

**Erstellung einer Enzybibliothek über gerichtete Evolution,
Entwicklung von Assaysystemen zur Durchmusterung von
Enzybibliotheken auf Epoxidhydrolaseaktivität, Aufreinigung
einer Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus***

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

Vorgelegt von Frank Zocher aus Ludwigsburg

Hauptberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid

Mitberichter: Prof. Dr. D. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1999

Institut für Technische Biochemie

1999

Hiermit versichere ich, daß ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den 11.6.99

Frank Zicher

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R.D. Schmid danke ich für die Überlassung und Betreuung des Themas, seine unermüdliche Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am ITB.

Herrn PD Dr. U.T. Bornscheuer für die Unterstützung der Arbeit durch anregende Diskussionen.

Der Firma BASF AG für die finanzielle Förderung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt hier Herrn PD Dr. B. Hauer für sein stetiges Interesse und seine Mithilfe.

Den Herren Dipl.-Chem. Markus Enzelberger, Dipl.-Chem. Erik Henke, Dipl.-Chem. Stefan Minning und Frau Dipl.-Biol. (t.o.) Kerstin Schierholz für die Zusammenarbeit im Laboralltag und für viele fachliche und weniger fachliche Gespräche.

Herrn Prof. Dr. R. Kazlauskas für die Möglichkeit, einen Teil der Arbeit in seinem Labor an der McGill University (Montreal, Kanada) durchzuführen und für viele interessante Diskussionen.

Herrn Dr. J. Altenbuchner für die Überlassung eines Expressionvektors für die Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*.

Mein Dank gilt auch den anderen Mitgliedern des Instituts für Technische Biochemie, besonders der Biokatalysegruppe, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihre Mithilfe.

Zum Schluß möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines Studiums und Myriam für ihr Verständnis und geduldige Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Abkürzungen

A	Adenin
Ac	Acetyl
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BTL	Lipase aus <i>Bacillus thermocatenulatus</i>
bzw.	beziehungsweise
c	stöchiometrische Konzentration in mol/l
C	Cytosin
CAL B	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> B
cEH	cytosolische Epoxidhydrolase
Da	Dalton
dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosin-5'-triphosphat
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DSM	Deutsche Stammsammlung Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Enantioselektivität
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuß
EH	Epoxidhydrolase

Et	Ethyl
Et ₃ N	Triethylamin
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytometer
FPLC	Fast performance liquid chromatography
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GFP	Green fluorescent protein
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
His	Histidin
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
HTS	Hochdurchsatzscreeningsystem
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani-Medium
M	Molar [mol/l]
<i>m</i> CPBA	3-Chlor-perbenzoesäure
Me	Methyl
mA	Milliampère
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
min	Minute
ml	Milliliter
NBP	4-(<i>p</i> -Nitrobenzyl)-pyridin
NEB	4-Nitrophenyl- <i>trans</i> -3,4-epoxy-4-phenylbutanoat
NEPC	4'-Nitrophenyl-2,3-epoxy-3-phenylpropylcarbonat
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
<i>p</i>	para

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCL	Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i>
PCR	Polmerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFE	Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PLE	Esterase aus Schweineleber
<i>p</i> NB	4-Nitrobenzyl
<i>p</i> NP	4-Nitrophenol
<i>p</i> NPA	4-Nitrophenylacetat
Pro	Prolin
(<i>R</i>)	(<i>R</i>)-Konfiguration
(<i>R</i>)-NEPC	4'-Nitrophenyl-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2,3-epoxy-3-phenylpropylcarbonat
ROL	Lipase aus <i>Rhizopus oryzae</i>
(<i>S</i>)	(<i>S</i>)-Konfiguration
SDS	Natriumdodecylsulfat
(<i>S</i>)-NEPC	4'-Nitrophenyl-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-epoxy-3-phenylpropylcarbonat
Ser	Serin
T	Thymin
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TP	theoretischer Boden
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umsatz
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Strahlung im ultravioletten Bereich
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
Vol.	Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent
W	Watt
λ	Wellenlänge in nm
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	EPOXIDHYDROLASEN	10
1.2	BEDEUTUNG DER CHIRALITÄT UND DER ENANTIOSELEKTIVITÄT	18
1.3	GERICHTETE EVOLUTION VON ENZYMEN.....	21
1.4	ASSAYSYSTEME FÜR EPOXIDHYDROLASEN.....	23
1.5	STREPTOMYCETEN.....	28
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	SCREENING NACH NEUEN ENZYMAKTIVITÄTEN	31
3.2	STRATEGIEN ZUR ERSTELLUNG VON ASSAYSYSTEMEN ZUM HOCHDURCHSATZSCREENING.....	33
3.3	UNTERSUCHUNGEN VON EPOXYCHROMOPHORESTERN ZUM NACHWEIS VON EPOXID- HYDROLASEAKTIVITÄT	33
3.4	ENTWICKLUNG EINES ASSAYSYSTEMS ZUM DIREKTEN SCREENING AUF EPOXIDE	41
3.5	ENTWICKLUNG DES NBP-TESTS ZUM NACHWEIS VON EPOXIDHYDROLASEAKTIVITÄT IM HOCHDURCHSATZSCREENING.....	44
3.5.1	<i>Validierung des NBP-Tests in Mikrotiterplatten</i>	<i>44</i>
3.5.2	<i>Übertragung des NBP-Assays für Mutantenbibliotheken auf eine HTS-Anlage.....</i>	<i>49</i>
3.6	UNTERSUCHUNG VON <i>STREPTOMYCETEN</i> -STÄMMEN MIT DEM NBP-ASSAY	50
3.7	FERMENTATION VON <i>STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS</i> TÜ4 UND BIOTRANSFORMATIONEN MIT <i>STREPTOMYCETEN</i> -STÄMMEN	52
3.8	AUFREINIGUNG DER EPOXIDHYDROLASE AUS <i>STREPTOMYCES ANTIBIOTICUS</i> TÜ4 MIT HILFE DES NBP-TESTS.....	56
3.8.1	<i>Anpassung des NBP-Assays für die Aufreinigung</i>	<i>56</i>
3.8.2	<i>Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus Streptomyces antibioticus Tü4 mit Hilfe der FPLC.....</i>	<i>57</i>
3.9	UMWIDMUNG EINER ESTERASE IN EINE EPOXIDHYDROLASE	60
3.9.1	<i>Herstellung der PFE Asp-Mutante.....</i>	<i>61</i>
3.9.2	<i>Umsetzungen mit der PFE Asp-Mutante.....</i>	<i>64</i>
3.9.3	<i>Erzeugung einer Enzymbibliothek durch evolutives Design.....</i>	<i>65</i>
4	DISKUSSION	67
4.1	HOCHDURCHSATZSCREENINGSYSTEME IN DER ENZYMKATALYSE	67
4.1.1	<i>Automatisierung durch HTS-Systeme.....</i>	<i>67</i>
4.1.2	<i>Durchführung von Enzymassays in HTS-Anlagen.....</i>	<i>68</i>
4.1.3	<i>Etablierung eines Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten unter Verwendung von chromophoren Verbindungen</i>	<i>69</i>

4.1.4	<i>Untersuchungen zum direkten Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität in Enzymbibliotheken und Entwicklung des NBP-Assays</i>	72
4.2	UNTERSUCHUNG VON <i>STREPTOMYCETEN</i> -STÄMMEN MIT DEM NBP-ASSAY AUF EPOXIDHYDROLASEAKTIVITÄT	75
4.2.1	<i>Biotransformationen mit Epoxiden durch Streptomyces-Stämme</i>	75
4.2.2	<i>Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus Streptomyces antibioticus Tü4</i>	77
4.3	UMWIDMUNG EINER ESTERASE IN EINE EPOXIDHYDROLASE	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	MATERIAL UND METHODEN	84
6.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND ENZYME	84
6.2	VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	85
6.3	VERWENDETE ONLINEDATENBANKEN UND SOFTWARE	88
6.4	CHEMISCHE METHODEN	89
6.4.1	<i>Chirale Kapillargaschromatographie</i>	89
6.4.2	<i>Kernresonanzspektroskopie</i>	89
6.4.3	<i>Arbeitsweise</i>	89
6.5	NÄHRMEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	90
6.5.1	<i>Nährmedien</i>	90
6.5.2	<i>Puffer und Lösungen</i>	90
6.6	STÄMME UND PLASMIDE	91
6.6.1	<i>Stämme</i>	91
6.6.2	<i>Herkunft der Plasmide</i>	92
6.6.3	<i>Stammhaltung</i>	94
6.6.4	<i>Anzucht in Flüssigmedien</i>	94
6.6.5	<i>Messung der Zelldichte</i>	94
6.6.6	<i>Induktion</i>	95
6.7	ZELLVEREINZELUNG IN MIKROTITERPLATTEN	95
6.7.1	<i>Vereinzelung mit dem Pickroboter</i>	96
6.8	ZELLAUFSCHLUß	96
6.8.1	<i>Zellaufschluß mit Ultraschall</i>	96
6.8.2	<i>Zellaufschluß mit Lysozym in Mikrotiterplatten</i>	96
6.9	BIOCHEMISCHE METHODEN	97
6.9.1	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i>	97
6.9.2	<i>Zusammensetzung des Proteinstandards (BioRad)</i>	98
6.9.3	<i>Esterase-Aktivitätsfärbung</i>	99
6.9.4	<i>Photometrischer Assay auf Esteraseaktivität</i>	99
6.9.5	<i>pH-Stat-Assay zur Aktivitätsbestimmung der BTL</i>	99

6.9.6	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	100
6.9.7	Fermentation von <i>Streptomyces antibioticus</i> Tü4.....	100
6.9.8	Proteinaufreinigung.....	100
6.9.9	Dialyse.....	102
6.9.10	Proteinblotting für die N-terminale Sequenzierung (Western-Blot).....	102
6.10	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN.....	103
6.10.1	Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	103
6.10.2	Error-prone Polymerasekettenreaktion	104
6.10.3	Punktgerichtete Mutagenese durch PCR ("Drei-Primer-Methode")	105
6.10.4	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese.....	107
6.10.5	Ethanol-fällung	110
6.10.6	Restriktionsanalysen.....	111
6.10.7	Dephosphorylierung mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase.....	111
6.10.8	Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase	111
6.10.9	Transformation in <i>E. coli</i> (PEG/DMSO-Methode).....	112
6.10.10	DNA-Sequenzierung.....	112
6.11	CHEMISCHE SYNTHESSEN.....	114
6.11.1	Darstellung von NEPC-Analoga	114
6.11.2	Darstellung von 4-Pentencarbonsäurechromophorestern.....	115
6.11.3	Darstellung von 4,5-Epoxy-pentancarbonsäurechromophorester.....	117
6.11.4	Darstellung von Dodecan-4-en-säure-chromophorestern	119
6.11.5	Darstellung von 4,5-Epoxy-dodecansäure-chromophorestern	123
6.11.6	Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-chromophor-kohlensäureestern	124
6.12	BIOTRANSFORMATIONEN MIT BTL.....	130
6.12.1	Acylierung von 1-Phenylethanol und 1-Phenylpropanol mit Vinylacetat oder Vinylbutyrat als Acyldonor.....	130
6.12.2	Hydrolyse von Essigsäure-1-phenylethylester	130
6.13	DURCHFÜHRUNG DES NBP-TESTS.....	130
6.13.1	Validierung.....	130
6.13.2	Assay in Gegenwart von Mikroorganismen.....	131
6.13.3	Biotransformationen von Epoxiden mit Streptomyceten-Stämmen.....	131
7	LITERATUR.....	133

1 Einleitung

1.1 Epoxidhydrolasen

Optisch reine Epoxide sind wichtige Bausteine in der organischen Synthese. Verschiedene Wege zur Darstellung optisch reiner Epoxide wurden deshalb entwickelt.

Zur asymmetrischen Synthese von Epoxiden wird von einer prochiralen Verbindung ausgegangen. Dabei gelangt man durch Verwendung eines chiralen Reagenz (Einsatz einer chiralen Persäure, eines chiralen Dioxiranes bzw. Oxaziridines oder eines chiralen Borates), eines chiralen Auxiliars oder eines chiralen Katalysators (metallisch oder nichtmetallisch) zu einem chiralen Epoxid [1].

Der bekannteste Weg zur Darstellung chiraler Epoxide ist die Sharpless-Oxidation ausgehend von Allylalkoholen zu den entsprechenden chiralen Glycidolen [2]. Eine weitere Methode ist das Verfahren nach Jacobsen und Katsuki, bei dem Übergangsmetallkatalysatoren verwendet werden. Hier beträgt der Enantiomerenüberschuß für *geminal*- und *trans*-substituierte Epoxide jedoch unter 60% *ee* [3]. Die direkte stereospezifische Epoxidierung von Alkenen durch Monooxygenasen (P450-Systeme) ist ebenfalls bekannt, allerdings sind die Umsätze gering und die Enzyme benötigen einen Cofaktor [1,4-6].

Deshalb stellt die Racematspaltung mit Epoxidhydrolasen (EH) einen interessanten Zugang zu enantiomerenreinen Epoxiden und den entsprechenden Diolen dar [1,7-11]. Epoxidhydrolasen bilden die Enzymklasse EC 3.3.2.3 und katalysieren die regio- und enantiospezifische Hydrolyse von Epoxiden. Dabei wird die Etherbindung in Epoxiden gespalten und es kommt zur Bildung von *vicinalen*-Diolen. Die Reaktion verläuft über eine S_N2 -spezifische Ringöffnung des Epoxids zum entsprechenden *trans*-konfigurierten 1,2-Diol (Abbildung 1).

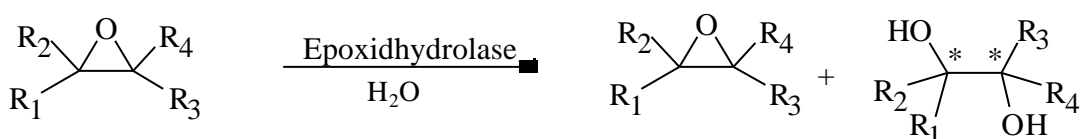


Abbildung 1: Hydrolyse von Epoxiden durch eine Epoxidhydrolase.

Epoxidhydrolasen benötigen keinen Cofaktor und kommen in einer Vielzahl von Organismen vor. Sie wurden in Säugetieren [12], Pflanzen [13], Insekten [14], Hefen [15-16], filamentösen Pilzen [17-20] und Bakterien [8,21-29] gefunden. Sie sind auch in Gegenwart von organischen Solventien katalytisch aktiv. Epoxidhydrolasen in Eukaryonten spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus von Xenobiotika, besonders bei aromatischen Systemen [30-34]. In Prokaryonten spalten sie die aus olefinischen oder aromatischen Verbindungen über P450-Systeme entstandenen Epoxide in *trans*-Dirole, während in Eukaryonten *cis*-Dirole gebildet werden (Abbildung 2) [35].

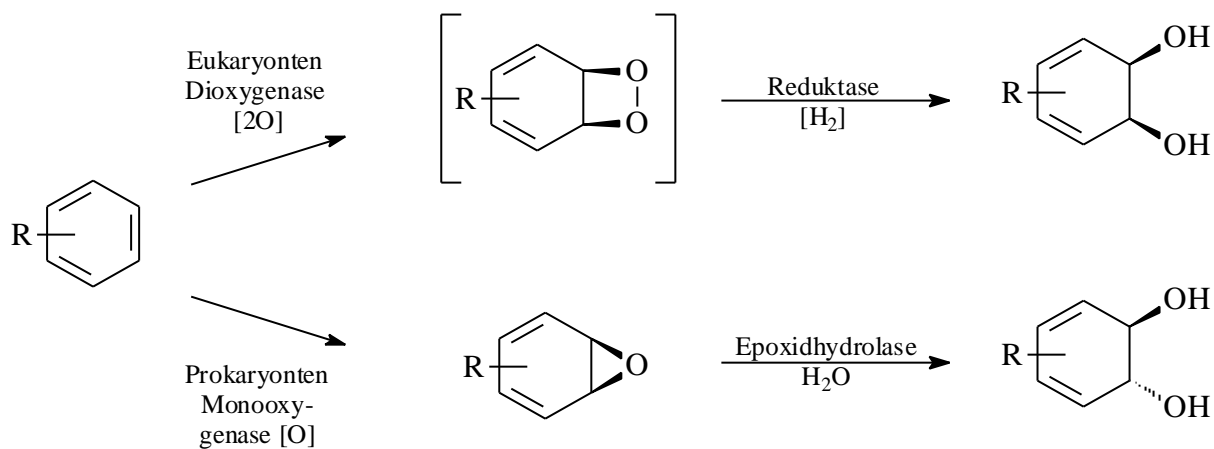


Abbildung 2: Aromatenabbau durch Pro- und Eukaryonten.

In Säugetieren wird zwischen der mikrosomalen (mEH [36-48]) und der cytosolischen (cEH [12,49-52]) Epoxidhydrolase unterschieden, wobei die mEH aus Säugetierleber am besten untersucht ist [53-57]. Eine Übersicht über Säugetierepoxidhydrolasen findet sich in [58]. Die Aminosäuresequenz einer mikrosomalen Epoxidhydrolase ist bekannt und das Gen wurde in *E. coli* kloniert [59]. Die dreidimensionale Struktur der Epoxidhydrolase ist unbekannt, allerdings weisen die bekannten Epoxidhydrolasesequenzen eine Homologie zu Haloalkandehalogenasen, wie z.B. aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 [60-61], zu Haloperoxidasen [62-63] und zu einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* auf, die ebenfalls Bromperoxidaseaktivität besitzt [64-65]. Diese Esterase besitzt 27% identische Aminosäuren verglichen mit der Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. C12 [66]. Ein Homologievergleich findet sich in Abbildung 3. Die Epoxidhydrolasen werden deshalb der α/β -Hydrolasefaltung zugerechnet [67].

HYES_HUMAN	181	VFLDDIGANLKPARDLGMVTILVQDQDTALKKELEKVTGIQLLNTAPLPTSCNP	SDMSHG
HALO_XANAU	1	-----MINAIRTPDQRFNSLDQYPF	SPNYLD
HYEP_HUMAN	56	SDEEIHDLHQRIDKFRFTPPLEDSCFHYGFNSNYLKKV	ISYWRNEFDWKKQVEILNRYPH
HYEP_AGRRA	1	-----	TIDXPEDFKH
HYEP_CORYN	1	-----	MSTEITHH
ESTE_PSEFL	1	-----	S
HYES_HUMAN	241	YVTVKPRVRLHFVELG-----WPAVCLCHGFPE	SWYSWRYQIPALAQAG-----
HALO_XANAU	27	DLPGYPGLRAHYLDEGNS-----DAEDVFLCLHGEP	TWSYLYRKMIPVFAESG-----
HYEP_HUMAN	116	FKTKIEGLDIHFIIHVKPPQLPAGHTPK	PLLMVHGWPGSFYEFYKIIPLLTDPKNHGLSDE
HYEP_AGRRA	11	YEVQLPDVKIHYVREG-----AGPTLLLVEKPE--	IAIDRIKTAFRKP-----
HYEP_CORYN	9	QAMING-YRMHYVTAGS-----GYPLVLLHGWP	QSWYEWNRVIPALAEQ-----
ESTE_PSEFL	2	TFVAKDGTQIYFKDWGS-----GKPVLF	SHGWLLDADMWEYQMEYLSRSG-----
HYES_HUMAN	285	--YRVLAMDMDKGYGESAPPEIEEY	CMEVLCCKEMVTFLLDKLGLSQAVFIGHDWGG-MLVW
HALO_XANAU	75	--ARVIAPDFFGFGKSDKPVDEEDYTF	EFHRNFLLALIERLDLRNITLVVQDWGG-FLGL
HYEP_HUMAN	176	HVFEVICPSIPGYGFSEAS-SKKG	FNSVATARIFYKLMRLRGLFQEFYIQGGDWGS-LICT
HYEP_AGRRA	52	---DNIHGGFNYYRANIRP-----	DAALWTDLDH-----
HYEP_CORYN	52	--FTVIAPDLRGLGDESKP--MT	GFDKRTMATDVRELVSHLGYDKVGVIGHDWGG-SVAF
ESTE_PSEFL	47	--YRTIAFDRRGFGRSDQP--WT	GNDYDTFADDIAQLIEHLDLKEVTLVGFSGGGDVAR
HYES_HUMAN	342	YMALFYPERVRAVASLNTFFI-----	PANPNMSPLESIKANPVFDYQLYFQ
HALO_XANAU	132	TLPMADPSRFKRLIIM-----	NACLMT--DPVTQPAFSAFVTQP
HYEP_HUMAN	234	NMAQLVPSHVKGLHLNMAVLVLSNFSTL	TLLLGQRFGRFLGLTERDVELLYPVKEKVFYSL
HYEP_AGRRA		-----	-----
HYEP_CORYN	107	YFAYDNRDVERLFIIL-----	DMIPGLIKAGDSFPIPVALMINHIF
ESTE_PSEFL	103	YIARHGSARVAGLVLL-----	GAVT--PLFGQKPDYPQGV
HYES_HUMAN	388	EPGVAAEAELEQNLSTRFTKSLFRASDE--	SVLSMHKVCEAGGLFVNSPFEPSLSRMVTEEE
HALO_XANAU	169	ADGFTAWKYDLVTPSDLRLDQFMKRW--	AP-----TLTEAEASAYAAPFPDTS
HYEP_HUMAN	294	MRESGYMHIQCTKPDTVGSALNDSPVGLA	AYILEKfstWTNTEFRYLEDGGLERKPSLDD
HYEP_AGRRA		-----	-----
HYEP_CORYN	148	FHGGNPDWATALISKDVNLYLRR-----	FLTTLDYNYSPNVFSEED
ESTE_PSEFL	137	LDVVARFKTELLKDRAQFISDFN-----	APFYGINKGQVVSQGV
HYES_HUMAN	446	IQFYVQQFKKSG-FRGPLNWYRNMERN	NKWACKSLGRKILIPALMVTAEKDFVLVPQMSQ
HALO_XANAU	215	YQAGVRKFKPKMVAQRDQACIDISTE	AISFWQNDWNG-QTFMAIGMKDKLLGPDVMPYPMKA
HYEP_HUMAN	354	LLTNVMLYWTTGTIISSQRFYKENL	GGWMTQKHERMKVYVPTGFSAFPPELLHTPEKVV
HYEP_AGRRA		-----	-----
HYEP_CORYN	189	IAEYVRVNSLPGSIRSQCQWYATGL	REDTENLAKATDKLTIPVIAWGGSHFLGDIRPAWQ
ESTE_PSEFL	176	QTQTLQIALLASLKATVDCVTAFA	ETDFRPDMAKIDVPTLVIHGDGDQIVPFETTGVAA
HYES_HUMAN	505	HMEDWIPHLKRGHIEDCGHWTQMDK	PTEVNQILIKWLDSDARNPPVVSKM
HALO_XANAU	274	LIN---GCP	EPLIADAGHFVQEFGEQVAREALKHFAETE-----
HYEP_HUMAN	414	RFKYP-KLISYSYMRVGGHFAAF	EEPPELLAQDIRKFLSVLERQ-----
HYEP_AGRRA		-----	-----
HYEP_CORYN	249	EVA---ENVEGGAVENCGHFVPE	EKPQFVIDTALKFFAPLR-----
ESTE_PSEFL	236	ELI---KGAELKVYK	DAPHGFAVTHAQQLNEDLLAFLKR-----

Abbildung 3: Sequenzvergleich der cEH (HYES_HUMAN) und mEH (HYEP_HUMAN), der Haloalkandehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (HALO_XANAU), der Epoxidhydrolasen aus *Corynebacterium* sp. C12 (HYEP_CORYN) und aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HYEP_AGRRA) und einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (ESTE_PSEFL). Verschiedene Aminosäuren sind schwarz, identische rot und ähnliche blau eingefärbt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind grün eingefärbt und mit einem Stern markiert.

Der postulierte Mechanismus der Epoxidringöffnung durch eine Epoxidhydrolase verläuft über den Angriff eines nukleophilen Carboxylatrestes am Enzym. Dies führt zur Bildung eines α -Hydroxyesterintermediats, welches kovalent am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden ist. Im nächsten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff eines Wassermoleküls, das durch ein benachbartes Histidin aktiviert ist. Es kommt zur Freisetzung des Diols und Regeneration des Enzyms [68-70]. Hinweise auf diesen Reaktionsmechanismus wurden durch Verwendung von ^{18}O -markiertem Enzym in unmarkiertem Wasser und umgekehrt gefunden. Für die cEH der Ratte wurde eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Asp₃₃₃, Asp₄₉₅ und His₅₂₃ [71] und für die mEH aus Asp₂₂₆, Asp₃₅₂ und His₄₃₁ angenommen [72]. Allerdings wurde kürzlich gefunden, daß nicht Asp₃₅₂, sondern Glu₄₀₄ an der katalytischen Triade beteiligt ist, und der Austausch von Glu₄₀₄ gegen Asp führte zu einer starken Umsatzsteigerung [73]. Der katalytische Mechanismus der mEH ist in Abbildung 4 dargestellt.

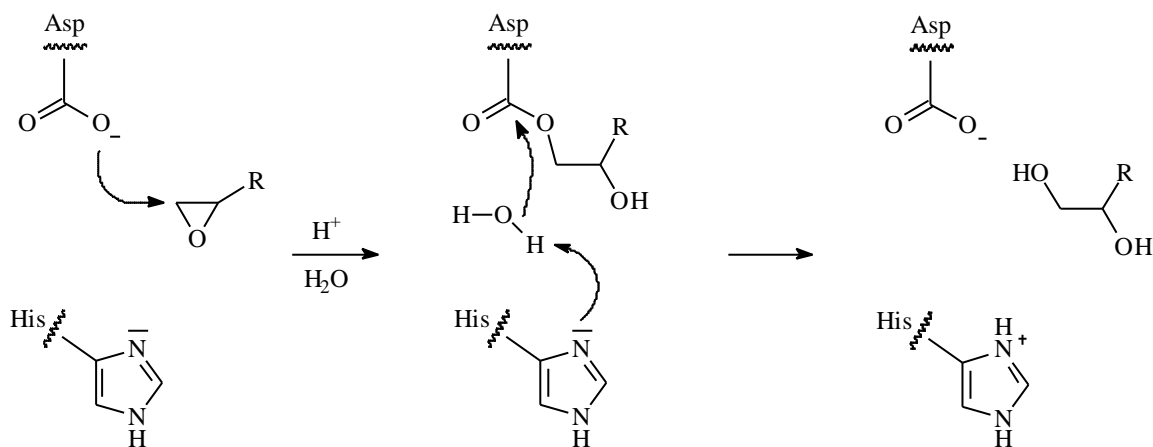


Abbildung 4: Angenommener katalytischer Mechanismus der mikrosomalen Epoxidhydrolase nach [68].

Die enzymatische Hydrolyse von terminalen Epoxiden verläuft meistens über den Angriff eines Nucleophils am sterisch weniger gehinderten Kohlenstoffatom, was zu einer Retention der Konfiguration führt oder, im selteneren Fall, über einen Angriff am Stereozentrum unter Inversion der Konfiguration (Abbildung 5) [8].

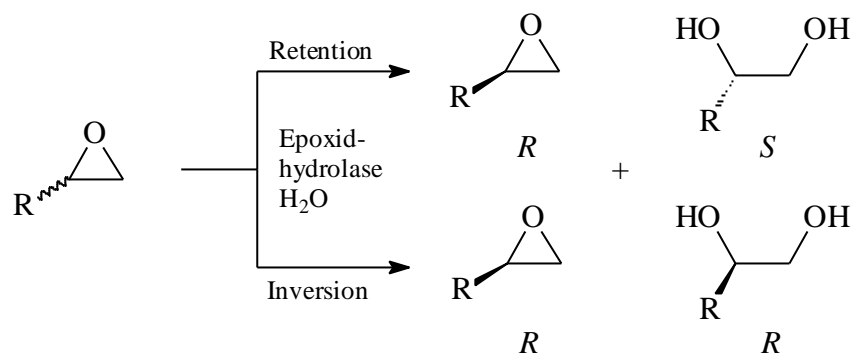


Abbildung 5: Enzymatische Epoxidhydrolyse unter Retention oder Inversion der Konfiguration.

Die erste bakterielle Epoxidhydrolase wurde 1969 in *Pseudomonas putida* gefunden und katalysiert die Synthese von L- und *meso*-Weinsäure aus einem Epoxidbaustein [74]. Die Arbeitsgruppe Faber untersuchte die Enzympräparation SP409 aus *Rhodococcus* sp. von Novo auf ihre Hydrolyseaktivitäten. Dabei wurde entdeckt, daß neben Nitrilen mit dieser Enzympräparation auch eine Vielzahl von mono- und 1,1-disubstituierten Epoxiden mit moderaten Enantioselektivitäten hydrolysiert werden konnten. Der Einsatz anderer Nucleophile als Wasser, wie z.B. eines Azids, führte stereoselektiv zu 1,2-Azidoalkoholen (Abbildung 6) [26,75]. Weitere Epoxidhydrolasen aus Bakterien und Pilzen wurden gefunden. Hier sind folgende Bakterienstämme mit Epoxidhydrolaseaktivität zu nennen: *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 [22-23,25,76], *Rhodococcus equi* IFO3730 [28], *Rhodococcus ruber* DSM43338 [21], *Mycobacterium paraffinicum* NCIMB10420 [21], *Corynebacterium* sp. UPT9 [24], *Corynebacterium* sp. C12 [77], *Agrobacterium radiobacter* AD1 [78-80], *Chryseomonas luteola* [81] und *Nocardia* sp. (EH1, H8, TB1) [29,82-85].

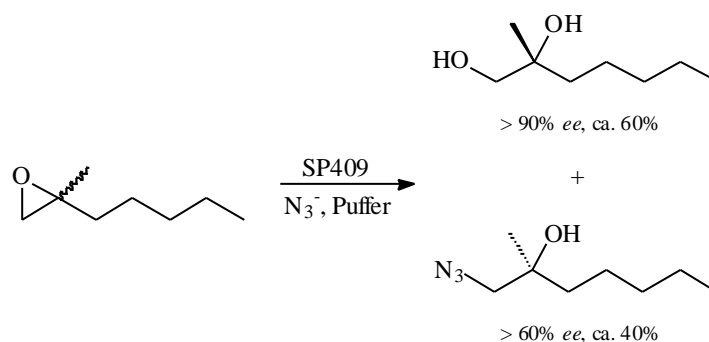


Abbildung 6: Epoxidspaltung mit *Rhodococcus* sp. SP409.

Einige Beispiele für Umsetzungen mit bakteriellen Epoxidhydrolasen finden sich in Abbildung 7.

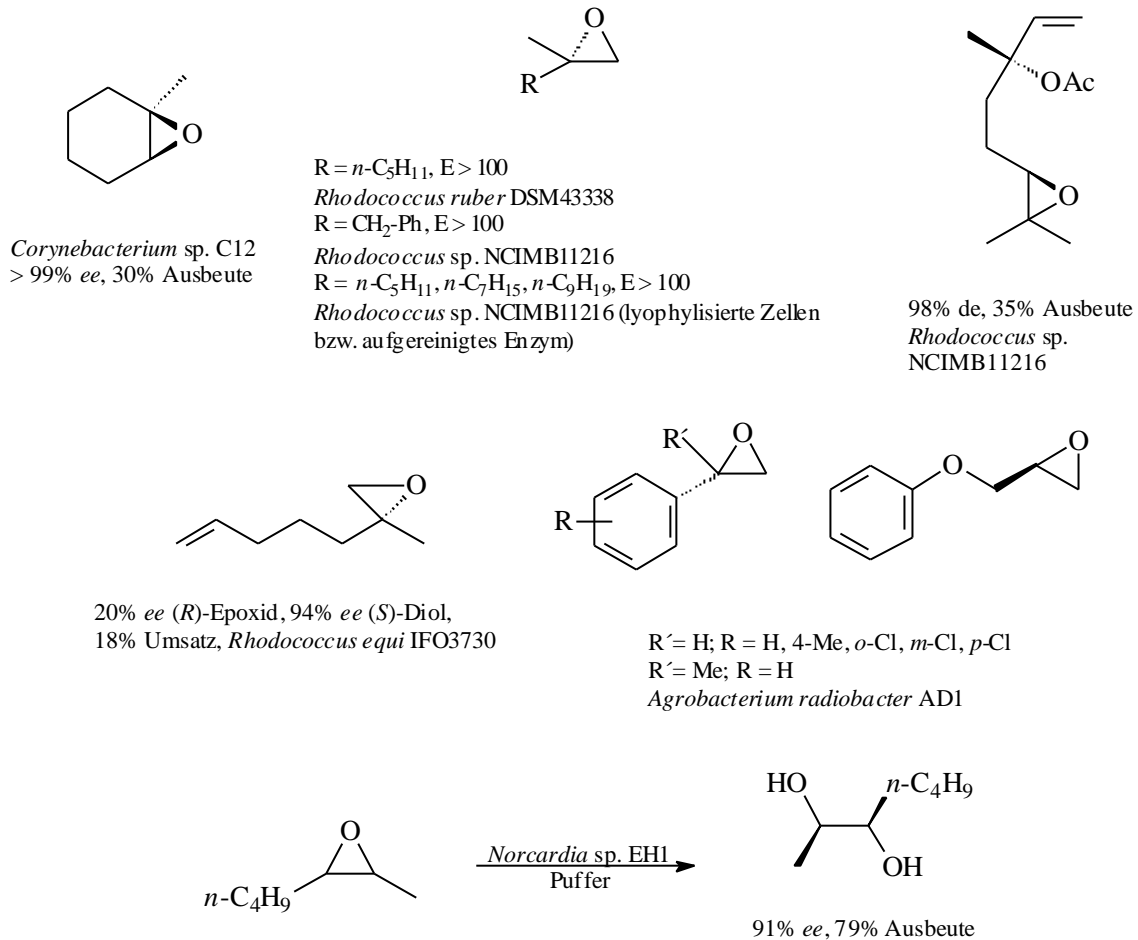


Abbildung 7: Beispiele für Biotransformationen mit bakteriellen Epoxidhydrolasen.

Einige der bakteriellen Epoxidhydrolasen, wie z.B. die Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1, wurden aufgereinigt. Dieser Stamm ist in der Lage auf Epichlorhydrin als einzige C-Quelle zu wachsen. Das die Epoxidhydrolase kodierende Gen wurde bestimmt, sequenziert und in *E. coli* überexprimiert. Das Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa und die katalytische Triade besteht vermutlich aus den Aminosäuren Asp₁₀₇, His₂₇₅ und Asp₂₄₆ [79-80,86]. Die Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. C12 wurde ebenfalls aufgereinigt: sie ist ein Multimer (wahrscheinlich Tetramer) und jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 32 kDa. Das die Epoxidhydrolase kodierende Gen wurde gefunden und sequenziert. Ein Sequenzvergleich zeigte eine hohe Homologie zu verschiedenen

Säugetier- und pflanzlichen Epoxidhydrolasen, aber auch zu Dehalogenasen und einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* mit Bromoperoxidaseaktivität [66].

Die Epoxidhydrolase aus *Nocardia* sp. EH1 wurde nach einer vierstufigen Aufreinigung rein erhalten. Sie ist ein Monomer und besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa, ein pH-Optimum bei pH 8-9 und ein Temperaturoptimum bei 35-40°C. Das aufgereinigte Enzym zeigt eine geringere Stabilität als in ganzen Zellen. Der Zusatz von Tween 80 oder Triton X-100 führte zu einer Stabilisierung des Enzyms [84]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wird eine Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14 beschrieben, die über ein Wachstumsscreening in Gegenwart eines Monoterpens gefunden wurde und Limonen-1,2-epoxid enantioselektiv spaltet. Diese Epoxidhydrolase besitzt allerdings nur ein sehr begrenztes Substratspektrum. Das Enzym wurde aufgereinigt: es scheint einer neuen Klasse von Epoxidhydrolasen anzugehören. Die Molekülmasse beträgt nur 17 kDa. Deshalb wird angenommen, daß sie nicht zu den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung gehört, da hierzu mindestens eine Molekülmasse von ca. 25 kDa notwendig ist [87].

Die erste Epoxidhydrolase aus einem Pilz wurde 1972 in *Helminthosporium sativum* gefunden, welche die enantioselektive Hydrolyse von 10,11-Epoxyfarnesol katalysiert [88]. Mit der Epoxidhydrolase aus dem Pilz *Aspergillus niger* LCP521 wurden die ersten präparativen Biotransformationen durchgeführt. Hierbei konnte (*S*)-Geraniol-*N*-phenylcarbammat durch Racematspaltung mit hoher optischer Reinheit erhalten werden [89]. Durch Racematspaltung mit diesem Pilz konnten auch alle vier Stereoisomere des 8,9-Epoxyimonens erhalten werden [90]. Mit lyophilisiertem Mycel konnte *p*-Nitrostyroloxid mit hoher Enantioselektivität umgesetzt werden. Der Einfluß von verschiedenen Cosolventien bei der Hydrolyse wurde untersucht: Dimethylsulfoxid konnte bis zu 20% zugesetzt werden, ohne daß eine größere Abnahme der Reaktivität beobachtet wurde [91-92]. Eine Zusammenfassung mit einer Reihe weiterer Substrate ist in Abbildung 8 dargestellt.

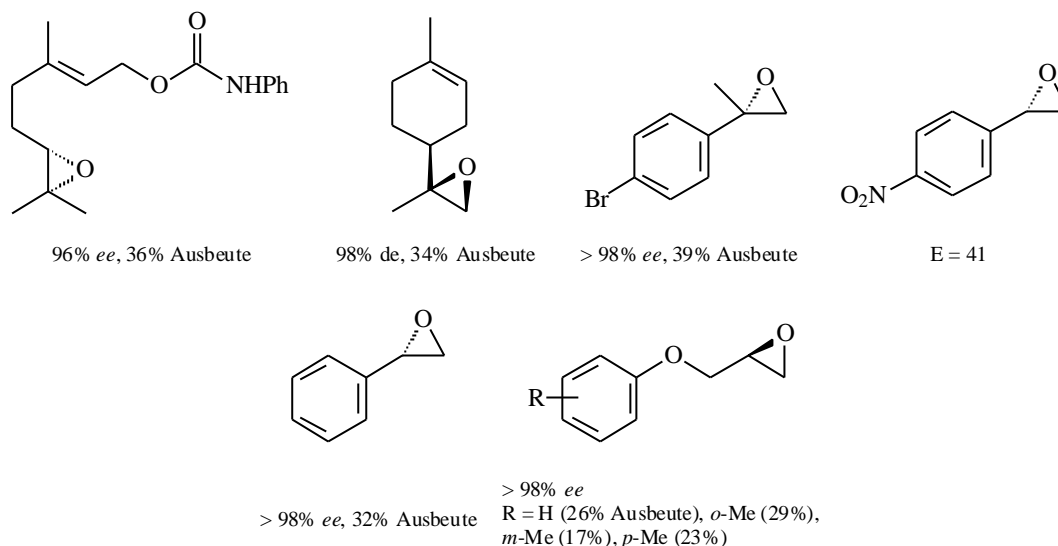


Abbildung 8: Umsetzungen mit *Aspergillus niger* LCP521.

Epoxidhydrolaseaktivität wurde auch in *Beauveria sulfurescens* ATCC7159 [93-94] und *Beauveria densa* CMC3240 [95] beobachtet. Diese hydrolysieren substituierte Styroloxide und annelierte Cycloalkanepoxide mit hoher Stereoselektivität (Abbildung 9).

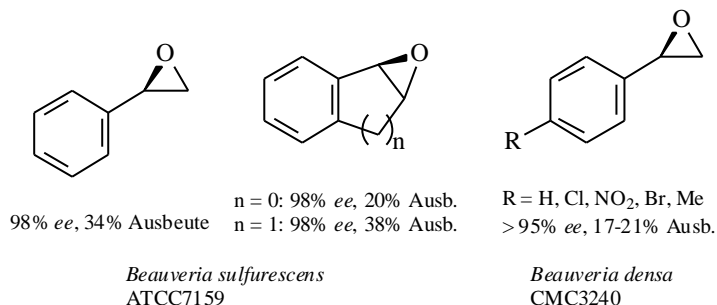


Abbildung 9: Beispiele für Biotransformationen mit *Beauveria*-Stämmen.

Untersuchungen mit verschiedenen *para*-substituierten Styroloxiden wurden mit dem Pilz *Syncephalastrum racemosum* durchgeführt und der Einfluß der Substituenten auf das Enantiomerenverhältnis der entstehenden Dirole bestimmt [96]. Mit den Pilzen *Ulocladium atrum* CMC3280 und *Zopfiella karachiensis* CMC3284 konnten 2,2-dialkylierte Epoxide mit Enantiomerenüberschüssen von 8 bis 44% *ee* erhalten werden [18].

Auch aus verschiedenen Hefen sind Epoxidhydrolasen bekannt. Hier ist z.B. die Hefe *Rhodotorula glutinis* zu nennen, welche eine Vielzahl von aryl-, alkyl- und alicyclischen Epoxiden mit hoher Enantioselektivität umsetzen kann [15,97]. Einige untersuchte

Reaktionen sind in Abbildung 10 zu finden. Weitere Epoxidhydrolasen sind aus *Rhodotorula araucariae* CBS6031 und *Rhodospiridium toruloides* CBS0349 bekannt [98].

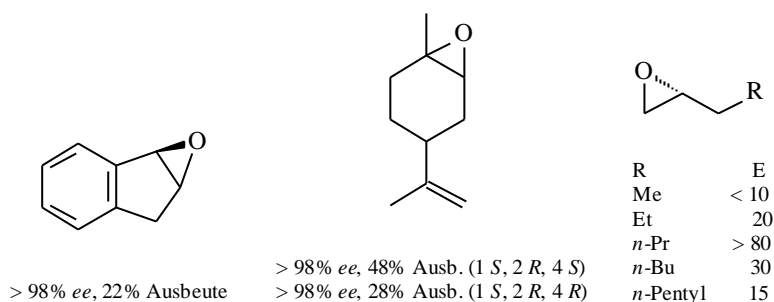


Abbildung 10: Beispiele für Racematspaltungen mit *Rhodotorula glutinis*.

1.2 Bedeutung der Chiralität und der Enantioselektivität

Bei der Untersuchung von Biotransformationen treten oft die Begriffe Chiralität und Enantioselektivität auf.

Eine Verbindung ist chiral, wenn sie mit ihrem Spiegelbild nicht zur Deckung gebracht werden kann. Diese Eigenschaft ist genau dann gegeben, wenn das Molekül asymmetrisch ist oder als Symmetrieebene nur eine Symmetrieachse C_n besitzt. Symmetrieebenen σ oder Drehspiegelachsen S_n , einschließlich des Symmetriezentrums S_2 , dürfen nicht vorhanden sein. Die Enantiomerenreinheit einer chiralen Substanz, welche in (*R*)- oder (*S*)-Form auftritt, wird durch den Enantiomerenüberschuß *ee* ausgedrückt. Dieser ist gemäß Gleichung 1 definiert.

$$\% ee \equiv \frac{x_A - x_B}{x_A + x_B} \times 100\%$$

Gleichung 1: Berechnung des Enantiomerenüberschuß (% *ee*) aus den Molenbrüchen x_A und x_B der Enantiomere A und B.

Als Racemat wird das äquimolare Gemisch (*ee* = 0) aus den beiden Enantiomeren bezeichnet. Eine Theorie zur quantitativen Analyse von enzymatischen Reaktionen wurde von Chen und Mitarbeitern entwickelt [152].

Die Enantioselektivität (E-Wert) einer Reaktion ist eine Konstante, die unabhängig von der Substratkonzentration und dem Umsatz ist. Der E-Wert drückt die Fähigkeit des Enzyms zur Unterscheidung zwischen den beiden konkurrierenden Enantiomeren aus. Die Enantioselektivität ist gemäß Gleichung 2 definiert. Diese Gleichung gilt jedoch nur für eine irreversible Reaktion ohne Produktinhibierung.

$$E \equiv \frac{\left(\frac{V_{max}}{K_M}\right)_R}{\left(\frac{V_{max}}{K_M}\right)_S} = \frac{\ln[(1-U)(1-ee_S)]}{\ln[(1-U)(1+ee_S)]} = \frac{\ln[1-U(1+ee_P)]}{\ln[1-U(1-ee_P)]}$$

Gleichung 2: Berechnung der Enantioselektivität (E-Wert) aus dem Enantiomerenüberschuß des Substrats (ee_S), des Produkts (ee_P) und dem Umsatz U oder aus dem Verhältnis V_{max}/K_M für das jeweilige Enantiomer (R) bzw. (S).

Bei irreversiblen Reaktionen läßt sich der Umsatz U aus den Enantiomerenüberschüssen des Substrats (ee_S) bzw. Produkts (ee_P) mit Hilfe von Gleichung 3 berechnen.

$$U \equiv \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

Gleichung 3: Berechnung des Umsatzes U aus dem Enantiomerenüberschuß des Substrats (ee_S) und des Produkts (ee_P).

Ein E-Wert von 1 entspricht einer nichtselektiven Reaktion. Bei einem E-Wert von über 100 spricht man von einer hochselektiven Reaktion, welche es ermöglicht optisch reines Substrat und Produkt bei 50 % Umsatz zu erhalten. Reaktionen mit E-Werten im Bereich über 20 sind zumeist jedoch auch präparativ nutzbar, da sie bei einem bestimmten Umsatz die Isolierung von optisch reinem Substrat zulassen.

In Abbildung 11 ist der Enantiomerenüberschuß an Substrat (ee_S) bzw. an Produkt (ee_P) gegen den Umsatz U bei verschiedenen Enantioselektivitäten E aufgetragen.

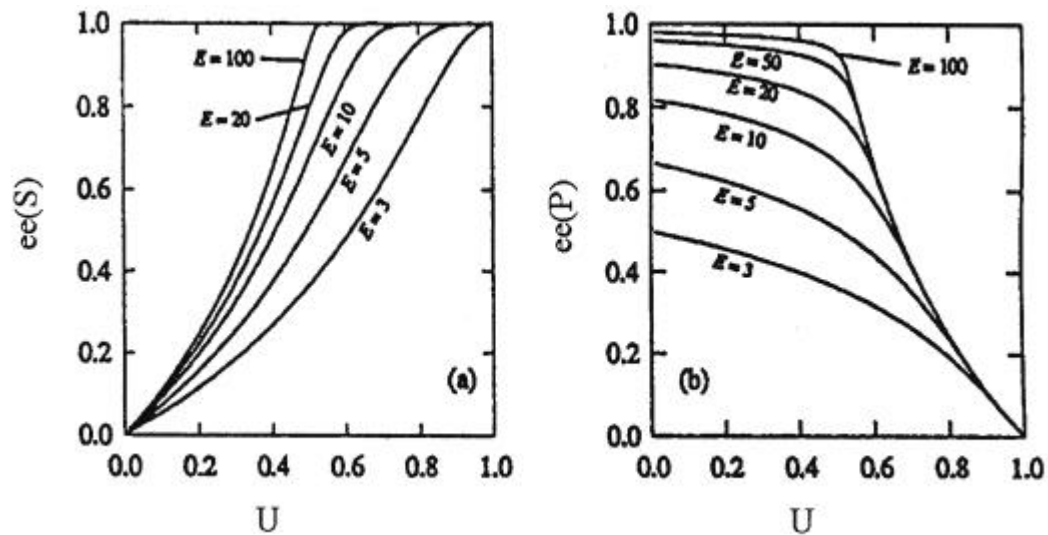


Abbildung 11: Zusammenhang zwischen Umsatz und Enantiomerenüberschuß an Substrat (links) bzw. Produkt (rechts) für verschiedene E -Werte.

1.3 Gerichtete Evolution von Enzymen

Die Entwicklung neuer Biokatalysatoren als Synthesewerkzeug für den Chemiker wird in jüngster Zeit immer wichtiger. Viele Enzyme besitzen jedoch für die Biokatalyse eine nicht ausreichend hohe Aktivität, Stereoselektivität oder Stabilität. Um ein Enzym bezüglich dieser Eigenschaften zu verbessern, stehen neben klassischen Methoden, wie Überexpression als rekombinantes Protein oder Optimierung der Reaktionsbedingungen, auch Methoden der Mutagenese zur Verfügung. Diese Verbesserung kann über einen rationalen Ansatz durch positionsgerichtete Mutagenese, über einen kombinatorischen Ansatz, welcher auch als gerichtete Evolution bezeichnet wird, oder durch Kombination beider Methoden erfolgen. Für die positionsgerichtete Mutagenese ist die dreidimensionale Struktur des Enzyms in seiner aktiven Form basierend auf NMR- oder Röntgenstrukturdaten oder eine sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologie zu bekannten Enzymen für eine hinreichend genaue Auswahl der zu mutierenden Positionen notwendig. Dieser Ansatz ist sehr zeitaufwendig, für jede Mutation muß das Enzym in ausreichender Menge zur Verfügung stehen und seine biochemischen Eigenschaften müssen untersucht werden. Die dadurch gewonnenen Ergebnisse können dann in ein verfeinertes Modelling einfließen und als Basis für neue Mutantenvorschläge dienen.

Ein anderer Ansatz ist die zufällige Mutagenese der für das zu verbessernde Protein kodierenden DNA. Für die zufällige Mutagenese stehen neben klassischen Methoden, wie z.B. chemischer Mutagenese, Röntgen- und UV-Strahlung, in neuerer Zeit auch gezieltere Methoden zur Verfügung, die nicht den gesamten Organismus mutagenisieren und als gerichtete Evolution bezeichnet werden (engl. directed evolution) [119-125].

Bei der gerichteten Evolution fallen durch die zufällige Mutagenese eine große Anzahl von Varianten (Größenordnung ca. 10^3 bis 10^6) an, deren Zahl mit der Anzahl der zu mutierenden Aminosäuren exponentiell wächst. Diese Varianten müssen exprimiert und auf verbesserte Eigenschaften hin untersucht werden. Mit klassischen Analysemethoden, wie z.B. Gaschromatographie oder HPLC, lassen sich Bibliotheken dieser Größe nicht mehr durchmustern. Ein effizientes Testsystem zum Screening ist deshalb von grundlegender Bedeutung. Dies kann auf der Basis eines Selektionsdrucks, wie z.B. veränderter Antibiotikaresistenz, dem Zusatz von Lösungsmitteln zur Verbesserung der Lösungsmittelstabilität oder dem Wachstum auf Mangelmedien erfolgen [122,126].

Die Mutationsrate muß genau eingestellt werden, da bei einer zu geringen Mutationsrate nur der Wildtyp wiedergefunden wird, bei einer zu hohen Rate werden nur inaktive Proteine erhalten. Positive Mutanten werden dann selektiert und einem weiteren Mutationszyklus unterworfen. Alternativ können Gene verbesserter Varianten durch sexuelle Evolution rekombiniert werden (DNA-shuffling) [122].

Aus der Literatur sind drei Methoden zur gerichteten Evolution bekannt:

1. die Verwendung von Mutationsstämmen [127-129],
2. DNA- oder gene-shuffling [130-134] und
3. error-prone PCR (fehlerhafte Polymerasekettenreaktion) [134-139].

Das Gen einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* wurde in einem Mutationsstamm mutiert. Innerhalb der Bibliothek wurde durch Wachstums- und Indikatorscreening nach einer Mutante gesucht, welche einen 3-Hydroxyethylester, der als Vorstufe für Epothilon dienen kann, spaltet. Dabei konnte eine Mutante isoliert werden, welche den 3-Hydroxyethylester mit 25% *ee* hydrolysiert [127].

Mit der Methode der *in vitro*-Rekombinationstechnik (DNA- oder gene-shuffling) gelang es, die enzymatische Aktivität des *lacZ*-Gens aus zwei mutierten inaktivierten *lacZ*-Genen wieder zu erhalten [131].

Die Methode der error-prone PCR wurde zur gerichteten Evolution einer in *E. coli* klonierten Esterase aus *Bacillus subtilis* benutzt. Dabei diente der *p*-Nitrobenzylester (*p*NB-Ester) von Loracarbef, einem Cephalosporin-Antibiotikum, als Modellsubstanz. Dieser *p*NB-Ester dient in der enzymatischen Synthese als Schutzgruppe und ist nur gering in Wasser löslich. Deshalb ist der Zusatz eines polaren organischen Lösungsmittels, wie z.B. Dimethylformamid, notwendig. Das Enzym muß dabei eine ausreichende Aktivität besitzen. Über error-prone PCR wurde eine Bibliothek von Esterasevarianten erstellt, anstelle des *p*NB-Ester wurde ein *p*-Nitrophenylester verwendet, da die Hydrolyse über die Detektion des freigesetzten *p*-Nitrophenols verfolgt werden kann. Nach vier Generationen wurde eine Mutante gefunden, deren katalytische Aktivität in 15% Dimethylformamid gegenüber dem Wildtypenzym um den Faktor 24 höher lag [136]. Durch anschließendes DNA-shuffling konnte die Enzymaktivität insgesamt um den Faktor 150 erhöht werden [122].

Es gelang auch die Stereoselektivität einer Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 gegenüber 2-Methyldekanoat durch error-prone PCR in vier Generationen von 2% *ee* auf 81% *ee* zu steigern. Die Enzymbibliothek wurde hierzu mit enantiomerenreinen (*R*)- bzw. (*S*)-*p*-Nitrophenylestern in Mikrotiterplatten durchmustert [137].

1.4 Assaysysteme für Epoxidhydrolasen

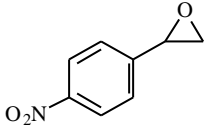
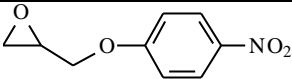
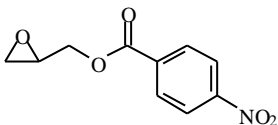
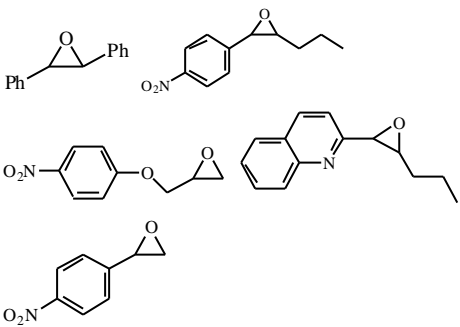
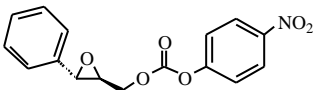
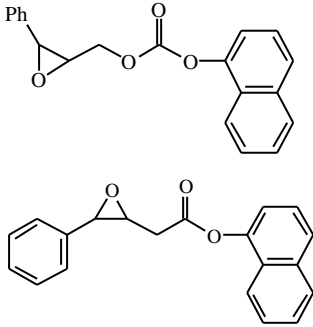
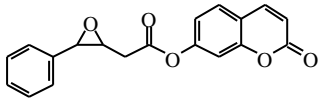
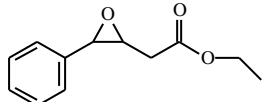
Um Epoxidhydrolaseaktivität nachzuweisen, und um die Enantioselektivität der Epoxidhydrolase zu bestimmen, sind verschiedene Methoden aus der Literatur bekannt.

Die Nachweise der Aktivität bzw. Selektivität beruhen auf:

- Kapillargaschromatographie an chiralen Phasen (chirale GC) [19,25,36,53,76,90-91,93],
- Hochauflösende Flüssigkeitsschromatographie (HPLC) [12,19,38,42,44,56-57,91,99-100]
- Spektrophotometrie (UV/VIS [101-104] oder Fluoreszenz [103,105-107]).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, welche es ermöglicht, in großen Stammsammlungen, in Genexpressions- oder Mutantenbanken, welche über Methoden der „directed evolution“ (z.B. durch error-prone PCR oder gene-shuffling) zugänglich sind, nach Epoxidhydrolaseaktivität zu suchen.

HPLC- und GC-Methoden sind wegen der großen Anzahl von anfallenden Proben und ihrer Aufarbeitung zeitaufwendig und deshalb für hohen Durchsatz nicht geeignet. Interessanter erscheinen deshalb Nachweisverfahren, die es erlauben, in einer Bibliothek direkt in Mikrotiterplatten oder auf Agarplatten die Epoxidhydrolaseaktivität nachzuweisen. Spektrophotometrische Methoden sind aufgrund ihrer Einfachheit und der geringen Meßzeit am besten für eine Automatisierung geeignet. Diese bieten auch den Vorteil der Möglichkeit einer raschen Quantifizierung der Enzymaktivität durch Messung einer Enzymkinetik. Die meisten Assaysysteme für Epoxidhydrolasen beruhen auf der Messung der Abnahme der Absorption im UV-Bereich in der Hydrolyse. Hier sind bei den bekannten Systemen die Absorptionskoeffizienten oft klein und geringe Aktivitätsunterschiede deshalb nicht meßbar [100-102]. Einige Assaysysteme sind zusammen mit den untersuchten Enzymen in Tabelle 1 dargestellt.

Verbindung	Enzym	Verfahren	Literatur
	<i>Aspergillus niger</i>	HPLC	[91]
	mEH (Ratte)	HPLC UV/VIS	[100-101]
	mEH (Ratte)	HPLC	[99]
	mEH (Ratte)	Fluoreszenz HPLC	[105]
	cEH (Maus)	UV/VIS, Abs.- abnahme	[102]
	cEH (Maus)	UV/VIS, HPLC	[103]
	cEH (Maus)	Freisetzung von 1-Naphthol u. Reaktion mit Fast Red RR: Nachweis der Aduktbldg. (UV/VIS)	[103]
	cEH (Maus)	Fluoreszenz von Umbelliferon	[103]
	cEH (Maus)	Oxidation von EtOH mit Alkoholdehydro- genase/NAD ⁺	[103]

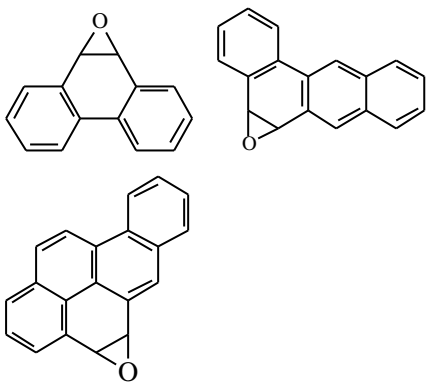
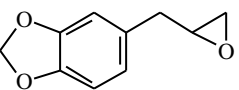
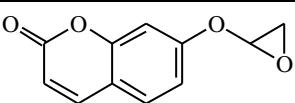
Verbindung	Enzym	Verfahren	Literatur
	mEH (Ratte)	UV/VIS Fluoreszenz	[106,108]
	mEH (Kaninchen)	UV/VIS	[104]
	mEH (Ratte)	Fluoreszenz, Diol nicht isolierbar (Darstellung über P450-System).	[107,109]
Halbwertszeit in Phosphatpuffer (37°C) 5 min, stabil in org. LM			

Tabelle 1: Assaysysteme für Epoxidhydrolasen (UV/VIS, Fluoreszenz).

Die Verwendung von (2*S*,3*S*)- und (2*R*,3*R*)-4-Nitrophenyl-2,3-epoxy-3-phenyl-propylcarbonat ((*S*)- bzw. (*R*)-NEPC) stellt einen interessanten Ansatz zum Screening auf Epoxidhydrolaseaktivität dar. Diese Substrate besitzen zwei funktionelle Gruppen, eine Epoxidfunktion und eine Carbonatfunktion. Diese beiden funktionellen Gruppen sind so positioniert, daß bei der Hydrolyse des Epoxids eine spontane Zyklisierung zu einem fünf- oder sechsgliedrigen Carbonat stattfinden kann. Dabei wird *p*-Nitrophenol als Chromophor abgespalten, welches photometrisch bestimmt wird und damit als Reporter benutzt werden kann. Das zyklische Carbonat reagiert dann, unter Abspaltung von Kohlendioxid, zu einem Triol weiter. Ein Reaktionsschema findet sich in Abbildung 12.

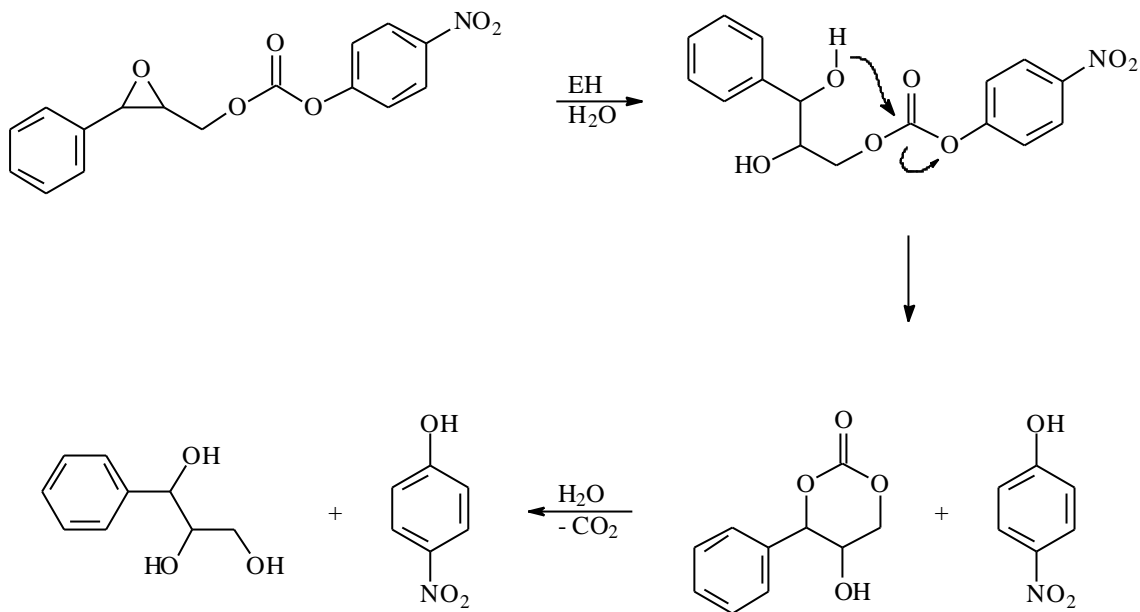


Abbildung 12: Reaktionsmechanismus der Epoxidspaltung von NEPC.

Allerdings ist bei der Verwendung von NEPC zu beachten, daß die Carbonatfunktion auch durch Lipasen und Esterasen, wie z.B. die Schweineleberesterase, als auch durch Glutathion-*S*-transferasen gespalten werden kann. Der NEPC-Assay kann deshalb nur für aufgereinigte Epoxidhydrolasen oder für Präparationen ohne andere hydrolytische Aktivitäten verwendet werden. Der NEPC-Test ist nur sensitiv gegenüber cytosolischer Epoxidhydrolase, gegenüber mikrosomaler Epoxidhydrolase wurde nur eine geringe Enzymaktivität gefunden. Zur Übertragung auf Epoxidhydrolasen mit anderer Substratspezifität müßte die Struktur der Assaysubstanz angepaßt werden, wobei durch das Vorhandensein eines Stereozentrums am Epoxidring auch das Screening auf eine bestimmte Enantiopräferenz des Enzyms möglich ist. Der Assay bietet auch die Möglichkeit zur Automatisierung in Mikrotiterplatten [103].

Zum direkten Nachweis von alkylierenden Substanzen kann 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) verwendet werden. Die alkylierenden Eigenschaften verschiedener Substanzen wie reaktiven Halogenverbindungen, Carbonsäurechloriden und Carbonsäureanhydriden, organischen Phosphorverbindungen, Aziridinen und Epoxiden wurden unter Verwendung von NBP untersucht [110]. Der angenommene Reaktionsmechanismus am Beispiel eines Epoxids ist in Abbildung 13 dargestellt. Durch die Alkylierung von NBP kommt es zur Bildung eines blauen Farbstoffs, der photometrisch detektiert werden kann. Die Struktur des blauen Farbstoffs ist allerdings umstritten und bisher nicht vollständig geklärt. Die Alkylierung von NBP durch verschieden substituiertes Styroloxid *in vitro* [111], durch *cis*- und *trans*-Methyl-

epoxyzimtsäure [112] und mit Chlorethylenoxid [113] ist untersucht worden. Aus der Toxikologie ist ein Zusammenhang zwischen der Alkylierungsfähigkeit einer Substanz und der Mutagenizität am Beispiel allylischer Verbindungen durch Verwendung von NBP gefunden worden [114]. Das Mutagenesepotential langsam reagierender Epoxide läßt sich durch Reaktion mit NBP bestimmen [115] und Umsetzungen verschiedener Alkylepoxide mit DNA oder Deoxyguanosin in Gegenwart von NBP wurden durchgeführt [116]. Der NBP-Test wurde auch benutzt, um die Aktivität von mikrosomaler Epoxidhydrolase gegenüber Safroloxid, nach Extraktion des wäßrigen Reaktionsmediums mit Essigsäureethylester und Erhitzen auf 75°C, zu bestimmen [117]. Auch ein dünnschichtchromatographischer Assay mit NBP wurde für verschiedene Epoxide entwickelt [118].

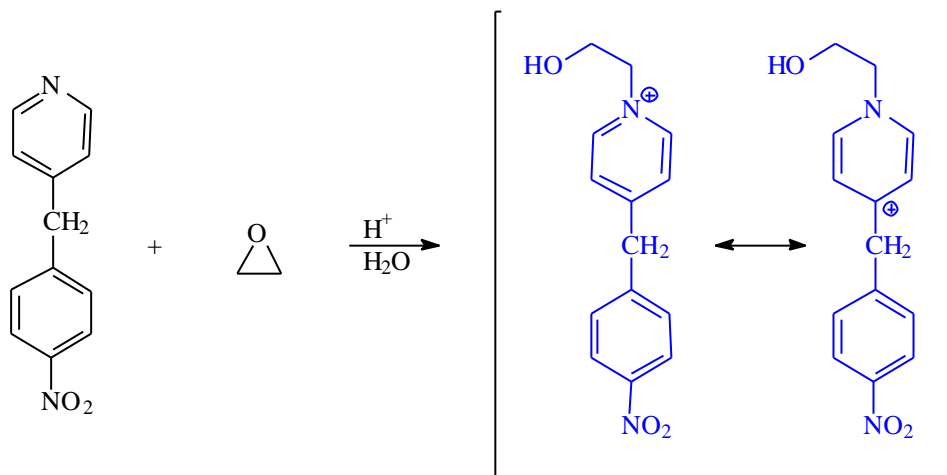


Abbildung 13: Angenommenes Reaktionsprodukt bei der Alkylierung von NBP.

Bei allen Epoxidbestimmungen mit NBP wurde die wäßrige Reaktionsphase mit einem organischen Solvent extrahiert und auf 75-110°C erhitzt, um die Bildung des blauen Produkts zu beobachten. Der blaue Farbstoff ist in Wasser unlöslich und fällt dort aus. Eine direkte photometrische Messung der Epoxidkonzentration in Puffer ohne Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel ist deshalb nicht möglich. Diese Durchführung ist aus diesem Grund auch nicht für das automatisierte Screening in Stammsammlungen oder Mutantenbibliotheken im Mikrotiterplattenformat geeignet.

1.5 Streptomyceten

Streptomyceten gehören zur Gattung der *Actinomyceten*. Sie sind grampositive Bakterien, die vorwiegend im Boden beheimatet sind. Bei ihnen findet man die Bildung eines Luftmycels und von Lufthyphen (Sporophoren), von denen Konidien abgeschnürt werden, welche der Verbreitung dienen. Ein charakteristisches Merkmal der *Streptomyceten* ist ihr Geruch, der an frisch umgebrochene Erde erinnert. Für diesen Geruch ist Geosim verantwortlich (1,10-Dimethyl-9-decalol), welches z.B. aus *Streptomyces griseus* isoliert wurde. *Streptomyceten* sind obligat aerob und zeichnen sich durch ihr mycelartiges Wachstum, einen komplexen Differenzierungszyklus und einen außerordentlich vielseitigen Sekundärmetabolismus aus. Von besonderer industrieller Bedeutung ist ihre Fähigkeit eine Vielzahl von therapeutisch wichtigen Antibiotika zu bilden: etwa 50 % aller bekannten Antibiotika werden von *Streptomyceten* gebildet, wie z.B. Streptomycin (*S. griseus*), Chloromycetin (*S. venezuelae*) und verschiedene Tetracycline (*S. aureofaciens*). *Streptomyceten* sekretieren eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, wie z.B. Amylasen, Cellulasen, Proteasen, Lipasen, Esterasen, Phospholipasen, Chitinasen, Ligninasen und Glukanasen. Viele *Streptomyceten* sind deshalb in der Lage Cellulose, Chitin und andere schwer zersetzliche Biopolymere abzubauen. Einige dieser Enzyme sind auch kommerziell erhältlich, wie z.B. eine α -Amylase aus *S. hygroscopicus*. Die meisten Arbeiten konzentrieren sich auf die Isolierung der Phospholipasen C und D aus verschiedenen *Actinomyceten*, wie z.B. auf die Phospholipase D aus *Streptomyces antibioticus*, welche in *E. coli* exprimiert wurde [140]. *Streptomyceten* sind darüberhinaus auch als Wirtssysteme zur Expression von heterologen Proteinen von großem Interesse.

Der Entzündungshemmer Ketorolac konnte mit einer Protease aus *Streptomyces griseus* in hoher optischer Reinheit durch *in situ* Racemisierung des Ethylesters erhalten werden (Abbildung 14) [141]. Dennoch ist die Zahl der genetisch charakterisierten hydrolytischen Enzyme aus *Streptomyceten* gering [142].

Auch die hydroxylierenden Aktivitäten von *Streptomyceten* wurden für Biotransformationen ausgenutzt, wie z.B. bei der regioselektiven Hydroxylierung des Terpens 1,4-Cineol, einem Bestandteil des Eukalyptusöls durch *Streptomyces griseus* [143] und bei der Hydroxylierung von α - und β -Ionon durch verschiedene *Streptomyceten*-Stämme (*S. fradiae* Tü27, *S. arenae*

Tü495, *S. griseus* ATCC13273, *S. violaceoniger* Tü38, *S. antibioticus* Tü4 und Tü46) zu den entsprechenden 3-Hydroxyderivaten (Abbildung 14) [144].

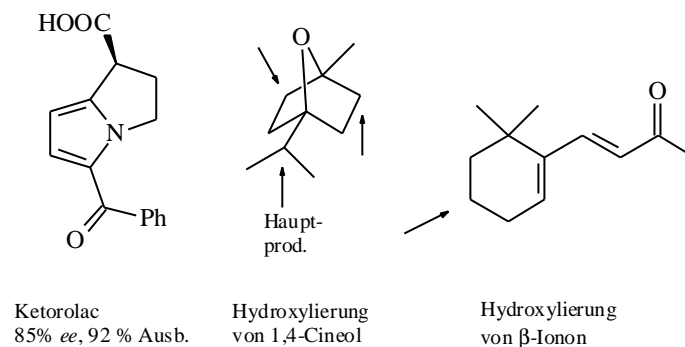


Abbildung 14: Biotransformationen mit *Streptomycceten*.

Halogenierungsreaktionen durch Haloperoxidasen aus *Streptomyces phaeochromogenes* [145], *Streptomyces aureofaciens* ATCC10762 [65,146], *Streptomyces griseus* Tü6 [147], *Streptomyces aureofaciens* Tü24 [148-149], *Streptomyces lividans* TK64 [150] und *Streptomyces venezuelae* ISP5230 [151] in Gegenwart von Wasserstoffperoxid wurden ebenfalls durchgeführt.

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die zeitaufwendige Suche nach neuen Enzymaktivitäten durch die Verwendung neuer Mutationsmethoden unter Einbeziehung automatisierter Screeningsysteme verkürzt werden. Ziel dieser Arbeit war der Aufbau und das Screening einer Enzymbibliothek auf Epoxidhydrolaseaktivität.

Ausgehend von einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*, welche aufgrund ihres katalytischen Mechanismus keine Epoxide spalten kann, sollte durch rationale und zufällige Mutagenese eine Enzymbibliothek erstellt werden. In dieser und in einer Enzymbibliothek einer Lipase aus *Bacillus thermocatenuatus*, welche ebenfalls über Protein-Engineering durch gerichtete Evolution erhalten wurde, sollte dann nach Epoxidhydrolaseaktivität gesucht werden. Hierzu mußte ein Assay bereitgestellt werden, der ein schnelles Screening in Mikrotiterplatten mit hohem Durchsatz ermöglicht. Der Assay sollte dann auf eine Anlage zum Hochdurchsatzscreening programmiert und dort validiert werden. Zur Entwicklung dieses Assays wurde das Substratspektrum der beiden Wildtypenzyme benötigt, damit das Nachweisverfahren entsprechend angepaßt werden kann.

Mit Hilfe dieses Assays sollte es dann auch möglich sein, andere Mikroorganismen, z.B. aus Stammsammlungen, auf Epoxidhydrolaseaktivität zu untersuchen, die Enzyme aufzureinigen, die zugehörigen Gene zu identifizieren und klonieren.

3 Ergebnisse

3.1 Screening nach neuen Enzymaktivitäten

Mikroorganismen stellen die Quelle einer Vielzahl von interessanten Enzymen für die pharmazeutische und chemische Industrie dar. Die Suche nach neuen oder verbesserten Enzymaktivitäten kann einerseits in Stammsammlungen, als auch über Methoden der gerichteten Evolution erfolgen.

Für eine schnelle Durchmusterung müssen die Stämme oder die Varianten z.B. in Mikrotiterplatten vereinzelt werden. Dies kann durch den Einsatz eines Durchflußzytometers (FACS) und Verwendung des „green fluorescent proteins“ (GFP) als Reporter gen erfolgen [153]. Das GFP, ein cofaktorunabhängiges und in einer Vielzahl von Organismen aktiv exprimierbares Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, kann durch seine Fluoreszenz detektiert werden und dient zur Transformandenselektion und Vereinzelung. Alternativ hierzu kann die Vereinzelung auch mit einem Pickroboter durchgeführt werden. Diese Methode besitzt den Vorteil, daß auf die Expression eines Markerproteins verzichtet werden, da das GFP durch seine Fluoreszenz nachfolgende Enzymassays stören kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einsatz eines Pickroboters zum Screening einer Enzymbibliothek, welche durch gerichtete Evolution einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* erhalten wurde, am Institut etabliert. Die vereinzelt Varianten wurden dann in Mikrotiterplatten kultiviert, die Enzyme unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors exprimiert und eine Stammhaltung als Glycerinkulturen in Mikrotiterplatten angelegt. Desweiteren wurden auch Stämme einer Stammsammlung von *Streptomyces* zum Screening verwendet. Beide Bibliotheken wurden durch ein Hochdurchsatzscreeningsystem auf Epoxidhydrolaseaktivität durchmustert. Im Assay positive Stämme oder Varianten wurden dann zum Nachweis der Aktivität und zur Bestimmung der Enantioselektivität der Epoxidhydrolasen durch Umsetzungen in größerem Maßstab und Analyse per GC charakterisiert („cherry picking“). Dabei konnten falsch positive Varianten oder Stämme ausgeschlossen werden (Abbildung 15).

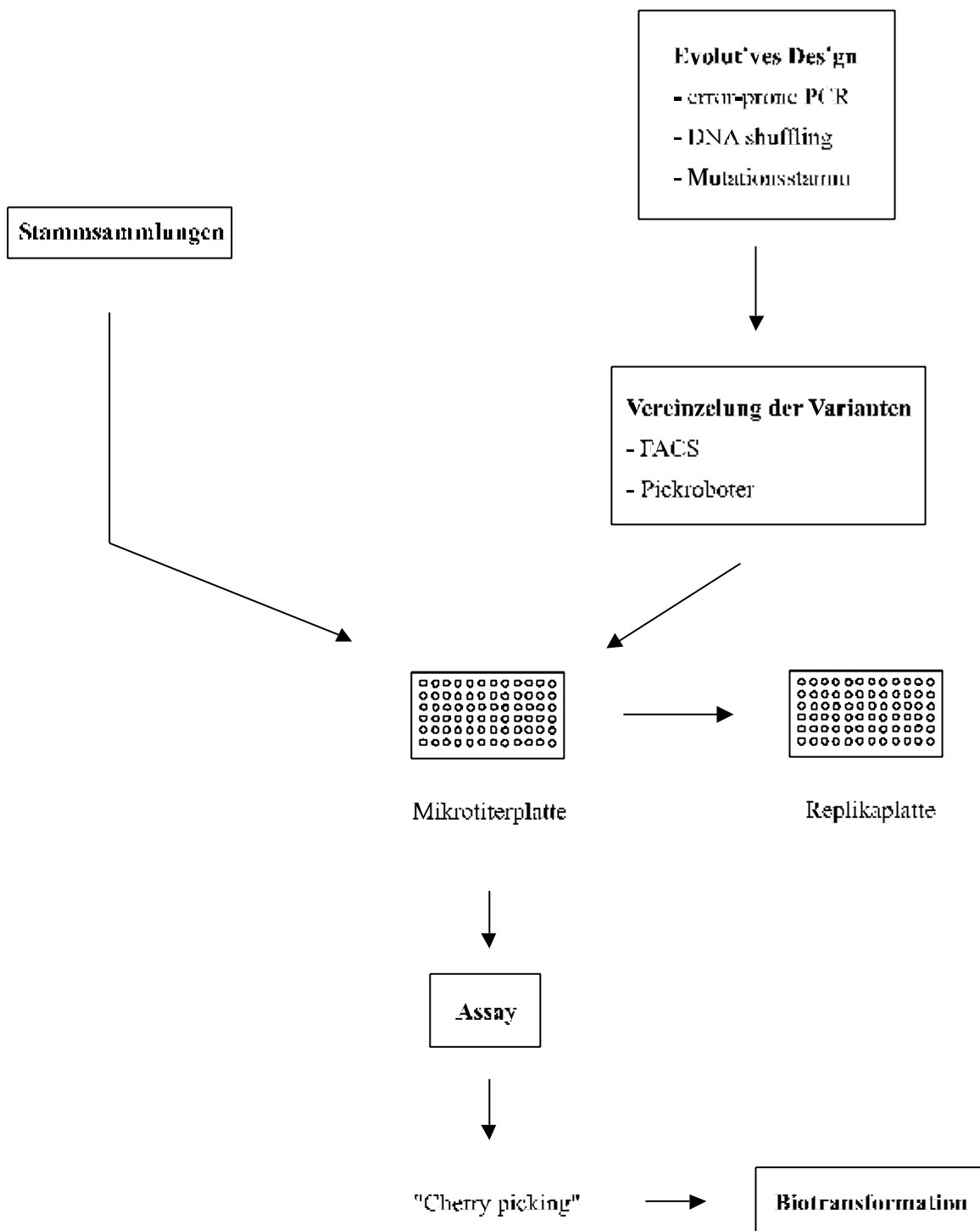


Abbildung 15: Hochdurchsatzenzymscreening auf neue oder verbesserte Biokatalysatoren.

3.2 Strategien zur Erstellung von Assaysystemen zum Hochdurchsatzscreening

Für das Screening nach neuen Enzymaktivitäten ist ein zuverlässiger und schneller Assay von zentraler Bedeutung. Durch die Fortschritte der Laborautomatisierung in den letzten Jahren steht aus dem Bereich der Pharmaforschung und der kombinatorischen Chemie eine Vielzahl von Automatisierungslösungen zur Verfügung. Das Hochdurchsatzscreening nach neuartigen Enzymen stellt einen neuen, zum Pharmascreeing komplementären, Ansatz dar. Im Enzymscreening wird im Gegensatz zum HTS im Pharmabereich die Aktivität einer Vielzahl von Varianten gegenüber einem Substrat untersucht, während in der Pharmaforschung über gekoppelte zellbasierte Assays die Reaktion einer Vielzahl von Substraten gegenüber einem Rezeptor untersucht wird. Die praktische Vorgehensweise beim Screening ähnelt sich aber bei beiden Ansätzen stark.

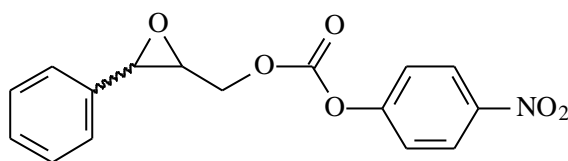
Zur Erstellung eines Enzymassays im HTS-Umfeld müssen folgende Anforderungen erfüllt sein:

- das Assayformat muß automatisierbar und der Assayverlauf gut detektierbar sein,
- das Assaysystem sollte der eigentlich gesuchten Reaktion möglichst ähnlich sein,
- der Assay muß eine eindeutige Entscheidung in einem kurzen Zeitintervall liefern,
- Nebenreaktionen sollten unterbunden sein oder keinen störenden Einfluß haben.

3.3 Untersuchungen von Epoxychromophorestern zum Nachweis von Epoxid-hydrolaseaktivität

Für einen Assay in Mikrotiterplatten werden bevorzugt Substrate verwendet, welche den Nachweis der Enzymaktivität durch die Abspaltung einer chromophoren Gruppe und dadurch die Detektion der enzymatischen Aktivität zulassen. Die Enzymaktivität ist z.B. durch Messung der Absorption oder der Fluoreszenz quantitativ bestimmbar und kann dadurch auch eine Aussage über die Kinetik der untersuchten Reaktion getroffen werden. Ausgehend von Untersuchungen mit cytosolischer Epoxidhydrolase aus Mausleber wurde 4'-Nitrophenyl-2,3-epoxy-3-phenylpropylcarbonat (NEPC, Abbildung 16) als Modellsubstrat gewählt [103]. Die Verwendung enantiomerenreiner Edukte zur Darstellung von (S)- bzw.

(*R*)-NEPC erlaubt gleichzeitig ein Screening auf die Enantioselektivität des untersuchten Biokatalysators.



1

Abbildung 16: NEPC als Modellsubstrat für cytosollische Epoxidhydrolase.

In Gegenwart einer Epoxidhydrolase kommt es zur Spaltung des Oxiranrings und dann durch einen Nachbargruppenangriff zur Bildung eines cyclischen Carbonats und Freisetzung des Chromophors. Das Carbonat reagiert unter Abspaltung von Kohlendioxid weiter. In diesem Assay auf Epoxidhydrolaseaktivität wird die Zunahme der Absorption durch Freisetzung von 4-Nitrophenol bei 405 nm beobachtet. Ein Ziel dieser Arbeit war die Erstellung eines Assaysystems zur beschleunigten Suche nach neuer Epoxidhydrolaseaktivität in Enzybibibliotheken. Um die Eignung von NEPC für diese Bibliotheken zu untersuchen, wurden Umsetzungen der Wildtypenzyme und verschiedener bekannter Epoxidhydrolasen durchgeführt. Damit sollte festgestellt werden, ob NEPC eine geeignete Assaysubstanz darstellt, oder, ob Modifikationen an der Struktur erfolgen müssen.

Mit NEPC wurden deshalb Topagarplatten angefertigt und die Spaltung durch verschiedene Mikroorganismen mit Epoxidhydrolase- oder Dehalogenaseaktivität untersucht. Dabei wurden die Stämme *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 und *Aspergillus niger* LCP521 mit Epoxidhydrolaseaktivität und der Stamm *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, welcher Dehalogenaseaktivität besitzt, verwendet. Der Stamm mit Dehalogenaseaktivität wurde benutzt, da Dehalogenasen dieselbe katalytische Triade wie Epoxidhydrolasen besitzen. Zum Vergleich wurde eine Variante der BTL benutzt. Bei dieser Variante wurde das Serin im aktiven Zentrum gegen Asparaginsäure ausgetauscht. Dadurch wurde dieselbe katalytische Triade, wie sie in Epoxidhydrolasen gefunden wurde, nachgeahmt und damit auch die Lipaseaktivität zerstört. Diese Variante lag im pCYTEXP1-BTL2-Asp-Plasmid in *E. coli* unter der Kontrolle des λ -Promotors kloniert vor. Zum Vergleich wurde die Wildtyplipase verwendet, deren Gen im selben Vektor pCYTEXP1-BTL2 vorlag. Die Induktion der BTL und der BTL Asp erfolgte unter der Kontrolle des λ -Promotors durch Hitzeschock. Dabei wurde festgestellt, daß nur ganze Zellen der Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus* sp.

NCIMB11216 das Substrat spalten können. Durch die BTL Asp-Mutante und die Wildtyp Lipase, die Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* LCP521 und die Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 konnte keine Hydrolyse beobachtet werden.

Die Raumstruktur der BTL ist bisher unbekannt. Deshalb wurden verschiedene Ester als NEPC-Esteranalogue dargestellt, um zu klären, ob NEPC zu groß für das aktive Zentrum der BTL ist und deshalb nicht umgesetzt werden kann (Abbildung 17). Ihr Hydrolyseverhalten in Agarplatten in Gegenwart des BTL-Wildtypenzym wurde untersucht.

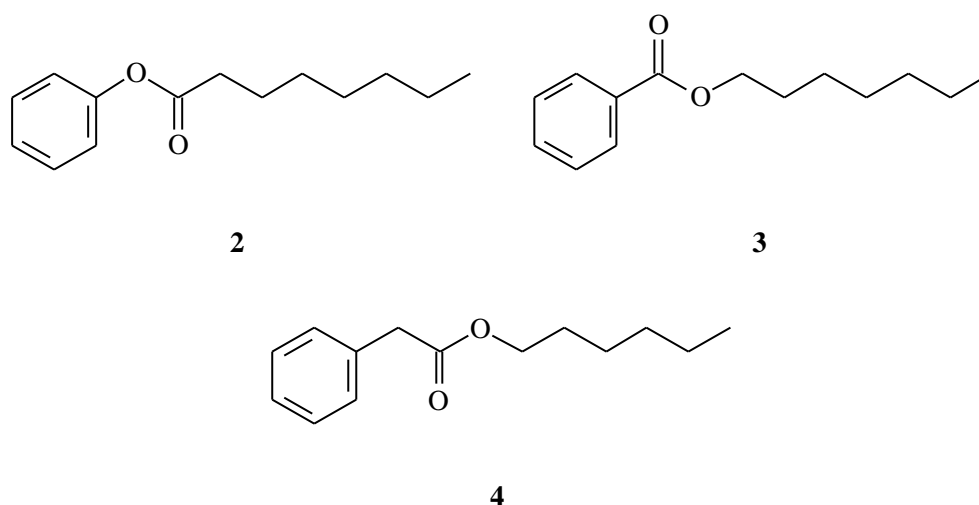


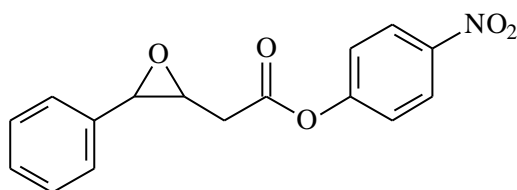
Abbildung 17: Verschiedene Ester als NEPC-Analogue.

Hierzu wurden, ähnlich dem Tributyrinassay, Agarplatten mit den Estern 2-4 in verschiedenen Konzentrationen (0,5-2% (v/v)) angefertigt und mit Übernachtskulturen von *E. coli*, welche das pCYTEXP1-BTL2-Plasmid besaßen, angeimpft. Zum Vergleich wurden Platten mit Tributyrin, welches ein Substrat der BTL darstellt, verwendet. Die Hofbildung durch Spaltung der Ester wurde nach Induktion des λ -Promotors bei 42°C beobachtet.

Mit Oktansäurephenylester (2) konnte eine rasche Hofbildung vergleichbar mit der durch Tributyrin gefunden werden. Benzoessäureheptylester (3) und Phenyllessigsäurehexylester (4) wurden nicht umgesetzt. Oktansäurephenylester ist das dem natürlichen Substratspektrum der BTL, nämlich Triglyceriden mit langkettigen Fettsäuren, ähnlichste Substrat und wird deshalb am schnellsten umgesetzt. NEPC sollte also in das aktive Zentrum der Lipase passen.

Ein NEPC-Analogue zum Nachweis der Umwidmung der BTL in eine Epoxidhydrolase sollte allerdings statt einer Phenyl- oder Benzylgruppe besser eine langkettige Alkylgruppe am Oxiranring tragen, da dies mehr den natürlichen Lipasesubstraten entspricht.

Ein weiteres photometrisches Assaysystem unter Verwendung von 4-Nitrophenyl-*trans*-3,4-epoxy-4-phenylbutanoat (NEB, Abbildung 18) mit der cytosolischen Epoxidhydrolase der Maus ist aus der Literatur bekannt. Dieser Chromophorester enthält neben einer Estergruppe auch eine Epoxidfunktion. Durch eine Epoxidhydrolase wird der Oxiranring zum Diol geöffnet. Dieses Diol zyklisiert dann intramolekular unter Abspaltung des Chromophors zum 3-Hydroxy-4-phenyl-butyrolacton. NEB besitzt verglichen mit Carbonatestern wie NEPC eine erhöhte Stabilität [103].



5

Abbildung 18: NEB als Modellsubstanz.

Um den Einfluß der Alkohol- und der Oxirangruppe auf die Hydrolyse mit der BTL und deren Mutanten zu untersuchen, wurden verschiedene 4-Penten- und 4,5-Epoxy-pentancarbonsäureester dargestellt (Abbildung 19). Auch diese Verbindungen könnten nach enzymatischer Spaltung des Oxiranrings unter Chromophorabspaltung ähnlich zu NEB intramolekular zyklisieren. Die Chromophorester **6** und **7** wurden durch Veresterung von 4-Pentencarbonsäure mit den chromophoren Alkoholen 4-Nitrophenol und Resorufin unter Verwendung von *N*-Ethyl-*N'*-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid (EDC) zur Aktivierung in Ausbeuten von 73% (**6**) und 28% (**7**) erhalten. Die zugehörigen Epoxyester **8** und **9** konnten durch Epoxidierung mit 3-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) aus den Estern **6** und **7** in Ausbeuten von 50% (**8**) bzw. 81% (**9**) dargestellt werden.

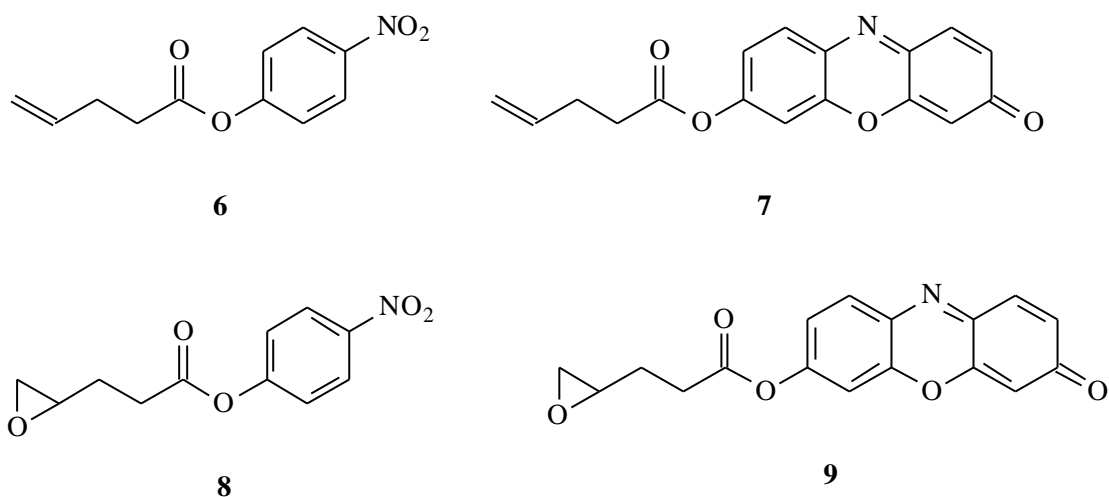


Abbildung 19: Substrate zur Untersuchung des Einflusses der Alkohol- und Oxirangruppe auf das Hydrolyseverhalten.

Diese Verbindungen wurden mit verschiedenen Enzymen umgesetzt (Tabelle 2). Die Substanzen wurden hierzu in Aceton gelöst (1 mM Endkonzentration) und die verschiedenen Enzyme in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7) zugegeben. Die Umsetzungen wurden bei Raumtemperatur in Mikrotiterplatten durchgeführt und die Freisetzung der beiden Chromophore beobachtet.

Enzym	Ester 6	Ester 7	Epoxyester 8	Epoxyester 9	(R)- NEPC
PFE	++	++	++	++	++
CAL B	0	0	++	++	0
ROL	-	-	++	++	-
<i>Rh. sp.</i> NCIMB11216	-	-	++	++	0
<i>Beauveria sulf.</i> ATCC7159	-	-	-	-	-
BTL Asp/Pro	-	-	-	-	-
BTL Asp	-	-	-	-	-
BTL	-	0	-	0	-

Tabelle 2: Assay mit verschiedenen Enzymen und Mikroorganismen in Mikrotiterplatten (++ sehr schnelle Reaktion, + schnelle Reaktion, 0 langsame Reaktion, - keine Reaktion).

Aus diesen Umsetzungen kann geschlossen werden, daß die kurzkettigen Chromophorester nicht als Modellsubstrate für einen Epoxidhydrolaseassay mit Mutanten der BTL verwendet werden können. Für die Umsetzung mit der BTL ist eine längerkettige Carbonsäure auf der Säureseite nötig. Für eine Enzybibliothek der PFE hingegen sind die kurzkettigen Chromophorester geeignet.

Deswegen wurden 4,5-Epoxy-dodecansäure-chromophorester als Substrate für die BTL-Enzybibliothek mit 4-Nitrophenol und Resorufin als chromophorer Gruppe hergestellt. 1-Decen-3-ol (**10**) wurde durch Umsetzung von 1-Octanal mit Vinylmagnesiumbromid in THF in einer Ausbeute von 58% erhalten. Dodecan-4-en-ethylester (**11**) wurde durch Reaktion des Alkohols **10** mit Triethylorthoacetat und Propionsäure in 49% Ausbeute isoliert. Dieser Ester wurde mit 10% KOH in Dioxan/Wasser hydrolysiert und Dodecan-4-en-säure (**12**) in 83% Ausbeute dargestellt. Die ungesättigte Carbonsäure wurde mit EDC aktiviert und durch Reaktion mit 4-Nitrophenol bzw. Resorufin wurden die entsprechenden Ester **13** (62% Ausbeute) und **14** (7% Ausbeute) erhalten. Die ungesättigten Chromophorester **13** und **14** wurden dann durch *m*CPBA zu den Epoxyestern **15** (95% Ausbeute) und **16** (55% Ausbeute) umgesetzt. Die Darstellungen sind in Abbildung 20 zusammengefaßt.

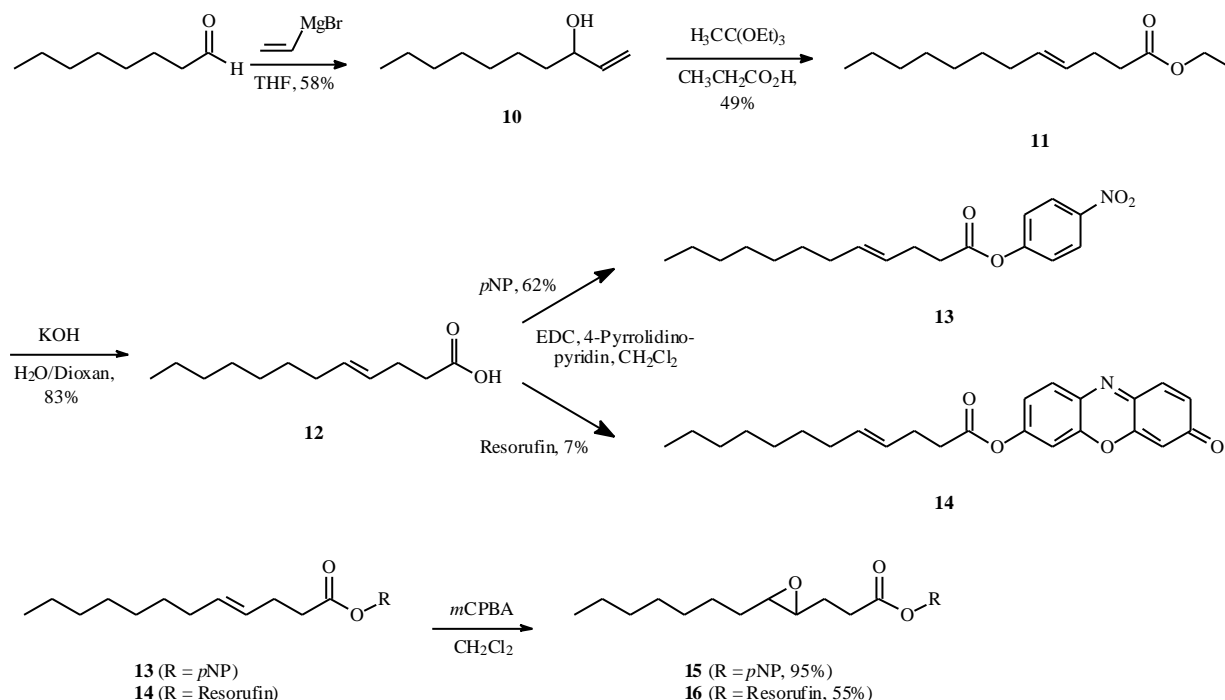


Abbildung 20: Darstellung von Epoxydodecancarbonsäurechromophorestern.

Mit den Dodecencarbonsäurechromophorestern **13** und **14** und den zugehörigen Epoxiden **15** und **16** wurden Umsetzungen mit verschiedenen Enzymen in Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden der BTL-Wildtyp, die Asp- und die Asp/Pro-Mutante der BTL verwendet. Zum Vergleich wurde eine Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (PCL) benutzt. Die Chromophorester **13-16** konnten durch den BTL-Wildtyp und die PCL rasch gespalten werden, d.h. die Substanzen passen in das aktive Zentrum der Enzyme. Mit der Asp- und der Asp/Pro-Mutante der BTL konnte keine Hydrolyse beobachtet werden, d.h. die Mutanten waren nicht in der Lage die Substanzen am Oxiranring zu spalten und zeigten deshalb keine Epoxidhydrolyseaktivität. Allerdings ist die Epoxidfunktion in den Chromophorestern relativ weit von der Carbonylgruppe entfernt. Wegen der ungeklärten Raumstruktur der BTL ist eine Voraussage sowohl der sterischen, wie der elektronischen Veränderungen im aktiven Zentrum nicht möglich und deshalb kann auch keine Aussage über die Orientierung der Assaysubstanzen im veränderten aktiven Zentrum der Lipasemutanten getroffen werden.

Die zu den Estern **13-16** analogen Carbonate **22-23** mit den Chromophoren 4-Nitrophenol und Resorufin wurden ebenfalls dargestellt. Diese sind Analoge zu NEPC mit einer länger-kettigen Alkylgruppe am Oxiranring statt eines Phenylrings bzw. mit Resorufin als chromophorer Gruppe.

Die Darstellung erfolgte auf zwei Synthesewegen. Im ersten Weg wurde von 1-Decen-3-ol (**10**) ausgegangen und durch Umsetzung mit Phosphortribromid in Pyridin 1-Brom-2-decen (**17**) in einer Ausbeute von 49% erhalten. Dieses ungesättigte Bromid wurde mit Natriumacetat in Eisessig in 95% Ausbeute zu Acetyl-2-decen-1-ol (**18**) umgesetzt. Dieser Ester wurde durch Erhitzen mit KOH-Lösung in 45% Ausbeute zu 2-Decen-1-ol (**19**) hydrolysiert. 2-Decen-1-ol (**19**) wurde dann mit *m*CPBA zu 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**) in 83% Ausbeute umgesetzt. Die Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**) über vier Stufen verlief mit einer Gesamtausbeute von 17%. Alternativ wurde die Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**) ausgehend von 2-Decenal und Epoxidierung mit H₂O₂ zu 2,3-Epoxy-1-decanal (**21**) durchgeführt und die Verbindung konnte in 27% Ausbeute erhalten werden. Die Reduktion des Aldehyds **21** mit NaBH₄ führte in 51% Ausbeute zu 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**). Über die zweistufige Darstellung konnte der Alkohol mit nur 14% Gesamtausbeute isoliert werden.

Das Glycidol **20** wurde mit 4-Nitrophenylchloroformiat zum 4-Nitrophenyl-carbonatester **22** (52% Ausbeute) und in Gegenwart von Triphosgen mit Resorufin zum Resorufincarbonatester **23** (48% Ausbeute) weiter umgesetzt. Die Synthesen sind in Abbildung 21 zusammengefaßt.

Die Epoxycarbonatchromophorester **22** und **23** wurden in Mikrotiterplatten von BTL-Wildtyp rasch gespalten. Hierzu wurden 1 mM Lösungen der Ester in *iso*-Propanol hergestellt und zusammen mit den Enzymlösungen in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Asp- und die Asp/Pro-Mutante der BTL zeigten keine Epoxidhydrolaseaktivität und wie erwartet keine Lipaseaktivität durch Spaltung an der Esterfunktion der Substrate.

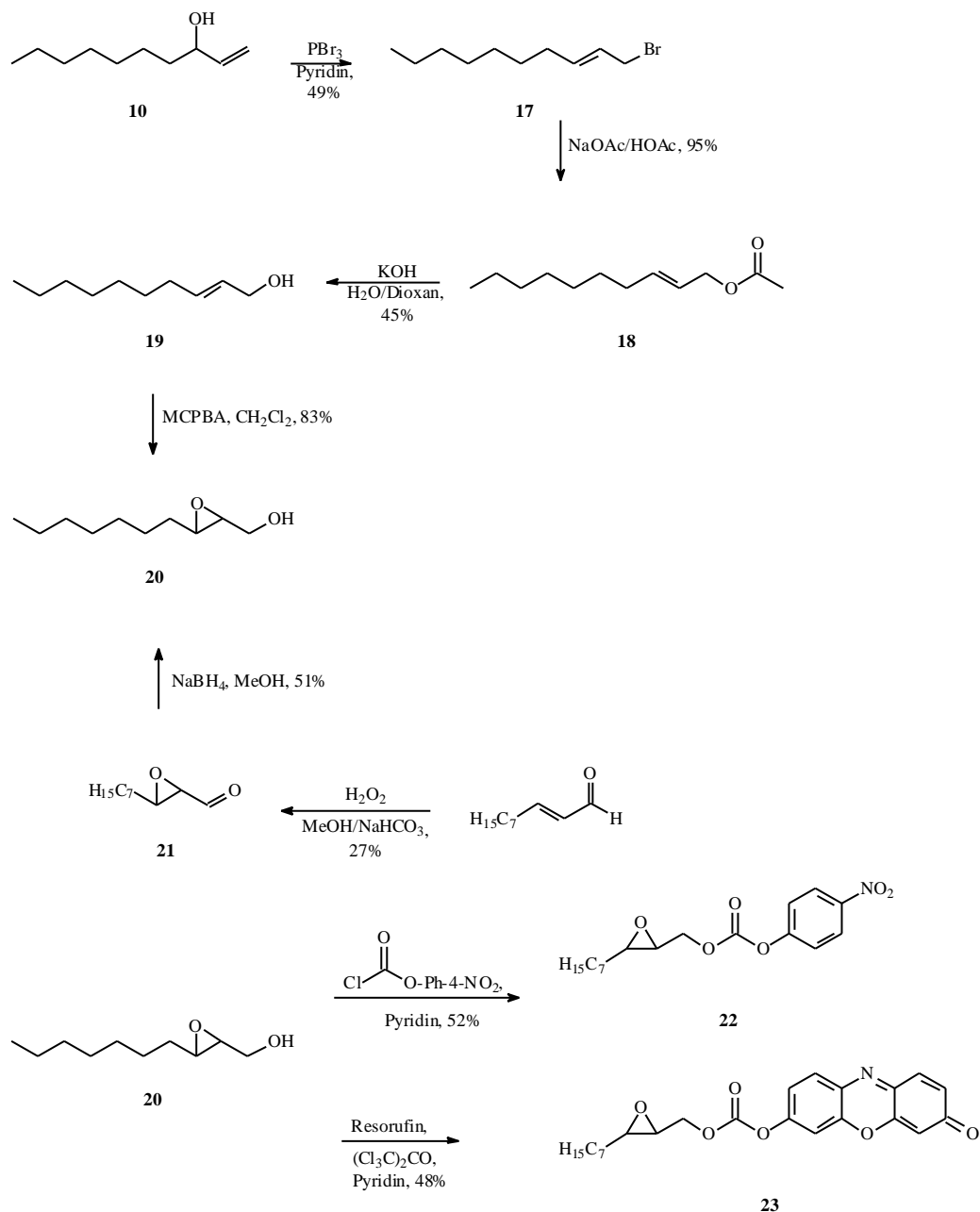


Abbildung 21: Darstellung von Epoxycarbonatchromophorestern.

3.4 Entwicklung eines Assaysystems zum direkten Screening auf Epoxide

Da bei der Verwendung von Chromophorestern nicht das eigentliche Zielsubstrat, sondern eine Modellverbindung umgesetzt wird, wurde ein Assay zur direkten Detektion der Spaltung von Epoxiden entwickelt.

In der Literatur dient meist substituiertes Styroloxid als Substrat für Epoxidhydrolasen [1,7-11]. Deshalb wurde untersucht, ob Styroloxid in das aktive Zentrum der BTL paßt und folglich auch für ein Screening auf Epoxidhydrolaseaktivität in einer Enzymbibliothek auf Basis dieser Lipase geeignet ist.

Da die Wildtypipase aufgrund ihres katalytischen Mechanismus nicht in der Lage ist, Styroloxid zu spalten, wurden möglichst ähnliche Substrate zuerst in einer Lipase-katalysierten Reaktion umgesetzt. Hierzu wurden 1-Phenylethanol und 1-Phenylpropanol verwendet, die eine ähnliche Größe wie Styroloxid besitzen und die Lipase-katalysierte Acylierung und Hydrolyse untersucht. Die Enantiomerenüberschüsse und der Umsatz der Reaktionen wurden über GC bestimmt.

Die BTL hydrolysiert Essigsäure-1-phenylethylester zu (*R*)-1-Phenylethanol mit hoher Enantioselektivität ($E > 150$) und acyliert 1-Phenylethanol in Toluol mit Vinylacetat und Vinylbutyrat zu den entsprechenden (*R*)-Eestern mit einer Enantioselektivität von über 150. Auch 1-Phenylpropanol wird mit Vinylacetat in Toluol durch BTL mit hoher Enantioselektivität zum (*R*)-Ester umgesetzt ($E > 150$). Der Verlauf der Biotransformationen mit der BTL ist in den Abbildungen 22-25 dargestellt.

Daraus läßt sich ableiten, daß Styroloxid in das aktive Zentrum der Enzymvarianten passen sollte und deshalb als Substrat zum Nachweis der Umwidmung der BTL geeignet ist.

Mit der Asp- und der Asp/Pro-Mutante der BTL wurden Umsetzungen mit Styroloxid durchgeführt. Dabei konnte keine enantioselektive enzymatische Spaltung des Epoxidrings beobachtet werden. Weitere rationale oder zufällige Mutationen sind deshalb notwendig, um zu einer Spaltung zu kommen.

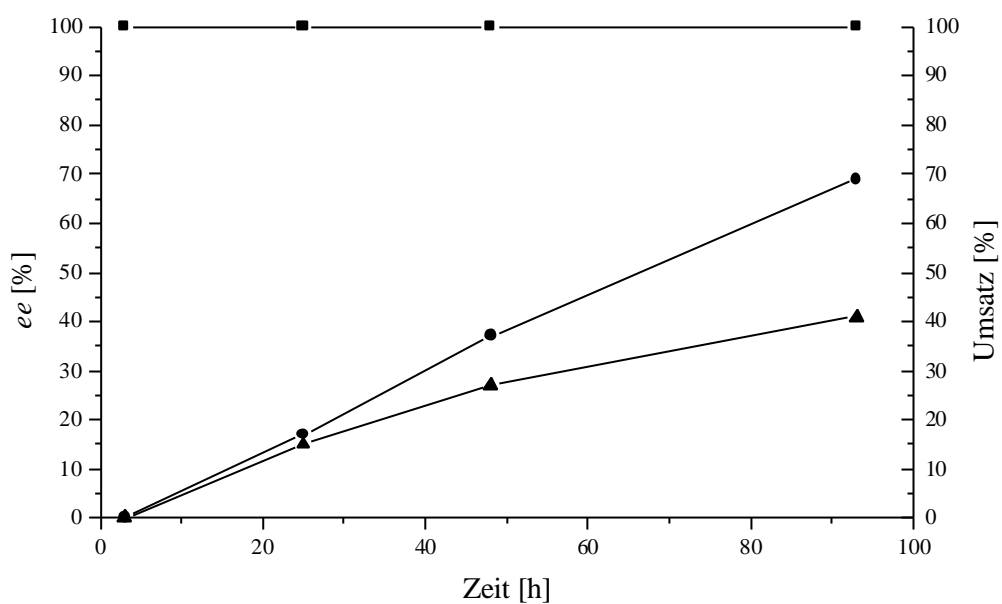


Abbildung 22: Hydrolyse von Essigsäure-1-phenylethylester mit BTL (■ 1-Phenylethanol, ● Essigsäure-1-phenylethylester, ▲ Umsatz).

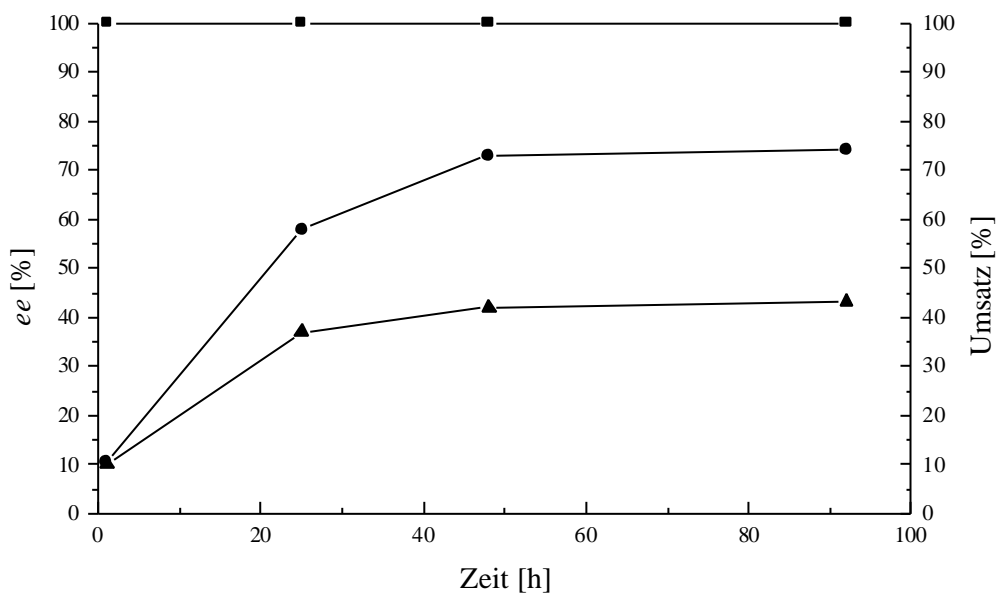


Abbildung 23: Acylierung von 1-Phenylethanol mit Vinylacetat durch BTL (● 1-Phenylethanol, ■ Essigsäure-1-phenylethylester, ▲ Umsatz).

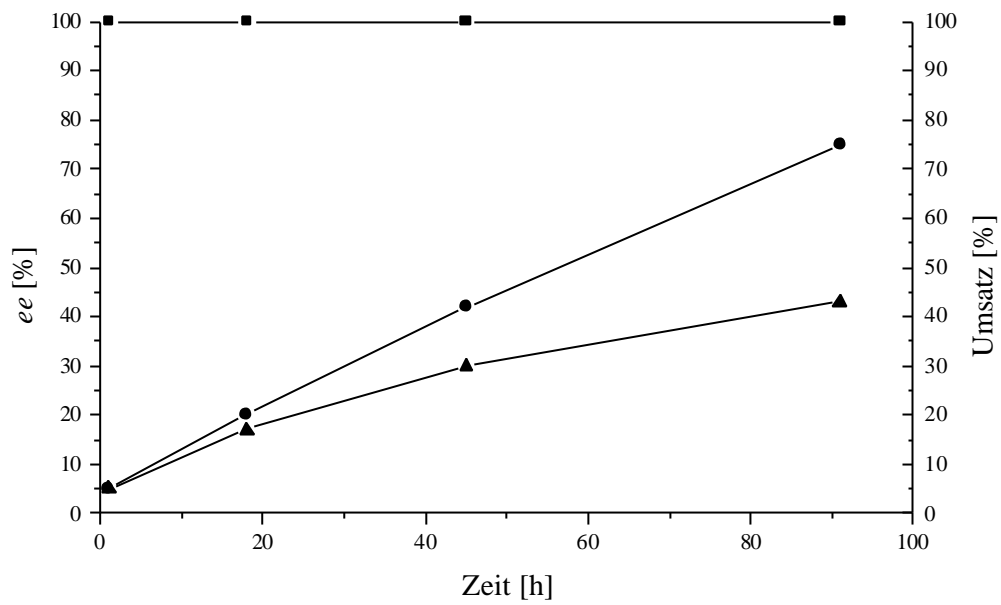


Abbildung 24: Acylierung von 1-Phenylethanol mit Vinylbutyrat durch BTL (● 1-Phenylethanol, ■ Buttersäure-1-phenylethylester, ▲ Umsatz).

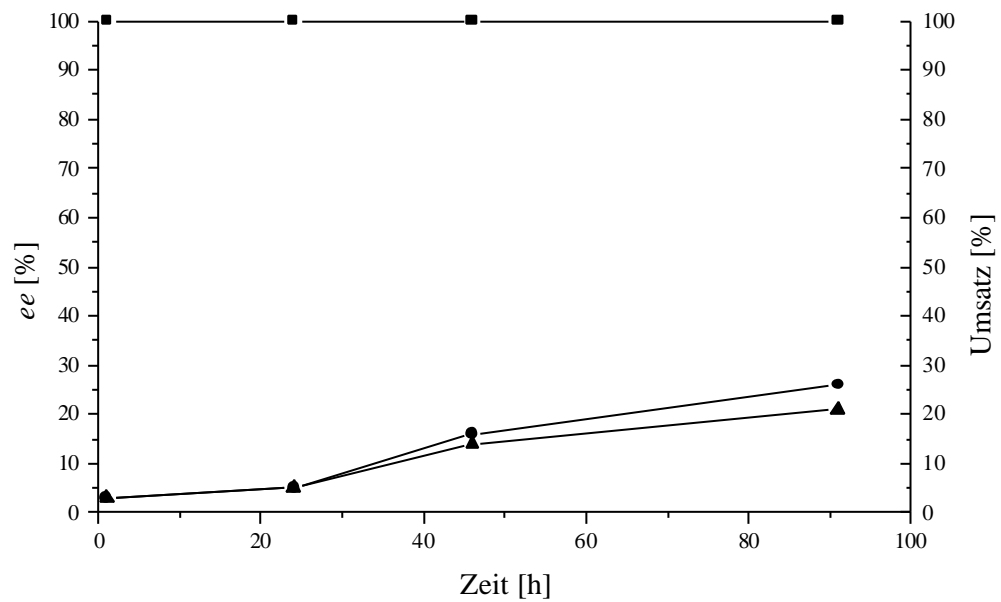


Abbildung 25: Acylierung von 1-Phenylpropanol mit Vinylacetat durch BTL (■ Essigsäure-1-phenylpropylester, ● 1-Phenylpropanol, ▲ Umsatz).

3.5 Entwicklung des NBP-Tests zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität im Hochdurchsatzscreening

3.5.1 Validierung des NBP-Tests in Mikrotiterplatten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein für ein Hochdurchsatzsystem geeigneter Assay auf Epoxidhydrolaseaktivität entwickelt werden. Da Styroloxid in das aktive Zentrum der BTL paßt, wurde ein Assay zum Nachweis der Spaltung von Styroloxid in Mikrotiterplatten durch eine Epoxidhydrolase entwickelt. Dieser Test sollte möglichst breit auch auf eine Vielzahl von anderen Epoxiden übertragbar und zum Screening von Enzymlibliotheken der BTL und der PFE geeignet sein.

Eine gemeinsame Eigenschaft von Epoxiden ist ihre Fähigkeit alkylierend zu wirken. Zur Messung von alkylierenden Substanzen wird häufig 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) verwendet. Diese Substanz reagiert in Gegenwart von alkylierenden Verbindungen zu einem wasserunlöslichen blauen Farbstoff, dessen Konstitution bisher ungeklärt ist (Abbildung 13).

Zum Nachweis der Alkylierung wurde die wäßrige Reaktionsmischung mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, das Reagenz zugegeben und die Mischung auf 75-110°C erhitzt. Die Absorption wurde bei 560 nm gemessen und dadurch eine Endpunktsbestimmung der Epoxidkonzentration durchgeführt [117]. Der blaue Farbstoff ist in Wasser unlöslich, deshalb kann ohne den Zusatz von Lösungsvermittlern keine homogene Lösung erhalten werden, deren Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Dieser sollte möglichst mit wenigen Pipettierschritten und ohne Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel auskommen. Auch die Inkubation sollte unter milden Bedingungen erfolgen.

Durch den Zusatz von Triethylglykoldimethylether als Lösungsvermittler zur Reaktionsmischung in der Mikrotiterplatte gelang es eine homogene Lösung zu erhalten, in der die Absorption des blauen Chromophors nach der enzymatischen Epoxidspaltung und Zugabe von NBP-Lösung gemessen werden konnte. Die Inkubation erfolgte bei 39°C ohne Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel.

Zur Validierung wurden neben Styroloxid (**24**) auch 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester (**25**), 1,2-Hexanoxid (**26**), 1,2-Decanoxid (**27**) und Indenoxid (**28**) verwendet. Diese Substrate stellen verschiedene Klassen von aromatisch- oder alkylsubstituierten Epoxiden dar (Abbildung 26).

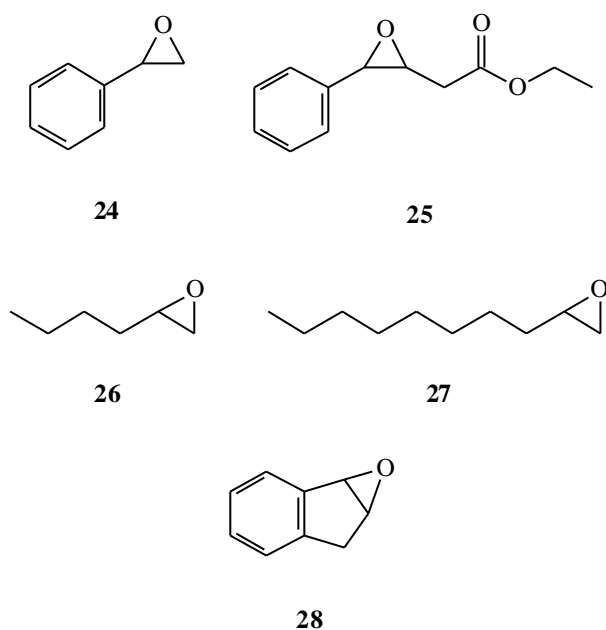


Abbildung 26: Epoxide zur Validierung des NBP-Assays.

Zur Validierung wurden Stammlösungen und eine Verdünnungsreihe aller Epoxide in Aceton angefertigt. Nach Zugabe des Epoxids in verschiedenen Konzentrationen zur wässrigen Reaktionsmischung (0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8 oder LB-Medium, ohne Enzym) in der Mikrotiterplatte wurde NBP-Lösung, eine Base und Triethylenglykoldimethylether als Lösungsvermittler zugegeben. Nach Inkubation bei 39°C wurde die Absorption bei 560 nm gegen 650 nm als Referenzwellenlänge gemessen und die Differenz der beiden Wellenlängen berechnet. Die Referenzwellenlänge wurde eingeführt, um Fremdeinflüsse, wie Inhomogenitäten oder Kratzer, in den verwendeten Mikrotiterplatten auszuschließen.

Für alle Epoxide, außer 1,2-Decanoxid, konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption und der Menge an vorhandenem Epoxid gefunden werden. Die beste Korrelation wurde in Gegenwart von Triethylamin oder ohne Base gefunden, mit Piperidin wurde eine Abnahme der Absorption beobachtet (Abbildungen 27-29). Obwohl Indenoxid die schnellste Reaktion zeigte, wurde der Assay für Styroloxid optimiert, da dieses Substrat für die verwendeten Enzymlibliotheken geeignet ist und eine leichte Nachprüfung der Resultate durch Gaschromatographie möglich war. Eine Korrelation zwischen der Abnahme der Styroloxidkonzentration und der Zunahme des Reaktionsproduktes Phenyl-1,2-ethandiol wurde durch gaschromatographische Analyse beobachtet.

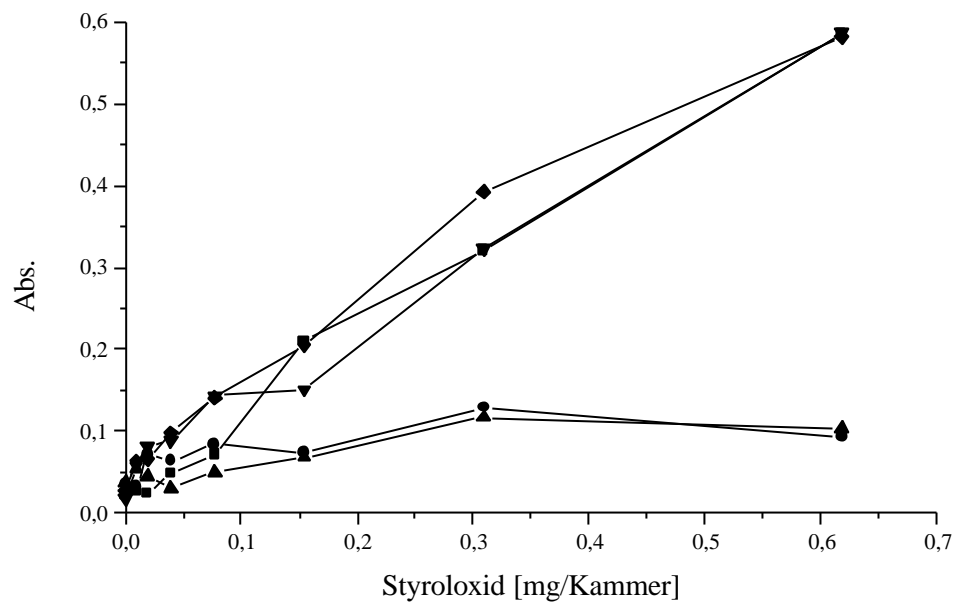


Abbildung 27: Inkubation von Styroloxid mit NBP und Lösungsvermittler in Natriumphosphatpuffer (60 min, 39°C) ohne Base (■), mit Piperidin (25 µl ▲, 50 µl ●) und in Gegenwart von Triethylamin (25 µl ◆, 50 µl ▼).

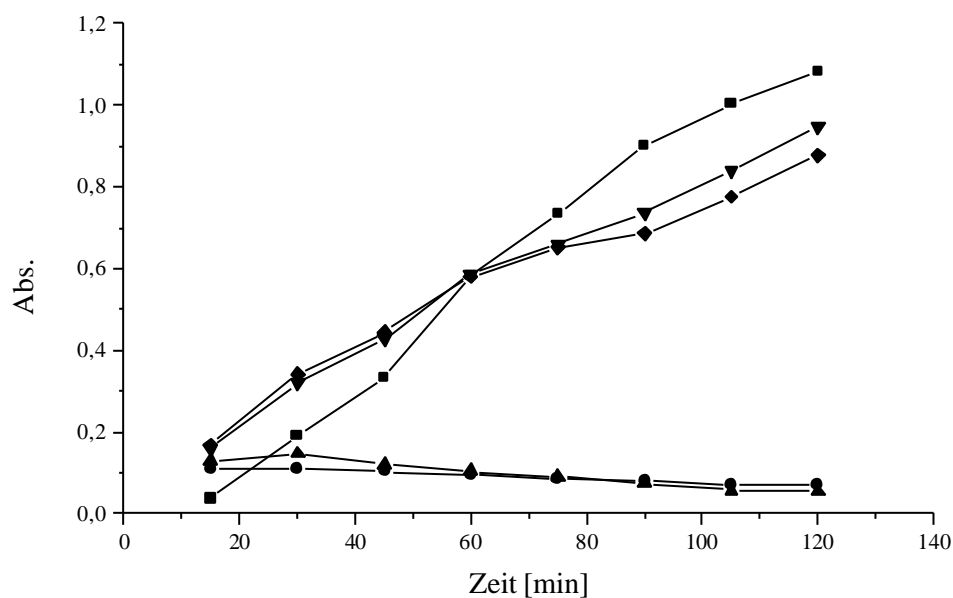


Abbildung 28: Einfluß der Reaktionszeit auf die Absorption im NBP-Test mit Styroloxid (39°C, 0,62 mg/Kammer) in Gegenwart von Piperidin (25 µl ▲, 50 µl ●), Triethylamin (25 µl ◆, 50 µl ▼) und ohne Base (■).

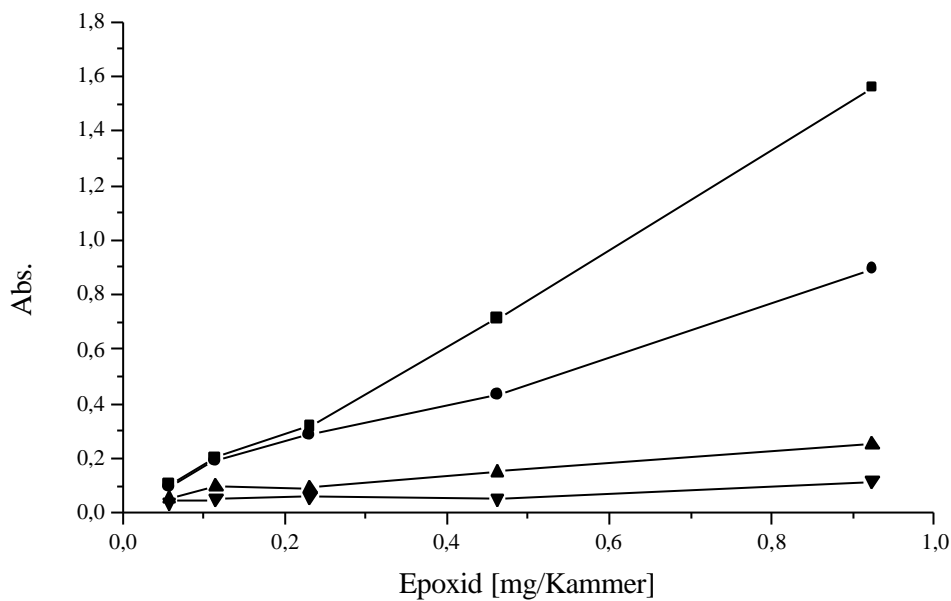


Abbildung 29: NBP-Assay mit verschiedenen Konzentrationen an Indenoxid (ohne Base ■, mit 50 µl Triethylamin ●) und an 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester (ohne Base ▲, mit 25 µl Triethylamin ▼) nach 60 min Inkubation bei 39°C.

Die Absorption von Reaktionsmischungen ohne und mit verschiedenen Styroloxidkonzentrationen in Gegenwart von *E. coli* DH5α-Zellen ohne Plasmid in LB-Medium wurde untersucht. *E. coli* besitzt keine Epoxidhydrolase und konnte deshalb als Blindprobe benutzt werden. Dadurch sollte überprüft werden, ob ganze Zellen oder Medium die Messung der Absorption stören. In Gegenwart von ganzen Zellen konnte nach 45 Minuten ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption und der Menge an Styroloxid gefunden werden. Der Fehler bei der Absorptionsmessung nach 45 Minuten betrug $\pm 3\%$ bei drei Kontrollexperimenten unter gleichen Bedingungen (Abbildung 30-31). Das Vorhandensein von ganzen Zellen in Nährmedium stört also die Bestimmung der Epoxidkonzentration nicht und das direkte Screening von Epoxidhydrolasevarianten und Epoxidhydrolase-exprimierenden Stämmen ist somit möglich.

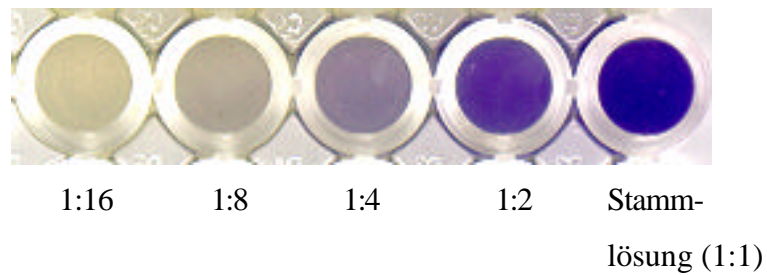


Abbildung 30: Mikrotiterplatte mit *E. coli* DH 5 α -Zellen ohne Plasmid mit verschiedenen Verdünnungen von Styroloxid in Aceton (0,17 M Stammlösung) nach 60 min Inkubation bei 39°C.

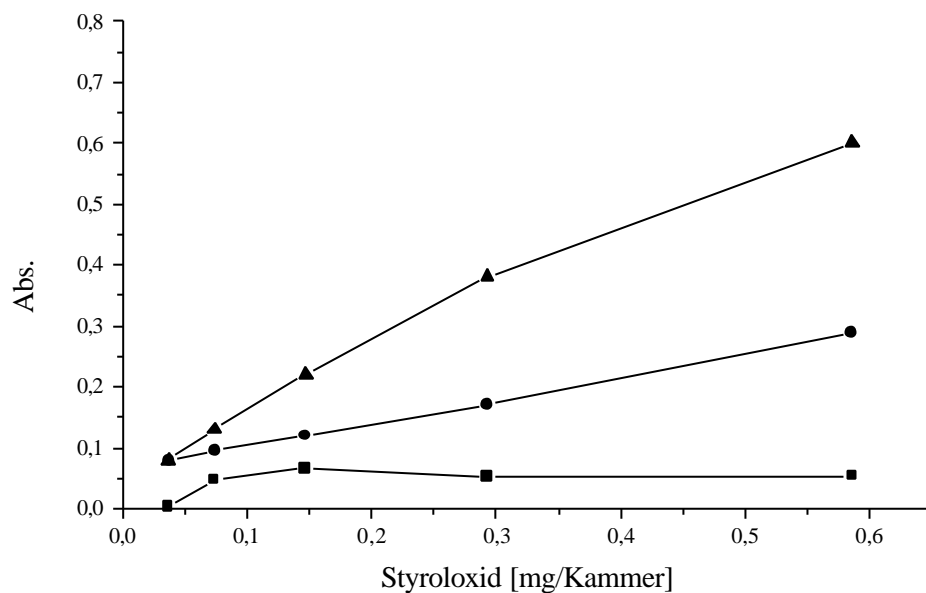


Abbildung 31: Absorption in Gegenwart von *E. coli* DH5 α ohne Plasmid nach dem NBP-Assay (●), ohne Zellen/NBP-Zugabe (■) und nach der Zell-Lyse/NBP-Zugabe (▲) mit verschiedenen Styroloxidkonzentrationen nach 45 min Inkubation bei 39°C.

Damit ist es unter diesen Bedingungen nicht notwendig mit organischem Lösungsmittel zu extrahieren oder die Reaktionsmischung durch Zentrifugation und Abnehmen des Überstands von den Zellen zu trennen.

Der Assay liefert ebenfalls zuverlässige Werte in Gegenwart von lysierten *E. coli* DH5 α -Zellen. Sogar in Gegenwart von Zellfragmenten und Lyseprodukten konnte eine

Proportionalität zwischen der Styroloxidkonzentration und der Absorption gefunden werden. Dies ermöglicht eine direkte Messung nach dem Zellaufschluß, ohne vorherige Entfernung von Zellfragmenten durch Zentrifugation, und vereinfacht so die Integration des Assays in eine Hochdurchsatzanlage. Auch der Einsatz von teuren Filtrationsplatten zur Klärung des Rohextrakts kann dadurch vermieden werden.

Der Assay wurde auch in Gegenwart von Zellsuspensionen verschiedener biokatalytisch aktiver Mikroorganismen durchgeführt. Hierzu wurde die enzymatische Hydrolyse von Styroloxid durch Stämme mit bekannter Epoxidhydrolaseaktivität, wie *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 und *Beauveria sulfurescens* ATCC7159, untersucht. Diese wurden hierzu in LB-Medium kultiviert und die Zellsuspension direkt für den NBP-Test verwendet. Nach zwei Stunden Inkubation dieser Mikroorganismen bei 39°C in Gegenwart von Styroloxidlösungen verschiedener Konzentration in Aceton/Natriumphosphatpuffer wurde der NBP-Assay durchgeführt. Epoxidhydrolaseaktivität konnte bei beiden Stämmen sogar in Reaktionsmischungen mit 33% oder 50% Aceton beobachtet werden (Abbildung 32).

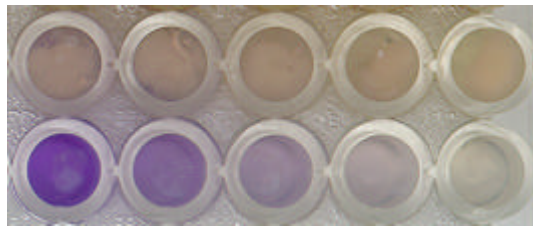


Abbildung 32: NBP-Assay nach enzymatischer Hydrolyse von Styroloxid durch *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 (obere Reihe), Kontrollreaktion ohne Zellen (untere Reihe).

3.5.2 Übertragung des NBP-Assays für Mutantenbibliotheken auf eine HTS-Anlage

Der Assay wurde auf einen Beckman 2000-Laborroboter mit Greifarm programmiert und dort validiert. Hierzu wurden die Varianten der BTL bzw. der PFE in *E. coli* in Mikrotiterplatten mit LB-Medium kultiviert. Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen in Mikrotiterplatten mit dem Pipettierroboter angelegt. Die Expression der Varianten erfolgte im Fall der BTL-Enzymbibliothek durch Induktion des λ -Promotors bzw. bei der PFE-Enzymbibliothek durch Induktion des Rhamnose-Promotors. Der Zellaufschluß von 150 μ l Kulturen wurde durch Einfrieren und Auftauen der Mikrotiterplatten und Zugabe von 50 μ l Lysepuffer bei 10°C für eine Stunde durchgeführt. Der Rohextrakt nach der Zelllyse wurde auf vier weitere Kammern

einer neuen Mikrotiterplatte verteilt. Dann wurde 100 μ l Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0) und 50 μ l Epoxidlösung in vier verschiedenen Konzentrationen in Aceton zugegeben. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37°C vier Stunden inkubiert und anschließend der NBP-Assay durch Zugabe von 50 μ l NBP-Lösung (5% (w/v) in Methoxyethanol), 50 μ l Triethylamin und 50 μ l Triethylenglykoldimethylether durchgeführt. Alle Inkubationsschritte fanden bei 39°C statt. Die Inkubation und die Absorptionsmessung nach 45 Minuten erfolgten in der HTS-Anlage. Dadurch war die Durchmusterung von 500 Varianten in 20 Mikrotiterplatten auf Epoxidhydrolaseaktivität pro Tag möglich.

3.6 Untersuchung von *Streptomyces*-Stämmen mit dem NBP-Assay

Aus der Familie der *Streptomyces* waren bisher Epoxidasen, die Olefine zu Epoxiden umsetzen können, wie z.B. die Dihydroxyacetanilidepoxidase aus *Streptomyces* LL-C10037 bekannt. Dieses Enzym stellt das Schlüsselenzym der Biosynthese des Epoxysemiquinonantibiotikums LL-C10037 α dar [154].

Die Epoxidierung von Nanaomycin A durch eine Monooxygenase zu Nanaomycin E mit nachfolgender reduktiver Ringöffnung durch eine Synthetase unter Verbrauch von NAD(P)H, wurde bei der Biosynthese von Nanaomycin B durch *Streptomyces rosa* var. *notoensis* nachgewiesen [155].

Bisher waren keine Epoxidhydrolasen aus der Familie der *Streptomyces* bekannt. Mit Hilfe des NBP-Assays wurde innerhalb der *Streptomyces*-Stammsammlung der Universität Tübingen (Prof. Zähler bzw. Prof. Wohlleben), der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ) und der American Type Culture Collection (ATCC) nach neuen Epoxidhydrolaseaktivitäten gesucht. Bei der Auswahl der Stämme wurden besonders solche berücksichtigt, bei denen bereits am ITB Hydroxylierungsaktivität gegenüber α - und β -Ionon durch P450-Systeme gefunden worden war, da Epoxidhydrolaseaktivität oft zusammen mit P450-Systemen vorhanden ist [144]. Dazu wurden verschiedene *Streptomyces*-Stämme im Schüttelkolben kultiviert und in der Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Epoxiden umgesetzt. Der NBP-Test wurde in Gegenwart ganzer Zellen mit 1,2-Hexanoxid, Indenoxid, Styroloxid und 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester durchgeführt. Dabei konnten *Streptomyces*-Stämme identifiziert werden, welche diese Epoxide spalten. Bei dem Substrat 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester ist allerdings zu beachten, daß diese Verbindung auch durch Esterasen oder Lipasen gespalten werden kann.

In Abbildung 33 ist die Umsetzung von Indenoxid durch drei *Streptomyces*-Stämme und in Abbildung 34 die Hydrolyse von Styroloxid in Gegenwart verschiedener Stämme gezeigt.

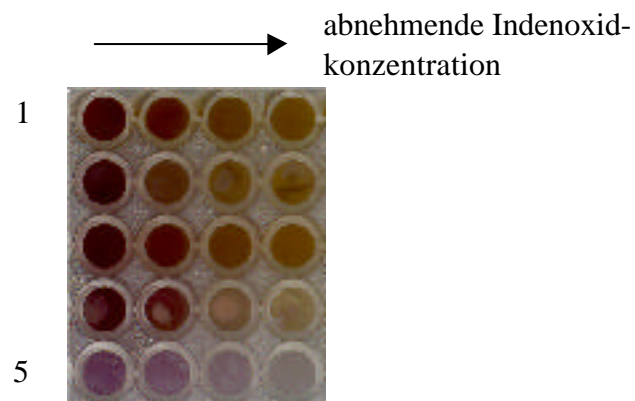


Abbildung 33: NBP-Assay mit Indenoxid (Reihe 1 *Streptomyces antibioticus* Tü4, Reihe 2 *Streptomyces arenae* Tü495, Reihe 3 *Streptomyces fradiae* Tü27, Reihe 4 *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 als Vergleich, Reihe 5 Blindprobe ohne Epoxidhydrolase).

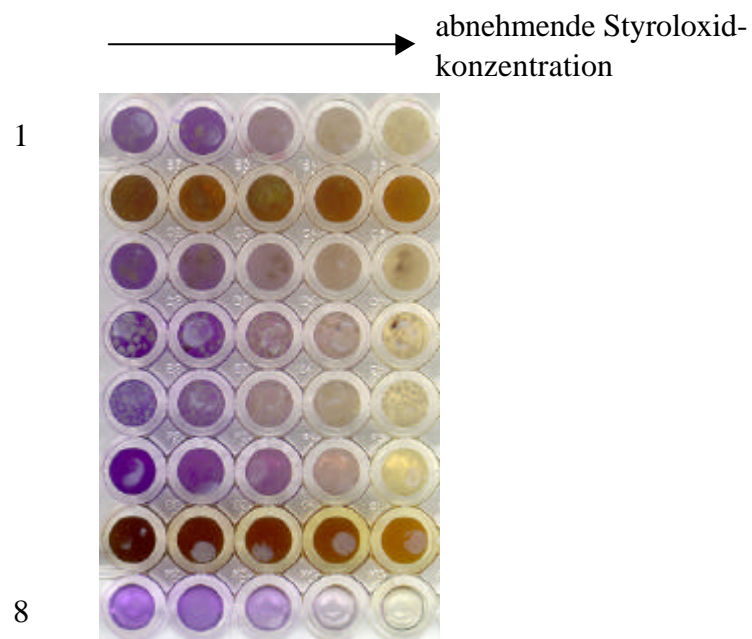


Abbildung 34: NBP-Assay mit Styroloxid (Reihe 1 *Streptomyces griseoviridis* Tü1963, Reihe 2 *Streptomyces antibioticus* Tü4, Reihe 3 *Streptomyces arenae* Tü495, Reihe 4 *Streptomyces exofolius* Tü1424, Reihe 5 *Streptomyces griseus* Tü16, Reihe 6 *Streptomyces griseus* ATCC13273, Reihe 7 *Streptomyces fradiae* Tü27, Reihe 8 Blindprobe ohne Epoxidhydrolase).

Durch den NBP-Assay konnten erstmals mehrere Epoxidhydrolasen in der Familie der *Streptomyceten* gefunden werden, deren Eignung als Biokatalysator weiter untersucht wurde (Tabelle 3).

Epoxid	Stamm
1,2-Hexanoxid	<i>S. griseus</i> DSM40236
2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester	<i>S. antibioticus</i> Tü4, <i>S. arenae</i> Tü495, <i>S. fradiae</i> Tü27, <i>S. griseus</i> DSM40236
Indenoxid	<i>S. antibioticus</i> Tü4, <i>S. arenae</i> Tü495, <i>S. fradiae</i> Tü27
Styroloxid	<i>S. antibioticus</i> Tü4, <i>S. fradiae</i> Tü27, <i>S. arenae</i> Tü495

Tabelle 3: *Streptomyceten*-Stämme mit Epoxidhydrolaseaktivität im NBP-Test.

3.7 Fermentation von *Streptomyces antibioticus* Tü4 und Biotransformationen mit *Streptomyceten*-Stämmen

Die höchste Epoxidhydrolaseaktivität im NBP-Test zeigte der Stamm *Streptomyces antibioticus* Tü4. Dieser Stamm wurde deshalb für quantitative Umsetzungen neben zwei weiteren *Streptomyceten*-Stämmen (*S. arenae* Tü495, *S. fradiae* Tü27) untersucht.

Um eine größere Menge an Epoxidhydrolase zur Proteinaufreinigung und für Biotransformationen zur Verfügung zu haben, wurde der Stamm *Streptomyces antibioticus* Tü4 im 30 L-Maßstab in Malzmedium im Fed-Batch-Verfahren bei 30°C kultiviert. Dabei konnten 318 g Biofeuchtmasse nach 24 Stunden Fermentation erhalten werden.

Die Biotransformationen wurden mit 1,2-Decanoxid, 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester und Styroloxid durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Stämme *S. fradiae* Tü27 und *S. arenae* Tü495 verwendet, die ebenfalls eine - allerdings geringere - Epoxidhydrolaseaktivität im NBP-Assay gezeigt hatten.

Die Biotransformationen wurden in 2 ml und in 250 ml Volumen durchgeführt. Die Umsetzungen erfolgten mit 0,2% (v/v) Epoxid in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) bei 30°C. Die Enantiomerenüberschüsse wurden über GC nach Extraktion mit Diethylether bzw.

Essigsäureethylester bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Racematspaltung von Styroloxid in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) durch Rohextrakt von *Streptomyces antibioticus* Tü4 ist in Abbildung 35 dargestellt.

Bei dieser Umsetzung in 2 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) konnte (*R*)-Styroloxid mit 91% *ee* und (*S*)-Phenyl-1,2-diol mit 21% *ee* nach sieben Stunden bei 80% Umsatz erhalten werden.

Im 250 ml-Maßstab konnte (*R*)-Styroloxid mit 82% *ee* und (*S*)-Phenyl-1,2-diol mit 72% *ee* bei 55% Umsatz (*E*=13) nach 24 Stunden Reaktionszeit, Extraktion der Reaktionsmischung mit Essigsäureethylester und Säulenchromatographie isoliert werden.

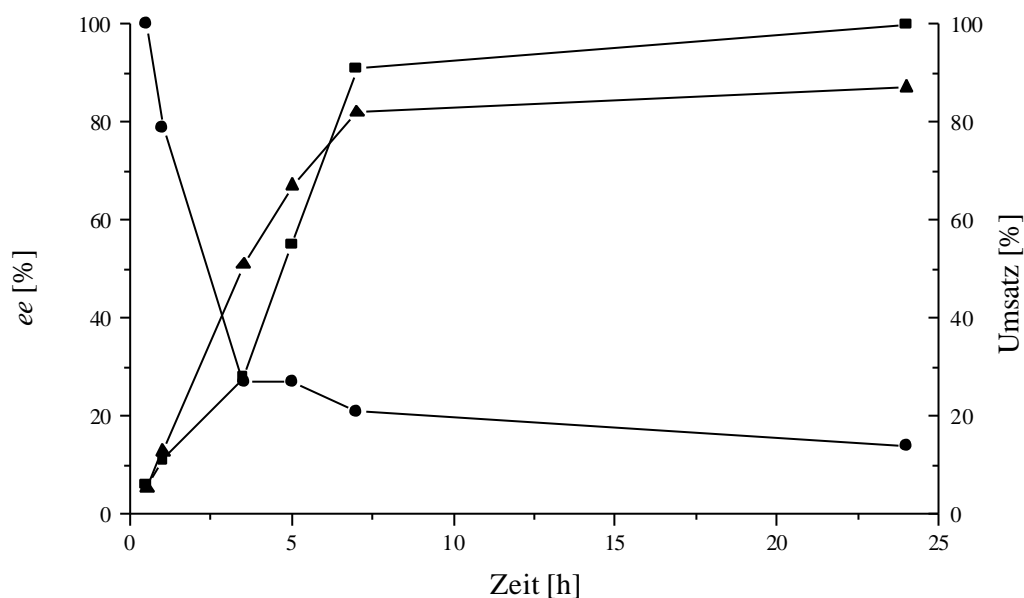


Abbildung 35: Racematspaltung von Styroloxid durch Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 (Rohextrakt mit 5% (v/v) DMSO, ■ % *ee* (Styroloxid), ● % *ee* (Phenyl-1,2-diol), ▲ % Umsatz).

Die verwendeten Epoxide sind in Wasser kaum löslich. Dies kann die enzymatische Reaktion behindern. Deshalb wurde der Einfluß von Cosolventien auf die Enzymstabilität und die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht. Hierzu wurden Umsetzungen von Styroloxid mit ganzen Zellen oder Rohextrakt in Gegenwart von Aceton, *N,N*-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Ethanol als Lösungsvermittler durchgeführt. Der Einfluß des Cosolvents bei Umsetzungen mit ganzen Zellen unterschied sich nicht von Umsetzungen mit

Rohextrakt. Wie in Abbildung 36 für ganze Zellen dargestellt, konnte durch Zusatz von 10% (v/v) DMSO nach 24 Stunden (*R*)-Styroloxid mit über 99% *ee* erhalten werden. Der Zusatz von 5% (v/v) Aceton führte zu einer Erhöhung des Enantiomerenüberschusses von 58 auf 85% *ee*. Durch den Zusatz von DMF zwischen 1-3% (v/v) kam es zu einem Anstieg des Enantiomerenüberschusses, allerdings konnte mit steigender DMF-Konzentration eine starke Abnahme des Enantiomerenüberschusses beobachtet werden. Vermutlich bewirkt eine höhere Konzentration die Denaturierung der Epoxidhydrolase.

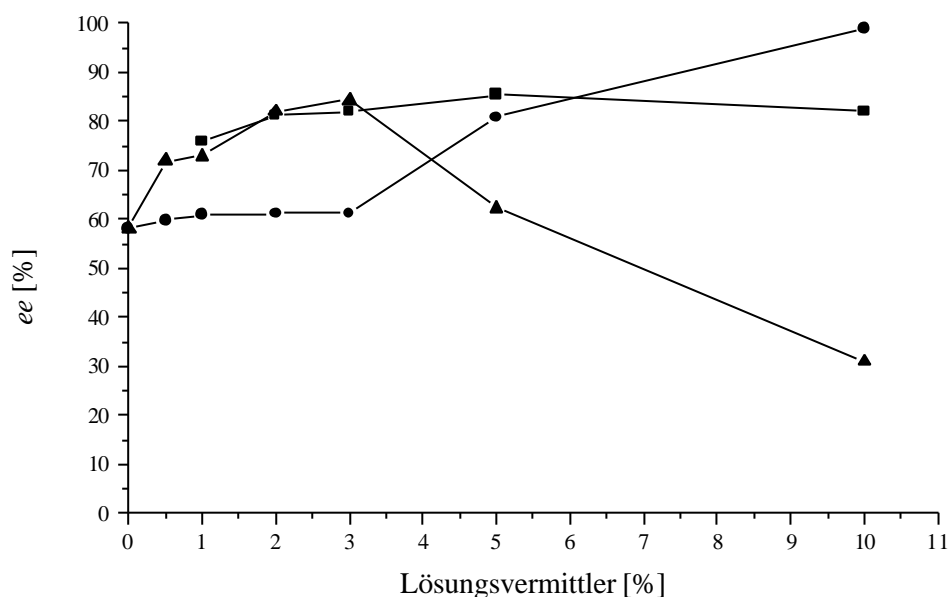


Abbildung 36: Einfluß des Cosolvents auf den Enantiomerenüberschuß an Styroloxid in Gegenwart von *Streptomyces antibioticus* Tü4 nach 24 Stunden Reaktion in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) bei 30°C (■ Aceton, ● DMSO, ▲ DMF).

Mit 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester konnte nach zweieinhalb Stunden in 250 ml Volumen und 15% Ethanol als Cosolvent ein Enantiomerenüberschuß von 81% *ee* des Edukts erreicht werden (Tabelle 4). Allerdings ist dabei zu beachten, daß der Stamm *Streptomyces antibioticus* Tü4 auch über eine Esteraseaktivität verfügt, und die Racematspaltung deshalb nicht nur über die Spaltung des Epoxids, sondern zusätzlich auch über eine enantioselektive Spaltung an der Estergruppe erfolgen kann.

Bei der Umsetzung von 1,2-Decanoxid konnte nach 17 Stunden das Produkt (*R*)-1,2-Decandiol nach Derivatisierung mit Aceton zum Acetonid mit 33% *ee* isoliert werden.

Zeit [Std.]	ee_{Substrat} [%]
0,5	18
1	72
2,5	81

Tabelle 4: Racematspaltung von 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester durch *Streptomyces antibioticus* Tü4.

Die Stämme *Streptomyces fradiae* Tü27 und *Streptomyces griseolus* Tü495 wurden ebenfalls mit 0,2% (v/v) Styroloxid in Gegenwart von 10% (v/v) DMSO in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8) umgesetzt. Diese zeigten allerdings nur eine geringe Enantioselektivität ($E \approx 3-4$, Tabelle 5).

Stamm	$ee_{\text{Styroloxid}}$ [%]	ee_{Diol} [%]	Umsatz [%]	Zeit [Std.]
<i>S. fradiae</i> Tü27	6	28	18	24
	70	23	75	48
<i>S. arenae</i> Tü495	52	38	60	24
	70	13	85	48

Tabelle 5: Racematspaltung von Styroloxid mit *Streptomyces fradiae* Tü27 und *Streptomyces arenae* Tü495.

3.8 Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 mit Hilfe des NBP-Tests

3.8.1 Anpassung des NBP-Assays für die Aufreinigung

Die Biotransformationen mit der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 sollten auch mit aufgereinigtem Enzym durchgeführt werden, da oftmals das aufgereinigte Enzym andere biokatalytische Eigenschaften als der Proteinrohextrakt besitzt.

Zur Überwachung der Aufreinigung kann ebenfalls der NBP-Test verwendet werden. Mit Hilfe dieses Tests können Fraktionen aus der Proteinaufreinigung rasch auf Aktivität in Mikrotiterplatten durchsucht werden. Die Verwendung eines Pipettierroboters ermöglicht die schnelle Untersuchung aller Fraktionen einer Proteinaufreinigung innerhalb von ungefähr vier Stunden gegenüber der langwierigen Probenvorbereitung und Messung aller einzelnen Fraktionen mit Hilfe der GC. Hierzu mußte geklärt werden, ob der Assay auch in der Lage ist, nur sehr geringe Enzymaktivitäten zu detektieren. Um die Detektionsgrenze der Epoxidhydrolaseaktivität im NBP-Assay zu ermitteln, wurde deshalb eine Verdünnungsreihe des Rohextrakts von *Streptomyces antibioticus* Tü4 in TE-Puffer (pH 8) angefertigt. Die Detektionsgrenze nach einer Stunde Reaktion mit Styroloxid und 40 Minuten Assayentwicklung lag bei einer Verdünnung des Rohextrakts von 1:10 auf 150 µl Reaktionsvolumen (Abbildung 37).

Mit Hilfe des NBP-Assays kann also die Aufreinigung einer Epoxidhydrolase im Mikrotiterplattenformat schnell verfolgt werden. Auch die Probenvorbereitung ist gegenüber der GC vereinfacht, da kein Extraktionsschritt mit einem organischen Lösungsmittel notwendig ist.

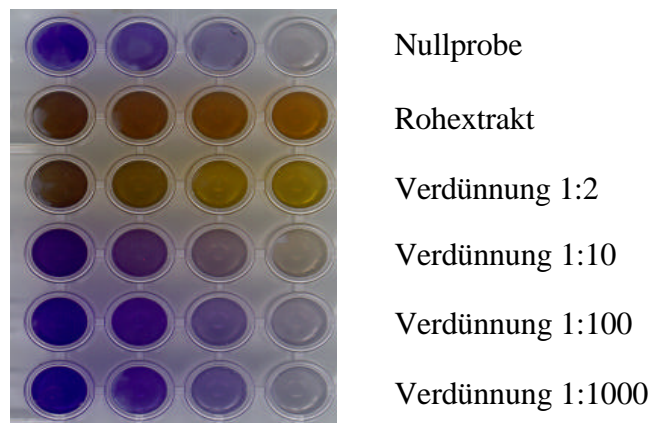


Abbildung 37: Verdünnungsreihe zur Anpassung des NBP-Tests für Proteinaufreinigungen von Epoxidhydrolasen.

3.8.2 Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 mit Hilfe der FPLC

Die Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 wurde mit dem ÄKTAexplorer-System durch FPLC aufgereinigt. Als erster Aufreinigungsschritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie („ion exchange chromatography“, IEC) unter Verwendung eines linearen NaCl-Gradienten und Toyopearl DEAE-650 M bzw. Super Q 650 M als Säulenmaterial durchgeführt. Dabei zeigte Super Q 650 M die bessere Auftrennung der Proteine und die Aufreinigung wurde deshalb für diesen Anionentauscher optimiert. Dazu wurde ein Stufengradient entwickelt: die Epoxidhydrolase wurde bei 260 mM NaCl in einer Fraktion eluiert. In dieser Fraktion konnte durch Absorptionmessung bei 417 nm auch das Vorhandensein von Protein mit einer Häm-Gruppe, wie z.B. einer P450-Monooxygenase, nachgewiesen werden (Abbildung 38).

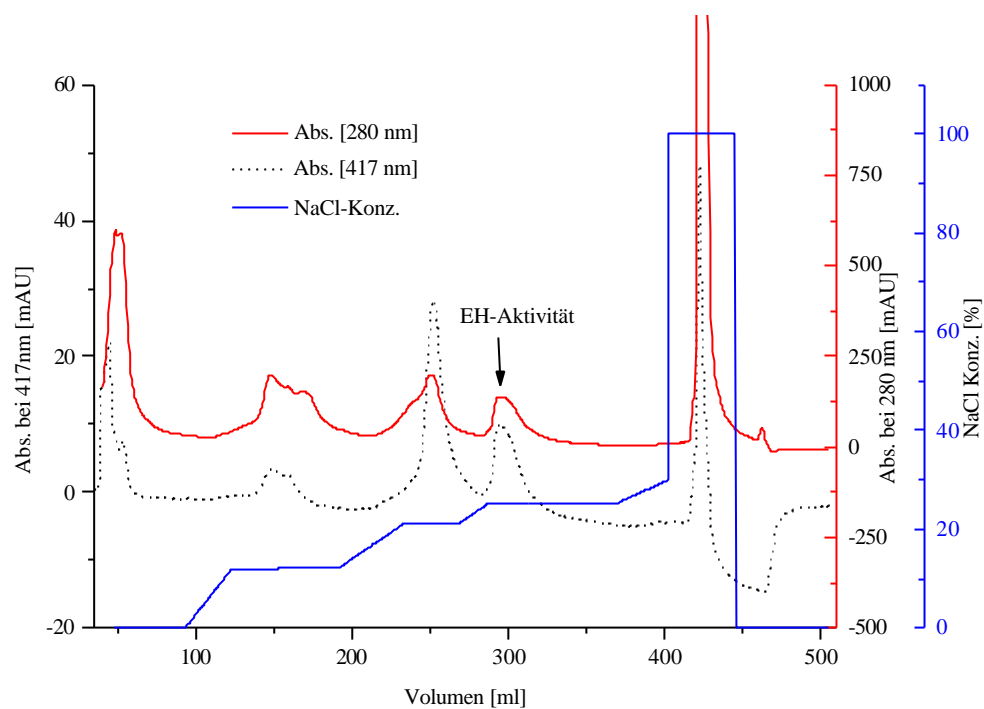


Abbildung 38: Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 mit dem Anionentauscher Toyopearl Super Q 650 M.

Die Epoxidhydrolaseaktivität wurde mit dem NBP-Assay dieser Fraktion zugeordnet (Abbildung 39). Zur Verifikation des NBP-Tests wurden präparative Umsetzungen mit verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung in 2 ml Volumen mit Styroloxid durchgeführt und diese gaschromatographisch nach Extraktion untersucht. Dabei wurde eine völlige Übereinstimmung mit dem NBP-Assay in Mikrotiterplatten gefunden. Dies zeigt, daß der NBP-Assay als schnelle Analyseverfahren zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität in der Proteinaufreinigung ausgezeichnet geeignet ist.

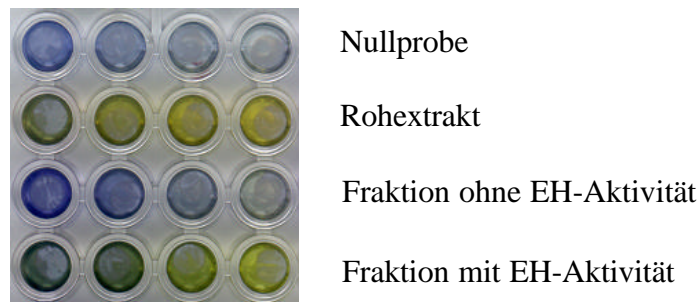


Abbildung 39: NBP-Test bei der Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4.

In der Fraktion mit Epoxidhydrolaseaktivität aus der Anionenaustauschchromatographie mit Super Q 650 M konnte durch den *p*NPA-Test auch Esteraseaktivität gefunden. Beim *p*NPA-Test wird die Esterase-katalysierte Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol und Essigsäure zum Nachweis von Esteraktivität benutzt. Die Detektion der Enzymaktivität erfolgt dabei durch die Freisetzung von *p*-Nitrophenol, welche über die Zeit photometrisch verfolgt wird. Diese Aktivität konnte durch ein Zymogramm einer Bande bei ca. 40 kDa zugeordnet werden (Abbildung 40).

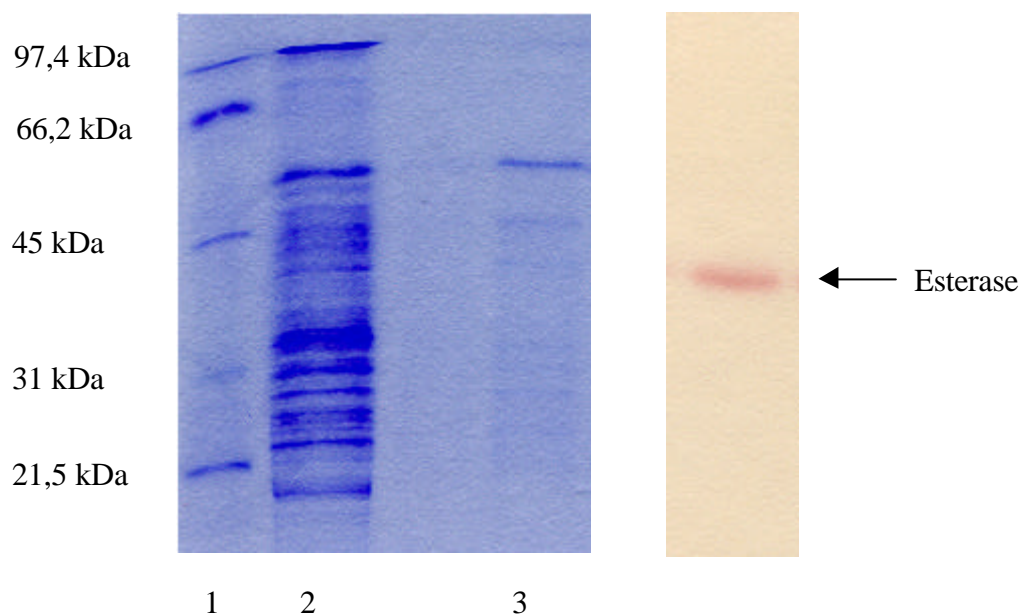


Abbildung 40: SDS-Gel (links, Bahn 1: Marker, Bahn 2: Rohextrakt, Bahn 3: Aufreinigung) und Zymogramm (rechts) der Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 mit dem Anionentauscher Toyopearl Super Q 650 M.

Die Fraktion mit Epoxidhydrolaseaktivität sollte durch weitere Reinigungsschritte aufgereinigt werden. Dazu wurden Aufreinigungen an verschiedenen hydrophoben Matrizes („hydrophobic interaction chromatography“, HIC), an Hydroxylapatit als adsorptive Matrix, welche oftmals eine gute Ergänzung zur Ionenaustausch- oder Gelchromatographie darstellt, und eine Gelfiltration durchgeführt.

Bei der hydrophoben Interaktionschromatographie wurden verschiedene substituierte Phenyl-, Butyl- und Octyl-Sepharosen verwendet und die Aufreinigung in Gegenwart unterschiedlicher Salze (NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) durchgeführt. Die Bindung bei verschiedenen pH-Werten (pH 6-9) wurde dabei untersucht. Es konnte keine Bindung an eine Matrix beobachtet werden: das gesamte Protein wurde bereits bei maximaler Salzkonzentration wieder eluiert. Dadurch konnte keine weitere Aufreinigung erreicht werden. Auch bei der Verwendung von Hydroxylapatit oder durch Gelfiltration konnte keine weitere Reinigung der Epoxidhydrolase erzielt werden, da die Epoxidhydrolase zusammen mit den anderen Proteinen eluiert wurde. Zu beachten ist hierbei, daß im Gegensatz zur IEC bei diesen Methoden auch keine Aufkonzentrierung des Proteins auftritt, d.h. die Volumenaktivität abnimmt.

Die Proteine der Aufreinigung wurden über einen Western-Blot auf eine PVDF-Membran übertragen und die Hauptbanden bei 32, 36, 38 und 40 kDa N-terminal sequenziert. Dabei konnte nach Suche in der Swiss-Prot-Datenbank keine Proteinsequenz für das Protein bei 32 kDa erhalten werden, die zu einer bekannten Epoxidhydrolase homolog ist. Die Proteine mit 36 und 38 kDa besaßen eine hohe Homologie zu einer Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus *Streptomyces aureofaciens*. Das Protein mit Esteraseaktivität im Zymogramm und 40 kDa Molekulargewicht zeigte eine Homologie in der Aminosäuresequenz zur Schweineleberesterase.

3.9 Umwidmung einer Esterase in eine Epoxidhydrolase

Die Esterase PFE besitzt eine Sequenzidentität von 27% der Aminosäuren zur Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. C12 [66]. Deshalb wurde versucht diese Esterase, welche auch Bromoperoxidaseaktivität zeigt, durch gerichtete Evolution in eine Epoxidhydrolase umzuwidmen. Die katalytische Triade der PFE wurde über Homologiebetrachtung mit verschiedenen bakteriellen Haloperoxidasen den Aminosäuren

Ser₉₅, Asp₂₂₃ und His₂₅₂ zugeordnet [64]. Für die S95D-Mutante (Asp-Mutante) wurde das Ser₉₅ gegen Asparaginsäure ausgetauscht, da Epoxidhydrolasen über die Aminosäure Asparaginsäure statt Serin im aktiven Zentrum verfügen, und dieses Gen dann als Ausgangsgen für die Umwidmung der Esterase in eine Epoxidhydrolase benutzt werden kann. Ein Computer-Modelling der Struktur der PFE und der Asp-Mutante auf der Basis der bekannten Struktur der Haloperoxidase aus *Streptomyces aureofaciens* ATCC10762 [156] wurde durch Homologiebetrachtung erstellt (Abbildung 41).

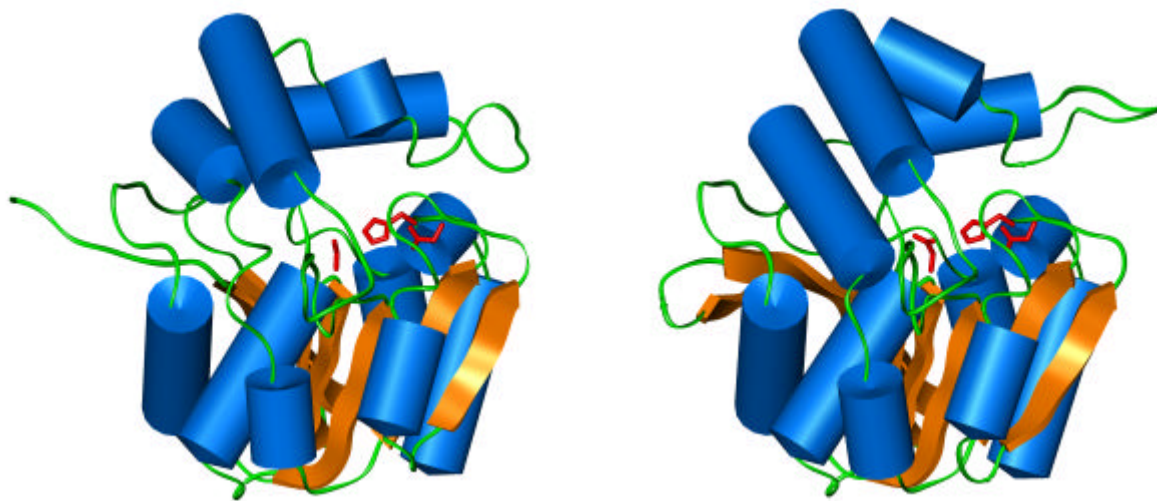


Abbildung 41: Homologie-Modelling der Struktur der PFE (links) und der Asp-Mutante S95D (rechts) auf der Basis einer Haloperoxidase-Struktur. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind in Rot hervorgehoben.

3.9.1 Herstellung der PFE Asp-Mutante

Die Punktmutation S95D wurde durch PCR-Reaktion in das PFE-Gen eingeführt und eine *SmaI*-/*BamHI*-Restriktionsschnittstelle an den Enden des Gens erzeugt. Zur Einführung der Mutation wurde die „Drei-Primer-Methode“ verwendet. Hierbei können spezifisch Nukleotide ausgetauscht werden. Das Genprodukt mit der S95D-Mutation wurde mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *BamHI* geschnitten und in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pUC18 kloniert. Dadurch wurde der Vektor pUC18 PFE Asp erhalten (Abbildung 42).

Der Vektor pUC18 PFE Asp wurde dann mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Das geschnittene mutierte Esterasegen wurde dann in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pJOE 2792.1 zurückkloniert, um den Vektor pJOE2792.1 PFE Asp zu erhalten (Abbildung 43). Die Verifizierung der Mutation erfolgte durch Sequenzierung.

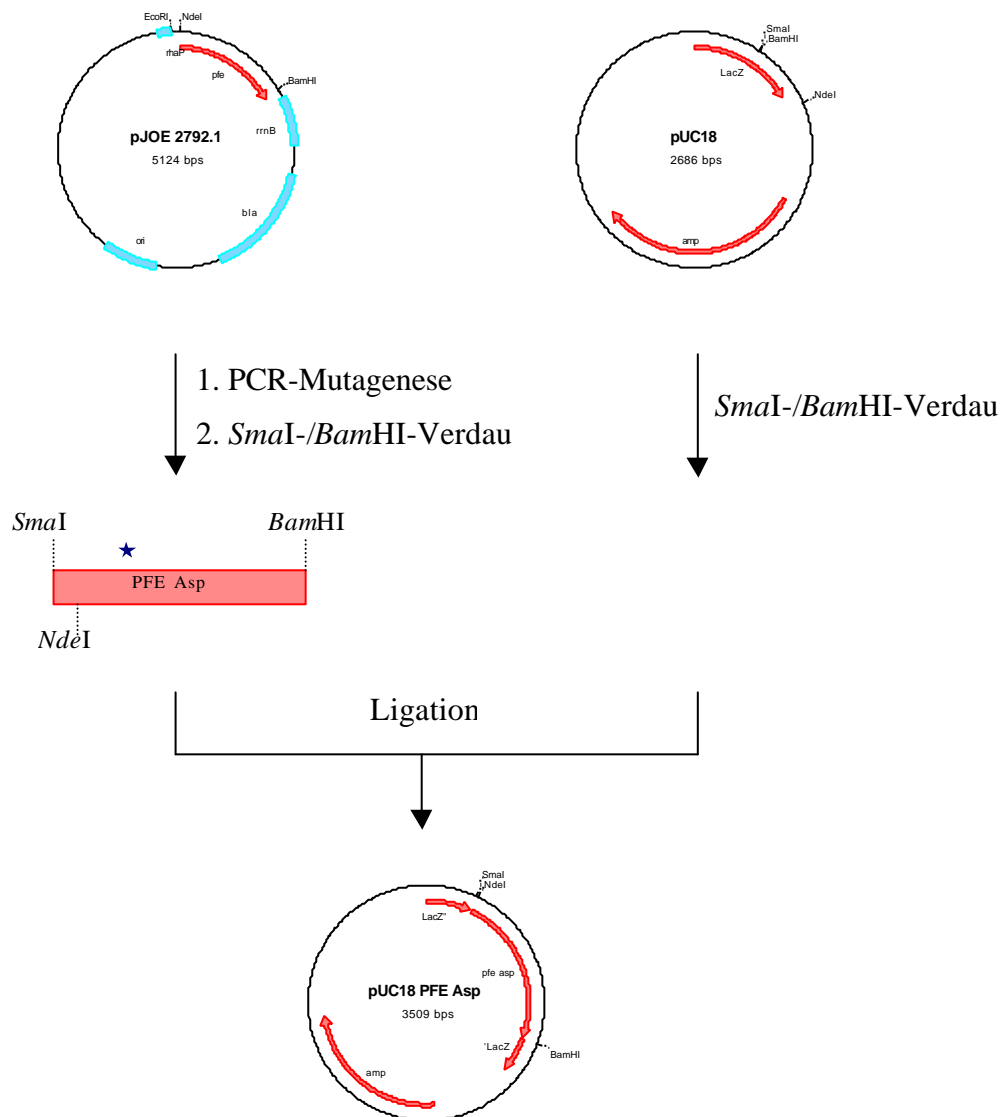


Abbildung 42: Strategie zur Klonierung von pUC18 PFE Asp.

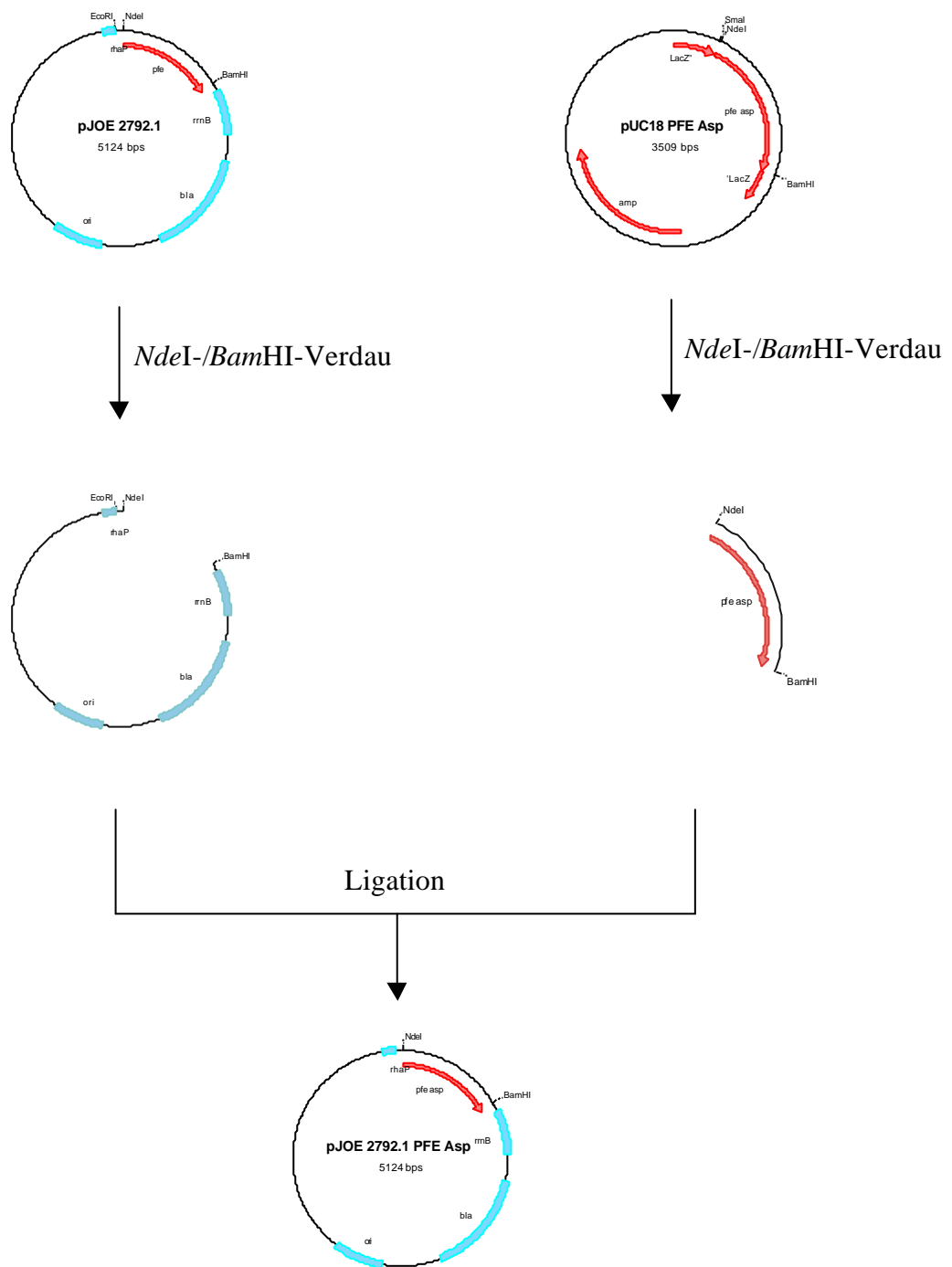


Abbildung 43: Strategie zur Klonierung von pJOE 2792.1 PFE Asp.

Dadurch steht das mutierte Esterasegen wieder unter der Kontrolle des Rhamnose-Promotors, welcher eine regulierte hohe Expression des Gens zulässt. Die PFE Asp-Mutante und zum Vergleich die Wildtyp-PFE wurden unter Kontrolle des Rhamnose-Promotors in *E. coli* DH5 α exprimiert (Abbildung 44).

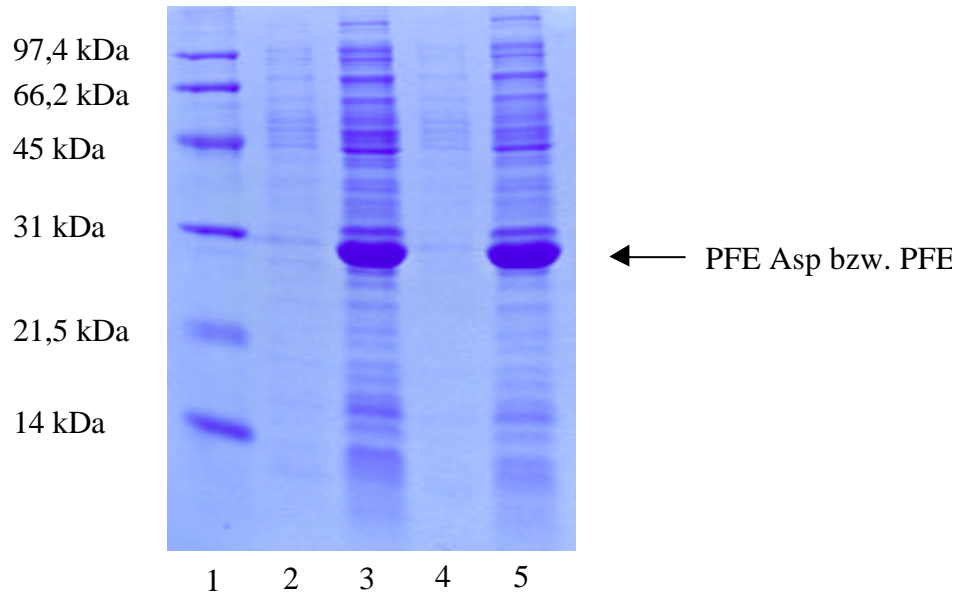


Abbildung 44: SDS-Gel der Expression der PFE und der Asp-Mutante (1: Standard, 2 u. 3: PFE vor/nach Induktion, 4 u. 5: PFE Asp vor/nach Induktion) in *E. coli* DH5 α .

3.9.2 Umsetzungen mit der PFE Asp-Mutante

Die Asp-Mutante der PFE zeigte wie erwartet keine Esteraseaktivität im *p*NPA-Test, da das Serin zur Bildung eines Acylenzym im aktiven Zentrum nicht mehr vorhanden ist.

Um ihre Aktivität gegenüber Epoxiden zu untersuchen, wurden Biotransformationen mit Styroloxid, 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester und 1,2-Decanoxid durchgeführt. Die Umsetzungen wurden in Gegenwart von 10% (v/v) DMSO mit 0,3% (v/v) Epoxid bei 39°C durchgeführt. Dabei konnte nach 48 Stunden keine enantioselektive Hydrolyse der Epoxide im GC beobachtet werden.

3.9.3 Erzeugung einer Enzybibliothek durch evolutives Design

Da der Austausch von Serin gegen Asparaginsäure im aktiven Zentrum der PFE nicht zu der gewünschten Epoxidhydrolaseaktivität geführt hatte, wurde das kodierende Gen der PFE Asp-Mutante durch error-prone PCR mutagenisiert. Dabei wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase ausgenutzt, Fehler im PCR-Produkt durch den Einbau von nichtkomplementären Nukleotiden zu erzeugen. Die Fehlerrate kann durch die Wahl der Reaktionsbedingungen eingestellt werden. Als Template diente das Plasmid pJOE2792.1 PFE Asp. Die error-prone PCR wurde in Gegenwart von $MnCl_2$ (1 mM), einer erhöhten $MgCl_2$ -Konzentration (6 mM) und einer vervierfachen *Taq*-Polymerasemenge durchgeführt. Für die Amplifikation des Template wurden vier Ansätze pipettiert, wobei sich in jedem eines der vier Nukleotide im 10-fachen Unterschuß befand (0,25 mM statt 2,5 mM, Abbildung 45).

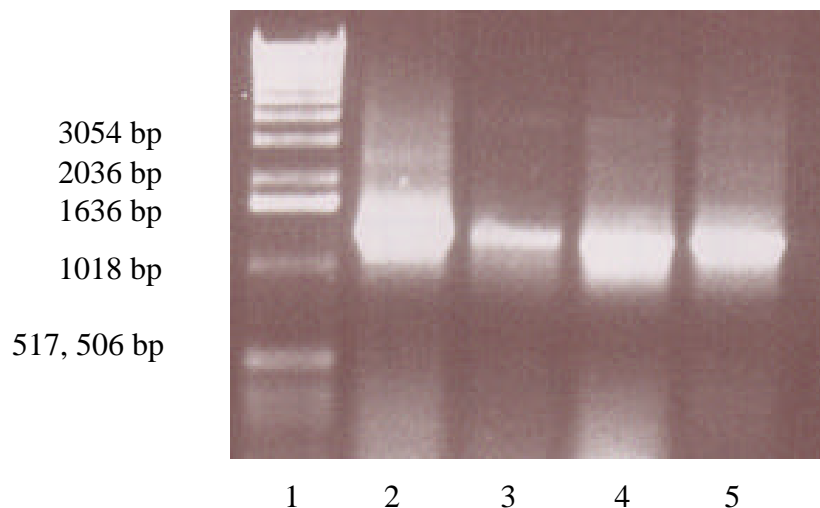


Abbildung 45: Agarosegel der error-prone PCR von pJOE 2792.1 PFE Asp (Spur 1: 1 kb Marker, Spuren 2-5 Adenosin, Cytosin, Guanidin bzw. Thyminid als limitierendes Nukleotid).

Die erhaltenen Fragmente wurden durch Agarosegelextraktion aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nde*I geschnitten. Die durch Zufallsmutagenese erhaltenen PCR-Fragmente wurden dann in den mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor pJOE2792.1 inseriert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Dieses Vorgehen hat gegenüber der Verwendung von Mutationsstämmen den Vorteil, daß nur das PFE Asp-Gen Mutationen trägt, das restliche Plasmid inklusive Promotor und Antibiotikaresistenzgen

unverändert erhalten bleibt. Deshalb ist auch eine vergleichbare Proteinexpression der Varianten gewährleistet.

Die auf Agarplatten erhaltenen Varianten wurden mit einem Pickroboter in Mikrotiterplatten mit 150 μ l LB Amp-Medium überführt und dort über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von Rhamnoselösung unter Verwendung eines Pipettierroboter. Nach vierstündiger Induktion bei 37°C wurden die Zellen durch Einfrieren, Auftauen und anschließender Zugabe von 100 μ l Lysepuffer bei 10°C aufgeschlossen. Durch den Pipettierroboter wurde der Rohextrakt auf vier Kammern einer Mikrotiterplatte verteilt und die Varianten dann mit Hilfe des NBP-Assays auf ihre Fähigkeit Styroloxid zu spalten durchmustert. Die verschlossenen Mikrotiterplatten wurden hierzu zehn Stunden bei 37°C inkubiert, bevor der NBP-Assay durchgeführt wurde. Bei den 2500 untersuchten PFE-Varianten konnte keine Epoxidhydrolaseaktivität nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Hochdurchsatzscreeningsysteme in der Enzymkatalyse

4.1.1 Automatisierung durch HTS-Systeme

Bei der Erstellung eines Screeningsystems zur Durchmusterung von Enzymlibliotheken kann von zwei verschiedenen Situationen ausgegangen werden: die gesuchte Enzymaktivität kann durch die Umsetzung einer möglichst ähnlichen Verbindung, welche leicht durch Messung der Änderung einer physikalischen Eigenschaft, wie z.B. durch die Freisetzung einer chromophoren Verbindung detektiert werden kann, erfolgen. Nachteilig hierbei ist die Verwendung eines Reagenz, welches mit dem eigentlichen Zielsubstrat nicht übereinstimmt und oft andere sterische Ansprüche an das Enzym stellt. Auch Parameter wie elektronische Einflüsse und unterschiedliche Bindungsenergien können meist nur schwer berücksichtigt werden. Deshalb ist die direkte Verwendung des Zielsubstrats bei der Durchmusterung von Enzymlibliotheken von großem Vorteil. Für die Suche in großen Variantenbanken sind Methoden der HPLC und GC wegen des Zeitaufwands und der oftmals notwendigen Probenvorbereitung weniger geeignet. Allerdings besitzen diese bei Biotransformationen den Vorteil, daß auch eine Aussage über Enantiomerenüberschuß und Enantioselektivität der Variante getroffen werden kann. Deshalb bieten sich diese Methoden für genauere Untersuchungen von positiven Varianten nach einem ersten Hochdurchsatzscreening an [167-168]. Statt der Messung der Enzymaktivität in Mikrotiterplatten kann eine rasche erste Vorselektion auf Enzymaktivität auch auf Agarplatten erfolgen. Diese hat den Vorteil, daß schnell visuell eine Vielzahl von Varianten, wie z.B. Lipasevarianten im Tributyrinassay durch Bildung eines klaren Hofes um die Kolonie (Halobildung), durchmustert werden kann. Dieses Vorscreening auf Agarplatten, welches auch als „hierarchisches HTS“ bezeichnet wird, mit Selektion positiver Varianten in Mikrotiterplatten und anschließender Weiterverarbeitung in einer HTS-Anlage reduziert die Zahl der zu untersuchenden Varianten stark. Dies steigert den Gesamtdurchsatz und minimiert dadurch die Kosten [126].

Die Verwendung eines miniaturisierten Formates zur Bearbeitung von Enzymlibliotheken aus Mutageneseexperimenten mit Methoden der gerichteten Evolution ist von großer Wichtigkeit, da hierbei zumeist 10^3 - 10^5 Varianten kultiviert, exprimiert und auf ihre Eignung als Biokatalysator untersucht werden müssen. Deshalb ist hier auch der Einsatz von

Robotertechnik zur Vereinzelung der Varianten, zur Kultivierung der Organismen und zur Expression der mutierten Proteine zusätzlich zum automatisierten Screening notwendig. Die Vereinzelung kann mit einem Pickroboter oder alternativ auch in einem Durchflußzytometer (FACS) erfolgen [153]. Bei der Verwendung eines FACS-Gerätes muß allerdings ein zweites Protein als Marker exprimiert werden. Dieses kann z.B. das GFP sein, welches durch seine Fluoreszenz im FACS-Gerät detektiert wird und dadurch als Selektionsmarker zur Vereinzelung der Zellen in Mikrotiterplatten dient. Das zusätzlich exprimierte Protein kann allerdings weitere Fluoreszenzassays stören. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten mit 96 Kammern zur Kultivierung und mit 384 Kammern zum Screening kann der erforderliche hohe Durchsatz erreicht werden. Allerdings ist die Kultivierung von Mikroorganismen in Mikrotiterplatten auf Stämme beschränkt, die kein Mycel bilden und in Mikrotiterplatten nicht pelletieren, da sonst kein optimales Wachstum mehr gewährleistet ist. Auch die Pipettierschritte mit dem Roboter verlaufen dann nicht mehr unter reproduzierbaren Bedingungen. Dies ist in besonderem Maße beim Screening von Stammsammlungen zu beachten. Hier muß zusätzlich auf die unterschiedliche Geschwindigkeit des Zellwachstums der unterschiedlichen Stämme geachtet werden. Eine ausreichende Durchmischung und Belüftung muß dabei ebenfalls gewährleistet sein. Diese Voraussetzungen sind bei Mikroorganismen wie *E. coli* und bei verschiedenen *Rhodococcus*-Stämmen erfüllt. Schwierigkeiten bereiten Mycelbildner wie *Streptomyces* sp. oder Pilze wie *Aspergillus* sp., welche sich als Wirtsstämme zur heterologen Proteinexpression eignen. Hier bietet sich bei der Kultivierung der Zusatz von Glasperlen zum Erreichen eines homogenen Wachstums an.

4.1.2 Durchführung von Enzymassays in HTS-Anlagen

Nach der Kultivierung in Mikrotiterplatten kann der nachfolgende Assay direkt oder nach Aufschluß der Mikroorganismen erfolgen. Der Aufschluß erfolgt dann durch Auftauen und Einfrieren der Zellen oder durch Zugabe von Lysozym in die einzelnen Kammern. An die Zell-Lyse kann sich ein Zentrifugationsschritt anschließen, um Zellfragmente zu entfernen. Im Fall der Enzybibliotheken der BTL bzw. der PFE wurde der Assay auf Epoxidhydrolaseaktivität mit Zellrohextrakt durchgeführt, da bei der Validierung des NBP-Assays gezeigt werden konnte, daß ein Aktivitätsnachweis auch in Gegenwart von lysierten Zellen erfolgen kann. Eine Übersicht über Methoden zum Nachweis von Enzymaktivitäten

durch Messung der Änderung einer physikalischen Eigenschaft in Mikrotiterplatten ist in Tabelle 6 dargestellt.

Methoden	Literatur
Absorption	[169-174]
Fluoreszenz (-polarisation)	[175-178]
Lumineszenz	[179]
Radioaktive Nachweisverfahren („scintillation proximity assays“)	[180]
Zeitaufgelöste IR-thermographische Spektroskopie	[181]
Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	[182-184]

Tabelle 6: Assayverfahren in Mikrotiterplatten im HTS.

Nachteilig bei einigen Verfahren ist die Verwendung spezieller Apparate, wie eines konfokalen Mikroskops bei der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie oder spezieller Mikrotiterplatten, wie beim „scintillation proximity assay“ und bei der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie. Dadurch steigt der Kapitaleinsatz beim Hochdurchsatzscreening stark an [185]. Am einfachsten und schnellsten ist meist die direkte Messung der Absorption oder Fluoreszenz in der Mikrotiterplatte. Hierbei ist zu beachten, daß Fluoreszenzmessungen sehr viel sensitiver als Absorptionsmessungen sind, was die Detektion von geringen Enzymaktivitäten oder Aktivitätsunterschieden zuläßt.

4.1.3 Etablierung eines Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten unter Verwendung von chromophoren Verbindungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Assaysystem zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität in Enzymbibliotheken entwickelt werden. Dadurch sollte ein schnelles und zuverlässiges Durchmustern von Stammsammlungen und Mutantenbibliotheken aus Zufallsmutageneseexperimenten ermöglicht werden.

Der Nachweis auf Epoxidhydrolaseaktivität bei Biotransformationen beruht zumeist auf GC- oder HPLC-Messungen und ist wegen der großen Anzahl der Proben für diese Fragestellung wenig geeignet. Deshalb stand die Entwicklung eines photometrischen Enzymassays auf Epoxidhydrolaseaktivität im Vordergrund der Arbeit. Dabei wurde von einer

Enzybibliothek der BTL (von M. Enzelberger, ITB, zur Verfügung gestellt) und einer im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Enzybibliothek der PFE ausgegangen. Beide Bibliotheken wurden durch Austausch des Serins in der katalytischen Triade gegen Asparaginsäure, welche in der katalytischen Triade der Epoxidhydrolasen statt Serin vorhanden ist, und darauf folgender weiterer Mutagenese durch gerichtete Evolution angelegt.

Da bei beiden Enzybibliotheken nur eine sehr geringe Anfangsaktivität zu erwarten war, wurde das Substratspektrum der Wildtyp-Hydrolasen im Hinblick auf eine photometrische Assaysubstanz untersucht, da mit Hilfe dieser Methode auch geringe Aktivitäten erfaßt werden können.

Aus Untersuchungen mit cEH waren die Verbindungen 4'-Nitrophenyl-2,3-epoxy-3-phenylpropylcarbonat (NEPC) und 4-Nitrophenyl-*trans*-3,4-epoxy-4-phenylbutanoat (NEB) als photometrische Assaysubstanzen bekannt (Abbildungen 16 u. 18) [103].

Durch Variation der Reste am Oxiranring kann ein dem Substratspektrum des Ausgangsenzyms angepaßtes Assaysystem erhalten werden. Interessant sollten für Lipase-Bibliotheken vor allem langkettige Alkylreste am Oxiranring sein, da diese mehr den natürlichen Substraten von Lipasen ähneln und deshalb besser in das aktive Zentrum der Lipase passen sollten. Auch die Alkoholseite muß entsprechend berücksichtigt werden: als chromophore Alkohole wurden 4-Nitrophenol und Resorufin verwendet. Nachteilig bei der Verwendung von 4-Nitrophenol ist, daß eine Unterscheidung zwischen der gelben Farbe des Chromophors ($\epsilon_{405 \text{ nm}} = 16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und der des Mediums schwierig ist. Geeigneter erscheint es deshalb ein Chromophor, möglichst im sichtbaren Bereich des Spektrums, zu wählen, das in einem anderen Bereich absorbiert. Hierzu wurde Resorufin benutzt, welches im sichtbaren Bereich bei 572 nm sein Absorptionsmaximum ($\epsilon_{572 \text{ nm}} = 60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) besitzt und in wäßriger Lösung violett ist. Der fast um den Faktor vier höhere Extinktionskoeffizient von Resorufin gegenüber 4-Nitrophenol erleichtert den Nachweis von nur geringer Epoxidhydrolaseaktivität. Für die Esterase-Bibliothek zeigten sich kurzkettige Alkylreste am Oxiranring zusammen mit Resorufin als chromophorem Alkohol als geeignet. Bei der Verwendung von Resorufin ist auch eine Bestimmung der Enzymaktivität über Fluoreszenz- anstatt über Absorptionsmessung möglich, welche eine empfindlichere Detektion ermöglicht.

Da die beiden Mutantenbibliotheken aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Bildung eines Acylenzyms keine Lipase- oder Esteraseaktivitäten mehr besitzen, kann eine enzymatische Hydrolyse nur noch am Oxiranring erfolgen. Dadurch kommt es zur Freisetzung des

Chromophors, welche photometrisch nachgewiesen werden kann. Nachteilig bei der Verwendung von Resorufin ist seine Größe, die möglicherweise mit dem aktiven Zentrum der zu untersuchenden Enzymvarianten inkompatibel ist. Beide Substanzen mußten folglich dem Substratspektrum der Ausgangsenzyme angepaßt werden. Aus diesem Grunde wurden die Reste am Oxiranring und damit an der Carbonsäurebindungsstelle der Lipase/Esterase variiert und der Einfluß der verschiedenen Chromophore an der Alkoholbindungsstelle auf die enzymkatalysierte Hydrolyse untersucht.

Hierzu wurden verschiedene Ester dargestellt, die in ihrer Größe NEPC ähneln und diese Ester als Substrat Agarplatten zugesetzt. Dabei zeigte sich, daß Oktansäurephenylester durch den BTL-Wildtyp sehr schnell hydrolysiert werden konnte. Benzoessäureheptylester und Phenyllessigsäurehexylester wurden nicht umgesetzt. Oktansäurephenylester als Ester einer langkettigen Carbonsäure kommt den natürlichen Substraten von Lipasen, nämlich Triglyceriden mit langkettigen Fettsäuren am nächsten, während Carbonsäuren mit aromatischen Resten oftmals nur schlecht von Lipasen umgesetzt werden. Die Hydrolyseversuche mit der BTL haben gezeigt, daß ein Molekül mit der Größe von NEPC in die Bindungstasche der Lipase passen sollte. Für die PFE waren sowohl kurzkettige 4-Nitrophenol- als auch Resorufinester geeignet.

Von der BTL ist bekannt, daß sie ihr Aktivitätsmaximum gegenüber 4-Nitrophenyl-carbonsäureestern bei einer Kettenlänge von 12 Kohlenstoffatomen besitzt [186]. Deshalb wurden Epoxydodecencarbonsäurechromophorester mit 4-Nitrophenol und Resorufin als chromophore Gruppe dargestellt. Diese wurden durch die Wildtyplipase gespalten. Auch mit der Asp- und Pro/Asp-Mutante der BTL wurden Umsetzungen durchgeführt: dabei konnte erwartungsgemäß keine Hydrolyse beobachtet werden. Desweiteren wurden NEPC-analoga langkettige Epoxycarbonatester mit 4-Nitrophenol bzw. Resorufin als chromophorer Gruppe hergestellt. Auch bei diesen analogen Epoxycarbonatestern konnte keine Spaltung durch die BTL-Mutanten erzielt werden, während die Wildtyplipase diese Substrate rasch umsetzte. Nachteilig bei der Verwendung dieser Epoxycarbonsäureester und Epoxycarbonate ist, daß der Oxiranring ungefähr 3 Å von der Esterfunktion entfernt ist, und, daß bei den beiden untersuchten Mutanten nur das Serin des aktiven Zentrums gegen ein Aspartat ausgetauscht ist.

Da die Raumstruktur der BTL, der PFE und der Epoxidhydrolasen bisher unbekannt ist, konnten keine zusätzlichen rationalen Vorhersagen für eine weitere Mutagenese der Lipase bzw. Esterase getroffen werden, um Epoxidhydrolaseaktivität zu generieren. Auch ist nicht bekannt, wieviele Mutationen für die Umwidmung eines Enzyms in eine andere Enzymklasse

notwendig sind. Dadurch läßt sich auch keine Aussage über die einzustellende Mutationsrate in der error-prone PCR treffen.

4.1.4 Untersuchungen zum direkten Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität in Enzymbibliotheken und Entwicklung des NBP-Assays

Bei der Verwendung von Chromophorestern zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität wird nicht die eigentlich interessierende Umsetzung mit dem Zielsubstrat untersucht, sondern ein Modellsystem. Deshalb ist der direkte Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten gegenüber den Zielsubstraten wünschenswert.

Die Umsetzungen mit Epoxidhydrolasen werden meist mit unterschiedlich substituiertem Styroloxid als Substrat durchgeführt. Diese Verbindungen werden häufig von den bekannten bakteriellen Epoxidhydrolasen mit moderaten bis hohen Enantioselektivitäten umgesetzt [9].

Deswegen wurde die Umsetzung von Styroloxid mit der Asp- und Asp/Pro-Mutante der BTL und der Asp-Mutante der PFE durchgeführt. Styroloxid besitzt eine ähnliche Größe wie 1-Phenylethanol bzw. 1-Phenylpropanol. Deshalb wurde zuerst untersucht, ob diese Substrate in das katalytische Zentrum der Wildtypenzyme passen und daher dann Styroloxid als Substrat zur Durchmusterung in der Enzymumwidmung verwendet werden kann. Hierzu wurde die Veresterung von 1-Phenylethanol mit Vinylacetat bzw. Vinylbutyrat in organischem Lösungsmittel und die Hydrolyse des entsprechenden Acetats durch die BTL untersucht. Der um ein Kohlenstoffatom längere Alkohol 1-Phenylpropanol wurde ebenfalls durch Vinylacetat und BTL verestert.

Alle diese Umsetzungen verliefen mit sehr hohen Enantioselektivitäten ($E > 150$). Das ähnlich große Epoxid sollte also auch in das aktive Zentrum der Lipase passen. Bei der Hydrolyse von Styroloxid in Gegenwart der BTL Asp- bzw. Asp/Pro-Mutante konnte allerdings kein Enantiomerenüberschuß gefunden werden. Weitere Zufallsmutagenese ist deshalb notwendig, oder als Ausgangspunkt für die Umwidmung muß von einem anderen Enzym, wie z.B. der PFE, ausgegangen werden, welche eine höhere Aminosäuresequenzhomologie zu den bekannten mikrobiellen Epoxidhydrolasen besitzt.

Die PFE acyliert unter Verwendung von Vinylacetat oder Vinylbutyrat 1-Phenylethanol mit einem E-Wert von über 100 und hydrolysiert das Acetat mit einem E-Wert von 58. Allerdings wird 1-Phenylpropanol durch Vinylacetat nur mit einem E-Wert von 3 durch die PFE acyliert

[187-188]. Styroloxid sollte also auch für die Durchmusterung der PFE-Enzymbibliothek als Substrat geeignet sein.

Ausgehend von Arbeiten über den Nachweis der Alkylierungsfähigkeit chemischer Verbindungen wurde 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) als Reagenz zur direkten Detektion von Epoxiden benutzt. Bislang war die direkte Messung der Epoxidkonzentration in wäßriger Lösung unter milden Bedingungen im Hochdurchsatzscreening nicht möglich, da das gebildete Chromophor in Wasser nicht löslich ist und ein Extraktionsschritt mit organischem Lösungsmittel und nachfolgendem Erhitzen auf 75-110°C notwendig ist. Deshalb mußte der Assay so modifiziert werden, daß er in homogener Lösung ohne Extraktionsschritt in Mikrotiterplatten bei moderaten Bedingungen mit verschiedenen Epoxiden durch einen Pipettierroboter durchgeführt werden kann.

Diese Zielsetzungen konnten durch den Zusatz von Triethylglykoldimethylether als Lösungsvermittler erreicht werden. Der Assay wurde dann unter Verwendung verschiedener Epoxide validiert. Dabei zeigte sich, daß der Assay für Verbindungen mit einer hohen Alkylierungsfähigkeit, wie z.B. Styroloxid, Indenoxid und 2,3-Epoxy-3-phenylpropionsäureethylester, sehr gut in Mikrotiterplatten anwendbar ist.

Hier konnte eine Endpunktsbestimmung der Epoxidkonzentration durch Messung der Absorption durchgeführt werden. Dabei war die Menge an Epoxid der Absorption proportional und daher konnte auf die durch die Epoxidhydrolase umgesetzte Menge an Epoxid zurückgeschlossen werden. Aus dieser Abnahme der Substratkonzentration können Epoxidhydrolasen dann im Screening erkannt werden.

Bei Verbindungen mit schwächer ausgeprägter Alkylierungsaktivität, wie z.B. 1,2-Hexanoxid, mußten um den Faktor fünf höhere Epoxidkonzentrationen verwendet werden. Mit nur sehr langsam alkylierenden Verbindungen, wie z.B. 1,2-Decanoxid, konnte keine Proportionalität zwischen der Absorption und der Menge an Epoxid gefunden werden. Hier muß weiterhin auf andere analytische Methoden, wie z.B. GC oder HPLC, ausgewichen werden.

Der Assay kann in Gegenwart einer Base, wie z.B. Triethylamin oder Piperidin, durchgeführt werden. In der Literatur wird über einen stabilisierenden Effekt durch Zusatz einer Base, besonders von Piperidin, auf das blaue Chromophor berichtet [110]. In Gegenwart von Triethylamin konnte eine schnellere Bildung des blauen Chromophors beobachtet werden. Eine Proportionalität zwischen der Menge an Epoxid und der Absorption konnte allerdings im Gegensatz zur Literatur unter den verwendeten Reaktionsbedingungen auch ohne Base gefunden werden. In Gegenwart von Piperidin wurde eine Abnahme der Absorption

beobachtet, deshalb wurde zur Assayvalidierung Triethylamin verwendet oder auf den Zusatz einer Base ganz verzichtet.

Der NBP-Assay erlaubt gegenüber dem herkömmlichen Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität über GC oder HPLC einen deutlich gesteigerten Durchsatz und wurde deshalb auf ein Hochdurchsatzscreeningsystem übertragen. Allerdings ist mit dem NBP-Assay nur eine Endpunktsbestimmung der Epoxidkonzentration möglich. Kinetische Messungen, wie sie z.B. beim *p*NPA-Assay auf Esteraseaktivität möglich sind, können mit dem NBP-Assay nicht durchgeführt werden, da die enzymatische Reaktion durch die Zugabe der Reagenzien abgebrochen wird.

Im Prinzip könnte der Epoxidhydrolaseassay mit NBP durch Proteine im nicht aufgereinigtem Zellaufschluß oder andere Enzymaktivitäten, wie z.B. Glutathion-*S*-transferasen oder Reduktasen, gestört werden. Durch die gefundene Korrelation zwischen den Messungen mit dem NBP-Assay und GC-Messungen kann dies jedoch ausgeschlossen werden. Die Werte, die durch den NBP-Assay erhalten wurden, konnten durch Verwendung von ganzen und lysierten *E. coli* DH5 α -Zellen ohne Plasmid und autoklavierten Zellen von *Rhodococcus* sp. NCIMB11216, die keine Epoxidhydrolaseaktivität mehr zeigten, bestätigt werden. Unter den Assaybedingungen konnte keine spontane Reaktion mit Nukleophilen, wie z.B. Wasser, Proteinen oder DNA, gefunden werden. Der NBP-Test kann deshalb auch zur Epoxidkonzentrationsbestimmung in Gegenwart von Mikroorganismen oder nicht aufgereinigtem Zellextrakt verwendet werden. Er eignet sich auch für den Einsatz zur automatisierten Suche nach Epoxidhydrolaseaktivität in großen Bibliotheken wie Stammsammlungen oder Variantenbanken.

Der Assay wurde für die Durchmusterung von Enzybibliotheken auf eine HTS-Anlage programmiert. Bei Verwendung eines Pipettierroboters können sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Durch Verwendung eines Beckman 2000-Laborroboters mit Greifarm ist die Durchmusterung von ca. 500 Varianten pro Tag möglich. Dabei ist zu beachten, daß für jede Probe eine Vierfachbestimmung mit verschiedenen Epoxidkonzentrationen durchgeführt wurde, um eine Inhibierung durch das Epoxid oder Diol zu vermeiden. Bei einer Einfachbestimmung wäre also die Vervierfachung des Durchsatzes möglich.

4.2 Untersuchung von *Streptomyces*-Stämmen mit dem NBP-Assay auf Epoxidhydrolaseaktivität

Mit Hilfe dieses Assays wurden verschiedene *Streptomyces*-Stämme in Mikrotiterplatten nach Kultivierung in Erlenmeyerkolben auf Epoxidhydrolaseaktivität untersucht. Die Biotransformationen wurden mit Styroloxid, Indenoxid, 1,2-Hexanoxid und 2,3-Epoxy-3-phenylpropionsäureethylester als Substrate durchgeführt. Dabei konnten erstmals Epoxidhydrolaseaktivitäten in der Familie der *Streptomyces* gefunden werden, die bislang dort unbekannt waren.

Bei der Suche wurden besonders solche Stämme berücksichtigt, welche auch über P450-Monooxygenasen verfügen, da diese zusammen mit Epoxidhydrolasen eine Enzymkaskade bilden können [144].

Da beim Einsatz von racemischen Epoxiden zusammen mit dem NBP-Test eine Aussage über die Enantioselektivität einer Biotransformation nur schwer möglich ist, wurden quantitative Umsetzungen der im Screening positiven Stämme mittels GC analysiert. Durch den Einsatz von enantiomerenreinen Epoxiden und Einführung einer Korrelation zwischen den beiden Enantiomeren könnte dieser Nachteil allerdings ausgeglichen werden.

4.2.1 Biotransformationen mit Epoxiden durch *Streptomyces*-Stämme

Um eine größere Menge an Epoxidhydrolase zur Verfügung zu haben, wurde eine 30 L-Fermentation des Stamms *Streptomyces antibioticus* Tü4 im Batch-Verfahren durchgeführt. Mit dieser Epoxidhydrolase und zwei weiteren *Streptomyces*-Stämmen (*S. fradiae* Tü27, *S. arenae* Tü495), welche im NBP-Test Epoxidhydrolaseaktivität gezeigt hatten, wurden Umsetzungen mit verschiedenen Epoxiden durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß die höchsten Enantiomerenüberschüsse mit dem Stamm *Streptomyces antibioticus* Tü4 erzielt werden konnten. Bei der Umsetzung mit Styroloxid wurde eine moderate Enantioselektivität ($E = 13$) ermittelt.

Bei den anderen Epoxiden konnten nur die Enantiomerenüberschüsse an Edukt (für 2,3-Epoxy-3-phenylpropionsäureethylester) bzw. Produkt (für 1,2-Decandiol nach Derivatisierung) durch GC bestimmt werden. Deshalb ist hier eine Aussage über die Enantioselektivität der Biotransformation nicht möglich, allerdings betrug der Enantiomerenüberschuß im Fall der Hydrolyse von 2,3-Epoxy-3-phenylpropion-

säureethylester bereits nach zweieinhalb Stunden 81% *ee*. Gegenüber diesem Substrat scheint der Stamm also sehr aktiv und stereoselektiv zu sein. Hierbei kann allerdings die enantioselektive Hydrolyse eines Teils des Substrats durch eine ebenfalls vorhandene Esterase nicht ausgeschlossen werden. Bei der Verwendung des langkettig substituierten 1,2-Decanoxids konnte nur ein geringer Enantiomerenüberschuß des Diols (33% *ee*) beobachtet werden. Die Epoxidhydrolase scheint also Epoxide mit kurzkettigen, allerdings voluminösen Substituenten, wie der Phenyl-Gruppe, zu bevorzugen.

Die Stabilität der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 wurde in Gegenwart verschiedener Cosolventien untersucht, da diese eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei der Racematspaltung ermöglichen. Dabei zeigte die Epoxidhydrolase die höchste Reaktivität in Gegenwart von 10% (v/v) DMSO oder Aceton. Eine geringere Hydrolaseaktivität konnte auch in Gegenwart anderer Solventien beobachtet werden. Die Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 besitzt also verglichen mit den Epoxidhydrolasen tierischen Ursprungs eine hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln.

Die beiden anderen Stämme *Streptomyces fradiae* Tü27 und *Streptomyces arenae* Tü495 zeigten eine geringere Enantioselektivität gegenüber den verwendeten Epoxiden und die erreichten Enantiomerenüberschüsse für Styroloxid lagen nur im Bereich 70% *ee* bei 80% Umsatz ($E \approx 3-4$). Diese sind deshalb für Biotransformationen mit den untersuchten Substraten weniger interessant, allerdings wurde ihr Substratspektrum nicht weiter untersucht.

Epoxidhydrolasen aus *Streptomyces* bieten den Vorteil einer gut entwickelten Fermentationstechnik, die die Bereitstellung von großen Mengen an Enzym ermöglicht. Auch ist die Genetik der *Streptomyces* weit entwickelt, welche die Zugänglichkeit größerer Mengen an Protein durch Klonierung in einem *Streptomyces*-Wirtsstamm oder auch durch heterologe Expression in einem Wirtsorganismus, wie z.B. *E. coli*, erleichtert. Allerdings ist die Expression von DNA mit einem hohen GC-Gehalt, wie ihn die *Streptomyces* besitzen, in einem Wirt wie *E. coli* schwierig. Auch werden die *Streptomyces*-Promotoren zur Proteinexpression in anderen Wirtsorganismen zumeist nicht erkannt.

4.2.2 Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4

Aus der Literatur sind die Proteinaufreinigungen von drei bakteriellen Epoxidhydrolasen bekannt.

Die Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 wurde über eine vierstufige Aufreinigung isoliert. Zuerst wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose CL-4B durchgeführt. Die Epoxidhydrolase erwies sich als sehr lipophil und wurde ohne Zugabe von Salz vollständig an der Matrix gebunden. Es mußte deshalb gegen Wasser eluiert werden. Anschließend wurde eine Anionenaustauschchromatographie an Source 30 Q durchgeführt und im Anschluß erfolgte eine weitere hydrophobe Interaktionschromatographie an Benzylthiosepharose. Auch dabei wurde eine starke Bindung an das Trägermaterial beobachtet. Nach Aufkonzentrierung erfolgte eine Gelfiltration an Superdex 75 HR und dadurch konnte ein homogenes monomeres Protein mit einer Molekülmasse von 35 kDa erhalten werden. Die Proteinsequenzierung war wegen einer N-terminalen Blockierung nicht möglich [25].

Aus *Corynebacterium* sp. C12 wurde die Epoxidhydrolase durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose aufgereinigt. Die Proteinsequenzierung des N-Terminus der Epoxidhydrolase konnte im Anschluß erfolgreich durchgeführt werden [66].

Als dritte mikrobielle Epoxidhydrolase wurde das Enzym aus *Nocardia* sp. EH1, einem Stamm aus der Familie der *Actinomyceten*, aufgereinigt. Auch hier wurde eine vierstufige Aufreinigung analog zur Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus* sp. durchgeführt. Die Epoxidhydrolase ist ebenfalls ein sehr lipophiles Protein und im aufgereinigten Zustand viel instabiler als unaufgereinigt. Durch den Zusatz von Tween 80 oder Triton X-100 bei der Aufreinigung konnte eine teilweise Stabilisierung des Proteins erreicht werden. Die N-terminale Sequenz des Proteins ist nicht bekannt [84].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *Streptomyces antibioticus* Tü4 untersucht. Als Aufreinigungsstrategie wurde die Proteinaufreinigung mit einem Anionenaustauscher, gefolgt von einer hydrophoben Interaktionschromatographie und einer Gelfiltration gewählt. Bei der Auswahl des Materials für die Ionenaustauschchromatographie erwies sich der stark bindende Anionenaustauscher Super Q 650 M geeigneter als das mittelstark bindende DEAE 650 M-Material und die Aufreinigung durch

einen Stufengradienten wurde deshalb auf dieses Material hin optimiert. Mit diesem aufgereinigten Proteinextrakt, welcher neben einer hohen Epoxidhydrolaseaktivität Esteraseaktivität besaß, wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie unter Verwendung von Matrices unterschiedlicher Hydrophobizität durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, daß die Proteine bei maximaler Salzkonzentration bereits eluiert wurden. In diesem Eluat wurde die Epoxidhydrolaseaktivität gefunden. Allerdings ist zu beachten, daß bei der hydrophoben Interaktionschromatographie im Gegensatz zur Chromatographie mit einem Anionenaustauscher keine Aufkonzentrierung, sondern eine Verdünnung der Proteine stattfindet, was zu einer Volumenaktivitätsabnahme führt. Dies deutet entweder darauf hin, daß ein Teil der Epoxidhydrolase auf der Säule zerfallen war, oder, daß die Epoxidhydrolase zum Teil auf der Säule immer noch gebunden vorlag. Dies wäre in Übereinstimmung mit der Proteinaufreinigung der Epoxidhydrolasen aus *Nocardia* sp. und *Rhodococcus* sp. Deshalb wurde auch gegen Wasser bzw. Cholatlösung, welche als Detergenz wirkt, eluiert. Dabei konnte allerdings kein zusätzliches Protein detektiert werden.

Eine weitere Aufreinigung über hydrophobe Interaktionschromatographie war nicht möglich. Deshalb wurde direkt im Anschluß eine Gelfiltration durchgeführt, bei der eine Auftrennung der Proteine nach der Größe stattfindet. Dabei wurde das gesamte Protein zusammen eluiert und aus diesem Grunde konnte bei dieser Aufreinigungsmethode keine zusätzliche Aufreinigung erreicht werden.

Neben einer hohen Epoxidhydrolaseaktivität wurde in derselben Fraktion auch Esteraseaktivität nachgewiesen. Da Esterasen, wie die Epoxidhydrolasen, α/β -Hydrolasefaltung aufweisen und eine ähnliche Form und Größe besitzen, wurden beide Proteine unter den gleichen Bedingungen eluiert. Daneben fand sich noch das Signal eines Proteins mit einer Häm-Gruppe im Absorptionsspektrum. Die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Fraktionen auf Epoxidhydrolaseaktivität konnte mit Hilfe des NBP-Tests schnell und zuverlässig durchgeführt werden.

Es konnte also nur eine teilweise Abreinigung fremder Proteine erreicht werden. Die Epoxidhydrolase erwies sich jedoch als stabil und Biotransformationen mit angereinigtem Enzym waren möglich. Diese unterschieden sich nicht von Umsetzungen mit Rohextrakt.

Die Biotransformationen konnten in Gegenwart verschiedener organischer Lösungsmittel durchgeführt werden. Dabei zeigte die Epoxidhydrolase eine hohe Stabilität, vergleichbar mit der bakteriellen Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 oder aus dem Pilz *Aspergillus niger* LCP521. Das Enzym ist deshalb in der organischen Synthese zur Darstellung optisch aktiver Epoxide, besonders im Vergleich zu den weniger stabilen

Epoxidhydrolasen tierischen Ursprungs, gut geeignet und zeichnet sich durch eine gute Zugänglichkeit zusammen mit einer hohen Stabilität aus.

4.3 Umwidmung einer Esterase in eine Epoxidhydrolase

In dieser Arbeit sollte die Umwidmung der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) durch gerichtete Evolution in eine Epoxidhydrolase versucht werden, da diese eine Aminosäuresequenzidentität von fast 30% zur Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. C12 aufweist [66].

Um die Zahl der zu untersuchenden Varianten zu verringern, wurde hierzu zuerst das Serin der katalytischen Triade durch punktgerichtete Mutagenese gegen Asparaginsäure, wie in den Epoxidhydrolasen, ausgetauscht. Diese Variante zeigte keine Esteraseaktivität mehr, und das mutierte Gen wurde als Ausgangspunkt für die Zufallsmutagenese verwendet, da diese Punktmutation nicht ausreichend war, um Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber Styroloxid, 1,2-Decanoxid oder 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester zu erzielen. Weitere Vorschläge für rationale Mutationen waren wegen der fehlenden Röntgenstruktur des Enzyms selbst und vor allem wegen der fehlenden Raumstruktur einer Epoxidhydrolase nicht möglich. Mit dem Gen der PFE wurde bereits durch die Verwendung eines Mutationsstamms (*Epicurian coli* XL1-Red) zusammen mit einem Indikatortesting eine gerichtete Evolution durchgeführt. Die Varianten wurden dabei auf ihre Fähigkeit durchmustert, sterisch gehinderte 3-Hydroxyester zu spalten, welche als Bausteine für Epothilone verwendet werden können. Dabei konnte eine Variante identifiziert werden, welche die Darstellung des 3-Hydroxyethylesters mit 25% *ee* durch eine Racematspaltung erlaubt [127].

Die error-prone PCR als Methode der gerichteten Evolution bietet die Möglichkeit, selektiv nur das zu verbessernde Gen zu mutieren. Promotor und Resistenzgen werden im Gegensatz zur Verwendung von Mutationsstämmen nicht verändert. Deshalb wurde eine gerichtete Evolution über eine error-prone PCR durchgeführt, die Varianten kloniert, exprimiert und auf ihre Fähigkeit, Styroloxid zu spalten, untersucht. Die Zufallsmutagenese in Verbindung mit einem effizienten Screeningsystem bietet die Möglichkeit, eine große Variantenbibliothek, welche ohne genaue Kenntnis der Struktur-Funktions-Beziehungen erzeugt wurde, zu erstellen.

Da bei diesem Screening von keiner Anfangsaktivität ausgegangen werden konnte und nur geringe Verbesserungen pro Mutationszyklus zu erwarten waren, erwies sich ein eindeutiges

Screening positiver Varianten als entscheidend, da bei nur geringen Aktivitätsunterschieden die Zahl der falsch positiven Varianten stark ansteigt. Bei den Assays konnte keine Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber Styroloxid gefunden werden.

Dies kann darin liegen, daß die Zahl der untersuchten Varianten zu gering war, oder, daß die Aktivität so gering war, daß sie im Screening nicht erkannt werden konnte.

Ein weiterer Grund könnte eine zu geringe Mutationsrate sein. Allerdings läßt sich nicht voraussagen, wieviel Mutationen für die Umwidmung einer Enzymaktivität in eine neue, gänzlich andere Aktivität notwendig sind, da eine solche Umwidmung ohne jegliche Ausgangsaktivität in eine neue Enzymklasse bisher noch nie beschrieben wurde und auch bis zur Fertigstellung der Arbeit keine Röntgenstruktur einer Epoxidhydrolase vorlag, um gezielt bestimmte Bereiche zu mutieren.

Die Zuordnung der Epoxidhydrolasen zu den Enzymen der α/β -Hydrolasefaltung erfolgte über Homologiebetrachtungen zu strukturell untersuchten Enzymklassen, wie den Dehalogenasen, Esterasen und Lipasen. In einer neueren Arbeit wird allerdings über eine bakterielle Epoxidhydrolase berichtet, welche viel kleiner ist als die bekannten Epoxidhydrolasen und wahrscheinlich keine α/β -Hydrolasefaltung besitzt [87].

Wegen der geringen Kenntnisse über die Struktur-Funktions-Beziehungen bei Epoxidhydrolasen bleibt also die prinzipielle Frage nach der Chance für die Umwandlung einer Lipase in eine Epoxidhydrolase weiterhin offen.

5 Zusammenfassung

Die Enzymklasse der Epoxidhydrolasen stellt einen interessanten Zugang zu enantiomerenreinen optisch aktiven Epoxiden dar, welche als wichtige chirale Bausteine in der organischen Chemie Anwendung finden.

Die Suche nach neuen Epoxidhydrolase-aktivitäten kann in Stammsammlungen oder durch Umwidmung bekannter Gene über gerichtete Evolution erfolgen. Hierzu muß eine Vielzahl von Stämmen oder Varianten untersucht werden. Deshalb wurden verschiedene Assaysysteme auf Epoxidhydrolaseaktivität entwickelt, welche die rasche Durchmusterung von Enzymbibliotheken ermöglichen und damit die Entwicklungszeit von neuen Biokatalysatoren drastisch verkürzen. Eine im Rahmen dieser Arbeit erstellte Enzymbibliothek der PFE und eine Bibliothek der BTL (von M. Enzelberger, ITB, zur Verfügung gestellt) wurde auf Epoxidhydrolaseaktivität untersucht. Da sich die katalytische Triade der Epoxidhydrolasen von der der Lipasen durch den Austausch der Aminosäure Serin durch Asparaginsäure unterscheidet, wurde zur Erstellung der Enzymbibliothek diese Mutation zielgerichtet durch eine PCR-Reaktion in das Gen der PFE eingeführt. Die PFE-Enzymbibliothek wurde anschließend über eine gerichtete Evolution durch error-prone PCR erhalten. Die verwendete Enzymbibliothek der BTL wurde analog hergestellt. Die Varianten der PFE Asp und der BTL Asp wurden mit einem Pickroboter vereinzelt, in Mikrotiterplatten kultiviert und die mutierten Enzyme exprimiert. Diese Bibliotheken wurden anschließend im Hochdurchsatzscreening auf Epoxidhydrolaseaktivität durchmustert.

Für diese Durchmusterung war die Entwicklung eines für das Hochdurchsatzscreening geeigneten Assays notwendig. Die aus der Literatur bekannten Assaysysteme zum Nachweis cytosolischer Epoxidhydrolasen beruhen auf chromophoren Carbonaten und Estern. Um ein angepaßtes Assaysystem zu erhalten, wurde das Substratspektrum der Wildtypenzyme untersucht, verschiedene Ester ähnlicher Größe dargestellt und mit dem Wildtypenzym umgesetzt. Dabei zeigte sich, daß Oktansäurephenylester durch BTL im Gegensatz zu Benzoessäureheptylester und Phenylelessigsäurehexylester rasch umgesetzt wurden. Um den Einfluß der Kettenlänge auf der Carbonsäureseite und der chromophoren Gruppe auf der Alkoholseite zu untersuchen, wurden verschiedene 4-Penten- und 4,5-Epoxy-pentancarbonsäureester mit 4-Nitrophenol und Resorufin als chromophore Alkohole dargestellt. Alle Ester konnten durch die PFE umgesetzt werden und sind deshalb zum Screening der PFE-Enzymbibliothek geeignet. Durch die BTL und durch die Asp- bzw. Asp/Pro-Mutante konnte

keine oder nur eine sehr langsame Hydrolyse der Substrate beobachtet werden. Deshalb wurden zur Durchmusterung der BTL-Enzymlbibliothek Dodecensäure- und 4,5-Epoxydodecensäure-chromophorester mit 4-Nitrophenol und Resorufin als Chromophore dargestellt. Die 4,5-Epoxydodecensäureester konnten durch die Wildtyp-BTL rasch gespalten werden. Mit der Asp- bzw. Asp/Pro-Mutante der BTL konnte unter Verwendung dieser Substrate allerdings keine Epoxidhydrolaseaktivität beobachtet werden. Desweiteren wurden längerkettigere alkylsubstituierte Epoxycarbonat-chromophorester dargestellt. Diese Epoxycarbonat-chromophorester wurden von der Wildtyp-BTL rasch gespalten, allerdings nicht von den beiden BTL-Mutanten. Da diese Assaysubstanzen nur indirekt Epoxidhydrolaseaktivität durch Abspaltung einer chromophoren Gruppe anzeigen, wurde ein direkter Assay zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität am Beispiel von Styroloxid entwickelt. Hierzu wurden die Umsetzungen von 1-Phenylethanol und 1-Phenylpropanol mit verschiedenen Acyldonoren und die Hydrolyse des Acetats von 1-Phenylethanol durch die BTL untersucht. Diese Umsetzungen verliefen mit hohen Enantioselektivitäten ($E > 150$). Die Verbindungen ähneln in ihrer Größe Styroloxid und dieses Epoxid kann deshalb als Substrat für eine Durchmusterung auf Epoxidhydrolaseaktivität genutzt werden.

Dem direkten Assay auf Epoxidhydrolaseaktivität liegt 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin (NBP) zugrunde. Der durch die Reaktion von NBP mit Epoxiden gebildete Farbstoff kann nach Extraktion spektralphotometrisch nachgewiesen werden. Durch den Zusatz von Triethylglykoldimethylether konnte eine homogene Lösung erhalten werden, welche ohne einen weiteren Zentrifugations- oder Extraktionsschritt eine Absorptionsmessung des Chromophors zuläßt. Der Assay wurde für Styroloxid, Indenoxid, 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester und 1,2-Hexanoxid entwickelt und auf das Mikrotiterplattenformat übertragen. Die Validierung wurde in Gegenwart ganzer Mikroorganismen und lysierter Zellen durchgeführt. Dabei wurde auch der Einfluß verschiedener Basen auf den Assay untersucht, wobei eine Proportionalität zwischen der Menge an Epoxid und der Absorption ohne Zugabe von Base oder in Gegenwart von Triethylamin gefunden werden konnte. Über Absorptionsmessung läßt sich auf die Menge an zurückbleibendem Epoxid nach einer Biotransformation und somit auf die relative Aktivität der Epoxidhydrolase schließen. Umsetzungen von unterschiedlichen Epoxiden in Gegenwart verschiedener Stämme mit Epoxidhydrolaseaktivität wurden durchgeführt und die enzymatische Hydrolyse durch den NBP-Assay nachgewiesen.

Der Assay wurde auf eine Anlage zum Hochdurchsatzscreening programmiert, dort validiert und zur Durchmusterung der zwei Enzybibibliotheken verwendet. In beiden Enzybibibliotheken konnte keine Epoxidhydrolaseaktivität nachgewiesen werden.

Der Assay eignet sich also auch zur Suche in Stammsammlungen und wurde zum Screening einer *Streptomyces*-Stammsammlung benutzt. Dabei konnten erstmals Epoxidhydrolasen aus der Familie der *Streptomyces* gefunden werden. Epoxidhydrolasen konnten in den Stämmen *Streptomyces antibioticus* Tü4, *Streptomyces fradiae* Tü27 und *Streptomyces griseolus* Tü495 durch den NBP-Test identifiziert werden. Mit diesen Stämmen wurden Biotransformationen mit Styroloxid, 1,2-Decanoxid und 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester durchgeführt und die Enantiomerenüberschüsse über GC bestimmt. Dabei wurde der Einfluß verschiedener Cosolventien auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Enantiomerenüberschüsse untersucht. Die höchsten Enantiomerenüberschüsse konnten in Gegenwart von 10% (v/v) DMSO erreicht werden. Im 250 ml Maßstab konnte (*R*)-Styroloxid mit 82% *ee* und (*S*)-Phenyl-1,2-diol mit 72% *ee* bei 55% Umsatz ($E=13$) nach 24 Stunden Reaktionszeit isoliert werden. In der Hydrolyse von 1,2-Decanoxid konnte ein Enantiomerenüberschuß an Diol von 33% *ee* nach 17 Stunden und bei der Hydrolyse von 2,3-Epoxy-3-phenylpropionsäureethylester von 81% *ee* an Edukt nach zweieinhalb Stunden erreicht werden. Die beiden anderen Epoxidhydrolasen erwiesen sich gegenüber Styroloxid als wenig stereoselektiv ($E \approx 3-4$).

Der Stamm *Streptomyces antibioticus* Tü4 wurde im 30 L-Maßstab im Batch-Verfahren fermentiert. Der NBP-Assay wurde zum Aktivitätsnachweis in der Aufreinigung der Epoxidhydrolase angepaßt und zur Aufreinigung dieses *Streptomyces*-Stamms verwendet. Die Aufreinigung erfolgte durch einen Stufengradienten und wurde für den Anionenaustauscher Toyopearl Super Q 650 M optimiert. Zusammen mit der Epoxidhydrolase wurde in der Reinigung eine Esteraseaktivität neben einem Protein mit Häm-Gruppe nachgewiesen. Bei der nachfolgenden hydrophoben Interaktionschromatographie unter Verwendung verschiedener Materialien konnte keine weitere Aufreinigung erzielt werden. Auch durch Gelfiltration oder Verwendung von Hydroxylapatit konnte kein weiterer Reinigungseffekt erreicht werden. Mit der angereinigten Epoxidhydrolase wurden Biotransformationen durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen dabei den Umsetzungen mit Rohextrakt und die Epoxidhydrolase zeigte dabei eine zum Rohextrakt vergleichbare Aktivität.

6 Material und Methoden

6.1 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Verwendete Chemikalien oder Enzyme	Hersteller
1,2-Decanoxid, 2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester, 1,2-Hexanoxid, Phenylelessigsäurechlorid, Styroloxid, Wasserstoff- peroxid	Aldrich
Lipase aus <i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano, Japan
Trypton	DIFCO-Laboratories, Detroit, USA
Agar, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid, Bromphenol- blau, 3-Chlor-perbenzoesäure, Coomassie Brilliant Blue R250, Diethylether, Dimethylsulfoxid, Dithiothreitol, Dioxan, Eisessig, <i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimid, Ethylendi- amintetraacetat (Na-Salz), Formaldehyd 37 %, Formamid, Hefe- extrakt, <i>n</i> -Heptanol, <i>n</i> -Hexan, Inden, Isopropyl- β -thio-galakto- pyranosid, Lysozym, Magnesiumchlorid, Malzextrakt, Methanol, Methoxyethanol, Methylenchlorid, Natriumacetat, Natrium- borhydrid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natrium- hydroxid, Natriumdodecylsulfat, Natriumsulfat, Natriumthiosulfit, 4-Nitrophenol, 4-Nitrophenyl-chloroformiat, 1-Oktanal, Oktan- säurechlorid, PEG 6000, 4-Pentencarbonsäure, Phenol, 1-Phenyl- ethanol, (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3-Phenylglycidol, Phosphor-tribromid, Piperidin, Propionsäure, Pyridin (getrocknet über Molekularsieb), 4-Pyrrolidino-pyridin, Resorufin, Rhamnosemonohydrat, Salzsäure 35%, Schweineleberesterase, Silbernitrat, (<i>R</i>)-Styrol- oxid, (<i>S</i>)-Styroloxid, Tetrahydrofuran, <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -Tetramethyl- endiamin, Toluol, <i>p</i> -Toluolsulfonsäure, Triethylamin, Triethyl- orthoacetat, Triethylenglycoldimethylether, Triphosgen, Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan, Vinylacetat	Fluka, Buchs, Schweiz

Verwendete Chemikalien oder Enzyme	Hersteller
Vinylmagnesiumbromid (in abs. THF)	Fluka, Buchs, Schweiz
1 kb-Ladder (Standard für Agarosegele)	Gibco BRL GmbH, Eggenstein
Lipase aus <i>Rhizopus oryzae</i>	ITB
Restriktionsendonukleasen und Puffer, T4-DNA-Ligase, <i>Taq</i> -Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Big Dye Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit, QIAGEN Blut- u. Zellkultur-DNA Kit, QIAGEN Midi-Plasmid-Präparations-Kit, QIAquick Spin Gel Extraktion Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Essigsäure 100%, Ethanol 100%, Glycerin	Riedel-de Haen, Seelze
Ampicillin (Natrium-Salz), Ammoniumperoxodisulfat, Glycin, Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer, Rotiphorese NF-Harnstoff, Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30% für SDS-PAGE, Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40% für die Sequenzierung	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg

6.2 Verwendete Geräte und Materialien

Verwendete Geräte und Materialien	Hersteller
Analytische Dünnschichtchromatographie	
Platten mit Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck
Präparative Säulenchromatographie	
Glassäulen verschiedener Größe, Kieselgel A 60, Korngröße 0,04 – 0,063 mm	Merck

Verwendete Geräte und Materialien	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	
DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT	BioRad
Video Copy Processor P66E	Mitsubishi
BWM 9X Monitor	Javelin Electronics
UV-Leuchttisch	MWG-Biotech
Brutschränke	
WTE	Binder
UM 500	Memmert
DNA-Sequenzierung	
373A DNA Sequencer	Applied Biosystems
Macintosh Quadra 650	Apple
Fermentation	
Fermenter 30 L	Bioengineering
Gefriertrocknung	
Alpha I-5	Christ
Homogenisator	
Ultra Turrax T25 mit Dispergierstab S25N-25F	IKA-Labortechnik
Inkubatoren	
HAT-Schüttelinkubator	Infors
Kernresonanzspektroskopie	
AC 250 F	Bruker
Netzgeräte	
Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply	BioRad
SDS-PAGE	
Minigel-Twin G42	Biometra
Model 583 Gel Dryer	BioRad
PCR-Geräte	
DNA Thermocycler	Eppendorf
Pickroboter	
BioPick	BioRobotics

Verwendete Geräte und Materialien	Hersteller
Pipetierroboter	
Beckman 2000 mit Sideloader und Inkubator	Beckman
pH-Meter	
Digital pH Meter pH525	WTW
pH-Stat	
Impulsomat 614, pH-Meter 620, Dosmiat 665, Thermostatierbare Rührzelle	Metrohm
Kryostat C1	Haake
Flachschreiber	Linseis
Photometer	
Titertek Plus MS 212 für Mikrotiterplatten	ICN
Fluorostar	BMG
UV/VIS-Spektrometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Schmelzpunktbestimmung	
Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli	Büchi
Proteinaufreinigung	
Äktaexplorer, UNICORN V 2.1, Frac-900 Sammler, Butylsepharose 4, Phenylsepharose 6 Low u. High Sub., Octylsepharose 4 (HiTrap HIC Test Kit), Sephacryl S 200	Pharmacia Biotech
Hydroxylapatit	Calbiochem
Amberchrom	Tosso Haas
Toyperl DEAE 650 M, Toyoperl Super Q 650 M	
Dialysemembran Spectra/Por	Spectrum Medical
Thermomixer	
Thermomixer 5436	Eppendorf
Waagen	
Basic, MC1 Research RC 210 D	Sartorius

Verwendete Geräte und Materialien	Hersteller
Wasserbad	
Wasserbad B3	Haake-Fisons
Zellaufschluß	
Branson Sonifier 250	Branson
Sterivex-GP Filter (0,22 µm)	Millipore
Zentrifugen	
Eppendorf Zentrifuge 5417 C	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5415 R	
Universal 30 F	Hettich
KR 22i (Rotor: AK 500-11, 155 mm)	Jouan
G 412	Jouan
Sorvall RC-5B (Rotor: SA 578)	Du Pont Instruments

6.3 Verwendete Onlinedatenbanken und Software

Software	Hersteller
Protein- und Gensequenzierungen	
Sequence retrieval system (Swiss-Prot)	http://expasy.hcuge.ch/srs5
Proteinstrukturen	
Protein Database (PDB)	http://www.pdb.bnl.gov/pdb-bin/pdbmain
Pickroboter	
BioPick	BioRobotics
Pipettierroboter	
Bioworks 2.2	Beckman
Sequenzalignent	
ClustalW V 1.64b	http://pbil.ibcp.fr/NPSA/npsa_clustalw.html

6.4 Chemische Methoden

6.4.1 Chirale Kapillargaschromatographie

Säulenmaterial: FS-Cyclodex β -I/P CS Fused Silica Kapillarsäule (Heptakis-(3-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-pentyl)- β -cyclodextrin), 50 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, CS-Chromatographie Service, Langerwehe

Trägergas: H₂

Injektor: Split Injektor, Split-Verhältnis 1:100, Temperatur 200°C

Detektor: Flammenionisationsdetektor, Temperatur 200°C

Programme:

Buttersäure-1-phenyl-ethylester, Essigsäure-1-phenyl-ethylester, Essigsäure-1-phenyl-propylester, 1-Phenylethanol: 130°C isotherm, 60 kPa Druck

Isopropyliden-1,2-decandiol: 120°C isotherm, 130 kPa Druck

Styroloxid: 75°C isotherm, 130 kPa Druck

2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester: 130°C (60 min) - 10 K/min - 180°C (5 min), 60 kPa Druck

Die Zuordnung der Konfiguration der Enantiomere erfolgte durch Vergleich mit enantiomerenreinen Standards.

6.4.2 Kernresonanzspektroskopie

Alle in δ [ppm] angegebenen chemischen Verschiebungen beziehen sich auf Tetramethylsilan als innerer Standard. Als Lösungsmittel wurde CDCl₃ verwendet.

6.4.3 Arbeitsweise

Sämtliche Lösungsmittel wurden getrocknet. Die Umsetzungen erfolgen in ausgeheizten und mit Stickstoff belüfteten Apparaturen unter Feuchtigkeitsauschluss und Schutzgasatmosphäre.

6.5 Nährmedien, Puffer und Lösungen

6.5.1 Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB (Luria-Bertani)-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 L Wasser, pH-Wert auf 7,0 einstellen
Malzmedium	10 g Malzextrakt, 4 g Hefe, ad 1 L Leitungswasser, Glucose (4 g/L Endkonzentration) wird sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren zugegeben
TSS-Medium	89 ml LB-Medium, 10 g PEG 6000, 5 ml DMSO, 10 ml MgCl ₂ (1 M)

Für feste Medien wird vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar zugegeben. Medium zur Selektion von Transformanten wird Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml, sterilfiltriert) zugesetzt.

Zum Nachweis von Lipaseaktivität wird Tributyrin (1% (v/v)) zugegeben und die Lösung vor dem Autoklavieren mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

Zur Anfertigung eines Topagars mit NEPC werden 5 ml NEPC-Stammlösung zu 75 ml Agarlösung gegeben.

6.5.2 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer (10x)	0,1% Bromphenolblau, 50% Glycerin, 49,9% EDTA (0,5 M, pH 8)
Gelelektrophoresepuffer (TAE 50x)	15 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 18,6 g EDTA (Na-Salz), ad 1 L dH ₂ O
Agaroselösung	1% (m/v) Agarose, ad 1 L 1x TAE-Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Dialysepuffer	50 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 0,1% (v/v) Glycerin, 1 mM DTT, pH 8,0
SDS-Laufpuffer (5x)	15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS, ad 1 L dH ₂ O
Lysepuffer	100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mg/ml Lysozym, pH 8,0
Tris-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 od. pH 8,0
TE-Puffer (10:1)	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH-Wert 7,5 oder pH 8,0

Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml Wasser, sterilfiltriert
IPTG-Stammlösung	200 mg/ml Wasser, sterilfiltriert
NEPC-Stammlösung	3 mg/ml Ethanol
Rhamnose-Stammlösungen	L-(+)-Rhamnosemonohydrat, sterilfiltriert 20% (w/v) für 250 ml Kulturen, 5% (w/v) für 150 µl Kulturen
Xgal-Stammlösung	20 mg/ml <i>N,N</i> -Dimethylformamid

6.6 Stämme und Plasmide

6.6.1 Stämme

Organismus	Bezeichnung
<i>E. coli</i>	DH5α [F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r ⁻ km ⁺ k) <i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 D(lac-ZYA-argF)U169 f80dlacZΔM15</i> λ]
<i>Beauveria sulfurescens</i>	ATCC7159
<i>Rhodococcus</i> sp.	NCIMB11216

Organismus	Bezeichnung
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Tü4
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	Tü1424
<i>Streptomyces fradiae</i>	Tü27
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Tü1963
<i>Streptomyces griseus</i>	ATCC13273
<i>Streptomyces griseus</i>	Tü16
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	DSM40236
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> subsp. <i>apingens</i>	DSM41392
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	GJ10

6.6.2 Herkunft der Plasmide

pUC 18-Plasmid

Vektoren der pUC-Familie enthalten ein Gen, welches für ein α -Fragment der β -Galactosidase codiert [157]. Dieser Vektor zeigt die Eigenschaft der α -Komplementierung: eine Zelle, welche Deletionen am 5'-Ende des *lacZ*-Gens trägt, synthetisiert ein inaktives C-terminales Fragment der β -Galactosidase (ω -Fragment). Eine Zelle, welche eine Deletion am 3'-Ende des *lacZ*-Gens trägt, synthetisiert ein inaktives N-terminales Fragment der β -Galactosidase (α -Fragment). Wenn die Zelle jedoch beide Gene für die Fragmente besitzt, dann wird β -Galactosidaseaktivität beobachtet. Viele Vektoren besitzen ein *lac* α -Genfragment, welches klein und leicht veränderbar ist. Die Verwendung dieser Vektoren erfordert einen Stamm, welcher das ω -Fragment Gen besitzt um einen aktiven Komplex zu erhalten. Dieses Gen befindet sich oft auf einem F'-Plamid. Wenn ein solcher Vektor verwendet wird, dann können Zellen, die diesen enthalten, selektioniert werden. Auf Medium mit IPTG, welches den *lac*-Repressor und damit die Transkription inhibiert und in Gegenwart von Xgal, das über enzymatische Spaltung durch die β -Galactosidase in einen blauen Farbstoff gespalten wird, werden diese Zellen dann blau.

pJOE 2792.1-Plasmid

Der high copy Expressionsvektor pJOE 2792.1 basiert auf dem Vektor pBTAC1. Einige Modifikationen wurden vorgenommen, wie z.B. wurde der Replikationsursprung (ori) gegen den Replikationsursprung von pBR322 (Stratagene) und der pBTAC1-Promotor gegen den durch Rhamnose-induzierbaren rhaB-Promotor aus *E. coli* JM109 ausgetauscht. Das Rhamnosepromotorsystem ähnelt dem Regulationssystem im Arabinosestoffwechsel von *E. coli*. Rhamnosemoleküle wirken als Induktor und binden an Aktivatorproteine in der Zelle. Dieser Induktor-Aktivator-Komplex bindet seinerseits an eine Promotorsequenz (rhaBAD) und die Transkription des stromabwärts liegenden Gens wird initiiert. Der Vektor verfügt über das *bla*-Gen, welches für die β -Lactamase codiert und als Selektionsmarker dient. Beim Rhamnosepromotor handelt es sich um ein positiv reguliertes Aktivatorsystem, die basale Expressionsrate eines stromabwärts gelegenen Gen ist vernachlässigbar gering und die Induktion ist leicht durch Zugabe von Rhamnose regulierbar.

pCYTEXP1-BTL2-Plasmid

Das Plasmid pCYTEXP1-BTL2 (6,2 kb) trägt die starken Bakteriophagen- λ -promotoren R_R und P_L , welche durch den durch das *cIts857*-Gen codierten temperatursensitiven Repressor kontrolliert werden. Das Plasmid erlaubt eine starke Expression des inserierten Gens in *E. coli*. Bei einer Temperatur zwischen 30-37°C wird der Repressor exprimiert und bindet an den λP_L -Promotor. Ab 42°C wird das Repressorgen inaktiviert und das Repressorprotein kontrolliert den λP_L -Promotor nicht mehr. Dies führt zur Expression der Lipase aus *Bacillus thermocatenulatus* BTL2.

pCYTEXP1-BTL2-Asp- und Asp/Pro-Plasmid

Das Plasmid pCYTEXP1-BTL2-Asp entspricht dem Plasmid pCYTEXP1-BTL2, allerdings codiert das Plasmid statt für Serin im aktiven Zentrum der BTL für Asparaginsäure (H147D). Im Plasmid pCYTEXP1-BTL2-Asp/Pro findet sich zusätzlich eine Mutation, welche für Prolin codiert (T46P). Beide Plasmide wurden von M. Enzelberger (ITB) zur Verfügung gestellt.

6.6.3 Stammhaltung

Stammhaltung auf festen Nährböden

Die Stämme werden auf Agarplatten (LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotika bzw. Malzmediumplatten) bei 37°C (LB-Agarplatten) bzw. 30°C (Malzmediumplatten) über Nacht inkubiert und bei 4°C gelagert.

Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Langzeitlagerung wird eine *E. coli*-Kolonie von der Agarplatte in 3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (100 µg/ml) angeimpft und bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,5-1 bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Erstellung eines Glycerinstocks von *Streptomyces*-Stämmen wird in 3 ml Malzmedium bei 30°C unter Schütteln 48 Stunden kultiviert.

Zu 500 µl der Kulturlösung wird 500 µl Glycerin gegeben, gemischt und die Glycerinkultur bei – 80°C gelagert.

6.6.4 Anzucht in Flüssigmedien

Ausgehend von einer *E. coli*-Einzelkolonie von der Agarplatte wird 3 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraus werden Kulturen mit LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 210 U/min bis zum Erreichen der gewünschten optischen Dichte inkubiert.

Bei *Streptomyces*-Stämmen wird mit Sporen von einer Agarplatte 3 ml Malzmedium angeimpft und 48 Stunden bei 30°C inkubiert. Daraus werden Kulturen mit Malzmedium im Verhältnis 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 30°C und 210 U/min inkubiert.

6.6.5 Messung der Zelldichte

Das Wachstum von *E. coli* wird durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 578 nm gegen Medium verfolgt. Für *E. coli*-Kulturen gilt im Bereich $OD_{578\text{ nm}}$ von 0 bis 0,3:
 $OD_{578\text{ nm}} = 5 \times 10^8 \times (\text{Zellen} / \text{ml})$.

6.6.6 Induktion

Induktion mit Rhamnose

Induktion von 250 ml Kulturen:

Hierzu wird aus einer 5 ml Übernachtskultur eine 250 ml Kultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und die Zellen vier Stunden bis zum Erreichen von $OD_{578\text{ nm}} = 0,4$ bei 37°C auf dem Schüttler (210 U/min) im Schikanekolben inkubiert. Es wird mit Rhamnoselösung (0,2% (w/v) Endkonzentration) vier Stunden bei 37°C induziert.

Die Zellen werden dann 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Es wird zweimal mit 40 ml TE-Puffer (0,1 M, pH 8) gewaschen, in 30 ml TE-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen.

Induktion in Mikrotiterplatten:

Zu einer 150 μl Kultur wird mit Hilfe des Pipettierroboters Rhamnoselösung (0,2% (w/v) Endkonzentration) zugegeben und vier Stunden bei 37°C auf dem Schüttler (210 U/min) induziert.

Induktion mit IPTG

Induktion von Kulturen:

Eine 250 ml Kultur wird, wie zuvor beschrieben, bis zum Erreichen von $OD_{578\text{ nm}} = 0,8$ bei 37°C inkubiert und dann IPTG-Lösung (Endkonzentration 0,1 mM) zugegeben. Es wird vier Stunden bei 37°C weiterkultiviert und die Zellen wie bei der Induktion mit Rhamnose beschrieben geerntet.

Induktion zum Nachweis der α -Komplementierung auf Agarplatte:

Auf einer Agarplatte mit einem Selektionsantibiotikum werden 40 μl einer Xgal-Stammlösung und 4 μl IPTG-Stammlösung vor dem Transformationsansatz ausgestrichen.

6.7 Zellvereinzelung in Mikrotiterplatten

Um große Mutantenbibliotheken durchmustern zu können, müssen die einzelnen Klone in diskrete Reaktionskompartimente, wie z.B. in Mikrotiterplatten, vereinzelt werden.

6.7.1 Vereinzelnung mit dem Pickroboter

Der Pickroboter BioPick nimmt über eine CCD-Kamera das Bild einer Agarplatte auf und erfaßt mittels eines Bilderkennungssystems dabei die Lage einzelner Kolonien, welche dann von einer Nadel gepickt und in mit geeignetem Nährmedium gefüllte Mikrotiterplatten überführt werden. Die Parameter wurden der Anzahl der Kolonien und ihrem Durchmesser angepaßt.

6.8 Zellaufschluß

6.8.1 Zellaufschluß mit Ultraschall

Das Pellet wird in 10-30 ml TE-Puffer (0,1 M, pH 8,0) resuspendiert und zweimal fünf min mit einer Minute Pause auf Eis mit Ultraschall behandelt (80 W, Pulse 35% s^{-1}). Es wird 45 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Zellextrakt wurde dann durch einen 0,22 μ m Sterivex-GP Filter filtriert.

6.8.2 Zellaufschluß mit Lysozym in Mikrotiterplatten

Zu Kulturen in Mikrotiterplatten wird 50 μ l Lysepuffer zupipettiert und bei 10°C eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte 30 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit dem Pipettierroboter abgenommen.

6.9 Biochemische Methoden

6.9.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Durch die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) können Proteine im analytischen oder präparativen Maßstab nach Größe von entfalteter oder gefalteter Proteinkette (SDS- und native PAGE) oder nach dem relativen Gehalt an sauren und basischen Gruppen (Isoelektrische Fokussierung, IEF) aufgetrennt werden [158]. Die Proteine wandern unter dem Einfluß eines elektrischen Felds durch die Poren eines Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Ladung der Proteine, der Porengröße und der angelegten Spannung abhängt. Bei der nativen PAGE erfolgt die Auftrennung der Proteine unter nicht denaturierenden Bedingungen, während bei der SDS-PAGE die Proteine durch den Zusatz von SDS denaturiert werden und eine proportional zu ihrem Molekulargewicht negative Ladung tragen.

Herstellung des SDS-Gels, Durchführung der Gelelektrophorese, Proteinfärbung

Zuerst wird ein 12,5%iges Trenngel gegossen, welches mit Isopropanol überschichtet wird. Nach einer Polymerisationsdauer von 20 min wird das Isopropanol abgegossen, mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingesetzt. Der Probenkamm wird nach 20 min entfernt und die Proben aufgetragen. Die Proben werden dazu mit 2x SDS-Probenpuffer verdünnt, fünf min bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert.

Als Proteinstandard dient ein Proteingemisch, von dem 10 µl auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgt für zehn min bei 10 mA, dann wird die Stromstärke auf 25 mA erhöht und die Elektrophorese bis die Bande des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreicht durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird das Gel 30-60 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung bis zum Sichtbar werden von Proteinbanden und klarem Hintergrund entfärbt. Das Gel wird dann im Gelrockner zwei Stunden unter Vakuum getrocknet.

Puffer und Lösungen für SDS-Gele

Puffer	Zusammensetzung
4x Sammelgel-Puffer	12,1 g Tris, 0,8 g SDS, ad 200 ml ddH ₂ O, mit Salzsäure auf pH 6,8 einstellen
4x Trenngel-Puffer	36,5 g Tris, 0,8 g SDS, ad 200 ml ddH ₂ O, mit Salzsäure auf pH 8,8 einstellen
Sammelgel (4%)	0,52 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30%, 1 ml 4x Sammelgel-Puffer, 2,47 ml ddH ₂ O, 4 µl TEMED, 40 µl APS 10% (m/v)
Trenngel (12,5%)	3,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30%, 2 ml 4x Trenngel-Puffer, 2,67 ml ddH ₂ O, 4 µl TEMED, 40 µl APS 10% (m/v)
2x SDS-Proben-Puffer	100 mM Tris, 200 mM DTT, 4% (m/v) SDS, 0,2% (m/v) Bromphenolblau, 20% (m/v) Glycerin, ad 10 ml ddH ₂ O
Elektrophorese-Puffer	6 g Tris, 28,8 g Glycin, 2 g SDS, ad 2 L ddH ₂ O, mit Salzsäure auf pH 8,3 einstellen
Coomassie-Färbelösung	2,5 g/L Coomassie-Brilliant Blue R-250, 42,5% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure 100%
Entfärbelösung	40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure 100%, 50% (v/v) dH ₂ O

6.9.2 Zusammensetzung des Proteinstandards (BioRad)

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase B	97,4 kDa
BSA	66,2 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa
Carboanhydrase	31,0 kDa
Trypsininhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,4 kDa

6.9.3 Esterase-Aktivitätsfärbung

Um Lipaseaktivität in einem Proteingel nachzuweisen, wird das Gel 30-60 min lang in 50 ml Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,5) mit 0,5% (w/v) Triton X-100 renaturiert und anschließend in der Mischung einer Lösung von 20 mg α -Naphthylacetat (in 5 ml Aceton gelöst) in 50 ml Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 7,5) und einer Lösung von 50 mg Fast Red in demselben Puffer gefärbt.

6.9.4 Photometrischer Assay auf Esteraseaktivität

Es werden zu 150 μ l Proteinextrakt aus der Aufreinigung 10 μ l *p*NPA-Lösung (10 mM) in DMSO zugegeben und bei 30°C inkubiert. Um die spontane Hydrolyse von *p*NPA zu quantifizieren, wird eine Blindprobe aus der Aufreinigung ohne Protein durchgeführt. Der Verlauf der Absorption bei 405 nm wird über die Zeit verfolgt.

6.9.5 pH-Stat-Assay zur Aktivitätsbestimmung der BTL

Der pH-Stat-Assay wird benutzt um Lipaseaktivität zu bestimmen. Als Grundlage dient die Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Triglycerids, wie z.B. Tributyrin. Durch die freigesetzte Fettsäure kommt es zu einem Absinken des pH-Werts, der durch automatische Zugabe von Natronlauge auf einen vorher eingestellten Wert konstant gehalten wird. Der Verbrauch an Natronlauge pro Zeiteinheit wird auf einem Schreiber festgehalten. Ein Unit (U) an Lipaseaktivität entspricht der Freisetzung von 1 μ mol Fettsäure pro Minute.

Zur Bestimmung von Lipaseaktivität werden 200 ml Lösung A und 470 μ l Lösung B in das temperierbare Reaktionsgefäß gegeben, die Lösung auf 37°C erwärmt und ein pH-Wert von 7 eingestellt. Es wird dann eine definierte Menge an Enzym zugegeben und der Verbrauch an Natronlauge gegen die Zeit auf einem Schreiber aufgenommen. Die Enzymaktivität wird durch graphische Differentiation im Bereich der größten Steigung bestimmt.

Lösung A: Zu 200 ml 2% (w/v) Gummi arabicum-Lösung in Wasser werden 10 g Tributyrin gegeben und die Emulsion fünf min mit einem Ultra-Turrax homogenisiert.

Lösung B: 22% (w/v) CaCl_2 -Lösung.

6.9.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt unter Verwendung des „BCA-Protein Assay Reagent-Kits“ von Pierce. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} durch Proteine zu Cu^+ , welche mit Bicinchoninsäure unter Bildung eines bei 562 nm absorbierenden Komplexes detektiert werden können. Mit diesem „enhanced assay“ können Proteinkonzentrationen von 5-250 $\mu\text{g/ml}$ nach Anleitung des Herstellers bestimmt werden.

6.9.7 Fermentation von *Streptomyces antibioticus* Tü4

Es werden zwei Schüttelkolben mit je 1 L Malzmedium mit Sporen von *Streptomyces antibioticus* Tü4 angeimpft und 48 Stunden lang geschüttelt (30°C, 210 U/min).

Mit 2 L Vorkultur werden 20 L Malzmedium (Zugabe von 0,5 L 20%iger steriler Glucoselösung zu 20 L Malzmedium) angeimpft. Es wird im 25 L Fermenter bei 30°C 24 Stunden gerührt (17 L/min O_2 , 200 U/min) und dann die Fermentation abgebrochen. Die Zellen werden bei 4000 U/min 30 min abzentrifugiert und mit TE-Puffer (0,1 M, pH 7,5) gewaschen. Die Biofeuchtmasse beträgt 318 g. Die Zellen werden in 400 ml TE-Puffer resuspendiert.

6.9.8 Proteinaufreinigung

Bei allen folgenden Proteinaufreinigungen wurde die Proteinbestimmung bei 280 nm und die Bestimmung der Menge an Häm-Gruppen bei 417 nm durchgeführt.

Anionentauscherchromatographie

Eine mit Anionentauscher gefüllte Säule (XK16/20-Säule, 60 ml Packvolumen) wird mit 25 ml Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,1) äquilibriert und dann 10 ml des Rohextraktes aufgebracht. Als Säulenmaterial wird Toyoperl Super Q 650 M (1800 TP/m) und Toyopearl DEAE-650M (1600 TP/m) verwendet. Zuerst wird ein linearer Gradient von 0-1 M NaCl in 0,1 M Tris/HCl-Puffer bei pH 8,1 verwendet. Eine weitere Verbesserung der Aufreinigung erfolgt über einen Stufengradienten. Es wird mit folgendem Gradienten eluiert:

1. Gradient: 60 ml NaCl-Lösung (0-120 mM),
 2. Gradient: 40 ml NaCl-Lösung (120-230 mM),
 3. Gradient: 15 ml NaCl-Lösung (230-260 mM),
- spülen mit 35 ml NaCl-Lösung (1 M), Reäquilibration mit 60 ml Tris/HCl-Puffer.
Der Fluß beträgt vier ml/min und die Fraktionsgröße vier ml.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Es werden vorgepackte HiTrap HIC-Materialien (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow high sub. und low sub., Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Octyl Sepharose 4 Fast Flow) verwendet. Die Säulen werden mit 15 ml 2 M NaCl bzw. 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert (Fluß: ein ml/min, pH 7-9, Fraktionsgröße: ein ml), Protein aus der Aufreinigung über Anionentauscher (ein ml nach Dialyse und Einstellen der Salzkonzentration) aufgebracht und mit NaCl bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 mM – 0 mM) gegen Wasser bzw. Cholatlösung (1% (w/v)) über 15 ml linear eluiert.

Aufreinigung mit Hydroxylapatit

Eine mit Hydroxylapatit gefüllte Säule (XK16/20, 200 ml Packvolumen, 1500 TP/m) wird mit 150 ml Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,1) äquilibriert und 10 ml des Rohextraktes aufgebracht. Es wird ein linearer Gradient von 0-1 M NaCl über 250 ml verwendet, mit 200 ml 1 M NaCl gespült und mit 200 ml Tris/HCl-Puffer reäquilibriert (Fluß: zwei ml/min, Fraktionsgröße: vier ml).

Gelfiltration

Protein aus der Anionentauscheraufreinigung wird dialysiert und eine Salzkonzentration von 1 M NaCl eingestellt. Zur Gelfiltration mit Sephacryl S 200 wird eine konstante Konzentration von 1 M NaCl verwendet (XK16-Säule, 250 ml Volumen, 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,1, Fluß: ein ml/min, Fraktionsgröße: ein ml).

6.9.9 Dialyse

Fractionen aus der Proteinaufreinigung (vier ml) werden in einer Dialysemembran unter Rühren gegen 2 L Dialysepuffer bei 8°C 20 Stunden unter Rühren dialysiert.

6.9.10 Proteinblotting für die N-terminale Sequenzierung (Western-Blot)

Nach der SDS-PAGE wird das Gel 15 min in Kathoden-Puffer geschwenkt. Es werden Filterpapiere in der Größe des Gels geschnitten und diese zehn min in Anoden 1-Puffer (Filterpapier 1), Anoden 2-Puffer (Filterpapier 2) bzw. Kathoden-Puffer (Filterpapier 3) gelegt. Die PVDF-Membran wird einige Sekunden in Methanol getaucht und dann drei min in Anoden 2-Puffer inkubiert. Von der Anode zur Kathode wird zuerst Filterpapier 1, dann Filterpapier 2, die PVDF-Membran, das Gel und zuletzt das Filterpapier 3 übereinander gelegt. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen werden durch Pressen entfernt und 30 min bei 15 V geblottet. Die Membran wird 15 min mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und dann bis zum Sichtbar werden von Proteinbanden in Entfärbelösung entfärbt. Die Membran wird mit Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Sequenzierung wird mit einem Gasphasensequenzierer nach dem Prinzip des Edman-Abbaus durchgeführt. Die Aminosäurezusammensetzung wird durch Vergleich mit einem Standardprotein bestimmt (β -Lactoglobulin).

Puffer zum Proteinblotting

Puffer	Zusammensetzung
Anoden 1-Puffer	0,3 M Tris, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4
Anoden 2-Puffer	25 mM Tris, 10% (v/v) Methanol, pH 10,4
Kathoden-Puffer	25 mM Tris, 40 mM 6-Aminocapronsäure, 10% (v/v) Methanol, pH 9,4
PVDF-Membran-Färbelösung	0,025% (m/v) Coomassie Blue R-250, 40% (v/v) Methanol
PVDF-Membran-Entfärbelösung	50% (v/v) Methanol

6.10 Molekulargenetische Methoden

6.10.1 Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1985 von K. Mullis entwickelt und dient zur Amplifikation einer Ausgangs-DNA (template) [159]. Dabei werden drei verschiedene Reaktionsschritte bis zu 40 mal durchlaufen. Zuerst findet die Denaturierung des Template-DNA-Doppelstrangs bei ca. 95°C statt (Denaturierungsschritt). Die dabei entstehenden DNA-Einzelstränge paaren im zweiten Reaktionsschritt (Annealing-/Anlagerungsschritt) bei 45-65°C (abhängig von der Schmelztemperatur des Primers bzw. des Templates) mit dem jeweils komplementären DNA-Primer. Im dritten Schritt kommt es zur DNA-Synthese von zwei Strängen durch Verlängerung der beiden Primer am 3'-Ende durch eine thermostabile Polymerase bei 68-72°C (Extensionsschritt). Das Produkt dieser Reaktion steht dann als Template für weitere Zyklen zur Verfügung. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Zunahme an Template-DNA.

Die Annealing-Temperatur T_a berechnet sich zu: $T_a = T_m - 5^\circ\text{C} = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^\circ\text{C}$, wobei T_m für die Schmelztemperatur und A, T, G und C für die Anzahl der entsprechenden Basen des Oligonukleotids steht.

Allg. PCR-Bedingungen

DNTP-Mix (2,5 mM)	8 μl
10x Polymerase-Puffer (100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mM Tris/HCl pH 8,8, 20 mM MgSO_4 , 1% (w/v) Triton X-100)	10 μl
MgCl_2 (25 mM)	10 μl
Zwei Primer (je 100 pmol)	je 1 μl
Template DNA	2 μl
ddH ₂ O	68 μl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/ μl)	1 μl

6.10.2 Error-prone Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation des Templates werden vier Ansätze pipettiert, wobei sich in jedem eines der vier Nukleotide im 10-fachen Unterschuß befindet (0,25 mM statt 2,5 mM). Die erhaltenen Fragmente werden durch Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

Error-prone PCR-Bedingungen

dNTP-Mix (0,25 mM bzw. 2,5 mM)	10 µl
10x Polymerase-Puffer	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	23 µl
MnCl ₂ (5 mM)	20 µl
Primer PR V (100 pmol)	1 µl
Primer PR R (100 pmol)	1 µl
Template DNA (pJOE 2792.1 PFE Asp)	1 µl
ddH ₂ O	40 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl)	4 µl

Temperaturprogramm: 95°C (3 min) – 95°C (1 min) – 72°C (3 min) – 72°C (10 min), 34 Zyklen.

Primer für error-prone PCR

PR V: 5' ATC GGT CGA CGC TCT CCC TTA TGC G 3'

PR R: 5' TGG CAG TTC CCT ACT CTC GCA TGG G 3'

6.10.3 Punktgerichtete Mutagenese durch PCR (“Drei-Primer-Methode”)

Die PCR-Reaktion stellt eine einfache und schnelle Art dar, spezifische Mutationen in einem Gen einzuführen [160-161]. Für die zweistufige Reaktion werden drei universelle Primer benötigt, von denen der eine am 5'-Ende des zu mutierenden Gens bindet (SDM1), die beiden anderen Primer binden am 3'-Ende auf dem anderen Strang (SDM2 und SDM3). Der Mutageneseprimer (MUT) enthält die zu verändernden Nukleotide. Der Mutageneseprimer 2 (SDM2) besitzt an seinem 5'-Ende Basen, die nicht mit dem Template hybridisieren können. Es werden zwei getrennte PCR-Reaktionen mit den Primern SDM1 und SDM2 und den Primern MUT und SDM3 durchgeführt. Die Produkte werden über Gelextraktion (QIAquick Spin Gel Extraktion Kit) aufgereinigt. Die erhaltenen Fragmente werden als Template für eine dritte PCR-Reaktion mit den Primern SDM1 und SDM3 eingesetzt (Abbildung 46). Das so erhaltene Fragment mit der Mutation wird wie zuvor beschrieben aufgereinigt, zuerst mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI und dann mit *Nde*I geschnitten.

Temperaturprogramm:

95°C (7 min) – 95°C (1 min 30 s) – 60°C (1 min 30 s) – 72°C (2 min) – 72°C (7 min),
25 Zyklen

Primer für die Mutagenese von pJOE 2792.1

SDM1: 5' CTC CCC GGG CAC CAT ATG AGC ACA TTT GTT GCA 3'

SDM2: 5' GTC GCT GAT GGG ATC CGC GTT TCA AGA ACG 3'

SDM3: 5' GTG ACC CTG GTG GGC TTC GAC ATG GGC GGC GGC GAT G 3'

MUT: 5' GCA AAT TCT GTT TTA TCA GAC CGC TTC TGC 3'

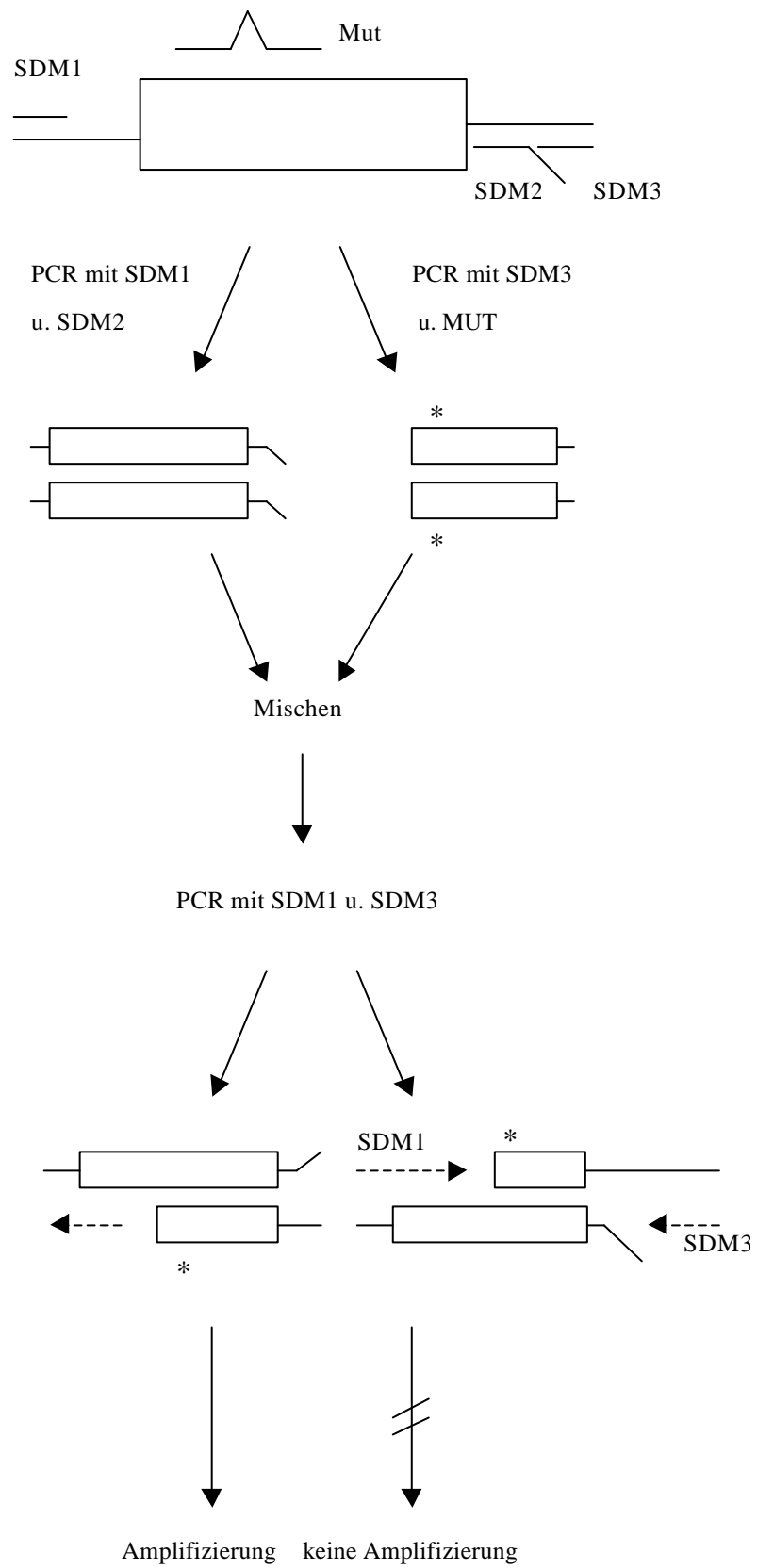


Abbildung 46: Schema der "Drei-Primer-Methode".

6.10.4 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die analytische bzw. präparative Auftrennung von DNA unterschiedlicher Molekularmasse erfolgt durch Elektrophorese in einem Agarosegel. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Porengröße der Agarose, der angelegten Spannung und der Größe der DNA-Moleküle abhängt. Um einen Zusammenhang zwischen Molekülgröße und -masse zu erhalten, muß die DNA linear vorliegen. Um DNA im UV-Licht sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid verwendet, welches sich in die DNA-Helices einlagert und im UV-Licht fluoresziert.

Agarose wird durch Erhitzen in der Mikrowelle in Lösung gebracht und Ethidiumbromid (0,001%) zugegeben. Die Probe wurde mit dem gleichen Volumen Probenpuffer gemischt und die Elektrophorese bei 120 V und etwa 70 mA 30 min durchgeführt. Als Standard dient der 1 kb DNA-Ladder. Die Detektion erfolgt bei 480 nm über das in die DNA intercalierte Ethidiumbromid. Bei der Intensität der Banden muß berücksichtigt werden, daß kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal ergeben, da sie weniger Ethidiumbromidmoleküle einlagern können als längere DNA-Fragmente.

Agarosegeleextraktion

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und die interessierende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion wird dann mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit durchgeführt. Die Methode basiert auf der selektiven Bindung von negativ geladener DNA an eine modifizierte positiv geladene DEAE-Matrix. Der Gelstreifen wird in drei Äquivalenten Solubilisierungspuffer (w/v) versetzt und fünf bis zehn min bei 50°C in einem Thermoschüttler erwärmt, bis das gesamte Gel gelöst ist. Die Lösung wird auf eine Säule aufgebracht und eine min bei 14000 U/min zentrifugiert. Bei der Aufreinigung von Fragmenten mit weniger als 500 bp oder mehr als 5000 bp wird anschließend ein Äquivalent (w/v) Isopropanol zugesetzt und erneut wie zuvor zentrifugiert. Zum Waschen werden 750 µl einer Puffer/Ethanol-Mischung verwendet und nochmals zentrifugiert. Nach Abschütten des Eluats wird erneut zentrifugiert. Eluiert wird mit 30 µl Wasser, welches die DNA von der Säule löst und nach einer Minute wird die DNA durch Zentrifugation (14000 U/min, eine min) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Plasmidpräparationen

Die Plasmidpräparationen werden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim u. Doly durchgeführt [163]. Für Untersuchungen von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen wird die Methode des Flexi-Prep als Schnelltest eingesetzt und zur Verwendung in Sequenzierungsreaktionen wird das QIAprep Spin Plasmid Purification Set verwendet.

Flexi-Prep

Aus einer 3 ml Übernachtskultur werden 1,5 ml abgenommen und durch Zentrifugation geerntet (14000 U/min, eine min). Das Pellet wird in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und die Zellen resuspendiert. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung zur alkalischen Lyse auf Eis für zehn Minuten aufgeschlossen und das Reaktionsgefäß 4-6 mal durch Umdrehen gemischt. Zur Neutralisation wird 200 µl Neutralisationspuffer zugegeben, das Gemisch durch Umdrehen 4-6 mal vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und die chromosomale DNA wird zusammen mit Zelltrümmern abzentrifugiert (14000 U/min, 15 min). Die DNA befindet sich in gelöster Form im Überstand, der abgenommen wird. Die DNA wird durch Zugabe von 400 µl Isopropanol bei Raumtemperatur für zehn min gefällt. Die gefällte DNA wird zehn min bei 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen. Es wird erneut 15 min bei 14000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet im Vakuum getrocknet. Das Pellet wird dann in 20 µl Wasser wieder aufgenommen.

Resuspensionspuffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A
Lösung zur alkalischen Lyse	0,2 M NaOH, 1% (m/v) SDS
Neutralisationslösung	5 M KOAc, pH 5,5

QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparations-Kit

Das Miniprep-Plasmid Kit wird nach den Anweisungen des Herstellers benutzt. Hierzu werden aus 1 bis 5 ml Übernachtskultur bis zu 20 µg Plasmid-DNA isoliert. Mit einer einzelnen Kolonie werden 1 bis 5 ml LB-Medium beimpft und über Nacht bei 37°C (250 U/min) inkubiert.

Dann werden 1-2 ml der Übernachtskultur zentrifugiert (14000 U/min, eine min) und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Dann werden 250 µl Puffer 2 zugegeben und das Reaktionsgefäß 4-6 mal durch Umdrehen gemischt, bis die Lösung viskos wird. Das viskose Lysat wird fünf min bei Raumtemperatur inkubiert und es werden 350 µl Neutralisationspuffer N zugegeben. Das Gemisch wird durch Umdrehen 4-6 mal durchgemischt und dann bei 14000 U/min für zehn min zentrifugiert. Während der Zentrifugation wird eine QIAprep-Säule in ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt und der Überstand aus der Zentrifugation wird durch Dekantieren auf die Säule aufgebracht. Die Säule mit dem Sammelröhrchen wird anschließend eine min bei 14000 U/min zentrifugiert und das Eluat wird verworfen. Die QIAprep-Säule wird mit 500 µl Puffer PB gewaschen um Nuklease-Aktivität oder gebundene Kohlenhydrate aus *E. coli*-Stämmen, wie z.B. aus der JM-Familie, zu entfernen und 30 s bei 14000 U/min zentrifugiert. Die DNA wird durch Zugabe von 750 µl Puffer PE gewaschen und der Waschpuffer durch Zentrifugation (14000 U/min, eine min) entfernt. Das Eluat wird verworfen und die Säule eine Minute weiterzentrifugiert. Die Säule wird in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und 50 µl Wasser aufgegeben. Zum Lösen der DNA wird eine min inkubiert und dann bei 14000 U/min eine min zentrifugiert.

Midi-Plasmid-Präparations-Kit

Eine 50-100 ml Kultur wird über Nacht bei 37°C und 210 U/min inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C geerntet (5000 U/min, zehn min). Das Pellet wird in 4 ml Puffer 1 resuspendiert und 4 ml Puffer 2 zur Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wird vorsichtig gemischt und nach fünf min bei Raumtemperatur werden 4 ml Puffer 3 zugegeben. Es wird 15 min auf Eis inkubiert und dann 30 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert oder abpipettiert und auf eine mit 4 ml Puffer QBT voräquilibriumierte Säule (Qiagen-tip 100) aufgebracht. Die DNA wird zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wird durch Zugabe von 350 µl Isopropanol gefällt und bei 15000 U/min und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der

Überstand wird vorsichtig abgeschüttet und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Es wird für 15 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet. Die DNA kann in 150-300 µl Wasser oder TE-Puffer wieder aufgenommen werden.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer 1	50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0
Puffer 2	0,2 M NaOH, 1% SDS (w/v)
Puffer 3	5 M KOAc (60% (v/v), Eisessig (11,5% (v/v)), Wasser (28,5% (v/v))
Puffer QBT	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, Isopropanol (15% (v/v)), Triton X-100 (0,15% (w/v))
Puffer QC	1 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, Isopropanol (15% (v/v))

Bestimmung der DNA Konzentration

Für Ligationen und Restriktionsanalysen wird die DNA-Menge über Gelelektrophorese abgeschätzt. Für die Sequenzierung wird die DNA-Menge über eine Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer Menge von 50 µg doppelsträngiger DNA [164].

6.10.5 Ethanolfällung

Die Lösung der zu fällenden DNA wird mit 1/10 Volumenteil Natriumacetat (3 M) versetzt und 2,5 Volumenteile eisgekühlter Ethanol (100%) zugegeben. Es wird auf Eis oder bei - 80°C eine halbe Stunde gefällt, 25 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird abdekantiert und das DNA-Pellet mit 2,5 Volumenteilen Ethanol (70%) gewaschen. Anschließend wird erneut für 20 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet im Exsikkator im Vakuum getrocknet.

6.10.6 Restriktionsanalysen

Für analytische oder präparative Restriktionsanalysen werden 0,5-1 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10-50 µl mit 1-2 Units der betreffenden Restriktionsendonuklease im entsprechenden Puffer geschnitten. Die Analysen werden ein bis zwei Stunden bei der für das Enzym optimalen Temperatur durchgeführt.

Nach dem Verdau wird die DNA für analytische Zwecke direkt auf ein Agarosegel aufgetragen. Falls die geschnittene DNA für eine Ligationsreaktion oder eine weitere Restriktionsanalyse unter anderen Pufferbedingungen verwendet werden soll, wird eine Ethanolfällung oder eine Gelextraktion durchgeführt.

6.10.7 Dephosphorylierung mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

Mit Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) werden 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA abgespalten. Damit kann eine Selbstligation der Vektor-DNA vermieden werden.

Pro µg DNA wurden 2 – 3 U CIAP mit 5 µl 10x CIAP-Puffer in 50 µl bei 37°C zwei Stunden inkubiert, das Enzym für zehn min bei 75°C denaturiert und anschließend die DNA durch Gelextraktion, Ethanolfällung oder durch das QIAprep Spin Prep PCR-Produktreinigungs-Kit gereinigt.

6.10.8 Ligation von DNA mit T4-DNA-Ligase

T4-DNA-Ligase katalysiert unter Beteiligung von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden von DNA. Dadurch können zwei lineare DNA-Moleküle verbunden oder ein lineares DNA-Stück zyklisiert werden.

Zur Ligation wird die DNA-Lösung mit 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) und Wasser gemischt (Endvolumen 10 µl). Die Mischung wird eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wird für die Transformation in *E. coli* DH5α verwendet.

6.10.9 Transformation in *E. coli* (PEG/DMSO-Methode)

Herstellung von kompetenten Zellen nach Chung et al. [165]

Aus einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α ohne Antibiotikazusatz werden 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Es wird bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD_{578 nm} von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Kultur wird mit 3500 U/min zehn min lang bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml TSS-Medium resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis werden die kompetenten Zellen in 200 μ l Aliquots aufgeteilt oder nach Frieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Die Aliquots werden dann direkt zur Transformation verwendet.

*Transformation von kompetenten *E. coli* DH5a-Zellen*

Zur Transformation werden 200 μ l Aliquots kompetenter Zellen mit entweder 1 μ l Plasmid (Retransformation eines Plasmids) oder 10 μ l Ligationsmischung versetzt, kurz gemischt und auf Eis 20 min inkubiert. Der Transformationsansatz wird 45 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert und dann 1 ml LB-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wird eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellen bei 4000 U/min (eine min, 4°C) abzentrifugiert werden. Es wird 1 ml Überstand abgenommen und die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert. Bei der Transformation von Ligationsmischungen wird die gesamte Zellsuspension, im Fall einer Retransformation 50 μ l, auf einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten werden bei 37°C 16 Stunden inkubiert und bei 4°C gelagert.

6.10.10 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wird das zu untersuchende DNA-Fragment mit Hilfe der PCR unter Verwendung eines Primers amplifiziert. Die Reaktionslösung enthält zusätzlich zu den dNTPs in geringerer Konzentration auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP). Beim Einbau dieser Didesoxynukleotide kommt es zum Abbruch der Kettenverlängerung. Dabei ist jedes der vier ddNTP mit einem Fluoreszenzmarker versehen, der durch einen Laserstrahl angeregt werden kann. Mit dem verwendeten Sequenzer kann die Basenabfolge direkt in einer

Bahn durch die Detektion der in verschiedenen Farben fluoreszierenden ddNTPs abgelesen werden [166].

Vorbereiten des Sequenziergels

Zur Herstellung des Sequenziergels werden 30 g Rotiphorese NF-Harnstoff in einer Mischung aus 9 ml 40%ige Rotiphorese NF-Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 6 ml Rotiphorese NF-10x TBE-Puffer und 23,5 ml Wasser unter Rühren gelöst. Die Lösung wird über einen Celluloseactatfilter (0,2 µm) filtriert und entgast. Durch Zugabe von 24 µl Tetramethyldiamin und 180 µl APS-Lösung (10% (m/v)) wird die Polymerisation gestartet. Das Gel wird sofort in die vorbereitete Gelkammer gegossen, der Probenkamm eingesetzt und das Gel zweieinhalb Stunden aushärten gelassen. Dann wird ein Vorlauf mit TBE-Laufpuffer durchgeführt (eine Stunde, 28 W, 18-20 mA).

Sequenzierungsreaktion

Es wird mit 4 µl DNA-Lösung aus einer QIAprep Spin Miniprep-Plasmid Präparation, 8 µl dNTP/ddNTP/Ampli-*Taq*-FS-Polymerase/Puffer-Lösung (Terminator Ready Reaction Mix), 4 µl Primer (1 pmol/µl) und 4 µl Wasser eine Sequenzierungsreaktion durchgeführt.

Temperaturprogramm zur Sequenzierung

95°C (7 min) – 95°C (1 min) – 52°C (1 min) – 60°C (2 min) – 60°C (1 min), 30 Zyklen.

Probenvorbereitung und Probenauftrag

Die PCR-Produkte werden durch Ethanol-fällung gereinigt und das Pellet in 4 µl einer Formamid/EDTA-Lösung (5:1 (v/v), 50 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und die DNA bei 90°C zwei Minuten denaturiert. Die Probe wird auf Eis eine Minute gekühlt und dann auf das Sequenziergel aufgetragen.

Sequenzierungslauf

Die Sequenzierungsfragmente werden unter denaturierenden Bedingungen (Harnstoff) durch hochaufgelöste Polyacrylamid-gelelektrophorese getrennt. Dazu wird eine Elektrophorese unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 12 Stunden, 2500 V, 40 mA, 30 W. Die Fluoreszenzsignale werden bei 531 nm, 560 nm, 580 nm und 610 nm nach Anregung mit einem Laser (40 mW) aufgezeichnet.

6.11 Chemische Synthesen

Darstellung von 4'-Nitrophenyl-(2R,3R)-2,3-epoxy-3-phenylpropylcarbonat

Ansatz:

1,5 g (2R,3R)-3-Phenylglycidol (10 mmol)

2,1 g 4-Nitrophenylchloroformiat (10 mmol)

0,9 g Pyridin (12 mmol)

50 ml Diethylether

Phenylglycidol und der Chlorkohlensäureester werden in Ether vorgelegt, im Eisbad unter Rühren Pyridin zugetropft und drei Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionsmischung wird zweimal mit 25 ml NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält ein gelbes Öl, welches an Kieselgel (Petrolether:Et₂O = 3:1) chromatographiert wird. Dabei wird eine teilweise Zersetzung der Substanz auf der Säule beobachtet. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,66 g (21%) (*R*)-NEPC (**1**), farblose Kristalle

Smp. 68°C, Lit. 72°-73°C [103]

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3,30 – 3,50 (m, 1 H, H-2), 3,90 (d, 1 H, ³J_{H-2, H-3} = 2 Hz, H-3), 4,33 (dd, 1 H, ³J = 5 Hz u. 12 Hz, H-1a), 4,67 (dd, 1 H, ³J = 3 Hz u. 5 Hz, H-1b), 7,21 – 7,62 (m, 7 H, Ph), 8,32 (d, 2 H, ³J = 9 Hz, Ph)

6.11.1 Darstellung von NEPC-Analoga

Oktansäurephenylester (**2**):

4,9 g Oktansäurechlorid (30 mol)

2,0 g Phenol (20 mmol)

15 ml Pyridin

20 ml Diethylether

Benzoensäureheptylester (3):

2,4 g Benzoylchlorid (17 mmol)

2,0 g 1-Heptanol (17 mmol)

5 ml Pyridin

30 ml Diethylether

Phenyllessigsäurehexylester (4):

2,0 g Phenyllessigsäurechlorid (13 mmol)

1,3 g 1-Hexanol (13 mmol)

5 ml Pyridin (62 mmol)

40 ml Diethylether

Der Alkohol wird in Pyridin und Diethylether im Eisbad gelöst und unter Rühren das Säurechlorid zugetropft. Es wird über Nacht weitergerührt. Die Reaktionslösung wird zweimal mit 25 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung und dann einmal mit 50 ml Wasser gewaschen. Die Lösung wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Es bleiben braune Öle zurück, welche an Kieselgel chromatographiert werden (*n*-Hexan:Ether = 9:1 (**2**, **3**) 2:1 (**4**)).

Ausbeuten: 2,42 g **2** (gelbes Öl, 55%), 1,9 g **3** (farbloses Öl, 51%), 1,6 g **4** (farbloses Öl, 59%).

R_f = 0,73 (**2**), 0,84 (**3**), 0,83 (**4**) (*n*-Hexan:Et₂O = 2:1)

6.11.2 Darstellung von 4-Pentencarbonsäurechromophorestern

*Darstellung von 4-Pentencarbonsäure-4'-nitrophenylester*Ansatz:

0,99 g 4-Pentencarbonsäure (1 ml, 9,8 mmol)

1,50 g 4-Nitrophenol (10,8 mmol)

0,15 g 4-Pyrrolidino-pyridin (1 mmol)

2,07 g EDC (10,8 mmol)

40 ml Methylenchlorid (wasserfrei)

4-Pentencarbonsäure, 4-Nitrophenol und 4-Pyrrolidino-pyridin werden in Methylenchlorid vorgelegt. Unter Rühren wird im Eisbad EDC zugegeben und 40 Stunden weitergerührt.

Die Reaktionsmischung wird zweimal mit 30 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung und dann zweimal mit 20 ml 1 N Salzsäure gewaschen. Die Etherphase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende gelbe Öl wird an Kieselgel (Petrolether:Et₂O = 2:1) chromatographiert.

Ausbeute: 1,32 g (73%) **6**, gelbes Öl

R_f = 0,65 (Petrolether:Et₂O = 2:1, Kieselgel)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 2,49 - 2,53 (m, 2 H, H-3), 2,72 (t, 2 H, ³J_{H-2, H-3} = 7,4 Hz, H-2), 5,08 - 5,20 (m, 2 H, H-5), 5,86 - 5,94 (m, 1 H, H-4), 7,23 - 7,31 (m, 2 H, Ph), 8,22 - 8,30 (m, 2 H, Ph)

¹³C-NMR: δ (ppm) = 28,66 (C-2); 33,54 (C-3); 116,27 (C-5); 122,47 (C-3' & C-5'); 125,20 (C-2' & C-6'); 135,92 (C-4); 145,29 (C-4'); 155,44 (C-1'); 170,60 (C-1)

EA: C₁₁H₁₁NO₄ (221,09)

Gef. C 59,92 H 5,14 N 6,28

Ber. C 59,70 H 5,02 N 6,33

Darstellung von 4-Pentencarbonsäure-resorufinester

Ansatz:

0,78 g 4-Pentencarbonsäure (7,8 mmol)

1,82 g Resorufin (7,8 mmol)

0,12 g 4-Pyrrolidinopyridin (0,9 mmol)

1,64 g EDC (7,8 mmol)

40 ml Methylenchlorid (wasserfrei)

Die Umsetzung erfolgt analog zu Verbindung **6**. Der zurückbleibende orange Feststoff wird an Kieselgel mit Diethylether als Eluent chromatographiert.

Ausbeute: 0,64 g (28%) **7**, oranger Feststoff

R_f = 0,95 (Et₂O, Kieselgel)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ (ppm):

2,39 - 2,48 (m, 2 H, H-3)

2,71 (t, 2 H, $^3J_{\text{H-2}, \text{H-3}} = 7,4$ Hz, H-2)

5,10 - 5,15 (m, 2 H, H-5)

5,86-5,94 (m, 1 H, H-4)

6,32 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-4}', \text{H-2}'} = 2,3$ Hz, H-4')

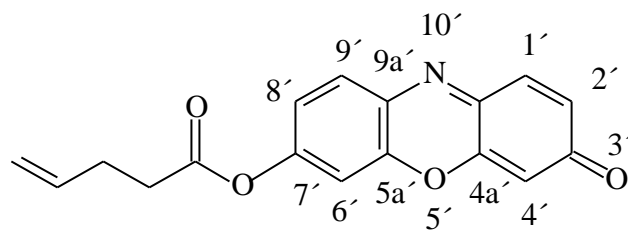
6,85 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H-2}', \text{H-1}'} = 9,8$ Hz, $^4J_{\text{H-4}', \text{H-2}'} = 2,0$ Hz, H-2')

7,10 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-6}', \text{H-8}'} = 2,0$ Hz, H-6')

7,12 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-8}'} = 7,0$ Hz, $^4J_{\text{H-6}', \text{H-8}'} = 2,4$ Hz, H-8')

7,42 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-1}', \text{H-2}'} = 9,8$ Hz, H-1')

7,78 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-8}'} = 8,6$ Hz, H-9')



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 28,70 (C-2); 33,59 (C-3); 107,21 (C-4'); 109,70 (C-6'); 116,30 (C-5); 119,29 (C-8'); 131,14 (C-9'); 131,20 (C-9a'); 134,79 (C-2'); 135,14 (C-4); 135,91 (C-1'); 144,33 (C-10a'); 148,25 (C-5a'); 149,30 (C-4a'); 153,53 (C-7'); 170,68 (CO); 186,23 (C-3')

EA: $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ (295,11)

Gef. C 69,40 H 4,87 N 4,18

Ber. C 69,12 H 4,44 N 4,75

6.11.3 Darstellung von 4,5-Epoxyentencarbonsäurechromophorester

Darstellung von 4,5-Epoxyentencarbonsäure-4'-nitrophenylester

Ansatz:

0,99 g 4-Pentencarbonsäure-4'-nitrophenyl-ester (**6**, 4,4 mmol)

1,10 g *m*CPBA (70%, 4,4 mmol)

Der Ester **6** wird in 20 ml Methylenchlorid vorgelegt und im Eisbad unter Rühren *m*CPBA in 30 ml Methylenchlorid gelöst zugetropft. Es wird bei Raumtemperatur über Nacht weitergerührt. Die Reaktionslösung wird dann mit 25 ml 20 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ -Lösung, 25 ml

gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Man erhält ein gelbes Öl, welches an Kieselgel (Petrolether:Et₂O = 1:2) chromatographiert wird.

Ausbeute: 0,52 g (50%) **8**, gelbes Öl

R_f = 0,59 (Kieselgel, Petrolether:Et₂O = 1:2)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 1,83-1,90 (m, 1 H, H-3a), 2,18-2,24 (m, 1 H, H-3b), 2,59 - 2,61 (m, 1 H, H-4), 2,72 - 2,79 (m, 2 H, H-2), 2,83 - 3,11 (m, 2 H, H-5), 7,30 (d, 2 H, ³J_{H-2', H-3'} = 8,9 Hz, Ph), 8,27 (d, 2 H, ³J_{H-2', H-3'} = 8,9 Hz, Ph)

¹³C-NMR: δ (ppm) = 27,74 (C-2); 30,96 (C-3); 47,39 (C-4); 51,39 (C-5); 122,83 & 125,62 (C-2', C-6' & C-5', C-3'); 145,73 (C-4'); 155,74 (C-1'); 170,92 (C-1)

EA: C₁₁H₁₁NO₅ (237,09)

Gef. C 55,68 H 4,62 N 5,84

Ber. C 55,68 H 4,68 N 5,90

Darstellung von 4,5-Epoxy-pentancarbonsäure-resorufinester

Ansatz:

0,28 g 4-Pentencarbonsäure-resorufinester (**7**, 1 mmol)

0,27 g mCPBA (70%, 1,1 mmol)

Die Darstellung verläuft analog zu Verbindung **8**. Man erhält ein gelbes Öl, welches an Kieselgel mit Ether chromatographiert wird. Dabei findet eine teilweise Zersetzung des Produkts auf der Säule statt.

Ausbeute: 0,25 g (81%) **9**, oranger Feststoff

R_f = 0,95 (Kieselgel, Et₂O), Smp. 105°C unter Zersetzung

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1,76 - 1,85 (m, 1 H, H-3a), 2,11 - 2,18 (m, 1 H, H-3b), 2,53 - 2,55 (m, 1 H, H-4), 2,64 - 2,78 (m, 2 H, H-2), 3,01 - 3,05 (m, 2 H, H-5), 6,27 (d, 1 H, ³J_{H-4', H-2'} = 1,9 Hz, H-4'), 6,81 (dd, 1 H, ³J_{H-2', H-1'} = 9,9 Hz, ³J_{H-4', H-2'} = 1,9 Hz, H-2'), 7,07 (d, 1 H, ³J_{H-6', H-8'} = 2,2 Hz, H-6'), 7,09 (dd, 1 H, ³J_{H-9', H-8'} = 10,6 Hz, ⁴J_{H-6', H-8'} = 2,3 Hz, H-8'), 7,37 (d, 1 H, ³J_{H-1', H-2'} = 9,7 Hz, H-1'), 7,73 (d, 1 H, ³J_{H-9', H-8'} = 8,7 Hz, H-9')

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 26,38$ (C-2); 29,60 (C-3); 46,01 (C-4); 50,00 (C-5); 106,22 (C-4'); 108,69 (C-6'); 118,24 (C-8'); 130,17 (C-9'); 130,24 (C-9a'); 133,80 (C-2'); 134,16 (C-1'); 143,34 (C-10a'); 147,27 (C-5a'); 148,30 (C-4a'); 152,43 (C-7'); 169,62 (CO); 185,36 (C-3')

EA: $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ (311,11)

Gef. C 64,44 H 4,25 N 4,32

Ber. C 65,58 H 4,21 N 4,50

6.11.4 Darstellung von Dodecan-4-en-säure-chromophorestern

Darstellung von 1-Decen-3-ol

Ansatz:

3,85 g 1-Octanal (30 mmol)

30 ml Vinylmagnesiumbromid (1,0 M in THF, 30 mmol)

5 ml THF (wasserfrei)

In einem Dreihalskolben mit Tropftrichter und Aceton/ N_2 -Kühlbad wird 1-Octanal in THF unter N_2 vorgelegt und Vinylmagnesiumbromidlösung zugetropft. Die Reaktionstemperatur wird dabei zwischen -20 und -30°C gehalten. Es wird dann 30 min bei Raumtemperatur weitergerührt, die Reaktionsmischung auf 100 ml gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung gegossen und dreimal mit je 75 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält ein farbloses Öl, welches an Kieselgel ($R_f = 0,61$; Petrolether:EtOAc = 9:1) chromatographiert wird.

Ausbeute: 2,70 g (58%) **10**, farbloses Öl

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,88$ (t, 3 H, $^3J = 6,6$ Hz, CH_3), 1,16 - 1,28 (m, 12 H, CH_2), 1,40 - 2,04 (m, 3 H, OH, H-4a, H-4b), 4,10 (t, 1 H, $^3J = 7,1$ Hz, H-3), 5,09 (dt, 1 H, $^3J_{\text{H-1E, H-2}} = 13,1$ Hz, $^3J_{\text{H-1E, H-1Z}} = 1,4$ Hz, H-1E), 5,20 (dt, 1 H, $^3J_{\text{H-1Z, H-2}} = 20,0$ Hz, $^3J_{\text{H-1E, H-1Z}} = 1,4$ Hz, H-1Z), 5,47 - 5,93 (m, 1 H, H-2)

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 14,10$ (C-10); 22,68 (C-9); 25,37 (C-8); 29,88 (C-7); 29,55 (C-6); 31,84 (C-5); 37,09 (C-4); 73,30 (C-3); 114,50 (C-1); 141,40 (C-2)

*Darstellung von Dodecan-4-en-ethylester*Ansatz:

3,95 g 1-Decen-3-ol (**10**, 25 mmol)

43,0 g Triethylorthoacetat (357 mmol, 47 ml)

1 ml Propionsäure

In einem Rundkolben mit Rückflußkühler werden 1-Decen-3-ol (**10**), Triethylorthoacetat und Propionsäure drei Stunden unter Rückfluß bei 140°C erhitzt. Dann erfolgt eine weitere Zugabe von 10 ml Triethylorthoacetat und es wird 3 Stunden weitererhitzt.

Überschüssiges Triethylorthoacetat wird im Wasserstrahlvakuum (80°C Badtemperatur) abdestilliert und das zurückbleibende farblose Öl an Kieselgel (Petrolether:EtOAc = 12:1) chromatographiert.

Ausbeute: 2,75 g (49%) **11**, farbloses Öl

$R_f = 0,71$ (Petrolether:EtOAc = 12:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,68$ (t, 3 H, $^3J = 6,9$ Hz, H-12), 0,93 - 1,44 (m, 13 H, CH_2 , CH_3 (Ethyl)), 1,75 - 1,87 (m, 2 H, H-6), 2,09 - 2,18 (m, 4 H, H-2, H-3), 3,93 (q, 2 H, $^3J = 7,2$ Hz, OCH_2), 5,17 - 5,30 (m, 2 H, H-4, H-5)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14,48$ (CH_3 (Ethyl)); 14,64; 23,05; 28,35; 29,47; 29,56; 29,71; 29,84; 32,23; 32,89; 34,83 (C-1 bis C-12, ohne C-3/4/5); 60,60 (CH_2 (Ethyl)); 75,00 (C-3); 128,28 (C-5); 132,24 (C-4); 173,67 (CO)

*Darstellung von Dodecan-4-en-säure*Ansatz:

2,30 g Dodecan-4-en-ethylester (**11**, 10,2 mmol)

15 ml 10% KOH-Lösung

5 ml Dioxan

In einem Rundkolben wird Dodecan-4-en-ethylester (**11**) vorgelegt und KOH-Lösung sowie Dioxan unter Rühren zugegeben. Es wird drei Stunden unter Rückfluß erhitzt, konz. Salzsäure bis pH 3 zugegeben und mit einem Gemisch aus Essigester/Ether (1:1) dreimal mit je 40 ml

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Das erhaltene gelbliche Öl wird an Kieselgel ($R_f = 0,35$; Petrolether:EtOAc = 4:1) chromatographiert.

Ausbeute: 1,68 g (83%) **12**, farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,79 - 0,82$ (t, 3 H, $^3J = 6,8$ Hz, H-12), 1,07 - 1,51 (m, 13 H, CH_2 , CH_3 (Ethyl)), 1,88 - 1,98 (m, 2 H, H-6), 2,22 - 2,36 (m, 4 H, H-2, H-3), 5,29 - 5,36 (dt, 1 H, $^3J_{\text{H-4, H-5}} = 15,3$ Hz, $^3J_{\text{H-5, H-6}} = 6,3$ Hz, H-5), 5,38 - 5,44 (dt, 1 H, $^3J_{\text{H-4, H-5}} = 15,3$ Hz, $^3J_{\text{H-5, H-6}} = 6,6$ Hz, H-4), 9,8 (br. s, 1 H, COOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14,49$; 23,05; 27,97; 29,47; 29,56; 29,80; 32,23; 32,88; 34,52 (C-1 bis C-12, ohne C-4/5); 127,87 (C-5); 132,58 (C-4); 179,82 (CO)

Darstellung von Dodecan-4-en-4'-nitrophenylester

Ansatz:

0,59 g Dodecan-4-en-säure (**12**, 9, 3 mmol)

0,46 g 4-Nitrophenol (3,3 mmol)

0,63 g EDC (3,3 mmol)

0,05 g 4-Pyrrolidinopyridin (0,3 mmol)

30 ml Methylenchlorid (wasserfrei)

In einem Rundkolben werden Dodecan-4-en-säure (**12**), 4-Nitrophenol, EDC und 4-Pyrrolidinopyridin unter Stickstoff in Methylenchlorid gelöst und drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 20 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und das zurückbleibende gelbe Öl an Kieselgel ($R_f = 0,68$; Petrolether:EtOAc = 9:1) chromatographiert.

Ausbeute: 0,59 g (62%) **13**, farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,87$ (t, 3 H, $^3J_{\text{H-12, H-11}} = 6,9$ Hz, CH_3), 1,21 - 1,43 (m, 10 H, H-7 bis H-12), 1,96 - 2,05 (m, 2 H, H-6), 2,42 - 2,47 (m, 2 H, H-3), 2,64 - 2,68 (m, 2 H, H-2), 5,30 - 5,49 (m, 2 H, H-4, H-5), 7,25 - 7,28 (m, 2 H, H-2'), 8,25 - 8,28 (m, 2 H, H-3')

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 14,21; 21,06; 22,67; 27,79; 29,11; 29,19; 31,85; 32,53; 34,44$ (C-1 bis C-12, ohne C-4/5); 122,44 & 125,19 (C-2', C-3'); 127,07 (C-5); 132,78 (C-4); 145,27 (C-4'); 155,50 (C-1'); 170,75 (CO)

EA: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ (319,20)

Gef. C 68,22 H 8,07 N 4,21

Ber. C 67,67 H 7,89 N 4,39

Darstellung von Dodecan-4-en-resorufinester

Ansatz:

1,09 g Dodecan-4-en-säure (**12**, 5,5 mmol)

1,43 g Resorufin (6,1 mmol)

1,17 g EDC (6,1 mmol)

0,10 g 4-Pyrrolidinopyridin (0,6 mmol)

40 ml Methylenchlorid (wasserfrei)

Die Durchführung erfolgt analog zur Darstellung des Dodecan-4-en-esters **13**. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und das zurückbleibende gelbe Öl an Kieselgel ($R_f = 0,88$; Petrolether: $\text{Et}_2\text{O} = 1:5$) unter teilweiser Zersetzung chromatographiert.

Ausbeute: 0,16 g (7%) **14**, oranger Feststoff

Smp. 97°C

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,80$ (t, 3 H, $^3J = 5,2$ Hz, H-12), 0,84 - 1,71 (m, 10 H, H-7 bis H-11), 1,88 - 1,97 (m, 2 H, H-6), 2,33 - 2,41 (m, 2 H, H-3), 2,60 (t, 2 H, $^3J_{\text{H-2}, \text{H-3}} = 7,3$ Hz, H-2), 5,31 - 5,52 (m, 2 H, H-4, H-5), 6,27 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-4}', \text{H-2}'} = 1,9$ Hz, H-4'), 6,80 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H-1}', \text{H-2}'} = 11,7$ Hz, $^4J_{\text{H-4}', \text{H-2}'} = 2,0$ Hz, H-2'), 7,03 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-6}', \text{H-8}'} = 2,4$ Hz, H-6'), 7,06 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-8}'} = 11,1$ Hz, $^4J_{\text{H-6}', \text{H-8}'} = 2,4$ Hz, H-8'), 7,36 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-1}', \text{H-2}'} = 9,7$ Hz, H-1'), 7,72 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-8}'} = 8,7$ Hz, H-9')

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 13,08; 21,65; 26,60; 26,79; 28,09; 28,16; 30,82; 31,47; 33,44$ (C-2 bis C-12, ohne C-4/5); 106,20 (C-4'); 108,68 (C-6'); 118,29 (C-5'); 126,06 (C-8'); 126,50 (C-4); 130,10 (C-5); 131,15 (C-9'); 131,75 (C-9a'); 133,78 (C-2'); 134,13 (C-1'); 143,34 (C-10a'); 147,21 (C-5a'); 148,32 (C-4a'); 152,61 (C-7'); 169,85 (CO); 185,34 (C-3')

6.11.5 Darstellung von 4,5-Epoxy-dodecansäure-chromophorestern

*Darstellung von 4,5-Epoxy-dodecansäure-4'-nitrophenylester*Ansatz:0,36 g Dodecan-4-en-4'-nitrophenolester (**13**, 1,1 mmol)0,28 g *m*CPBA (70%, 1,1 mmol)

Die Darstellung erfolgt analog zum Epoxid **8**. Das zurückbleibende gelbe Öl wird an Kieselgel ($R_f = 0,4$; Petrolether:EtOAc = 9:1) chromatographiert.

Ausbeute: 0,35 g (95%) **15**, farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,88$ (t, 3 H, $^3J = 6,7$ Hz, H-12), 1,19 - 1,58 (m, 10 H, H-7 bis H-11), 1,82 - 1,88 (m, 2 H, H-6), 2,15 - 2,21 (m, 2 H, H-3), 2,70 - 2,85 (m, 4 H, H-2, H-4, H-5), 7,30 (d, 2 H, $^3J = 9,0$ Hz, H-2'), 8,27 (d, 2 H, $^3J = 9,0$ Hz, H-3')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14,09$; 22,63; 25,97; 27,06; 29,20; 29,38; 30,68; 31,76; 31,90 (C-2, C-3 & C-6 bis C-12); 57,25 (C-4); 58,99 (C-5); 122,42 & 125,23 (C-2', C-3'); 145,36 (C-4'); 155,37 (C-1'); 170,59 (CO)

*Darstellung von 4,5-Epoxy-dodecansäure-resorufinester*Ansatz:58 mg Dodecan-4-en-resorufinester (**14**, 0,15 mmol)40 mg *m*CPBA (70%, 0,15 mmol)

Die Darstellung erfolgt analog zum Ester **15**. Das zurückbleibende braune Öl wird an Kieselgel ($R_f = 0,73$; Petrolether:Et₂O = 1:4) chromatographiert.

Ausbeute: 34 mg (55%) **16**, brauner Feststoff

Smp. 182°C (unter Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,80$ (t, 3 H, $^3J = 6,7$ Hz, H-12), 1,18 - 1,54 (m, 10 H, H-7 bis H-11), 1,75 - 1,82 (m, 2 H, H-6), 2,07 - 2,18 (m, 2 H, H-3), 2,42 - 2,65 (m, 1 H, H-4), 2,67 - 2,78 (m, 3 H, H-2, H-5), 6,27 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-4}', \text{H-2}'} = 1,9$ Hz, H-4'), 6,81 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H-2}', \text{H-1}'} = 11,3$ Hz, $^4J_{\text{H-4}', \text{H-2}'} = 1,6$ Hz, H-2'), 7,06 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-6}', \text{H-8}'} = 2,2$ Hz, H-6'), 7,08 (dd, 1 H, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-8}'} = 12,5$ Hz, $^4J_{\text{H-6}', \text{H-8}'} = 2,1$ Hz, H-8'), 7,37 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-1}', \text{H-2}'} = 10,0$ Hz, H-1'), 7,23 (d, 1 H, $^3J_{\text{H-9}', \text{H-8}'} = 8,7$ Hz, H-9')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 13,07$; 21,61; 24,95; 26,06; 28,18; 28,36; 29,68; 30,73; 30,88 (C-2 & C-3, C-6 bis C-12); 56,23 (C-4); 57,95 (C-5); 106,21 (C-4'); 108,68 (C-6'); 118,26 (C-5'); 127,23 (C-8'); 132,59 (C-9'); 133,62 (C-9a'); 133,81 (C-2'); 134,14 (C-1'); 143,34 (C-10a'); 147,24 (C-5a'); 148,33 (C-4a'); 152,49 (C-7'); 169,68 (CO); 185,39 (C-3')

6.11.6 Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-chromophor-kohlensäureestern

Darstellung von 1-Brom-2-decen

Ansatz:

2,9 g 1-Decen-3-ol (**10**, 18,7 mmol)

2,0 g Phosphortribromid (7,4 mmol)

0,2 g Pyridin (2,5 mmol)

Der Alkohol und Pyridin werden vorgelegt und Phosphortribromid unter Eiskühlung zugetropft. Es wird 24 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt und dann das Reaktionsgemisch drei Stunden bei 80°C erhitzt. Das Gemisch wird in 50 ml Diethylether aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende farblose Öl wird an Kieselgel ($R_f = 0,79$; Petrolether) chromatographiert.

Ausbeute: 2,02 g (49%) **17**, farbloses Öl

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,87$ (t, 3 H, $^3J = 6,2$ Hz, CH_3), 1,27 - 1,44 (m, 10 H, H-5 bis H-9), 1,90 - 1,98 (m, 2 H, H-4), 3,94 (d, 1 H, $^3J = 7,5$ Hz, H-1), 5,61 - 5,80 (m, 2 H, H-2, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14,10$; 22,65; 27,69; 28,82; 31,80; 32,08; 33,70; 38,74; 126,23; 136,82

*Darstellung von Acetyl-2-decen-1-ol*Ansatz:2,02 g 1-Brom-2-decen (**17**, 9 mmol)

1,50 g Natriumacetat (18 mmol)

15 ml Eisessig

1-Brom-2-decen und Natriumacetat werden unter Rühren in Eisessig gelöst und drei Stunden unter Rückfluß auf 140°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird in Diethylether aufgenommen und zuerst mit gesättigter K₂CO₃- und anschließend mit NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende Öl wird an Kieselgel (R_f = 0,90; Petrolether:Et₂O = 2:1) chromatographiert.

Ausbeute: 1,16 g (65%) **18**, farbloses Öl

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0,88 (t, 3 H, ³J = 7,3 Hz, H-10), 1,22 - 1,43 (m, 12 H, H-4 bis H-9), 2,06 (s, 3 H, COCH₃), 4,50 (d, 2 H, ³J = 6,3 Hz, H-1), 5,53 - 5,59 (m, 1 H, H-2), 5,74 - 5,80 (m, 1 H, H-3)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 14,10 (C-10); 21,06 (COCH₃); 22,66; 25,07; 28,89; 29,13; 31,81; 32,27 (C-4 bis C-9); 65,37 (C-1); 123,65 (C-2); 136,81 (C-3); 170,91 (CO)

*Darstellung von 2-Decen-1-ol*Ansatz:1,16 g Acetyl-2-decen-1-ol (**18**, 5,9 mmol)

15 ml 15% KOH-Lösung

In einem Rundkolben wird der Ester **18** mit KOH-Lösung fünf Stunden unter Rückfluß (120°C) erhitzt. Es wird mit Methylenechlorid extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Man erhält eine farblose Flüssigkeit, welche an Kieselgel (R_f = 0,55; Petrolether:Et₂O = 2:1) chromatographiert wird.

Ausbeute: 0,41 g (45%) **19**, farblose Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,88$ (t, 3 H, $^3J = 6,9$ Hz, H-10), 1,28 (t, 1 H, $^3J = 2,3$ Hz, OH), 1,29 - 1,40 (m, 10 H, H-5 bis H-9), 2,02 - 2,09 (m, 2 H, H-4), 4,08 (d, 2 H, $^3J = 5,6$ Hz, H-1), 5,63 - 5,73 (m, 2 H, H-2, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14,49$ (C-10 & C-9); 23,05 (C-8); 29,53 (C-6 & C-7); 32,21 (C-5); 32,60 (C-4); 64,25 (C-1); 129,17 (C-3); 134,02 (C-2)

Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-1-ol

Ansatz:

0,30 g 2,3-Epoxy-decan-1-al (**21**, 1,8 mmol)

0,34 g Natriumborhydrid

3 ml Methanol

In einem Rundkolben wird das Epoxid in Methanol gelöst und Natriumborhydrid unter Eiskühlung portionsweise zugegeben. Es wird drei Tage bei Raumtemperatur weitergerührt und das Reaktionsgemisch mit insgesamt 40 ml Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende farblose Öl wird an Kieselgel ($R_f = 0,44$; Petrolether: $\text{Et}_2\text{O} = 2:1$) chromatographiert.

Ausbeute: 0,16 g (51%) **20**, farblose kristalline Masse

Smp. 42°C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 0,81$ (t, 3 H, $^3J = 6,7$ Hz, H-10), 1,21 - 1,30 (m, 8 H, H-6 bis H-9), 1,33 - 1,44 (m, 2 H, H-5), 1,47 - 1,54 (m, 2 H, H-4), 1,77 (t, 1 H, $^3J = 6,5$ Hz, OH), 2,85 - 2,90 (m, 2 H, H-2, H-3), 3,53 - 3,58 (m, 1 H, H-1a), 3,82 - 3,86 (m, 1 H, H-1b)

$^{12}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14,46$; 23,01; 26,33; 29,57; 29,74; 31,94; 32,14; (C-10 bis C-4); 56,39 (C-3); 58,82 (C-2); 62,11 (C-1)

Alternative Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**) über die Epoxidierung von 2-Decen-1-ol (**19**):

0,41 g 2-Decen-1-ol (**19**, 2,7 mmol)

0,74 g *m*CPBA (70%, 3 mmol)

In einem Rundkolben wird der Alkohol **19** in 5 ml Methylenchlorid vorgelegt und *m*CPBA in 15 ml Methylenchlorid gelöst unter Eiskühlung zugetropft. Es wird 36 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das zurückbleibende farbloses Öl wurde an Kieselgel (R_f = 0,44; Petrolether:Et₂O = 2:1) chromatographiert.

Ausbeute: 0,39 g (83%) **20**, farbloses Öl

Darstellung von 2,3-Epoxy-1-decanal

Ansatz:

1,0 g 2-Decenal (6,5 mmol)

1 ml H₂O₂ (30%, 9,7 mmol)

Wasserstoffperoxid wird in 20 ml eines Gemischs aus einer gesättigter NaHCO₃-Lösung und Methanol (40:60 (v/v), pH 8,5) vorgelegt und der Aldehyd in 5 ml Methanol gelöst unter Eiskühlung zugetropft. Es wird auf 40°C erwärmt und zwei Stunden weitergerührt. Dann wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Das ausgefallene NaHCO₃ wird abfiltriert und das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt. Das Reaktionsgemisch wird mit Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält ein farbloses Öl, welches an Kieselgel (R_f = 0,59; Petrolether:EtOAc = 9:1) chromatographiert wurde.

Ausbeute: 0,30 g (27%) **21**, farblose Flüssigkeit

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0,89 (t, 3 H, ³J = 6,6 Hz, H-10), 1,22 - 1,36 (m, 8 H, H-6 bis H-9), 1,39 - 1,52 (m, 2 H, H-5), 1,61 - 1,71 (m, 2 H, H-4), 3,13 - 3,23 (m, 1 H, H-3), 3,24 - 3,35 (m, 1 H, H-2), 9,01 (d, 1 H, ³J = 6,3 Hz, CHO)

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 14,07; 22,61; 25,78; 29,09; 29,19; 31,21; 31,69$ (C-10 bis C-4); $56,82$ (C-3); $59,18$ (C-2); $198,57$ (CO)

Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-4'-nitrophenyl-carbonat

Ansatz:

0,39 g 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**, 2,2 mmol)

0,49 g 4-Nitrophenyl-chloroformiat (2,4 mmol)

0,21 g Pyridin (2,0 mmol, über Molekularsieb getrocknet)

Das Epoxid und Pyridin werden in 10 ml Methylenchlorid gelöst und unter Eiskühlung 4-Nitrophenylchloroformiat in 10 ml Methylenchlorid gelöst zugetropft. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Lösung wird dreimal mit 20 ml Wasser gewaschen und die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bleibt ein gelbes Öl zurück, welches an Kieselgel ($R_f = 0,62$; Petrolether: $\text{Et}_2\text{O} = 2:1$) chromatographiert wird.

Ausbeute: 0,39 g (52%) **22**, farbloses Öl

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,81$ (t, 3 H, H-10), $1,12 - 1,30$ (m, 8 H, H-6 bis H-9), $1,31 - 1,41$ (m, 2 H, H-5), $1,41 - 1,57$ (m, 2 H, H-4), $2,87$ (sext., 1 H, $J = 2,7$ Hz u. $9,0$ Hz, H-3), $3,00 - 3,02$ (m, 1 H, H-2), $4,10$ (dd, 1 H, $^3J = 6,3$ Hz, H-1a), $4,47$ (dd, 1 H, $^3J = 3,1$ Hz, H-1b), $7,31 - 7,37$ (m, 2 H, H-2', H-6'), $8,20 - 8,27$ (m, 2 H, H-3', H-5')

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 14,47; 23,01; 26,21; 29,54; 29,67; 31,80; 32,12; 54,91; 57,00; 69,66$ (C-10 bis C-1); $122,15$ (C-3' & C-5'); $125,74$ (C-2' & C-6'); $145,87$ (C-4'); $152,77$ (C-1'); $155,78$ (CO)

EA: $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ (337,18)

Gef. C 60,72 H 6,91 N 4,02

Ber. C 60,50 H 6,88 N 4,15

*Darstellung von 2,3-Epoxy-decan-resorufin-carbonat*Ansatz:

168 mg 2,3-Epoxy-decan-1-ol (**20**, 0,1 mmol)

230 mg Resorufin (0,1 mmol)

12 mg Triphosgen (0,04 mmol)

16 mg Pyridin (0,2 mmol)

In einem Rundkolben werden das Epoxid, Resorufin und Pyridin in 20 ml Methylenchlorid vorgelegt und Triphosgen unter Eiskühlung und Rühren zugegeben. Nach einer Stunde werden nochmals 50 mg Triphosgen unter Eiskühlung zugegeben. Es wird dann über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Das überschüssige Resorufin wird abfiltriert und nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das braune Öl an Kieselgel ($R_f = 0,7$; Petrolether:Et₂O = 1:4) chromatographiert.

Ausbeute: 20 mg (48%) **23**, oranger Feststoff

Smp. 65-69°C

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 0,88$ (t, 3 H, ³J = 6,9 Hz, H-10), 1,24 - 1,40 (m, 8 H, H-6 bis H-9), 1,42 - 1,50 (m, 2 H, H-5), 1,51 - 1,64 (m, 2 H, H-4), 2,91 - 2,97 (m, 2 H, H-2, H-3), 3,63 (dd, 1 H, J = 1,6 Hz u. 12,6 Hz, H-1b), 3,91 (dd, 1 H, J = 1,6 Hz u. 12,4 Hz, H-1a), 6,34 (d, 1 H, ³J_{H-4', H-2'} = 2,2 Hz, H-4'), 6,86 (dd, 1 H, ³J_{H-4', H-2'} = 2,0 Hz, ³J_{H-2', H-1'} = 10,0 Hz, H-2'), 7,21 (d, 1 H, ³J_{H-6', H-8'} = 2,4 Hz, H-6'), 7,25 (dd, 1 H, ³J_{H-6', H-8'} = 2,4 Hz, ³J_{H-9', H-8'} = 12,5 Hz, H-8'), 7,44 (d, 1 H, ³J_{H-1', H-2'} = 10,0 Hz, H-1'), 7,81 (d, ³J_{H-9', H-8'} = 8,6 Hz, H-9')

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 14,09$; 22,64; 25,96; 29,20; 29,36; 31,57; 31,76; 56,01; 58,43; 61,73 (C-10 bis C-1); 107,36 (C-4'); 109,10 (C-6'); 118,51 (C-8'); 131,29 (C-9a'); 134,82 (C-2'); 135,28 (C-1'); 144,37 (C-10a'); 148,54 (C-5a'); 149,26 (C-4a'); 152,50 (C-7'); 153,42 (O₂CO); 186,32 (C-3')

6.12 Biotransformationen mit BTL

6.12.1 Acylierung von 1-Phenylethanol und 1-Phenylpropanol mit Vinylacetat oder Vinylbutyrat als Acyldonor

0,3 mmol Alkohol und 1 mmol Acyldonor werden in 5 ml Toluol gelöst und lyophilisierte BTL-Lipase (1000 U) zugegeben. Die Mischung wird bei 40°C gerührt und Proben entnommen (250 µl). Diese werden drei min bei 14000 U/min zentrifugiert und der Überstand durch GC analysiert.

6.12.2 Hydrolyse von Essigsäure-1-phenylethylester

0,3 mmol Essigsäure-1-phenylester werden in einem Gemisch aus 1 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) und 5 ml Toluol gelöst. Die Mischung wird bei 40°C gerührt und lyophilisierte BTL-Lipase (1000 U) zugegeben. Es werden mehrere gleiche Ansätze angefertigt. Zu verschiedenen Zeiten werden die Proben mit 300 µl Methylenchlorid extrahiert und drei min bei 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird durch GC analysiert.

6.13 Durchführung des NBP-Tests

6.13.1 Validierung

Der Assay kann mit verschiedenen Epoxiden durchgeführt werden. Zur Validierung werden Stammlösungen der Epoxide in Aceton hergestellt. Zu 100 µl Zellrohextrakt oder Medium in einer Mikrotiterplatte werden 40 µl Epoxidstammlösung und 50 µl Triethylenglycoldimethylether gegeben. Verschiedene Mengen an Triethylamin (0, 25 oder 50 µl) oder Piperidin (0, 25 oder 50 µl) und 50 µl NBP-Stammlösung in Methoxyethanol werden zugegeben (Tabelle 7). Die Mikrotiterplatte wird bei 39°C inkubiert.

Die Absorption bei 560 nm gegen 650 nm als Referenzwellenlänge wird zu verschiedenen Zeiten gemessen und die Differenz der Absorptionswerte wird berechnet.

Stammlösungen	Konzentration
Styroloxid	0,17 M
2,3-Epoxy-3-phenyl-propionsäureethylester	0,14 M
Indenoxid	0,16 M
1,2-Hexanoxid	0,8 M
1,2-Decanoxid	0,1 M
NBP	5% (w/v)

Tabelle 7: Stammlösungen im NBP-Test.

Die Darstellung von Indenoxid erfolgt gemäß [93]. Das Epoxid wird an Kieselgel chromatographiert ($R_f = 0,55$, Petrolether:EtOAc = 9:1, 61% Ausbeute). ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren entsprechen der Literatur.

6.13.2 Assay in Gegenwart von Mikroorganismen

Eine Stammlösung von Styroloxid (1,3 M in Aceton) wird hergestellt und mit Aceton verdünnt (Endkonzentrationen 1,3 M, 0,65 M, 0,32 M, 0,16 M, 0,08 M). 50 μl der Lösungen werden zu 100-150 μl Zellsuspension in einer Mikrotiterplatte gegeben und zwei bis acht Stunden bei 39°C inkubiert. Dann werden 50 μl Triethylglycoldimethylether, 50 μl Triethylamin und 50 μl NBP-Stammlösung in Methoxyethanol zugegeben. Nach 45 min Inkubation bei 39°C wird wie in 6.13.1 beschrieben die Absorption jeder Kammer gemessen.

6.13.3 Biotransformationen von Epoxiden mit *Streptomyces*-Stämmen

Für die Umsetzungen werden ganze Zellen, Rohextrakt nach Aufschluß mit Ultraschall oder Fraktionen nach der Proteinaufreinigung verwendet.

Die Zellen einer 250 ml-Kultur werden für die Umsetzung in 250 ml Volumen verwendet (8 g Biofeuchtmasse), zweimal mit 50 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0) gewaschen und

mit Ultraschall in 30 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0) aufgeschlossen oder die ganzen Zellen nach dem Waschen in 30 ml Natriumphosphatpuffer resuspendiert. Die Umsetzungen mit Fraktionen aus der Proteinaufreinigung werden in Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8) durchgeführt.

Umsetzungen in 250 ml Volumen: Es werden weitere 200 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0), 500 μ l Epoxid und 10 ml Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf dem Schüttler (210 U/min) bei 30°C geschüttelt und zu verschiedenen Zeiten Proben (1,5 ml) entnommen.

Umsetzungen in 1,5 ml Volumen: Zu 1,5 ml Zellsuspension oder Proteinextrakt werden 5 μ l Epoxid und 75 μ l DMSO gegeben. Die Mischung wird auf dem Thermomixer bei 30°C geschüttelt.

Extraktion der Proben: Die Proben (1,5 ml) werden mit 300 μ l Diethylether extrahiert und für eine min bei 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird zur GC-Messung verwendet. Bei der Racematspaltung von 1,2-Decanoxid wird mit 300 μ l Essigsäureethylester extrahiert, 100 μ l Aceton und eine Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben. Die Bildung des Acetonids wird dann im GC nachgewiesen.

7 Literatur

- [1] S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, *Epoxydes énantiopurs: obtention par voie chimique ou par voie enzymatique*. Bull. Soc. Chim. Fr. **132** (1995), 769-800.
- [2] T. Katsuki, V. S. Martin, *Asymmetric epoxidation of allylic alcohols: The Katsuki-Sharpless epoxidation reaction*. Org. React. (N.Y.) **48** (1996), 1-299.
- [3] N. Hosoya, A. Hatayama, R. Irie, H. Sasaki, T. Katsuki, *Rational design of Mn-Salen epoxidation catalysts: Preliminary results*. Tetrahedron **50** (1994), 4311-4322.
- [4] J. A. M. de Bont, *Bioformation of optically pure epoxides*. Tetrahedron: Asymmetry **4** (1993), 1331-1340.
- [5] P. Besse, H. Veschambre, *Chemical and biological synthesis of chiral epoxides*. Tetrahedron **50** (1994), 8885-8927.
- [6] A. N. Onumonu, A. Colocoussi, C. Mathews, M. P. Woodland, D. J. Leak, *Microbial alkene epoxidation - merits and limitations*. Biocatalysis **10** (1994), 211-218.
- [7] J. Swaving, J. A. M. de Bont, *Microbial transformation of epoxides*. Enzyme Microb. Technol. **22** (1998), 19-26.
- [8] K. Faber, M. Mischitz, W. Kroutil, *Microbial epoxide hydrolases*. Acta Chem. Scand. **50** (1996), 249-258.
- [9] R. V. A. Orru, A. Archelas, R. Furstoss, K. Faber, *Epoxide hydrolases and their synthetic applications*. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. **63** (1998), 145-167.
- [10] A. Archelas, R. Furstoss, *Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine chemicals*. Trends Biotechnol. **16** (1998), 108-116.
- [11] A. Archelas, R. Furstoss, *Biocatalytic Approaches for the Synthesis of Enantiopure Epoxides*. Topics Curr. Chem. **200** (1999), 160-191.
- [12] G. Bellucci, C. Chiappe, F. Marioni, M. Benetti, *Regio- and enantioselectivity of the cytosolic epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of racemic monosubstituted alkyloxiranes*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1991), 361-363.
- [13] E. Blée, F. Schuber, *Stereocontrolled hydrolysis of the linoleic acid monoepoxide regioisomers catalyzed by soy-bean epoxide hydrolase*. Eur. J. Biochem. **230** (1995), 229-234.
- [14] R. J. Linderman, E. A. Walker, C. Haney, R. M. Roe, *Determination of the regiochemistry of insect epoxide hydrolase catalyzed epoxide hydration of juvenile hormone by ¹⁸O-labelling studies*. Tetrahedron **51** (1995), 10845-10856.

- [15] C. A. G. M. Weijers, *Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **8** (1997), 639-647.
- [16] C. A. G. M. Weijers, J. A. M. de Bont, *Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **6** (1999), 199-214.
- [17] S. Pedragosa-Moreau, C. Morisseau, J. Zylber, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, *Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure para-substituted styrene oxides. A mechanistic approach*. *J. Org. Chem.* **61** (1996), 7402-7407.
- [18] G. Grogan, S. M. Roberts, A. J. Willetts, *Novel aliphatic epoxide hydrolase activities from dematiaceous fungi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141** (1996), 239-243.
- [19] S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, *Microbiological transformations. 32. Use of epoxide hydrolase mediated biohydrolysis as a way to enantiopure epoxides and vicinal diols: Application to substituted styrene oxides*. *Tetrahedron* **52** (1996), 4593-4606.
- [20] W. J. Choi, E. C. Huh, H. J. Park, E. Y. Lee, C. Y. Choi, *Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis*. *Biotechnol. Techn.* **12** (1998), 225-228.
- [21] I. Osprian, W. Kroutil, M. Mischitz, K. Faber, *Biocatalytic resolution of 2-methyl-2-(aryl)alkyloxiranes using novel bacterial epoxide hydrolases*. *Tetrahedron: Asymmetry* **8** (1997), 65-71.
- [22] M. Mischitz, K. Faber, *Chemo-enzymatic synthesis of (2R,5S)- and (2R,5R)-5-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-methyl-2-vinyl-tetrahydrofuran ('linalool oxide'): Preparative application of a highly selective epoxide hydrolase*. *Synlett* (1996), 978-979.
- [23] M. Mischitz, C. Mirtl, R. Saf, K. Faber, *Regioselectivity of Rhodococcus sp. NCIMB11216 epoxide hydrolase: Applicability of E-values for description of enantioselectivity depends on substrate structure*. *Tetrahedron: Asymmetry* **7** (1996), 2041-2046.
- [24] M. Mischitz, W. Kroutil, U. Wandel, K. Faber, *Asymmetric microbial hydrolysis of epoxides*. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (1995), 1261-1272.
- [25] M. Mischitz, K. Faber, A. Willetts, *Isolation of a highly enantioselective epoxide hydrolase from Rhodococcus sp. NCIMB11216*. *Biotechnol. Lett.* **17** (1995), 893-898.

- [26] M. Mischitz, K. Faber, *Asymmetric opening of an epoxide by azide catalyzed by an immobilized enzyme preparation from Rhodococcus sp.* Tetrahedron Lett. **35** (1994), 81-84.
- [27] W. Kroutil, M. Mischitz, K. Faber, *Deracemization of (\pm)-2,3-disubstituted oxiranes via biocatalytic hydrolysis using bacterial epoxide hydrolases: kinetics of an enantioconvergent process.* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1997), 3629-3636.
- [28] W. Kroutil, I. Osprian, M. Mischitz, K. Faber, *Chemoenzymatic synthesis of (S)-(-)-frontalin using bacterial epoxide hydrolases.* Synthesis (1997), 156-158.
- [29] W. Kroutil, M. Mischitz, P. Plachota, K. Faber, *Deracemization of (\pm)-cis-2,3-epoxyheptane via enantioconvergent biocatalytic hydrolysis using Nocardia EHI-epoxide hydrolase.* Tetrahedron Lett. **37** (1996), 8379-8382.
- [30] D. M. Jerina, J. W. Daly, *Arene oxides: a new aspect of drug metabolism.* Science **185** (1974), 573-582.
- [31] F. Oesch, *Purification and specificity of a human microsomal epoxide hydratase.* Biochem. J. **139** (1974), 77-88.
- [32] F. Oesch, *Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds.* Xenobiotica **3** (1973), 305-340.
- [33] J. Seidegard, G. Ekstrom, *The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics.* Environ Health Perspect **105** Suppl. 4 (1997), 791-799.
- [34] L. W. Wormhoudt, J. N. Commandeur, N. P. Vermeulen, *Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity.* Crit. Rev. Toxicol. **29** (1999), 59-124.
- [35] M. Paolini, G. L. Biagi, G. Cantelli-Forti, *Commentary-measurement of microsomal epoxide hydrolase activity in humans: problems and perspectives.* J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. **16** (1997), 73-76.
- [36] P. L. Barili, G. Berti, E. Mastroilli, *Regio- and stereochemistry of the acid catalyzed and of a highly enantioselective enzymatic hydrolysis of some epoxytetrahydrofurans.* Tetrahedron **49** (1993), 6263-6276.
- [37] G. Bellucci, C. Chiappe, G. Ingrosso, *Kinetics and stereochemistry of the microsomal epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of cis-stilbene oxides.* Chirality **6** (1994), 577-582.

- [38] G. Bellucci, C. Chiappe, A. Cordoni, F. Marioni, *Different enantioselectivity and regioselectivity of the cytosolic and microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of simple phenyl substituted epoxides*. *Tetrahedron Lett.* **35** (1994), 4219-4222.
- [39] J. Seidegard, J. W. de Pierre, *Microsomal epoxide hydrolase. Properties, regulation and function*. *Biochim. Biophys. Acta* **695** (1983), 251-270.
- [40] G. Bellucci, G. Berti, C. Catelani, E. Mastrorilli, *Unusual steric course of the epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of (\pm)-3,4-epoxytetrahydropyran. A case of complete stereoconvergence*. *J. Org. Chem.* **46** (1981), 5148-5150.
- [41] C. Catelani, E. Mastrorilli, *Acid-catalyzed and enzymatic hydrolysis of trans- and cis-2-methyl-3,4-epoxytetrahydropyran*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1983), 2717-2721.
- [42] G. Bellucci, C. Chiappe, A. Cordoni, *Enantioconvergent transformation of racemic cis-b-alkyl substituted styrene oxides to (R,R) threo diols by microsomal epoxide hydrolase catalysed hydrolysis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **7** (1996), 197-202.
- [43] G. Bellucci, C. Chiappe, G. Ingrosso, C. Rosini, *Kinetic resolution by epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of racemic methyl substituted methylenecyclohexene oxides*. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** (1995), 1911-1918.
- [44] C. Chiappe, A. Cordoni, F. Marioni, G. Bellucci, *Substrate enantioselectivity in the rabbit liver microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of trans and cis 1-phenylpropene oxides. A comparison with styrene oxide*. *Tetrahedron: Asymmetry* **4** (1993), 1153-1160.
- [45] A. Y. Lu, D. Ryan, D. M. Jerina, J. W. Daly, W. Levin, *Liver microsomal epoxide hydrolase. Solubilization, purification, and characterization*. *J. Biol. Chem.* **250** (1975), 8283-8288.
- [46] G. Bellucci, G. Berti, M. Ferretti, E. Mastrorilli, L. Silvestri, *Enantioselectivity of the microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of trans-4,5-Dimethyl-1,2-epoxycyclohexane*. *J. Org. Chem.* **50** (1985), 1471-1474.
- [47] P. L. Barili, G. Berti, G. Catelani, F. Colonna, E. Mastrorilli, *Alkaline and enzymatic hydrolysis of Isobutyl 3,4-Anhydro-2,6-dideoxy-DL-hexopyranosides. Preparation of enantiomeric Bovinopyranosides through a highly efficient kinetic resolution*. *J. Org. Chem.* **52** (1987), 2886-2892.
- [48] G. Bellucci, G. Berti, R. Bianchini, P. Cetera, E. Mastrorilli, *Stereoselectivity in the epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of the stereoisomeric 3-tert-Butyl-1,2-*

- epoxycyclohexanes. Further evidence for the topology of the enzyme active site.* J. Org. Chem. **47** (1982), 3105-3112.
- [49] D. C. Zeldin, J. Kobayashi, J. R. Falck, B. S. Winder, B. D. Hammock, J. R. Snapper, J. H. Capdevila, *Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase.* J. Biol. Chem. **268** (1993), 6402-6407.
- [50] D. C. Zeldin, S. Wei, J. R. Falck, B. D. Hammock, J. R. Snapper, J. H. Capdevila, *Metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by cytosolic epoxide hydrolase: substrate structural determinants of asymmetric catalysis.* Arch. Biochem. Biophys. **316** (1995), 443-451.
- [51] E. C. Dietze, E. Kuwano, J. Casas, B. D. Hammock, *Inhibition of cytosolic epoxide hydrolase by trans-3-phenylglycidols.* Biochem. Pharmacol. **42** (1991), 1163-1175.
- [52] E. C. Dietze, E. Kuwano, B. D. Hammock, *The interaction of cytosolic epoxide hydrolase with chiral epoxides.* Int. J. Biochem. **25** (1993), 43-52.
- [53] M. A. Elalaoui, H. Thaler-Dao, C. Chavis, G. Maury, T. Daiboun, *Biotransformations of *a/b*-epoxyalcohols catalyzed by epoxide hydrolases.* Biocatalysis **1993** (1993), 227-236.
- [54] G. Bellucci, C. Chiappe, F. Marioni, *Enantioselectivity of the enzymatic hydrolysis of cyclohexene oxide and (\pm)-1-methylcyclohexene oxide: A comparison between microsomal and cytosolic epoxide hydrolases.* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1989), 2369-2373.
- [55] G. Bellucci, I. Capitani, C. Chiappe, F. Marioni, *Product enantioselectivity of the microsomal and cytosolic epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of meso epoxides.* J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1989), 1170-1171.
- [56] S. B. Raju, D. Basavaiah, *Enantioselective hydrolysis of 2,2-disubstituted oxiranes mediated by microsomal epoxide hydrolase.* Synthetic Commun. **25** (1995), 3293-3306.
- [57] C. Chiappe, L. Conti, F. Marioni, G. Pierini, G. Bellucci, *Substrate enantioselection in the microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of monosubstituted oxiranes. Effects of branching of alkyl chains.* J. Org. Chem. **54** (1989), 5978-5983.
- [58] M. Arand, W. Hinz, F. Müller, K. Hänel, L. Winkler, A. Mecky, M. Knehr, H. Dürk, H. Wagner, M. Ringhoffer, F. Oesch, *Structure and mechanism of soluble epoxide hydrolase and its relation to microsomal epoxide hydrolase.* Control. Mech. Carcinog. (1996), 116-134.

- [59] P. A. Bell, C. B. Kasper, *Expression of rat microsomal epoxide hydrolase in Escherichia coli. Identification of a histidyl residue essential for catalysis.* J. Biol. Chem. **268** (1993), 14011-14017.
- [60] S. Keuning, D. B. Janssen, B. Witholt, *Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from Xanthobacter autotrophicus GJ10.* J. Bact. **163** (1985), 635-639.
- [61] D. B. Janssen, F. Pries, J. van der Ploeg, B. Kazemier, P. Terpstra, B. Witholt, *Cloning of 1,2-Dichloroethane degradation genes of Xanthobacter autotrophicus GJ10 and expression and sequencing of the dhla gene.* J. Bact. **171** (1989), 6791-6799.
- [62] S. M. Franken, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes.* EMBO J. **10** (1991), 1297-1302.
- [63] J. K. Beetham, D. Grant, M. Arand, J. Garbarino, T. Kiyosue, F. Pinot, F. Oesch, W. R. Belknap, K. Shinozaki, B. D. Hammock, *Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature.* DNA Cell Biol **14** (1995), 61-71.
- [64] I. Pelletier, J. Altenbuchner, *A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity.* Microbiology **141** (1995), 459-468.
- [65] O. Pfeifer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K.-H. van Pée, *Molecular cloning and sequencing of a non-haem bromoperoxidase gene from Streptomyces aureofaciens ATCC10762.* J. Gen. Microbiol. **138** (1992), 1123-1131.
- [66] E. Misawa, C. K. C. Chan Kwo Chion, I. V. Archer, M. P. Woodland, N.-Y. Zhou, S. F. Carter, D. A. Widdowson, D. J. Leak, *Characterization of a catabolic epoxide hydrolase from Corynebacterium sp.* Eur. J. Biochem. **253** (1998), 173-183.
- [67] X. S. Puente, C. López-Otín, *The PLEES proteins: a family of structurally related enzymes widely distributed from bacteria to humans.* Biochem. J. **322** (1997), 947-959.
- [68] G. M. Lacourciere, R. N. Armstrong, *The catalytic mechanism of microsomal epoxide hydrolase involves an ester intermediate.* J. Am. Chem. Soc. **115** (1993), 10466-10467.
- [69] B. Borhan, A. D. Jones, F. Pinot, D. F. Grant, M. J. Kurth, B. D. Hammock, *Mechanism of soluble epoxide hydrolase. Formation of an alpha-hydroxy ester-enzyme intermediate through Asp-333.* J. Biol. Chem. **270** (1995), 26923-26930.

- [70] R. Rink, D. B. Janssen, *Kinetic Mechanism of the Enantioselective Conversion of Styrene Oxide by Epoxide Hydrolase from Agrobacterium radiobacter AD1*. *Biochemistry* **37** (1998), 18119-18127.
- [71] M. Arand, H. Wagner, F. Oesch, *Asp³³³, Asp⁴⁹⁵, and His⁵²³ from the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase*. *J. Biol. Chem.* **271** (1996), 4223-4229.
- [72] L. T. Laughlin, H.-F. Tzeng, S. Lin, R. N. Armstrong, *Mechanism of microsomal epoxide hydrolase. Semifunctional site-specific mutants affecting the alkylation half-reaction*. *Biochemistry* **37** (1998), 2897-2904.
- [73] M. Arand, F. Müller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban, D. Pompon, R. Kellner, F. Oesch, *Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu⁴⁰⁴ with Asp leads to a strongly increased turnover rate*. *Biochem. J.* **337** (1999), 37-43.
- [74] R. H. Allen, W. B. Jacoby, *Tartaric acid metabolism. IX. Synthesis with tartrate epoxidase*. *J. Biol. Chem.* **244** (1969), 2078-2084.
- [75] P. Hechtberger, G. Wirnsberger, M. Mischitz, N. Klempier, K. Faber, *Asymmetric hydrolysis of epoxides using an immobilized enzyme preparation from Rhodococcus sp.* *Tetrahedron: Asymmetry* **4** (1993), 1161-1164.
- [76] U. Wandel, M. Mischitz, W. Kroutil, K. Faber, *Highly selective asymmetric hydrolysis of 2,2-disubstituted epoxides using lyophilized cells of Rhodococcus sp. NCIMB11216*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1995), 735-736.
- [77] S. F. Carter, D. J. Leak, *The isolation and characterization of a carbocyclic epoxide-degrading Corynebacterium sp.* *Biocatal. Biotransform.* **13** (1995), 111-129.
- [78] M. H. J. Jacobs, A. J. van den Wijngaard, M. Pentenga, D. B. Janssen, *Characterization of the epoxide hydrolase from epichlorhydrin-degrading Pseudomonas sp.* *Eur. J. Biochem.* **202** (1991), 1217-1222.
- [79] J. H. L. Spelberg, R. Rink, R. M. Kellogg, D. B. Janssen, *Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from Agrobacterium radiobacter*. *Tetrahedron: Asymmetry* **9** (1998), 459-466.
- [80] R. Rink, M. Fennema, M. Smids, U. Dehmel, D. B. Janssen, *Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from Agrobacterium radiobacter AD1*. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 14650-14657.
- [81] A. L. Botes, J. A. Steenkamp, M. Z. Letloenyane, M. S. van Dyk, *Epoxide hydrolase activity of Chryseomonas luteola for the asymmetric hydrolysis of aliphatic mono-substituted epoxides*. *Biotechnol. Lett.* **20** (1998), 427-430.

- [82] R. V. A. Orru, W. Kroutil, K. Faber, *Deracemization of (\pm)-2,2-disubstituted epoxides via enantioconvergent chemoenzymic hydrolysis using *Nocardia EHI* epoxide hydrolase and sulfuric acid*. *Tetrahedron Lett.* **38** (1997), 1753-1754.
- [83] W. Kroutil, R. V. A. Orru, K. Faber, *Stabilization of *Nocardia EHI* epoxide hydrolase by immobilization*. *Biotechnol. Lett.* **20** (1998), 373-377.
- [84] W. Kroutil, Y. Genzel, M. Pietzsch, C. Syldatk, K. Faber, *Purification and characterization of a highly selective epoxide hydrolase from *Nocardia* sp. *EHI**. *J. Biotechnol.* **61** (1998), 143-150.
- [85] R. V. A. Orru, I. Osprian, W. Kroutil, K. Faber, *An efficient large-scale synthesis of (*R*)-(-)-mevalonolactone using simple biological and chemical catalysts*. *Synthesis* (1998), 1259-1263.
- [86] Rijksuniversiteit te Groningen (1998), *Enantioselective epoxide hydrolases and genes encoding these*, EP 0 879 890 A1.
- [87] M. J. van der Werf, K. M. Overkamp, J. A. M. de Bont, *Limonene-1,2-Epoxide Hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolase*. *J. Bact.* **180** (1998), 5052-5057.
- [88] Y. Suzuki, S. Marumo, *Fungal metabolism of (\pm)-epoxyfarnesol and its absolute stereochemistry*. *Tetrahedron Lett.* **19** (1972), 1887-1890.
- [89] X. M. Zhang, A. Archelas, R. Furstoss, *Microbiological transformations. 19. Asymmetric dihydroxylation of the remote double bond of geraniol: A unique stereochemical control allowing easy access to both enantiomers of geraniol-6,7-diol*. *J. Org. Chem.* **56** (1991), 3814-3817.
- [90] X.-J. Chen, A. Archelas, R. Furstoss, *Microbiological transformations. 27. The first examples for preparative-scale enantioselective or diastereoselective epoxide hydrolyses using microorganisms. An unequivocal access to all four Bisabolol stereoisomers*. *J. Org. Chem.* **58** (1993), 5528-5532.
- [91] H. Nellaiah, C. Morisseau, A. Archelas, R. Furstoss, J. C. Baratti, *Enantioselective hydrolysis of *p*-nitrostyrene oxide by an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger**. *Biotechnol. Bioeng.* **49** (1996), 70-77.
- [92] C. Morisseau, H. Nellaiah, A. Archelas, R. Furstoss, J. C. Baratti, *Asymmetric hydrolysis of racemic *para*-nitrostyrene oxide using an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger**. *Enzyme Microb. Technol.* **20** (1997), 446-452.

- [93] S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, *Microbiological transformations*. 28. *Enantiocomplementary epoxide hydrolyses as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide*. *J. Org. Chem.* **58** (1993), 5533-5536.
- [94] S. Pedragosa-Moreau, A. Archelas, R. Furstoss, *Microbiological transformations*. 31: *Synthesis of enantiopure epoxides and vicinal diols using fungal epoxide hydrolase mediated hydrolysis*. *Tetrahedron Lett.* **37** (1996), 3319-3322.
- [95] G. Grogan, C. Rippe, A. Willetts, *Biohydrolysis of substituted styrene oxides by Beauveria densa CMC3240*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **3** (1997), 253-257.
- [96] P. Moussou, A. Archelas, J. Baratti, R. Furstoss, *Microbiological transformations*. 38. *Clues to the involvement of a general acid activation during hydrolysis of para-substituted styrene oxides by a soluble epoxide hydrolases from Syncephalastrum racemosum*. *J. Org. Chem.* **63** (1998), 3532-3537.
- [97] C. A. G. M. Weijers, A. L. Botes, M. S. van Dyk, J. A. M. de Bont, *Enantioselective hydrolysis of unbranched aliphatic 1,2-epoxides by Rhodotorula glutinis*. *Tetrahedron: Asymmetry* **9** (1998), 467-473.
- [98] A. L. Botes, C. A. G. M. Weijers, M. S. van Dyk, *Biocatalytic resolution of 1,2-epoxyoctane using resting cells of different yeast strains with novel epoxide hydrolase activities*. *Biotechnol. Lett.* **20** (1998), 421-426.
- [99] K. A. Giuliano, E. P. Lau, R. R. Fall, *Simplified liquid chromatographic assay for epoxide hydrolase*. *J. Chromat.* **202** (1980), 447-452.
- [100] R. B. Westkaemper, R. P. Hanzlik, *A convenient reverse-phase liquid chromatographic assay for epoxide hydrase*. *Anal. Biochem.* **102** (1980), 63-67.
- [101] R. B. Westkaemper, R. P. Hanzlik, *Mechanistic studies of epoxide hydrolase utilizing a continuous spectrophotometric assay*. *Arch. Biochem. Biophys.* **208** (1981), 195-204.
- [102] R. N. Wixtrom, B. D. Hammock, *Continuous spectrophotometric assays for cytosolic epoxide hydrolase*. *Anal. Biochem.* **174** (1988), 291-299.
- [103] E. C. Dietze, E. Kuwano, B. D. Hammock, *Spectrophotometric substrates for cytosolic epoxide hydrolase*. *Anal. Biochem.* **216** (1994), 176-187.
- [104] T. Watabe, K. Akamatsu, *Photometric assay of hepatic epoxide hydrolase activity with safole oxide (SAFO) as substrate*. *Biochem. Pharmacol.* **23** (1974), 2839-2844.
- [105] H.-F. Tzeng, L. T. Laughlin, S. Lin, R. N. Armstrong, *The catalytic mechanism of microsomal epoxide hydrolase involves reversible formation and rate limiting hydrolysis of the alkyl-enzyme intermediate*. *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996), 9436-9437.

- [106] R. N. Armstrong, W. Levin, D. M. Jerina, *Hepatic microsomal epoxide hydrolase. Mechanistic studies of the hydration of K-region arene oxides*. J. Biol. Chem. **255** (1980), 4698-4705.
- [107] M. Isobe, T. Sone, E. Takabatake, *p-Nitrophenyl vinyl ether, a novel substrate for the assay of cytochrome P-450 dependent olefinic epoxidation in hepatic microsomes*. J. Pharmacobiodyn. **8** (1985), 614-622.
- [108] C. Hassett, J. Lin, C. L. Carty, E. M. Laurenzana, C. J. Omiecinski, *Human hepatic microsomal epoxide hydrolase: comparative analysis of polymorphic expression*. Arch. Biochem. Biophys. **337** (1997), 275-283.
- [109] T. Sone, M. Isobe, E. Takabatake, N. Ozawa, T. Watabe, *7-Ethenyloxycoumarin as a new substrate for fluorophotometric assay of hepatic microsomal epoxidizing activities*. J. Pharmacobiodyn. **12** (1989), 149-158.
- [110] R. Preussmann, H. Schneider, F. Epple, *Untersuchungen zum Nachweis alkylirender Agentien*. Arzneimittel-Forsch. **19** (1969), 1059-1073.
- [111] K. Hemminki, T. Heinonen, H. Vainio, *Alkylation of Guanosine and 4-(p-Nitrobenzyl)-Pyridine by Styrene Oxide Analogues in vitro*. Arch. Toxicol. **49** (1981), 35-41.
- [112] E. C. Rietveld, F. J. C. van Gastel, F. Seutter-Berlage, B. Zwanenburg, *Glutathione conjugation and bacterial mutagenicity of racemic and enantiomerically pure cis- and trans-methyl epoxycinnamates*. Arch. Toxicol. **61** (1988), 366-372.
- [113] A. Barbin, J.-C. Béréziat, A. Croisy, I. K. O'Neill, *Nucleophilic selectivity and reaction kinetics of chloroethylene oxide assessed by the 4-(p-Nitrobenzyl)pyridine assay and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Chem.-Biol. Interact. **73** (1990), 261-277.
- [114] E. Eder, T. Neudecker, D. Lutz, D. Henschler, *Correlation of alkylating and mutagenic activities of allyl and allylic compounds: standard alkylation test vs. kinetic investigation*. Chem.-Biol. Interact. **38** (1982), 303-315.
- [115] J. H. Kim, J. J. Thomas, *Use of 4-(nitrobenzyl)Pyridine (4-NBP) to test mutagenic potential of slow-reacting epoxides, their corresponding olefins, and other alkylating agents*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **49** (1992), 879-885.
- [116] A. Hemminki, T. Väyrynen, K. Hemminki, *Reaction kinetics of alkyl epoxides with DNA and other nucleophiles*. Chem.-Biol. Interact. **93** (1994), 51-58.

- [117] R. Serrentino, P. G. Gervasi, *Photometric determination of microsomal epoxide hydrase activity by the 4-(p-nitrobenzyl)pyridine test*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **56** (1980), 2393-2397.
- [118] L. G. Hammock, B. D. Hammock, J. E. Casida, *Detection and analysis of epoxides with 4-(p-Nitrobenzyl)-pyridine*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **12** (1974), 759-764.
- [119] H. Bialy, *Intellectual property and the parsing of protein space*. *Nature Biotechnol.* **17** (1999), 2-3.
- [120] A. Schwienhorst, *Evolutionary Methoden im Enzymdesign*. *Biospektrum* **4** (1998), 44-47.
- [121] F. H. Arnold, *Design by directed evolution*. *Acc. Chem. Res.* **31** (1998), 125-131.
- [122] F. H. Arnold, J. C. Moore, *Optimizing industrial enzymes by directed evolution*. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **58** (1997), 1-14.
- [123] O. Kuchner, F. H. Arnold, *Directed evolution of enzyme catalysts*. *Trends Biotechnol.* **15** (1997), 523-530.
- [124] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Superior biocatalysts by directed evolution*. *Topic Curr. Chem.* **200** (1999), 31-57.
- [125] F. H. Arnold, *Directed evolution: Creating biocatalysts for the future*. *Chem. Eng. Sci.* **51** (1996), 5091-5102.
- [126] D. C. Demirjian, P. C. Shah, F. Morfs-Varas, *Screening for Novel Enzymes*. *Top. Curr. Chem.* **200** (1999), 1-29.
- [127] U. T. Bornscheuer, J. Altenbuchner, H. H. Meyer, *Directed evolution of an esterase for the stereoselective resolution of a key intermediate in the synthesis of Epothilones*. *Biotechnol. Bioeng.* **58** (1998), 554-559.
- [128] A. Greener, M. Callahan, B. Jerpseth, *An efficient random mutagenesis technique using E. coli mutator strain*. *Methods Mol. Biol.* **57** (1996), 375-385.
- [129] N. M. Low, P. H. Hollinger, G. Winter, *Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a mutator strain*. *J. Biol. Chem.* **260** (1996), 359-368.
- [130] W. P. C. Stemmer, *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994), 10747-10751.
- [131] W. P. C. Stemmer, *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*. *Nature* **370** (1994), 389-391.
- [132] I. Matsumura, A. D. Ellington, *DNA shuffling brightens prospects for GFP*. *Nature Biotechnol.* **14** (1996), 366.

- [133] S. Harayama, *Artificial evolution by DNA shuffling*. Trends Biotechnol. **16** (1998), 76-82.
- [134] J. R. Cherry, M. H. Lamsa, P. Schneider, J. Vind, A. Svendsen, A. Jones, A. H. Pedersen, *Directed evolution of a fungal peroxidase*. Nature Biotechnol. **17** (1999), 379-384.
- [135] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *Randomization of genes by PCR mutagenesis*. PCR Meth. Appl. **2** (1992), 28-33.
- [136] J. C. Moore, F. H. Arnold, *Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents*. Nature Biotechnol. **14** (1996), 458-467.
- [137] M. T. Reetz, A. Zonta, K. Schimossek, K. Liebeton, K.-E. Jaeger, *Erzeugung enantioselektiver Biokatalysatoren für die Organische Chemie durch In-vitro-Evolution*. Angew. Chem. **109** (1997), 2961-2963.
- [138] J. H. Spee, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, *Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP*. Nucl. Acids. Res. **21** (1993), 777-778.
- [139] J.-P. Vartanian, M. Henry, S. Wain-Hobson, *Hypermotagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions*. Nucl. Acids Res. **24** (1996), 2627-2631.
- [140] Y. Iwasaki, N. Mishima, K. Mizumoto, H. Nakano, T. Yamane, *Extracellular production of phospholipase D of Streptomyces antibioticus using recombinant Escherichia coli*. J. Ferment. Bioeng. **79** (1995), 417-421.
- [141] G. Fülling, C. J. Sih, *Enzymatic second-order asymmetric hydrolysis of ketorolac esters: in situ racemization*. J. Am. Chem. Soc. **109** (1987), 2845-2846.
- [142] C. Tesch, K. Nikoleit, V. Gnau, F. Götz, C. Bormann, *Biochemical and molecular characterization of the extracellular esterase from Streptomyces diastatochromogenes*. J. Bacteriol. **178** (1996), 1858-1865.
- [143] J. P. N. Rosazza, J. J. Steffens, S. Sariaslani, A. Goswami, J. M. Beale, S. Reeg, R. Chapman, *Microbial Hydroxylation of 1,4-Cineole*. Appl. Environ. Microbiol. **53** (1987), 2482-2486.
- [144] S. Lutz-Wahl, P. Fischer, C. Schmidt-Dannert, W. Wohlleben, B. Hauer, R. D. Schmid, *Stereo- and regioselective hydroxylation of alpha-ionone by Streptomyces strains*. Appl Environ Microbiol **64** (1998), 3878-3881.

- [145] K.-H. van Pée, F. Lingens, *Purification and molecular catalytic properties of bromoperoxidase from Streptomyces phaeochromogenes*. J. Gen. Microbiol. **131** (1985), 1911-1916.
- [146] M. Weng, O. Pfeifer, S. Krauss, F. Lingens, K.-H. van Pée, *Purification, characterization and comparison of two non-haem bromoperoxidases from Streptomyces aureofaciens ATCC10762*. J. Gen. Microbiol. **137** (1991), 2539-2546.
- [147] R. Zeiner, K.-H. van Pée, F. Lingens, *Purification and partial characterization of multiple bromoperoxidases from Streptomyces griseus*. J. Gen. Microbiol. **134** (1988), 3141-3149.
- [148] K.-H. van Pée, G. Sury, F. Lingens, *Purification and properties of a nonheme bromoperoxidase from Streptomyces aureofaciens*. Biol. Chem. Hoppe Seyler **368** (1987), 1225-1232.
- [149] K.-H. van Pée, *Molecular cloning and high-level expression of a Bromoperoxidase gene from Streptomyces aureofaciens Tü24*. J. Bact. **170** (1988), 5890-5894.
- [150] R. Bantleon, J. Altenbuchner, K.-H. van Pée, *Chloroperoxidase from Streptomyces lividans: Isolation and characterization of the enzyme and the corresponding gene*. J. Bact. **176** (1994), 2339-2347.
- [151] M. Knoch, K.-H. van Pée, L. C. Vining, F. Lingens, *Purification, properties and immunological detection of a bromoperoxidase-catalase from Streptomyces venezuelae and from a chloramphenicol-nonproducing mutant*. J. Gen. Microbiol. **135** (1989), 2493-2502.
- [152] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers*. J. Am. Chem. Soc. **104** (1982), 7294-7299.
- [153] M. M. Enzelberger, F. Zocher, C. Schmidt-Dannert, U. T. Bornscheuer, R. D. Schmid, H. Eipel, B. Hauer, *Vereinzelung von Enzymmutanten durch Einsatz von FACS und des GFP*. Bioforum **21** (1998), 192-194.
- [154] B. Shen, S. J. Gould, *Opposite facial specificity for two hydroquinone epoxidases: (3-si,4-re)-2,5-Dihydroacetanilide Epoxidase from Streptomyces LL-C10037 and (3-re,4-si)-2,5-Dihydroxyacetanilide Epoxidase from Streptomyces MPP3051*. Biochemistry **30** (1991), 8936-8944.
- [155] S. Omura, S. Minami, H. Tanaka, *Biosynthesis of Nanaomycin: Syntheses of Nanaomycin E from Nanaomycin A and of Nanaomycin B from Nanaomycin E in a cell-free system*. J. Biochem. **90** (1981), 291-293.

- [156] H. J. Hecht, H. Sobek, T. Haag, O. Pfeifer, K.-H. v. Pée, *The metal-ion-free oxidoreductase from Streptomyces aureofaciens has an a/b hydrolase fold*. Nature Struct. Biol. **1** (1994), 532-537.
- [157] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Laboratory Press 1989.
- [158] U. K. Laemmli, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227** (1970), 680-685.
- [159] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51** (1986), 263-273.
- [160] M. M. Ling, B. H. Robinson, *Approaches to DNA Mutagenesis: An overview*. Anal. Biochem. **254** (1997), 157-178.
- [161] D. H. Jones, K. Sakamoto, R. L. Vorce, B. H. Howard, *DNA mutagenesis and recombination*. Nature **344** (1990), 793-794.
- [162] I. Mikaelian, A. Sergeant, *A general and fast method to generate multiple site directed mutations*. Nucleic Acids Res. **20** (1992), 376.
- [163] H. C. Birnboim, J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res. **7** (1979), 1513-1527.
- [164] M. A. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York 1993.
- [165] C. T. Chung, S. L. Niemela, R. H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** (1989), 2172-2175.
- [166] J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zargursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister, *A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides*. Science **238** (1987), 336-341.
- [167] J. J. Burbaum, *Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon?* Drug Discovery Today **3** (1998), 313-322.
- [168] J. G. Houston, M. Banks, *The chemical-biological interface: developments in automated and miniaturised screening technologies*. Curr. Opin. Biotechnol. **8** (1997), 734-740.

- [169] S. A. Furlan, M. F. Carvalho-Jonas, R. Merkle, G. B. Bértoli, R. Jonas, *Application of the Microtiter Reader System for screening of beta-D-galactosidase producing microorganisms*. Arq. Biol. Technol. **38** (1995), 1261-1268.
- [170] A. J. Cairns, *Colorimetric microtiter plate assay of glucose and fructose by enzyme-linked formazan production: applicability to the measurement of fructosyl transferase activity in higher plants*. Anal. Biochem. **167** (1987), 270-278.
- [171] P. J. Hergenrother, M. K. Haas, S. F. Martin, *Chromogenic assay for phospholipase D from Streptomyces chromofuscus: Application to the evaluation of substrate analogs*. Lipids **32** (1997), 783-788.
- [172] A. R. Quesada, A. Canedo, M. A. Moreno, J. L. Fernandez-Puentes, *A microtiter plate-based assay for screening of beta-lactams*. Lett. Appl. Microbiol. **22** (1996), 303-306.
- [173] J. M. Walker, J. S. Winder, S. J. Kellam, *High-throughput microtiter plate-based chromogenic assays for glycosidase inhibitors*. Appl. Biochem. Biotechnol. **38** (1993), 141-146.
- [174] N. B. Waslidge, D. J. Hayes, *A colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity suitable for use in a high throughput assay format*. Anal. Biochem. **231** (1995), 354-358.
- [175] S. Linko-Loepponen, M. Makinen, *A microtiter plate assay for N-acetyl-b-D-glucosaminidase using a fluorogenic substrate*. Anal. Biochem. **148** (1985), 50-53.
- [176] L. M. Levine, M. L. Michener, M. V. Toth, B. C. Holwerda, *Measurement of Specific Protease Activity Utilizing Fluorescence Polarisation*. Anal. Biochem. **247** (1997), 83-88.
- [177] C. L. Crespi, V. P. Miller, B. W. Penman, *Microtiter plate assays for inhibition of human drug-metabolizing cytochromes P450*. Anal. Biochem. **248** (1997), 188-190.
- [178] N. Lubenow, F. Diepenbrock, H. Schickling, D. Bock, R. Heckler, J. Sander, *Phenylketonurie screening with a fluorometric microplate assay*. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **32** (1994), 525-528.
- [179] D. C. Hill, S. K. Wrigley, L. J. Nisbet, *Novel Screen Methodologies for Identification of New Microbial Metabolites with Pharmacological Activity*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **59** (1998), 75-121.
- [180] C. A. Baker, R. A. Poorman, F. J. Kezdy, D. J. Staples, C. W. Smith, A. P. Elhammer, *A scintillation proximity assay for UDP-GalNAc:polypeptide, N-acetyl-galactosaminyltransferase*. Anal. Biochem. **239** (1996), 20-24.

- [181] M. T. Reetz, M. H. Becker, K. M. Kühling, A. Holzwarth, *Zeitaufgelöste IR-thermographische Detektion und Screening von enantioselektiven katalytischen Reaktionen*. *Angew. Chem.* **110** (1998), 2792-2795.
- [182] M. Auer, K. J. Moore, F. J. Meyer-Almes, R. Guenther, A. J. Pope, K. A. Stoeckli, *Fluorescence correlation spectroscopy: lead discovery by miniaturized HTS*. *Drug Discovery Today* **3** (1998), 457-465.
- [183] U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwille, M. Eigen, *Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 1416-1420.
- [184] A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler, M. Eigen, *Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: high-throughput screening for enzyme activity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 1421-1426.
- [185] D. W. Brandt, *Core system model: understanding the impact of reliability on high-throughput screening systems*. *Drug Discovery Today* **3** (1998), 61-68.
- [186] C. Schmidt-Dannert, persönliche Mitteilung.
- [187] F. Zocher, N. Krebsfänger, O. J. Yoo, U. T. Bornscheuer, *Enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens**. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **5** (1988), 199-202.
- [188] N. Krebsfänger, F. Zocher, J. Altenbuchner, U. T. Bornscheuer, *Production, purification, characterization, and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens**. *Enzyme Microb. Technol.* **22** (1998), 641-646.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name	Frank Zoher
Geburtsdatum/-ort	26. Dezember 1969 in Ludwigsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung:

1977 - 1980	Schloßlesfeld Grundschule Ludwigsburg
1980 - 1989	Mörike Gymnasium Ludwigsburg
Mai 1989	Abitur am Mörike Gymnasium

Wehrdienst:

1989 - 1990	Zivildienst Rettungsdienst Deutsches Rotes Kreuz Ludwigsburg
-------------	--

Wissenschaftliche Ausbildung:

1990 - 1996	Studium der Chemie an der Universität Stuttgart
Mai 1993	Diplomvorprüfung
Januar - Februar 1996	Diplomhauptprüfung
Februar - August 1996	Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. D. Schmid über „Untersuchungen von Lipasen und Esterasen gegenüber primären Alkoholen und chiralen Carbonsäuren“