTTCA GGAAA TTACC GAATA CGCAA AATCA
331 ATTCC GGGCT TTGTT AACCT GGATC TGAAT GACCA GGTCA CCCTG CTGAA GTATG
386 GTGCT TCGGA AATTG TTTAC ACGAT GAGTG CGTCC CGTAT GAACA AAGAT GGCAC
441 CCTGA TCAGT GAAGG CCAGG GTTTT ATGAC CCGTG AATTT CTGAA GTCCC TGC GC
496 AAACC GTTCG GTGAT CTGAT GGAAC CGGCC TTTGA ATTTG CAGTC AAATT TAATG
551 CGCTG GAACT GGATG ACAGC GATCT GGCTA TTTTC ATCGC GGTGA TTATC CTGTC
606 TGGCG ACCGT CCGGG TCTGC TGAAC GTTAA GCCGA TTGAA GATAT TCAGG ACAAC
661 CTGCT GCAAG CGCTG GAACT GCAAC TGAAA CTGAA TCACC CGGAA AGCTC TCAAC
716 TGTTT GCAAA GCTGC TGCAA AAAAT GACCG ATCTG CGCCA AATTG TCACG GAACA
771 TGTGC AGCTG CTGCA AGTGA TCAAA AAGAC CGAAA CGGAT ATGTC ACTGC ACCCG
826 CTGGC CCAGG AAATT TATAA AGACC TGTAC TAACT CGAG

EL13

1 CCATG GGCAG CGAAC TGATC GTCAA CGTCA TCAAC GGTCC GGGTA TGGGT ATGCT
56 GGGCA AGCGC GAACC GGCAA TCTAC GGCGG CACCA CGCAC GACGA ACTGG TCGCG
111 CTGAT CGAAC GTGAA GCGGC CGAAC TGGGC CTGAA AGCGG TGGTT CGCCA GAGCG
166 ATTCT GAAGC CCAAC TGCTG GACTG GATTC ATCAG GCAGC TGATG CGGCC GAACC
221 GGTTA TTCTG AACGC AGGTG CTCTG ACCTT TACGA GCGTC GCACT GCGTG ATGCA
276 TGCGC AGAAC TGTC A GCTCC GCTGA TTGAA GTGCA TATTT CGAAT ATCCA CGCCC
331 GCGAA GAATT TCGTC GCCAT AGTTA TCTGT CCCC G ATTGC AACCG GCGTC ATCGT
386 GGGTC TGGGT ATTCA AGGTT ATCTG CTGGC ACTGC GTTAC CTGGC TGAAC ACGTT
441 GGCAC GGGTA GTCTC GAG

EL14

1 CCATG GTGCG TGGCC AAGTG TTTGA CGTGG GTCCG CGCTA TACCA ACCTG AGCTA
56 CATCG GTGAA GGTGC AGCAG GCATG ATTTG TTCGG CTTAT GATAA CGTGA ATAAA
111 GTGCG TGTTG CAATT AAAAA GATCA GCCCG TTTGA ACATC AGACC TACTG CCAAC
166 GTACG CTGCG CGAAA TTAAT ATCCT GCTGC GTTTC CGCCA CGAAA ACATT ATCGG
221 CATCA ATGAC ATTAT CCGCG CTCCG ACCAT CGAAC AGATG AAAGA CGTCT ATATT
276 GTGCA GGATC TGATG GAAAC CCTGC TGTAC AAGCT GCTGA AAACG CAGCA TCTGT
331 CTAAT GATCA CATTT GCTAT TTTCT GTACC AAATC CTGCG TGGCC TGAAG TATAT
386 TCATA GCGCA AACGT CCTGC ACCGC GACCT GAAAC CGTCT AACCT GCTGC TGAAT
441 ACCAC GTGTG ATCTG AAGAT TATCG GCTTT GGTCT GGCGC GTGTT GCCGA TCCGG
496 ACCAT GATCA CACCG GTTTC CTGAC GGAAT ATGTC GCGAC CCGTT GGTAT CGTGC
551 GCCGG AAATT ATGCT GAACA GCAAG GGCTA TACGA AATCA ATTGA TATTT GGTCG
606 GTTGG TTGCA TCCTG GCGGA AATGC TGTCG AATCG CCCGA TTTTT CCGGG CAAAC
661 ATTAC CTGGA CCAGC TGAAC CACAT TCTGG GCATC CTGGG TAGCC CGTCT CAGGA
716 AGACC TGAAC TGTAT TATCA ATCTG AAAGC CCGTA ATTAT CTGCT GAGTC TGCCG
771 CATAA AAACA AGGTG CCGTG GAATC GCCTG TTTCC GAACG CAGAT TCCAA GGCTC
826 TGGAC CTGCT GGATA AAATG CTGAC CTTCA ACCCG CATAA ACGTA TCGAA GTTGA
881 ACAGG CGCTG GCCCA CCCGT ATCTG GAACA ATATT ACGAC CCGTC AGATG AACCG
936 ATTGC AGAAG CTCCG TTTAA ATTCG ATATG GAACT GGATG ACCTG CCGAA GGAAA
991 AGCTG AAGGA ACTGA TCTTC GAAGA AACCG CACGT TTCCA GCCGG GCTAC CGCAG
1046 TGGTT CCCTC GAG

Curriculum Vitae

Persönliches

Name: Juliane Stahmer (geb. Weigend)

Nationalität: Deutsch

Geburtsdatum: 16.12.1986 (Halle/Saale, Deutschland)

Hochschul- und Schulbildung

- 11.2011 - 11.2014: **Promotion bei Prof. Dr. Bernhard Hauer, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart**
Dissertation: Studie zur Entwicklung eines neuen Biokatalysators zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen
- 10.2008 – 09.2011: **Diplomstudium Chemie, Universität Stuttgart**
Diplomarbeit: Entwicklung eines neuen metallabhängigen Biokatalysesystems (Gesamtnote: sehr gut)
- 10.2006 – 09.2008: **Studium Chemie, Universität Bremen**
- 08.1993 – 06.2006: **Abitur am Gymnasium Neustadt am Rübenberge**
Elementary School Ames, Iowa, USA (1994-95)
Grundschule Wettin

Praktische Erfahrungen

- 04.2013 – 05.2013: **Forschungsaufenthalt an der University of Washington, Seattle, USA**
In silico Enzymdesign (Kooperation mit Prof. Dr. Baker)
- 10.2010 – 03.2011: **Studentischer Mitarbeiter im Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart**
Ortsgerichtete Evolution der *Candida antarctica* Lipase B
- 02.2009 – 06.2009: **Studentischer Mitarbeiter im Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart**
Erlernen der Enzymherstellung und -charakterisierung
- 04.2008 – 07.2008: **Studentischer Mitarbeiter im Institut für Werkstofftechnik, Universität Bremen**
Sol-Gel Beschichtungen zum Schutz vor Korrosion von Stahl oder Nickel
- 06.2007 – 03.2008: **Studentischer Mitarbeiter bei Biolog Life Science Inst., Bremen**
Inventarisierung von Chemikalien und Geräten
- 05.2006 – 06.2006: **Praktikum in der Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit, Friedrich Löffler Institut, Mariensee**
Techniken zur flowzytometrischen Spermientrennung von landwirtschaftlichen Nutztieren