

**Biokatalyse *chemisch* betrachtet:  
Fallstudien aus der technischen- und aus  
der Labor-Synthese**

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

Vorgelegt von  
**Sebastian A. Löw**  
aus Waiblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Mitberichter: Prof. Dr. René Peters

Vorsitzender: Prof. Dr. Elias Klemm

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2015

**Institut für Technische Biochemie**

**2015**



## **Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Biokatalyse *chemisch* betrachtet: Fallstudien aus der technischen und aus der Labor-Synthese“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

## **Declaration of Authorship**

I hereby certify that the dissertation entitled „Biocatalysis from a chemical point of view: Case studies of technical and laboratory scale syntheses“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 11. Dezember 2015

---

Sebastian Löw

# Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am im Zeitraum vom September 2011 bis Juli 2015 am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart angefertigt.

Ich möchte mich zuerst besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Hauer dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat meine Arbeit durchzuführen sowie für die Betreuung und die inspirierenden Diskussionen. Bei Dr. Martin Weissenborn bedanke ich mich ganz herzlich für die enge Zusammenarbeit und die stete Motivation durch alle Höhen und Tiefen. Des Weiteren bedanke ich mich auch bei Dr. Bettina Nestl für die Betreuung, die Gespräche und Anregungen. Bei den Studenten Carina Schuler, Stefanie Kummer und Miriam Kuhn bedanke ich mich für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die überaus angenehme Atmosphäre, das gute Arbeitsklima und die vielen Diskussionen, Gespräche und schönen Erlebnisse.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Frau Isabell und meiner Familie bedanken ohne deren bedingungslosen Rückhalt und permanente Unterstützung ich diese Arbeit nie hätte anfertigen können.

*„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür,  
dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe  
erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden:  
die Begeisterung und die Ehrfurcht.“*

**Max Planck**

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Kurzreferat</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Abstract</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>5</b>  |
| 1.1 Ansatzpunkte für Optimierungen in der Biokatalyse . . . . .                     | 6         |
| 1.2 Charakterisierung des Begriffes „organische“ Herangehensweise . . .             | 8         |
| 1.2.1 Die Synthese . . . . .  | 8         |
| 1.2.2 Der Reaktionsmechanismus - Variation der Substituenten . . .                  | 9         |
| 1.2.3 Katalyse - Variation der Substrate . . . . .                                  | 10        |
| 1.3 Rifamycine . . . . .  | 12        |
| 1.4 Synthetische Nicotinamid-Cofaktoren . . . . .                                   | 16        |
| 1.5 Enzym-katalysierte Carbenreaktionen . . . . .                                   | 23        |
| 1.5.1 Porphyrin . . . . .   | 23        |
| 1.5.2 Diazoverbindungen . . . . .   | 25        |
| 1.5.3 Metall-Porphyrin-katalysierte Reaktionen mit Diazoverbin-<br>dungen . . . . . | 26        |
| 1.5.4 Enzym-katalysierte Reaktionen mit Diazoverbindungen . . .                     | 27        |
| 1.5.5 Weitere Reaktionen mit Diazoverbindungen . . . . .                            | 28        |
| <b>3 Material und Methoden</b>  | <b>33</b> |
| 3.1 Chemikalien . . . . .   | 33        |
| 3.2 Analytische Methoden . . . . .  | 33        |
| 3.2.1 Gaschromatographie . . . . .  | 33        |
| 3.2.2 Flüssigchromatographie . . . . .  | 34        |
| 3.2.3 NMR . . . . .   | 34        |
| 3.3 Molekularbiologische Methoden . . . . .   | 34        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .  | 34 |
| 3.3.2 | Kultivierung von <i>E. coli</i> . . . . .   | 35 |
| 3.3.3 | Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) . . . . .  | 35 |
| 3.3.4 | Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .   | 36 |
| 3.3.5 | Proteinaufreinigung mittels His GraviTrap TALON Säulen .  | 36 |
| 3.3.6 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .   | 37 |
| 3.4   | Rifamycin . . . . .   | 38 |
| 3.4.1 | Generelle Probenvorbereitung . . . . .  | 38 |
| 3.4.2 | Versuchsdurchführungen . . . . .  | 38 |
| 3.5   | Synthetische Nicotinamid Cofaktoren . . . . .   | 41 |
| 3.5.1 | Synthesen . . . . .   | 41 |
| 3.5.2 | Cyclovoltammetrische Potentialbestimmungen . . . . .  | 45 |
| 3.5.3 | Biotransformationen: Initiales Screening . . . . .  | 45 |
| 3.5.4 | Untersuchung des Substrat- und Enzymspektrums der syn-<br>thetischen Cofaktoren . . . . .                   | 47 |
| 3.5.5 | Kinetische Betrachtung von NAPH im direkten Vergleich zu<br>NADH . . . . .                                  | 47 |
| 3.6   | Carbenreaktionen . . . . .  | 48 |
| 3.6.1 | Substratspektrum der NH-Insertion . . . . .   | 48 |
| 3.6.2 | Kontroll-Experimente . . . . .  | 49 |
| 3.6.3 | Aufreinigung 1 . . . . .  | 52 |
| 3.6.4 | Aufreinigung 2 . . . . .  | 53 |
| 3.6.5 | Evaluation der sequenzierten Proteine . . . . .   | 55 |
| 3.6.6 | Charakterisierung von YfeX als Katalysator der triphe-<br>nylphosphinfreien Carbonyl-Olefinierung . . . . . | 55 |
| 3.6.7 | Vergleich potentieller Katalysatoren der Triphenylphosphin<br>beinhaltenden Carbonyl-Olefinierung . . . . . | 57 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>58</b> |
| 4.1      | Rifamycine . . . . .   | 58        |
| 4.1.1    | Geeignetes Oxidationsmittel . . . . .  | 58        |
| 4.1.2    | Geeignete Methanol-Konzentration . . . . .   | 59        |
| 4.1.3    | Zeitverlauf . . . . .  | 60        |
| 4.1.4    | Hohe Methanol-Konzentration . . . . .  | 61        |
| 4.1.5    | Reaktion in reinem Methanol . . . . .  | 62        |
| 4.2      | Nicotinamid-Cofaktoren . . . . .   | 65        |
| 4.2.1    | Potentiale der synthetisierten Cofaktoren . . . . .  | 65        |
| 4.2.2    | Initiales Aktivitätsscreening . . . . .  | 66        |
| 4.2.3    | Untersuchung des Substrat- und Enzymspektrums der syn-<br>thetischen Cofaktoren . . . . .                                      | 74        |
| 4.2.4    | Kinetische Betrachtung von NAPH im Vergleich zu NADH .   | 79        |
| 4.3      | Enzymkatalysierte Carbenreaktionen . . . . .   | 85        |
| 4.3.1    | Substratspektrum der NH-Insertion . . . . .  | 85        |
| 4.3.2    | Kontrollen . . . . .   | 93        |
| 4.3.3    | Strategie zur Identifikation des neuen Katalysators . . . . .  | 94        |
| 4.3.4    | Proteinaufreinigung Teil 1 . . . . .   | 96        |
| 4.3.5    | Proteinaufreinigung Teil 2 . . . . .   | 102       |
| 4.3.6    | Evaluation der sequenzierten Proteine . . . . .  | 108       |
| 4.3.7    | Identifikation weiterer Katalysatoren . . . . .  | 110       |
| 4.3.8    | Charakterisierung von YfeX als Katalysator der Protein-<br>katalysierten NH-Insertion mit $\alpha$ -Methylbenzylamin . . . . . | 113       |
| 4.3.9    | Charakterisierung von YfeX als Katalysator der Protein-<br>katalysierten Carbonyl-Olefinierung . . . . .                       | 116       |
| 4.3.10   | Vergleich potentieller Katalysatoren der Triphenylphosphin<br>beinhaltenden Carbonyl-Olefinierung . . . . .                    | 120       |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>122</b> |
| 5.1      | Rifamycin . . . . .   | 122        |
| 5.1.1    | Reaktionsoptimierung . . . . .  | 122        |
| 5.1.2    | Reaktion in reinem Methanol . . . . .   | 123        |
| 5.1.3    | Prozesse . . . . .  | 123        |
| 5.2      | Nicotinamid Cofaktoren . . . . .  | 126        |
| 5.2.1    | Hammett-Plot . . . . .  | 126        |
| 5.2.2    | Initiales Screening . . . . .   | 129        |
| 5.2.3    | Proportionalitätsfaktor . . . . .   | 130        |
| 5.2.4    | Kinetische Betrachtungen des Cofaktoreinflusses . . . . .   | 133        |
| 5.3      | Enzymkatalysierte Carbenreaktionen . . . . .  | 135        |
| 5.3.1    | Substratspektrum der <i>E. coli</i> katalysierten Carben-Reaktion                                     | 135        |
| 5.3.2    | Bewertung der Substrate NH-Insertion nach Hammett . . .   | 136        |
| 5.3.3    | Carbonyl-Olefinierung . . . . .   | 138        |
| 5.3.4    | Kontrollen und Aufreinigung . . . . .   | 140        |
| 5.3.5    | Identifikation und Evaluation aktiver Proteine . . . . .  | 141        |
| 5.3.6    | Charakterisierung der von Yfex katalysierten NH-Insertion<br>mit $\alpha$ -Methylbenzylamin . . . . . | 142        |
| 5.3.7    | Charakterisierung der von Yfex katalysierten Carbonyl Ole-<br>finierung . . . . .                     | 143        |
| 5.3.8    | Mechanistische Betrachtungen der Protein katalysierten<br>Carbonyl-Olefinierung . . . . .             | 144        |
| <b>6</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>148</b> |



# Abkürzungsverzeichnis

| <b>Abkürzung</b> | <b>Bedeutung</b>  |
|------------------|---|
| ACN              | Acetonitril   |
| ADH              | Alkoholdehydrogenase  |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat  |
| BA               | Benzaldehyd   |
| BSTFA            | N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid  |
| CV               | Cyclovoltammetrie   |
| DAD              | Diodenarraydetektor   |
| DEAE             | Diethylaminoethylcellulose  |
| DMF              | Dimethylformamid  |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid  |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure  |
| DT               | Natriumdithionit  |
| EA               | Ethylacetat   |
| EDA              | Ethyldiazoacetat  |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat  |
| <i>ee</i>        | enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)                                      |
| ERED             | En-Reduktasen   |
| <i>et al.</i>    | et alii, et aliae, et alia (und andere)   |
| FID              | Flammenionisationsdetektor  |
| Gew.-%           | Gewichtsprozent   |
| GC-MS            | Gaschromatographie/Massenspektrometrie  |
| HPLC             | High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HRP              | Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)                                    |

|       |   |
|-------|---|
| IPTG  | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid                      |
| IRED  | Imin-Reduktasen   |
| KPi   | Kaliumphosphatpuffer  |
| LB    | lysogeny broth  |
| LC/MS | Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie                      |
| MBA   | $\alpha$ -Methylbenzylamin                                      |
| MeOH  | Methanol  |
| MR    | Morphinon Reduktase   |
| MTBE  | Methyl- <i>tert</i> -butylether                                 |
| MTO   | Methyltrioxorhenium   |
| MV    | Methylviologen  |
| NADH  | Nicotinamiddinucleotid – und in der reduzierten Form<br>–Hydrid |
| NCR   | NAD(P)H-dependent 2-cyclohexen-1-one reductase                  |
| NMR   | nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)      |
| NP    | Nebenprodukt  |
| OYE   | Old yellow enzyme   |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                 |
| porph | Prophyrin   |
| rpm   | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)                   |
| SDS   | sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)                   |
| SHE   | Standard-Wasserstoffelektrode                                   |
| TON   | turnover number (Wechselzahl)                                   |
| TRIS  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                 |
| z.B.  | zum Beispiel  |

---

## Kurzreferat

Die Biochemie ist ein vergleichsweise junger Zweig der Chemie, obwohl sie schon seit Jahrtausenden vom Menschen im täglichen Gebrauch eingesetzt wird. Möchte man die Werkzeuge der Biochemie auf aktuelle chemische Fragestellungen anwenden wird die Dominanz der biologischen Sichtweise auf diesem Gebiet deutlich.

In dieser Arbeit wurden biochemische Projekte mit Verbesserungspotential durch organisch chemische Herangehensweise optimiert. Werden bei einer Synthese die sekundären Parameter, z.B. die Nachhaltigkeit oder Reaktionssicherheit, auf Kosten der primären Parameter wie Ausbeute oder Reaktionsdauer verbessert oder leidet die generelle Effektivität einer Reaktion, besteht Handlungsbedarf. Da die biochemische Rifamycin S-Synthese durch die Verwendung eines aufwendigen Oxidationsmittels, der Meerrettichoxidase, zwar nachhaltig aber nicht mehr effizient von statten ging, wurden Alternativen dazu aufgezeigt und optimiert. Die vorgestellte Oxidation von Rifamycin B zu Rifamycin O und dessen direkte Hydrolyse büßte nichts an Effektivität gegenüber dem bestehenden Prozesses ein und gewann dennoch ein hohes Maß an Nachhaltigkeit dazu. In einem weiteren Projekt wurde die biochemische Reduktion aktivierter C=C-Doppelbindungen vom organisch-chemischen Standpunkt aus betrachtet. Für diese Reaktion, basierend auf der Reduktion des Enzym-Flavins durch NADH-Cofaktoren, wurden NADH-analoge Cofaktoren synthetisiert. Die von Hammett beschriebenen Substituenten-Effekte konnten hierbei für das elektrochemische Potential der synthetischen Cofaktoren gezeigt werden. Darüber hinaus konnte ein Cofaktor entwickelt werden mit dem die enzymatische Reduktion zehn Mal schneller als mit dem natürlichen Cofaktor möglich war. Eine weitere Anwendung fand diese Sichtweise bei der Betrachtung enzymatisch katalysierter Carbenreaktionen. Für die NH-Insertion konnte das Substratspektrum deutlich erweitert, sowie gänzlich neue Stoffklassen zur

---

Reaktion gebracht werden. Dabei wurde ein Set neuer *E.coli*-eigener Proteine, die zur Katalyse von Carbenreaktionen geeignet sind, entdeckt. Die wohl bedeutendste Entdeckung dieser Arbeit ist die Protein-unterstützte Carbonyl-Olefinierung mit Carbenen. Die Durchführbarkeit dieser Reaktion mit *E.coli* Proteinen könnte die Grundlage zu einer biologischen und nachhaltigen Anwendung der Wittig-artigen Carbonyl Olefinierung sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine chemisch inspirierte Biologie ebenso interessant ist wie der umgekehrte häufiger angewandte Fall. Für das Feld der synthetischen Biologie ist dies ein wichtiger Fingerzeig für zukünftige Optimierungsansätze.

---

## Abstract

The biochemistry is a comparatively young area in chemistry although it has been used by mankind since centuries. When the tools of biochemistry are applied to current chemical questions the dominant biological view becomes apparent. In this work three case studies of chemical optimisation of biochemical reactions have been made. If a synthesis is made ecologically sustainable but therefore lacks efficiency due to low yield and selectivity, actions have to be taken.

An example is the biochemical production of rifamycin S from rifamycin B. The enzymatic reaction was performed with the enzyme horseradish peroxidase to substitute the non-sustainable industrial reaction with hydrochloric acid in chlorinated solvents. This enzymatic reaction, however, is economically and therefore also ecologically inefficient and therefore not competitive with the current industrial process. Cheaper and readily available oxidation reagents than enzymes have been tested in a process thereby avoiding chlorinated solvents. Within this work I was able to show the oxidation of rifamycin B with ammonia persulfate to rifamycin O and the subsequent hydrolysis to rifamycin S in methanol without the loss of efficiency relative to the currently employed industrial process. In another case study the enzymatic reduction of activated C=C double bonds have been investigated from a chemists point of view. This reaction is based on the reduction of a prosthetic flavin in the active site of the ene-reductase enzyme via the nicotinamide cofactor NADH. The reaction optimisation was realised by the synthesis of several synthetic nicotinamide cofactors to vary the electrochemical potential of these derivatives. It was demonstrated that the substituent effects described by Hammett correlated to the electrochemical potential of the synthetic cofactors. With this strategy a novel cofactor with a tenfold accelerated reaction speed relative to NADH was identified. A third application of the chemical approach was shown

---

for enzyme catalysed carbene reactions. The carbene insertion into NH bonds was limited to aromatic amines using the haem containing enzyme P450. By employing haem-containing proteins from E.coli the substrate scope was broadened for aliphatic NH-insertions as well as O-H-insertions. The probably most significant discovery in this work is the protein supported carbonyl olefination with carbenes. The feasibility of this reaction with E.coli proteins could be the foundation for a biological and sustainable application of the wittig-type carbonyl olefination.

Within the scope of this work it was shown that a chemically inspired biology is an useful approach for the optimisation of processes in for the industrial and lab scale as well as the development of new reactions. For the field of synthetic biology the consideration from this chemical angle could be an important point for future optimisations.

# 1 Einleitung

Die Katalyse chemischer Reaktionen ist eines der spannendsten und faszinierendsten Gebiete der Chemie. Sie hat sowohl Einfluss auf die Grundlagenforschung sowie auf die angewandte und großtechnische Synthese. Die Natur hat in den Jahrmillionen molekularer Evolution beeindruckende Katalysatoren hervorgebracht: die Enzyme. Da hinter jedem katalytischen Prozess ein getrennt zu betrachtender Mechanismus steht sind die Aktivitäten, Produktivitäten und Spezifitäten der Enzyme so unterschiedlich wie ihre Aufgaben und Herkünfte.<sup>1,2</sup> Als ein Beispiel für ein kinetisch perfektes Enzym sei hier die Acetylcholinesterase angeführt, deren geschwindigkeitsbestimmender Schritt die Diffusion der Substrate bzw. Produkte in die Aktive Tasche und wieder heraus ist. Sie kann bis zu 25000 Moleküle pro Sekunden umsetzen und ist daher von evolutionären Gesichtspunkten gesehen nicht mehr zu verbessern<sup>3-5</sup> Dennoch schaffen es Enzyme nur langsam in Laboren und industriellen Reaktoren gängige Katalysatoren zu verdrängen, da es eine Reihe von Nachteilen gibt die dem organischen Synthetiker die Arbeit mit ihnen zunächst verwehren. Zum einen sind sie bedingt durch ihre Herkunft sehr gut wasserlöslich, aber in der Regel in organischen Lösungsmitteln nicht stabil und darin inaktiv.<sup>5,6</sup> Zum anderen haben sie oft eine sehr kleine Toleranz betreffend abweichender Substrate,<sup>7</sup> Temperaturen<sup>8</sup> und pH-Werte<sup>9</sup> weshalb sie als generell empfindlich einzustufen sind. Es gibt eine Vielzahl an erfolgreichen Beispielen die einzelne oder mehrere solcher Nachteile nivelliert haben aber das Verbesserungspotential ist immer noch immens.<sup>10-13</sup>

Um solchen Herausforderungen zu begegnen und Enzyme für die großtechnische Synthese nutzbar zu machen gibt es eine Reihe von Herangehensweisen zur Optimierung von Biokatalysatoren.

### 1.1 Ansatzpunkte für Optimierungen in der Biokatalyse

In dem Übersichts-Artikel „Industrial biocatalysis today and tomorrow“, der 2001 veröffentlicht wurde, beschreiben die Autoren Herausforderungen der Biokatalyse und Möglichkeiten diese anzugehen.<sup>14</sup> In einem System in dem Edukte mittels Biokatalysator und weiteren Reagenzien, wie z.B. Cofaktoren, zu den Produkten umgesetzt werden gibt es in verschiedenen Stadien des Prozesses Optionen zur Optimierung. Die einzelnen Punkte, in der beschriebenen Publikation *the biocatalytic cycle* genannt, sind in Abbildung 1 mit blauer Hinterlegung dargestellt. Beginnend bei der Katalysator Auswahl kann über die Charakterisierung und anschließende Modifizierung derselben erheblicher Einfluss auf die Produktspezifität, Selektivität und die Effektivität genommen werden. Gängige Methoden sind hierbei die Veränderung der Proteinstruktur gefolgt von einem Screening Ansatz aber auch Reaktions-, Wirts- und Prozessoptimierungen werden oftmals eingesetzt. Diese Methoden werden auch auf der Suche nach neuen Reaktionen eingesetzt.<sup>15,16</sup> Befindet sich der Prozess schon im Stadium der Anwendung kann eine Optimierung der Rahmenbedingungen wie Proteinimmobilisierung oder die Verwendung mehrerer Phasen zu einer weiteren Steigerung der Produktivität führen.<sup>17</sup> Die zirkuläre Darstellung verdeutlicht die repetitive Natur dieser Optimierungen, da in einem sehr guten Prozess ein neu gefundenes Protein die Ergebnisse noch übertreffen kann. In diesem Fall kann der Zyklus vom ersten Punkt wiederholt werden. Interessanterweise betrachten die beschriebenen Ansätze den vorliegenden Prozess als „biologisch“, sodass die verwendeten Methoden ebenfalls aus der Sicht eines Biologen gewählt werden. Wird ein Prozess stattdessen mit einer organisch-chemischen Herangehensweise betrachtet entstehen neue Freiheitsgrade. Aus der Sicht eines organischen Synthesechemikers ist ein Enzym zuerst ein sehr aufwendiger Katalysator der in Vergleich mit anderen Katalysatoren gesetzt werden muss; allein



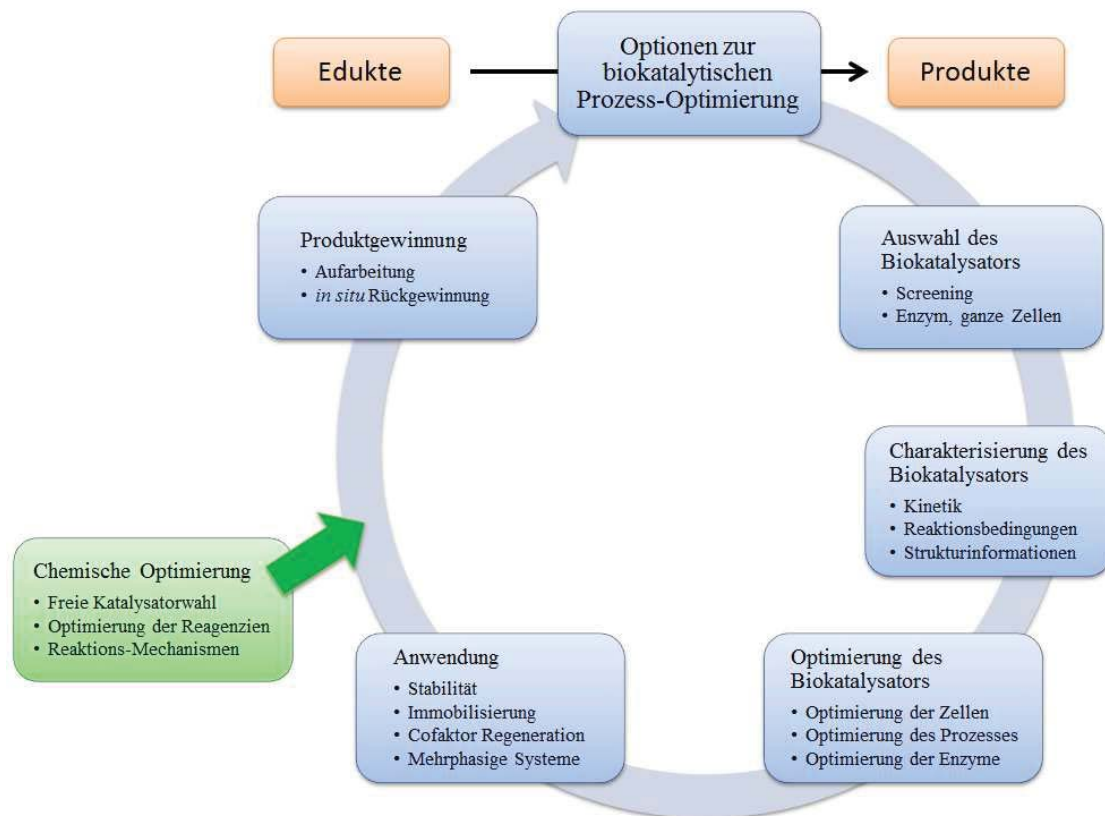


Abbildung 1: Ansatzpunkte für Optimierungen in der Biokatalyse. Modifizierte Version des *the biocatalytic cycle* aus „Industrial biocatalysis today and tomorrow“. <sup>14</sup> Die bekannten Punkte sind in blau hinterlegt. Der neue, chemische Ansatz wurde grün hinterlegt hinzugefügt.

die Verwendung eines Enzyms macht einen Prozess nicht nachhaltig. Wenn z.B. viel Energie für die Enzymproduktion aufgewendet werden muss und die Ausbeute an Produkt gering ist kann es, auch von einem ökologischen Standpunkt aus, sinnvoll sein auf effizientere Metallkomplexe zurückzugreifen. Ein weiterer Ansatzpunkt vom Standpunkt eines Chemikers ist neben der Optimierung des Enzyms die Optimierung der, teilweise in stöchiometrischen Mengen, verwendeten organischen Reagenzien. Die chemische Modifikation der sogenannten Cofaktoren birgt ein großes Potential, das bisher nur wenig ausgeschöpft wurde. Die größte Her-

ausforderung der Biokatalyse ist sicherlich die Entdeckung neuer Reaktivitäten. Während vom biologischen Standpunkt aus, die Enzyme modifiziert werden, bis sie die gewünschte Reaktion katalysieren, kann der Chemiker bei der Betrachtung von Reaktionsmechanismen Ansatzpunkte für neue Reaktionen mit schon existierenden Enzymen finden. Dadurch wird auch hier das Portfolio der zur Verfügung stehenden Methoden vergrößert. Dass diese Herangehensweise sowohl auf schon etablierte, industriell angewandte Prozesse, auf Prozesse im Labormaßstab ebenso wie auf gänzlich neue Reaktionen anwendbar ist, wird in der vorliegenden Arbeit an drei ausgewählten Fallbeispielen aus den angeführten Stadien biochemischer Prozesse gezeigt.

### **1.2 Charakterisierung des Begriffes „organische“ Herangehensweise**

Der Name organische Chemie entstand historisch aus dem damaligen Verständnis, dass organische Substanzen ausschließlich aus Tieren und Pflanzen, anorganische Stoffe dagegen aus Mineralien gewonnen werden könnten.<sup>18</sup> Nach der Entdeckung von Wöhler 1828, dass Ammoniumcyanat, eine typisch anorganische Verbindung, im Labor zu „organischem“ Harnstoff umgesetzt werden kann sind die Grenzen fließend. Geblieben ist der Name und die unterschiedlichen Blickwinkel und Prinzipien der Organik bzw. Anorganik, die exemplarisch in den folgenden Abschnitten aufgezeigt werden.

#### **1.2.1 Die Synthese**

In der organischen Chemie hat die Synthese einen enorm hohen Stellenwert. Die Charakterisierung der erhaltenen Substanzen dient häufig allein der strukturel-

len Identifikation und der Bestimmung der Reinheit. Dieser Umstand lässt sich folgendermaßen erklären: die meisten synthetisierten Verbindungen sind entweder

- Zwischenstufen auf dem Weg zu weiteren komplexeren Molekülen.
- Substrate für die eigentlich zu untersuchende Reaktion oder Katalyse.
- Targets deren Relevanz von anderen Gebieten der Chemie untersucht werden.

Daraus folgt, dass der Erfolg einer Synthese ein Maßstab guter organischer Chemie ist und zahlenmäßig gemessen werden muss. Als bedeutendste Parameter werden üblicherweise die Ausbeute, die erhaltene Reinheit und die Anzahl der benötigten Reaktionsschritte angesehen und wenn möglich der Enantiomerenüberschuss (*ee*, englisch: enantiomeric excess). Des Weiteren, jedoch nicht mit der selben Priorität, wird Wert auf Energieeffizienz, Laborsicherheit und Nachhaltigkeit gelegt. Diese Größen lassen durch ihre Quantifizierung einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Synthesen des gleichen Produktes zu, sind aber aufgrund ihrer subjektiven Wertigkeit nur qualitativ Anwendbar.

### 1.2.2 Der Reaktionsmechanismus - Variation der Substituenten

Der Verlauf organischer Reaktionen über Zwischenprodukte oder -stufen lässt sich modellhaft in Reaktionsmechanismen ausdrücken. Das Verständnis letzterer ist oft beschwerlich und Gegenstand von Diskussionen. Eine Möglichkeit Reaktionsverläufe zu analysieren ist die Variation der angelegten Parameter. Die Wahl des Lösungsmittels, der Temperatur oder Substitution von Resten an den eingesetzten Molekülen führen häufig zu unterschiedlichen Reaktionswegen respektive Produkten. Die daraus resultierenden Erkenntnisse können daraufhin genutzt werden die Reaktion anzupassen oder weiter zu optimieren. Sehr interessante Schlussfolgerungen auf dem Feld des Einflusses aromatischer Substituenten auf die Reaktivität

konnten Hammett *et al.* ziehen. Sie bestimmten experimentell für verschieden Substituenten einen Faktor  $\sigma$  und stellten diesen Faktor in einem Diagramm gegen den Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten graphisch dar.<sup>19</sup> Im idealen Fall, also einer Reaktion die nur von den elektronischen Effekten der Substituenten beeinflusst wird, erhält man einen linearen Zusammenhang nach den Gleichungen:

$$\log(K_{\text{rel}}) = p\sigma \quad (1)$$

und

$$(K_{\text{rel}}) = (K_x/K_H) \quad (2)$$

wobei  $K_x$  die Gleichgewichtskonstante der Reaktion mit Substituent „x“,  $K_H$  die Gleichgewichtskonstante der Reaktion mit Substituent „H“ und  $p$  der Proportionalitätsfaktor des Reaktionssystems ist. Wie in jedem empirischen System können auch hier Abweichungen auftreten, die dann zur Aufklärung des Reaktionsverlaufs genutzt werden können.<sup>20</sup> Dass es möglich ist  $\sigma$  auch mit Potentialen in Relation zu setzen zeigten erstmals Davis *et al.*<sup>21</sup> Sie verwendeten substituierte Tetraphenyl-Porphyrine und erhielten auch hier einen linearen Zusammenhang zwischen  $E_{1/2}$ , dem Redoxpotential des Porphyrins und  $\sigma$ . Da wie schon in der Einleitung angeführt das Redoxpotential eines Cofaktors Einfluss auf die Reaktion nehmen kann bleibt nun die Frage ob sich ein linearer Zusammenhang sowohl für die Paare  $\sigma \leftrightarrow$  Potential als auch für Potential  $\leftrightarrow$  Aktivität nachweisen lässt.

### 1.2.3 Katalyse - Variation der Substrate

Wie zuvor angeführt verlaufen die Reaktionen der organischen Chemie oft anhand einer Reaktionskoordinate nachvollziehbaren Abfolge von Zwischenprodukten. Bei bimolekularen Reaktionen besteht in manchen Fällen der erste Schritt in der Aktivierung des einen Reagenz zu einer reaktiven Zwischenstufe, die dann mit einem

zweiten Reagenz, dem Substrat, umgesetzt werden kann. Geht der Faktor, der zur Aktivierung gebraucht wird, unverändert aus der Reaktion hervor spricht man von Katalyse. Durch Variationen der Substrate können wieder Rückschlüsse auf die Reaktion und deren Mechanismus in Erfahrung gebracht werden. Im Gegensatz zu den unter 1.2.2 behandelten Variationen gehen diese darüber hinaus. Wie unter 4.3 beschrieben sind z.B. durch Eisenporphyrin aktivierte Carbene in der Lage sowohl mit Nucleophilen wie Anilin und Phenol als auch mit Doppelbindungen wie im Styrol zu reagieren. In diesem Beispiel wäre EDA das erste Reagenz, das von Eisenporphyrin - dem Katalysator - aktiviert wird und dann mit einer Palette an Substraten zur Reaktion gebracht wird. Die Tatsache, dass die Zwischenstufe mit so verschiedenen Substrate zur Reaktion gebracht werden kann führte zu einer postulierten Spezies, die allen experimentellen Daten entspricht und chemisch Sinn ergibt:  $\text{Fe}=\text{AcOEt}$  (siehe Abbildung 2).

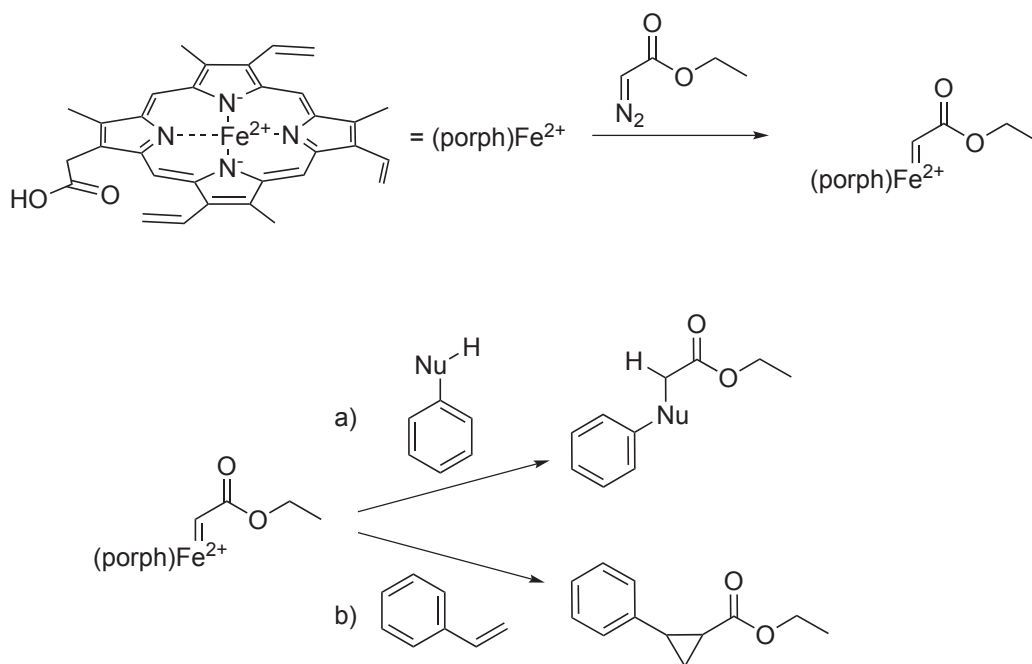


Abbildung 2: Eisen-Porphyrin katalysierte Carben Reaktion mit a) Anilin und b) Styrol.

Somit kann man als weiteres Charakteristikum der organischen Chemie die Rückschlüsse auf Reaktionsmechanismen anhand der stattfindenden Folgereaktionen sehen. Weiterhin ist aber auch der umgekehrte Fall, die gezielte Neuentdeckung von Reaktionen anhand der identifizierten Zwischenstufe charakteristisch.

### 1.3 Rifamycine

Rifamycin S ist ein zentrales Zwischenprodukt bei der Produktion von Ansamycinen,<sup>22</sup> Antibiotika die heute weltweit im Kampf gegen Tuberkulose,<sup>23</sup> Lepra<sup>24</sup> und Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) Erreger<sup>25</sup> eingesetzt werden. Edukt für die Synthese hochwirksamer Rifamycine, wie Rifampicin, Rifabutin und Rifapentin,<sup>26</sup> ist Rifamycin B, das aus *Amycolatopsis rifamycinica* in großen Titern ( $19 \text{ g l}^{-1}$ ) erhalten werden kann.<sup>27</sup> Die Rifamycine wurden Ende der fünfziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts von Sensi *et al.* entdeckt.<sup>28</sup> Interessanterweise wurde die Aktivität zuerst fälschlicherweise Rifamycin B zugeschrieben, das aber durch Metabolisierung im Körper zuerst zu Rifamycin O oxidiert und dann zu dem eigentlich aktiven Rifamycin S hydrolysiert wird. Betrachtet man die großtechnische Synthese gleicht sie der im Körper auftretenden Reaktion. Der erste Schritt ist die Oxidation zu Rifamycin O, durch die Verwendung von Natriumnitrit unter niedrigen pH-Bedingungen ( $\text{pH} \sim 3\text{-}4$ ).<sup>29</sup> Der erhaltene Feststoff wird anschließend in einem Gemisch aus Methanol und einem chlorierten Lösungsmittel (bevorzugt Chloroform) gelöst und unter sehr sauren Bedingungen ( $\text{pH} < 1$ ) hydrolysiert (siehe Abbildung 3).<sup>30</sup> Nachteile dieser Synthese sind die schlechte Ausbeute von ca. 70 % bedingt durch die harschen Bedingungen der Synthese und die Verwendung chlorierter Lösungsmittel, die die Nachhaltigkeit dieses Prozesses deutlich in Frage stellen. Der im Jahr 2013 von Sanofi veröffentlichte „Solvent Selection Guide“, also eine Richtlinie für die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels, empfiehlt alle

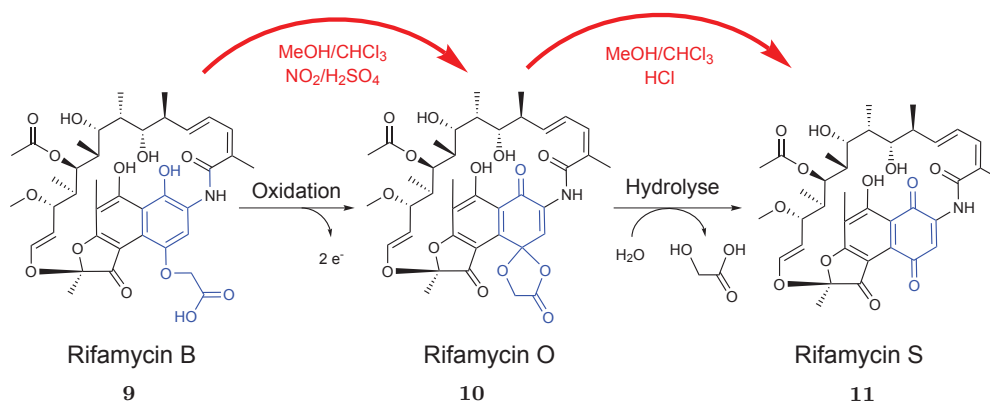
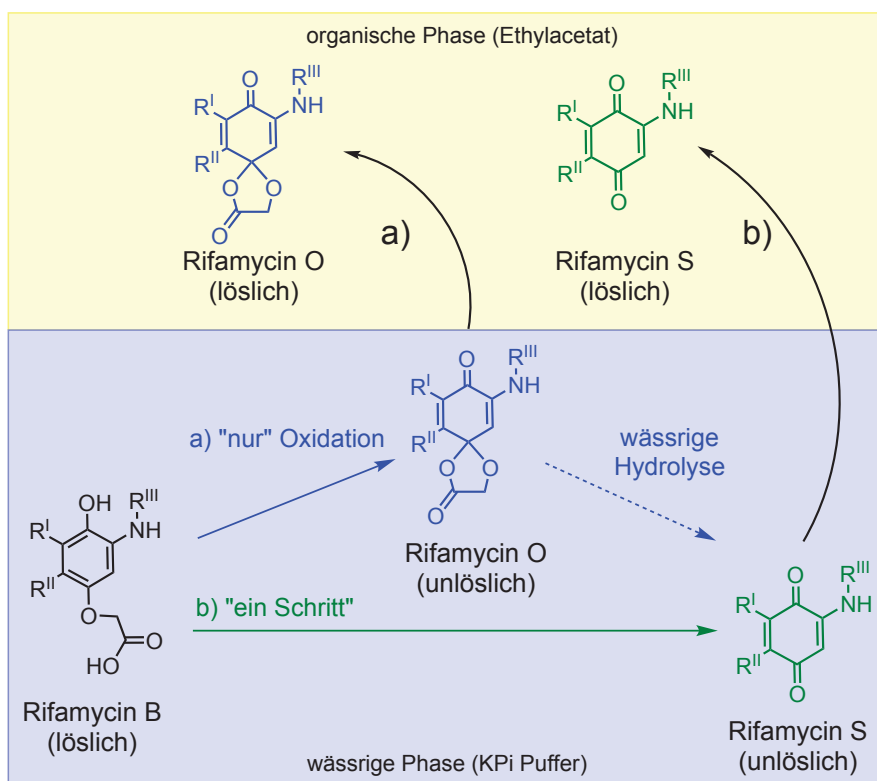


Abbildung 3: Reaktionsschema der großtechnischen Rifamycin S Synthese

chlorierten Lösungsmittel zu ersetzen.<sup>31</sup> Neben dem Prädikat „Ersatz empfohlen“ (Dichlormethan) wird teilweise sogar die Einstufung „verbannt“ (Chloroform) benutzt. Unter diesem Gesichtspunkt ist der Bedarf nach alternativen Reaktionswegen unter Verwendung nachhaltiger Lösungsmittel klar ersichtlich. Han *et al.*<sup>32</sup> veröffentlichten 1982 eine Methode Rifamycin B durch Mangandioxid (MnO<sub>2</sub>) zu oxidieren und machten die Beobachtung, dass die Hydrolyse spontan im sauren wässrigen Milieu abläuft. Das vorgestellte Experiment zeigte, dass 17 mM Rifamycin B in einer Mischung von Methanol mit 5 % konzentrierter HCl und der Verwendung von 10 fachem Überschuss an MnO<sub>2</sub> mit einer Ausbeute von 91 % zu Rifamycin S umgesetzt werden kann. Trotz der guten Ausbeute wurde die Methode nicht industriell eingesetzt, wohl wegen der großen Menge an benötigtem MnO<sub>2</sub>. Um die Reaktion umweltfreundlicher zu gestalten wurde der Einsatz von Enzymen untersucht. Banerjee *et al.* fanden ein oxidierendes Enzym, die Rifamycinoxidase, die aus *Curvularia lunata* erhalten werden kann.<sup>33,34</sup> Mit diesem Enzym gelang es die direkte Umsetzung von Rifamycin B zu Rifamycin S zu beobachten. Das Reaktionsoptimum wurde bei pH 6,5 und 50 °C festgestellt. Die Entdecker versuchten daraufhin die Stabilität durch Immobilisierung zu erhöhen,<sup>35</sup> allerdings waren die eingesetzten Mengen an Substrat eher gering und es kam auch hier nie zu einem

industriellen Einsatz. In meiner Diplomarbeit<sup>36</sup> konnte ich zeigen, dass auch die Meerrettichperoxidase zur Katalyse dieser Reaktion in der Lage ist. Die Frage ob die Meerrettichperoxidase ausschließlich die Oxidation oder zusätzlich auch die Hydrolyse katalysiert, konnte durch geschickte Reaktionsführung geklärt werden (siehe Schema 1): Im Fall der sukzessiven Reaktion, erst die Oxidation, dann die

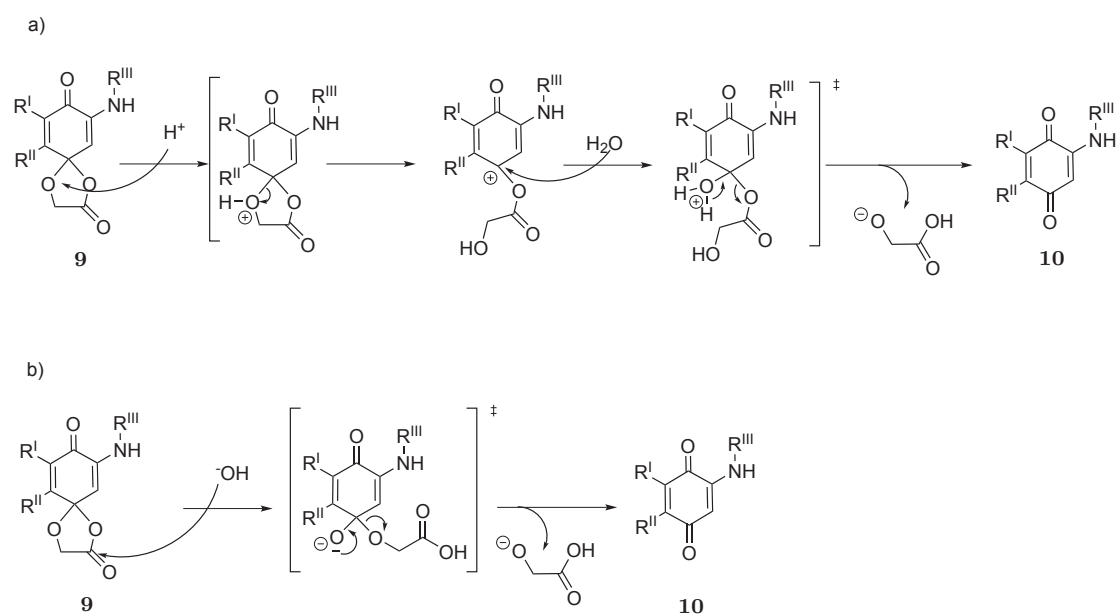


Schema 1: Reaktionsschema der Peroxidasen-katalysierten Rifamycin S Synthese a) Rifamycin O als Hauptprodukt bei sukzessivem Reaktionsverlauf, b) Rifamycin S als Hauptprodukt bei direktem Reaktionsverlauf.

Hydrolyse (a)), wäre Rifamycin O das Hauptprodukt, da nach dem Übergang in die organische Phase keine wässrige Hydrolyse mehr stattfinden kann. Bei direkter, enzymkatalysierter Tandemreaktion (b)), müsste in hohem Maße Rifamycin S entstehen, das in Ethylacetat (EA) gut löslich ist. Daher wäre das Hauptpro-



dukt der Reaktion Rifamycin S. Tatsächlich konnte mit einem Verhältnis von 85 % Rifamycin O zu 15 % Rifamycin S der sukzessive Reaktionsweg nachgewiesen werden. Die erhaltenen 15 % Rifamycin S zeigen darüber hinaus, dass die Hydrolyse auch in wässrigem Milieu bei  $\text{pH} > 7$  möglich ist. Neben dem Reduzieren des Enzyms auf ein simples Oxidationsmittel war das Bemerkenswerte an dem Experiment die Beobachtung, dass Rifamycin O im alkalischen hydrolysiert werden konnte. Trotz des von Christi *et al.* postulierten Reaktionsmechanismus,<sup>34</sup> der eine basenkatalysierte Hydrolyse von Rifamycin O denkbar macht, wurde bisher die Hydrolyse nur im sauren Milieu beschrieben,<sup>35,37</sup> wie es auch die klassische organische Chemie vorsieht. In Schema 2 wird der säurekatalysierte Mechanismus der Acetalspaltung (a)) dem der für den Spezialfall Rifamycin O postulierten basenkatalysierten Mechanismus (b)) gegenübergestellt: Nach separater Optimierung der



Schema 2: Zwei mögliche Reaktionsmechanismen der Hydrolyse von Rifamycin O a) säurekatalysiert, b) basenkatalysiert

Oxidation und der Hydrolyse stellte ich in meiner Arbeit eine peroxidasenkataly-

sierte Eintopfsynthese von Rifamycin S aus Rifamycin B vor. Im Hinblick auf die Komplexität und damit einhergehende Arbeit, die in einem Enzym steckt, blieb die Frage nach einem alternativen, günstigen aber dennoch effektiven Oxidationsmittel offen. Die Verwendung eines Eintopf-Reaktionssystems ist vorteilhaft, scheint aber Limitierungen bezüglich der Konzentrationen aufzuerlegen da Rifamycin O bei den verwendeten Konzentrationen unlöslich ist. Dadurch wird es nicht quantitativ zu Rifamycin S hydrolysiert. Diese Punkte sollen in der vorliegenden Arbeit aus chemischer Sicht betrachtet werden.

### 1.4 Synthetische Nicotinamid-Cofaktoren

Enzyme, die Reaktionen katalysieren während derer sich die Oxidationszahl eines oder mehrerer Atome innerhalb eines Moleküls ändert, werden Oxidoreduktasen genannt.<sup>38</sup> Von ein paar Ausnahmen wie z.B. Peroxygenasen<sup>39</sup> abgesehen benötigen Enzyme dieser Familie zusätzliche Moleküle, um ihre Aufgabe zu erfüllen: Die sogenannten Cofaktoren.<sup>40</sup> Diese können dazu dienen, Hydride (z.B. Nicotinamidadenindinukleotid (NAD(P)H),<sup>41</sup> Flavine<sup>42</sup>), Elektronen (z.B. FeS-Cluster<sup>43</sup>) oder Energie (z.B. Adenosintriphosphat (ATP)<sup>44</sup>) aufzunehmen bzw. abzugeben, komplexere Moleküle zu übertragen (z.B. Cobalamin,<sup>45</sup> S-Adenosylmethionin (SAM)<sup>46</sup>) oder reaktive Spezies zu bilden, die die Reaktion erst möglich machen (z. B. Häm<sup>47</sup>). Die Definition des Begriffes „Cofaktor“ lässt sich noch weiter unterteilen: Es kann zwischen einer prosthetischer Gruppe, einem Molekül das an das Enzym gebunden ist und dem Coenzym, ein organisches Molekül das nach der Reaktion das Enzym verändert wieder verlässt, unterschieden werden. Im Folgenden wird der Begriff Cofaktor synonym zu Coenzym verwendet. Ein sehr anschauliches Beispiel für das Zusammenwirken verschiedener Cofaktoren in einem Enzym ist die P450 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* (BM3).<sup>48</sup>

NADPH ist hierbei der initiale Elektronen/Hydridlieferant und reduziert ein Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), das wiederum ein Flavinmononucleotid (FMN) reduziert. Letzteres gibt die zwei erhaltenen Elektronen sukzessive an ein in einem Porphyrinsystem gebundenes Eisenatom (Fe(porph)) ab, das nach Wasserabspaltung zur reaktiven Eisen(IV)-Oxo-Spezies ((porph)Fe(IV)=O) wird.<sup>49</sup> Triebkraft für solche Elektronenkaskaden sind unterschiedliche Potentiale der einzelnen Cofaktoren, die in Kombination idealerweise zu einem Potentialgefälle führen (siehe Abbildung 4).<sup>50</sup> Potentialunterschiede können einerseits durch

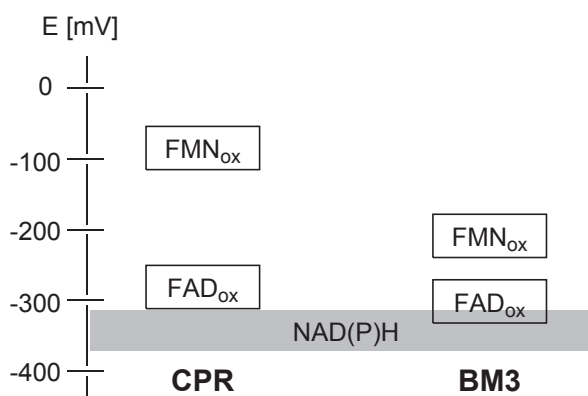


Abbildung 4: Flavin-Potentiale der Enzyme CPR und BM3 gegen die Normalwasserstoffelektrode.

unterschiedliche chemische Strukturen erreicht werden wie im Fall NADH/FMN<sup>51</sup> oder aber durch unterschiedliche Umgebungen im Enzym FMN/FAD.<sup>52</sup> In jedem Fall ermöglicht die Manipulation des elektrochemischen Potentials einen direkten Eingriff in die Chemie des Enzyms. Massey *et al.* konnten durch Herabsetzen des Flavin-Potentials, durch Substitution einer Methyl- durch eine Cyanogruppe, von -200 auf -50 mV das Redoxverhalten von Old Yellow Enzyme 1 (OYE1) invertieren. Somit wurde aus einer Reduktase, die NADPH verwendet um z.B. Zimtaldehyd zu Dihydrozimtaldehyd zu reduzieren, eine Desaturase, die die umgekehrte Reaktion unter Verwendung von Luftsauerstoff als Oxidationsequivalent

katalysiert.<sup>53</sup> Bei der Betrachtung der Cofaktoren NADH und NADPH lässt sich feststellen, dass sich das Potential gleicht, wobei jedoch im Fall von NADPH eine weitere Phosphatgruppe vorhanden ist, die an zusätzliche Koordinationsstellen im Enzym binden kann. Krebs *et al.* konnten anhand der unterschiedlichen physiologischen Konzentrationen an  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  zeigen, dass beiden Cofaktoren unterschiedliche Rollen in den natürlichen Redoxprozessen zugewiesen sind.<sup>54</sup> Nach Nerst<sup>55</sup> muss das Verhältnis von  $\text{NAD}^+$  zu NADH sehr groß sein, um ein hohes Oxidationspotential zu schaffen während ein sehr kleines Verhältnis von  $\text{NADP}^+$  zu NADPH ein hohes Reduktionspotential erzeugt. Das ermöglicht biologischen Systemen mit dem gleichen Prinzip der Hydridübertragung durch Schaffung des jeweils passenden Milieus die gewünschte Reaktion zu erhalten. Dies zeigt darüber hinaus auch wie effizient Enzyme Substrate, denn als solches können auch die Cofaktoren gesehen werden, erkennen und nutzen können. Betrachtet man die Enzymklasse der Oxidoreduktasen, kann man generell zwischen zwei Mechanismen unterscheiden: Die direkte und die Flavin-vermittelte Hydridübertragung. Während die direkte Hydridübertragung vor allem bei Reaktionen mit einer C-O (C=O)-Bindung verwendet wird, z.B. bei Alkohol Dehydrogenasen (ADH) und sowohl bei Oxidationen als auch bei Reduktionen Anwendung findet ist die Flavin-vermittelte Reaktion auf Reduktionen und C=C Bindungen beschränkt, z.B. bei En-Reduktasen (ERED).<sup>56</sup> Vergleicht man den Mechanismus einer ERED wie OYE 1 mit dem Mechanismus einer ADH wie der aus Pferdeleber, dann fällt auf, dass beiden Mechanismen eine unterschiedliche Aktivierung zu Grunde liegt: Bei der ERED wird die Aktivierung durch Wasserstoffbrückenbindung zu protoniert vorliegenden basischen Resten, wie z.B. Histidin, innerhalb der aktiven Tasche hervorgerufen.<sup>57,58</sup> Im Gegensatz dazu findet die Aktivierung bei den ADHs in der Regel durch ein Metallkation, das an den Sauerstoff der zu aktivierenden Carbonylfunktion bindet, statt.

Besonderheiten lassen sich auch hier finden; so konnten Olson *et al.* an einer ADH aus Pferdeleber zeigen, dass der Cofaktor ( $\text{NAD}^+$ ) durch Interaktion mit den Resten His51 und Ser48, zusätzlich zum Metallkation, direkten Einfluss auf die Aktivierung des Substrates nehmen kann (siehe Abbildung 5).<sup>59</sup> Während für

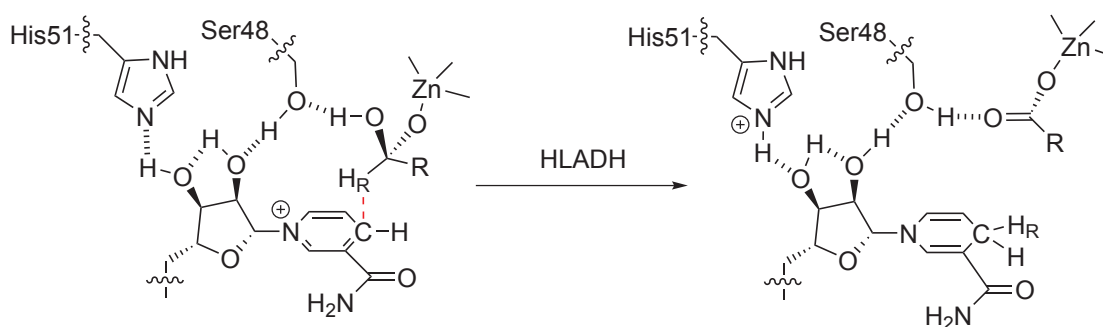


Abbildung 5: Cofaktorunterstützter Mechanismus der H-Abstraktion.

viele Aspekte der enzymatischen Katalyse, z.B. Stereoselektivität, Abschirmung der reaktiven Spezies vor dem Reaktionsmedium oder Positionierung des Substrates, das Proteingerüst eine entscheidende Rolle spielt, zeigten van der Plas *et al.*, dass es generell möglich ist auf das Enzymgerüst zu verzichten. Ihnen gelang es, durch eine geschickte Cofaktor-Manipulation,  $\text{Zn}^{2+}$  so zu koordinieren, dass zwei neue Koordinationsstellen für das Substrat vorhanden waren. Dadurch wurde das Substrat in räumliche Nähe zum zu übertragenden Hydrid gebracht und ein (stereoselektiver) Angriff auf die prochirale Carbonylfunktion gelang (siehe Abbildung 6).<sup>60</sup> Wie aus diesen Beispielen hervorgeht, ist die gleichzeitige und exakte Bindung des Substrates und des Cofaktors und die daraus hervorgehende Positionierung der Reaktionspartner essentiell für die erfolgreiche Katalyse. Im starken Gegensatz dazu steht der Mechanismus der Flavinenzyme: Es handelt sich hierbei um eine sukzessive Bindung und Reaktion zweier Substrate an der gleichen Bindungsstelle. Veranschaulicht wird diese Reaktionsfolge in Abbildung 7.

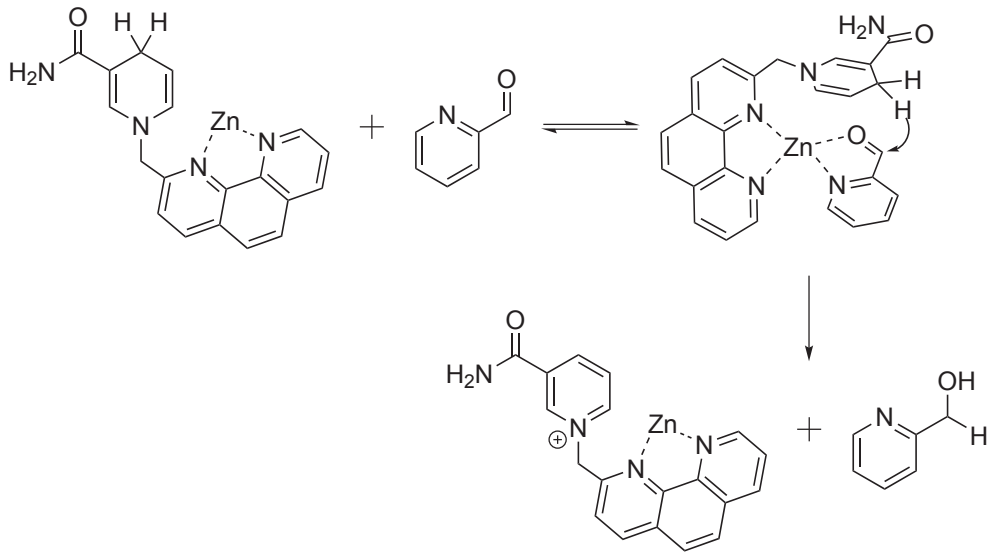


Abbildung 6: Cofaktorunterstützter Mechanismus der C=O Reduktion.

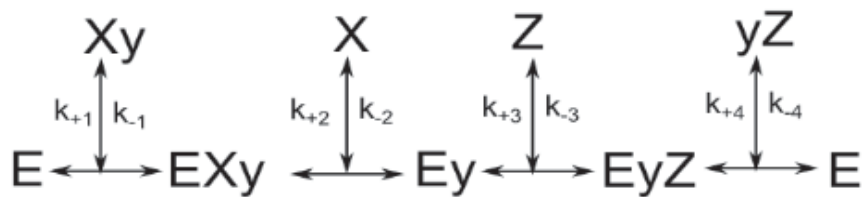
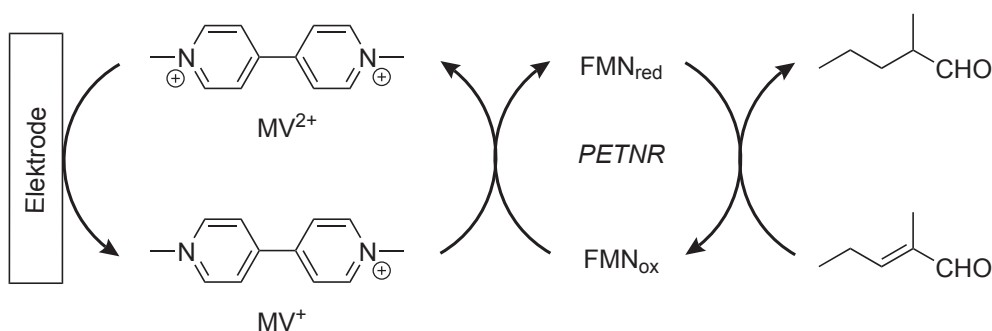


Abbildung 7: Ablauf eines ping-pong bi-bi Mechanismus, mit E = Enzym, X = Cofaktor, y = H<sup>-</sup> und Z = Substrat

Dieser Ablauf wird „ping-pong bi-bi“ Mechanismus genannt und basiert darauf, dass zuerst der Cofaktor das Flavin reduziert und danach selbst als oxidiertes Produkt die aktive Tasche wieder verlässt, um Platz zu schaffen für das eigentliche Substrat. Dieses wird wiederum reduziert bevor es das Enzym verlässt.<sup>61</sup> Der im Vergleich zu den ADHs mit kinetischen Gleichungen wesentlich schwerer zu beschreibende Mechanismus weist hingegen vom präparativen Standpunkt einige Vorteile auf: Zum einen kann das schon eingangs erwähnte Potential des Flavins verändert werden und zum anderen zeigten Scrutton *et al.*, dass der Hydridtransfer mittels quantenmechanischer Tunnelung von statten geht<sup>62</sup> womit die genaue

Bindung des Cofaktors nicht mehr entscheidend ist. Darüber hinaus gibt es interessante Arbeiten die zeigten, dass Methylviologen, das durch eine Elektrode recycelt werden kann, benutzt werden kann, um den Cofaktor komplett zu ersetzen (siehe Schema 3).<sup>63</sup> Einen anderen Ansatz verfolgen Hollmann *et al.*: Sie

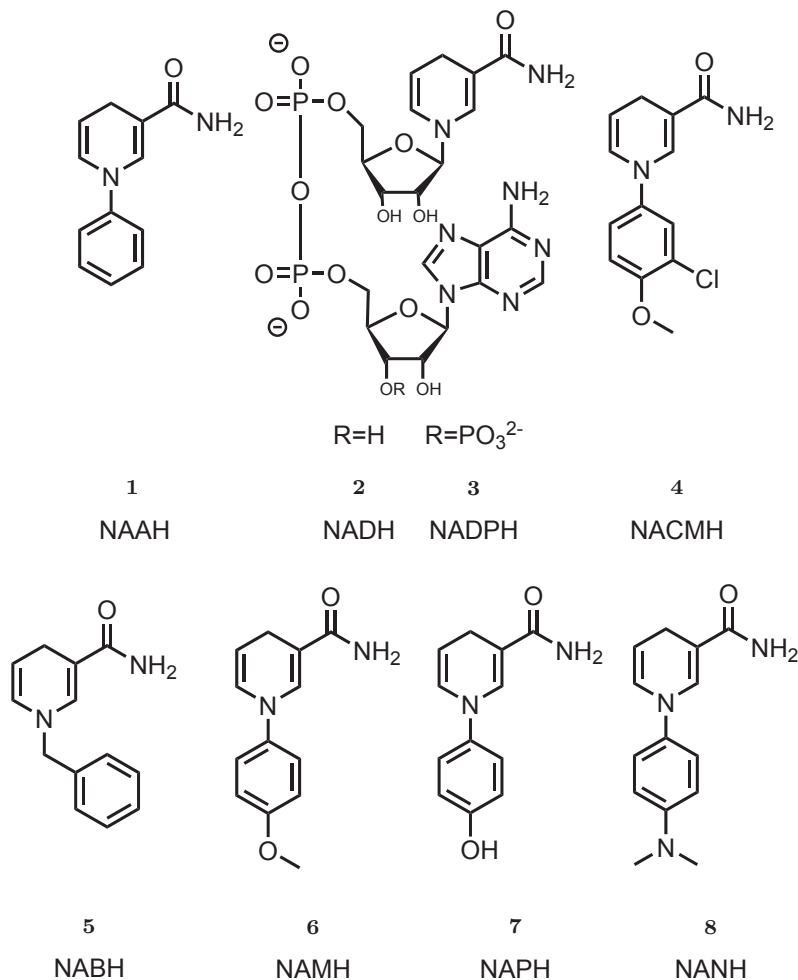


Schema 3: Methylviologen (MV) medierte Reduktion von 2-Methylpentenal

behielten von der komplexen Struktur von NADH die katalytisch aktive Einheit, das Nicotinamid und variierten die Reste am Stickstoff und an der Carbonylfunktion.<sup>64</sup> Die Untersuchung der Einflüsse auf das Reduktionssystem führten zwar zu keiner Verbesserung der Kenngrößen der Reaktion allerdings konnten sie zeigen, dass die Herstellungskosten der synthetischen Cofaktoren deutlich unter denen von NADH liegen und daher technische Relevanz zeigen. Zu betonen ist hierbei, dass die substituierten Reste am Heteroaromaten ausschließlich sterischer Natur waren. Hier zeigt sich eine Möglichkeit eine biochemische Reaktion mit Hilfe chemischer Denkweise zu verbessern. In Analogie zu einer Säure-Base-Reaktion, die umso besser abläuft je mehr sich  $pK_a$  und  $pK_b$  unterscheiden,<sup>65</sup> kann man in diesem Fall annehmen, dass die Reaktion umso besser abläuft je größer die Potentialdifferenz der Reaktionspartner ist. Da die Potentialerniedrigung des Flavins, wie Massey zeigen konnte,<sup>66</sup> dazu führte, dass eine Reduktase zu einer Oxidase wurde sollte es nicht verändert werden. Hingegen könnte die Erhöhung des Potentials des synthetischen Cofaktors einen positiven Einfluss auf die Effektivität des Systems haben. Zu

## 1.4 Synthetische Nicotinamid-Cofaktoren

untersuchen wären hierbei von der Größe ähnliche aber vom Oxidationspotential sehr unterschiedliche Nicotinamid Cofaktoren (siehe Schema 4). Die verwendeten



Schema 4: Denkbare Cofaktoren von gleicher Größe und unterschiedlichem Oxidationspotential

Abkürzungen erklären sich wie folgt: Sie sind in Anlehnung an NADH gewählt worden. Die Abkürzung NADH steht für NicotinAmidDinucleotid — und in der reduzierten Form – Hydrid. Da die Nicotinamid Einheit beibehalten aber das Dinucleotid ausgetauscht wurde wurde die Abkürzung NAXH gewählt, wobei das X für den Anfangsbuchstaben des jeweiligen Substrates steht wie aus der folgenden



Liste zu entnehmen ist:

- NAAH 1 — Anilin
- NACMH 4 — 3-Chlor,4-Methoxyanilin
- NABH 5 — Benzylamin
- NAMH 6 — 4-Methoxyanilin
- NAPH 7 — 4-AminoPhenol
- NANH 8 — N,N-Diemthyl,4-Aminoanilin

## 1.5 Enzym-katalysierte Carbenreaktionen

### 1.5.1 Porphyrin

Das Porphyrin-Ringsystem besteht aus vier Pyrrol-Ringen, verknüpft über vier Methingruppen (siehe Abbildung 8). Es ist in der Natur weit verbreitet und erfüllt viele wichtige Aufgaben unter anderem Photonenernte im Chlorophyll,<sup>67</sup> Sauerstofftransport im Blut,<sup>68</sup> Entgiftung durch katalytische Sauerstoffaktivierung in Enzymen der Cytochrom P450-Familie<sup>69</sup> und Methyltransport im Cobalamin.<sup>49,70</sup> Diese Vielseitigkeit ergibt sich aus der Kombination der Porphyrin-Systems mit unterschiedlichen Metallen wie Mg, Fe, Co sowie unterschiedlichen Resten am Ringsystem. Schon früh entdeckten Chemiker das inherente katalytische Potential dieses Moleküls. 1935 stellten Rothemund *et al.* eine flexible Synthese aus Pyrrol und verschiedenen Benzaldehyden vor, die Porphyrinderivate leicht zugänglich machte.<sup>71</sup> Inzwischen ist das System sehr gut untersucht und viele Metallkomplexe<sup>72-74</sup> und chemische Katalysen<sup>75-77</sup> sind bekannt.

Unter der Vielzahl der Porphyrinkomplexe haben die Eisenkomplexe eine beson-

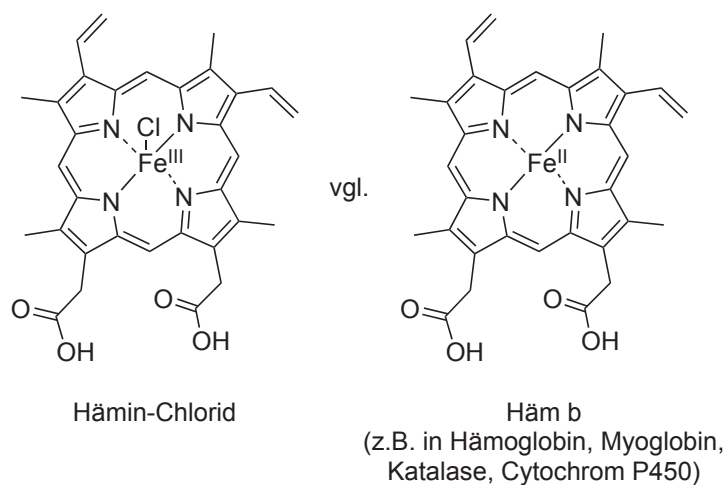


Abbildung 8: Vergleich des in dieser Arbeit verwendeten Häm-in-Chlorids mit dem physiologisch auftretenden Häm b.

dere Rolle. Sie stellen die Stoffgruppe der Häme und sind zum einen die Porphyrinringgruppe, die physiologisch die größte Rolle spielt<sup>78</sup> und zum anderen synthetisch interessant, da ihre vielseitige Reaktivität zusätzlich durch einen axialen Liganden steuerbar ist.<sup>79</sup> Dies kommt insbesondere in Proteinen zum Einsatz, wenn unterschiedliche Aminosäurereste als axialer Ligand dienen können und dadurch die Reaktivität stark beeinflusst wird.<sup>80</sup> Als Beispiel seien hier zwei in der Natur vorkommende, Häm enthaltende Proteine nämlich das Hämoglobin und Enzyme der P450 Familie angeführt. Histidin ist der axiale Ligand im Hämoglobin und verändert den elektronischen Zustand im Eisen dahingehend, dass  $O_2$  abhängig vom pH-Wert und dem Partialdruck gebunden respektive entlassen werden kann. In den P450 Enzymen dient Cystein als elektronenschiebender Ligand, was unter Verwendung von zwei weiteren Elektronen zur Sauerstoffaktivierung bei gleichzeitiger Wasserabspaltung und resultierender katalytischer Aktivität führt.<sup>81</sup>

### 1.5.2 Diazoverbindungen

In der organischen Synthese werden nach dem Baustein Prinzip einzelne vorgefertigte Moleküle über funktionelle Gruppen zusammengefügt. Funktionelle Gruppen, die eine hohe Vielseitigkeit haben, also viele Kombinationsmöglichkeiten bieten, sind von besonderem Interesse. Die Diazo-Funktion ( $C=N=N$ ) zählt zu dieser Gruppe. Ye und McKervey zeigen in ihrem fast 800 Publikationen fassenden Review von 1994 die immense Anwendungsbreite von Diazoverbindungen, bei einer zusätzlich hohen Toleranz anderer funktionellen Gruppen.<sup>82</sup> Die wichtigsten Reaktivitäten lassen sich in acht Gruppen unterteilen (siehe Abbildung 9).

1.  $\alpha$ ,  $\alpha$ -Substitutions Reaktionen
2. CH-Insertion
3. Cyclopropanierung
4. Reaktionen mit Aromaten
5. Ylid Bildung und anschließende Reaktion
6. Wolff-Umlagerung
7.  $\beta$ -Hydrid Eliminierung
8. Reaktion mit Aldehyden und Ketonen

Die Reaktionen sind allgemein in Abbildung 9 beginnend links oben, im Uhrzeigersinn dargestellt.

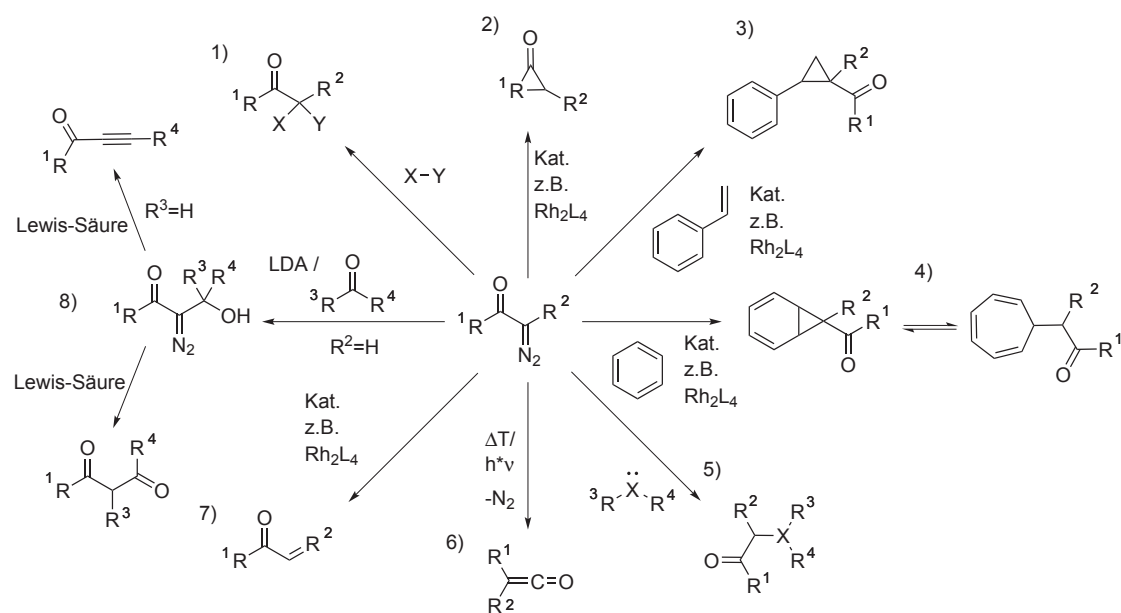


Abbildung 9: Die acht wichtigsten Reaktivitäten von Diazoverbindungen.

### 1.5.3 Metall-Porphyrin-katalysierte Reaktionen mit Diazoverbindungen

Ein Großteil der gezeigten Reaktionen laufen nur unter katalysierten Bedingungen ab. Rhodium mit verschiedenen Carboxylliganden, vor allem aber mit Acetat ( $Rh_2OAc_4$ ), löste hierbei Kupfer als vorherrschenden Katalysator ab, da es Reaktionen unter extrem milden Bedingungen ermöglicht.<sup>83</sup> Einen bedeutenden Nachteil (neben den hohen Kosten für Rhodium) besitzt  $Rh_2OAc_4$  allerdings: die fehlende Stereospezifität. Eine solche kann z.B. mit  $Rh(\text{porph})$  bei der Cyclopropanierung erreicht werden.<sup>84</sup> Inzwischen ist das Spektrum der Metallkatalysatoren für Carbentransfer-Reaktionen sehr ausgeprägt (siehe Abbildung 10).<sup>85</sup>

|           |           |    |           |
|-----------|-----------|----|-----------|
| <b>Fe</b> | Co        | Ni | <b>Cu</b> |
| <b>Ru</b> | <b>Rh</b> | Pd | <b>Ag</b> |
| Os        | Ir        | Pt | <b>Au</b> |

Abbildung 10: Metalle für den Carbenttransfer; die Schriftgröße entspricht ihrer Qualität als Katalysator.<sup>85</sup>

#### 1.5.4 Enzym-katalysierte Reaktionen mit Diazoverbindungen

Wie man Abbildung 10 entnehmen kann sind Rh und Cu die am geeignetsten und am meist erforschten Katalysatoren für Carbenttransfer-Reaktionen aus Diazoverbindungen, dennoch ist Eisen nicht zu vernachlässigen. Das gilt vor allem deshalb, da Eisen(II)Porphyrine hervorragende Katalysatoren für die NH-Insertion und die Cyclopropanierungsreaktion sind. Einiges Aufsehen erregten die Publikationen von Arnold *et al.*: eine P450 *in vivo* katalysierte Cyclopropanierung<sup>86</sup> und Amin-Insertion über eine Häm-Carben Zwischenstufe.<sup>87</sup> Beide Reaktionen waren mit Eisen-Porphyrinen schon bekannt<sup>88</sup> allerdings konnte sie im Falle der Cyclopropanierung erstmals die Reaktion *in vivo* zeigen und im Falle der Amin-Insertion eine erhöhte Produktpräferenz bezüglich des Monoadditionsproduktes durch die sterische Einschränkung in der aktiven Tasche (siehe Abbildung 11).

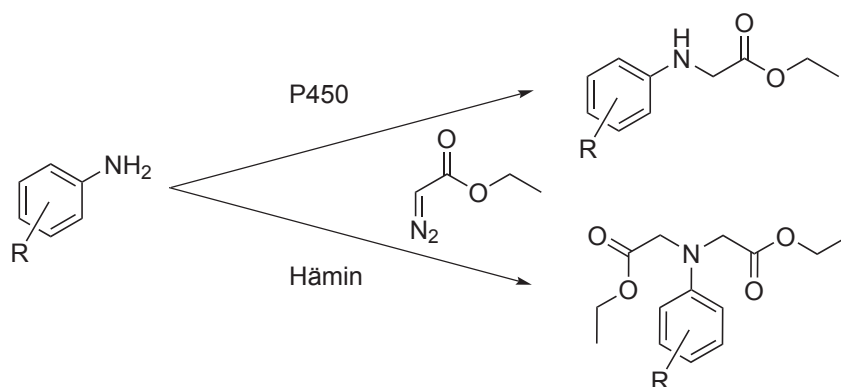
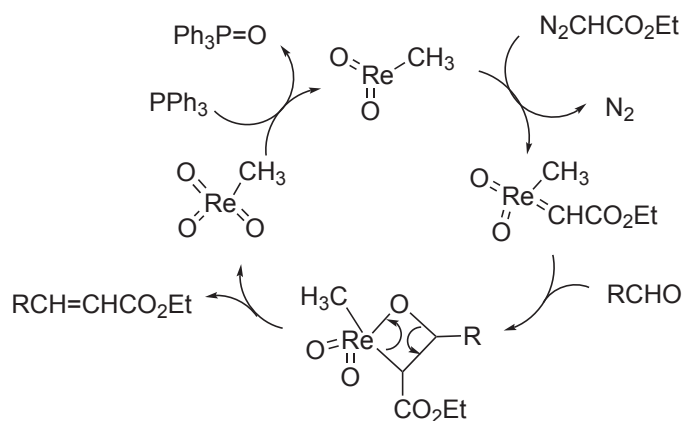


Abbildung 11: Katalysierte Aminierung von EDA mit Anilinderivaten.

### 1.5.5 Weitere Reaktionen mit Diazoverbindungen

Eine weitere eindrucksvolle Reaktion ist die Wittig-artige Olefinierung von Aldehyden unter Verwendung eines Metallkatalysators, einer Diazoverbindung und Triphenylphosphin. Von Lu und Ni wurde diese Reaktivität an  $\text{MoO}_2(\text{S}_2\text{CNEt}_2)_2$  gefunden<sup>89</sup> und von Herrmann *et al.* durch die Verwendung von Methyltrioxorhenium (MTO) zur breiten Anwendbarkeit gebracht (siehe Schema 5).<sup>90</sup>

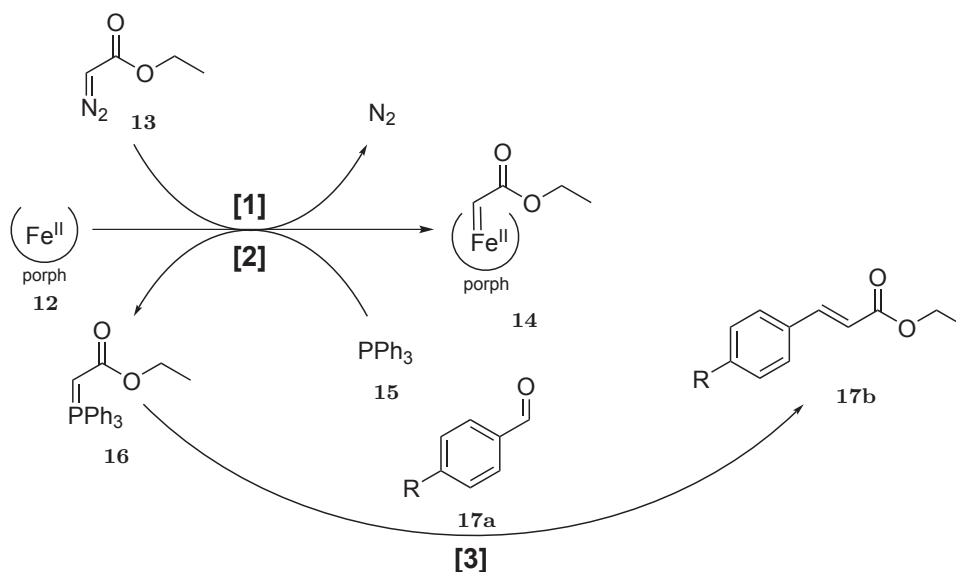


Schema 5: Mechanismus der Methyltrioxorhenium katalysierten Carbonyl-Olefinierung unter Verwendung von Triphenylphosphin zur Wiederherstellung der katalytisch aktiven Spezies.

Von Woo *et al.* wurde diese Reaktionen mit Eisen-Porphyrinen katalysiert<sup>91</sup> und der in Schema 5 vorgeschlagene Mechanismus für ihre Katalysatoren untersucht.<sup>92</sup> Sie kamen zu dem Schluss, dass der Mechanismus über die umstrittene Zwischenstufe des cyclischen Eisen-Betains nicht haltbar ist und schlugen den alternativen Weg über ein Phosphor Ylid vor.

Indizien für den alternativen Weg waren:

- die stöchiometrische Verwendung des Eisenkatalysators führte nicht zum Produkt
- die Reaktion von Phosphin, Diazoverbindung und Eisenkatalysator führte zur Bildung des Phosphorylids
- das Phosphorylid reagierte mit dem Aldehyd ohne Katalysator zum Produkt



Schema 6: Sequenzieller Reaktionsmechanismus der Carbonyl Olefinierung unter Verwendung von Triphenylphosphin. [1] Bildung des Eisen-Porphyrin-Carbens durch die Reaktion von Ethyldiazoacetat mit einem Eisen (II)-Porphyrin. [2] Bildung des Phosphor-Ylens durch die Reaktion des Carbens mit Triphenylphosphin. [3] Wittig-Reaktion des Ylens mit Benzaldehyd zum Zimtsäureethylester.

In dem Licht der von Arnold *et al.* veröffentlichten Reaktionen stellt sich nun die Frage nach der Verwendbarkeit von Eisen-Porphyrinbeeinhaltenenden Enzyme für diese Reaktion.



## 2 Zielsetzung

Bei Reaktionen im Labormaßstab bis hin zur großtechnischen Synthese besteht ein stetes Interesse zur Verbesserung.<sup>93–96</sup> Hierbei sind interdisziplinäre Denkansätze besonders erfolgreich, wie man am Beispiel vieler von der Biologie inspirierten chemischen Synthesen sieht.<sup>97–100</sup> Die umgekehrte Herangehensweise, biologische Prozesse von einem chemischen Standpunkt anzugehen, ist weit weniger populär. Betrachtet man den in der Einleitung beschriebenen *biocatalytic cycle*<sup>14</sup> so sind alle darin beschriebenen Punkte biologischer bzw. verfahrenstechnischer Natur. Wird, wie in Abbildung 1 dargestellt, bei der biochemischen Prozessoptimierung zusätzlich die chemische Herangehensweise angewendet, eröffnet sich ein neues Feld um Prozesse zu verbessern. Dabei kann eine erneute Evaluation der verwendeten Reaktionskomponenten ebenso wie mechanistische Erwägungen der untersuchten Reaktion angewendet werden. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass eine solche chemische Herangehensweise sowohl auf schon etablierte Prozesse ebenso wie auf Reaktionen im Labormaßstab erfolgreich angewendet werden kann. Dafür wurden drei Projekte, die als Fallbeispiele dienen sollen ausgewählt. Bei der großtechnischen Synthese von Rifamycin S wird das nicht nachhaltige, chlorierte Lösungsmittel Chloroform eingesetzt. Der alternative, biochemische Prozess verwendet eine Meerrettichperoxidase zur Oxidation von Rifamycin B bei anschließender wässriger Hydrolyse des entstehenden Rifamycin O zu Rifamycin S. Im Hinblick auf die Fragestellung der chemischen Optimierung soll die Notwendigkeit der Meerrettichperoxidase als Katalysator untersucht werden. Bei dieser Untersuchung sollen auch andere, chemische Oxidantien getestet und ihre Eignung in einem Prozess evaluiert werden. Bei dem zweiten Projekt sollen biochemische Reduktionen, die unter Verwendung des Nicotinamid-Cofaktors NADH verlaufen, untersucht werden. Dabei soll der Cofaktor – und insbesondere seine chemische Struk-

---

tur – im Mittelpunkt stehen. Eine Effizienzsteigerung soll hierbei nicht, wie sonst üblich, durch eine Veränderung des Katalysators erzielt werden, sondern durch Manipulation der elektrochemischen Beschaffenheit des Cofaktors. Dabei sollen die synthetisierten Cofaktoren mit einem Set aus unterschiedlichen Oxidoredukta-  
sen kombiniert werden. Bei überdurchschnittlichen Ergebnissen soll eine vertiefte Charakterisierung vorgenommen werden. Im dritten Projekt sollen enzymatisch katalysierte Carben-Reaktionen Gegenstand der Forschung sein. Dabei sollen typische Werkzeuge der organischen Chemie wie der Austausch von Substituenten eingesetzt werden. Darüber hinaus werden anhand des postulierten Mechanismus neue Edukte für die Carben-Reaktionen getestet. Diese drei Fallbeispiele sind aus den unterschiedlichsten Entwicklungsstadien eines biochemischen Prozesses herausgegriffen. Sie könnten deshalb bei erfolgreicher Durchführung repräsentativ für weitere Prozesse stehen und daher die generelle Anwendbarkeit und die daraus resultierenden Vorteile der chemischen Herangehensweise zeigen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden stets in der höchstmöglichen Reinheit von Alfa Aesar (Ward Hill, US), Carl Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH), Macherey-Nagel (Düren, DE) und Sigma-Aldrich (Schnelldorf, DE) bezogen. Rifamycin B, Rifamycin O und Rifamycin S wurden großzügig von Sandoz (Kundl, AT) bereitgestellt. Nicht kommerziell erhältliche Verbindungen, wie die synthetischen Cofaktoren wurden, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben synthetisiert

### 3.2 Analytische Methoden

#### 3.2.1 Gaschromatographie

Für die gaschromatographischen Messungen wurden folgende Systeme verwendet: Shimadzu GC-2010-System (Kyōto, JP) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), ein Shimadzu GC-2010-System mit einem Massenspektrometer, sowie ein Agilent 7890A GC/MS-System (Santa Clara, US) mit einem kombinierten Flammenionisationsdetektor und einem massenselektivem Detektor (Agilent 5975 Series MSD, Santa Clara, US). Für die FID-Messungen diente Wasserstoff, bei den MS-Messungen Helium als Trägergas mit einer Flussgeschwindigkeit von jeweils  $30 \text{ cm s}^{-1}$ . Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , Injektionsvolumen  $1 \text{ } \mu\text{l}$ , Split-Verhältnis 5:1 sowie einer FID-Temperatur von  $320 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Temperaturgradient wurde dem Substrat angepasst sodass in jedem Fall eine Basislinientrennung erhalten wurde. Quantifizierungen wurden mit 1-Octanol als internem Standard durchgeführt.

#### 3.2.2 Flüssigchromatographie

Die flüssigchromatographischen Analysen wurden auf einem Shimadzu LC/MS-2010 System oder einem Agilent 1200 series HPLC System unter Verwendung einer Chromolith Performance RP-18 end-capped 100-4.6 HPLC Säule (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur mit 10 mM Ammoniumacetat (pH 6.5)/MeOH in einem Verhältnis von 3/2 als mobile Phase und einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Analyten wurden detektiert und quantifiziert unter Verwendung der Massenspektrometrie oder der DAD-Fläche.

#### 3.2.3 NMR

Zur Charakterisierung der synthetisierten Moleküle wurde die NMR-Spektroskopie genutzt. <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 125, 250 oder 500 MHz vermessen. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) in parts per million (ppm) wurde bezogen auf den internen Standard Tetramethylsilan ( $\delta = 0$  ppm). Die Proben wurden in CDCl<sub>3</sub> gelöst, mit Ausnahme der synthetischen Cofaktoren für die, wenn nicht anders angegeben, deuteriertes DM-SO als Lösungsmittel verwendet wurde.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation der *E. coli*-Zellen wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Dazu wurden die chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Es wurde 1  $\mu$ l Plasmid-DNA zu den kompetenten Zellen (50  $\mu$ l) zugegeben und 30 min auf

Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Nach kurzem Ruhen auf Eis (2-3 min) wurde 500 µl LB-Medium zugegeben und mindestens 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Diese Zeit benötigten die Zellen zur Ausprägung der plasmidcodierten Antibiotikaresistenz zur Identifikation der Transformanten. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.3.2 Kultivierung von *E. coli***

Für die Kultivierung wurde zuerst eine Übernachtskultur hergestellt. Hierfür wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli* BL21(DE3) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Dann erfolgte die Inokulation der 400 ml Hauptkultur (TB-Medium) mit 400 µl dieser Übernachtskultur. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C und 180 rpm für ca. 24 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) geerntet. Dann wurde das Kulturmedium verworfen und das Pellet mit 20 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5 100 mM) resuspendiert. Dann wurde erneut zentrifugiert (2000 x g, 15 min, 4 °C). Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen entweder direkt aufgeschlossen oder bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.3.3 Expression in *E. coli* BL21(DE3)**

Die Expression mittels IPTG Induktion erfolgte für die unterschiedlichen Enzyme NCR, MR, OYE1, OYE3, Bfr, Hmp, KatE und YfeX analog, sofern nicht anders angegeben. Hierfür wurde eine 5 ml Übernachtskultur (LB-Medium) mit dem entsprechenden Selektionsmarker versehen. Dann wurde mit den Expressionsstämmen von einer LB-Agar Platte oder aus einem Glycerol-Stock angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (400 ml LB-Medium) wurde anschließend mit 4 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer

OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 0,1 mM IPTG zur Induktion und anschließend die Inkubation bei 30 °C und 180 rpm über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) geerntet. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen bei -20 °C gelagert oder direkt aufgeschlossen.

#### 3.3.4 Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen

Die *E. coli*-Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in Aufschlusspuffer (3 ml g<sup>-1</sup>) resuspendiert. Der verwendete Zellaufschlusspuffer war abhängig von der anschließenden Verwendung des Lysats. Je nach Verwendung wurde ein der Aufreinigungsmethode entsprechender Bindepuffer (siehe 3.6.3 und 3.6.4) verwendet oder der als Reaktionsmedium verwendete Puffer (siehe 3.5.4 und 3.5.5) als Aufschlusspuffer benutzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einem Sonifier (Branson Sonifier W250, Output: 4, duty cycle: 40 %,) unter Eiskühlung für viermal eine Minute, mit jeweils einer Abkühlphase von 1 min. Nach dem Aufschluss wurden die unlöslichen Zellteile, wie zum Beispiel Zellwandbestandteile und Membranen, mittels Zentrifugation (35000 x g, 45 min, 4 °C) abgetrennt. Das Lysat konnte anschließend verwendet werden oder wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.5 Proteinaufreinigung mittels His GraviTrap TALON Säulen

Es wurden 1 ml His GraviTrap TALON Säulen (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, DE) zur Aufreinigung von Proteinen mit His<sub>6</sub>-Tag verwendet. Es handelt sich bei dieser Methode der Aufreinigung um eine Co<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie, bei der aufgrund der Affinität der Histidin-Seitenketten gegenüber Co<sup>2+</sup> die Proteine an das Säulenmaterial gebunden werden. Zur Elution der Proteine wurde

Imidazol verwendet, das durch eine höhere Affinität für  $\text{Co}^{2+}$  als die Histidin-Seitenketten die Proteine verdrängt. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei wieder die der jeweiligen Reaktion angepassten Puffer verwendet wurden (siehe 3.6.3, 3.6.4, 3.5.4 und 3.5.5). Um eventuelle partikuläre Verunreinigungen (restliche Zelltrümmer o.ä.) zu entfernen, wurden die Proben jeweils unmittelbar vor der Auftragung auf die His GraviTrap TALON Säule über einen Spritzenfilter filtriert (0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße). Nach der Aufreinigung wurden die Proteine zweimal 1 h bei 4 °C gegen 50 mM KPi-Puffer pH 7,5 dialysiert um das Imidazol und das NaCl zu entfernen. Hierfür wurde eine Dialysemembran mit 6-8 kDa Molekulargewicht-Trenngrenze (Spectrum Europe B.V., Breda, NL) verwendet. Nach der Dialyse wurde das aufgereinigte Protein aliquotiert oder bis zur Verwendung bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

### **3.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist eine Methode um Proteingemische in Abhängigkeit der molekularen Massen ihrer Untereinheiten aufzutrennen. Es handelt sich um eine Elektrophorese, die diskontinuierlich ausgeführt wird. Die Trennschicht besteht aus zwei Polyacrylamidgelen, dem Sammelgel (5 %) und dem Trenngel (12-15 %). Das Sammelgel dient der Fokussierung, das Trenngel der Auftrennung der Proteine. Die Proteine müssen zur Auftrennung denaturiert und mit negativer Ladung versehen vorliegen. Dazu wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min inkubiert. Pro Tasche wurden 15  $\mu\text{g}$  Protein auf das Gel aufgetragen. Hierfür wurde die Protein-Konzentration der Proben zuvor mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Braunschweig, DE) nach Herstellerangaben ermittelt. Zusätzlich zu den Proben wurde als Größenstandard 5  $\mu\text{l}$  eines Makers (peqGOLD Protein-Marker IV, prestained; VWR International GmbH, Erlangen,

DE) aufgetragen. Das Anlegen der Spannung führte zur Wanderung der Proteine durch das Gel, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Porengröße des Gels, der Größe und der Ladung der aufzutrennenden Proteine war. Die Fokussierung im Sammelgel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 12 mA. Mit dem Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 25 mA pro Gel erhöht. Der Lauf wurde gestoppt sobald der Farbstoff das Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde anschließend für 1-2 h in einer Coomassie-Färbelösung gefärbt. Dann wurde das Gel über Nacht mittels Entfärbelösung entfärbt, sodass die Proteinbanden erkennbar wurden.

### 3.4 Rifamycin

#### 3.4.1 Generelle Probenvorbereitung

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Proben nach dem folgenden Verfahren aufgearbeitet und vermessen. Die durch Extraktion mit Ethylacetat erhaltene Fraktion wurde unter einem Stickstoffstrom verdampft. Der verbleibende Feststoff wurde in 400 µl Methanol gelöst und mit 600 µl Ammoniumacetat Puffer (10 mM, pH 6,5) versetzt. Es wurde 1 µl mittels HPLC oder LC/MS vermessen. Die Umsätze wurden mittels LC/MS bestimmt, basierend auf dem ermittelten Response Factor.

#### 3.4.2 Versuchsdurchführungen

*Untersuchungen zum Oxidationssystem – Fentons Reagenz*

20 mg Rifamycin B (0,026 mmol) wurden in 9,5 ml KPi-Puffer (10 mM, pH 8), der 0,5 ml Methanol enthielt, gelöst und mit 0,6 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,15% m/v) versetzt.



Die Reaktion wurde jeweils mit und ohne 0,5 ml 0,54 mM FeSO<sub>4</sub> Lösung (Endkonzentration 0,027 mM) durchgeführt und wurde mittels LC/MS nach 30, 60, 120 und 180 min analysiert.

#### *Untersuchungen zum Oxidationssystem – Ammoniumperoxodisulfat*

20 mg Rifamycin B (0,026 mmol) wurden in 9,5 ml KPi-Puffer (10 mM, pH 8), der 0,5 ml Methanol enthielt, gelöst. Dann wurde die Probe mit 6 mg APS (0,26 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde mittels LC/MS nach 30, 60, 120 und 180 min analysiert.

#### *Geeignete Methanol Konzentration – Prozess 1*

30 mg Rifamycin B (0,039 mmol) wurden in verschiedenen Volumina Methanol (0-3 ml, siehe Abbildung 12) gelöst. Dann wurden 9 mg APS (0,039 mmol) und 5 ml KPi-Puffer (10 mM, pH 8) zugegeben. Die Reaktion wurde 4 h bei 60 °C gerührt und nach der beschriebenen Probenaufbereitung mittels LC/MS analysiert. In dem Ansatz mit 3 ml Methanol konnte eine Konzentration von 3,5 mM Rifamycin S gemessen werden was einer Ausbeute von 70 % entspricht.

#### *Zeitverlauf*

30 mg Rifamycin B (0,039 mmol) wurden in 3 ml Methanol gelöst. Dann wurden 9 mg APS (0,039 mmol) und 5 ml KPi-Puffer (10 mM, pH 8) zugegeben. Die Reaktion wurde bei 60 °C gerührt und zu den Zeiten 30, 60, 90, 180 und 240 min mittels LC/MS analysiert.

#### *Nachweis der Umesterung*

40 mg Rifamycin B (0,052 mmol) und 12 mg APS (0,052 mmol) wurden unter Argon Schutzgasatmosphäre mit 400 µl absolutiertem Methanol (unter Rückfluss über CaH<sub>2</sub> getrocknet) versetzt. Die erhaltene Suspension wurde unter Schütteln für 20 min auf 60 °C erwärmt. Dann wurden 40 µl der Probe mit 100 µl KPi-Puffer (10 mM, pH 9,5) gequenched und mittels LC/MS analysiert.

#### *Einfluss der Konzentration*

40 mg Rifamycin B (0,052 mmol) und 12 mg APS (0,052 mmol) wurden vorgelegt und mit 400, 500, 600 oder 1000 µl Methanol versetzt. Die erhaltenen Suspensionen wurden unter Schütteln für 10 min auf 70 °C erwärmt. Dann wurden 40 µl der Probe mit 100 µl KPi-Puffer (10 mM, pH 9,5) gequenched und mittels LC/MS analysiert.

#### *Reaktion in anderen Lösungsmitteln*

40 mg Rifamycin B (0,052 mmol) und 12 mg APS (0,052 mmol) wurden vorgelegt und mit 1000 µl Methanol, Acetonitril, DMSO, Ethanol oder Isopropanol versetzt. Die erhaltenen Suspensionen wurden unter Schütteln für 10 min auf 70 °C erwärmt. Dann wurden 40 µl der Probe mit 100 µl KPi-Puffer (10 mM, pH 9,5) gequenched und mittels LC/MS analysiert.

#### *Optimierung der Reaktion*

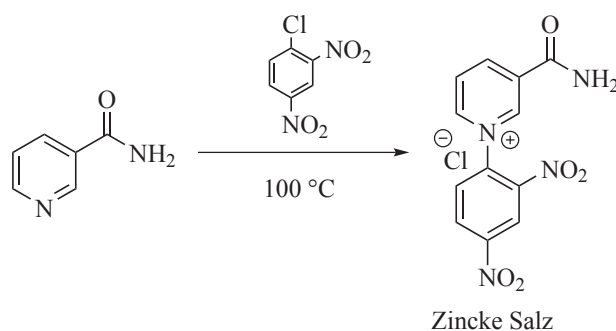
40 mg Rifamycin B (0,052 mmol) und 12 mg APS (0,052 mmol) wurden vorgelegt und mit 400 µl Methanol versetzt. Zu den erhaltenen Suspensionen wurden jeweils 0, 4, 8 und 16 µl KPi-Puffer (10 mM, pH 9,5) gegeben. Die Proben wurden unter

Schütteln für 20 min auf 60 °C erwärmt. Dann wurden 40 µl der Probe mit 100 µl KPi-Puffer (10 mM, pH 9,5) gequenched und mittels LC/MS analysiert.

### 3.5 Synthetische Nicotinamid Cofaktoren

#### 3.5.1 Synthesen

*Zincke-Salz (3-Carbamoyl-1-(2,4-dinitrophenyl)pyridin-1-iumchlorid)*



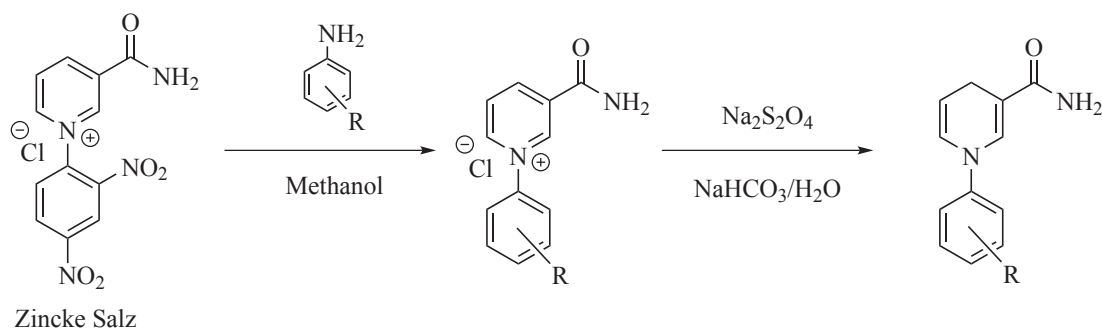
Schema 7: Reaktionsschema der Synthese von 3-Carbamoyl-1-(2,4-dinitrophenyl)-pyridin-1-iumchlorid.

Eine Mischung aus 7,32 g Nicotinamid (59,9 mmol) und 13,35 g 2,4-Dinitrochlorobenzol (65,91 mmol) wurde unter Rühren für 30 min auf 100 °C erhitzt. Dabei entstand ein orangener glasartiger Feststoff, der anschließend in 80 ml Methanol gelöst wurde. Dann wurden 50 ml MTBE zugegeben und die obere Phase wurde abdekantiert und verworfen. Dieser Schritt wurde noch zweimal mit je 50 ml MTBE wiederholt. Der bei diesen Schritten ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und anschließend in 20 ml Methanol gelöst. Dann wurde Ethylacetat zugegeben bis kein Feststoff mehr ausfiel. Der erhaltene goldene Feststoff (7,42 g, 22,8 mmol)

### 3.5 Synthetische Nicotinamid Cofaktoren

wurde im Vakuum getrocknet und unter Stickstoff für die weitere Verwendung gelagert.  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,27 (d, 1H); 8,49 (t, 1H); 8,96 (d, 1H); 9,34 (m, 3H); 9,69 (s, 1H).

#### Allgemeine Cofaktorsynthese



Schema 8: Reaktionsschema der Synthese der verschiedenen arylsubstituierten Cofaktoren.

Die im Folgenden beschriebene Synthese wurde für alle arylsubstituierten Cofaktoren in zwei Schritten durchgeführt: In Schritt 1 wurde 1 g 3-Carbamoyl-1-(2,4-dinitrophenyl)pyridin-1-iumchlorid (3,08 mmol) in 150 ml Methanol gelöst, so dass eine gelbe Lösung erhalten wurde. Dann wurden 3,08 mmol des entsprechenden Anilinderivats, gelöst in 100 ml Methanol, zugegeben. Die erhaltene tiefrote Lösung wurde bei 50 °C so lange erwärmt bis eine hellgelbe Färbung zu erkennen war. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Feststoff in 80 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die wässrige Lösung wurde drei Mal mit 50 ml MTBE extrahiert um das entstandene Nitroanilin zu entfernen. In Schritt 2 wurde die wässrige Lösung des zu reduzierenden Cofaktors (maximal 3,08 mmol) unter Stickstoffatmosphäre mit 0,5 g  $\text{NaHCO}_3$  (6 mmol) versetzt. Danach wurde unter Rühren portionsweise,

über eine Stunde verteilt, 2,3 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (10,7 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde anschließend dreimal mit jeweils 50 ml MTBE extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie (95:5 Ethylacetat:Ethanol) aufgereinigt und unter Stickstoff für die weitere Verwendung gelagert.

#### *NAAH*

Die Synthese von NAAH wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 70 mg (0,35 mmol, Ausbeute: 11 %) oranger Feststoff erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) = 3,21 (d, 2H); 4,97 (m, 1H); 5,52 (s, 2H); 6,31 (m, 1H); 7,10 (m, 3H); 7,35 (m, 2H); 7,54 (t, 1H)

#### *NAPH*

Die Synthese von NAPH wurde in Schritt 1 wie zuvor beschrieben durchgeführt. In Schritt 2 wurde die wässrige Lösung nach der Zugabe der 0,5 g  $\text{NaHCO}_3$  mit Ethylacetat überschichtet und nach jeder Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  wurde das Lösungsmittel abgenommen und durch frisches ersetzt. Die weitere Aufarbeitung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 105 mg (0,48 mmol, Ausbeute: 16 %) gelber Feststoff erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) = 3,01 (d, 2H); 4,83 (m, 1H); 6,28 (m, 1H); 6,85 (m, 5H); 7,14 (m, 2H); 9,35 (s, 2H).

#### *NACMH*

Die Synthese von NACMH wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 212 mg (0,8 mmol, Ausbeute: 26 %) oranger Feststoff erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) = 3,19 (t, 2H); 3,18 (s, 3H); 4,93 (m, 1H) 5,40 (s, 2H); 6,20 (m, 1H); 6,88 (m, 1H); 6,99 (m, 1H) 7,15 (m, 1H); 7,41 (m, 1H).

#### *NAMH*

Die Synthese von NAMH wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 287 mg (1,24 mmol, Ausbeute: 40 %) roter Feststoff erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3,24 (d, 2H); 3,80 (s, 3H); 4,90 (m, 1H); 5,44 (s, 2H); 6,21 (d, 1H); 6,86 (d, 2H); 7,05 (d, 2H); 7,43 (s, 1H).

#### *NANH*

Die Synthese von NANH wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es wurden 40 mg (0,16 mmol, Ausbeute: 5 %) oranger Feststoff erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 2,85 (s, 6H); 3,03 (d, 2H); 4,80 (m, 1H); 6,32 (d, 1H); 6,74 (s (NH<sub>2</sub>) + d, 2+2); 7,05 (d, 2H); 7,23 (s, 1H).

#### *NABH*

Nicotinamid (4,88 g; 40 mmol) wurde in 40 ml Acetonitril gelöst und Benzylbromid (4,8 ml; 40 mmol) wurde hinzugegeben. Es wurde für 16 h unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50 ml MTBE hinzugegeben. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und dreimal mit MTBE gewaschen. Es wurden 11,54 g (39,4 mmol; 99 %) eines weißen Pulvers erhalten. Unter Stickstoffatmosphäre wurde der weiße Feststoff (11,54 g; 39,4 mmol) in 240 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  gelöst und es wurde Natriumhydrogencarbonat (16,55 g; 197 mmol) hinzugegeben. Natriumdithionit (34,3 g; 197 mmol) wurde portionsweise unter Stickstoffgegenstrom hinzugegeben. Es wurde für 3 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gerührt. Der erhaltene gelbe Feststoff wurde abfiltriert und zweimal mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen. Es wurden 7,2 g (33,6 mmol, Ausbeute: 85 %) in Form eines gelben Pulvers erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3,18 (s, 2H); 4,31 (d, 2H); 4,75 (m, 2H); 5,33 (s, 2H); 5,75 (d, 1H); 7,32 (m, 5H).

### 3.5.2 Cyclovoltammetrische Potentialbestimmungen

Die Cyclovoltammogramme wurden mit den Geräten der Firma EG&Princeton Applied Research aufgenommen. Diese Geräte bestehen aus einem Potentiostat-/Galvanostat M 273A und einem Funktionsgenerator M 175. Elektrochemistry PowerSuit von der Firma Princeton Applied Research wurde als Messprogramm verwendet. Es wurde eine Dreielektrodenanordnung bestehend aus einer Glassy-Carbon-Arbeits Elektrode, einer Platin-Gegenelektrode und einer Silber-Referenzelektrode verwendet. Die Messungen wurden unter Argonatmosphäre in einer 0,1 M Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat Lösung in DMSO (NAAH **1**, NADH **2**, NABH **5**, NAPH **7**) oder Acetonitril (NAMH **6**, NANH **8**) durchgeführt. Als interner Standard wurden Ferrocen/Ferrocenium ( $\text{Fc}^0/\text{Fc}^+$ ) verwendet. Alle Spektren werden gegen Ferrocen/Ferrocenium ( $\text{Fc}^0/\text{Fc}^+$ ) angegeben.

### 3.5.3 Biotransformationen: Initiales Screening

#### *Flavintragende En-Reduktasen*

Zu 700  $\mu\text{l}$  TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) wurden 100  $\mu\text{l}$  Enzymlösung (NCR oder MR, 0,85 mg/ml, End-Konzentration = 85  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 100  $\mu\text{l}$  Substrat-Stocklösung (100 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 100  $\mu\text{l}$  Cofaktor-Stocklösung (100 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 1 ml MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS analysiert.

#### *Flavinfreie En-Reduktase*

Zu 700  $\mu\text{l}$  TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) wurden 100  $\mu\text{l}$  Enzymlösung (NCR oder MR, 0,85 mg/ml, End-Konzentration = 85  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 100  $\mu\text{l}$  Substrat-Stocklösung

(100 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 100  $\mu$ l Cofaktor-Stocklösung (100 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 1 ml MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS analysiert.

#### *Iminreduktasen*

Zu vorgelegtem TRIS-Puffer (ph 7,5, 50 mM) wurde die entsprechende Menge Enzymlösung (IREDst, IREDsr) zupipetiert, sodass eine End-Konzentration von 1250  $\mu$ g/ml und ein Volumen von 380  $\mu$ l erhalten wurde. Dann wurden 10  $\mu$ l Substrat-Stocklösung (100 mM in DMSO, End-Konzentration = 2,5 mM) und 10  $\mu$ l Cofaktor-Stocklösung (200 mM in DMSO, End-Konzentration = 5 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS analysiert.

#### *Alkoholdehydrogenasen*

Zu 380  $\mu$ l Enzymlösung (YADH/HLADH, 0,2 mg/ml in TRIS-Puffer ph 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l Substrat-Stocklösung (80 mM in DMSO, End-Konzentration = 2 mM) und 10  $\mu$ l Cofaktor-Stocklösung (160 mM in DMSO, End-Konzentration = 4 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS analysiert.

#### *P450 Monooxygenasen*

Zu 380  $\mu$ l Enzymlösung (BM3/ $M_{aq}$ , 10  $\mu$ M in TRIS-Puffer ph 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l Substrat-Stocklösung (80 mM in DMSO, End-Konzentration = 2 mM) und



10  $\mu\text{l}$  Cofaktor-Stocklösung (100 mM in DMSO, End-Konzentration = 2,5 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert, mit BSTFA derivatisiert und via GC/MS analysiert.

#### **3.5.4 Untersuchung des Substrat- und Enzymspektrums der synthetischen Cofaktoren**

Zu 480  $\mu\text{l}$  Enzymlösung (NCR/MR: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und OYE1/OYE3: 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Citrat-Puffer pH 7,5, 12 mM) wurden 10  $\mu\text{l}$  Substrat-Stocklösung (100 mM in DMSO, End-Konzentration = 2 mM) und 10  $\mu\text{l}$  Cofaktor-Stocklösung (125 mM in DMSO, End-Konzentration = 2,5 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 20 min bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 500  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS vermessen.

#### **3.5.5 Kinetische Betrachtung von NAPH im direkten Vergleich zu NADH**

##### *Variation der Cofaktor-Konzentration*

Zu 380  $\mu\text{l}$  Enzymlösung (NCR: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Citrat-Puffer pH 7,5, 12 mM) wurden 10  $\mu\text{l}$  Substrat-Stocklösung (40 mM in DMSO, End-Konzentration = 1 mM) und 10  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Cofaktor-Stocklösung (in DMSO, End-Konzentration = 0,1/0,5/1/5/10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischungen wurden für 5/10/15/20/30 min bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS vermessen.

### *Variation der Substrat-Konzentration*

Zu 380  $\mu\text{l}$  Enzymlösung (NCR: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Citrat-Puffer pH 7,5, 12 mM) wurden 10  $\mu\text{l}$  Cofaktor-Stocklösung (40 mM in DMSO, End-Konzentration = 1 mM) und 10  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Substrat-Stocklösung (in DMSO, End-Konzentration = 0,1/0,5/1/5/10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischungen wurden für 5/10/15/20/30 min bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert und das Extrakt via GC/MS vermessen.

## 3.6 Carbenreaktionen

### 3.6.1 Substratspektrum der NH-Insertion

#### *Nicht literaturbekannte Anilinderivate*

Zu 470  $\mu\text{l}$  *E.coli*-P450M<sub>aq</sub>-Lysat (Enzym-Konzentration = 5  $\mu\text{M}$ , aufgeschlossen in KPi-Puffer (pH 8, 100 mM) wurden 10  $\mu\text{l}$  Nukleophil-Stocklösung (500 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu\text{l}$  Ethyldiazoacetat-Stocklösung (500 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10  $\mu\text{l}$  Natriumdithionit-Lösung (500 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 500  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

#### *Neue Stoffklassen*

Zu 370  $\mu\text{l}$  *E.coli*-P450M<sub>aq</sub>-Lysat (Enzym-Konzentration = 23  $\mu\text{M}$ , aufgeschlossen in KPi-Puffer (pH 7,6, 100 mM) wurden 10  $\mu\text{l}$  Nukleophil-Stocklösung (800 mM in DMSO, End-Konzentration = 20 mM), 10  $\mu\text{l}$  Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10  $\mu\text{l}$  Natriumdithionit-

Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 14 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400 µl MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

#### *Neue Reaktion*

Zu 370 µl *E.coli*-P450M<sub>aq</sub>-Lysat (Enzym-Konzentration = 7 µM, aufgeschlossen in KPi-Puffer (pH 7,6, 100 mM) wurden 10 µl Benzaldehyd/Derivat-Stocklösung (800 mM in DMSO, End-Konzentration = 20 mM), 10 µl Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10 µl Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 17 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400 µl MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

### **3.6.2 Kontroll-Experimente**

Für alle in diesem Abschnitt folgende Reaktionen wurde *E.coli* wie unter 3.3 beschrieben exprimiert, aufgeschlossen und mit KPi-Puffer (pH 7,6, 100 mM) auf eine Protein-Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Dieses erhaltene Lysat wurde wie unten stehend behandelt und dann mit 10 µl Benzaldehyd-Stocklösung (800 mM in DMSO, End-Konzentration = 20 mM), 10 µl Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10 µl Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400 µl MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

#### *Dialyse*

10 ml *E.coli*-Lysat wurden in ein 12 kDa Ausschlusspolymer eingebracht und zweimal 1 h gegen 5 l TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) dialysiert. Dann wurde über Nacht gegen 5 l TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) dialysiert.

#### *Aufkonzentration*

5 ml *E.coli*-Lysat wurden auf 10 kDa Membranfiltern aufgetragen und bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert. Dann wurde auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und wieder zentrifugiert. Nach der dritten Zentrifugation wurde eine Protein-Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und auf Aktivität getestet.

#### *Aceton-Fällung*

10 ml *E.coli*-Lysat wurden mit 1,1 ml Aceton (End-Konzentration = 10 %) versetzt und 1 h bei 120 rpm und 4 °C geschüttelt. Dann wurde bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert. Diese Schritte wurden für 20, 30, 40, 50 und 60 % Aceton wiederholt. Die erhaltenen Pellets wurden jeweils mit 400 µl TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

#### *Ammoniumsulfat-Fällung*

10 ml *E.coli*-Lysat wurden mit 1,1 ml gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (End-Konzentration = 10 %) versetzt und 1 h bei 120 rpm und 4 °C geschüttelt. Dann wurde bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert. Diese Schritte wurden für 20, 30, 40, 50 und 60 % Ammoniumsulfat wiederholt. Die erhaltenen Pellets wurden jeweils mit 400 µl TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

#### *Hitze-Fällung*

10 ml *E.coli*-Lysat wurden 1 h auf 50 °C erhitzt. Dann wurde bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 400 µl TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

#### *Hohe Salz-Konzentration*

Die bei der Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Überstände von 20, 30, 40, 50 und 60 % Ammoniumsulfat wurden jeweils ohne Dialyse auf Aktivität getestet. Obwohl bei der Fraktion von 20 % (1,14 M Ammoniumsulfat) mit 1,71 M Ammoniumsulfat (30 %) weiterer aktiver Katalysator gefällt werden konnte zeigte die Fraktion selbst keine Produktbildung.

#### *Abhängigkeit von der Protein-Konzentration*

Zu 0, 100, 200, 300 und 370 µl *E.coli*-Lysat wurde die entsprechende Menge an TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) gegeben sodass ein Endvolumen von 370 µl erreicht wurde. Diese Proben wurden auf Aktivität getestet.

#### *Auf-Konzentration*

5 ml *E.coli*-Lysat wurden auf -80 °C gekühlt und anschließend lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff wurde mit 5 ml TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) und 10 min bei 120 rpm und 4 °C geschüttelt. Die erhaltene Suspension wurde bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 400 µl TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

### 3.6.3 Aufreinigung 1

#### *Anionenaustausch*

Es wurden 22 ml *E.coli*-Lysat (Protein-Konzentration = 10 mg/ml) mit einem 0,45  $\mu$ m Spritzenfilter filtriert und mittels einer 50 ml Probenschleife und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine TOYOPEARL DEAE 650M-Anionenaustauschsäule (Säulenvolumen 30 ml) aufgebracht. Als Laufmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) und als Elutionsmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM, 1 M Natriumchlorid) verwendet. Bei einem Fluss von 5 ml/min wurde die Konzentration an Elutionsmittel in 10 %-Schritten erhöht. Jede Konzentration wurde für 2,5 Säulenvolumina beibehalten. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 10 ml. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils mit 3 g Ammoniumsulfat versetzt und 10 min bei 120 rpm und 4 °C geschüttelt. Dann wurde bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden mit 400  $\mu$ l TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

#### *Größenausschluss*

Die beschriebene Anionenaustauschchromatographie wurde dreimal wiederholt und die erhaltenen Fraktionen B9-C1 wurden auf 10 kDa Membranfiltern aufgetragen und bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert bis ein Endvolumen von 10 ml erreicht war. Diese Probe wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,1 ml/min auf eine Sephacryl S-200 HR-Größenausschlussssäule (Säulenvolumen 530 ml) aufgebracht. Als Laufmittel wurde Ammoniumacetat-Puffer (pH 7,5, 5 mM) verwendet. Die Probe wurde bei 0,3 ml/min ohne Verwendung eines Elutionsmittels für 1,5 Säulenvolumina eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert und anschließend mit 400  $\mu$ l TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

### 3.6.4 Aufreinigung 2

#### *Anionenaustausch*

Es wurden 22 ml *E.coli*-Lysat (Protein-Konzentration = 10 mg/ml) mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und mittels einer 50 ml Probenschleife und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine TOYOPEARL DEAE 650M-Anionenaustauschsäule (Säulenvolumen 30 ml) aufgebracht. Als Laufmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) und als Elutionsmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM, 1 M Natriumchlorid) verwendet. Bei einem Fluss von 5 ml/min wurde die Konzentration an Elutionsmittel auf 10 % erhöht. Dann wurde ein Gradient über 10 % für drei Säulenvolumina angelegt. Die Fraktionen während des Gradienten wurden in jeweils 10 ml Volumen gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils dialysiert (Ammoniumacetat-Puffer pH 7,5, 5 mM), anschließend lyophilisiert und dann mit 400 µl TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

#### *Hydrophobe Interaktion*

Es wurden 22 ml *E.coli*-Lysat (Protein-Konzentration = 10 mg/ml) mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und mittels einer 50 ml Probenschleife bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine Phenylsepharose-HP-Hydrophobe Interaktionschromatographiesäule (Säulenvolumen 11 ml) aufgebracht. Als Laufmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM, 1 M Ammoniumsulfat) und als Elutionsmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) verwendet. Bei einem Fluss von 5 ml/min wurde die Konzentration an Elutionsmittel auf 50 % erhöht. Dann wurde die Konzentration an Elutionsmittel in 10 %-Schritten erhöht. Die Fraktionen wurden in Volumen zu 10 ml gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils dialysiert (Ammoniumacetat-Puffer pH 7,5, 5 mM), anschließend lyophilisiert und

dann mit 400  $\mu$ l TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) versetzt und auf Aktivität getestet.

#### *Kombination aller Schritte*

Es wurden 22 ml *E.coli*-Lysat (Protein-Konzentration = 10 mg/ml) mit einem 0,45  $\mu$ m Spritzenfilter filtriert und mittels einer 50 ml Probenschleife bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine TOYOPEARL DEAE 650M-Anionenaustauschsäule (Säulenvolumen 30 ml) aufgebracht. Als Laufmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) und als Elutionsmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM, 1 M Natriumchlorid) verwendet. Bei einem Fluss von 5 ml/min wurde die Konzentration an Elutionsmittel auf 10 % erhöht. Dann wurde ein Gradient über 10 % für drei Säulenvolumina angelegt. Die Fraktionen 17-22 wurden gesammelt und auf 10 kDa Membranfiltern aufgetragen und bei 9500 x g, 4 °C 60 min zentrifugiert. Es wurden 50 ml Konzentrat erhalten, die mit 50 ml 3 M Ammoniumsulfat-Lösung (End-Konzentration = 1,5 M) versetzt und 60 min bei 120 rpm und 4 °C geschüttelt wurden. Die erhaltene Suspension wurde bei 9500 x g, 4 °C für 60 min zentrifugiert und der Feststoff verworfen. Vom Überstand wurden je 20 ml mit einem 0,45  $\mu$ m Spritzenfilter filtriert und mittels einer 50 ml Probenschleife bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine Phenylsepharose-HP-Hydrophobe Interaktionschromatographiesäule (Säulenvolumen 11 ml) aufgebracht. Als Laufmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM, 1 M Ammoniumsulfat) und als Elutionsmittel wurde TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) verwendet. Bei einem Fluss von 5 ml/min wurde die Konzentration an Elutionsmittel auf 50 % erhöht. Dann wurde die Konzentration an Elutionsmittel in 10 %-Schritten erhöht. Es wurde nur die Fraktion 4 gesammelt, lyophilisiert und anschließend mit 400  $\mu$ l TRIS-Puffer versetzt. Die so erhaltenen Suspensionen wurden zur Sequenzierung gegeben.



### 3.6.5 Evaluation der sequenzierten Proteine

#### *Reaktion mit $\alpha$ -Methylbenzylamin*

Zu 370  $\mu$ l aufgereinigtem Enzym (Enzymend-Konzentration = 20  $\mu$ M, TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l  $\alpha$ -Methylbenzylamin-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu$ l Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10  $\mu$ l Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

#### *Reaktion mit Benzaldehyd*

Zu 370  $\mu$ l aufgereinigtem Enzym (Enzymend-Konzentration 20  $\mu$ M, TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l Benzaldehyd-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu$ l Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10  $\mu$ l Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

### 3.6.6 Charakterisierung von YfeX als Katalysator der triphenylphosphinfreien Carbonyl-Olefinierung

#### *Variation der Benzaldehyd-Konzentration*

Zu 370  $\mu$ l aufgereinigtem YfeX (Enzymend-Konzentration = 20  $\mu$ M, TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l Benzaldehyd-Stocklösung (40, 80, 200, 400 mM in

DMSO, End-Konzentrationen = 1, 2, 5, 10 mM), 10  $\mu$ l Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) und 10  $\mu$ l Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

#### *Variation der Ethyldiazoacetat-Konzentration*

Zu 370  $\mu$ l aufgereinigtem YfeX (Enzymend-Konzentration = 20  $\mu$ M, TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l Benzaldehyd-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu$ l Ethyldiazoacetat-Stocklösung (40, 200, 400, 800, 2000 mM in DMSO, End-Konzentrationen = 1, 5, 10, 20, 50 mM) und 10  $\mu$ l Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

#### *Variation der Natriumdithionit-Konzentration*

Zu 370  $\mu$ l aufgereinigtem YfeX (Enzymend-Konzentration = 20  $\mu$ M, TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu$ l Benzaldehyd-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu$ l Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentrationen = 10 mM) und 10  $\mu$ l Natriumdithionit-Lösung (40, 400, 800, 2000 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 1, 10, 20, 50 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu$ l MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

*Variation der YfeX Konzentration*

Zu 25, 125, 250 und 370  $\mu\text{l}$  aufgereinigtem YfeX (Enzym-Konzentration = 160  $\mu\text{M}$ , TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurde jeweils die entsprechende Menge an TRIS-Puffer (pH 7,5, 50 mM) gegeben um ein Endvolumen von 370  $\mu\text{l}$  zu erhalten (Enzymend-Konzentration = 10, 50, 100 und 148  $\mu\text{M}$ , TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM). Dann wurden 10  $\mu\text{l}$  Benzaldehyd-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu\text{l}$  Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentrationen = 10 mM) und 10  $\mu\text{l}$  Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

**3.6.7 Vergleich potentieller Katalysatoren der Triphenylphosphin beinhaltenden Carbonyl-Olefinierung**

Zu 370  $\mu\text{l}$  Katalysator-Lösung (End-Konzentration 20  $\mu\text{M}$ , TRIS-Puffer pH 7,5, 50 mM) wurden 10  $\mu\text{l}$  Benzaldehyd-Stocklösung (40, 80, 200, 400 mM in DMSO, End-Konzentrationen = 1, 2, 5, 10 mM), 10  $\mu\text{l}$  Ethyldiazoacetat-Stocklösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM), 10  $\mu\text{l}$  Natriumdithionit-Lösung (400 mM in KPi-Puffer, End-Konzentration = 10 mM) und 10  $\mu\text{l}$  Triphenylphosphin-Lösung (400 mM in DMSO, End-Konzentration = 10 mM) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde mit 400  $\mu\text{l}$  MTBE extrahiert und via GC/MS vermessen.

---

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Rifamycine

#### 4.1.1 Geeignetes Oxidationsmittel

Mit den unter 1.3 beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Enzymen sich lediglich auf die Oxidation beschränkt. Alternative Oxidationsmittel wie Natriumnitrit und  $\text{MnO}_2$  schieden aus den in der Einleitung erwähnten Gründen wie Nachhaltigkeit und Kostenersparnis aus. Als vorteilhafte potentielle Oxidationsmittel wurden deshalb Ammoniumpersulfat (APS) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) getestet. Da aus der Literatur bekannt ist, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit Fe(II) unter Bildung von OH-Radikalen reagiert, wurde dieses zum Vergleich zugegeben.<sup>101</sup> Es wurden folgende Werte erhalten (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Umsetzung von Rifamycin B mit verschiedenen Oxidationsmitteln. Angegeben sind die Umsätze in %.

|  | Rifamycin B | Rifamycin O | Rifamycin S |
|--|-------------|-------------|-------------|
| $\text{H}_2\text{O}_2$                 | 28          | 28          | 44          |
| $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{FeSO}_4$ | 21          | 16          | 63          |
| APS                                    | 2           | 32          | 66          |

Es ist zu erkennen, dass sowohl  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit  $\text{FeSO}_4$  als auch APS zu guten Ausbeuten an Rifamycin S führten. Da aber die Oxidation mit APS vollständig ablief, wurde es für die folgenden Experimente als Oxidationsmittel verwendet.

### 4.1.2 Geeignete Methanol-Konzentration

Wie ich in meiner Diplomarbeit gezeigt habe, hat die tatsächlich auftretende Konzentration an Rifamycin O einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Rifamycin S.<sup>36</sup> Sobald eine gewisse Konzentration an Rifamycin O überschritten wird, fällt dieses aus und ist als Feststoff für die weitere Hydrolyse nicht mehr zugänglich. Da dieses Verhalten in sauren Lösungen deutlich ausgeprägter ist, wurden weiterhin basische Lösungen verwendet. Des Weiteren lässt sich das Präzipitieren von Rifamycin O durch Erhöhung des Methanol-Gehaltes der verwendeten Lösungen unterdrücken. Wenn 10 mM Rifamycin B eingesetzt wird entsteht in dem System eine gewisse Menge an Rifamycin O. Um die Mindestmenge an Methanol, die benötigt wird um diese Menge an Rifamycin O in Lösung zu halten, wurde die Methanol Menge in 10 % Schritten erhöht (siehe Abbildung 12):

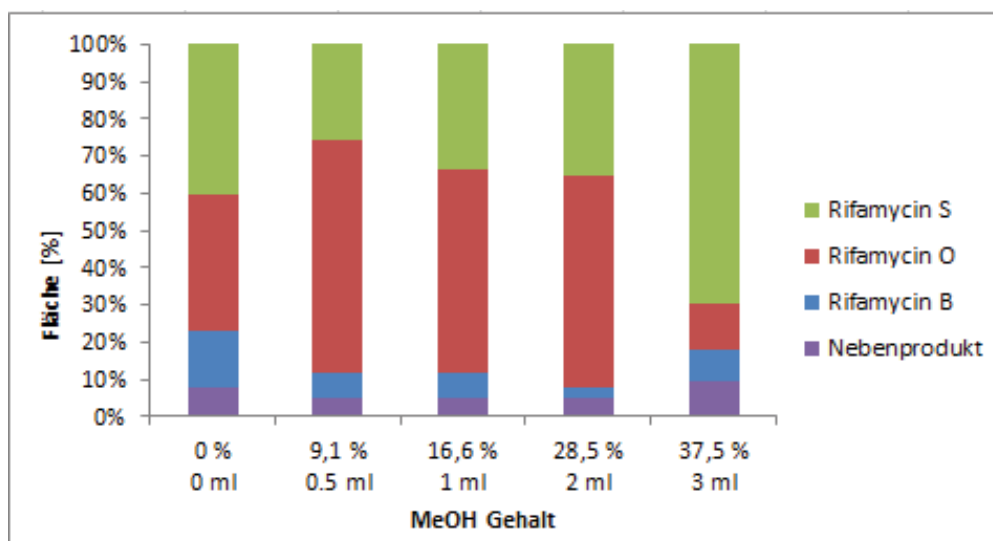


Abbildung 12: Produktverteilung bei schrittweiser Erhöhung des Methanolgehaltes.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Konzentration von 28,5 % Methanol, noch große Mengen an Rifamycin O vorhanden sind. Wird dagegen 37,5 % Methanol verwendet steigt der Anteil an Rifamycin S deutlich an was auf die bessere

Hydrolyse von gelöstem Rifamycin O zurückzuführen ist. Deutlich hervorzuheben ist jedoch die Tatsache, dass dieses Ergebnis nur für die verwendete Startkonzentration von 10 mM Rifamycin B gilt. Bei höherer Rifamycin B Konzentration kann bei schneller Oxidation auch eine größere Menge an Rifamycin O entstehen, sodass auch eine höhere Menge an Methanol zur Verhinderung der Präzipitation benötigt würde.

### 4.1.3 Zeitverlauf

Die unter 4.1.2 festgestellte Mindestmenge von 37,5 % Methanol wurde auf die Produktbildung im zeitlichen Verlauf untersucht. In Abbildung 13 ist das Verhältnis der Produkte über eine Zeitspanne von 240 min dargestellt:

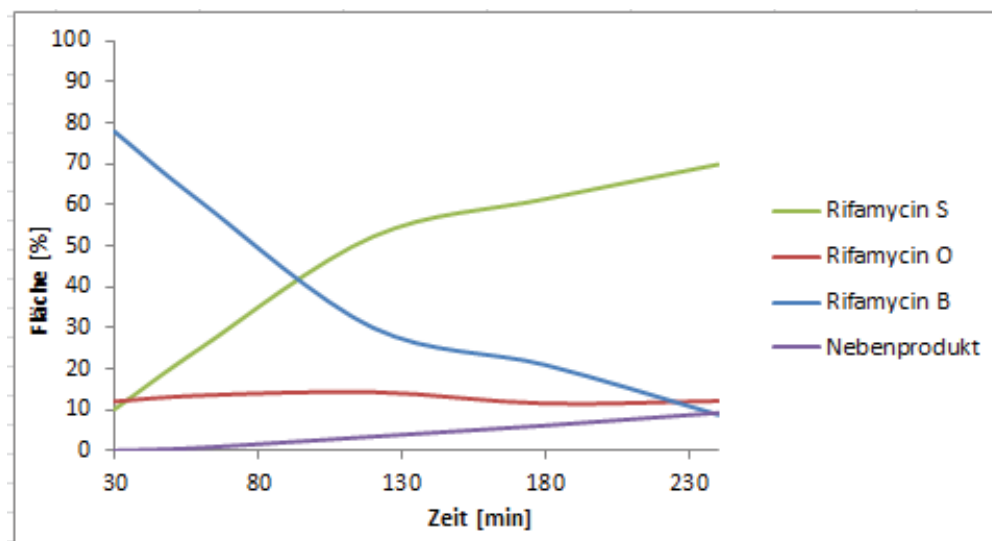


Abbildung 13: Produktverteilung der Reaktion von Rifamycin B zu Rifamycin S aufgetragen gegen die Zeit.

Die Bildung an Rifamycin S ist direkt proportional zur Abnahme an Rifamycin B. Bemerkenswert ist auch die Beobachtung, dass die Menge an Rifamycin O zu keiner Zeit eine Grenze, hier 1,2 mM, überschreitet. Diese Feststellung stützt die

Hypothese, dass die entsprechende Konzentration an Methanol in der Lage ist, das entstehende Rifamycin O in Lösung und damit für die Hydrolyse verfügbar zu halten.

#### 4.1.4 Hohe Methanol-Konzentration

Da, wie unter 4.1.2 gezeigt wurde, eine Erhöhung der eingesetzten Menge an Rifamycin B auch eine Erhöhung des Methanolgehaltes nach sich zieht, wurde das Verhalten der Systeme bei hohen Methanol-Konzentrationen getestet. Dafür wurde die Rifamycin B Konzentration verzweieinhalbfacht und ein Methanol-Gehalt von 70, 80 und 90 % untersucht (siehe Abbildung 14).

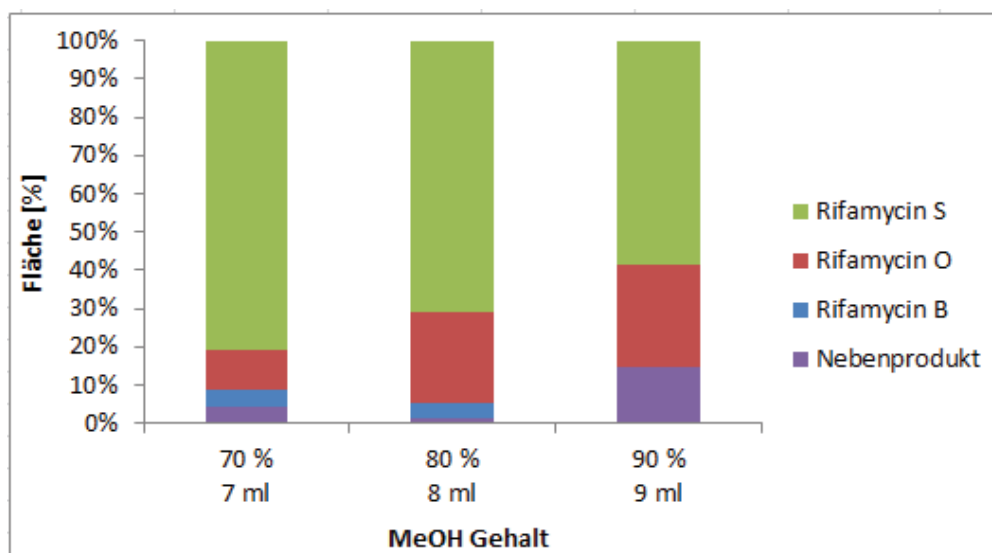


Abbildung 14: Produktverteilung bei schrittweiser Erhöhung des Methanolgehaltes um jeweils 10 %

Bei der Betrachtung der Oxidation klar ersichtlich, dass eine hohe Methanolkonzentration die Reaktion nicht verlangsamt, sondern im Gegenteil eher befördert. Allerdings wird die Hydrolyse gehindert und die Bildung des unerwünschten Nebenproduktes nimmt zu.

### 4.1.5 Reaktion in reinem Methanol

#### *Nachweis der Umesterung*

Die postulierte basenkatalysierte Hydrolyse (Schema 2) von Rifamycin O ist ein Spezialfall einer Esterhydrolyse. Die Experimente aus meiner Diplomarbeit bestätigen diese Hypothese: Ein steigender pH-Wert führte zu einer Vergrößerung der Hydrolyseaktivität.<sup>36</sup> Aus dieser Beobachtung folgt eine weitere Hypothese: Wenn eine Esterhydrolyse möglich ist kann auch eine Umesterung möglich sein. Das folgende Experiment wurde wie unter 3.4 beschrieben unter Argon-Schutzgasatmosphäre und mit über  $\text{CaH}_2$  getrocknetem Methanol durchgeführt, um die wässrige Hydrolyse ausschließen zu können.

Nach 20 min bei 60 °C wurden 60 % Rifamycin S nachgewiesen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Umesterung mit Methanol durchgeführt werden kann und die zwei stufige Synthese von Rifamycin S aus Rifamycin B unter Ausschluss von Wasser stattfinden möglich ist.

#### *Einfluss der Konzentration*

Der mit der Verwendung von reinem Methanol einhergehende Vorteil der vergrößerten Löslichkeit von Rifamycin B wurde quantitativ untersucht. Dafür wurden 40 mg Rifamycin B und die äquimolare Menge an APS (12 mg) vorgelegt und mit unterschiedlichen Volumina an Methanol (400  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 600  $\mu\text{l}$ , 1000  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Die dadurch erhaltenen Substratkonzentrationen sowie die Produktverteilung nach 20-minütiger Reaktion bei 60 °C sind in Tabelle 3 dargestellt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da bei 40 mg Rifamycin B die Löslichkeit in 400  $\mu\text{l}$  Methanol deutlich überschritten wird. Da die Produkte gut in Methanol löslich sind, könnte dies das Gleichgewicht verschieben und daher die geringen Konzentrationen bevorzugen. Für die folgenden Optimierungen wurden 132 mM verwendet.



Tabelle 3: Umsetzung von Rifamycin B mit verschiedenen Methanolvolumina.

| Substrat Konzen-<br>tration [mM] | Rifamycin<br>B [%] | Rifamycin<br>O [%] | Rifamycin<br>S [%] | Neben<br>Produkt [%] |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| 53                               | 22                 | 59                 | 18                 | 1                    |
| 88                               | 12                 | 47                 | 36                 | 4                    |
| 106                              | 16                 | 36                 | 46                 | 2                    |
| 132                              | 6                  | 33                 | 52                 | 9                    |

*Reaktion in anderen Lösungsmitteln*

Nach dem positiven Ergebnis der Wasser-freien Rifamycin O Umsetzung wurde die Reaktion in anderen Lösungsmittel getestet (siehe Abbildung 15).

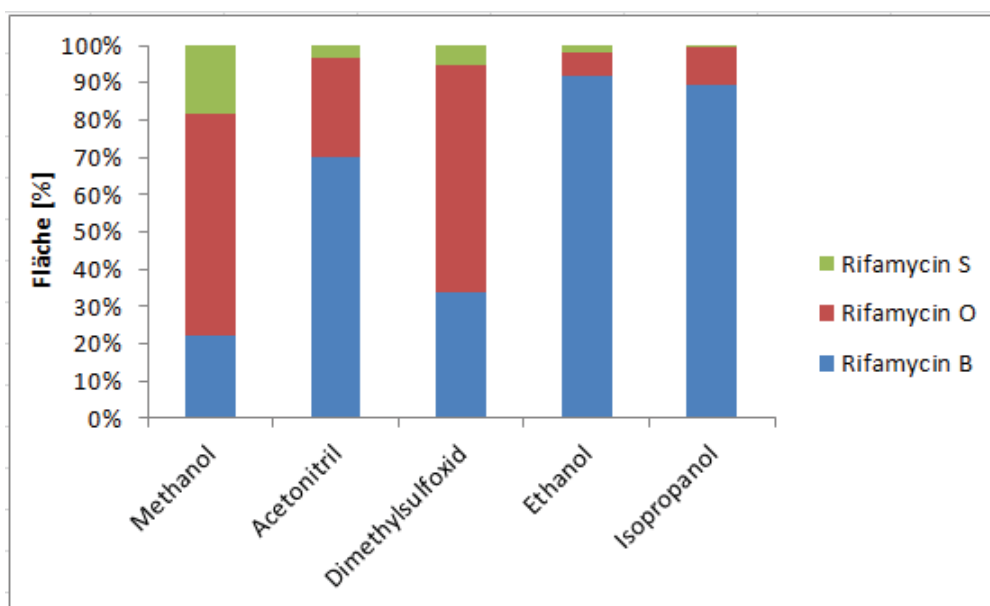


Abbildung 15: Produktverteilung bei Verwendung von jeweils 1000 µl unterschiedlicher Lösungsmittel.

## 4.1 Rifamycine

---

Mit Methanol ist deutlich die beste Oxidations- und Hydrolyseaktivität zu verzeichnen. Die Spuren an Rifamycin S, die bei den anderen Lösungsmittel auftreten, können durch im Lösungsmittel gelöstes Wasser erklärt werden, da dieses Experiment nicht mit getrockneten Lösungsmittel durchgeführt wurde.

### *Optimierung der Reaktion*

Die Tatsache, dass Methanol in der Lage ist nicht nur als Lösungsmittel zu fungieren sondern auch die Abspaltung des Acetals zu bewerkstelligen muss nicht bedeuten, dass reines Methanol die beste Reaktionsbedingung für die Reaktion darstellt. Daher wurde der Einfluss kleiner KPi-Puffermengen auf die Produktbildung getestet (siehe Abbildung 16).

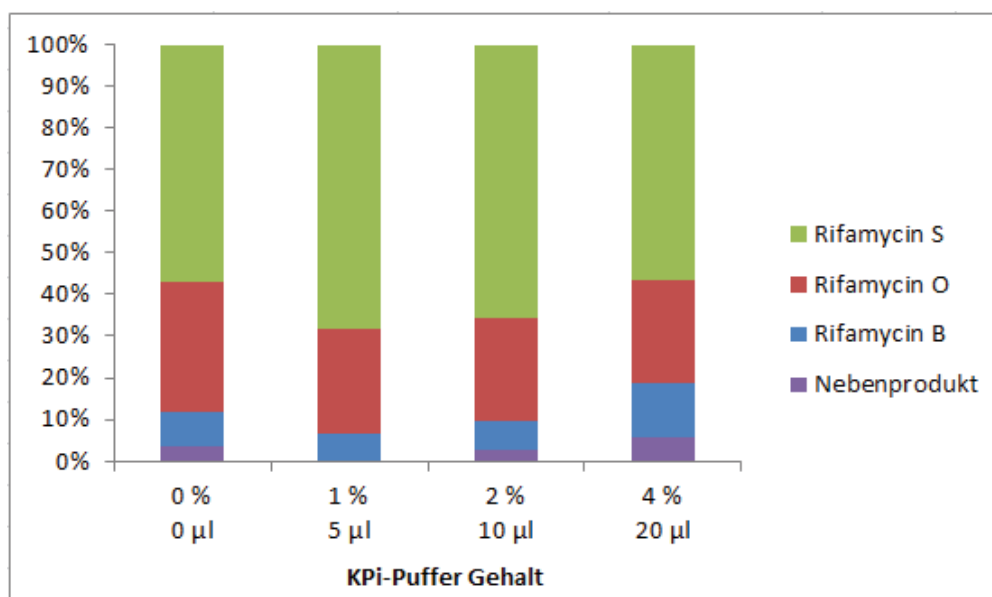


Abbildung 16: Produktverteilung bei Verwendung unterschiedlicher Mengen an KPi-Puffer.

Es ist zu erkennen, dass die Hydrolyse ohne Zugabe von Puffer erwartungsgemäß

nicht optimal ist. Die Zugabe von 1 % Puffer verbessert die Hydrolyse ohne die Oxidation zu verlangsamen. Bei einem höherem Anteil an Puffer wird die Oxidation schlechter, weswegen die optimale Puffermenge 1% beträgt.

## 4.2 Nicotinamid-Cofaktoren

### 4.2.1 Potentiale der synthetisierten Cofaktoren

Die Potentiale der Nicotinamid-Cofaktoren wurden wie in 3.5 angegeben mittels Cyclovoltammetrie bestimmt.<sup>102</sup> Hierfür wurden Cyclovoltammogramme, wie in Abbildung 17 für NADH **2**, NAAH **1**, NABH **5** und NAPH **7** dargestellt, aufgenommen. Die aus den Cyclovoltammogrammen abgelesenen Oxidationspotentiale

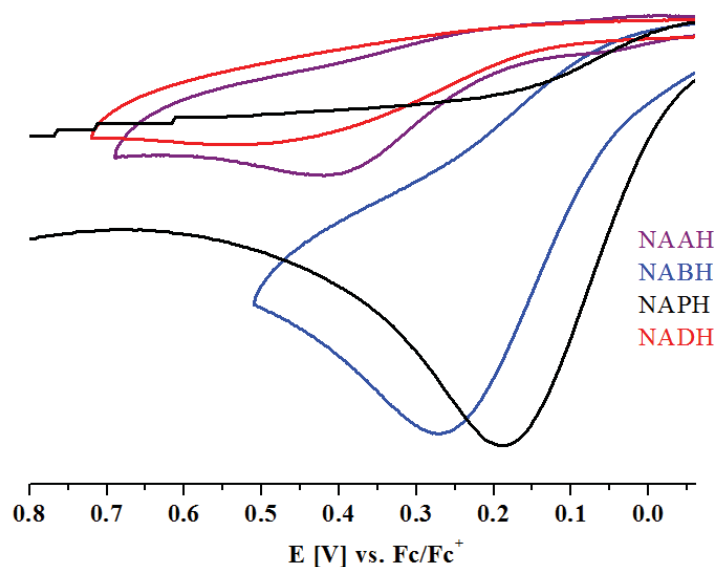


Abbildung 17: Cyclovoltammogramm von NADH **2**, NAAH **1**, NABH **5** und NAPH **7** aufgenommen in DMSO. Als Referenzelektrode wurde Glassy Carbon und als Referenzsubstanz Ferrocen verwendet. Gemessen von Dipl. Chem. I. Löw.

(E) wurden anschließend gegen die Standard-Wasserstoffelektrode (SHE) unter Zuhilfenahme des Standards Ferrocen ( $E=0,4$  V gegen die SHE)<sup>103,104</sup> umgerechnet und somit vergleichbar gemacht. Die so erhaltenen Oxidationspotentiale sind aus Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Aus Cyclovoltammogrammen entnommene Oxidationspotentiale E gegen die SHE umgerechnet.

|               | NADH | NAAH  | NABH  | NAMH  | NAPH  | NANH  |
|---------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $E^\circ$ [V] | 0,12 | -0,02 | -0,07 | -0,21 | -0,22 | -0,52 |

#### 4.2.2 Initiales Aktivitätsscreening

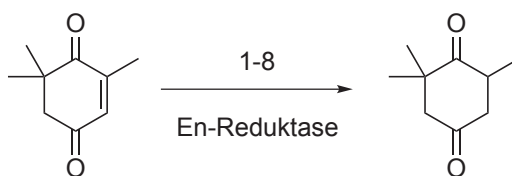
Um die generelle Aktivität der synthetischen Nicotinamid-Cofaktoren zu untersuchen wurde ein Set an Nicotinamid-Cofaktor-abhängigen Enzymen zusammengestellt und mit den entsprechenden Standard-Substraten umgesetzt. Zu den getesteten Enzymen gehörten die Folgenden:

- Flavin-abhängige En-Reduktasen (Morphinon Reduktase aus *Pseudomonas putida* M10 (MR)<sup>105</sup> und Nicotinamid dependent cyclohexenone reductase aus *Zymomonas mobilis* (NCR)<sup>106</sup>)
- Flavin-freie En-Reduktase aus *Nicotinia tabacum* (NtDDBR)<sup>107</sup>
- R-spezifische Iminreduktasen (aus *Streptosporangium roseum* (IREDSr) und aus *Streptomyces turgidiscabies* (IREDst))<sup>108</sup>
- Alkohol Dehydrogenase (aus Hefe (YADH) und aus Pferdeleber (HLADH))<sup>59</sup>
- P450 Monooxygenasen (P450 BM3,  $M_{aq.}$ )<sup>109</sup>

Diese ersten Ergebnisse wurden nicht quantifiziert, da die Frage nach der generellen Aktivität mit synthetischen Cofaktoren zu Beginn des Projektes nur positiv oder negativ zu beantworten war. Um sie jedoch relativieren zu können wurde den synthetischen Cofaktoren (NAAH **1**, NACMH **4**, NABH **5**, NAMH **6**, NAPH **7**, NANH **8**) die Reaktion mit den natürlichen Cofaktoren NADH **2** und NADPH **3** gegenübergestellt.

#### *Flavin-tragende En-Reduktasen*

Die erste mit den synthetischen Cofaktoren getestete Reaktion war eine von En-Reduktasen katalysierte C=C Bindungsreduktion (siehe Schema 9)



Schema 9: Reduktion von Ketoisophoron zu Levodion, katalysiert von einer En-Reduktase.

In Abbildung 18 ist ein GC-Chromatogramm nach 14 h Reaktionszeit zu sehen. Verwendet wurde aufgereinigter NCR Wildtyp und die Cofaktoren **1**, **2**, **4**, **5**, **6**, **7** und **8** wie unter 3.5 beschrieben. Es ist gut zu erkennen, dass die Cofaktoren alle vergleichbare Ergebnisse zeigen. Die lange Reaktionszeit von 14 h führt zur Vernachlässigung kinetischer Effekte. Interessant ist die nur 50 %ige Umsetzung des Substrates trotz äquimolerer Zugabe von Substrat und Cofaktor. Produktinhibierung durch den Cofaktor oder das Produkt, oder Enzyminaktivierung wären denkbare Erklärungen.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei dem positiven Ergebnis mit NCR um einen Einzelfall handelt, wurde eine weitere Flavin-abhängige En-Reduktase, die

## 4.2 Nicotinamid-Cofaktoren

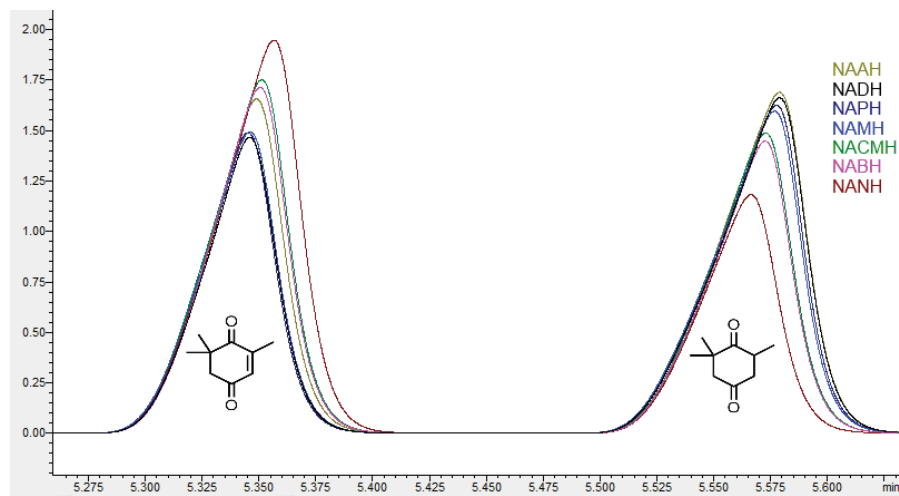


Abbildung 18: Überlagerte GC-Chromatogramme der Umsetzungen von Ketoisophon mit NCR WT und verschiedenen Cofaktoren.

MR, mit der gleichen Reaktion (Schema 9) getestet (siehe Abbildung 19).

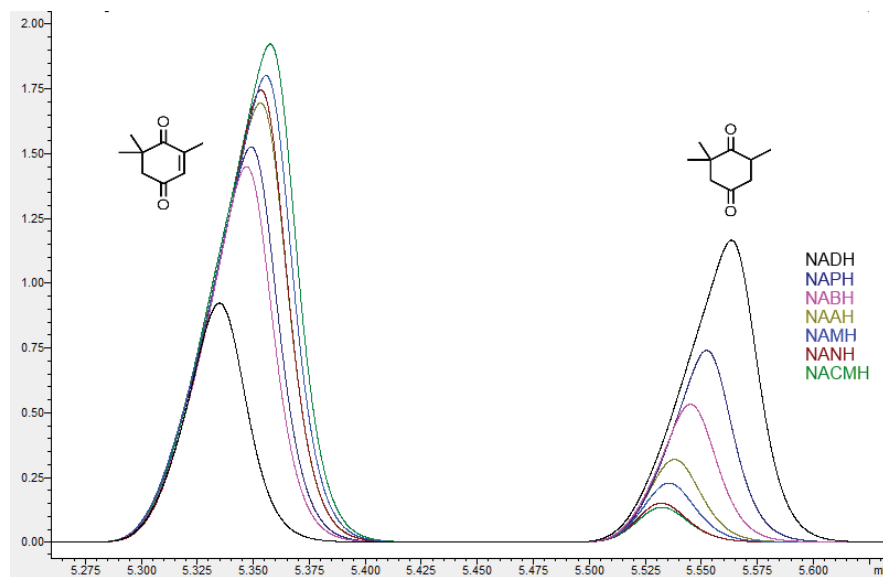


Abbildung 19: Überlagerte GC-Chromatogramme der Umsetzungen von Ketoisophon mit MR WT und verschiedenen Cofaktoren.

Dieses Experiment zeigt eine weitere erfolgreiche Katalyse mit synthetischen Co-

faktoren, auch wenn die Abweichungen von der Reaktion mit dem natürlichen Cofaktor größer als bei der Reaktion mit NCR sind. Die MR scheint eine ausgeprägtere Cofaktorspezifität als NCR zu haben, dennoch scheinen Flavin-abhängige En-Reduktasen als Katalysatoren in diesem System geeignet zu sein.

### *Flavin-freie En-Reduktasen*

Die Veröffentlichung einer Flavin-freien En-Reduktase von Nigel Scrutton *et al.* ermöglichte den Vergleich von Flavin-abhängigen und -freien En-Reduktasen in Systemen mit synthetischen Cofaktoren. In diesem Experiment wurden die gleichen Cofaktoren wie beim initialen Aktivitätsscreen der Flavin-abhängigen En-Reduktasen (4.2.2) verwendet. In Abbildung 20 ist klar ersichtlich, dass keine Umsetzung mit den synthetischen Cofaktoren stattfand.

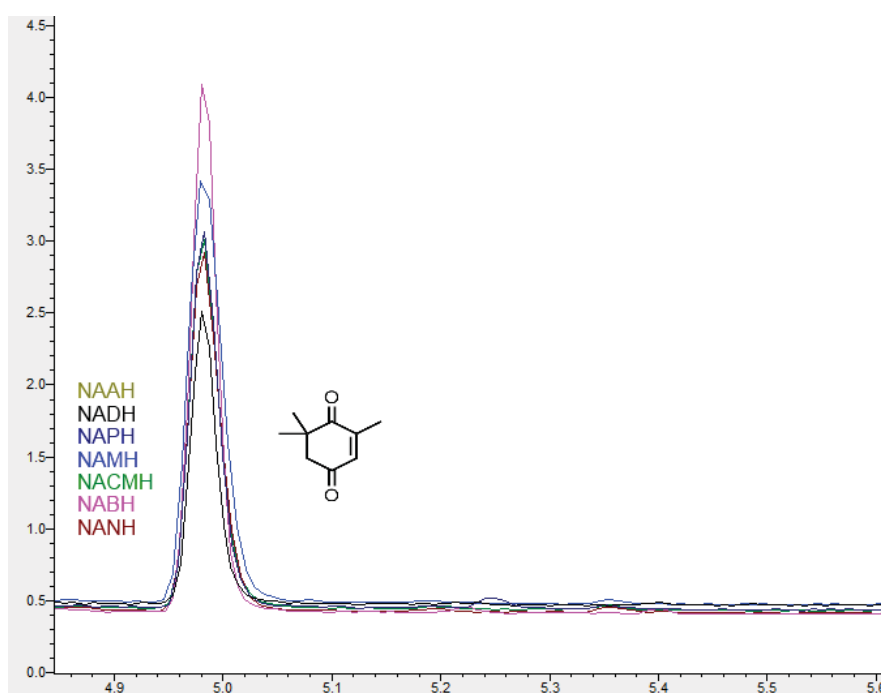
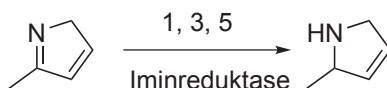


Abbildung 20: Überlagerte GC Chromatogramme der Umsetzungen von Ketoisophon mit NtDBR und verschiedenen Cofaktoren

Dieses Ergebnis war erwartet, da schon in der Veröffentlichung eine sehr hohen Spezifität der NtDBR gegenüber NADPH festgestellt wurde (1600:1). Da keine weitere Flavin-freie En-Reduktase vorlag wurde zum Vergleich auf andere ähnliche Flavin-freie Enzyme zurückgegriffen.

### *Iminreduktasen*

Mit dem negativen Ergebnis der NtDBR galt es zu überprüfen, ob die Reaktivität der synthetischen Cofaktoren gänzlich vom Flavin abhängig ist. Eine weitere Doppelbindung reduzierende Enzymklasse sind die Iminreduktasen, die die Reduktion von Iminen zu Aminen katalysieren: (siehe Schema 10)



Schema 10: Reduktion von 2-Methylpyrrol zu 2-Methylpyrrolidin katalysiert von Iminreduktasen

Da dieses Experiment der Kontrolle galt wurde im Folgenden nur der natürliche Cofaktor NADPH **3** mit den zwei synthetischen Cofaktoren NAAH **1** und NABH **5** verglichen. Es wurden zwei verschiedene Iminreduktasen, getestet: IREDsr und IREDst. Die überlagerten Chromatogramme sind in Abbildung 21 dargestellt.

Die Reaktion mit NADPH **3**, die als Positivkontrolle zu verstehen ist, zeigt einen Produkt-Peak (blau). Bei den synthetischen Cofaktoren NAAH **1** und NABH **5** ist hingegen keine Produktbildung nachzuweisen. Dieses Ergebnis spricht für die Inaktivität von NABH **5** und NAAH **1** als Reduktionsäquivalente.



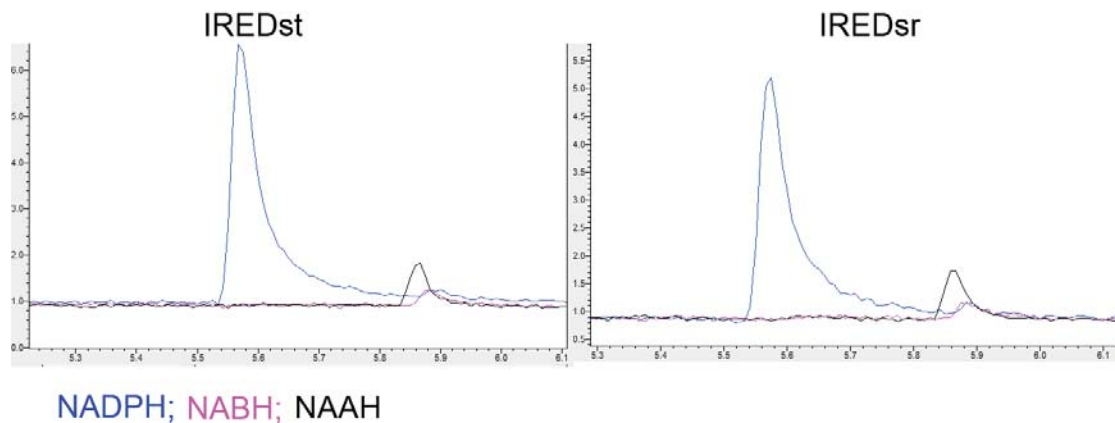
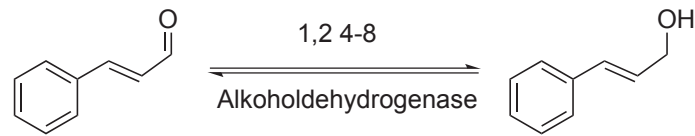


Abbildung 21: Überlagerte GC Chromatogramme der Umsetzungen von 2-Methylpyrrol mit IREDsr, IREDst und verschiedenen Cofaktoren

#### *Alkoholdehydrogenasen*

Wie in der Einleitung (siehe 1.4) beschrieben, haben NADH **2** und NADPH **3** unterschiedliche physiologische Aufgaben. Ihre Unterscheidung ist sehr diffizil und beruht auf unterschiedlichen Bindungsstellen im Enzym. Die bisher untersuchten Flavin-freien Enzyme waren jeweils NADPH-spezifisch, was die Inakzeptanz der synthetischen Cofaktoren erklären kann. Deshalb ist die Untersuchung NADH-abhängiger Flavin-freier Reduktasen der nächste logische Schritt. Als solche kommen Alkoholdehydrogenasen in Frage. Die Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) wird physiologisch dazu genutzt Alkohol zu Acetaldehyd zu oxidieren,<sup>5</sup> während die Alkoholdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe, engl. yeast, YADH) seit Jahrtausenden dazu genutzt wird trinkbaren Alkohol herzustellen (siehe Schema 11).<sup>41</sup>

Es wurden sowohl die HLADH als auch die YADH getestet. Beide Enzyme lagen in lyophilisierter, also in gefriergetrockneter Form vor und wurden für die Reaktion wieder in Lösung gebracht. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 22 zu sehen.



Schema 11: Von Alkoholdehydrogenasen katalysiertes Gleichgewicht zwischen Zimtaldehyd und Zimtalkohol

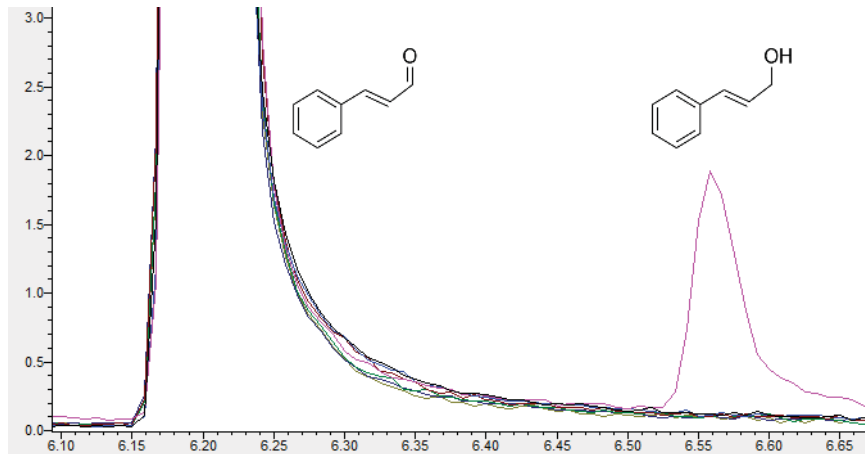
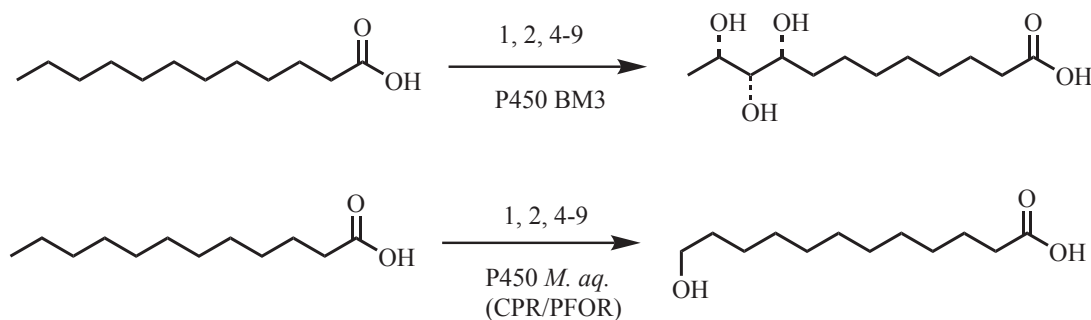


Abbildung 22: Überlagerte GC Chromatogramme der Umsetzungen von Zimtaldehyd zu Zimtalkohol mit YADH und verschiedenen Cofaktoren

Auch in diesem Beispiel ist zu sehen, dass die nicht natürlichen Cofaktoren nicht als Reduktionsäquivalent akzeptiert werden. Der Übergangszustand der Reaktion scheint zu sehr von der Positionierung der zwei Substrate abzuhängen, weswegen im Folgenden Flavin-freie Enzyme von den Experimenten ausgenommen wurden. Stattdessen wurde eine weitere Klasse von Enzymen getestet. Es handelte sich hierbei um Häm-Enzyme, die eine Flavin-abhängige Reduktase vorgeschaltetet haben: Die Enzyme der P450 Familie.

*P450 Monoxygenasen*

In den bisher gezeigten Experimenten war die Fähigkeit nicht natürliche Cofaktoren nutzen zu können eine Eigenschaft, die nur Flavin-abhängigen Enzymen zu eigen war. Die Frage, ob sich diese Cofaktorpromiskuität, also die Fähigkeit andere Cofaktoren als den natürlichen nutzen zu können, ausschließlich auf Enzyme, die nach dem ping-pong bi-bi Mechanismus agieren beschränkt, sollte mit dem folgenden Experiment geklärt werden. Die Enzyme der P450 Familie besitzen wie unter 1.4 beschrieben eine Flavinkaskade die in der Reduktion von Häm endet, das wiederum  $O_2$  aktiviert. Die aktive  $Fe(IV)=O$  Spezies kann daraufhin die Substrate hydroxylieren (siehe Schema 12).<sup>110</sup>



Schema 12: P450 katalysierte Oxidation von Dodecansäure

Die Arbeiten von Honda und Scheps<sup>109</sup> zeigten, dass es möglich ist die Monooxygenase von *Marinobacter aquaeleoi* CYP153A sowohl mit der Reduktasedomäne der P450 BM3 von *Bacillus megaterium* als auch mit der Reduktasedomäne von *Rhodococcus ruber* (Pfor) zu fusionieren. Im Folgenden wurden die zwei Enzyme CYP153A-PFOR und CYP153A-CPR getestet. Des Weiteren wird das Enzym P450 BM3-CPR (original) der Versuchsreihe hinzugefügt. Es werden die Cofaktoren NAAH **1**, NADPH **3**, NACMH **4**, NABH **5**, NAPH **7** NANH **8** mit dem Substrat Dodecansäure untersucht. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).

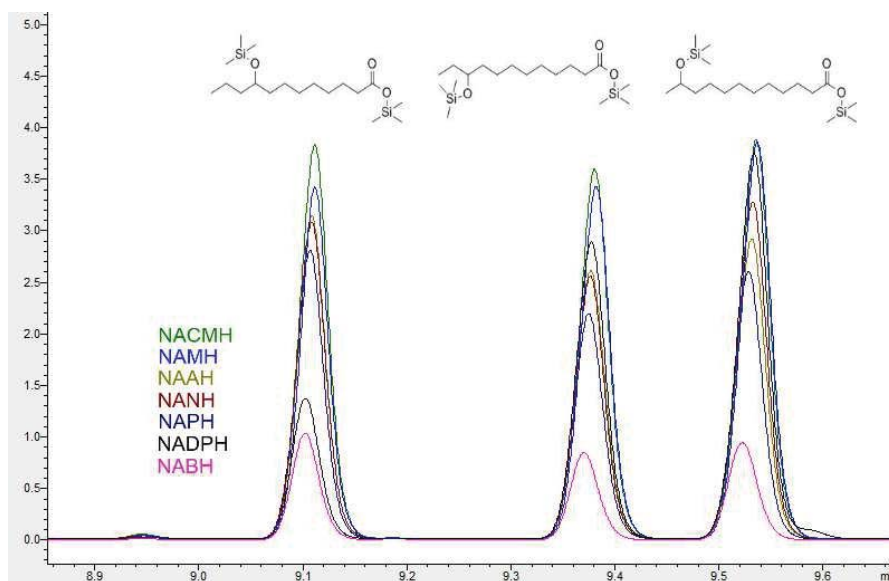


Abbildung 23: P450 BM3-CPR katalysierte Oxidation von Dodecansäure mit verschiedenen Cofaktoren

Die zuvor festgestellte Tendenz, dass ein Flavin im Enzym nötig ist wird hier bestätigt. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen ob das Flavin direkt an der Substratreduktion beteiligt ist oder Teil einer Reduktionskaskade ist. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Enzyme der P450 Familie durch die Sauerstoffaktivierung oxidierend wirken im Gegensatz zu En-Reduktasen die Substrate reduzieren. Das dazu benötigte Reduktionsäquivalent kann sowohl von den natürlichen wie auch von den synthetischen Cofaktoren stammen.

### 4.2.3 Untersuchung des Substrat- und Enzymspektrums der synthetischen Cofaktoren

Dass arylderivatisierte Nicotinamid Cofaktoren als alternative Hydridendonoren zu NADH **2** dienen können, konnte im vorangegangenen Abschnitt (4.2.2) für En-Reduktasen und Enzyme der P450 Familie gezeigt werden. Die einfache Expres-

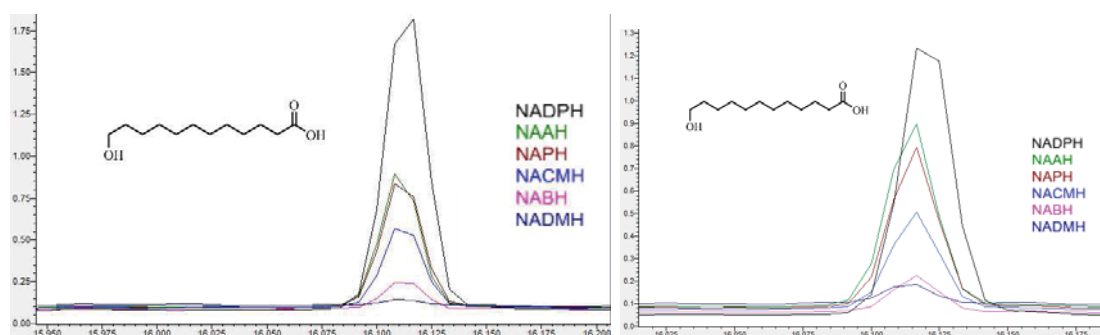
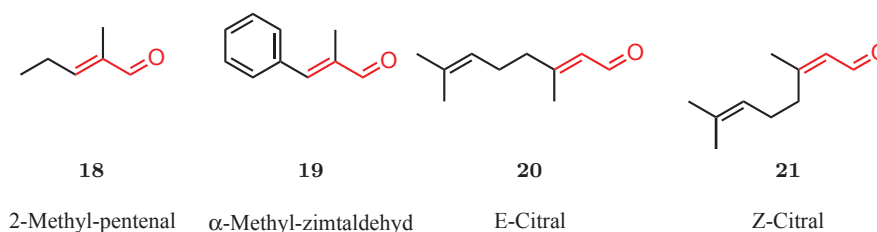


Abbildung 24: Von P450 Maq-PFOR (links) und P450 Maq-CPR (rechts) katalysierte Oxidation von Dodecansäure

sion, die hohe Lösungsmitteltoleranz und ausgezeichnete Aktivität machten die En-Reduktasen zur ersten Wahl für weitere Experimente. Um die Interaktion mit unterschiedlichen Substraten zu untersuchen wurden folgende Enzyme gewählt: Nicotinamid dependent cyclohexenone reductase (NCR), Morphinon Reduktase (MR), Old Yellow Enzyme 1 (OYE1) und Old Yellow Enzyme 3 (OYE3) Als Substrate dienten die in Schema 13 dargestellten, aktivierte Doppelbindungen enthaltenden Moleküle mit unterschiedlichen sterischen Ansprüchen.



Schema 13: Mögliche Substrate für die von En-Reduktasen katalysierte C=C Bindungsreduktion

Die Cofaktoren betreffend wurde ein Set aus drei synthetischen (NAAH **1**, NABH **5** und NAPH **7**) im Vergleich mit NADH **2** zusammengestellt. NAAH **1** weist ein kleineres, NABH **5** ein vergleichbares und NAPH **7** ein höheres Reduktionspotential im Vergleich zu NADH auf. Da sie eine ähnliche Größe haben, können sie

somit in Relation zueinander gesetzt werden. Die Reaktionen wurden wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt und sind in Tabelle 5 - Tabelle 8 dargestellt.

Auch in diesem Experiment konnte bestätigt werden, dass die syn. Cofaktoren sehr gute Surrogate sind. Mehr noch konnte gezeigt werden, dass sie oftmals besser als der natürliche Cofaktor NADH funktionieren.

Tabelle 5: Umsetzung mit NCR

| Umsetzung [%]             | NAAH       | NADH       | NABH       | NAPH       |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 2-Methyl-pental (18)      | 53.7 ± 5.0 | 68.6 ± 1.2 | 54.2 ± 2.6 | 82.0 ± 3.5 |
| α-Methyl-zimtaldehyd (19) | 65.2 ± 4.8 | 68.7 ± 1.1 | 66.1 ± 2.7 | 95.6 ± 3.1 |
| E-Citral (20)             | 74.0 ± 1.0 | 33.0 ± 0.5 | 68.0 ± 1.6 | 91.9 ± 6.9 |
| Z-Citral (21)             | 62.3 ± 0.8 | 46.8 ± 9.5 | 51.3 ± 6.3 | 88.9 ± 9.3 |

Bei der Umsetzung mit NCR ist schon nach 20 Minuten ein hoher Umsatz für alle Substrate festzustellen. α-Methyl-zimtaldehyd **19** zeigt die höchsten Umsätze, was durch die zusätzliche Aktivierung durch den aromatischen Ring zu erklären ist. Dabei scheint auch der erhöhte Platzbedarf im aktiven Zentrum im Vergleich zu 2-Methyl-pental **18** nicht zum Nachteil zu werden. Werden die sterisch anspruchsvollsten Substrate des Sets E- und Z-Citral betrachtet, kann festgestellt werden, dass im Besonderen NADH empfindlich auf die Vergrößerung reagiert. Ungeachtet dessen ist NAPH für alle getesteten Substrate mit NCR der beste Cofaktor und zeigt ausgezeichnete Umsetzungen.

Die Morphinon Reduktase ist im Vergleich zu NCR ein deutlich schlechterer Katalysator. Die besten Umsätze zeigen sich bei den Substraten 2-Methyl-pental **18** und α-Methyl-zimtaldehyd **19** mit dem Cofaktor NADH und liegen bei 24 - 28 %. NAPH ist nahezu gleich (18 und 23 % respektive) und zeigt die generell schlechte

Tabelle 6: Umsetzung mit MR

| Umsetzung [%]                      | NAAH       | NADH       | NABH       | NAPH       |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 2-Methyl-pentenal ( <b>18</b> )    | 12.2 ± 0.1 | 24.1 ± 3.3 | 10.2 ± 0.6 | 18.5 ± 2.3 |
| α-Methyl-zimtaldehyd ( <b>19</b> ) | 17.8 ± 0.5 | 27.6 ± 0.4 | 18.3 ± 0.4 | 22.8 ± 0.2 |
| E-Citral ( <b>20</b> )             | 1.9 ± 0.1  | 4.3 ± 0.1  | 1.6 ± 0.1  | 2.5 ± 0.1  |
| Z-Citral ( <b>21</b> )             | 5.0 ± 0.1  | 10.2 ± 0.1 | 3.8 ± 0.4  | 7.3 ± 0.1  |

Akzeptanz von syn. Cofaktoren genauso deutlich wie wie Umsätze von NAAH und NABH. Dieses Ergebnis bildet das unter 4.2.2 erlangte Ergebnis genau ab. Die übrigen Substrate liegen mit unter 10 % Umsatz weit unter den beschriebenen.

Tabelle 7: Umsetzung mit OYE1

| Umsetzung [%]                      | NAAH       | NADH       | NABH       | NAPH       |
|------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| 2-Methyl-pentenal ( <b>18</b> )    | 18.7 ± 0.7 | 6.6 ± 0.4  | 44.5 ± 0.9 | 36.3 ± 1.2 |
| α-Methyl-zimtaldehyd ( <b>19</b> ) | 45.0 ± 0.2 | 22.9 ± 0.4 | 65.7 ± 2.9 | 85.6 ± 2.7 |
| E-Citral ( <b>20</b> )             | 7.3 ± 0.3  | 1.8 ± 0.1  | 14.1 ± 0.2 | 7.6 ± 0.9  |
| Z-Citral ( <b>21</b> )             | 1.5 ± 0.1  | 0.4 ± 0.0  | 3.0 ± 0.1  | 1.4 ± 0.2  |

OYE1 stellt sich als guter Katalysator dar. Wie auch bei den beiden zuvor beschriebenen Enzymen wird auch hier α-Methyl-zimtaldehyd **19** von allen Cofaktoren besser umgesetzt als 2-Methyl-pentenal **18**. Sehr interessant ist hier das deutliche Verhältnis NAPH:NADH von 6:1 bzw. 4:1 aber auch die anderen Cofaktoren zeigen erhöhte Umsätze gegenüber NADH. Bemerkenswert ist besonders NABH, das bis auf die Reaktion mit α-Methyl-zimtaldehyd **19** die besten Ergebnisse liefert und damit auf eine besondere Effektivität zwischen bestimmten Cofaktoren und

Enzymen hinweist. In diesem Fall scheint das Potential nicht allein ausschlaggebend zu sein, sondern eine wirkungsvolle Hydridübertragung die z.B. durch die Geometrie der aktiven Tasche in Kombination mit der geknickten Struktur von NABH zu Stande kommen könnte.

Tabelle 8: Umsetzung mit OYE3

| Umsetzung [%]                     | NAAH           | NADH           | NABH           | NAPH           |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 2-Methyl-pental (18)              | $30.3 \pm 0.6$ | $21.7 \pm 0.6$ | $51.4 \pm 1.0$ | $31.3 \pm 0.5$ |
| $\alpha$ -Methyl-zimtaldehyd (19) | $32.0 \pm 0.4$ | $19.8 \pm 0.6$ | $52.4 \pm 1.1$ | $37.9 \pm 0.5$ |
| E-Citral (20)                     | $2.7 \pm 0.2$  | $2.8 \pm 0.1$  | $6.6 \pm 0.1$  | $1.7 \pm 0.1$  |
| Z-Citral (21)                     | $1.5 \pm 0.1$  | $1.0 \pm 0.0$  | $4.6 \pm 0.1$  | $0.9 \pm 0.0$  |

Bei der Betrachtung von OYE3 zeigt sich die evolutionäre Verwandtschaft zu OYE1. Wieder ist es NABH, das durchweg die höchsten Umsätze zeigt und in diesem Fall Faktor 2.5 besser als NADH ist. Die Tendenz, dass 2-Methyl-pental **18** und  $\alpha$ -Methyl-zimtaldehyd **19** wesentlich besser umgesetzt werden als E-Citral **20**, Z-Citral **21** und **22** zeigt sich auch hier, mit der Ausnahme, dass OYE3 2-Methyl-pental **18** und  $\alpha$ -Methyl-zimtaldehyd **19** nahezu gleich gut als Substrat akzeptiert.



#### 4.2.4 Kinetische Betrachtung von NAPH im Vergleich zu NADH

Das Experiment bezüglich des Substratspektrums konnte den bisher gezogenen Schluss, dass synthetische Cofaktoren generell für En-Reduktasen geeignet sind nicht nur bestärken, sondern zeigt überdies, dass es Enzym-Cofaktor Kombinationen gibt, die den natürlichen Cofaktor NADH in der Aktivität übertreffen. Weitere hier nicht aufgeführte Ergebnisse zeigten, dass dieser Vorteil umso mehr verschwindet, je länger die Reaktionszeit beträgt. Diese Tatsache ist leicht nachzuvollziehen wenn man bedenkt, dass voller Umsatz nicht übertroffen werden kann. Ist die Reaktionszeit lange genug gewählt, kann auch der langsamste Cofaktor zu den besten aufschließen sofern das Enzym die erforderliche Stabilität besitzt.

Daher scheint die initiale Reaktivität der Cofaktoren weitaus aufschlussreicher als die finale. Jedoch kann die Standardmethode der kinetischen Charakterisierung in diesem Fall nicht angewendet werden. Durch die Veränderung des elektrochemischen Potentials der Cofaktoren verändert sich unvermeidbar auch ihr Absorptionsspektrum. Leider war es nicht möglich wie bei dem Paar NADH/NAD<sup>+</sup> eine geeignete Wellenlänge zur spektroskopischen Verfolgung der Reaktion zu finden. Daher wurde die aufwendigere aber aussagekräftigere Methode der Produktbestimmung mittels GC gewählt. Aussagekräftiger deshalb, da das gebildete Produkt gemessen wird, also die tatsächlich auftretende Reaktion. Bei der alternativen Methode wäre nur die Abnahme an NADH zu messen, die aber auch aus anderen Gründen abnehmen kann. So ist die Flavin-NADH katalysierte Wasserstoffperoxid Produktion aus O<sub>2</sub> beschrieben<sup>111,112</sup> und Reaktionen müssten daher unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt werden.<sup>113-115</sup> In dem hier hier gewählten Ansatz spielen Nebenreaktionen keine Rolle, da die Effektivität direkt observiert wird. Mehr noch würde ein Cofaktor, der besonders gut die Wasserstoffperoxid Bildung an Luft förderte im spektroskopischen Ansatz als besonders aktiv erscheinen ohne

jedoch für die gewünschte Reaktion geeignet zu sein. Um die Kinetik in Systemen mit Enzymen zu beschreiben entwickelten Michaelis und Menten<sup>116</sup> 1913 ein mathematisches Model auf der Grundlage der Reaktion:



Für die Untersuchung der kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $k_{cat}$ , und  $v_{max}$  nach

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

und

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E] + [ES]} \quad (5)$$

wird die untersuchte Reaktion mit unterschiedlichen Substrat-Konzentrationen durchgeführt und über die Zeit betrachtet. Betrachtet man bei einer Konzentration den Produktanstieg gegen die Zeit wird zuerst ein linearer Anstieg der Reaktionsprodukte oder die Abnahme der Substrate beobachtet. Diese initiale Phase entspricht einer Reaktion erster Ordnung mit anschließender Konvergenz zum maximalen Umsatz; durch Produktinhibierung entsteht nicht zwangsläufig Totalumsatz. Berechnet man aus dem linearen Teil der Kurve die Umsatzrate ( $v_0$ ) nach

$$v_0 = \frac{[P]}{t} \quad (6)$$

erhält man für jede Konzentration einen Wert  $v_0$ . Diese Werte gegen die Substrat-Konzentration aufgetragen ergeben eine Kurve aus der sich  $v_{max}$  und  $K_m$  ( $= 0,5 \cdot v_{max}$ ) ablesen lassen.

In dem Experiment, das wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt wurde, diente NCR als Katalysator und Z-Citral als Substrat. Da allerdings sowohl Z-Citral als auch der Cofaktor als Substrat gesehen werden müssen wurde das Experiment einmal mit variiertes Substrat und noch einmal mit variiertes Cofaktor-Konzentration

durchgeführt. Da sich NAPH **7** in 4.2.3 als bester synthetischer Cofaktor herausgestellt hat, wurde es gewählt um im direkten Vergleich mit NADH betrachtet zu werden. Auch NCR wurde auf den in 4.2.3 erhaltenen Ergebnissen als bester Katalysator ausgewählt. Es wurde jedoch die Enzym-Konzentration um 96 % erniedrigt um die Reaktion besser verfolgen zu können. Z-Citral wurde ausgewählt, da es ein anspruchsvolles, industriell interessantes Substrat ist. Darüber hinaus ist die Reaktivität zwischen NADH **2** und den vom Potential entsprechenden, aber deutlich kleineren Cofaktoren NAAH **1** und NABH **5** auf dem gleichen Niveau. In Abbildung 25 sind die Stoffmengen pro Zeiteinheit bei unterschiedlichen Z-Citral Ausgangskonzentrationen (0,1, 0,5, 1, 5, 10 mM) und gleichbleibender Cofaktor-Konzentration (1 mM) für NADH und NAPH dargestellt: In beiden Abbildungen

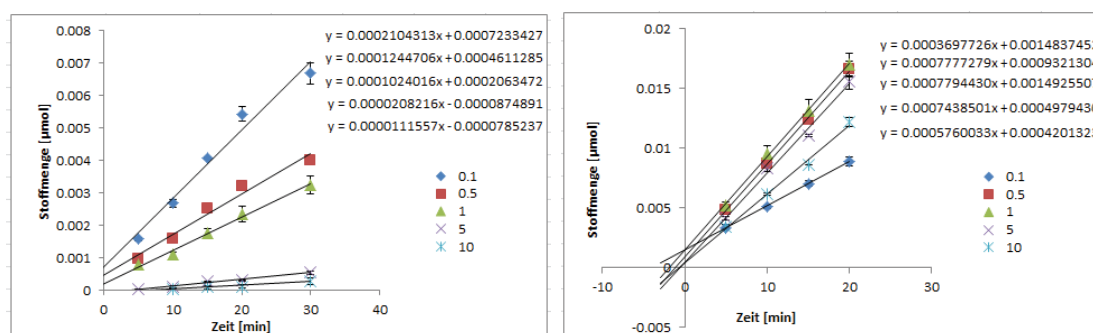


Abbildung 25: Stoffmenge an Citronellal gegen die Reaktionszeit bei konstanter Cofaktor-Konzentration von 1 mM und variiert Z-Citral-Konzentration (0,1-10 mM); links NADH, rechts NAPH

ist an den lineareren Anstiegen gut zu erkennen, dass sich die Reaktionen zu den gemessenen Zeitpunkten in der initialen Phase befinden. Die initialen Raten, abgelesen aus den Gleichungen der Regressionsgeraden wurden in  $\mu\text{mol}/\text{min}$  in folgende Michelis-Menten-Diagramme eingefügt und mit dem Excel-Plugin XL\_Kinetics<sup>117</sup> die entsprechenden Kurven gefittet (siehe Abbildung 26).

Die Auftragung der initialen Raten entsprechen nicht den erwarteten Kurven, die

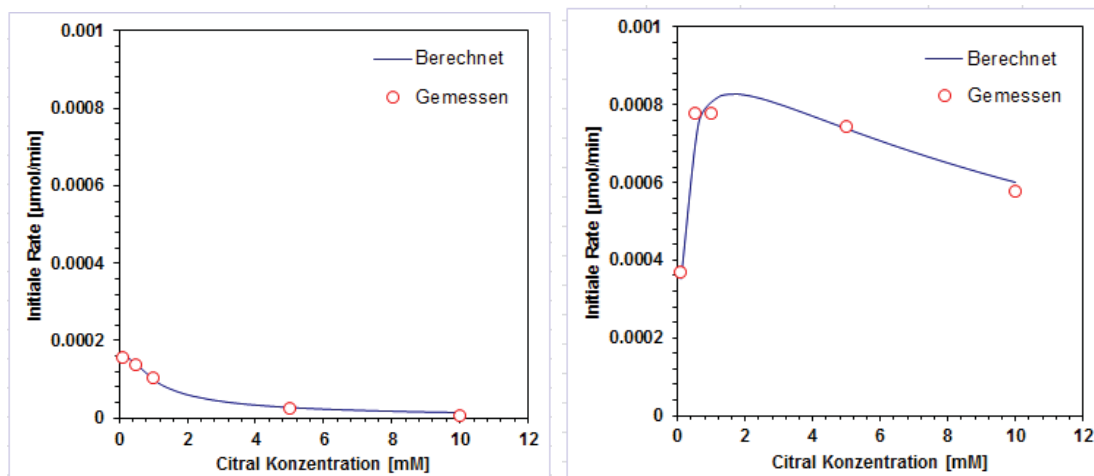


Abbildung 26: Umsatzrate gegen die Z-Citral-Konzentration (0,1-10 mM) bei konstanter Cofaktor-Konzentration von 1 mM; links NADH, rechts NAPH; die roten Punkte entsprechen den gemessenen initialen Raten, die blauen Kurven wurden mit XL\_Kinetics gefittet

eine Konvergenz gegen einen Maximalwert vorsehen. Eine Abnahme der Umsatzrate bei erhöhter Substrat-Konzentration ist jedoch bekannt und wird Substratinhibition genannt. In dem vorliegenden Fall mit NADH **2** ist davon auszugehen, dass die untere Grenze an Substrat-Konzentration noch nicht erreicht ist, bei dem die Umsatzrate wieder abnimmt was zu diesem atypischen Michaelis-Menten-Diagramm führt. Das heißt schon Konzentrationen von 100 µM Z-Citral inhibieren in Anwesenheit von NADH die Reaktion. Bei NAPH **7** entspricht das Verhalten deutlich mehr der Theorie, allerdings kann bei steigender Substrat-Konzentration anfänglich eine Zunahme an Produktbildung festgestellt werden. Die anschließende Abnahme bei 5 und 10 mM könnte auch hier auf Substratinhibition zurückzuführen sein. Zu den Punkten wurden mit XL\_Kinetics Kurven gefittet, die dem Verlauf der Messpunkte entsprechen. Die dabei verwendeten Parameter  $K_{m,vmax}$  und  $K_S$  sind für beide Cofaktoren der folgenden Tabelle zu entnehmen (siehe Tabelle 9)

Tabelle 9: Verwendete Parameter bei der Berechnung der Michaelis Menten Kurven bei variierter Citral-Konzentration und konstanter Cofaktor-Konzentration

|      | $K_m$ [mol·l <sup>-1</sup> ] | $v_{max}$ [μmol·min <sup>-1</sup> ] | $k_S$ [mol·l <sup>-1</sup> ] |
|------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| NADH | 0,0614                       | 0,000305                            | 0,49862                      |
| NAPH | 0,1865                       | 0,001012                            | 15                           |

Die selbe Vorgehensweise wurde bei gleichbleibender Z-Citral-Konzentration und variierter Cofaktor-Konzentration angewandt. Wieder sind die erhaltenen Stoffmengen an Citronellal bei unterschiedlicher Cofaktor-Konzentration und gleichbleibender Citral-Konzentration für NADH und NAPH dargestellt (siehe Abbildung 27).

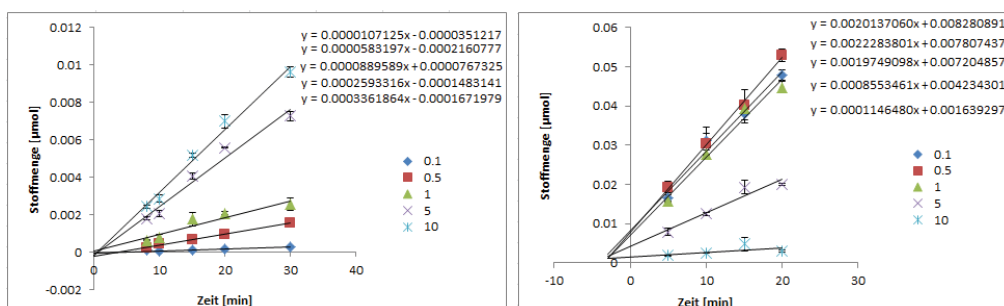


Abbildung 27: Stoffmenge an Citronellal gegen die Reaktionszeit bei konstanter Z-Citral-Konzentration von 1 mM und variierter Cofaktor-Konzentration (0,1-10 mM); links NADH, rechts NAPH

Wie zuvor wurden aus den Regressionsgeraden die Steigungen abgelesen und daraus die initialen Raten bestimmt. Diese wurden in Abbildung 28 dargestellt. NADH zeigte in diesem Fall den erwarteten Verlauf, ansteigend und konvergierend zu einem Maximalwert. Dennoch liegen die initialen Raten, wie auch schon zuvor, deutlich unter denen von NAPH. Bei NAPH ist in diesem Experiment ein anderer Verlauf zu beobachten. Ein steiler Anstieg bis zu einem Maximum, gefolgt von einer Absenkung bei höherer Substrat-Konzentration deutet hier auf stärkere

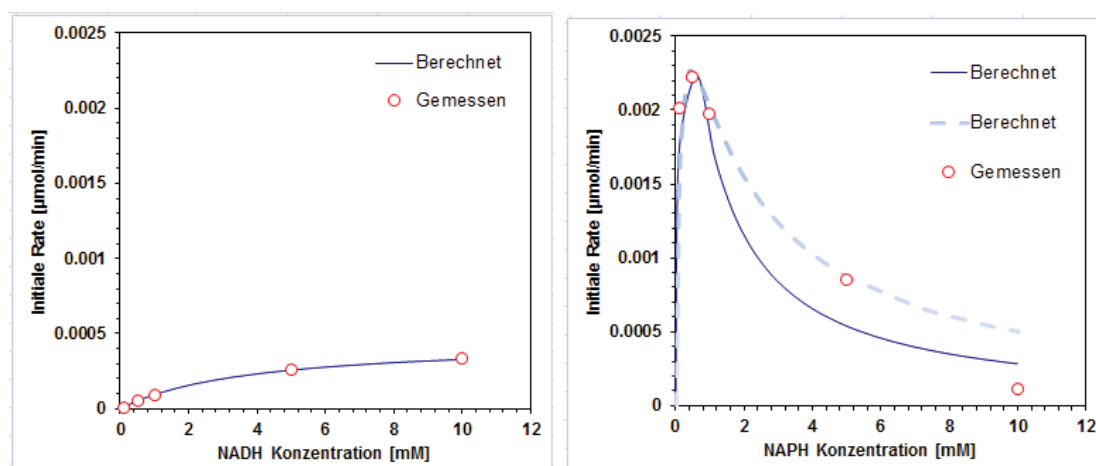


Abbildung 28: Umsatzrate gegen die Cofaktor-Konzentration (0,1-10 mM) bei konstanter Citral-Konzentration von 1 mM; links NADH, rechts NAPH; die roten Punkte entsprechen den gemessenen initialen Raten, die blauen Kurven wurden mit XL\_Kinetics gefittet

Substratinhibierung hin. Zu bemerken ist an dieser Stelle, dass NAPH bei dem verwendeten DMSO-Anteil von 2,5 % bei Konzentrationen  $> 5$  mM nicht mehr löslich war und präzipitierte. Dies macht den Wert 10 mM NAPH-Konzentration fraglich. Daher wurde eine weitere Kurve ohne den Wert bei 10 mM gefittet. Die dafür verwendeten Parameter sind wie die Parameter für NADH aus Tabelle 10 zu entnehmen

Tabelle 10: Verwendete Parameter bei der Berechnung der Michaelis Menten Kurven bei variiertem Cofaktor-Konzentration und konstanter Citral-Konzentration

|      | $K_m$ [mol·l <sup>-1</sup> ] | $v_{max}$ [µmol·min <sup>-1</sup> ] | $k_S$ [mol·l <sup>-1</sup> ] |
|------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| NADH | 3.80239                      | 0.000453                            | -                            |
| NAPH | 0.09680                      | 0.003323                            | 1.81399                      |

## 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

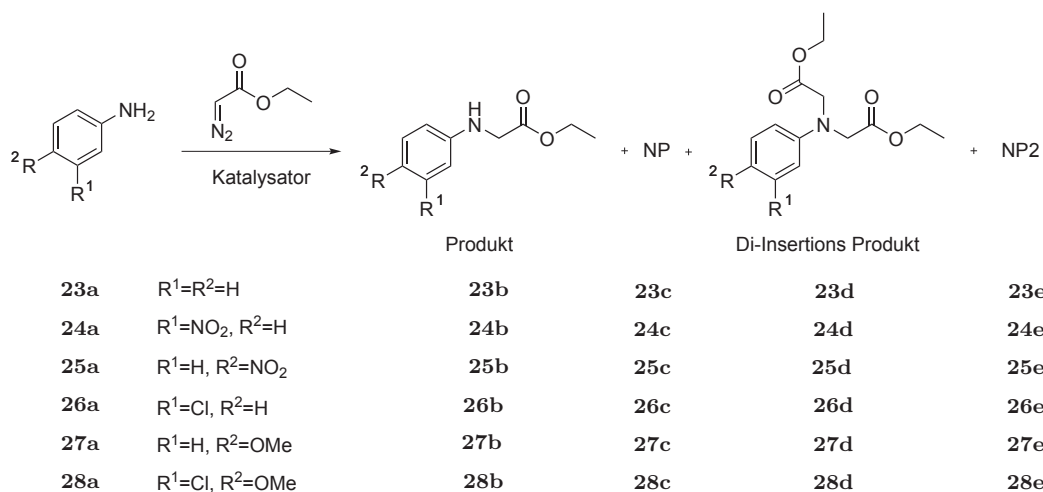
### 4.3.1 Substratspektrum der NH-Insertion

#### *Nicht literaturbekannte Anilinderivate*

Die Charakterisierung einer Reaktion gelingt oftmals durch Variation der Substrate, insbesondere wenn diese nicht nur sterische sondern elektronische Einflüsse wie z.B. bei Elektronen schiebenden Gruppen an aromatischen Ringen aufweisen. Die Reaktivität von Molekülen mit unterschiedlichen Substituenten kann allerdings in Enzymen aufgrund von sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen von erwarteten Werten abweichen (siehe 5.2.3). Aus den Publikationen von Arnold *et al.* geht hervor, dass Enzyme aus der P450 Familie in der Lage sind Carbenreaktionen zu katalysieren.<sup>87,118,119</sup> Darüber hinaus zeigten Fasan *et al.*, dass auch Myoglobin diese Reaktionen katalysieren kann.<sup>120,121</sup> In dem Versuch neue Enzyme zu finden, die die Reaktion unter aeroben Bedingungen und eventuell besser katalysieren können und die NH-Insertion besser zu verstehen wurde P450-*M.aq.*<sup>109</sup> als *E.coli*-Lysat und ein Set aus Anilin-Derivaten für die folgenden Experimente benutzt. Es zeigte sich, dass die NH-Insertion katalysiert wurde, allerdings wurde die Bildung mehrerer Produkte beobachtet (siehe Schema 14). Neben den gewünschten Produkten **23b-28b** traten weitere unerwünschte Nebenprodukte sowie teilweise die zweifachen Insertionen auf. Interessant ist hierbei, dass sowohl das Produkt als auch das Nebenprodukt beide den erwarteten Massenpeak aufweisen, aber nur das tatsächliche Produkt das richtige Fragmentierungsmuster aufweist (siehe Abbildung 29).

Charakteristisch für das Produkt ist die komplette Abspaltung der Estergruppe ( $m/z = 73$ ) vom Molekülpeak mit einer  $m/z$  von 179 bei Anilin. Daraus ergibt sich der Base Peak zu  $m/z$  von 106. Beim Nebenprodukt wird hingegen eine Gruppe mit  $m/z = 44$ , möglicherweise Acetaldehyd und eine Gruppe mit  $m/z =$

### 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen



Schema 14: Katalysierte NH-Insertionsreaktion mit Ethyldiazoacetat. NP: Nebenprodukt und NP2: zweifach Insertion des Nebenprodukts.

59, möglicherweise Acetat abgespalten. Dieses Muster lässt sich für alle Anilin-Derivate und Di-Insertionen zeigen und diente zur Unterscheidung von Produkt und Nebenprodukt. Die Nebenprodukte ließen sich, im Gegensatz zum Produkt, aufgrund von hoher Instabilität und Flüchtigkeit nicht aufreinigen und somit auch nicht identifizieren.

Im folgenden sind die getesteten Substrate aufgeführt mit den Umsätzen zu den entsprechenden Produkten (siehe Tabelle 11). Das Lysat von *E.coli* mit überexprimiertem P450-*M.aq.* scheint ein guter Katalysator für die NH-Insertion zu sein. Die Experimente zeigten, dass die Gesamtumsätze mit bis zu 100 % Substratumsatz sehr hoch liegen, jedoch wird das gewünschte Produkt nicht als Hauptprodukt gebildet und es findet eine nicht näher charakterisierte Nebenreaktion statt. Darüber hinaus zeigt dieses Experiment, dass auch unter sauerstoffhaltigen Bedingungen Produkt gebildet wird und Schutzgas, wie bisher in der Literatur verwendet,<sup>87</sup> nicht unbedingt verwendet werden muss.

Interessanterweise konnte in den Kontrollen mit *E.coli*-Lysat, das ohne P450-



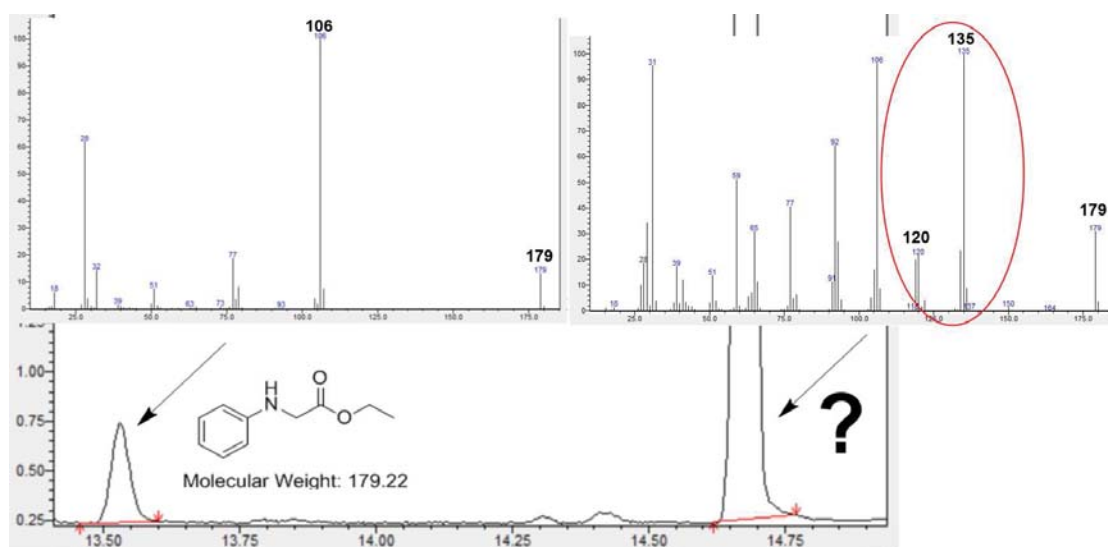


Abbildung 29: GC-Chromatogramm mit überlagerten Massenspektren für das Produkt links und das unbekannte Nebenprodukt rechts.

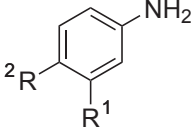
Enzym exprimiert wurde, Produktbildung festgestellt werden. Dies zeigt, dass in *E. coli* Proteine vorhanden sind, die diese Reaktion katalysieren. Diese Beobachtung war unerwartet und hoch interessant, da auch in Publikationen zu Carben Reaktionen mit unaufgereinigten Enzymen nicht näher auf diese Hintergrundaktivität eingegangen wurde. Da ein generelles Interesse an neuen Enzymen vorhanden ist, der Katalysator im *E. coli*-Lysat Sauerstoff tolerierte und sehr aktiv war, wurde nicht weiter auf die Charakterisierung der Reaktion mit P450-Enzymen eingegangen sondern das *E. coli*-Lysat weiter untersucht.

### *Neue Stoffklassen*

Bei der Charakterisierung der enzymatisch katalysierten NH-Insertion, bezüglich der Substrate wurde bisher nur auf die schon bekannte Stoffklasse der aromatischen Amine zurückgegriffen. Die Carben-Insertion in weitere nukleophile Heteroatom-Wasserstoff-Bindungen der Form: XH, ist aber für viele Heteroatome beschrieben

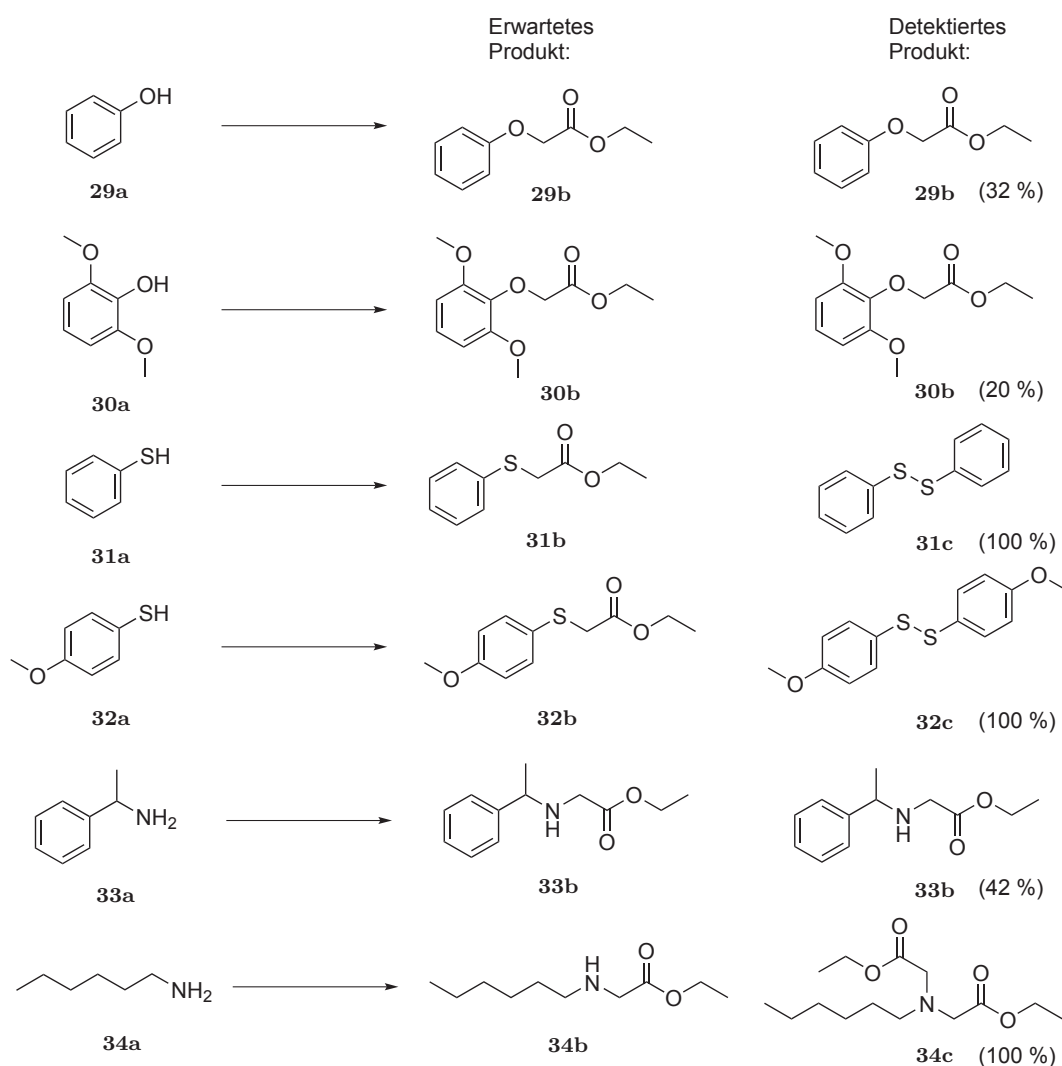
### 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

Tabelle 11: NH-Insertion mit den Substraten **23-28** katalysiert von P450-*M.aq. E.coli*-Lysat.

| Umsetzung [%]   |             | Produkt, b | NP, c | Di-Insertions<br>Produkt, d | NP2, e | gesamt |
|---|-------------|------------|-------|-----------------------------|--------|--------|
|  |             |            |       |                             |        |        |
| R <sup>1</sup> =R <sup>2</sup> =H   | <b>(23)</b> | 4,1        | 77,6  | 3,6                         | 14,6   | 100    |
| R <sup>1</sup> =NO <sub>2</sub> R <sup>2</sup> =H                                 | <b>(24)</b> | 17,2       | 75,8  | 0                           | 0      | 93,0   |
| R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =NO <sub>2</sub>                                 | <b>(25)</b> | 6,3        | 60,3  | 0                           | 0      | 66,6   |
| R <sup>1</sup> =Cl R <sup>2</sup> =H  | <b>(26)</b> | 26,7       | 45,2  | 20,3                        | 0      | 92,1   |
| R <sup>1</sup> =H R <sup>2</sup> =OMe   | <b>(27)</b> | 4,0        | 46,7  | 14,7                        | 34,5   | 100    |
| R <sup>1</sup> =Cl R <sup>2</sup> =OMe  | <b>(28)</b> | 22,8       | 25,5  | 1,9                         | 49,8   | 100    |

die noch nicht für enzymatische Systeme bekannt sind. Deshalb wurden im folgenden die Stoffklassen aromatische Alkohole (Phenole), aromatische Thiole (Thiophenole) und aliphatische Amine mit Lysat getestet. Das Schema ist im folgenden aufgeführt (siehe Schema 15).

Mit Ausnahme der Thiophenole gelang die enzymkatalysierte Insertionsreaktion auch mit bisher nicht literaturbekannten Nukleophilen. Thioverbindungen neigen unter Sauerstoffatmosphäre zur Disulfidbildung wie z.B. die Oxidation von Glutathion GSH zu Glutathion-Disulfid GSSG.<sup>122</sup> Dadurch wurden die Thiole inaktiviert und es konnte keine SH-Insertion beobachtet werden. Die Phenol Insertionen waren erfolgreich, konnten aber beide auch mit Häminchlorid mit gleichem Umsatz gezeigt werden. Dazu im Gegensatz stehen die Insertionen mit aliphatischen primären Aminen, die beide mit Häminchlorid keine Reaktion zeigten und daher den Aspekt der enzymatischen Katalyse sehr gut verdeutlichen. Hexylamin scheint allerdings deutlich zu reaktiv und liefert ausschließlich das doppelte Insertionsprodukt (sie-



Schema 15: Katalysierte Insertionsreaktion mit Ethyldiazoacetat. Nach dem Reaktionspfeil stehen links die erwarteten und rechts die detektierten Produkte mit den entsprechenden Umsätzen.

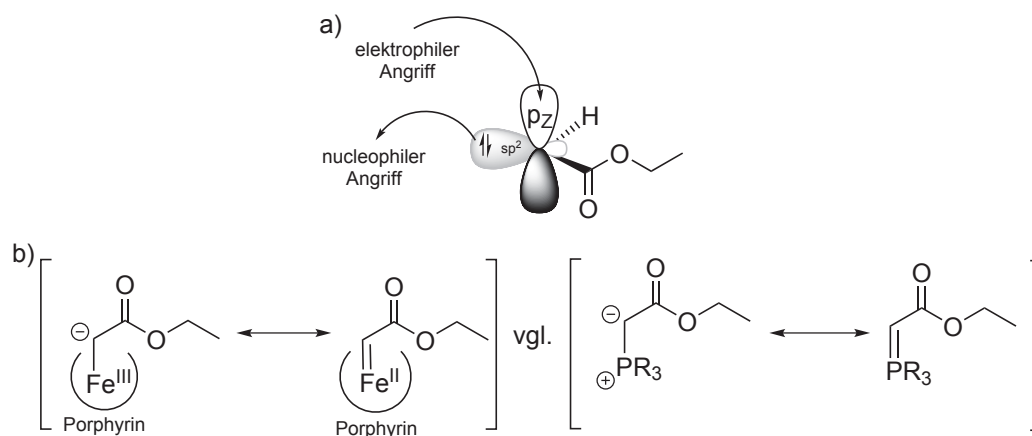
he Schema 15).  $\alpha$ -Methylbenzylamin (**33a**) jedoch liefert neben dem schon vom Anilin bekannten nicht identifizierbaren Nebenprodukt das erwartete Zielmolekül Ethyl-*N*-(1-phenylethyl)glycinat (**33b**).  $\alpha$ -Methylbenzylamin (**33a**) bietet als Substrat noch einen weiteren Vorteil: Durch das Stereozentrum am  $\alpha$ -Kohlenstoff kann im Enzym eine Präferenz für eines der beiden Enantiomere vorhanden sein. Eine

Kontrolle der Stereoselektivität ist daher möglich.

#### *Neue Reaktion*

Die zwei freien Elektronen eines Carbens können ungepaart und parallel in zwei verschiedenen Orbitalen vorliegen – dann wird es Triplett-Carben genannt – oder gepaart und antiparallel, dann spricht man von einem Singulett-Carben. Das besondere an Singulett-Carbenen ist ihre ambivalente Struktur. Mit dem unbesetzten p-Orbital und nur einem Elektronen-Sextett sind sie elektrophil und nukleophile Angriffe (siehe NH-Insertion) sind möglich. Allerdings besitzen sie auch ein freies Elektronenpaar mit dem ein nukleophiler Angriff denkbar ist. Diese Eigenschaften gelten vor allem für freie Carbene, können aber auch auf Metall-Carben-Komplexe übertragen werden. In Schema 16 a) ist diese Situation für ein freies Carben dargestellt. Singulett-Carbene sind energetisch vor allem dann gegenüber Triplett-Carbenen bevorzugt wenn  $\pi$ -Donor-Substituenten, wie in der Ylid-Grenzstruktur, vorliegen. Es kann daher auch bei den eisenkatalysierten Carben-Reaktionen von einem Singulett-Carben ausgegangen werden, da wie in einem Phosphor-Ylid der Phosphor respektive das Eisen als  $\pi$ -Donor-Ligand des  $p_z$ -Orbitals gesehen werden kann und so die Nukleophilie verstärkt (siehe Schema 16 b)).<sup>123</sup> Im Gegensatz dazu steht der elektronenziehende Effekt der Ethylacetatgruppe, die die Nukleophilie des Carbens senken und dessen Elektrophilie erhöhen.

Trotz mehrerer Publikationen, unter anderem von Woo *et al.*,<sup>91,92</sup> in denen gezeigt wurde, dass die Reaktion eines Aldehyds und eines Eisen-Porphyrin-Carbens nicht ohne die Zugabe von  $\text{PPh}_3$  ablaufen kann, wurde die Zugabe von Benzaldehyd zu EDA und Natriumdithionit zu *E.coli* Lysat getestet um mögliche, noch nicht charakterisierte, Biokatalysatoren für diese Reaktion zu identifizieren. Tatsächlich konnte in diesem Experiment die Umsetzung von mehreren Aldehyden zu ihren entsprechenden Wittig Produkten gezeigt werden (siehe Schema 17). Trotz der

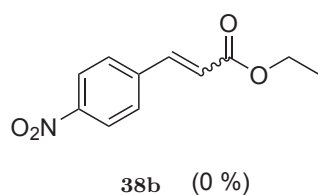
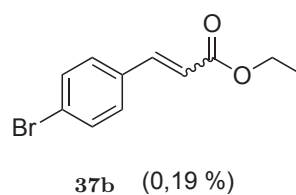
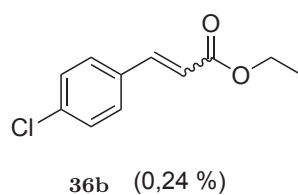
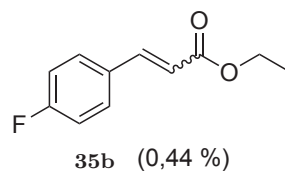
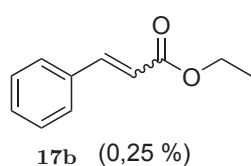
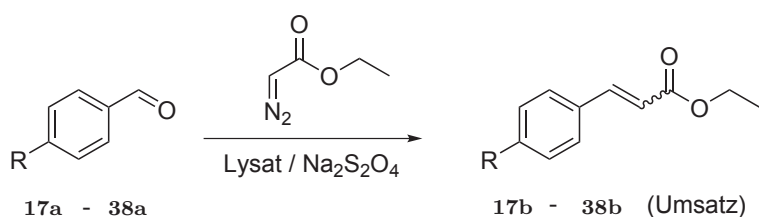


Schema 16: a) Darstellung eines Carbenes mit einem von zwei Elektronen besetzten nukleophilen  $sp^2$ -artigen Orbital und einem elektrophilen freien  $p_z$ -Orbital. b) Vergleich zweier mesomeren Grenzstrukturen in einem Eisen-Carben und einem Phosphor-Ylid.

geringen Umsätze waren die Produkte anhand von chemisch synthetisierten Standards und über ihre Massenspektren identifizierbar.

### 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

---



Schema 17: Lysat katalysierte Carbonyl-Olefinierung ohne die Zugabe von Triphenylphosphin.

Für die Negativkontrolle, bestehend aus 10  $\mu\text{M}$  Häminchlorid, konnten in keinem Fall auch nur Spuren des Produktes nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine gänzlich neue, bisher unbekannte enzymatische Reaktivität hin. Da kein Triphenylphosphin zugegeben wurde und mit Hämin alleine keine Reaktion beobachtet werden konnte, kann die Möglichkeit eines anderen, Enzym-exklusiven Mechanismus in Betracht gezogen werden.

### 4.3.2 Kontrollen

Da diese Ergebnisse sowohl auf einen neuen Katalysator als auch auf eine neue Reaktion hindeuteten wurde großen Wert auf die entsprechenden Kontrollen gelegt. Wie schon in den vorhergegangenen Experimenten erwähnt, wurde Hämin-Chlorid als literaturbekannter Katalysator für Carben-Reaktionen verwendet um den Einfluss des Protein-Gerüsts zu zeigen. Als Negativkontrolle wurde Puffer verwendet, da hier keine Reaktion erwartet wurde. Beide Experimente waren negativ für die Carbonyl-Olefinierung. Diese ersten Kontrollen zeigten, dass ein noch nicht beschriebener Katalysator für Carben-Reaktionen im *E.coli*-Lysat vorhanden sein muss. Zur Bestätigung, dass tatsächlich ein Protein für diese Reaktivität verantwortlich ist wurde das folgende Set an Kontrollen durchgeführt und anschließend auf Aktivität getestet.

- Aktivität nach Dialyse in einem 12 kDa Ausschlusspolymer gegen TRIS-Puffer
- Aktivität nach Aufkonzentration mit 10 kDa Membranfiltern
- Proteinfällung mit Aceton  $10 < x < 50$  % zeigte Aktivität mit Präzipitat
- Proteinfällung mit  $\text{NH}_4\text{SO}_4$   $10 < x < 50$  % zeigte Aktivität mit Präzipitat
- Keine Aktivität im Überstand nach Erhitzung auf  $50$  °C (Hitzegefällung)
- Keine Aktivität bei hoher Salz-Konzentration  $> 1\text{M}$
- Abhängigkeit der Produktbildung von der Protein-Konzentration
- Nach der Lyophilisation konnte ein unlöslicher Feststoff erhalten werden, der Aktivität zeigte

Die Fällungen sind ein Zeichen für den Verlust der Nativstruktur und anschließende Agglomeration des Proteins. Die Inaktivierung durch hohe Salz-Konzentration ist ebenfalls ein bekanntes Phänomen bei Enzymen.<sup>17,124</sup> Interessant ist hierbei, dass die lösliche Struktur wohl nicht entscheidend für die Reaktivität ist da auch unlöslicher Feststoff Aktivität zeigt. Die alternative Annahme der Katalysator

könnte ein kleines chemisches Molekül (wie z.B. Siderophore<sup>125</sup> und Enterobactin<sup>126</sup>) sein, konnte durch die Größenausschlussexperimente mit 12 kDa Membranfilter widerlegt werden. Auch die Fällungen mit resultierendem inaktivem Überstand und die Unlöslichkeit des aktiven Lyophilisats sprechen gegen ein kleines lösliches Molekül. Alle diese Ergebnisse weisen auf einen Katalysator in Form eines Proteins hin. Der Katalysator zeichnet sich durch hohe Aktivität bei der Katalyse der NH-Insertion, sowie hoher Sauerstofftoleranz aus. Darüber hinaus konnte eine gänzlich neue, nicht beschriebene Reaktion mit diesem Katalysator durchgeführt werden. Da die wirtschaftlichen Vorteile eines vergrößerten Substratspektrums und der Arbeit unter aeroben Bedingungen auf der Hand liegen und das wissenschaftliche Interesse neuer Reaktionen und Katalysatoren beträchtlich ist, wurde die weitere Charakterisierung des Katalysators zugunsten seiner Identifikation zurück gestellt. Da es mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Protein handelte, wurden die weiteren Experimente zur Aufreinigung des unbekanntes Katalysators auf der Grundlage bekannter biologischer Chromatographieverfahren durchgeführt.

#### 4.3.3 Strategie zur Identifikation des neuen Katalysators

Die Vorgehensweise bei der Identifikation eines unbekanntes Proteins verläuft oftmals nach dem gleichen Muster:<sup>127</sup> Es werden mehrere orthogonale Reinigungsschritte nacheinander durchgeführt, wobei nach jedem Schritt Aktivität nachgewiesen werden soll. Dadurch erhält man Proteine hoher Reinheit, die dann sequenziert werden können z.B. durch Sequenzierung nach Edman,<sup>128,129</sup> Sanger<sup>130</sup> oder wie in diesem Projekt Analyse per MALDI-TOF-TOF oder LC-ESI-MS/MS und Vergleich mit Proteindatenbanken in Kooperation mit der Universität Hohenheim, namentlich Jens Pfannstiel. Diese Strategie ist in Abbildung 30 bildlich dargestellt.





Abbildung 30: Schematische Darstellung der geplanten Proteinaufreinigung. Die pyramidale Form symbolisiert die abnehmende Menge an Protein in jeder Stufe.

Trotz der klar definierten Strategie stellten sich eine Reihe von unerwarteten Herausforderungen bezüglich der Aktivitätstests in diesem Projekt heraus: Das Zielprotein liegt in einer natürlich in der Zelle auftretenden (möglicherweise sehr geringen) Konzentration vor. Dadurch war es teilweise nicht möglich das Zielprotein in einer Fraktion in nachweisbarer Menge anzureichern. Der Umsatz der Reaktion ist generell sehr gering und lag daher oftmals unter der Nachweisgrenze. Arbeitsschritte die zur Erhöhung der Protein-Konzentration und der daraus folgenden Erhöhung des Umsatzes dienten, führten zur Inaktivität und konnten deshalb nicht angewendet werden. Die Salz-Konzentration musste gering gehalten werden, da eine hohe Salz-Konzentration inhibitorisch wirkte. Alle diese Punkte führten zu oftmals falsch-negativen Ergebnissen der Aktivitätstests und machten eine sukzessive Abfolge der einzelnen Aufreinigungen sehr beschwerlich da die Katalysator-Konzentrationen naturgemäß mit der Gesamtproteinmenge abnahm und dadurch sehr klein werden kann. Folgende Arbeitsschritte wurden entwickelt und sukzessive

in das Protokoll aufgenommen um eine ausreichend hohe Produkt-Konzentration zur Analyse zu erhalten:

1. Dialyse gegen 5 mM Ammoniumformiat-Puffer um eine einheitliche und durch die Flüchtigkeit von Ammoniumformiat niedrige Salz-Konzentration zu erreichen
2. Lyophilisation der gesamten Fraktion damit die Flüssigkeitsmenge eingestellt werden konnte
3. Resuspendierung des gesamten Lyophilisats in 500  $\mu$ l TRIS-Puffer (50 mM pH 7.5)
4. Aktivitätstest mit 400  $\mu$ l der erhaltenen Suspension

Durch diese Vorgehensweise wurde sicher gestellt, dass die Salz-Konzentration so gering war, dass die Reaktion nicht beeinträchtigt wurde. Darüber hinaus konnten die Reaktivitäten der einzelnen Fraktionen untereinander gut verglichen werden, da die Katalysatoraktivität pro Fraktion direkt mit der erhaltenen Produkt-Konzentration gleichzusetzen waren. Da dieses Protokoll über viele Versuche hinweg erarbeitet wurde gilt diese Vorgehensweise daher nicht für alle folgenden Experimente. Die für den den jeweiligen Versuch verwendeten Arbeitsschritte können aus dem Material und Methoden Teil entnommen werden (siehe 3.6).

#### 4.3.4 Proteinaufreinigung Teil 1

Für die sukzessive Reinigung des *E.coli* Lysats wurde zuerst die Qualität der Anionenaustauschchromatographie evaluiert und anschließend mit der Größenausschlusschromatographie kombiniert.

##### *Anionenaustausch*

Das Prinzip der Anionenaustauschchromatographie beruht auf der Wechselwirkung positiver Ladungen der Säule und den negativen Ladungen der aufzureini-

genden Proteine. Durch negativ geladene Ionen im Elutionsmittel können gebundene Proteine sukzessive von der Säule verdrängt werden. Das Elutionsmittel kann auf zwei Weisen erhöht werden: Schrittweise und kontinuierlich. Der Vorteil der kontinuierlichen Erhöhung ist eine höhere erreichbare Auflösung. Dennoch wurde die schrittweise Elution gewählt, damit eine einheitlichere und reproduzierbarere Peakzusammensetzung erhalten wird.

Es zeigte sich, dass eine Elution in 10 %-Schritten NaCl (1 M) eine gute Trennung ergibt (siehe Abbildung 31).

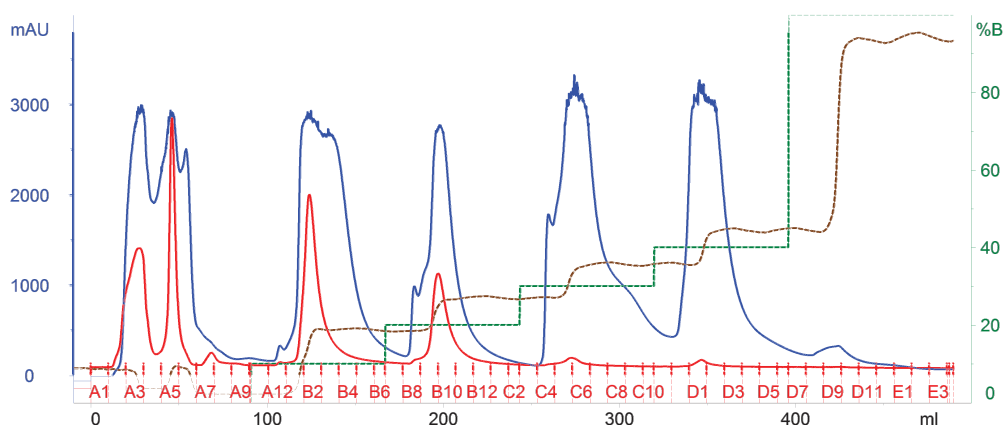


Abbildung 31: Anionenaustauschchromatogramm: Protein-elution in 10 % NaCl Schritten, blau: Absorption allgemeiner Protein-Strukturen bei 280 nm, rot: Absorption des Häm-Zentrums bei 417 nm, grün: Konzentration des Elutionsmittels, braun: die Leitfähigkeit.

Aus vergangenen Experimenten ging hervor, dass das Zielprotein bis 20 % NaCl eluiert, deshalb wurden die Fraktionen A1-B12 auf Aktivität getestet. Die zwei Produkte E und Z-Zimtsäureethylester sind in rot und blau dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Aktivität im Durchfluss (A3-A4) und die eigentlich aktive Fraktion B9-B11, bei 20 % NaCl (siehe Abbildung 32)

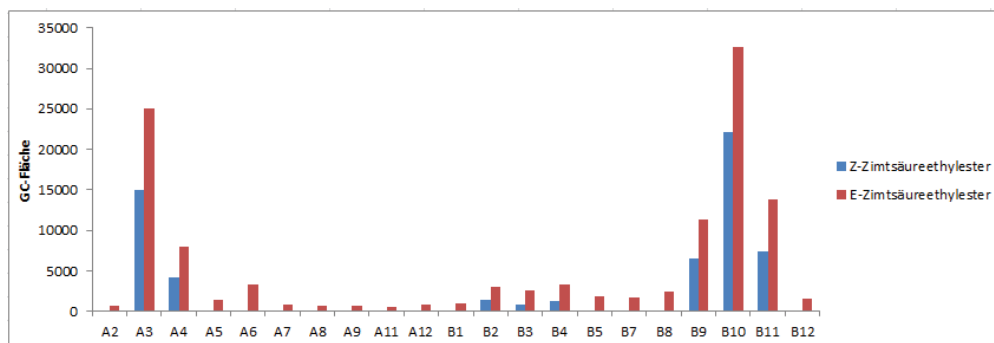


Abbildung 32: GC-MS: Area bei m/z 176, DEAE-Fraktionen A1-B12.

#### *Größenausschluss*

Da mit der Anionenaustauschchromatographie erfolgreich eine große Menge an Proteinen abgetrennt werden konnte und dennoch Aktivität vorhanden war, wurde direkt mit der Größenausschlusschromatographie fortgefahren. Hierfür wurde die beschriebene Anionenaustauschchromatographie mehrfach wiederholt, die Fraktionen B9-C1 zusammengefasst und mittels 10 kDa Membranfilter aufkonzentriert. Die erhaltene Lösung wurde auf einer 100 cm langen, 2,6 cm Durchmesser aufweisenden und Sephacryl S-200 Säulenmaterial beinhaltenden Säule nach ihrer Größe aufgetrennt (siehe Abbildung 33).

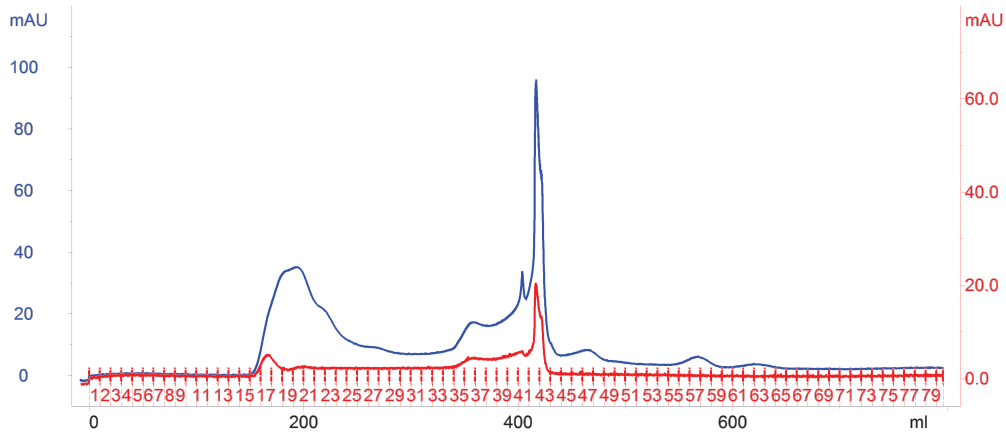


Abbildung 33: Größenausschlusschromatogramm: Proteinelution ohne Gradient, blau: Absorption allgemeiner Protein-Strukturen bei 280 nm, rot: Absorption des Häm-Zentrums bei 417 nm.

Von den erhaltenen Fraktionen wurden immer zwei zusammengefasst und auf Aktivität untersucht (siehe Abbildung 34).

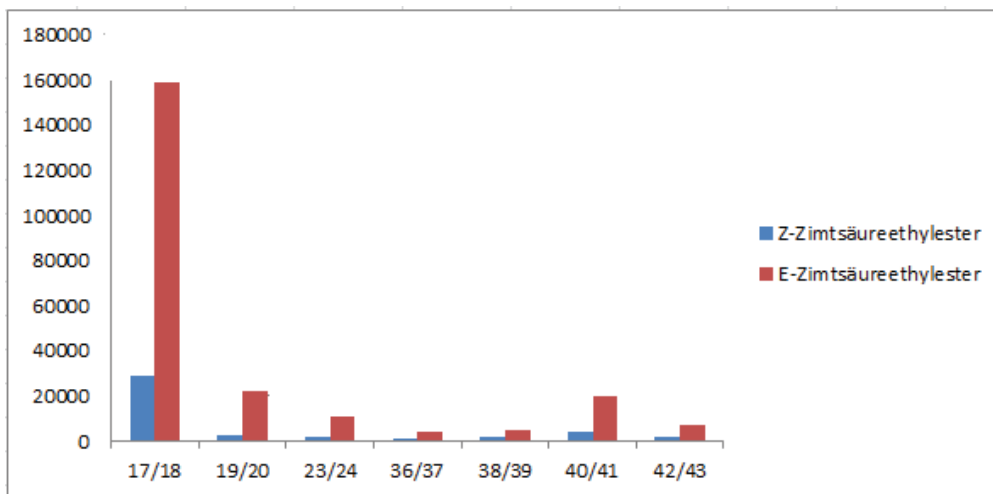


Abbildung 34: GC-MS: Area bei  $m/z$  176, die Fraktionen wie beschrieben.

Der Lauf wurde wiederholt um vergleichbare Fraktionen zu bekommen (siehe Abbildung 35).

### 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

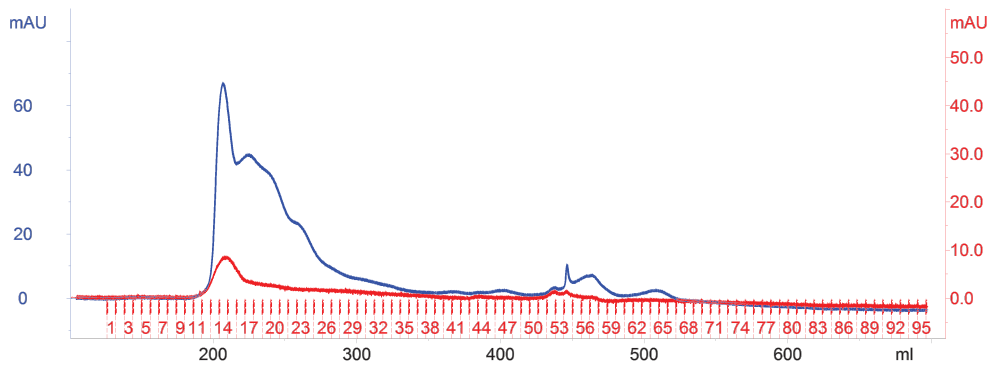


Abbildung 35: Größenausschlusschromatogramm: Proteinelution ohne Gradient, blau: Absorption allgemeiner Protein-Strukturen bei 280 nm, rot: Absorption des Häm-Zentrums bei 417 nm.

Aus dem ersten Lauf (siehe Abbildung 34) war bekannt, dass das Zielprotein sehr früh eluiert, deshalb sollten nur die Fraktionen 13-16 untersucht werden. Durch technische Störungen gingen Fraktion 13 und Fraktion 15 verloren. Im folgenden sind die Aktivitäten der Fraktionen 14, 16 und 17 aufgeführt (siehe Abbildung 36).

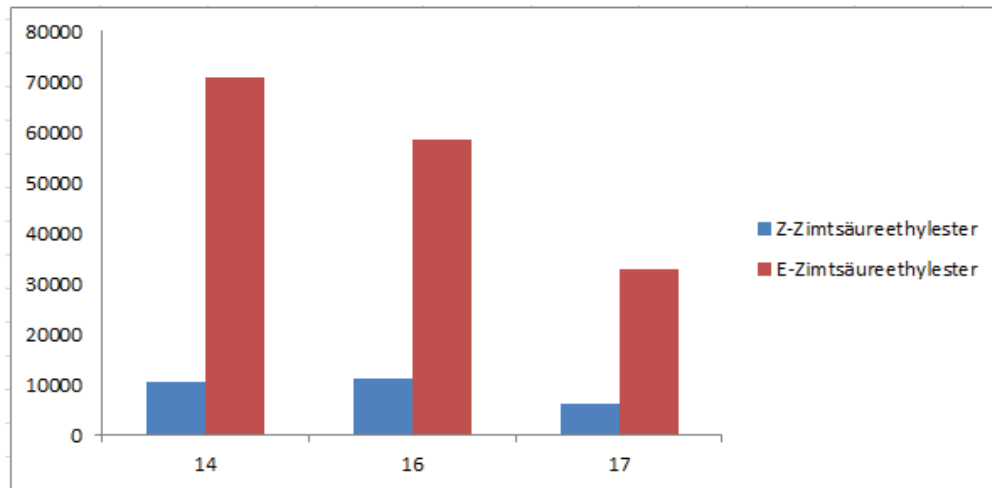


Abbildung 36: GC-MS: Area bei m/z 176, die Fraktionen 14, 16 und 17.

In diesem Experiment wies Fraktion 14 die höchste Aktivität auf. Zur Untersuchung der Reinheit und der Identifikation einzelner Proteine wurde eine SDS-

PAGE der Fraktionen 17/18 des ersten Laufs und der Fraktionen 14, 16 und 17 des zweiten Laufs durchgeführt. Fraktion 14 wurde ganz rechts nochmals mit doppelter Proteinmenge aufgetragen ( $20 \mu\text{l}$  mit  $1 \mu\text{l} \mu\text{g}^{-1}$ ). Es ist zu sehen, dass zwei Banden mit hoher Reinheit zwischen 100 und 130 kDa auftreten (markiert mit roten Pfeilen) weshalb diese ausgeschnitten und zur Sequenzierung gegeben wurden (siehe Abbildung 37).

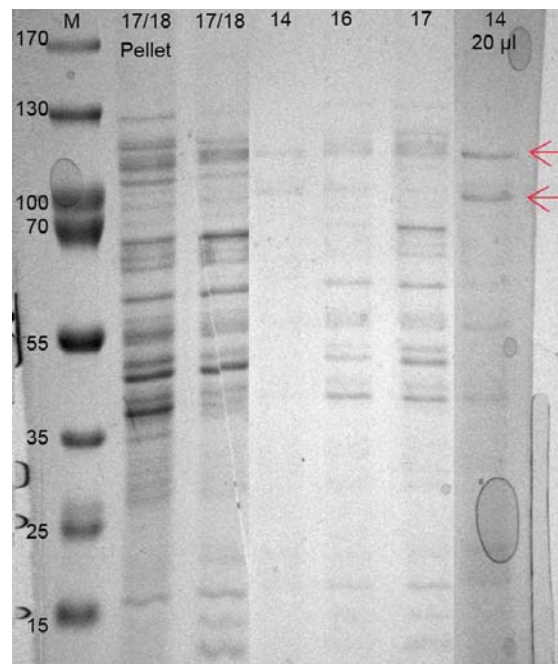


Abbildung 37: SDS-PAGE der Fraktionen 17/18 des ersten Laufs und der Fraktionen 14, 16 und 17 des zweiten Laufs, sequenzierte Banden rot markiert.

Die Ergebnisse der Sequenzierung ergaben für die obere Bande mit hoher Wahrscheinlichkeit die Pyruvat Dehydrogenase, Decarboxylase Komponente E1 gemischt codiert auf dem *aceE*-Gen. Die untere Bande war Teil einer ribosomalen Untereinheit und wurde aufgrund einer fehlenden katalytischen Maschinerie nicht weiter betrachtet. Anhand dieser Ergebnisse wurde von Stefanie Kummer im Rahmen ihrer Masterarbeit das *aceE*-Gen aus der chromosomalen DNA von *E.coli* mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) isoliert, in einen pET28 Vektor transfor-

miert und in *E.coli* BL21 (*DE3*) überexprimiert. Nach erfolgreicher Aufreinigung konnte keine Aktivität, bezüglich der für das *E.coli* Lysat beobachteten Carbenreaktionen, für dieses Enzym gefunden werden. Dieses negative Ergebnis zeigte, dass die Aufreinigungsstrategie angepasst werden musste um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die positiven Zwischenergebnisse deuteten aber generell darauf hin, dass die Strategie der einzelnen Reinigungsschritte gefolgt von Aktivitätstests Erfolg versprechend waren. Als Konsequenz wurde im folgenden Abschnitt (4.3.5), unter Verwendung inkrementell verbesserter Aufarbeitung- und Analyseschritte, eine weitere chromatographische Aufreinigung sowie eine Proteinfällung dem Reinigungsablauf hinzugefügt.

#### 4.3.5 Proteinaufreinigung Teil 2

Da die alleinige Aufreinigung des *E.coli* Lysats mittels DEAE und SEC nicht ausreichte um Fraktionen mit ausreichend hoher Reinheit zu erhalten, wurde die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit vorhergehender Ammoniumsulfatfällung evaluiert und anschließend mit den anderen Schritten kombiniert.

##### *Anionenaustausch: Optimierung*

Die Elutionsmethode der Anionenaustauschchromatographie wurde weiter optimiert. Da aus 4.3.4 bekannt war, dass das Zielprotein bei 20 % NaCl eluiert wurde von 10 - 20 % ein Konzentrationsgradient angelegt (siehe Abbildung 38).

Die Fraktionen zwischen 10 und 20 % NaCl, die die höchste Protein-Konzentration zeigten wurden auf Aktivität getestet. Gezeigt werden die Fraktionen 15-19, 21, 22 (Fraktion 20 ist gerätebedingt als leer Fraktion vorgesehen; siehe Abbildung 39).

Die Fraktionen 17 und 18 sowie 21 und 22 zeigten die höchsten Aktivitäten. Zu bemerken ist hierbei, dass die Aktivität genau proportional zu der Absorption bei 417 nm ist, die auf die Anwesenheit eines Häm-Moleküls hindeutet.



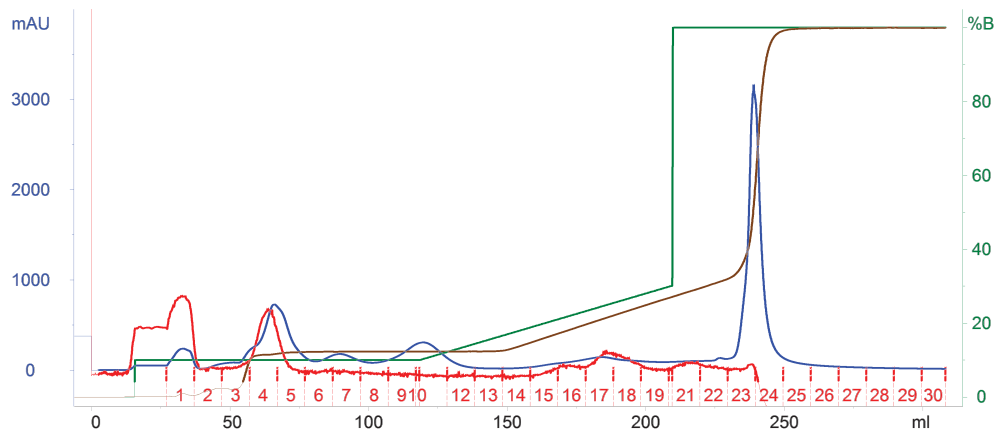


Abbildung 38: Anionenaustauschchromatogramm: Proteinelution in 10 % NaCl Schritten und Gradient zwischen 10 und 20 %, blau: Absorption allgemeiner Proteinstrukturen bei 280 nm, rot: Absorption des Häm-Zentrums bei 417 nm, grün: NaCl-Konzentration, braun: Leitfähigkeit.

#### *Hydrophobe Interaktionschromatographie*

Das Prinzip der Hydrophoben Interaktionschromatographie beruht auf der Wechselwirkung hydrophober Areale auf der Oberfläche von Proteinen mit Phenylresten auf der Säule. Da die Proteine in Lösung gänzlich von einer abschirmenden Hydrat-Hülle umgeben sind wird ein kaotropes Salz, in der Regel  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , zur Freilegung der hydrophoben Areale zugegeben. Durch die Senkung der Salz-Konzentration mittels Zugabe salzfreien Elutionsmittels wird die Hydrat-Hülle der Proteine wieder hergestellt und diese je nach Größe ihrer Hydrophobizitäten eluiert. Wie auch bei der Anionenaustauschchromatographie kann das Elutionsmittel auch hier auf zwei Weisen erhöht werden und wie zuvor wurde die schrittweise Elution gewählt, damit eine einheitlichere und reproduzierbarere Peakzusammensetzung erhalten wird.

Es zeigte sich, dass Senkung der  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  Konzentration in 10 %-Schritten (0,5 - 0 M) eine gute Trennung ergibt (siehe Abbildung 40).

### 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

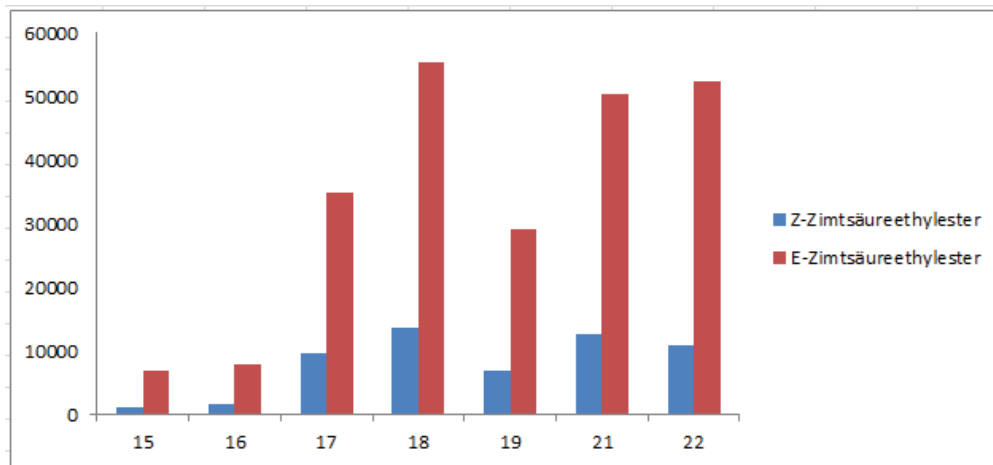


Abbildung 39: GC-MS: Area bei m/z 176, Fraktionen 15-19, 21, 22.

Da die Informationen der Fällung des Zielproteins zwischen 20 und 40 %  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  nicht ungeprüft auf die Elution des Zielproteins übertragbar war, aber nicht alle Fraktionen auf Aktivität getestet werden konnten, wurden die Fraktionen den Peaks entsprechend zusammengefügt und als Fraktionen 1-7 getestet. Die Fraktionen beinhalten folgende Proben: F1 (Durchfluss) A2-A6, F2: A12-B2, F3: B3-B5, F4: B6-B8, F5: B9-B11, F6: B12-C2, F7: C3-C4.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

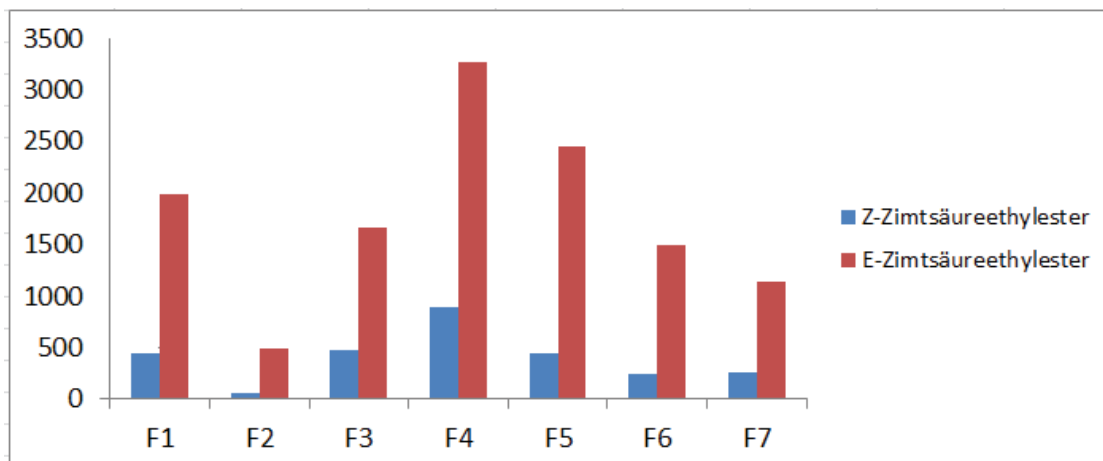


Abbildung 41: GC-MS: Fläche bei m/z 176 der HIC-Fraktionen 1-7.

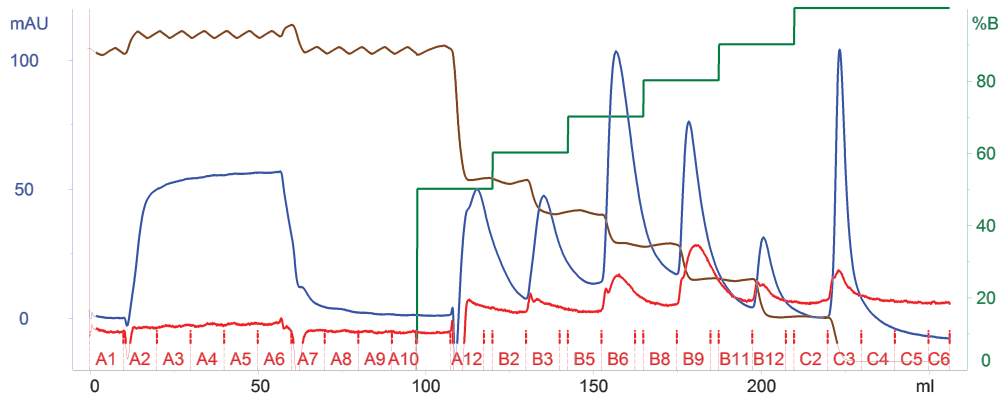


Abbildung 40: Hydrophobes Interaktionschromatogramm: Proteinelution durch Senkung der  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  Konzentration in 10 %-Schritten (0,5 - 0 M), blau: Absorption allgemeiner Protein-Strukturen bei 280 nm, rot: Absorption des Häm-Zentrums bei 417 nm, grün: reziproke  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ -Konzentration, braun: Leitfähigkeit.

### *Kombination aller Schritte*

Das Ziel, das gewünschte Protein in reiner Form zu isolieren wurde durch die geringe Aktivität erschwert. Um ausreichend Proteinmenge für die jeweils aufeinander folgenden Schritte zu erhalten wurden die einzelnen Reinigungen mehrfach durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen vereinigt ohne jeweils auf Aktivität getestet zu werden. Zusammengefasst wurden folgende Experimente verkettet:

- Anionenaustauschchromatographie, es wurden 10 Läufe durchgeführt und jeweils die Fraktionen 17-22 zusammengefasst.
- Das erhaltene Volumen von 400 ml wurde mit Hilfe von Viva-Spin Säulen auf ein Volumen von 50 ml gebracht.
- Die erhaltene Lösung wurde mit gleichem Volumen an 3 M Ammoniumsulfat Lösung versetzt um eine Konzentration von 1,5 M Ammoniumsulfat zu erhalten, um einen Teil der Proteine zu Fällern und die Probe für die Hydrophobe Interaktionschromatographie vorzubereiten.
- Die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde zweimal durchgeführt

und es wurde jeweils die Fraktion 4 zur Sequenzierung gesendet.

#### *Ergebnisse der Sequenzierung*

Die Ergebnisse der zwei Proben, die zur Sequenzierung gegeben wurden, sind im folgen dargestellt (siehe Tabelle 12). Der Farbcode ist folgendermaßen zu verstehen: Proteine die grün hinterlegt sind, sind Enzyme mit bekannten Mechanismen, die gut dem unbekanntem Protein entsprechen können. Gelbe Hinterlegung entspricht einem bekannten Enzym aber unbekanntem Mechanismus oder einem bekannten Mechanismus der schwerlich in Einklang mit den gefundenen Reaktionen gebracht werden kann. Die Hinterlegung in orange symbolisiert die unwahrscheinlichsten Vertreter. Die rot markierten Proteine sind entweder nicht bekannt oder gänzlich unwahrscheinlich und werden daher bei der Untersuchung zurückgestellt. Die den Proteinen zugehörigen Gene sind in der zweiten Spalte und die entsprechende molekulare Masse (MM) in der dritten Spalte gezeigt. Das Rating in der vierten und fünften Spalte gibt an mit welcher Punktzahl die gefundenen Bruchstücke mit dem aus der Datenbank bekannten Enzym übereinstimmen. Je höher, desto wahrscheinlicher, dass das entsprechende Protein in der Lösung vorhanden war. Die grün und gelb markierten Proteine wurden exprimiert und anschließend auf Aktivität getestet: Isocitrat Lyase (AceA),<sup>131</sup> Fruktose Bisphosphat Aldolase (FbaA),<sup>132</sup> Glucuronat Isomerase (UxaC),<sup>133</sup> Katalase HP II (KatE, Häm-abhängig),<sup>134</sup> Alkyl Hydroperoxid Reduktase (AhpC)<sup>135</sup> und Bacterioferritin (Bfr, Häm-abhängig).<sup>136</sup>

Tabelle 12: Vorgeschlagene Proteine für die zwei aufgereinigten Proben in absteigender Häufigkeit der in der Lösung gefundenen Bruchstücke. Der Farbcode von grün, über gelb und orange zu rot symbolisiert die subjektive Einschätzung des katalytischen Potentials der entsprechenden Proteine in Bezug auf die Carben-Reaktionen. Angegeben sind die codierenden Gene, die molekulare Masse (MM) und das Rating, das die einzelnen Proteine in der Sequenzierung erreicht haben.

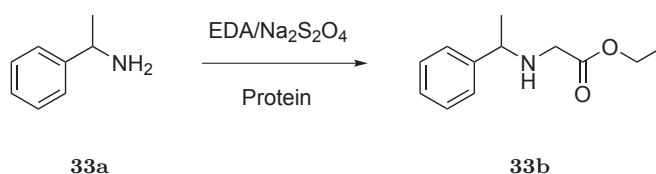
| Identifizierte Proteine (130)  | Gen         | MM      | Rating |        |
|--------------------------------|-------------|---------|--------|--------|
|                                |             |         | Lauf 1 | Lauf 2 |
| Isocitrat Lyase                | <i>aceA</i> | 48 kDa  | 18     | 16     |
| Fruktose Bisphosphat Aldolase  | <i>fbaA</i> | 39 kDa  | 18     | 11     |
| Glucuronate Isomerase          | <i>uxaC</i> | 54 kDa  | 19     | 5      |
| Hydroperoxidase II             | <i>katE</i> | 84 kDa  | 15     | 14     |
| Trypsin im Complex mit Borat   |             | 23 kDa  | 2      | 5      |
| Transketolase                  | <i>tktA</i> | 73 kDa  | 18     | 0      |
| Type II Citrat Synthase        | <i>gltA</i> | 48 kDa  | 7      | 12     |
| Alkyl Hydroperoxid Reduktase   | <i>ahpC</i> | 19 kDa  | 8      | 6      |
| Aminopeptidase N               |             | 101 kDa | 9      | 14     |
| Bacterioferritin               | <i>bfr</i>  | 19 kDa  | 7      | 11     |
| Pyruvat Kinase                 |             | 51 kDa  | 4      | 0      |
| Peptidase B                    | <i>pepB</i> | 48 kDa  | 8      | 7      |
| Purin Nukleosid Phosphorylase  |             | 26 kDa  | 0      | 8      |
| Pyridoxin 5'-Phosphat Synthase |             | 26 kDa  | 3      | 6      |
| Oligopeptidase A               |             | 77 kDa  | 5      | 16     |
| Glutaminyl-tRNA Synthetase     |             | 54 kDa  | 14     | 0      |
| ⋮                              |             |         |        |        |

### 4.3.6 Evaluation der sequenzierten Proteine

Die unter 4.3.5 identifizierten potentiellen neuen Biokatalysatoren wurden im Rahmen der Masterarbeit von Stefanie Kummer exprimiert, aufgereinigt und für die folgenden Reaktionen auf Aktivität getestet.

#### *Carben-Reaktion mit $\alpha$ -Methylbenzylamin*

Das erste Experiment sollte zeigen, ob die identifizierten Proteine in der Lage sind die bisher noch nicht gezeigte NH-Insertion eines aliphatischen Amins in Wasser und unter aeroben Bedingungen zu katalysieren.



Schema 18: Die für die identifizierten Proteine getestete Carben-Reaktion mit  $\alpha$ -Methylbenzylamin

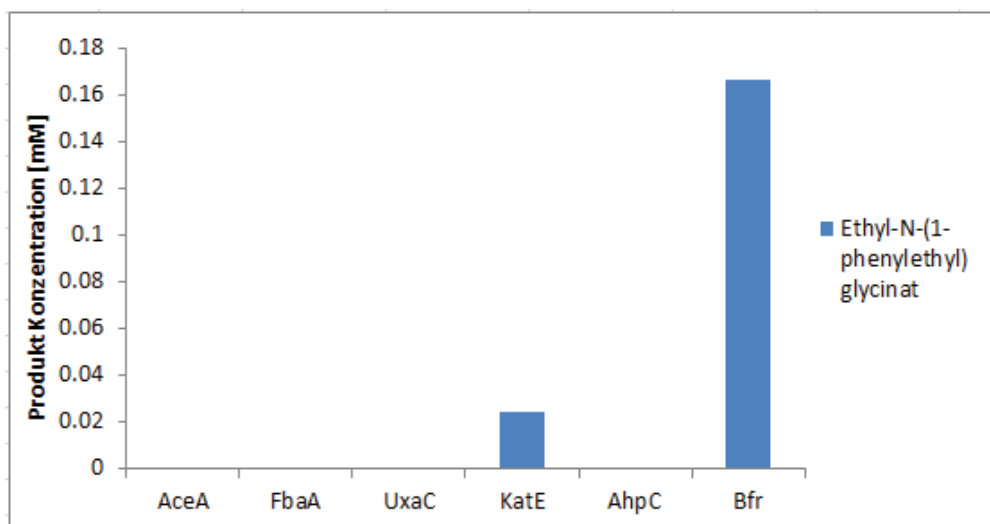
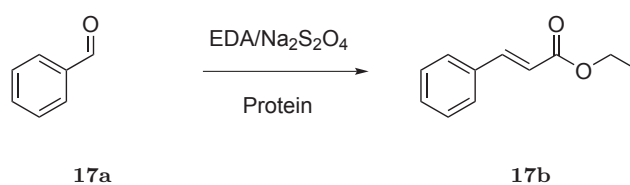


Abbildung 42: Produkt-Konzentration der getesteten Proteine auf Aktivität der NH-Insertion mit  $\alpha$ -Methylbenzylamin.

Tatsächlich waren die beiden Häm-beihaltenden Proteine KatE und Bfr in diesem Experiment aktiv. AceA, FbaA, UxaC und AhpC zeigten keine Produktbildung.

#### *Carben-Reaktion mit Benzaldehyd*

Die durch die Sequenzierung identifizierten Proteine wurden des Weiteren auf katalytische Aktivität bezüglich der neuen Carbonyl-Olefinierung getestet.



Schema 19: Die für die identifizierten Proteine getestete Carben-Reaktion mit Benzaldehyd

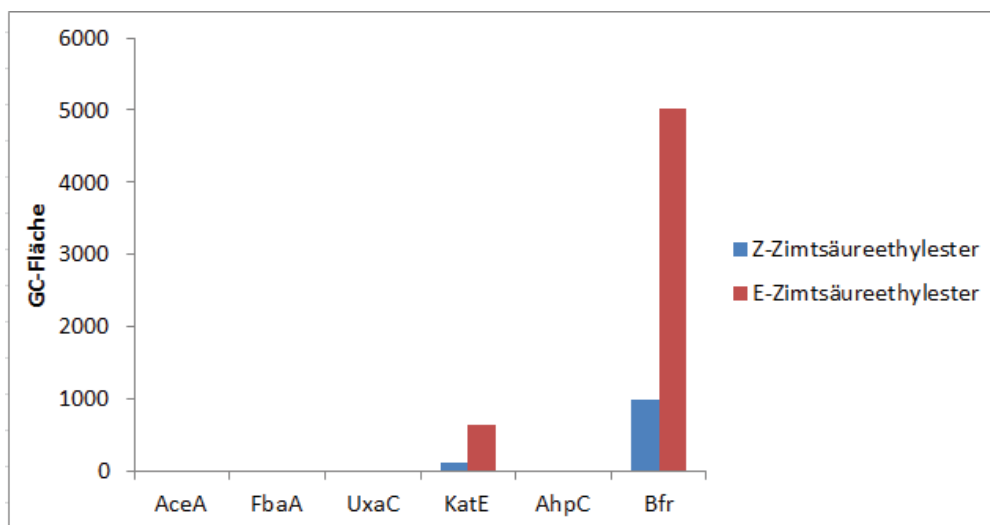
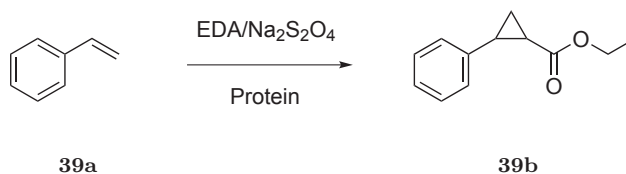


Abbildung 43: Die GC-Flächen der getesteten Carben-Reaktion mit Benzaldehyd.

Auch hier waren die beiden Häm-beihaltenden Proteine KatE und Bfr aktiv. Wieder ist Bfr deutlich aktiver als KatE. Die Parallelen der beiden Reaktionen sind augenfällig und deuten auf einen ähnlichen Mechanismus hin.

### 4.3.7 Identifikation weiterer Katalysatoren

Das Ergebnis, dass beide neuen, aktiven Katalysatoren ein Häm-Zentrum besitzen und die Beobachtung, dass die einzelnen Aktivitäten nicht der Aktivität des gesamten unaufgereinigten Lysats entsprechen führte zu dem Schluss, dass weitere durch die chromatographische Aufreinigung abgetrennte und daher nicht gefundene Katalysatoren im *E.coli*-Genom vorhanden sein könnten. Es wurden daher zwei weitere Häm-Abhängige Proteine aus *E.coli* exprimiert und aufgereinigt, die Stickstoffmonoxid Dioxygenase (Hmp)<sup>137</sup> und die hypothetische Deferrochelatase/Peroxidase (YfeX).<sup>138</sup> Die getesteten Reaktionen sind zum einen die zuvor getesteten (siehe Schema 18 und Schema 19) sowie die für P450-Enzyme beschriebene Cyclopropanierung (siehe Schema 20).



Schema 20: Die in Abbildung 46 gezeigte Carben-Reaktion mit Styrol.

Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen wurde Hämin-Chlorid als zusätzliche Kontrolle getestet. Die Ergebnisse sind im folgenden aufgetragen (siehe Abbildung 44, Abbildung 45 und Abbildung 46)



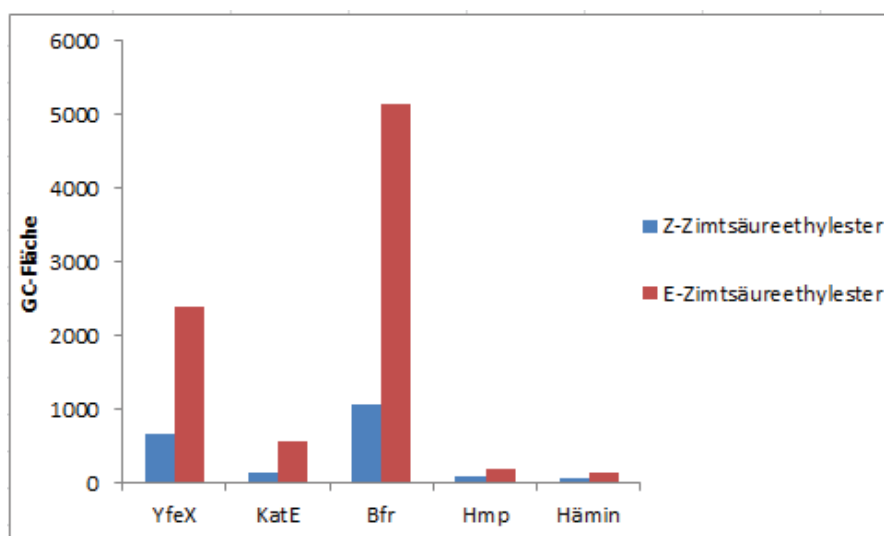


Abbildung 44: Die GC-Flächen der getesteten Carbonyl-Olefinierung mit Benzaldehyd.

Mit diesem Experiment konnte die Hypothese, *E. coli* besitze noch weitere Katalysatoren für die Carbonyl-Olefinierung, verifiziert werden. Die hypothetische Deferrochelatase/Peroxidase YfeX zeigt sogar eine bessere Aktivität als KatE. Mit Hmp konnten wie mit Hämin nur Spuren an Produkt festgestellt werden. Die E/Z-Verhältnisse liegen bei allen Proben zwischen 2 und 5 im Gegensatz zu den für die Triphenylphosphin beinhaltende Eisen-Porphyrin katalysierte Carbonyl-Olefinierung berichteten E/Z-Verhältnissen von  $> 20$ .

### 4.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

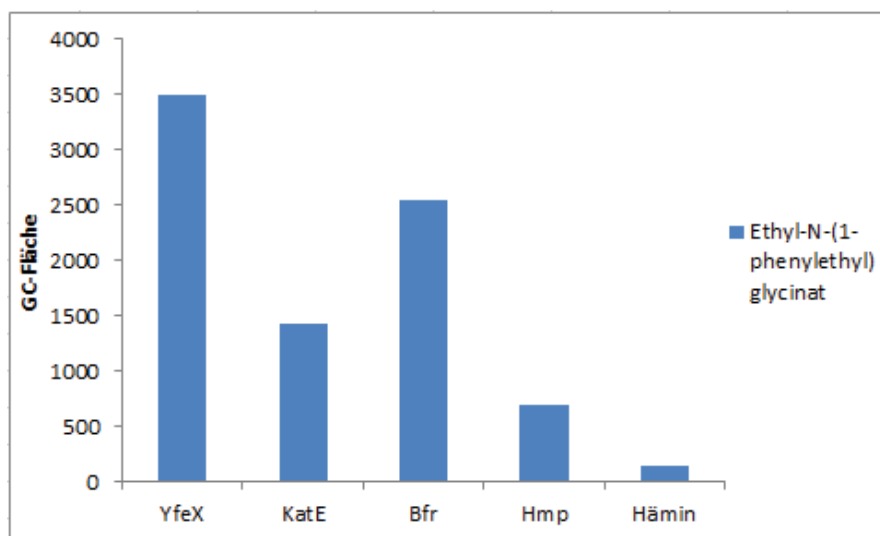


Abbildung 45: Die GC-Flächen der getesteten NH-Insertion mit  $\alpha$ -Methylbenzylamin. Für die NH-Insertion mit  $\alpha$ -Methylbenzylamin zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Carbonyl-Olefinierung. Allerdings sind hier Hmp und KatE vergleichbar mit YfeX und Bfr in ihrer Aktivität. Für diese Reaktion ist YfeX Bfr sogar in der Produktbildung überlegen.

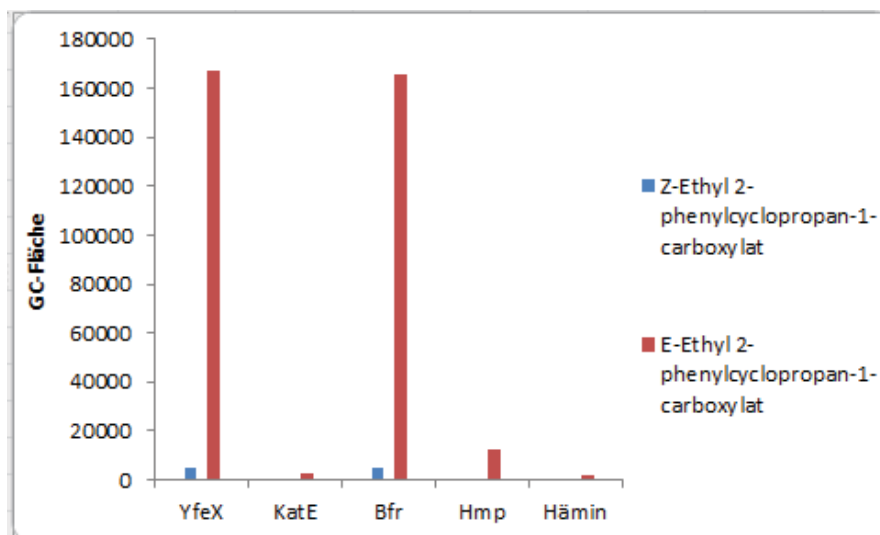


Abbildung 46: Die GC-Flächen der getesteten Cyclopropanierung mit Styrol.

Bei der Cyclopropanierung ist die Situation am deutlichsten. YfeX und Bfr sind

sehr ähnlich in ihrer Reaktivität und deutlich reaktiver als KatE und Hmp. Für Häm-in konnten wieder nur Spuren an Produkt nachgewiesen werden.

Diese Experimente zeigen, dass es in *E. coli* tatsächlich weitere Carben-Reaktionen katalysierende Häm-beinhaltende Enzyme gibt. Mit YfeX wurde ein Enzym gefunden, dessen eigentliche physiologische Rolle unbekannt, und dessen Aktivität als Deferrochelataase umstritten ist.<sup>139,140</sup> Darüber hinaus ist die Aktivität der von Bfr entsprechend und der von Hmp und KatE deutlich überlegen. Aus diesen Gründen wurde YfeX gewählt um weitere Charakterisierungen, bezüglich der katalytischen Aktivität bei Carben-Reaktionen, durchzuführen; es wurde sowohl die NH-Insertion sowie die Carbonyl-Olefinierung charakterisiert. Die folgenden Experimente der Charakterisierung von YfeX zur NH-Insertion mit  $\alpha$ -Methylbenzylamin wurden von Stefanie Kummer und die zur Carbonyl-Olefinierung mit Benzaldehyd von Miriam Kuhn im Rahmen ihrer Masterarbeiten durchgeführt.

#### **4.3.8 Charakterisierung von YfeX als Katalysator der Protein-katalysierten NH-Insertion mit $\alpha$ -Methylbenzylamin**

Zur Charakterisierung einer biochemischen Reaktion werden wie in der organischen Chemie die Parameter einer Reaktion variiert, um dadurch Rückschlüsse auf deren Mechanismus und die Rolle der beteiligten Komponenten ziehen zu können. Die in den folgenden Abschnitten variierten Parameter sind die  $\alpha$ -Methylbenzylamin und die YfeX-Konzentration sowie die Reaktionszeit.

##### *Variation der $\alpha$ -Methylbenzylamin-Konzentration*

Die Veränderung der Start-Konzentration kann auf vielfältige Weise Einfluss auf die Reaktion nehmen. Generell führt eine erhöhte Substrat-Konzentration zur besseren Verfügbarkeit desselben in der Reaktion und kann daher zur Erhöhung der

Produktbildung führen. In enzymatischen Reaktionen kann das Substrat jedoch, wenn es in zu hoher Konzentration vorliegt, die aktive Tasche blockieren (siehe Cofaktoren 4.2).

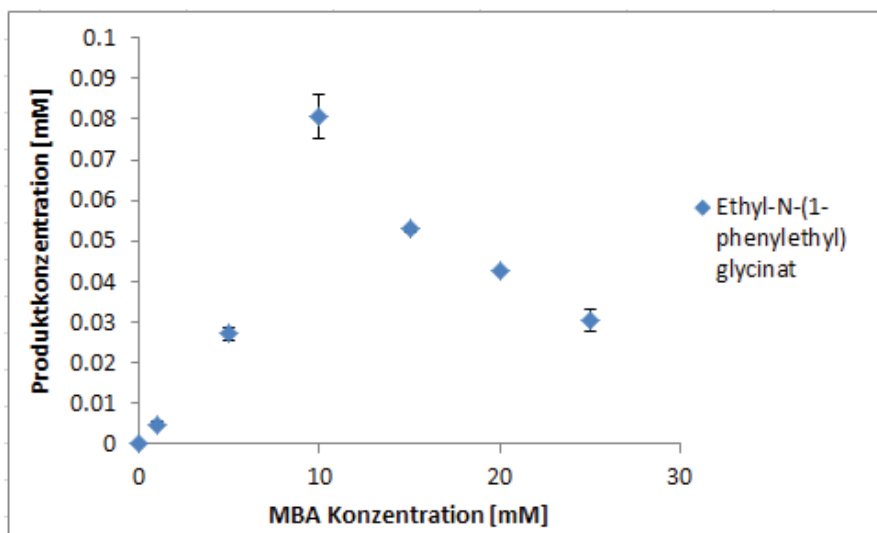


Abbildung 47: Produkt Konzentration gegen die eingesetzte  $\alpha$ -Methylbenzylamin-Konzentration aufgetragen.

Bei geringen Substratmengen wird auch wenig Produkt gebildet, jedoch kann ein deutlicher Anstieg bis zu 10 mM Substrat-Konzentration beobachtet werden. Danach nimmt die Reaktivität wieder ab, was mit der schon bei den Cofaktoren auftretende Substratinhibierung (siehe 4.2) erklärt werden kann.

#### *Variation der YfeX Konzentration*

Nicht nur das Substrat hat einen großen Einfluss auf die Reaktion, auch der Katalysator spielt eine entscheidende Rolle. Je mehr Katalysator in der Reaktion vorhanden ist, desto mehr Substrat kann pro Zeiteinheit umgesetzt werden. Deshalb sollte ein linearer Anstieg der Produktbildung bei steigender Protein-Konzentration nachgewiesen werden.

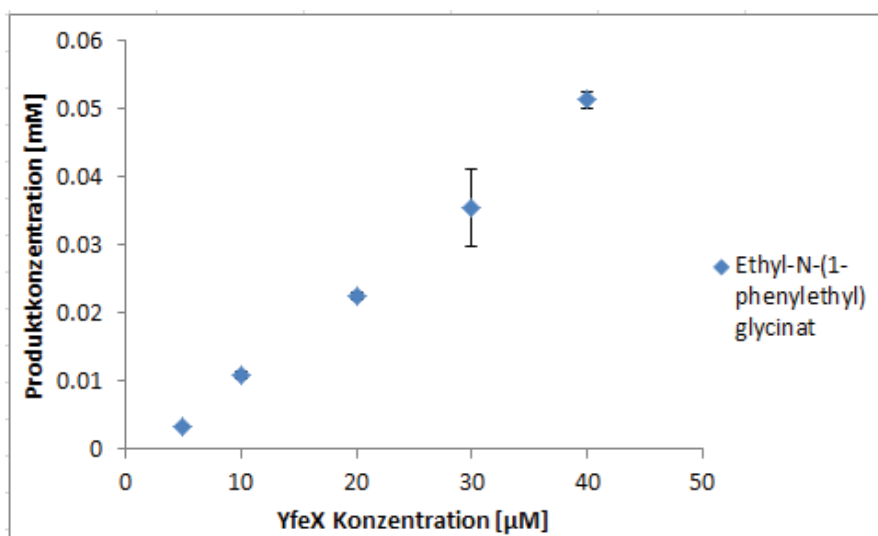


Abbildung 48: Produkt Konzentration gegen die eingesetzte YfeX-Konzentration aufgetragen.

Wie erwartet konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Produktbildung und der YfeX-Konzentration für die Konzentrationen von 5-40  $\mu\text{M}$  gezeigt werden.

#### *Variation der Reaktionszeit*

Da die Reaktionszeit auf viele Reaktionen einen entscheidenden Einfluss hat wurde sie auch für diese Reaktion untersucht. In der Regel gilt für chemische Reaktionen, dass eine längere Reaktionszeit zu mehr Produkt führt. Allerdings gilt dies nicht für Gleichgewichtsreaktionen, bei denen die Rückreaktion sehr schnell ist oder katalysierte Reaktionen bei denen der Katalysator über die Zeit inaktiviert wird. Um diese Frage zu klären wurde die Reaktion nach 15, 30, 45 und 60 min analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 aufgetragen.

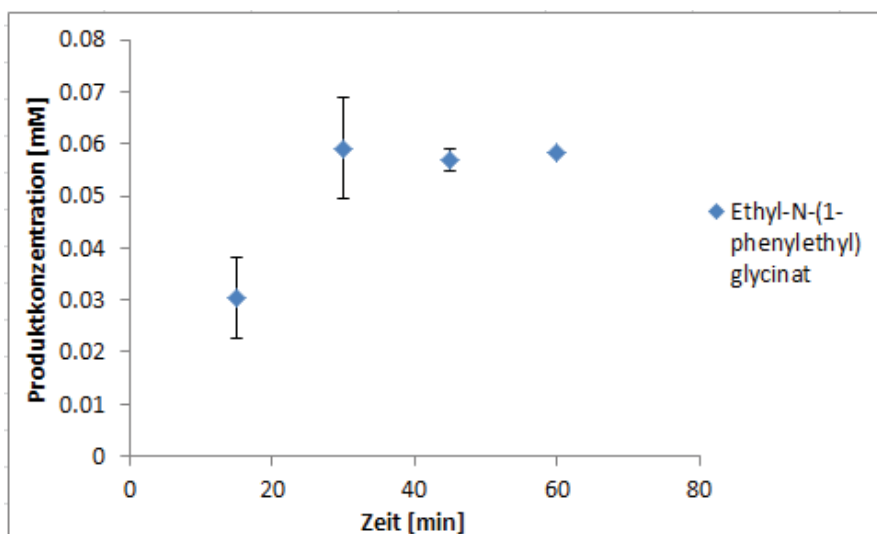


Abbildung 49: Produkt Konzentration gegen die Reaktionszeit aufgetragen.

Die Verlängerung der Reaktionszeit von mehr als 30 min konnte die Produktbildung nicht mehr steigern. Entweder inhibiert das Produkt die Reaktion sehr stark oder der Katalysator wird über die Zeit zerstört.

#### 4.3.9 Charakterisierung von YfeX als Katalysator der Protein-katalysierten Carbonyl-Olefinierung

Auch bei der Carbonyl-Olefinierung ist ein großer Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Produktbildung anzunehmen. Deshalb wurden in den folgenden Abschnitten die Konzentrationen der eingesetzten Reagenzien und des Katalysators untersucht. Die variierten Parameter sind die Benzaldehyd-, die Ethyldiazoacetat-, die Natriumdithionit- und die verwendete YfeX-Konzentration.

##### *Variation der Benzaldehyd-Konzentration*

Zur Untersuchung des Einflusses der Benzaldehyd Konzentration wurden die Konzentrationen 1, 2, 5 und 10 mM getestet und in Abbildung 50 dargestellt.

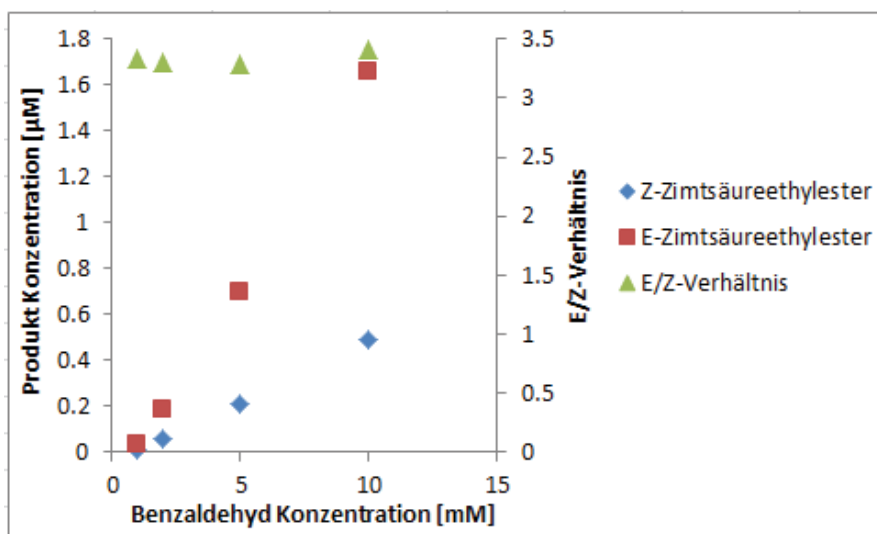


Abbildung 50: Produkt Konzentration gegen die eingesetzte Benzaldehyd Konzentration aufgetragen. Zusätzlich zu den Produkten Z-Zimtsäureethylester in blau und E-Zimtsäureethylester in rot ist das Verhältnis von E zu Z in grün dargestellt.

Es ist ersichtlich, dass die Produkt-Konzentration linear mit der eingesetzten Benzaldehyd Konzentration zunimmt. Auf das E/Z-Verhältnis hat die veränderte Substrat-Konzentration keinen Einfluss. Ein hemmender Effekt wird bei den eingesetzten Konzentrationen nicht beobachtet.

#### *Variation der Ethyldiazoacetat Konzentration*

In diesem Experiment sollte getestet werden ob auch die Erhöhung der Ethyldiazoacetat Konzentration einen positiven Effekt, wie es bei Benzaldehyd der Fall ist, hat. Dafür wurden die Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 50 mM gewählt. Die Verschiebung hin zur Untersuchung höherer Konzentrationen wurde wegen dem Mangel einer Sättigung bei dem Benzaldehyd Experiment durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.

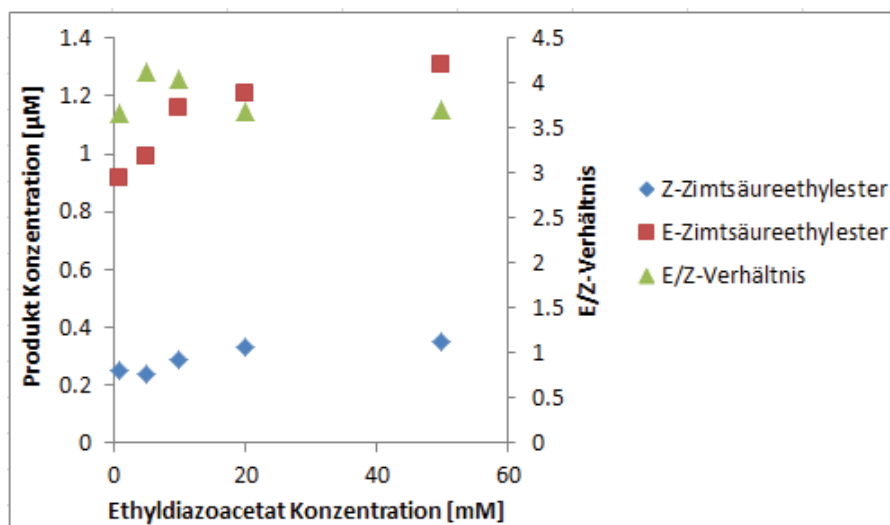


Abbildung 51: Produkt Konzentration gegen die eingesetzte Ethyldiazoacetat Konzentration aufgetragen. Zusätzlich zu den Produkten Z-Zimtsäureethylester in blau und E-Zimtsäureethylester in rot ist das Verhältnis von E zu Z in grün dargestellt.

Wie bei Benzaldehyd ist auch bei EDA eine Erhöhung der Produktbildung bis 10 mM Substrat-Konzentration zu erkennen. Allerdings ist der Einfluss nicht so gravierend wie bei Benzaldehyd. Bei geringen Substrat-Konzentrationen ist die Produktbildung nicht signifikant geringer und bei hohen Konzentrationen ist der positive Effekt nicht ausgeprägt.

#### *Variation der Natriumdithionit Konzentration*

Nach der Variation der zwei Substrate, die zusammen zum Produkt reagieren, wurde die Konzentration von Natriumdithionit, das die Reduktionsäquivalente liefert, verändert. Die Konzentrationen 1, 10, 20 und 50 mM sind in Abbildung 52 dargestellt.



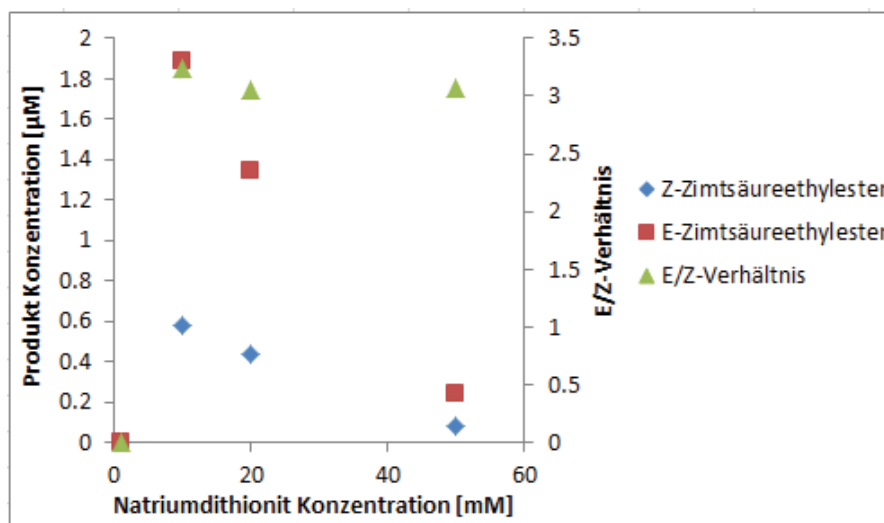


Abbildung 52: Produkt Konzentration gegen die eingesetzte Natriumdithionit Konzentration aufgetragen. Zusätzlich zu den Produkten Z-Zimtsäureethylester in blau und E-Zimtsäureethylester in rot ist das Verhältnis von E zu Z in grün dargestellt.

Obwohl Natriumdithionit nur die Elektronen zur Reduktion des Häms liefert ist sein Einfluss auf die Reaktion enorm. Bei geringen Konzentrationen wird keine Produktbildung festgestellt, bei Konzentrationen  $> 10$  mM nimmt die Produktbildung deutlich ab. Die Denaturierung des katalytischen Proteins durch das reduktive Milieu oder die Zersetzung des Produktes sind denkbar.

#### *Variation der YfeX Konzentration*

Als katalytisch aktive Komponente wurde das Protein YfeX eingesetzt und in den Konzentrationen 10, 50, 100, 148  $\mu\text{M}$  getestet. Die Ergebnisse sind Abbildung 53 zu entnehmen.

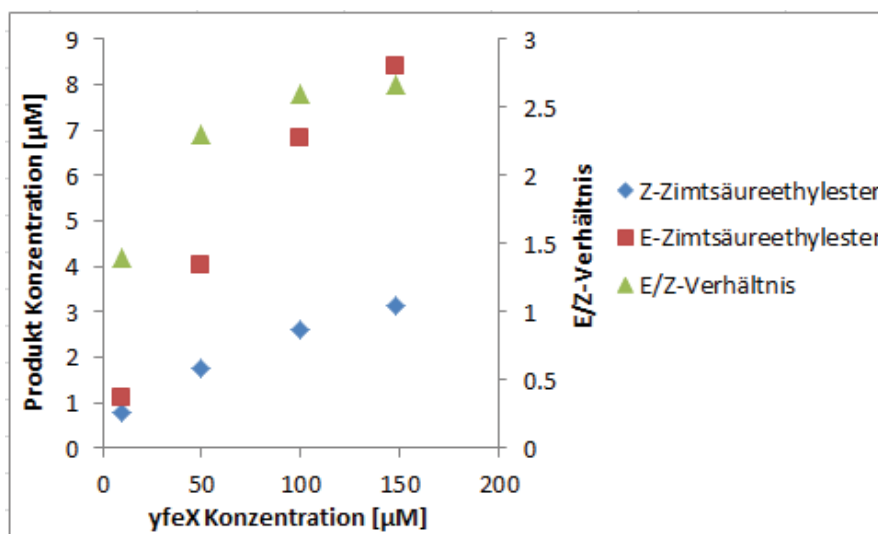


Abbildung 53: Produkt Konzentration gegen die eingesetzte YfeX Konzentration aufgetragen. Zusätzlich zu den Produkten Z-Zimtsäureethylester in blau und E-Zimtsäureethylester in rot ist das Verhältnis von E zu Z in grün dargestellt.

Die Produktbildung scheint linear mit der eingesetzten Protein-Konzentration zuzunehmen. Für höhere Konzentrationen scheint allerdings eine Sättigung einzutreten, was auf das geringere Verhältnis von Substrat, die Benzaldehyd Konzentration wird konstant gehalten, zu Protein zurück geführt werden kann.

#### 4.3.10 Vergleich potentieller Katalysatoren der Triphenylphosphin beinhaltenden Carbonyl-Olefinierung

Die positiven Ergebnisse aus den vorangegangenen Abschnitten zeigten, dass ein Katalysator für die neue Reaktion vorhanden ist. Die Möglichkeit der Aktivitätssteigerung durch die Verwendung von Triphenylphosphin zur Rückgewinnung der aktiven Spezies wurde im folgenden Experiment getestet. Untersucht wurden folgende potentielle Katalysatoren: P450 BM3, YfeX und Hämin. Des Weiteren wurde der axiale Ligand Histidin an Position 215 von YfeX gegen Alanin ersetzt um eine veränderte elektronische Umgebung am Metallatom zu schaffen und dadurch deren

Einfluss auf die Reaktion zu testen. In diesem Zusammenhang wurde zusätzlich Histidin, das auch bei freiem Hämin als Ligand fungieren kann,<sup>141</sup> zu einer Reaktion mit Hämin gegeben. Eine elektronische Situation ähnlich der im Protein könnte dadurch geschaffen werden und der Einfluss des Proteingerüsts wird dadurch verdeutlicht. Die Produktbildungen der verschiedenen Systeme sind Abbildung 54 zu entnehmen.

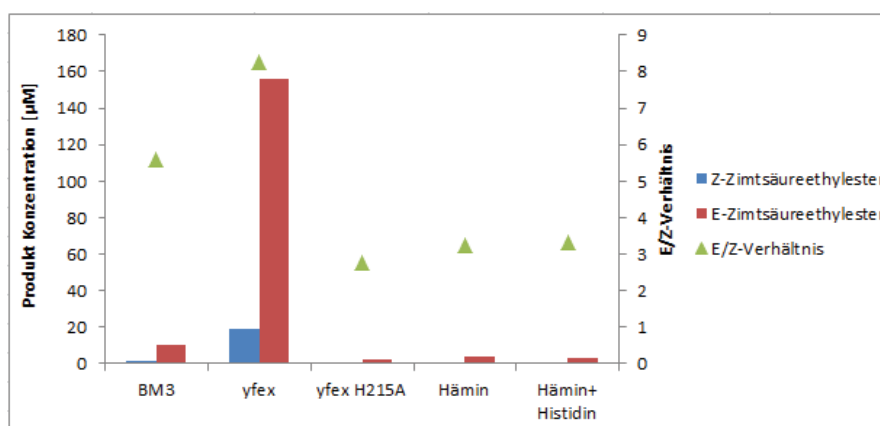


Abbildung 54: Produktkonzentration in den verschiedenen Systemen mit den potentiellen Katalysatoren: P450 BM3, YfeX, die Alanin Mutante des axialen Liganden His 215 von YfeX, Hämin und Hämin + Histidin.

Es ist klar ersichtlich, dass in dieser Reaktion das Häm-Protein P450 BM3 sehr geringe Umsätze im Vergleich zu YfeX zeigt. Auch scheint der axiale Histidin Ligand von YfeX essentiell für die Reaktion zu sein, da die Mutante inaktiv ist. Weder Hämin, noch Hämin + Histidin sind in diesem Reaktionssystem in der Lage signifikante Mengen an Produkt zu bilden.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Rifamycin

#### 5.1.1 Reaktionsoptimierung

Wie unter 1.2 gezeigt wurde, ist die effektive Synthese das Kernstück der organischen Chemie; dies gilt für Laborexperimente ebenso wie für industrielle Prozesse. Da die Schritte der Reaktionsoptimierung im Labormaßstab deutlich leichter durchführbar sind werden sie bei Erfolg auf den großen Maßstab angewendet. Die hier vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Synthese von Rifamycin S sind als solche Optimierungen im kleinen Maßstab zu sehen, die nun industriell nutzbar gemacht werden können. Die Suche nach alternativen Oxidationsmittel führte von Peroxidasen über das Fenton's Reagenz schließlich zu APS, einem günstigen Oxidationsmittel das sehr gut für die Oxidation von Rifamycin B geeignet ist. Mit APS geht die Reaktion allerdings sehr schnell von statten, sodass Rifamycin O in Konzentrationen entsteht, die im Reaktionsmedium unlöslich sind. Präzipitiertes Rifamycin O ist unreaktiv für die folgende Hydrolyse und muss daher vermieden werden. Wie im Ergebnis-Teil unter 4.1 gezeigt, kann durch Variation der eingesetzten Methanolmenge die Reaktion positiv beeinflusst werden. Zum einen erhöht sich die Löslichkeit von Rifamycin O und damit verbessert sich die Hydrolyse zu Rifamycin S, zum anderen wird auch die Löslichkeit von Rifamycin B und damit die mögliche Start-Konzentration erhöht. Da in industriellen Prozessen oft die Reaktionszeit und der zur Verfügung stehende Reaktorplatz limitierend sind, wird eine schnelle Reaktion möglichst großer Edukt-Konzentrationen angestrebt. Dies wird durch ausreichende Zugabe von Methanol erreicht. In diesem Fall ist bei einer Konzentrationen von 10 mM Rifamycin B eine Konzentration von 37,5 % *v/v* ausreichend um das eingesetzte Rifamycin B zu lösen und das entstehende Rifamycin O in Lösung zu halten. Dabei konnte nach 4 h eine Ausbeute von 70 % an

Rifamycin S erhalten werden.

### 5.1.2 Reaktion in reinem Methanol

Im Zuge der Optimierung der Methanol-Konzentration wurde die obere Grenze gesucht, ab der eine Reaktion von Rifamycin B zu Rifamycin S nicht mehr abläuft. Dabei stellte sich heraus, dass Methanol nicht nur in der Lage ist als Lösungsmittel zu dienen, sondern auch selbst die Hydrolyse, respektive Methanolyse von Rifamycin O durchzuführen. Dies konnte wie unter 3.4 beschrieben gezeigt werden, indem die Reaktion mit getrocknetem Methanol unter Argonatmosphäre erfolgreich durchgeführt wurde. Interessanterweise verläuft die Reaktion umso besser je höher die Start-Konzentration an Rifamycin B ist. Wird die Konzentration herabgesetzt, findet die Oxidation weiterhin statt. Allerdings wird die Hydrolyse deutlich verschlechtert. Bei Untersuchungen bezüglich anderer Lösungsmittelsysteme zeigte nur DMSO nennenswerte Umsetzungen aber nur zu Rifamycin O. Allerdings wäre DMSO selbst bei guter Rifamycin S Bildung aus Gründen der Rückgewinnung nur die zweite Wahl hinter Methanol. Weitere Optimierungen zeigten den vorteilhaften Einfluss kleiner Puffermengen, sodass das System mit 99 % Methanol die beste Rifamycin S Bildung zeigte. Dabei konnte nach 20 min eine Ausbeute von 68 % an Rifamycin S erhalten werden.

### 5.1.3 Prozesse

Die oben diskutierten Fortschritte lassen sich nun in zwei unterschiedlichen Prozessoptionen für die industrielle Rifamycin S Produktion zusammenfassen (siehe Abbildung 55).

In Prozess 1 wird die Konzentration von 37,5 % Methanol benutzt. Die Zugabe von Methanol kann hierbei schon während des Waschschriffs erfolgen, bei dem der Fermentationsüberstand vom Pilzmyzel getrennt wird. Im derzeitigen industriellen

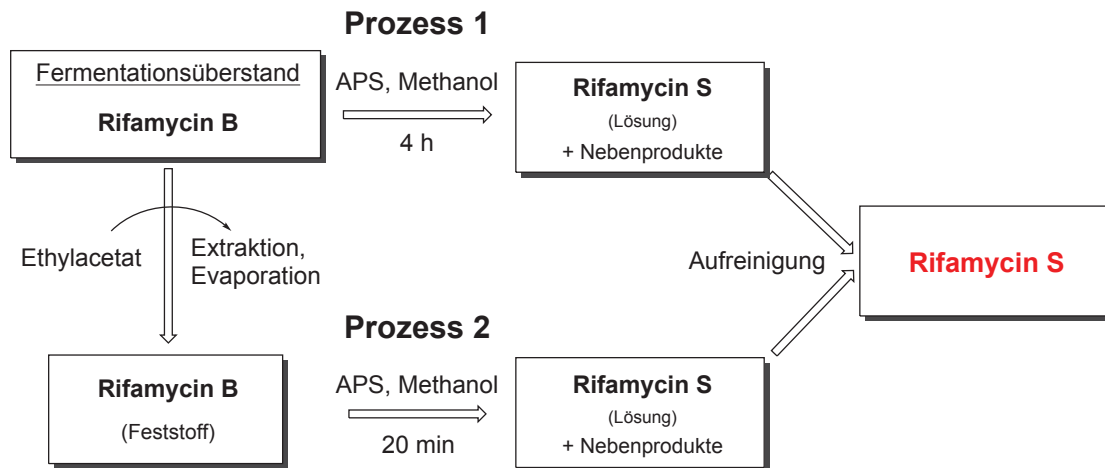


Abbildung 55: Zwei mögliche Prozessoptionen für die Produktion von Rifamycin S

Prozess wird das verbleibende Myzel mit Wasser ausgewaschen, was aufgrund der geringen Löslichkeit von Rifamycin B in Wasser uneffektiv ist. Durch Zugabe von Methanol in diesem Stadium kann aufgrund der erhöhten Löslichkeit zusätzlich die Ausbeute an Rifamycin B erhöht werden – bei gleichzeitiger Reduktion von anfallendem Abwasser. Nach Erreichen des erforderlichen Methanolverhältnisses wird durch Zugabe von APS und Erwärmung auf 60 °C die Reaktion gestartet. Die nach 4 h anfallende Lösung muss nur noch gereinigt werden um Rifamycin S zu erhalten. In Prozess 2 wird Rifamycin B als Feststoff benötigt um das Verhältnis von 99:1 von Methanol:Wasser zu erhalten. Dafür kann mit Ethylacetat extrahiert werden, das nach anschließender Evaporation für die nächste Extraktion wieder verwertet werden kann. Nach Zugabe von APS zu Rifamycin B wird Methanol zugegeben und die Reaktion bei 60 °C für 20 min durchgeführt. Durch Zugabe von Wasser wird die Reaktion unterbrochen und nach Aufreinigung kann Rifamycin S erhalten werden. Zusammengefasst und dem derzeitigen Prozess gegenübergestellt werden die Daten der zwei Prozesse in Tabelle 13.

Tabelle 13: Vergleich der drei Prozesse: des derzeitigen technischen Prozesses, Prozess 1 und Prozess 2

|   | Tech. Prozess | Prozess 1 | Prozess 2 |
|---|---------------|-----------|-----------|
| Dauer [h]   | 5,8           | 4         | 0,33      |
| Produkt [g l <sup>-1</sup> ]  | 1,9           | 1,1       | 62,5      |
| Ausbeute [%]  | 78            | 70        | 68        |
| Spezifische Produktleistung<br>[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ] | 0,33          | 0,28      | 189,4     |

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Ausbeuten und durch die verkürzte Reaktionszeit im Fall von Prozess 1 auch die Spezifische Produktleistung vergleichbar ist. Letztere ist allerdings durch den hohen Edukteintrag sowie die sehr kurze Reaktionszeit bei Prozess 2 um den Faktor 574 gegenüber dem technischen Prozess erhöht. Diese enorme Effizienzsteigerung muss gegen den Mehraufwand des vorhergehenden Extraktions und Evaporations-Zyklus abgewogen werden. In beiden Fällen wird jedoch komplett auf chlorierte Lösungsmittel verzichtet und nur von dem Sanofi Solvent Selection Guide<sup>31</sup> empfohlene nachhaltige Lösungsmittel verwendet. Unter dem Gesichtspunkt der organischen Betrachtung liegt mit Prozess 1 zwar kein Fall einer verbesserten Synthese im Sinne der Hauptargumente Ausbeute und Reinheit vor, allerdings ist die Reduktion der Syntheseschritte und die verbesserte Nachhaltigkeit ein deutlicher Fortschritt gegenüber dem derzeitigen Prozess.<sup>142</sup> Bestätigt wird diese Aussage durch den Umstand, dass derzeit Sandoz seine Anlage in Mahad, Indien auf Prozess 1 umstellt.

## 5.2 Nicotinamid Cofaktoren

### 5.2.1 Hammett-Plot

Die in der Einleitung aufgeworfene Frage, ob das Potential synthetischer Cofaktoren durch die Variation der Substituenten verändert werden kann, wurde wie im Abschnitt (4.2.1) gezeigt, mit einem „ja“ beantwortet. Der genaue Einfluss der Substituenten auf das Potential zeigt sich bei der Auftragung der Werte in einem Hammett-Plot. Für dieses Diagramm werden die Hammett-Parameter  $\sigma$  benötigt, die für viele Substituenten tabelliert wurden. Hierfür wurde der Einfluss der Substituenten auf die Deprotonierungsreaktion von Benzoesäure in Wasser untersucht und die Ergebnisse in Relation zum Substituenten Wasserstoff dargestellt.<sup>19</sup> Viele der in dieser Arbeit vorgestellten synthetischen Cofaktoren besitzen ein an den Heteroaromaten gebundenes aromatisches System. Allerdings sind neben Phenyl- und Benzyl- keine weiteren für die Arbeit relevanten Substituenten auf den Parameter  $\sigma$  hin untersucht worden. Für die weitere Diskussion wird daher die in Abbildung 56 dargestellte Vereinfachung der Substituenten angenommen. Diese Vereinfachung ist deshalb möglich, da elektronische Effekte über ein konjugiertes oder aromatisches System hinweg „verlängert“ werden. Diese Besonderheit mesomeriestabilsierter Systeme lässt sich auch bei der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) beobachten. Hierbei können bei  $sp^2$ -gebundenen Protonen bis zu  $^5J$ -Kopplungen gemessen werden.<sup>143</sup>





## 5.2 Nicotinamid Cofaktoren

Für die Potentiale der verschiedenen Cofaktoren ergeben sich daraus die folgende Werte (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Hammett-Parameter  $\sigma$  für verschiedene Cofaktoren in absteigender Reihenfolge.

|          | NADH | NAAH  | NABH  | NAMH  | NAPH  | NANH  |
|----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $\sigma$ | 0,01 | -0,01 | -0,09 | -0,27 | -0,37 | -0,83 |

Wie unter 3.5 beschrieben wurden mit Cofaktoren cyclovoltammetrischen Untersuchungen durchgeführt. Die erhaltenen Oxidationspotentiale sind in Abbildung 57 gegen die entsprechenden Hammett-Parameter  $\sigma$  aufgetragen.

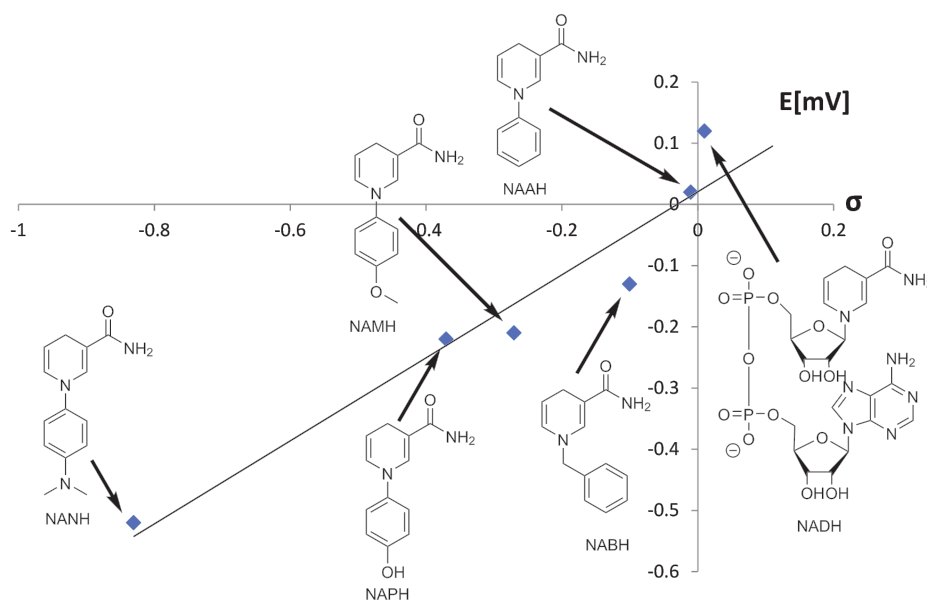


Abbildung 57: Das mittels Cyclovoltammetrie gemessene Oxidationspotential verschiedener Cofaktoren gegen die entsprechenden Hammett-Parameter  $\sigma$ .

Der lineare Zusammenhang zwischen dem elektrochemischen Oxidationspotential und  $\sigma$  ist deutlich sichtbar. Damit ist sowohl das Postulat, dass die vereinfachten

Substituenten verwendet werden können, als auch das Postulat, dass das Oxidationspotential durch Substituenten zu erniedrigen ist, zutreffend. Der Effekt auf das Potential lässt sich auf eine bessere Stabilisierung der positiven Ladung nach der Oxidation zurückführen. Ob das erniedrigte Potential einen positiven Einfluss auf die enzymatische Reaktivität hat wird in den folgenden Abschnitten geklärt.

### 5.2.2 Initiales Screening

Die Ergebnisse von Abschnitt 4.2.2 sind in der folgenden Matrix (siehe Abbildung 58) noch einmal in anderer Form übersichtlich dargestellt. In der Matrix sind die Umsetzungen der Substrate zu den erwarteten Produkten in Relation zu den Umsetzungen mit NAD(P)H (= 1) zu sehen. Je dunkler der Farbton, desto schlechter sind die Umsätze im Vergleich zu NAD(P)H, das heißt, dass entsprechende Enzym nimmt den synthetischen Cofaktor schlechter als Reduktionsäquivalent an.

| relative Reaktivität | NAD(P)H | NABH | NAMH | NANH | NACMH | NAPH | NAAH |
|----------------------|---------|------|------|------|-------|------|------|
| <b>Flavintragend</b> |         |      |      |      |       |      |      |
| NCR                  | 1.00    | 0.82 | 0.96 | 0.63 | 0.82  | 0.99 | 0.94 |
| MR                   | 1.00    | 0.40 | 0.14 | 0.10 | 0.08  | 0.49 | 0.20 |
| P450 Maq CPR         | 1.00    | 0.13 | -    | -    | 0.36  | 0.54 | 0.70 |
| P450 Maq Pfor        | 1.00    | 0.11 | -    | -    | 0.28  | 0.58 | 0.41 |
| P450 BM3             | 1.00    | 0.25 | 0.25 | 0.72 | 0.95  | 0.50 | 0.87 |
| <b>Flavinfrei</b>    |         |      |      |      |       |      |      |
| NtDBR                | 1.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| HLADH                | 1.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| YADH                 | 1.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| Iredst               | 1.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |
| Iredrt               | 1.00    | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00  | 0.00 | 0.00 |

Abbildung 58: Die Aktivitäten von verschiedenen Cofaktoren und Enzymen in Relation zu der Aktivität von NAD(P)H farblich dargestellt.

Dabei fällt zuerst der Unterschied zwischen Flavin-tragenden und Flavin-freien Enzymen ins Auge. Nur Flavin-tragende Enzyme scheinen in der Lage zu sein

synthetische Cofaktoren zu verwenden. Dieser Umstand ist auf den unterschiedlichen Reaktionsmechanismus zurückzuführen (siehe 1.4). Während bei den Flavin-tragenden Enzymen die Flavinreduktion separiert von der Substratreduktion ist, ist bei den Flavin-freien Enzymen die zeitgleiche, exakte Platzierung des Cofaktors und des Substrats essentiell. Da die synthetischen Cofaktoren deutlich weniger Interaktionsmöglichkeiten mit dem Enzym – als das beim NAD(P)H der Fall ist – zur Verfügung haben, kommt es zu keiner produktiven Bindung und damit zu keiner Reaktion. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass es bei den Enzymen starke Unterschiede bezüglich der Cofaktorpräferenz zu geben scheint. Da diese allerdings bei den bisher betrachteten Kombinationen kein signifikantes Muster aufweist ist die Präferenz wohl sterischer Natur und davon abhängig wie der jeweilige synthetische Cofaktor das entsprechende aktive Zentrum erreichen kann. Zu beachten ist bei diesen Versuchen, dass bei allen Experimenten hohe Substrat-Konzentrationen und lange Reaktionszeiten verwendet wurden um auch bei geringen Umsätzen kleine Mengen an Produkt detektieren zu können. Deshalb sind die erhaltenen Umsätze nur qualitativ zu verstehen zum Nachweis der generellen Aktivität des Enzyms mit synthetischem Cofaktor. Dies gilt besonders für die Cofaktoren mit signifikant erniedrigtem Oxidationspotential, da hier die Aktivitätsverbesserung vor allem in der schnelleren Reduktion des Flavins liegt. Dieser Einfluss tritt verstärkt bei kurzen Reaktionszeiten hervor.

### 5.2.3 Proportionalitätsfaktor

Da der direkte Einfluss der Substituenten auf das elektrochemische Potential der synthetischen Cofaktoren gezeigt wurde, ist nun zu evaluieren ob die Reaktivität des Cofaktors mit dem Potential in Relation steht. Dafür wurde der Umsatz gegen  $\sigma$  für die verschiedenen Cofaktoren, Substrate und Enzyme aufgetragen. In Abbildung 59 ist dieser Zusammenhang exemplarisch für NCR dargestellt.

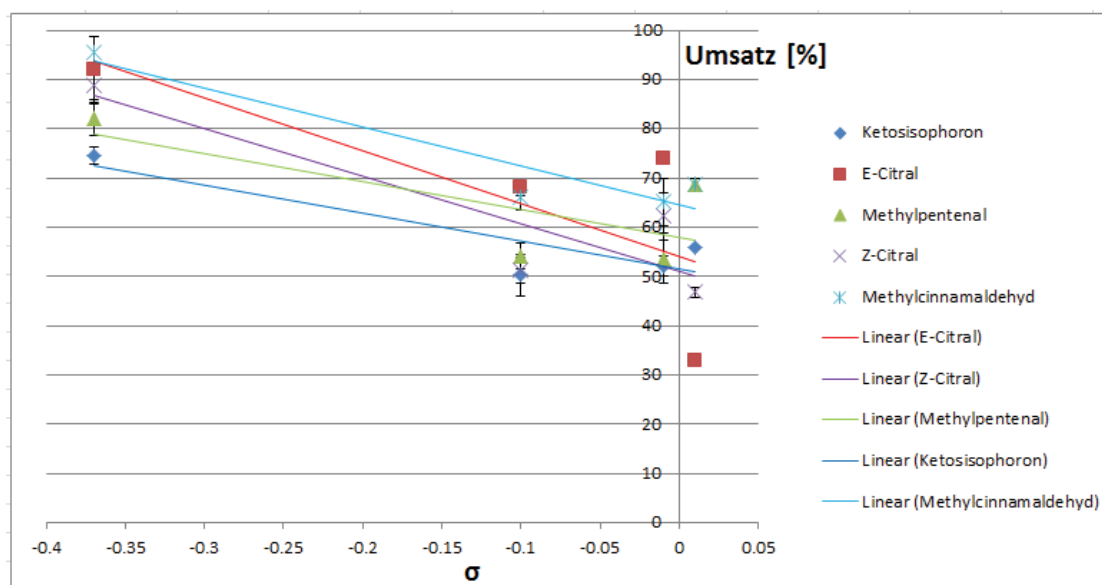


Abbildung 59: Die Umsätze verschiedener Substrate gegen  $\sigma$  der entsprechenden Co-faktoren für das Enzym NCR.

Die Steigung der Ausgleichsgeraden für die unterschiedlichen Cofaktoren entspricht dem Proportionalitätsfaktor  $\rho$  der Hammett-Gleichung. Die Proportionalitätsfaktoren sind in der Matrix Abbildung 60 mit Farbcode zusammengefasst. Hierbei ist in grün ein sehr starker, positiver Einfluss des erhöhten Oxidationspotentials auf den Umsatz in grün und wenig Einfluss in rot dargestellt.

|   | $\rho$ (Reaktionsparameter) | NCR     | MR      | OYE1    | OYE3    |
|---|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Steigender<br>sterischer<br>Anspruch<br>↓ | Ketosisophoron              | -56.746 | 4.3712  | 8.9499  | 1.666   |
|   | Methyl-pental               | -56.993 | -1.0524 | -60.304 | -10.722 |
|   | Methyl-cinnamaldehyd        | -78.635 | -0.1295 | -138.33 | -29.217 |
|   | Z-Citral                    | -96.825 | 0.7488  | -0.9774 | 1.4589  |
|   | E-Citral                    | -107.28 | 1.5713  | -7.3059 | 3.6309  |

Abbildung 60: Der Proportionalitätsfaktor  $\rho$  für verschiedene Substrate und Enzyme mit Farbcode dargestellt. Grün bedeutet einen hohen, rot einen geringen Einfluss des Oxidationspotentials auf den Umsatz.

Wie allerdings in Abbildung 59 im Fall von E-Citral zu erkennen ist, ist der exakte lineare Zusammenhang nicht immer gegeben. In der Statistik wird die Varianz der Variablen durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  angegeben. Ist  $R^2 = 1$  besteht ein perfekter linearer Zusammenhang, ist  $R^2 = 0$  ist kein Zusammenhang zu erkennen. Für die Reaktionsparameter aus Abbildung 60 sind in Abbildung 61 die Bestimmtheitsmaße mit dem Farbcode grün = 1 und rot = 0 dargestellt. Diese Darstellung erlaubt den folgenden Schluss: Bei den Reaktionen, die keinen deutlichen positiven Einfluss des Potentials auf den Umsatz aufweisen, ist generell auch das Bestimmtheitsmaß sehr schlecht. Das heißt es ist kein linearer Zusammenhang zwischen dem Potential und dem Umsatz messbar. Daraus folgt, dass es Enzyme bzw. Enzym-Substrat-Kombinationen gibt, die besonders gut auf das erhöhte Potential ansprechen, aber auch Kombinationen die wegen anderer Präferenzen, wie z.B. Sterik, keinen Einfluss erkennen lassen.

| Steigender<br>sterischer<br>Anspruch<br>↓ | $R^2$         | NCR     | MR     | OYE1   | OYE3   |
|---|---------------|---------|--------|--------|--------|
|   | Ketoisophoron | 0.7927  | 0.2015 | 0.2367 | 0.0287 |
| Methyl-pentenal                           | 0.545         | 0.0008  | 0.026  | 0.0223 |        |
| Methyl-cinnamaldehyd                      | 0.8934        | 0.00002 | 0.8061 | 0.1427 |        |
| Z-Citral                                  | 0.8047        | 0.0022  | 0.3813 | 0.1473 |        |
| E-Citral                                  | 0.5789        | 0.0502  | 0.0637 | 0.0863 |        |

Abbildung 61: Die Bestimmtheitsmaße  $R^2$  für verschiedene Substrate und Enzyme mit Farbcode dargestellt. Grün bedeutet einen hohen, rot einen geringen lineare Zusammenhang der einzelnen Variablen.

Es gibt allerdings auch noch einen weiteren Aspekt, der hierbei betrachtet werden muss: Der Umsatz. Nimmt man den Durchschnitt der Umsätze einer Enzym-Substrat-Kombination für verschiedene Cofaktoren dann erhält man eine Tendenz zur Aktivität der Reaktion. Mit diesen Werten lässt sich abschätzen wie gut die Katalyse abläuft und dadurch wie aussagekräftig die zuvor getätigten Aussagen

sind. In der Matrix in Abbildung 62 sind die Durchschnitts der Umsätze der verschiedenen Cofaktoren für die jeweiligen Reaktionen dargestellt:

| Steigender<br>sterischer<br>Anspruch<br>↓ | Ø Umsatz      | NCR     | MR      | OYE1    | OYE3    |
|---|---------------|---------|---------|---------|---------|
|   | Ketoisophoron | 58.2934 | 2.15803 | 2.76288 | 0.94116 |
| Methyl-pentenal                           | 64.6195       | 16.2412 | 26.5329 | 33.7063 |         |
| Methyl-cinnamaldehyd                      | 73.9112       | 21.6085 | 54.8112 | 35.5579 |         |
| Z-Citral                                  | 62.3117       | 6.56314 | 1.6094  | 1.99994 |         |
| E-Citral                                  | 66.7478       | 2.60289 | 7.70898 | 3.42987 |         |

Abbildung 62: Die Durchschnitts der Umsätze für verschiedene Substrate und Enzyme mit Farbcode dargestellt. Grün bedeutet einen hohen, rot einen geringen durchschnittlichen Umsatz.

Vergleicht man die Matrizes aus Abbildung 60, Abbildung 61 und Abbildung 62 fällt sofort die direkte Korrelation der positiven Werte auf. Dieser Umstand legt den Schluss nahe, dass nur bei ausreichend hohen Umsätzen, wie generell bei NCR oder der Kombination OYE1 und Methyl-cinnamaldehyd, Aussagen über die besprochenen Zusammenhänge getroffen werden können. Darüber hinaus kann aus den vorliegenden Ergebnissen schließen, dass die Enzyme MR, OYE1 und OYE3 deutlich unterschiedliche Erkennungsstrategien für Cofaktoren haben. Bei NCR könnte ein wesentlich offenerer Zugang zur aktiven Tasche die sterischen Einflüsse und den positiven Effekt der vielen Koordinationsstellen des NADHs nivellieren und dadurch die Möglichkeit bieten den reinen elektrochemischen Effekt des Cofaktors ausschöpfen zu können.

#### 5.2.4 Kinetische Betrachtungen des Cofaktoreinflusses

Nachdem die Kombination NCR-Z-Citral als Reaktion mit hoher Korrelation zwischen Umsatz und Potential sowie gutem Bestimmtheitsmaß identifiziert wurde diente sie im Folgenden als Modellreaktion zur Untersuchung der kinetischen

## 5.2 Nicotinamid Cofaktoren

Größen  $K_m$ ,  $v_{max}$  und  $k_{cat}$  für die Cofaktoren NADH und NAPH. Dafür wurden die Reaktionen wie unter 3.5 beschrieben durchgeführt und unter 4.2 ausgewertet. Die erhaltenen kinetischen Kenngrößen der Reaktionen sind in Tabelle 15 dargestellt. Aus dieser Gegenüberstellung der kinetischen Kenngrößen lassen sich einige

Tabelle 15: Kinetische Kenngrößen der Reduktion von Z-Citral katalysiert durch NCR für NADH und NAPH.

| Konstante<br>Cofaktor-<br>Konzentration: | $v_{max}$<br>[ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ] | $K_m$<br>[ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] | $K_s$<br>[ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] | $k_{cat}$<br>[ $\text{s}^{-1}$ ] | $k_{cat}/K_m$<br>[ $\text{s}^{-1}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{l}$ ] |
|--|--|--|--|----------------------------------|--|
| NADH                                     | 0,000305   | 0,0614                                       | 0.4986                                       | 14.48                            | 235.87   |
| NAPH                                     | 0,001012   | 0,1865                                       | 15   | 48.07                            | 257.74   |

| Konstante<br>Citral-<br>Konzentration: | $v_{max}$<br>[ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ] | $K_m$<br>[ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] | $K_s$<br>[ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] | $k_{cat}$<br>[ $\text{s}^{-1}$ ] | $k_{cat}/K_m$<br>[ $\text{s}^{-1}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{l}$ ] |
|--|--|--|--|----------------------------------|--|
| NADH                                   | 0.000453   | 3.8023                                       | -  | 21.54                            | 5.66   |
| NAPH                                   | 0.005536   | 0.2053                                       | 0.5418                                       | 262.96                           | 1280.35  |

sehr interessante Schlüsse ziehen: Im oberen Teil wird die Cofaktor-Konzentration konstant gehalten, damit ist Citral das Substrat auf die sich die Kenngrößen beziehen. Dabei kann mit NAPH ein drei Mal höherer Wert für  $v_{max}$  erreicht werden als mit NADH. Die Werte für  $K_m$  unterscheiden sich im selben Maße, daraus folgt die nahezu gleiche katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_m$  für beide Cofaktoren in diesem System. Diese Darstellung lässt aber gänzlich außer acht, dass diese Aussage, aufgrund der immensen Substratinhibierung, nur für sehr kleine Citral-Konzentrationen von  $< 0,1$  mM gilt. Der Wert  $K_s$  zeigt eine 30fach stärkere Substratinhibierung, wenn NADH statt NAPH als Cofaktor eingesetzt wird. Das kommt vor allem in einem



industriellen Prozess zum tragen, da hier eine möglichst hohe Raum-Zeit-Ausbeute erwünscht ist. Dabei wäre NAPH, vor allem bei hohen Substratkonzentrationen, ein dem NADH überlegenes Reduktionsäquivalent.

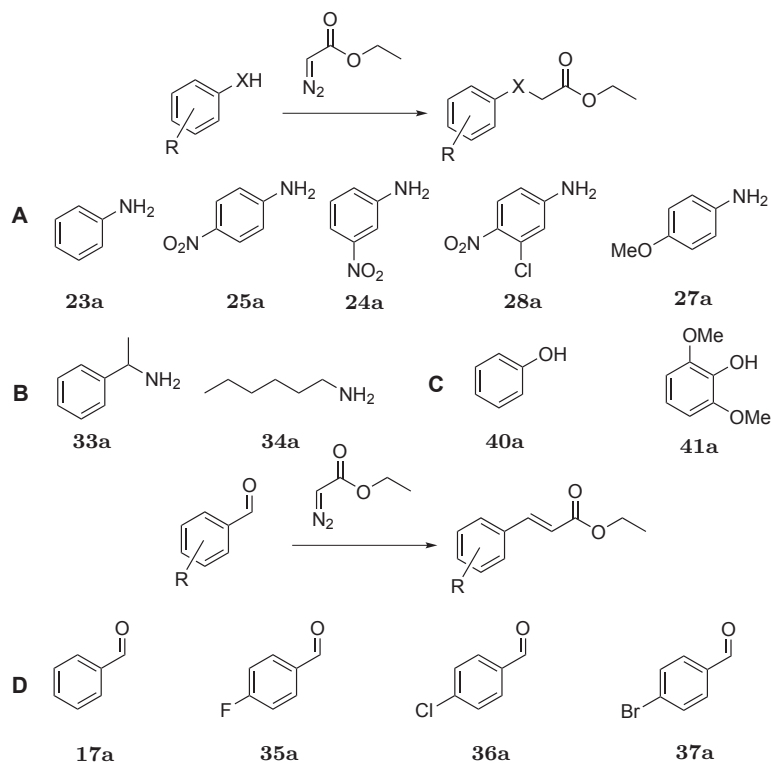
Wird die Citral-Konzentration konstant gehalten lassen sich die Coaktoren als Substrate, auf die sich die Kenngrößen beziehen, verstehen. Hierbei lässt sich mit NAPH nochmals eine deutliche Steigerung von  $v_{max}$  verzeichnen, auf einen Wert, der rund 12 Mal höher als mit NADH ist. Während in diesem System der  $K_m$  von NAPH dem des Citrals bei konstantem NAPH entspricht, ist der  $K_m$  von NADH sehr hoch. Dieser hohe Bedarf an NADH um auf  $v_{max}$  zu kommen schlägt sich in dem geringen Verhältnis  $k_{cat}/K_m$  von 5,66 nieder. Damit liegt die katalytische Effizienz mit NADH um den Faktor 226 unter der von NAPH. Erschwerend kommt hier dazu, dass NADH diese Werte nur bei sehr hohen Cofaktor-Konzentrationen erreicht. Diese sollten jedoch in einem industriellen Prozess, aufgrund der hohen Kosten, vermieden werden. Bei NAPH zeigt sich das umgekehrte Bild, hier tritt bei hohen Konzentrationen Substratinhibierung ein. Damit liegen die Vorteile von NAPH gegenüber NADH auf der Hand: Mit NAPH kann die Citral-Reduktion sehr schnell, bei geringen Cofaktor-Konzentrationen und dennoch hohen Substratkonzentrationen durchgeführt werden. Somit ist NAPH - aus Effektivitätsgründen - als Cofaktor bei der Reduktion von Z-Citral, katalysiert von NCR, der Verwendung von NADH klar vorzuziehen.

## 5.3 Enzymkatalysierte Carbenreaktionen

### 5.3.1 Substratspektrum der *E.coli* katalysierten Carben-Reaktion

Wie unter 4.3 beschrieben wurden eine Reihe initialer Experimente zum Substratspektrum der katalysierten Carben-Reaktionen durchgeführt. Die Liste an neuen, bis zu diesem Zeitpunkt nicht literaturbekannter Substrate, beinhaltet die Anilin-

Derivate (**24a-25a**) (**A**), die aliphatischen Amine **34a** und **33a** (**B**), die Phenole **40a** und **41a** (**C**) und neben Benzaldehyd (**17**) die Derivate **35a-38a** (**D**) (siehe Schema 21).



Schema 21: Neue Substrate für die eine Produktbildung mit Ethyldiazoacetat nachgewiesen werden konnte; XH-Insertionen mit **A** Anilin-Derivaten, **B** aliphatische Aminen, **C** Phenolen und Carben-Olefinierung mit **D** Benzaldehyd-Derivaten.

### 5.3.2 Bewertung der Substrate NH-Insertion nach Hammett

Wie schon bei den Cofaktoren wurde auch hier versucht Veränderungen in der Reaktivität durch Variation der Substituenten hervorzurufen. Für die NH-Insertion ist Anilin, wie von Arnold *et al.* gezeigt ein Standard-Substrat. Woo *et al.* führten eine Analyse der Substituenten-Einflüsse bei der Eisen-Porphyrin katalysierten NH-Insertion in dem aprotischen Lösungsmittel Toluol durch. Sie zeigten dass

elektronenschiebende Substituenten einen beschleunigenden Effekt aufweisen.<sup>144</sup> Die Gruppe erstellte einen Hammett-Plot<sup>19</sup> und fand die Reaktivität abnehmend in der Reihe:  $\text{OCH}_3 > \text{CH}_3 > \text{Br} \sim \text{Cl} > \text{NO}_2 > \text{CN}$ . Diese Tendenz ist erwartet für eine Reaktion, deren geschwindigkeitsbestimmender Schritt ein nukleophiler Angriff eines aromatischenamins an einen elektrophilen Kohlenstoff ist, einzig die vertauschte Aktivität von  $\text{NO}_2$  und  $\text{CN}$  ( $\text{CN} > \text{NO}_2$  wäre erwartet) weicht davon ab und wird aber von den Autoren nicht näher erklärt. In wässrigem Milieu stellt sich die Situation allerdings anders dar. In der Dissertation von Dr. Stahmer zu Epoxidhydrolasen konnte gezeigt werden, dass Amin Substrate mit hoher Nukleophilie in erheblichem Maße protoniert vorliegen und daher nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung stehen. Somit erhält man im Hammett Diagramm eine Kurve mit Minima bei niedrigen und hohen  $\sigma$  und ein lokales Maximum dazwischen. Sie konnte 3-Chloro-4-methoxyanilin **28a** in ihrer Arbeit als bestes Nukleophil ausmachen, in diesem System ist es hingegen 3-Chloro-Anilin **42a** (siehe Abbildung 63).<sup>145</sup>

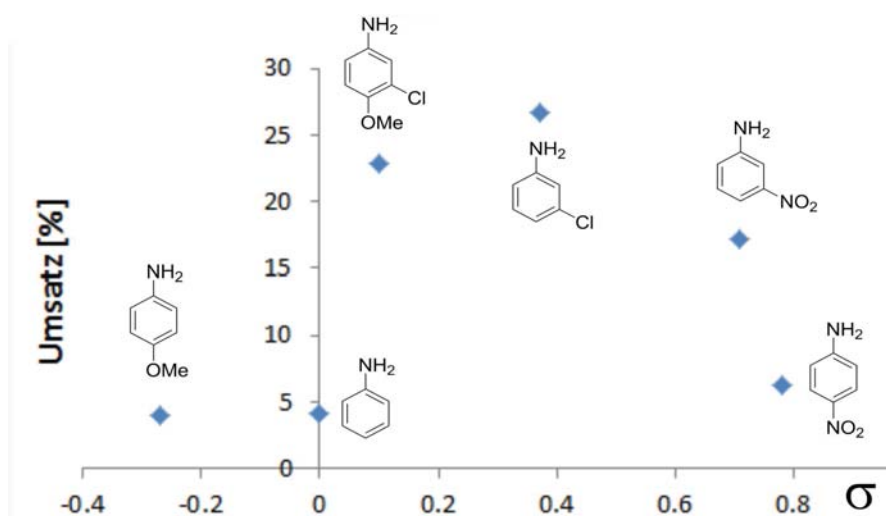


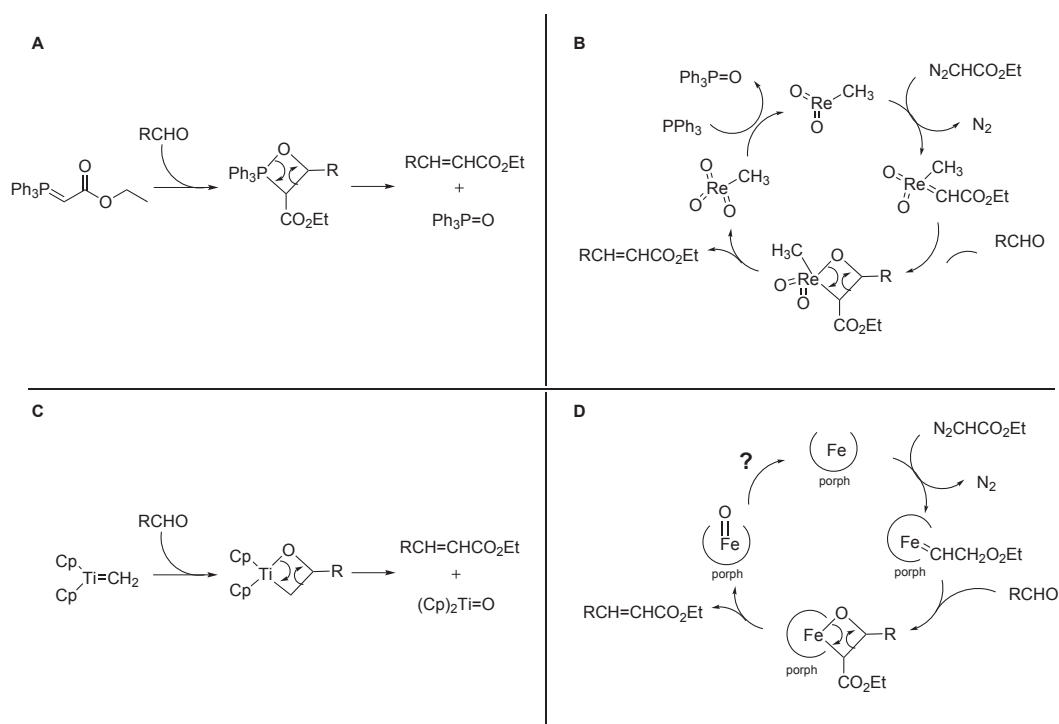
Abbildung 63: Der Umsatz der katalysierten NH-Insertion für verschiedene Anilin-Derivate gegen die Hammett-Konstante  $\sigma$  aufgetragen.

Vor diesem Hintergrund erscheint es erstaunlich, dass die Produktbildung mit den

nukleophileren aliphatischen Aminen Hexylamin **34** und  $\alpha$ -Methylbenzylamin gezeigt werden konnte, im Fall von Hexylamin sogar die doppelte Insertion. Über die Gründe der unerwartet hohen Reaktivität der aliphatischen Amine liegen noch keine gesicherten Erkenntnisse vor. Denkbar wäre z.B. eine hydrophobe aktive Tasche, die selektiv nur die unprotonierten, neutralen Amine, die im Gleichgewicht zwar in geringen Mengen aber dennoch vorhanden sind, einlässt oder Protonenakzeptoren wie Histidin, die das Ammonium-Ion wieder aktivieren.

### 5.3.3 Carbonyl-Olefinierung

Woo *et al.* veröffentlichten neben der NH-Insertion auch eine weitere spannende Eisen-Porphyrin katalysierte Reaktion: Eine Carbonyl-Olefinierung. In der entsprechenden Publikation diskutieren sie mögliche Mechanismen und vergleichen einen postulierten Mechanismus mit der Methyltrioxorhenium katalysierten Reaktion (Schema 22 B und D). In Schema 22 sind vier Mechanismen der Carbonyl-Olefinierung die einen viergliedrigen Übergangszustand annehmen verglichen;<sup>90,146,147</sup>



Schema 22: Vergleich der Reaktionen A Wittig, B Methyltrioxorhenium, C Tebbe und D Eisen-Porphyrin

In **A** ist die Wittig-Reaktion mit einem Phosphoran als Substrat und einem Phosphorylid als Zwischenprodukt zu sehen. In **B** ist die Reaktion mit Methyltrioxorhenium, das zu einer inaktiven Metall-Oxo-Spezies führt, die dann mit Triphenylphosphin regeneriert wird dargestellt. **C** zeigt die Tebbe-Reaktion, deren Substratspektrum auf Methylierungen beschränkt ist und ebenfalls zu einer inaktiven Metall-Oxo-Spezies führt und **D** stellt eine postulierte Eisen-Porphyrin katalysierte Reaktion die theoretisch zu einer Eisen(IV)-Oxo-Spezies führte und deren Regeneration wie bei Methyltrioxorhenium durch Triphenylphosphin stattfinden könnte dar. Der Umstand, dass die Eisen(IV)-Oxo-Spezies in den Enzymen der P450-Familie sehr reaktiv ist und schnell weiter reagiert sowie die in der Einleitung beschriebenen Argumente für eine Überführung des Carbens in die aktive

Ylid-Spezies durch die Verwendung von Triphenylphosphin sprechen gegen diesen Mechanismus. Dennoch ist Produktbildung ohne die Zuge von Triphenylphosphin messbar und dieser Mechanismus böte eine mögliche Erklärung.

#### *Nachweis der Carbonyl-Olefinierung*

Die erfolgreiche Umsetzung von Benzaldehyd und -derivaten (**17-44**) mit *E.coli*-Lysat unter Verwendung von Natriumdithionit und Ethyldiazoacetat ist überraschend und hochgradig spannend. Da in diesem Experiment kein Triphenylphosphin verwendet wurde muss von einem anderen Mechanismus ohne Phosphoran-Zwischenstufe ausgegangen werden. In diesem Zusammenhang scheint der Mechanismus D in Schema 22 eine Option zu sein und die nicht vorhandene Rückführung des Katalysators könnte die niedrigen Umsätze erklären.

#### **5.3.4 Kontrollen und Aufreinigung**

Nachdem die Kontrollen (siehe 4.3.2) eindeutig belegten, dass es sich bei dem neuen Katalysator aus *E.coli*-Lysat um ein Protein handelt wurde die Identifikationsstrategie (siehe 4.3.3) entsprechend einem Biomolekül gewählt. Es wurden zwei Ansätze entwickelt, von denen sich nur einer als erfolgreich erwies. Der erste Ansatz bestand in der Abtrennung einer großen Menge an Fremdprotein, mit anschließender SDS-PAGE und Sequenzierung der dominanten Banden. Hierbei stellte sich heraus, dass zum einen Proteine im Lysat vorhanden sind, die so hochfrequent auftreten, dass trotz einer guten Aufreinigung die dominanten Banden inaktiv sein können. Zum anderen zeigte sich, dass das Zielprotein in so geringer Konzentration vorliegt, dass trotz messbarer Aktivität keine SDS-Bande identifiziert werden kann. Der zweite Ansatz berücksichtigt diese Erkenntnisse und führt dank vier aufeinander folgenden Reinigungsschritten mit anschließender Sequenzierung der gesamten Fraktion zu mehreren positiven Kandidaten. Der Erfolg dieser Strategie

ist nicht zuletzt der stetigen Verbesserung der Probenaufbereitung und Analyse geschuldet da durch die Verkleinerung der Gesamtproteinmenge Zielprotein verloren geht und die Aktivitätsmessungen daher kontinuierlich erschwert werden.

### 5.3.5 Identifikation und Evaluation aktiver Proteine

#### *Aktivität der sequenzierten Proteine*

Die erfolgreiche Identifikation der Proteine Katalase HP11 (KatE) und Bacterioferritin (Bfr) für die Reaktionen mit Benzaldehyd zeigt deutlich, dass das katalytische Potential *E.coli*-eigener Proteine noch lange nicht ausgeschöpft ist – im Gegenteil eher unterschätzt wird. Der konsequente Schluss nach weiteren Katalysatoren im *E.coli*-Genom zu suchen führte zu zwei weiteren Hämhaltigen Proteinen: Stickstoffmonoxid Dioxygenase (Hmp) und die hypothetische Deferrochelatase/Peroxidase (YfeX), die ebenfalls in der Lage sind das Produkt Zimtsäureethylester zu bilden.

#### *Anwendbarkeit der neuen Katalysatoren*

Da die Aktivitätstest der Proteinaufreinigung nur mit Benzaldehyd durchgeführt wurden, wurde getestet, ob die neu identifizierten Katalysatoren auch für andere Carben-Reaktionen geeignet sind. Dazu wurden neben der Carbonyl-Olefinierung mit Benzaldehyd die NH-Insertion mit  $\alpha$ -Methylbenzylamin und die Cyclopropanierung mit Styrol getestet. Hämin-Chlorid diente in den Experimenten als Kontrolle und lieferte stets die geringste Produktbildung. Es zeigten sich Parallelen der Reaktivitäten der Proteine in den verschiedenen Reaktionen. Bfr und Yfex waren stets die beiden aktivsten Katalysatoren jedoch war Yfex bei der NH-Insertion besser und Bfr bei der Carbonyl-Olefinierung. Es gab jedoch auch deutliche Unterschiede, wie in der Reaktivität von KatE und Hmp zu sehen ist. Eindeutig geht aus in diesem Experiment die Möglichkeit hervor, die gefundenen *E.coli* Proteine

nicht nur für die gesuchte Carbonyl-Olefinierung sondern auch weitere Carben-Reaktionen einzusetzen.

### *YfeX als Kandidat zur Charakterisierung*

Da die literaturbekannte Charakterisierung des Proteins YfeX in weiten Teilen noch aussteht und die physiologische Rolle noch unbekannt ist, hatte die Erforschung und Charakterisierung dieses hypothetischen Enzyms großes wissenschaftliches Interesse und daher Priorität vor den anderen Proteinen.

### **5.3.6 Charakterisierung der von Yfex katalysierten NH-Insertion mit $\alpha$ -Methylbenzylamin**

Bei der Betrachtung der Substrat-Konzentrationen lässt sich oftmals ein starker Einfluss nachweisen, der teilweise auch Rückschlüsse auf die Reaktion an sich zulässt. Die Konzentration an  $\alpha$ -Methylbenzylamin hat einen deutlichen Einfluss auf die Produktbildung. Bei geringen Substrat-Konzentrationen wird wenig Produkt gebildet und die Produktbildung nimmt mit steigender Konzentration zu. Deutlich ist in diesem System die Substratinhibierung zu erkennen, da bei Konzentrationen  $> 10$  mM die Produktbildung wieder abnimmt. Die Untersuchung der Reaktionszeit ergab eine maximale Produkt-Konzentration nach 30 Minuten. Warum im weiteren Verlauf der Reaktion kein weiteres Produkt gebildet wird ist unklar. Die wahrscheinlichste Erklärung ist die Inaktivierung des katalytischen Häm-Zentrums. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Experimente wurde jedoch die Standard-Reaktionszeit von 60 Minuten beibehalten.



### 5.3.7 Charakterisierung der von Yfex katalysierten Carbonyl Olefinierung

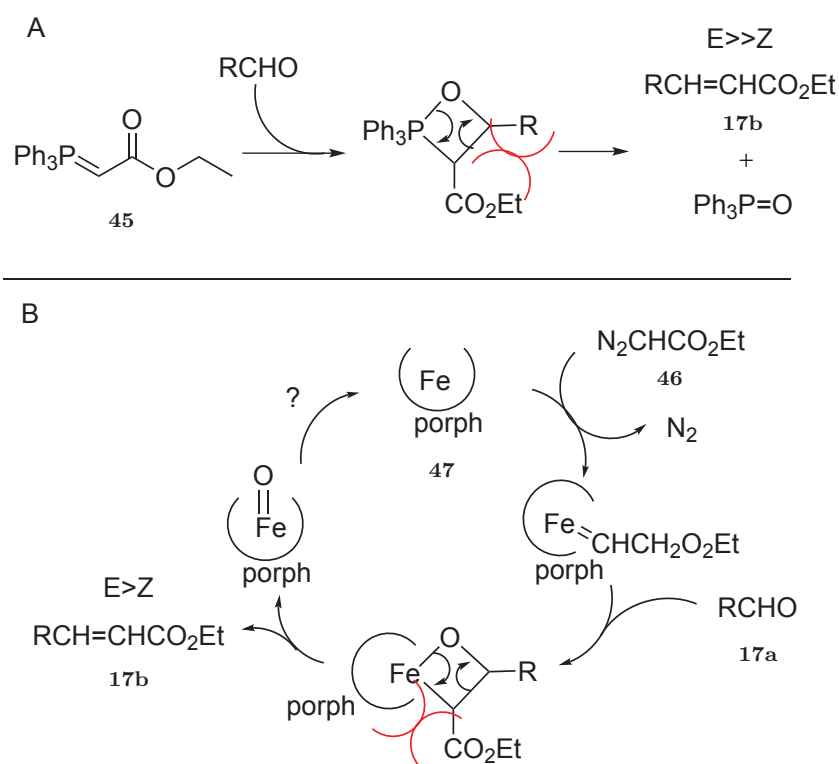
Im Fall der Yfex katalysierten Carbonyl-Olefinierung zeigt sich eine deutliche und lineare Abhängigkeit der Produktbildung von der Konzentration des Substrats Benzaldehyd. Die Verfügbarkeit desselben scheint in wässriger Lösung nicht optimal zu sein und wird wohl durch höhere Konzentrationen verbessert. Die Tatsache, dass es sich bei der Reaktion um eine zwei-Komponenten-Reaktion handelt, bei dem zuerst die reaktive Spezies in der aktiven Tasche gebildet werden muss bevor Benzaldehyd abreagieren kann scheint hierbei keine Rolle zu spielen. Im Gegenteil, die Annahme Benzaldehyd könnte die aktive Tasche blockieren und die Bildung des Carbens verhindern lässt sich bei den betrachteten Konzentrationen nicht zeigen. Die Beobachtung, dass eine erhöhte Ethyldiazoacetat Konzentration keine nennenswerte Verbesserung bringt ist konsistent mit der Theorie, dass die Benzaldehyd Verfügbarkeit geschwindigkeitsbestimmend ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das YfeX, sofern es noch nicht inaktiviert wurde, im „Carben-Zustand“ vorliegt. Die Natriumdithionit Konzentration hat den stärksten Einfluss auf die Produktbildung – allerdings im negativen Sinne. Während die geringe Reaktivität bei kleinen Konzentrationen auf das fehlende elektrochemische Potential und dadurch fehlende Reduktion des Eisen (III) zu Eisen (II) zurückzuführen ist, ist die geringe Reaktivität bei höheren Konzentrationen durch die aggressive Natur des Reagenz zu erklären. Denaturierung des Katalysators oder Folgereaktionen des Produkts können mögliche Ursachen sein. Die Konzentration des Proteins geht wie erwartet linear in die Produktbildung mit ein, da jeder Katalysator eine gewisse Lebensdauer hat und nur eine gewisse Anzahl an Umsetzungen leisten kann. Daher führt die Verdopplung des Katalysators lediglich zu einer Verdopplung der maximalen Produktbildung.

### 5.3.8 Mechanistische Betrachtungen der Protein katalysierten Carbonyl-Olefinierung

Mit der Wechselzahl (engl. Turnover number, TON) wird die Anzahl der erfolgreichen katalytischen Zyklen eines Katalysators angegeben. Diese ist bei der Carbonyl-Olefinierung unter Verwendung von Proteinen bisher  $< 1$ . Daher stellt sich die Frage ob Katalyse vorliegt.

Da die vorhandene Aktivität durch viele Experimente und Kontrollen auf das Vorhandensein eines Häm-haltigen Proteins zurückgeführt werden konnte und durch die Identifikation weiterer aktiver Häm-Proteine bestätigt wurde ist nun die Rolle derselben in der Reaktion zu klären. An dieser Stelle ist nochmals anzuführen, dass in den verwendeten Konzentrationen Hämin-Chlorid kaum Reaktivität zeigte. Erst die Erhöhung der Häm-Konzentration um den Faktor 5 auf 100  $\mu\text{M}$  lieferte mit den Proteinen vergleichbare Aktivität. Es ist daher naheliegend, dass die Proteinumgebung eine entscheidende Rolle bei der neuen Reaktivität spielt. Ein weiterer interessanter Punkt ist das E/Z-Verhältnis der entstehenden Produkte. Die Wittig Reaktion liefert mit stabilen Yliden – und darum handelt es sich bei dem in der Reaktion unter Verwendung von Triphenylphosphin und EDA entstehenden Ylid – einen starken E-Überschuss. Woo *et al.* zeigte in ihrem System mit den selben Substraten unter Verwendung von Triphenylphosphin ein E/Z-Verhältnis von  $> 30:1$ .<sup>92</sup> In den Protein-katalysierten Reaktionen entstehen die Produkte in einem Verhältnis von 2:1 - 5:1. Diese Verschiebung könnte auf wenig Platz in der aktiven Tasche des Proteins und daraus resultierenden Abstoßungen der Reste, angedeutet in Schema 23 durch die roten Halbkreise, zurückzuführen sein. Während sich bei der Reaktion mit dem Phosphoran **45**, bei der Reaktion von Woo *et al.* wird wie bei der Wittig Reaktion dieses Intermediat gebildet, die Reste frei mit der minimalen Abstoßung ausrichten können wird in enzymatischen Reaktionen oft das unvorteilhafte Produkt aufgrund von sterischen Hinderungen in der aktiven

Tasche gebildet.



Schema 23: Vergleich der Triphenylphosphin beinhaltenden (A) und der Eisen-Porphyrin katalysierten (D) Carbonyl-Olefinierung.

Es können dennoch Gründe für eine  $\text{TON} < 1$  bei trotzdem vorhandener katalytischer Aktivität angeführt werden. Aufgrund fehlender Referenzdaten bezüglich des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von YfeX nicht kann bewiesen werden, dass jedes eingesetzte Protein ein Häm trägt. Ein „leeres“ Proteingerüst zählte demnach zu der TON ohne aktiv sein zu können. Entscheidend für die enzymatische Aktivität ist weiterhin die Expression, da Enzyme inaktiv exprimiert werden können. Trotz sichtbarer Löslichkeit sind Fehlfaltungen und die daraus resultierende Inaktivität denkbar und durch ein geeignetes Expressionssystem zu verhindern. Solche fehlgefalteten Proteine sind ebenso wie diese die kein Häm tragen mittels Prote-

inbestimmung zu messen und verfälschen die TON. Im letzten Punkt ist darauf hinzuweisen, dass es sich hierbei um ein Wildtyp-Protein ohne bekannte Funktion handelt. Da Carben-Vorstufen wie in der Form Ethyldiazoacetat nicht in der Natur auftauchen kann davon ausgegangen werden, dass die messbare Aktivität promiskuitiver Natur ist und daher mit Enzyme-Engineering deutlich optimiert werden kann. Alle diese Punkte zeigen, dass es sich hier um ein Protein mit großem Potential handelt, das lediglich noch nicht ausgeschöpft wird. Da es sich allerdings wie im Fall des Methyltrioxorheniums um eine Inaktivierung des Metalls handeln könnte wurde zusätzlich die Reaktion mit Triphenylphosphin evaluiert.

### **5.3.9 Vergleich potentieller Katalysatoren der Triphenylphosphin beinhaltenden Carbonyl-Olefinierung**

Die unter 5.3.7 diskutierten Aspekte der Katalysator Inaktivierung und die daraus folgende Verwendung von Triphenylphosphin zur Wiederherstellung der aktiven Spezies führte bei gleichbleibenden Bedingungen mit yfeX zu einer TON von 8. Zum Vergleich wurde P450 BM3 getestet wobei nur eine TON von 0,5 gemessen wurde. Die Verwendung von Häminchlorid sowie die Verwendung von Häminchlorid in Kombination mit Histidin führte nur zu Spuren des Produkts. Dieses Ergebnis zeigt ganz deutlich wie essentiell die Proteinumgebung und nicht nur der Histidin-Ligand für die Reaktion in Wasser ist, zumal die Reaktion mit Hämin alleine in organischen Lösungsmitteln beschrieben ist. Die Negativkontrolle H215A bei der das Häm-Koordinierende Histidin gegen Alanin getauscht wurde zeigte keine Aktivität. Allerdings bleibt auch hier, wie schon zuvor diskutiert, die Frage ob durch den veränderten Liganden das elektronisches Potential des Eisens zu dessen Inaktivität verschoben, die Geometrie der aktiven Tasche zur Unzugänglichkeit verändert oder durch den fehlenden Liganden kein Häm-Zentrum gebunden werden konnte. Definitiv kann jedoch gesagt werden, dass das Protein-

gerüst von yfeX zusammen mit einem Eisen-Porphyrin die Katalyse bewerkstelligt sofern Triphenylphosphin vorhanden ist. Damit ist dies die erste enzymatisch katalysierte Triphenylphosphin beinhaltenden Carbonyl-Olefinierung in wässriger Lösung. Darüber hinaus ist der verwendete Katalysator ein *E.coli* eigenes, unmodifiziertes Protein mit hypothetischer/promiskuitiver Aktivität.

---

## 6 Zusammenfassung

Die zu Beginn dieser Arbeit aufgeworfene Frage, ob eine chemische Herangehensweise an biochemische Reaktionen Potential zur Optimierung bietet, wurde anhand von drei Fallbeispielen untersucht.

Die Peroxidasen-katalysierte Reaktion von Rifamycin B zu Rifamycin S wurde unter dem Gesichtspunkt der Effizienz betrachtet. Gegenüber der derzeitigen industriellen Darstellung von Rifamycin S bietet die biochemische Eintopf-Synthese die Möglichkeit auf chlorierte Lösungsmittel zu verzichten und führt daher zu einem nachhaltigeren Prozess. Dennoch zeigte sich eine weitere Chance zur Optimierung. Die chemische Analyse der Reaktion – losgelöst von der notwendigen Anwendung der Biologie – offenbarte, dass die biochemische Komponente nur ein substituierbares Oxidans war. Eine eingehende Untersuchung alternativer, anorganischer Oxidationsmittel führte zu einem System, in dem Ammoniumperoxodisulfat bei vergleichbarer Raum-Zeit-Ausbeute wie im derzeitigen industriellen Prozess eingesetzt werden kann, unter Beibehaltung des nachhaltigen Verzichts auf chlorierte Lösungsmittel. Die unter Berücksichtigung des Reaktionsmechanismus durchgeführte Reaktion in reinem Methanol ist ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Anwendung chemischer Prinzipien. Damit konnte ein Prozess entwickelt werden, der die hohe Löslichkeit der Rifamycine in Methanol nutzt und dadurch die Raum-Zeit-Ausbeute um den Faktor 574 steigern konnte. Die aus diesen Untersuchungen hervorgehenden Prozesse haben beide das Potential zur industriellen Anwendung. Während Prozess 1 direkt mit allen Vorteilen in bestehende Rifamycin S Synthesenanlagen integriert werden kann, ist für Prozess 2 ein zusätzlicher apparativer Aufwand nötig, der aber durch die erhebliche gesteigerte Effizienz gerechtfertigt wird.

Im der zweiten Fallstudie wurden biochemische Reduktionsreaktionen und die Bereitstellung der dafür benötigten Reduktionsäquivalente untersucht. Biochemische

Reduktionen unter Verwendung von Enzymen stellen eine nachhaltigere Alternative zu den in der Chemie üblichen Edelmetall-Katalysatoren dar. Die Optimierungen der biokatalytischen Reaktionen laufen dabei vornehmlich über die Modifikation des Proteingerüsts oder über Anpassungen des Reaktionssystems ab. Aus chemischer Sicht sind allerdings auch die verwendeten – und oft zu bloßen Hydrid-Donoren degradierten – Nicotinamid-Cofaktoren Stellschrauben zur Optimierung der Reaktionen. Dabei wurden bisher die Cofaktoren im Hinblick auf ihre Größe und ihren sterischen Anspruch im Enzym untersucht. Eine Studie des Einflusses unterschiedlicher Substituenten am Heteroaromaten bezüglich der elektronischen Verhältnisse liegt bisher nicht vor. Deshalb wurden chemisch veränderte Analoga zu NADH synthetisiert, ihre Oxidationspotentiale mittels Cyclovoltammetrie gemessen und anschließend mit den Substituenteneffekten nach Hammett verglichen. Dabei wurde ein linearer Zusammenhang festgestellt. Bei der Untersuchung verschiedener Enzymklassen und ihrer Fähigkeit die synthetischen Cofaktoren als Reduktionsäquivalent zu nutzen stellte sich eine signifikante Abhängigkeit von der prosthetischen Flavin-Gruppe heraus. In Abwesenheit eines Flavins waren die synthetischen Cofaktoren inaktiv konnten jedoch in Anwesenheit eines Flavins als Hydrid-Donoren fungieren. Eine detaillierte Untersuchung von vier Substraten mit vier verschiedenen En-Reduktasen zeigte eine breite Anwendbarkeit der synthetischen Cofaktoren. Darüber hinaus zeigten sich bei der Verwendung von NAPH, bei dem das Adenin-Dinukleotid durch den schiebenden 4-Hydroxy-phenylrest substituiert wurde, mit NCR deutlich bessere Umsätze als mit NADH. Die kinetische Untersuchung der Reduktion von *Z*-Citral mit NCR zeigte im direkten Vergleich von NADH und NAPH eine deutlich effizientere Reaktion für NAPH. Somit konnte durch die chemische Herangehensweise eine neue Komponente der Reaktionsoptimierung erschlossen werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die chemische Herangehensweise auf die Grund-

---

lagenforschung angewendet. Hierfür wurden enzymatisch katalysierte Carbenreaktionen untersucht. Bei der NH-Insertion wurde das Substratspektrum durch Variation der Substituenten sowie ganzer Substanzklassen deutlich erweitert und dabei Aktivität mit *E. coli*-Lysat festgestellt. Eine Proteinaufreinigung mittels verschiedener chromatographischer Methoden führte zu einem Set an neuen, für diese Reaktion bisher nicht beschriebenen, *E. coli*-eigenen, katalytisch aktiven Proteinen. Eine gemeinsame Eigenschaft der gefundenen Proteine war das Vorhandensein eines Häm-Zentrums. Daraufhin wurden weitere Häm-haltige Enzyme aus dem Genom von *E. coli* untersucht und dadurch weitere Biokatalysatoren identifiziert. Auch bei diesem Projekt wurde eine Analyse des Reaktionsmechanismus aus chemischer Sicht durchgeführt. Die daraus hervorgehende Hypothese, dass die bei der Reaktion entstehende Carben-Zwischenstufe mit Aldehyden reagieren könnte, wurde für Benzaldehyd und dessen Halogen-Derivate verifiziert. Diese neue, bisher nur unter Verwendung von Triphenylphosphin bekannte Reaktion der Carbonyl-Olefinierung wurde ebenfalls für die *E. coli*-eigenen Proteinen gezeigt. Damit wurde eine biologische, Wittig-analoge Reaktion entdeckt. Die Implikationen für die großtechnische Carotinsynthese sind noch zu evaluieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die eingangs beschriebene chemische Herangehensweise in den verschiedensten Stadien biochemischer Prozesse eine sinnvolle Ergänzung zu der biologischen Optimierung darstellen kann. Eine Erweiterung der Freiheitsgrade ermöglicht stets das Wachstum neuer Ideen und kann der Grundstein zu weiteren bahnbrechenden Entdeckungen sein.



---

## Literatur

- [1] Bairoch, A. *Nucleic acids research* **2000**, *28*, 304–305.
- [2] Nestl, B. M.; Hammer, S. C.; Nebel, B. A.; Hauer, B. *Angewandte Chemie - International Edition* **2014**, *53*, 3070–95.
- [3] Sage, H. J.; Singer, S. J. *Biochemistry* **1962**, *1*, 305–317.
- [4] Zaks, A.; Klibanov, A. M. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 8017–8021.
- [5] Gupta, M. N. *European journal of biochemistry* **1992**, *203*, 25–32.
- [6] Kasim, N. a.; Whitehouse, M.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Lennernäs, H.; Hussain, A. S.; Junginger, H. E.; Stavchansky, S. a.; Midha, K. K.; Shah, V. P.; Amidon, G. L. *Molecular pharmaceutics* **2004**, *1*, 85–96.
- [7] Wetzl, D. Untersuchungen zur Bestimmung des inhärenten katalytischen Potentials von Metall-bindenden Enzymen. Ph.D. thesis, 2014.
- [8] Yip, K.; Stillman, T.; Britton, K.; Artymiuk, P.; Baker, P.; Sedelnikova, S.; Engel, P.; Pasquo, A.; Chiaraluce, R.; Consalvi, V.; Scandurra, R.; Rice, D. *Structure* **1995**, *3*, 1147–1158.
- [9] Frankenberger, W.; Johanson, J. *Soil Biology and Biochemistry* **1982**, *14*, 433–437.
- [10] Reznicek, O.; Facey, S. J.; de Waal, P. P.; Teunissen, A. W. R. H.; de Bont, J. A. M.; Nijland, J. G.; Driessen, A. J. M.; Hauer, B. *Journal of applied microbiology* **2015**, *119*, 99–111.
- [11] Reetz, M. T.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Liebeton, K.; Jaeger, K.-E. *Angewandte Chemie* **1997**, *109*, 2961–2963.
- [12] Kuchner, O.; Arnold, F. H. *Trends in biotechnology* **1997**, *15*, 523–30.

- [13] Eijssink, V. G. H.; Borchert, T. V.; van den Burg, B. *Biomolecular engineering* **2005**, *22*, 21–30.
- [14] Schmid, a.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, a.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [15] Hult, K.; Berglund, P. *Trends in biotechnology* **2007**, *25*, 231–8.
- [16] Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. *Nature* **2012**, *485*, 185–94.
- [17] Iyer, P. V.; Ananthanarayan, L. *Process Biochemistry* **2008**, *43*, 1019–1032.
- [18] Norris, J. *Principles of Organic Chemistry*, 2nd ed.; The Maple Press York PA: New York, 1922; pp 1–643.
- [19] Hammett, L. P. *Journal of the American Chemical Society* **1937**, *59*, 96–103.
- [20] Grunwald, E.; Jumper, C. F.; Meiboom, S. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 522–528.
- [21] Kadish, K. M.; Morrison, M. M.; Constant, L. A.; Dickens, L.; Davis, D. G. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98*, 8387–8390.
- [22] Floss, H. G.; Yu, T.-W. *Chemical reviews* **2005**, *105*, 621–32.
- [23] Aristoff, P. A.; Garcia, G. A.; Kirchhoff, P. D.; Showalter, H. D. *Tuberculosis* **2010**, *90*, 94–118.
- [24] Bakker, M. I.; Hatta, M.; Kwenang, A.; Van Benthem, B. H. B.; Van Beers, S. M.; Klatser, P. R.; Oskam, L. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *72*, 443–448.
- [25] Müller, P.; Alber, D. G.; Turnbull, L.; Schlothauer, R. C.; Carter, D. A.; Whitchurch, C. B.; Harry, E. J. *PloS one* **2013**, *8*, e57679.

- 
- [26] Burman, W. J.; Gallicano, K.; Peloquin, C. *Clinical pharmacokinetics* **2001**, *40*, 327–41.
- [27] Jin, H. Z.; Lin, J. P.; Xu, Z. N.; Cen, P. L. *The Journal of General and Applied Microbiology* **2002**, *48*, 329–334.
- [28] Sensi, P.; Margalith, P.; Timbal, H. R. *Il Farmaco; edizione scientifica* **1959**, *14*, 146–147.
- [29] Pasqualucci, C. R.; Bonfanti, G.; Turolla, C. A Method of Producing Rifamycin O from Fermentation Broths. 1975.
- [30] Pasqualucci, C. R.; Bonfanti, G.; Scarpitta, G. A Process for Preparing Rifamycin S by Hydrolysis of Rifamycin O. 1976.
- [31] Prat, D.; Pardigon, O.; Flemming, H.-W.; Letestu, S.; Ducandas, V.; Isnard, P.; Guntrum, E.; Senac, T.; Ruisseau, S.; Cruciani, P.; Hosek, P. *Organic Process Research & Development* **2013**, *17*, 1517–1525.
- [32] Seong, B. L.; Han, M. H. *Chemistry Letters* **1982**, 627–628.
- [33] Vohra, R. M.; Banerjee, U. C.; Das, S.; Dube, S. *Biotechnology Letters* **1989**, *11*, 851–854.
- [34] Banerjee, U.; Saxena, B.; Chisti, Y. *Biotechnology Advances* **1992**, *10*, 577–595.
- [35] Banerjee, U. C. *The Journal of General and Applied Microbiology* **1993**, *39*, 251–255.
- [36] Löw, S. *Peroxidase Catalysed Transformation of Rifamycin B to Rifamycin S*; Diplomarbeit, 2011; pp 1–72.

- [37] Han, M. H.; Seong, B.-L.; Son, H.-J.; Mheen, T.-I. *FEBS Letters* **1983**, *151*, 36–40.
- [38] Committee, I. U. o. B.; Nomenclature, M. B.; Webb, E. C. *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*; Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, 1992; p 862.
- [39] Tiran, C.; Lecomte, J.; Dubreucq, E.; Villeneuve, P. *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **2008**, *15*, 179–183.
- [40] Wilkinson, A.; McNaught, A. D. *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*; 1997.
- [41] Harden, A.; Young, W. J. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **1906**, *77*, 405–420.
- [42] Christen, P.; Hofmann, E. *EJB Reviews 1989*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989.
- [43] Nicolet, Y. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, *25*, 138–143.
- [44] Fry, D. C.; Kuby, S. A.; Mildvan, A. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83*, 907–911.
- [45] Taylor, R. T.; Weissbach, H. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1968**, *123*, 109–126.
- [46] Boger, R. H.; Sydow, K.; Borlak, J.; Thum, T.; Lenzen, H.; Schubert, B.; Tsikas, D.; Bode-Boger, S. M. *Circulation Research* **2000**, *87*, 99–105.
- [47] Hofrichter, M.; Ullrich, R.; Pecyna, M. J.; Liers, C.; Lundell, T. *Applied microbiology and biotechnology* **2010**, *87*, 871–97.

- [48] Munro, A. W.; Leys, D. G.; McLean, K. J.; Marshall, K. R.; Ost, T. W.; Daff, S.; Miles, C. S.; Chapman, S. K.; Lysek, D. A.; Moser, C. C.; Page, C. C.; Dutton, P. *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 250–257.
- [49] Kaim, W.; Schwederski, B. *Bioanorganische Chemie: Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen*; Vieweg+Teubner Verlag, 2015; p 460.
- [50] Li, H.; Jamal, J.; Chreifi, G.; Venkatesh, V.; Abou-Ziab, H.; Poulos, T. L. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, *124*, 1–10.
- [51] Skala, M. C.; Riching, K. M.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Eickhoff, J.; Eliceiri, K. W.; White, J. G.; Ramanujam, N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 19494–9.
- [52] Heuts, D. P. H. M.; Scrutton, N. S.; McIntire, W. S.; Fraaije, M. W. *The FEBS journal* **2009**, *276*, 3405–27.
- [53] Murthy, Y. V. S. N.; Meah, Y.; Massey, V. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 5344–5345.
- [54] Veech, R.; Eggleston, L.; Krebs, H. *Biochem. j* **1969**,
- [55] Nernst, W. Die elektromotorische Wirksamkeit der Ionen. Ph.D. thesis, 1889.
- [56] Toogood, H. S.; Scrutton, N. S. *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *19*, 107–115.
- [57] Toogood, H. S.; Fryszkowska, A.; Hulley, M.; Sakuma, M.; Mansell, D.; Stephens, G. M.; Gardiner, J. M.; Scrutton, N. S. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2011**, *12*, 738–49.
- [58] Brenna, E.; Crotti, M.; Gatti, F. G.; Manfredi, A.; Monti, D.; Parmeggiani, F.; Pugliese, A.; Zampieri, D. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *101*, 67–72.

- [59] Olson, L. P.; Luo, J.; Almarsson, O.; Bruice, T. C. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9782–9791.
- [60] Engbersen, J. F.; Koudijs, A.; van der Plas, H. C. *Bioorganic Chemistry* **1988**, *16*, 215–221.
- [61] Bisswanger, H. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*; Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
- [62] Scrutton, N. S.; Basran, J.; Sutcliffe, M. J. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *264*, 666–671.
- [63] Fisher, K.; Mohr, S.; Mansell, D.; Goddard, N. J.; Fielden, P. R.; Scrutton, N. S. *Catalysis Science & Technology* **2013**, *3*, 1505.
- [64] Paul, C. E.; Gargiulo, S.; Opperman, D. J.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; Taglieber, A.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. *Organic letters* **2013**, *15*, 180–3.
- [65] Bell, R. *The Proton in Chemistry*; Springer Science & Business Media, 2013.
- [66] Murthy, Y. V. S. N.; Meah, Y.; Massey, V. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 5344–5345.
- [67] Searle, G. F.; Tredwell, C. J.; Barber, J.; Porter, G. *Biochimica et biophysica acta* **1979**, *545*, 496–507.
- [68] Rostorfer, H. H.; Rigdon R. H., *American Journal of Physiology* **1946**, *146*, 222–228.
- [69] Sligar, S.; Cinti, D.; Gibson, G.; Schenkman, J. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1979**, *90*, 925–932.
- [70] Brink, N. G.; Kuehl, F. A.; Folkers, K. **1995**, *112*, 354.

- [71] Rothmund, P. *Journal of the American Chemical Society* **1935**, *57*, 2010–2011.
- [72] Vankova, S.; Groppo, E.; Chiesa, M.; Damin, A.; Barolo, C.; Spoto, G.; Zecchina, A. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2009**, *11*, 4060–4067.
- [73] Storm, C. B.; Krane, J.; Skjetne, T.; Telnaes, N.; Branthaver, J. F.; Baker, E. W. *Science* **1984**, *223*, 1075–1076.
- [74] Ariel, S.; Dolphin, D.; Domazetis, G.; James, B. R.; Leung, T. W.; Rettig, S. J.; Trotter, J.; Williams, G. M. *Canadian Journal of Chemistry* **1984**, *62*, 755–762.
- [75] Wang, D.; Groves, J. T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 15579–84.
- [76] Olguín, J.; Müller-Bunz, H.; Albrecht, M. *Chemical communications* **2014**, *50*, 3488–90.
- [77] Stephenson, N. a.; Bell, A. T. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, *275*, 54–62.
- [78] Puri, D. *Textbook Of Medical Biochemistry*; Elsevier India, 2005; p 432.
- [79] Alexiou, C.; Lever, a. B. P. *Coordination Chemistry Reviews* **2001**, *216-217*, 45–54.
- [80] Mansuy, D. *Pure and Applied Chemistry* **1987**, *59*, 759–770.
- [81] Barton, H. A.; Marletta, M. A. *Toxicology Letters* **1994**, *70*, 147–153.
- [82] Ye, T.; Mckervey, M. A. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1091–1160.

- [83] Doyle, M. P.; Tamblyn, W. H.; Bagheri, V. *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, *46*, 5094–5102.
- [84] Maxwell, J. L.; Brown, K. C.; Bartley, D. W.; Kodadek, T. *Science* **1992**, *256*, 0–3.
- [85] Gillingham, D.; Fei, N. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4918–4931.
- [86] Coelho, P. S.; Brustad, E. M.; Kannan, A.; Arnold, F. H. *Science* **2013**, *339*, 307–10.
- [87] Wang, Z. J.; Peck, N. E.; Renata, H.; Arnold, F. H. *Chemical Science* **2014**, *5*, 598–601.
- [88] Aviv, I.; Gross, Z. *Synlett* **2006**, 951–953.
- [89] Lu, X.; Fang, H.; Ni, Z. *Journal of Organometallic Chemistry* **1989**, *373*, 77–84.
- [90] Herrmann, W.; Wang, M. *Angewandte Chemie - International Edition* **1991**, *30*, 1641–1643.
- [91] Mirafzal, G. a.; Cheng, G.; Woo, L. K. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 176–177.
- [92] Cheng, G.; Mirafzal, G. a.; Woo, L. K. *Organometallics* **2003**, *22*, 1468–1474.
- [93] Ochoa-Gómez, J. R.; Gómez-Jiménez-Aberasturi, O.; Maestro-Madurga, B.; Pesquera-Rodríguez, A.; Ramírez-López, C.; Lorenzo-Ibarreta, L.; Torrecilla-Soria, J.; Villarán-Velasco, M. C. *Applied Catalysis A: General* **2009**, *366*, 315–324.
- [94] Ratner, D. M.; Murphy, E. R.; Jhunjunwala, M.; Snyder, D. A.; Jen-



- sen, K. F.; Seeberger, P. H. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2005**, 578–80.
- [95] Taylor, S. J.; Morken, J. P. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 12202–12203.
- [96] Lucia, A.; Xu, J. *Computers & Chemical Engineering* **1990**, *14*, 119–138.
- [97] Klem, M. T.; Willits, D.; Solis, D. J.; Belcher, A. M.; Young, M.; Douglas, T. *Advanced Functional Materials* **2005**, *15*, 1489–1494.
- [98] Kaiser, M.; Wetzels, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. *Cellular and molecular life sciences* **2008**, *65*, 1186–201.
- [99] Rueping, M.; Dufour, J.; Schoepke, F. R. *Green Chemistry* **2011**, *13*, 1084.
- [100] Poupon, E., Nay, B., Eds. *Biomimetic Organic Synthesis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011.
- [101] Gargiulo, S. *Novel approaches for using dehydrogenases and ene-reductases for organic synthesis*.
- [102] Kissinger, P. T.; Heineman, W. R. *Journal of Chemical Education* **1983**, *60*, 702.
- [103] Koepp, H.; Wendt, H.; Stkehlow, H. *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1960**, *64*, 483–491.
- [104] Haynes, W. M. *Handbook of Chemistry and Physics*, 93rd ed.; 2012; pp 5–94 – 5–101.
- [105] French, C.; Bruce, N. *Biochem. J* **1994**, *301*, 97–103.
- [106] Hall, M.; Stueckler, C.; Hauer, B.; Stuermer, R.; Friedrich, T.; Breuer, M.;

- Kroutil, W.; Faber, K. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008*, 1511–1516.
- [107] Mansell, D. J.; Toogood, H. S.; Waller, J.; Hughes, J. M. X.; Levy, C. W.; Gardiner, J. M.; Scrutton, N. S. *ACS Catalysis* **2013**, *3*, 370–379.
- [108] Scheller, P. N.; Fademrecht, S.; Hofelzer, S.; Pleiss, J.; Leipold, F.; Turner, N. J.; Nestl, B. M.; Hauer, B. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2201–2204.
- [109] Honda Malca, S.; Scheps, D.; Kühnel, L.; Venegas-Venegas, E.; Seifert, A.; Nestl, B. M.; Hauer, B. *Chemical communications* **2012**, *48*, 5115–7.
- [110] Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1770*, 330–44.
- [111] Babior, B. M. *Blood* **1999**, *93*, 1464–76.
- [112] Behrens, M. M.; Ali, S. S.; Dao, D. N.; Lucero, J.; Shekhtman, G.; Quick, K. L.; Dugan, L. L. *Science* **2007**, *318*, 1645–7.
- [113] Hay, S.; Sutcliffe, M. J.; Scrutton, N. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 507–12.
- [114] Gutierrez, A.; Lian, L.-Y.; Wolf, C. R.; Scrutton, N. S.; Roberts, G. C. K. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1964–1975.
- [115] Craig, D. H.; Moody, P. C.; Bruce, N. C.; Scrutton, N. S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7598–607.
- [116] Michaelis, L.; Menten, M. *Biochem.* **1913**, *49*, 333–369.
- [117] Wu, B.; Ako, R.; Hu, M. *Pharmaceutica Analytica Acta* **2012**, *01*.
- [118] Heel, T.; McIntosh, J. a.; Dodani, S. C.; Meyerowitz, J. T.; Arnold, F. H. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2556–2562.

- 
- [119] Hyster, T. K.; Arnold, F. H. *Israel Journal of Chemistry* **2015**, *55*, 14–20.
- [120] Sreenilayam, G.; Fasan, R. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1532–1534.
- [121] Bordeaux, M.; Tyagi, V.; Fasan, R. *Angewandte Chemie* **2015**, *127*, 1764–1768.
- [122] Aslund, F.; Berndt, K. D.; Holmgren, a. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 30780–30786.
- [123] Aggarwal, V. K.; Fulton, J. R.; Sheldon, C. G.; De Vicente, J. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6034–6035.
- [124] Hoffmeister, F. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol* **1888**, *24*, 247–260.
- [125] Hantke, K. *FEMS Microbiology Letters* **1990**, *67*, 5–8.
- [126] Chart, H.; Griffiths, E. *Journal of general microbiology* **1985**, *131*, 1503–1509.
- [127] Willson, R. C.; Ladisch, M. R. *Large-Scale Protein Purification Introduction*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 1990; pp 1–13.
- [128] Edman, P. *Acta chem. scand* **1950**, *4*, 283–293.
- [129] Edman, P.; Begg, G. *European Journal of Biochemistry* **1967**, *1*, 80–91.
- [130] Sanger, F. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [131] Muñoz Elías, E. J.; McKinney, J. D. *Nature medicine* **2005**, *11*, 638–44.
- [132] Marsh, J. J.; Lebherz, H. G. *Trends in Biochemical Sciences* **1992**, *17*, 110–113.

- [133] Novel, G.; Stoeber, F. *Biochimie* **1973**, *55*, 1057–1070.
- [134] Mulvey, M. R.; Sorby, P. A.; Triggs-Raine, B. L.; Loewen, P. C. *Gene* **1988**, *73*, 337–345.
- [135] Chae, H. Z.; Robison, K.; Poole, L. B.; Church, G.; Storz, G.; Rhee, S. G. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 7017–7021.
- [136] Andrews, S. C.; Findlay, J. B.; Guest, J. R.; Harrison, P. M.; Keen, J. N.; Smith, J. M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1991**, *1078*, 111–116.
- [137] Stevanin, T. M.; Ioannidis, N.; Mills, C. E.; Kim, S. O.; Hughes, M. N.; Poole, R. K. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275*, 35868–75.
- [138] Yoshida, T.; Tsuge, H.; Konno, H.; Hisabori, T.; Sugano, Y. *The FEBS journal* **2011**, *278*, 2387–94.
- [139] Létoffé, S.; Heuck, G.; Delepelaire, P.; Lange, N.; Wandersman, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 11719–24.
- [140] Dailey, H. A.; Septer, A. N.; Daugherty, L.; Thames, D.; Gerdes, S.; Stabb, E. V.; Dunn, A. K.; Dailey, T. A.; Phillips, J. D. *mBio* **2011**, *2*, e00248–11.
- [141] Losse, G.; Mueller, G. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1962**, *327*, 205–16.
- [142] Löw, S. A.; Nestl, B. M.; Weissenborn, M. J.; Zepeck, F.; Hauer, B. *Organic Process Research & Development* **2015**, 150508153235000.
- [143] Kolehmainen, E.; Knuutinen, J.; Salovaara, P. J. *Organic Magnetic Resonance* **1982**, *20*, 201–202.

- [144] Baumann, L. K.; Mbuvi, H. M.; Du, G.; Woo, L. K. *Organometallics* **2007**, *26*, 3995–4002.
- [145] Stahmer, J. Studie zur Entwicklung eines neuen Biokatalysators zur Darstellung von vicinalen Aminoalkoholen. Ph.D. thesis, 2015.
- [146] Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Chemische Berichte* **1954**, *87*, 1318–1330.
- [147] Tebbe, F. N.; Parshall, G. W.; Reddy, G. S. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 3611–3613.

# Lebenslauf

## Sebastian Löw

### Persönliche Daten

Adresse: Untere Strasse 25  
70199 Stuttgart  
Deutschland

Geburtsdatum: 29. 11. 1984

Email: Sebastian\_loew84@yahoo.de

### Ausbildung

- Sep. 2011 – Jul. 2015 Doktorarbeit im Fachbereich Chemie Arbeiten im Bereich der Biokatalyse zur organischen Betrachtung biochemischer Reaktionen unter der Leitung von Prof. Dr. Hauer am Institut für Technische Biochemie.
- Jan. 2011 – Jun. 2011 Diplomarbeit mit dem Thema „Peroxidase katalysierte Umsetzung von Rifamycin B zu Rifamycin S“. Durchführung unter der Leitung von Prof. Dr. Hauer am Institut für Technische Biochemie.
- Okt. 2005 – Dez. 2010 Studium der Chemie Grund- und Hauptstudium in Stuttgart mit den Prüfungsfächern Organische Chemie, Anorganische Chemie, Physikalische Chemie und Technische Biochemie.
- Okt. 2001 – Jun. 2004 Abitur Gymnasiale Oberstufe am Technisches Gymnasium in Waiblingen mit den Leistungskursen Technik und Chemie.