

Studien zur Substratspezifität der Linalool Dehydratase-Isomerase mit dem Fokus auf der Dehydratisierung von tertiären Alkoholen

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

Vorgelegt von
Christopher Geinitz
aus Berlin

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Dieter Wolf
Vorsitzender:	Prof. Dr. Joris van Slageren
Tag der Verteidigung:	22. Oktober 2015

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2015

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Studien zur Substratspezifität der Linalool Dehydratase-Isomerase mit dem Fokus auf der Dehydratisierung von tertiären Alkoholen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled „Studies on substrate specificity of the Linalool Dehydratase-Isomerase with focus on the dehydration of tertiary alcohols“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 19.02.2015

Christopher Geinitz

Danksagung

Für die Möglichkeit der Promotion in der Biokatalyse mit einem spannenden Thema, großem Freiraum, konstruktiver Unterstützung sowie den hervorragenden Arbeitsbedingungen am ITB danke ich herzlichst Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Dr. Bettina Nestl für die sehr gute Betreuung, die vielen hilfreichen Fachgespräche und Hilfestellungen vor allem bezüglich englischsprachiger Arbeiten während meiner Doktorarbeit.

Zudem möchte ich mich noch bei Prof. Dr. Johannes Kästner für die freundliche Unterstützung bezüglich quantenmechanischer Probleme bedanken.

Für die tolle Zusammenarbeit möchte ich mich außerdem herzlichst bei Verena Dederer, Ina Dutzi, Melanie Rosenberger und Carolin Sailer bedanken, die mich zu unterschiedlichsten Problemen und Stadien dieser Arbeit unterstützten.

Außerdem möchte ich mich bei Conny und Jule bedanken, die mir sehr mit Abbildung 56 geholfen haben.

Desweiteren gilt ebenfalls mein besonderer Dank Gargamel, Katze, BJ, Sumi, Marko, Phillip S., Konrad, Sebastian, Sven R., Janosch und Bernd die mir vor allem zu Beginn meiner Promotion aber auch später jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und ihr wissenschaftliches Gedankengut mit mir teilten. Darüber hinaus danke ich vor allem für die netten Pausen mit Milch und Wasser (was mich betrifft) und Gebäck, herausfordernden Diskussionen, den tollen Abenden mit Spaß und Kultur sowie anderweitigen Unternehmungen Lisa, Jule, Christine, Phillip T., Horny, Lna, Jörg, Wouter, Franzi, Silke, Dominique, Thorsten, Andy, Martin, Per-Olof, Miri, Kathrin, Stephan, Sabrina, Silvi, Conny, Mihaela sowie Mina und Melli. Falls ich jemanden vergessen haben sollte, so danke ich hiermit noch einmal allen Mitarbeitern des ITB's für die tolle Atmosphäre während meiner Promotion.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der Europäischen Union (KyroBio).

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

„Auch eine Enttäuschung, wenn sie nur gründlich und endgültig ist, bedeutet einen Schritt vorwärts.“

- Max Planck

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

- Sir Isaac Newton

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
ABSTRACT	3
ZUSAMMENFASSUNG	5
1. EINLEITUNG	8
1.1. Die chemische Hydratisierung	13
1.2. Die chemische Dehydratisierung.....	16
1.3. Hydro-Lyasen und ihre Möglichkeiten	21
1.3.1. Kofaktorabhängige Hydro-Lyasen.....	22
1.3.2. Kofaktorunabhängige Hydro-Lyasen.....	30
1.4. Zielsetzung	42
2. MATERIAL UND METHODEN	43
2.1. Materialien, Medien und Puffer.....	43
2.1.1. Enzyme und Puffer	43
2.1.2. Chemikalien und Kits (nicht für Synthesen).....	43
2.1.3. Medien und Puffer	45
2.2. Synthesen.....	48
2.2.1. 2,6-Dimethyl-5-hepten-2-ol (3)	48
2.2.2. 3,7-Dimethyl-6-okten-3-ol (4)	48
2.2.3. 3,7-Dimethyl-6-okten-1-in-3-ol (6)	49
2.2.4. (<i>E</i>)-3,7-Dimethylokta-1,4,6-trien-3-ol (7)	49
2.2.5. (<i>E</i>)-3,7-Dimethylokta-4,6-dien-3-ol (8).....	49
2.2.6. (<i>E/Z</i>)-4,8-Dimethyl-2,7-nonadien-4-ol (10/11).....	50
2.2.7. 3-Ethyl-1-okten-3-ol (12).....	50
2.2.8. (<i>E</i>)-3-Methyl-4-Okten-3-ol (13)	51
2.2.9. (<i>E</i>)-3-Methyl-1,4-oktadien-3-ol (14)	51
2.2.10. 3-Methyl-1-penten-3-ol (17).....	51
2.2.11. 3-Methyl-1-hexen-3-ol (18).....	52
2.2.12. 3-Methyl-1-hepten-3-ol (19).....	52
2.2.13. 3-Methyl-1-okten-3-ol (20)	52
2.2.14. 3-Methyl-1-nonen-3-ol (21).....	53
2.2.15. 3-Methyl-1-decen-3-ol (22).....	53

2.2.16.	3-Methyl-5-phenyl-1-penten-3-ol (23)	53
2.2.17.	3-Ethyl-1-vinylcyclopentanol (24)	54
2.2.18.	3,5-Dimethyl-1-hexen-3-ol (25)	54
2.2.19.	2-Phenyl-3-buten-2-ol	54
2.2.20.	7-Methyl-1,6-oktadien-3-ol (5) [105, 106]	55
2.2.21.	Linalylamin (9) [107]	56
2.2.22.	3-Methoxy-3, 7-dimethyl-1,6-oktadien (15).....	58
2.2.23.	Butylcyclopent-2-enol (27) [108]	58
2.2.24.	d ⁵ -Linalool (33) [109].....	59
2.3.	Stämme und Plasmide.....	60
2.3.1.	Mikrobiologisches Arbeiten.....	61
2.4.	Zellkultur und Stammhaltung	61
2.4.1.	Agarplatten.....	61
2.4.2.	Übernachtskulturen.....	61
2.4.3.	Stammhaltung	61
2.4.4.	Anzucht von <i>E. coli</i> und heterologe Expression im Schüttelkolben	61
2.4.5.	Zellaufschluss mittels Ultraschall (Sonification)	62
2.4.6.	Zellaufschluss durch chemische Lyse.....	62
2.4.7.	Zellaufschluss mittels Emulsifier.....	62
2.5.	Mikrobiologische Methoden.....	63
2.5.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	63
2.5.2.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)	63
2.5.3.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Hilfe der Hitzeschock-Methode.....	63
2.5.4.	Amplifizierung eines Gens mittels Polymerasekettenreaktion	64
2.5.5.	Kolonie-PCR.....	65
2.5.6.	Agarose-Gelelektrophorese und Isolation von DNA-Fragmenten.....	66
2.5.7.	Restriktionsverdau von DNA.....	67
2.5.8.	Ligation von DNA-Fragmenten	68
2.5.9.	DNA-Sequenzierung.....	70
2.6.	Analytische und Biochemische Methoden.....	70
2.6.1.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	70
2.6.2.	Western Blot	70
2.6.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	72
2.6.4.	Proteinaufreinigung.....	72
2.6.5.	Pufferaustausch	74
2.6.6.	Biotransformationen	74

2.7.	Analytik.....	75
3.	ERGEBNISSE	76
3.1.	Klonierung, Expression und Aufreinigung	76
3.2.	Biotransformationen	79
3.2.1.	Substratscreening	80
3.2.2.	Neue Reaktionen.....	88
3.2.3.	Nukleophile Addition.....	90
3.3.	Studien zum Mechanismus	91
3.3.1.	Experimente mit Deuterium.....	92
3.3.2.	Linalylamin als Inhibitor.....	97
3.4.	Lösungsmittelstabilität und Einfluss auf den Umsatz.....	98
3.5.	Homologiemodellierung.....	104
3.6.	Entwicklung eines Screening Assays	107
4.	DISKUSSION	116
4.1.	Klonierung, Expression und Aufreinigung	116
4.2.	Biotransformationen	118
4.2.1.	Umsetzung der Substrate	119
4.2.2.	Neue Reaktionen.....	127
4.2.3.	Nukleophile Addition.....	128
4.3.	Studien zum Mechanismus	128
4.3.1.	Experimente mit Deuterium.....	128
4.4.	Lösungsmittelstabilität.....	131
4.5.	Homologiemodellierung.....	132
4.6.	Entwicklung eines High-throughput Screenings	134
5.	AUSBLICK	136
6.	ANHANG	139
6.1.	Analytik.....	139
6.2.	Chromatogramm der Umsetzung des Methylethers 15.....	140
6.3.	Plasmidkarten.....	141
7.	LITERATURVERZEICHNIS	143

CURRICULUM VITAE 154

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Masse/Volumen
δ	Chemische Verschiebung (phys. Größe [ppm])
A ₆₀₀	Absorption bei 600 nm
Amp	Ampicillin
ABTS	Diammonium-2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	demineralisiertes und deionisiertes Wasser
dNTPs	Mischung aus den 4 Desoxynukleotidtriphosphaten
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
GC	Gaschromatograph(ie)
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HPLC	Hochdruck(performance)flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl β -D-1-galactopyranosid

Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
LB	engl.: lysogeny-broth
LDI	Linalool Dehydratase-Isomerase
min	Minute
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazon Hydrochlorid Monohydrat
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MTBE	Methyltertbutylether
MS	Massenspektrometer(trie)
n-	nano ($\cdot 10^{-9}$)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
p-	pico ($\cdot 10^{-12}$)
ppm	engl.: parts per million (engl. Einheit der chemischen Verschiebung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	engl.: terrific-broth
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
U	Unit
z. B.	zum Beispiel

Abstract

The increasing interest on dehydration reactions is caused by the large problems which are present nowadays in the degradation of sustainable resources and their derived products. In this light, enzymes like lyases with C-X bond-forming and bond-cleaving ability are getting more and more important. Regarding sustainable resources like sugars or cellulose the role of novel dehydratases with C-O cleaving ability is outstanding.

This work is concerned with the linalool dehydratase-isomerase from the β -proteobacteria *Castellaniella defragrans*. Herein the LDI is involved in the degradation pathway of the monoterpene myrcene through selective hydration of myrcene into (*S*)-linalool followed by isomerization into geraniol. Further steps in this pathway most probably involve the oxidation into geranial and geranic acid, finally be degraded via β -oxidation.

This work mainly employs the problems of the little specified enzyme LDI concerning substrate specificity and further characterization especially of the mechanism. Beginning with expression of the LDI we established a system in *E. coli* BL21(*DE3*). Biotransformations with lysate showed highest activity towards dehydration at slightly acidic conditions. For a better understanding about substrate specificity we synthesized a large substrate library including many linalool derivatives. Using this library we discovered a very broad substrate scope of the LDI. In addition to the monoterpenes linalool and derivatives, small to large substrates were accepted. Interestingly nearly all of the substrates converted had a specific tertiary α -methylallyl alcohol motif in common. Further we could identify linalyl amine as potent inactivator for the LDI. Also all accepted substrates showed a high EE resulting in accumulation of the (*R*)-alcohol regarding dehydration. Experiments using deuterium oxide as well as comparison of d^5 -linalool with linalool gave further detailed information about a possible mechanism. Herein the results of the specific activities lead to the fact that hydration of the hydroxyl-group is the rate-determining step. Using rotamer structures of non-accepted and converted substrates as well as secondary structure prediction gave first insights into a possible structure model. By making use of the postulated mechanism we found out that besides water also methanol could be eliminated. This reaction could be verified in additional experiments using methanol resulting in nucleophile addition. While using other solvents we could gain further information about the solvent resistance of the LDI. In order to develop a screening system the described reaction about elimination of methanol was successfully endorsed on

several coupling assays based on formaldehyde or hydrogen peroxide. Within this set the coupling reaction of 4-aminoantipyrine with vanillic acid appears to be the best one.

To conclude the LDI's role in dehydrating sustainable resources is limited because of the very specific motif needed for dehydration. But the possibility of dehydrating very small substrates as well as the synthesis of enantioselective (*R*)- and (*S*)-alcohols is from an industrial point of view very valuable.

Zusammenfassung

Die natürliche Funktion der aus dem Proteobakterium *Castellaniella defragrans* stammenden Linalool Dehydratase-Isomerase liegt in der Funktionalisierung des Monoterpens Myrcen. Dabei wird im ersten Schritt Myrcen zu Linalool hydratisiert, während im zweiten Schritt die Isomerisierung von Linalool zu Geraniol stattfindet. Im weiteren Verlauf wird Geraniol vermutlich zu Geranial und Geranialsäure weiteroxidiert und kann so über die β -Oxidation abgebaut werden. In dieser Arbeit mit dem Fokus auf der Substratspezifität bezüglich der Dehydratisierung konnte sehr viel mehr über die LDI, vor allem in Hinblick auf den Mechanismus, das Substratspektrum und der weiteren Charakterisierung der LDI, in Erfahrung gebracht werden. So beschränkt sich das Substratspektrum nicht bloß auf die Monoterpene Myrcen, Linalool und Geraniol sondern es werden auch die Diterpene Farnesol und Nerolidol ohne Probleme akzeptiert. Neben diesen konnte auch eine Vielzahl anderer Substrate umgesetzt werden, wobei allen Substraten ein spezifisches Strukturmotiv eigen ist. Alle Substrate bestehen aus einem tertiären α -Methylallylalkohol und einem variierenden Rest. Interessanterweise muss an dem Kohlenstoff der Alkoholfunktion nicht zwingend in α -Stellung eine Methylgruppe liegen. Hier konnte auch gezeigt werden, dass eine Ethylgruppe oder ein Cyclopentanring ebenfalls von der LDI akzeptiert werden. Neben diesen Substraten konnten auch sehr kurze Substrate wie 2-Methyl-3-buten-2-ol **16** umgesetzt werden, aber auch aromatische Substrate **23** oder sehr lange Substrate wie Isophytol **32**.

Durch Synthesen einer Vielzahl strukturell abgewandelter Derivate des Linalools konnte indes ein guter Überblick über den Mechanismus gewonnen werden. Die Tatsache, dass kein Substrat ohne Vinylgruppe umgesetzt werden konnte, auch wenn diese aus elektronischer Sicht durch eine andere Doppelbindung ersetzt wurde, unterstreicht die Wichtigkeit dieser für die Bindung in das aktive Zentrum. Zudem konnte unter Verwendung von Rotameren mehr über die nähere Umgebung des aktiven Zentrums herausgefunden und gleichzeitig begründet werden, warum einige der synthetisierten Substrate wie **7** und **8** nicht umgesetzt werden konnten. Unter Zuhilfenahme von Deuteriumoxid im Puffer sowie durch den Vergleich der Dehydratisierung von Linalool mit d^5 -Linalool konnte zudem herausgefunden werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht die C-H Bindungsspaltung an dem Methylenkohlenstoff ist, sondern die Protonierung und Abspaltung der Hydroxyfunktion was zur Ausbildung eines Karbokations führt. Dieses Karbokation wird zudem über die Vinylgruppe durch Hyperkonjugation mesomerie-stabilisiert. Im weiteren Verlauf wird ein

Proton am α -Methylkohlenstoff abgespalten und es folgt die Ausbildung der C-C Doppelbindung.

Dieser Mechanismus konnte erfolgreich gegenüber anderen funktionellen Gruppen getestet werden. Hierbei konnte der Methylether des Linalools ebenfalls erfolgreich eliminiert werden. Aufgrund des etwas niedrigeren pK_B -Wertes des Methoxysauerstoffs gegenüber dem des tertiären Alkohols, kann dieser protoniert und Methanol abgespalten werden. Interessant war hierbei, dass sogar die Rückreaktion in 30 % Methanol gelang, wenn auch nur in sehr begrenzten Mengen. Andere Struktur motive wie die des Esters wurden ebenfalls getestet. Vor allem die Ergebnisse bezüglich Vinylester sind sehr interessant. Leider konnte hierbei keine reine LDI getestet werden, weswegen die Aussagen dieser Ergebnisse nicht als gefestigt angesehen werden sollten.

Um die LDI weiter zu charakterisieren, wurden die Reaktionen der Hydratisierung und der Dehydratisierung am Beispiel von Linalool und Myrcen in unterschiedlichen Lösungsmitteln getestet. Interessanterweise führte die Verwendung aller Lösungsmittel zur Inaktivierung der LDI, wobei vor allem auffällt das polar-protische Lösungsmittel wie DMSO, Methanol und Ethanol einen eher geringen Einfluss haben, wohingegen aprotische Lösungsmittel wie Ethylacetat, THF oder Toluol sehr schnell zur Inaktivierung führen. Einzige Ausnahme ist, dass bei der Hydratisierung von Myrcen polar-protische Lösungsmittel ohne Vorinkubation zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung in den ersten Minuten führen.

Die Möglichkeit Methanol aus Substrat **15** eliminieren zu können, ermöglichte es ein Screening auf Basis der Oxidation von Methanol in Formaldehyd mit Hilfe der Glucose Oxidase zu entwickeln. Das hierbei gebildete Wasserstoffperoxid dient der Meerrettichperoxidase die Kupplungsreaktion von 4-Aminoantipyrin und Vanillinsäure durchzuführen. Während die Reaktion im Eppimaßstab eine rote Färbung des Lysats nach sich führte, war die Differenz zwischen Negativ- und Positivkontrolle in den 96 Well Platten innerhalb der gegebenen Zeit zu gering, um verlässliche Aussagen zu liefern. Das Problem lag hierbei eindeutig in der zur Verfügung stehenden Menge an LDI im Lysat. Das Expressionssystem BL21(*DE3*) reichte für das Screening nicht aus, um einen nennenswerten Umsatz zu erzielen. Von daher ist es hier sinnvoll, ein neues Expressionssystem zu entwickeln. Erste Ansätze mit einem auf dem T5 Promotor basierenden Expressionssystem sehen vielversprechend aus.

Das Dehydratisierungsreaktionen eine immer wichtigere Rolle spielen, was vor allem der Defunktionalisierung von nachwachsenden Rohstoffen und deren Folgeprodukten geschuldet

ist, lässt weitere Forschung hinsichtlich enzymatisch vermittelter Reaktionen notwendig erscheinen. Die LDI wird vermutlich in der Defunktionalisierung von Zuckern und Derivaten keine Rolle spielen, da sich ihre Aktivität bisher auf Substrate mit einem spezifischen tertiären Allylalkohol-Motiv beschränkt. Dennoch ist das ermittelte Substratspektrum sehr groß wobei vor allem die Möglichkeit sehr kleine Substrate zu dehydratisieren sowie selektiv tertiäre (*R*)- und (*S*)-Alkohole herzustellen, für die Industrie von großem Interesse ist.

1. Einleitung

Der stetig steigende Energiebedarf der großen Industrienationen wie auch der Schwellenländer scheint nur noch wenige Jahrzehnte aus den derzeitigen konventionellen Lagerstätten für Kohle, Erdöl, Uran oder Erdgas gedeckt werden zu können. Aus diesem Grund muss über alternative Möglichkeiten, den Energiehunger der großen Nationen zu stillen, nachgedacht werden. Die Ausbeutung neuer Lagerstätten in bisher unberührten Gebieten wie der Antarktis oder Grönland, die Suche auf dem Meeresboden mit für die Umwelt verheerenden Folgen wie zum Beispiel bei der Ölkatastrophe von BP im Golf von Mexiko (Deepwater Horizon¹), oder die noch sehr umstrittene hydraulische Frakturierung (Fracking)[1] bei der Wasser versetzt mit Additiven unter hohem Druck in die Tiefe gepresst wird um das Gestein aufzubrechen, sind wohl die bekanntesten und wahrscheinlichsten Alternativen zur derzeitigen fossilen Rohstoffgewinnung.[2] Gleichzeitig gibt es aber auch Bestrebungen Energieträger auf Basis nachwachsender Rohstoffe zu gewinnen. Schon in den 70er Jahren wurde Bioethanol als Folge des Jom-Kippur Krieges und dem damit verbundenen Ölembargo der OPEC-Staaten sowie dem ersten Golfkrieg als mögliche Alternative zu den fossilen Brennstoffen wiederentdeckt [3, 4], galt es doch aufgrund der Herstellung aus nachwachsenden Rohstoffen als umweltfreundliches Produkt. Vor allem Brasilien und die Vereinigten Staaten begannen daraufhin, basierend auf Zuckerrohr und Mais, Bioethanol als Kraftstoff, hauptsächlich für den eigenen Markt, zu produzieren [5]. Noch heute wird Bioethanol fast ausschließlich aus stark zucker- oder stärkehaltigen Pflanzen gewonnen. Aufgrund des stetig steigenden Bedarfs bei den derzeit zur Verfügung stehenden Agrarflächen, welche in der Konkurrenz zum Lebensmittelmarkt stehen, kann dieser allerdings selbst bei Intensivierung der Landwirtschaft nicht mehr gedeckt werden.

Von daher wird derzeit intensiv nach Methoden gesucht, die ganze Pflanze bzw. die bei der landwirtschaftlichen Nutzung anfallenden Pflanzenreste wie Stroh oder Holzreste zu verwerten. Diese bestehen hauptsächlich aus Cellulose und Hemicellulose, weitverzweigte Polysaccharide, die sich im Moment nur schwer enzymatisch in ihre Mono- oder Disaccharide zerlegen lassen, was einer der Hauptgründe dafür ist warum Bioethanol immer noch größtenteils aus Pflanzen wie Soja, Zuckerrohr, Getreide oder Mais hergestellt wird.

Neben der gezielten Herstellung von Bioethanol aus nachwachsenden Rohstoffen richtet sich der Fokus der Industrie aber auch immer mehr hin zu wichtigen Grundchemikalien für die

¹ Name der Ölplattform im Golf von Mexiko bei der es am 20. April 2010 zu einem Blowout kam.

Synthese von komplexen Molekülen wie Polymeren oder Pharmaka auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Eine der wichtigsten Chemikalien für die chemische Industrie, Ethylen, lässt sich bereits aus Bioethanol durch Dehydratisierung herstellen. Das Unternehmen Braskem (Brasilien) produziert auf diese Weise Polyethylen (PE) auf Basis von Zuckerrohr [6].

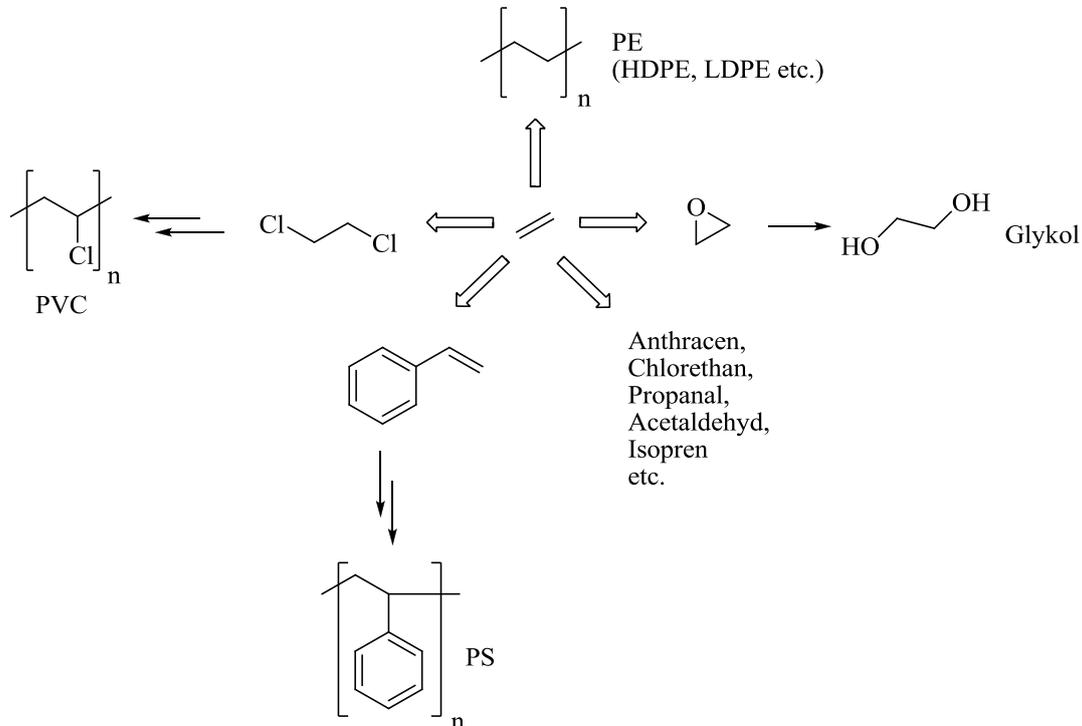


Abbildung 1 Die Wege des Ethylens. Dargestellt ist die Vielfalt an immens wichtigen Molekülen für die Wirtschaft, die sich aus der Grundchemikalie Ethylen herstellen lassen. Seien es Polymere wie Polyethylen (PE; HDPE: high density polyethylen; LDPE: low density polyethylen), Polyvinylchlorid (PVC), Polystyrol (PS) oder auch Glykol, Isopren, Acetaldehyd etc..

Ethylen findet sich neben Polyethylen aber auch in vielen anderen Kunststoffen wie Polystyrol und Polyvinylchlorid und wird auch in der Synthese weiterer Basischemikalien wie Glykol, Anthracen, Acetaldehyd oder Isopren (Abbildung 1), die ebenso Basis für eine Vielzahl weiterer Chemikalien sind, eingesetzt.

Neben Ethylen werden auch weitere Chemikalien heute großtechnisch oder aber zumindest im Pilotmaßstab in Bioraffinerien hergestellt. 1,3-Propandiol (DuPont Tate&Lyle), Butanol und Isobutanol (ButamaxTM, Gevo, DuPont, BP etc.), Acrylsäure (Dow & OPXBio), Lävulinsäure (Maine BioProducts), Isopren (Goodyear & Genencor (DuPont)), Glykol (Archer Daniels Midland), Isosorbid (Roquette), Bernsteinsäure (BioAmber) oder auch Adipinsäure (Genomatica, Verdezyne) sind nur einige Beispiele für wichtige Chemikalien an denen die Industrie interessiert ist.[7]

Viele dieser Chemikalien werden als sogenannte Plattformchemikalien bezeichnet, da sie Ausgangsprodukte für eine Vielzahl chemisch relevanter Verbindungen sind. Vor allem in dem Bereich der Polymere und Kunststoffe ist ihr Einsatz immens gefragt. Neben einfachen Polymeren wie Polyethylen (PE), verzweigtem PE (HDPE, LDPE etc.), Polypropylen und Polystyrol, werden sie auch zur Gewinnung von Kautschuk (aus Isopren), Cyclo-Olefin-Copolymeren (COC) und Polytrimethylterephthalat (PTT) (u.a. aus 1,3-Propandiol) verwendet. Eine weitere Basischemikalie, die in den letzten Jahren intensiv an Bedeutung gewonnen hat, ist 1,4-Butandiol. Heutzutage wird es hauptsächlich aus Acetylen und Formaldehyd (Repp-Prozeß), aber auch z.B. aus Maleinsäureanhydrid (Davy-Prozeß), gewonnen. Aber vor allem aufgrund des rasant wachsenden Marktes des Folgeproduktes Butadien ist eine Syntheseroute auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen sehr gefragt. Das Marktforschungsinstitut Ceresana geht davon aus, dass der Verbrauch von Butadien im Jahre 2020 auf etwa 13,7 Mio Tonnen ansteigen wird [8] (vgl. die Produktion von Ethylen, der am meisten produzierten Chemikalie, betrug im Jahr 2013 etwa 130 Mio. Tonnen [9]). Allein OMV investiert bis 2015 etwa 230 Mio. Euro in den Ausbau der Butadienproduktion [10]. Butadien wird hauptsächlich für die Produktion von Butadien-Styrol-Kautschuk verwendet, findet aber auch Anwendung in der Produktion von Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) (Copolymer) oder dient als wichtiges Zwischenprodukt in der Produktion von Nylon. Erste Erfolge für die Biosynthese von 1,4-Butandiol aus Zuckern mit Hilfe von *E. coli* wurden 2011 in Nature Chemical Biology [11] veröffentlicht. Hierbei wird auch die enge Verknüpfung von Industrie und Forschung im Bereich der Biotechnologie offensichtlich. In 2012 gelang es Genomatica & DuPont 1,4-Butandiol fermentativ in großtechnischem Maßstab (mehr als 2000 t) in fünf Wochen herzustellen [12].

Generell ist der Einsatz von Enzymen gegenüber vielen chemischen Reaktionen zu bevorzugen. Gravierende Nachteile wie Umweltverschmutzung, die Bildung von Nebenprodukten und den damit einhergehenden schlechten Ausbeuten, ein hoher Energieverbrauch, giftige oder extreme Prozesse, die spezielle Anlagen und Sicherheitsanforderungen erforderlich werden lassen, sowie ein hoher Verbrauch an Chemikalien, der sich negativ auf die Umwelt auswirkt, können durch den Einsatz von Enzymen theoretisch gelöst werden. Enzyme besitzen hohe Regio- und Stereoselektivitäten, hohe Reaktionsgeschwindigkeiten und ihre Reaktionen laufen für gewöhnlich bei milden Reaktionsbedingungen ab. Ein weiterer großer Vorteil von Enzymen ist, dass meistens schon relativ geringe Mengen ausreichen um Reaktionen in industriellem Maßstab zu katalysieren. Die milden Reaktionsbedingungen sowie die relativ einfache Kontrolle der Reaktionen reduzieren die Anforderungen an großtechnischen Anlagen und

zudem wird durch ihren Einsatz der Verbrauch von Chemikalien, Wasser und Energie deutlich reduziert, was zu einem geringeren Abfallaufkommen führt.

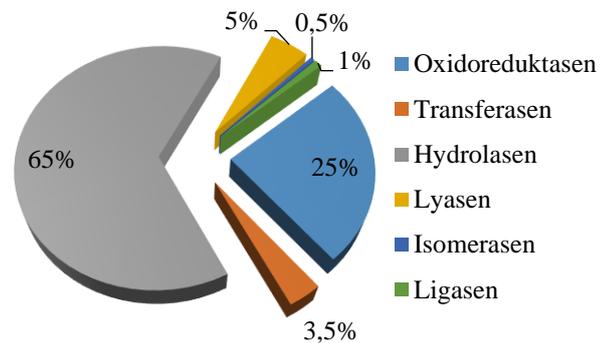


Abbildung 2 Verteilung der Enzymklassen in der Industrie [13].

Ein großes Problem bei der gezielten Herstellung von Basischemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen ist die Überfunktionalisierung der Zuckermoleküle. Die gezielte Defunktionalisierung dieser, um gewünschte Produkte zu erhalten, erweist sich aber immer noch als äußerst schwierig. Da die organische Chemie hierbei auf große Probleme stößt, wird auch hier der Einsatz von Enzymen und Ganzzellsystemen vorangetrieben. Abbildung 2 zeigt die Verteilung der Enzymklassen, die in der Industrie Anwendung finden. In Anbetracht der Tatsache, dass Enzyme in unserem alltäglichen Gebrauch immer häufiger eingesetzt werden, ist es doch erstaunlich, dass 90 % aller verwendeten Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen und Hydrolasen kommen. Lyasen und vor allem Hydro-Lyasen spielen bisher eine eher untergeordnete Rolle trotz der Besonderheit, dass gerade sie eine große Rolle in der Defunktionalisierung von Biomasse spielen. Lyasen sind Enzyme, welche die reversible nicht hydrolytische Spaltung eines Moleküls in zwei Fragmente katalysieren. Hierbei wird meist eine C-C Doppelbindung oder alternativ eine Ringstruktur ausgebildet. Es gibt eine Vielzahl von Lyasen, die ihrer Funktion nach in unterschiedliche Gruppen aufgeteilt sind. Neben Lyasen die C-C Bindungen knüpfen bzw. brechen können, wie z.B. Aldolasen, gibt es auch Lyasen, die spezifisch für C-N-, C-S-, C-X- (X = Halogen), P-O- und C-O-Bindungen sind. Einige dieser Lyasen finden sich auch heute schon in der Industrie wieder, wie zum Beispiel die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in der enantioselektiven Produktion von L-Phenylalanin, das als Vorstufe für Aspartam dient [14, 15], Pektin-Lyasen in der Textilindustrie [16] oder die Fumarat-Hydratase in der Produktion von L-Äpfelsäure [17].

Für Dehydratisierungen bzw. Hydratisierungen sind insbesondere die Hydratasen und Dehydratasen von großem Interesse, gibt es doch eine Vielzahl von chemisch relevanten und interessanten Reaktionen, deren enzymatische Katalyse erstrebenswert ist. Bei einem Blick auf die Plattformchemikalien stellt man schnell fest, dass viele dieser Chemikalien (Ethanol, 1,4-

Butandiol, Isobutanol, *tert*-Butanol etc.) weiter dehydratisiert werden müssen, um für die eigentliche Verwendung in geeigneter Form vorzuliegen. Zwar gibt es hierfür eine Reihe chemischer Katalysatoren, doch wäre es erstrebenswert diese Reaktionen enzymatisch zu katalysieren.

Die Natur hat unzählige Enzyme hervorgebracht welche den Einbau von Wasser in isolierte oder konjugierte C=C Doppelbindungen oder die Abspaltung von Wasser aus den entsprechenden Alkoholen katalysieren. Enzyme, die solche Reaktionen katalysieren, werden als Hydro-Lyasen (EC 4.2.1.X) bezeichnet. Sie sind oft Teil des Primär- oder Sekundärmetabolismus und besitzen meist sehr hohe Regio- und Stereoselektivitäten. Bei der Bezeichnung De/Hydratase wird unterschieden je nachdem auf welcher Seite sich das Gleichgewicht der Reaktion befindet. Für gewöhnlich befindet sich dieses bei 1,4-Additionen leicht auf Seiten des Alkohols, wohingegen bei isolierten Doppelbindungen es sich genau andersherum verhält. Generell katalysieren Hydro-Lyasen den Einbau und die Abspaltung von Wasser. Zum Beispiel existieren Carboanhydrasen, die die Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid in Hydrogencarbonat katalysieren, welches sich in dieser Form leichter im Körper transportieren lässt.

Interessant bei den Hydro-Lyasen ist vor allem, dass neben kofaktorabhängigen Lyasen wie z.B. der Diol-Dehydratase oder der Fumarat-Hydratase auch Lyasen existieren, die die Addition von Wasser an isolierte C-C Doppelbindungen ohne Kofaktoren katalysieren. Viele dieser kofaktorunabhängigen Lyasen wie die Oleat Hydratase sind in der Lage die Hydratisierung von isolierten C-C Doppelbindungen zu katalysieren bzw. deren Alkohole zu Dehydratisieren, was in der Industrie vor allem in Bezug auf die Dehydratisierung von Plattformchemikalien auf reges Interesse stößt.

Im Folgenden wird eine Vielzahl von Reaktionen beschrieben, die auf Basis der Eliminierung von Wasser aus Alkoholen bzw. deren Rückreaktion durchgeführt werden. Zudem sollen die Probleme der herkömmlichen Chemie mit den Möglichkeiten, die sich durch die Verwendung von Enzymen ergeben, verglichen werden.

1.1. Die chemische Hydratisierung

Die Hydratisierung, die Addition eines Moleküls Wasser an eine ungesättigte Verbindung (Abbildung 3), ist eine der wichtigsten Reaktionen in der Funktionalisierung von Olefinen.



Abbildung 3 Säurekatalysierte Hydratisierung von Olefinen.

Durchgeführt wird sie heutzutage hauptsächlich mit Hilfe von starken Säuren wie H_3PO_4 oder H_2SO_4 , aber auch mit sauren Ionentauschern, Zeolithen oder Heteropolysäuren. Unterschieden wird zwischen der indirekten Hydratisierung und der direkten Hydratisierung. Ursprünglich wurde industriell hergestellter Ethanol auf Basis von Ethylen durch Hydratisierung mit H_2SO_4 synthetisiert. Bei der indirekten Hydratisierung mit Ag_2SO_4 als Katalysator wird das zwischenzeitlich gebildete Mono- bzw. Diethylsulfat durch Hydrolyse in Ethanol und H_2SO_4 gespalten. Bei hohen Temperaturen kann sich hierbei auch Diethylether als Nebenprodukt bilden. Bei der direkten Hydratisierung werden vor allem $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{SiO}_2$ -Katalysatoren bei etwa $300\text{ }^\circ\text{C}$ und 70 bar eingesetzt, wobei man sich das Prinzip von Le Chatelier zu Nutzen macht. Allerdings findet hier die Herstellung von Ethanol auf Basis der alkoholischen Gärung von Kohlenhydraten steigendes Interesse als Alternativsynthese zur Petrochemie. Die Herstellung von Isopropanol aus Propen kann neben H_2SO_4 auch mit sauren Ionentauschern (Sulfonsäureseitenketten) und Heteropolysäuren (Kap. 1.2) wie z.B. WO_3/SiO_2 durchgeführt werden. Ein weiteres Beispiel für die industriell durchgeführte Hydratisierung von Olefinen ist die von Isobuten welche heutzutage meist mit 50-60%iger Schwefelsäure durchgeführt wird. Diese Reaktion spielt hauptsächlich bei der selektiven Abtrennung von Isobuten aus C_4 -Raffinat eine tragende Rolle. Bei einem neuentwickelten Verfahren von Hüls kommen hierfür auch saure Ionentauscher auf Basis von Sulfonsäure zum Einsatz. [17]

Trotz der Einfachheit der Reaktionen existieren viele Probleme wie mangelnde Regio- und Stereoselektivitäten mit denen Chemiker zu kämpfen haben. Häufige Nebenreaktionen wie die Etherifizierung oder Protonmigration, die zu unerwünschten Nebenprodukten führen, müssen außerdem vermieden werden.

Im Falle der Regioselektivität existieren zwei Routen zur selektiven Synthese von Alkoholen. Die erste Route, die Oxymercurierung, führt zur selektiven elektrophilen Addition von Wasser nach der Markownikow-Regel mit Hilfe von Quecksilberacetat und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid.

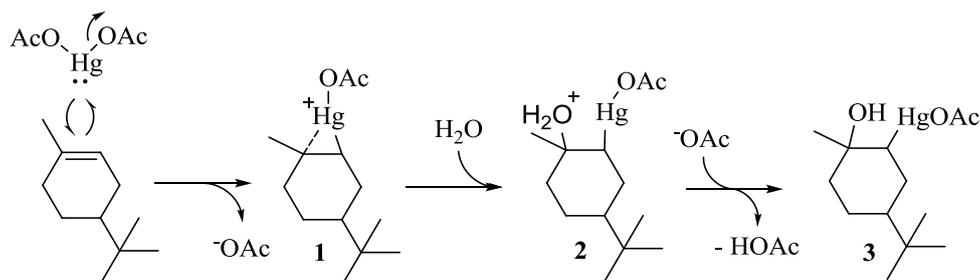


Abbildung 4 Oxymercurierung. Gezeigt wird die Schrittweise Anlagerung von Quecksilberacetat an das weniger substituierte Kohlenstoffatom der Doppelbindung sowie Wasser an das höher substituierte Kohlenstoffatom.

Abbildung 4 zeigt den Mechanismus der Oxymercurierung am Beispiel eines Cyclohexen-derivats. Im ersten Schritt dissoziiert das Quecksilberacetat und es lagert sich HgOAc^+ an die Doppelbindung unter Ausbildung eines Mercuriniumions an (1). Im nächsten Schritt addiert Wasser an das partiell positiv geladene, also das höher substituierte Kohlenstoffatom des Mercuriniumions (2). Das zu Beginn abgespaltene Acetat deprotoniert das Oxoniumion und es bildet sich der Quecksilberalkohol (3).

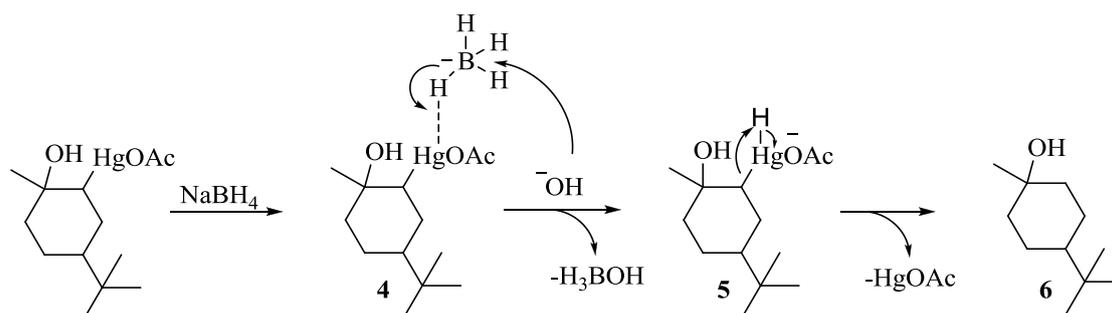


Abbildung 5 Reduktion des Quecksilberalkohols mit Natriumborhydrid und alkalischer Aufarbeitung zum gewünschten Alkohol.

Im nächsten Schritt wird der Quecksilberalkohol mit Hilfe von Natriumborhydrid und Base zum Alkohol reduziert (Abbildung 5). In dieser Demercurierungsreaktion wird die Quecksilberacetatgruppe unter reduktiver Eliminierung durch ein Proton ersetzt und abgespalten. Im ersten Schritt dieser Reaktion wird unter alkalischen Bedingungen ein Hydrid auf das Quecksilber übertragen (4). Durch Bindungsbildung zwischen dem Wasserstoff und dem partiell negativen Kohlenstoff (5) kann nun das Quecksilberacetat abgespalten werden (6).

Die Hydratisierung von ungesättigten Verbindungen entgegen der Markownikow-Regel wird hingegen mit der Hydroborierung (Abbildung 6) durchgeführt. Hierbei wird im ersten Schritt über einen 4-gliedrigen Übergangszustand (1) durch Addition eines Borans an 1-Methylcyclohexen ein Alkylboran gebildet (2). Die *syn*-Addition von Boranen an Olefine erfolgt selektiv, wobei sich das Bor-Atom an der sterisch zugänglicheren Gruppe addiert. Durch

oxidative Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid und Natronlauge erhält man im Anschluss den Alkohol. Hierbei bildet sich zuerst ein Hydroperoxid (**3**). Ein Nukleophiler Angriff an das Boratom und die folgende Alkylmigration zum Sauerstoff resultiert im Alkylboran (**4**). Aufgrund der drei B-H Bindungen sind diese Schritte auf alle B-H Bindungen übertragbar, was im letzten Schritt der Hydrolyse (**5**) zur Abspaltung von Borsäure und zum gewünschten Alkohol führt (**6**). Die Selektivität der Hydroborierung mit BH_3 ist allerdings nicht immer ausreichend, weshalb meist sterisch anspruchsvollere Organoborane wie 9-Borabicyclo(3.3.1)nonan (9-BBN) verwendet werden [18].

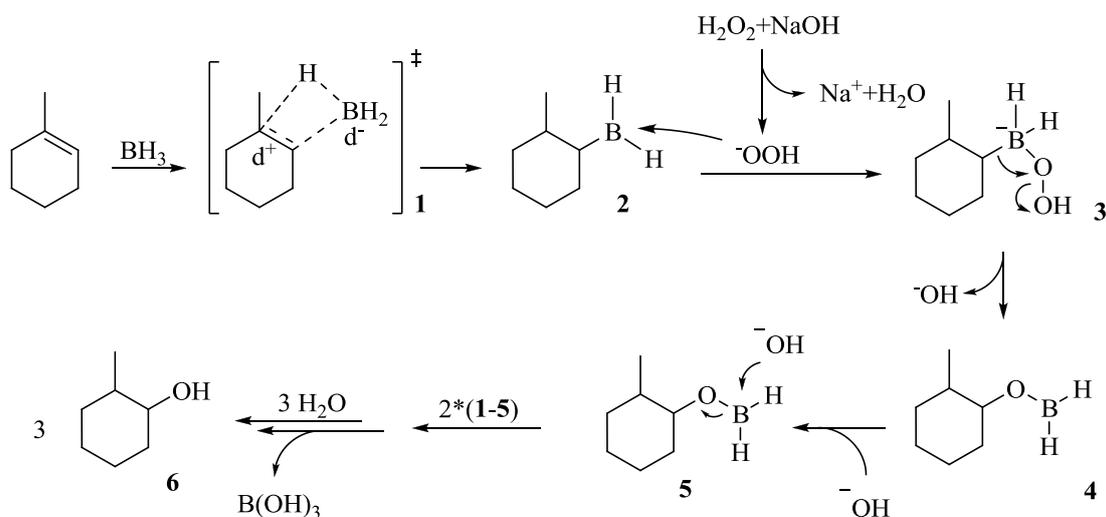


Abbildung 6 Mechanismus der Hydroborierung. Im ersten Schritt erfolgt die Ausbildung eines Trialkylborans, welches im Folgenden durch oxidative Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid und Natronlauge in die entsprechenden Alkohole umgesetzt werden kann.

Allerdings sind auch diese beiden Möglichkeiten auf einfache ungesättigte Moleküle beschränkt. Zudem sind beide Varianten trotz der milden Reaktionsbedingungen nur für den Labormaßstab geeignet, da für die Hydratisierung der Oxymyrcurierung Quecksilber in großem Umfang benötigt wird und dies aus Gründen der Wirtschaftlich- und Umweltverträglichkeit nicht tragbar ist. Ebenso ist der hohe Verbrauch an Boran für die Hydroborierung zu teuer um als wirkliche Alternative für die Hydratisierung in großem Umfang zu fungieren. Als Alternativen für die Hydroborierung können die Hydratisierung mit $\text{Ti(BH}_4)_3$ [19] oder mit $\text{Zn(BH}_4)_2/\text{SiO}_2$ [20] dienen. Doch auch diese Methoden sind trotz der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und Regioselektivität für großtechnische Anwendungen noch nicht ausgereift.

Ein weiteres bisher ungelöstes Problem ist die asymmetrische Hydratation von Olefinen. Bisher wurde hierfür noch keine allgemein anwendbare Synthese beschrieben. Meist werden die

Olefine durch metallkatalysierte Oxidation in die korrespondierenden Ketone oxidiert und hinterher selektiv reduziert. Ein Beispiel hierfür ist die Wacker-Tsuji Oxidation von Styrol in Acetophenon mit anschließender enzymatisch-katalysierter Reduktion zum Phenyl-1-ethanol [21]. Für die direkte asymmetrische Hydratation sind bisher nur wenige Beispiele bekannt. Zum Beispiel gelang es Xue *et al.* [22] auf Basis eines SiO₂-Chitosan-Cobalal-Katalysators 1-Okten enantioselektiv in (*S*)-2-Okтанol zu hydratisieren. Gleiches gelang Xue *et al.* mit einem Katalysator basierend auf Wolle und Palladium [23]. Die enantioselektive Hydratisierung von Enonen wurde erstmals durch Roelfes *et al.* [24] mit Hilfe eines Kupferkomplexes umgeben von (Desoxy)ribonukleinsäureliganden beschrieben.

1.2. Die chemische Dehydratisierung

Die Dehydratisierung von Alkoholen erfolgt generell mit Mineralsäuren wie H₂SO₄, H₃PO₄, anderen Brönsted-Säuren aber auch mit Lewis-Säuren und organischen Säuren wie *p*-Toluolsulfonsäure. Die Bedingungen um hierbei Alkohole zu Dehydratisieren sind meist relativ harsch, schwanken aber mitunter drastisch, je nachdem um was für einen Alkohol es sich handelt. Primäre Alkohole benötigen meist hohe Säurekonzentrationen (80-90 % H₂SO₄) und hohe Temperaturen (~200 °C), wohingegen bei sekundären oder tertiären Alkoholen die Bedingungen deutlich milder ausfallen (20 %, 80-90 °C, für tertiäre Alkohole).[17]

Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren viel dafür getan neue effektive Katalysatoren zu entwickeln um den Anforderungen hinsichtlich Aktivität, Reaktionsbedingungen, Nebenreaktionen und Umweltverträglichkeit entgegenzukommen. Neben starken Brönsted Säuren sind Metall- bzw. gemischte Metalloxidverbindungen in der Dehydratisierung von Olefinen weit verbreitet. Joseph Priestley entdeckte schon 1783 bei der Dehydratisierung von Ethanol zu Ethylen die katalytische Eigenschaft von γ -Al₂O₃ (Tonerde). Neben Aluminiumoxid können als Katalysatoren auch Übergangsmetalloxide wie Zinkoxid oder Rheniumoxid dienen. Während Zinkkatalysatoren bisher nur die Dehydratisierung von β -Hydroxyestern katalysieren, katalysieren Rheniumoxid-Katalysatoren [25] (z.B. CH₃ReO₃ oder Re₂O₇) unter anderem neben den Deoxydehydratisierungsreaktionen von Diolen (z.B. Glykol) oder Polyolen auch die Dehydratisierungen von Allylischen, Aliphatischen oder auch Homoallylischen Alkoholen (vgl. Abbildung 7).

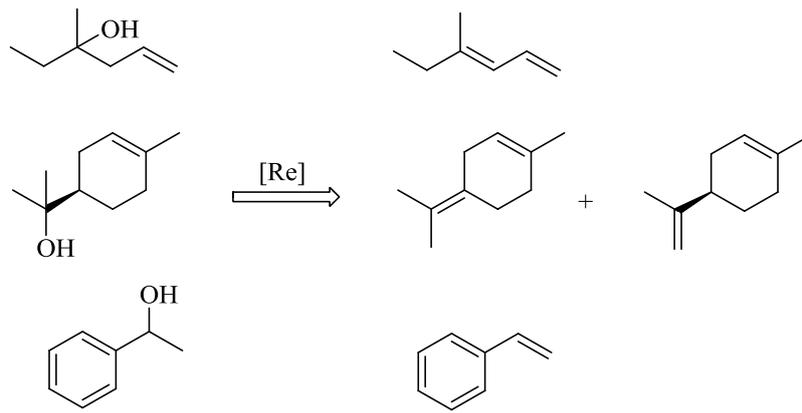


Abbildung 7 Beispiele für von Rheniumoxid umgesetzte Alkohole. Unter anderem konnten neben tertiären Allylalkoholen auch Terpeneol und Styrol dehydratisiert werden.

Zeolithe [26-28] sind die wohl bekanntesten Metalloxide und für die Dehydratisierung von Alkoholen weit verbreitet. Die Definition von Breck [29] für Zeolithe lautet wie folgt: „Zeolithe sind kristalline, hydratisierte Aluminosilikate, synthetisiert oder natürlich vorkommend, mit Gerüststruktur, die Alkali- bzw. Erdalkalitionen enthalten.“ Generell besitzen sie die Formel $M^{n+}_{x/n} [(AlO_2)_x (SiO_2)_y] \cdot z H_2O$. Zeolithe sind sehr porös und es ist möglich gezielt Brönsted- oder Lewisäurezentren in Zeolithe entweder bei der Synthese oder nachträglich über Ionenaustausch einzuführen. Als Kationen können aber auch organische Moleküle wie Tetrapropylammonium dienen, die zur Synthese von Zeolith-Socony Mobil-5 (ZSM-5) und ZSM-11 führen, welche als verbreitete heterogene Katalysatoren beim Cracken von Kohlenwasserstoffen Anwendung finden. Bei der säurekatalysierten Hydratisierung von Olefinen spielen Zeolithe eine eher untergeordnete Rolle. Zwar besitzen sie sehr hohe Selektivitäten, sind doch ihre Umsätze bei Temperaturen von 100-200 °C und bis zu 200 bar mit etwa 20 % zu gering um wirtschaftlich interessant zu sein [28]. Einzige Ausnahme sind hier cyclische Alkohole welche Ausbeuten von über 20 % erreichen können [30].

Die Dehydratisierung von Alkoholen allerdings verläuft mit deutlich größeren Ausbeuten. Der von Mobil Oil 1975 entwickelte Zeolithkatalysator ZSM-5 erreicht Ausbeuten von 100 % und Selektivitäten von über 95 % für Alkylalkohole oder aromatische Alkohole wie Phenylethanol. Die wichtigsten Anwendungen im Bereich von Dehydratisierungsreaktionen finden Zeolithe in den Verfahren Methanol to Olefins (MTO) in dem Methanol zu Ethen und Propen dehydratisiert wird und in dem Methanol to Gasoline (MTG) Verfahren in dem aus Methanol aromatenreiche Kohlenwasserstoffgemische hergestellt werden.[27, 28, 31]

Seit langem bekannt, haben Heteropolysäuren (HPS) erst in den letzten Jahren Verwendung als grüne Katalysatoren gefunden. HPS sind aus Metallclustern mit eingeschlossenen Anionen aufgebaut (Beispiel Abbildung 8) [32], die einen komplexen dreidimensionalen Käfig bilden. Meist bestehen sie aus den Metallen Vanadium, Wolfram oder Molybdän, die über

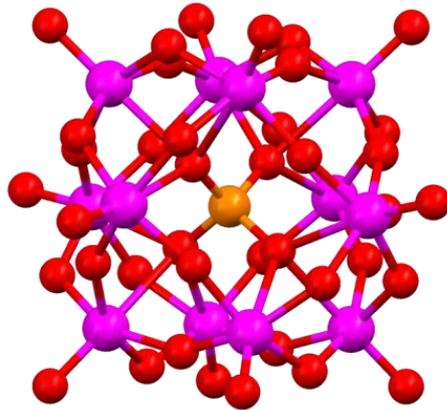


Abbildung 8 Keggin-Struktur einer Heteropolysäure. Die Metallatome (Rosa) sind über Sauerstoffatome (Rot) verknüpft. Das Heteroatom ist im Inneren der Struktur gebunden (orange). Bild von Prof. Walter G. Klemperer.

Sauerstoffatome verknüpft sind. Inmitten dieses Netzwerks befindet sich meist ein Heteroatom, z.B. Ti^{4+} , Zr^{4+} , Al^{3+} oder $\text{Cu}^{1+/2+}$, je nach Struktur und der Anzahl möglicher Koordinationsstellen [33]. Aufgrund ihrer hohen Azidität eignen sie sich hervorragend für säurekatalysierte Reaktionen wie die Dehydratisierung von Isopropanol, Ethanol, 1,4-Butandiol, 1-Butanol aber auch von 1,2-Diphenylethanol und Cholesterol. Meist sind die HPS für die heterogene Katalyse an Träger, wie Kohlenstoff oder Silikat gebunden. Dies führt zu einer verbesserten Dispersion in der Lösung und damit einhergehend einer Vergrößerung der aktiven Oberfläche. Infolgedessen lässt sich der Katalysator leichter regenerieren und es entstehen weniger giftige Abwässer. Zwar ist die Herstellung von HPS immer noch sehr teuer, jedoch schließt dies großtechnische Anwendungen nicht mehr aus.

Als weitere Alternative für Mineralsäuren finden saure Ionenaustauscher meist bestehend aus verknüpften sulfoniertem Polystyrol ($-\text{SO}_3\text{H}$) seit Jahren vielfache Anwendung in der Industrie. Ihre großtechnische Anwendung wurde bereits vor über 60 Jahren bei der Veresterung von Alkenen (z.B. Buten) mit Carbonsäuren (z.B. Essigsäure) etabliert. Gegenüber den Mineralsäuren weisen die synthetischen Festphasen-Katalysatoren ein deutlich geringeres Abfallaufkommen, eine leichtere Abtrennung zwischen den Produkten und eine geringere Korrosionswirkung auf. Allerdings limitieren die relativ hohen Kosten und die geringe Stabilität ihre Anwendungsbreite. Hohe Temperaturen ($>120\text{ }^\circ\text{C}$, führen zu Verlust der Sulfonsäuregruppen), Basen (z.B. Amine, führen zum Aufbrechen des $-\text{SO}_3\text{H}$ Netzwerks) oder Metallkationen (z.B. Fe, Unterbrechen das $-\text{SO}_3\text{H}$ Netzwerk) deaktivieren den Katalysator.

Dennoch finden saure Ionenaustauscher vor allem in der De/Hydratisierung von tert-Butanol bzw. Isobuten industrielle Anwendung. [34, 35]

Wichtige Beispiele für großtechnisch durchgeführte Dehydratisierungen sind die von 1,4-Butandiol zu Tetrahydrofuran (THF) sowie die von Isobutanol zu Isobuten sind doch deren Produkte wichtige Grundbausteine zur Synthese von Pharmaka, Polymeren, Treibstoff und im Falle von THF wichtige Lösungsmittel für industrielle Anwendungen. Die Dehydratisierung von Isobutanol bzw. tert-Butanol wird meist bei hohen Temperaturen (etwa 300 °C) und hohen Drücken (10-20 bar) auf Metalloxidkatalysatoren (Al_2O_3) durchgeführt. UOP LLC (ehem. Universal Oil Products) verwendet hierfür saure Ionenaustauscher auf Sulfonsäurebasis. Die Herstellung von THF erfolgt durch die Wasserabspaltung aus 1,4-Butandiol mittels starken Säuren (H_2SO_4 , H_3PO_4) oder sauren Ionenaustauschern (Davy-McKee) [17]. Durch Erhitzen der Reaktion kann das THF/ H_2O -Gemisch abdestilliert werden, was zu einer nahezu quantitativen Ausbeute führt. Neben THF wird auch Dioxan großtechnisch durch Dehydratisierung aus Glykol hergestellt. Zur industriellen Produktion von Polystyrol wird das durch Epoxidierung von Ethylbenzol entstehende 1-Phenylethanol (Methylvinylcarbinol) zu Styrol dehydratisiert und hiernach entsprechend weiter verarbeitet. Sumitomo verwendet hier einen auf ZrO_2 basierenden Katalysator, während beim SM/PO-Verfahren von Shell $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ als Katalysator verwendet wird. Ethylen ist neben Propylen der wohl wichtigste Grundbaustein der organischen Chemie. Zwar wird der weitaus größere Teil heutzutage durch Steamcracken von Naphtha oder anderen höheren Kohlenwasserstoffgemischen gewonnen, so gewinnt doch die Herstellung von Ethylen neben dem MTO-Prozess aus Bioethanol auf Basis nachwachsender Rohstoffe mittels H_2SO_4 an Bedeutung. Auch bei der Produktion von Crotonaldehyd wird das zwischenzeitlich entstehende 3-Hydroxybutanal industriell mit Essigsäure dehydratisiert. Neben den genannten Substraten gibt es noch einige weitere Reaktionen wie die Synthese von Morpholin aus Diethanolamin (mit H_2SO_4) oder von Diacetonalkohol zu Mesityloxid (kat. I_2) doch sind diese durch geeignetere Synthesen heutzutage ersetzt worden. [17]

Doch sind auch hier die Anwendungen trotz vieler Katalysatoren auf kleine Moleküle begrenzt. Zudem ist hier wie bei der Hydratisierung die asymmetrische Dehydratisierung zur Synthese enantiomerenreiner Alkohole ein weitgehend ungelöstes Problem für Chemiker. Nur wenige Beispiele für die asymmetrische Dehydratisierung sind bisher bekannt. Erwähnenswert hier ist die Dehydratisierung von β -Hydroxyestern und β -Styrol- β -Hydroxyestern von Choi *et al.* [36, 37] und Lee *et al.* [38] sowie die von Du *et al.* [39] bei der β -Hydroxyketone mittels biomimetischer Tetrapeptide dehydratisiert werden. Du *et al.* konnten erfolgreich durch

Verwendung eines synthetischen Tetrapeptids die katalytische Funktion einer Fettsäuredehydratase nachstellen und so mit hohen Enantioselektivitäten diverse β -Hydroxyketone umsetzen (Abbildung 9). [39]

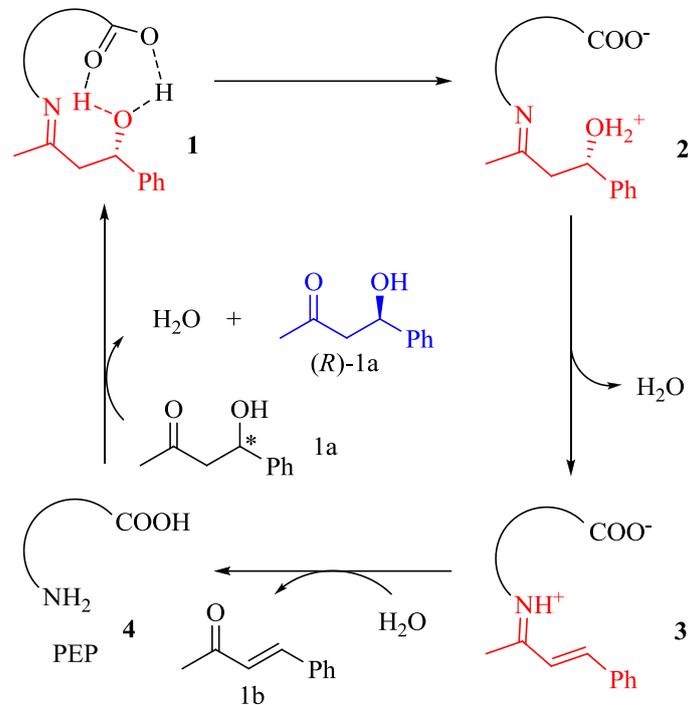


Abbildung 9 Biomimetische Dehydratisierung mittels Tetrapeptiden [39]. Im ersten Schritt erfolgt die Ausbildung des Imins unter Wasserabspaltung **1** sowie die selektive Koordination und Protonierung des Alkohols durch die Carboxyfunktion **2**. Durch Wasserabspaltung bildet sich das dehydratisierte Imin **3** das im Folgenden durch Hydrolyse wiederum in das dehydratisierte Keton 1b umgesetzt wird. PEP: Name des Tetrapeptids

1.3. Hydro-Lyasen und ihre Möglichkeiten

Obwohl Enzyme in der chemischen Industrie mittlerweile in steigendem Umfang eingesetzt werden, ist die Verwendung von Enzymen, die für die Hydratisierung von ungesättigten Verbindungen bzw. die Dehydratisierung von Alkoholen Verantwortung tragen, sehr begrenzt. Dies ist eigentlich erstaunlich da beiden Reaktionen in industriellem Maßstab sehr große Beschränkungen auferlegt sind. Sucht man in der Literatur nach relevanten Reaktionen, so wird man fast ausschließlich bei kleinen Molekülen, C₂-C₄ oder Styrol, fündig. Neuentwickelte Katalysatoren führen zwar zu hohen Ausbeuten und zu weniger Nebenprodukten doch helfen auch sie nicht die Probleme der asymmetrischen Addition/Eliminierung bzw. die mangelnden Regioselektivitäten zu beheben.

Ein großes Problem der Hydro-Lyasen ist ihr sehr enges Substratspektrum. Zwar bietet hier das Protein-Engineering Möglichkeiten die Eigenschaften gezielt zu verändern, doch bedarf es dazu deutlich mehr Informationen über die Struktur und den Mechanismus der Enzyme. Gerade über Enzyme wie die Oleat Hydratase, die Kieviton Hydratase oder die Linalool Dehydratase-Isomerase ist bisher sehr wenig bekannt, obwohl deren Reaktionen, die kofaktorunabhängige Hydratisierung von isolierten Doppelbindungen bzw. die Eliminierung der entsprechenden Alkohole von sehr großem Interesse sind (Siehe Kap. 1.3.2). Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist gerade in dem Bereich kurzkettiger Alkohole das Potential für Hydro-Lyasen vor allem aufgrund der großen Anwendungsbreite von Polymeren enorm. Aber auch am Beispiel der asymmetrischen Synthese quartärer Kohlenstoffzentren lässt sich das Potential von Hydro-Lyasen erahnen, gibt es doch eine Vielzahl von natürlich vorkommenden und synthetischen Molekülen die einen oder mehrere enantiomerenreine tertiäre Alkohole besitzen. Einige dieser tertiären Alkohole spielen z.B. in der Pharmakologie eine enorm wichtige Rolle. Dies zeigt sich zum Beispiel an Cortisol, das als Entzündungshemmer eingesetzt wird, an Efavirenz und Tipranavir, die als Reverse-Transkriptase Inhibitoren in der Behandlung von HIV verwendet werden oder auch an Topotecan, das Einsatz gegen Bronchialkarzinome findet. Auch die allgegenwärtigen Pharmaka Salbutamol (Asthma), Adrenalin oder auch Morphin und Codein (Schmerzmittel) besitzen chirale Alkohole (Abbildung 10).

Aber nicht nur in der Pharmaindustrie sondern auch in der Agrochemischen, der Parfüm- und der Nahrungsmittelindustrie spielen Enantiomere eine wichtige Rolle. Zum Beispiel wirkt Glutaminsäure nur in ihrer *L*-Form als Geschmacksverstärker während die *D*-Form oder auch das Racemat aus beiden diesen Effekt nicht erzielen [40]. Auch der Geruch von diversen chiralen Molekülen kann sich gravierend unterscheiden. Zum Beispiel hat das *R*-Enantiomer

von Limonen den gewohnten orangen-, zitronenartigen Geruch und wird von daher vielseitig verwendet, während die *S*-Form eher einen terpentinarartigen Geruch aufweist. Auch in der Agrarindustrie spielen Enantiomere eine wichtige Rolle, da bei verwendeten Racematen meistens eine Form deutlich schlechter abbaubar ist und sich von daher in Böden und Gewässern anreichert.

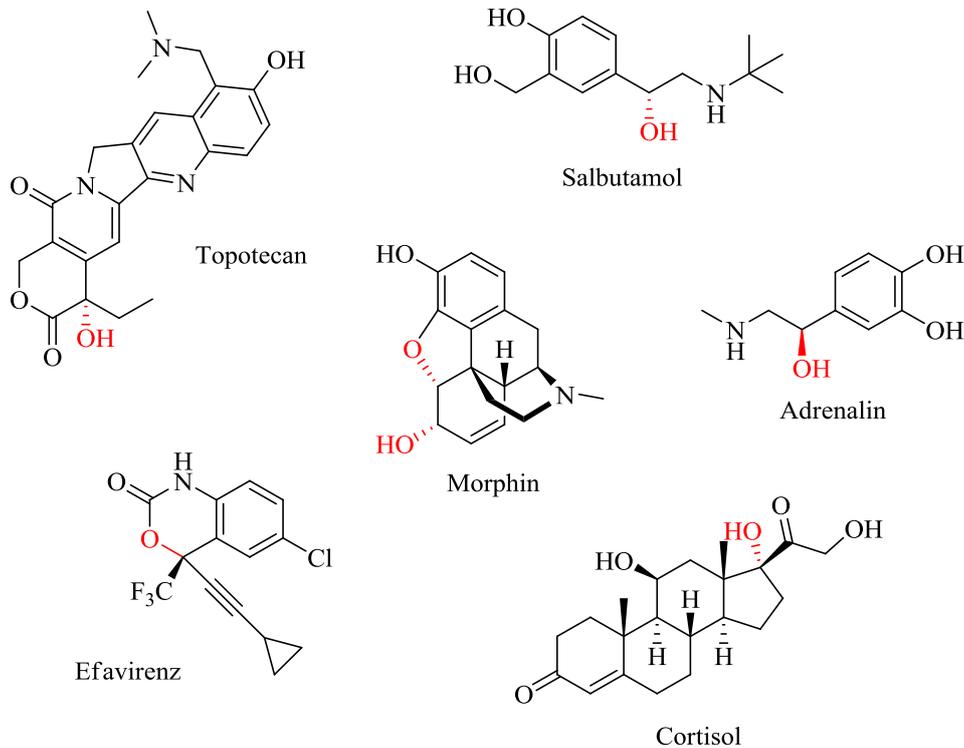


Abbildung 10 Wichtige pharmakologische Substanzen mit chiralen Alkoholen und Ethern.

Diese Beispiele zeigen nur einen kleinen Ausblick über das mögliche Einsatzgebiet von Hydro-Lyasen, doch dieses ist gewaltig. Verknüpft mit den hohen Regio-, Stereo- und Enantioselektivitäten und den geringen Nebenprodukten, sowie den vergleichsweise milden Bedingungen, ermöglichen die Hydro-Lyasen eine Vielzahl von interessanten Anwendungen.

Im Folgenden werden einige Hydro-Lyasen, sowohl kofaktorabhängige wie auch kofaktorunabhängige vorgestellt. Die wohl bekanntesten Hydro-Lyasen finden sich im Citrat-Zyklus, in der Glykolyse und spielen eine gewichtige Rolle in der β -Oxidation von Fettsäuren.

1.3.1. Kofaktorabhängige Hydro-Lyasen

Die Phosphopyruvat Hydratase

Einer der wichtigsten Vertreter der Hydro-Lyasen katalysiert den vorletzten Schritt der Glykolyse auf dem Weg zum Pyruvat. Die Enolase [41] (Phosphopyruvat Hydratase, EC

interagiert mit der Carboxyl- und der Hydroxylfunktion des Citrats und bindet im Verlauf der Dehydratisierung die Hydroxylgruppe des Citrats, was vor allem durch ein Aspartat unterstützt wird.

Bei den Fumarasen [46-48] (EC 4.2.1.2) unterscheidet man zwischen 2 Klassen. Fumarasen der Klasse I sind bakterielle Enzyme, welche die Reaktion mit Hilfe eines Eisenclusters katalysieren, aus einem Dimer bestehen und für gewöhnlich thermisch labil sind. Die Fumarasen der Klasse II entstammen Pro- und Eukaryoten und bestehen aus einem Tetramer und benötigen für die Reaktion keinerlei Kofaktoren. Interessanterweise haben neuere Forschungen hinsichtlich des Säure-Base-katalysierten Mechanismus gezeigt, dass die Eliminierung nicht via E₁-Eliminierung über ein Carbokation, sondern über einen E_{1cB}-Mechanismus mit einem intermediären Carbanion verläuft.

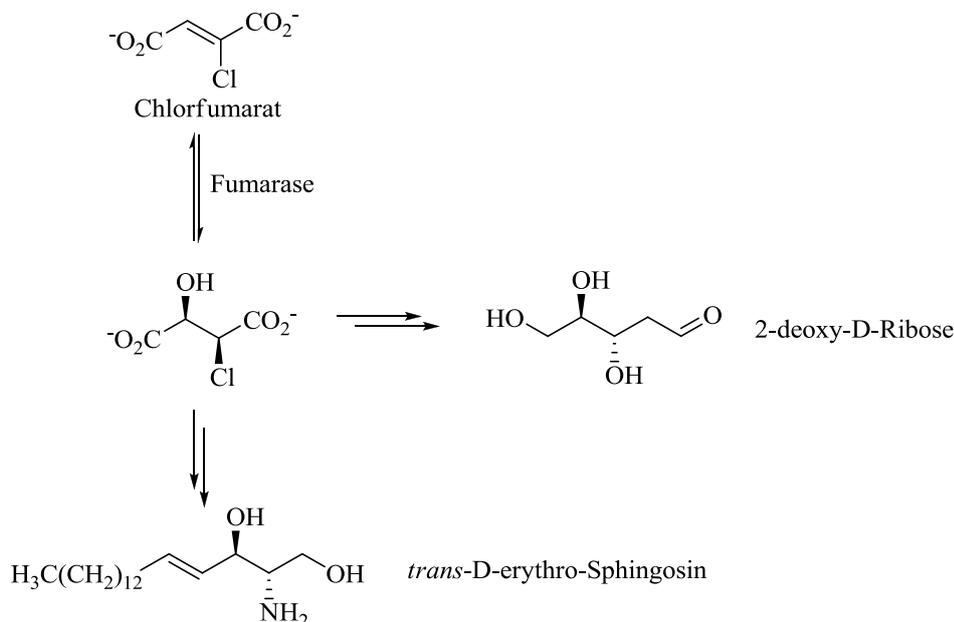


Abbildung 14 Syntheserouten mit Hilfe der Fumarase. Aus dem L-threo-Chlormalat lässt sich neben 2-deoxy-D-Ribose auch der Proteinkinasehemmer *trans*-D-erythro-Sphingosin über mehrere Schritte herstellen.

Neben Fumarat konnten nur Chloro-, Fluoro- und Difluorofumarat nachweislich von der Fumarase umgesetzt werden, was auf ein sehr begrenztes Substratspektrum hindeutet. Interessant ist hierbei, dass aus dem Produkt der Chlorfumarathydratisierung, dem L-threo-Chlormalat, mögliche Routen zur Synthese von 2-deoxy-D-Ribose und dem Proteinkinasehemmer *trans*-D-erythro-Sphingosin eröffnet werden (Abbildung 14)[49].

Die Maleat Hydratase [48, 50] (Malease; EC 4.2.1.31) katalysiert die Hydratisierung von Malonsäure in D-Malat via *trans*-Addition (Abbildung 13). Vermutlich gibt es auch hier wie bei der Fumarase zwei Klassen von Maleasen. Die erste beschriebene Malease wurde in der

Hasenniere entdeckt [51] und benötigt einen [Fe-S]-Cluster, sowie reduzierende Agenzien für volle Aktivität. Eine später beschriebene Malease aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [50] wies aber Aktivität selbst unter reduzierenden und chelatisierenden Bedingungen auf. Weitere Unterschiede waren zudem das die Malease aus der Hasenniere im nativen Zustand als Monomer und das bakterielle Enzym als Dimer vorlag. Außerdem war die bakterielle Malease in der Lage neben Malonsäure, auch 2-Methylmalonsäure und 2,3-Dimethylmalonsäure zu akzeptieren. Längere Substrate oder Substrate welche nur auf einer Seite die Carbonsäurefunktion hatten, konnten von der Malease nicht umgesetzt werden.

Nahe Verwandte der Malease und Fumarase sind auch die Citraconase (EC 4.2.1.35) und die Mesaconase (EC 4.2.1.34), die hier jedoch nicht weiter beschrieben werden sollen.

Hydro-Lyasen für die Dehydratisierung von Zuckern

Natürlich spielen Hydro-Lyasen auch eine wichtige Rolle in der Defunktionalisierung von Zuckern. Eine ganze Reihe von Hydro-Lyasen, wie z.B. die Galactonat Dehydratase (EC 4.2.1.6), die Altronat Dehydratase (EC 4.2.1.7), die Mannonat Dehydratase (EC 4.2.1.8), die Gluconat Dehydratase (EC 4.2.1.39), die Glucarat Dehydratase (EC 4.2.1.40), die Xylonat Dehydratase (EC 4.2.1.82) oder die Fuconat Dehydratase (EC 4.2.1. 67(D)/68(L)) sind mittlerweile aus den unterschiedlichsten Organismen isoliert worden, welche in der Lage waren auf Basis der entsprechenden Zuckern zu wachsen.

In den Stoffwechselwegen katalysieren diese immer die Dehydratisierung des α , β -Diols der entsprechenden Zuckersäuren. Aufgrund der Deprotonierung des Wasserstoffs in α -Stellung zur Carbonsäure und der Notwendigkeit eines bivalenten Kations werden die hier erwähnten Hydro-Lyasen der Enolase Superfamilie zugeordnet. Im Mechanismus dient das bivalente Kation, meist Mg^{2+} oder Fe^{2+} , vermutlich der Stabilisierung des Enolatintermediats durch Koordinierung an die Säurefunktion und der α -Hydroxygruppe der Zucker [52, 53]. Der vermutete Mechanismus der Mannonat Dehydratase ist in Abbildung 15 dargestellt. Im ersten Schritt wird das Tyrosin 159 von Arginin aktiviert, was dazu führt, dass das Tyrosin in der Lage ist den Wasserstoff in α -Stellung zu deprotonieren (1). Durch Rückbildung der Säurefunktion des durch das bivalente Kation stabilisierten Enolat-Intermediats wird im nächsten Schritt die Alkoholfunktion in β -Stellung abgespalten (2). Durch die Keto-Enol-Tautomerie (3) wird aus dem Enolat im finalen Schritt der α -Keto-Zucker (4).

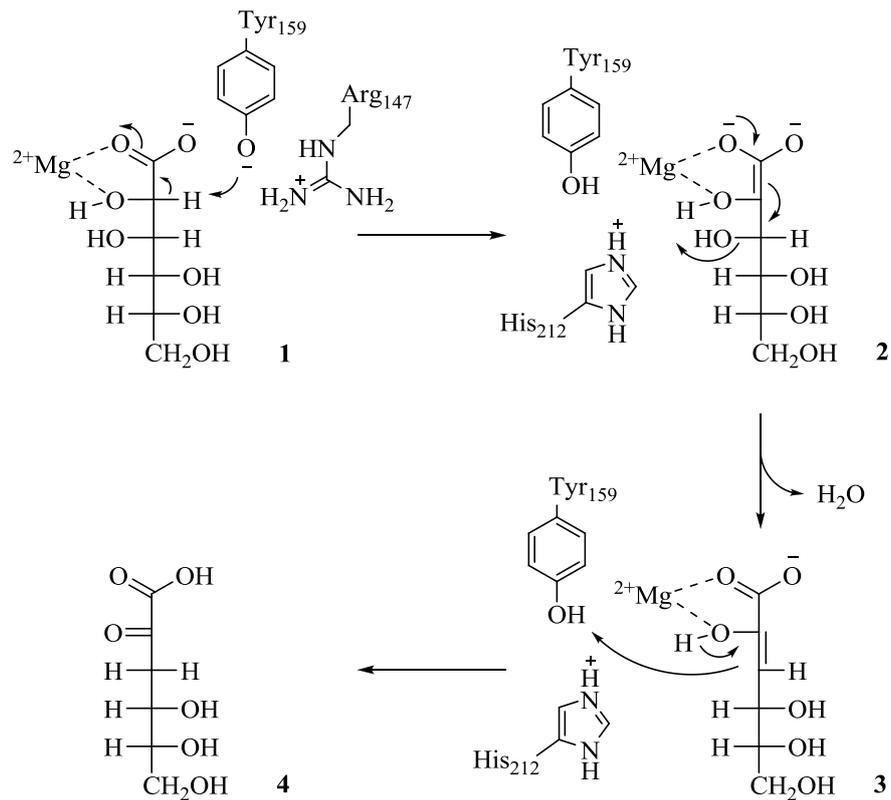


Abbildung 15 Vermuteter Mechanismus der Mannonat Dehydratase [52, 53] vermittelt durch die Aminosäuren Tyr159, Arg147 und His212 [53].

Die Diol- und Glyceroldehydratase

Zu den am besten beschriebenen Hydro-Lyasen gehören die Koenzym B₁₂-abhängigen Diol- (EC 4.2.1.28) und Glyceroldehydratase (EC 4.2.1.30) [54-56]. Deren Besonderheit, die Verwendung von Koenzym B₁₂ zur Katalyse, führt zu einem radikalischen Mechanismus, was zu drei großen Problemen während der Katalyse führt. Es entstehen hochreaktive Zwischenprodukte deren Radikale kontrolliert und abgeschirmt werden müssen, die Inaktivierung durch Nebenreaktionen muss verhindert werden und die Radikalbildung sollte am aktiven Zentrum stattfinden. Dennoch unterlaufen beide Enzyme während der Katalyse einer kontinuierlichen Inaktivierung. Der hierbei inaktivierte Kofaktor [57, 58] wird durch sogenannte Reaktivasen unter ATP Verbrauch entfernt. Hierdurch wird dem Apoenzym ermöglicht wieder aktives Koenzym B₁₂ zu binden. Die Diol- und Glyceroldehydratase konnten unter anderem von T. Toraya in einer Vielzahl von Gram positiven und Gram negativen Bakterien gefunden werden. In *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Lactobacilli*, *Clostridia*, *Salmonella* und *Enterobacter* Stämmen dienen diese Enzyme dazu Glycerin, 1,2-Propandiol oder Glykol zu verstoffwechseln. Aufgrund der großen strukturellen und charakteristischen

Ähnlichkeiten wird im Folgenden nur von der Dioldehydratase gesprochen. Gleiches gilt aber ebenso für die Glyceroldehydratase [56].

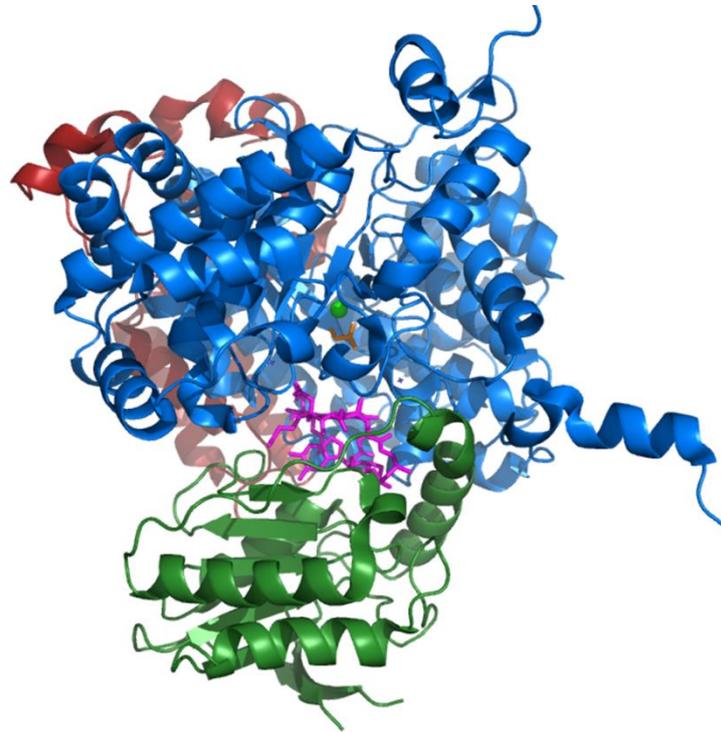


Abbildung 16 Kristallstruktur eines Monomers der Dioldehydratase. Zu sehen sind die 3 Untereinheiten (grün, β), (rot, γ) und (blau, α), sowie das Adenosylcobalamin in magenta und das Substrat (orange) mit Kalium (hellgrün) im Inneren der α -Untereinheit. Die grüne β -Untereinheit dient sozusagen als Deckel und schützt das Radikalintermediat vor äußerden Einflüssen. Bei Bedarf kann durch Hilfe einer Reaktivase die Untereinheit soweit geöffnet werden das inaktives Cobalamin ausgetauscht werden kann.

Die Dioldehydratase ist aus drei Untereinheiten aufgebaut die zu einem Dimer von Trimer $(\alpha\beta\gamma)_2$ zusammengelagert sind (Abbildung 16). Das Adenosylcobalamin wird über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der β - und γ -Untereinheit gebunden. Die α -Untereinheit enthält ein TIM-Barrel in welches der Adenosylrest des Cobalamins zeigt. Das Substrat und das für die Katalyse essentielle Monokation befinden sich weiter im Inneren des Barrels.

Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Im ersten Schritt 1) wird die Co-C Bindung durch Binden des Substrats in das aktive Zentrum gespalten. Das gebildete Radikal abstrahiert ein Proton des Substrats (1) in Nachbarstellung zur funktionellen Gruppe X (2), was zu einer Migration dieser führt (3). Durch Rückbildung des Radikals am Adenosylrest wird das Produkt (4) gebildet. Da es sich bei dem Produkt hierbei um einen geminalen Diol handelt, zerfällt dieser spontan in den entsprechenden Aldehyd und Wasser.

Durch Verlassen des Aldehyds aus dem aktiven Zentrum kann das Cobalamin wieder regeneriert werden.[59]

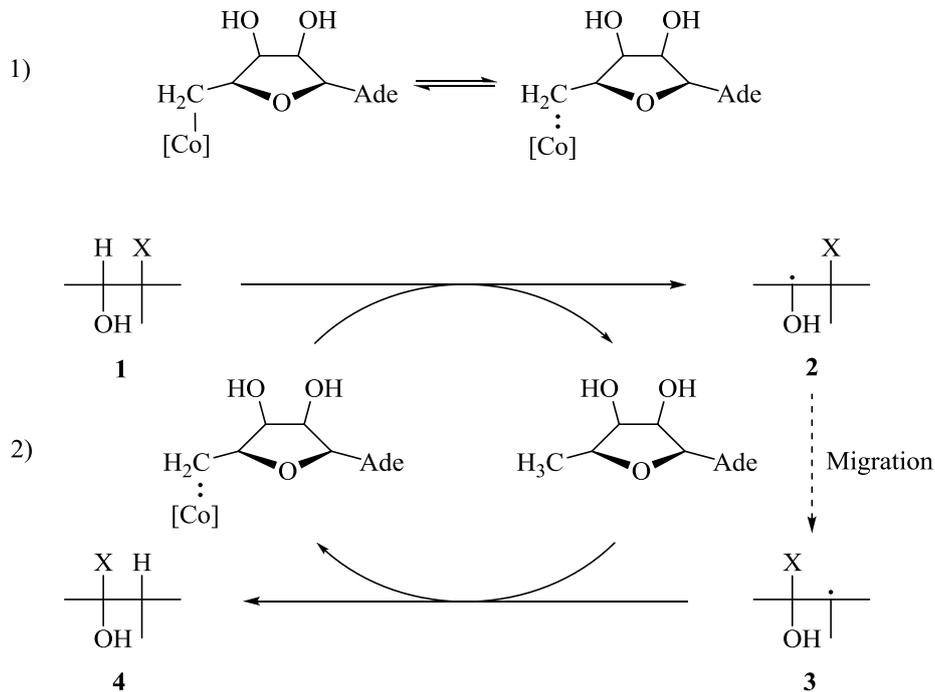


Abbildung 17 Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Dioldehydratase [59]. X = OH

Die Diol- bzw- Glyceroldehydratase erfährt schon heute ein reges Interesse, da sie ein Schlüsselenzym der Synthese von 1,3-Propandiol (PDO) aus Glycerol in den oben genannten Bakterien ist. Momentan wird der Großteil der weltweiten 1,3-Propandiol-Produktion von DuPont Tate & Lyle biotechnologisch in den USA hergestellt. Doch aufgrund steigender Nachfrage für Polytrimethylenterephthalat, das Hauptprodukt der 1,3-PDO Weiterverarbeitung, und neuen Anwendungsmöglichkeiten werden hier auch weitere Firmen, wie Metabolic Explorer (Frankreich) oder Huamei Biomaterial (China), zeitnah in die biotechnologische Produktion von 1,3-PDO einsteigen [60].

Die Acetylen Hydratase

Die Acetylen Hydratase [48, 61-64] (EC 4.2.1.112) katalysiert den ersten Schritt der Fermentation von Acetylen, welches von *Pelobacter acetylenicus* als Kohlenstoff- und Energiequelle verstoffwechselt werden kann (Abbildung 18). Die Acetylen Hydratase katalysiert hierbei die Hydratisierung von Acetylen in Acetaldehyd, welches im Folgenden in Acetat und Ethanol umgewandelt werden kann. Das Interessante an dem Enzym ist, dass es neben Wolfram und zwei Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid Kofaktoren auch einen [4Fe-4S]-Cluster zur Katalyse benötigt, obwohl hier, nicht wie zu erwarten, kein Redoxprozess abläuft.

Das Enzym ist sehr labil gegenüber Sauerstoff und nur in der reduzierten Form (W^{IV+}) aktiv. Analysen mit Hilfe der Kristallstruktur wiesen darauf hin, dass das Acetylen bei der Katalyse nicht direkt an das Wolfram, welches durch die Molybdopterin-Kofaktoren und einen Cysteinrest fixiert ist, gebunden ist. An das Wolfram ist das katalytische Wasser koordiniert, welches von einer sauren Aminosäurefunktion (Aspartat) aktiviert wird. Die hohe pK_a -Wert Verschiebung die für das Aspartat benötigt wird, wird durch den elektronenschiebenden Effekt des Eisen-Schwefel-Clusters erreicht. Das entstehende Ethenol wandelt sich aufgrund des tautomeren Gleichgewichts in Acetaldehyd um.

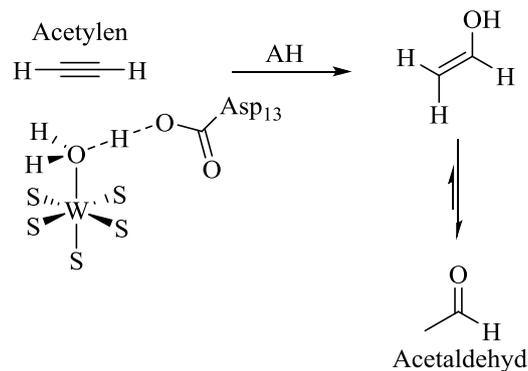


Abbildung 18. Acetylen Hydratase (AH) katalysierte Hydratisierung von Acetylen zu Acetaldehyd

Neben der Acetylen Hydratase wurde schon im Jahre 1958 ein weiteres Enzym aus einem *Pseudomonas* Stamm isoliert, welches die Hydratisierung einer C-C Dreifachbindung ermöglicht. Die Acetylen-carboxylat Hydratase [65] (EC 4.2.1.27) katalysiert die Hydratisierung von Propiolsäure (Propinsäure) in Malonat-Semialdehyd bei einem optimalen pH von 8.

1.3.2. Kofaktorunabhängige Hydro-Lyasen

Die Scytalon Hydratase

Die Scytalon Hydratase, erstmals bei Pilzerregern entdeckt, ist Bestandteil der Melaninsynthese, welche einen großen Einfluss auf die Pathogenität der Erreger hat (Abbildung 19).

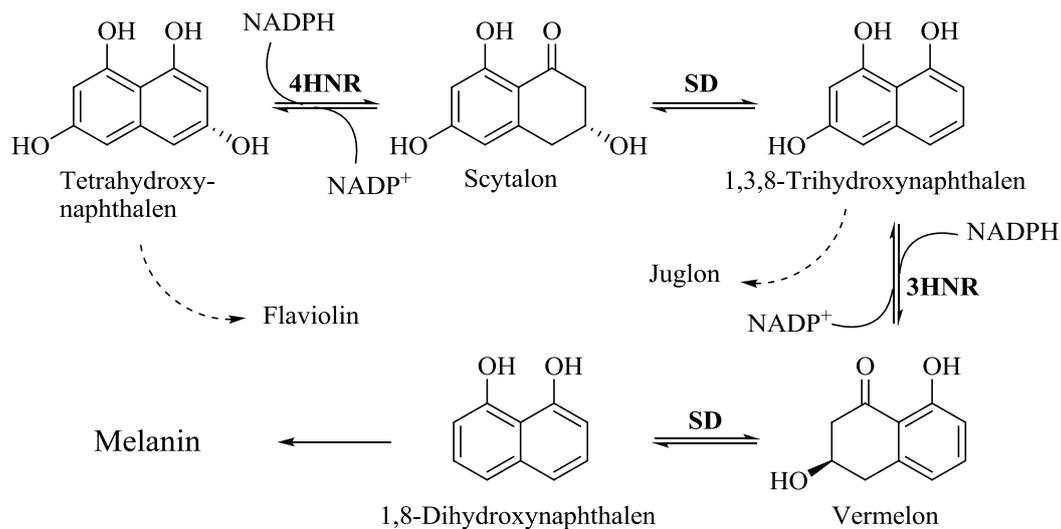


Abbildung 19. Melaninsynthese von Pilzen: 4HNR = Tetrahydroxynaphthalen Reduktase; SD = Scytalone Dehydratase; 3HNR = Trihydroxynaphthalen Reduktase

Die Scytalon Dehydratase [66-68] (SD, EC 4.2.1.94) katalysiert hierbei die Dehydratisierung von Scytalon in 1,3,8-Trihydroxynaphthalen und von Vermelon in 1,8-Dihydroxynaphthalen. Dabei katalysiert die SD beide Reaktionsschritte ohne Metall oder andere Kofaktoren. Die treibende Kraft der Reaktion ist dabei die Ausbildung des aromatischen Ringsystems, was eine zusätzliche Hilfe durch Kofaktoren nicht erfordert. Das Enzym besteht aus 170 Aminosäuren und bildet ein Trimer aus drei identischen Untereinheiten. Das Monomer ist ausschließlich aus α - und β -Motiven aufgebaut, welche eine ungewöhnlich verzerrte kegelförmige α , β -Fasstruktur ausbilden. Jordan *et al.* [69] gelang es auf Basis der Kristallstruktur von Lundqvist *et al.* [70] einen Mechanismus für die Scytalon Dehydratase aufzustellen. Vermutlich fungiert ein Histidin als generelle Base und Säure in der *syn*-Eliminierung beider Reaktionen. Unterstützt wird diese durch zwei Tyrosine welche die Carbonylgruppe über ein Wassermolekül protonieren und somit den α -Wasserstoff genügend aktivieren, um vom Histidin abstrahiert zu werden. Voraussichtlich dient das Proton im nächsten Schritt zur Protonierung der Hydroxylgruppe und somit dem Freiwerden von Wasser. Die mit Hilfe der Kristallstruktur und des Mechanismus gefundenen Inhibitoren wie Carproamid [71] könnten sehr hilfreich im Kampf gegen die von dem Erreger verursachte Reisbräune und den damit verbundenen Ernteaussfällen sein.

Die Carotinoid Hydratase

Ein noch weitgehend unbeschriebenes Enzym aus der Klasse der Hydro-Lyasen ist die Carotinoid Hydratase [72] (CrtC, EC 4.2.1.131). Carotinoide spielen eine wichtige Rolle im Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies und erhöhen somit die intrazelluläre Resistenz gegen

weit auf Seiten des hydratisierten Produktes [77]. Neben Ölsäure konnte auch die Hydratisierung von z.B. Myristoleinsäure, Palmitoleinsäure [78], Linolensäure [79], Linolsäure [80] und Ricinolsäure beobachtet werden. Seitdem wurde hinsichtlich der Substratspezifität eine Vielzahl von Untersuchungen gemacht, die auf eine größere Bandbreite des Substratspektrums schließen lassen, allerdings mit der Limitierung auf der spezifischen Hydratisierung von C₉, 10-*cis*-Fettsäuren.

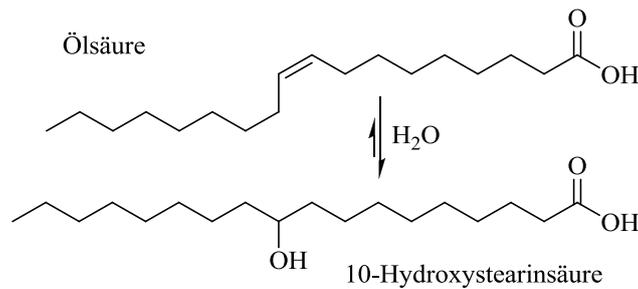


Abbildung 21 Natürliche Reaktion der Oleat Hydratase. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt etwa zu 85 % auf Seiten des Alkohols.

Bis 2009 wurden zahlreiche unterschiedliche Organismen wie *Pseudomonas* [75], *Flavobacterium* [78, 79, 81], *Nocardia paraffinae* [82], *Corynebacterium* [83] oder auch *Mycobacterium fortuitum* und *Saccharomyces cerevisiae* [84, 85] gefunden, welche die Funktionalisierung von Ölsäure katalysieren konnten, doch erst in diesem Jahr gelang es einer Gruppe aus Delft [86] die Oleat-Hydratase zu isolieren und zu beschreiben. Die etwa 74 kDa große Oleat-Hydratase aus *Elisabethkingia meningoseptica* hat ihren optimalen pH-Wert bei etwa 6 und besitzt eine maximale spez. Aktivität von 390 ± 70 mU/mg. Um den Mechanismus der Oleat-Hydratase besser verstehen zu können, warum die Hydratisierung spezifisch für die nichtaktivierte C₉-C₁₀ Doppelbindung ist und welche Rolle sie im Metabolismus tatsächlich einnimmt, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung. Trotz aller Limitierungen ist die Reaktion unglaublich interessant, da es bisher die einzige beschriebene Dehydratisierung eines sekundären nicht aktivierten Alkohols bzw. dessen Rückreaktion ist. K. Otte konnte die Oleat Hydratase in einem Zwischenschritt der Biosynthese von Ricinolsäure ausgehend von Sebacinsäure etablieren [87].

Die Kieviton Hydratase und Phaseollidin Hydratase

Zwei weitere Hydro-Lyasen, welche in der Lage sind isolierte C-C Doppelbindungen aus Kieviton und Phaseollidin zu hydratisieren, wurden erstmals im Jahr 1979 durch Kuhn & Smith [88] beschrieben. Kieviton und Phaseollidin sind Phytoalexine der Gartenbohne (*Phaseolus*

vulgaris), prenylierte Isoflavonoide, welche antimikrobielle Eigenschaften besitzen. Phytoalexine werden in der Regel von Pflanzen kurz nach deren Befall durch Bakterien oder Pilzen produziert und vor allem in den Bereichen der befallenen Stellen angereichert, um deren Ausbreitung und Vermehrung zu vermeiden. Dass die hierbei isolierte Kievitone Hydratase (EC 4.2.1.95) einen großen Einfluss auf die Pathogenität gegenüber der Gartenbohne aufwies, konnte mit Hilfe unterschiedlicher *Fusarium* Varianten gezeigt werden [89]. Turbek und Schardl konnten weiterhin zeigen, dass die Kieviton Hydratase glykosiliert und im nativen Zustand als Dimer vorliegt. Hierbei fanden sie allerdings 2 Spezies von 47 kDa und 49 kDa [90]. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass die Kieviton Hydratase sowohl für die Hydratisierung von Kieviton wie auch für die von Phaseollidin verantwortlich war, konnte 1992 durch native Gelelektrophorese und anschließender Aktivitätstests gezeigt werden, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Enzyme handeln musste [91]. Im Jahr 1995 wurde dann die komplette Sequenz der Kieviton Hydratase durch Schardl *et al.* [92] veröffentlicht.

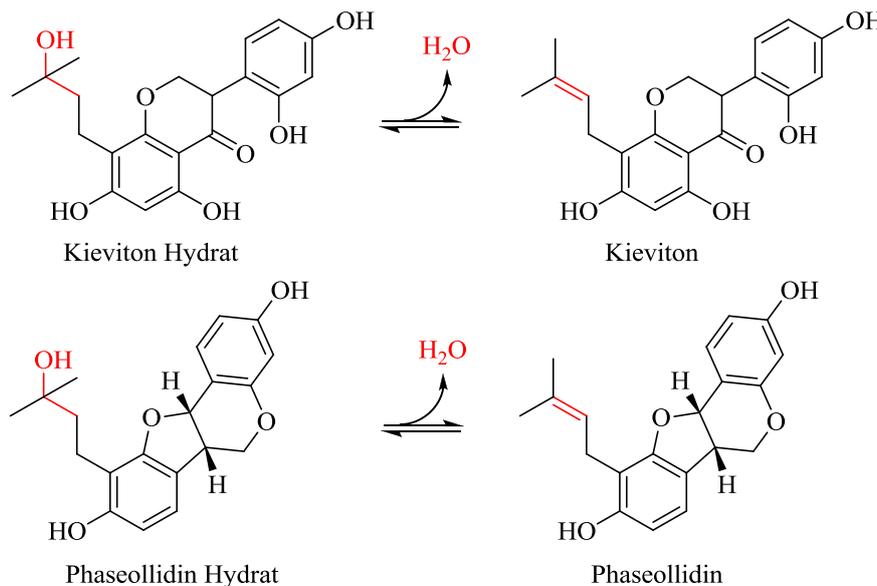


Abbildung 22. Die katalysierten Reaktionen der Kieviton Hydratase (EC 4.2.1.95) und der Phaseollidin Hydratase (EC 4.2.1.97).

In Abbildung 22 sind die beiden Reaktionen gezeigt, welche von der Kieviton- bzw Phaseollidin Hydratase katalysiert werden. Interessanterweise findet die eigentliche De/Hydratisierung bei den Isoflavonoiden an der externen C=C Doppelbindung statt, welche nicht durch nebenstehende elektronenziehenden oder schiebenden funktionellen Gruppen aktiviert wird, wie es bei anderen De/Hydratasen meist der Fall ist. Da bisher sämtliche Aktivitätstests mit aufgereinigtem Enzym durchgeführt worden sind und nichts über Verwendung von Kofaktoren oder Metallen bekannt ist, kann davon ausgegangen werden, dass

die Reaktionen ohne jegliche Art von Additiven katalysiert werden. Einzig die Verwendung von Ascorbinsäure im Puffer könnte auf eine gewisse Labilität gegenüber oxidativen Medien oder Sauerstoff hinweisen. Diesbezüglich wurde aber noch nichts beschrieben.

Diese hier gezeigte Dehydratisierung zweier nicht aktivierter tertiären Alkohole findet bereits reges Interesse in der Industrie und deren mögliche zukünftige Anwendung wurde auch schon patentiert [93]. Um die Dehydratisierung kleiner Moleküle wie *tert*-Butanol oder 2-Methyl-3-Buten-2-ol zu ermöglichen soll hier vor allem der Einsatz von Kofaktoren, welche die Isoflavonoide imitieren, getestet werden.

Die Phenolsäure Decarboxylase

Manche Enzyme können auch unerwartet Hydratase-Aktivität besitzen, was 2013 durch Kurt Faber *et al.* [94] bei der Carboxylierung von Hydroxystyrolerivaten mit der Phenolsäure Decarboxylase nachgewiesen werden konnte. Die promiskuitive Hydrataseaktivität wurde zufällig bei Studien über die Carboxylierung von *p*-Vinylphenol entdeckt. Die *S*-selektive Hydratisierung von *p*-Vinylphenolderivaten (Abbildung 23) konnte daraufhin mit Decarboxylasen aus unterschiedlichen Stämmen wiederholt und nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte das eigentlich erwartete Produkt nur in sehr geringen Mengen gefunden werden. Leider wurde noch nicht getestet wie sich dieses Enzym bezüglich der Dehydratisierung von 1-Phenylethanol bzw. der Hydratisierung von Styrol verhält, was für eine industrielle Anwendung von großem Interesse wäre.

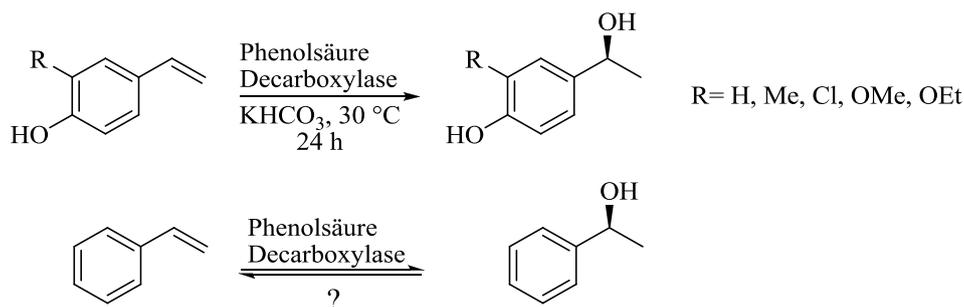


Abbildung 23 Phenolsäure Decarboxylase. Die Hydratisierung bzw. die Dehydratisierung von Styrol wurde nicht getestet.

Die Linalool Dehydratase-Isomerase

Im Jahr 2010 wurde durch die Gruppe um Jens Harder am Max Planck Institut für Meeresbiologie in Bremen ein Enzym entdeckt, welches am Abbauweg von Monoterpenen durch das β -Proteobakterium *Castellaniella (ex Alcaligenes) defragrans 65Phen* beteiligt war

[95]. Monoterpene sind Kohlenwasserstoffe wie z.B. Myrcen, Limonen, α -Phellandren oder α -Pinen deren Molekülgerüst formal aus zwei Isopreneinheiten aufgebaut ist. Pflanzen und Prokaryoten synthetisieren Terpene mit Hilfe des Methylerythritolphosphatweges, über Isopentylpyrophosphat welches den Grundbaustein für die Terpensynthese bildet. Vor allem Koniferen produzieren Monoterpene als sekundäre Pflanzenstoffe welche einen großen Einfluss auf die Thermotoleranz, den Schutz vor UV-Strahlung, die Kommunikation zwischen den Pflanzen oder die Kommunikation zwischen Pflanzen und Insekten haben. Die von den Pflanzen gebildeten Monoterpene werden durch die Abgabe über die Wurzeln oder verrottende Blätter im Boden aufgenommen und dienen dort einer Vielzahl aerobischer und anaerober Mikroorganismen als Energie- und Kohlenstoffquelle. Um diese jedoch nutzen zu können, benötigen die Organismen Wege die Kohlenwasserstoffe zu aktivieren. Aerob passiert dies häufig durch Oxygenasen, welche die Hydroxylierung unter Verwendung von molekularem Sauerstoff als Kosubstrat bewerkstelligen.

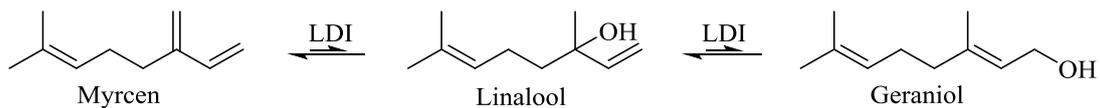


Abbildung 24 Natürliche Reaktionen der Linalool Dehydratase-Isomerase (LDI).

Umso interessanter ist der Abbau von Monoterpenen unter anaeroben Bedingungen durch *Castellaniella defragrans*. Brodkorb *et al.* konnten im Abbauweg des Monoterpens Myrcen ein Enzym identifizieren, welches in der Lage war, Myrcen selektiv zu (*S*)-Linalool (95,4 %) [96] zu hydratisieren (Abbildung 24). Weiterhin war dieses Enzym in der Lage die Umlagerung von Linalool zu Geraniol zu katalysieren. Im weiteren Verlauf des Abbauweges wird vermutlich Geraniol zu Geranial und weiter zu Geraniolsäure oxidiert, welches durch β -Oxidation im Fettsäurezyklus abgebaut werden kann und somit als Energie und Kohlenstoffquelle dient.

Dieses neu entdeckte Enzym erhielt den Namen Linalool Dehydratase-Isomerase aufgrund der Bifunktionalität und wurde den Hydro-Lyasen untergeordnet (LDI, EC 4.2.1.127). Obwohl die natürliche Funktion der LDI die Hydratisierung und die Isomerisierung darstellt, so ist doch das Gleichgewicht beider Reaktionen weit auf Seiten von Linalool bzw. Myrcen. Da beide Substrate thermodynamisch gesehen deutlich stabiler sind als Geraniol, wird die Reaktion durch das stetige Entfernen Geraniols aus dem Gleichgewicht durch Weiteroxidation in Geranial aufrechterhalten. Das native Enzym liegt als Homotetramer, bei einer Größe von etwa 40 kDa für das Monomer, vor. Das Temperaturoptimum der LDI liegt bei 35 °C und der optimale pH-Wert der Hydratisierung bei etwa 8 bis 9. Die spezifischen Aktivitäten der

einzelnen Reaktionen liegen bei 410 nkatal/mg Protein für die Isomerisierung von Geraniol in Linalool und 140 nkatal/mg für die weitere Dehydratisierung von Linalool in Myrcen. Die Umkehrreaktion, die Hydratisierung von Myrcen zu Linalool, verlief mit 133 pkatal/mg deutlich langsamer. Eine mögliche Begründung für die deutlich höheren Aktivitäten gegenüber Linalool und Geraniol liegt vermutlich darin, dass diese Reaktionen als Entgiftungsprozesse gesehen werden, da Monoterpenalkohole eine deutlich höhere Zelltoxizität besitzen. Beide Reaktionen, sowohl die De/Hydratisierung als auch die Isomerisierung benötigen weder Kofaktoren noch den Einsatz von Metallen für die Katalyse. Einzig der Einsatz eines Reduktionsmittels wie Dithiothreitol (DTT) ist zwingend erforderlich um nach der Aufreinigung die volle Aktivität zurückzuerhalten. Aus diesem Grund ist auch die Labilität gegenüber oxidativen Agenzien wie Ti^{3+} oder Sauerstoff nachvollziehbar. Leider war es Harder *et al.* nicht möglich neben Myrcen, Linalool und Geraniol weitere Substrate wie α -, β -Ocimen, Citronellol oder Nerol umzusetzen (Abbildung 25), was auf ein sehr kleines Substratspektrum hindeutete. [95]

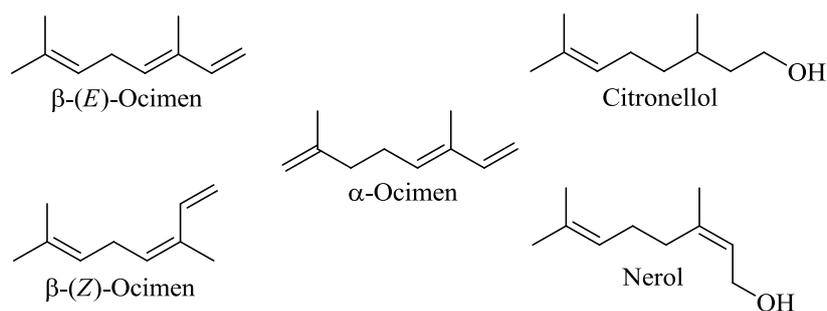


Abbildung 25 Von der LDI nicht akzeptierte Substrate

Die natürlichen Substrate der LDI und ihre Anwendungen

Die natürlichen Substrate der LDI, Linalool, Myrcen und Geraniol werden heute schon im industriellen Maßstab hergestellt und finden Verwendung als Duftstoffe in der Parfüm-, Lebensmittel- und Konsumgüterindustrie. Vor allem Linalool und seine Ester werden aufgrund ihrer Eigenschaften als Geruchsstoffe vor allem in der Parfümindustrie eingesetzt. Hier finden sich vor allem die Ester in z.B. Bergamotte, Lavendel oder auch Eau de Cologne wieder. Linalool findet sich in über 60 % aller parfümierten Haushaltsprodukte wie Seifen, Duschgel, Spülmittel etc. wieder [97]. Zudem ist es Bestandteil vieler ätherischer Öle (z.B. Orange, Koriander oder Bahia-Rosenholz) und ist von daher aus dem alltäglichen Leben nicht wegzudenken.

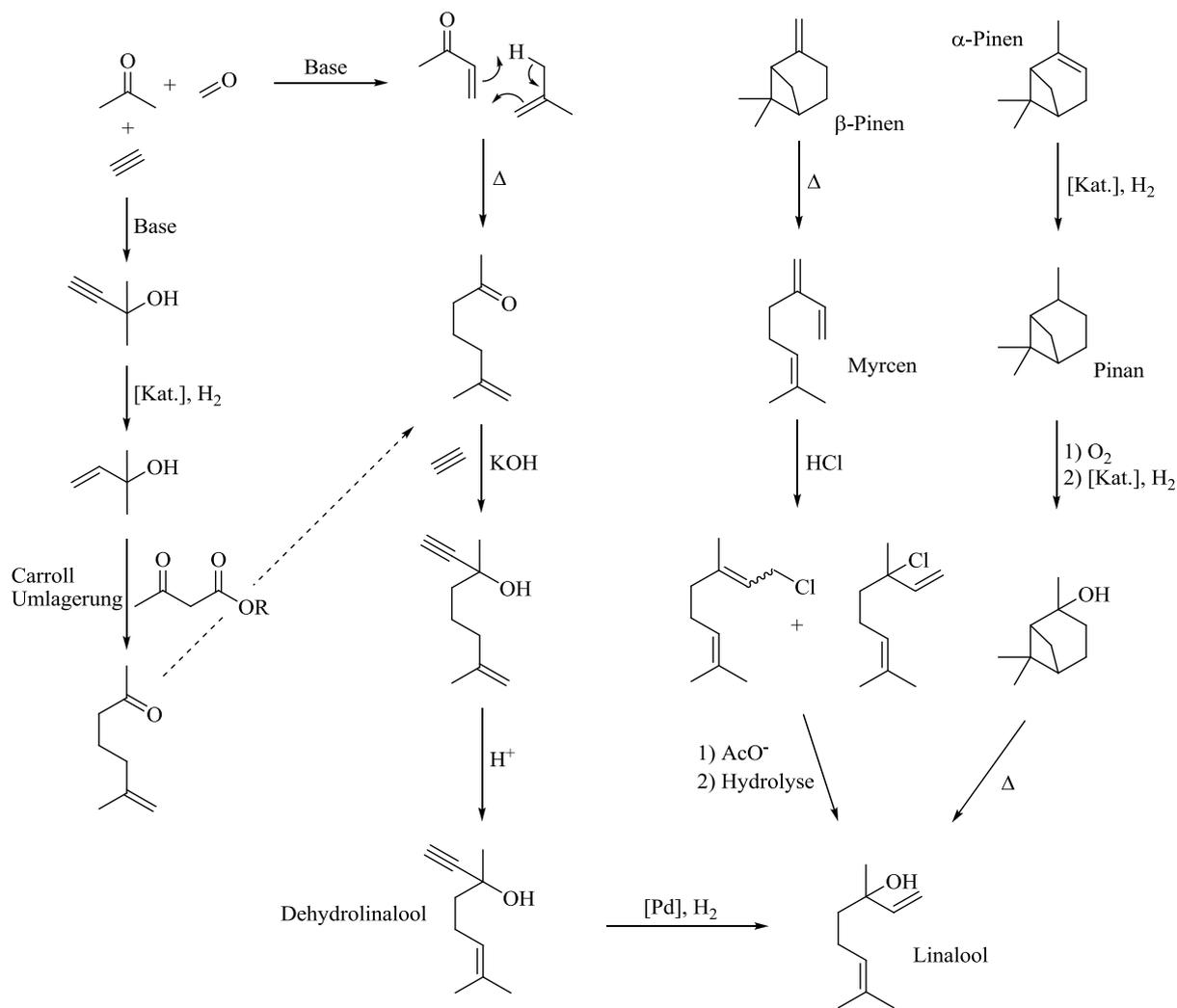


Abbildung 26 Syntheserouten zum Linalool [98].

Gewinnen lassen sich diese Monoterpene durch fraktionierte Destillation aus einer Vielzahl ätherischer Öle, doch ist aufgrund der erforderlichen Reinheit eine synthetische Route für die Industrie die geeignetere Wahl. Im Jahr 2000 wurden etwa 12000 t Linalool produziert, worauf etwas weniger als die Hälfte auf die Extraktion von ätherischen Ölen oder die partiell synthetische Route über Pinen, der Hauptbestandteil von Terpentin, entfallen (Abbildung 26) [99].

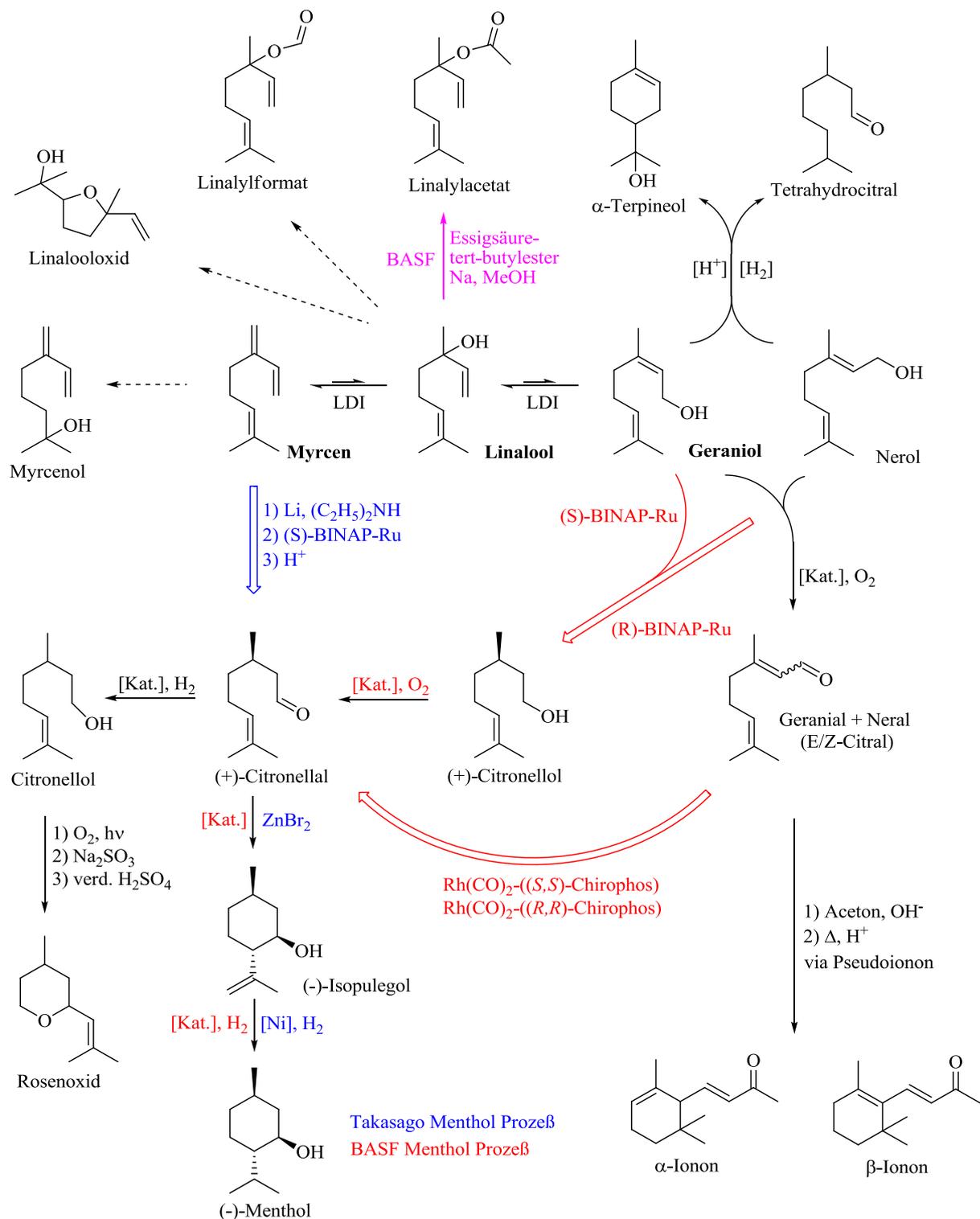


Abbildung 27 Interessante Syntheserouten ausgehend von Myrcen, Geraniol und Linalool der LDI. Alle Produkte inklusive Myrcen, Linalool und Geraniol finden vor allem in der Lebensmittel- und Konsumgüterindustrie Verwendung.

Interessant an den Monoterpenen Linalool, Myrcen und Geraniol ist zudem, dass sie vor allem aus Sicht der Industrie als Ausgangsmaterial für eine Vielzahl weiterer höchst interessanter

Substanzen dienen. Neben Terpeneol, durch Zyklisierung, lassen sich auch Citronellol, Citral, Citronellal, Ionon sowie höhere Terpene wie Farnesol aber auch komplexere Moleküle wie Vitamin A aus diesen Monoterpenen herstellen. Takasago und die BASF entwickelten zudem unabhängig voneinander ausgehend von Myrcen, Citral (Neral und Geranial) bzw. Geraniol und Nerol Prozesse zur Synthese von (-)-Menthol (Abbildung 27).

Ein großer Vorteil der enzymatischen Synthese ist die hohe Regio- und Stereoselektivität bezüglich der zu katalysierenden Reaktionen. Die großen Schwierigkeiten bei der Auftrennung der Enantiomere von Linalool könnten sich mit der LDI lösen lassen. Da die Hydratisierung von Myrcen selektiv zum (*S*)-Linalool und somit die Dehydratisierung von *rac*-Linalool zu (*R*)-Linalool führt, eröffnen sich hier neue Möglichkeiten für die Parfümindustrie.

Durch die Möglichkeit ausgehend von Myrcen zum Geraniol mit Hilfe der LDI zu gelangen, könnten auch hier einige neue enzymatische Routen integriert werden. Zum Beispiel könnte die LDI Einsatz in einer partiell-biotechnologischen Route zu (-)-Menthol finden. Das Geraniol lässt sich mit der Geraniol Dehydrogenase (EC 1.1.1.83) relativ einfach zu Geranial weiteroxidieren. Dieses könnte im weiteren Verlauf durch eine Reduktase zu Citronellal, wie schon von Muller *et al.* [100], Reich *et al.* [101] oder Hall *et al.* [102] beschrieben worden ist, reduziert werden. Die Zyklisierung von Citronellal zu Isopulegol konnte unterdessen ebenfalls von Seitz *et al.* [103] mit einer Squalene-Hopene Zyklase (SHC) aus *Zymomonas mobilis* und Hammer *et al.* [104] mit einer SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* nachgewiesen werden. Die weitere Reduktion mit Wasserstoff über einen entsprechenden Katalysator, um zum gewünschten Menthol zu gelangen, müsste zumindest nach heutigem Stand der Technik auch weiterhin mit Wasserstoff und entsprechendem Katalysator auf traditionell-chemischem Wege durchgeführt werden.

Aber auch ausgehend von Geraniol, das als Diphosphat Bestandteil vieler biosynthetischer Routen für Terpene ist, könnte die LDI zur Synthese von Myrcen, das Basis für eine Vielzahl möglicher Synthesen ist, dienen. Neben der hohen Neigung zur Polymerisation und dementsprechend als Polymer, könnte Myrcen als Dien auch Grundlage für viele interessante Produkte, die mit Hilfe der Diel-Alder Reaktion synthetisiert werden, sein.

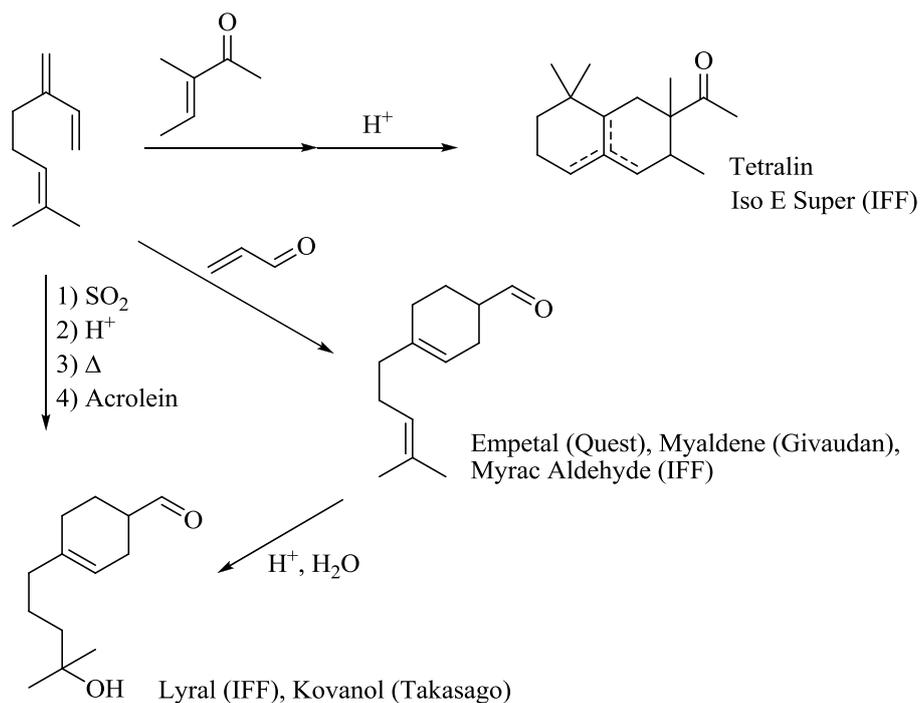


Abbildung 28 Interessante Produkte ausgehend von Myrcen als Substrat [98].

In Abbildung 28 sind einige Beispiele für wichtige Diels-Alder Produkte aus dem Bereich der Duftstoffe, ausgehend von Myrcen gezeigt. Addition von Acrolein führt zu einer Isomerenmischung die auch als Empetal[®] oder Myrac Aldehyd[®] bezeichnet wird. In der Abbildung ist das Hauptprodukt der Addition von Acrolein dargestellt. Die Hydratisierung der Doppelbindung führt zu Lyral, das in Seifen, Aftershave oder auch Deodorants verwendet wird. Allerdings muss hier das Aldehyd geschützt werden, da es ansonsten zu Nebenreaktionen kommen kann. Die elegantere Version um zum Lyral zu gelangen verläuft über eine Zyklosulfonspezies durch eine Diels-Alderartige Reaktion mit SO₂. Das Produkt kann selektiv hydratisiert werden und man erhält durch Pyrolyse wieder die Dienspezies, die durch eine Diels-Alder Reaktion mit Acrolein zu Lyral führt. Die Addition von 3-Methyl-2-penten-3-on, gefolgt von einer säurekatalysierten Zyklisierung führt zu einer angenehm holzig duftenden Mischung die auch als Iso E super[®] bezeichnet wird. [98]

Vor allem die großen Firmen der Duftstoffindustrie wie Givaudan, International Flavor & Fragrances (IFF), Firmenich, Takasago und Symrise könnten von daher an einer partiell-biosynthetischen Route dieser Produkte Interesse finden.

1.4. Zielsetzung

Das Institut für Biochemie an der Universität Stuttgart beschäftigt sich mit der Erforschung und Entwicklung von neuen enzymatischen Katalysatoren für industrielle und technisch interessante Reaktionen. In dieser Hinsicht sind das Substratspektrum, die Regio- und Stereoselektivität sowie weitere wichtige Eigenschaften, wie die Aktivität und die Stabilität von entscheidender Bedeutung. Bei näherem Blick auf die bereits veröffentlichten Ergebnisse der bekannten Hydro-Lyasen insbesondere derer die nicht aktivierte Doppelbindungen bzw. Alkohole dehydratisieren wird deutlich, dass hier sehr starke Limitierungen bezüglich der oben genannten Eigenschaften auftreten. Aufgrund der hohen Spezifität der Enzyme, der Größe des Substrats und der damit einhergehenden Probleme hinsichtlich Spezifität, Verfügbarkeit und Analytik wurde der Fokus auf die Linalool-Dehydratase Isomerase (LDI) gelegt welche zudem aliphatische Substrate mittellanger Kohlenstoffketten akzeptiert und somit technisch relevantere Substrate umzusetzen vermag.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung der Linalool-Dehydratase Isomerase in Bezug auf die Dehydratisierung von aliphatischen Alkoholen speziell im Bereich kurzkettiger Alkohole. Durch Ermitteln der Substratspezifität sollte zudem mehr über einen möglichen Mechanismus in Erfahrung gebracht werden. Neben der Synthese unterschiedlichster Moleküle sollten hier auch Experimente unter Verwendung von deuteriertem Wasser auf der Suche nach einem plausiblen Mechanismus helfen. Unter Verwendung der erhaltenen Ergebnisse sollte versucht werden ein mögliches High-throughput Screening zu entwickeln, was als Basis für eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten dienen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien, Medien und Puffer

2.1.1. Enzyme und Puffer

Enzym/Enzypuffer	Hersteller
<i>NdeI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>NcoI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>BamHI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>HindIII</i>	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Roth
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
Lysozym	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glucose Oxidase	SigmaAldrich, St. Louis
Horseradish Peroxidase	SigmaAldrich, St. Louis
<i>DpnI</i>	Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.2. Chemikalien und Kits (nicht für Synthesen)

Chemikalie/Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	ThermoFischer, Waltham
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	ZymoResearch, Irvine
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	ZymoResearch, Irvine
PMSF	SigmaAldrich, St. Louis

DTT	SigmaAldrich, St. Louis
GelRed™	Biotum, Hayward
Methanol	SigmaAldrich, St. Louis
Orange G	SigmaAldrich, St. Louis
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eisessig	SigmaAldrich, St. Louis
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	SigmaAldrich, St. Louis
Kaliumdihydrogenphosphat	SigmaAldrich, St. Louis
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	SigmaAldrich, St. Louis
EDTA	SigmaAldrich, St. Louis
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SigmaAldrich, St. Louis
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie-Brilliantblau R-250	SigmaAldrich, St. Louis
Manganchlorid (MnCl ₂ *4 H ₂ O)	SigmaAldrich, St. Louis
Kaliumacetat (KOAc)	SigmaAldrich, St. Louis
Rubidiumchlorid (RbCl)	SigmaAldrich, St. Louis
Calciumchlorid (CaCl ₂)	SigmaAldrich, St. Louis
Kaliumchlorid (KCl)	SigmaAldrich, St. Louis
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Orange G	SigmaAldrich, St. Louis
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
30% Acrylamid Mix	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MOPS	SigmaAldrich, St. Louis

2.1.3. Medien und Puffer

LB-Medium	NaCl	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	Trypton	10 g
	ddH ₂ O	1000 ml
TB-Medium	Hefeextrakt	24 g
	Glycerol	4 ml
	Trypton	48 g
	ddH ₂ O	add 900 ml
	10X Kaliumphosphatpuffer	100 ml
10X Kaliumphosphatpuffer	KH ₂ PO ₄	0,17 M
	K ₂ HPO ₄	0,72 M
	ddH ₂ O	1000 ml

Puffer und Lösungen für die Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer	Tris-HCl	4,8 g
	Eisessig	1,14 ml
	0,5 M EDTA-Lösung	2 ml
	ddH ₂ O	add 1000 ml
	pH 8 mit HCl einstellen	
Orange DNA Ladepuffer	Saccharose	2 g
	Orange G	10 mg
	ddH ₂ O	5 ml
1-1,5%-ige Agarose	Agarose	10-15 g
	TAE-Puffer	1000 ml

Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidelektrophorese

6X SDS-Page Ladepuffer	TrisHCl (1M, pH 8)	3,5 ml
	DTT	0,925 g
	Glycerol	3 ml
	SDS	1 g
	Bromphenolblau	12 mg
	ddH ₂ O	add 10 ml
4X Lower Tris Puffer	TrisHCl	181,7 g
	SDS	4 g
	ddH ₂ O	1000 ml
4X Upper Tris Puffer	TrisHCl	60,6 g
	SDS	4 g
	ddH ₂ O	1000 ml
Trenngel 12% (10 ml)	30% Acrylamid Mix	4 ml
	H ₂ O	3,3 ml
	1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
	10 % SDS (in H ₂ O)	0,1 ml
	10 % APS (in H ₂ O)	0,1 ml
	TEMED	0,08 ml
Sammelgel 4% (5 ml)	30% Acrylamid Mix	0,83 ml
	H ₂ O	3,4 ml
	1,0 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
	10 % SDS (in H ₂ O)	0,05 ml
	10 % APS (in H ₂ O)	0,05 ml
	TEMED	0,01 ml
50X SDS Elektrophorese Puffer	TrisHCl	150 g
	Glycin	720 g
	SDS	50 g
	ddH ₂ O	1000 ml
Coomassie-Färbelösung	Methanol	15 ml
	Eisessig	72 ml
	Coomassie-Brilliantblau R-250	1 g
	ddH ₂ O	add 1000 ml
Entfärbelösung	Ethanol	300 ml
	Eisessig	100 ml
	ddH ₂ O	add 1000 ml

Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen

TfbI-Puffer	KOAc	0,59 g
	RbCl	2,42 g
	CaCl ₂	0,29 g
	MnCl ₂ *4H ₂ O	2 g
	Glycerol	30 ml
	ddH ₂ O	add 200 ml
	pH 5,8 mit Essigsäure	
TfbII-Puffer	MOPS	0,21 g
	CaCl ₂	1,1 g
	Glycerol	15 ml
	ddH ₂ O	add 100 ml
	pH 6,5 mit NaOH	

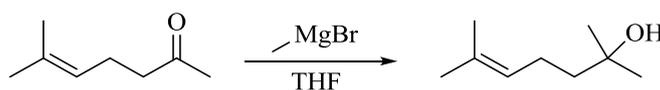
Puffer und Lösungen für den Western Blot

10X TBS Puffer	TrisHCl	30,29 g
	NaCl	87,66 g
	KCl	30 mM
	ddH ₂ O	1000 ml
Transferpuffer	TrisHCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	ddH ₂ O	1000 ml
10X PBS-Puffer	NaCl	1,5 M
	Na ₂ HPO ₄	80 mM
	KCl	30 mM
	KH ₂ PO ₄	15 mM
	ddH ₂ O	1000 ml

2.2. Synthesen

Sämtliche benötigten Chemikalien und Lösungsmittel für die Synthesen und Biotransformationen wurden, sofern nicht explizit daraufhin gewiesen, bei den gängigen Firmen für Chemikalien (SigmaAldrich, Acros, CarlRoth etc.) bestellt und verwendet.

2.2.1. 2,6-Dimethyl-5-hepten-2-ol (**3**)

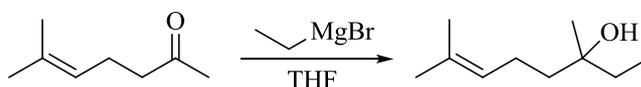


Allgemeine Synthese der Grignard-Verbindungen:

Einer mittels Eisbad gekühlten Lösung aus 17,4 mmol Methylmagnesiumbromid in THF wurden langsam unter Stickstoff und stetigem Rühren 2 g (15,8 mmol) 6-Methyl-5-hepten-2-on welches in 10 ml THF gelöst war hinzuge tropft. Nach einer Stunde rühren wurde die Lösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weiter gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gequenchet und die organische Phase abgenommen. Die wässrige Phase wurde im Anschluss dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert, die organischen Phase vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Dem Einengen über dem Evaporationsverdampfer folgte die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Mobile Phase: Cyclohexan:Ethylacetat 3:1 (v/v). Das Produkt (1,36 g, 61 %) wurde im Anschluss mittels NMR analysiert.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.14 (t, 1H), 2.07 (dd, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.54-1.48 (m, 2H), 1.23 (s, 6H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ = 131.77 (s), 124.44 (s), 71.07 (s), 43.63 (s), 29.22 (s, 2C), 25.72 (s), 23.12 (s), 17.65 (s) ppm.

2.2.2. 3,7-Dimethyl-6-okten-3-ol (**4**)

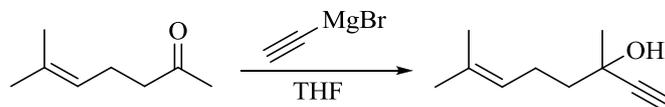


Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 17,4 mmol Ethylmagnesiumbromid und 15,8 mmol 6-Methyl-5-hepten-2-on. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,54 g (68 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 5.22-5.06 (m, 1H), 2.09-1.98 (dd, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.57-1.39 (m, 4H), 1.16 (s, 3H), 0.94-0.86 (t, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ =

131.71 (s), 124.52 (s), 72.97 (s), 41.07 (s), 34.31 (s), 26.27 (s), 25.73 (s), 22.63 (s), 17.65 (s), 8.25 (s) ppm.

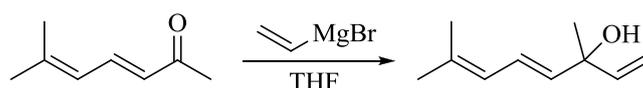
2.2.3. 3,7-Dimethyl-6-okten-1-in-3-ol (**6**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 17,5 mmol Ethynylmagnesiumbromid und 15,8 mmol 6-Methyl-5-hepten-2-on. Als Produkt wurden so 1,85 g (77 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 5.17 (ddd, 1H), 2.46 (s, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.68 (m, 4H), 1.66 (s, 3H), 1.50 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 132.65 (s), 123.66 (s), 87.56 (s), 71.46 (s), 68.29 (s), 43.13 (s), 29.81 (s), 23.58 (s), 25.73 (s), 17.74 (s) ppm.

2.2.4. (*E*)-3,7-Dimethylokta-1,4,6-trien-3-ol (**7**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 16,1 mmol 6-Methyl-3,5-heptadien-2-on und 17,8 mmol Vinylmagnesiumbromid. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 0,66 g (27 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 6.53-6.43 (dd, 1H, J = 10.9, 15.3 Hz), 6.05-5.92 (dd, 1H, J = 10.6, 17.3 Hz), 5.86-5.78 (d, 1H, J = 10.9 Hz), 5.7-5.61 (d, 1H, J = 15.3 Hz), 5.3-5.2 (dd, 1H, J = 1, 17.3 Hz), 5.1-5.04 (dd, 1H, J = 1, 10.6 Hz), 1.8-1.74 (2s, 6H), 1.4 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 144.03 (s), 124.60 (s), 124.34 (s), 112.04 (s), 73.33 (s), 28.14 (s), 26.02 (s), 18.38 (s), 136.07 (s), 135.82 (s) ppm.

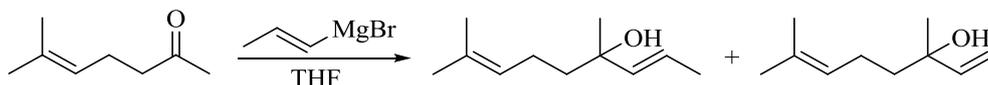
2.2.5. (*E*)-3,7-Dimethylokta-4,6-dien-3-ol (**8**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 17,7 mmol Ethylmagnesiumbromid und 16,1 mmol 6-Methyl-3,5-Heptadien-2-on. Als Produkt wurden so 0,95 g (38 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 6.43 (dd, J = 15.33, 10.85 Hz, 1H), 5.87-5.78 (m, 1H), 5.67-5.56 (m, 1H), 1.78 (s, 1H), 1.58 (q, J = 7.44, 7.35, 7.35 Hz, 1H), 1.43 (s, 1H), 1.29 (s, 1H), 0.89 (t, J = 7.48, 7.48 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 137.42 (s), 135.14 (s), 124.54 (s), 123.95 (s), 73.30 (s), 35.41 (s), 27.63 (s), 26.00 (s), 18.34 (s), 8.35 (s) ppm.

2.2.6. (*E/Z*)-4,8-Dimethyl-2,7-nonadien-4-ol (**10/11**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 17,5 mmol Propenylmagnesiumbromid und 15,8 mmol 6-Methyl-5-Hepten-2-on.

Das *E/Z*-Gemisch konnte während der Säulenchromatographie mit 5:1 Cyclohexan: Ethylacetat aufgetrennt werden. Erhalten wurde so 530 mg (20 %) des *trans-(E)*-Substrats und 180 mg (7 %) *cis-(Z)*-Substrat.

^1H NMR (*trans-(E)*-Substrat) (250 MHz, CDCl_3) δ = 5.59 – 5.33 (m, 2H), 5.20 – 5.09 (m, 1H), 2.21 – 1.95 (m, 2H), 1.88 – 1.79 (m, 3H), 1.71 – 1.56 (m, 8H), 1.34 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 136.57 (s), 131.88 (s), 125.41 (s), 124.47 (s), 74.32 (s), 43.36 (s), 29.08 (s), 25.72 (s), 22.97 (s), 17.66 (s), 14.08 (s) ppm.

^1H NMR (*cis-(Z)*-Substrat) (250 MHz, CDCl_3) δ = 5.72 – 5.53 (m, 2H), 5.17 – 5.05 (m, 1H), 2.16 – 1.92 (m, 2H), 1.87 – 1.80 (m, 3H), 1.72 – 1.50 (m, 8H), 1.26 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 137.98 (s), 131.79 (s), 124.48 (s), 122.66 (s), 72.95 (s), 42.51 (s), 28.03 (s), 25.73 (s), 22.94 (s), 17.72 (s), 17.69 (s) ppm.

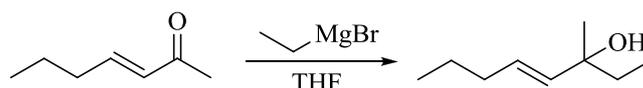
2.2.7. 3-Ethyl-1-okten-3-ol (**12**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 17,2 mmol Vinylmagnesiumbromid und 15,6 mmol 3-Oktanon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,36 g (55 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 5.81 (dd, 1H), 5.15 (m, 2H), 1.52 (m, 4H), 1.39 (s, 1H), 1.35-1.22 (m, 6H), 0.87 (m, 6H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 143.88 (s), 112.39 (s), 75.67 (s), 40.34 (s), 33.19 (s), 32.33 (s), 23.12 (s), 22.64 (s), 14.07 (s), 7.73 (s) ppm.

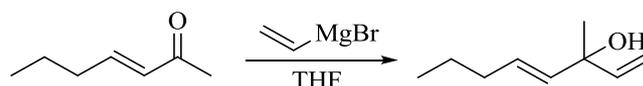
2.2.8. (*E*)-3-Methyl-4-Okten-3-ol (**13**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 19,6 mmol Ethylmagnesiumbromid und 17,8 mmol 3-Hepten-2-on. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,5 g (59 %) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 5.58 (m, 2H), 2.02 (dd, J = 13.76, 6.48 Hz, 2H), 1.60-1.48 (m, 2H), 1.47-1.36 (m, 2H), 1.25 (s, 3H), 0.91 – 0.82 (2t, 6H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ = 136.79 (s), 127.97 (s), 48.39 (s), 35.81 (s), 35.10 (s), 26.35 (s), 19.77 (s), 14.31 (s), 10.79 (s) ppm.

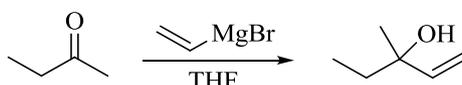
2.2.9. (*E*)-3-Methyl-1,4-oktadien-3-ol (**14**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 19,6 mmol Vinylmagnesiumbromid und 17,8 mmol 3-Hepten-2-on. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,7 g (68 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 6.05 - 5.91 (dd, J = 17.32, 10.60 Hz, 1H), 5.73-5.51 (m, 2H), 5.28 – 5.18 (dd, J = 17.32, 1.22 Hz, 1H), 5.08 – 5.02 (dd, J = 10.60, 1.22 Hz, 1H), 2.06 – 1.98 (td, J = 7.14, 5.97, 5.97 Hz, 2H), 1.57 (d, J = 1.97 Hz, 1H), 1.46 - 1.33 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 0.90 (t, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ = 144.33 (s), 135.64 (s), 128.99 (s), 111.79 (s), 73.10 (s), 34.31 (s), 28.04 (s), 22.36 (s), 13.67 (s) ppm.

2.2.10. 3-Methyl-1-penten-3-ol (**17**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Als Grignardreagenz wurde hier allerdings 20 mmol Vinylmagnesiumbromid verwendet und 18,4 mmol 2-Butanon als Keton. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 130 mg (13 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.94-5.87 (dd, J = 17.42, 10.83 Hz, 1H), 5.23-5.18 (d, J = 17.33 Hz, 1H), 5.08-5.04 (d, J = 10.82 Hz, 1H), 1.60-1.52 (m, 2H), 1.27 (s, 3H), 0.91-0.86 (t,

$J = 7.47, 7.47$ Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) 144.92 (s), 111.77 (s), 73.49 (s), 34.84 (s), 27.15 (s), 8.16 (s) ppm.

2.2.11. 3-Methyl-1-hexen-3-ol (**18**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Als Grignardreagenz wurde hier 20 mM Vinylmagnesiumbromid verwendet und 18,4 mmol 2-Pentanon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 480 mg (23 %) erhalten.

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.91$ (dd, $J = 10.75, 17.5$ Hz, 1H), 5.19 (dd, $J = 1.25, 17.5$ Hz, 1H), 5.04 (dd, 1H, $J = 1.25, 10.75$ Hz, 1H), 1.58-1.25 (m, 4H), 1.28 (s, 3H), 0.92 (t, 3H) ppm. ^{13}C -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 145.28$ (s), 111.43 (s), 73.31 (s), 44.70 (s), 27.64 (s), 17.19 (s), 14.50 (s) ppm.

2.2.12. 3-Methyl-1-hepten-3-ol (**19**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Als Grignardreagenz wurde hier 20 mM Vinylmagnesiumbromid verwendet und 18,4 mmol 2-Hexanon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,1 g (47 %) erhalten.

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.92$ (dd, 1H, $J = 10.75, 17.5$ Hz, 1H), 5.20 (dd, $J = 1.25, 17.5$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 1.25, 10.75$ Hz, 1H), 1.60-1.45 (m, 3H), 1.45-1.23 (m, 6H), 0.90 (t, 3H) ppm. ^{13}C -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 145.27$ (s), 111.46 (s), 73.29 (s), 42.14 (s), 27.67 (s), 26.11 (s), 23.12 (s), 14.07 (s) ppm.

2.2.13. 3-Methyl-1-okten-3-ol (**20**)

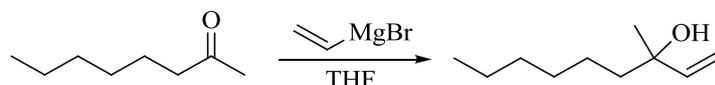


Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Als Grignardreagenz wurde hier 14,5 mmol Vinylmagnesiumbromid verwendet und 13 mmol 2-Heptanon als Keton. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,03 g (56 %) erhalten.

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.90$ (dd, $J = 10.75, 17.5$ Hz, 1H), 5.20 (dd, $J = 1.25, 17.5$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 1.25, 10.75$ Hz, 1H), 1.60-1.40 (m, 3H), 1.40-1.19 (m, 8H), 0.98 (t, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 145.27$ (s), 111.470 (s), 73.32 (s), 42.37 (s), 32,25 (s), 27.67 (s), 23.58 (s), 22.62 (s), 14.05 (s) ppm.

2.2.14. 3-Methyl-1-nonen-3-ol (**21**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Als Grignardreagenz wurde hier 20 mmol Vinylmagnesiumbromid verwendet und 18,4 mmol 2-Oktanon als Keton. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,71 g (60 %) erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.91$ (dd, $J = 11, 17.5$ Hz, 1H), 5.20 (m, 1H), 5.03 (m, 1H), 1.70-1.30 (m, 13H), 0.88 (t, 3H) ppm. ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 145.29$ (s), 111.46 (s), 73.32 (s), 42.42 (s), 31.82 (s), 29.72 (s), 27.68 (s), 23.87 (s), 22.62 (s), 14.07 (s) ppm.

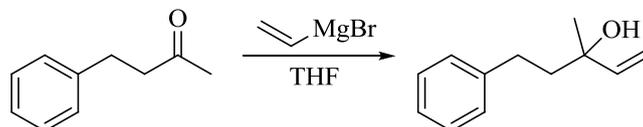
2.2.15. 3-Methyl-1-decen-3-ol (**22**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Als Grignardreagenz wurde hier 20 mmol Vinylmagnesiumbromid verwendet und 18,4 mmol 2-Nonanon als Keton. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 2,19 g (70 %) erhalten.

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.92$ (dd, $J = 10.75, 17.25$ Hz, 1H), 5.20 (dd, $J = 17.25, 1.25$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 10.75, 1.25$ Hz, 1H), 1.60-1.38 (m, 3H), 1.38-1.15 (m, 12H), 0.90 (t, 3H) ppm. ^{13}C -NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 145.29$ (s), 111.47 (s), 73.32 (s), 42.44 (s), 31.84 (s), 30.03 (s), 29.29 (s), 27.67 (s), 23.92 (s), 22.67 (s), 14.11 (s) ppm.

2.2.16. 3-Methyl-5-phenyl-1-penten-3-ol (**23**)

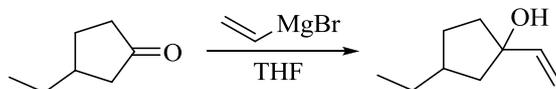


Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 14,9 mmol Vinylmagnesiumbromid und 13,5 mmol 4-Phenyl-2-butanon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,74 g (73 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.38$ -7.03 (m, 5H), 6.04-5.91 (dd, 1H), 5.31-5.22 (dd, 1H), 5.18-5.04 (m, 1H), 2.73-2.58 (m, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H), 1.35 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz,

CDCl_3) $\delta = 144.83$ (s), 142.40 (s), 128.42 (s,2C), 128.35 (s,2C), 125.78 (s), 112.07 (s), 73.26 (s), 44.07 (s), 30.37 (s), 28.05 (s) ppm.

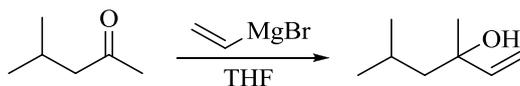
2.2.17. 3-Ethyl-1-vinylcyclopentanol (**24**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 19,6 mmol Vinylmagnesiumbromid und 17,8 mmol 2-Ethylcyclopentanon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 1,95 g (78 %) erhalten.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 6.08 - 5.93$ (dd, $J = 17.27, 10.65$ Hz, 1H), $5.30 - 5.19$ (ddd, $J = 17.29, 6.42, 1.32$ Hz, 1H), $5.04 - 4.98$ (td, $J = 10.64, 1.38, 1.38$ Hz, 1H), $2.1 - 1.3$ (m, 9H), $0.92 - 0.85$ (t, $J = 7.37, 7.37$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 144.96$ (s), 110.59 (s), 81.82 (s), 46.40 (s), 40.72 (s), 39.62 (s), 31.02 (s), 29.89 (s), 12.96 (s) ppm.

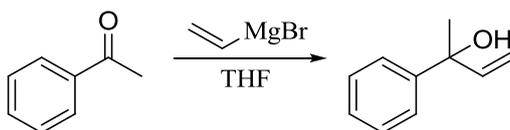
2.2.18. 3,5-Dimethyl-1-hexen-3-ol (**25**)



Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 16,2 mmol Vinylmagnesiumbromid und 14,8 mmol 4-Methyl-2-pentanon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 0,28 g (14 %) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.94$ (dd, $J = 17.37, 10.75$ Hz, 1H), 5.21 (d, $J = 17.55$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 10.72$ Hz, 1H), 1.75 (m, 1H), $1.49-1.44$ (m, 2H), 1.28 (s, 3H), $0.96-0.92$ (t, 6H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 145.71$ (s), 111.08 (s), 73.80 (s), 50.95 (s), 28.72 (s), 24.59 (s), 24.53 (s), 24.33 (s) ppm.

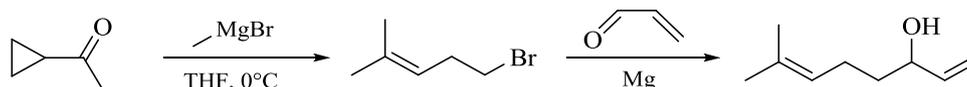
2.2.19. 2-Phenyl-3-buten-2-ol



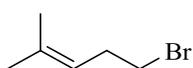
Die Synthese erfolgte wie oben beschrieben. Verwendet wurden hier 9,2 mmol Vinylmagnesiumbromid und 8,3 mmol Acetophenon. Als Produkt wurden so nach Aufreinigung 0,21 g (17 %) erhalten

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 7.50 - 7.19$ (m, 5H), $6.24 - 6.11$ (dd, $J = 17.27, 10.60$ Hz, 1H), $5.34 - 5.11$ (ddd, $J = 13.93, 11.61, 0.99$ Hz, 2H), 1.66 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) $\delta = 144.85$ (s), 128.26 (s, 2C), 127.02 (s), 125.17 (s, 2C), 112.37 (s), 74.77 (s), 48.78 (s), 29.35 (s) ppm.

2.2.20. 7-Methyl-1,6-oktadien-3-ol (**5**) [105, 106]

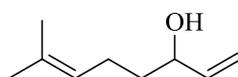


1-Bromo-4-methyl-3-penten



4,21 g (50 mmol) Cyclopropylmethylketon wurde in 10 ml trockenem THF gelöst und langsam unter stetigem Rühren zu einer mittels Eisbad gekühlten Lösung aus (1,25 eq) Methylmagnesiumbromid und 20 mL THF hinzuge tropft. Die Lösung wurde im Anschluss für 20 min unter Rückfluss und über Nacht auf Raumtemperatur weiter gerührt. Hiernach wurde eine verdünnte Lösung aus 35 mL konz. Schwefelsäure (1:2 Schwefelsäure-Wasser-Verhältnis) sehr langsam der Mischung hinzuge tropft. Nach weiteren 30 min Rühren wurde die organische Phase abgenommen, die wässrige Phase dreimal mit 20 ml Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Dem Einengen über dem Evaporationsverdampfer folgte die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Mobile Phase: Cyclohexan:Ethylacetat 3:1 (v/v). Als Produkt wurden so 5,4 g (56%) erhalten.

7-Methyl-1,6-oktadien-3-ol

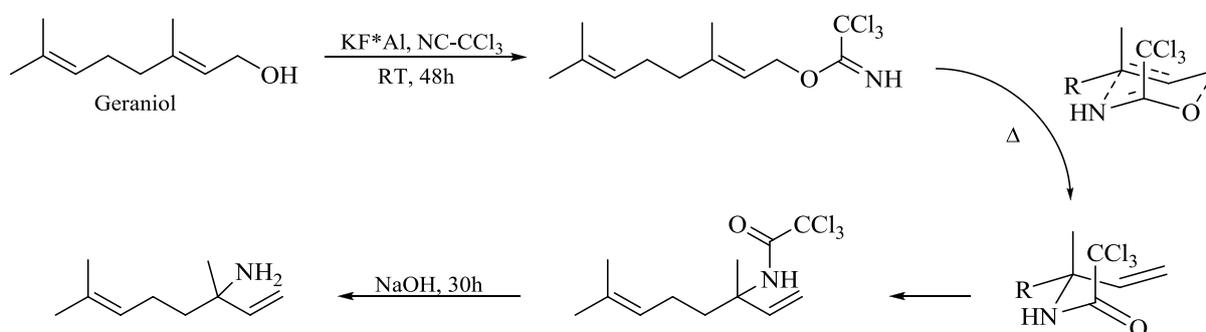


Zu 1,1 g mit Iod aktivierten Mg-Spänen wurde langsam das Bromid (5,4 g, 32 mmol) in 30%igem Diethylether hinzugegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Mischung über dem Wasserbad ($50\text{ }^\circ\text{C}$) für weitere zwei Stunden erwärmt. Im Anschluss wurde die Lösung auf $-15\text{ }^\circ\text{C}$ (mit NaCl -Eisbad) abgekühlt und mit 10% (v/v) Diethylether versetztem Acrolein (2 g, 35 mmol) langsam versetzt. Die Reaktion wurde im Anschluss bei Raumtemperatur über Nacht weiter gerührt. Die Lösung wurde mit 30 mL gesättigter NH_4Cl -Lösung gequenchet. Hiernach wurde die organische Phase abgenommen, die wässrige Phase

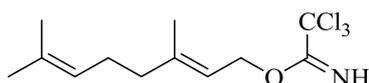
dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert, die organischen Phase vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Dem Einengen über dem Evaporationsverdampfer folgte die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Mobile Phase: Cyclohexan:Ethylacetat 3:1 (v/v). Das Produkt (0,86 g, 19 %) wurde im Anschluss mittels NMR analysiert.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ = 5.98-5.78 (m, 1H), 5.27-5.05 (m, 3H), 4.17-4.06 (q, 1H), 2.14-2.02 (dd, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.63-1.51 (m, 2H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 141.19 (s), 132.21 (s), 123.87 (s), 114.55 (s), 72.85 (s), 37.00 (s), 24.01 (s), 25.72 (s), 17.71 (s) ppm.

2.2.21. Linalylamin (**9**) [107]



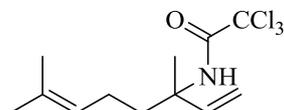
Geranioltrichloracetimidat



410 mg (10 mmol) Natriumhydrid (57-63 % Suspension in Mineralöl) wurde zweimal mit 5 ml Heptan aufgeschlämmt und der Überstand mit einer Spritze abgezogen. Im Anschluss wurden 60 ml trockenener Diethylether hinzugegeben. Zu dieser Suspension wurde tropfenweise 15,4 g (100 mmol) Geraniol, gelöst in 15 ml Diethylether, hinzugegeben. Nachdem sich kein Wasserstoff mehr gebildet hat wurde die Lösung mit Hilfe eines Eis-NaCl-Bads auf etwa -10 °C abgekühlt. 10 ml (100 mmol, 14,4 g) Trichloracetonitril wurden so langsam hinzugegropft, dass die Temperatur der Lösung unter 0 °C blieb. Hiernach wurde die Lösung auf langsam auf Raumtemperatur erwärmt und im Anschluss über dem Evaporationsverdampfer eingengt. 150 ml Pentan mit 0,4 ml Methanol wurden hinzugegeben und ordentlich vermischt. Der dunkle Niederschlag der sich hiernach bildete wurde abfiltriert, zweimal mit Pentan gewaschen und die vereinigten organischen Phasen erneut über dem Evaporationsverdampfer eingengt. Das

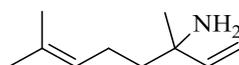
noch leicht verunreinigte Produkt (~24 g) wurde hiernach nicht weiter aufgereinigt, sondern wie beschrieben direkt weiterverwendet.

3,7-Dimethyl-3-trichloracetamido-1,6-oktadien



Das Produkt (~24 g) aus der vorherigen Synthese (Geranioltrichloracetimidat) wurde in 300 ml Xylol gelöst und unter Rückfluss und stetigem Rühren für 8 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die dunkle Lösung über eine kurze Säule mit Silicagel (~ 70 g) und Toluol filtriert. Die Säule wurde im Anschluss mit 250 ml Toluol gespült und die vereinigten leicht gelben organischen Phasen über dem Evaporationsverdampfer aufkonzentriert. Der gelbe Rückstand wurde über einer Vigreux-Kolonnen destilliert. Das Produkt (~16 g) kam bei 13 mbar und etwa 108 °C.

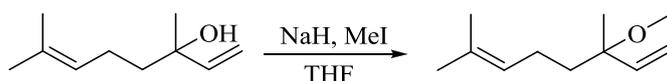
3,7-Dimethyl-1,6-oktadien-3-amin (Linalylamin)



In einen 500 mL 3-Halskolben, der mit einem Rückflusskühler, einem Calciumchlorid-Trockenrohr und einer Stickstoffzufuhr ausgestattet war, wurden die 16 g des Diens in 250 mL 95% Ethanol und 200 mL 6N NaOH gelöst. Die Luft wurde hiernach durch Stickstoff ersetzt und die Reaktion über 60h (Wochenende) bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 300 mL Diethylether extrahiert und die organische Phase abgenommen. Der wässrige Rückstand wurde weitere dreimal mit 50 mL Diethylether gewaschen, die organischen Phasen vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde im Anschluss über dem Evaporationsverdampfer eingeengt und weitere viermal mit heißem Hexan extrahiert. Das Extrakt wurde wiederum über dem Evaporationsverdampfer eingeengt und über einer Vigreux-Kolonnen destilliert. Das Produkt (8 g) kam bei etwa 100 °C und 14 mbar. Gesamtausbeute der Synthese ausgehend von Geraniol: 51%.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 5.89 (dd, 1H), 5.16-5.03 (m, 2H), 5.00 (dd, 1H), 1.95 (m, 2H), 1.67 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.49-1.36 (m, 2H), 1.17 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ = 147.39 (s), 131.45 (s), 124.46 (s), 110.57 (s), 53.65 (s), 43.15 (s), 28.45 (s), 25.69 (s), 23.01 (s), 17.64 (s) ppm.

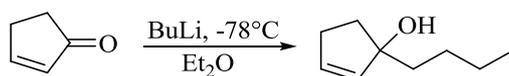
2.2.22. 3-Methoxy-3,7-dimethyl-1,6-oktadien (**15**)



1,5 g (37 mmol) Natriumhydrid (57-63% Dispersion in Öl) wurden bei 0 °C in 30 ml THF unter Stickstoffatmosphäre gelöst. 5 g (34 mmol) Linalool wurde in 10 ml THF gelöst und langsam unter stetigem Rühren hinzugegeben. Nach 30 min wurden 4,9 g (35 mmol) Methyljodid hinzugegeben und bei Raumtemperatur über Nacht weiter gerührt. Die Reaktion wurde mit 50 ml Wasser gequench, die organische Phase abgenommen und die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel über dem Evaporationsverdampfer eingengt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Mobile Phase Cyclohexan:Ethylacetat 3:1 (v/v). Das Produkt (3,74 g, 65 %) wurde im Anschluss mittels NMR analysiert.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.82\text{-}5.70$ (dd, 1H), $5.21\text{-}5.03$ (m, 3H), 3.16 (s, 3H), $2.03\text{-}1.92$ (dd, 2H), 1.68 (s, 3H), $1.63\text{-}1.50$ (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.23 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) $\delta = 142.84$ (s), 131.46 (s), 124.46 (s), 114.66 (s), 77.21 (s), 50.01 (s), 39.29 (s), 25.70 (s), 22.36 (s), 21.57 (s), 17.63 (s) ppm.

2.2.23. Butylcyclopent-2-enol (**27**) [108]

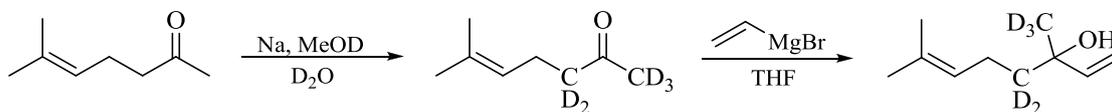


Unter Stickstoffatmosphäre wurden (24,4 mmol) Cyclopentenon in 100 ml Diethylether gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Anschließend wurden 1,1 eq Butyllithium langsam (etwa 30 min) hinzugegeben und für weitere 15 min gerührt. Nach Zugabe von 1,5 ml Wasser wurde bis zum Erwärmen auf Raumtemperatur weitergerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit gesättigter NH_4Cl -Lösung gequench und die organische Phase isoliert. Die wässrige Phase wurde im Anschluss noch drei Mal mit 20 ml Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet und mit dem Evaporationsverdampfer eingengt. Das Produkt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Cyclohexan:Ethylacetat 3:1. Das Produkt (1,19 g, 35 %) wurde im Anschluss mittels NMR analysiert.

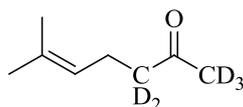
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) $\delta = 5.90\text{-}5.84$ (m, 1H), $5.71\text{-}5.67$ (m, 1H), $2.53\text{-}2.44$ (m, 1H), $2.33\text{-}2.24$ (m, 1H), $2.05\text{-}1.98$ (m, 1H), $1.86\text{-}1.80$ (m, 1H), $1.69\text{-}1.58$ (m, 2H), $1.36\text{-}1.30$

(m, 4H), 0.93 – 0.88 (t, 3H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ = 136.54 (s), 133.36 (s), 86.17 (s), 40.49 (s), 37.64 (s), 31.14 (s), 26.63 (s), 23.23 (s), 14.10 (s) ppm.

2.2.24. d^5 -Linalool (**33**) [109]



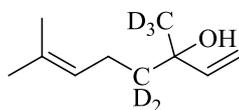
6-Methyl-5-[1,1,1,3,3- $^2\text{H}_5$]hepten-2-on



1 g (7,9 mmol) 6-Methyl-5-hepten-2-on wurden in einer Lösung aus 120 mg Natrium (5,2 mmol) in 50 ml CH_3OD gelöst und für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel über dem Evaporationsverdampfer abgezogen und dem Rückstand 2,5 ml D_2O hinzugegeben. Die Lösung wurde im Anschluss dreimal mit 15 ml Diethylether extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet und zuletzt über dem Evaporationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand (0,42 g, 41 %) wurde ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.10 - 5.03 (m, 1H), 2.28 - 2.20 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1.62 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 209.24 (s), 132.77 (s), 122.64 (s), 25.68 (s), 22.41 (s), 17.65 (s) ppm.

3,7-[10,10,10- $^2\text{H}_3$]Dimethyl-1,6-oktadien[4,4- $^2\text{H}_2$]-3-ol (d^5 -(R/S)-Linalool)



0,42 g (3,3 mmol) des d^5 -Heptenons wurde in 15 ml trockenem Diethylether gelöst und langsam unter stetigem Rühren zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 3,6 mmol Vinylmagnesiumbromid in 15 mL THF hinzugesetzt. Die Lösung wurde für 1 h gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und nochmals über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde im Anschluss mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gequenchet, die organische Phase dekantiert und die wässrige Phase dreimal mit je 20 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und über dem

Evaporationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EA:PE 1:3) aufgereinigt. Erhalten wurden so 0,19 g (36 %) des d^5 -Linalools **33**.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ = 5.96 - 5.87 (m, 1H), 5.23 - 5.18 (m, 1H), 5.15 – 5.09 (m, 1H), 5.09 – 5.04 (m, 1H), 2.08 – 1.93 (m, 2H), 1.68 (s, 3H), 1,62 (s, 3H) ppm. ^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3) δ = 145.04 (s), 131.95 (s), 124.32 (s), 111.68 (s), 73.25 (s), 25.71 (s), 22.61 (s), 17.70 (s) ppm.

2.3. Stämme und Plasmide

Tabelle 1 Verwendete *E. coli* Stämme

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> K12	DH5 α	fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17
<i>E. coli</i> B	BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B dcm ompT hsdS($r_B^- m_B^-$) gal
	C41(DE3)	F $^-$ ompT gal dcm hsdS $_B$ ($r_B^- m_B^-$)(DE3)
	C43(DE3)	F $^-$ ompT gal dcm hsdS $_B$ ($r_B^- m_B^-$)(DE3)
	M15(Prep4)	NaIS, StrS, RifS, Thi., Lac., Ara+, Gal+, Mtl., F., RecA+, Uvr+, Lon+

Tabelle 2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Origin of replication	Besonderheiten	Größe
pET28a-(+) (Novagen)	f1 pBR322	Kan, 2x His $_6$ -Tag, T7 Promotor, lacI, MCS	5369 bp
pQE31 (Quiagen)	f1 pBR322	Amp, His $_6$ -Tag, T5 Promotor, 2x lacO, MCS	3463 bp
pET28a-(+)- CdeLDI	Das Plasmid enthält das Gen der LDI aus <i>Castellaniella defragrans</i> mit einem N-terminalen His $_6$ -Tag.		

Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang (Kapitel 6.3).

2.3.1. Mikrobiologisches Arbeiten

Alle Nährmedien und Puffer wurden vor Verwendung durch Autoklavieren bei 121 °C und zwei bar Druck für 15 min oder durch Filtration mit Hilfe einer 0,2 µm Membran sterilisiert. Einwegspitzen wurden vor Benutzung autoklaviert. Zur Herstellung sämtlicher Puffer und Medien wurde, sofern nicht anders angegeben, deionisiertes Wasser verwendet.

2.4. Zellkultur und Stammhaltung

2.4.1. Agarplatten

Agarplatten dienen als Plattform für die Anzucht von Bakterienkolonien. Das Nährmedium besteht aus LB-Medium und 1,5% Agarose und verleiht dem Medium durch Ausbildung einer Matrix eine gelartige Konsistenz. Transformanden gewünschter Gene werden auf dem Nährmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um unerwünschte Transformanden auszuschließen wird dem Medium Kanamycin (30 mg/ml) oder Ampicillin (100 mg/ml) hinzugegeben, je nach Resistenz des transformierten Plasmids. Die Agarplatten mit den gewünschten Transformanden wurden mit Parafilm luftdicht abgeschlossen und bei 4 °C für bis zu 8 Wochen gelagert.

2.4.2. Übernachtkulturen

5 ml LB-Medium in Reagenzgläsern wurden mit den gewünschten Transformanden der Agarplatten angeimpft. Hierfür wurden sterile Spitzen verwendet. Zusätzlich wird hier, wie auch bei den Agarplatten zur Selektion das entsprechende Antibiotikum hinzugegeben. Die Übernachtkulturen wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 180 U/min über Nacht inkubiert.

2.4.3. Stammhaltung

Zur Lagerung über einen großen Zeitraum (> 6 Monate) wurden Übernachtkulturen der gewünschten *E. coli* Zellen angelegt. Hiervon wurden am nächsten Morgen 1 ml mit 1 ml 60 %-igem Glycerin versetzt und im Anschluss in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4.4. Anzucht von *E. coli* und heterologe Expression im Schüttelkolben

800 ml LB-Medium in einem 2 l Schüttelkolben wurden mit einer Übernachtkultur von *E. coli* BL21 (*DE3*) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,005 angeimpft. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) bei einer OD₆₀₀ von 0,5 eingeleitet. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C und 180 U/min im Schüttelinkubator wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 9000 U/min über 15 min geerntet.

2.4.5. Zellaufschluss mittels Ultraschall (Sonification)

Die nach der Genexpression erhaltenen Zellpellets wurden im gewünschten Puffer resuspendiert (Verhältnis 5 ml Puffer pro Gramm Zellpellet). Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym und 0,2 mM PMSF wurde die Lösung in einem Eisbad abgekühlt. Der Zellaufschluss erfolgte unter stetiger Eisbadkühlung am Sonifier (Branson Sonifier 250W) mittels Ultraschall bei 40 Watt und einem Arbeitsintervall von 35%. Der Aufschluss erfolgte 6-8 Zyklen lang, bestehend aus jeweils 45 s Aufschluss und 45 s Ruhephase. Im Anschluss wurde das nichtlösliche Zellmaterial bei 19000 U/min (SS34-Rotor) und 4 °C über 45 min abzentrifugiert. Das Lysat wurde im Anschluss abdekantiert und für weitere Verwendungen direkt weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

2.4.6. Zellaufschluss durch chemische Lyse

Die chemische Lyse wurde nur für kleine Probenmengen (Zellpellet aus max. 2 ml Ansatz) verwendet. Es wurden wie vom Hersteller empfohlen 5 ml BugBuster Reagenz pro Gramm Zellpellet verwendet. Bei kleineren Mengen, welche bei Expressionsstudien erhalten wurden (1-2 ml Kulturmedium), wurde der Überstand abdekantiert und das verbliebene Pellet mit 100 µl BugBuster Reagenz pro 1 ml Kulturmedium aufgeschlossen. Das Pellet wurde resuspendiert und für 1 h auf Eis unter gelegentlichem vortexen (alle 15 min) inkubiert. Im Anschluss wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren (13200 U/min, 10 min, Tischzentrifuge) abgetrennt. Das Lysat und die unlöslichen Bestandteile konnten hiernach getrennt voneinander durch SDS-Gelelektrophorese analysiert werden. Alternativ konnte das Lysat auch direkt für Biotransformationen weiterverwendet werden.

2.4.7. Zellaufschluss mittels Emulsifier

Die erhaltenen Zellpellets der Expressionen (> 1 l) wurden in 4-5 ml Puffer pro Gramm Pellet aufgeschlämmt, homogenisiert und auf Eis gelagert. Der Emulsifier wurde vor dem Aufschluss erst mit dH₂O gewaschen und im Anschluss mit dem gewünschten Aufschlusspuffer equilibriert. Die Suspension wurde in den entsprechenden Vorratsbehälter durch ein Sieb gegeben, um letzte Reste möglichen Pellets auszuschließen, da diese den Emulsifier verstopfen könnten. Der Suspension wurde vor dem Aufschluss noch PMSF (Endkonzentration 0,1 mM) hinzugegeben. Der Zellaufschluss wurde bei einem Gegendruck von etwa 1,5 bar durchgeführt, sodass der Druck für den Aufschluss bei etwa 800-1000 bar lag. Die Lösung wurde dreimal durch das System gepumpt, um möglichst vollständigen Aufschluss zu erreichen. Die aufgeschlossene Probe wurde im Anschluss bei 19000 U/min für 45 min zentrifugiert, der

Überstand von den Zellrückständen abgetrennt und auf Eis bzw. bei -20 °C je nach Verwendung gelagert.

2.5. Mikrobiologische Methoden

2.5.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Stämmen wurde das Zyppey Plasmid Miniprep Kit verwendet. Hierfür wurden Übernachtskulturen (5 ml LB-Medium) mit den entsprechenden Kolonien der benötigten Plasmide angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Der weitere Aufschluss sowie die folgende Isolation wurden wie von ZymoResearch angegeben durchgeführt. Die Elution des Plasmids von der Säule wurde mit 50-70 µl ddH₂O durchgeführt.

2.5.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

100 ml LB-Medium wurden mit der entsprechenden Übernachtskultur des gewünschten Stammes angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 inkubiert. Im Anschluss dazu wurden die Zellen auf Eis gekühlt und für 10 min bei 4000 U/min abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 40 ml TfbI-Puffer resuspendiert und erneut für 15 min auf Eis gelagert. Nach erneutem Abzentrifugieren (10 min, 4000 U/min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml TfbII-Puffer resuspendiert, erneut auf Eis gelagert (15 min), im Anschluss aliquotiert (50 µl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung fand bei -80 °C statt.

2.5.3. Transformation von *E. coli* mit Hilfe der Hitzeschock-Methode

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Hierfür wurden 2-5 µl Plasmid-DNA einem Aliquot (50 µl) kompetenter Zellen hinzugegeben und diese für 30 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde der Hitzeschock bei 42 °C in einem Wasserbad für 45 s durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 5 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 30 °C für 60 min bei 300 U/min in einem Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, 750 µl des Überstandes verworfen und das Pellet wieder resuspendiert. Danach wurden die Zellen auf einer LB-Agar Platte mit dem gewünschten Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

2.5.4. Amplifizierung eines Gens mittels Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten aus doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde die von Mullis [110] entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet.

Im ersten Schritt werden kurze komplementäre DNA Fragmente (Primer) an das zu amplifizierende DNA-Fragment angelagert (Annealing), welches bei 95 °C zuvor aufgespalten wurde. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Länge der Primer und deren GC-Gehalt und liegt im Normalfall etwa 15 - 20 °C unter der Schmelztemperatur der Primer.

Die Schmelztemperatur T_m der Primer wurde von Metabion wie folgt berechnet:

$$T_m = 100.5 + (41 * (yG+zC)/(wA+xT+yG+zC)) - (820/(wA+xT+yG+zC)) + 16.6 * \log_{10}([Na^+])$$

Hier sind w , x , y und z die Anzahl der Basen A, T, G, C. Der Term $16.6 * \log_{10}([Na^+])$ beinhaltet die Miteinberechnung der Salzkonzentration auf die Schmelztemperatur. Hierbei wird die Konzentration von Natrium gewählt, da der Einfluss beziehungsweise die Bildung von Salzbrücken zwischen den DNA-Strängen durch Na^+ am ehesten begünstigt wird (Metabion AG).

Die tatsächliche Annealingtemperatur lässt sich anhand der Schmelztemperatur für die Primer dennoch nicht exakt bestimmen. Deswegen wurden im Falle der PCR-Reaktionen immer Temperaturen von +/- 3 °C der zu erwartenden Annealingtemperatur verwendet.

Dem Annealingschritt folgte die Amplifizierung des gewünschten Gen-Fragments mit Hilfe der *Pfu*-DNA Polymerase. Als Alternative hierzu kann die *Taq*-DNA Polymerase verwendet werden, diese ist aber aufgrund der schlechteren Proof-Reading Rate, das heißt, der größeren Wahrscheinlichkeit während der Amplifizierung falsche Nukleotide einzubauen, nur bedingt der *Pfu*-DNA Polymerase vorzuziehen, auch wenn diese etwa doppelt so lange für die Gen-Amplifizierung benötigt.

Die drei Zyklen (Denaturieren, Annealing und Elongation) wurden für die PCR insgesamt 30 Mal wiederholt, bevor diese abgebrochen wurde.

Tabelle 3. Reaktionsansatz für die Standard-PCR

Templat DNA	1-10 µl (50-100 ng)
Primer Forward (10 pmol)	1,2 µl
Primer Reverse (10 pmol)	1,2 µl

<i>Pfu</i> -Puffer (inkl. MgSO ₄) 10X	3 µl
dNTPs (10 mM)	1,2 µl
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	total 30 µl

Bei zu amplifizierenden Gensequenzen mit einem GC-Gehalt von mehr als 55 % wurde dem Reaktionsansatz 5 Vol. % DMSO, da dieses die Basenpaarung stört, hinzugefügt. Als Alternative zu DMSO kann auch Betain verwendet werden, das als isostabilisierendes Mittel die Sequenzabhängigkeit hinsichtlich des DNA-Schmelzüberganges reduziert [111, 112].

Tabelle 4. Thermocycler-Programm für Standard-PCR

#	PCR-Schritte	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	3-5 min
2	Denaturierung	95 °C	45 s
3	Annealing	$T_{m,Primer} - 15 \pm 3$ °C	45 s
4	Elongation	72 °C	
5	zu Schritt 2		30 Wiederholungen
6	Finale Elongation	72 °C	
7	Kühlen	8 °C	

Die Produkte wurden im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und verifiziert. Standard-PCR Produkte wurden im Anschluss mit dem Zyppy DNA-Purification Kit (ZymoResearch) nach Protokoll aufgereinigt. Die Elution wurde entgegen dem Protokoll mit 20-30 µl ddH₂O durchgeführt.

2.5.5. Kolonie-PCR

Für eine schnelle Überprüfung, ob die Geninsertion nach einer Ligation erfolgreich war, wurde die Kolonie-PCR verwendet. Hierbei wurde ein PCR Ansatz ähnlich dem in Tabelle 3 verwendet. Allerdings wurden hierbei als Template Zellen von der Agarplatte gepickt und dem Ansatz hinzugegeben. Außerdem wurde anstatt der *Pfu*-DNA Polymerase hier die *Taq*-DNA Polymerase verwendet, zum einen wegen der um den Faktor 2 schnelleren Amplifizierung und zum anderen da für die Kontrolle eine geringere Proof-Reading Funktion keinerlei Bedeutung

hat. Im Anschluss wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Tabelle 5. Kolonie-PCR Ansatz:

Templat DNA	DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen (Platte)
Primer Forward (10 pmol)	1 µl
Primer Reverse (10 pmol)	1 µl
<i>Taq</i> -Puffer (inkl. MgSO ₄) 10X	3 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl
ddH ₂ O	total 30 µl

Tabelle 6. PCR-Programm für die Kolonie-PCR

#	PCR-Schritte	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	95 °C	45 s
3	Annealing	$T_{m,Primer} - 15 \pm 3$ °C	45 s
4	Elongation	72 °C	
5	zu Schritt 2		25 Wiederholungen
6	Finale Elongation	72 °C	
7	Kühlen	8 °C	

2.5.6. Agarose-Gelelektrophorese und Isolation von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde mit der Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Größe der Fragmente wurde die Agarosekonzentration des Gels von 1 bis 1,5 % variiert. Wichtig bei der Präparation des Gels ist die Verwendung von TAE-Puffer. Zur Visualisierung der DNA-Proben wurde der noch flüssigen Agaroselösung (40-50 ml) 5 µl GelRed (Fluoreszenzfarbstoff) zugegeben. Die Proben wurden mit 2/5 Vol. % Orange G Ladepuffer versetzt, in die Kammern des Agarose-Gels gegeben und bei einer konstanten Spannung von 120 V für 45 min aufgetrennt. Die fertigen Gele wurden im Anschluss unter UV-Licht digital fotografiert.

Um die gewünschten DNA-Fragmente aus den Gelen zu isolieren, wurden die benötigten DNA-Banden mit Hilfe eines Skalpells auf einem UV-Tisch bei 365 nm ausgeschnitten. Die Fragmente wurden im Anschluss mit dem Zyppy GelExtraction Kit nach Protokoll aufgereinigt. Die Elution von der Säule wurde mit 5 bis 30 µl ddH₂O durchgeführt.

2.5.7. Restriktionsverdau von DNA

Um gewünschte Gene oder Genfragmente umzuklonieren oder zu isolieren wurde der Restriktionsverdau verwendet. Hierbei wurde die DNA an den gewünschten Restriktionsstellen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die benötigten DNA-Fragmente wurden im Anschluss auf der UV-Tischplatte mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Zyppy Gelextraktion Kit aufgereinigt.

Als Protokoll hierfür wurde das Fermentas-Tool für den Doppelverdau verwendet (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>). Als Restriktionspuffer wurde derjenige verwendet, der die maximale Aktivität für die entsprechenden Restriktionsenzyme aufwies. War ein Doppelverdau aufgrund von Star-Aktivität oder zu geringer Aktivität nicht möglich, so musste nach dem einfachen Verdau der Puffer mit Hilfe des DNA Purification-Kits durch ddH₂O ausgetauscht werden.

Tabelle 7. Ansatz für Restriktionsverdau mit *NcoI* und *HindIII*

Templat DANN	5-30 µl (500-3000 ng)
Tango Puffer 10X	3-5 µl
<i>NcoI</i>	1 µl
<i>HindIII</i>	2 µl
ddH ₂ O	total 30-50 µl

Der Restriktionsverdau wurde bei 37 °C in einem Thermocycler durchgeführt. Die Zeit für den Verdau wurde so gewählt, dass bei 100% Aktivität für die verwendete Menge an Template DNA ein 30-50facher Überverdau erfolgte. Per Definition besagt die Aktivität ein Unit bei Restriktionsenzymen den vollständigen Verdau von 1 µg der genomischen DNA des λ-Phagen innerhalb einer Stunde. Aus diesem Grund wurde in unserem Fall bei Einsatz von etwa 10 U Restriktionsenzym 1 µg Template DNA in etwa 3 bis 5 Stunden (abhängig vom

Restriktionsenzym) verdaut. Im Anschluss an den Verdau werden die Restriktionsenzyme bei 80 °C für 20 min inaktiviert.

Tabelle 8 Ansatz für den Restriktionsverdau mit *NdeI* und *BamHI*

Templat DNA	5-30 µl (500-3000 ng)
Tango Puffer 10X	6-10 µl
<i>NdeI</i>	2 µl
<i>BamHI</i>	2 µl
ddH ₂ O	total 30-50 µl

Aufgrund der Star-Aktivität von *BamHI* wurde der Verdau mit *NdeI* und *BamHI* nacheinander durchgeführt. Da beide Enzyme den gleichen Puffer verwenden, musste hier nach Abbruch durch Inaktivierung und Abkühlen des Ansatzes auf 0 °C im Eisbad nur das zweite Restriktionsenzym hinzugegeben werden und erneut 3-5 Stunden bei 37 °C inkubiert werden.

2.5.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente in den gewünschten Vektor zu klonieren, wird die T4-DNA-Ligase verwendet. Diese ist in der Lage sowohl überhängende (sticky) als auch glatte (blunt) Enden, welche durch den Restriktionsverdau entstanden sind, zu verknüpfen. Als Kofaktor für die Verknüpfung des 3'-Hydroxylendes des Akzeptors und des 5'-Phosphatendes des Donors wird ATP benötigt. Im ersten Schritt wird im aktiven Zentrum des Enzyms ein Lysinrest adenyliert, das heißt, ein Adenosinmonophosphat (AMP) wird unter Verbrauch eines Moleküls ATP an das Lysin-NH₂ gebunden. Im nächsten Schritt wird das AMP auf das 5'-Phosphatende des „Donors“ übertragen. Die hierbei entstehende Pyrophosphatbindung wird im letzten Schritt von der Hydroxylgruppe des 3'-Akzeptors gespalten, was zu einem Phosphodiester führt [113].

Für den Ligationsansatz müssen die Konzentrationen der Vektoren und der Geninserte bekannt sein. Diese werden durch Absorptionsmessungen bei 260 nm mit Hilfe eines NanoDrop2000 Spektrometers (PiqLab) bestimmt. Anhand dieser Werte wurde die benötigte Menge an Vektor beziehungsweise Insert berechnet. Für die Ligation wurde ein Insert:Vektor Verhältnis von 3-5:1 verwendet.

Formel zur Berechnung der Menge an Insert für den Ligationsansatz:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Masse Vektor}}{\text{bp Vektor}} \times \text{bp Insert} \times F$$

Hierbei ist F das Verhältnis von Insert zu Vektor und die Masse Vektor entspricht dem was für die Ligation verwendet wird (für gewöhnlich 100-200 ng).

Die Ligationsansätze wurden bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden 5 µl des Ligationsansatzes für die Transformation in 50 µl kompetente *E. coli* Dh5α Zellen (Kapitel 2.5.3) verwendet und im Anschluss auf den entsprechenden Agaroseplatten ausgestrichen. Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (Kapitel 2.5.5) überprüft und im Anschluss durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 9. Ligationsansatz mittels T4 DNA Ligase

Vektor DANN	x µl (100-200 ng)
Insert DANN	y µl
T4 DNA Ligase	1 µl
T4 DNA Ligase Puffer 10X	2 µl
ddH ₂ O	total 20 µl

Um eine große Zahl negativer Klone (Leervektor) zu vermeiden, kann die Vektor DNA direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau mit Hilfe der thermosensitiven Alkaline Phosphatase dephosphoryliert werden. Dies führt dazu, dass eine Selbstligierung des Vektors nicht mehr möglich ist. Da die Phosphatase mit den meisten Fermentas Puffern kompatibel ist, sollte dieser Schritt direkt im Anschluss an den Verdau erfolgen, da eine zusätzliche Aufreinigung nach der Dephosphorylierung nur zu DNA Verlusten führt.

Tabelle 10. Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung

Restriktionsverdau Ansatz	20 µl
Alkaline Phosphatase	1,2 µl
Der verwendete Tango Restriktionspuffer ist kompatibel mit der Phosphatase	

Die Dephosphorylierung mit Hilfe der Alkaline Phosphatase wird bei 37 °C für 20 min durchgeführt. Die Phosphatase im Anschluss bei 80 °C für 15 min inaktiviert. Nach der Dephosphorylierung wird das Gen-Fragment mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit dem Gel Extraction Kit aufgereinigt und hiernach für die Ligation verwendet.

2.5.9. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde durch die Firma GATC Biotech (Köln) durchgeführt. Die Standardprimer für die Vektoren pQE31 und pET-28a(+) wurden von GATC für die Sequenzierung bereitgestellt. Die Sequenzierung wurde nach der Sanger Didesoxy-Methode [114] an einem Sanger ABI 3730xl System durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des Programmes SeqMan 5.0 von DNASTAR ausgewertet.

2.6. Analytische und Biochemische Methoden

2.6.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht wurde mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [115] durchgeführt. Hierbei wird das Proteingemisch anfangs mit Hilfe eines SDS Puffers bei 95 °C für 15 min denaturiert. Das in dem Puffer enthaltene anionische Detergenz SDS bricht nichtkovalente Bindungen der Proteine auf und bindet an diese. Durch die unterschiedliche Länge der Proteine werden diese ihrer Größe nach mit einer entsprechenden Ladung versehen. Als weiteres Agens beinhaltet der SDS Puffer auch DTT, welches als starkes Reduktionsmittel dazu dient alle Disulfidbrückenbindungen zu spalten und somit die Linearisierung der Proteine zu unterstützen. Die denaturierten Proben werden im Anschluss auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und durch Anlegen eines konstanten Stroms der Ladung und Größe der Proteine nach entsprechend aufgetrennt.

Für das diskontinuierliche Polyacrylamidgel wurden 10 bzw. 12,5 %-ige Trenngel und jeweils ein 4 %-iges Sammelgel verwendet. Das Sammelgel dient dazu, die Proteinproben an der Grenze zum Trenngel aufzukonzentrieren, um eine möglichst hohe Bandenschärfe während der Auftrennung im Trenngel zu erreichen. Als Marker wurden etwa 3-5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Je nach Anzahl der Taschen wurden zwischen 7-15 µl Probenmenge in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte für etwa 15 min bei 12 mA und anschließend bei 25 mA für weitere 50 min. Im Anschluss wurde das Gel über Nacht mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und mit einer entsprechenden Entfärbelösung der nicht gebundene Farbstoff wieder entfärbt.

2.6.2. Western Blot

Der Western Blot dient zum spezifischen Färben von Proteinen, welche bereits durch Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind. Hierbei werden die Proteinbanden nach der SDS

Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion beruht auf Antikörpern, welche an ein bestimmtes Motiv binden (z.B. His₆-Tag). Durch einen spezifischen Nachweis können die Antikörper im Anschluss mittels Farbreaktion nachgewiesen werden.

Die Whatman-Filterpapiere und die Nitrocellulose wurden entsprechend der Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Die Nitrocellulose und das SDS-Gel wurden für 10 min in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau zwischen Anode und Kathode beim Blotten ist wie folgt; drei Whatmanpapiere unterhalb der Nitrocellulosemembran, auf welcher das noch ungefärbte SDS-Gel liegt. Weitere drei Whatman-Filterpapiere schließen den Aufbau ab. Zu beachten ist, dass keine Luftblasen zwischen dem SDS-Gel und der Nitrocellulose vorliegen, da sonst Störungen beim Blotten auftreten können. Das Blotten erfolgte bei einer Spannung von 15 V über 45 min. Da die Proteine im SDS-Gel negativ geladen sind, wandern sie aus dem Gel in Richtung der positiv geladenen Anode zur Nitrocellulosemembran.

Im Anschluss an den Transfer kann die Nitrocellulose mit Ponceau-Lösung angefärbt werden, um das erfolgreiche Übertragen der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Zur Visualisierung der His-getaggten Proteine kann die Ponceau-S-Färbung (0,1%, Ponceau-S, 5% Essigsäure) durch waschen mit TBS-Puffer wieder entfernt werden.

Zum spezifischen Nachweis mittels Antikörper wird zu Beginn die Nitrocellulose in 40 ml Blockierungslösung (4 % Magermilchpulver in TBS-Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C getränkt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Membran wurde dreimal für je 10 min in TBS-Tween Puffer gewaschen und bei Raumtemperatur für etwa 2 h mit dem Anti-His Erstantikörper inkubiert (Monoklonaler Maus-Anti-Polyhistidin Antikörper aus der, Anti-His, 1:10000 in 20 ml 4 % Magermilchpulver TBS-Puffer). Überschüssige Antikörper werden durch dreimaliges Waschen für je 10 min in TBS-Puffer entfernt. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Maus-Antikörper (IgG) Meerrettichperoxidase-verlinkt aus Hase, 1:10000 in 20 ml 4 % Magermilchpulver TBS-Puffer) bei Raumtemperatur über 1 h. Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern kann auch Übernacht bei 4 °C durchgeführt werden.

Der spezifische Nachweis für die antikörperbindenden Proteine erfolgte mit Hilfe des ECL-Kits (Enhanced Chemolumineszenz) von AmershamTM. Die Peroxidase des Antikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol, wonach überschüssige Energie in Form von sichtbarem Licht abgegeben wird (Chemolumineszenz). Die emittierten Lichtquanten können nun an den entsprechenden Stellen durch eine entsprechend empfindliche Kamera detektiert werden.

Neben dem Luminol ist auch *p*-Iodophenol Teil des ECL-Kits, welches eine signalverstärkende Funktion ausübt, um selbst kleinste Proteinmengen sichtbar zu machen.

Vor der spezifischen Anfärbung mit Luminol wird die Membran nochmals wiederholt mit TBS-Puffer gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran etwa eine Minute in einer 1:1 Lösung aus den Reagenzien A und B des ECL Western Blotting Analysis System Kits von Amersham™ inkubiert. Die von der Membran emittierende Chemolumineszenz wurde im Anschluss mit Hilfe einer Kamera aufgenommen und in ein entsprechendes Signal umgewandelt. Die Expositionszeit wurde vom Gerät automatisch gewählt (etwa 3 min).

2.6.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA Assay von Smith [116] verwendet. Das hierfür verwendete BCA Assay Kit von Pierce basiert zum einen auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Peptidbindungen der Proteine im alkalischen Milieu und zum anderen auf der Chelatisierung von Cu^{1+} durch Bicinchoninsäure (BCA). Der violette Komplex, der sich hierbei bildet, kann bei 562 nm kolorimetrisch detektiert werden. Da der BCA Assay gegenüber dem Bradford Assay schneller durchzuführen ist, eine höhere Sensitivität sowie eine größere Fehlertoleranz aufweist, wurde dieser dem Bradford Assay vorgezogen.

Um die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen, wurde vorher eine Kalibriergerade erstellt. Hierbei wurden BSA-Standards unterschiedlicher Konzentrationen (25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$) erstellt. Die Proben wurden anschließend, wie im Protokoll beschrieben, mit dem entsprechenden Arbeitsreagenz versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben im Spektrometer photometrisch bei 562 nm vermessen und die Absorptionswerte gegen die Konzentration grafisch aufgetragen. Die Proteinkonzentrationen der unbekanntenen Proben lassen sich hiernach einfach aus der Geradensteigung und den gemessenen Absorptionswerten bestimmen. Befinden sich die Absorptionswerte der Proben außerhalb des linearen Bereichs der Kalibriergerade, so werden die Proben entsprechend mit dH_2O oder Puffer verdünnt.

2.6.4. Proteinaufreinigung

Nickel Affinitätschromatographie an der Aktä

Die Aufreinigung des Proteins sollte aufgrund des angegliederten His₆-Tags mit Hilfe der Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Säulen erfolgen. Die stationäre Phase dieser Säulen besteht aus quervernetzter Agarose (Sephacrose) die mit einem Liganden gekoppelt ist. Bei den

Ni²⁺-NTA-Säulen ist dies Nitrioloessigsäure, welche stabile Chelatkomplexe mit dem Nickel-Kation eingeht. Aufgrund der großen Affinität des Histidins gegenüber Ni²⁺ werden Proteine mit einem His₆-Tag so beim Durchfluss an das Säulenmaterial gebunden, während der Großteil der restlichen Proteine ungebunden durch die Säule fließt. Um das gebundene Protein wieder aus dem Komplex zu lösen bedarf es nun Liganden, welche das gebundene Protein verdrängen. Hierfür dienen in der Regel hohe Konzentrationen an Imidazol. Dies führt dazu, dass das Zielprotein von der Säule eluiert wird. Nach dem System Wash und dem Pump Wash an der Äkta wurde die Säule bei einem Fluss von 1 ml pro min mit dem Equilibrierungspuffer (50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, pH 8) equilibriert und im Anschluss mit 30-50 ml Lysat (50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, pH 8) beladen. Die Eluierung erfolgte mit Hilfe eines Gradienten (über 15 Säulenvolumen) mit dem Elutionspuffer (50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol).

Kobalt Affinitätschromatographie mittels Gravitation

Eine Alternative zur HisTag Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Säulen an der Äkta ist die Aufreinigung mittels Talonsäulen (GE Healthcare) nach dem Gravitationsprinzip. Wie die HisTrap Säulen bestehen die Talonsäulen aus einem Sepharosenetzwerk in dem hier anstatt Ni²⁺, Kobalt Kationen (Co²⁺) eingelagert sind. Diese besitzen gegenüber Ni²⁺ eine erhöhte Affinität für die Polyhistidinsequenz des aufzureinigenden Proteins. Die Aufreinigung erfolgte gemäß dem Handbuch nach dem Gravitationsprinzip. Zur Equilibrierung wurden 20 ml TrisHCl Puffer (25 mM, pH 8) verwendet. Im Anschluss wurde die Säule mit dem Zell Lysat (etwa 30 ml, 5-10 mg/ml) beladen. Hiernach wurde die Säule mit 10 ml TrisHCl Puffer (25 mM, 5 mM Imidazol, pH 8) gewaschen. Die Eluierung erfolgte im Anschluss mit 3 ml TrisHCl Puffer (25 mM, 400 mM Imidazol, pH 8).

Größenausschlusschromatographie an der Äkta

Zur finalen Aufreinigung der LDI sollte die Größenausschlusschromatographie der Aufreinigung mittels Metallaffinitätschromatographie folgen. Als Säulenmaterial wurde Sephacryl S-200 HR verwendet, da dieses Material für Proteine im Bereich von 5 – 250 kDa geeignet ist. Aufgrund der vielen kleinen Kammern und Höhlen gelangen kleine Moleküle und Proteine langsamer durch die Matrix als größere Proteine. Das Säulenvolumen (l: 80 cm; d: 2,5 cm) betrug etwa 630 ml. Die vorgepackte Säule wurde an der Äkta vor Verwendung über Nacht bei einem Fluss von 0,5 ml/min mit entgastem 20%-igen Ethanol und ebenfalls über Nacht mit entgastem ddH₂O gespült und im Anschluss mit dem Laufpuffer (80 mM TrisHCl pH 8, 2 mM

DTT) bei einem Fluss von 0,5 ml/min equilibriert. 5 ml des nach der Metallaffinitätschromatographie erhaltenen Lysats (Konzentration 1 mg/ml) wurden auf die Säule geladen und bei einem Fluss von 0,5 ml/min über der Säule aufgetrennt. Die erhaltenen 1,5 ml Fraktionen wurden im Anschluss mit dem natürlichen Substrat Linalool auf Aktivität überprüft und vereinigt.

2.6.5. Pufferaustausch

Das Überführen des beim Aufschluss oder nach der Aufreinigung gewonnenen Lysats in einen gewünschten Puffer wurde mit PD-10 Säulen von GE Healthcare bewerkstelligt. Die gelartige stationäre Phase besteht aus verzweigten, neutralen Polysacchariden (Dextrane), welche es ermöglicht Substanzen mit sehr niedrigem Molekulargewicht von denen mit sehr großem Molekulargewicht zu trennen. Das Prinzip beruht darauf, dass kleine Moleküle, wie Salze oder das bei der HisTag-Aufreinigung verwendete Imidazol, in die Zwischenräume des Dextrans gelangen, während große Moleküle wie Enzyme ungebremst durchfließen. Die größere Verweildauer der kleinen Moleküle wird dazu genutzt, Enzymlösungen bestimmter Puffer- und Salzkonzentrationen durch diejenigen auszutauschen, mit denen die Säule vorher equilibriert wurde. Der Pufferaustausch erfolgte gemäß dem Handbuch. Die Säule wurde vor Beginn mit 15 ml dH₂O gespült und im Anschluss mit dem gewünschten Puffer mit ebenfalls 15 ml equilibriert. Hiernach folgte die Beladung der Säule mit 2,5 ml Probe, welche im Anschluss mit 3,5 ml des gewünschten Puffers eluiert wurde.

2.6.6. Biotransformationen

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen (Eppis) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Biotransformationen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, gemäß folgender Tabelle.

Tabelle 11 Zusammensetzung der Biotransformationen

Zellysat	100 µl
Substratlösung (20 mM in 10 % DMSO)	500 µl
80 mM TrisHCl Puffer pH 8 oder 80 mM Citratpuffer pH 6	300 µl
DTT-Lösung (20 mM in dem entsprechenden Puffer)	100 µl

Die Reaktionen wurden bei 35 °C im Thermocycler mit 850 U/min oder im Inkubator bei 180 U/min durchgeführt. Im Inkubator wurden die Eppis jedoch auf der Seite gelagert, um eine

bessere Durchmischung zu gewährleisten. Für gewöhnlich wurden nur Reaktionen über Nacht in dem Inkubator durchgeführt. Nach dem Abschluss der Reaktion wurde die Reaktionsmischung mit 1000 µl Cyclohexan eine Minute lang mittels Vortexer extrahiert. Cyclohexan erwies sich in Studien zur Extraktionseffizienz gegenüber MTBE und Ethylacetat als deutlich geeigneter. Zudem stellte sich heraus das einmaliges Extrahieren über 60 s mit 1000 µl gegenüber dem mehrmaligen Extrahieren mit dementsprechend weniger Lösungsmittel zu vernachlässigbaren Unterschieden führte. Der organische Überstand wurde in GC-Glasvials überführt und im Anschluss mittels Gaschromatographen analysiert.

2.7. Analytik

Die Analytik der organischen Phasen der Biotransformationen wurde ausschließlich mittels Gaschromatograph durchgeführt. Hierbei wurde allerdings zwischen GC-MS, GC-FID und GC-MS-Headspace unterschieden. Das GC-MS wurde ausschließlich zur genauen Analyse der Biotransformation, also zur qualitativen Bestimmung verwendet. Für die quantitative Analyse der Biotransformation ist das Massenspektrometer mittels Elektronenstoßionisierung nicht geeignet, da nicht garantiert werden kann, dass zu jedem Zeitpunkt gleichviele Moleküle der Probe ionisiert und somit detektiert werden können. Einzige Ausnahme sind die Proben, die mittels GC-MS-Headspace gemessen worden sind. Da dieses System nur für das Massenspektrometer vorhanden ist, konnte hier leider keine alternative Bestimmung mit Hilfe des GC-FIDs durchgeführt werden. Das Headspace System eignet sich für Substanzen mit relativ hoher Flüchtigkeit bzw. Substanzen deren Siedepunkte sehr niedrig sind. Hierbei wird die Probe nicht extrahiert sondern die wässrige Phase auf eine definierte Temperatur in einem dem GC angeschlossenen Ofen erhitzt. Im Anschluss wird mit Hilfe der Injektionsspritze die Probe aus der Gasphase entnommen und direkt in das GC eingespritzt. Zur quantitativen Analyse wurde das GC-FID verwendet. Ebenso wurde zur Bestimmung der Enantioselektivitäten mit Hilfe chiraler Säulen das GC-FID verwendet. Bei dem FID-Detektor handelt es sich um einen Flammenionisationsdetektor, bei dem die Probe am Ende der Säule durch eine Flamme thermisch ionisiert wird. Die hierbei freiwerdenden Elektronen werden detektiert und als Signal weitergegeben.

Die für die Biotransformationen verwendeten Methoden des GC-FIDs und des GC-MS sind im Anhang in Kapitel 6.1 zu finden.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung

Das codonoptimierte Gen der LDI, welches von GeneART synthetisiert wurde, lag als Plasmid in dem *E. coli* Stamm K12 vor und wurde zur Vervielfältigung über Nacht bei 37 °C in einer Übernachtskultur angezüchtet. Nach Isolierung des Plasmids durch Minipräp (Kap. 2.5.1) wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III geschnitten, um das Gen mit den erforderlichen Schnittstellen zu isolieren. Als geeignetes Empfängerplasmid wurde pET28a(+) mit einer Kanamycinresistenz gewählt. Dieses wurde ebenfalls mit den korrespondierenden Restriktionsenzymen wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben verdaut und mit dem Gen der LDI entsprechend ligiert (Kap. 2.5.8). Im Anschluss wurde eine Expressionsstudie in BL21(*DE3*), und den Walker-Stämmen C41(*DE3*) und C43(*DE3*) bei 30 und 37 °C, sowie unterschiedlichen IPTG Konzentrationen (0,1, 0,25 und 0,5 mM) durchgeführt um die möglichst besten Expressionsbedingungen zu ermitteln.

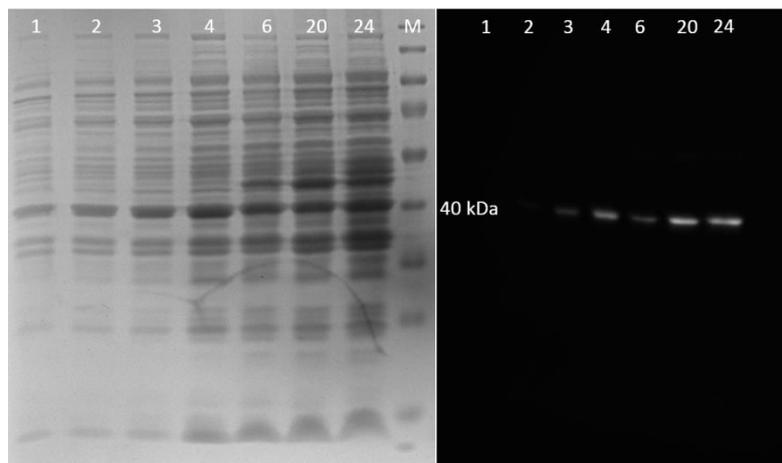


Abbildung 29 SDS-Gel und Western Blot der Expression (Lysat, 1,5 mg/mL) mit 0,5 mM IPTG bei 37 °C in BL21 (*DE3*) (*Nco*I, *Hind*III Variante). Die Reihen 1-24 entsprechen der Expression nach den entsprechenden Stunden. Die Bande auf Höhe von etwa 40 kDa entspricht der Bande der LDI.

Abbildung 29 zeigt das SDS-Gel und den Western Blot der Expression der LDI mit den Schnittstellen *Nco*I und *Hind*III bei 0,5 mM IPTG und 37 °C. Deutlich zu sehen ist auf Höhe von 40 kDa eine Doppelbande zu sehen von denen die untere die der LDI zugehörige Bande ist. Ab 4 Stunden Expressionszeit scheint die Proteinbande im Verhältnis zur restlichen Proteinmenge nicht weiter zuzunehmen.

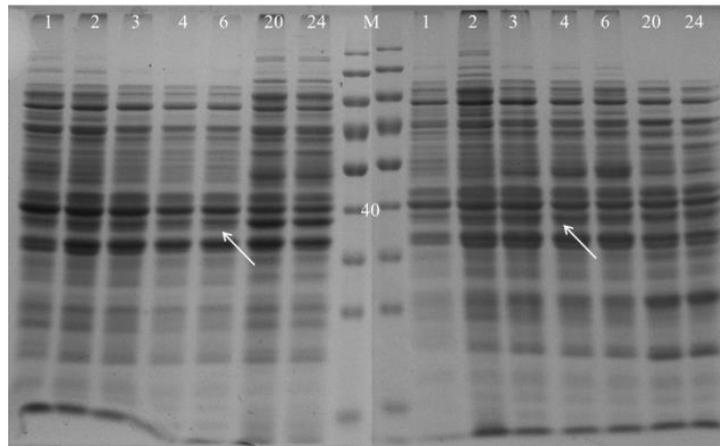


Abbildung 30 Expression in C43 (*DE3*)(links) und C41 (*DE3*)(rechts). Beide Expressionen wurden bei 0,5 mM IPTG und 37 °C durchgeführt. Die Zahlen über den Banden entsprechen der Expressionsdauer. Die weißen Pfeile deuten auf die Proteinbande der LDI. Zwar ist eine entsprechende Bande für die LDI zu sehen doch ist die Expression verglichen mit der in BL21(*DE3*) nicht vergleichbar. Das SDS-Gel steht stellvertretend für die anderen Expressionsbedingungen.

Abbildung 30 steht stellvertretend für alle SDS-Gele, die bei dieser Expressionsstudie mit C41(*DE3*) und C43(*DE3*) gemacht wurden (30 °C, 37 °C sowie 0,1, 0,25 und 0,5 mM IPTG). Mittels Aktivitätstest aus Kapitel 2.6.6, also der Umsetzung von Linalool mit Zelllysate und anschließender Detektion mit Hilfe des Gaschromatographen konnte bei jeder relevanten Fraktion (nach >2 h) Aktivität nachgewiesen werden. In Abbildung 30 ist deutlich zu sehen, dass die Expression der LDI nicht vergleichbar mit der in Abbildung 29 ist. Die dicker werdende Bande auf Seiten der C43(*DE3*) Expression knapp unter der 40 kDa Bande bei 20 und 24 Stunden ist nicht die LDI, da hier nahezu keine Aktivität mehr vorhanden war. Vermutlich überlagert diese Bande die der eigentlichen LDI.

Aufgrund dieser SDS-Gele wurde die Expression der LDI in BL21(*DE3*) bei 37 °C mit 0,5 mM IPTG über 4 Stunden durchgeführt.

Trotz der moderaten Expression sollte anfangs versucht werden, die LDI mit Hilfe der Metallaffinitätschromatographie an der Äkta aufzureinigen. Ein Problem der Äkta-aufreinigung ist, dass bei Verwendung der Ni-NTA-HisTrap Säulen DTT-haltige Puffer aufgrund der reduzierenden Wirkung nicht verwendet werden können. Zudem mussten die Fraktionen der Äkta-Aufreinigung mittels Amicon Concentrators aufkonzentriert werden, was wiederholt zum Aggregieren des Proteins führte. Auch die Verwendung von DTT-haltigem Puffer führte nicht zum gewünschten Erfolg.

Aus diesem Grund wurde anstatt der Aufreinigung an der Äkta mittels Ni-NTA-HisTrap Säulen die Aufreinigung mit Hilfe der Talon Säulen (GE Healthcare) durchgeführt. Der große Vorteil dieser Säulen besteht darin, dass neben der besseren Affinität des His₆-Tags an Cobalt, die aufgereinigte Fraktion mit einem relativ geringen Volumen an Puffer von der Säule eluiert wird und somit eine Aufkonzentrierung nicht erforderlich ist.

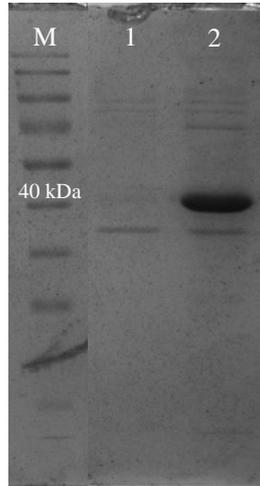


Abbildung 31 Aufreinigung mit Hilfe der Talon Säulen. M ist der Marker, 1 entspricht dem Waschlauf mit 10 mM Imidazol und 2 der Elution mit 250 mM Imidazol. Der Reinheitsgrad beträgt etwa 90 %. Das hierbei gewonnene aufgereinigte Protein wurde für die Aktivitätsstudien verwendet.

Um die Reinheit des Proteins weiter zu vergrößern, wurde die Aufreinigung mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie angeschlossen. Verwendet wurden hierfür 5 ml (1/100 des Säulenvolumens) des vorgereinigten Lysats (~1 mg/ml). Nach dem Durchlauf durch die Säule über Nacht bei einem Fluss von 0,5 ml/min wurden die unterschiedlichen Fraktionen auf Aktivität mittels GC-FID überprüft. Die aktive Fraktion (sehr geringe Aktivität) wurde im Anschluss aufgrund der sehr geringen Konzentration soweit es ging mittels Amicon Concentrators aufkonzentriert und mittels SDS-Gel visualisiert (Abbildung 32).

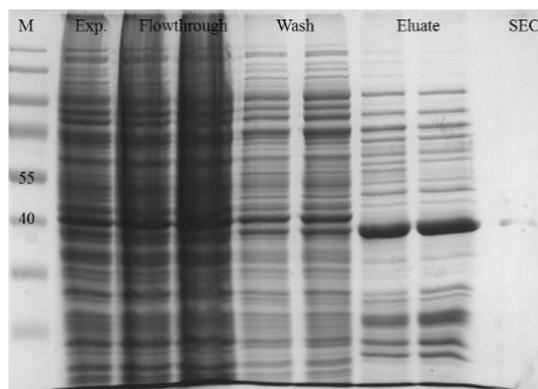


Abbildung 32. Aufreinigung der LDI mittels Talon Affinitätschromatographie und anschließender SEC-Aufreinigung. Aufgrund der geringen Konzentration ist die SEC-Bande nur schwach erkennbar.

Abbildung 32 zeigt die durchgehende Aufreinigung des Lysat einer schwachen Expression mit Hilfe der Talon Säulen und der Größenausschlusschromatographie (SEC). Ist die Bande der LDI im Lysat nur sehr schwer erkennbar, so ist die entsprechende Bande im Waschlauf und im finalen Eluat nach der Metallaffinitätschromatographie schon deutlich erkennbar. Doch auch nach der Metallaffinitätschromatographie beträgt die Reinheit aufgrund der schwachen Expression nur etwa 40-50 %. Nach der Größenausschlusschromatographie ist die Reinheit bezüglich des verbleibenden Proteins offensichtlich sehr groß. Allerdings war hier die erhaltene Fraktion an aufgereinigtem Protein nach dem Aufkonzentrieren sehr klein (1 ml, <0,05 mg/ml), und nur sehr schwach aktiv.

Das Lysat sowie die semiaufgereinigten Fraktionen konnten ohne nennenswerten Aktivitätsverlust (< 10 %) über mehr als 2 Wochen bei – 20 °C gelagert werden. Beide Fraktionen wurden ohne Zugabe von DTT gelagert.

3.2. Biotransformationen

Zu Beginn der Studie zur Substratspezifität wurde ein pH-Profil erstellt, um den Puffer und pH-Wert zu ermitteln, bei dem die Aktivität der LDI bezüglich der Dehydratisierung von Linalool am höchsten ist. In dem von Brodkorb *et al.* erstellten pH Profil handelt es sich um die Hydratisierung von Myrcen. Der hier ermittelte Puffer TrisHCl 80 mM mit einem pH-Wert von 8-9 macht auch aus chemischer Sicht Sinn, da sich im Alkalischen eine Hydratisierung aufgrund der größeren Nucleophilie des Wassers leichter durchführen lässt. Da aber die Dehydratisierung grundsätzlich unter sauren Bedingungen durchgeführt wird, wurde ein neues pH-Profil für die LDI mit Hinsicht auf die Dehydratisierung von Linalool erstellt. Als Puffersysteme dienten Citrat (pH 5-6), Kaliumphosphat (pH 6-8), TrisHCl (pH 7-9) und Glycin-NaOH (pH 9-10) jeweils in 80 mM Konzentration.

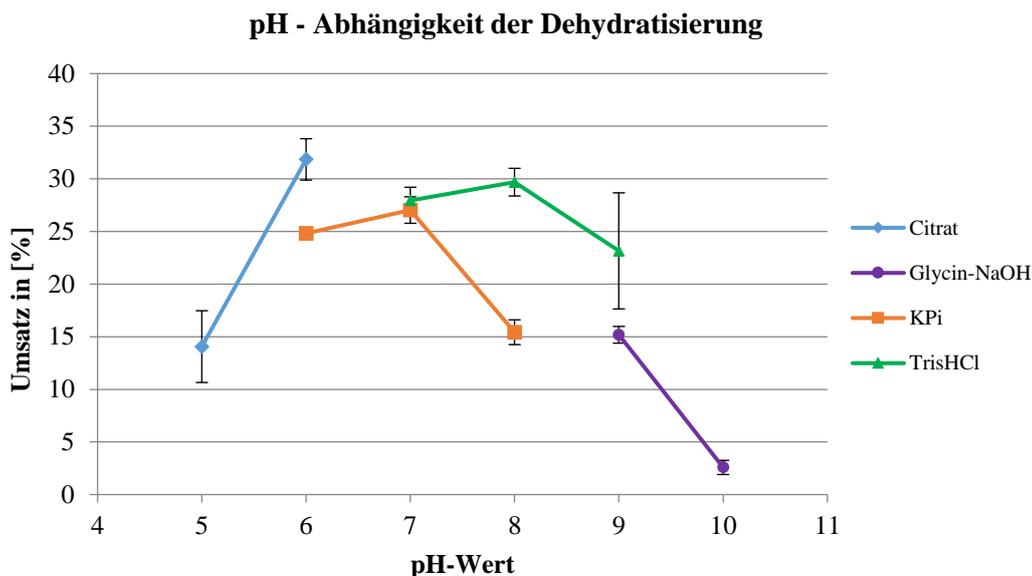


Abbildung 33 pH-Profil der Dehydratisierung von Linalool. Deutlich zu sehen ist, dass die höchste Aktivität im Bereich der pH-Werte 6 bis 8 liegt.

Um bei dem natürlichen Substrat Linalool für das pH-Profil vollständigen Umsatz zu vermeiden, wurde die Reaktion mit 100 µl Zelllysate (Konzentration 4 mg/ml) über 15 min in den unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Interessant ist hierbei, dass die LDI über einen sehr großen pH-Bereich (5 - 9,5) eine recht hohe Aktivität besitzt. Deutlich zu sehen ist, dass sich das pH-Optimum bei etwa 6 bis 8 befindet, während die Aktivität bei pH <6 bzw. >9 deutlich abnimmt. Zudem ist der Kaliumphosphatpuffer bei vergleichbaren pH-Werten gegenüber dem TrisHCl-Puffer aufgrund der geringeren Aktivität weniger gut geeignet. Scheinbar wirkt sich das Kaliumphosphat leicht negativ auf die LDI aus. Demgegenüber ist die Aktivität mit dem Citratpuffer bei pH 6 etwas größer als bei dem TrisHCl Puffer mit pH 8, was bei den folgenden Experimenten bestätigt werden konnte. Aufgrund der relativ geringen Aktivitätsunterschiede zwischen pH 6 und pH 8 wurden die Biotransformationen zur Substratspezifität in beiden Puffern durchgeführt.

3.2.1. Substratscreening

Da nichts über den Mechanismus oder das aktive Zentrum bekannt ist und die bisher verwendeten Substrate von Brodkorb *et al.* leider auch nicht genügend Hinweise hinsichtlich eines Mechanismus oder des aktiven Zentrums lieferten, sollte zu Beginn durch die Synthese diverser Linaloolderivate ein Überblick über die Spezifität des vermuteten Motifs der Dehydratisierung geschaffen werden. Von daher wurden die im Folgenden dargestellten Substrate (3-15) synthetisiert und auf Aktivität getestet. Hierbei wurde das natürliche Substrat

Linalool umfangreich variiert. Unter anderem wurde das vermutete spezifische Motiv des tertiären α -Methylallylalkohols durch Entfernen der Vinylgruppe und Methylgruppe, aber auch der Rest durch Einführung einer neuen C-C Doppelbindung, was zu einer deutlich größeren Rigidität des Derivates führt, verändert. Zudem wurden neue funktionelle Gruppen wie NH_2 - oder die CH_3O - eingebaut, um mehr über den Mechanismus in Erfahrung zu bringen. Eine Auflistung dieser Linaloolderivate befindet sich in Abbildung 34.

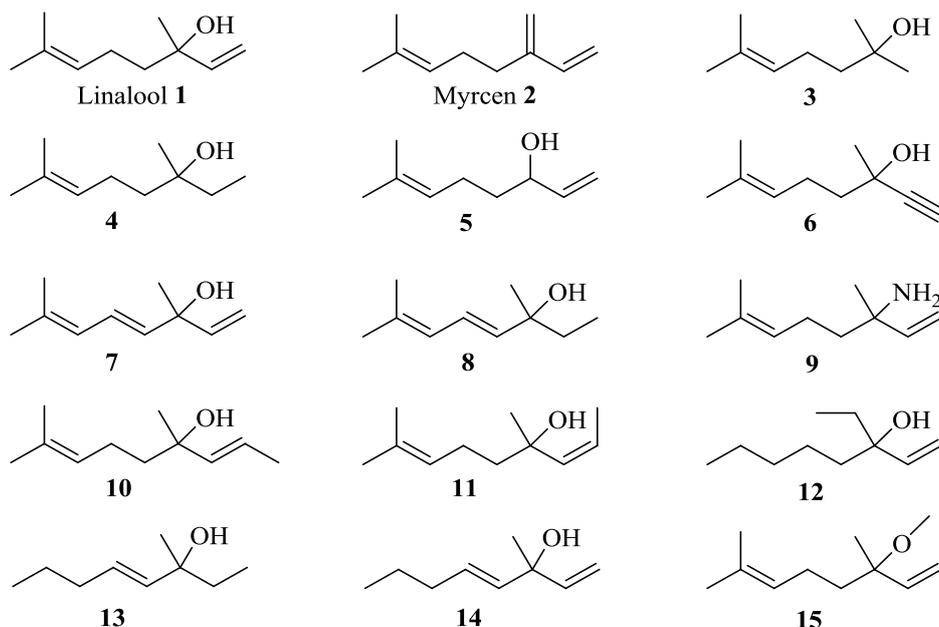
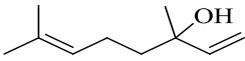
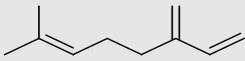
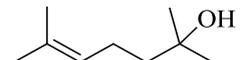
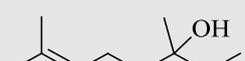
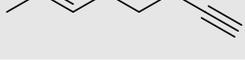
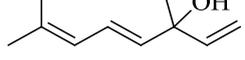
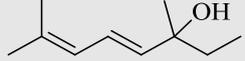
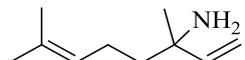


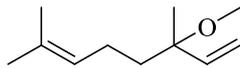
Abbildung 34 Synthetisierte und getestete Linaloolderivate

Für das Substratscreening wurde das nach dem Zellaufschluss erhaltene Lysat aus *E. coli* BL21(*DE3*) auf Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat Linalool getestet. Dies war insofern notwendig, da die erste Reaktionszeit so gewählt wurde, dass mit Linalool bei definierter Zeit kein vollständiger Umsatz erreicht wurde. Die so ermittelten 15 min führten zu etwa 35% Umsatz was einen Vergleich bezüglich anderer Substrate zugelassen hat. Als zweite Reaktionszeit wurde 20 h gewählt um auch bei sehr geringer Aktivität den Umsatz ermitteln zu können. Die Biotransformationen wurden exakt wie im Kapitel 2.6.6 beschrieben durchgeführt. Es wurden nach jeweils 15 min und 20 h die Reaktionen durch Extraktion mit Cyclohexan abgebrochen, die Proben am GC gemessen und der Umsatz bestimmt. Der Enantiomerenüberschuss ee wurde hingegen nur nach 20 h ermittelt. Alle Reaktionen wurden möglichst zeitnah mit dem gleichen Lysat durchgeführt, welches währenddessen auf Eis lagerte um möglichst vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten. Als Negativkontrolle für die jeweiligen Biotransformationen diente grundsätzlich Lysat aus einer Expression von *E. coli* BL21(*DE3*) mit pET-28a(+) ohne Geninsert. Somit konnte verglichen werden, ob eventuelle

Aktivität nicht auf in *E. coli* enthaltene Proteine zurückzuführen sei. Die Ergebnisse der Umsetzungen in den folgenden Tabellen sind abzüglich der verwendeten Negativkontrolle mit leerem pET28a-(+) Vektor. Allerdings war bei keiner der Dehydratisierungsreaktionen ein nennenswerter Produktpeak, verglichen mit den Umsetzungen mit der LDI zu erkennen.

Tabelle 12 Linalool und dessen Analoga, welche mit der LDI getestet wurden.

#	Substrat	pH 6	pH 8	pH 6	pH 8	ee[%]
		Umsatz nach 15 min in [%]		Umsatz nach 20 h in [%]		
1		35,1±1,6	16,6±6,5	47,6±2,8	31,7±0,2	98
2		3,4±1,1	3,6±0,3	4,1±0,8	4,7±0,5	99*
3		<1	<1	<1	<1	-
4		<1	<1	<1	<1	-
5		<1	<1	<1	<1	-
6		<1	<1	<1	<1	-
7		<1	<1	<1	<1	-
8		<1	<1	<1	<1	-
9		<1	<1	<1	<1	-
10		<1	<1	21,8±3,0	4,1±3,2	-**
11		<1	<1	<1	<1	-
12		4,0±0,5	<1	13,4±1,5	3,2±2,9	-**
13		<1	<1	<1	<1	-
14		51,3±0,1	35,5±0,3	47,1±0,5	51,7±0,1	99

15		<1	<1	0,3±0,1	0,1±0,01	-
----	---	----	----	---------	----------	---

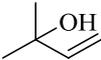
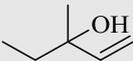
In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Biotransformationen mit den beiden natürlichen Substraten sowie den Linaloolderivaten, welche getestet wurden, dargestellt. *Verglichen mit *rac*-Linalool war hier nur (*S*)-Linalool ersichtlich. **Mit der vorhandenen Säule keine ausreichende Peakauftrennung (Breiter Peak, keine zwei Maxima ersichtlich).

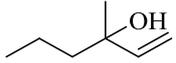
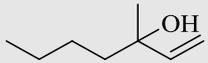
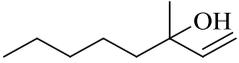
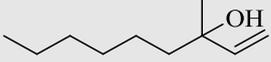
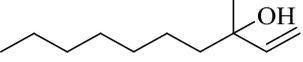
In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Umsetzungen von Linalool **1**, Myrcen **2** und den unterschiedlichen Linaloolderivaten (**3-15**) dargestellt. Das natürliche Substrat der Dehydratisierung Linalool konnte unter den angegebenen Bedingungen bereits nach 15 min zu 35,1% umgesetzt werden. Interessant ist der deutliche Unterschied zwischen pH 6 und pH 8, da hier nur noch etwa 16,6% umgesetzt werden konnten. Nach 20 h fand indes ein nahezu vollständiger Umsatz statt. Doch auch hier gibt es deutliche Unterschiede zu pH 8 (31,7%). Der hohe ee-Wert von 98 konnte zudem durch Verwenden von (*R*)-(-)-Linalool unabhängig von diesem Substratscreen bestätigt werden, da hier kein Produkt ermittelt werden konnte. Myrcen **2** hingegen konnte nur zu einem sehr geringen Teil unter den gegebenen Bedingungen umgesetzt werden. Selbst nach 20 h wurden hier nur etwa 4% umgesetzt. Der sehr hohe ee-Wert von 99 erklärt sich dadurch, dass nur (*S*)-Linalool als Produkt ermittelt werden konnte. Leider konnten nur wenige der Analoga von der LDI akzeptiert werden (Tabelle 12). Interessant ist hierbei, dass gerade das *trans*-Isomer **10** umgesetzt werden konnte, demgegenüber aber das *cis*-Isomer **11** nicht. Dies entspricht der gleichen Erfahrung, die mit den beiden Isomeren Geraniol und Nerol von Brodkorb *et al.* gemacht wurde. Hier wurde von der LDI auch nur Geraniol, die *trans*-Form, akzeptiert, isomerisiert und dehydratisiert, während man bei Nerol kein dehydratisiertes Produkt ausmachen konnte. Offensichtlich werden auch nur Substrate umgesetzt, bei denen das Motiv des tertiären α -Methylallylalkohols vorhanden ist. Zwar kann die „Vinyl“-Gruppe um ein Kohlenstoff in *trans*-Stellung erweitert werden, doch fällt die Doppelbindung weg, wie in **4**, **8** und **13**, so wird das Substrat trotz identischer Größe und Struktur nicht akzeptiert. Auch die interne Doppelbindung scheint die Funktion der Vinylgruppe offensichtlich nicht ausfüllen zu können. Allerdings scheint diese die Aktivität etwas zu beschleunigen wie dies bei Substrat **14** der Fall ist. Dies allerdings auch nur, wenn die endständige Prenyleinheit nicht vorhanden ist, wie bei Substrat **7**. Bei Abwesenheit der Methylgruppe **3** kann die LDI das Substrat genauso wenig umsetzen wie bei der Substitution der Vinylgruppe in eine Ethynylgruppe **6**, allerdings dehydratisiert die LDI das Substrat mit einer Ethyl- statt Methylgruppe **12**. Auch die Substitution der Alkoholfunktion in eine Aminogruppe **9** führt nicht zu einer Deaminierung. Schaut man sich die Umsätze derweil etwas

genauer an, so fällt auf, dass das Substrat **14** verglichen mit allen anderen getesteten Substraten zu den Aktivsten gehört, konnte hier doch schon nach 15 min ein Umsatz von etwa 51 % bei pH 6 und 35 % bei pH 8 erreicht werden. Über Nacht erreichen beide ihr Maximum von etwa 50 % was bei der Annahme der kinetischen Racematspaltung zu erwarten ist. Die beiden anderen Substrate **10** und **12** konnten indes zumindest nach 20 h merklich umgesetzt werden. Auch ist deutlich zu sehen, dass die Dehydratisierung bei allen Substraten bei pH 6 grundsätzlich schneller von statten geht als bei pH 8. Demgegenüber zeigt sich, dass bei Myrcen die Hydratisierung bei pH 8 etwas schneller voranschreitet als bei pH 6, was auch von Brodkorb *et al.* [95] schon beschrieben worden ist. In Biotransformationen mit deutlich mehr Lysat (800 μ l, Konzentration 7 mg/ml, Citrat-Puffer pH 6, 24 h) konnte gezeigt werden, dass der Methylether **15** von der LDI sehr gut akzeptiert worden ist ($44.1 \pm 2.9\%$) (Chromatogramm im Anhang: Abbildung 59). Hierbei bildete sich neben dem dehydratisierten Produkt Myrcen **2** auch etwas Linalool **1**. Unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 2.6.6 konnte allerdings während den 20 h nur ein sehr kleiner Teil umgesetzt werden. Mit Hilfe dieser Reihe von Linaloolanaloga und den daraus resultierenden Ergebnissen ließen sich erste Hinweise auf einen möglichen Mechanismus finden wie zum Beispiel die Notwendigkeit der Vinylgruppe oder die Akzeptanz für Ethergruppen.

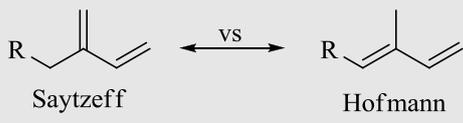
Neben den unterschiedlichen Linaloolderivaten wurden auch Substrate synthetisiert, die sich einfach in der Kettenlänge unterschieden. Hiermit sollte der Einfluss der Größe des Substrats auf den Umsatz bzw. die Aktivität getestet werden. Vor allem das kleinstmögliche Substrat, welches das spezifische Motiv des α -Methylallylalkohols enthält, war hierbei von großem Interesse, da das Produkt der Dehydratisierung, Isopren, schon heute großtechnische Anwendung findet. Insgesamt wurden hier 7 Substrate von einer Kettenlänge C₄ bis hin zu C₁₀ getestet.

Tabelle 13 A: Getestete Substrate unterschiedlicher Kettenlänge sowie **B:** das Produktverhältnis zwischen Saytzeff- und Hofmann-Produkt bei diesen Substraten.

#	Substrat	pH 6	pH 8	pH 6	pH 8	ee[%]
A		Umsatz nach 15 min in [%]		Umsatz nach 20 h in [%]		
16		20,4 \pm 4,1	14,4 \pm 2,9	67,5 \pm 1,2	34,9 \pm 2,5	-
17		<1	<1	<1	<1	n.b.*

18		16,0±2,5	1,8±0,2	46,6±0,7	21,7±0,1	n.b.*
19		31,1±1,1	8,9±2,0	52,5±0,4	48,3±0,1	97
20		48,9±0,4	37,1±0,4	65,7±0,3	51,0±0,1	99
21		48,8±1,2	45,4±1,0	88,7±0,1	57,8±0,1	92
22		26,4±8,7	44,5±3,8	92,4±0,2	81,1±0,1	99

B Anomalie in der Produktbildung: Verhältnis Saytzeff-Produkt vs Hofmann-Produkt

#	Saytzeff-Produkt	Hofmann-Produkt	
18	68	1	
19	39	1	
20	4	1	
21	1,3	1	
22	1,1	1	

*n.b. = nicht bestimmt.

Die in Tabelle 13A gezeigten Substrate sollten zeigen, wie groß das Substratspektrum bezüglich der Kettenlänge der LDI ist. Interessanterweise konnten alle Substrate von einer Kettenlänge von 4 C-Atomen **16** bis hin zu 10 C-Atomen **22** mit einer Ausnahme, Substrat **17**, ohne Probleme umgesetzt werden. Für gewöhnlich ist der Umsatz bei pH 6 auch etwas besser als bei pH 8, mit Ausnahme des C₁₀-Substrats **22**, was aber aufgrund des großen Fehlerwertes vermutlich eher ein Messfehler war. Auch ist deutlich zu sehen, dass der Enantiomerenüberschuss (ee-Wert) bei allen über 90 liegt, was auf eine hohe Selektivität zurückzuführen ist. Auffallend ist der gute Umsatz von mehr als 50 % (67 %) von 2-Methyl-3-Buten-2-ol **16**. Dies ist vermutlich auf die Achiralität des Substrats zurückzuführen. Demgegenüber steht allerdings der nahezu nicht detektierbare Umsatz des nur um einen Kohlenstoff verlängerten Substrates **17**. Interessant ist vor allem, dass es sich in der Reihe bei dem C₅-Substrat **17** um das einzige handelt, das nahezu gar nicht umgesetzt werden konnte. Je

länger die Kettenlänge, desto besser war der Gesamtumsatz nach 20 h mit bis zu 92 % für das C₁₀-Substrat **22**.

Die Besonderheit bei diesen Substraten war, dass im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Substraten bei der Produktbildung eine zusätzliche Anomalie auftrat, die im unteren Teil **B** der Tabelle 13 dargestellt wurde. Bei Verwendung dieser Substrate konnten nach 20 h zwei Produkte detektiert werden, welche sich in der Lage der Doppelbindung nach der Dehydratisierung unterschieden. Zwar ist bei diesen Substraten das Saytzeffprodukt immer das bevorzugte, doch ändert sich das Verhältnis von Substrat **18** bis **22** deutlich von etwa 68:1 auf knapp 1,1:1 in Richtung Hofmannprodukt. Interessanterweise lässt sich hier auch beobachten, dass, je mehr Hofmannprodukt gebildet wird, die Ausbeuten bei diesen Substraten weit über die anfangs erwarteten ~50 % hinausgehen. Am deutlichsten wird dies bei den Substraten **21** und **22**, bei denen nach 20 Stunden mit etwa 90 % nahezu vollständiger Umsatz stattfand und sich hier ein Hofmann-Saytzeff Produktverhältnis von nahezu 1 ausbildete.

Um neben den Linaloolderivaten und den linearen Substraten mehr über die LDI bezüglich dem Einfluss und der Akzeptanz aromatischer und zyklischer Substrate zu erhalten, wurden die in Abbildung 35 dargestellten Substrate getestet. Neben der Variation des spezifischen Motivs in **23** und **27** wurde auch durch der Einfluss von Verzweigungen nahe dem aktiven Motiv wie in Substrat **24** getestet. Zudem wurden auch die Terpene α -Bisabolol **25** und α -Terpineol **26**, sowie das aromatische Substrat **22** getestet. Durch testen dieser Substrate sollte mehr über die nähere Umgebung des aktiven Zentrums herausgefunden werden und inwieweit sich komplexere Substrate umsetzen lassen.

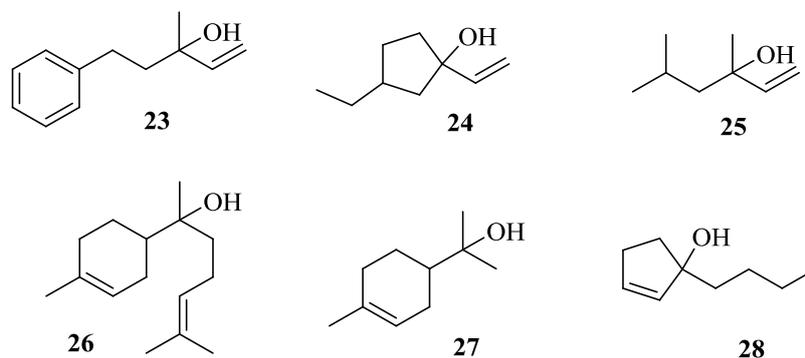
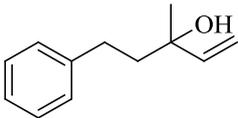
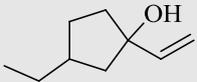
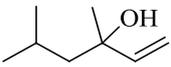
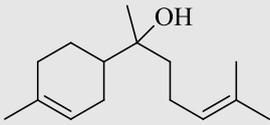
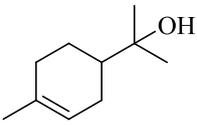
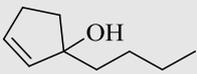


Abbildung 35 Cyclische und verzweigte Substrate die getestet wurden, um mehr über die nähere Umgebung des aktiven Zentrums herauszufinden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Biotransformationen der cyclischen und verzweigten Substrate gezeigt.

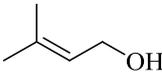
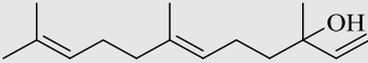
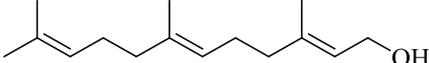
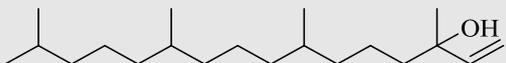
Tabelle 14 Cyclische und verzweigte Substrate welche von der LDI akzeptiert worden sind.

#	Substrat	pH 6		pH 8		ee[%]
		Umsatz nach 15 min in [%]		Umsatz nach 20 h in [%]		
23		27,5±0,5	22,4±0,2	47,6±0,5	48,6±0,1	94
24		19,2±3,6	14,5±0,6	52,5±0,8	41,2±0,3	98
25		<1	<1	<1	<1	-
26		<1	<1	<1	<1	-
27		<1	<1	<1	<1	-
28		<1	<1	<1	<1	-

Leider konnten nur zwei der in Abbildung 35 dargestellten Substrate umgesetzt werden. Diese allerdings recht gut. Nach 20 h konnte hier bei Beiden, **23** und **24**, der vermutlich maximale Umsatz von etwa 50 % erreicht werden. Bei dem aromatischen Substrat **23** ist sogar bei pH 8 nach 20 h der Maximalumsatz erreicht worden. Sehr interessant ist hier, dass das kurzketttige Substrat **25** im Gegensatz zu dem Cyclopentanderivat **24** nicht umgesetzt werden konnte. Im Prinzip unterscheiden sich beide Substrate nur um die Verknüpfung der beiden Methylgruppen durch eine C-C Bindung, abgesehen von der finalen Ethylgruppe in **24**. Umso bemerkenswerter ist hier die Tatsache, dass das nicht-cyclische Substrat nicht umgesetzt wurde. Basierend darauf ist es allerdings ersichtlich, dass die Substrate α -Bisabolol **26** und α -Terpineol **27** ebenfalls nicht akzeptiert worden sind. Zudem konnte das Substrat **28** mit dem in die Vinylgruppe integriertem Cyclopentenring ebenfalls nicht umgesetzt werden.

Da die Substrate Linalool, Myrcen und Geraniol als für die LDI natürlich angesehen werden, sollten entsprechende natürliche Terpenderivate, welche sich in der Anzahl der Terpeneinheiten unterscheiden, getestet werden. Neben den Sesquiterpenen Nerolidol **31** und Farnesol **32** wurden auch das dehydrierte Diterpen Isophytol **33** wie auch das um eine Terpeneinheit verkürzte Geranioläquivalent Prenol **29** verwendet. Das entsprechende Linalooläquivalent **16** wurde schon bei den linearen Substraten (Tabelle 13) getestet.

Tabelle 15 Terpene und terpenartige Substrate für die LDI

#	Substrat	pH 6	pH 8	pH 6	pH 8	ee[%]
		Umsatz nach 15 min		Umsatz nach 20 h		
29		4,6 ±2,9	<1	9,1±1,9	2,7±2,9	-
30		10,5±4,4	3,9±1,4	21,2±0,6	21,3±7,8	n.b.*
31		2,7±0,3	<1	52,2±13,1	37,8±14,1	-
32		<1	<1	18,1±5,4	n.b.*	n.b.*

* n.b. = nicht bestimmt.

Neben den natürlichen Substraten Linalool **1** und Myrcen **2** konnten auch die Analoga Prenol **29**, Nerolidol **30** und Farnesol **31** sowie das dehydrierte Diterpen Isophytol **32** umgesetzt werden. Allerdings sind die Umsätze mit diesen Substraten deutlich geringer als bei Linalool. Bei dem verkürzten Geraniolanaloga Prenol **29** konnte neben Isopren auch eine geringe Menge des Isomerisierungsprodukts, des tertiären Alkohols **16**, beobachtet werden. Die relativ großen Fehler, vor allem bei Nerolidol **30**, Farnesol **31** und Isophytol **32**, sind vermutlich auf die sehr schlechte Löslichkeit zurückzuführen.

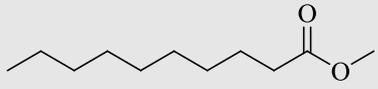
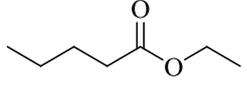
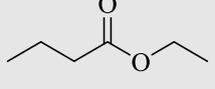
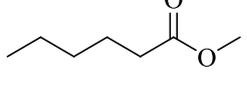
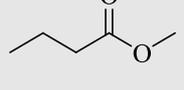
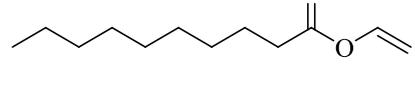
3.2.2. Neue Reaktionen

Betrachtet man den möglichen Mechanismus der Hydratisierung, so führt eine vermeindliche Protonierung der 3'-Doppelbindung zur Ausbildung eines tertiären Karbokations, an das sich wiederum im Folgenden ein Wassermolekül anlagert. Geht man davon aus, dass das Wassermolekül durch die umstehenden Aminosäuren koordiniert wird und durch deren basischen Seitenketten die Nukleophilie des Wassers erhöht wurde, so könnte man dieses Prinzip auch auf andere Reaktionen anwenden. Zum Beispiel würde die Protonierung der

Carboxyfunktion eines Esters und anschließendem nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls zur Spaltung des Esters in den entsprechenden Alkohol und die entsprechende Säure erfolgen.

Von daher wurden hinsichtlich der Esterspaltung einige verfügbare Substrate getestet. Im Unterschied zu den bisherigen Biotransformationen wurden hier nur 5 mM Substrat verwendet. Als Positivkontrolle diente 1 M NaOH-Lösung, da die Esterspaltung vor allem im alkalischen Milieu einfach durchgeführt werden kann. Als Negativkontrolle diente nur TrisHCl Puffer pH 8 und als Kontrolle gegenüber dem semiaufgereinigtem Lysat, Lysat aus der Expression mit einem Leervektor. Das Problem hierbei ist leider, dass die von *E. coli* exprimierten Hydrolasen auch in der Lage sind Ester zu spalten, was, dadurch das kein isoliertes Enzym verwendet werden konnte, keine hundertprozentig sichere Aussage über die Umsetzung zulässt. Zwar ist der Anteil an Hydrolasen im aufgereinigtem Enzym deutlich geringer als in der Kontrolle doch sind die Werte hier mit etwas Vorsicht zu betrachten.

Tabelle 16 Verwendete Ester in Biotransformationen mit der LDI nach 20 Stunden Reaktionszeit. Umsätze in [%]

#	Substrat	Positivkontrolle 1M NaOH	Semiaufgereinigt (0,68 mg/ml)	Kontrolle (6 mg/ml)
1		96,5	3,2	8,3
2		99,9	8,2	12,5
3		100,0	4,4	6,6
4		99,9	7,9	16,9
5		99,9	5,7	9,6
6		87,7	22,8	26,0

Die in Tabelle 16 angegebenen Werte der Umsetzungen wurden jeweils doppelt bestimmt. Aufgründdessen wurde hier kein Fehlerbalken angezeigt.

In Tabelle 16 ist deutlich zu sehen, dass die 1 M NaOH Lösung nach 20 Stunden alle Ester in quantitativer Menge umsetzen konnte. Demgegenüber sind die enzymatischen Umsetzungen deutlich niedriger. Interessant hierbei ist, dass bei allen Estern ein gewisser Umsatz stattfand. Allerdings ist der Umsatz überall geringer als in der Kontrolle, wobei der Unterschied zwischen Kontrolle und LDI mit den Vinylester sehr gering ist. Auffällig ist hier dennoch der relativ hohe Umsatz des Vinylesters **6** bei der Kontrolle und der LDI. Auch ist der Umsatz an sich hier deutlich größer als mit den Methyl- und Ethylethern, deren Umsatz zwischen 3 und 8 % liegt. Scheinbar werden auch sowohl von der Kontrolle wie auch von dem semiaufgereinigten Lysat die Ester mittlerer Kettenlänge **4** (Valeriansäureethylester) und **6** (Capronsäuremethylester) gegenüber den kurzkettigen Estern **5** und **7** (Butansäureethylester und -methylester) bevorzugt. Ausnahme ist hierbei allerdings der Decansäurevinylester, der gegenüber allen anderen Estern insbesondere seines Methylesteräquivalents, einen deutlich größeren Umsatz zeigte.

3.2.3. Nukleophile Addition

Die natürliche Reaktion der Hydratation von Myrcen entspricht der nukleophilen Addition von Wasser. Da als alternatives Substrat auch der Methylether von Linalool als Substrat akzeptiert worden ist, dürfte auch die Rückreaktion also die Addition von Methanol an die Doppelbindung funktionieren. Von daher wurden Biotransformationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Methanol durchgeführt. Der Vollständigkeit halber wurden neben Methanol auch diverse andere Nukleophile, die in Tabelle 17 aufgeführt sind, verwendet. Um die Nukleophilie der verwendeten Substrate zu erhöhen, wurden die Reaktionen bei pH 8 über Nacht durchgeführt.

Tabelle 17 Verwendete Nukleophile für die Addition

Nukleophil	Konzentration	Produktbildung [%]
Methanol	10/30/50 Vol.%	0,02/0,07/-
Ethanol	10/30/50 Vol.%	-
Natriumazid	10-500 mM	-
Phenol	10-50 mM	-
Mercaptoethanol	10-100 mM	-
Ammoniak	10-500 mM	-
Thiocyanat	10-500 mM	-

Propanthiol	10-100 mM	-
-------------	-----------	---

In der Tabelle 25 sind die verwendeten Nucleophile inklusive aller getesteten Konzentrationen für eine mögliche Addition an Myrcen gelistet.

Leider konnte bis auf Methanol keine weitere Addition mit alternativen Nucleophilen festgestellt werden. Doch auch mit Methanol ist die Produktbildung marginal klein und erreicht bei 30 (v/v) % Methanol sein Maximum mit etwas weniger als 0,1%. Interessant war hierbei noch, dass die Produktbildung von Linalool von den meisten Nucleophilen nur geringfügig beeinflusst worden ist. So lag die Bildung von Linalool bei Thiocyanat bis 100 mM, bei Mercaptoethanol bis 100 mM, bei Phenol bis 50 mM und bei Natriumazid bis 100 mM nahezu unverändert vor. Selbst bei 500 mM Ammoniak lag noch etwa 50 % Produkt vor. Einzig Propanthiol verursachte deutlich Einbußen bei der Produktbildung, was vermutlich an der Dimerisierung und der damit verbundenen Möglichkeit als „Substrat“ in die Tasche zu wandern und dort das Zentrum zu blockieren, liegt.

3.3. Studien zum Mechanismus

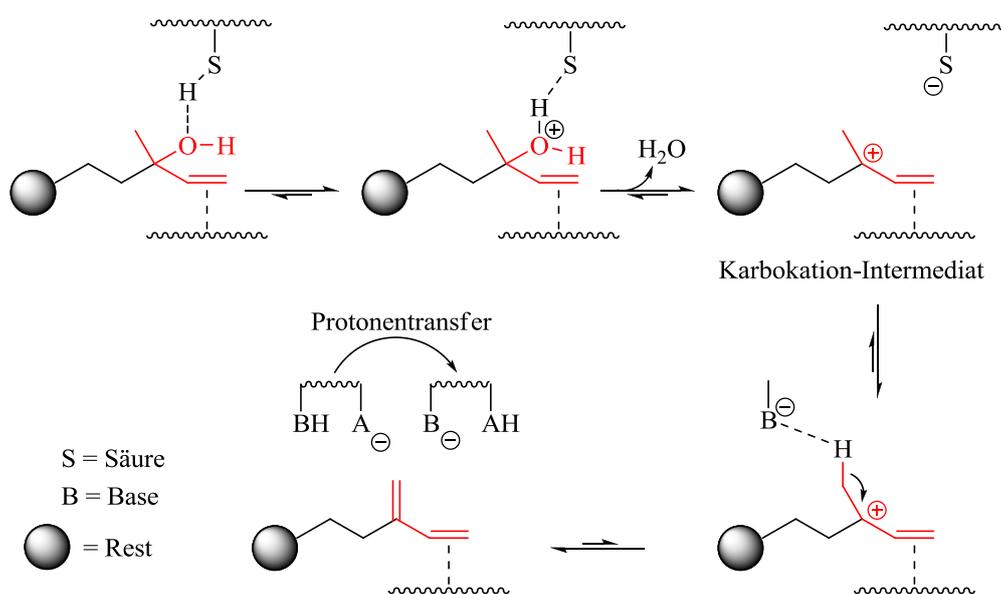


Abbildung 36 Schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus für die LDI

In Abbildung 36 ist der postulierte Mechanismus der LDI schematisch dargestellt. Während im ersten Schritt der Katalyse die Hydroxylfunktion von einer aciden Aminosäure protoniert wird, kommt es im zweiten Schritt durch Abspaltung eines Wassermoleküls aus dem Oxoniumion zur Ausbildung eines Karbokation-Intermediats. Das Karbokation wird vermutlich durch umstehende aromatische Aminosäureseitenketten, wie z.B. bei den Zyklasten der Fall [117-120] sowie durch Mesomerie mit der Vinylgruppe, stabilisiert. Die hierbei entstehende

elektronenziehende Wirkung des Karbokations senkt den pK_s -Wert der angrenzenden Methylgruppe soweit, dass die Methylgruppe von einer basischen Aminosäure (eventuell auch die der Protonierung) deprotoniert werden kann. Dies führt im Folgenden zur Ausbildung der Doppelbindung. Auch wenn einige Ergebnisse aus den Biotransformationen für diesen Mechanismus Argumente liefern, sollten mit Hilfe weiterer Experimente mit Deuterium zusätzliche Hinweise und Aussagen ermittelt werden, um die These des Mechanismus zu festigen.

3.3.1. Experimente mit Deuterium

Um genaueres über den Mechanismus unabhängig der Verwendung variabler Substrate zu erfahren, werden meist Experimente mit dem Wasserstoffisotop Deuterium durchgeführt. Die merklichen Reaktivitätsunterschiede basieren auf den großen Massen- und damit den recht großen Schwingungsenergieunterschieden und damit der Aktivierungsenergie E_a , der entsprechenden C-H/C-D Bindungen.

Dabei wird unterschieden zwischen

1. Primären kinetischen Isotopeneffekten; diese spielen vor allem dann eine Rolle wenn während der Reaktion eine C-H/C-D Bindung gebrochen werden muss, dabei kann die Reaktion mit H etwa siebenmal schneller ablaufen.
2. Sekundären kinetischen Isotopeneffekten; hier wird keine C-H/C-D (bzw. X-H/X-D, X = O, S, N etc.) direkt gespalten. Die Reaktivitätsunterschiede basieren zum einen auf der Entfernung des Isotops zum Reaktionszentrum und werden durch den Einfluss des Isotops auf die Hybridisierung und Hyperkonjugation und damit auf die Schwingungsenergie der C-H Bindung hervorgerufen. Sekundäre kinetische Isotopeneffekte können Werte von 0,7-1,5 aufweisen.
3. Kinetische Lösungsmittel-Isotopeneffekte spielen vor allem dann eine Rolle wenn durch Austausch des Lösungsmittels (z.B. beim Wechsel von H₂O in D₂O) Reaktivitätsunterschiede auftreten. Prinzipiell können hierbei alle Werte auftreten die bei den Primären und kinetischen Sekundären Isotopeneffekten auftreten, was unter anderem daran liegt, dass das Lösungsmittel selber als Reaktand dienen kann oder auch dafür da ist, den Übergangszustand zu stabilisieren.[121, 122]

Kinetischer Lösungsmittel-Isotopeneffekt

Mit Hilfe von Deuteriumoxid sollten also erste Hinweise über den Mechanismus der Hydratisierung bzw. der Dehydratisierung gesammelt werden. Hierbei wurden die beiden natürlichen Reaktionen der LDI in Puffern unterschiedlicher D₂O-Konzentration durchgeführt. Der D₂O-Gehalt variierte in 9 % Schritten von 0 - 72 %.

Tabelle 18 Reaktionsansatz der Biotransformationen für die Lösungsmittelstudie

TrisHCl Puffer (80 mM) pH 8 in 90 % D ₂ O	800-X µl
Zell Lysat	100 µl
Substrat (100 mM Substrat, 50 % DMSO/TrisHCl)	100 µl
TrisHCl Puffer (80 mM, pH 8)	X =100-800 µl

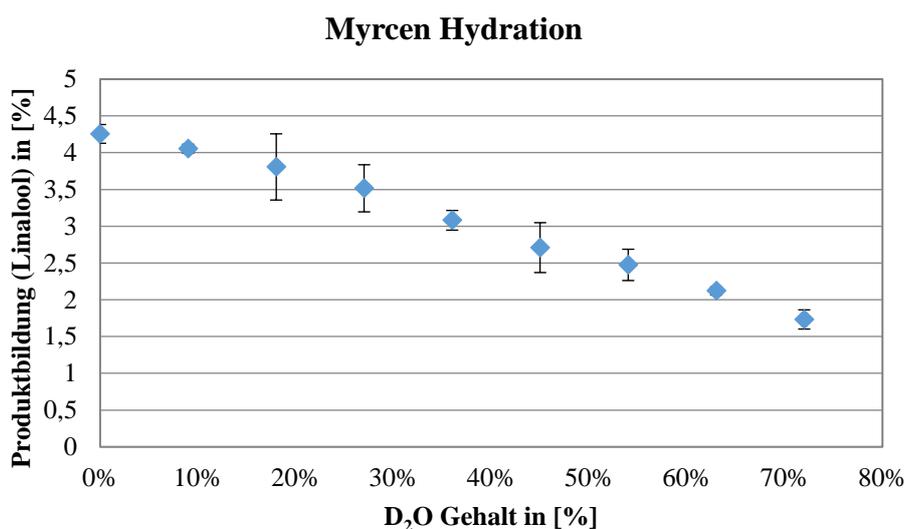


Abbildung 37 In dem Diagramm der Myrcen Hydratisierung ist die prozentuale Bildung von Linalool bei den jeweiligen Deuteriumoxidkonzentration (D₂O) zu sehen.

Im Falle der Hydratisierung von Myrcen sinkt die Aktivität deutlich mit steigendem Gehalt in D₂O im Tris-Puffer. Können am Anfang ohne D₂O noch etwa 4,3 % Linalool gebildet werden so sinkt die Produktausbeute linear auf etwa 1,7 % bei 72 % D₂O-Gehalt. Dies entspricht einer Abnahme von 60 %. Bei linearer Fortführung würde bei 100 % D₂O Gehalt nur noch etwa 0,7 % Produkt gebildet werden. Dies entspräche einer Abnahme von ca. 84 %.

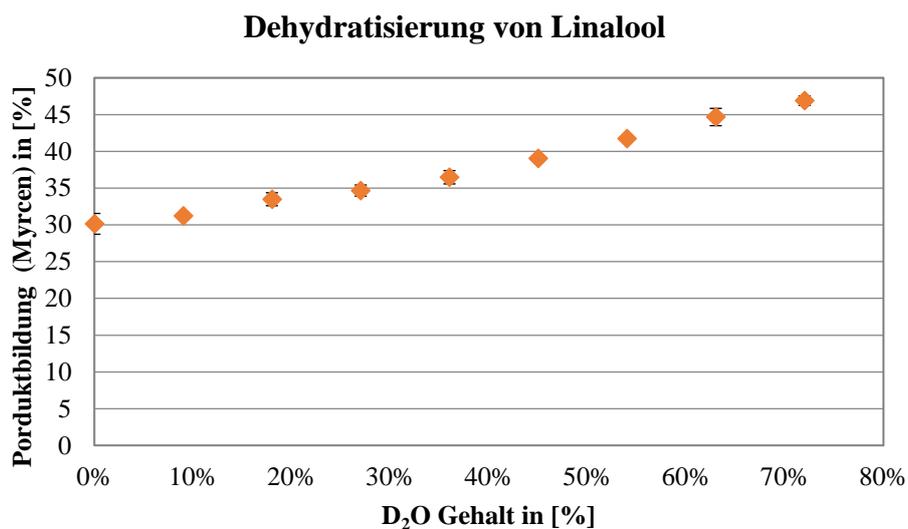


Abbildung 38 In dem Diagramm der Linalool Dehydratisierung ist die prozentuale Bildung von Myrcen bei den jeweiligen Deuteriumoxidkonzentration (D₂O) zu sehen.

Bei der Dehydratisierung von Linalool verhält sich die Produktbildung bei steigendem D₂O-Gehalt erwartungsgemäß genau andersherum zur Hydratisierung. Hier ist der Einfluss nahezu genauso deutlich. So nimmt auch hier die Produktbildung von ursprünglich 30 % bei 0 % D₂O auf etwa 47 % bei 72 % D₂O-Gehalt zu, was einer Steigerung von etwa 57 % entspricht. Bei linearer Fortführung der Geraden würde etwa 54 % Produkt, unter außer Acht lassen der Enantioselektivität, gebildet werden, was einer Steigerung von 80 % entspräche.

Vergleich Linalool mit d⁵-Linalool (Primärer Isotopeneffekt)

In Vorexperimenten sollte die Aktivität von Linalool gegenüber dem deuterierten Vertreter d⁵-Linalool getestet werden. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde erst ermittelt unter welchen Bedingungen (Substratkonzentration, Enzymkonzentration und Zeit) die Aktivität am größten ist. Als Substratkonzentrationen (Substrat war hier Linalool) wurden 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM, als Enzymkonzentration 31 µg, 15,5 µg und 7,7 µg der zu etwa 90 % reinen LDI (Abbildung 31) und als Zeiten wurden 10, 20, 30 und 60 min gewählt.

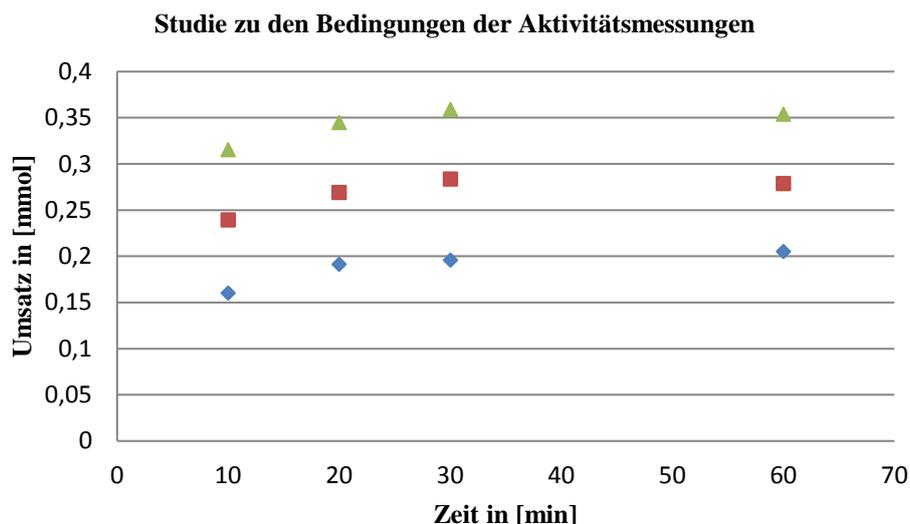
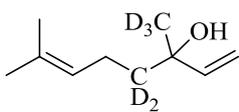
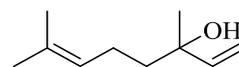


Abbildung 39 Umsatz bei konstanter Substratkonzentration und steigender Enzymkonzentration. Gezeigt sind für jede Enzymkonzentration die jeweiligen schnellsten Umsätze im Vergleich zur Substratkonzentration. Blau (7,7 µg Enzym, 0,5 mmol Substrat), rot (15,5 µg Enzym, 1 mmol Substrat), grün (31 µg Enzym mit 1 mmol Substrat).

Aus Abbildung 39 lässt sich herauslesen, dass bei einer Enzymkonzentration von 7,7 µg pro ml und 0,5 mM Substrat die relative Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zu den höheren Enzymkonzentrationen am größten ist. Zwar wurde in gleicher Zeit weniger Substrat umgesetzt, verglichen aber mit der Enzymmenge wurde hier pro Einheit Enzym mehr Substrat in gleicher Zeit umgesetzt als mit 15,5 µg und 31 µg Enzym. Der lineare Bereich der höchsten Aktivität liegt offensichtlich zwischen 0 und 10 min. Aus diesem Grund wurden für die spezifische Aktivität als Zeitpunkt des Reaktionsstopps 5 min gewählt, sowie 7,7 µg/ml Enzym und 0,5 mM Substrat. Als Substrate wurden Linalool, d^5 -Linalool **29** und das C₁₀-Substrat **22**, aufgrund der besten Umsetzung, gewählt.

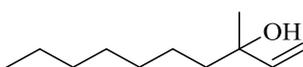
Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Linalool und d^5 -Linalool sollte durch den kinetischen Isotopeneffekt bestimmt werden, ob die Abspaltung eines Deuteriums im d^5 -Linalool einen entsprechend großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausübt. Ist die Spaltung der C-D Bindung am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt, so sollte die Dehydratisierung des d^5 -Linalools deutlich langsamer von statten gehen. Ist dies nicht der Fall, so dürfte die Protonierung und somit vermutlich die Bildung eines Karbokationintermediates der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dehydration sein.

Tabelle 19 d^5 -Linalool versus Linalool

Substrat		
Umsatz nach 15 min (pH 6) in [%]	34,4±0,3	35,1±1,6
Umsatz nach 20 h (pH 6) in [%]	52,9±1,4	47,6±2,8
Spezifische Aktivität	1,17 U/mg	1,21 U/mg

Die Ergebnisse beider Reaktionen liefern interessante Ergebnisse hinsichtlich des Mechanismus. Sowohl der Umsatz nach 15 min (34,4 % vs 35,1 %) als auch die spezifische Aktivität (1,17 U/mg vs 1,21 U/mg) weisen nur kleine Differenzen zwischen d^5 -Linalool und Linalool auf. Grundsätzlich ist der Umsatz und die Aktivität bei dem deuterierten Substrat etwas niedriger was verständlich ist, wenn man bedenkt, dass die C-D Bindung stärker ist als die C-H Bindung. Allerdings deuten die sehr geringen Differenzen auch daraufhin, dass die Deprotonierung offensichtlich nicht Teil des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Dehydratisierung ist. Der ee-Wert von 96% von d^5 -Linalool ist ebenso nahezu identisch mit dem des Linalools (ee = 98%). Der k_H/k_D -Wert liegt bei etwas über 1 (1,03), was also sehr für einen sekundären Isotopeneffekten spricht.

Tabelle 20 Spezifische Aktivität des C₁₀-Substrats **22**

Substrat	
Spezifische Aktivität	1,43 U/mg

Bemerkenswert ist, dass das Substrat **22** mit einer linearen Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen schneller umgesetzt worden ist als das natürliche Substrat Linalool. Vergleicht man die Ergebnisse der Biotransformation anderer Substrate mit denen von Linalool **1**, so ist der Umsatz der Substrate **14**, **20** und **21** nach 15 min ebenfalls deutlich größer als der des natürlichen Substrats. Dies lässt den Schluss zu, dass auch hier die Aktivitäten über denen von Linalool liegen.

3.3.2. Linalylamin als Inhibitor

Neben den spezifischen Aktivitäten sollte auch versucht werden eventuelle Inhibitoren zu finden. Bei einem Experiment in dem Linalylamin parallel mit Linalool, beide in gleicher Konzentration, eingesetzt wurde, stellte sich heraus, dass das Linalylamin einen stark negativen Einfluss auf den Umsatz des Linalools hatte. Dabei konnte das Produkt der Dehydratisierung von Linalool, Myrcen, nicht mehr ausgemacht werden, weswegen eine Studie mit unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen durchgeführt wurde. Hierbei wurden eine Linaloolkonzentration von 0,1-10 mM und eine Linalylaminkonzentration von 0,01-10 mM eingesetzt. Zudem wurden die Reaktionen in Citratpuffer (80 mM, pH 6) mit 100 µl Lysat (5 mg/ml) über 15 min bei 35 °C durchgeführt. Die Ergebnisse der Umsetzungen in Prozent [%] sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21 Inhibitorstudie mit Linalylamin (Umsatz in [%])

Konz. Amin [mM]		0	0,01	0,1	0,5	1	5	10
Konz. Linalool [mM]	0,1	100	0,12	0,024	-	-	-	-
	0,5	100	0,17	0,06	0,02	0,007	-	-
	1	100	0,48	0,17	0,048	0,047	-	-
	2,5	100	0,73	0,3	0,086	0,05	-	-
	5	100	2,15	1,42	1,15	1,08	1	0,99
	10	100	3,34	2,24	1,61	1,6	1,35	1,17

In Tabelle 21 sind die Umsätze unter verschiedenen Aminkonzentrationen dargestellt. Hierbei nicht zu verwechseln sind die 100 % Angaben nicht der Absolutumsatz sondern der relative maximale Umsatz im Vergleich zur Verwendung von Linalylamin in den Biotransformationen. Daraus geht deutlich hervor, dass selbst bei sehr kleinen Konzentrationen an Linalylamin (0,01 mM) nahezu keine Produktbildung mehr stattfindet. Selbst bei 1000-fachem Substratüberschuss beträgt die Inhibierung schon 96,7 %, die mit sinkendem Substratüberschuss auf nahezu 100 % ansteigt (99,5 % bei 0,5 mM Linalool und 99,9 % bei 0,1 mM Linalool).

3.4. Lösungsmittelstabilität und Einfluss auf den Umsatz

Neben der deutlich besseren Löslichkeit für hydrophobe Substrate ermöglichen Lösungsmittelsysteme auch Reaktionen die in Wasser zurückgedrängt werden, wie z.B. Eliminierungen in denen Wasser frei wird, wie bei der Dehydratisierung oder der Verseifung. Außerdem lassen sich meist gewünschte Produkte leichter isolieren und der unlösliche Biokatalysator kann einfacher zurückgewonnen werden. Zudem ist die Thermostabilität der Enzyme bei niedrigen Wassergehalten oft höher [123]. Eigentlich ist die Dehydratisierung in Wasser eine Reaktion die sehr ungewöhnlich ist, schließlich wird durch das Prinzip von Le Chatelier das Gleichgewicht der Reaktion stark auf die Seite des hydratisierten Produktes verschoben. Demgegenüber steht in diesem Falle allerdings, dass das thermodynamische Gleichgewicht der natürlichen Reaktion zwischen Linalool und Myrcen auf Seiten des Myrcens liegt [95] und zudem vermutlich das Myrcen aufgrund der schlechteren Löslichkeit aus dem Gleichgewicht gezogen wird. Um diese Vorgänge besser verstehen zu können und eventuell die Reaktionen der LDI in eine bestimmte Richtung zu verschieben, sollte eine Studie der LDI gegenüber unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Für die Studien wurden neun unterschiedliche Lösungsmittel verwendet. Hierfür wurden von polar-protischen (MeOH, EtOH), über aprotisch-polare (DMSO, Aceton, Acetonitril, THF²) bis hin zu unpolaren Lösungsmitteln (DCM, Ethylacetat, Toluol, THF) alle möglichen Arten von Lösungsmitteln miteinbezogen. Die betrachteten Reaktionen waren die Hydratisierung von Myrcen, sowie die Dehydratisierung von Linalool. Um die Stabilität der LDI gegenüber den Lösungsmitteln zu ermitteln wurde das Lysat vor Zugabe des Substrats in dem entsprechenden Lösungsmittel-Puffergemisch nach 15 minütiger Vorinkubation bei 35 °C im Schüttelinkubator bei 850 rpm inkubiert. Im Anschluss folgte die Zugabe von 10 mM Substrat und weitere Inkubation je nach Reaktion 15 min für die Dehydratisierung und 45 min für die Hydratisierung. Um den Einfluss der Lösungsmittel ohne Vorinkubation auf die Reaktionen zu testen wurde das Lysat direkt dem Lösungsmittel-Puffer-Substratgemisch hinzugefügt. Nach der Extraktion mit Cyclohexan wurden die organischen Phasen mittels Gaschromatograph analysiert.

² Die Zuordnung von THF fällt zwischen aprotisch-polar und unpolar.

Tabelle 22 Reaktionsansatz mit unterschiedlichen Lösungsmitteln

Zell Lysat	100 μ l
80 mM Citratpuffer pH 6	800 μ l – X
Lösungsmittel (v/v)	X = 50 μ l – 500 μ l
DTT (20 mM Stock im Citratpuffer)	100 μ l

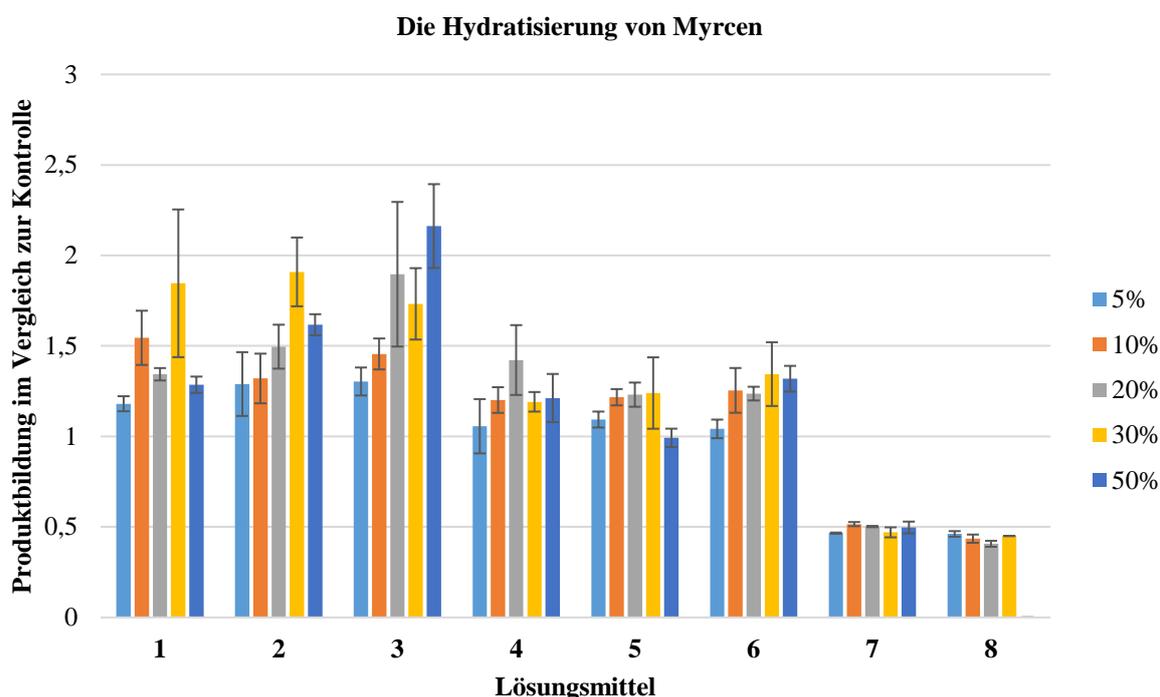


Abbildung 40 Die Hydratisierung von Myrcen unter Verwendung diverser Lösungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen von 5-50 Vol. %. DMSO = 1, Methanol = 2, Ethanol = 3, Aceton = 4, Acetonitril = 5, Ethylacetat = 6, Toluol = 7, THF = 8. Dichlormethan = 9 konnte aufgrund fehlerhafter Daten nicht dargestellt werden.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Hydratisierung von Myrcen bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittelkonzentrationen zu sehen. Der Wert 1 auf dem Y-Achsenabschnitt steht für die Produktbildung ohne Verwendung von Lösungsmittel abgesehen von den 2 Vol. % DMSO, die aus dem Substratstock kommen. Erstaunlicherweise ist die Produktbildung bei den ersten sechs Lösungsmitteln größer als die der Kontrolle. Vor allem bei DMSO, Methanol und Ethanol steigt die Produktkonzentration auf bis das 2-fache an. Hierbei haben die meisten Lösungsmittel ihr Maximum bei 20-30 Vol. %. Nur Ethanol scheint hier eine Ausnahme zu machen, wobei das aber aufgrund der Fehlerbalken nicht genau bestimmt werden kann. Selbst die Lösungsmittel Aceton, Acetonitril und Ethylacetat scheinen einen leicht

positiven Effekt auf die Hydratisierung zu haben. Demgegenüber stehen allerdings deutliche Abnahmen der Produktkonzentration bei Toluol und THF. Hier werden nur noch etwa 45 % Produkt gebildet. Allerdings bleibt dieser Wert unabhängig von der Lösungsmittelkonzentration nahezu konstant. Die Daten von Dichlormethan konnten nicht ausgewertet werden.

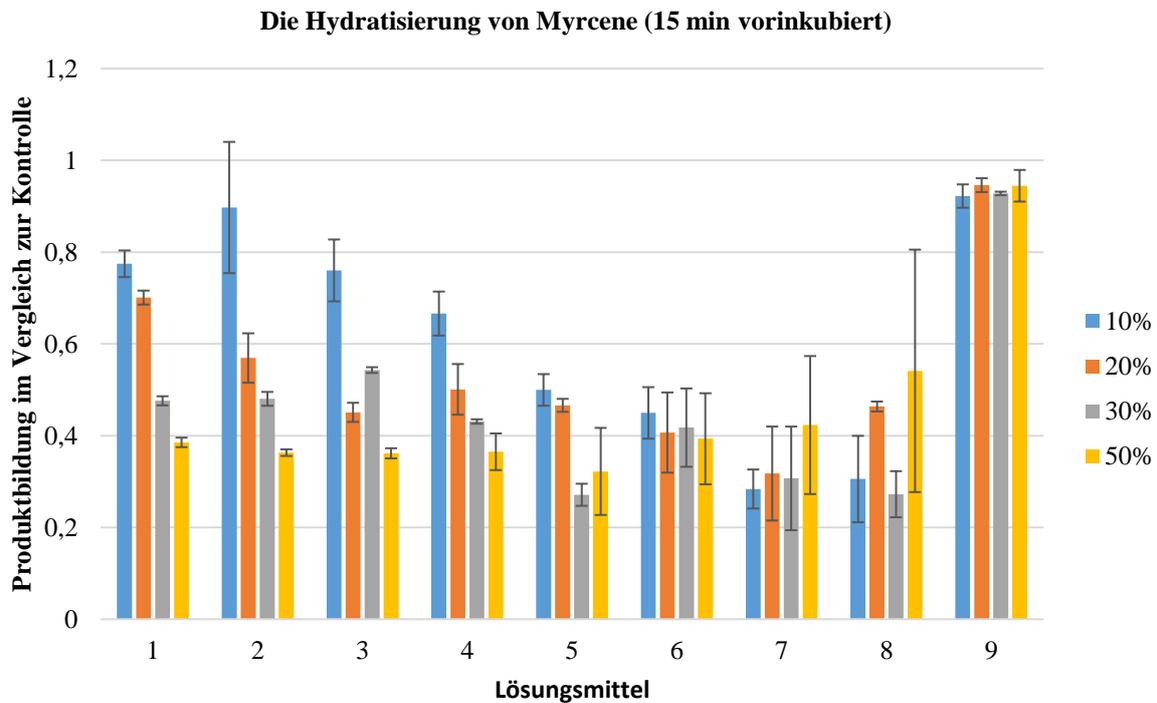


Abbildung 41. Die Hydratisierung von Myrcen unter Verwendung diverser Lösungsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen von 10-50 Vol. % mit dem Unterschied, dass das Substrat erst nach 15 min Inkubationszeit hinzugegeben wurde. DMSO = 1, Methanol = 2, Ethanol = 3, Aceton = 4, Acetonitril = 5, Ethylacetat = 6, Toluol = 7, THF = 8, Dichlormethan = 9

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Hydratisierung von Myrcen bei unterschiedlichen Lösungsmittelkonzentrationen von 10-50 Vol. % nach 15 minütiger Vorinkubation dargestellt. Der Wert 1 auf dem Y-Achsenabschnitt spiegelt den Wert der Kontrolle, also die Hydratisierung von Myrcen mit 2 Vol. % DMSO (aus dem Substratstock 20:80 (v/v) DMSO/Puffer) wieder. Im Gegensatz zur Hydratisierung ohne Vorinkubation (

Die Hydratisierung von Myrcen

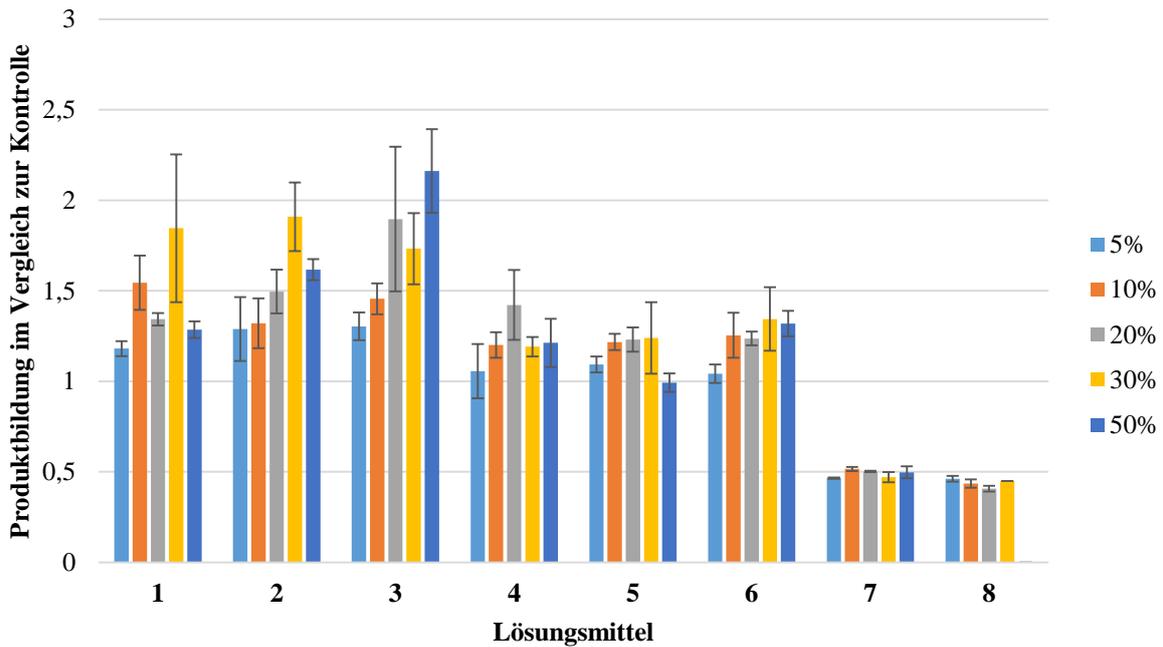


Abbildung 40) nimmt die Produktbildung mit steigendem Lösungsmittelgehalt hier bei nahezu allen Lösungsmitteln deutlich ab. Sind es bei DMSO, Methanol, Ethanol und Aceton noch vergleichsmäßig geringe Auswirkungen zumindest bei 10 Vol. % (67-90% Restaktivität) so sind es bei allen anderen Lösungsmitteln 50 % oder noch weniger wie etwa bei THF und Toluol (30 %). Vergleichen mit den Ergebnissen aus Abbildung 40 sind hier doch deutliche Unterschiede festzustellen. Dies wird vor allem bei den sehr gut wasserlöslichen Lösungsmitteln DMSO, Methanol, Ethanol und Aceton ersichtlich. Interessant ist hierbei, dass die Produktbildung bei allen Lösungsmitteln bei Verwendung von 50 Vol. % Lösungsmittel nahezu konstant bleibt (bei etwa 40 %). Einzige Ausnahme ist hier Dichlormethan, das scheinbar keinen Einfluss auf die Aktivität bezüglich der Hydratisierung hat.

Die Dehydratisierung von Linalool

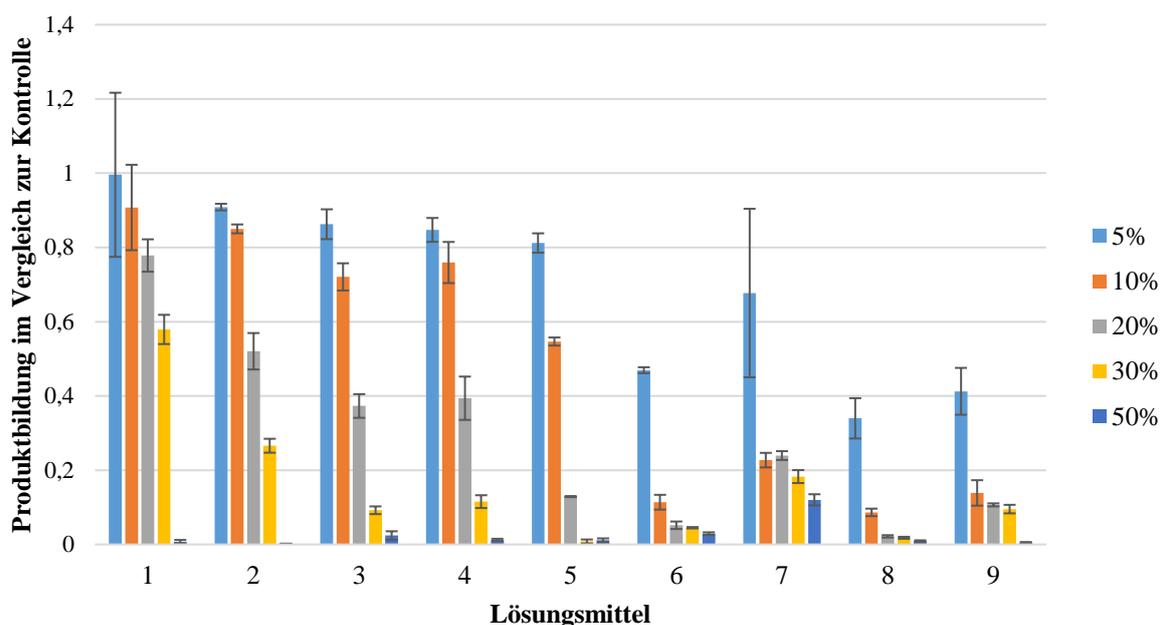


Abbildung 42 Das Diagramm zeigt die Auswirkungen der unterschiedlichen Lösungsmittel auf die Dehydratisierung von Linalool. DMSO = 1, Methanol = 2, Ethanol = 3, Aceton = 4, Acetonitril = 5, Ethylacetat = 6, Toluol = 7, THF = 8, Dichlormethan = 9

In der Abbildung der Dehydratisierung von Linalool ohne Vorinkubation sieht der Verlauf deutlich anders aus als in dem der Hydratisierung. Schon geringe Mengen Lösungsmittel können einen sehr großen Einfluss auf die Aktivität gegenüber Linalool haben. Einzig DMSO mit 5 Vol. % hat nahezu keinen Einfluss auf die Aktivität. Bei Methanol, Ethanol, Aceton und Acetonitril nimmt dagegen die Aktivität schon leicht ab, ist mit etwa 80-90 % aber immer noch recht hoch. Mit steigender Konzentration nimmt allerdings bei allen Lösungsmitteln die Aktivität stark ab und geht bei 50 Vol. % bis nahezu 0 %. Auch hier ist zu sehen, dass bei 30 Vol. % DMSO mit knapp 60 % noch verhältnismäßig viel Aktivität vorhanden ist. Mit den anderen eher unpolaren Lösungsmitteln Ethylacetat, Toluol, THF und DCM nimmt die Aktivität dagegen sehr schnell sehr deutlich ab. Hier reichen schon 10 Vol. % um nur noch etwa 10 % Aktivität zu erreichen. Besonders ersichtlich ist dies bei Ethylacetat, THF und Dichlormethan. Einzig verwunderlich ist die Restaktivität von Toluol bei Verwendung von 50 Vol. % Toluol, da hier anscheinend noch etwa 13 % verbleiben, was deutlich mehr gegenüber allen anderen Lösungsmitteln ist.

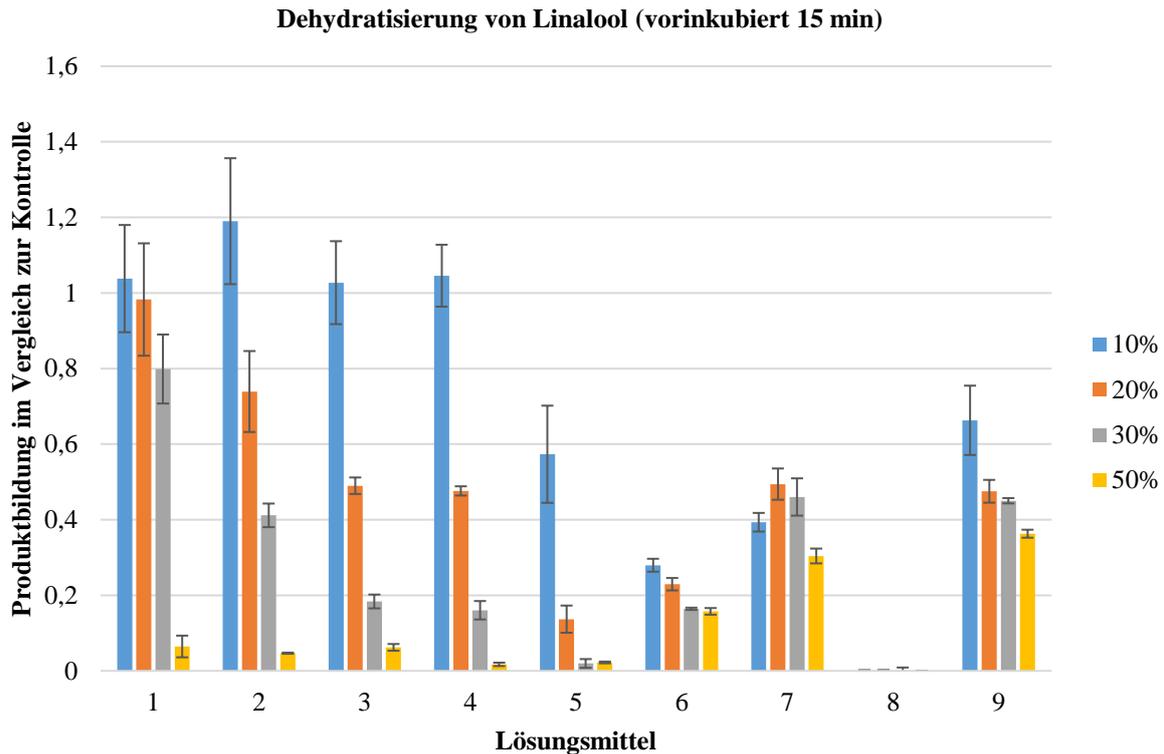


Abbildung 43 Das Diagramm zeigt die Auswirkungen der unterschiedlichen Lösungsmittel auf die Dehydratisierung von Linalool nach 15 minütiger Inkubation in den entsprechenden Lösungsmitteln. DMSO = 1, Methanol = 2, Ethanol = 3, Aceton = 4, Acetonitril = 5, Ethylacetat = 6, Toluol = 7, THF = 8, Dichlormethan = 9

Abbildung 43 zeigt die Produktbildung der Dehydratisierung nach 15 minütiger Vorinkubation in den entsprechenden Lösungsmitteln. Anders als in Abbildung 42 haben hier scheinbar die Lösungsmittel DMSO, Methanol, Ethanol und Aceton eine leicht konservierende Wirkung auf die LDI, bleibt hier die Aktivität doch relativ konstant. Zu sehen ist das dadurch das bei den sehr gut wasserlöslichen Lösungsmitteln (DMSO, Methanol, Ethanol und Aceton) und Verwendung von 10 Vol. % die Aktivität nahezu identisch mit der Kontrolle ist. Erst höhere Konzentrationen beeinträchtigen die Aktivität deutlich. Bei DMSO sind selbst bei 30 Vol. % noch etwa 80 % Restaktivität vorhanden. Interessant ist hier, dass schon bei 10 Vol. % THF keine Aktivität mehr vorhanden war, wohingegen bei 50 Vol. % Lösungsmittel Ethylacetat, Toluol und selbst bei Dichlormethan noch 20-40 % Aktivität erreicht wurde. Demgegenüber ist bei DMSO, Methanol, Ethanol, Aceton und Acetonitril bei 50 Vol. % fast keine Aktivität mehr vorhanden.

Als Konsequenz hieraus wurde bei den Biotransformationen aufgrund des geringen Einflusses auf die Reaktivität und um die Löslichkeit der Substrate zu erhöhen immer 5 % DMSO hinzugegeben.

Interessant ist der sehr hohe Anteil an α -Helix Elementen deren Wahrscheinlichkeit zudem ebenfalls extrem hoch ist. Meist sind diese Helices durch sehr kurze Coil-Abschnitte voneinander getrennt (2-5 AS) was sehr auf eine antiparallele Ausrichtung dieser hindeutet.

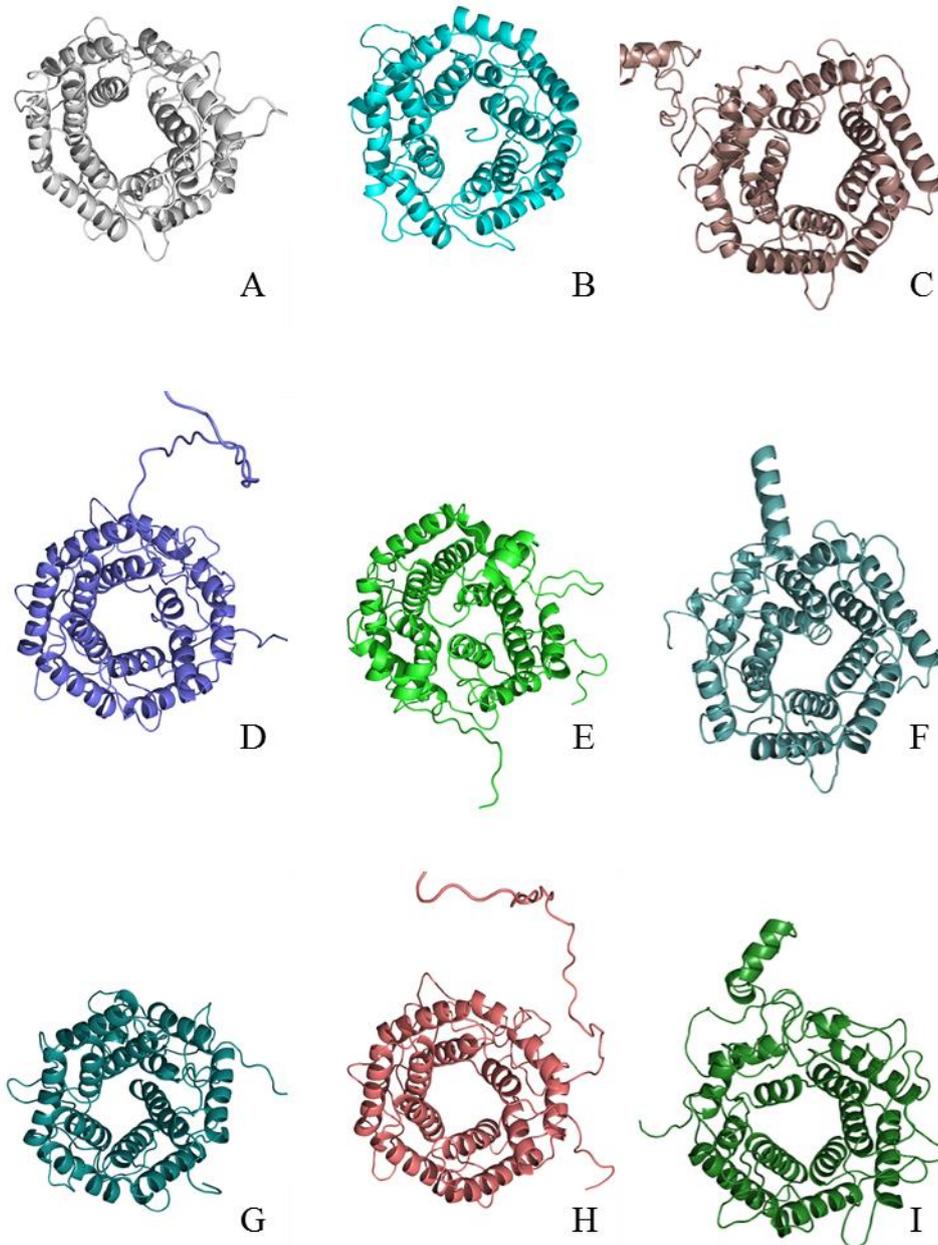


Abbildung 45 Ausgewählte Homologiemodelle von I-Tasser, Lomets und Muster. Vorlagen: A: Putative Glycosylhydrolase BT3782, B,C: Alginate Lyase aus *Agrobacterium tumefaciens* C58, D: Sugar Epimerase aus Ruminal bacterium, E: Mannosidase BT3792 aus *Bacteroides Thetaiotaomicron*, F: Putative Glycosyl Hydrolase (NP_813087.1) aus *Bacteroides Thetaiotaomicron*, G: Endoglucanase A (Cela) Katalytischer Kern, Aminosäuren 33-395, H: α -1,2-Mannosidase aus *Caulobacter strain* K31, I: Cellobiose 2-Epimerase

Auf Basis dieser Sekundärstrukturvorhersagen sowie anderer Berechnungen und Vorhersagen wie Sequenzidentität, Strukturidentität, Lösungsmittelzugängigkeit, Torsionswinkel,

Hydrophobischen Wechselwirkungen und anderen Eigenschaften wurden durch die Server MUSTER (MULTI-Source ThreadER program) [124], LOMETS (LOCAL METa-Threading-Server) [125] und I-TASSER [126-128] Homologiemodelle erstellt. Auch wenn die Sequenzidentitäten sehr klein sind (bestes Ergebnis bei der Datenbanksuche mittels BlastSearch ergab 26 % Sequenzidentität für ein hypothetisches Protein aus *Mycobacterium sp.* JDM601 [129, 130]), so haben doch alle Modelle (Abbildung 45) ein $(\alpha/\alpha)_6$ Motiv gemeinsam, obwohl es sich um unterschiedliche Vorlagen zur Modellierung handelt. Im Prinzip handelt es sich hierbei um eine Faserstruktur, welche durch sechs α -Helices, die parallel ausgerichtet sind, umgeben von sechs α -Helices in antiparalleler Ausrichtung zu den inneren Helices, ausgebildet ist.

3.6. Entwicklung eines Screening Assays

Da für die LDI keine Kristallstruktur zur Verfügung steht, besteht nur die Möglichkeit mittels zufälliger Mutagenese mehr über dieses Enzym in Erfahrung zu bringen. Problematisch hierbei ist die Tatsache, dass das Enzym zum einen keine Kofaktoren benötigt und zum anderen sind mit Linalool, einem tertiären Alkohol und dem ungesättigten Myrcen alle verfügbaren Screenings nicht kompatibel. Da der tertiäre Alkohol nicht oxidiert werden kann, fallen hier mögliche NADH-abhängige Dehydrogenasen Screenings raus. Zudem funktionieren mögliche Additionsreaktionen aufgrund der guten Abschirmung und der geringen Reaktivität der Hydroxylgruppe ebenfalls nicht in ausreichend hoher Geschwindigkeit und Ausbeute. Außerdem gibt es keine Verfahren mit denen man das bei der Dehydratisierungsreaktion freiwerdende Wasser detektieren kann.

Der erste Versuch führte somit zu einem für Linolsäurederivate spezifischen 235 nm Assay, der speziell auf das konjugierte π -System gerichtet ist. Dieses System schien sehr interessant zu sein, da Myrcen ebenfalls ein konjugiertes π -System besitzt. Dieses wird bei der Hydratisierung zu Linalool zerstört, was sich in einer Änderung des Absorptionsspektrums bemerkbar machen sollte.

Zu Beginn wurden die Substrate im Bereich von 220-300 nm in unterschiedlichen Konzentrationen vermessen und analysiert. Hierbei schien das System durchaus vielversprechend, da Myrcen ein anderes Absorptionsspektrum aufwies als Linalool. Problematisch war hier nur, dass erst in relativ hohen Substratkonzentrationen $>2,5$ mM signifikante Unterschiede auftraten. Bei anschließenden Versuchen mit Lysat, erwies sich das System allerdings als nicht tragbar. Da die Proteine im Lysat größtenteils auch im Bereich von 230-300 nm absorbieren, war während der Reaktionen keine messbare (bzw. ausreichende) Differenz ermittelbar. Zusätzlich musste die Lysatmenge aufgrund der starken Absorption der Proteine deutlich begrenzt werden. Problematisch war das mit eingeschränkter Enzymmenge der Umsatz dementsprechend geringer wurde. Ein weiteres Problem entstand außerdem dadurch, dass das System mit 10 mM Myrcen und 10% Ethanol nicht ausreichend war, um Myrcen komplett in Lösung zu bringen, sondern dieses als Suspension vorlag und somit auch Probleme beim Absorptionsspektrum lieferte. Eine Erhöhung der Ethanolkonzentration führte allerdings zu denaturiertem Enzym und eine Senkung der Substratmenge zu oben genanntem Problem. Letzten Endes erwies sich dieses System als nicht verwendbar für einen möglichen Assay.

Als Alternative für den 235 nm Assay sollte nun ein Substrat mit dem Motiv des umsetzbaren α -Methylallylalkohols dienen, welches idealerweise außerhalb der Absorptionsbanden der Proteine absorbiert, bestenfalls farblich ist und das in möglichst geringen Konzentrationen, damit sich keine Probleme durch Suspensionen oder verwendeten Lösungsmitteln ergeben.

In diesem Zusammenhang erwies sich ein Substrat, welches in Kap. 3.2.1 von der Linalool Dehydratase-Isomerase umgesetzt werden konnte, als äußerst vielversprechend (Abbildung 46).

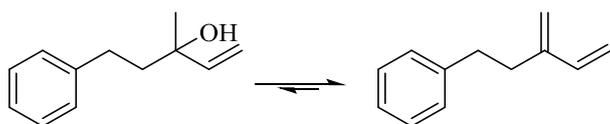


Abbildung 46 Basierend auf dieser Reaktion mit Substrat **23** sollte ein möglicher Ansatz für ein Screening entwickelt werden.

Im Hinblick auf dieses Substrat war die Idee, die Länge der C-Kette um ein Kohlenstoffatom zu kürzen. Sollte dieses Substrat akzeptiert werden, so müsste sich die Doppelbindung der Methylengruppe, welche durch das Enzym gebildet würde, aufgrund der besseren Stabilisierung umlagern (Abbildung 47). Das Absorptionsspektrum des neu gebildeten Produkts würde indes eine deutliche Verschiebung gegenüber dem Edukt aufweisen. Im Idealfall wäre die Verschiebung so weit, dass die Proteinbanden der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin nicht weiter ins Gewicht fallen würden. Alternativ ließe sich das aromatische System noch weiter substituieren, was eine weitere Verschiebung der Absorptionsbanden in den sichtbaren Bereich zur Folge gehabt hätte. Idealerweise lassen sich hiermit auch Substratkonzentrationen in sehr geringen Mengen analysieren und somit auch die Reaktionszeit für den Assay erheblich verkürzen.

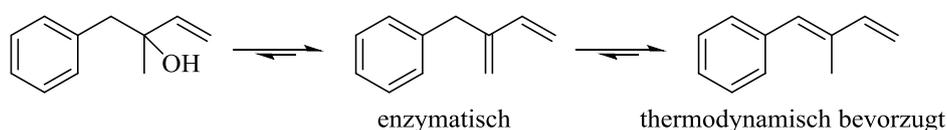


Abbildung 47 Mögliches Substrat zur Entwicklung eines Screenings basierend auf Absorption.

Die Synthesen für die erwünschten Substrate sind in Abbildung 48 gezeigt.

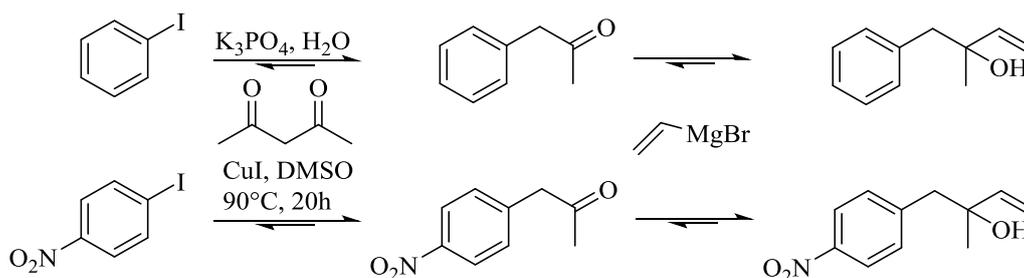


Abbildung 48 Synthesen für mögliche Substrate im Hinblick auf das Screening basierend auf der Absorption des konjugierten π -Systems. Während das obere Substrat synthetisiert wurde, allerdings nicht von der LDI akzeptiert worden ist, wurde aufgrunddessen von der Synthese des unteren Substrates abgesehen.

Leider konnte das gewünschte Substrat aus Abbildung 48 (oben rechts) von der LDI nicht umgesetzt werden, weswegen von der Synthese des substituierten Benzylringes abgesehen wurde. Bestätigt wurde dies zudem dadurch, dass Substrat **25** aus Abbildung 35 ebenfalls nicht umgesetzt werden konnte. Aus diesem Grund wurde von einem möglichen Screening mit Hilfe aromatischer Substrate und der mit Dehydratisierung einhergehenden Ausbildung eines konjugierten π -Systems und somit der Verschiebung des Absorptionsmaximas abgesehen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass auch der Methylether des natürlichen Substrats Linalool umgesetzt werden konnte, ermöglichte uns dies in eine neue Richtung hinsichtlich eines möglichen Screenings einzuschlagen. Da bei dieser Eliminierung im Gegensatz zum Linalool kein Wasser, sondern Methanol, frei wird, besteht dadurch die Möglichkeit ein Screening auf Basis der Oxidation von Methanol zu entwickeln. Als Enzym zur Oxidation des freiwerdenden Methanols sollte die Glucose Oxidase aus *Aspergillus niger* dienen, welche eine sehr gute Aktivität für Methanol besitzt. Das hierbei freiwerdende Wasserstoffperoxid dient als Grundlage für eine Vielzahl möglicher Farbausays, welche durch Verwendung von Meerrettich Peroxidase bewerkstelligt werden. Neben dem entstehenden Wasserstoffperoxid kann auch das gebildete Formaldehyd als Basis für ein Screening dienen.

Als mögliche Kupplungsreaktionen für entsprechende Screening wurden neben dem Purpaldassay für Formaldehyd, die Reaktion von 4-Aminoantipyrin mit Vanillinsäure, ABTS, MBTH mit Eisen(III)-chlorid und Sulfaminsäure, 4-Chlornaphthol, 2-Naphthol und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin getestet. Für die Reaktionen in 96 Well Platten wurden neben unterschiedlichen Methanolkonzentrationen von 12,5 mM – 125 nM auch unterschiedliche Puffer für die jeweiligen Reaktionen getestet. Dies war notwendig um herauszufinden, welche Puffer mit den Assaysubstraten kompatibel sind. Zum Beispiel fällt im Kaliumphosphatpuffer das Fe(III) als FePO_4 aus und steht so der Reaktion nicht mehr zur Verfügung. Neben dem

TrisHCl Puffer (50 mM, pH 8) wurden der Citratpuffer (50 mM, pH 6), Kaliumphosphat-puffer (50 mM, pH 7) und Wasser mit 1 % NaCl getestet. Verwendet wurden auf 200 μ l Gesamtvolumen 20 μ l einer Mischung aus Glucose Oxidase (1 U/ml) und Meerrettich Peroxidase (>10 U/ml), 100 μ l Puffer (100 mM), 20 μ l Substratlösung (Methanol) und 60 μ l der für die Farbreaktionen benötigten Substrate. Einzige Ausnahme bildet hier der Purpald-assay. Das Reaktionsvolumen beträgt hier nur 150 μ l da nach der Reaktionszeit noch einmal 150 μ l (5 mg/ml Purpald, 5 M NaOH) hinzugegeben werden müssen (Volumen eines Wells 300 μ l).

Wie sich herausstellen sollte (Abbildung 50) ist der TrisHCl-Puffer ungeeignet für einen möglichen Kupplungsassay, da die Glucose Oxidase offensichtlich auch dazu in der Lage ist, die Alkoholgruppen des Puffers zu oxidieren, was dazu führte, dass selbst die Negativkontrollen farbig wurden. Demgegenüber treten diese Probleme bei dem Citrat und dem Kaliumphosphatpuffer nicht auf. Allerdings eignen sich beide Puffer nicht für den Assay basierend auf MBTH, Eisen(III) und Sulfaminsäure (Abbildung 49), da mit Phosphat das Eisen als unlösliches Eisenphosphat ausfällt und mit Citrat das Eisen komplexiert wird und damit ebenfalls aus dem System genommen wird.

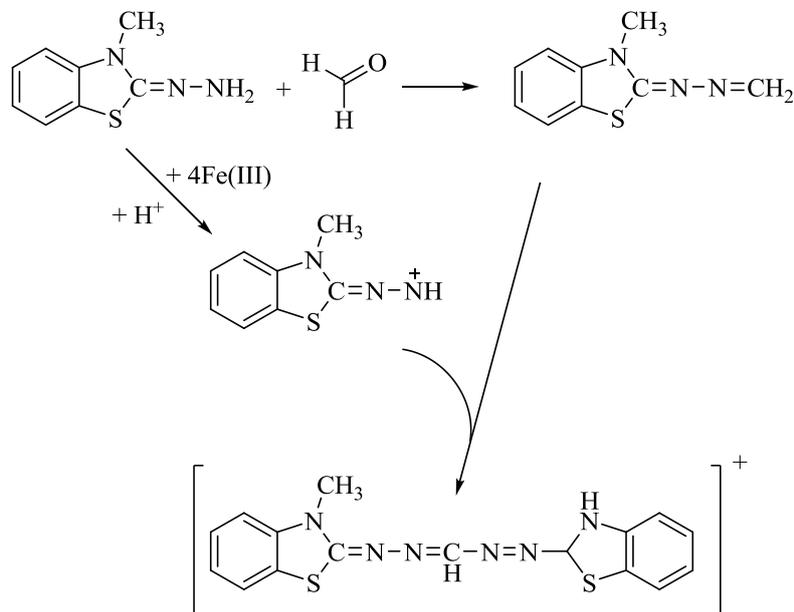


Abbildung 49 Kupplungsreaktion von MBTH mit Formaldehyd und Fe(III).



Abbildung 50 Links: Die unterschiedlichen getesteten Screenings von oben nach unten: Citrat-, TrisHCl-, Kaliumphosphatpuffer und 1% NaCl-Wasser-Lösung, nach 10 min Reaktionszeit bei 35 °C im Inkubator bei 180 rpm. Rechts: Identische Platte nach 60 min. Verfahren von oben nach unten: 1. 4-Aminoantipyrin + Vanillinsäure, 2. ABTS, 3. MBTH + Fe(III) + Sulfaminsäure, 4. Referenz 5. 2-Naphthol, 6. 4-Chlornaphthol, 7. 3,3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin, 8. Purpald. Methanolkonzentrationen von links nach rechts: 12,5 mM, 6,25 mM, 1,25 mM, 0,62 mM, 0,12 mM, 0,06 mM, 0,01 mM, 0,006 mM, 0,001 mM, 0,0001 mM, 0 mM.

Die Kupplungsreaktion mit ABTS (Abbildung 51) verläuft zwar sehr schnell und sensitiv, bildet aber auch unabhängig vom Puffer und der Anwesenheit von Substrat sehr schnell seine typische grüne Farbe aus. Aufgrund dieser Sensivität gegenüber äußeren Einflüssen ist ein Screening für die LDI mit ABTS ungeeignet.

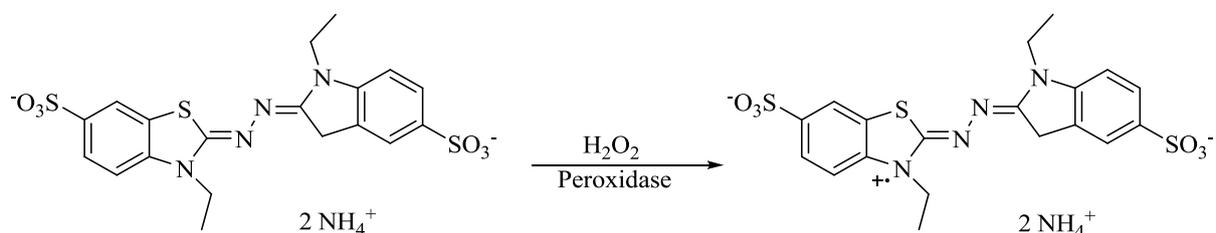


Abbildung 51 ABTS-Assay. Durch die Reaktion von H_2O_2 mit der Peroxidase bildet sich das stabile intensiv grüne Radikalkation des ABTS.

Die Kupplungsreaktion mit 4-Chlornaphthol ist zwar nicht so sensitiv wie die der anderen Reaktionen (bis etwa 0,6 mM), hat aber den Vorteil, dass sich während der Reaktion ein dunkelblauer, violetter Niederschlag ausbildet. Für das Spektrometer eher ungünstig könnte dieses Substrat aber vielleicht für einen möglichen Festphasenassay verwendet werden. Demgegenüber eignet sich 2-Naphthol aufgrund der nur schwachen Färbung nicht als Assaysubstrat (Abbildung 52). Auch konnte unter dem Spektrometer keine signifikante Fluoreszenz ausgemacht werden.

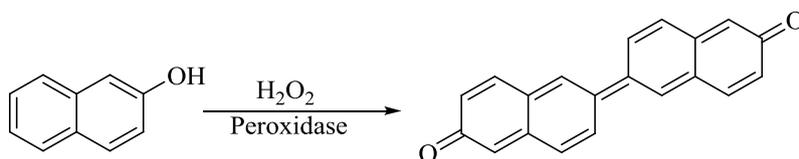


Abbildung 52 Kupplungsreaktion von 2-Naphthol mit H_2O_2 und Peroxidase. Das erhaltene Produkt kann durch Fluoreszenz detektiert werden. Die Reaktion mit 4-Chlornaphthol verläuft vergleichbar, doch fällt hier ein dunkelblauer, violetter Niederschlag aus.

Der 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidinassay ist etwas sensitiver als der 4-Chlornaphthol (bis etwa 0,06 mM). Bei hohen Methanolkonzentrationen ($>0,5$ mM) besitzt der Assay eine orange-rote Färbung während er bei niedrigeren Konzentrationen eine hellblaue Färbung aufweist. Allerdings verliert dieser Assay sehr schnell wieder seine Färbung, was deutlich daran zu erkennen ist, dass bei allen Puffern nach 60 min nur noch eine schwach gelbe Färbung zu sehen ist.

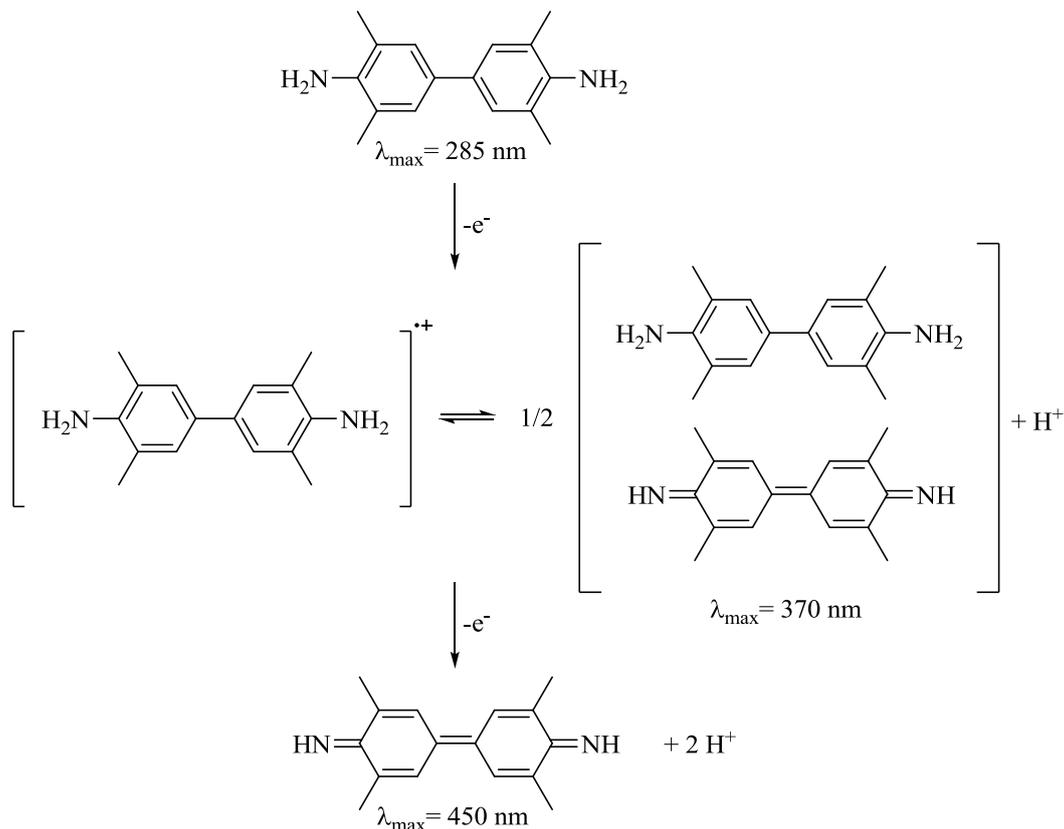


Abbildung 53 Die Kupplungsreaktion mit 3,3,5,5-Tetramethylbenzidin. Die Elektronen werden von der Meerettichperoxidase zur Spaltung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff verbraucht. Durch Ausbildung des vollständig durchkonjugierten π -Systems verschiebt sich das Absorptionsmaximum deutlich von 285 nm (UV-Bereich) in den sichtbaren Bereich (450 nm).

Der Purpaldassay aus Abbildung 54 benötigt deutlich länger zur Farbentwicklung, was daran zu sehen ist, dass die violette Färbung erst nach 60 min zu erkennen ist. Von der Sensitivität her ist der Assay in etwa vergleichbar mit dem TMB-Assay (Abbildung 53). Problematisch bei diesem Assay ist allerdings vor allem die Tatsache, dass die Farbreagenzien erst nach der Reaktion hinzugegeben werden können, da aufgrund der 5 M NaOH Lösung das Protein denaturiert. Dieses Problem tritt bei allen anderen Substraten zumindest in dieser Form nicht auf.

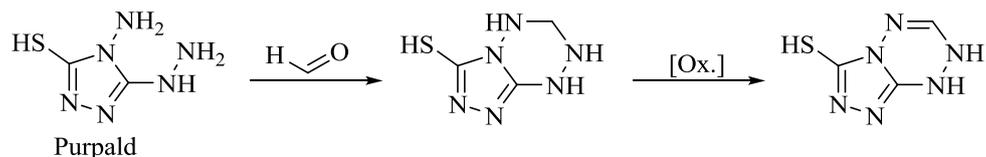


Abbildung 54 Die Farbreaktion des Purpaldassays.

Der 4-Aminoantipyrin-Assay (Abbildung 55), dessen rote Farbentwicklung durch Kupplung mit Vanillinsäure zustande kommt, ist ebenfalls vergleichbar aktiv wie der TMB-Assay oder

der Purpaldassay. Verglichen mit dem Purpaldassay entwickelt sich hier die Farbe aber schon in wenigen Sekunden. Da dieses Screening im Gegensatz zu dem TMB-Assay bei niedrigen Methanolkonzentrationen aber keine Farbe aufweist, wurde für die weiteren Tests der 4-Aminoantipyrin Assay verwendet. Zudem liegt die Methanol Grenzkonzentration, bei der sich mit bloßem Auge schon eine deutlich Farbänderung erkennen lässt, im Bereich von etwa 50-100 μM und ist damit im idealen Bereich für ein Screening selbst bei niedrigem Umsatz.

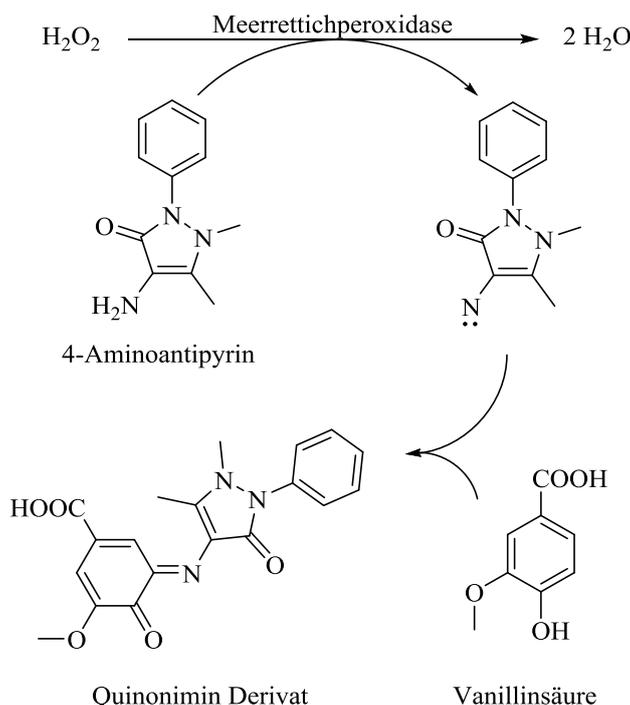


Abbildung 55 Kupplungsreaktion des 4-Aminoantipyrins mit Vanillinsäure. Im ersten Schritt wird das Amin des Antipyrins durch Wasserstoffperoxid und die Meerrettichperoxidase unter Ausbildung zweier Wassermoleküle oxidiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Ausbildung der Iminbindung zwischen dem elektronenarmen Stickstoff und dem elektronenreichen Kohlenstoff der Vanillinsäure in meta-Stellung zur Säurefunktion. Das ausgebildete Quinoniminderivat weist nach dieser Kupplungsreaktion die intensiv rote Farbe auf.

In weiteren Tests sollte das Lysat der LDI auf den Methylether von Linalool im 1000 μl Maßstab, identisch wie bei den Biotransformationen (Kap. 2.6.6), durchgeführt werden. Nach 60 min wurden die Farbreagenzien, sowie die Glucose Oxidase und die Meerrettich Peroxidase hinzugegeben. Bei Verwendung der gleichen Menge an Lysat wie in Kapitel 3.2.1 konnte leider keine Farbveränderung gegenüber der Negativkontrolle ausgemacht werden. Erst bei Verwendung der 8-fachen Menge an Lysat konnte eine leicht sichtbare Rotfärbung festgestellt werden (kein Bild). In weiteren Versuchen sollte das System auf 96-Well Platten übertragen werden. Problematisch wurde hier das man nur eine sehr begrenzte Menge an Lysat einsetzen konnte, da die maximale Absorption mit höheren Enzymkonzentrationen schnell erreicht wird.

Unter den verwendeten Bedingungen und unterschiedlichen Reaktionszeiten konnte im Spektrometer bei 562 nm allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und dem Lysat mit der LDI ausgemacht werden.

Der Versuch das System direkt auf Nitrocellulose als Festphasenassay zu übertragen, schlug ebenfalls fehl. Hierfür wurden Nitrocellulosemembranen auf frische Agarplatten gelegt und mit Zellen einer Übernachtskultur bestrichen. Nach dem Inkubieren über Nacht wurden die Cellulosemembranen mit etwa 2 ml LB-Medium, welches 0,5 mM IPTG enthielt getränkt und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Alternativ befand sich direkt im LB-Agarmedium IPTG was direkt nach dem Ausstreichen und dem über Nacht inkubieren zur Expression führen sollte. Im Anschluss wurden die Membranen isoliert und bei – 80 °C zur Zellyse eingefroren. Hiernach wurden das Substrat, sowie die Reagenzien 4-Aminoantipyrin und Vanillinsäure in Citratpuffer hinzugegeben, bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert und die Platten mit einer Negativkontrolle verglichen. Doch auch hier konnte keinerlei Verfärbung der Kolonien ausgemacht werden.

4. Diskussion

4.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung

Das von Novagen synthetisierte codonoptimierte Gen der LDI mit den Schnittstellen *NcoI* und *HindIII* wurde erfolgreich vermehrt und aus dem gelieferten Stamm und Plasmid isoliert. Die darauf folgende Expressionsstudie in BL21(*DE3*) und den Walker Stämmen C41(*DE3*) und C43(*DE3*) unter Verwendung unterschiedlicher Temperaturen (30 °C und 37 °C) sowie unterschiedlichen IPTG Konzentrationen (0,1, 0,25 und 0,5 mM) führten zu einer moderaten Expression in BL21(*DE3*) bei 0,5 mM IPTG. In den Walker Stämmen ließ sich hingegen nur durch Aktivitätsmessungen Expression feststellen. Interessanterweise waren in keinem der SDS-Gele Inclusion Bodies zu erkennen, was eventuell auf eine Überexpression aber inkorrekte Faltung zurückzuführen gewesen wäre. Weiterhin ist auch erstaunlich, dass dadurch das die LDI aus einem Proteobakterium stammt eigentlich hinsichtlich Sequenz keinerlei größere Probleme auftreten sollten, wie zum Beispiel bei Pflanzen- oder Insektenproteinen, welche eventuell noch weiter modifiziert hätten werden müssen. Auch diente die Codonoptimierung eigentlich der idealen Translation und Transkription in *E. coli*, was aber offensichtlich nicht immer von Vorteil ist. Interessant wäre der Vergleich gewesen die gleichen Expressionsstudien mit der Originalsequenz der LDI zu testen, ob die Probleme hier auch auftreten oder nicht. Eventuell ist es auch möglich, dass der His₆-Tag an sich zu Problemen bei der Faltung und somit zum Abbau führt.

Die anfangs getestete Aufreinigung an den Ni-NTA-HisTrap Säulen an der Äkta lief zwar erfolgreich, doch war aufgrund der niedrigen Konzentration der LDI, sowie der geringen Aktivität in den aufgereinigten Fraktionen eine Aufkonzentrierung erforderlich. Das allerdings während der Aufkonzentrierung das Protein schon in den Amicon Säulen trotz Verwendung DTT-haltigen Puffers aggregierte und hiernach nahezu keine Aktivität mehr vorhanden war, lässt auf eine große Sensibilität der LDI gegenüber äußeren Einflüssen wie Sauerstoff oder auch mechanischen Einflüssen oder Drücken schließen. Die Labilität gegenüber oxidativen Agenzien wie Sauerstoff wurde auch schon von Brodkorb *et al.* [95] beschrieben. Aus diesen Gründen, vor allem aber weil hiernach keine Aufkonzentrierung notwendig war, sollten statt der Ni-NTA-HisTrap Säulen die Co²⁺-haltigen Talon Säulen verwendet werden. Die großen Unterschiede zur Äkta mit der His-Trap Säule sind hierbei das geringe Elutionsvolumen von der Säule (3,5 ml) sowie die Tatsache, dass die Aufreinigung nach dem Gravitationsprinzip (kein Druck von außen) durchgeführt wurde. Das Problem hierbei war nur noch das aufgrund

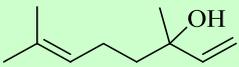
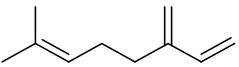
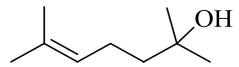
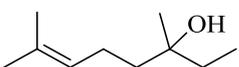
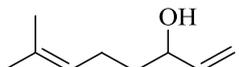
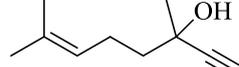
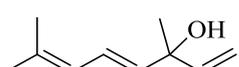
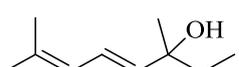
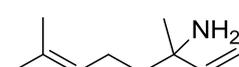
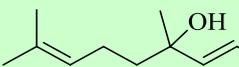
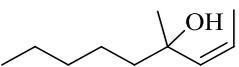
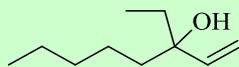
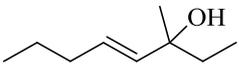
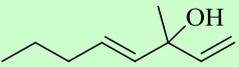
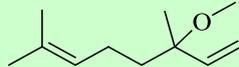
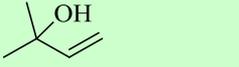
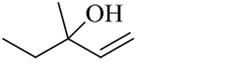
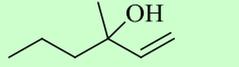
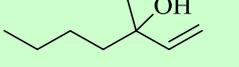
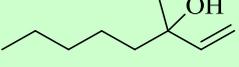
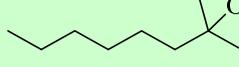
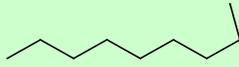
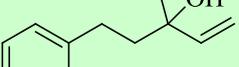
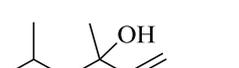
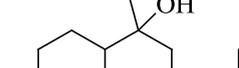
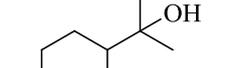
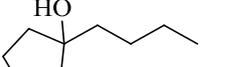
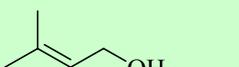
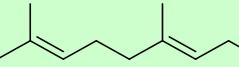
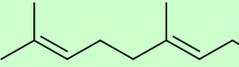
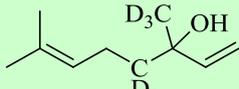
der moderaten Expression die Aufreinigung nicht optimal verlief. Trotz Verwendung von 30-50 ml Lysat, war die Menge an LDI nicht ausreichend um schwach bindende Proteine zu verdrängen, was eventuell daran lag, dass die Kapazität der Säule deutlich größer als die im Lysat vorhandene Menge an LDI war. Die weitere Aufreinigung wurde mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt. Das Problem bei der SEC liegt darin, dass die Aufreinigung nur bei einem sehr geringen Fluss durchgeführt werden kann. Dies bedeutet, dass bei einem Säulenvolumen von etwa 600 ml das Lysat inklusive der LDI über 10 Stunden durch die Säule fließt. Geringe Fluss- und somit Druckschwankungen können zu erheblichen Trennungsproblemen führen. Zwar führte diese Aufreinigungsmethode zu einer deutlichen Verbesserung der Reinheit allerdings auch zu einem erheblichen Verlust der Aktivität obwohl in dem verwendeten Puffer DTT enthalten war. Eventuell liegt das an der extrem langen Aufreinigungszeit bei der währenddessen nicht gekühlt werden konnte. Möglicherweise führt dies dazu, dass ein Teil der Proteine denaturiert und auf der Säule verbleibt was auch begründet weshalb deutlich weniger Protein von der Säule eluiert wurde.

Letzten Endes führen diese Probleme dazu, dass es besser wäre ein neues Expressionssystem in Betracht zu ziehen. Eventuell könnte der Austausch des T7 Promotors wie in pET der Fall durch Verwenden eines Plasmids mit dem T5 Promotor wie z.B. pBAD, pJOE oder pQE hierbei helfen. Auch könnte gleichzeitig durch Verwenden eines Plasmids hoher Kopienzahl wie pET durch eines mittlerer Kopienzahl wie pQE helfen, die Genexpression zu fördern. Neben dem T5 Promotor der verglichen mit dem T7 Promotor zu einer langsameren Expression führt, was eventuell zu einer besseren Faltung und somit zu weniger Proteolyse führt, könnte eventuell auch ein C-terminaler His₆-Tag zu einer deutlich besseren Expression führen.

Im Falle des pQE-Systems konnten indes schon erste vielversprechende Experimente mit pQE31 gemacht werden. Als Expressionsstämme wurden hier M15[pREP4] sowie JM109 gewählt.

4.2. Biotransformationen

Tabelle 23 Auflistung aller verwendeten Substrate. In grün sind die von der LDI akzeptierten Substrate dargestellt.

	1		2		3
	4		5		6
	7		8		9
	10		11		12
	13		14		15
	16		17		18
	19		20		21
	22		23		24
	25		26		27
	28		29		30
	31		32		33

4.2.1. Umsetzung der Substrate

Um die für die Umsetzungen optimalsten Bedingungen zu ermitteln, wurde zu Beginn eine pH-Puffer-Studie durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass ein leicht saurer pH-Wert von 6 mit dem Citratpuffer als unter den getesteten Puffern der geeignetste für die LDI war. Geht man davon aus, dass Dehydratisierungen generell bevorzugt im sauren Milieu durchgeführt werden, so geht dieses Ergebnis mit den Beobachtungen der chemischen Dehydratisierungen konform.

Da weder Kristallstruktur noch ein verlässliches Homologiemodell von der LDI bekannt sind, wurden mit Hilfe der in Abbildung 34 enthaltenen Substrate Informationen gesammelt, die dabei helfen sollten, den Mechanismus der Hydratisierung bzw. Dehydratisierung besser verstehen und identifizieren zu können. Die Frage ob das Motiv des α -Methylallylalkohols wie im Linalool oder das vergleichbare Motiv in Geraniol tatsächlich essentiell ist, sollte mit diversen Linaloolderivaten getestet und analysiert werden.

Hierbei wurden die in Abbildung 34 dargestellten Linaloolderivate synthetisiert. Aus den Ergebnissen (Tabelle 12), den umgesetzten sowie nichtumgesetzten Substraten, erfährt man einiges über den Mechanismus und über das aktive Zentrum. Vergleicht man die beiden Linaloolderivate **3** und **4** so fehlt diesen die endständige C=C Doppelbindung, welche gleichzeitig einen Verlust der Mesomeriestabilisierung eines möglichen Karbokation-Intermediats zur Folge hat. Möglicherweise übt die endständige Doppelbindung neben der Stabilisierung eines Karbokation-Intermediats zudem auch eine koordinativ-bindende Funktion für einen aktiven Enzym-Substrat Komplex aus. Allerdings wurde solch eine Funktion bezogen auf eine Vinylgruppe noch nie beschrieben, weswegen sich hier genauere Aussagen nur mit Hilfe einer Kristallstruktur vorhersagen lassen. Zwar wird die Protonierung der Hydroxyfunktion durch den Verlust der endständigen C=C Doppelbindung aufgrund der geringeren Elektronendichte und dem damit verbundenen erhöhten pK_s -Wert theoretisch vereinfacht, gleichzeitig wird die Bildung des Karbokationintermediates durch Wegfallen der Mesomeriestabilisierung allerdings deutlich erschwert.

Die beiden Substrate **5** und **12** dienten dazu herauszufinden welchen Einfluss die 1'-Methylgruppe hat und ob eventuell auch anderweitig protoniert werden kann, um den Alkohol zu Eliminieren. Von großem Interesse wäre die Eliminierung des sekundären Alkohols in Substrat **5** gewesen. Leider konnte in den Biotransformationen kein Produkt identifiziert werden. Dies lässt sich aber aus vielen Gründen erklären. Zum einen ist es sehr wahrscheinlich das die Methylgruppe die einzige Stelle ist die es der LDI ermöglicht, in direkter

Nachbarstellung zum Alkohol zu deprotonieren. Zum anderen sinkt die Stabilität des möglichen Karbokationintermediats was gleichzeitig zu einer deutlichen Änderung des pK_s -Wertes führt. Das Substrat **12** besitzt statt der 1'-Methylgruppe eine um ein Kohlenstoffatom verlängerte Ethylgruppe. Im Gegensatz zu **5** konnte das Substrat umgesetzt werden was deutlich zeigt, dass die zusätzliche CH_3 -Gruppe sterisch zwar etwas störend wirkt (vergleichsweise geringer Umsatz) aber die eigentliche Deprotonierung an der CH_2 -Gruppe dennoch zugelassen wird. Offensichtlich ist das aktive Zentrum ausreichend flexibel, um für die zusätzliche CH_3 -Gruppe genügend Raum zu stellen, damit die Deprotonierung nicht verhindert wird.

Die Substrate **7** und **8** unterscheiden sich von Linalool durch eine zusätzliche Doppelbindung zwischen C_3 und C_4 innerhalb des Moleküls, wohingegen Substrat **8** zusätzlich noch die endständige $C=C$ Doppelbindung vermisst. Substrat **7** sollte aufgrund der erhöhten Elektronendichte am tertiären C-Atom und der damit verbundenen zusätzlichen Stabilisierung des Karbokation-Intermediats protoniert bzw. dehydratisiert werden. Zudem würde bei erfolgreicher Dehydratisierung ein komplett durchgehend konjugiertes π -System ausgebildet werden, was die Reaktion aus chemischer Sicht deutlich vereinfachen sollte. Substrat **8** fehlt hingegen die externe Doppelbindung, deren Gewicht hinsichtlich des pK_s -Wertes der OH-Gruppe bzw. der Stabilisierung des Karbokation-Intermediats durch die interne Doppelbindung aufgewogen wird. Durch die Ausbildung eines dreifach konjugierten π -Systems dürfte die Dehydratisierung sogar noch etwas einfacher durchzuführen sein als beim Linalool. Aus elektronischer Sicht ist es also eigentlich nicht erklärbar, warum beide Substrate von der LDI nicht akzeptiert werden können. Allerdings besitzen beide Substrate gegenüber dem natürlichen Substrat Linalool aus sterischer Sicht eine deutlich größere Rigidität gegenüber Linalool, da ihnen die Möglichkeit der freien Drehbarkeit um die C_3 - C_4 Bindung fehlt. Um den Einfluss der internen Doppelbindung weiter zu testen, wurden die Substrate **13** und **14** synthetisiert und ebenfalls getestet. Bei beiden Substraten wurde die Prenylgruppe durch eine einfache Alkankette ersetzt, um den sterischen Einfluss zu verringern. Die sehr guten und vor allem schnellen Umsätze deuten darauf hin das Substrat **14** vermutlich sogar besser und schneller in das aktive Zentrum bindet und umgesetzt wird als das natürliche Substrat Linalool. Dies liegt vermutlich zum einen an der nicht vorhandenen Prenyleinheit und zum anderen an der zusätzlichen Mesomeriestabilisierung des Karbokation-Intermediats, die den Effekt der damit einhergehenden Erniedrigung des pK_s -Wertes mehr als aufhebt. Die Tatsache das Substrat **13** nicht umgesetzt werden konnte, lässt demgegenüber noch einmal deutlich werden, dass die externe C-C Doppelbindung für die LDI zwingend erforderlich ist, um aktiv zu binden, da hier weder der sterische Anspruch noch der pK_s -Wert Gründe für einen Nichtumsatz liefern.

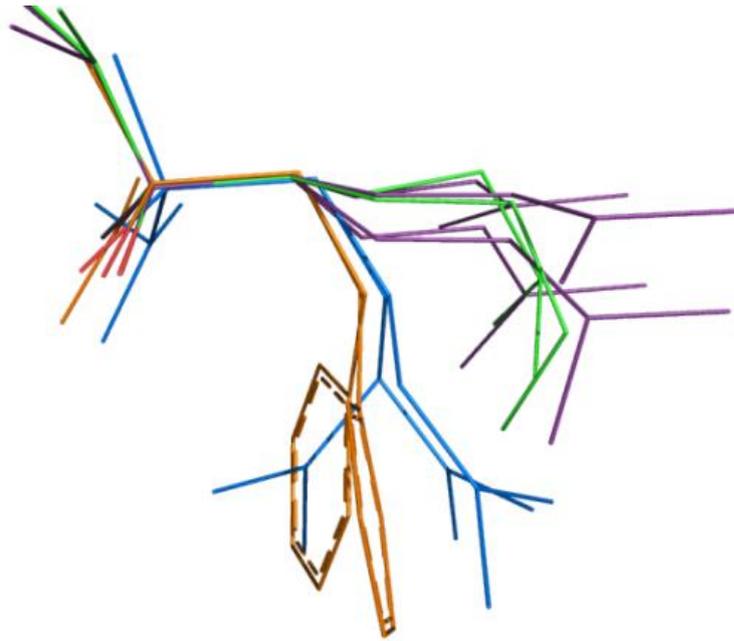


Abbildung 56 Rotamere der Substrate Linalool **1** (blau), **23** (orange), **14** (grün) und **7** (lila) mit Pymol überlagert. Die Region oben links stellt das spezifische α -Methylallylalkohol-Motiv, welches frei um die C-C Einfachbindung drehbar ist. Gezeigt sind die Zustände, welche den größten Unterschied der möglichen Rotamere ersichtlich werden lassen. Die Rotamere wurden mit Ex: OMEGA version 2.4.6. OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM erstellt und in Pymol überlagert.

Die in **Abbildung 56** gezeigten Rotamere der Substrate **1** (blau), **23** (orange), **14** (grün) und **7** (lila) verdeutlichen die großen Unterschiede der möglichen Rotamere zwischen den Substraten mit und ohne Doppelbindung. Deutlich zu sehen, gelingt es den Substraten **1** und **23** aufgrund der nicht vorhandenen internen Doppelbindung weit größere strukturelle Veränderungen einzugehen als **7** und **14**. Da aber neben **1** und **23** auch Substrat **14** in guten Ausbeuten in Biotransformationen umgesetzt worden ist, dürfte der Grund für die Nichtumsetzung von Substrat **7** einzig bei der zusätzlichen Methylgruppe und dem damit verbundenen größeren sterischen Anspruch liegen.

Schaut man sich die natürliche Reaktion an, die Dehydration von Linalool zu Myrcen, so wird deutlich das neben der Protonierung der Hydroxylgruppe auch die Deprotonierung an der Methylgruppe durchgeführt wird. Interessanterweise führt die Deprotonierung zum thermodynamisch ungünstigen Hofmann Produkt, was entgegen der Saytzeff Regel steht. Um die Wichtigkeit der Methylgruppe zu belegen, wurde der sekundäre Alkohol **5** synthetisiert. Jedoch konnte in Biotransformationen gezeigt werden, dass dieses Substrat von der LDI nicht

akzeptiert wurde. Offensichtlich ist die Methylgruppe essentiell für die Dehydratisierung. Vermutlich ist es aufgrund der Struktur der aktiven Tasche nicht möglich, eines der C₄-Wasserstoffe zu deprotonieren, um die C₃-C₄ Doppelbindung zu erhalten. Möglich ist auch das wegen der fehlenden Methylgruppe das Karbokation-Intermediat nicht mehr ausreichend stabilisiert werden kann.

Auch das substituierte Derivat Linalylamin **9** konnte von der LDI nicht umgesetzt werden. Struktur und sterischer Anspruch können aber aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit keinen Grund hierfür liefern. In der protonierten Form ist die Amin-Funktion eine etwas schwächere Abgangsgruppe als Wasser, was mit der etwas größeren Nukleophilie von Ammoniak gegenüber Wasser erklärt werden kann. Allerdings wiesen Biotransformationen nicht darauf hin das Ammoniak freigesetzt wurde. Die Inhibitorstudie die anschließend mit Linalylamin durchgeführt wurde, wies deutlich darauf hin, dass das Amin schon in sehr kleinen Mengen auf die LDI inhibierend wirkt was zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung gegenüber Linalool führte. Aufgrund der Annahme, dass der Mechanismus der LDI über einen kofaktorunabhängigen Säure-Base-Mechanismus verläuft, scheint das Linalylamin während der Reaktion in die aktive Tasche zu binden und somit die LDI zu blockieren. Möglicherweise bildet sich mit dem Amin eine ionische Bindung zwischen dem protonierten Amin (-NH₃⁺) und der deprotonierten Aminosäure (-COO⁻, -O⁻). Diese ionische Bindung verhindert vermutlich, dass das Amin aus dem aktiven Zentrum entlassen werden kann. Dies könnte letzten Endes zu einer kompletten Inaktivierung der LDI führen und erklären warum selbst bei 1000-fachem Substratüberschuss nur etwa 3 % des ohne Amin gebildeten Umsatzes erreicht wurden. Die für eine exakte Bestimmung der Inhibition benötigten Daten (k_i) konnten leider nicht ermittelt werden.

Auch das Alkinsubstrat **6** wurde nicht umgesetzt, obwohl die Protonierung der Alkoholfunktion aufgrund der elektronenschiebenden Wirkung der sp-Hybridisierung und der damit verbundenen Stabilisierung der Karbokationintermediats einfacher durchzuführen ist. Gleichzeitig verhindert womöglich die starre Alkinfunktion das Binden des Substrats in einer aktiven Konformation in der aktiven Tasche.

Die beiden Substrate **10** und **11** bei denen die Vinylgruppe um ein C-Atom verlängert wurde, wurden in Analogie zu dem natürlichen Substrat Geraniol synthetisiert. Bei Geraniol konnte das Konformationsisomer Nerol von der LDI nicht umgesetzt werden und genauso verhält es sich bei den beiden *cis-trans* Isomeren **10** und **11**. Interessanterweise konnte hier auch nur das

cis-Isomer umgesetzt werden was den Schluss zulässt das wegen sterischer Effekte des *trans*-Isomers dieses nicht in die aktive Tasche binden kann.

Mit dem Linaloolmethylether **15** wurde ein Substrat synthetisiert, dessen Protonierung des Sauerstoffs chemisch gesehen, aufgrund des induktiven Effekts und Hyperkonjugation der Methylgruppe einen etwas niedrigeren pK_B -Wert aufweist als bei Linalool **1**, ebenfalls bewerkstelligt werden sollte. Gründe für eine Nichtumsetzung wären also nur auf die Sterik oder fehlende Wechselwirkungen in der aktiven Tasche zurückzuführen. In den Biotransformationen konnte aber gezeigt werden, dass der Methylether von der LDI akzeptiert wurde und neben Myrcen **2** auch Linalool **1** als Zwischenprodukt identifiziert werden konnten. Daraus lässt sich schließen, dass die Protonierung des Sauerstoffs trotz der Methylgruppe während der Katalyse durch die LDI ermöglicht wird. Außerdem scheint auch der größere sterische Anspruch der Methylgruppe von der aktiven Tasche toleriert zu werden.

Die in Tabelle 13 gezeigten Substrate unterscheiden sich nur in der Kettenlänge voneinander. Erstaunlicherweise konnte das kleinstmögliche Substrat **16**, welches das α -Methylallylalkohol Motiv beinhaltet, sehr gut umgesetzt werden. Wegen des achiralen Alkohols unter den gegebenen Bedingungen sogar weit über die 50 % hinaus (67,5 %). Das Produkt, Isopren, ist für die Industrie von großem Interesse, wird hieraus doch das dem Naturkautschuk identische *cis*-Polyisopren gewonnen. Interessant ist in Reihe der Substrate auch, dass ausgerechnet das C_5 -Molekül **17** nicht umgesetzt werden konnte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ethylgruppe in Konkurrenz zur Vinylgruppe steht und nur schwer aus dem nicht-aktiven Substrat-Enzym-Komplex zu lösen ist. Allerdings ist eine Fixierung einer Ethylgruppe durch mögliche zwischenmolekulare Kräfte, wie die van-der-Waals-Kräfte, nicht stark genug, um so etwas zu ermöglichen. Eventuell blockiert die Ethylgruppe auch die richtige aktive Konformation, wozu eine Methyl- bzw. Propylgruppe nicht befähigt ist. Interessant wäre hier zu Wissen ob und wenn wie sich dieses Substrat als Inhibitor verhält. Von daher wären hier Biotransformationen wie sie mit Linalylamin durchgeführt worden sind sehr interessant.

Die Substrate mit einer Kettenlänge von C_6 bis C_{10} können hingegen sehr gut dehydratisiert werden. Der Umsatz erreicht bei den beiden Substraten **21** und **22** sogar etwa 90%. Was hier allerdings erstaunlich ist, ist, dass sich während der Reaktion im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Substraten, das Hofmannprodukt in deutlich wahrnehmbarem Ausmaß während der Reaktionszeit gebildet hat. Ist bei **18** und **19** nur sehr wenig des Hofmannprodukts zu sehen, so steigt der Anteil auf fast 50 % bei **21** und **22**. Gleichzeitig steigt der Umsatz auf über 90 % was sehr interessant ist, geht man davon aus, dass die Reaktion der LDI einer kinetischen

Racematspaltung unterliegt. Dies müsste nämlich bedeuten, dass das verbleibende Substrat einer Racemisierung unterliegt.

Aber wie kommt dies zustande? Und wie lässt sich dies mit steigender Kettenlänge vereinbaren?

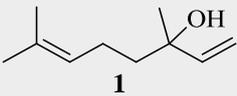
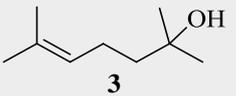
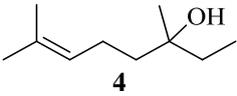
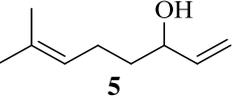
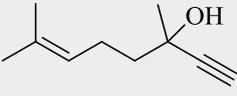
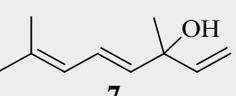
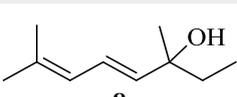
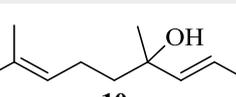
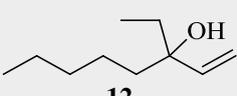
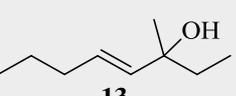
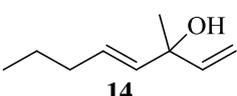
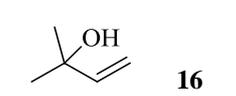
Interessant ist hierbei, dass das Hofmann-Produkt nur bei den Substraten aus Tabelle 13 detektiert werden konnte. Bei der Umsetzung von Linalool in Myrcen lässt sich das Hofmann-Produkt (β -Ocimen) auch nach 20 Stunden nicht in messbaren Mengen feststellen. Auch bei den anderen Substraten, die von der LDI akzeptiert wurden, konnte kein zweites Produkt in signifikanten Mengen festgestellt werden, was eine mögliche Puffer- oder pH-abhängige Racemisierung und Umlagerung ausschließt. Dies könnte eventuell dadurch überprüft werden, dass man die Dehydratisierung mit der LDI nach etwa 30 min abbricht, das Produkt isoliert und in den entsprechenden Puffern testet. Interessant ist auch die Tatsache, dass mit steigender Kettenlänge das Hofmann-Produkt in zunehmendem Ausmaß vorliegt, was eventuell auch auf eine Enzymabhängigkeit schließen lässt. Da bei den Biotransformationen mit Zell Lysat aus *E. coli* gearbeitet wurde, ist es durchaus möglich, dass hierbei Enzyme die Umlagerung oder/und die Racemisierung katalysieren. Diese These würde sich vermutlich auch durch Verwendung von aufgereinigtem Enzym bestätigen oder entkräften lassen. Alternativ könnte man auch versuchen nach einer bestimmten Zeit bei der der Umsatz nahe 50 % liegt, die Probe zu inaktivieren (auf 95 °C erhitzen) und den weiteren Verlauf der Produkte zu ermitteln. Zumindest lässt sich ausschließen ob Enzyme an der Racemisierung oder der Umlagerung beteiligt sind.

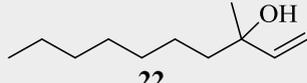
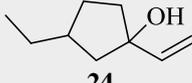
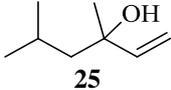
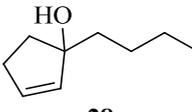
Abbildung 35 zeigt eine Reihe von zyklischen, aromatischen und verzweigten Substrate welche in Biotransformationen getestet wurden. Erstaunlicherweise konnte Substrat **25** im Gegensatz zu **24** nicht umgesetzt werden, obwohl sich **24** abgesehen von der um ein C-Atom verlängerte Kette nur durch die Ausbildung eines Cyclopentanringes von **25** unterscheidet. Allerdings scheint aufgrund der Ausbildung dieses Ringes der sterische Anspruch der zusätzlichen CH₂-Gruppe deutlich geringer zu sein, was sich auch in den deutlich besseren Ausbeuten zeigt. Vermutlich reicht schon die kleine Winkeländerung (120 ° vs 109,4 °) in den Bindungen aus, um den sterischen Wechselwirkungen entgegen zu wirken. Aufgrund dessen ist es also auch nicht verwunderlich das die aromatischen Substrate deren Benzylring am C₄ und C₅ Kohlenstoff anfangen, ebenfalls nicht akzeptiert wurden. Aus diesem Grund war es leider nicht möglich ein Screening auf Basis eines sich ausbildenden konjugierten π -Systems bei der Dehydratisierung zu entwickeln. Demgegenüber konnte das aromatische Substrat **23** in sehr guten Ausbeuten

umgesetzt werden. Dabei hat es den Anschein, dass sich ab dem sechsten C-Atom der Substratkanal öffnet und deutlich größere und verzweigtere Substrate zulässt. Leider konnten die Substrate Bisabolol **26**, Terpeneol **27** und **28** nicht umgesetzt werden, was im Falle von Terpeneol und Bisabolol vermutlich auf die fehlende Vinylgruppe und auf sterische Effekte zurückzuführen ist. Substrat **28** ähnelt im Prinzip dem *cis*-Substrat **11**, abgesehen von der endständigen Prenyleinheit und der Ausbildung des Cyclopentenringes innerhalb des aktiven α -Methylallylmotifs. Vermutlich verhindert die freie Drehbarkeit der „Vinyl“-Gruppe das aktive Binden des Substrats, da die Stabilität des Karbokation-Intermediats bzw. der pK_s -Wert keine Gründe für einen Nichtumsatz liefern.

Als weitere Hilfestellung bezüglich der Stabilität der Karbokation-Intermediate wurden von Herrn Prof. Kästner mit Hilfe von DFT-Rechnungen (Dichtefunktionaltheorie) die Energien der Hydrolytischen Spaltung von R-OH in R⁺ und OH⁻ von einigen ausgewählten Substraten berechnet. Die Berechnungen wurden mit B3LYP functional [131] und def2-SVP basis [132] in Turbomole V6.4 [133] durchgeführt. Die Geometrien wurden mit DL-FIND [134] in ChemShell [135] optimiert und in Turbomole übertragen.

Tabelle 24. Energien der hydrolytischen Spaltung ausgewählter Substrate.

	kJ/mol		kJ/mol
 1	996,1	 3	1027,5
 4	1014,2	 5	1031,9
 6	1015,1	 7	884,9
 8	891,0	 10	960,9
 12	1021,1	 13	981,3
 14	955,1	 16	1020,6

	1004,9		987,7
	1003,6		951,6

Die erhaltenen Energiewerte (Tabelle 24) sollten nicht als absolute Energiewerte verstanden werden, da die Rechnungen unter anderem aus der Gasphase betrachtet und mit isolierten, nicht solvatisierten Ionen durchgeführt wurden und somit nicht auf ein wässriges System übertragen werden können. Ebenso ist die genaue Geometrie wie sie innerhalb des aktiven Zentrums vorliegt unbekannt weswegen diese Werte nur Richtwerte darstellen. Dennoch lassen sich anhand der Werte untereinander sehr interessante Ergebnisse bezüglich der Stabilität des Carbokations schließen. Eine niedrigere Energie ist gleichbedeutend mit einem stabileren Carbokation und somit gleichbedeutend mit einer einfacheren Protonierung und Abspaltung der Hydroxylgruppe des entsprechenden Moleküls. Bemerkenswert ist vor allem das Substrat **13** dessen Carbokation stabiler ist als das des Linalools **1** und sterisch auch in der Lage ist in das aktive Zentrum zu gelangen (vgl. **14**). Dass dieses Substrat dennoch nicht umgesetzt werden konnte, kann also nur daran liegen, dass eben hier die endständige Vinylgruppe fehlt. Ebenso zeigt sich dies an den Energien der Substrate **12** und **16** im Vergleich zu Substrat **4**.

Betrachtet man nun die Energien der Carbokationen sowie die Substrate welche umgesetzt und welche nicht umgesetzt werden konnten, so lässt sich daraus schließen, dass die Protonierung, im Gegensatz zu sterischen Problemen, nicht der limitierende Faktor für ein größeres Substratspektrum ist. Vermutlich könnten sogar Substrate dehydratisiert werden die nicht im Besitz einer Doppelbindung in Allylstellung sind. Vergleicht man z. B. die sehr geringen Stabilitätsunterschiede zwischen **3**, **4**, **12** und **16** so könnte man auch hier mit relativer Gewissheit sagen, dass die Protonierung stattfinden kann. Da diese aber nicht akzeptiert worden sind, ist es zwingend erforderlich die Bedeutung der Vinylgruppe näher zu ermitteln. Eventuell lässt sich hier auch durch weitere Erforschung der Isomerisierung mehr über diese Doppelbindung herausfinden.

Trotz aller Limitierungen bezüglich des aktiven Motivs besitzt die LDI dennoch ein sehr großes Substratspektrum. Hierbei ist vor allem die Akzeptanz für besonders kleine und sehr lange Substrate wie auch die hohe Selektivität hervorzuheben.

4.2.2. Neue Reaktionen

Da gezeigt werden konnte, dass neben der Hydratisierung und Dehydratisierung von tertiären Alkoholen auch der Methylether defunktionalisiert werden konnte, sollte versucht werden den Mechanismus auch auf andere Systeme zu übertragen. Die Tatsache, dass bei der Hydratisierung die Methylengruppe bzw. bei der Dehydratisierung die Hydroxyfunktion protoniert wird, sollte verwendet werden, um die Carbonylgruppe einer Estergruppe zu aktivieren um den nukleophilen Angriff von Wasser wie es bei der Hydratisierung der Fall ist zu unterstützen. Die Verwendung von Ethyl-, Methyl- und Vinylestern sollte so weit wie möglich das von der LDI akzeptierte Motiv imitieren. Zudem wurden nur einfache Ester unterschiedlicher Kettenlänge ohne Verzweigungen verwendet. Zwar konnten unter Verwendung von semiaufgereinigtem Lysat alle verwendeten Ester zu einem gewissen Prozentsatz umgesetzt werden, allerdings konnten auch alle Negativkontrollen die Ester umsetzen. Angesichts der Tatsache, dass die aufgereinigte LDI auch noch andere Proteine in unbekannter Konzentration vorliegen hat, ist es schwer zu sagen ob hierbei nur die LDI den Umsatz verursacht hat oder eventuell bei der Aufreinigung auch Hydrolasen in angereicherter Form vorlagen. Neben den Hydrolasen besteht die Möglichkeit, dass die Ester bei dem pH-Wert von 8 spontan zerfallen. Der fast 10fache Überschuss an Lysat in der Kontrolle sollte dazu dienen einen Vergleich zur aufgereinigten LDI zu ziehen. Allerdings ist hier aufgrund der vergleichbaren Umsätze eine Aussage schwer zu treffen, da man nicht sagen kann ob bei der Aufreinigung nicht auch Hydrolasen angereichert worden sind, welche eventuell wegen ihres hohen Histidin-Anteils ebenfalls an die Talonsäulen binden können. Vergleicht man die Werte miteinander, so fällt auf, dass vor allem bei dem Decansäurevinylester die Differenz zwischen Kontrolle und LDI sehr gering ist (13 %), während bei dem Decansäuremethylester deutlich weniger umgesetzt wurde. Zudem beträgt die Differenz hier mehr als 50 %. Dass eine Kettenlänge von C₁₀ von der LDI bevorzugt umgesetzt wurde, konnte schon in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden. Zudem fördert vermutlich die Vinylgruppe wie sie in allen Substraten welche von der LDI umgesetzt werden konnten, die Bindung in das aktive Zentrum. Zwar könnte der erhöhte Umsatz auch durch das Freiwerden von Acetaldehyd gefördert werden, doch würde dies nicht den geringen Unterschied in den Umsätzen erklären. Eine sichere Aussage lässt sich anhand der bisherigen Ergebnisse bezüglich der Spaltung von Estern insbesondere von Methyl- und Ethylestern nicht treffen. Hierfür muss die LDI komplett aufgereinigt werden sonst lässt sich keine eindeutige Aussage treffen. Dass die LDI allerdings den Vinylester umsetzen kann, gilt anhand der geringen Unterschiede der Umsätze als sehr wahrscheinlich. Doch auch hier sollte die Reaktion mit aufgereinigter LDI wiederholt werden.

4.2.3. Nukleophile Addition

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Methylether des Linalools umgesetzt werden konnte, sollte versucht werden, auch die Rückreaktion also die nukleophile Addition von Methanol nachweisen zu können. Neben Methanol als Nukleophil wurden auch noch weitere Nukleophile wie Ethanol, Natriumazid, Phenol, Natriumthiocyanat, Mercaptoethanol und Propanthiol getestet. Allerdings konnte bis auf Methanol keine weitere Addition unter den getesteten Bedingungen bestätigt werden. Das Problem bei der nukleophilen Addition ist die Tatsache dass die Reaktionen in Wasser durchgeführt werden. Da Wasser an sich schon ein sehr gutes Nukleophil ist und im Puffer in 55,5 M Konzentration vorliegt, ist es sehr schwer den nukleophilen Angriff alternativer Substrate zu beobachten. Bei Methanol lässt sich vermutlich auch genau aus diesem Grund die Bildung des Methylethers des Linalools beobachten, da hier die Konzentration von Methanol (bei 30 v/v% ~9,3 M) verglichen mit Wasser (70 % ~ 39 M) immerhin zu etwa einem Viertel vorliegt. Doch auch hier können gerade einmal <1 % (0,07 %) Produkt ausgemacht werden. Die Tatsache, dass höhere Methanolkonzentrationen zu keinerlei Produkt führen, lässt zudem darauf schließen, dass diese ab mind. 50 % auf die LDI deutlich inhibierend wirken muss. Mit Ethanol konnte im Gegensatz zu Methanol bei allen getesteten Konzentrationen keine Produktbildung festgestellt werden. Leider konnte der Ethylether des Linalools im Sinne der Eliminierung nicht getestet werden, was Schlüsse auf die mögliche nicht vorhandene Produktbildung zugelassen hätte. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass aufgrund sterischer Wechselwirkungen die Limitierung in der Größe des Ethers sehr beschränkt ist, wie auch aus den Ergebnissen aus Kapitel 3.2.1 geschlossen werden kann. Ausgehend davon ist es auch nicht verwunderlich das die alternativen Nukleophile ebenfalls nicht zu einer Produktbildung führten, sind diese doch in ihrem sterischem Anspruch verglichen mit Methanol deutlich größer. Aufgrund der Tatsache das tertiäre Halogenide nicht stabil sind, wurde von der Addition mit Chlorid beziehungsweise Bromid abgesehen.

4.3. Studien zum Mechanismus

4.3.1. Experimente mit Deuterium

Im Zusammenhang mit Säure-Base-katalysierten Reaktionen sind kinetische Isotopeneffekte besonders interessant. Vor allem durch den Einfluss von D₂O auf die Reaktionsgeschwindigkeit können schon wichtige Aussagen über den Mechanismus getroffen werden. Neben diesen Lösungsmittelisotopeneffekten sollte auch durch Isotopensubstitution am Linalool der Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden. Bei Wasserstoff ist der Einfluss der Isotopensubstitution besonders groß, beträgt hier die Masse des Deuteriums doch doppelt so

viel wie die des Wasserstoffs. Durch die durchgeführten Experimente mit d^5 -Linalool sollte herausgefunden werden ob es sich bei der Reaktion um einen primären Isotopeneffekt oder einen sekundären Isotopeneffekten handelt. Zudem konnten mit D_2O als Lösungsmittel Aussagen über den kinetischen Lösungsmittelleffekt getroffen werden.

Schaut man sich die Ergebnisse der Reaktionen in unterschiedlichen Deuteriumoxidkonzentrationen allerdings genauer an, so können die extrem starken Unterschiede anhand der sekundären Isotopeneffekte nicht erklärt werden. So ist die „Reaktionsgeschwindigkeit“ der Hydratisierung von Myrcen in Wasser bei weitergeführter Annahme der Steigung der Geraden um den Faktor 6,4 größer als in Deuteriumoxid. Hier spielen allerdings mehrere Effekte eine wichtige Rolle, die den gravierenden Unterschied erklären können. Zum einen verläuft die Dissoziation von D_2O aufgrund der niedrigeren Nullpunktsenergie (basierend auf der doppelten Masse von D gegenüber H) deutlich langsamer als die von H_2O . Das bedeutet, dass das D_3O^+ -Ion als Säure deutlich schwächer ist als H_3O^+ . Zum anderen ist die Selbstdiffusion von D_2O aufgrund des dynamischen Isotopeneffekts deutlich kleiner als die von H_2O womit der deutliche Unterschied unter anderem erklärt werden kann. Außerdem ist es wegen der stärkeren O-D Bindung gegenüber der O-H Bindung deutlich schwerer, die Doppelbindung zu protonieren. Gleichzeitig ist H_2O ein deutlich besseres Nukleophil als D_2O .

Bei der Umkehrreaktion der Dehydratisierung verläuft die Reaktion in D_2O bei der Annahme der linearen Fortführung der Geraden auf 100 % D_2O etwa um den Faktor 1,8 schneller als in H_2O . Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass bei der Deprotonierung der Methylgruppe die Rückprotonierung mit Deuterium deutlich langsamer verläuft als mit Wasserstoff, da durch das Lösungsmittel D_2O dieses im großen Überschuss vorliegt. Gleiches gilt für das vermeintlich durch Protonierung intermediär gebildete Karbokation, dessen Rückreaktion mit H_2O ebenfalls durch den großen Überschuss an D_2O deutlich verringert wird. Zwar verläuft die Protonierung hiernach auch etwas langsamer als in Wasser, dennoch wird der Effekt durch die anderen offensichtlich mehr als aufgehoben.

Kinetiken und der Vergleich von Linalool mit d^5 -Linalool (Primärer Isotopeneffekt)

Das durch die Talonsäulen aufgereinigte Enzym, welches eine Reinheit von etwa 90 % hatte, wurde verwendet, um erste Kinetiken hinsichtlich ausgewählter Substrate zu erhalten. Drei Substrate, darunter das natürliche Substrat Linalool **1**, d^5 -Linalool **33** sowie das Substrat der Kettenlänge C_{10} **22** wurden für die spezifische Aktivität ausgewählt. Die Aktivitäten bewegten sich im Bereich von 1,17 U/mg bis zu etwa 1,43 U/mg Protein. Vergleicht man die Werte mit

den Ergebnissen der Umsetzungen in den Biotransformationen so stimmen diese in etwa überein. Interessanterweise ist Linalool offensichtlich nicht das Substrat, welches von der LDI am schnellsten umgesetzt werden kann. Das Substrat mit der Kettenlänge C₁₀ **22** konnte deutlich schneller umgesetzt werden, obwohl es von der Kettenlänge her deutlich länger ist als Linalool. Eventuell vermindert die Isopentylgruppe die Geschwindigkeit durch den Substratkanal in Richtung des aktiven Zentrums, während gleichzeitig die einfache Verlängerung der Alkankette keinen großen Einfluss darauf hat. Warum *d*⁵-Linalool etwas langsamer umgesetzt wurde, wurde schon in Kapitel 4.3.1 erwähnt.

In der Literatur [95] beträgt die spezifische Aktivität von Linalool etwa 140 nkatal/s was in etwa 8,4 U/min entspricht. Somit liegt die gemessene spezifische Aktivität für Linalool mit 1,21 U/min zwar im gleichen Bereich, ist aber dennoch um den Faktor 6 niedriger. Mögliche Gründe hierfür liegen vermutlich in der Analytik der beiden Messungen. Wurden bei Brodkorb *et al.* die wässrigen Proben direkt vermessen, so wurde die Probe in dieser Arbeit erst mit Cyclohexan extrahiert und danach analysiert. Das Problem bei Myrcen ist, dass die Löslichkeit in der wässrigen Phase sehr gering ist, was auch mit Verwendung von DMSO als Mediator nur zu einer verbesserten Suspension führt. Möglich wäre aber auch, dass der zusätzliche His₆-Tag zu Aktivitätsverlusten führt, sollte er sich im Bereich des Substratkanaleingangs befinden.

Der direkte Vergleich der Aktivitäten von Linalool mit *d*⁵-Linalool weist deutlich daraufhin, dass der Einbau von Deuterium einen nur sehr geringen Einfluss auf den Umsatz und die Aktivität hat. So sind die Differenzen beim Umsatz mit *d*⁵-Linalool (34,4±0,3 %) verglichen mit denen von Linalool **1** (35,1±1,6 %) sehr klein. Ebenso verhält es sich mit den spezifischen Aktivitäten mit 1,17 U/mg vs 1,21 U/mg. Würde im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Dehydratisierung von Linalool die Deprotonierung der C-H bzw. C-D Bindung eine essentielle Rolle spielen, so müsste die Differenz vor allem bei der spezifischen Aktivität deutlich größer sein (k_h/k_d bis zu 7). Da k_h/k_d aber bei etwa 1 liegt, lässt sich daraus ableiten das ausgehend von einem Säure-Base Mechanismus die Protonierung der Hydroxylgruppe eine deutlich wichtigere Rolle einnimmt als die Deprotonierung, was vermutlich auch daran liegt, dass bei Verlust der Hydroxylfunktion und Ausbildung eines Karbokationintermediats, die Abspaltung des Protons bzw. Deuteriums aufgrund der folgenden Ausbildung der C-C Doppelbindung deutlich vereinfacht wird.

4.4. Lösungsmittelstabilität

Aufgrund der Tatsache das Dehydratisierungsreaktionen in Wasser eher ungewöhnlich sind und viele Enzyme ihre Reaktionen in Lösungsmitteln abseits von Wasser teilweise deutlich besser katalysieren [136], sollte der Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die von der LDI katalysierten Reaktionen getestet werden.

Wie sich herausstellen sollte, ist gerade bei der Hydratisierung von Myrcen der Einfluss von Lösungsmitteln im speziellen von polar-protischen wie Methanol und Ethanol sehr positiv. Bei Konzentrationen von über 10 % ist die Produktausbeute nahezu verdoppelt. Auch bei DMSO, Aceton, Acetonitril und Ethylacetat konnte ein leicht positiver Einfluss ermittelt werden. Vergleicht man die Ergebnisse allerdings mit denen, in welchen das Lysat 15 min in den entsprechenden Lösungsmittelgemischen inkubiert wurde, so fällt auf, dass hier die Produktbildung deutlich niedriger ausfällt als in der Kontrolle ohne Lösungsmittel. Selbst niedrige Konzentrationen von etwa 10 % DMSO, Methanol und Ethanol bewirken eine 20 %-ige Abnahme an Produktbildung. Aus diesen Daten lässt sich gut herauslesen, dass egal welches Lösungsmittel verwendet wird, alle einen störenden Effekt auf die LDI ausüben. Die zu Beginn erhaltenen besseren Ausbeuten bei der Hydratisierung lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die deutlich bessere Löslichkeit des Myrcens zurückführen, das durch Verwendung von Lösungsmitteln schneller zur aktiven Tasche der LDI findet, als bei ausschließlicher Verwendung von Wasser. Dies wird vermutlich auch der Grund sein weswegen gerade mit wassermischbaren Lösungsmitteln die Produktbildung in den ersten 15 min noch größer ist als in der Kontrolle trotz inhibierender Effekte auf das Enzym an sich. Bei den nicht wassermischbaren Lösungsmitteln liegt das Myrcen wahrscheinlich in noch geringerer Konzentration in der wässrigen Phase vor als in der Kontrolle, weswegen die Ausbeuten hier doch deutlich geringer ausfallen.

Bei der Dehydratisierung von Linalool verhält es sich erstaunlicherweise mit der Ausbeute etwas anders. Hier wirken selbst schon 5 % an Lösungsmittel leicht inhibierend wobei die Effekte bei DMSO, Methanol, Ethanol, Aceton und Acetonitril noch vergleichsweise gering ausfallen. Dabei wäre aus chemischer Sicht gerade hier ein Anstieg der Ausbeute zu erwarten gewesen, wird doch durch den Einsatz von Lösungsmitteln die Rückreaktion aufgrund des geringeren Wasseranteils verlangsamt. Das dem besonders bei der Reaktion ohne Vorinkubation nicht entspricht, zeigen die Ergebnisse aus der Hydratation von Myrcen. Womöglich wird durch Verwendung von Lösungsmitteln die Rückreaktion soweit beschleunigt das sich dies im Prinzip verlangsamt auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Dehydratisierung

auswirkt. Die mit Wasser nicht oder nur schlecht mischbaren Lösungsmittel wirken sich hingegen noch viel deutlicher negativ auf die Ausbeute aus. Schon mit 10 % haben wir hier nur noch max. 20 % bei Toluol, während mit den anderen Lösungsmitteln Ethylacetat, THF und Dichlormethan nur noch etwa 10 % an Produkt gegenüber der Kontrolle gebildet werden. Bei 50 % Lösungsmittel, unabhängig davon welches, findet bei der Dehydratisierung nahezu keine Produktbildung mehr statt. Einzig bei Toluol und Dichlormethan verbleiben noch etwa 10-20 % Restaktivität, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass bei gegebenen Bedingungen die Durchmischung nicht ausreichend war. Möglicherweise führt dies zu einer guten Phasentrennung durch die die Wahrscheinlichkeit der Enzyme an den Grenzflächen denaturiert zu werden aufgrund der geringeren Oberfläche (vgl. Suspension) kleiner war als bei den anderen Lösungsmitteln. Erstaunlicherweise wirken sich zumindest DMSO, Methanol, Ethanol und Aceton bis 10 % während 15-minütiger Vorinkubation nicht negativer auf die Produktbildung aus als das Puffersystem an sich. Höhere Konzentrationen allerdings bewirken einen starken Aktivitätsverlust der LDI. THF als Lösungsmittel hingegen führt schon bei Verwendung von 10 % zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der LDI. Demgegenüber verbleibt bei den Lösungsmitteln Toluol und Dichlormethan in den Konzentrationen 30 beziehungsweise 50 % eine relativ große Restaktivität, die sich deutlich von denen der wassermischbaren Lösungsmittel unterscheidet.

Im Prinzip lässt sich sagen, dass Lösungsmittel auf die LDI in natürlichem Zustand keinen positiven Einfluss ausüben und meist sogar sehr schnell zu deutlichen Aktivitätseinbußen führen. Die kurzen Aktivitätsteigerungen bei der Hydratisierung lassen sich auf deutlich bessere Löslichkeit des Substrats zurückführen. Aber auch hier zeigt sich bereits nach kurzer Inkubation, dass die hierdurch gewonnene schnellere Umsetzung zu Beginn gegenüber dem Aktivitätsverlust nach kurzer Zeit schnell ins Hintertreffen geht. Im Prinzip ist die Labilität von Enzymen gegenüber organischen Lösungsmitteln nicht verwunderlich, was unter anderem von A. Klibanow schon mehrfach beschrieben wurde [137].

4.5. Homologiemodellierung

Beginnend mit einer BLAST-Suche nach ähnlichen Enzymen auf Basis der Protein- und der Nukleotidsequenz der LDI sollte nach Verwandten oder ähnlichen Proteinen in der Datenbank gesucht werden. Doch auch drei Jahre nach der Erstveröffentlichung der Sequenz von Brodkorb *et al.* hat sich bezüglich der LDI in Sachen ähnlicher Sequenzen nicht viel getan. Brodkorb *et al.* stuften die LDI damals aufgrund mangelnder Sequenzidentität mit anderen Enzymen als ein Enzym einer eigenen Klasse unter den Hydro-Lyasen ein. Doch auch die seither neu

beschriebenen, komplett sequenzierten Genome und veröffentlichten Gendaten in den Gendatenbanken führten zu keinerlei neuer Erkenntnis bezüglich der LDI. Von daher wurde auf Basis unterschiedlicher Algorithmen mit Hilfe des Programmes PSI-PRED eine Sekundärstrukturvorhersage durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 44 zu sehen ist. Auf Basis dieser und anderer Eigenschaften wurden im Folgenden mit Hilfe der Online-Server MUSTER, LOMETS und I-TASSER mögliche Homologiemodelle erstellt (Abbildung 45). Auch wenn sich aufgrund der sehr schlechten Sequenzidentitäten keine 100 %-ige Aussage über die wahre Struktur der LDI treffen lässt, so ist es doch relativ sicher, dass das Grundgerüst der LDI tatsächlich dem vorhergesagten $(\alpha/\alpha)_6$ Motiv sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch ist. Interessant ist hierbei, dass alle drei Server größtenteils auf unterschiedliche Algorithmen zugreifen und auch die Vorlagen für die Homologiemodelle teilweise sehr unterschiedlich waren. Dennoch wies nahezu jedes Modell die $(\alpha/\alpha)_6$ Grundstruktur auf. Die hierbei auftretende fassartige Struktur könnte ein erstes Indiz dafür sein, warum vor allem langkettige Substrate ohne große Verzweigungen gut umgesetzt werden können. Auffällig ist, dass alle Enzyme die als Vorlage dienten als Funktion die Spaltung und Veränderung von komplexen Zuckermolekülen haben. Zum Beispiel beteiligt sich die Alginat Lyase am Abbauweg des Polysaccharids Alginat [138] und die Cellobiose-2-Epimerase katalysiert die Epimersierung von Cellobiose in 4-O- β -D-glucopyranosyl-D-mannose [139]. Weitere sehr prominente Enzyme, die aus diesem $(\alpha/\alpha)_6$ Fassstrukturmotiv aufgebaut sind, sind die Di- und Triterpenzyklen [140]. In Abbildung 57 ist hier ein Homodimer der Squalen-Hopen Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* sowie eine einzelne $(\alpha/\alpha)_6$ Einheit zur Veranschaulichung dargestellt. Auch die Zyklen besitzen eine sehr große Akzeptanz für sehr große Moleküle was auch an Ihren Edukten (Di-, Sesqui- oder Triterpene) und deren zyklischen Produkten zu sehen ist.

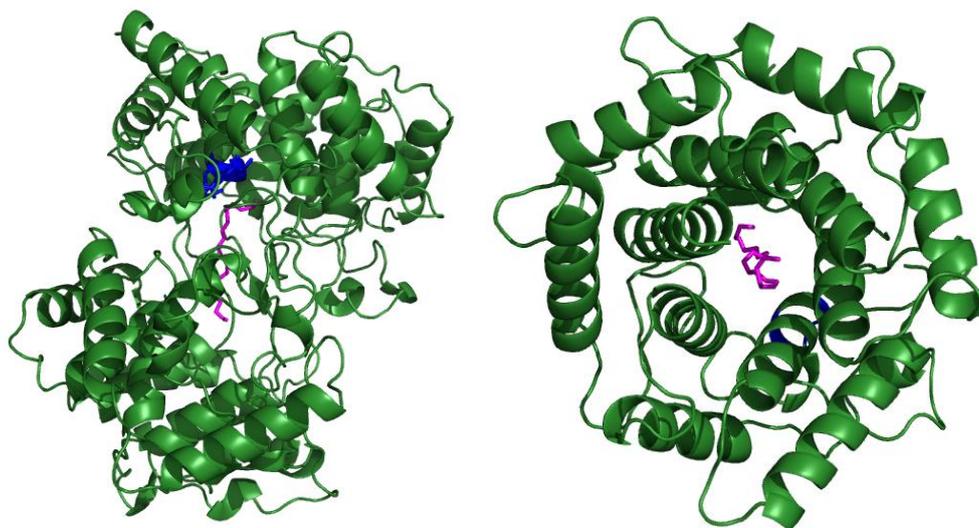


Abbildung 57 Links: Homodimer einer Squalen-Hopfen Zyklase (AacSHC). Das aktive DDXD-Motiv (blau) sitzt am unteren Ende einer $(\alpha/\alpha)_6$ Fassstruktur. Zwischen den beiden $(\alpha/\alpha)_6$ Fassstrukturen des Homodimers liegt das Substrat Squalene (Magenta). Rechts: Von-oben Ansicht der oberen $(\alpha/\alpha)_6$ Fassstruktur.

4.6. Entwicklung eines High-throughput Screenings

Bisher ist es nicht möglich die LDI gezielt zu verändern, da weder eine Kristallstruktur noch ein verlässliches Homologiemodell zur Verfügung steht. Ein weiteres Problem ist zusätzlich das auf Basis der natürlichen Reaktion keine Chance besteht ein Screening zu entwickeln. Die Dehydratisierung bzw. die Hydratisierung bieten an sich ebenfalls keinen Anhaltspunkt für ein mögliches Verfahren, da die Detektion einzelner Wassermoleküle in einem wässrigen Puffer eher schwierig wird. Auch die beiden natürlichen Substrate bieten trotz Ausbildung der konjugierten Doppelbindung im Myrcen keine Möglichkeit hierfür. Dies liegt daran, dass die Absorption von Myrcen im Bereich < 250 nm in den Konzentrationen in denen es vollständig gelöst ist, zu niedrig ist, um signifikante Unterschiede ersichtlich werden zu lassen.

Die Überlegung ein Verfahren zu entwickeln, das auf der Dehydratisierung eines Substrats welches in näherer Umgebung zu dem tertiären Alkohol ein aromatisches System besitzt, war somit der nächste Anlauf. Das Problem hierbei war allerdings, dass die Substrate die hierfür dienen sollten, als solche von der LDI nicht akzeptiert worden sind. Dies lag sehr wahrscheinlich daran, dass der aromatische Ring zu nah an dem für die Dehydratisierung notwendigen Motiv lag. Vergleicht man das Substrat **25** aus den Biotransformationen mit dem aromatischen Substrat **23**, so wird dies noch einmal offensichtlich.

Mit der Eliminierung von Methanol aus dem Linaloolmethylether **15** eröffnete sich eine neue Möglichkeit ein Screening zu entwickeln. Methanol lässt sich durch die Glucose Oxidase in Formaldehyd oxidieren, währenddessen sich als Nebenprodukt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bildet. Wasserstoffperoxid dient als Grundlage für eine Vielzahl von Kupplungsreaktionen, die mit der Meerrettichperoxidase durchgeführt werden können. Nach dem einige dieser Reaktionen getestet worden sind, stellte sich heraus, dass das Verfahren welches auf Aminoantipyrin und Vanillinsäure basiert, aufgrund seiner hohen Sensitivität und schnellen Farbauscheidung, am geeignetsten schien. Da eine erste Vorkontrolle mit sehr viel Lysat tatsächlich in einer Rotfärbung endete, sollte versucht werden dieses System auf 96 Well Platten zu übertragen. Hierbei musste allerdings festgestellt werden, dass die verwendeten Mengen an Enzym, bzw. die Aktivität des Lysats nicht ausreichte, um im Spektrometer eine signifikante Änderung der Absorption bei 562 nm gegenüber der Negativkontrolle zu erreichen. Vergleicht man dies mit dem Ergebnis aus den Biotransformationen (0,3 % Umsatz nach 20 h) so wird deutlich, dass es zwingend notwendig ist, die Expression für dieses System zu optimieren. Aus dem gleichen Grund hat vermutlich auch der Festphasenassay nicht zu dem gewünschten Ergebnis geführt. Ein weiteres Problem bei zu geringer Reaktionsgeschwindigkeit ist die Tatsache, dass bei Verwendung von Lysat auch noch andere Enzyme in der Verstoffwechslung von Methanol eine Rolle spielen können. Dazu kommt, dass das Wasserstoffperoxid ebenfalls von im Lysat enthaltenen Enzymen abgebaut werden kann und somit als Reagenz der Kupplungsreaktion entzogen wird.

Dennoch ist ein Screening basierend auf der Eliminierung von Methanol die vielversprechendste Möglichkeit. Aufgrund der Tatsache, dass mit einer ausreichenden Menge an Protein die Reaktion auch in guten Umsätzen katalysiert werden kann, muss ein besseres Expressionssystem entwickelt werden. Helfen könnten hier auch Substrate die besser als der Methylether des Linalools **15** umgesetzt werden können. Vergleicht man die Ergebnisse aus den Biotransformationen, so könnten zum Beispiel die Methylether der Substrate **14**, **16**, **22** oder auch **23** als Alternative dienen. Auch könnte man die Ether von Substraten herstellen, wie z.B. **7**, **25** und **28**, die nur schwach umgesetzt werden konnten, um Mutationen zu finden die die aktive Tasche vergrößern um die Akzeptanz gegenüber sterisch anspruchsvolleren Substraten zu erhöhen. Eventuell könnte man für ein Vorscreening auch auf die Dünnschichtchromatographie zurückgreifen.

5. Ausblick

Die Möglichkeiten mit der Linalool-Dehydratase Isomerase tertiäre Alkohole zu dehydratisieren, sind bisher auf α -Methylallylalkohole mit Ausnahme von **12** und **24** begrenzt. Warum die Vinylgruppe essentiell für die Umsetzung ist, lässt sich vermutlich erst sicher durch eine Proteinkristallstruktur mit aktiv gebundenem Substrat bestimmen. Sollte sich das Expressionssystem mit pQE31 etablieren, so wäre hierbei eventuell die Möglichkeit gegeben, die LDI in ausreichender Menge zu exprimieren, so dass man über die Talonsäulen eine ausreichende Reinheit für mögliche Kristallisationsstudien erreicht. Die hierbei erworbene Möglichkeit mit Hilfe der Bioinformatik die Tertiär- und Quartärstruktur sowie das aktive Zentrum der LDI zu ermitteln, lässt viele Möglichkeiten zur weiteren Forschung hinsichtlich Mechanismus und Substratspezifität offen. Die Fähigkeit das aktive Zentrum zu verändern, einzelne Aminosäuren auszutauschen, ermöglicht es uns gezielt spezifische Eigenschaften zu verändern. Eventuell lässt sich somit das Substratspektrum vergrößern oder aber auch so zu verändern, dass man neben tertiären Allylalkoholen auch tertiäre oder sekundäre Alkohole dehydratisieren kann. Die Tatsache das die LDI selbst sehr kleine Moleküle akzeptiert, wie zum Beispiel 2-Methyl-3-buten-2-ol **16** und Prenol **29** deren Dehydratisierung zu Isopren führt, lässt die LDI vor allem für die Industrie interessant werden. Eine biotechnologische Syntheseroute zu Isopren wäre von daher äußerst attraktiv. Ein in dieser Richtung äußerst interessantes Patent von MetabolicExplorer beschäftigt sich mit der Biosynthese von Prenol, einer Vorstufe von Isopren [141] (Abbildung 58). Der fehlende Schritt von Prenol zu Isopren kann hier mit der LDI vervollständigt werden.

Aber auch Substrate wie Isopropanol, *tert*-Butanol aber auch MTBE, Hydroxytetrahydrofuran oder gar Ethanol versprechen ein immenses Potential. Andere interessante Aufgabengebiete für die LDI sind aber auch die selektive Hydratisierung und Dehydratisierung. Zum Beispiel gibt es bisher keine direkte selektive Synthese für Licareol (*R*)-Linalool und Coriandrol (*S*)-Linalool, welche vor allem in der Aromen- und Duftstoffindustrie in Waschmitteln, Parfüm- und Healthcareprodukten Verwendung finden. Da die LDI *S*-spezifisch de-/hydratisiert, lässt sich durch Dehydratisierung des racemischen Linalools einfach (*R*)-Linalool herstellen, ebenso wie aus Myrcen selektiv (*S*)-Linalool synthetisiert werden kann. Hierbei ist allerdings die Ausbeute von (*S*)-Linalool durch Hydratisierung von Myrcen noch relativ schlecht. Vielleicht lässt sich hier die Ausbeute dadurch steigern, indem man eine enzymatisch gekoppelte Veresterung mit Hilfe von Lipasen in Linalylacetat in Betracht zieht und somit den Alkohol dem Gleichgewicht der Reaktion entzieht.

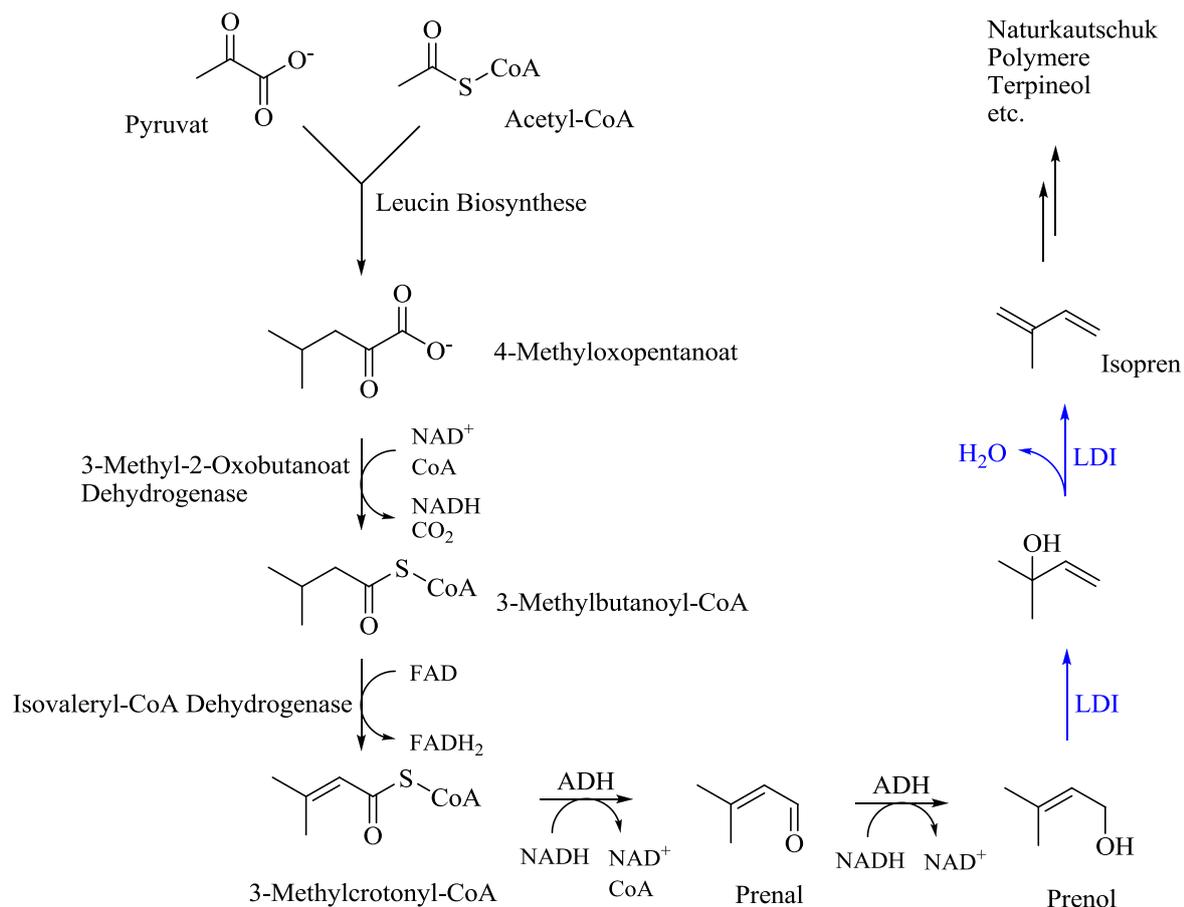


Abbildung 58 Biosynthese von Prenol nach Metabolic Explorer. Die fehlenden Schritte von Prenol zu Isopren lassen sich einfach mit der LDI vervollständigen.

Wie gezeigt werden konnte, lassen sich mit Hilfe polar-protischer Lösungsmittel wie Methanol oder Ethanol die Ausbeuten der Hydratisierung steigern. Allerdings verliert das Enzym bei andauernder Inkubation schnell seine Aktivität in den entsprechenden Lösungsmitteln. Durch Mutationen beweglicher Aminosäureregionen bzw. einzelnen Aminosäuren, die man über den B-Faktor bestimmen kann, können sich hier womöglich deutlich größere Resistenzen gegenüber Lösungsmitteln aufbauen und somit der Umsatz vor allem bezüglich der Hydratisierung steigern lassen [142]. Der B-Faktor lässt Aussagen über die Beweglichkeit der Aminosäuren des gesamten Proteins zu und wird mit dem Röntgendiffraktometer gemessen. Im Prinzip beschreibt der B-Faktor die mittlere Abweichung der durchschnittlichen Lage eines Atoms (Moleküls). Durch weitere Veresterung zu Linalylacetat ((*R*)/(*S*)-Linalylacetat) ebenso wie durch Zyklisierung zu Linalooloxid kommt man hier zu weiteren begehrten Substraten der Duftstoffindustrie. Das relativ große Substratspektrum der LDI ermöglicht hierbei eine Vielzahl vereinfachter Synthesen für die entsprechenden (*R*)- bzw. (*S*)-Enantiomere gewünschter Substrate und ist von daher äußerst interessant vor allem da sich durch die selektive Synthese viele neue Verwendungszwecke erschließen.

Bei ausreichender Proteinexpression und dementsprechend aktivem Lysat könnte auch die Eliminierung von Methanol als Ausgangspunkt für diverse Mutationsstudien dienen. Das Aminoantipyrin-Vanillinsäure Screening eignet sich hervorragend aufgrund der hohen Sensitivität für unspezifische Mutationsstudien wie error-prone PCR. Vermutlich können manche Methylether auch schneller als der Linaloolmethylether **15** umgesetzt werden, wie es auch bei der Dehydratisierung der Fall gewesen ist. Eventuell könnten hier die Methylether der Substrate **14**, **16**, **22** oder **23** einen guten Dienst erweisen. Im Idealfall lässt sich auch ein Festphasenscreening entwickeln bei dem man die einzelnen Kolonien nach Aktivität screenen kann. So könnte eine deutliche Farbintensitätssteigerung auf höhere Aktivität aber auch auf eine mögliche verlorene Selektivität und Spezifität hindeuten. Ebenso lässt sich zudem auch nach neuen Substraten screenen.

6. Anhang

6.1. Analytik

GC-Methodenfiles und Säulen:

Für die quantitative Analyse wurde, sofern möglich, das GC-FID (Shimadzu GC-2010er Serie) verwendet. Als Säule wurde eine HP5-Säule von Agilent (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) verwendet.

Temperaturprogramm für die Substrate mit einem Siedepunkt von bis ca. 170 °C: Starttemperatur 80 °C für 2 min halten, mit 10 °C/min auf 150 °C heizen und mit 70 °C/min auf 310 °C heizen und die 310 °C für 1 min halten.

Temperaturprogramm für die Substrate mit einem Siedepunkt größer als 170 °C: Starttemperatur 100 °C für 2 min halten, mit 10 °C/min auf 210 °C heizen und mit 70 °C/min auf 310 °C heizen und für 1 min halten.

Für die sehr kleinen Substrate musste für die quantitative Analyse die GC-MS-Headspace verwendet werden (Shimadzu GCMS-2010er Serie) verwendet werden. Als Säule wurde eine DB5-MS Säule von Agilent (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) verwendet.

Temperaturprogramm: Starttemperatur 45 °C für 3 min halten, mit 5 °C/min auf 55 °C heizen, mit 10 °C/min auf 80 °C heizen und mit 70 °C/min bis 310 °C heizen und für 2 min halten.
Cyclerprogramm: 2,5 mL Headspace-Spritze, Inkubationstemperatur: 95 °C, Inkubationszeit: 3 min, Sprizentemperatur: 120 °C. Verwendeter Split: 50.

Zur Analyse des Enantiomerenüberschusses wurde eine Supelco β-DEX 225 Säule (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm) verwendet. Temperaturprogramm: Starttemperatur 70 °C für 2 min halten, mit 3 °C/min auf 125 °C heizen und mit 40 °C/min auf 225 °C heizen und für 2 min halten.

6.2. Chromatogramm der Umsetzung des Methylethers 15

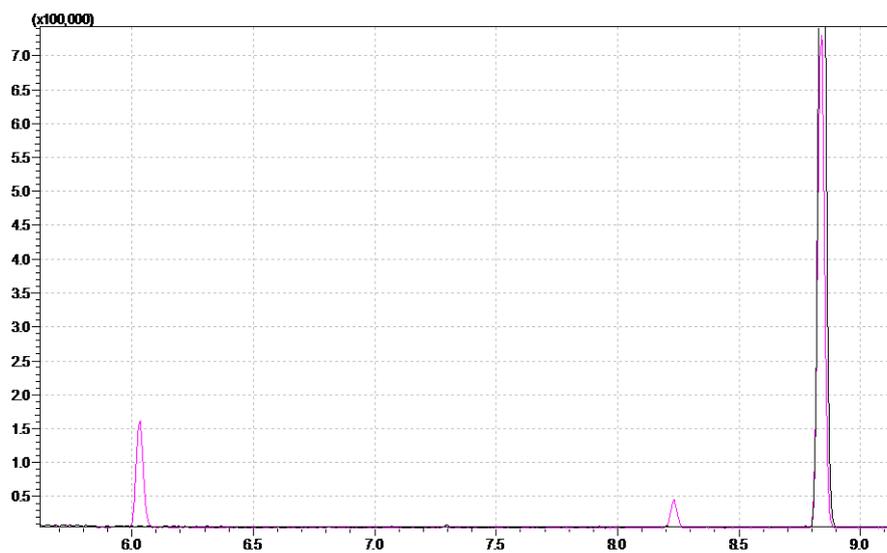


Abbildung 59 Chromatogramm der Dehydratisierung von Methoxylinalool. Die Negativkontrolle (schwarz) unterscheidet sich deutlich von der Umsetzung mit der LDI. Der Peak mit der Retentionszeit von 8,8 min entspricht dem Ether **15**, der Peak bei 8,25 min dem Linalool und der Peak bei 6,05 min dem Myrcen.

6.3. Plasmidkarten

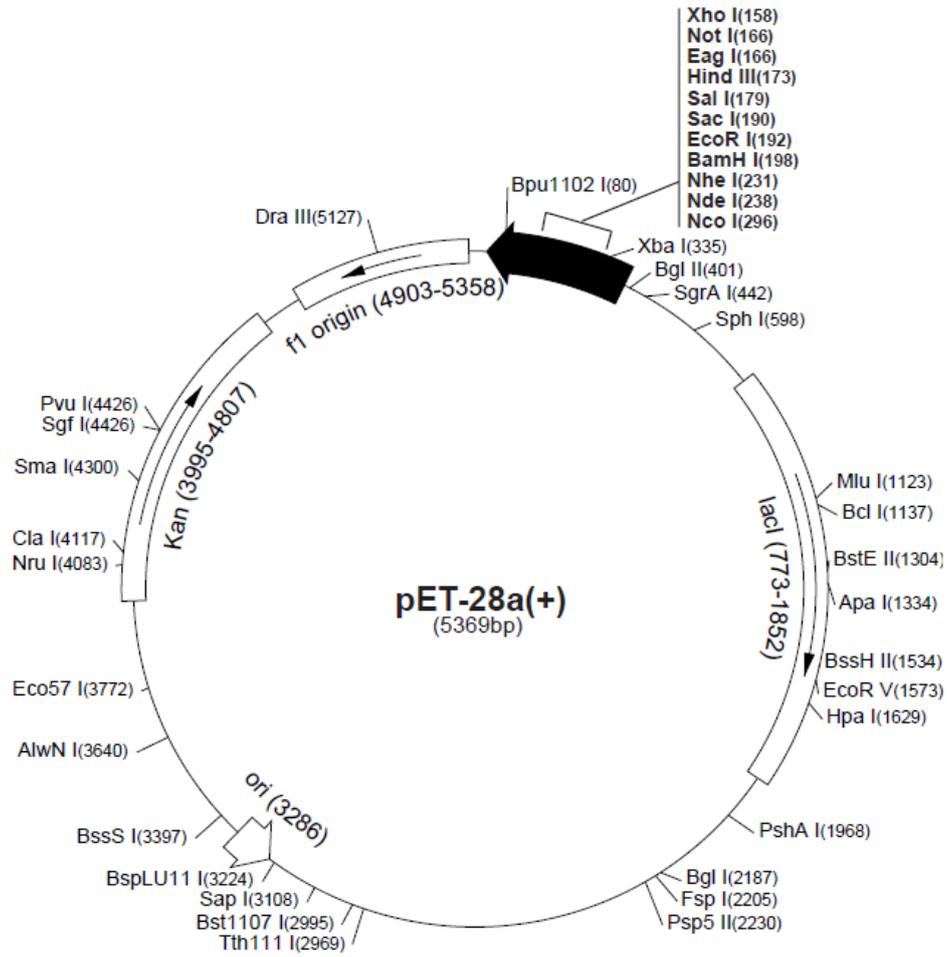


Abbildung 60 Plasmidkarte pET28a(+)(Novagen)

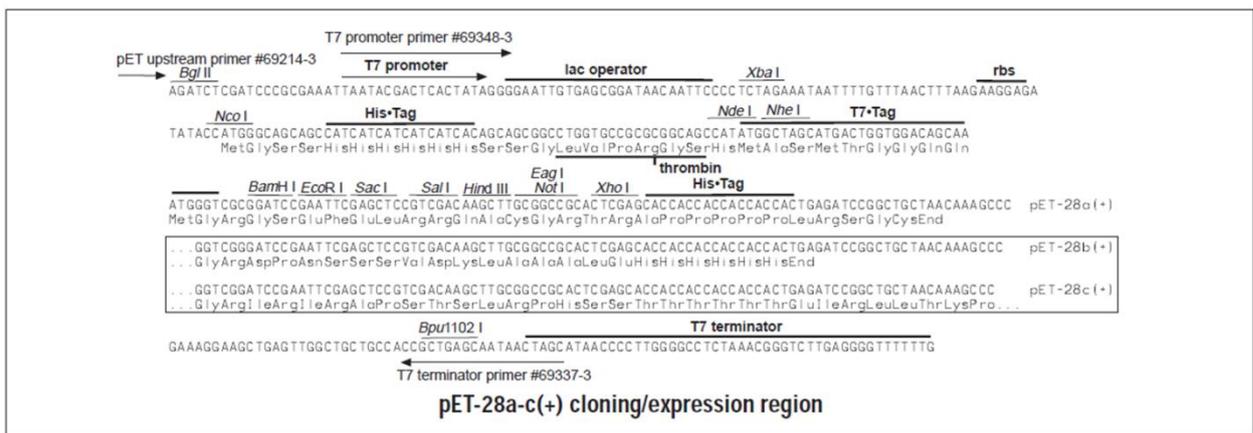


Abbildung 61 Multiple Cloning Site (Novagen)

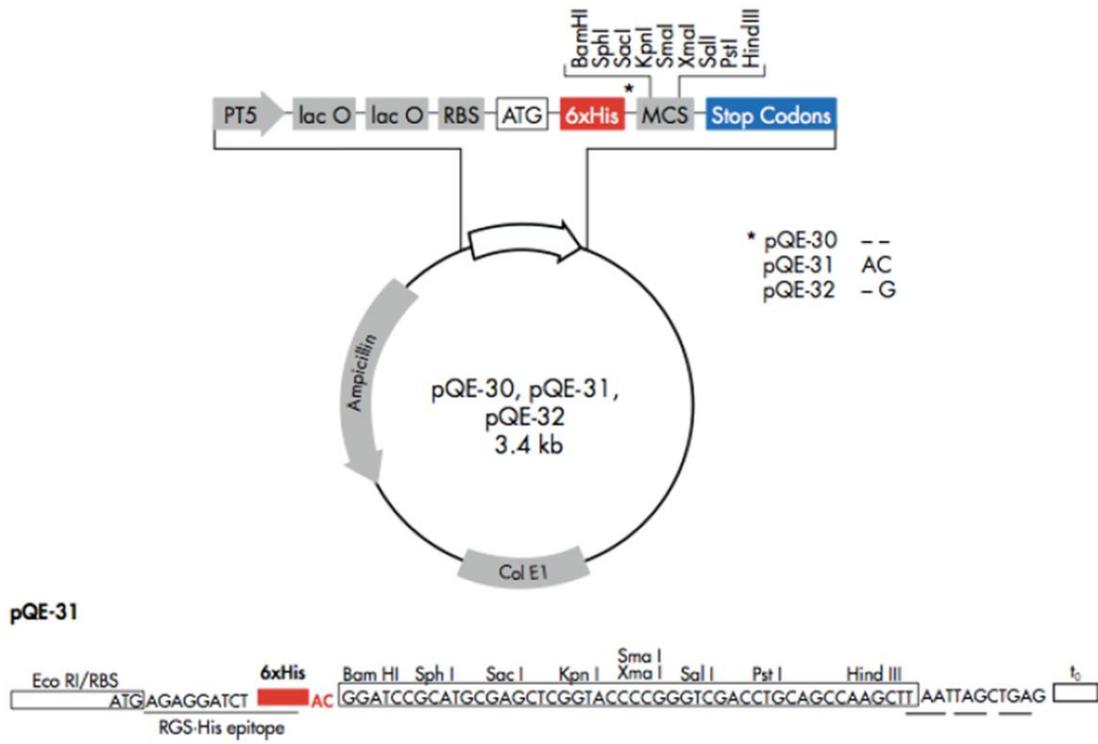


Abbildung 62 pQE-Vektor (Qiagen) inklusive der multiplen Cloning Site (weißer Pfeil).

7. Literaturverzeichnis

1. Umweltbundesamt, *Gutachten 2012: Umweltauswirkungen von Fracking bei der Aufsuchung und Gewinnung von Erdgas aus unkonventionellen Lagerstätten*. 2012.
2. H. Andrulleit, A.B., H.G. Babies, D. Franke, J. Meßner, R. Pierau, M. Schauer, S. Schmidt, S. Weihmann, *Energiestudie 2013. Reserven, Ressourcen und Verfügbarkeit von Energierohstoffen (17)*. 2013, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR): Hannover. p. 112 S.
3. M. Balat, H.B., *Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel*. Applied Energy, 2009. **86**: p. 2273-2282.
4. Kovarik, B., *Henry Ford, Charles Kettering and the Fuel of the Future*. Automotive History Review, 1998. **32**: p. 7-27.
5. services, E.c., *Sugar and ethanol production potential: Ord river stage II*. 2007, Economic consulting services: Mt. Pleasant WA 6153. p. 59.
6. P. Imhof, J.C.v.d.W., *Catalytic Process Development for Renewable Materials*. 2013: Wiley-VCH-Verlag.
7. de Jong, E., Higson, A., Walsh, P., Wellisch, M., *Bio-based Chemicals - Value added products from biorefineries*. 2013, IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery. p. 1-36.
8. Ceresana, *Marktstudie Butadien*. 2013, Marktforschungsinstitut Ceresana: Konstanz.
9. Ceresana, *Marktstudie Ethylen*. 2014, Marktforschungsinstitut Ceresana.
10. APA/Reuters/bral *OMV investiert 230 Millionen Euro in Raffinerie-Ausbau*. 2013.
11. Yim, H., et al., *Metabolic engineering of Escherichia coli for direct production of 1,4-butanediol*. Nature Chemical Biology, 2011. **7**(7): p. 445-452.
12. Lane, J., *Genomatica and DuPont Tate & Lyle Bio Products Successfully Produce 1,4-Butanediol (BDO) on Commercial Scale*. 2013: Loudon, Tenn. and San Diego, Cal.
13. Fernandez-Arrojo, L., et al., *Metagenomic era for biocatalyst identification*. Current Opinion in Biotechnology, 2010. **21**(6): p. 725-733.
14. MacDonald, M.J. and G.B. D'Cunha, *A modern view of phenylalanine ammonia lyase*. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire, 2007. **85**(3): p. 273-282.
15. Evans, C.T., et al., *Production of Phenylalanine Ammonia-Lyase (Pal) - Isolation and Evaluation of Yeast Strains Suitable for Commercial Production of L-Phenylalanine*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1987. **25**(5): p. 406-414.
16. Yadav, S., et al., *Pectin lyase: A review*. Process Biochemistry, 2009. **44**(1): p. 1-10.

17. Arpe, H.-J., Weissermehl, K., *Industrielle organische Chemie*. Wiley-VCH-Verlag, 1998. **5te Auflage**.
18. Brown, C.A., Coleman, R. A., *Selective hydroboration of double bonds in the presence of triple bonds by 9-borabicyclo[3.3.1]nonane. A new route to acetylenic organoboranes and alcohols*. Journal of Organic Chemistry, 1979. **44**(2328).
19. Kumar, K.S.R., S. Baskaran, and S. Chandrasekaran, *An Unusual Antimarkovnikov Hydration of Alkenes with Titanium(III) Tetrahydroborates*. Tetrahedron Letters, 1993. **34**(1): p. 171-174.
20. Ranu, B.C., R. Chakraborty, and M. Saha, *An Unusual Regioselective Anti-Markovnikov Hydration of Alkenes with Zinc Borohydride on Silica-Gel Support*. Tetrahedron Letters, 1993. **34**(29): p. 4659-4662.
21. Schnapperelle, I., W. Hummel, and H. Groger, *Formal Asymmetric Hydration of Non-Activated Alkenes in Aqueous Medium through a "Chemoenzymatic Catalytic System"*. Chemistry-a European Journal, 2012. **18**(4): p. 1073-1076.
22. Xue, L., et al., *The asymmetric hydration of 1-octene to (S)-(+)-2-octanol with a biopolymer-metal complex, silica-supported chitosan-cobalt complex*. Reactive & Functional Polymers, 2004. **58**(2): p. 117-121.
23. Xue, L., et al., *Asymmetric hydration of alkenes catalyzed by wool-palladium complex*. Polymers for Advanced Technologies, 2004. **15**(6): p. 346-349.
24. Boersma, A.J., et al., *Catalytic enantioselective syn hydration of enones in water using a DNA-based catalyst*. Nature Chemistry, 2010. **2**(11): p. 991-995.
25. Korstanje, T.J., et al., *Rhenium-Catalyzed Dehydration of Nonbenzylic and Terpene Alcohols to Olefins*. ACS Catalysis, 2012. **2**(10): p. 2173-2181.
26. Weitkamp, J., *Zeolites and catalysis*. Solid State Ionics, 2000. **131**(1-2): p. 175-188.
27. Puppe, L., *Zeolithe - Eigenschaften und technische Anwendungen*. Chemie in unserer Zeit, 1986. **4**: p. 117-127.
28. Höldrich, W., Hesse, M., Näumann, F., *Zeolithe: Katalysatoren für die Synthese organischer Verbindungen*. Angewandte Chemie-International Edition, 1988. **100**: p. 232-251.
29. Breck, D.W., *Zeolite Molecular Sieves*. 1974, New York: Wiley.
30. Masahiro, T., Yohei, Fukuoka, *Verfahren zur Herstellung eines cyclischen Alkohols*, A.K.K. Kaisha, Editor. 1985: Japan.
31. M. Baerns, A.B., A. Brehm, J. Gmehlig, K.-O. Hinrichsen, H. Hofmann, U. Onken, R. Palkovits, A. Renken, *Technische Chemie*. Vol. 2. Auflage. 2013: Wiley-VCH.

32. C. Housecroft, A.G.S., *Inorganic Chemistry (2nd Edition)*. Vol. 2. 2004: Prentice Hall.
33. Janik, M.J., et al., *Correlating Acid Properties and Catalytic Function: A First-Principles Analysis of Alcohol Dehydration Pathways on Polyoxometalates*. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009. **113**(5): p. 1872-1885.
34. Gelbard, G., *Organic synthesis by catalysis with ion-exchange resins*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2005. **44**(23): p. 8468-8498.
35. Harmer, M.A. and Q. Sun, *Solid acid catalysis using ion-exchange resins*. *Applied Catalysis a-General*, 2001. **221**(1-2): p. 45-62.
36. Choi, E.T., et al., *Asymmetric dehydration of beta-hydroxy esters and application to the syntheses of flavane derivatives*. *Tetrahedron*, 2008. **64**(7): p. 1515-1522.
37. Choi, E.T., et al., *Asymmetric dehydration of beta-styryl-beta-hydroxy esters and application to the synthesis of a neoflavonoid*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2008. **29**(4): p. 859-862.
38. Lee, M.H., et al., *Kinetic Resolution of beta-Alkenyl-, beta-Alkynyl- and beta-Flavanyl-Substituted beta-Hydroxy Esters in Asymmetric Dehydration*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008(33): p. 5630-5637.
39. Du, Z.X., et al., *Highly enantioselective biomimetic intramolecular dehydration: kinetic resolution of beta-hydroxy ketones catalyzed by beta-turn tetrapeptides*. *Tetrahedron Letters*, 2013. **54**(22): p. 2828-2832.
40. Prescott, J. and G. Bell, *Cross-Cultural Determinants of Food Acceptability - Recent Research on Sensory Perceptions and Preferences*. *Trends in Food Science & Technology*, 1995. **6**(6): p. 201-205.
41. Zhang, E., et al., *Mechanism of enolase: The crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolase-phosphoenolpyruvate at 2.0 angstrom resolution*. *Biochemistry*, 1997. **36**(41): p. 12526-12534.
42. Brewer, J.M., *Increase in Yeast Enolase Fluorescence Produced by Substrates and Competitive Inhibitors in Presence of Excess Mg²⁺*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1971. **250**(1): p. 251-&.
43. Wu, L., S.P. Lin, and D. Li, *Comparative inhibition studies of enoyl-CoA hydratase 1 and enoyl-CoA hydratase 2 in long-chain fatty acid oxidation*. *Organic Letters*, 2008. **10**(15): p. 3355-3358.

44. Bahnson, B.J., V.E. Anderson, and G.A. Petsko, *Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: Three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion*. *Biochemistry*, 2002. **41**(8): p. 2621-2629.
45. Lloyd, S.J., et al., *The mechanism of aconitase: 1.8 angstrom resolution crystal structure of the S642A : citrate complex*. *Protein Science*, 1999. **8**(12): p. 2655-2662.
46. Yogev, O., A. Naamati, and O. Pines, *Fumarase: a paradigm of dual targeting and dual localized functions*. *Febs Journal*, 2011. **278**(22): p. 4230-4242.
47. Weaver, T., et al., *Crystal structures of native and recombinant yeast fumarase*. *Journal of Molecular Biology*, 1998. **280**(3): p. 431-442.
48. Jin, J.F. and U. Hanefeld, *The selective addition of water to C=C bonds; enzymes are the best chemists*. *Chemical Communications*, 2011. **47**(9): p. 2502-2510.
49. Findeis, M.A. and G.M. Whitesides, *Fumarase-Catalyzed Synthesis of L-Threo-Chloromalic Acid and Its Conversion to 2-Deoxy-D-Ribose and D-Erythro-Sphingosine*. *Journal of Organic Chemistry*, 1987. **52**(13): p. 2838-2848.
50. Vanderwerf, M.J., W.J.J. Vandentweel, and S. Hartmans, *Purification and Characterization of Maleate Hydratase from Pseudomonas-Pseudoalcaligenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993. **59**(9): p. 2823-2829.
51. Dreyer, J.L., *Isolation and Biochemical-Characterization of Maleic-Acid Hydratase, an Iron-Requiring Hydro-Lyase*. *European Journal of Biochemistry*, 1985. **150**(1): p. 145-154.
52. Palmer, D.R.J., et al., *Importance of mechanistic imperatives in enzyme-catalyzed beta-elimination reactions: Stereochemical consequences of the dehydration reactions catalyzed by D-galactonate dehydratase from Escherichia coli and D-glucarate dehydratase from Pseudomonas putida*. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(40): p. 9580-9581.
53. Rakus, J.F., et al., *Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: D-Mannonate dehydratase from Novosphingobium aromaticivorans*. *Biochemistry*, 2007. **46**(45): p. 12896-12908.
54. Daniel, R., T.A. Bobik, and G. Gottschalk, *Biochemistry of coenzyme B-12-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes*. *Fems Microbiology Reviews*, 1998. **22**(5): p. 553-566.
55. Kajiura, H., et al., *Molecular basis for specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol and glycerol dehydratases*. *Febs Journal*, 2007. **274**(21): p. 5556-5566.

56. Toraya, T., *Radical catalysis of B-12 enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000. **57**(1): p. 106-127.
57. Liao, D.I., et al., *Structure of glycerol dehydratase reactivase: A new type of molecular chaperone*. Structure, 2003. **11**(1): p. 109-119.
58. Shibata, N., et al., *Release of a damaged cofactor from a coenzyme B-12-dependent enzyme: X-ray structures of diol dehydratase-reactivating factor*. Structure, 2005. **13**(12): p. 1745-1754.
59. Shibata, N., et al., *Structural rationalization for the lack of stereospecificity in coenzyme B-12-dependent diol dehydratase*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(25): p. 22717-22725.
60. de Guzman, D. *Bio-1,3 PDO market update*. 2013.
61. Rosner, B.M. and B. Schink, *Purification and Characterization of Acetylene Hydratase of Pelobacter-Acetylenicus, a Tungsten Iron-Sulfur Protein*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**(20): p. 5767-5772.
62. tenBrink, F., B. Schink, and P.M.H. Kroneck, *Exploring the Active Site of the Tungsten, Iron-Sulfur Enzyme Acetylene Hydratase*. Journal of Bacteriology, 2011. **193**(5): p. 1229-1236.
63. Seiffert, G.B., et al., *Structure of the non-redox-active tungsten/[4Fe : 4S] enzyme acetylene hydratase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(9): p. 3073-3077.
64. Yadav, J., S.K. Das, and S. Sarkar, *A functional mimic of the new class of tungstoenzyme, acetylene hydratase*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(18): p. 4315-4316.
65. Yamada, E.W. and W.B. Jakoby, *Enzymatic Utilization of Acetylenic Compounds .2. Acetylenemonocarboxylic Acid Hydrase*. Journal of Biological Chemistry, 1959. **234**(4): p. 941-945.
66. Basarab, G.S., et al., *Catalytic mechanism of scytalone dehydratase: Site-directed mutagenesis, kinetic isotope effects, and alternate substrates*. Biochemistry, 1999. **38**(19): p. 6012-6024.
67. Kihara, J., et al., *Cloning, functional analysis and expression of a scytalone dehydratase gene (SCD1) involved in melanin biosynthesis of the phytopathogenic fungus Bipolaris oryzae*. Current Genetics, 2004. **45**(4): p. 197-204.

68. Motoyama, T., K. Imanishi, and I. Yamaguchi, *cDNA cloning, expression, and mutagenesis of scytalone dehydratase needed for pathogenicity of the rice blast fungus, Pyricularia oryzae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998. **62**(3): p. 564-566.
69. Jordan, D.B., et al., *Catalytic mechanism of scytalone dehydratase from Magnaporthe grisea*. *Pesticide Science*, 1999. **55**(3): p. 277-280.
70. Lundqvist, T., et al., *Crystal-Structure of Scytalone Dehydratase - a Disease Determinant of the Rice Pathogen, Magnaporthe-Grisea*. *Structure*, 1994. **2**(10): p. 937-944.
71. Yamada, N., et al., *Enzymatic characterization of scytalone dehydratase Val75Met variant found in melanin biosynthesis dehydratase inhibitor (MBI-D) resistant strains of the rice blast fungus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004. **68**(3): p. 615-621.
72. Hiseni, A., I.W.C.E. Arends, and L.G. Otten, *Biochemical characterization of the carotenoid 1,2-hydratases (CrtC) from Rubrivivax gelatinosus and Thiocapsa roseopersicina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011. **91**(4): p. 1029-1036.
73. Sun, Z.T., et al., *A novel carotenoid 1,2-hydratase (CruF) from two species of the non-photosynthetic bacterium Deinococcus*. *Microbiology-Sgm*, 2009. **155**: p. 2775-2783.
74. Phadwal, K., *Carotenoid biosynthetic pathway: molecular phylogenies and evolutionary behavior of crt genes in eubacteria*. *Gene*, 2005. **345**(1): p. 35-43.
75. L. L. Wallen, R.G., Benedict, and R. W. Jackson, *The microbial production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1962. **99**: p. 249-263.
76. Kusic, A., Y. Miura, and Schroepf.Gj, *Oleate Hydratase - Studies of Substrate Specificity*. *Lipids*, 1971. **6**(8): p. 541-&.
77. Niehaus, W.G. and Schroepf.Gj, *Reversible Hydration of Oleic Acid to 10d-Hydroxystearic Acid*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1965. **21**(3): p. 271-&.
78. Hou, C.T., *Is Strain Ds5 Hydratase a C-10 Positional Specific Enzyme - Identification of Bioconversion Products from Alpha-Linolenic and Gamma-Linolenic Acids by Flavobacterium Sp Ds5*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995. **14**(1): p. 31-34.
79. Kawashima, H., *Production of 10-Ketostearic Acid from Oleic-Acid by a Strain of Flavobacterium Sp 12-4a*. *Biotechnology Letters*, 1995. **17**(5): p. 493-496.

80. Koritala, S. and M.O. Bagby, *Microbial Conversion of Linoleic and Linolenic Acids to Unsaturated Hydroxy Fatty-Acids*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1992. **69**(6): p. 575-578.
81. Hou, C.T., *Production of 10-Ketostearic Acid from Oleic-Acid by Flavobacterium Sp Strain Ds5 (Nrri B-14859)*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. **60**(10): p. 3760-3763.
82. Latrasse, A., et al., *Conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid by Nocardia paraffinae*. Biotechnology Letters, 1997. **19**(8): p. 715-718.
83. Seo, C.W., et al., *Hydration of Squalene and Oleic-Acid by Corynebacterium Sp S-401*. Agricultural and Biological Chemistry, 1981. **45**(9): p. 2025-2030.
84. Wei, Y., L. Dostal, and J.P.N. Rosazza, *Stereospecificity of Microbial Hydrations of Oleic-Acid to 10-Hydroxystearic Acid*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(1): p. 281-284.
85. Elsharkawy, S.H., et al., *Microbial Oxidation of Oleic-Acid*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. **58**(7): p. 2116-2122.
86. Bevers, L.E., et al., *Oleate Hydratase Catalyzes the Hydration of a Nonactivated Carbon-Carbon Bond*. Journal of Bacteriology, 2009. **191**(15): p. 5010-5012.
87. Otte, K.B., *Enzymatischer Zugang zu mittelkettigen Dicarbonsäuren*, in *Institut für Technische Biochemie*. 2014, Universität Stuttgart.
88. Kuhn, P.J. and D.A. Smith, *Isolation from Fusarium-Solani F Sp Phaseoli of an Enzymic System Responsible for Kievitone and Phaseollidin Detoxification*. Physiological Plant Pathology, 1979. **14**(2): p. 179-&.
89. Cleveland, T.E. and D.A. Smith, *Characterization of Kievitone Hydratase from Fusarium-Solani F Sp Phaseoli Culture Filtrates*. Phytopathology, 1981. **71**(8): p. 867-867.
90. Turbek, C.S., et al., *Induction and Purification of Kievitone Hydratase from Fusarium-Solani F Sp Phaseoli*. Phytochemistry, 1990. **29**(9): p. 2841-2846.
91. Turbek, C.S., D.A. Smith, and C.L. Schardl, *An Extracellular Enzyme from Fusarium-Solani F-Sp Phaseoli Which Catalyzes Hydration of the Isoflavonoid Phytoalexin, Phaseollidin*. Fems Microbiology Letters, 1992. **94**(1-2): p. 187-190.
92. Li, D.X., et al., *The Fusarium-Solani Gene Encoding Kievitone Hydratase, a Secreted Enzyme That Catalyzes Detoxification of a Bean Phytoalexin*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1995. **8**(3): p. 388-397.

93. Marliere, P., *Method for producing an alkene comprising the step of converting an alcohol by an enzymatic dehydration step*. 2011. p. 1-46.
94. Wuensch, C., et al., *Asymmetric Enzymatic Hydration of Hydroxystyrene Derivatives*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013. **52**(8): p. 2293-2297.
95. Brodkorb, D., et al., *Linalool Dehydratase-Isomerase, a Bifunctional Enzyme in the Anaerobic Degradation of Monoterpenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(40): p. 30436-30442.
96. Luddeke, F. and J. Harder, *Enantiospecific (S)-(+)-Linalool Formation from beta-Myrcene by Linalool Dehydratase-Isomerase*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences*, 2011. **66**(7-8): p. 409-412.
97. Claessen, E.L., *Widely used fragrance ingredients in shampoos and conditioners are frequent causes of eczema*. 2009, University of Gothenburg.
98. Sell, C.S., *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer, 2nd Edition*. 2006: The Royal Society of Chemistry.
99. Karlaganis, G., *OECD SIDS Initial Assessment Report (Linalool)*. 2002, Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape: Berne.
100. Muller, A., B. Hauer, and B. Rosche, *Enzymatic reduction of the alpha,beta-unsaturated carbon bond in citral*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2006. **38**(3-6): p. 126-130.
101. Reich, S., et al., *Crystal Structure Determination and Mutagenesis Analysis of the Ene Reductase NCR*. *Chembiochem*, 2012. **13**(16): p. 2400-2407.
102. Hall, M., et al., *Asymmetric bioreduction of activated C = C bonds using Zymomonas mobilis NCR enoate reductase and old yellow enzymes OYE 1-3 from yeasts*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008(9): p. 1511-1516.
103. Seitz, M., et al., *Substrate specificity of a novel squalene-hopene cyclase from Zymomonas mobilis*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2012. **84**: p. 72-77.
104. S. Hammer, A.M., J. M. Dominicus, B. M. Nestl and B. Hauer, *Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis*. *Nature Chemical Biology*, 2014.
105. Schwartz, B.D., et al., *Towards the total synthesis of vibsandin E, 15-O-methylcyclovibsandin B, 3-hydroxyvibsandin E, furanovibsandin A, and 3-O-methylfuranovibsandin A*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006(14): p. 3181-3192.

106. Willimann, L. and H. Schinz, *Über 7-Methyl-Octadien-(2,6)-Ol-(1), Ein Apogeneraniol*. Helvetica Chimica Acta, 1952. **35**(7): p. 2401-2406.
107. Overman, L.E., *A general method for the synthesis of amines by the rearrangement of allylic trichloroacetimidates. 1,3 transposition of alcohol and amine functions*. Journal of the American Chemical Society, 1976. **98**(10): p. 2901-2910.
108. Coote, S.C., P. O'Brien, and A.C. Whitwood, *Stereoselective aziridination of cyclic allylic alcohols using chloramine-T*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2008. **6**(23): p. 4299-4314.
109. Kreck, M., et al., *Biogenetic studies in Syringa vulgaris L.: Synthesis and bioconversion of deuterium-labeled precursors into lilac aldehydes and lilac alcohols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(2): p. 463-469.
110. Mullis, K., et al., *Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro - the Polymerase Chain-Reaction*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1986. **51**: p. 263-273.
111. Melchior, W.B., Jr., von Sippel, P.H., *Alteration of the Relative Stability of dA - dT*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. **70**: p. 298-302.
112. Rees, W.A., et al., *Betaine Can Eliminate the Base Pair Composition Dependence of DNA Melting*. Biochemistry, 1993. **32**(1): p. 137-144.
113. Lehman, I.R., *DNA Ligase - Structure, Mechanism, and Function*. Science, 1974. **186**(4166): p. 790-797.
114. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5463-5467.
115. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-&.
116. Smith, P.K., et al., *Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
117. Dougherty, D.A., *Cation-pi interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp*. Science, 1996. **271**(5246): p. 163-168.
118. Johnson, W.S., S.D. Lindell, and J. Steele, *Rate Enhancement of Biomimetic Polyene Cyclizations by a Cation-Stabilizing Auxiliary*. Journal of the American Chemical Society, 1987. **109**(19): p. 5852-5853.

119. Sato, T. and T. Hoshino, *Functional analysis of the DXDDTA motif in squalene-hopene cyclase by site-directed mutagenesis experiments: Initiation site of the polycyclization reaction and stabilization site of the carbocation intermediate of the initially cyclized A-ring*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999. **63**(12): p. 2189-2198.
120. Syren, P.O., et al., *Entropy is Key to the Formation of Pentacyclic Terpenoids by EnzymeCatalyzed Polycyclization*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2014. **53**(19): p. 4845-4849.
121. Peter W. Atkins, J.d.P., Michael Bär, *Atkins: Physikalische Chemie*. 2013.
122. Prof. Dr. Gregor Fels, D.C.B. *Aufklärung von Reaktionsmechanismen - Kinetische Isotopeneffekte*.
123. Zaks, A. and A.M. Klibanov, *Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(7): p. 3194-3201.
124. Wu, S.T. and Y. Zhang, *MUSTER: Improving protein sequence profile-profile alignments by using multiple sources of structure information*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 2008. **72**(2): p. 547-556.
125. Wu, S.T. and Y. Zhang, *LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction*. *Nucleic Acids Research*, 2007. **35**(10): p. 3375-3382.
126. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang, *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. *Nature Protocols*, 2010. **5**(4): p. 725-738.
127. Roy, A., J.Y. Yang, and Y. Zhang, *COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation*. *Nucleic Acids Research*, 2012. **40**(W1): p. W471-W477.
128. Zhang, Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. *Bmc Bioinformatics*, 2008. **9**.
129. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic Acids Research*, 1997. **25**(17): p. 3389-3402.
130. Altschul, S.F., et al., *Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices*. *Febs Journal*, 2005. **272**(20): p. 5101-5109.
131. Devlin, F.J., et al., *Ab-Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular-Dichroism Spectra Using Density-Functional Force-Fields - a Comparison of Local, Nonlocal, and Hybrid Density Functionals*. *Journal of Physical Chemistry*, 1995. **99**(46): p. 16883-16902.

132. Weigend, F. and R. Ahlrichs, *Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2005. **7**(18): p. 3297-3305.
133. *TURBOMOLE V6.4, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007.*
134. Kastner, J., et al., *DL-FIND: An Open-Source Geometry Optimizer for Atomistic Simulations*. Journal of Physical Chemistry A, 2009. **113**(43): p. 11856-11865.
135. Metz, S., et al., *ChemShell-a modular software package for QM/MM simulations*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science, 2014. **4**(2): p. 101-110.
136. Klibanov, A.M., *Enzymatic Catalysis in Anhydrous Organic-Solvents*. Trends in Biochemical Sciences, 1989. **14**(4): p. 141-144.
137. Klibanov, A.M., *Why are enzymes less active in organic solvents than in water?* Trends in Biotechnology, 1997. **15**(3): p. 97-101.
138. Wong, T.Y., L.A. Preston, and N.L. Schiller, *Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications*. Annual Review of Microbiology, 2000. **54**: p. 289-340.
139. Fujiwara, T., et al., *Crystal structure of Ruminococcus albus cellobiose 2-epimerase: Structural insights into epimerization of unmodified sugar*. Febs Letters, 2013. **587**(7): p. 840-846.
140. Cao, R., et al., *Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold*. Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 2010. **78**(11): p. 2417-2432.
141. C. Boisart, S., G. Letellier, MetabolicExplorer, *New Biosynthesis Pathway for Prenol in a recombinant Microorganism*. 2014.
142. Nestl, B.M. and B. Hauer, *Engineering of Flexible Loops in Enzymes*. Acs Catalysis, 2014. **4**(9): p. 3201-3211.

Curriculum Vitae

Persönliches

Name: Christopher Geinitz

Geburtsdatum: 11 Juni 1985

Geburtsort: Berlin

Nationalität: deutsch

Anschrift: Bachstrasse 7, CH-9400 Rorschach

Email: chrisgeinitz@web.de

Studium und Ausbildung

- 11/2010 – 10/2015 **Promotion am Institut für Technische Biochemie an der Universität Stuttgart unter Prof. Dr. Bernhard Hauer im Bereich Biokatalyse**
- Titel: „Studien zur Substratspezifität der Linalool Dehydratase-Isomerase mit dem Fokus auf der Dehydratisierung von tertiären Alkoholen“
- 10/2005 – 09/2010 **Diplomstudium Chemie
Universität Stuttgart**
- Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Aktivität und Substratspezifität von Diol- und Glyceroldehydratase“
- 10/2004 – 07/2005 **Wehrdienst in Füssen(Allgäu)**
- 09/1995 – 07/2004 **Abitur am Friedrich-Abel Gymnasium, Vaihingen an der Enz**

Praktische Erfahrungen

- 04/2008 – 10/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie,
Universität Stuttgart