

# **Studien zum Einsatz von enzymatischen Lewis- und Brønsted-Säuren in Carbonyl-aktivierten organischen Reaktionen**

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

Vorgelegt von  
**Jennifer N. Bischoff (geb. Bolsinger)**  
aus Denkendorf

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer  
Mitberichter: Prof. Dr. René Peters  
Vorsitzender: Prof. Dr. Albert Jeltsch

Tag der Verteidigung: 25. Oktober 2016

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart  
-2016-



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

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „*Studien zum Einsatz von enzymatischen Lewis- und Brønsted-Säuren in Carbonyl-aktivierten organischen Reaktionen*“ 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. Darüber hinaus versichere ich, dass die hier vorgelegte Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

### **Declaration of Authorship**

I hereby certify that the dissertation entitled „*Studies on enzymatic Lewis- and Brønsted-acids as catalysts in carbonyl-activated organic reactions*“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, 09.06.2016

Jennifer Bischoff



# DANKSAGUNG

Mein besonderer und großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die Möglichkeit meine Dissertation über dieses interessante und herausfordernde Thema in seinem Arbeitskreis unter hervorragenden Arbeitsbedingungen anfertigen zu können, sowie die ausgezeichnete Betreuung und große Unterstützung in dieser Zeit.

Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. Bettina Nestl für die ausgezeichnete Betreuung und ihre wertvollen Ratschläge, Diskussionen und Tipps ganz herzlich bedanken, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dr. Bernd Nebel danke ich für seinen unermüdlichen und selbstlosen Einsatz bei der Pflege und Wartung der analytischen Messgeräte, sowie die große Hilfe bei allen Fragen und Problemen im Bereich der analytischen Chemie. Für die vielen hilfreichen und aufschlussreichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit danke ich im tHisF-Projekt Herr Dr. Dennis Wetzl und vom Team Zyklase Herr Dr. Stephan Hammer, Silke Bastian und Lisa Kühnel. Weiter möchte ich mich bei Phillip Scheller und Christine Gally für ihre Hilfe bei molekularbiologischen Arbeiten bedanken, aber vor allem auch für ihre Unterstützung und die tröstenden und aufbauenden Worte in schwierigen Situationen außerhalb des Labors. Danke auch an meine Studenten, Hanna Dehmer und Moritz Sinast, die mir durch ihre praktische Laborarbeit eine große Hilfe waren.

Ein großer Dank geht zudem an alle Mitarbeiter des Instituts in den letzten vier Jahren während meiner Diplomarbeit und Dissertation für die tolle Arbeitsatmosphäre, spannende Diskussionen, jegliche Hilfe und die schöne und unterhaltsame Zeit, die wir bei vielen Aktionen außerhalb der Universität zusammen hatten, egal ob bei sportlichen Aktivitäten, wie Wandern oder Skifahren, oder bei geselligen Grillabenden und beim Feiern.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern, meinen Brüdern und Felix bedanken, welche mich in jeder Lebenslage uneingeschränkt unterstützt und motiviert haben, sowie mir mit ihren wertvollen Tipps und Ratschlägen bei allen leichten und schweren Entscheidungen stets zur Seite standen.



*„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**





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>13</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>21</b>
1.1 Biokatalyse	21
1.1.1 Enzympromiskuität natürlicher Enzyme	22
1.1.2 Artificielle Enzymkatalysatoren	24
1.2 Lewis-Säure Katalyse	26
1.2.1 Chemische Übergangsmetallkatalysatoren als Lewis-Säuren	27
1.2.2 Zink-abhängige Enzyme als Lewis-Säure Katalysatoren	28
1.2.3 Pyrazinamidase PH999	29
1.2.4 Imidazol Glycerinphosphat-Dehydrogenase Untereinheit tHisF	30
1.3 Brønsted-Säure Katalyse	34
1.3.1 Chirale Brønsted-Säuren in der chemischen Katalyse	34
1.3.2 Enzymkatalysatoren auf Brønsted-Säure Basis	35
1.3.3 Squalen-Hopen-Zyklase <i>AacSHC</i>	36
<b>2 ZIELSETZUNG UND MOTIVATION</b>	<b>43</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>45</b>
3.1 Materialien	45
3.1.1 Chemikalien	45
3.1.2 Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten	45
3.1.3 Molekularbiologische Kits	45
3.1.4 Primer	45
3.1.5 Plasmide	46
3.2 Medien und Zellkulturen	49
3.2.1 <i>E. coli</i> Stämme	49

3.2.2	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	49
3.2.3	Zellwachstum und Stammhaltung	50
3.3	Molekularbiologische Methoden	51
3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	51
3.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und DNA-Sequenzierung	51
3.3.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	52
3.3.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	52
3.3.5	Ortsgerichtete Mutagenese mittels QuikChange™ PCR	53
3.4	Proteinbiochemische Methoden	54
3.4.1	Proteinexpression	54
3.4.2	Zellaufschluss	55
3.4.3	Proteinreinigung	55
3.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	59
3.4.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	60
3.4.6	PAR-Assay zur Bestimmung der Zink(II)-Bindungsaffinität	61
3.4.7	Aktivitätsbestimmung der PH999	62
3.5	Analytische Methoden	62
3.5.1	Gaschromatographie (GC)	62
3.5.2	Flüssigchromatographie (HPLC)	64
3.5.3	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	67
3.5.4	Weitere Methoden	67
3.6	Enzymatische Synthesen	67
3.6.1	Analytische Biotransformationen	67
3.6.2	Präparative Biotransformationen	69
3.7	Chemische Synthesen	71
3.7.1	Azachalcon <b>5</b>	71
3.7.2	Produkt <b>19</b> der Michael Reaktion von Azachalcon <b>5</b> und Mercaptoethanol <b>18</b>	71
3.7.3	3-Methylcitronellal <b>1</b>	72
3.7.4	Chemische Zyklisierung von 3-Methylcitronellal <b>1</b> zu <i>trans</i> -3-Methylisopulegol <b>2</b> und <i>cis</i> -3-Methylisopulegol <b>52</b>	73
3.7.5	7-Methyloctenal <b>31</b>	74

3.7.6	Chemische Zyklisierung von 7-Methyloctenal <b>31</b> zu <i>trans</i> -2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol <b>32</b> und <i>cis</i> -2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol <b>33</b>	76
3.7.7	3,3,6-Trimethylheptenal <b>38</b>	77
3.7.8	Chemische Zyklisierung von 3,3,6-Trimethylheptenal <b>38</b> zu <i>trans</i> -2-Isopropyl-4,4-Dimethyl-cyclopentanol <b>45</b>	78
3.7.9	8-Methylnonenal <b>44</b>	79
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>83</b>
4.1	Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität von Zink(II)-bindenden Enzymen als chirale Lewis-Säuren	84
4.1.1	Expression, Reinigung und Bestimmung der Aktivität der PH999	84
4.1.2	Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der PH999	85
4.1.3	Erstellung, Expression und Reinigung der artifiziellen tHisF-Varianten HHD und NC	91
4.1.4	Untersuchung zur katalytischen Promiskuität der tHisF	92
4.1.5	Studien zu Substrateigenschaften des Azachalcons <b>5</b> und zur Metallbindung der tHisF	97
4.1.6	Erweiterung des Spektrums von Schwefelnukleophilen in der Michael Additionen	102
4.2	Squalen-Hopen Zyklase als chirale Brønsted-Säure	105
4.2.1	Expression und Reinigung der <i>Aac</i> SHC	105
4.2.2	Prins Reaktion von Citronellal-Analoga durch Aktivierung der Carbonylfunktion	106
4.2.3	Erstellung von Doppelmutanten für die Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal <b>1</b>	111
4.2.4	Untersuchungen zum Einfluss der Ringgröße in der <i>Aac</i> SHC katalysierten Prins Reaktion	113
<b>5</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	<b>117</b>
5.1	Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität von Zink(II)-bindenden Enzymen als chirale Lewis-Säuren	119
5.1.1	Expression, Reinigung und Bestimmung der Aktivität der PH999	119
5.1.2	Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der PH999	120
5.1.3	Untersuchung zur katalytischen Promiskuität der tHisF	124

5.1.4	Erweiterung des Spektrums von Schwefelnukleophilen in der Michael Addition	129
5.2	Squalen-Hopen Zyklase als chirale Brønsted-Säure	131
5.2.1	Prins Reaktion von Citronellal-Analoga durch Aktivierung der Carbonylfunktion	131
5.2.2	Erstellung von Doppelmutanten für die Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal <b>1</b>	134
5.2.3	Untersuchungen zum Einfluss der Ringgröße in der <i>AacSHC</i> katalysierten Monozyklisierung	136
5.3	Ausblick	137
5.3.1	Zink-abhängigen Metalloenzymen als enzymatische Lewis-Säuren	137
5.3.2	Nutzung der Squalen-Hopen Zyklase <i>AacSHC</i> als chirale Brønsted-Säure Katalysatoren	138
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>155</b>
7.1	Expression und Reinigung	155
7.1.1	PH999	155
7.1.2	<i>AacSHC</i>	156
7.2	Gensequenzen	158
7.2.1	tHisF von <i>Thermotoga maritima</i>	158
7.2.2	PH999 von <i>Pyrococcus horikoshii</i>	158
7.2.3	Squalen-Hope-Zyklase aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ( <i>AacSHC</i> )	159
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>161</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
$\delta$	chemische Verschiebung
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
AacSHC	Squalen-Hopen-Zyklase I aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bichinoninsäure
BINOL	1,1'-Bi-2-naphthol
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DCM	Dichlormethan
<i>de</i>	Diastereomerenüberschuss
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Mischung der vier Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	<i>electron impact</i>
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
ESR	Elektronenspinresonanz

FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
ImGP	Imidazol-Glycerolphosphat Synthase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Kpi	Kaliumphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
m	Masse
M	Molar
min	Minute
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie/Massenspektrometer
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
NMR	Kernspinresonanz
OD <sub>600</sub>	optische Dichte gemessen bei 600 nm
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorciol
PH999	Pyrazinamidase aus <i>Pyrococcus horikoshii</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Base</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PZA	Pyrazinamid
PZAase	Pyrazinamidase
ppm	<i>parts per million</i>
psi	<i>pound per square inch</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
Tbf	Transformationspuffer (transformation buffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
tHisF	HisF Untereinheit der ImGP aus <i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Triton X-100	Handelsname für (p-tert-Ocylphenoxy)-polyethoxyethanol
U	Unit
ÜN	über Nacht
z. B.	zum Beispiel





## ZUSAMMENFASSUNG

Reaktionen zum Aufbau neuer, selektiver C-C, C-O, C-S und C-N Bindungen gehören zu den wichtigsten in der organischen Synthese. Biokatalysatoren mit ihrer hohen katalytischen Aktivität und Selektivität stehen als eine oft umweltfreundliche Alternative zu chemischen Katalysatoren im Fokus aktueller Forschungsarbeiten. Ziel dieser Arbeit waren Studien zur Substratspezifität und Reaktionspromiskuität von enzymatischen Lewis- und Brønsted-Säurekatalysatoren zur Aktivierung der Carbonylfunktion in Aldol Reaktionen, Michael Reaktionen und Prins Reaktionen. Dafür wurden die Zink-abhängigen Metalloenzyme Pyrazinamidase PH999 aus *Pyrococcus horikoshii* und tHisF aus *Thermotoga maritima* als enzymatische Lewis-Säuren und die Squalen-Hopen-Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) als Brønsted-Säure gewählt.

Das Zink wird in Metalloenzymen über eine Aminosäuretriade bestehend aus zwei Histidin Aminosäuren und einer Asparaginsäure an das Protein koordiniert und übernimmt die Funktion der katalytischen Lewis-Säure. Das Proteingerüst dient als chiraler Ligand, wodurch die Selektivität einer Reaktion beeinflusst wird. In der Hydrolase PH999 aktiviert das Zink in der natürlichen Reaktion Wasser für die Hydrolyse von Pyrazinamid zur Pyrazinsäure. Nach der Expression und Charakterisierung der PH999 wurde das Potential für die Katalyse promiskuitiver Reaktionen anhand der Aldol Reaktion von 2-Pyridincarboxaldehyd mit Aceton untersucht. Erste Ergebnisse konnten einen Umsatz für die Aldol Reaktion zeigen. Weitere Untersuchungen zu mechanistischen Eigenschaften des Enzymes PH999 wiesen jedoch darauf hin, dass dies nicht auf die Katalyse am Metall zurück zu führen ist, sondern viel mehr auf Lysin Aminosäuren an der Oberfläche des Enzyms. Diese katalysieren die Aldol Reaktion analog entsprechender Organokatalysatoren über ein Enaminintermediat. Wie schwierig die Katalyse an einem definierten Metallzentrum ist, zeigt auch die promiskuitive Michael Reaktion von Azachalcon mit Mercaptoethanol der tHisF. Bei der tHisF handelt es sich um ein artifizielles Metalloenzym, in welches durch Einführung der Aminosäuretriade nach Reetz *et al.* Zink koordiniert werden kann. Studien zur Bindung des Zinks im Proteingerüst haben gezeigt, dass es neben der definierten Metallbindestelle zu einer weiteren Zinkkoordination an zahlreichen Asparaginsäure- und

Glutaminsäure Resten an der Enzymoberfläche kommt. Dies hat zur Folge, dass keine selektive Katalyse der Michael Reaktion stattfindet.

Die Squalen-Hopen-Zyklase katalysiert in der Natur Polyzyklisierungen, wobei die katalytische Asparaginsäure als Brønsted-Säure agiert und im ersten Schritt das Substrat an der terminalen C-C Doppelbindung protoniert. In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass neben der Protonierung von Doppelbindungen auch eine Protonierung von Epoxiden und Carbonylgruppen möglich ist. Um verschiedene spezifische Bindungen von nicht-natürlichen Substraten und damit verschiedene Zyklisierungsprodukte zu adressieren wurde eine kleine fokussierte Mutantenbibliothek der *AacSHC* generiert. Hierfür wurden in Einzelmutanten die Aminosäuren in der Umgebung von 15 Å um die katalytisch aktive Asparaginsäure durch verhältnismäßig kleine und große hydrophobe Aminosäuren ersetzt. Durch verschiedene Einzelmutanten konnten in der Folge die verschiedenen Isomere von Isopulegol als Produkte der Prins Reaktion von Citronellal selektiv katalysiert werden. Basierend auf diesen Vorarbeiten wurden Untersuchungen zur Substratpromiskuität der Prins Reaktion katalysiert durch die *AacSHC* durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht in wie weit chemische Effekte, hier im speziellen der Thorpe-Ingold Effekt, einen Einfluss auf die Aktivität und Selektivität der *AacSHC* haben. Aus der Mutantenbibliothek konnte für die synthetisierten Citronellalanaloga 3-Methylcitronellal und 7-Methyloctenal Varianten mit einer bis zu 12-fach und 20-fach erhöhten Aktivität und exzellenten Selektivitäten gegenüber dem Wildtyp identifiziert werden. Für 3-Methylcitronellal war es zudem möglich die Aktivität, ohne Verlust der hohen Selektivität, durch Kombination zweier Einzelmutanten um das Vierfache im Vergleich zu den entsprechenden Einzelmutanten auf  $42,0 \pm 4,4$  % zu steigern. Für die Ausweitung des Substratspektrums der Prins Reaktion zum Aufbau von Fünf- und Siebenringprodukten wurde 8-Methylnonenal als Siebenringssubstrat und 3,3,6-Trimethylheptenal als Fünfringssubstrat synthetisiert und mit der Mutantenbibliothek der *AacSHC* getestet. Während für das 8-Methylnonenal keine Aktivität identifiziert werden konnte, konnte mit dem Wildtyp beim 3,3,6-Trimethylheptenal Spuren  $<0,5$  % des zyklisierten Produkts nachgewiesen werden. Weiter wurden die Mutanten I261G und F601A als beste Mutanten der *AacSHC* Mutantenbibliothek mit einem geringen Umsatz von  $0,77 \pm 0,03$  % und  $0,78 \pm 0,15$  % identifiziert.

## ABSTRACT

Reactions to build up selective carbon-carbon, carbon-oxygen, carbon-sulfur and carbon-nitrogen bonds are key transformations in organic synthesis to generate the carbon backbone of organic molecules. Biocatalysts with strong catalytic activity and selectivity are environmental friendly alternatives to chemical catalysts and part of actual research projects. The aim of the presented work are studies on the substrate specificity and reaction promiscuity of enzymatic Lewis- and Brønsted-acid catalyst for the activation of the carbonyl oxygen in Aldol reactions, Michael reactions and Prins reactions. As Lewis-acid catalysts the zinc-dependent metalloenzymes pyrazinamide PH999 from *Pyrococcus horikoshii* and tHisF from *Thermotoga maritima* and as Brønsted-acid catalyst the squalene-hopene cyclase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC) were chosen.

In metalloenzymes the zinc is coordinated to the protein via an amino acid triade of two histidine amino acids and an aspartic acid. The zinc is acting as the catalytic active Lewis-acid and the protein scaffold as chiral ligand, which influences the selectivity of the reaction. In the hydrolase PH999 natural reaction the zinc activates the water for the hydrolysis of pyrazinamide to pyrazinoic acid. After expression and characterization of the PH999 the potential as catalyst for promiscuous reactions was studied. Therefore the Aldol reaction of 2-pyridinecarboxaldehyde and acetone as model reaction was chosen and first results showed an increased activity for the reaction. Further mechanistic studies of the enzyme PH999 indicated, that the reaction does not occur at the zinc in the active site. The results show a catalysis at the lysine amino acid residues on the protein surface of the enzyme, which are able to catalyze the Aldol reaction like organocatalysts over an enamine transition state. Difficulties of the catalysis with a defined metal center are also shown by the promiscuous Michael reaction of azachalcone and mercaptoethanol with the tHisF. The tHisF is an artificial metalloenzyme, with an amino acid triade Reetz *et al.* implemented to coordinate zinc. Studies on the binding affinity of the zinc to the protein scaffold showed, that in addition to the defined metal binding site the zinc can also be coordinated by the available aspartic and glutamic acid residues at the protein surface, with the consequence of a non-selective catalysis of the Michael reaction.

The squalene-hopene cyclase catalyze in nature polycyclizations by initial protonation of the terminal carbon-carbon double bond with a catalytic active aspartic acid acting as Brønsted-acid. In previous work it was shown, that in addition to the protonation of the terminal double bond of terpenes also a protonation of epoxides and carbonyl groups is possible. To address different specific binding of non-natural substrates and following from this producing the corresponding cyclisation products a small focused mutant library of the *AacSHC* was generated. Therefore single mutants were created by changing the amino acids in the surrounding of 15 Å of the catalytic active aspartic acid by comparatively small and large hydrophobic amino acids. With different single mutants it was possible to catalyze the selective Prins reaction of citronellal to the different isomers of isopulegol as the product. Based on these results studies to investigate the substrate promiscuity of the Prins reaction catalyzed by the *AacSHC* were performed. Additionally chemical effects, in this case specifically the Thorpe-Ingold effect, and their impact on activity and selectivity of the *AacSHC* were studied. For the synthesized citronellal analogs 3-methylcitronellal and 7-methyloctenal single mutants of the focused *AacSHC* mutant library with a 12- and 20-fold increased activity and excellent selectivity compared to the wildtype were identified. It was further possible to combine two single mutants in double mutants to increase the activity for 3-methylcitronellal again four fold to  $42.0 \pm 4.4$  % compared to the according single mutants without a loss in selectivity. To expand the substrate spectrum of the Prins reaction to build up five-ring and seven-ring products, 8-methylnonenal as seven-ring substrate and 3,3,6-trimethylheptenal as five-ring substrate were synthesized and screened with the *AacSHC* mutant library. For the 8-methylnonenal no activity could be found, while for 3,3,6-trimethylheptenal traces of  $\leq 0.5$  % of the cyclized product could be identified with the wildtype. By screening the *AacSHC* mutant library the mutants I261G and F601A with an increased activity of  $0.77 \pm 0.03$  % and  $0.78 \pm 0.15$  % could be identified as best single mutants for the reaction.

# 1 EINLEITUNG

Zu den wichtigsten Reaktionen der organischen Synthese zählen selektive Reaktionen zum Aufbau von komplexen Kohlenstoffgrundgerüsten, unter anderem die Diels-Alder Reaktion, die Michael Reaktion, die En Reaktion, die Nazarov Zyklisierung, die Henry Reaktion, die Aldol Reaktion und Friedel-Crafts Reaktionen.<sup>1</sup> Die Entwicklung von chiralen Übergangsmetall-katalysatoren und Organokatalysatoren ermöglichte eine Vielzahl neuer Synthese-möglichkeiten mit der Folge, dass heute ca. 80 % der organischen Reaktionen in der industriellen Synthese katalytisch durchgeführt werden.<sup>2,3</sup> Die Realität der chemischen Synthese zeigt jedoch auch, dass diese Katalysatoren zum Teil empfindlich gegenüber Luft und Feuchtigkeit sind, Nebenprodukte und Lösungsmittelabfälle anfallen und oft hohe Reaktionstemperaturen notwendig sind. Im Fall der Übergangsmetallkatalysatoren kommt zudem die Toxizität und bei Organokatalysatoren die hohe Katalysatorbeladung hinzu.<sup>4-6</sup> Eine oft umweltfreundliche Alternative zu den klassischen organischen Katalysatoren stellen die Biokatalysatoren in Form von Enzymen mit ihren ausgezeichneten Selektivitäten (Chemo-, Regio- und Stereoselektivität) und hohen katalytischen Aktivitäten unter milden Reaktionsbedingungen dar.<sup>6</sup> Jedoch haben biokatalytische Prozesse mit ca. 5 % in der Industrie noch eine untergeordnete Rolle, was darauf zurück zu führen ist, dass Enzyme eine geringe Reaktionsvielfalt besitzen und zudem für synthetisch wichtige organische Reaktionen bisher keine entsprechenden Enzyme zur Verfügung stehen.<sup>3</sup> Die Erforschung und Entwicklung neuer, effizienter und effektiver Biokatalysatoren für die Anwendung in der enantioselektiven Synthese im Labor- und Industriemaßstab ist in den letzten Jahren ein stetig wachsender Forschungsschwerpunkt geworden.<sup>7-9</sup>

## 1.1 Biokatalyse

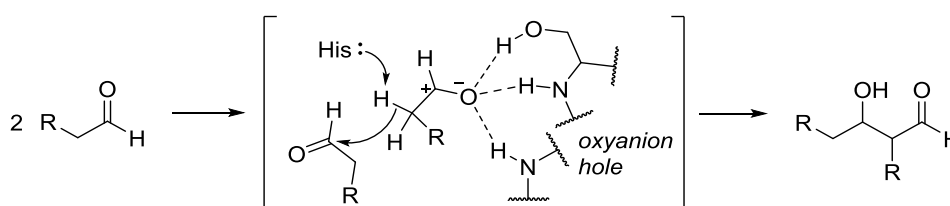
Für eine Vielzahl an Hydrolysereaktionen, Reduktionsreaktionen, sowie Oxidationsreaktionen stehen schon heute verschiedenste Enzyme, wie Lipasen, Esterasen, Proteasen, Transaminasen, Dehydrogenasen, Enreduktasen, Oxygenasen und Oxidasen zur Verfügung.<sup>2,10</sup> Für den Aufbau neuer C-C Bindungen dagegen sind nur wenige enzymatische Beispiele bekannt.<sup>1,11</sup> Die verbesserten *Screening* und *Engineering* Methoden ermöglichen

jedoch die immer breitere Anwendbarkeit der Biokatalysatoren, indem dadurch die Enzymstabilität erhöht, das Substratspektrum ausgeweitet und die Selektivität verbessert werden kann.<sup>7</sup> Für die Entwicklung neuer, synthetisch relevanter Biokatalysatoren gibt es zwei Strategien, zum einen die Möglichkeit nach promiskuitiven Eigenschaften natürlicher Enzyme zu suchen und durch *enzyme engineering* auszubauen. Zum anderen können, wenn für bestimmte chemische Reaktionen keine Promiskuität in natürlichen Enzymen vorhanden ist, durch verschiedene Verfahren artifizielle Enzymkatalysatoren mit neuen Funktionen generiert werden.

### 1.1.1 Enzympromiskuität natürlicher Enzyme

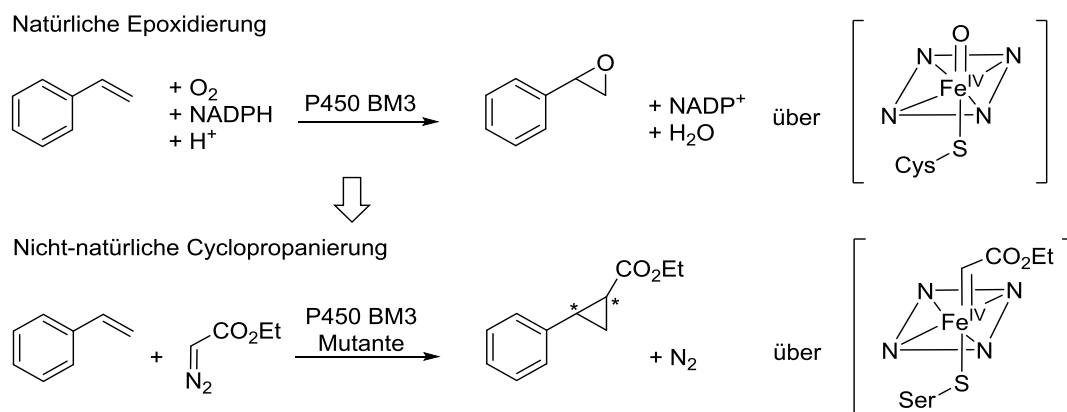
Enzympromiskuität ist die Ausnutzung alternativer Funktionen von natürlichen Enzymen. Zusätzlich zu ihrer natürlichen katalytischen Aktivität besitzen Enzyme trotz ihrer bemerkenswerten Spezifität oft eine promiskuitive Aktivität und können neue, nicht-physiologische Reaktionen katalysieren oder nicht-natürliche Substrate umsetzen. Die Gründe für die Promiskuität von Enzymen sind vielfältig und haben mechanistische und evolutionäre Hintergründe. In der Natur ist die Promiskuität bei Bedarf einer neuen enzymatischen Funktion Startpunkt für eine schrittweise Evolution, so dass die promiskuitive Funktion die primäre Funktion des neuen Enzyms werden kann. So divergierten neue Familienmitglieder aus bestehenden und es entstanden die heute bekannten großen und funktionell unterschiedlichen Enzymfamilien, wie zum Beispiel die Superfamilie der Hydrolasen.<sup>12,13</sup> In der Biokatalyse wird dieses Prinzip zur Entwicklung effizienter Biokatalysatoren für nicht-natürliche Reaktionen oder den Umsatz nicht-natürlicher Substrate verwendet, indem Enzyme mit einer geringen identifiziert promiskuitiven Aktivität über semi-rationales Design oder gerichtete Evolution weiterentwickelt werden.<sup>7</sup> Steht und fällt das rationale Design, bei welchem mit Hilfe computergestützter Verfahren Varianten modelliert werden, mit der Kenntnis von Struktur und Mechanismus des Enzyms, sind diese für die gerichtete Evolution nicht nötig. Hier werden per Zufallsmutagenese Bibliotheken erstellt, welche dann mittels Selektion oder *Screening* auf Varianten mit den gewünschten Eigenschaften durchforstet werden.<sup>14</sup> Die Promiskuität kann in verschiedene Klassen, die Konditions-, Substrat- und katalytische Promiskuität eingeteilt werden, wobei die Promiskuität eines Enzyms nicht immer eindeutig nur einer Klasse zugeordnet werden kann.<sup>15,16</sup> Bei der Konditionspromiskuität wird eine Reaktion in organischem Lösungsmittel, bei hohen Temperaturen oder extremen pH-

Werten durchgeführt und dadurch der Reaktionstyp des Enzyms beeinflusst. Bei der Substratpromiskuität werden nicht-natürliche Substrate analog dem Mechanismus des natürlichen Substrats umgesetzt. Für die Kombination von Konditions- und Substratpromiskuität sind die Lipasen, oftmals mit industrieller Anwendung, ein bekanntes Beispiel. In Wasser katalysieren Lipasen die Esterhydrolyse zu den entsprechenden Fettsäuren und Alkoholen. In organischen Lösungsmittel kann die Rückreaktion zur Bildung von Ester- und Amidbindungen, sowie die Racematspaltung zur Darstellung von chiralen Alkoholen, Säuren und Aminen stattfinden.<sup>15,17,18</sup> Die katalytische Promiskuität ist die Katalyse von nicht-natürlichen Reaktionen mit einem anderen als dem natürlichen Reaktionsmechanismus und kann in die natürliche und die induzierte, katalytische Promiskuität unterteilt werden. Bei der natürlichen, katalytischen Promiskuität handelt es sich um eine Nebenreaktion des Enzyms, welche bereits vom Wildtyp katalysiert werden kann. Das Beispiel einer Lipase zeigt, der Wildtyp kann die Aldol Reaktion von Hexanal und Propanal katalysieren und durch Entfernen des für die natürliche Aktivität essentiellen Serins kann die spezifische Aktivität um das Vierfache gesteigert werden (**Abbildung 1**).<sup>19</sup>



**Abbildung 1:** Natürliche katalytische Promiskuität der Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) in Cyclohexan für die Aldol Reaktion von Hexanal. Das Substrat wird dabei durch das *oxyanion hole* des Enzymes aktiviert und nicht durch das für die natürliche Aktivität essentielle Serin.<sup>15,19</sup>

Ein jüngstes Beispiel für die induzierte, katalytische Promiskuität ist die Verwendung einer P450 BM3-Mutante für die Cyclopropanierung von Arnold *et al.* P450 Enzyme katalysieren natürlicherweise die C-H Aktivierung mit Hilfe eines Eisen-Häm Cofaktors, wodurch zum Beispiel die Epoxidierung von Styrol möglich ist.<sup>20-22</sup> Durch rationales Design und gerichtete Evolution wurden P450 BM3-Mutanten designt, welche in der Lage sind Nitrene für die Sulfiminierung und Carbene für die selektive Cyclopropanierung von Olefinen zu aktivieren und die Reaktionen *in vivo* und *in vitro* zu katalysieren (**Abbildung 2**).<sup>23-27</sup>



**Abbildung 2:** Induzierte katalytische Promiskuität in der P450 BM3-Mutante. Natürlicherweise katalysiert P450 BM3 die Monooxygenierung von Olefinen zum entsprechenden Epoxid. Die Mutation des Cystein in Serin ermöglichte die selektive Katalyse der nicht-natürliche Cyclopropanierung.<sup>24</sup>

### 1.1.2 Artificielle Enzymkatalysatoren

Auf der Suche nach neuen, enzymatischen Systemen, welche Reaktionen katalysieren, die natürlicherweise durch klassische enzymatische Reaktionen nicht zugänglich sind, wurden verschieden artifizielle Enzymkatalysatoren entwickelt. Sie alle haben zum Ziel das Beste aus homogener und enzymatischer Katalyse zu verknüpfen, indem sie die Übergangsmetallkatalyse mit deren Möglichkeiten eine große Vielfalt an Reaktionen zu katalysieren mit der hohen Regio- und Stereoselektivität der Enzymkatalyse kombinieren. Das grundlegende Prinzip artifizierlicher Metalloenzyme ist die Einführung eines Metallkomplexes mit katalytischer Aktivität in ein Protein, welches die zweite Koordinationssphäre bildet und damit die Selektivität einer Reaktion kontrolliert. Für die Umsetzung sind bis dato drei verschiedene Strategien beschrieben:<sup>28-32</sup>

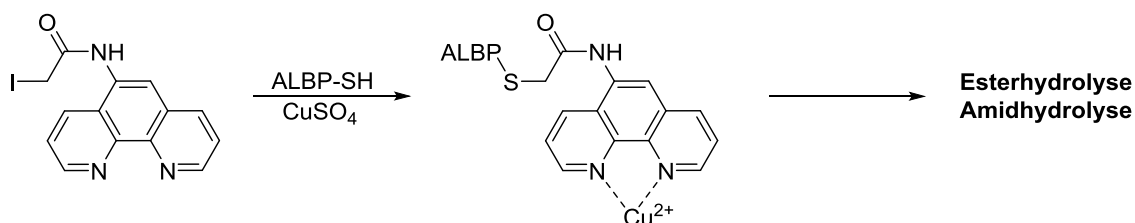
- kovalente Bindung,
- supramolekulare Verankerung und
- direkte Komplexierung von Metallen.

Mit den artifiziiellen Katalysatoren konnte ein breites Spektrum an nicht-natürlichen Reaktionen katalysiert werden, unter anderem Hydrolysereaktionen, Sulfoxidationen, Epoxidierungen, Ketonreduzierungen und Diels-Alder Reaktionen.<sup>29</sup>

Bei der kovalenten Bindung wird ein achiraler chemischer Metallkatalysator über nukleophile Aminosäurereste (Cystein, Lysin, Serin) an das Proteingerüst gebunden. Di Stefano *et al.* koppelte in seinen Arbeiten den Kupfer-koordinierenden Phenanthrolin Liganden nukleophil an das Cystein des ALBP-Enzyms (Fettsäure-Transporter Enzym) und

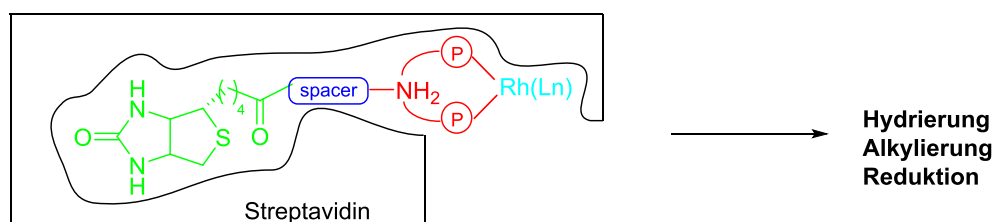


konnte damit nicht-natürliche Hydrolysereaktionen von Ester- und Amidbindungen katalysieren (**Abbildung 3**).<sup>33</sup> Aufbauend auf diesen ersten Arbeiten folgten weitere Beispiele mit Papain für die Esterhydrolyse<sup>34-36</sup> und Myoglobin für die Suloxidation.<sup>37</sup>



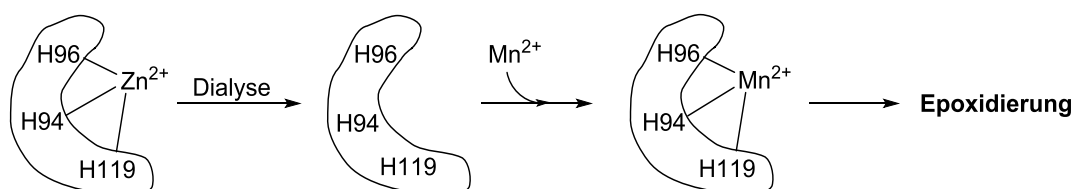
**Abbildung 3:** Kovalente nukleophile Kopplung von Kupfer-koordinierendem Phenanthrolin an das Cystein des ALBP-Enzyms zur Katalyse der Ester- und Amidhydrolyse.<sup>33</sup>

Eine weitere Möglichkeit chemische Metallkatalysatoren mit einem Proteingerüst zu kombinieren ist die supramolekulare Verankerung, bei welcher die spezifische und starke Wechselwirkung von chemischen Molekülen an ein spezielles Protein genutzt wird. Ward *et al.* entwickelte aufbauend auf den Arbeiten von Whitesides *et al.* die Biotin-Streptavidin Technologie, bei welcher die große chemische Vielfalt durch chemische Modifikation des *Spacers* oder durch Modifikation des Proteins mittels gentechnischer Methoden erreicht wird.<sup>38</sup> Somit können unter anderem die chirale Hydrierung von *N*-Acetaminosäuren, Alkylierungen von 1,3-Diphenylallylacetat oder die Reduktion von aromatischen oder aliphatischen Ketonen katalysiert werden (**Abbildung 4**).<sup>39</sup> Als alternatives Proteingerüst diente Roelfes *et al.* ein DNA-Gerüst, an welches ein Kupfer koordinierender Ligand gebunden und anschließend unter anderem Friedel-Crafts Acylierungen, Diels-Alder Reaktionen und Michael Reaktionen katalysiert wurden.<sup>40</sup>



**Abbildung 4:** Supramolekulare Verankerung in der Biotin-Streptavidin Technologie, mit dem Biotin (grün), *Spacer* (blau), Ligand (rot) und dem Rhodium (türkis) als organisches Fragment, welches durch spezifische Wechselwirkungen an das Streptavidin koordiniert ist und für Hydrierung von *N*-Acetaminosäuren, Alkylierungen von 1,3-Diphenylallylacetat oder die Reduktion von aromatischen oder aliphatischen Ketonen verwendet werden kann.<sup>39</sup>

Die dritte Möglichkeit zur Erstellung eines artifiziellen Metalloenzym ist die dative Bindung katalytisch aktiver Metalle über Metallbindende-Aminosäuren (Histidin, Cystein, Asparagin- und Glutaminsäure) an das Protein. In der Carboanhydrase ist Zink über drei Histidin Aminosäuren an das Protein koordiniert und kann durch andere redox-aktive Metalle ausgetauscht werden, um eine neue, nicht-natürliche Aktivität zu generieren. Von Kazlauskas *et al.* wurde als ein Beispiel der Austausch mit Mangan durchgeführt und anschließend die Epoxidierung von aromatischen Olefinen katalysiert (**Abbildung 5**).<sup>41</sup> Ist in einem geeigneten Proteingerüst keine Metallbindestelle vorhanden, kann diese, wie Arbeiten von Reetz *et al.*, zeigen artifiziell eingeführt und anschließend das Metall (Kupfer(II)) koordiniert werden. Die Einführung der His/His/Asp-Triade in die tHisF als Proteingerüst und die Verwendung des artifiziellen Metalloenzym als Katalysator in einer Diels-Alder Reaktion werden in Kapitel 1.2.4 ausführlich diskutiert.<sup>42</sup>



**Abbildung 5:** Dative Bindung des Zinks an die Triade bestehend aus drei Histidin Aminosäuren in der nativen Carboanhydrase. Durch Austausch des Zinks mit Mangan können anschließend Epoxidierungen katalysiert werden.<sup>41</sup>

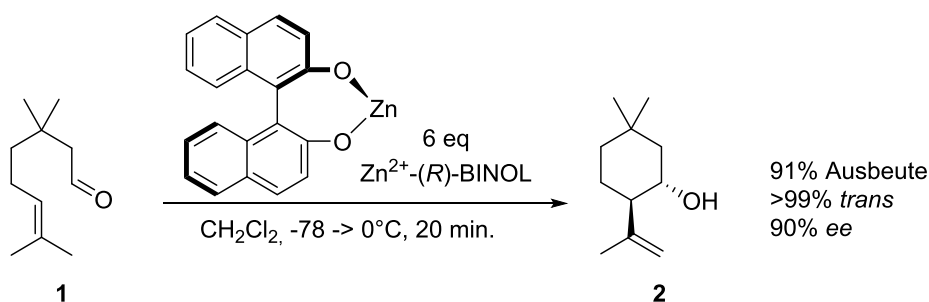
## 1.2 Lewis-Säure Katalyse

Das Prinzip der Lewis-Säure Katalyse beruht auf der effizienten Aktivierung des Substrats durch Erhöhung der Elektrophilie für die Reaktion mit einem Nukleophil. In chiralen Lewis-Säuren wird hierfür ein Metall- oder Halbmetall-Zentralatom mit einem chiralen Liganden kombiniert. Die Folge ist eine fast endlose Anzahl an chemischen Katalysatoren für die verschiedensten Reaktionen. Aber auch in der Natur findet das Prinzip der Lewis-Säure Katalyse in Metalloenzymen Anwendung. Vor allem das Übergangsmetall Zink(II) agiert als Lewis-Säure und ist über Aminosäurereste an das Proteingerüst koordiniert, welches selbst als chiraler Ligand fungiert und zudem weitere, für die Katalyse essentielle Aminosäuren zur Verfügung stellt.

### 1.2.1 Chemische Übergangsmetallkatalysatoren als Lewis-Säuren

Die rasante Entwicklung der Lewis-Säuren begann mit dem äquimolaren Einsatz von Aluminiumchlorid in der Diels-Alder Reaktion von Yates *et al.*<sup>43</sup> im Jahr 1960. Neben Aluminiumchlorid wurden auch die Halogenide von Bor, Titan, Zinn, Magnesium und Zink als weitere klassische Lewis-Säuren in Friedel-Crafts Reaktionen, Mukaiyama-Aldol Reaktionen, En Reaktionen und Diels-Alder Reaktionen verwendet, welche jedoch in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden müssen und nur eine geringe Selektivität aufweisen. Mit der Verwendung von Lewis-Säure Katalysatoren in der asymmetrischen Synthese, durch Kombination der Lewis-Säure mit einem meist teuren chiralen Liganden, begann der Einsatz von katalytischen Mengen des Metallkomplexes. Die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten aus chiralen Liganden mit den verschiedensten Metallen, vor allem Übergangsmetallen, machten die Lewis-Säure Katalysatoren zu einer wichtigen Klasse von Werkzeugen für die asymmetrische Katalyse.<sup>44,45</sup>

Zink hat, im Vergleich zu anderen Übergangsmetallen, wie Palladium, entscheidende Vorteile; es ist leicht zugänglich, günstig und wenig toxisch. Dadurch haben Zink(II)-Komplexe in den unterschiedlichsten organischen Reaktionen, als Katalysatoren Anwendung gefunden. In Kombination mit chiralen Liganden werden sie heute in der asymmetrischen Synthese von Oxidationen, Reduktionen, über C-C, C-N, C-O Bindungsbildende Reaktionen bis hin zu stereoselektiven Polymerisierungen und Cyclopropanierungen eingesetzt.<sup>46-48</sup> Ein für Reaktionen zum Aufbau neuer C-C Bindungen sehr häufig genutzter chiraler Ligand ist BINOL und dessen Derivate.<sup>49</sup> Bereits 1985 konnte von Yamamoto *et al.* die Zyklisierungsreaktion von 3-Methylcitronellal **1** zum 3-Methylisopulegol **2** mit Hilfe des Zn(II)-BINOL Komplexes mit sehr guten Ausbeuten und Selektivitäten durchgeführt werden (**Abbildung 6**).<sup>50,51</sup>

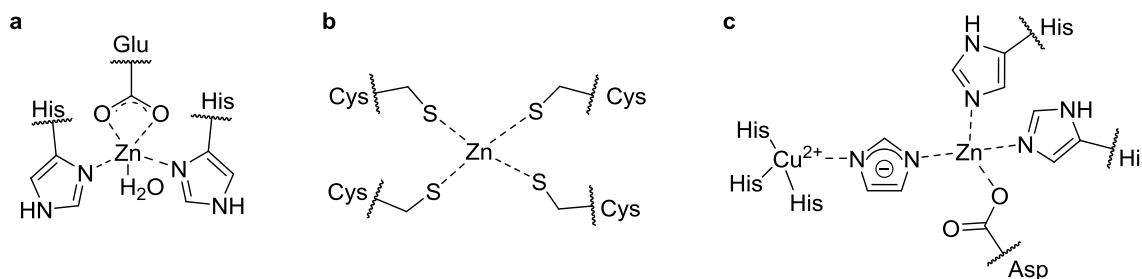


**Abbildung 6:** Zyklisierung von 3-Methylcitronellal **1** unter Einsatz des chiralen Zn(II)-BINOL Komplexes.<sup>51</sup>

Durch die darauf folgende Weiterentwicklung der BINOL-Derivate in Kombination mit Zink(II) eröffnete sich zudem ein großes Reaktions- und Substratspektrum für Aldol Reaktionen, Diels-Alder Reaktionen, Michael Reaktionen und Mannich Reaktionen.<sup>47,52-56</sup>

### 1.2.2 Zink-abhängige Enzyme als Lewis-Säure Katalysatoren

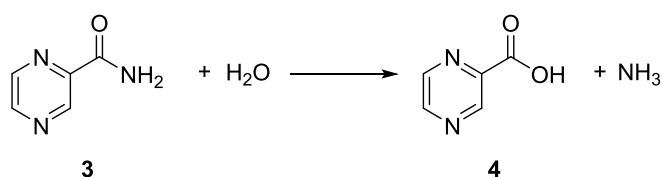
Ca. 50 % aller Enzyme sind Metalloenzyme und enthalten ein oder mehrere Metallionen, welche über koordinationsfähige Aminosäurereste (Histidin, Cystein, Asparagin- oder Glutaminsäure) an das Enzym gebunden sind. Die Metallionen in Metalloenzymen nehmen entweder als Lewis-Säuren-Katalysatoren oder Redoxkatalysatoren an der Reaktion teil. Das wichtigste als Lewis-Säure fungierende Metallion ist das Zink(II), welches in zahlreichen essentiellen Enzymen die am Aufbau (Synthetasen, Polymerasen, Ligasen und Transferasen) und Abbau (Hydrolasen) von wichtigen bioanorganischen Molekülen beteiligt sind, vorkommt. Zwei Eigenschaften des Zink(II) sind neben seiner Lewis-Säure Funktion, es ist nach Kupfer in Wasser das Lewis-sauerste Metall, für die effektive Katalyse von besonderer Bedeutung. Erstens besitzt es eine  $d^{10}$ -Konfiguration und hat daraus folgend keine bevorzugte Koordinationszahl. Es kann die Koordinationszahl vier (tetraedrisch) genauso wie die Koordinationszahl fünf (trigonal-bipyramidale oder quadratisch-pyramidale) oder die Koordinationszahl sechs (oktaedrische), sowie eine Vielzahl an verzerrten Geometrien dazwischen einnehmen. Dadurch kann das Proteingerüst die Koordinationsgeometrie stark beeinflussen und dem Substrat ist es möglich während der Reaktion in einer dem Übergangszustand ähnlichen Geometrie an das Metall zu koordinieren. Voraussetzung für die Substrataktivierung ist die feste Koordination des katalytisch aktiven Zink(II)s im aktiven Zentrum an das Proteingerüst, welche über eine Aminosäure-Triade aus Histidin-Aminosäureseitenketten und Asparagin- und Glutaminsäuren gegeben ist (**Abbildung 7a**). Zweitens besitzt Zink(II) eine sehr hohe Wasseraustauschrate, was für seine Funktion in Hydrolasen durch Wasserkoordination ein Hydroxidion für die Katalyse bereitzustellen unabdingbar ist. Neben der Lewis-Säure Funktion kann Zink(II) auch rein strukturelle oder cokatalytische Aufgaben übernehmen. Bekanntestes Beispiel für eine Strukturfunktion ist die Alkoholdehydrogenase, in welcher das Zink zur räumlichen Fixierung an vier Cystein Aminosäuren gebunden ist (**Abbildung 7b**). Cokatalytische Zinkbindestelle bestehen aus zwei oder mehr Metallionen, wobei meist Zink in Kombination mit Eisen oder Kupfer vorkommt, wie im Beispiel der Cu,Zn-Superoxid-Dismutase (**Abbildung 7c**).<sup>57-64</sup>



**Abbildung 7:** Mögliche Funktionen des Zink(II) in Enzymen **(a)** Katalytisch aktives Zink(II) in der Carboxypeptidase koordiniert an zwei Histidin-Aminosäureseitenketten und eine Glutaminsäure. Zink(II) ist hier direkt an Bindungsbrüchen und -bildungen beteiligt. **(b)** Das rein strukturelle Zink(II) der Alkoholdehydrogenase gebunden an vier Cystein Aminosäuren, dient ausschließlich zur räumlichen Fixierung und ist nicht an der Katalyse beteiligt. **(c)** Das kokatalytisch aktive Zink in der Superoxid-Dismutase ist über zwei Histidin-Aminosäureseitenketten und eine Asparaginsäure an das Protein koordiniert und fixiert und aktiviert ein vom Substrat vorübergehend verdrängtes Histidin, welches deprotoniert und resonanzstabilisiert Kupfer und Zink verbrückt.<sup>57</sup>

### 1.2.3 Pyrazinamidase PH999

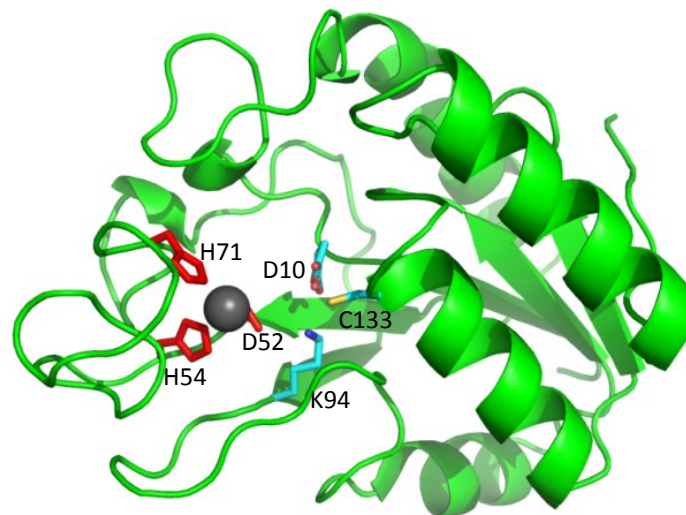
Pyrazinamid **3** (PZA) ist eines der wichtigsten Medikamente in der Tuberkulose Therapie.<sup>65</sup> In seiner aktiven Form Pyrazinsäure **4** inhibiert es die Typ I Fettsäure-Synthase, unterdrückt die Mykolsäure Biosynthese und beeinflusst die Versauerung des Cytoplasmas von *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>66,67</sup> Mutationsstudien des *pncA* Gens, welches die Pyrazinamidase (PZAase) kodiert, haben gezeigt, dass die *Mycobacterium tuberculosis* Resistenz mit der Aktivität der PZAase zusammenhängt.<sup>68</sup> Die Pyrazinamidase gehört zur Klasse der Hydrolasen und katalysiert als natürliche Reaktion die Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zu Pyrazinsäure **4** und Ammoniak (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Natürliche Reaktion der Pyrazinamidase (PZAase), die Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zu Pyrazinsäure **4** und Ammoniak.<sup>69</sup>

*Pyrococcus horikoshii* ist ein hyperthermophiler Organismus mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 98°C.<sup>70</sup> Für die aus diesem Organismus stammende thermophile PZAase PH999 mit einer 37 %-igen Sequenzidentität zu *Mycobacterium tuberculosis* wurde die Expression in *E. coli* etabliert, die Struktur gelöst und anhand dieser der Reaktionsmechanismus aufgeklärt. Die PZAase ist ein Zink(II)-abhängiges Metalloenzym, bestehend aus sechs parallelen  $\beta$ -Faltblättern, welche zur Ausbildung der  $\alpha/\beta$ -

Einzelndomäne, auf einer Seite von  $\alpha$ -Helices und auf der anderen Seite von einer  $\alpha$ -Helix und einem langen *Loop* umgeben sind. Der *Loop* formt die aktive Tasche, welche größer als das Substrat Pyrazinamid **3** ist und eine Asp52/His54/His71-Triade besitzt, an welche das Zink(II) oktaedrisch mit drei Wassermoleküle koordiniert. Neben der Zinkbindestelle findet sich in der aktiven Tasche zudem noch eine katalytische aktive Triade bestehend aus Cys133, Lys94 und Asp10 (**Abbildung 9**).<sup>69</sup>



**Abbildung 9:** Struktur der Pyrazinamidase P999 mit Zn(II), dargestellt als graue Sphäre, koordiniert an die Asp52/His54/His71-Triade (rote Sticks), sowie die Aminosäure der aktiven Tasche Lys94, Cys133 und Asp10 (cyane Sticks) (PDB-Code: 1IM5).<sup>69</sup>

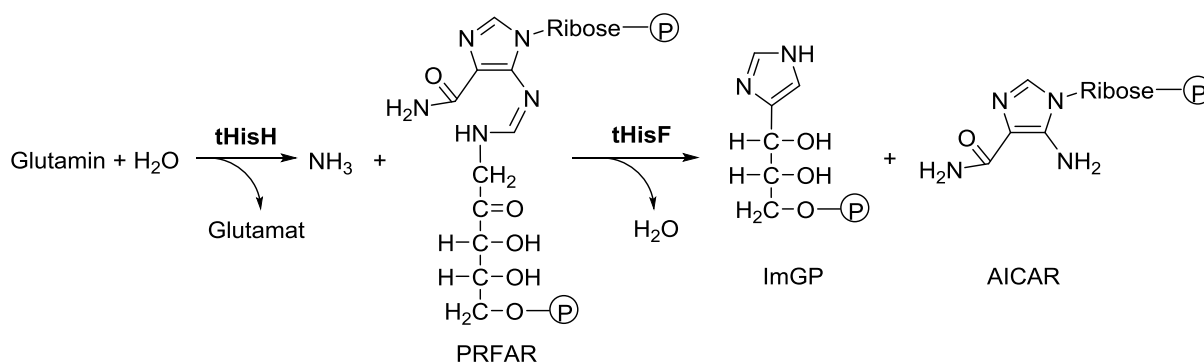
Der von Du *et al.* vorgeschlagene Katalysemechanismus für Pyrazinamidasen kann in zwei wesentliche Schritte unterteilt werden. In der ersten Hälfte wird Pyrazinamid **3** gebunden und das Cystein 133 durch die als Base fungierende Asparaginsäure 10 aktiviert. Anschließend wird der Carbonylkohlenstoff des Pyrazinamids durch das Cystein angegriffen, um durch Bildung einer Thioester-Bindung und unter Abspaltung von Ammonium das acylierte Enzym zu bilden. In der zweiten Hälfte findet die Hydrolyse durch einen nukleophilen Angriff des am Zink(II) aktivierten Wasserstoffmoleküls auf die Thioester-Bindung statt.<sup>69</sup>

## 1.2.4 Imidazol Glycerinphosphat-Dehydrogenase Untereinheit tHisF

### 1.2.4.1 Natürliche Funktion und Struktur der tHisF

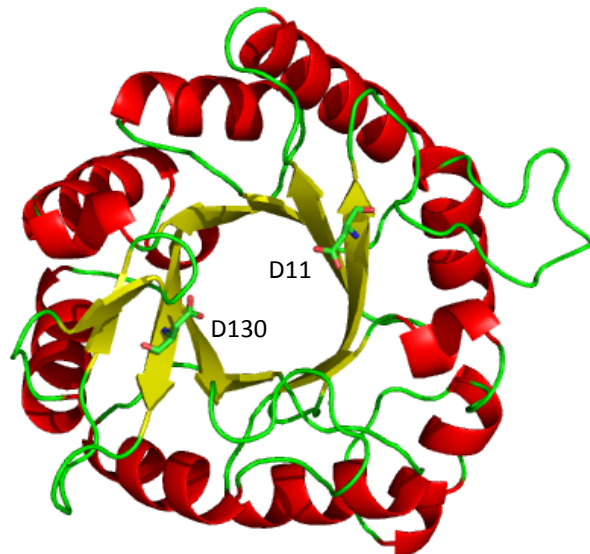
Die tHisF ist eine Untereinheit der thermophilen Imidazol Glycerinphosphat-Dehydrogenase (ImGPase) aus dem Bakterium *Thermotoga maritima*. Die ImGPase gehört zur Familie der

Glutamin-Aminotransferasen (GATasen) und ist ein Schlüsselenzym der Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese, welches in der Histidinbiosynthese und der *de novo* Purinbiosynthese involviert ist.<sup>71</sup> Die ImGPase ist aus zwei Untereinheiten mit je einem aktiven Zentrum aufgebaut. Der tHisH Glutaminase-Untereinheit, welche die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat unter Abspaltung von Ammoniak katalysiert und der Synthase-Untereinheit tHisF. Die tHisF katalysiert im ersten Schritt die Kondensation von *N'*-((5'-Phosphoribulosyl)formimion)5-aminoimidazol-4-carboxamide-ribonukleotid (PRFAR) mit dem durch die tHisH gebildeten Ammoniak zum Imin I, welches mit Wasser unter Abspaltung von 5-Aminoimidazol-4-carboxamideribotid (AICAR) zum Imin II reagiert. Im zweiten Schritt zyklisiert das Imin II durch eine Säure-Base Reaktion unter Wasserabspaltung zum Imidazolglycerinphosphat (ImGP) (**Abbildung 10**).<sup>72-74</sup>



**Abbildung 10:** Natürliche Reaktion der ImGPase aus *Thermotoga maritima* in der Histidin-Biosynthese mit den beiden Reaktionen der Untereinheiten tHisH und tHisF.<sup>74</sup>

Die Kristallstruktur der tHisF zeigt, dass die tHisF Untereinheit aus einer für ihre Stabilität bekannten TIM-Barrel Struktur mit acht  $\alpha$ -Helices und acht  $\beta$ -Faltblättern besteht. Die  $\beta$ -Faltblätter sind in der Mitte parallel zueinander angeordnet und werden von den  $\alpha$ -Helices umgeben, wobei jedes Faltblatt mit einer Helix verbunden ist, so dass annähernd von einer  $(\alpha/\beta)_8$ -Struktur gesprochen werden kann. Aus Mutationsstudien ist bekannt, dass für den Säure-Base-Mechanismus vom Imin II zum ImGP die Aminosäuren D11 und D130 essentiell sind. Die beiden Asparaginsäuren befinden sich im TIM-Barrel auf gegenüberliegenden Seiten (**Abbildung 11**).<sup>74-79</sup>

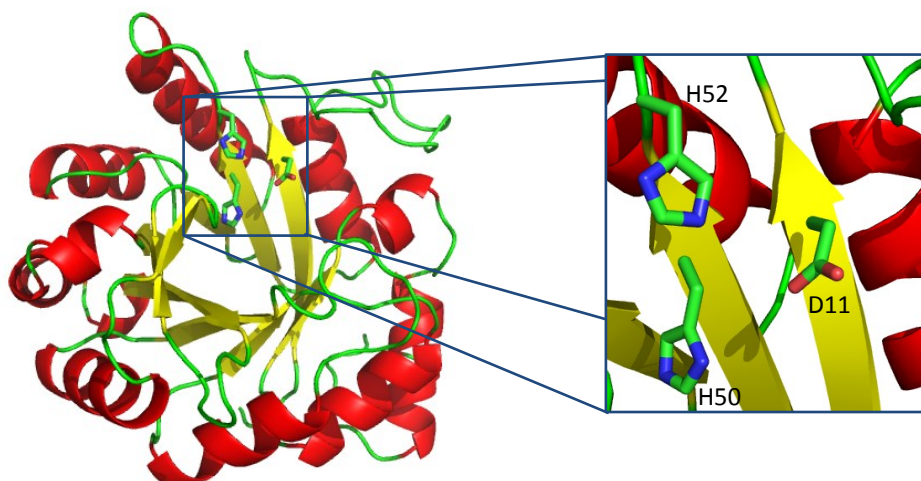


**Abbildung 11:** TIM Barrel Struktur der tHisF-Untereinheit der Imidazol Glycerinphosphat-Dehydrogenase mit acht  $\alpha$ -Helices (rot) und acht  $\beta$ -Faltblättern (gelb). Im Inneren befinden sich die für den Säure-Base-Mechanismus essentiellen Asparaginsäuren Asp11 und Asp130 (grüne Sticks) (PDB-Code 2A0N).<sup>77</sup>

#### 1.2.4.2 Artificielle Metall-bindende tHisF-Mutante

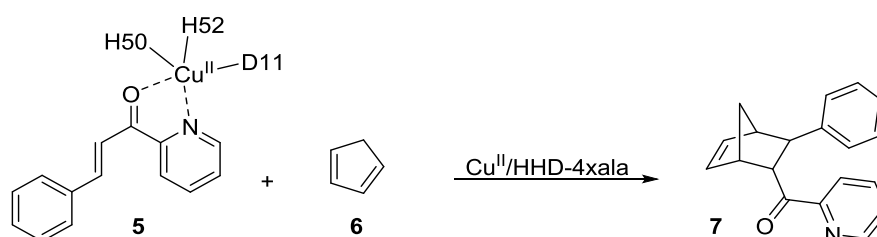
Die Thermostabilität der tHisF, sowie ihre gute Expressierbarkeit in *E. coli* und eine einfache Reinigung der tHisF im großen Maßstab durch Hitzefällung der restlichen *E. coli* Proteine waren für Reetz *et al.* bereits in früheren Arbeiten gute Gründe für die Wahl der tHisF als Proteingerüst für artifizielle Enzyme. Durch kovalente Bindung wurden chemische Liganden für die Metallkoordination oder Organokatalysatoren an das Proteingerüst tHisF gebunden und gezeigt, dass die tHisF als Proteingerüst für artifizielle Enzyme verwendet werden kann.<sup>80</sup> Aufbauend auf diesen Arbeiten wurde die tHisF mit den oben genannten Vorteilen auch als Proteingerüst für eine artifizielle Kupfer-bindende tHisF Variante gewählt. Die benötigte Metallbindestelle wurde in Form einer His/His/Asp Triade, wie sie aus natürlichen Metalloenzymen bekannt ist, durch Punktmutationen eingeführt.<sup>42,64,81</sup> Die benötigte Asparaginsäure ist in der tHisF bereits an Position 11 vorhanden und die Positionen für die beiden benötigten Histidin-Aminosäureseitenketten wurden auf dem zur Asparaginsäure benachbarten  $\beta$ -Faltblatt gewählt. Die Aminosäuren Leucin an Position 50 und Isoleucin an Position 52 wurden durch zwei Histidin Aminosäuren ersetzt. Zusätzlich wurden die zur Triade kompetitiven vier Histidin Aminosäuren (H84, H209, H228 und H244) und ein Cystein (C9) an der Oberfläche und im Inneren des TIM Barrels durch Alanin ersetzt und so die tHisF HHD-4xala Mutante (HHD) mit den Mutationen C9A, L50H, I52H, H84A, H209A, H228A und H244A erhalten (**Abbildung 12**).<sup>42</sup>





**Abbildung 12:** tHisF-Mutante HHD-4xala mit der artifiziell eingeführten His50/His52/Asp11-Triade (grüne Sticks) als Metallbindestelle für Kupfer(II) (PDB-Code 2A0N).<sup>42</sup>

Zudem wurde eine Negativkontrollmutante NC-4xala (NC) mit den Mutationen C9A, H84A, H209A, H228A und H244A erstellt, welcher sowohl die Metallbindestelle als auch die kompetitiven Histidin Aminosäuren und das Cystein fehlen. Mit Hilfe von ESR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die HHD-Mutante zugegebenes Kupfer (II) an der definierten His/His/Asp Metallbindestelle koordiniert, während im Vergleich für die NC-Mutante nur Hinweise für eine nicht-spezifische Koordination an der Proteinoberfläche gefunden werden konnten.<sup>42</sup> Mit der neuen artifiziellen Kupfer(II) koordinierenden HHD-Mutante konnte die Literatur bekannte Diels-Alder Reaktion des Azachalcon **5**, welches gute koordinativen Eigenschaften gegenüber Kupfer besitzt, mit Cyclopentadien **6** katalysiert werden.<sup>82,83</sup> Die Ergebnisse zeigen für die HHD-Mutante im Vergleich zum freien Kupfer(II) eine um das 1,6-fache erhöhte Aktivität. Zudem wird mit der HHD-Mutante durch die Funktion des Kupfer(II)s als Lewis-Säure und des Proteingerüsts als chiraler Ligand Selektivität induziert und der Enantiomerenüberschuss des Produkts **7** steigt auf 46 % im Vergleich zum racemischen Produkt, gebildet durch die NC-Mutante oder freies Kupfer(II) (**Abbildung 13**).<sup>42</sup>



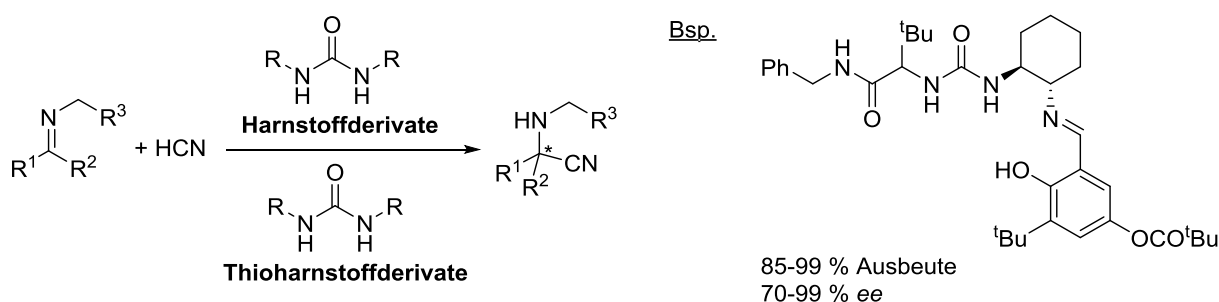
**Abbildung 13:** Diel-Alder-Reaktion des Azachalcon **5**, koordiniert über eine Fünf-Ring Chelat Übergangszustand an das Kupfer(II) mit Cyclopentadien **6** in wässrigem Medium zum Produkt **7**.<sup>42</sup>

## 1.3 Brønsted-Säure Katalyse

Organokatalysatoren haben sich im Laufe der Jahre als Brønsted-Säure Katalysatoren in der chiralen homogenen Katalyse für eine Vielzahl an Reaktionen etabliert, wobei das Substrat durch Protonierung seiner funktionellen Gruppen durch die Brønsted-Säure aktiviert wird. Auch in der Enzymkatalyse ist das Prinzip der Brønsted-Säure Katalyse weit verbreitet. Ein bekanntes und vielseitiges Beispiel für eine spezifische Brønsted-Säure ist die katalytisch aktive Asparaginsäure in Squalen-Hopfen Zyklasten.

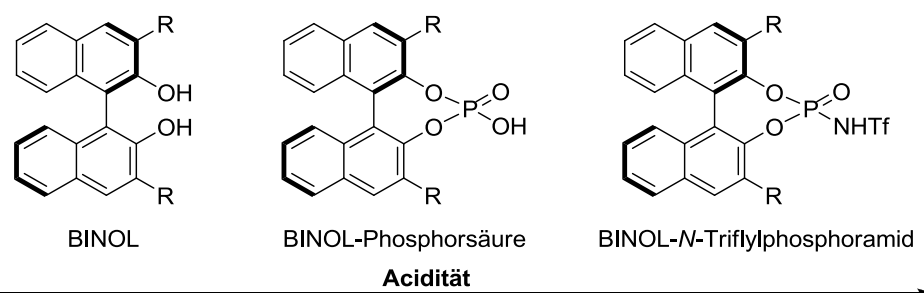
### 1.3.1 Chirale Brønsted-Säuren in der chemischen Katalyse

Das Feld der chiralen Brønsted-Säure Katalyse kann aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionsmechanismen in die allgemeine und die spezifische Brønsted-Säure Katalyse unterteilt werden. In welche der beiden Klassen eine Brønsted-Säure eingestuft wird hängt dabei stark von ihrer Acidität und der Basizität des Substrats ab. Allgemeine Brønsted-Säuren sind schwache Säuren mit  $pK_S$ -Werten von  $\sim 10 - 30$  und fungieren als Wasserstoffbrückendonoren, wodurch sie den Übergangszustand während der Katalyse stabilisieren können. Im Gegensatz zu den allgemeinen Brønsted-Säuren fungieren die speziellen Brønsted-Säuren als Protonendonoren. Es handelt sich um starke Säuren mit  $pK_S$ -Werten von  $-5$  bis  $5$ , welche auch unreaktive Substrate effizient in einem vorgelagerten Gleichgewicht protonieren können. Sowohl die allgemeinen als auch die speziellen Brønsted-Säuren haben sich in einem rasanten Tempo als universelle Katalysatoren für die verschiedensten organischen Reaktionen entwickelt.<sup>84-89</sup> Erstes Beispiel auf dem Gebiet der allgemeinen chiralen Brønsted-Säure Katalyse war die Strecker-Reaktion von Jacobsen *et al.*, in welcher Thioharnstoff- oder Harnstoffderivate als chirale Wasserstoffbrückendonoren zur Aktivierung des Imins verwendet wurden (**Abbildung 14**).<sup>90-92</sup>



**Abbildung 14:** Strecker Reaktion mit Harnstoff- und Thioharnstoffderivaten als allgemeine Brønsted-Säure Katalysatoren nach Jacobsen *et al.*, beispielhaft ist ein Harnstoffderivat mit den erzielten Ausbeuten und Enantioselektivitäten für >50 verschiedene Substrate gezeigt.<sup>92</sup>

Im Vergleich zu BINOL-Derivaten, welche von McDougal *et al.*<sup>93</sup> als allgemeine Brønsted-Säure für die chirale Katalyse der Morita-Baylis-Hillman Reaktion verwendet wurde, sind die abgeleiteten BINOL-Phosphorsäuren deutlich acider und fungieren als spezifische Brønsted-Säuren. So wurde das BINOL-Hydrogenphosphat erstmals 2004 unabhängig von zwei Forschergruppen zur Aktivierung von Imin-Substraten für die asymmetrische Mannich Reaktion verwendet.<sup>94,95</sup> Nachdem die BINOL-Phosphorsäuren in weiteren zahlreichen Reaktionen als chirale Brønsted-Säuren zum Einsatz kamen, gelangen diese bei der Aktivierung von Carbonylen an ein Limit und es wurden noch acidere Verbindungen benötigt. Hierfür wurde die OH-Gruppe gegen die stark elektronenziehende Gruppe NTf ersetzt und es entstanden die BINOL-*N*-Triflylphosphoramid Derivate.<sup>86,87</sup> In der asymmetrischen Diels-Alder Reaktion eines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketons mit einem Silyloxydiens wurde ein BINOL-*N*-Triflylphosphoramid Derivat erstmals von Yamamoto *et al.* eingesetzt (**Abbildung 15**).<sup>96</sup>

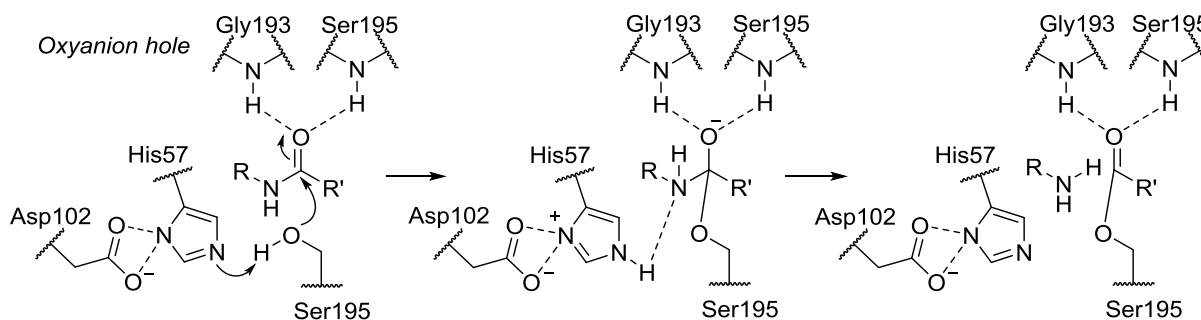


**Abbildung 15:** BINOL, BINOL-Phosphorsäure und BINOL-*N*-Triflylphosphoramid Derivate mit steigender Acidität und daraus resultierende die Möglichkeit immer unreaktivere Substrate in der asymmetrischen organischen Katalyse zu aktivieren. Bei BINOL Derivaten handelt es sich um eine allgemeine Brønsted-Säure, während BINOL-Phosphorsäure und BINOL-*N*-Triflylphosphoramid Derivate zur Klasse der speziellen Brønsted-Säuren zählen.<sup>87,89</sup>

### 1.3.2 Enzymkatalysatoren auf Brønsted-Säure Basis

Die Brønsted-Säure Katalyse und deren Unterteilung in allgemeine und spezifische Brønsted-Säuren sind auch in der Biokatalyse bekannt. So katalysieren Enzyme Reaktionen in vielen Fällen indem sie als allgemeine Brønsted-Säuren den Übergangszustand durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren. Bei der Bindungsknüpfung oder beim Bindungsbruch wird die Basizität des Substrats verstärkt und die freie Energie des aktivierten Komplexes durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Substrat und den Aminosäuren der aktiven Tasche reduziert. Mit dem Lösen der ersten Kristallstruktur, die eines Lysozyms mit dem co-kristallisiertem Polysaccharid (*N*-Acetylglucosamin)<sub>3</sub>, wurde

die Übergangsstabilisierung des tetraedrischen Intermediats durch Wasserstoffbrückenbindungen bestätigt.<sup>97-100</sup> Ein weiteres Beispiel, in welchem die Aminosäuren als allgemeine Brønsted-Säure ähnlich den Thioharnstoff- und Harnstoffderivate in der organischen Synthese fungieren, findet man in Enzymen in Form des *oxyanion holes*. Es ist Bestandteil der meist hydrolytischen Enzyme wie Hydrolasen, Lipasen, Proteasen und Esterasen und aktiviert das Elektrophil über eine doppelte Wasserstoffbrückenbindung (**Abbildung 16**).<sup>101</sup>



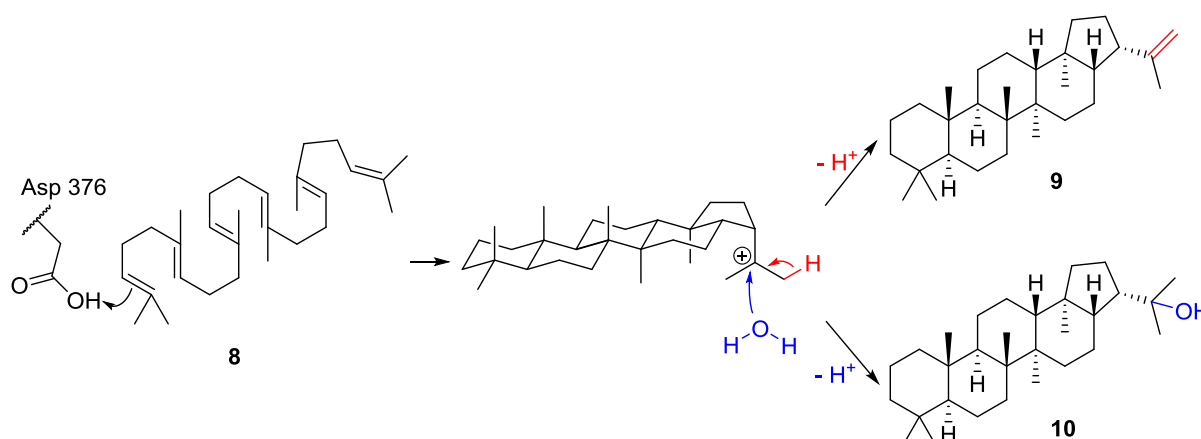
**Abbildung 16:** Die Serinprotease hydrolysiert die Amidbindung über einen zweistufigen Mechanismus mit einem kovalenten tetraedrischen Übergangszustand. Dieser wird durch nukleophilen Angriff des Serins, welches über die katalytische Triade aus Asp und His aktiviert ist, an das Carbonyl gebildet. Das *oxyanion hole* wird durch zwei Wasserstoffatome des Proteinrückrats (Gly193 und Ser195) gebildet und aktiviert als allgemeine Brønsted-Säure das Substrat.<sup>101</sup>

Bei Enzymen handelt es sich durch die geringe Acidität der Aminosäuren meist um allgemeine Brønsted-Säuren, welche nicht in der Lage sind anspruchsvolle Substrate zu protonieren. Die Funktion als spezifische Brønsted-Säure in Biokatalysatoren ist kaum beschrieben, eine Ausnahme ist die katalytisch aktive Asparaginsäure der Squalen-Hopen Zyklenen.<sup>102,103</sup>

### 1.3.3 Squalen-Hopen-Zyklase AacSHC

Squalen-Hopen Zyklenen katalysieren komplexe Polyzyklisierungsreaktionen von Terpenen, bei welchen stereoselektiv C-C Bindungen gebildet und somit größere Kohlenstoffgerüste aufgebaut werden. Die katalytisch aktive Asparaginsäure fungiert dabei als spezifische Brønsted-Säure und protoniert die terminale C-C Doppelbindung.<sup>103</sup> Die Squalen-Hopen Zyklase AacSHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* katalysiert in ihrer natürlichen Funktion die Polyzyklisierung von Squalen **8** zu Hopen **9** und Hopanol **10**.<sup>104</sup> Da es sich um eine Terpen-Zyklase der Klasse II handelt wird im ersten Schritt die Kaskade durch Protonierung der terminalen C-C Doppelbindung mit Hilfe der katalytisch aktiven Asparaginsäure 376 gestartet. Das entstandene reaktive Carbokation greift kaskadenartig das jeweils nächste  $\pi$ -

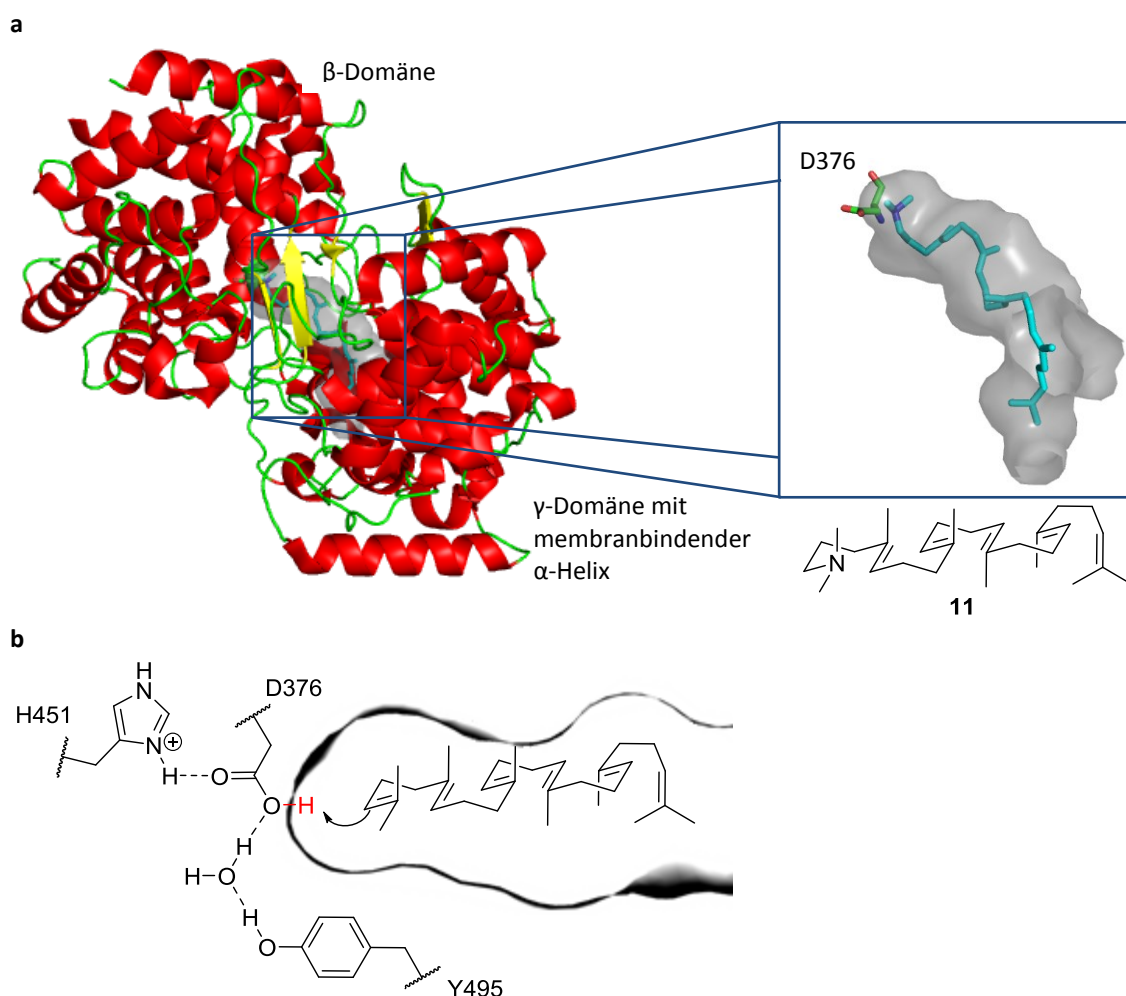
System der benachbarten C-C Doppelbindung an. Im letzten Schritt der konzertierten Zyklisierung entstehen die beiden Produkte Hopan **9** und Hopanol **10** im Verhältnis 5:1 durch Deprotonierung bzw. durch nukleophile Addition eines Wassermoleküls.<sup>105,106</sup> Am Ende werden in der kaskadenartigen Polyzyklisierung fünf neue C-C Bindungen geknüpft und neun neue Chiralitätszentren aufgebaut (**Abbildung 17**).<sup>107</sup>



**Abbildung 17:** Die von *AacSHC* katalysierte natürliche Polyzyklisierung von Squalen **8** durch initiale Protonierung der endständigen C-C Doppelbindung. Das finale Carbokation wird durch Deprotonierung (rot) oder nukleophile Addition von Wasser (blau) abgefangen und führt zu den pentacyclischen Produkten Hopan **9** und Hopanol **10**. Die beiden Produkte entstehen in einem Verhältnis 5:1.

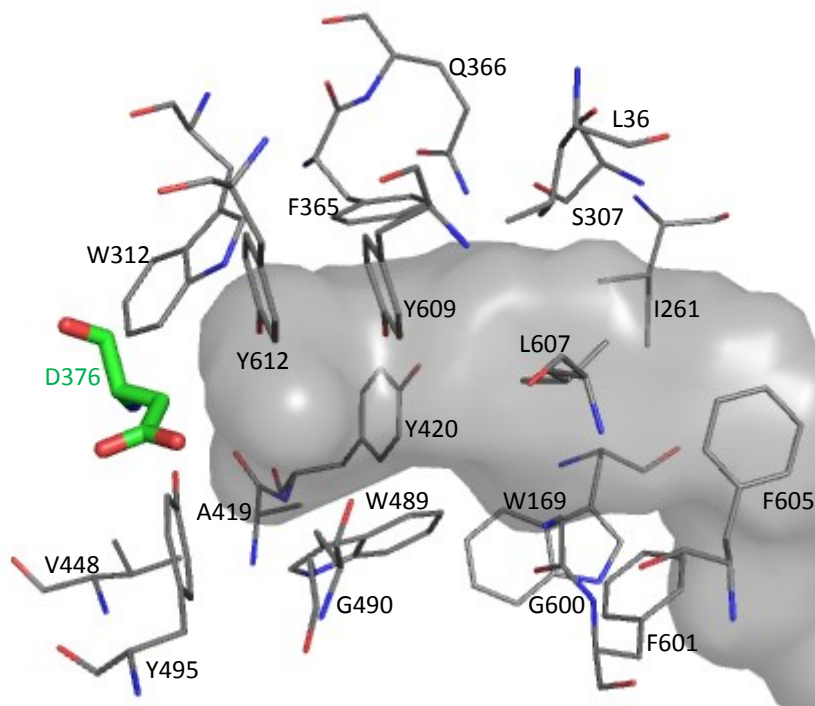
Die Kristallstruktur der *AacSHC* wurde im Jahr 1998 gelöst und anhand dieser wurden seitdem verschiedene mechanistische Studien durchgeführt.<sup>104,108–111</sup> Bei der *AacSHC* handelt es sich um ein monomeres Membranprotein, welches aus einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Domäne jeweils mit einer  $(\alpha/\alpha)_6$ -Fasstruktur aufgebaut ist.<sup>104</sup> Die äußeren  $\alpha$ -Helices sind durch QW-Strukturmodule verbunden, welche mit ihren typischen hochkonservierten Aminosäuresequenzen QxxDGGWG oder QxxDGSWG eine charakteristische *loop*-Struktur bilden. Die *AacSHC* bindet mit einer  $\alpha$ -Helix der  $\gamma$ -Domäne an die Proteinmembran, an welcher sich auch der hydrophobe Substratkanal befindet. Hierdurch wird das Substrat aus der Membran aufgenommen und die zyklischen Produkte vermutlich wieder in diese abgegeben. Durch den Substratkanal ist die aktive Tasche zwischen den beiden Proteindomänen gelegen mit der Proteinmembran verbunden. Die katalytisch aktive Asparaginsäure (D376) liegt am Ende der hydrophoben aktiven Tasche, eingebettet in dem in SHC's konservierten DxDD-Sequenzmotiv und stellt das Proton für die Protonierung der Doppelbindung zur Verfügung. Dieses Proton hat eine biologisch ungewöhnlich hohe Acidität, welche auf die *anti*-Orientierung des Protons zurückzuführen ist. Diese wird durch die Stabilisierung des Protons mit einem spezialisierten Wasserstoffbrücken-Netzwerk aus den Aminosäuren Histidin (H451) und Tyrosin (Y495) und einem Wassermolekül

realisiert.<sup>106,109,110,112,113</sup> Die aktive Tasche selbst besteht hauptsächlich aus hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren, wodurch das Squalen **8** in einer für die Polyzyklisierung vorgefalteten reaktiven Konformation in der aktiven Tasche stabilisiert wird. Die Co-Kristallisation mit dem Substratanalogen und Inhibitor 2-Azasqualen **11** zeigt, dass auch dieses in einer notwendigen vorgefalteten reaktiven Konformation in der aktiven Tasche vorliegt, wodurch die Zyklisierung stattfinden könnte.<sup>113</sup> Während der Katalyse werden zudem die carbokationischen Intermediate mit Hilfe der aromatischen Aminosäuren durch  $\pi$ -Elektronen Interaktionen stabilisiert und so eine vorzeitige Reaktion mit Wasser vorgebeugt (**Abbildung 18**).<sup>111,114</sup>



**Abbildung 18:** (a) Struktur des monotopischen Membranproteins AacSHC. Die Kristallstruktur der AacSHC mit dem co-kristallisierten Inhibitor 2-Azasqualen **11** (cyan), welches in einer reaktiven Konformation in der reaktiven Tasche gebunden ist. Die aktive Tasche (grau) befindet sich zwischen den Domänen und besitzt an ihrem Ende die katalytisch aktive Asparaginsäure 376 (PDB-Code: 1UMP). (b) Das im Vergleich zum *trans*-Proton wesentlich acidere *cis*-Proton, welches durch das Wasserstoffbrücken Netzwerk zwischen H451, Y495 und einem Wassermolekül aktiviert und stabilisiert wird. Das *cis*-Proton ist somit in der Lage durch Protonierung des Squalens **8** an der terminalen C-C Doppelbindung die Polyzyklisierung zu starten.

Die *AacSHC* akzeptiert neben dem natürlichen Substrat Squalen **8** ein großes Substratspektrum und setzt diese selektiv um. Es reicht von einem um eine Isopreneinheit verlängerten Substrat (C<sub>35</sub>) über verschiedene Kettenlängen bis hin zum Sesquiterpene Farnesol (C<sub>15</sub>).<sup>115,116</sup> Hoshino *et al.* zeigte, dass durch den Einsatz verschiedener Mutanten der aktiven Tasche bei der Zyklisierung von Squalen **8** eine bemerkenswerte Produktvielfalt erreicht wird und auch Monozyklisierungen zu neuen, nicht-natürlichen Produkten möglich sind.<sup>111</sup> Die Monozyklisierung von Geraniol (C<sub>10</sub>) zeigte mit der *AacSHC* jedoch keinen Umsatz, da es vermutlich durch seine stark verkürzte Struktur in der aktiven Tasche keine für die Reaktion erforderliche reaktive Sesselkonformation einnehmen kann.<sup>116,117</sup> Ein Lösungsansatz, um die Katalyse der Monozyklisierung von Geraniol mit Hilfe der *AacSHC* zu ermöglichen, war die Anpassung der aktiven Tasche an das Substrat und eine damit verbundene Stabilisierung der vorgefalteten reaktiven Konformation des Substrats in der aktiven Tasche von Hammer *et al.*<sup>118</sup> Hierfür wurde eine fokussierte *AacSHC*-Mutantenbibliothek generiert, für welche innerhalb eines Abstands von 15 Å zur katalytisch aktiven Asparaginsäure 376 Aminosäuren der ersten Sphäre der aktiven Tasche substituiert wurden. Um ein maximal diverses Set an Formen der aktiven Tasche zu bekommen, wurde an den 16 Positionen jeweils mit möglichst kleinen und großen hydrophoben Aminosäuren substituiert.<sup>118</sup> In weiterführenden Arbeiten von Silke Bastian wurden zusätzlich noch weitere Positionen in der ersten Sphäre der aktiven Tasche aufgenommen, so dass die *AacSHC*-Mutantenbibliothek zuletzt 19 Positionen mit insgesamt 64 Mutanten umfasste (**Abbildung 19**). Zusätzlich wurde die Kontrollmutante D376C erstellt, bei welcher die katalytisch aktive Asparaginsäure durch das inaktive Cystein ersetzt wurde und somit keine Protonierung des Substrats mehr möglich ist. Die *AacSHC*-Mutantenbibliothek zeigte seine Diversität bereits beim Umsatz mit Squalen **8** zu unterschiedlichen mono-, di- und mehrfachzyklisierten Produkten. Darüber hinaus konnten Mutanten für die erfolgreiche selektive Monozyklisierung von Geraniol identifiziert werden.

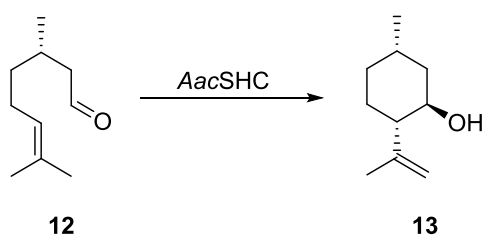


**Abbildung 19:** Aktive Tasche der AacSHC mit den Aminosäurepositionen der ersten Sphäre mit einem Abstand von bis zu 15 Å zur katalytisch aktiven Asparaginsäure 376, welche für die fokussierte AacSHC-Mutantenbibliothek substituiert wurden (PDB-Code: 1UMP).<sup>118</sup>

Eine weitere bekannte Säure-katalysierte Reaktion ist die Prins-Reaktion von Citronellal **12**, bei welcher durch die Protonierung der Carbonylgruppe eine Mischung aus den verschiedenen Isopulegolisomere hergestellt werden kann.<sup>119</sup> Die Produktvielfalt in einer achiralen Umgebung ist auf die unterschiedlichen reaktiven Sesselkonformationen und deren Energien im Übergangszustand zurück zu führen, wobei es durch die unterschiedlich stark ausgeprägten 1,3 diaxialen Wechselwirkungen zu den Energiedifferenzen kommt. Somit ist der unterschiedliche Angriff der Alkengruppe an die aktivierte Carbonylgruppe möglich.<sup>120</sup> Arbeiten von Siedenburg *et al.* zeigten, dass beim Einsatz der Squalen-Hopen-Zyklase von *Zymomonas mobilis* ZmoSHC1 eine Aktivität für die Monozyklisierung von Citronellal **12** von 30 % beobachtet werden kann. Mit Hilfe der Mutante F486A konnte eine Aktivitätssteigerung auf 60 % erreicht werden. Jedoch sind beide Umsetzungen mit Wildtyp und der Mutante aus bisher unbekanntem Gründen wenig selektiv und zeigen ein Isomerengemisch ähnlich in achiraler Umgebung.<sup>121,122</sup> In weiterführenden Arbeiten von Hammer *et al.* konnte mit dem AacSHC Wildtyp eine sehr geringe Aktivität mit vollständiger Selektivität in der Pins-Reaktion von (*S*)-Citronellal **12** (-)-*iso*-Isopulegol **13** beobachtet werden. Aus der AacSHC-Mutantenbibliothek konnte die I261A Mutante, mit einer über



zehnfach höheren Aktivität ohne Verlust der Selektivität, identifiziert werden (**Abbildung 20**).<sup>117,118</sup>



**Abbildung 20:** Prins Reaktion von (*S*)-Citronellal **12** zu (-)-*iso*-Isopulegol **13**. Mit dem AacSHC-Wildtyp kann ein Umsatz von  $0,59 \pm 0,03$  % und  $>99$  % Selektivität erreicht werden. Der Einsatz der I261A Mutante steigert den Umsatz um das über 10-fache auf  $11 \pm 0,01$  % ohne Verlust der Selektivität.<sup>118</sup>

Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Carbonyl-Aktivierung und damit die nicht-natürliche Prins Reaktion durch die als enzymatische Brønsted-Säure agierende AacSHC katalysiert werden konnte. Durch die definierte Form der aktiven Tasche wird das Substrat in einer definierten reaktiven Konformation stabilisiert und ermöglicht somit die selektive Monozyklisierung von Citronellal.



## 2 ZIELSETZUNG UND MOTIVATION

Enzyme mit ihren ausgezeichneten Selektivitäten (Chemo-, Regio- und Stereoselektivität) und hohen katalytischen Aktivitäten bieten eine oft umweltfreundliche Alternative zu klassischen organischen Katalysatoren. Für Reaktionen zum Aufbau neuer, selektiver C-C, C-O, C-S und C-N Bindungen in der organischen Synthese mit Hilfe von enzymatischen Lewis- und Brønsted-Säuren sind bis heute in der Biokatalyse jedoch nur wenige Beispiele bekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll das Anwendungsspektrum von bereits verfügbaren Enzymen für neue, selektive, nicht-natürliche Reaktionen und Substrate untersucht und erweitert werden. In Enzymen sind die Aktivierungsmodi der Lewis- und Brønsted-Säure bekannt und vorhanden, jedoch werden diese Zentren nur für natürliche Reaktionen eingesetzt. Anhand von drei Modellsystemen wurden die Substrat- und Reaktionspromiskuität von Enzymen als enzymatische Lewis- und Brønsted-Säure Katalysatoren für in der chemischen Synthese wichtigen Reaktionen studiert. Als Modellreaktionen wurden die Aldol Reaktion, Michael Reaktion und Prins Reaktion gewählt, bei welchen die Katalyse jeweils durch Aktivierung der Carbonylgruppe mit Hilfe einer Säure erfolgt. Um den Voraussetzungen der organischen Reaktionen, den Einsatz von Lösungsmittel zur Substratsolubilisation und die eventuell benötigten erhöhten Temperaturen gerecht zu werden, wurden thermostabile Enzyme verwendet. In der Natur sind als enzymatische Lewis-Säuren eine Vielzahl an Zink(II)-bindenden Metalloenzymen bekannt. Ihre katalytische Promiskuität soll anhand der natürlichen PH999 aus *Pyrococcus horikoshii* und der artifiziellen Metall-bindenden tHisF aus *Thermotoga maritima* mit Hilfe der Aldol Reaktion und Michael Reaktion mit Thionukleophilen untersucht werden. Das an eine His/His/Asp-Aminosäuretriade koordinierte Zink(II) übernimmt bei beiden Systemen die Funktion der katalytischen Lewis-Säure und das Proteingerüst die des chiralen Liganden. Die Substratpromiskuität wird anhand der Squalen-Hopen-Zyklase AacSHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* als enzymatische spezifische Brønsted-Säure mit einer Asparaginsäure für den Protonentransfer untersucht. Die Protonierung von terminalen C-C Doppelbindungen, sowie die Protonierung der Carbonylfunktion des Citronellals **12** sind bereits beschrieben und zusätzlich wurde eine fokussierte AacSHC Mutantenbibliothek mit Einzelmutanten der

aktiven Tasche mit einer deutlich verbesserten Aktivität und Selektivität erstellt. Ziel in dieser Arbeit war es das Substratspektrum für die Prins Reaktion zur selektiven Monozyklisierung von synthetisierten Fünf-, Sechs- und Siebenringesubstraten durch Verwendung und Erweiterung der *AacSHC* Mutantenbibliothek auszuweiten.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien wurden von den Firmen Alfa-Aesar (Ward Hill, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH), und Sigma-Aldrich (St. Louis, US) bezogen. Verwendete Substrate, welche nicht kommerziell erhältlich waren, wurden chemisch synthetisiert und analysiert (Kapitel 3.7).

#### 3.1.2 Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Für die QuikChange™ PCR wurde die *Pfu* DNA-Polymerase mit der entsprechenden Pufferlösung (GenON, Ludwigshafen, DE) und *DpnI* (Thermo-Scientific, Waltham, US) verwendet. Marker von Fermentas (St. Leon-Rot, DE) wurden für die Agarose-Gelelektrophorese (GeneRuler 1kbp DNA Ladder) und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PageRuler Prestained Protein Ladder und PageRuler Unstained Protein Ladder) verwendet.

#### 3.1.3 Molekularbiologische Kits

Für die DNA-Reinigung (Zymoclean DNA Clean & Concentrator Kit), sowie die Plasmidpräparation (Zyppy™ Plamid Miniprep Kit) wurden molekularbiologische Kits von Zymo Research (Iverine, US) verwendet.

#### 3.1.4 Primer

Synthetische Oligonukleotide (Primer) für die ortsgerichtete Mutagenese (**Tabelle 1** und **Tabelle 2**) und für die DNA-Sequenzierung (**Tabelle 3**) wurden von der Firma Metabion (Matrinsried, DE) bezogen. Die Primer wurden mit ddH<sub>2</sub>O bei 60°C für 10 min zu einer Endkonzentration von 0,1 µmol/µL gelöst und auf eine Arbeitskonzentration von 0,01 µmol/µL verdünnt.

**Tabelle 1:** In dieser Arbeit verwendete Primer für die ortsgerichtete Mutagenese der PH999.

Mutante	Sequenz 5' -> 3' (Primer forward/Primer revers)
PH999_K94A	CGTGATCATTTTCGGCAGCTACAGAGCCAGATAAAGAAGC/ GCTTCTTTATCTGGCTCTGTAGCTGCCGAAATGATCACG
PH999_H54A	GGCCACAAGGGATTGGGCTCTGAAAATCACATAAGC/ GCTTATGTGATTTTCAGGAGCCCAATCCCTTGTGGCC
PH999_H71A	CCTGGCCCAGGGCTTGCGTTCAAAACTCCTG/ CAGGAGTGTTTTGAACGCAAGCCCTGGGCCAGG

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Primer für die ortsgerichtete Mutagenese der AacSHC.

Mutante	Sequenz 5' -> 3' (Primer forward/Primer revers)
AacSHC_L36A	GGCTATTGGTGGGGCCCGCGCTGAGCAACGTG/ CACGTTGCTCAGCGCCGGGCCACCAATAGCC
AacSHC_W169G	GAATTTGGCAGCGGCGCGCGCGACC/ GGTCGCGCGCGCGCCGCTGCCAAATTC
AacSHC_I261A	CCAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGCGGCGCGCAGCCCGTGGTTTTATGCG/ GCGGCTGCGCGCCCGCCAGCTGCCATC
AacSHC_Y420A	GCTGGGGCGCGGCGGATGTGGATAACACCAG/ CTGGTGTATCCACATCCGCGCGCCCGAGC
AacSHC_F601G	CCGGCACCGGGGGCCCGGGCGATTTTTATCTGG/ CCAGATAAAAATCGCCCGGGCCCGGTGCCGG

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Primer für die Sequenzierung.

Primer	Sequenz 5' -> 3'
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
pET_RP	GCAATTAACCTCACTAAAGG
AacSHC_in	CGCTGAGCATTGTGATGAGCCGC

### 3.1.5 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Enzyme auf unterschiedliche Plasmide kloniert verwendet. Das tHisF-Gen aus *Thermotoga maritima* in einen pET-24a(+)-Vektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Reinhard Sterner zur Verfügung gestellt.<sup>74</sup> Das Gen der PH999 aus *Pyrococcus horikoshii* kloniert in einen pET-21a(+)-Vektor wurde freundlicherweise von Prof. S.-H. Kim überlassen.<sup>69</sup> Die Plasmide für AacSHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* in pET-22b(+)-Vektor wurde von Dr. Stephan Hammer, Dr. Christoph Geinitz und Silke Bastian übernommen.<sup>117</sup>

Die pET-Vektoren beruhen auf einem T7-Expressionssystem, bei welchem die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase erfolgt und durch den lac-Repressor kontrolliert wird. Nach Induktion mit IPTG wird der lac-Repressor vom lac-Operator im Promotorbereich des

Zielgens entfernt und die Expression erfolgt mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase, welche an den T7-Promotor bindet.<sup>123</sup> Abhängig vom pET-System enthält pET-24a(+) eine Kanamycin und pET-21a(+) und pET-22b(+) eine Ampicillin Resistenzen zur Selektion.

Alle verwendete Plasmide sind in **Tabelle 4 – Tabelle 6** aufgelistet, die entsprechenden Gensequenzen der Enzyme sind im Anhang dieser Arbeit enthalten (Kapitel 7.2).

**Tabelle 4:** In dieser Arbeit verwendete pET-28a(+)-Plasmide der tHisF.

Variante	Insert	Quelle	ITB-Nr.
tHisF_WT	tHisF_His6	Prof. Sterner <sup>74</sup>	pITB1023
tHisF_HHD <sup>1)</sup>	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_H209A_H228A_H244A	J. Bolsinger	pITB1001
tHisF_NC <sup>1)</sup>	tHisF_C9A_H84A_H209A_H228A_H244A	J. Bolsinger	pITB1002

<sup>1)</sup> Analog zu Reetz *et al.* erstellte Plasmide (Diplomarbeit Jennifer Bolsinger)<sup>42</sup>

**Tabelle 5:** In dieser Arbeit verwendete pET-21a(+)-Plasmide der PH999.

Variante	Insert	Quelle	ITB-Nr.
PH999_WT	PH999	Prof. S.-H. Kim <sup>69</sup>	pITB1362
PH999_K94A	PH999_K94A	Diese Arbeit	pITB1363
PH999_NC	PH999_H54A_H71A	Diese Arbeit	pITB1364
PH999_NC_K94A	PH999_H54A_H71A_K94A	Diese Arbeit	pITB1365

**Tabelle 6:** In dieser Arbeit verwendete pET-22b(+)-Plasmide der AacSHC.

Variante	Insert	Quelle	ITB-Nr.
WT <sup>2)</sup>	AacSHC	S. Hammer	pITB1024
L63A <sup>2)</sup>	AacSHC_L36A	S. Hammer	pITB1025
L36W <sup>2)</sup>	AacSHC_L36W	S. Hammer	pITB1026
W169A <sup>2)</sup>	AacSHC_W169A	S. Hammer	pITB1027
W169G <sup>2)</sup>	AacSHC_W169G	S. Bastian	pITB1291
I261A <sup>2)</sup>	AacSHC_I261A	S. Hammer	pITB1028
I261F <sup>2)</sup>	AacSHC_I261F	S. Hammer	pITB1029
I261G <sup>2)</sup>	AacSHC_I261G	S. Hammer	pITB1030
I261L <sup>2)</sup>	AacSHC_I261L	S. Hammer	pITB1031
I261V <sup>2)</sup>	AacSHC_I261V	S. Hammer	pITB1032
I261W <sup>2)</sup>	AacSHC_I261W	S. Hammer	pITB1033
S307A <sup>2)</sup>	AacSHC_S307A	S. Hammer	pITB1034
S307F <sup>2)</sup>	AacSHC_S307F	S. Hammer	pITB1035
S307G <sup>2)</sup>	AacSHC_S307G	S. Bastian	pITB1292
W312A <sup>2)</sup>	AacSHC_W312A	S. Hammer	pITB1036
W312F <sup>2)</sup>	AacSHC_W312F	S. Bastian	pITB1293
W312G <sup>2)</sup>	AacSHC_W312G	S. Bastian	pITB1294
F365A <sup>2)</sup>	AacSHC_F365A	C. Geinitz	pITB1037
F365C <sup>2)</sup>	AacSHC_F365C	C. Geinitz	pITB1038

---

F365G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F365G</i>	C. Geinitz	pITB1039
F365W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F365W</i>	S. Hammer	pITB1040
Q366A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Q366A</i>	S. Hammer	pITB1041
Q366F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Q366F</i>	S. Hammer	pITB1042
Q366G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Q366G</i>	S. Bastian	pITB1298
Q366W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Q366W</i>	S. Bastian	pITB1299
D376C <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_D376C</i>	S. Hammer	pITB1043
A419F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_A419F</i>	S. Hammer	pITB1044
A419G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_A419G</i>	S. Hammer	pITB1045
A419W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_A419W</i>	S. Bastian	pITB1300
A419Y <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_A419Y</i>	S. Bastian	pITB1301
Y420A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y420A</i>	S. Hammer	pITB1046
Y420C <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y420C</i>	S. Hammer	pITB1047
Y420G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y420G</i>	S. Bastian	pITB1302
Y420W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y420W</i>	S. Hammer	pITB1048
V448A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_V448A</i>	S. Hammer	pITB1049
V448F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_V448F</i>	S. Hammer	pITB1050
V448G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_V448G</i>	S. Bastian	pITB1303
V448W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_V448W</i>	S. Bastian	pITB1304
W489A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_W489A</i>	S. Hammer	pITB1051
W489F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_W489F</i>	S. Bastian	pITB1305
W489G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_W489G</i>	S. Bastian	pITB1306
G490A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_G490A</i>	S. Bastian	pITB1307
G490F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_G490F</i>	S. Bastian	pITB1308
Y495G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y495G</i>	S. Bastian	pITB1309
Y495L <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y495L</i>	S. Bastian	pITB1310
Y495W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y495W</i>	S. Bastian	pITB1311
G600A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_G600A</i>	S. Hammer	pITB1052
G600F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_G600F</i>	S. Hammer	pITB1053
G600L <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_G600L</i>	S. Bastian	pITB1312
G600W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_G600W</i>	S. Bastian	pITB1313
F601A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F601A</i>	S. Hammer	pITB1054
F601G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F601G</i>	S. Bastian	pITB1314
F601W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F601W</i>	S. Hammer	pITB1055
F605A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F605A</i>	S. Hammer	pITB1056
F605G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F605G</i>	S. Bastian	pITB1315
F605W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_F605W</i>	S. Hammer	pITB1057
L607A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_L607A</i>	S. Hammer	pITB1058
L607F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_L607F</i>	S. Hammer	pITB1059
L607G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_L607G</i>	S. Bastian	pITB1316
L607W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_L607W</i>	S. Hammer	pITB1060
Y609A <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y609A</i>	S. Hammer	pITB1061
Y609F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y609F</i>	S. Bastian	pITB1317
Y609G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y609G</i>	S. Bastian	pITB1318
Y609L <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y609L</i>	S. Bastian	pITB1319
Y609W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y609W</i>	S. Hammer	pITB1062
Y612F <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y612F</i>	S. Bastian	pITB1320



Y612G <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y612G</i>	S. Bastian	pITB1321
Y612W <sup>2)</sup>	<i>AacSHC_Y612W</i>	S. Bastian	pITB1322
L36A_W169G	<i>AacSHC_L36A_W169G</i>	Diese Arbeit	pITB1366
L36A_I261A	<i>AacSHC_L36A_I261A</i>	Diese Arbeit	pITB1367
L36A_Y420A	<i>AacSHC_L36A_Y420A</i>	Diese Arbeit	pITB1368
L36A_Y420G	<i>AacSHC_L36A_Y420G</i>	Diese Arbeit	pITB1369
L36A_F601G	<i>AacSHC_L36A_F601G</i>	Diese Arbeit	pITB1370
W169G_I216A	<i>AacSHC_W169G_I216A</i>	Diese Arbeit	pITB1380
W169G_Y420A	<i>AacSHC_W169G_Y420A</i>	Diese Arbeit	pITB1371
W169G_Y420G	<i>AacSHC_W169G_Y420G</i>	Diese Arbeit	pITB1372
W169G_F601G	<i>AacSHC_W169G_F601G</i>	Diese Arbeit	pITB1373
I261A_Y420A	<i>AacSHC_I261A_Y420A</i>	Diese Arbeit	pITB1374
I261A_Y420G	<i>AacSHC_I261A_Y420G</i>	Diese Arbeit	pITB1375
I261A_F601G	<i>AacSHC_I261A_F601G</i>	Diese Arbeit	pITB1376
Y420A_F601G	<i>AacSHC_Y420A_F601G</i>	Diese Arbeit	pITB1377
Y420G_F601A	<i>AacSHC_Y420G_F601A</i>	Diese Arbeit	pITB1378
I261A_D376C	<i>AacSHC_I261A_D376C</i>	S. Hammer	pITB1081
Y420G_D376C	<i>AacSHC_Y420G_D376C</i>	Diese Arbeit	pITB1379

<sup>2)</sup> Varianten, welche als Bestandteil der *AacSHC*-Mutantenbibliothek verwendet wurden.

## 3.2 Medien und Zellkulturen

### 3.2.1 *E. coli* Stämme

In dieser Arbeit wurden verschiedene spezialisierte *E. coli*-Stämme, der *E. coli* DH5 $\alpha$ -Stamm für die Plasmidpräparation und die *E. coli* Stämme BL21(*DE3*) und Rosetta (*DE3*)pLysS für die Proteinexpression, verwendet. Die Genotypen der verwendeten Stämme finden sich in **Tabelle 7**.

**Tabelle 7:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup></i> ), $\lambda$ -
BL21( <i>DE3</i> )	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) $\lambda$ ( <i>DE3</i> [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])
Rosetta ( <i>DE3</i> )pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> ( <i>R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) gal dcm $\lambda$ ( <i>DE3</i> [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLysSRARE ( <i>Cam<sup>R</sup></i> )

### 3.2.2 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Zellkulturen erfolgte in LB- und TB-Medium. Beide Medien wurden zur Sterilisation 25 min bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Der für das TB-Medium notwendige TB-Puffer wurde separat hergestellt und nach dem Autoklavieren in einem

Verhältnis von 1:9 zugegeben. Für die Selektion wurde den Medien nach dem Autoklavieren je nach enthaltener Antibiotikaresistenz des Plasmids, entweder Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/mL oder Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 15 g Agar pro Liter Flüssigmedium vor dem Autoklavieren zugegeben.

<b>LB-Medium</b>	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
<b>TB-Medium</b>	Trypton	12 g
	Hefeextrakt	24 g
	Glycerin	4 mL
	ddH <sub>2</sub> O	ad 900 mL
<b>10x TB-Puffer</b>	Kaliumdihydrogenphosphat	5,24 g
<b>(1 M Kaliumphosphat pH 7)</b>	Dikaliumhydrogenphosphat	10,7 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 100 mL

### 3.2.3 Zellwachstum und Stammhaltung

Die Inkubation von Flüssigkulturen wurde standardmäßig in 5 mL LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm über Nacht durchgeführt. Dabei erfolgte die Inokulation mit einer Kolonie von einer LB-Agar-Platte oder 2 µL des Glycerinstocks. Zur Selektion wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben und die Zelldichte durch Absorptionmessung bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) mittels einem Ultraspec 3000 Photometer (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) bestimmt. Die Gewinnung von Einzelkolonien aus Glycerinstocks oder transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte durch Ausplattieren der Zellen auf LB-Agarplatten und Inkubation bei 37°C über Nacht. Die Verwendung von Antibiotika-Selektionsplatten gewährleistet die richtige Selektion von Transformanten mit dem gewünschten Plasmid.

Die langfristige Lagerung der *E. coli*-Zellen erfolgte in Form von Glycerinstocks bei -78°C. Dafür wurden die Flüssigkulturen 1:1 mit 60 % (v/v)-igen Glycerin vermischt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die analytische und präparative Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. 50 mL einer 1 %-igen Agaroselösung wurden mit GelRed™ (Biotum, Hayward, US) versetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Probe wurden im Verhältnis 3:2 mit OrangeG-DNA Ladepuffer vermischt. Als Standard wurde der GenRuler™ 1 kb plus DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, DE) verwendet. Die Trennung der Proben erfolgte bei einer konstant angelegten Spannung von 120 V für 45 min und die Detektion mittels UV-Licht.

<b>1 % Agaroselösung</b>	Agarose	10 g
	TAE-Puffer	ad 1000 mL
<b>TAE-Puffer</b>	Tris	4,8 g
	Eisessig	1,14 mL
	0,5 M EDTA-Lösung	2 mL
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
	pH 8,0	mit Salzsäure
<b>OrangeG-DNA Ladepuffer</b>	Saccharose	10 g
	OrangeG	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 5 mL

#### 3.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und DNA-Sequenzierung

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (ZymoResearch, Iverine, US) verwendet. Es wurde nach dem Standardprotokoll des Herstellers verfahren. Dieses verwendet die selektive alkalische Denaturierung zur Abtrennung von chromosomaler DNA.<sup>124</sup> Die Konzentration der Plasmid-DNA Probe wurde mit einem Nanodrop 1000 (Aigent, Santa Clara, US) photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA bei der Firma GATC Biotech (Konstanz, DE) durch die Didesoxy-Methode nach Sanger sequenziert.<sup>125</sup> Die verwendeten Sequenzierungsprimer finden sich in Kapitel 3.1.4.

### 3.3.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (Rubidiumchlorid) wurden nach dem Standardprotokoll der Rubidiumchlorid Methode hergestellt.<sup>126</sup> Dafür wurden 100 mL LB-Medium mit dem jeweiligen *E. coli*-Stamm inokuliert und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (4°C; 10 min; 4000 rpm). Das Pellet wurde in 40 mL TbfI-Puffer resuspendiert, weitere 15 min auf Eis inkubiert und nochmals abzentrifugiert (4°C; 10 min; 4000 rpm). Anschließend wurden die Zellen in 5 mL TbfII-Puffer resuspendiert, weitere 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 100 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -78°C gelagert.

#### TbfI-Puffer

Kaliumacetat	0,59 g
RbCl	2,42 g
CaCl <sub>2</sub>	0,29 g
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2,0 g
Glycerin	30 mL
ddH <sub>2</sub> O	200 mL
pH 5,8	mit Essigsäure

#### TbfII-Puffer

MOPS	0,21 g
RbCl	0,12 g
CaCl <sub>2</sub>	1,1 g
Glycerin	15 mL
ddH <sub>2</sub> O	100 mL

### 3.3.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Dafür wurden 100 µL chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, 5 µL Plasmidlösung zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 45 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und nochmals für 3 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µL LB-Medium zugegeben und bei 37°C und 180 rpm für 1 h inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.5 Ortsgerichtete Mutagenese mittels QuikChange™ PCR

Die DNA-Sequenz eines Gens kann mit Hilfe ortsgerechter Mutagenese gezielt durch den Austausch einzelner Aminosäuren modifiziert werden.<sup>127</sup> Die Einführung der gewünschten Punktmutationen erfolgte durch die QuikChange™ PCR-Methode, welche an das Protokoll des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, US) angelehnt ist. Die Methode kann im Wesentlichen in zwei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird die DNA durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierfür werden zur DNA komplementäre synthetische Primer mit der gewünschten Punktmutation erstellt, welche bei der Elongation durch die DNA-Polymerase erweitert werden. Das Ergebnis ist mutierte Plasmid-DNA mit zwei Einzelstrangbrüchen. Im zweiten Schritt wird die methylierte DNA der unveränderten parentalen Plasmid-DNA durch das Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. Anschließend erfolgte die Transformation (siehe Abschnitt 3.3.4) in *E. coli* DH5 $\alpha$ , welche *in vivo* die Ligation der Einzelstrangbrüche vornimmt.

Für die QuikChange™ PCR wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (GenON, Ludwigshafen, DE) verwendet. Der *DpnI*-Verdau wurde nach dem Standardprotokoll des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, US) durchgeführt, nach welchem auch die benötigten Primer (siehe Abschnitt 3.1.4) designt wurden. Der verwendete Ansatz, sowie das Temperaturprogramm für die QuikChange™ PCR sind in **Tabelle 8** und **Tabelle 9** aufgelistet.

**Tabelle 8:** PCR-Ansatz für die QuikChange™ PCR

Substanz	Volumen	Endkonzentration
ddH <sub>2</sub> O	39,5 $\mu$ L	
10 x <i>Pfu</i> DNA-Polymerase Puffer	5 $\mu$ L	1x
DNA-Template	1,5 $\mu$ L	1 – 5 ng/ $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M
Revers Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M
dNTPs (10 mM pro NTP)	1 $\mu$ L	200 $\mu$ M (pro NTP)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	1 $\mu$ L	

**Tabelle 9:** Temperaturprofil der QuikChange™ PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	90 sec	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	
Hybridisierung <sup>1)</sup>	1 min	50-70°C	20
Elongation <sup>2)</sup>	1 min/kb	72°C	
Finale Elongation	15 min	72°C	1

<sup>1)</sup> Die Hybridisierungstemperatur ist abhängig von den jeweiligen Primern

<sup>2)</sup> Die Elongationszeit ist abhängig vom jeweiligen DNA-Templat

## 3.4 Proteinbiochemische Methoden

### 3.4.1 Proteinexpression

Für die Expression der Gene wurden die entsprechenden Plasmide der tHisF und der AacSHC in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) und die der PH999 in Rosetta (DE3)pLysS transformiert und als Glycerinstocks gelagert. Für die Expression der Gene wurden zwei unterschiedliche Methoden, die Induktion mittels IPTG und die Autoinduktion, genutzt.

#### 3.4.1.1 IPTG-Induktion der tHisF und PH999

Bei der Induktion mittels IPTG wird durch dessen Zugabe die Expression der T7 RNA-Polymerase aktiviert, welche für die Transkription des Zielgens verantwortlich ist. Zusätzlich wird das Zielgen selbst durch das IPTG-abhängige *lac*-Repressor System kontrolliert.

Für die IPTG-Expression wurden 400 mL LB-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit 400 µL Kanamycin (30 mg/mL) versetzt und anschließend mit einer Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen auf eine Start-OD<sub>600</sub> von ~0,05 inokuliert und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 inkubiert. Die Expression der tHisF wurde nach Erreichen dieses Wertes durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Anschließend wurde die Kultur bei 30°C und 180 rpm für 4,5 h inkubiert. Die Expression der PH999 wurde mit einer IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM induziert und die Kultur bei 30°C und 180 rpm für 5 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte jeweils durch zentrifugieren in einem SLA 3000-Rotor (8000 rpm; 25 min; 4°C). Das Zellpellet wurde bei -20°C gelagert.

#### 3.4.1.2 Autoinduktion der AacSHC

Die Autoinduktion dagegen verläuft durch eine selbständige Änderung des *E. coli* Metabolismus bei Nährstoffmangel. Beim Verbrauch von Glucose aus dem Nährmedium wird Lactose durch  $\beta$ -Galactosidase zur Allactose metabolisiert, welches der natürliche Induktor des *lac*-Repressors ist. Allactose aktiviert durch die Bindung an den *lac*-Repressor die Synthese der T7 RNA-Polymerase und damit die Transkription des Zielgens.

Die Expression der *AacSHC* mittels Autoinduktion erfolgte mit 500 mL TB-Medium inokuliert mit 5 mL Übernachtskultur bei 37°C, 180 rpm und einer Inkubationszeit von 18 h. Die Zellernte erfolgte analog zur IPTG-Induktion durch zentrifugieren und das Zellpellet wurde bei -20°C gelagert.

### 3.4.2 Zellaufschluss

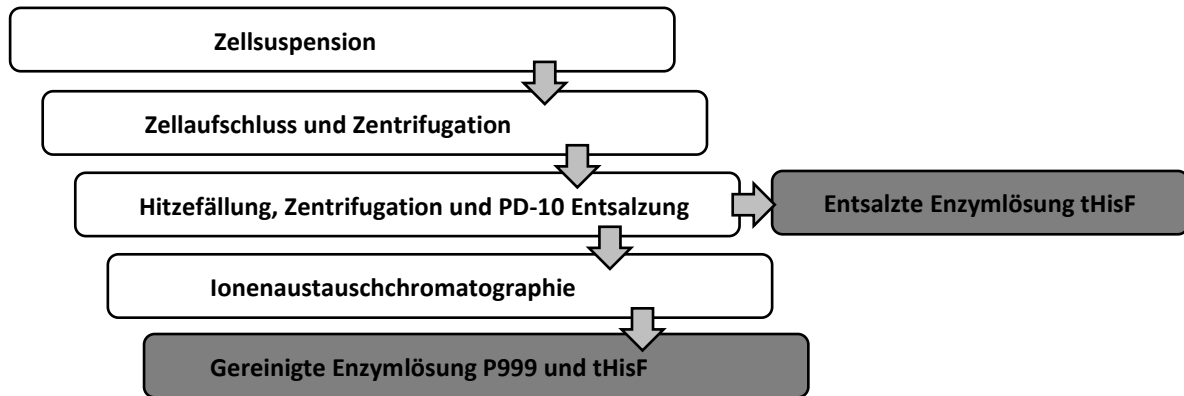
Die *E. coli*-Zellen wurden in 3 mL Lysepuffer pro 1 g Zellpellet resuspendiert und der mechanische Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Dafür wurde ein Branson Sonifier (Branson Sonifier W250) bei 80 Watt und einem Arbeitsintervall von 20 % für vier Minuten auf Eiswasser verwendet. Die resultierende Suspension wurde zentrifugiert (8600 rpm; 30 min; 4°C). Abhängig vom Enzym befanden sich die tHisF und die PH999 im Lysat, die *AacSHC* im Zellpellet und wurden weiter gereinigt (Kapitel 3.4.3).

<b>tHisF-Lysepuffer</b>	Bis-Tris-HCl pH7	50 mM
<b>PH999-Lysepuffer</b>	Bis-Tris-HCl pH7	50 mM
	DTT	10 mM
<b><i>AacSHC</i>-Lysepuffer</b>	Natriumcitrat pH 6	200 mM
	PMSF	1 mM
	DNase	Spatelspitze

### 3.4.3 Proteinreinigung

#### 3.4.3.1 tHisF und PH999

Bei der tHisF und PH999 handelt es sich um thermostabile lösliche Enzyme deren Reinigung nach Expression und Zellaufschluss mit Hilfe von Hitzefällung und Ionenaustauschchromatographie erfolgte. In den Biotransformationen wurden die Enzymlösungen sowohl nach der Hitzefällung und Entsalzung als entsalzte Enzymlösung, als auch nach der Ionenaustauschchromatographie als gereinigt Enzymlösung eingesetzt (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der Herstellungsschritte für die entsalzten und gereinigten Enzymlösungen von tHisF und PH999.

Hierfür wurden aus dem Lysat direkt die nativen *E. coli* Proteine durch Hitzefällung (30 min; 72°C für tHisF und 80°C für PH999) präzipitiert und durch Zentrifugation (8600 rpm; 30 min; 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mittels PD-10 Säulen (GE Healthcare, Solingen, DE) nach den Herstellerangaben mit dem gewünschten Puffer entsalzt, mit Vivaspin Säulen mit 10 kDa MWCO (Satorius-Stedim biotech, Göttingen, DE) aufkonzentriert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (Kapitel 3.4.4.1) gemessen.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie (TOYOPEARL DEAE-605M, Toso, Minota, JP) an einem ÄKTAexplorer System (GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, UK). Es wurde ein binäres Puffersystem aus Binde- und Elutionspuffer mit einem Laufmittelfluss von 5 mL/min verwendet. Für die tHisF wurde nach dem Equilibrieren der Säule mit Bindepuffer (zwei Säulenvolumen) die Probe mit dem doppelten Probenschleifen-Volumen Bindepuffer auf die Säule aufgebracht und mit zwei Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte über einen gemischten linearen und Stufengradienten. Im ersten Schritt wurde die Konzentration des Elutionspuffers über sechs Säulenvolumen auf 25 % erhöht und weitere 0,25 Säulenvolumen gehalten. Im zweiten Schritt wurde die Konzentration des Elutionspuffers auf 100 % erhöht, um die restlichen gebundenen Proteine mit zwei Säulenvolumen Elutionspuffer zu eluieren. Bei der PH999 wurde nach dem Equilibrieren der Säule mit Bindepuffer (zwei Säulenvolumen) die Probe ebenfalls mit dem doppelten Probenschleifen-Volumen Bindepuffer auf die Säule aufgebracht und mit weiteren zwei Säulenvolumen Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte über einen gemischten linearen und Stufengradienten. Im ersten Schritt wurde die Konzentration des Elutionspuffers über 0,2 Säulenvolumen auf 22,5 % erhöht und weitere 2,5 Säulenvolumen



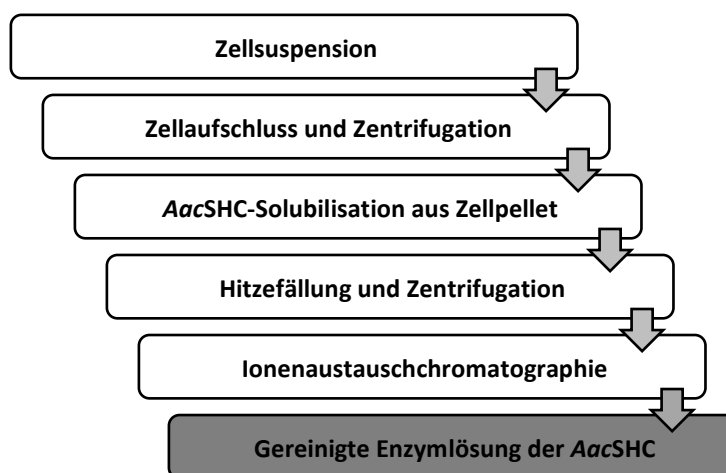
gehalten. Im zweiten Schritt wurde die Konzentration des Elutionspuffers auf 100 % erhöht, um die restlichen gebundenen Proteine mit zwei Säulenvolumen Elutionspuffer zu eluieren. Bei beiden Enzymen wurden die gewünschten Fraktionen vereinigt, mittels PD-10 Säulen (GE Healthcare, Solingen, DE) nach den Herstellerangaben mit dem gewünschten Puffer entsalzt, mit Vivaspin Säulen mit 10 kDa MWCO (Satorius-Stedim biotech, Göttingen, DE) aufkonzentriert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (Kapitel 3.4.4.1) gemessen. Die entsalzten und gereinigten Enzymlösungen wurden anschließend bei 4°C gelagert.

<b>Bindepuffer</b>	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
<b>Elutionspuffer</b>	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	NaCl	1 M

### 3.4.3.2 *AacSHC*

Bei der *AacSHC* handelt es sich um ein thermostabiles Membranprotein, welches monotopisch vermutlich mit einer  $\alpha$ -Helix im Bereich des Substrateingangskanals an die Zellmembran bindet.<sup>104,108</sup> Deshalb befindet sich die *AacSHC* nach dem Zellausschluss nicht im Lysat, sondern bindet an die Zellwandfragmente im Zellpellet. Mit Hilfe des wässrigen Detergenz Triton X-100 wurde das Enzym in Lösung gebracht. Bei Triton X-100 handelt es sich um ein nicht-ionisches Detergenz, bestehend aus einem *p-tert*-Octylphenol-Derivat mit einer Polyethylenglycol-Seitenkette und mit einer kritischen Mizellenkonzentration von  $\sim 0,2$  % (w/v).<sup>128</sup>

Die Reinigung der *AacSHC* erfolgte in mehreren Schritten über eine Hitzefällung und Ionenaustauschchromatographie (**Abbildung 22**).



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der Herstellungsschritte für die Enzymlösung von *AacSHC*.

Nach dem Zellaufschluss wurde das resultierende Zellpellet mit 1 mL Solubilisationspuffer pro Gramm Zellpellet resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die *E. coli* Proteine direkt durch Hitzefällung (30 min; 50°C) präzipitiert und durch Zentrifugation (8600 rpm; 60 min; 4°C) abgetrennt. Die Enzymlösung wurde mittels Anionenaustauschchromatographie (Diethylaminoethyl-Sepacel®, Sigma Aldrich, St. Louise, US) gereinigt. Hierfür wurde die Enzymlösung 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt (~12 mM Natriumcitrat als Endkonzentration) und an die Anionenaustauschmatrix gebunden. Es wurde mit fünf Säulenvolumen *AacSHC*-Waschpuffer gewaschen, das Enzym mit *AacSHC*-Elutionspuffer eluiert und die Säule mit fünf Säulenvolumen Regenerationspuffer regeneriert. Die Enzymlösung wurde mittels SDS-Page (Kapitel 3.4.5) analysiert und die Proteinkonzentration nach Bradford (Kapitel 3.4.4.2) gemessen. Alle Enzymlösungen wurden bei 4°C gelagert.

<b><i>AacSHC</i>-Solubilisationspuffer</b>	Natriumcitrat pH 6	60 mM
	Triton X-100	1 % (w/v)
<b><i>AacSHC</i>-Waschpuffer</b>	Natriumcitrat pH 6	12 mM
	Triton X-100	0,2 % (w/v)
<b><i>AacSHC</i>-Elutionspuffer</b>	Natriumcitrat pH 6	12 mM
	Triton X-100	0,2 % (w/v)
	NaCl	200 mM
<b><i>AacSHC</i>-Regenerationspuffer</b>	Natriumcitrat pH 6	12 mM
	Triton X-100	0,2 % (w/v)
	NaCl	500 mM

### 3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration unbekannter Proben wurde mit dem BCA Protein Assay Kit von Thermo-Scientific (Waltham, US) oder mit der Bradford Ultra Lösung von Expedon (Harston, UK) durchgeführt.

#### 3.4.4.1 BCA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA Protein Assay Kit basiert auf der von Smith *et al.*<sup>129</sup> entwickelten Methode. Dabei werden Kupfer(II)-Ionen im alkalischen Medium zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, welche anschließend mit je zwei Molekülen Bichinonsäure (BCA) komplexieren. Der gebildete Komplex kann photometrisch bei 562nm detektiert werden, damit ist die Menge des gebildeten Komplexes proportional zu den gebildeten Kupfer(I)-Ionen und diese zur in der Probe enthaltenen Proteinmenge.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibriergerade aus Lösungen mit bekannten Konzentrationen von BSA (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/mL) erstellt. Diese wurden zusammen mit den unbekannt Proben auf einer Mikrotiterplatte nach Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Reagenzien versetzt und bei 37°C für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Absorption wurde anschließend bei 562 nm gemessen. Für die Kalibriergerade wurde die Absorption gegen die bekannte Konzentration der BSA Lösungen aufgetragen. Im linearen Absorptionsbereich der entsprechenden Kalibriergeraden konnte dann die unbekannte Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe der Geradengleichung bestimmt werden. Alle Proben, sowie die Kalibriergerade wurden als Triplikate gemessen.

#### 3.4.4.2 Nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford basiert auf der Coomassie Brilliantblau Bindung an Proteine, wobei die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm photometrisch detektiert werden kann.<sup>130</sup> Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von unbekannt Proben wurde eine Kalibriergerade aus Lösungen mit bekannten Konzentrationen von BSA (0, 200, 400, 600,

800 und 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) erstellt. Das Reagenz Bradford Ultra (Expedeon, Harston, UK) ermöglicht die Proteinkonzentrationsbestimmung in Gegenwart von bis zu 1 % Detergenz und wurde nach Angaben des Herstellers auf einer Mikrotiterplatte eingesetzt. Alle Proben, sowie die Kalibriergerade, wurden als Triplikate gemessen.

### 3.4.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichts wurde die von Laemmli *et al.*<sup>131</sup> entwickelte Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Im ersten Schritt erfolgte eine Linearisierung der Proteine durch Reduktion der Disulfidbrücken mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol und Denaturierung mit dem anionische Detergenz SDS. Hierfür wurden die Proben mit 6 x SDS-Puffer versetzt und bei 95°C für 10 min inkubiert. Die zusätzliche Anlagerung einer negativen Ladung durch das SDS an das Protein führt zu einer Proteinladung, welche annähernd proportional mit der Größe des Proteins korreliert. Die Polyacrylamidgele, im Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % bzw. 12 % und im Sammelgel mit 4 %, wurden durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und *N,N'*-Methylbisacrylamid (Rotiphorese® 30) analog der Vorschrift mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet und katalysiert.<sup>132</sup> In der Elektrophoreseapparatur wurden die Gele mit Ladepuffer überschichtet und pro Tasche 10 ng Proteingemisch der denaturierten Proben geladen. Als Standard dienten 5  $\mu\text{L}$  des PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, DE), bzw. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, DE). Die Elektrophorese wurde zuerst mit einer konstanten Stromstärke von 12 mA pro Gel zum Sammeln der Probe im Sammelgel und anschließend für die Trennung im Trenngel bei 25 mA durchgeführt. Nach Elektrophoreseende wurden die Gele über Nacht mit Coomassie-Blue-Färbelösung gefärbt, dabei bindet die Coomassie-Blue-Farbe an die Proteine und färbt diese blau. Bei der anschließenden Entfärbung wird der ungebundene Farbstoff aus dem Gel gelöst und die blauen Banden werden sichtbar.

**6x SDS PAGE  
Ladepuffer**

1 M Tris-HCl pH 8,0	3,5 mL
DTT	0,93 g
Glycerin	3 mL
SDS	1 g
Bromphenolblau	1,2 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 mL

<b>Sammelgel 4 %</b>	ddH <sub>2</sub> O	1,4 mL
	30 % Acrylamidlösung	330 µL
	1 M Tris-HCl pH 6,8	250 µL
	10 % SDS	20 µl
	10 % APS	20 µL
	TEMED	2 µL
<b>Trenngel 12 %</b>	ddH <sub>2</sub> O	3,3 mL
	30 % Acrylamidlösung	4 mL
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
	10 % SDS	100 µL
	10 % APS	100 µL
	TEMED	4 µL
<b>Trenngel 10 %</b>	ddH <sub>2</sub> O	4 mL
	30 % Acrylamidlösung	3,3 mL
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
	10 % SDS	100 µL
	10 % APS	100 µL
	TEMED	4 µL
<b>10x Elektrophoresepuffer</b>	Tris	121 g
	HEPES	238 g
	SDS	10 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL
<b>Coomassie- Färbelösung</b>	Methanol	30 %
	Essigsäure	10 %
	ddH <sub>2</sub> O	60 %
	Coomassie-Brilliantblau R-250	1 g/L
<b>Coomassie- Entfärbelösung</b>	Methanol	30 %
	Essigsäure	10 %
	ddH <sub>2</sub> O	60 %

### 3.4.6 PAR-Assay zur Bestimmung der Zink(II)-Bindungsaffinität

Untersuchungen zur Bindungsaffinität von Zink(II) an das Proteingerüst der tHisF wurden in Anlehnung an J. H. Mills *et al.*<sup>133</sup> mit 4-(2-Pyridylazo)resorciol **20** (PAR) in einem Farbassay durchgeführt. Zum Entfernen von gebundenem Zink(II) aus der HDD- und NC-tHisF Enzymlösung wurden diese, nach der Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie und Entsalzung über PD-10 Säulen, acht Mal gegen Tris-

HCl Puffer (25 mM; pH 7,4; 150 mM NaCl) versetzt mit 10 mM EDTA dialysiert. Zur Entfernung des an EDTA gebundenen Zink(II)s wurde die Lösung sechs Mal gegen Bis-Tris-HCl Puffer (10 mM; pH 7,0) dialysiert. Die Zink(II)-freie tHisF wurde mit dem Zink(II) sensitiven Farbstoff PAR **20** und Zink(II)sulfat in einer Mikrotiterplatte versetzt. PAR **20** war in einer Konzentration von 45  $\mu\text{M}$  und Zink(II)sulfat in einer Konzentration von 12  $\mu\text{M}$  vorhanden. Die Endkonzentrationen von tHisF waren 0, 3, 6, 9, 10,5, 12, 13,5, 15, 22,5, 30, 45 und 60  $\mu\text{M}$ . Die Mikrotiterplatte wurde für 1 h bei 25°C und 120 rpm inkubiert und anschließend die Absorption mit einem Mikrotiterplattenleser (Omega-Polarstar 415, BMG Labtech, Ortenberg, DE) bei 500 nm gemessen, welche dem Absorptionsmaximum von PAR **20** gebunden an Zink(II) entspricht. Als positive Kontrolle wurde die Reaktion mit den entsprechenden Konzentrationen an EDTA durchgeführt. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen.

### 3.4.7 Aktivitätsbestimmung der PH999

Der Assay für die Bestimmung der Aktivität der PH999 wurde in Anlehnung an X. Du *et al.*<sup>69</sup> durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 10  $\mu\text{M}$  PH999 in 10 mM Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 und 20 mM Pyrazinamid **3** zusammen und wurde bei 60°C inkubiert. Für den Wildtyp wurde bei verschiedenen Zeitpunkten (1, 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60 und 120 min) 100  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung mit 20  $\mu\text{L}$  20 % Eisenammoniumdisulfat-Lösung und 890  $\mu\text{L}$  100 mM Glycin-HCl Puffer pH 3,4 gemischt und die Absorption bei 480 nm an einem Ultraspec 3100 Pro Photometer (GE Healthcare, Solingen, DE) gemessen. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion jeweils in Puffer, mit 0,4 mM Zink(II) und mit 10  $\mu\text{M}$  Lysin-Lösung durchgeführt. Die Reaktionsansätze der Negativkontrollen und der PH999 Mutanten wurde nach einer Reaktionszeit von 20 min gemessen. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen.

## 3.5 Analytische Methoden

### 3.5.1 Gaschromatographie (GC)

Für die Analyse der Aldol Reaktion mittels Gaschromatographie wurde ein Shimadzu GCMS-QP2010 (Kyōto, JP) mit einem gekoppelten Massenspektrometer und einer DB-5MS-Säule (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ; Agilent, Santa Clara, US) verwendet. Als Trägergas wurde Helium mit einer linearen Geschwindigkeit von 30 cm/s benutzt. Gemessen wurde bei einer

Injektionstemperatur von 250°C, einer Ionenquellentemperatur ebenfalls von 250°C und einem Split-Verhältnis von 10:1. Folgendes Temperaturprogramm wurde zum Messen verwendet: 60°C (3 min), erhitzen mit 6°C/min auf 120°C, erhitzen mit 10°C/min auf 150°C, erhitzen mit 15°C/min auf 170°C, erhitzen mit 20°C/min auf 200°C und erhitzen mit 30°C/min auf 320°C mit einer Haltezeit von 5 min. Die Detektion am MS Detektor erfolgte im EI-Modus bei 70 eV im Scan-Bereich von 40 m/z bis 500 m/z. Zusätzlich wurde, um die Sättigung des Detektors mit Lösungsmittel zu verhindern, die Messung am Detektor mit einem *solvent cut* von 6 min gestartet. Die Retentionszeit des Edukts 2-Pyridincarboxaldehyd **14** betrug  $t = 7,5$  min ( $m/z = 107$  [ $M^+$ ]), die des Additionsprodukts **16**  $t = 17,2$  min ( $m/z = 165$  [ $M^+$ ]) und des Kondensationsprodukts **17**  $t = 17,5$  min ( $m/z = 147$  [ $M^+$ ]). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Flächenprozentage des Gesamtchromatogramms.

Die Analyse der AacSHC-Biotransformationen erfolgte an einem Agilent 7890A GC System (Santa-Clara, US) mit einem kombinierten Flammenionisation (FID)- und Massendetektor (Agilent 5975 Series MSD, Santa Clara, US). Eine parallele Analyse ist durch die Teilung des Gasflusses direkt nach der Trennung der Substanzen in der Kapillarsäule DB-5 (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ; Agilent, Santa Clara, US) möglich. Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Druck von 14,9 psi verwendet. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 250°C, einem Injektionsvolumen von 1  $\mu\text{L}$ , einem Splitverhältnis von 5:1 und einer FID-Temperatur von 320°C. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von 1-Decanol als internen Standard. Die Detektion am MS Detektor erfolgte im EI-Modus mit einer Ionenquellentemperatur von 230°C im Scan-Bereich von 40 m/z bis 400 m/z. Zusätzlich wurde, um die Sättigung des Detektors mit Lösungsmittel zu verhindern, die Messung am Detektor mit einem *solvent cut* von 6 min gestartet. Für die verschiedenen Substrate wurden Methoden mit den folgenden Temperaturprogrammen entwickelt.

**3-Methylcitronellal (1)**: 75 °C mit einer Haltezeit von 3 min, erhitzen mit 6 °C/min auf 140 °C, erhitzen mit 10 °C/min auf 160 °C und erhitzen mit 100 °C/min auf 320 °C mit einer Haltezeit von 5 min. Die Retentionszeit des Edukts 3-Methylcitronellal **1** betrug  $t = 7,5$  min ( $m/z = 168$  [ $M^+$ ]), die des *trans*-Produkts 5,5-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **2**  $t = 7,1$  min ( $m/z = 168$  [ $M^+$ ]) und des *cis*-Produkts **52**  $t = 7,3$  min ( $m/z = 168$  [ $M^+$ ]).

**7-Methyloctenal (31)**: 50 °C mit einer Haltezeit von 3 min, erhitzen mit 3 °C/min auf 68 °C, erhitzen mit 0,2 °C/min auf 72 °C, erhitzen mit 20 °C/min auf 150 °C und erhitzen mit 100 °C/min auf 320 °C mit einer Haltezeit von 5 min. Die Retentionszeit des Edukts 7-

Methyloctenal **31** betrug  $t = 11,0$  min ( $m/z = 140$  [ $M^+$ ]), die des *trans*-Produkts 2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **32**  $t = 10,2$  min ( $m/z = 140$  [ $M^+$ ]) und des *cis*-Produkts **33**  $t = 10,7$  min ( $m/z = 140$  [ $M^+$ ]).

**3,3,6-Trimethylheptenal (38)**:  $50$  °C mit einer Haltezeit von 3 min, erhitzen mit  $5$  °C/min auf  $92$  °C, erhitzen mit  $0,2$  °C/min auf  $94$  °C, erhitzen mit  $100$  °C/min auf  $320$  °C mit einer Haltezeit von 5 min. Die Retentionszeit des Edukts 3,3,6-Trimethylheptenal **38** betrug  $t = 14,6$  min ( $m/z = 139$  [ $C_{10}H_{19}^+$ ]) und des *trans*-Produkts 2-Isopropyl-4,4-Dimethylcyclopentanol **45**  $t = 14,6$  min ( $m/z = 154$  [ $M^+$ ]).

**8-Methylnonenal (44)**:  $60$  °C mit einer Haltezeit von 3 min, erhitzen mit  $5$  °C/min auf  $105$  °C, erhitzen mit  $0,8$  °C/min auf  $114$  °C, erhitzen mit  $100$  °C/min auf  $320$  °C mit einer Haltezeit von 5 min. Die Retentionszeit des Edukts 8-Methylnonenal **44** betrug  $t = 16,0$  min ( $m/z = 154$  [ $M^+$ ]).

Die chirale GC-Analyse von 3-Methylcitronellal **1** erfolgte mit einer CP Chiralsil DEX CB Säule ( $25$  m x  $0,25$  mm x  $0,25$   $\mu$ m; Agilent, Santa Clara, US) am Shimadzu GC-2010 (Kyōto, JP) mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von  $30$  cm/s. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von  $250$  °C, einem Injektionsvolumen von  $1\mu$ L, einem Splitverhältnis von 5:1 und einer FID-Temperatur von  $270$  °C. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:  $70$  °C (2 min), erhitzen mit  $5$  °C/min auf  $200$  °C mit einer Haltezeit von 10 min. Die Retentionszeiten der beiden Produktenantimere von *trans*-5,5-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **2** betragen  $15,5$  und  $15,7$  min.

Die chirale GC-Analyse von 7-Methyloctenal **31** erfolgte mit einer Supleco beta-DEX 110 Säule ( $30$  m x  $0,25$  mm x  $0,25$   $\mu$ m; Sigma-Aldrich, St. Louis, US) im Split Modus mit einem Splitverhältnis von 100:1. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:  $50$  °C (1 min), erhitzen mit  $1$  °C/min auf  $80$  °C mit einer Haltezeit von 40 min. Die Retentionszeiten der beiden Produktenantimere von *trans*-5,5-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **32** betragen  $50,3$  und  $50,8$  min.

### 3.5.2 Flüssigchromatographie (HPLC)

Die Analyse mittels Umkehrphasen-Flüssigchromatographie mit gekoppeltem Massendetektor kommt bei der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit verschiedenen Thionukleophilen zum Einsatz. Verwendet wurde das Agilent LC 1260 Infinity System



(Santa Clara, US) mit einer Poroshell 120-C18-Säule (3,0 x 50 mm x 2,7  $\mu\text{m}$ ; Agilent, Santa Clara, US) und einem gekoppelten Massenspektrometer (Agilent 6130 Quadrupole LC/MS, Santa Clara, US). Als Injektionsvolumen wurden 1  $\mu\text{L}$ , ein konstanter Laufmittelfluss von 0,4 mL/min und ein binäres Laufmittelgemisch aus  $\text{H}_2\text{O}$  mit 0,1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril (B) gewählt. Der Laufmittelgradient wurde auf das jeweilige Thionukleophil wie folgt angepasst.

**Mercaptoethanol (18):** Start bei 65 % A und 35 % B mit einer Haltezeit von 0,4 min, bis Minute 5 linearer Gradient auf 50 % A und 50 % B mit einer Haltezeit bis Minute 7 und bis Minute 7,01 linearer Gradient auf 65 % A und 35 % B mit einer Haltezeit bis Minute 8. Die Retentionszeit des Edukts Azachalcon **5** betrug  $t = 4,9$  min ( $m/z = 210$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und des Produkts 3-((2-Hydroxyethyl)thio)-3-phenyl-(pyridin-2-yl)propanon **19**  $t = 2,3$  min ( $m/z = 288$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**4-Methoxythiophenol (22a):** Start bei 60 % A und 40 % B, bis Minute 2 linearer Gradient auf 50 % A und 50 % B mit einer Haltezeit bis Minute 8 und bis Minute 12 linearer Gradient auf 60 % A und 40 % B mit einer Haltezeit bis Minute 13. Die Retentionszeit des Edukts Azachalcon **5** betrug  $t = 4,0$  min ( $m/z = 210$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und des Produkts 3-((4-Methoxyphenyl)thio)-3-phenyl-(pyridin-2-yl)propanon **23a**  $t = 9,3$  min ( $m/z = 350$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**4-Methylthiophenol (22b):** Start bei 60 % A und 40 % B, mit einem linearen Gradienten bis Minute 3 auf 50 % A und 50 % B, bis Minute 5 auf 40 % A und 60 % B, bis Minute 8 auf 85 % A und 15 % B und bis Minute 10 auf 60 % A und 40 % B. Die Retentionszeit des Edukts Azachalcon **5** betrug  $t = 5,0$  min ( $m/z = 210$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und des Produkts 3-Phenyl-(pyridin-2-yl)-3-(p-tolylthio)propanon **23b**  $t = 7,5$  min ( $m/z = 334$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**Benzylmercaptan (22c):** Start bei 60 % A und 40 % B, mit einem linearen Gradienten bis Minute 3 auf 50 % A und 50 % B, bis Minute 4 auf 40 % A und 60 % B, bis Minute 10 auf 85 % A und 15 % B und bis Minute 12 auf 60 % A und 40 % B mit einer Haltezeit von 1 min. Die Retentionszeit des Edukts Azachalcon **5** betrug  $t = 4,2$  min ( $m/z = 210$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und des Produkts 3-(Benzylthio)-3-phenyl-(pyridin-2-yl)propanon **23c**  $t = 10,3$  min ( $m/z = 334$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**4-Nitrothiophenol (22d):** Start bei 60 % A und 40 % B, linearer Gradient bis Minute 2 auf 50 % A und 50 % B mit einer Haltezeit bis Minute 8 und linearer Gradient auf 60 % A und 40 % B mit einer Haltezeit bis Minute 14. Die Retentionszeit des Edukts Azachalcon **5** betrug  $t = 4,5$  min ( $m/z = 210$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) und des Produkts 3-((4-Nitrophenyl)thio)-3-phenyl-1-(pyridin-2-yl)propanon **23d**  $t = 10,2$  min ( $m/z = 365$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**1-Propanthiol (24):** Start bei 60 % A und 40 % B, mit einem linearen Gradienten bis Minute 2 auf 50 % A und 50 % B und einer Haltezeit bis Minute 8 und einem linearen Gradienten bis Minute 12 auf 60 % A und 40 % B mit einer Haltezeit von 1 min. Die Retentionszeit des Edukts Azachalcon **5** betrug  $t = 3,9$  min ( $m/z = 210$   $[M+H]^+$ ) und des Produkts 3-Phenyl-3-(propylthio)-(pyridin-2-yl)propanon **25**  $t = 8,7$  min ( $m/z = 286$   $[M+H]^+$ ).

Die Detektion der Proben erfolgte mit Hilfe des Massenspektrometers im ESI (positiv) Modus mit einem Massebereich von 150 - 600 g/mol. Der Fragmentor wurde bei  $\pm 70$ , der Trockengasfluss bei 12 L/min und einer Trockengastemperatur von 350°C, der Zerstäubendruck bei 35 psi und die Kapillarspannung bei  $\pm 3000$  V gewählt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Flächenprozentage des Gesamtchromatogramms.

Die chirale Analyse der Michael Reaktion mit verschiedenen Thionukleophilen wurde mit Hilfe einer Reprosil-AM Säule (4,6 x 250 mm x 8  $\mu$ m; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, DE) getrennt und analysiert. Die Flussrate und das isokratische Laufmittelgemisch aus *n*-Heptan/*iso*-Propanol wurde abhängig vom Thionukleophil gewählt.

**Mercaptoethanol (18):** Flussrate 2 mL/min, *n*-Heptan/*iso*-Propanol (85:15) mit Retentionszeiten von Azachalcon **5**  $t = 2,89$  min, Mercaptoethanol **18**  $t = 3,10$  min und den Produktenantiomeren **19**  $t = 5,88$  min und 7,43 min.

**4-Methoxythiophenol (22a):** Flussrate 1 mL/min, *n*-Heptan/*iso*-Propanol (90:10) mit Retentionszeiten von Azachalcon **5**  $t = 6,84$  min, 4-Methoxythiophenol **22a**  $t = 5,32$  min und den Produktenantiomeren **23a**  $t = 9,95$  min und 10,86 min.

**4-Methylbenzylthiol (22b):** Flussrate 0,6 mL/min, *n*-Heptan/*iso*-Propanol (90:10) mit Retentionszeiten von Azachalcon **5**  $t = 10,67$  min, 4-Methylbenzylthiol **22b**  $t = 6,34$  min und den Produktenantiomeren **23b**  $t = 11,96$  min und 12,78 min.

**Benzylmercaptan (22c):** Flussrate 1 mL/min, *n*-Heptan/*iso*-Propanol (90:10) mit Retentionszeiten von Azachalcon **5**  $t = 6,34$  min, Benzylmercaptan **22c**  $t = 3,99$  min und den Produktenantiomeren **23c**  $t = 6,87$  min und 7,59 min.

**4-Nitrothiophenol (22d):** Flussrate 1 mL/min, *n*-Heptan/*iso*-Propanol (75:25) mit Retentionszeiten von Azachalcon **5**  $t = 5,00$  min, 4-Nitrothiophenol **22d**  $t = 12,75$  min und den Produktenantiomeren **23d**  $t = 10,36$  min und 11,79 min.

**1-Propanthiol (24):** Flussrate 1 mL/min, *n*-Heptan/*iso*-Propanol (95:5) mit Retentionszeiten von Azachalcon **5**  $t = 7,57$  min, 1-Propanthiol **24**  $t = 3,49$  min und den Produktenantiomeren **25**  $t = 6,76$  min und  $7,04$  min.

Detektiert wurde mittels DAD-Detektor für Mercaptoethanol **18** und Benzylmercaptan **22c** bei 220 nm, für 4-Nitrothiophenol **22d** bei 254 nm und für die restlichen Thionukleophile **22a**, **22b** und **24** bei 230 nm. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand der Flächenprozent des Gesamtchromatogramms.

### 3.5.3 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die synthetisierten Moleküle wurden mittels NMR Spektroskopie charakterisiert. Dafür wurden  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 500 MHz und 125 MHz aufgenommen und die chemische Verschiebung  $\delta$  bezogen auf den Standard Tetramethylsilan ( $\delta = 0$  ppm) in *parts per million* (ppm) angegeben. Für die Zuordnung der Signale wurden zusätzlich 2D-NMR-Spektren nach der  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC Methode (*heteronuclear single quantum coherence*) aufgenommen und analysiert.

### 3.5.4 Weitere Methoden

IR-Spektren wurden als Flüssigkeitsfilm zwischen zwei Natriumchloridplatten mit einem Bruker Vector 22 FT-IR Spektrometer analysiert und die Messwerte in der Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben. Die hochauflösenden Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT 95 bestimmt. Die Drehwertbestimmung wurde an einem Perkin-Elmer 241 Polarimeter vorgenommen.

## 3.6 Enzymatische Synthesen

### 3.6.1 Analytische Biotransformationen

#### 3.6.1.1 Michael Reaktion mit tHisF

Analytische Biotransformationen der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit einem Thionukleophil wurden in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen angelehnt an die von Reetz *et al.*<sup>42</sup> entwickelte Vorschrift durchgeführt. Dafür wurde 200  $\mu\text{L}$  der tHisF-Enzymlösung mit 10  $\mu\text{L}$  10 mM Zink(II)sulfat-Lösung bei 20°C und 400 rpm für 2 h vorinkubiert.

Anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  des Azachalcons **5** als 100 mM DMSO-Lösung, 100  $\mu\text{L}$  des Thionukleophils als 120 mM Lösung (abhängig vom Thionukleophil als DMSO oder  $\text{H}_2\text{O}$ -Lösung) und 590  $\mu\text{L}$  Wasser zugegeben. Daraus ergaben sich folgende Standardzusammensetzung: 104  $\mu\text{M}$  (3 mg/mL) tHisF, 10 mM Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0, 10 mM Azachalcon **5**, 10 mM Thionukleophil, 100  $\mu\text{M}$  Zink(II)sulfat und 10 bzw. 20 % DMSO. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion nur in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0, in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 mit 100  $\mu\text{M}$  Zink(II)sulfat, sowie ohne Zugabe der Zink(II)sulfat-Lösung zur tHisF-Enzymlösung durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde bei 850 rpm im Thermoschüttler bei den entsprechenden Temperaturen für 1 h inkubiert und anschließend zweimal mit 300  $\mu\text{L}$  Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, 10  $\mu\text{L}$  mit 1 mL Wasser/Acetonitril (1:1) gemischt und mittels Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (Kapitel 3.5.2) analysiert. Für die chirale Analyse mittels Normalphasen-Flüssigchromatographie (Kapitel 3.5.2) wurde das Ethylacetat verdampft und die Probe in 700  $\mu\text{L}$  *n*-Heptan/*iso*-Propanol (85:15) gelöst.

### 3.6.1.2 Aldol Reaktion mit PH999

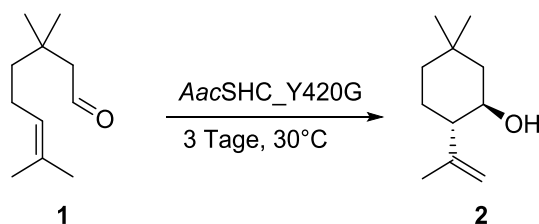
Analytische Biotransformationen der Aldol Reaktion von 2-Pyridincarboxaldehyd **14** mit Aceton **15** wurden in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dafür wurde 100  $\mu\text{L}$  der PH999-Enzymlösung mit 5  $\mu\text{L}$  10 mM Zink(II)sulfat-Lösung, 50  $\mu\text{L}$  des 2-Pyridincarboxaldehyd **14** als 100 mM Aceton-Lösung und 150  $\mu\text{L}$  Aceton **15** gemischt. Daraus ergaben sich folgende Standardzusammensetzung: 0,2 mg/mL PH999, 10 mM Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 mit 2 mM DTT, 10 mM 2-Pyridincarboxaldehyd **14**, 100  $\mu\text{M}$  Zink(II)sulfat und 50 % Aceton **15**. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion nur in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0, in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 mit 100  $\mu\text{M}$  Zink(II)sulfat, in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 mit 100  $\mu\text{M}$  Lysin, sowie ohne Zugabe der Zink(II)sulfat-Lösung zur PH999-Enzymlösung durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei 60°C und 850 rpm im Thermoschüttler inkubiert und anschließend zweimal mit 150  $\mu\text{L}$  Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mittels Gaschromatographie (Kapitel 3.5.1) analysiert.

### 3.6.1.3 Prins Reaktion mit *AacSHC*

Die Biotransformationen mit *AacSHC* wurden in 2 mL Glasfläschchen durchgeführt. Zu 500  $\mu$ L *AacSHC*-Enzymlösung wurde das Substrat als DMSO-Lösung (200 mM) zugegeben. Daraus ergab sich folgende Standardzusammensetzung: 2 mM Substrat, 3-5 mg/mL Enzym, 12 mM Citrat-Puffer pH 6,0, 0,2 % Triton X-100 und 1 % DMSO. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion jeweils nur in Citratpuffer, sowie mit der Kontrollmutante *AacSHC\_D376C* bei welcher die katalytisch aktive Asparaginsäure durch Cystein ersetzt wurde, durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 40 h bei 600 rpm und 30°C im Thermoschüttler inkubiert und anschließend zweimal mit 450  $\mu$ L Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet und mittels Gaschromatographie (Kapitel 3.5.1) analysiert.

## 3.6.2 Präparative Biotransformationen

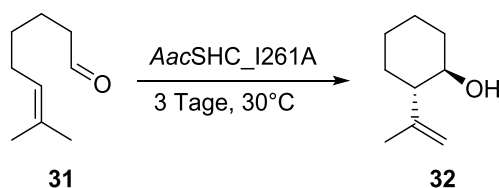
### 3.6.2.1 (1*R*, 2*S*)-3-Methylisopulegol (**2**)



Die Synthese von (1*R*, 2*S*)-3-Methylisopulegol **2** erfolgte in Anlehnung an die analytische Biotransformationen. Für die Reaktion wurden 50 mL der *AacSHC\_Y420G* Enzymlösung (~7 mg/mL) mit 50 mL Reaktionspuffer (12 mM Citrat-Puffer pH 6,0, 0,1 % Triton-X, 200 mM NaCl) gemischt und das 3-Methylcitronellal **1** (120 mg) als 200 mM DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde für 3 Tage bei 30°C und 180 rpm in einer Schottflasche (250 mL) inkubiert und anschließend dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1  $R_f$  (*trans*-Produkt) = 0,43). Das (1*R*, 2*S*)-3-Methylisopulegol **2** (38,15 mg; 0,23 mmol; 31,9 % Ausbeute; Reinheit >98 %) wurde als farblose Öl isoliert. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>134</sup>  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0,87 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 0,90 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,07 (t,  $J$  = 11,8 Hz, 1H); 1,15 (dt,  $J$  = 4,6; 13,2 Hz, 1H); 1,31 (dq,  $J$  = 2,8; 13,2 Hz, 1H); 1,37-1,52 (m, 2H); 1,67 (s, 3H); 1,69-1,74 (m, 2H); 1,74-1,81 (m, 1H); 3,57 (dt,  $J$

= 4,4; 10,6 Hz, 1H); 4,79 (s, 1H); 4,84 (s, 1H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 19,3 (1C); 25,1 (1C); 26,4 (1C); 32,2 (1C); 33,1 (1C); 38,5 (1C); 46,8 (1C); 55,0 (1C); 67,6 (1C); 112,8 (1C); 146,7 (1C) ppm. Spezifischer Drehwert  $[\alpha]_D^{25} = -7,3$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1,0$ ). Literatur  $[\alpha]_D^{25} = +9,1$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1,0$ ) für (1*S*, 2*R*)-3-Methylisopulegol **2**.<sup>134</sup>

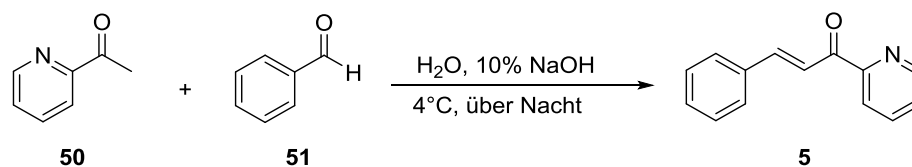
### 3.6.2.2 (1*R*, 2*S*)-2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol (**32**)



Die Synthese von (1*R*, 2*S*)-2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **32** erfolgte in Anlehnung an die analytische Biotransformationen. Für die Reaktion wurden 70 mL der *AacSHC\_I261A* Enzymlösung (~4 mg/mL) mit 30 mL Reaktionspuffer (12 mM Citrat-Puffer pH 6,0, 0,1 % Triton-X, 200 mM NaCl) gemischt und das 7-Methyloctenal **31** (85 mg) als 200mM DMSO-Lösung zugegeben (finale DMSO-Konzentration 1 %). Die Reaktionsmischung wurde für 3 Tage bei 30°C und 180 rpm in einer Schottflasche (250 mL) inkubiert und anschließend dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1  $R_f$  (*trans*-Produkt) = 0,39). Das (1*R*, 2*S*)- 2-(Prop-1-en-2-yl)cyclo-hexanol **32** (17,71 mg; 0,13 mmol; 20,8 % Ausbeute; >98 %) wurde als hellgelbes Öl isoliert.  $^1\text{H}$ -NMR (*trans*-Produkt) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1,13-1,29 (m, 4H); 1,59-1,62 (m, 1H); 1,63-1,64 (m, 1H); 1,65 (s, 3H); 1,67-1,74 (m, 1H); 1,83-1,90 (m, 1H); 1,97-2,03 (m, 1H); 3,36 (dt,  $J = 4,4; 10,0$  Hz, 1H); 4,78 (s, 1H); 4,83 (s, 1H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (*trans*-Produkt) (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 19,2 (1C); 24,9 (1C); 25,7 (1C); 30,2 (1C); 34,1 (1C); 54,6 (1C); 70,7 (1C); 112,8 (1C); 146,7 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>135</sup> Spezifischer Drehwert  $[\alpha]_D^{25} = -8,6$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1,0$ ). Literatur  $[\alpha]_D^{25} = +15,2$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1,0$ ) für (1*S*, 2*R*)- 2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **32**.<sup>136</sup>

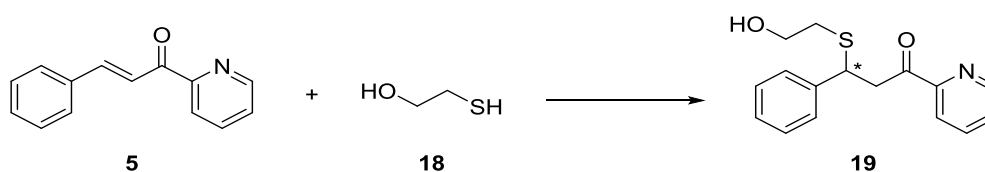
## 3.7 Chemische Synthesen

### 3.7.1 Azachalcon (5)



Die Synthese des Azachalcon **5** ((*E*)-3-Phenyl-1-(pyridin-2-yl)prop-2-en-1-on) erfolgte nach Otto *et al.*<sup>137</sup> 2-Acetylpyridin **50** (2,17 g; 17,9 mmol) wurde in 105 mL demineralisiertes Wasser vorgelegt, in einem im Eisbad gek\u00fchlten und Benzaldehyd **51** (1,84g; 17,3 mmol) zugegeben. Das Gemisch wurde im Eisbad gek\u00fchl\u00fct und ger\u00fchrt bis eine Emulsion entstand. Unter kr\u00e4ftigem R\u00fchren wurde 10 mL 10 %-ige Natriumhydroxidl\u00f6sung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 4°C f\u00fcr 18 h stehen gelassen und das Rohprodukt durch Filtration gewonnen. Durch Umkristallisation aus siedendem Ethanol wurde das Azachalcon **5** (1,44 g; 6,91 mmol; 39,9 % Ausbeute; Reinheit >95 %) als gr\u00fcngelbe Kristalle erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,46 (m, 4H); 7,72 (m, 2H); 7,87 (m, 1H); 7,98 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H); 8,20 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 8,31 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H); 8,75 (m, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 120,9 (1C); 122,9 (1C); 127,0 (1C); 128,9 (4C); 130,7 (1C); 135,2 (1C); 137,1 (1C); 144,8 (1C); 148,9 (1C); 154,3 (1C); 189,6 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur \u00fcberein.<sup>137</sup>

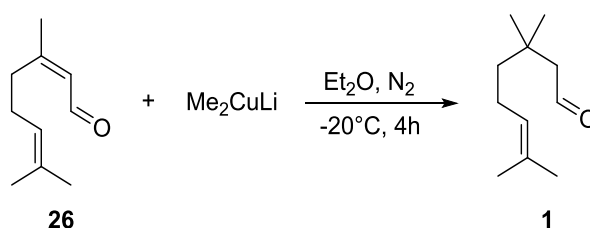
### 3.7.2 Produkt (19) der Michael Reaktion von Azachalcon (5) und Mercaptoethanol (18)



Die Synthese des Referenzprodukts **19** der Michael Reaktion erfolgte angelehnt an die Biotransformationen. Das Azachalcon **5** (105 mg; 0,52 mmol) wurde in 5 mL DMSO gel\u00f6st und zusammen mit Mercaptoethanol **18** (39 mg; 0,52 mmol) in 5 mL Wasser und 2,5 mL 200 mM Tris-Puffer pH 8,0 in 37 mL Wasser geben und mit 500  $\mu$ L 10 mM Kupfersulfatl\u00f6sung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 40°C f\u00fcr 1 h ger\u00fchrt und zweimal mit 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden \u00fcber NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das L\u00f6sungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels

Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1;  $R_f = 0,45$ ). Das Produkt **19** (30,9 mg; 0,11 mmol; 21,4 % Ausbeute; Reinheit >95 %) wurde als farbloses Öl erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2,59$  (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 3,64 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 3,69 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 3,75 (dd,  $J = 6,7; 17,8$  Hz, 1H); 3,93 (dd,  $J = 8,1; 17,6$  Hz, 1H); 4,61 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H); 7,22 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H); 7,31 (t,  $J = 7,6$  Hz; 2H); 7,43 (d,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 7,46 (dd,  $J = 1,2; 7,5$  Hz, 1H); 7,82 (dt,  $J = 1,9; 7,8$  Hz, 1H); 8,01 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 8,67 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 34,49$  (1C); 43,8 (1C); 44,3 (1C); 60,6 (1C); 122,1 (1C); 127,4 (1C); 127,4 (1C); 127,9 (2C); 128,6 (2C); 137,0 (1C); 142,2 (1C); 149,0 (1C); 152,9 (1C); 198,7 (1C) ppm. IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3400$  (w), 3056 (w), 3027 (w), 1696 (s)  $\text{cm}^{-1}$ . HREIMS  $m/z$  287,0988 (berechnet 287,0980).

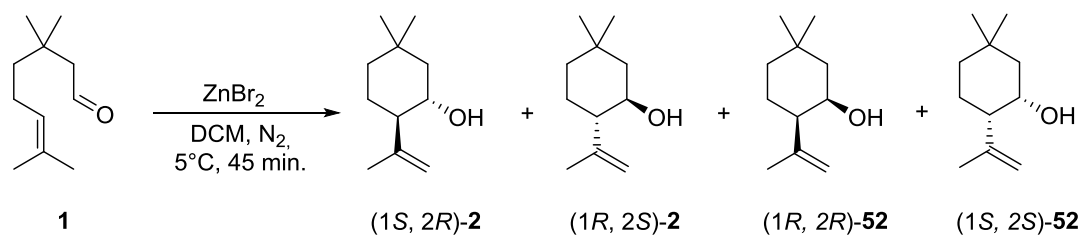
### 3.7.3 3-Methylcitronellal (**1**)



Die Synthese von 3-Methylcitronellal **1** (3,3,7-Trimethyloct-6-enal) erfolgte in einer Stufe nach Sakane *et al.*<sup>134</sup> ausgehend von Citral **26**. Zu einer Suspension aus Kupferiodid (1,8 g; 9,5 mmol) in 50 mL THF wurden bei  $0^\circ\text{C}$  unter  $\text{N}_2$  11,8 mL Methyllithium (1,6 M in  $\text{Et}_2\text{O}$ ; 18,9 mmol) zugegeben und für 10 min gerührt. Die Lösung wurde auf  $-78^\circ\text{C}$  gekühlt, Citral **26** (1,37 g; 9,0 mmol) in 10 mL THF zugetropft und weitere 10 min gerührt, bevor die Lösung auf  $-20^\circ\text{C}$  erwärmt und für 4 h gerührt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine kalte gesättigte  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gegeben und dreimal mit 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 10:1;  $R_f = 0,54$ ). Es wurde 3-Methylcitronellal **1** (470,5 mg; 2,80 mmol; 31 % Ausbeute; Reinheit >98 %) als gelbes Öl erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,06$  (s, 6H); 1,32-1,38 (m, 2H); 1,60 (s, 3H); 1,68 (s, 3H); 1,93-2,00 (m, 2H); 2,27 (d,  $J = 3,3$  Hz, 2H); 5,08 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H); 9,85 (t,  $J = 3,3$  Hz, 1H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 17,6$  (1C); 22,7 (1C); 25,7 (1C); 27,5 (2C); 33,5 (1C); 42,7 (1C); 54,7 (1C); 124,3 (1C); 131,6 (1C); 203,7 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur übereinstimmen.<sup>134</sup>

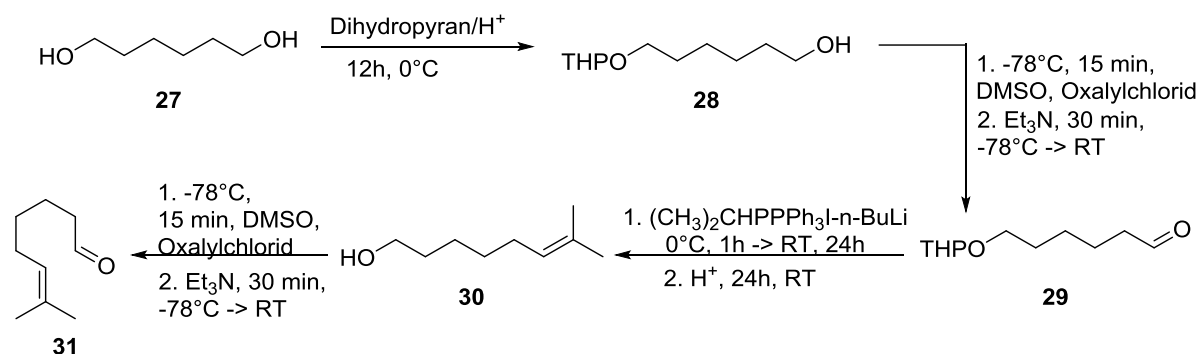


### 3.7.4 Chemische Zyklisierung von 3-Methylcitronellal (**1**) zu *trans*-3-Methylisopulegol (**2**) und *cis*-3-Methylisopulegol (**52**)



Die chemische Zyklisierung zum 3-Methylisopulegol (5,5-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanol) **2** und **52** wurde mit Hilfe von Zink(II)bromid als Lewis-Säure in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.<sup>138</sup> 3-Methylcitronellal **1** (50 mg; 0,3 mmol) wurde unter N<sub>2</sub> in 6 mL DCM gelöst und Zink(II)bromid (67,5 mg; 0,3 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 45 min bei 5°C gerührt, anschließend mit 2 M NaOH-Lösung versetzt und dreimal mit 20 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1, R<sub>f</sub> (*trans*-Produkt) = 0,43; R<sub>f</sub> (*cis*-Produkt) = 0,63). Die beiden 5,5-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)cyclohexanol Isomere *trans* **2** (26,1 mg; 0,16 mmol; 53,3 % Ausbeute; Reinheit >98 %) und *cis* **52** (3 mg; 0,02 mmol; 6,7 % Ausbeute; Reinheit >98 %) wurden als farblose Öle erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (*trans*-Produkt) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,87 (s, 3H); 0,90 (s, 3H); 1,07 (t, J = 11,8 Hz, 1H); 1,15 (dt, J = 4,6; 13,2 Hz, 1H); 1,31 (dq, J = 2,8; 13,2 Hz, 1H); 1,37-1,52 (m, 2H); 1,67 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1,68-1,74 (m, 2H); 1,74-1,81 (m, 1H); 3,57 (dt, J = 4,4; 10,6 Hz, 1H); 4,79 (s, 1H); 4,83 (s, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (*trans*-Produkt) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 18,3 (1C); 24,1 (1C); 25,3 (1C); 31,1 (1C); 32,0 (1C); 37,5 (1C); 45,7 (1C); 53,8 (1C); 66,6 (1C); 111,8 (1C); 145,6 (1C) ppm. IR (*trans*-Produkt) (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3392, 2950, 1455, 1365, 1051, 884 cm<sup>-1</sup>. IR (*cis*-Produkt) (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3433, 2956, 1459, 1378, 1071 cm<sup>-1</sup>. Die gemessenen NMR-Daten und IR-Daten für das *trans*-Produkt stimmen mit der Literatur übereinstimmen.<sup>134</sup>

## 3.7.5 7-Methyloctenal (31)



Die Synthese von 7-Methyl-6-octenal **31** erfolgte in vier Stufe nach Sakane *et al.*<sup>134</sup> ausgehend von 1,6-Hexandiol **27** (5,4 g; 34 mmol) und Dihydropyran (1,72 g; 20,4 mmol) in 120 mL THF wurde bei 0°C unter N<sub>2</sub> *p*-Toluolsulfonsäure (322 mg; 1,7 mmol) zugegeben und für 12 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenched und dreimal mit 35 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1; R<sub>f</sub> = 0,56). Der mono-THPEther **28** (2,76g; 13,66 mmol; 40,2 % Ausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,36-1,43 (m, 4H); 1,49-1,65 (m, 8H); 1,68-1,75 (m, 1H); 1,79-1,85 (m, 1H); 3,35-3,42 (m, 1H); 3,47-3,53 (m, 1H); 3,63 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H); 3,71-3,77 (m, 1H); 3,83-3,90 (m, 1H); 4,57 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 19,7 (1C); 25,5 (1C); 25,6 (1C); 26,0 (1C); 29,7 (1C); 30,8 (1C); 32,7 (1C); 32,7 (1C); 62,4 (1C); 62,9 (1C); 67,5 (1C); 98,9 (1C) ppm.

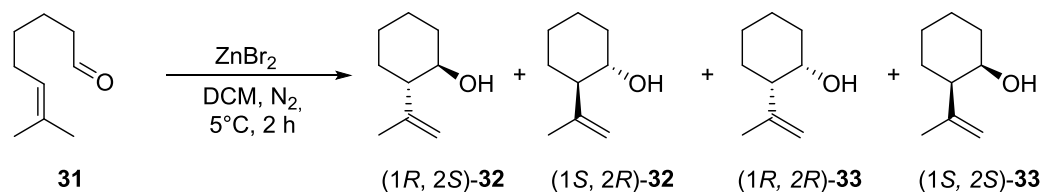
Im zweiten Schritt wurde eine Swern Oxidation durchgeführt um den mono-THP Ether **28** zu oxidieren. Zu einer Lösung aus Oxalylchlorid (1,87 g; 14,7 mmol) in 70 mL DCM wurde eine Lösung aus DMSO (2,23 g; 28,6 mmol) in 10 mL DCM bei -78°C unter N<sub>2</sub> zugetropft und für 5 min gerührt. Dann wurde der mono-THP Ether **28** (2,76 g; 13,6 mmol) in 5 mL DCM zugegeben. Nach 15 min bei -78°C wurde Triethylamin (8,4 g; 83 mmol) zugegeben, das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und für 30 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1M HCl versetzt und dreimal mit 35 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1; R<sub>f</sub> = 0,56). Der Aldehyd **29** (2,33 g; 11,65 mmol; 85,6 % Ausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,38-1,47 (m, 2H); 1,47-1,75 (m, 9H); 1,76-1,87 (m,

1H); 2,45 (dt,  $J = 1,8; 7,4$  Hz, 2H); 3,36-3,42 (m, 1H); 3,47-3,53 (m, 1H); 3,72-3,77 (m, 1H); 3,83-3,89 (m, 1H); 4,57 (t,  $J = 3,4$  Hz, 1H); 9,77 (t,  $J = 1,8$  Hz, 1H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 19,7$  (1C); 21,9 (1C); 25,5 (1C); 25,9 (1C); 29,5 (1C); 30,8 (1C); 43,9 (1C); 62,4 (1C); 67,3 (1C); 99,0 (1C); 202,7 (1C) ppm.

In der dritten Stufe wurde für die Wittig Reaktion eine Lösung aus Isopropyltriphenylphosphoniumiodid (5,0 g; 11,6 mmol) in 150 mL THF bei  $0^\circ\text{C}$  unter  $\text{N}_2$  vorgelegt und 7,3 mL  $n$ -BuLi (1,6 M in  $n$ -Hexane; 11,6 mmol) zugegeben. Die resultierende tiefrote Lösung wurde für 1 h bei  $0^\circ$  gerührt und dann der Aldehyd **29** (2,2 g; 11,0 mmol) in 15 mL THF zugegeben. Die Lösung wurde 24 h bei RT gerührt, über Celite gefiltert und mit 200 mL Diethylether gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde im Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 20:1;  $R_f = 0,48$ ). Das Produkt (2,23 g; 9,85 mmol; 85,7 % Ausbeute) wurde als hellgelbes Öl erhalten und ohne weitere Charakterisierung umgesetzt, wofür es in 30 mL Methanol gelöst und  $p$ -Toluolsulfonsäure Monohydrat (121 mg; 0,7 mmol) zugegeben wurde. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei RT gerührt und dann mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung versetzt und dreimal mit 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1;  $R_f = 0,33$ ) um den Alkohol **30** (1,28 g; 8,87 mmol; 90,1 % Ausbeute) als farbloses Öl zu erhalten.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,31$ -1,40 (m, 4H); 1,54-1,59 (m, 2H); 1,60 (s, 3H); 1,69 (s, 3H); 1,93-2,02 (m, 2H); 3,64 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H); 5,11 (t,  $J = 7,1$  Hz, 1H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 17,7$  (1C); 25,0 (1C); 25,7 (1C); 28,0 (1C); 29,7 (1C); 32,8 (1C); 63,1 (1C); 124,6 (1C); 131,4 (1C) ppm.

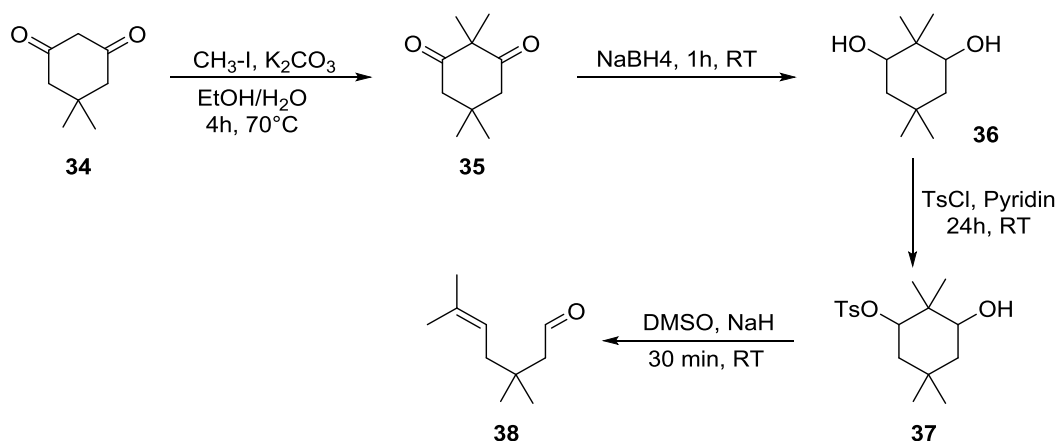
Im letzten Schritt wurde der Alkohol **30** durch Swern Oxidation, wie bereits im zweiten Schritt beschrieben, oxidiert und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 7:1;  $R_f = 0,57$ ) um das Produkt 7-Methyloct-6-enal **31** (380,5 mg; 2,71 mmol; 78,6 % Ausbeute; Reinheit >98 %) als gelbes Öl zu erhalten.  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,34$ -1,40 (m, 2H); 1,60 (s, 3H); 1,61-1,67 (m, 2H); 1,69 (s, 3H); 2,00 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H); 2,42 (dt,  $J = 1,6; 7,5$  Hz, 2H); 5,09 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H); 9,76 (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 17,7$  (1C); 21,7 (1C); 25,7 (1C); 27,7 (1C); 29,4 (1C); 43,9 (1C); 124,0 (1C); 131,9 (1C); 202,9 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur übereinstimmen.<sup>134</sup>

### 3.7.6 Chemische Zyklisierung von 7-Methyloctenal (**31**) zu *trans*-2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol (**32**) und *cis*-2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol (**33**)



Die chemische Zyklisierung von 7-Methyloctenal **31** wurde mit Hilfe von Zink(II)bromid als Lewis-Säure in Anlehnung an die Literatur durchgeführt.<sup>138</sup> 7-Methyloctenal **31** (50 mg; 0,36 mmol) wurden unter N<sub>2</sub> in 6 mL DCM gelöst und Zink(II)bromid (80 mg; 0,36 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei 5°C gerührt, anschließend mit 2 M NaOH-Lösung versetzt und dreimal mit 10 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1; R<sub>f</sub> (*trans*-Produkt) = 0,39; R<sub>f</sub> (*cis*-Produkt) = 0,50). Die beiden 2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol-Isomere *trans* **32** (11,9 mg; 0,085 mmol; 23,6 % Ausbeute; Reinheit >98 %) und *cis* **33** (1,99 mg; 0,014 mmol; 3,9 % Ausbeute; Reinheit >98 %) wurden als farblose Öle erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (*trans*-Produkt) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,13-1,29 (m, 4H); 1,59-1,62 (m, 1H); 1,63-1,64 (m, 1H); 1,65 (s, 3H); 1,67-1,74 (m, 1H); 1,83-1,90 (m, 1H); 1,97-2,03 (m, 1H); 3,36 (dt, *J* = 4,4; 10,0 Hz, 1H); 4,78 (s, 1H); 4,83 (s, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (*trans*-Produkt) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 19,2 (1C); 24,9 (1C); 25,7 (1C); 30,2 (1C); 34,1 (1C); 54,6 (1C); 70,7 (1C); 112,8 (1C); 146,7 (1C) ppm. IR (*trans*-Produkt) (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3413, 2928, 1644, 1449, 1114, 1065, 886 cm<sup>-1</sup>. IR (*cis*-Produkt) (Film):  $\tilde{\nu}$  = 3445, 2928, 1463, 1074 cm<sup>-1</sup>. Die gemessenen NMR-Daten und IR-Daten stimmen mit der Literatur übereinstimmen.<sup>135</sup>

## 3.7.7 3,3,6-Trimethylheptenal (38)



Die Synthese von 3,3,6-Trimethylheptenal **38** erfolgte in vier Stufen ausgehend von Dimedon **34**. In der ersten Stufe wurde das Dimedon **34** nach R. Kiwus *et al.*<sup>139</sup> methyliert. Hierfür wurde Dimedon **34** (4,2 g; 30 mmol) in 50 mL Ethanol/Wasser (1:1) gelöst und Kalimcarbonat (10,4 g; 75 mmol) und Iodmethan (8,5 g; 60 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei  $70^\circ\text{C}$  unter Rückfluss erhitzt und anschließend mit 50 mL Wasser verdünnt und viermal mit 25 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, so dass aus der Mutterlauge das Produkt 2,2,5,5-Tetramethyl-1,3-cyclohexandion **35** (2,2 g; 13,1 mmol; 43,7 % Ausbeute) ausfällt.

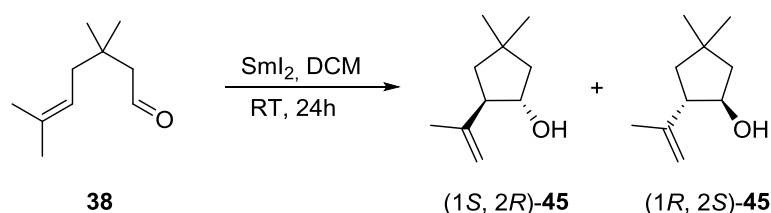
Im zweiten Schritt erfolgte die Reduktion des Diketons **35** zum Alkohol **36** nach N. H. Andersen *et al.*<sup>140</sup> mit Hilfe von Natriumborhydrid. Zu einer Lösung aus 2,2,5,5-Tetramethyl-1,3-cyclohexandion **35** (2,2 g; 13,1 mmol) in 20 mL Ethanol unter  $\text{N}_2$  wurde Natriumborhydrid (495 mg; 13,1 mmol) bei  $0^\circ\text{C}$  zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Zugabe von 10 % HCl und dreimaliger Extraktion mit 25 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt 2,2,5,5-Tetramethyl-1,3-cyclohexandiol **36** (495 mg; 2,9 mmol; 22,1 % Ausbeute) aus Chloroform umkristallisiert.

Die letzten beiden Schritte wurden nach Y. Gaoni *et al.*<sup>141</sup> durchgeführt. Das Diol **36** (495 mg; 2,9 mmol) wurde in 5 mL Pyridin unter  $\text{N}_2$  bei  $0^\circ\text{C}$  gelöst und mit *p*-Toluolsulfonylchlorid (691 mg; 3,6 mmol) in 7 mL DCM versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei  $0^\circ\text{C}$  und über Nacht bei RT gerührt. Es wurden Eis zugegeben und weitere 30 min gerührt, bevor die Lösung mit Wasser verdünnt und dreimal mit 10 mL DCM extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1M HCl und gesättigter NaCl-Lösung mit Natriumcarbonat versetzt gewaschen, über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

entfernt und das Rohprodukt **37** (642 mg; 2,0 mmol; 69,0 % Ausbeute) erhalten, welches ohne weitere Reinigung im letzten Schritt umgesetzt wurde.

Zu einer Lösung aus Natriumhydrid (48,0 mg; 2,0 mmol) in 3 mL DMSO wurde das Rohprodukt **37** (642 mg; 2,0 mmol) in 2 mL DMSO tropfenweise unter N<sub>2</sub> bei RT zugegeben und für 30 min gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt, 10 mL Wasser zugetropft, verdünnte NaCl-Lösung zugegeben und drei Mal mit 10 mL *n*-Pentan/Diethylether (2:1) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1; R<sub>f</sub> = 0,70) um das 3,3,6-Trimethylheptenal **38** (81,5 mg; 0,53 mmol; 26,5 % Ausbeute; Reinheit >98 %) als hellgelbes Öl zu erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,98 (s, 6H); 1,52 (s, 3H); 1,66 (s, 3H); 1,94 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H); 2,17 (d, *J* = 3,2 Hz, 2H); 5,12 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H); 9,76 (t, *J* = 3,2 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (62 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 17,94 (1C); 26,08 (1C); 27,43 (2C); 34,71 (1C); 40,88 (1C); 54,55 (1C); 120,01 (1C); 134,37 (1C); 203,76 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur übereinstimmen.<sup>141</sup>

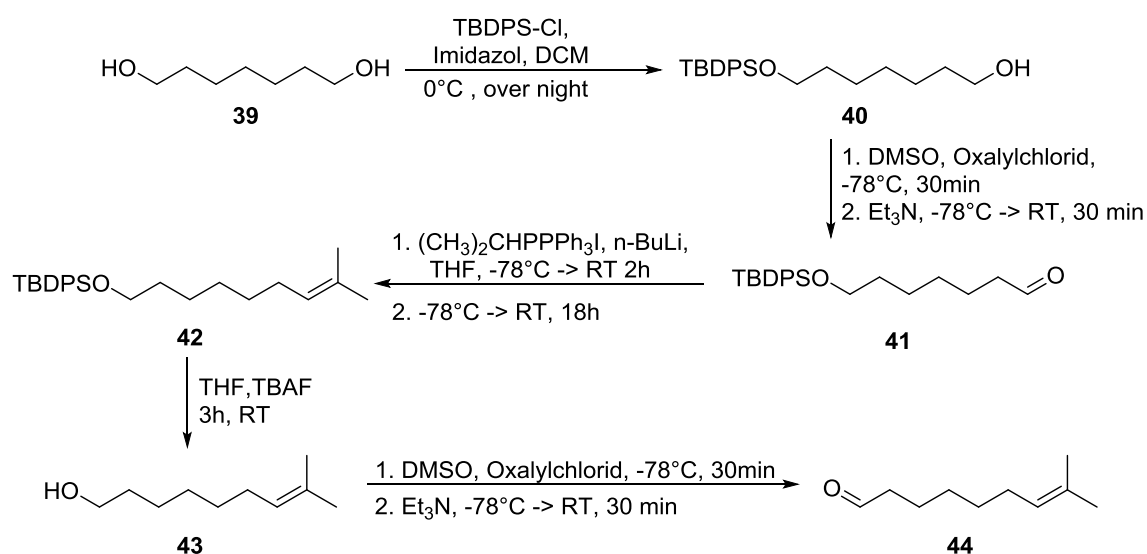
### 3.7.8 Chemische Zyklisierung von 3,3,6-Trimethylheptenal (**38**) zu *trans*-2-Isopropyl-4,4-Dimethyl-cyclopentanol (**45**)



Die chemische Zyklisierung von 3,3,6-Trimethylheptenal **38** wurde mit Hilfe von Samariumiodid als Lewis-Säure in Anlehnung an die Literatur nach Sarkar *et al.* durchgeführt.<sup>142</sup> Zur Lösung des 3,3,6-Trimethylheptenal **38** (80 mg; 0,52 mmol) in 8 mL DCM wurde unter N<sub>2</sub> bei RT die blaue Samariumiodid-Lösung (0,1 M in THF; 0,064 mmol; 640 μL) zugegeben. Die Reaktionsmischung färbte sich sofort gelb und wurde über Nacht gerührt. Nach Zugabe von 1 M HCl wurde dreimal mit 10 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1; R<sub>f</sub> = 0,37) um das 2-Isopropyl-4,4-Dimethyl-cyclopentanol **45** (43,6 mg; 0,28 mmol; 53,8 % Ausbeute; Reinheit >98 %) als gelbes Öl zu erhalten. <sup>1</sup>H-NMR

(250 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,04 (s, 3H); 1,11 (s, 3H); 1,36-1,49 (m, 2H); 1,58-1,68 (m, 1H); 1,73 (s, 3H); 1,90 (dd,  $J$  = 7,7 Hz, 1H); 2,48-2,55 (m, 1H); 4,07 (q,  $J$  = 8,3 Hz, 1H); 4,82 (d,  $J$  = 8,3 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (62 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 19,97 (1C); 31,46 (1C); 31,55 (1C); 35,11 (1C); 43,94 (1C); 48,87 (1C); 55,40 (1C); 75,34 (1C); 110,83 (1C); 145,74 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur übereinstimmen.<sup>140</sup>

### 3.7.9 8-Methylnonenal (44)



Die Synthese von 8-Methylnonenal **44** erfolgte in fünf Stufen nach Comito *et al.*<sup>143</sup> ausgehend vom 1,7-Heptandiol **39**. Zu einer Lösung aus 1,7-Heptandiol **39** (3,3 g; 25,2 mmol) und Imidazol (2,0 g; 29,0 mmol) in 160 mL DCM wurde unter N<sub>2</sub> und bei 0°C TBDPSCl (6,7 g; 24,5 mmol) in 25 mL DCM tropfenweise zugeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und über Nacht gerührt, anschließend mit 300 mL DCM verdünnt und mit 250 mL 0,5 M HCl-Lösung und 200 mL Brine-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1; R<sub>f</sub> = 0,31). Der TBDPS-geschützte Alkohol **40** (5,2 g; 14,05 mmol; 55,8 % Ausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1,05 (s, 9H); 1,21 (s, 1H); 1,27-1,40 (m, 6H); 1,51-1,59 (m, 4H); 3,60-3,67 (m, 4H); 7,34-7,44 (m, 6H); 7,65-7,69 (m, 4H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 19,3 (1C); 25,7 (1C); 25,8 (1C); 26,9 (3C); 29,2 (1C); 32,5 (1C); 32,8 (1C); 63,1 (1C); 63,9 (1C); 127,6 (4C); 129,5 (2C); 134,2 (2C); 135,6 (4C) ppm.

Im zweiten Schritt wurde eine Swern Oxidation durchgeführt um den Alkohol **40** zu oxidieren. Zu einer Lösung aus DMSO (1,75 g; 22,4 mmol) in 150 mL DCM wurde

Oxalylchlorid (2,3 g; 18,3 mmol) bei -78°C unter N<sub>2</sub> zugetropft und für 30 min gerührt. Anschließend wurde der mono-TBDPS-geschützte Alkohol **40** (5,2 g; 14,1 mmol) in 15 mL DCM zugegeben. Nach 30 min bei -78°C wurde Triethylamin (7,25 g; 71,7 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch auf RT erwärmt und für weitere 30 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1M HCl versetzt und dreimal mit 25 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 9:1, R<sub>f</sub> = 0,54). Der Aldehyd **41** (3,78 g; 10,27 mmol; 73,1 % Ausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,04 (s, 9H); 1,25-1,41 (m, 4H); 1,51-1,65 (m, 4H); 2,40 (dt, *J* = 1,7; 7,5 Hz, 2H); 3,65 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 7,35-7,44 (m, 6H); 7,64-7,68 (m, 4H); 9,75 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 19,3 (1C); 25,7 (1C); 25,8 (1C); 26,9 (3C); 29,2 (1C); 32,5 (1C); 32,8 (1C); 63,1 (1C); 63,9 (1C); 127,6 (4C); 129,5 (2C); 134,2 (2C); 135,6 (4C) ppm.

In der dritten Stufe wurde für die Wittig Reaktion eine Lösung aus Isopropyltriphenylphosphoniumiodid (4,8 g; 11,1 mmol) in 100 mL THF bei -78°C unter N<sub>2</sub> vorgelegt und 8,0 mL *n*-BuLi (1,6 M in *n*-Hexane; 12,3 mmol) zugegeben. Die resultierende tiefrote Lösung wurde bei -78°C gerührt auf RT erwärmt, weitere 2 h gerührt und wieder auf -78°C gekühlt. Dann wurde das Aldehyd **41** (3,78 g; 10,3 mmol) in 20 mL THF zugegeben. Die Lösung wurde 18 h bei RT gerührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt in 30 mL DCM gelöst, mit 130 mL Cyclohexan verdünnt, über Silica filtriert und mit 1 % Ethylacetat/Cyclohexan (400 mL) eluiert. Das Produkt **42** (3,95 g; 10,0 mmol; 97,4 % Ausbeute) wurde als gelbes Öl erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,04 (s, 9H); 1,22-1,38 (m, 4H); 1,51-1,58 (m, 2H); 1,59 (s, 2H); 1,68 (s, 2H); 1,91-1,98 (m, 2H); 3,65 (t, *J* = 6,3 Hz, 2H); 5,08-5,13 (m, 1H); 7,34-7,44 (m, 6H); 7,64-7,68 (m, 4H); 9,75 (t, *J* = 1,7 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 19,3 (1C); 25,7 (1C); 25,8 (1C); 26,9 (3C); 29,2 (1C); 32,5 (1C); 32,8 (1C); 63,1 (1C); 63,9 (1C); 127,6 (4C); 129,5 (2C); 134,2 (2C); 135,6 (4C) ppm.

Für die Entschützung wurde der TBDPS-geschützte Alkohol **42** (3,95 g; 10,0 mmol) unter N<sub>2</sub> in 85 mL THF gelöst und 15 mL TBAF (1M in THF; 15 mmol) zugegeben und für 3 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit Wasser versetzt und dreimal mit 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 70 mL Brine-Lösung gewaschen, über NaSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1; R<sub>f</sub> = 0,39). Der Alkohol **43** (1,42 g; 9,10 mmol; 91 % Ausbeute) wurde als hellgelbes Öl zu



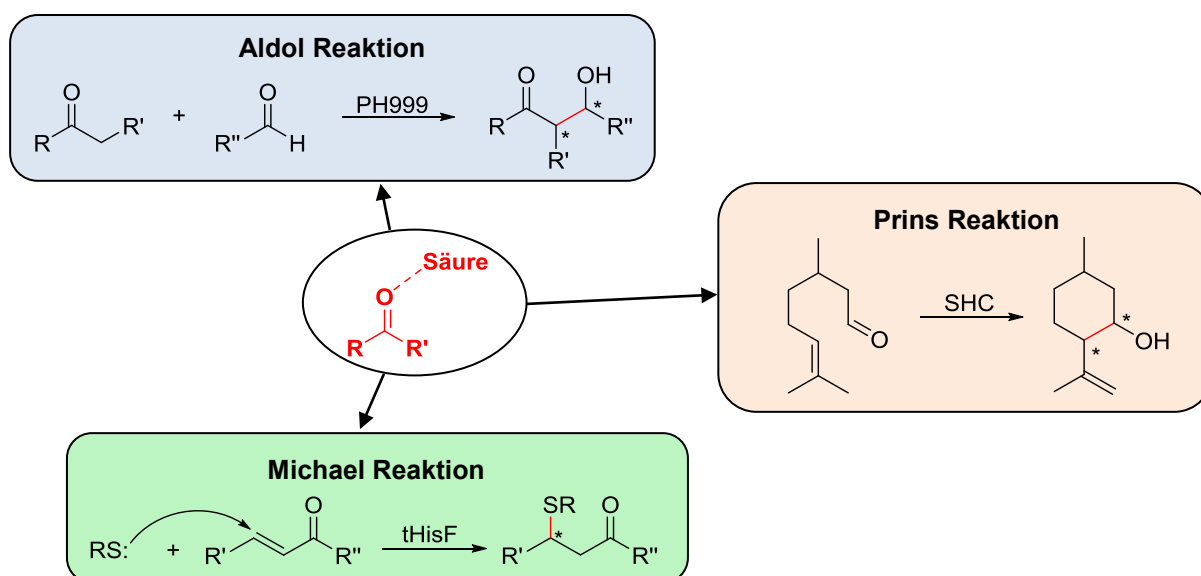
erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,26-1,39$  (m, 7H); 1,52-1,58 (m, 2H); 1,59 (s, 3H); 1,68 (s, 3H); 1,93-2,00 (m, 2H); 3,64 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H); 5,11 (t,  $J = 7,0$  Hz, 1H) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 17,7$  (1C); 25,7 (1C); 25,7 (1C); 28,0 (1C); 29,1 (1C); 29,8 (1C); 32,8 (1C); 63,1 (1C); 124,8 (1C); 131,3 (1C) ppm.

Im letzten Schritt wurde der Alkohol **43** durch Swern Oxidation, wie bereits im zweiten Schritt beschrieben, oxidiert und mittels Säulenchromatographie über Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat 7:1;  $R_f = 0,61$ ) um das Produkt 8-Methylnon-7-enal **44** (450 mg; 2,9 mmol; 64,4 % Ausbeute; Reinheit >98 %) als farbloses Öl zu erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,29-1,38$  (m, 4H); 1,59 (s, 3H); 1,61-1,67 (m, 2H); 1,69 (s, 3H); 1,92-2,02 (m, 2H); 2,42 (dt,  $J = 1,9; 7,3$  Hz, 2H); 5,09 (t,  $J = 7,0$  Hz, 1H); 9,76 (t,  $J = 1,9$  Hz, 1H) ppm.  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 17,7$  (1C); 22,1 (1C); 25,7 (1C); 27,8 (1C); 28,8 (1C); 29,6 (1C); 43,9 (1C); 124,4 (1C); 131,6 (1C); 203,0 (1C) ppm. Die gemessenen NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>143</sup>



## 4 ERGEBNISSE

Anhand von zwei unabhängigen Studien soll im Rahmen dieser Arbeit evaluiert werden, in wie weit Enzyme für die chirale Katalyse von nicht-natürliche Reaktionen verwendet werden können. Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand von Zink(II)-abhängigen Enzymen deren katalytische Promiskuität untersucht. Es galt zu klären, ob das Zink(II) als Lewis-Säure für die Aktivierung einer Carbonylgruppe genutzt und damit die nicht-natürliche Aldol und Michael Reaktion katalysiert werden kann. Für die Studien zur Katalyse der Aldol Reaktion wurde die Pyrazinamidase PH999 von *Pyrococcus horikoshii* mit einer natürlichen His/His/Asp-Triade zur Zink(II)koordination ausgewählt. In die tHisF von *Thermotoga maritima* wurde dieselbe Triade artifiziell eingeführt und das koordinierte Zink(II) als Lewis-Säure für die Michael Reaktion mit Schwefelnukleophilen verwendet. Im zweiten Teil wurde die Substratpromiskuität der Squalen-Hoppe-Zyklase (SHC) aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* analysiert. Die SHC besitzt eine katalytisch aktive Asparaginsäure, welche als Brønsted Säure agiert und durch Protonierung der Carbonylgruppe die intramolekulare Prins Reaktion katalysiert. In allen drei Modellreaktionen werden nach der Aktivierung der Carbonylgruppe mit Hilfe einer Säure neue C-C oder C-S Bindungen aufgebaut (**Abbildung 23**).



**Abbildung 23:** Organische Reaktionen, mit welchen die Substrat- und katalytische Promiskuität der Enzyme PH999, tHisF und AacSHC untersucht werden soll. Sie alle haben gemeinsam, dass die Carbonylgruppe durch eine Säure aktiviert wird.

## 4.1 Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität von Zink(II)-bindenden Enzymen als chirale Lewis-Säuren

### 4.1.1 Expression, Reinigung und Bestimmung der Aktivität der PH999

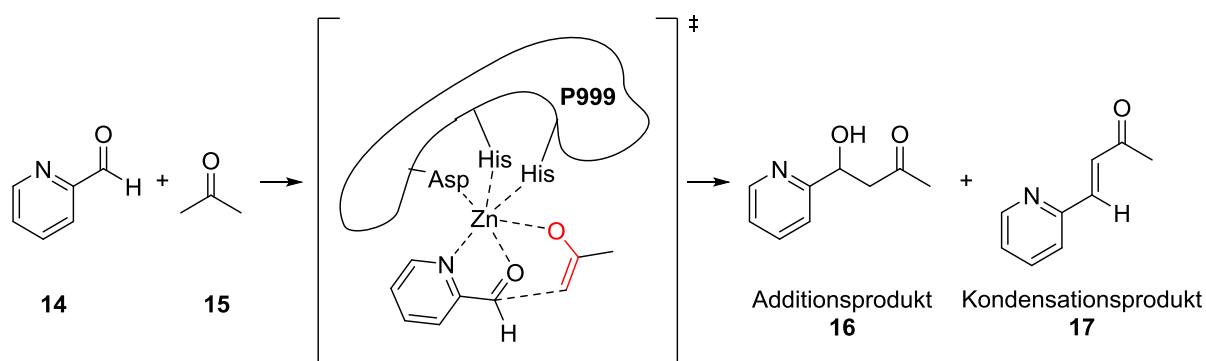
Das Gen der PH999 aus *Pyrococcus horikoshii* kloniert in einen pET-21a(+)-Vektor wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. S.-H. Kim aus Kalifornien zur Verfügung gestellt.<sup>69</sup> In ersten Expressionsversuchen mit *E. coli* BL21 (DE3) konnte keine Überexpression der PH999 erzielt werden. Daraufhin wurden in Anlehnung an die Literatur Expressionstudien im Expressionsstamm *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) durchgeführt.<sup>69</sup> *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) bietet im Vergleich zu *E. coli* BL21 (DE3) den Vorteil, dass tRNA für die in *E. coli* selten verwendeten Codons bereitgestellt wird und somit Enzyme mit diesen Codons, wie im Fall der PH999 exprimiert werden können. Für die Expressionstudien wurden in LB-Medium verschiedene Temperaturen (30° und 37°C) und Expressionszeiten (1, 2, 3, 4, 5 h und über Nacht) nach einer Induktion mit 0,5 mM IPTG getestet (Kapitel 3.2.3). Die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.4.5) zeigte durch die PH999 Proteinbande bei 21 kDa, dass die beste Expression bei einer Temperatur von 30°C und einer Expressionszeit von 5 h erreicht wurde. Die Reinigung des Enzyms (Kapitel 3.4.3.1) erfolgte in zwei Schritten, einer Grobreinigung mittels Hitzefällung von *E. coli* Proteinen und einer Anionenaustauschchromatographie mit einem Äkta System. Die lösliche PH999 konnte mit einer Reinheit von >90 % erhalten werden. Ein exemplarisches SDS-PAGE-Gel der Expression und Reinigung der PH999 findet sich im Anhang (Kapitel 7.1.1). Alle in dieser Arbeit erstellten Mutanten der PH999 konnten nach demselben für den Wildtyp beschriebenen Protokoll exprimiert und gereinigt werden.

Die Aktivität der exprimierten und gereinigten PH999 wurde nach einem modifizierten Ansatz in Anlehnung an X. Du *et al.*<sup>69</sup> mit Hilfe der natürlichen Reaktion, der Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zu Pyrazinsäure **4**, bestimmt (Kapitel 3.4.7). Für die Reaktionsansätze wurde eine Substratkonzentration von 20 mM Pyrazinamid **3** und eine Enzymkonzentration von 10 µM PH999 in 10 mM Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 verwendet. Für den Wildtyp wurde bei einer Reaktionstemperatur von 30°C eine spezifische Aktivität von  $0,18 \pm 0,01$  µmol/min mg Enzym ermittelt. Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60°C konnte die spezifische Aktivität um das Vierfache auf  $0,73 \pm 0,03$  µmol/min mg Enzym gesteigert werden. Die ermittelte spezifische Aktivität liegt deutlich unter der in der Literatur

beschriebenen spezifischen Aktivität von 17,3  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  Enzym bei 30°C und 357  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  Enzym bei 60°C.<sup>69</sup> Als Negativkontrolle wurde die Reaktion in Puffer ohne Zugabe von Enzym durchgeführt und keine Umsetzung detektiert.

#### 4.1.2 Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der PH999

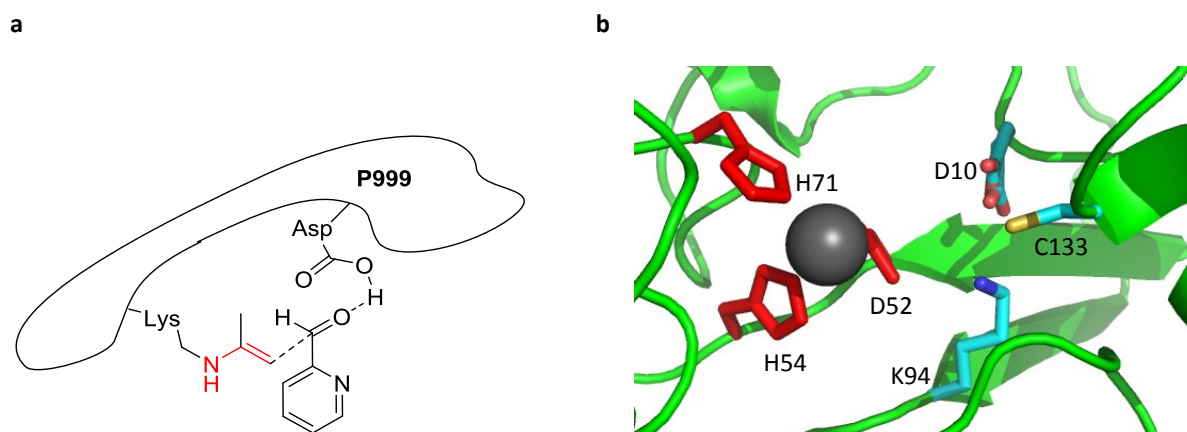
Nachdem die natürliche Aktivität der PH999 verifiziert werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob es möglich ist mit der PH999 eine Aldol Reaktion zu katalysieren und damit eine katalytische Promiskuität nachzuweisen. Das an der His/His/Asp-Triade koordinierte Zink(II) agiert als Lewis-Säure. Es aktiviert in der natürlichen Reaktion Wasser und stellt das Hydroxidion für die Hydrolyse bereit. In der Aldol Reaktion muss das Zink(II) für eine erfolgreiche Katalyse zwei Aufgaben erfüllen. Zum einen aktiviert es die Carbonylfunktion des Aldol Akzeptors und zum anderen den Donor durch Bildung einer Zink(II)-Enolat-Zwischenstufe. Als Startpunkt erfolgte die Substratauswahl für die Aldol Reaktion nach dem Vorbild des natürlichen Substrats Pyrazinamid **3**. Als Aldol Akzeptor wurde das strukturell verwandte 2-Pyridincaboxaldehyd **14** gewählt. Dieses kann über die freien Elektronenpaare des Carbonylsauerstoffes und des Stickstoffes über einen Fünfring-Chelat Übergangszustand an zwei Koordinationsstellen am Zink(II) koordinieren. Da in der natürlichen Reaktion als zweites Substrat Wasser vorhanden ist, wurde als Aldol Donor das Aceton **15** gewählt. Aceton **15** liegt durch die Keto-Enol-Tautomerie zu einem geringen Teil in seiner Enolform vor, welche an das Zink(II) koordinieren und als Nukleophil dienen kann. Durch die Koordination von Akzeptor und Donor werden die beiden zu reagierenden Substrate zusätzlich zur Aktivierung in eine räumliche Nähe gebracht (**Abbildung 24**).



**Abbildung 24:** Aldol Reaktion von 2-Pyridincarboxaldehyd **14** und des Donors Aceton **15**. Die Katalyse erfolgt durch die Aktivierung des Akzeptors 2-Pyridincarboxaldehyd **14** und des Donors Aceton **15**. Es entstehen zwei Produkten, das  $\beta$ -Hydroxyketon 4-Hydroxy-4-(pyridinyl)butanon als Additionsprodukt **16** und das Kondensationsprodukt **17** (*E*)-4-(Pyridinyl)butenon, ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonyl, durch Wasserabspaltung aus dem Additionsprodukt **16**.

In Enzymfällungsversuchen konnte bis zu einer Konzentration von 50 % Aceton **15** keine sichtbare Fällung des Enzyms festgestellt werden. Um das ungünstige Keto-Enol-Gleichgewicht des Acetons **15** (der Anteil der Enol-Form beträgt nur ca.  $1,5 \cdot 10^{-4}$  %) auf der Seite des Ketons auszugleichen, wurde aus diesem Grund das Aceton **15** in der für die PH999 höchstverträglichsten Konzentration von 50 % in den Biotransformationen verwendet.

Für die Aldol Reaktion ist neben dem Reaktionsmechanismus über das Zink(II)-Enolat, welches natürlicherweise in Typ II Aldolasen vorkommt, ein weiterer Reaktionsmechanismus über eine Enamin Zwischenstufe analog den Typ I Aldolasen bekannt. Typ I Aldolasen katalysieren die Aldol Reaktion im aktiven Zentrum durch einen Lysin-Aminosäurerest. Dieser kann analog zu Organokatalysatoren, mit dem Aldol Donor ein Enamin bilden und dadurch das Nukleophil für die Reaktion bereit stellen.<sup>144</sup> Aus der Struktur und dem Reaktionsmechanismus der PH999 ist bekannt, dass in der aktiven Tasche ein Lysin vorhanden ist. Dieses Lysin an Position 94 könnte die Aldol Reaktion nach dem Vorbild einer Typ I Aldolase durch Bildung einer Enamin-Zwischenstufe mit dem Aceton **15** katalysieren. Für die Bildung der Enamin-Zwischenstufe ist zusätzlich eine Base notwendig um das  $\alpha$ -Proton des Acetons **15** aufzunehmen, welches zur Bildung des Alkohols wieder an das 2-Pyridincaboxaldehyd **14** abgegeben wird. Die Aufgabe der zusätzlichen Base kann in der PH999 von der in der aktiven Tasche vorhandenen Asparaginsäure an Position 10 übernommen werden (**Abbildung 25**).



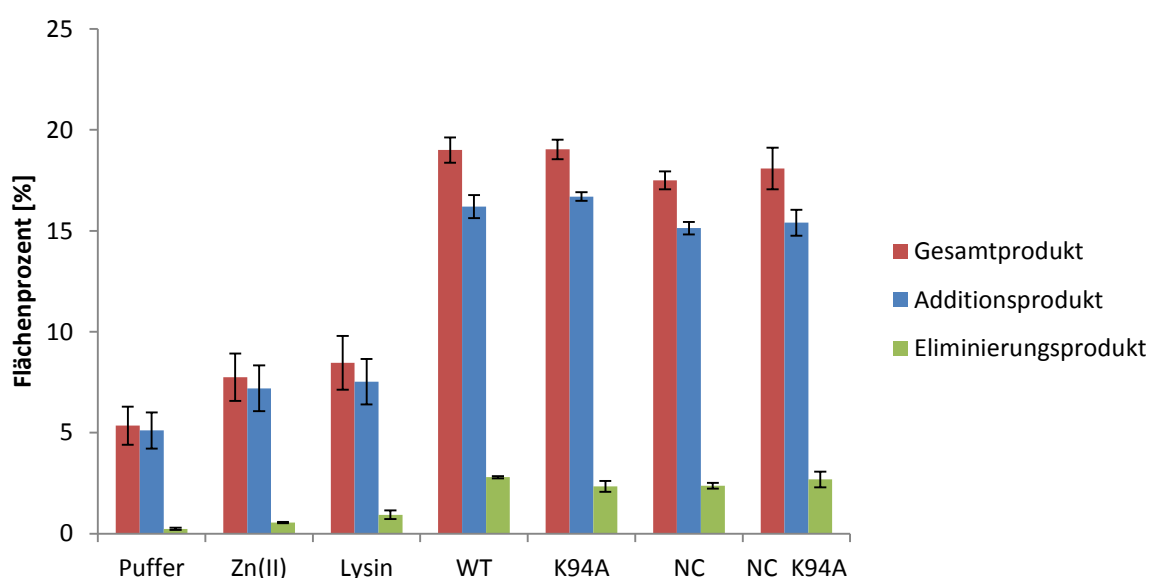
**Abbildung 25:** (a) Die Enamin-Zwischenstufe, gebildet aus Aceton **15** als Aldol Donor und Lysin. Zusätzlich ist die Asparaginsäure als Base für einen Protonenübertrag zuständig. (b) Struktur der aktiven Tasche mit den katalytisch aktiven Aminosäuren, mit der His/His/Asp-Triade (rot) und dem koordinierten Zink(II)(graue Sphäre), sowie der Asparaginsäure, dem Cystein und Lysin (cyan).

Aufgrund der Struktur der PH999 mit einem an die His/His/Asp-Triade gebundenen Zink(II) und einem Lysin-Aminosäurerest, sowie einer Asparaginsäure als Base sind beide Katalysemeechanismen in der aktiven Tasche möglich. Für die Untersuchung des Katalysemeechanismus der Aldol Reaktion wurden verschiedene Substitutionsmutanten der katalytisch aktiven Aminosäuren in der aktiven Tasche erstellt. Der Austausch des Lysins 94 gegen Alanin (K94A), soll einen Mechanismus über die Enamin-Zwischenstufe verhindern. Die Entfernung der Zink(II)bindestelle in Form der His/His/Asp Triade durch den Austausch der beiden Histidin Aminosäuren durch zwei Alanin Aminosäuren (H54A\_H71A = NC) macht eine Koordination des Zink(II)s unmöglich und schließt den Mechanismus über das Zink(II)-Enolat aus. Als Negativkontrollmutante (NC\_K94A) wurden sowohl die Zink(II)bindestelle als auch das Lysin entfernt, in Folge dessen sollte diese Mutante keine Aktivität mehr gegenüber der Aldol Reaktion aufweisen.

Ausgehend vom PH999 Wildtyp wurden die Mutationen durch ortsgerichtete Mutagenese (Kapitel 3.3.5) eingeführt und per Sequenzierung (Kapitel 3.3.2) verifiziert. Die Mutanten wurden nach der Transformation (Kapitel 3.3.4) in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 Rosetta (*DE3*) mit den bereits für den Wildtyp beschriebenen Bedingungen überexprimiert und durch Hitzefällung und Anionenaustauschchromatographie gereinigt und lagen laut SDS-Gel mit einer Reinheit >90 % vor (Kapitel 3.4.1.1 und Kapitel 3.4.3.1). Die Aktivitäten der Mutanten gegenüber dem natürlichen Substrat Pyrazinamid wurden mit dem Aktivitätsassay bestimmt (Kapitel 3.4.7). Wie erwartet haben die beiden Substitutionsmutanten und die Negativkontrollmutante nur noch eine geringe Restaktivität von 0,06 - 0,08  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  Enzym, was einer im Vergleich zum Wildtyp um das 10-fach erniedrigten spezifischen Aktivität entspricht.

Die Aldol Reaktion (Kapitel 3.6.1.2) wurde mit dem gereinigten PH999 Wildtyp bzw. den Mutanten in 0,5 mL Ansätze durchgeführt. Zusätzlich wurden Negativkontrollen in Puffer ohne Zugabe von Enzym, mit Zugabe von Zink(II) und mit Zugabe von Lysin durchgeführt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob bereits Zink(II) oder Lysin ohne Zugabe von Enzym diese Reaktion katalysieren können. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels GC-MS Messungen (Kapitel 3.5.1). Um die Produkte der verschiedenen Proben bezüglich ihrer Umsätze und Aktivitäten zu vergleichen, erfolgte die Auswertung anhand der Flächenprozentage des Gesamtchromatogramms. Das Ergebnis der Negativkontrolle, die Reaktion der beiden Substrate in Puffer, zeigte eine Aktivität von  $5,35 \pm 0,94$  %

Gesamtprodukt (bestehend aus Additionsprodukt **16** und Kondensationsprodukt **17**). Durch Zugabe von  $100\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  konnte die Aktivität in geringem Maße auf  $7,75 \pm 1,17$  % gesteigert werden. Ein ähnliches Maß an Steigerung ist auch durch Zugabe von  $100\mu\text{M}$  Lysin auf  $8,46 \pm 1,34$  % möglich. Bei der Umsetzung mit PH999 Wildtyp konnte eine signifikante Steigerung der Aktivität auf  $19,00 \pm 0,62$  % Gesamtprodukt detektiert werden. Die Umsetzungen mit den Substitutionsmutanten K94A und NC und der Negativkontrollmutante NC\_K94A, zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus der PH999, zeigten alle Umsetzungen mit einem Gesamtprodukt vergleichbar zum Wildtyp. Für die K94A-Mutante wurde ein Umsatz von  $19,04 \pm 0,49$  %, für die NC-Mutante von  $17,50 \pm 0,45$  % und für die NC\_K94A-Mutante von  $18,09 \pm 1,03$  % beobachtet (**Abbildung 26**).

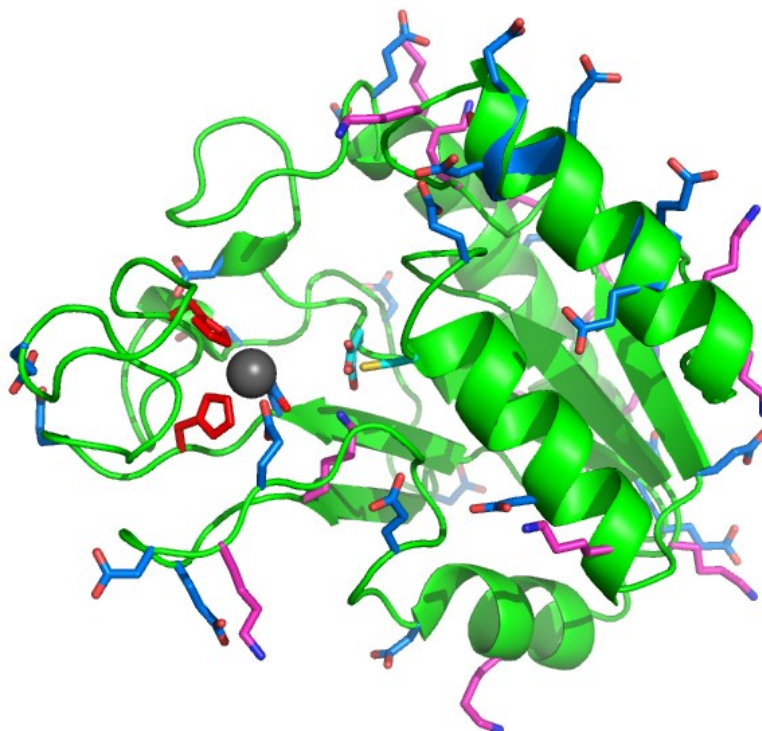


**Abbildung 26:** Umsätze der Aldol Reaktion nach 24 h mit gereinigter PH999 Wildtyp und Mutanten. Es wurden verschiedene Kontrollreaktionen und die Biotransformationen mit dem Wildtyp und den Mutanten durchgeführt. Gezeigt ist jeweils das Gesamtprodukt und die entsprechenden Anteile an Additions- **16** und Kondensationsprodukt **17**. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die hohe Umsetzung der NC\_K94A Mutante in der Größenordnung des Wildtyps ist ein erster Hinweis darauf, dass die Katalyse nicht wie erwartet im aktiven Zentrum stattfindet. Gestärkt wird dieser Hinweis durch das, in den Fehlergrenzen liegende, gleiche Ergebnis der Substitutionsmutanten NC und K94A. Bei der Katalyse über einen der beiden Mechanismen hätte man erwartet, dass bei einer Substitutionsmutante eine gesunkene Aktivität detektiert worden wäre. Somit kann vielmehr die Hypothese aufgestellt werden, dass die Katalyse an der Enzymoberfläche stattfindet. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, welcher Teil der Enzymoberfläche für die Katalyse verantwortlich ist.



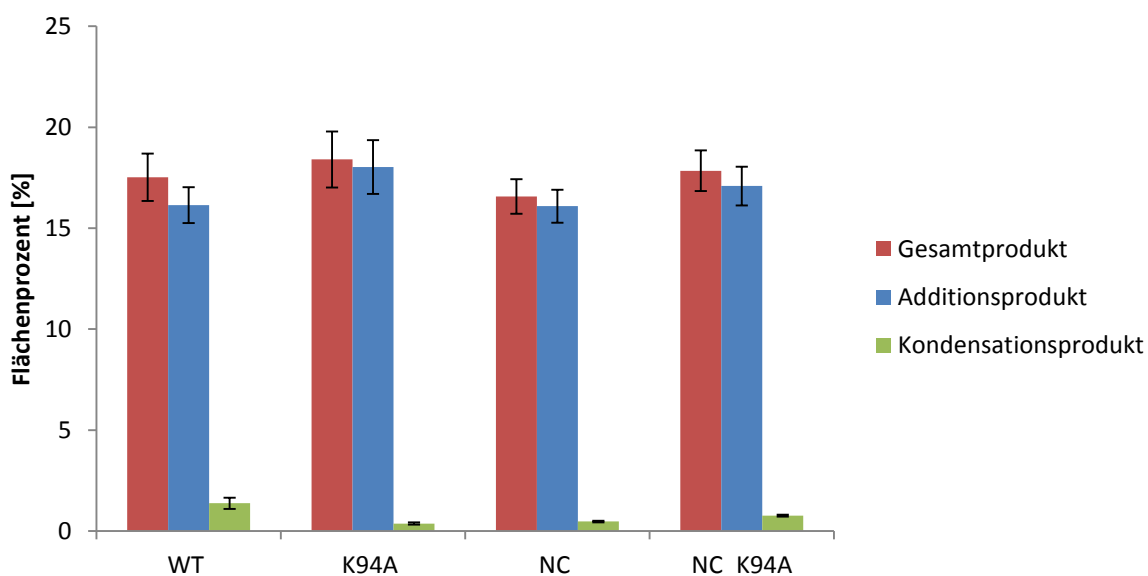
Die Analyse der Kristallstruktur ergibt, dass sich auf der Enzymoberfläche 14 Lysine befinden, welche alle in direkter Nachbarschaft zu einer von 28 Glutamin- oder Asparaginsäure sind (**Abbildung 27**).



**Abbildung 27:** Struktur der PH999 mit Zink(II) (graue Sphäre), den Aminosäuren der Metallbindestelle (rot), den katalytisch aktiven Aminosäureresten (cyan), den Oberflächenlysine-Aminosäureresten (pink) und den Glutamin- und Asparaginsäure Aminosäureresten (blau).

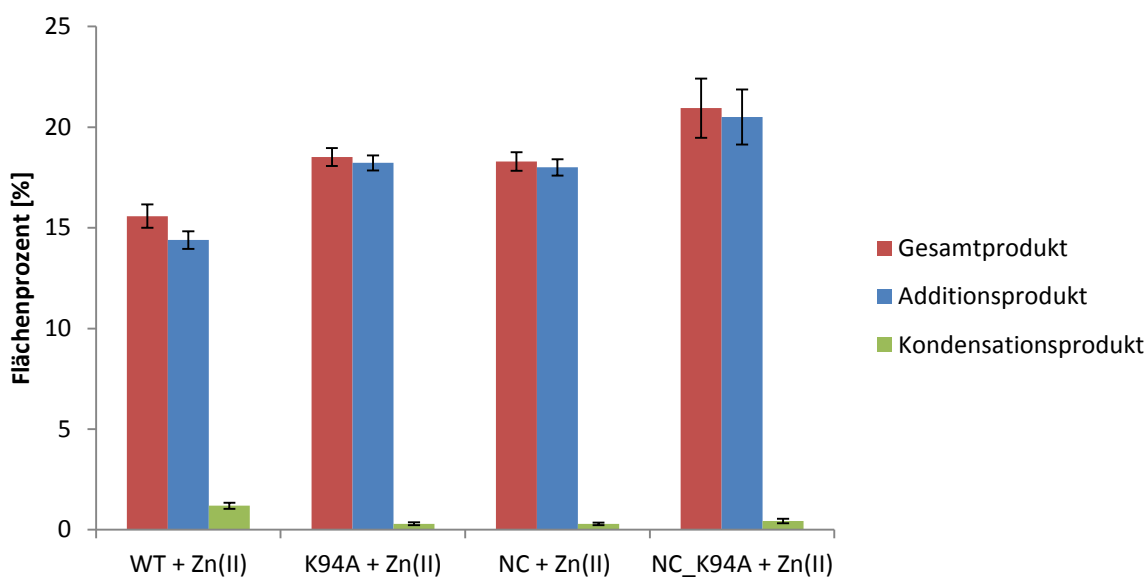
Daraus ergeben sich 14 weitere Möglichkeiten zur Katalyse der Aldol Reaktion über die Enamin-Zwischenstufe. Die Asparagin- und Glutaminsäure Aminosäuren können aber auch als Liganden für das Zink(II) dienen, welches nicht vollständig aus der Enzymlösung entfernt wurde. Das koordinierte Zink(II) könnte somit für die Katalyse der Aldol Reaktion über ein Zink(II)-Enolat verantwortlich sein. Damit gibt es an der Enzymoberfläche der PH999 zwei Möglichkeiten für eine Katalyse. Experimentell sollte geklärt werden, welcher der beiden Katalysemechanismen, über die Enamin- oder Enolat-Zwischenstufe, für die Aktivität der PH999 verantwortlich ist. Zur Überprüfung des Mechanismus über das Enamin wurde die Enzymlösung über drei Tage gegen EDTA dialysiert. Somit wurden alle in der Enzymlösung befindlichen und an das Enzym koordinierten zweifach geladenen Ionen, unter diesen Zink(II), entfernt. In der resultierenden Enzymlösung stehen nur noch die Lysin-Aminosäurereste für eine Katalyse zur Verfügung. Die Ergebnisse zeigen, dass nach der Dialyse eine fast unveränderte Aktivität vorhanden ist. Beim Wildtyp sinkt sie leicht von

$19,00 \pm 0,62$  % auf  $17,52 \pm 1,18$  %, bei den Substitutionsmutanten für K94A von  $19,04 \pm 0,49$  % auf  $18,40 \pm 1,39$  %, für die NC von  $17,50 \pm 0,45$  % auf  $16,56 \pm 0,86$  % und für die Negativkontrollmutante NC\_K94A von  $18,09 \pm 1,03$  % auf  $17,84 \pm 1,01$  % (**Abbildung 28**).



**Abbildung 28:** Umsätze der Aldol Reaktion nach 24 h mit gereinigtem PH999 Wildtyp und Mutanten dialysiert gegen EDTA. Gezeigt ist jeweils das Gesamtprodukt und die entsprechenden Anteile an Additions- **16** und Kondensationsprodukt **17**. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Für die Überprüfung, ob die Katalyse über den Zink(II)-Enolat Mechanismus verläuft, wurde zu der gegen EDTA dialysierten Enzymlösung zusätzlich  $100 \mu\text{M ZnSO}_4$  zugegeben. Damit ist ausreichend Zink(II) in der Enzymlösung vorhanden, welches an die möglichen Zink(II)bindstellen koordinieren und die Reaktion katalysieren könnte. Die Ergebnisse zeigen, dass nach der Zugabe von Zink(II) zur Enzymlösung innerhalb der Fehlergrenzen identische Umsätze wie vor der Zink(II)zugabe von  $15,58 \pm 0,58$  % für den Wildtyp,  $18,52 \pm 0,45$  % für die K94A-Mutante,  $18,29 \pm 0,46$  % für die NC-Mutante und  $20,94 \pm 1,48$  % für die NC\_K94A-Mutante erreicht werden (**Abbildung 29**).



**Abbildung 29:** Umsätze der Aldol Reaktion nach 24 h mit gereinigtem PH999 Wildtyp und Mutanten mit Zugabe von 100  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ . Gezeigt ist jeweils das Gesamtprodukt und die entsprechende Anteile an Additions- **16** und Kondensationsprodukt **17**. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei der PH999 nicht zu einer Katalyse in der aktiven Tasche koordinierten Zink(II) kommt und damit keine katalytische Promiskuität nachgewiesen werden kann. Vielmehr ist stattdessen die Enzymoberfläche für die Katalyse der Aldol Reaktion und die zweifache Steigerung des Umsatzes von jeweils  $\sim 8\%$  in den Negativkontrollen mit Zink(II) und Lysin auf  $\sim 19\%$  in der Reaktion mit Enzym verantwortlich. Die weiteren Untersuchungen zur Klärung, welcher Katalysemechanismus an der Enzymoberfläche die Aldol Reaktion katalysiert, zeigt dass die Lysine und damit der Katalysemechanismus über die Enamin-Zwischenstufe die Aktivitätssteigerung hervorruft.

#### 4.1.3 Erstellung, Expression und Reinigung der artifiziellen tHisF-Varianten HHD und NC

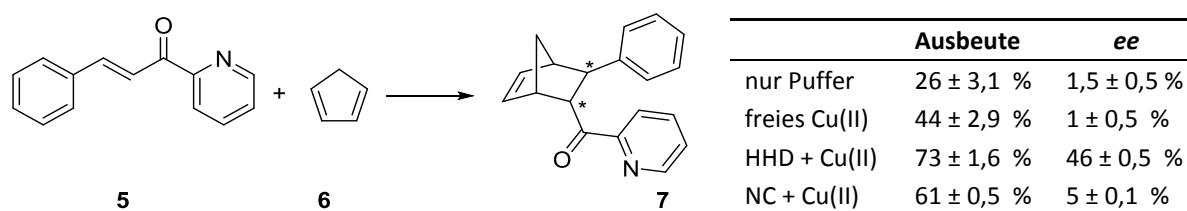
Ausgehend vom tHisF Wildtyp wurden die beiden Mutanten HHD und NC durch ortsgerichtete Mutagenese (Kapitel 3.3.5) im Rahmen meiner Diplomarbeit hergestellt.<sup>145</sup> Das tHisF-Gen, kloniert auf den *E. coli* kompatiblen pET28a(+) – Vektor, wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sterner aus Regensburg erhalten.<sup>74</sup> Die entsprechenden Mutationen wurden analog zu denen von Reetz *et al.*<sup>42</sup> beschrieben eingeführt.

In beide Mutanten wurden Aminosäuren, welche später in Konkurrenz zur Metallbindestelle das Metall koordinieren könnten, entfernt. Dabei handelt es sich um vier Histidin

Aminosäurereste mit den Positionen 84, 209, 228 und 244 an der Enzymoberfläche, welche durch Alanin ersetzt wurden und um ein Cystein an der Position 9 im inneren des TIM-Barrels, welches ebenfalls durch Alanin ersetzt wurde. Die NC Variante, ohne Metallbindestelle als Kontrollmutante, enthält dementsprechend nur diese bereits genannten fünf Mutationen: C9A, H84A, H209A, H228A und H244A. In die Metallbindende HHD-Variante wurde zwei Mutationen zur Einführung der Metallbindestelle in Form einer His/His/Asp-Triade vorgenommen. Die Leucin Aminosäure an Position 50 und die Isoleucin Aminosäure an Position 52 wurden durch zwei Histidin Aminosäuren ersetzt. Zusammen mit der bereits im Enzym vorhandenen Asparaginsäure an Position 11 ergibt sich die Asp11/His50/His52-Triade. Die HHD Variante enthält insgesamt sieben Mutationen: C9A, L50H, I52H, H84A, H209A, H228A und H244. Die Verifizierung der Mutationen erfolgte jeweils durch Sequenzierung (Kapitel 3.3.2). Die Überexpression erfolgte nach Reetz *et al.*<sup>42</sup> in *E. coli* BL21(DE3) durch Induktion mit 1 mM IPTG und anschließender Inkubation bei 30°C für 4,5 h (Kapitel 3.4.1.1). Für die Reinigung wurden die *E. coli* Proteine durch Hitzefällung denaturiert und abgetrennt. Die Enzymlösung wurde anschließend mittels PD-10 Säulen entsalzt, um in der Lösung vorhandene Metallionen, welche in den Biotransformationen zu Nebenreaktionen führen könnten, zu entfernen (Kapitel 3.4.3.1).

#### 4.1.4 Untersuchung zur katalytischen Promiskuität der tHisF

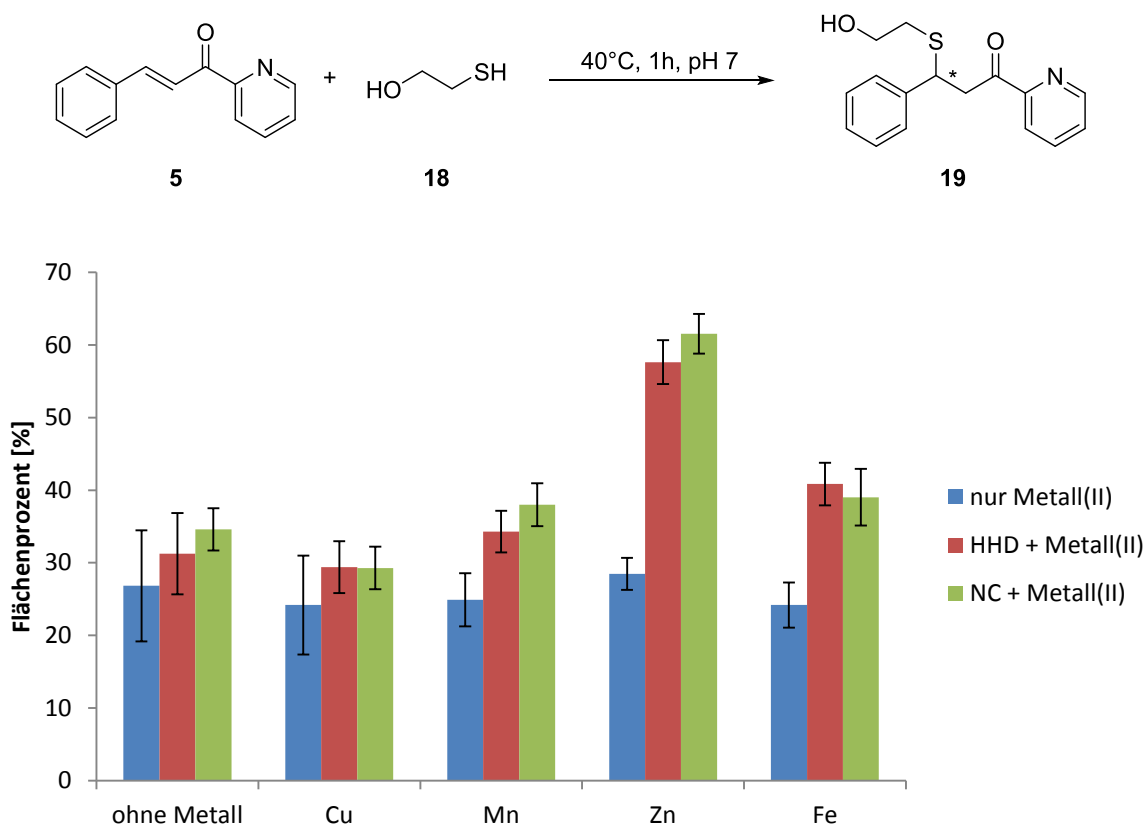
Ausgangspunkt für die Untersuchung der katalytischen Promiskuität der tHisF mit einer artifiziellen Metallbindestelle waren die Arbeiten von Reetz *et al.*<sup>42</sup> zur Diels-Alder Reaktion von Azachalcon **5** mit Cyclopentadien **6** zum zyklischen Addukt **7**. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz der Kupfer koordinierenden tHisF Mutante HHD die Reaktivität und Selektivität im Vergleich zu den Kontrollreaktionen in Pufferlösung, mit freiem Kupfer(II) und mit der NC-Mutante gesteigert werden konnte (**Abbildung 30**).



**Abbildung 30:** Diel-Alder Reaktion des Azachalcon **5** mit Cyclopentadien **6** zum zyklischen Addukt **7** von Reetz *et al.* mit den entsprechenden Ausbeuten und Enantioselektivitäten der Mutanten nach 96 h. Das *endo/exo* Verhältnis des Produkts steigt von 8:1 in Puffer, 7:1 mit freiem Cu(II) und 9:1 mit NC + Cu(II) auf 13:1 mit der HHD-Mutante + Cu(II).<sup>42</sup>

Die Ergebnisse unterstützen die These, dass das Kupfer(II) an die artifizielle Metallbindestelle koordiniert und als Lewis-Säure die Aktivität erhöht. Das Proteingerüst übernimmt somit die Aufgabe des chiralen Liganden und beeinflusst die Selektivität.

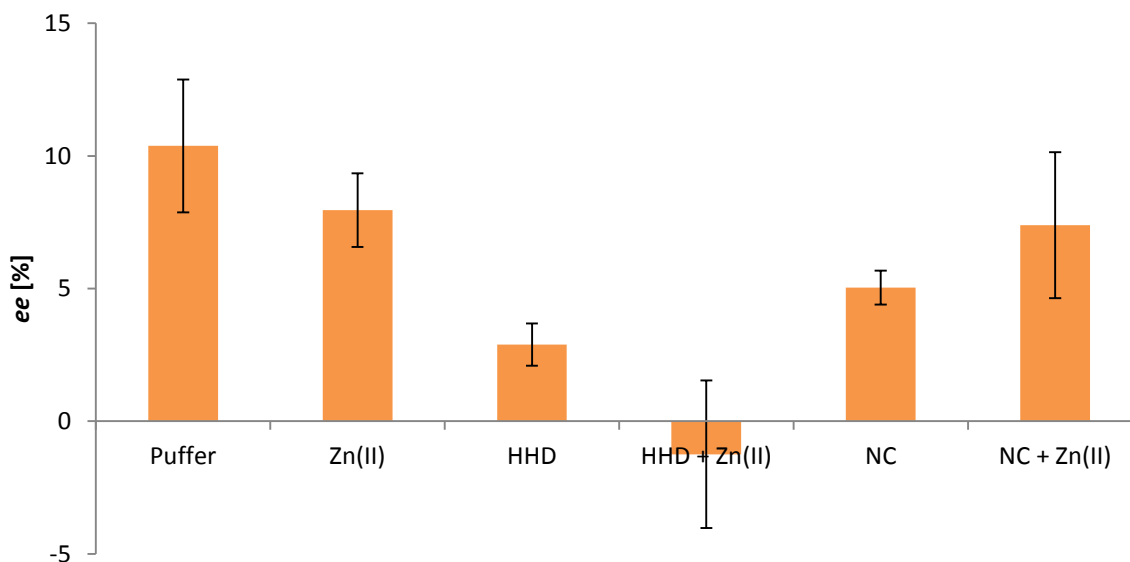
Am ITB wurden von Dennis Wetzl in seiner Dissertation<sup>146</sup> erste Studien zur Ausnutzung der katalytischen Promiskuität der tHisF in der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit verschiedenen Stickstoff- und Schwefelnukleophilen durchgeführt. Mit Mercaptoethanol **18** konnte er eine initiale Produktbildung (Hintergrundreaktion) detektieren. Aufbauend auf diesen Ergebnissen habe ich im Rahmen meiner Diplomarbeit<sup>145</sup> verschiedene Reaktionsparameter getestet, um Reaktionsbedingungen zu finden, welche eine moderate Hintergrundaktivität haben und durch den Einsatz der tHisF gesteigert werden könnten. Im *Screening* wurden unter anderem die Reaktionstemperatur (40, 60, 70 und 80°C), die Kupferkonzentration (0,1 und 1 mM), der pH-Wert (pH 6, 7 und 8) und die Reaktionszeit (1, 4 und 20 h) variiert mit dem Ergebnis, dass die Bedingungen für eine moderate Aktivität mit freiem Kupfer von  $24,18 \pm 6,79$  % bei 40°C, 1 h, pH 7,0 und 0,1 mM Metall am besten gegeben sind. Die Ergebnisse mit den tHisF-Mutanten und Kupferzugabe zeigen, dass es nicht wie erwartet zu einer Steigerung der Aktivität kommt. Es wird vielmehr beobachtet, dass sobald Kupfer zugegeben wird ein inhibierender Effekt eintritt und die Aktivität leicht sinkt. Um den Einfluss des Metalls auf die Aktivität zu untersuchen wurden neben Kupfer weitere zweiwertige Metalle wie Mangan, Zink(II) und Eisen getestet. Die Kontrollreaktionen mit freiem Metall zeigen alle Umsätze zwischen 24 – 28 %. Eine Steigerung der Aktivität auf  $57,62 \pm 3,02$  % konnte mit der HHD-Mutante und Zink(II) detektiert werden. Die Kontrollreaktion mit der NC-Mutante und Zink(II) zeigte jedoch eine nochmal leicht höhere Aktivität von  $61,53 \pm 2,72$  %. Dies entsprach nicht den Erwartungen, nach welchen die NC-Mutante ohne artifizielle Metallbindestelle eine geringere Aktivität aufweisen sollte (**Abbildung 31**).



**Abbildung 31:** Umsätze von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** in der Michael Reaktion zum Produkt **19** der tHisF Varianten mit verschiedenen Metallen (Angabe in Flächenprozent) aus meiner Diplomarbeit.<sup>145</sup> Dabei entspricht „ohne Metall“ jeweils der Proben ohne Zugabe eines Metalls und ohne Zugabe von Enzym (blau), mit Zugabe der HHD (rot) und mit Zugabe von NC (grün). Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

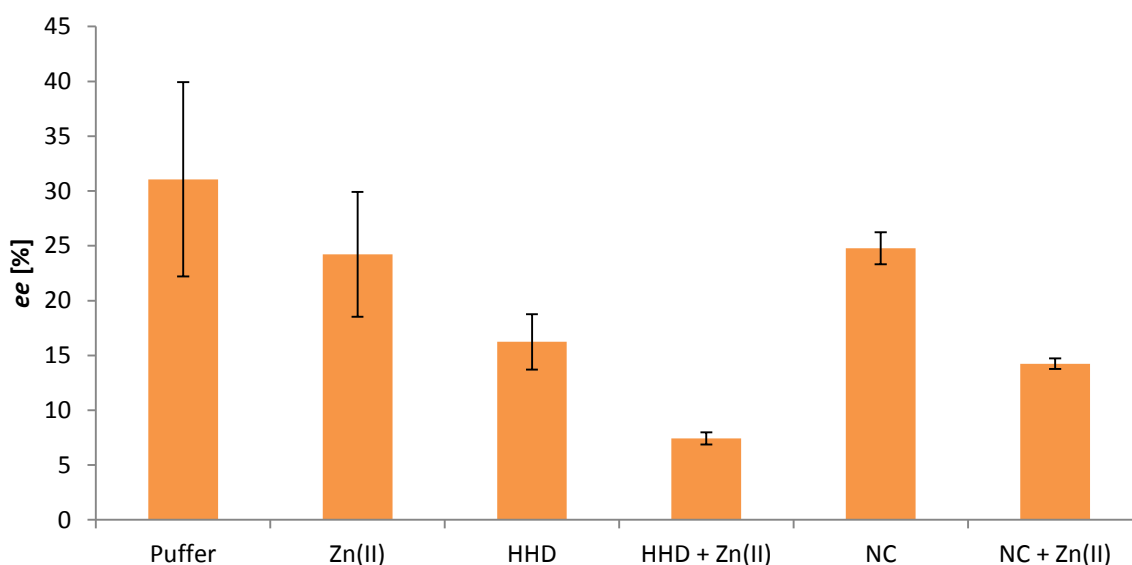
Im Rahmen dieser Arbeit, sollte die Michael Reaktion katalysiert durch tHisF und Zink(II) weiter untersucht werden. Hierfür wurde nach der Synthese des Azachalcons **5** (Kapitel 3.7.1) im ersten Schritt die in meiner Diplomarbeit<sup>145</sup> ermittelten Ausbeuten bestätigt und die Enantioselektivität bestimmt. Die Biotransformationen wurden mit den bereits optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt (Kapitel 3.6.1.1) und die Ausbeute mittels LC-MS (Kapitel 3.5.2) bestimmt. Um die Produkte der unterschiedlichen Proben bezüglich ihrer Umsätze zu vergleichen, erfolgte die Auswertung anhand der Flächenprozent des Gesamtchromatogramms. Die Ergebnisse der Ausbeute waren dabei innerhalb der Fehlergrenzen mit den Ergebnissen aus meiner Diplomarbeit identisch. Die Enantioselektivität der Reaktionen wurden mittels Analyse an der chiraler HPLC (Kapitel 3.5.2) bestimmt. Dafür wurde zur Herstellung des Produkts als Referenz für die Entwicklung der chiralen HPLC Methode, die Michael Reaktion angelehnt an die Biotransformation mit Kupfersulfat durchgeführt (Kapitel 3.7.2). Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Reaktionen nur sehr geringe Selektivitäten von  $\leq 10\%$  beobachtet werden. Auffällig ist, dass die größte

Selektivität mit  $10,38 \pm 2,50$  % in Pufferlösung, als Negativkontrolle, detektiert wurde (**Abbildung 32**).



**Abbildung 32:** Enantiomerenüberschüsse der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** unter Einsatz von freiem Zink(II), den tHisF-Mutanten HHD und NC, sowie den Zink(II) gebundenen tHisF-Mutanten HHD und NC als Katalysatoren. Als Negativkontrolle wurde die Reaktion in Pufferlösung durchgeführt. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Durch die Senkung der Reaktionstemperatur wurde weiter untersucht ob eine Erhöhung der Enantioselektivität erreicht werden kann. Hierfür wurden die Reaktionen analog zur Diels-Alder Reaktion von Reetz *et al.*<sup>42</sup> bei 12°C anstatt 40°C durchgeführt. Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Selektivitäten gegenüber einer Reaktionstemperatur von 40°C gesteigert werden können. Dies ist jedoch ohne Ausnahme für alle Reaktionen der Fall, sodass bei den Negativkontrolle in Puffer eine Dreifache Steigerung auf  $31,06 \pm 8,86$  % und mit freiem Zink(II) auf  $24,22 \pm 5,70$  % detektiert wurde. Bei allen Reaktionen mit Enzym sind die Selektivitäten geringer. Für die Reaktion mit an die HHD Mutante koordiniertem Zink(II) hätte man durch die selektive Koordination des Zink(II)s an die Triade und dem Proteingerüst mit der Funktion des chiralen Liganden die höchste Selektivität erwartet. Es konnte jedoch nur die geringste Selektivität mit  $7,43 \pm 0,55$  % detektiert werden (**Abbildung 33**).

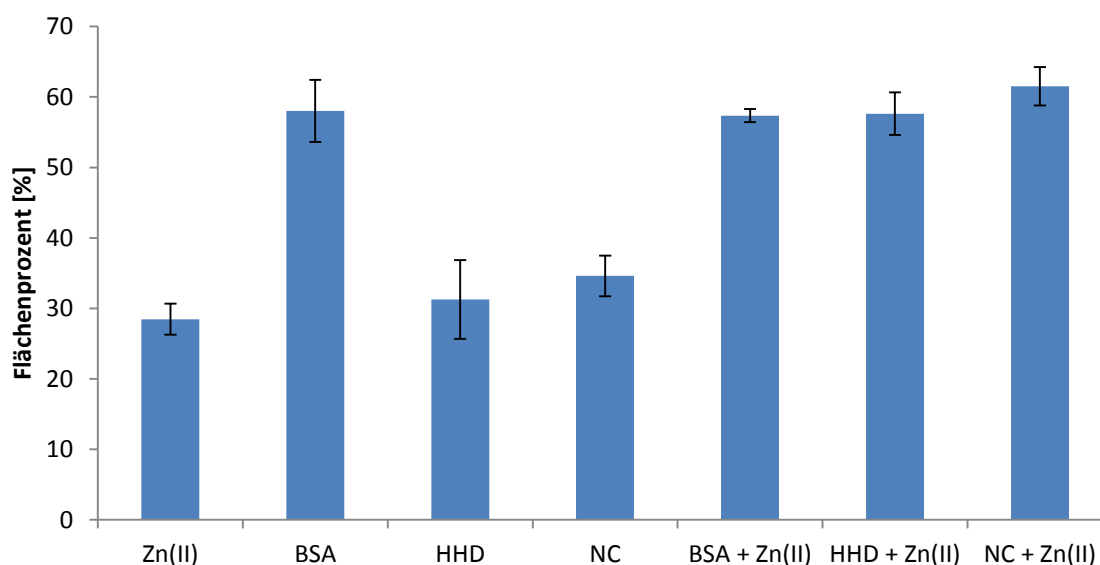


**Abbildung 33:** Enantiomerenüberschüsse der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** bei einer Reaktionstemperatur von 12°C und einer Reaktionszeit von 1 h mit den Negativkontrollen und den Reaktionen mit Enzym. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Ergebnisse der Micheal Reaktion sowohl bei 40°C als auch bei 12°C decken sich nicht mit der Annahme, dass für die selektive Umsetzung eines nicht chiralen Substrats ein chiraler Katalysator im Reaktionsgemisch vorhanden sein muss. Die hohe Selektivität der Negativkontrolle in Pufferlösung ist ein erster Hinweis, dass es sich beim Azachalcon **5** nicht wie angenommen um eine planare, nicht chirale Substanz handelt, sondern vielmehr um ein prochirales Substrat. Die geringen Selektivitäten mit der Zink(II) koordinierten HHD Variante wiederum geben Hinweise, dass die Koordination an das Enzym nicht selektiv verläuft. In wie weit die beiden Effekte einzeln oder in Kombination eine Rolle spielen wurde durch Untersuchungen zur Zink(II)bindung und zur Prochiralität des Azachalcons **5** im nächsten Kapitel untersucht (Kapitel 4.1.5).

Zuvor wurde in einem letzten Schritt in den Untersuchungen der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** mit BSA durchgeführt, um zu sehen in wie weit eine alternative Proteinstruktur ohne definierte Metallbindestelle im Austausch für die tHisF für die Katalyse verwendet werden kann. BSA koordiniert bereits an seiner Proteinoberfläche Zink(II) und es stehen weitere Aminosäuren zur Verfügung, welche zusätzliches Zink(II) koordinieren können.<sup>147</sup> Die Ergebnisse zeigen, dass mit BSA ohne Zugabe von Zink(II) bereits eine Aktivität von  $58,02 \pm 5,70$  % beobachtet werden konnte, welche auch durch eine zusätzliche Zugabe von Zink(II) nicht erhöht werden konnte (**Abbildung 34**). Beide Reaktionen mit BSA sind zudem racemisch.





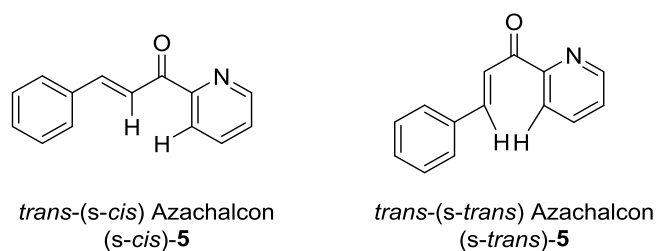
**Abbildung 34:** Umsetzungen der Michael Reaktion mit BSA und BSA mit zusätzlicher Zink(II)zugabe im Vergleich zu den Reaktionen mit der tHisF und der Negativkontrolle mit freiem Zink(II) nach 1 h bei 40°C. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Somit kann allein durch Zugabe von BSA die gleiche Aktivität erreicht werden, wie durch den Einsatz der tHisF und allein die Möglichkeit einer Zink(II)koordination an der Oberfläche genügt, um eine Erhöhung der Aktivität zu erreichen. Eine selektive Reaktion war mit beiden Proteingerüsten nicht möglich.

#### 4.1.5 Studien zu Substrateigenschaften des Azachalcons (5) und zur Metallbindung der tHisF

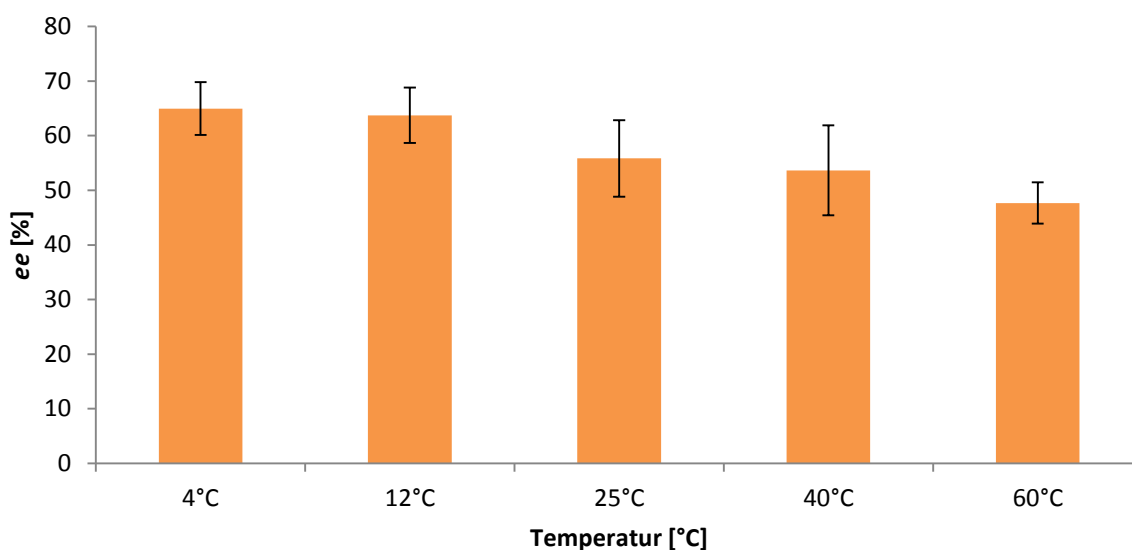
##### 4.1.5.1 Untersuchungen zur Prochiralität des Azachalcons (5)

Die Ergebnisse zur Selektivität der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** lieferten erste Hinweise, dass es sich beim Substrat Azachalcon **5** um ein prochirales Substrat handelt. Die Negativkontrollen in Pufferlösung oder mit freiem Zink(II) lieferten hohe Selektivitäten von  $\geq 28$  %. Bei der Betrachtung der Azachalconstruktur **5** zeigt sich, dass von den beiden möglichen Konformeren *cis* und *trans* immer das *trans* Konformer vorliegt, da es im *cis* Konformer zu sterischen Hinderung zwischen dem Benzolring und der Carbonylgruppe kommt. Weiter liegen vom *trans* Konformer wiederum zwei Konformere, das *trans*-(*s-cis*) und das *trans*-(*s-trans*) vor (**Abbildung 35**).



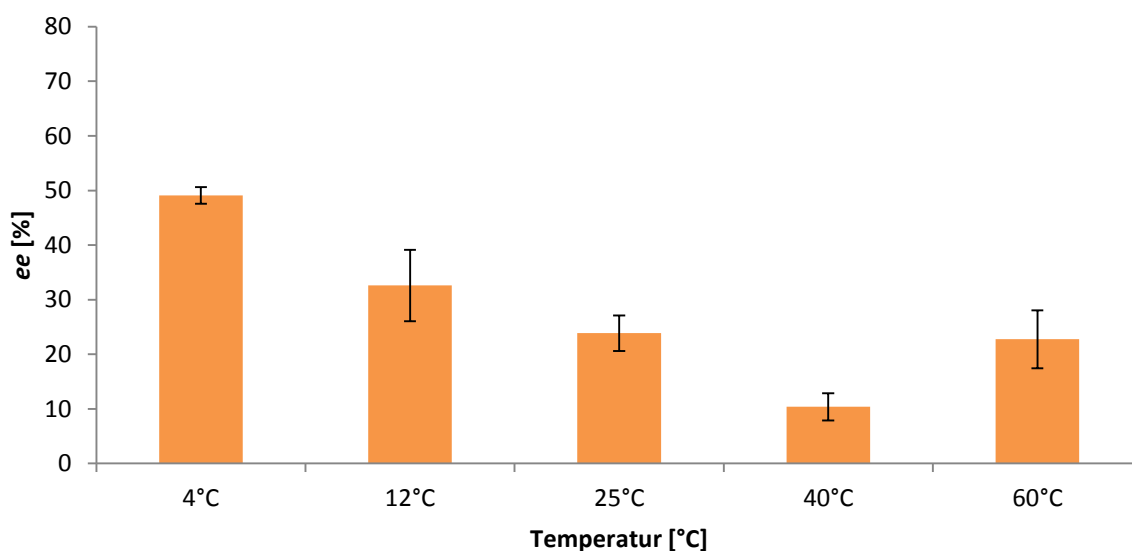
**Abbildung 35:** Die beiden Konformer *trans*-(*s-cis*) und *trans*-(*s-trans*) des *trans*-Azachalcons **5**.

Durchgeführte IR-Studien für das 2-Azachalcon **5** zeigten, dass im IR-Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  zwei Banden bei  $1669$  und  $1698 \text{ cm}^{-1}$  und damit beide Konformere vorhanden sind. Damit existiert neben dem planaren *trans*-(*s-cis*) Azachalcon **5** ein prochirales *trans*-(*s-trans*) Konformer, welches durch die sterische Hinderung der Wasserstoffatome entsteht. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist das Gleichgewicht aus beiden Konformeren für die hohen Selektivitäten der Negativkontrollen verantwortlich. Um diese Aussage durch experimentelle Ergebnisse weiter zu stützen wurden die Umsetzungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Durch Senken der Temperatur sollte der Übergang der Isomere ineinander durch mangelnde Energie erschwert werden und somit eine Erhöhung der Selektivität beobachtet werden. Im Gegenzug sollte bei Erhöhung der Temperatur und dem damit verbundenen Einbringen von Energie, der Übergang der Konformere erleichtert werden und die Selektivität sinken. Die Reaktionen wurden entsprechend den Biotransformationen (Kapitel 3.6.1.1) in reinem Wasser bei  $4^\circ$ ,  $12^\circ$ ,  $25^\circ$ ,  $40^\circ$  und  $60^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Ergebnisse für Wasser zeigen wie erwartet, dass mit steigender Temperatur die Selektivität von  $64,96 \pm 4,85 \%$  bei  $4^\circ\text{C}$  auf  $47,67 \pm 3,79 \%$  bei  $60^\circ\text{C}$  abnimmt (**Abbildung 36**).



**Abbildung 36:** Enantiomerenüberschüsse der Michael Reaktionen von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** in reinem Wasser als Reaktionsmedium mit einer Reaktionszeit von 1 h bei verschiedenen Temperaturen. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Zusätzlich wurden die Reaktionen in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 entsprechend der Negativkontrolle durchgeführt, um zu untersuchen welchen Einfluss das Puffersalz auf die Selektivität der Reaktion hat. Bei Zugabe von Puffer ist die Selektivität jeweils geringer als in Wasser, es kann jedoch vergleichbar beobachtet werden, dass die Selektivität auch in Puffer mit steigender Temperatur abnimmt (**Abbildung 37**).



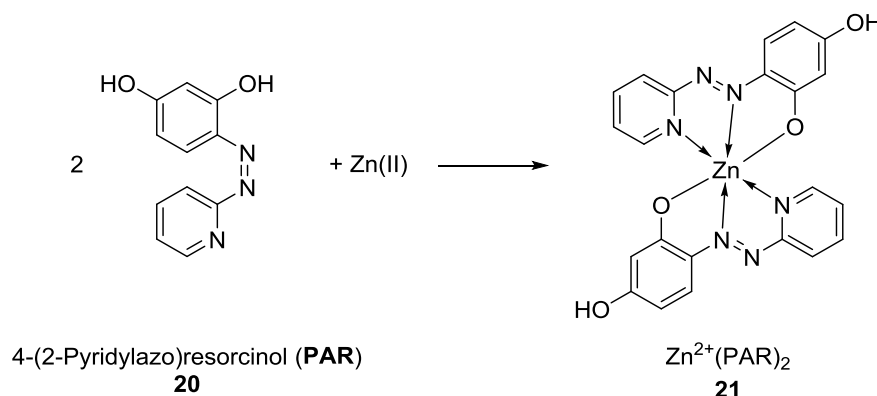
**Abbildung 37:** Enantiomerenüberschuss der Michael Reaktionen von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** in Bis-Tris Puffer pH 7,0 als Reaktionsmedium mit einer Reaktionszeit von 1 h bei verschiedenen Temperaturen. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Ein Grund hierfür könnte die Störung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes durch die Puffermoleküle und die damit verbundene Destabilisierung des *s-trans* Konformers sein. Es konnte gezeigt werden, dass beobachtete Selektivitäten der Biotransformationen auf die prochirale Substrateigenschaft des Azachalcons **5** zurück zu führen sind und nicht durch den Einsatz der tHisF als Katalysator.

#### 4.1.5.2 Untersuchung zur Zink(II)-Bindung an tHisF HHD- und NC-Mutanten

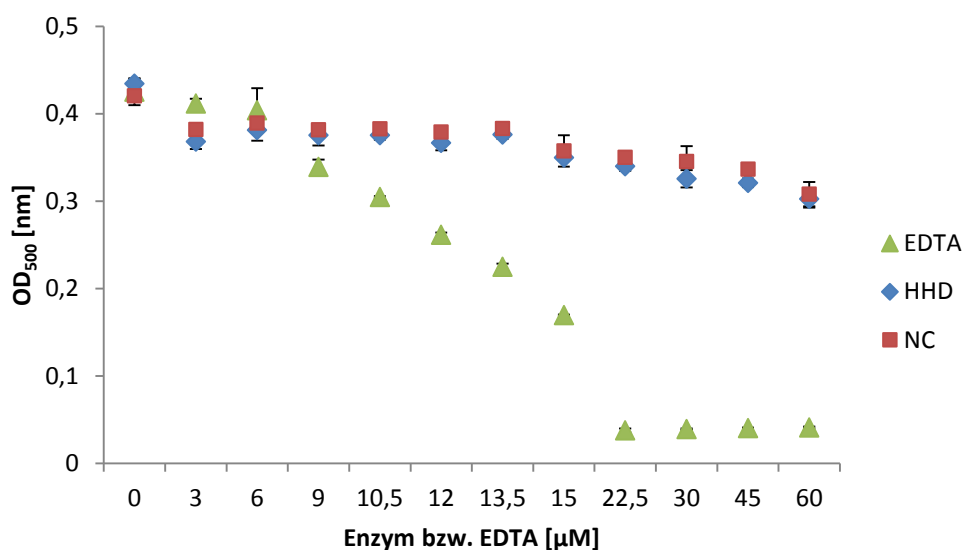
Die Untersuchungen zur neuen, promiskuitiven Micheal Reaktion mit der tHisF haben erste Hinweise gegeben, dass das Metall nicht spezifisch an die definierte artifizielle Metallbindestelle in der tHisF koordiniert, sondern dass es vielmehr zu einer Oberflächenkoordination am Proteingerüst kommt. Die Metall-Protein Affinität kann für das Zink(II) mit Hilfe verschiedener colometrischer Assays untersucht und daraus eine Aussage über die Bindung und die Bindungskonstante  $K_D$  gemacht werden. In diesem Fall soll untersucht werden in wie weit das Zink(II) spezifisch an die Triade der HHD-Mutante bindet und wie sich die Koordination im Vergleich zur NC-Mutante unterscheidet. Die Untersuchungen erfolgten mit dem kostengünstigen Zink(II) sensitiven Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)resorcinol **20** (PAR). PAR **20** bindet spezifisch Zink(II) mit einer Bindungsaffinität von  $K_D = 250$  nM. Über die Absorptionänderung bei Zugabe von Enzym in eine Lösung aus Zink(II) und PAR kann somit eine Aussage über die Zink(II)affinität der tHisF Mutanten gemacht werden. Die Absorption nimmt bei einer höheren Bindungsaffinität des Enzyms für Zink(II) d.h. einem kleineren  $K_D$ -Wert ab. Als Faustregel ist bekannt, dass eine  $K_D$ -Wert von  $\geq 10^{-6}$  M typisch für die Bindung von Metallionen an eine Proteinoberfläche ist, während für die selektive Bindung von Metallionen ein  $K_D$ -Wert von  $< 10^{-7}$  M auftritt.<sup>148</sup> Somit kann mit Hilfe von PAR **20** eine Aussage über eine selektive Bindung an die Triade oder eine Oberflächenkoordination des Zink(II)s an die tHisF gemacht werden. Für die experimentelle Durchführung (Kapitel 3.4.6) wurden beide tHisF Mutanten, HHD und NC, gereinigt und Metallionen in der Enzymlösung durch Dialyse gegen Puffer versetzt mit EDTA entfernt. Zur Entfernung der EDTA wurde gegen 10 mM Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 dialysiert und die Mutanten mit PAR **20** und Zink(II)sulfat versetzt. Dabei wurde die tHisF Konzentration von 0, 3, 6, 9, 10,5, 12, 13,5, 15, 22,5, 30, 45 und 60  $\mu$ M gewählt. Als Positivkontrolle wurden die Ansätze zusätzlich in den gleichen Konzentrationen mit EDTA, welches eine geringere Bindungskonstante wie PAR **20** besitzt, durchgeführt. Alle Ansätze wurden in Mikrotiterplatten als Triplikate durchgeführt und für 1 h bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurde die Absorption bei 500 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum des Zn(II)/PAR<sub>2</sub>-Komplexes **21** (Kapitel 3.4.6). Durch die Inkubation koordinieren zwei PAR-Moleküle **20** über zwei Stickstoff- und ein Sauerstoffatom an das Zink(II) und es entsteht der orange Zn(II)/PAR<sub>2</sub>-Komplex **21** (Abbildung 38).<sup>133,149</sup>



**Abbildung 38:** Reaktion von PAR **20** mit Zink(II)(II)-Ionen zum 1:2 Komplex Zn(II)/PAR<sub>2</sub> **21**, welcher photometrisch bei einer OD von 500 nm detektiert werden kann.

Die Positivkontrolle mit EDTA zeigt wie erwartet eine Abnahme der Absorption mit Erhöhung der EDTA Konzentration. Das heißt durch den niederen  $K_D$ -Wert Zn/EDTA von  $7,6 \cdot 10^{-14}$  M wird das Zink(II) vom Zn(II)/PAR<sub>2</sub>-Komplex **21** gelöst und koordiniert an EDTA. Für die tHisF wird erwartet, dass bei der HHD Mutante mit spezifischer Metallbindestelle mit Zunahme der Enzymkonzentration eine Abnahme der Absorption vergleichbar mit der Positivkontrolle eintritt. Im Gegenzug sollte bei der NC-Mutante keine Abnahme der Absorption eintreten, da hier nur eine Oberflächenkoordination mit einer größeren Bindungskonstante  $K_D$  im Vergleich zum Zn(II)/PAR<sub>2</sub>-Komplex **21** vorhanden sein sollte. Die Ergebnisse für beide tHisF-Mutanten HHD und NC zeigten jedoch, dass es nur zu einer sehr geringen Abnahme der Absorption mit zunehmender Enzymkonzentration kommt. Zudem zeigen beide Mutanten das gleiche Verhalten (Abbildung 39).



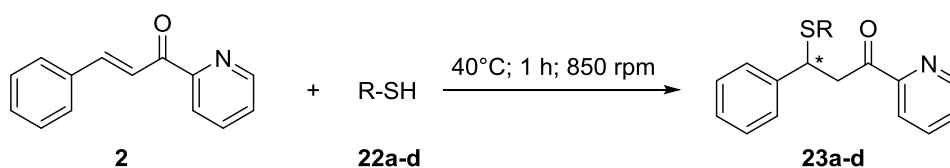
**Abbildung 39:** PAR-Assay mit 45 µM PAR **20**, 12 µM Zink(II)sulfat, 10 mM Bis-Tris pH 7,0 und variablen Konzentrationen EDTA bzw. tHisF\_HHD und tHisF\_NC. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Bei beiden Mutanten wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet was zu dem Schluss führt, dass es in keiner der beiden Mutanten zu einer spezifischen Bindung des Zink(II)s an das Enzym kommt. Die Triade der HHD-Mutante ist offensichtlich nicht in der Lage das Zink(II) spezifisch zu koordinieren und es kommt vielmehr zu einer Koordination des Zink(II)s an die Proteinoberfläche der Mutanten.

#### 4.1.6 Erweiterung des Spektrums von Schwefelnukleophilen in der Michael Additionen

Nach dem die Ergebnisse der Modellreaktion mit Mercaptoethanol **18** eine Steigerung der Aktivität der Michael Reaktion zeigten, sollte das Nukleophilspektrum auf weitere aliphatische und aromatische Thiole ausgeweitet werden. Die Biotransformationen mit allen Thiolen wurden mit den bereits optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt (Kapitel 3.6.1.1) und die Ausbeute mittels LC-MS (Kapitel 3.5.2) bestimmt. Um die Produkte der verschiedenen Proben bezüglich ihrer Umsätze zu vergleichen, erfolgte die Auswertung anhand der Flächenprozentage des Gesamtchromatogramms. Die Enantioselektivität der Reaktionen wurden mittels Analyse an der chiraler HPLC (Kapitel 3.5.2) bestimmt.

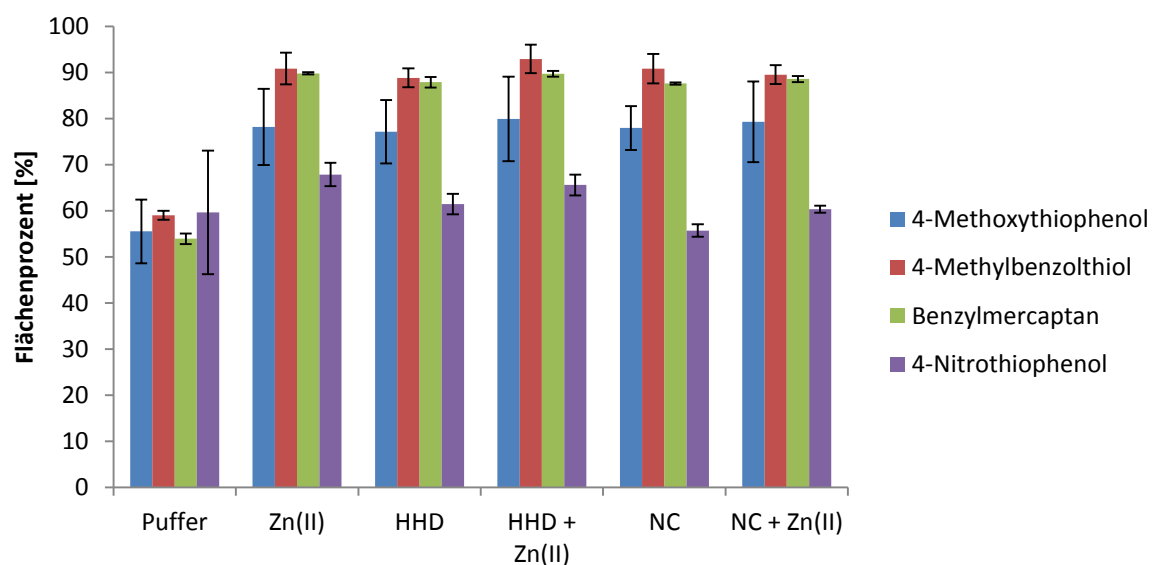
Ausgewählt wurden vier aromatische Thionukleophile 4-Methoxythiol **22a**, 4-Methylthiophenol **22b**, Benzylmercaptan **22c** und 4-Nitrothiophenol **22d** (Tabelle 10).



**Tabelle 10:** Aromatische Thionukleophile, welche zur Erweiterung des Nukleophilspektrums der Michael Reaktion getestet wurden mit den entsprechenden Reaktionsprodukten.

Nukleophil	Produkt
<p><b>22a</b> 4-Methoxythiophenol</p>	<p><b>23a</b></p>
<p><b>22b</b> 4-Methylbenzenethiol</p>	<p><b>23b</b></p>
<p><b>22c</b> Benzylmercaptan</p>	<p><b>23c</b></p>
<p><b>22d</b> 4-Nitrothiophenol</p>	<p><b>23d</b></p>

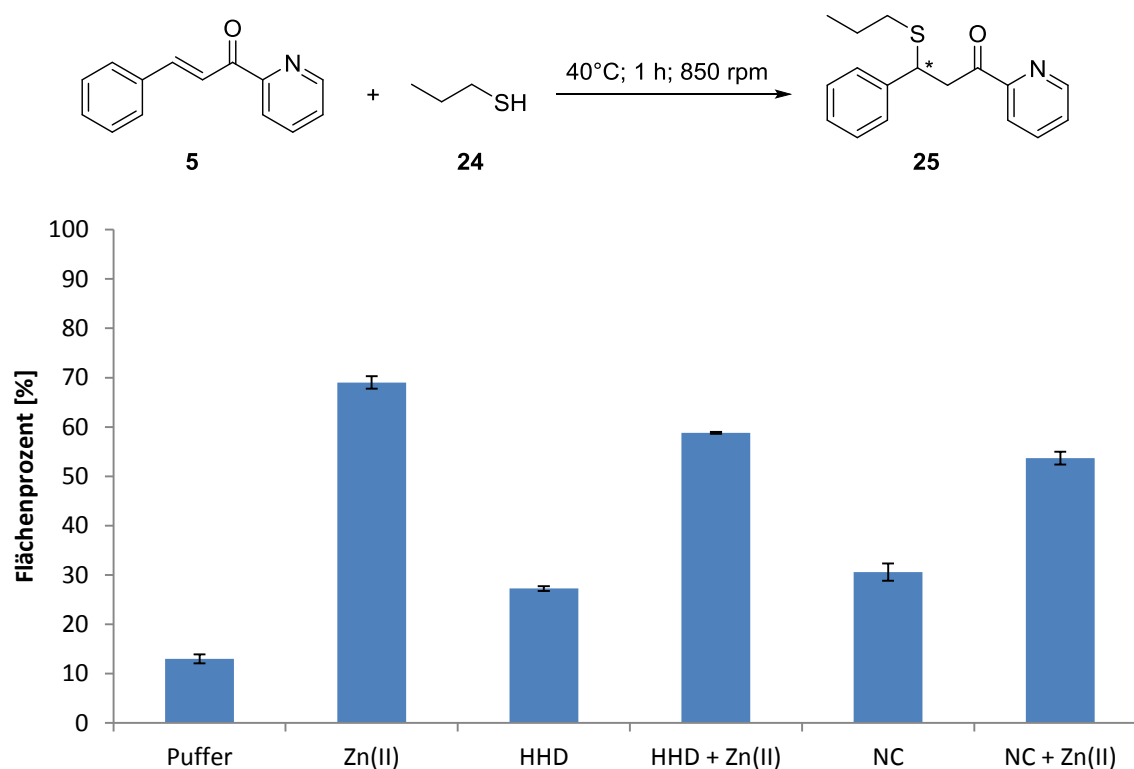
Alle aromatischen Thionukleophile zeigten hohe Hintergrundreaktionen von 53 – 60 %. Der Einsatz von freiem Zink(II) als Katalysator konnte die Aktivität zu einem fast vollständigen Umsatz von bis zu 90 % steigern. Die Folge war, dass für den Einsatz von Enzym sowohl der tHisF-HHD als auch NC Mutante kein Potenzial mehr zur Steigerung vorhanden war. Die chirale Analyse ergab für alle Thionukleophile zudem, dass racemisch Produkte entstehen und keine Selektivität beobachtet werden konnte (**Abbildung 40**).



**Abbildung 40:** Umsetzungen von Azachalcon **5** mit verschiedenen Thionukleophilen **22a-d**. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Zusätzlich wurde 1-Propanthiol **24** als aliphatisches Thionukleophil gewählt. Die Negativkontrolle mit Puffer zeigte eine moderate Umsetzung von  $13,00 \pm 0,90$  %. Mit Zugabe von Zink(II) wurde eine Steigerung auf  $69,03 \pm 1,25$  % erreicht, welche durch Zugabe von Enzym und Zink(II) nicht erneut gesteigert werden konnte (**Abbildung 41**). Zudem konnte für keine Reaktion Selektivität beobachtet werden.





**Abbildung 41:** Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit 1-Propanthiol **24** als aliphatisches Thionukleophil zum Addukt **25**. Die Reaktion wurde nach den oben bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Ausgehend vom Mercaptoethanol **18** als Thionukleophile für die Michael Reaktion mit Azachalcon **5** konnte keine Erweiterung des Substratspektrums erreicht werden. Sowohl die ausgewählten aromatischen als auch das aliphatische Thionukleophil war so aktiv, dass es bereits in Pufferlösung und mit Zugabe von Zink(II) zu hohen, zum Teil fast vollständigen Umsetzungen kommt und keine Steigerung der Aktivität mit der tHisF möglich ist. Eine Erhöhung der Selektivität konnte nicht nachgewiesen werden, was auf die bereits untersuchten Effekte, die Prochiralität des Substrats und der unspezifischen Zink(II)bindung an die Proteinoberfläche, zurückzuführen ist (Kapitel 4.1.5)

## 4.2 Squalen-Hopen Zyklase als chirale Brønsted-Säure

### 4.2.1 Expression und Reinigung der AacSHC

Das Gen der AacSHC kloniert in einen pET-22b(+)-Vektor, sowie die Gene der Mutantenbibliothek, transformiert in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3), wurde freundlicherweise von Dr. Stephan Hammer und Silke Bastian zur Verfügung gestellt.<sup>69</sup> Bei der AacSHC handelt es sich um ein thermophiles Enzym, mit den Vorteilen einer möglichen

Grobreinigung durch Hitzefällung von *E. coli* Proteinen und einer gewisse Robustheit gegenüber Mutationen, welche meist eine destabilisierende Wirkung haben. Die AacSHC und alle verwendeten Mutanten konnten durch Überexpression mit *E. coli* BL21 (DE3) erhalten werden. Dabei wurde nach dem etablierten Protokoll der Autoinduktion bei 37°C in TB-Medium verfahren (Kapitel 3.4.1.2). Die Reinigung erfolgte im Wesentlichen in zwei Schritten. Der Grobreinigung durch Hitzefällung von *E. coli* Proteinen und einer anschließenden Ionenaustauschchromatographie (Kapitel 3.4.3.2). Ein exemplarisches SDS-PAGE-Gel der Expression und Reinigung von den in dieser Arbeit erstellten Mutanten findet sich im Anhang (Kapitel 7.1.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem Wildtyp und der Mutante D376C, welche durch den Austausch der katalytisch aktiven Asparaginsäure gegen ein katalytisch nicht mehr aktives Cystein als Negativkontrolle verwendet wurde, 65 Einzelmutanten der aktiven Tasche nach Expression und Reinigung verwendet (**Tabelle 11**).

**Tabelle 11:** Übersicht über die verwendeten Einzelmutanten, insgesamt handelt es sich um 19 Positionen mit verschiedenen Mutationen.

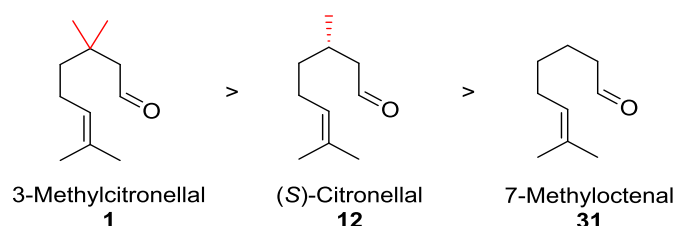
Position	L36	W169	I261	S307	W312	F365	Q366	A419	Y420	V448	W489	G490	Y495	G600	F601	F605	L607	Y609	Y612
Mutation	A	A	A	A	A	A	A	F	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	F
	W	G	F	F	F	C	F	G	C	F	F	F	L	F	G	G	F	F	G
			G	G	G	G	G	W	G	G	G		W	L	W	W	G	G	W
			W			W	W	Y	W	W				W			W	L	
																		W	

#### 4.2.2 Prins Reaktion von Citronellal-Analoga durch Aktivierung der Carbonylfunktion

Bei der Prins Reaktion handelt es sich um eine Säure-katalysierte Addition, bei welcher zuerst die Carbonylgruppe durch Protonierung aktiviert wird und es anschließend zum nukleophilen Angriff durch ein Alken kommt. Mit der AacSHC konnte in vorangegangenen Arbeiten von Dr. Stephan Hammer eine Aktivierung der Carbonylgruppe durch Protonierung und eine damit verbundene Aktivität für die Monozyklisierung von (*S*)-Citronellal **12** nachgewiesen werden. Beim Screening der AacSHC Mutantenbibliothek wurde die Mutante I261A mit einer gegenüber dem Wildtyp um das über 10-fach erhöhten Aktivität identifiziert. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Zyklisierung des (*S*)-

Citronellals **12** durch Einsatz der I261A Mutante selektiv zum (-)-*neoiso*-Isopulegol **13** verläuft.<sup>118</sup>

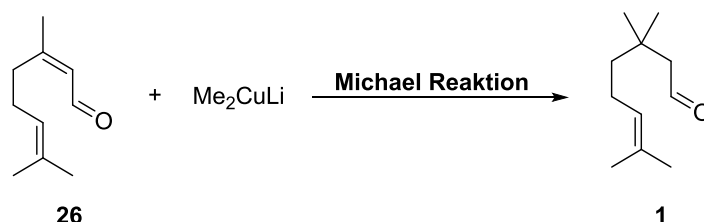
Ausgehend von diesen Ergebnissen, soll in dieser Arbeit das Substratspektrum der Prins Reaktion zum Aufbau von Monozyklen erweitert werden. Es soll untersucht werden, ob für die beiden Citronellal-Analoga 3-Methylcitronellal **1** und 7-Methyloctenal **31** mit dem Wildtyp eine Aktivität und Selektivität identifiziert werden kann und ob diese durch den Einsatz von *Aac*SHC Mutanten gesteigert werden kann (**Abbildung 42**).



**Abbildung 42:** Erweiterung des Substratspektrums ausgehend vom Citronellal **12** auf die Analoga 3-Methylcitronellal **1** und 7-Methyloctenal **31**.

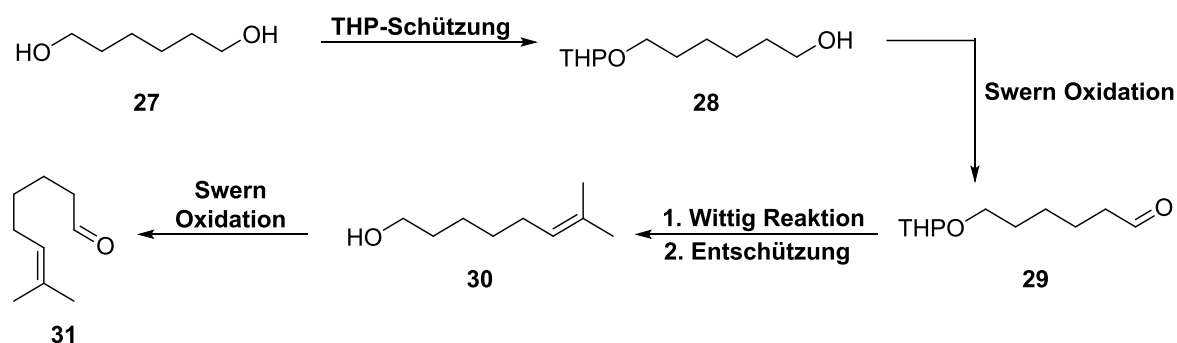
Zusätzlich soll anhand dieser Substrate untersucht werden, in wie weit chemische Effekte, hier im speziellen der Thorpe-Ingold Effekt, einen Einfluss auf die Aktivität und Selektivität der *Aac*SHC haben.<sup>150</sup>

Da die beiden Substrate 3-Methylcitronellal **1** und 7-Methyloctenal **31** nicht kommerziell erhältlich sind, wurden diese im ersten Schritt chemisch synthetisiert. Das 3-Methylcitronellal **1** wurde in einer Stufe nach Sakane *et al.*<sup>134</sup> durch eine Michael Reaktion mit dem Gilman Cupprat ausgehend vom Citral **26** synthetisiert (**Abbildung 43**, Kapitel 3.7.3).



**Abbildung 43:** Synthese des 3-Methylcitronellal **1** ausgehend vom Citral **26** mit Hilfe eines Gilman Cupprats.

Das 7-Methyloctenal **31** wurde in vier Stufen nach Sakane *et al.*<sup>134</sup> ausgehend von 1,6-Hexandiol **27** hergestellt (**Abbildung 44**, Kapitel 3.7.5).

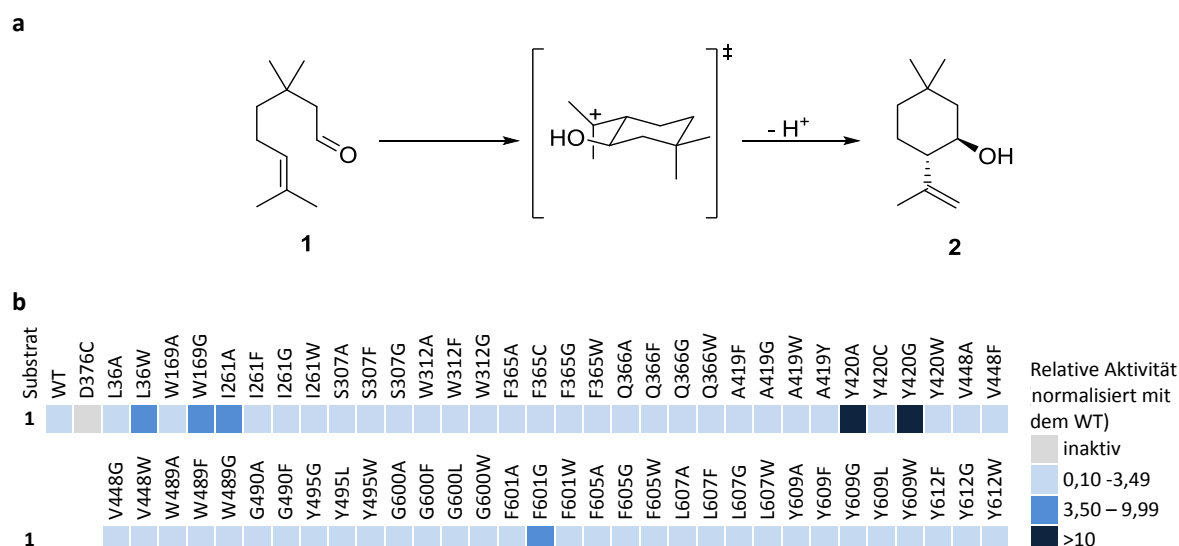


**Abbildung 44:** Vierstufige Synthese des 7-Methyloctenal **31** ausgehend vom 1,6-Hexandiol **27**.

Für die Analyse mittels GC-MS/FID wurden die benötigten Referenzen der zyklisierten Produkte durch chemische Zyklisierung der Substrate mit Zink(II)bromid als Lewis-Säure in Anlehnung an die Literatur durchgeführt (Kapitel 3.7.4 und 3.7.6).<sup>138</sup>

Die Reaktionsansätze wurde in Anlehnung an die Citronellal-Zyklisierung mit den bereits optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt.<sup>118</sup> Die Konzentrationen des Substrats betrug 2 mM und in der Reaktionsmischung waren 1 % DMSO, 0,2 % Triton-X und 12 mM Citrat-Puffer pH 6,0 enthalten. Die Reaktionen wurden für 40 h bei 30°C inkubiert (Kapitel 3.6.1.3). Die Ausbeute der Reaktionen wurden mittels GC-MS/FID (Kapitel 3.5.1) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von 1-Decanol als internen Standard. Die Zyklisierung von 3-Methylcitronellal **1** wurde zuerst auf eine *AacSHC*-Wildtyp Aktivität untersucht, welche mit einem Umsatz von  $0,77 \pm 0,13$  % nachgewiesen werden konnte. In der Negativkontrolle, der Reaktion in Pufferlösung, konnte keine Aktivität detektiert werden und eine Katalyse durch die Pufferlösung findet nicht statt. Um sicher zu stellen, dass die katalytisch aktive Asparaginsäure für die Katalyse der Reaktion verantwortlich ist, wurde die Reaktion mit der Mutanten D376C durchgeführt. Mit dieser Mutante konnte keine Aktivität festgestellt werden, so dass die geringe Aktivität im *AacSHC*-Wildtyp auf eine Katalyse am D376 in der aktiven Tasche der *AacSHC* zurückgeführt werden kann. Auf der Suche nach einer Mutante mit im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Aktivität wurde die *AacSHC* Mutantenbibliothek *gescreent*. Es konnten zwei Mutanten mit einer über das 10-fach erhöhten Aktivität und vier Mutanten mit einer 3,5 - 10-fach erhöhten Aktivität identifiziert werden. Die höchste Aktivität mit einem Umsatz von  $9,52 \pm 0,65$  % konnte mit der Y420G Mutante erreicht werden. Die Reaktion verläuft sowohl mit dem Wildtyp als auch mit den Mutanten Diastereoselektiv mit >99 % *trans*-Produkt. Zusätzlich wurde zur Y420G Mutante eine korrespondierende Mutante ohne die katalytisch aktive Asparaginsäure

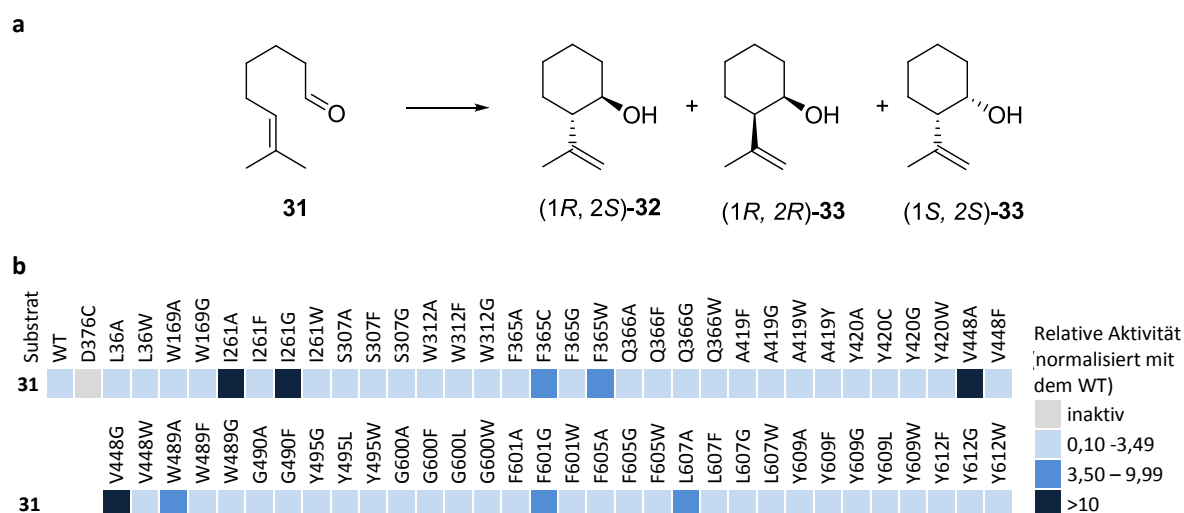
Y420G\_D376C erstellt, bei welcher neben der Mutation Y420G zu Erhöhung der Aktivität die Asparaginsäure 376 gegen das inaktive Cystein mutiert ist. Die Y420G\_D376C Mutante bestätigt durch die fehlende Aktivität in der Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal **1**, dass die Reaktion durch die vorhandene Asparaginsäure als Brønsted Säure katalysiert wird (**Abbildung 45**).



**Abbildung 45:** (a) Reaktion von 3-Methylcitronellal **1** zu *trans*-3-Methylisopulegol **2**. (b) Das Ergebnis des Screenings der *AacSHC*-Bibliothek in der Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal **1**. Der Farbcode beschreibt die relative Aktivität der einzelnen Mutanten bezogen auf den Wildtyp. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die chirale Analyse der Reaktionen erfolgte an der GC-FID (Kapitel 3.5.1). Für die Umsetzung mit dem *AacSHC*-Wildtyp konnte ein Enantiomerenüberschuss der Reaktion von  $85 \pm 2$  % detektiert werden. Durch den Einsatz der Y420G Mutante konnte der Enantiomeren-überschuss auf  $>98$  % gesteigert werden. Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des Produkts wurde ein semipräparativer Ansatz mit der besten Einzelmutante Y420G unter Einsatz von 120 mg Substrat für 3 Tage bei  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt (Kapitel 3.6.2.1). Die isolierte Ausbeute der Reaktion betrug 31,9 %. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung des Produkts wurde die Enantioselektivität mit Hilfe des spezifischen Drehwerts bestimmt. Das Ergebnis  $[\alpha]_D^{25} = -7,3$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1,0$ ) zeigte im Vergleich zur Literatur des (1*S*,2*R*)-3-Methylisopulegol **2** mit einem spezifischen Drehwert von  $[\alpha]_D^{25} = +9,1$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 1,0$ ), dass in den Biotransformationen unter Einsatz der *AacSHC* das (1*R*,2*S*)-3-Methylisopulegol **2** gebildet wurde.<sup>51</sup>

Für die Zyklisierung von 7-Methyloctenal **31** wurde nach dem Prinzip für das 3-Methylcitronellal **1** vorgegangen. Mit der *AacSHC*-Wildtyp konnte ein geringer Umsatz von  $0,69 \pm 0,07$  % mit einer Diastereoselektivität *trans:cis* von 59:41 beobachtet werden. Die Negativkontrolle mit Pufferlösung und der Mutante D376C zeigte keine Aktivität, so dass die Reaktion durch die katalytisch aktive Asparaginsäure 376 katalysiert wird. Durch das *Screening* der *AacSHC* Mutantenbibliothek konnten vier sehr gute Mutanten mit einer 10-fach höheren Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und fünf gute Mutanten mit einer mittleren 3,5 - 10-fach höheren Aktivität identifiziert werden. Die I261A Mutante ist mit einer 29-fach höheren Aktivität die beste Mutante. Die Ausbeute konnte mit der I261A Mutante auf  $20,17 \pm 1,28$  % und die Diastereoselektivität auf *trans:cis* von 89:11 gesteigert werden. Zusätzlich wurde die korrespondierende Knockout-Mutante I261A\_D376C erstellt, welche keine Aktivität in der Prins Reaktion von 7-Methyloctenal **31** zeigt und somit die Katalyse durch die als katalytisch aktive Brønsted-Säure fungierende Asparaginsäure bestätigt (**Abbildung 46**).



**Abbildung 46:** (a) Reaktion von 7-Methyloctenal **31** zum zyklisierten Produkt *trans* **32** und *cis*-2-Propenylcyclohexanol **33**. (b) Ergebnisse des Screenings der *AacSHC*-Bibliothek in der Prins Reaktion von 7-Methyloctenal **31**. Der Farbcode beschreibt die relative Aktivität der einzelnen Mutanten bezogen auf den Wildtyp. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

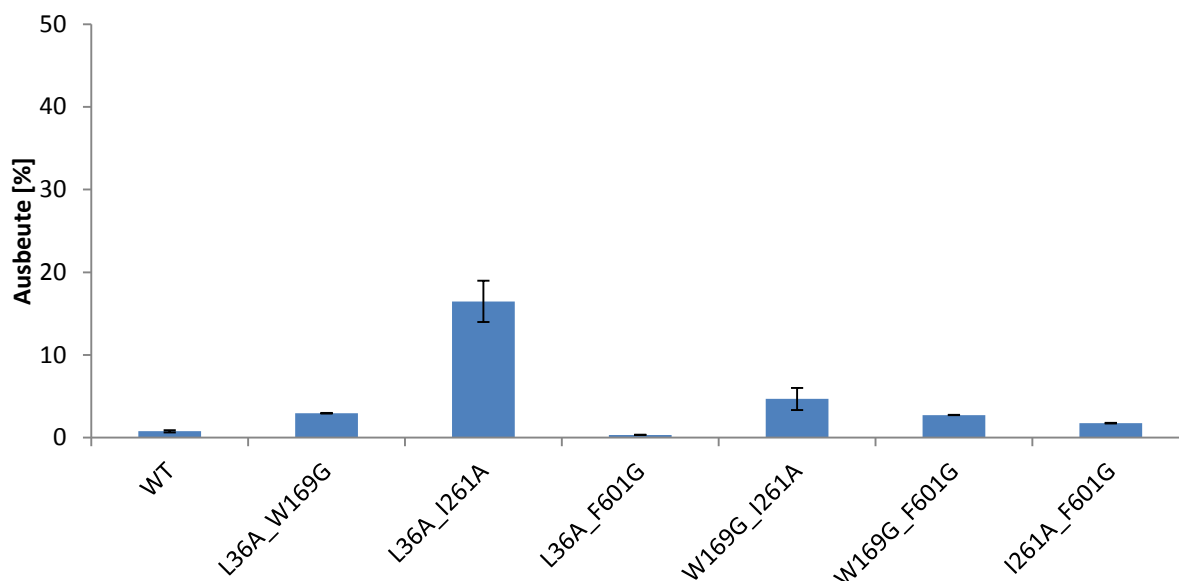
Die chirale Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte in Kooperation mit der analytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie mittels GC-FID (Kapitel 3.5.1). Im ersten Schritt wurde ein semipräparativer Ansatz der Biotransformation mit der I261A Mutante unter Einsatz von 85 mg 7-Methyloctenal **31** bei 30°C für 3 Tage durchgeführt. Die isolierte Ausbeute von *trans*-2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol **32** betrug 20,8 % und der Enantiomerenüberschuss 86 %. Mit Hilfe des spezifischen Drehwerts, welcher  $[\alpha]_D^{25} = -8,6$

(CHCl<sub>3</sub>, c = 1,0) betrug, konnte durch den Vergleich mit dem für (1*S*, 2*R*)- 2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol in der Literatur bekannten Wert  $[\alpha]_D^{25} = +15,2$  (CHCl<sub>3</sub>, c = 1,0) die absolute Konfiguration von (1*R*, 2*S*)- 2-(Prop-1-en-2-yl)cyclohexanol bestimmt werden.<sup>136</sup>

### 4.2.3 Erstellung von Doppelmutanten für die Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal (1)

In einem weiteren Schritt soll für die Prins Reaktion des 3-Methylcitronellal **1** die Aktivität weiter erhöht werden ohne dabei die Selektivität zu verlieren. Ein Ansatz ist die Kombination von identifizierten Einzelmutationen mit guten bis sehr guten relativen Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp in Doppelmutanten. Demnach wurden die beiden sehr guten Mutationen Y420G und Y420A jeweils mit den guten Mutationen L36A, W169G, I261A und F601G zu den folgenden Doppelmutanten Y420A\_L36A, Y420A\_W169G, Y420A\_I261A, Y420A\_F601G, Y420G\_L36A, Y420G\_W169G, Y420G\_I261A und Y420G\_F601G kombiniert. Zusätzlich wurden die guten Mutationen untereinander ebenfalls zu den Doppelmutanten L36A\_W169G, L36A\_I261A, L36A\_F601G, W169G\_I261A, W169G\_F601G und I261A\_F601G kombiniert.

Die entsprechenden Mutationen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese (Kapitel 3.3.5) eingeführt und die Mutanten anschließend wie bereits in Kapitel 4.2.1 beschrieben, erfolgreich exprimiert und gereinigt. Die Durchführung der Biotransformationen erfolgte ebenfalls in gleicher Weise wie bereits für die Einzelmutanten in Kapitel 4.2.2 beschrieben mit einer Konzentrationen des Substrats von 2 mM in 12 mM Citrat-Puffer pH 6,0 mit 1 % DMSO und 0,2 % Triton-X bei 30°C für 40 h (Kapitel 3.6.1.3). Die Ausbeute der Reaktionen wurden mittels GC-MS/FID (Kapitel 3.5.1) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe von 1-Decanol als internen Standard. Eine Kombination von zwei guten Mutationen mit jeweils einer 3,5 – 10-fachen relativen Aktivität zum Wildtyp ermöglicht eine Steigerung der Aktivität auf  $16,49 \pm 2,49$  % mit der L36A\_I261A Mutante. Dies entspricht einer 3-fachen Steigerung im Vergleich zur Einzelmutante I261A. Die weiteren Mutanten L36A\_W169G, L36A\_F601G, W169G\_I261A, W169G\_F601G und I261A\_F601G zeigen mit Aktivitäten von ~3 % keine erhöhte Aktivität (**Abbildung 47**).

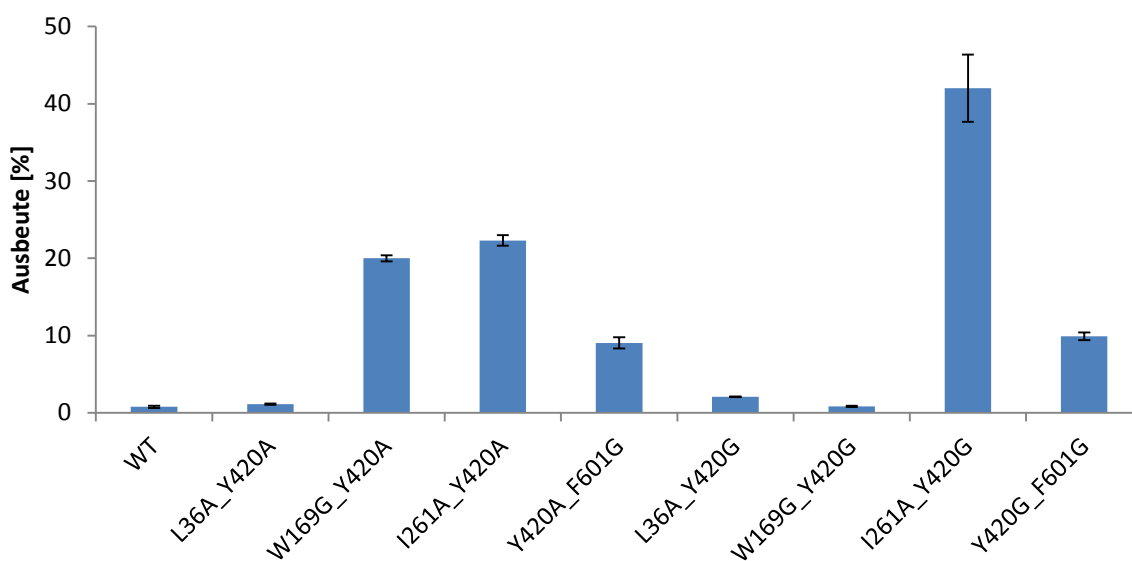


**Abbildung 47:** Ausbeute der Zyklisierung von 3-Methylcitronellal **1** mit den Doppelmutanten aus der Kombination von zwei guten Mutanten. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Bestimmung der Selektivität der Reaktion mit L36A\_I261A zeigte, dass die Kombination der beiden Mutationen zu einem Verlust der Selektivität von >98 % *ee* in den Einzelmutanten auf 88 % in der Doppelmutante führt.

Aus der Kombination einer sehr guten Mutante Y420A oder Y420G mit einer guten Mutante L36A, W169G, I261A oder F601G konnte die Doppelmutante I261A\_Y420G als beste Doppelmutante identifiziert werden. Die Mutante I261A\_Y420G erreicht mit einer Ausbeute von  $42,03 \pm 4,36$  % eine Vierfache Steigerung der Aktivität im Vergleich zur Y420G Mutante und damit eine 47-fach höhere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Zusätzlich konnten zwei Doppelmutanten W169G\_Y420A und I261A\_Y420A mit einer doppelt so hohen Aktivität im Vergleich zur Y420A Mutante identifiziert werden (**Abbildung 48**).



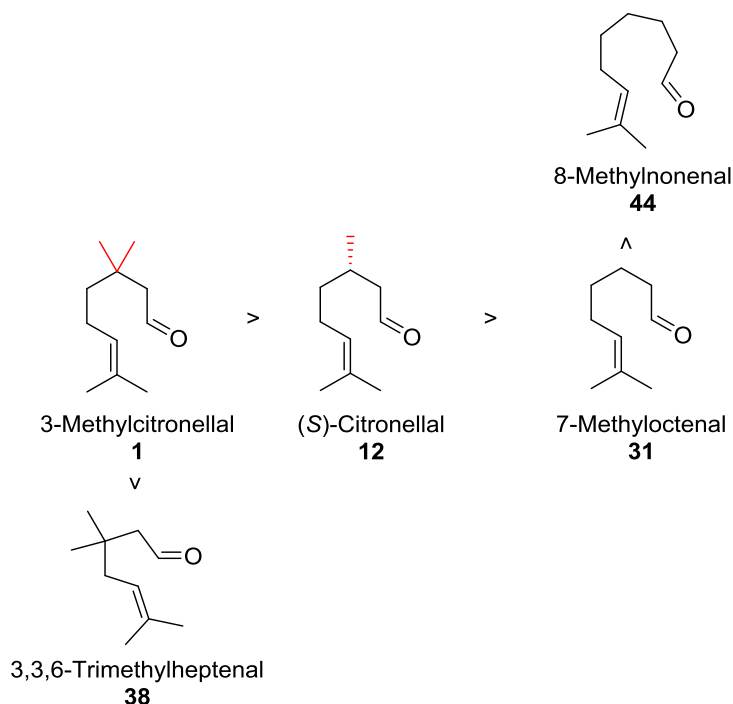


**Abbildung 48:** Ausbeute der Zyklisierung von 3-Methylcitronellal **1** mit den Doppelmutanten aus der Kombination von einer sehr guten und einer guten Mutante. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Alle Doppelmutanten mit der Beteiligung der Y420A oder Y420G Mutation zeigten Enantioselektivität von >98 % und damit keinen Verlust von Selektivität. Damit wurde gezeigt, dass mit der gezielten Kombination von aktiven Einzelmutanten in Doppelmutanten eine Steigerung der Aktivität ohne Verlust von Selektivität erreicht werden konnte.

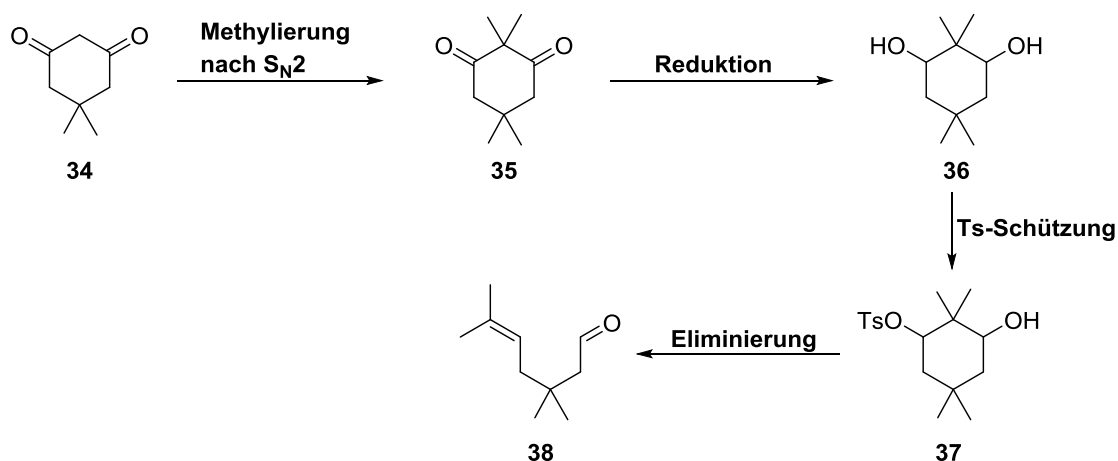
#### 4.2.4 Untersuchungen zum Einfluss der Ringgröße in der *AacSHC* katalysierten Prins Reaktion

Bis dato wurden mit der *AacSHC* und ihren Mutanten ausschließlich Substrate zyklisiert, welche einen Sechsring-Produkt bilden. In einem weiteren Schritt soll der Einfluss der gebildeten Ringgröße, hier von Fünf- und Siebenring-Produkten, in der monozyklischen Prins Reaktion untersucht werden. Es soll getestet werden, ob und wie weit die *AacSHC* und ihre Mutanten in der Lage sind Substrate mit einer anderen als der für Sechsring-Produkte bekannten Sesselkonformation im Übergangszustand reaktiv zu stabilisieren und damit die Reaktion zu katalysieren. Für die Studien wurden ausgehend von Citronellal **12**, 3-Methylcitronellal **1** und 7-Methyloctenal **31** jeweils ein Beispielsubstrat für den Fünfring, 3,3,6-Trimethylheptenal **38**, und den Siebenring, 8-Methylnonenal **44**, ausgewählt (**Abbildung 49**).



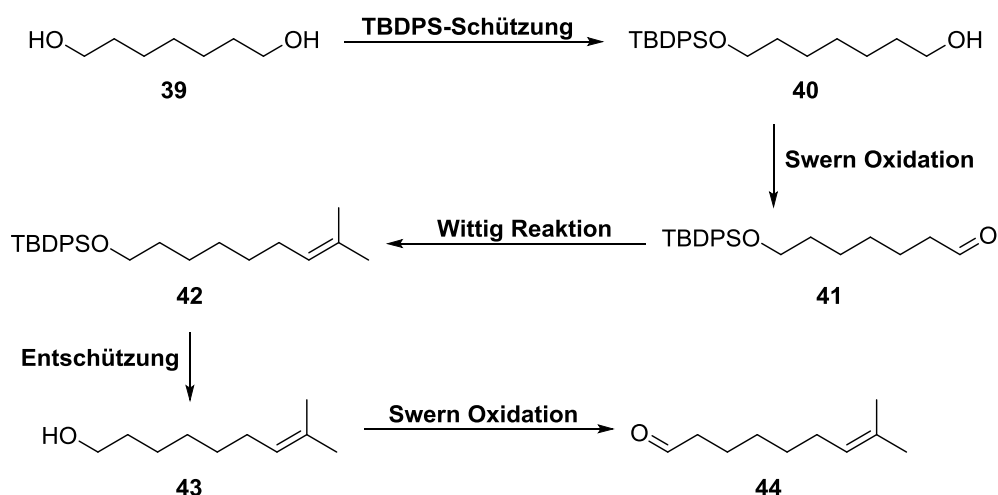
**Abbildung 49:** Erweiterung des Substratspektrums von AacSHC auf Substrate zum Aufbau von Fünfringprodukten und Siebenringprodukten.

Da beide zu testende Substrate nicht kommerziell im Handel erhältlich sind, mussten diese im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an die Literatur synthetisiert werden. Das 3,3,6-Trimethylheptanal **38** wurde ausgehend vom Dimedon **34** in vier Stufen nach R. Kiwus *et al.*<sup>139</sup> und N. H. Andersen *et al.*<sup>140</sup> synthetisiert (**Abbildung 50**, Kapitel 3.7.7).



**Abbildung 50:** Vier-stufige Synthese von 3,3,6-Trimethylheptenal **38** ausgehend vom Dimedon **34**.

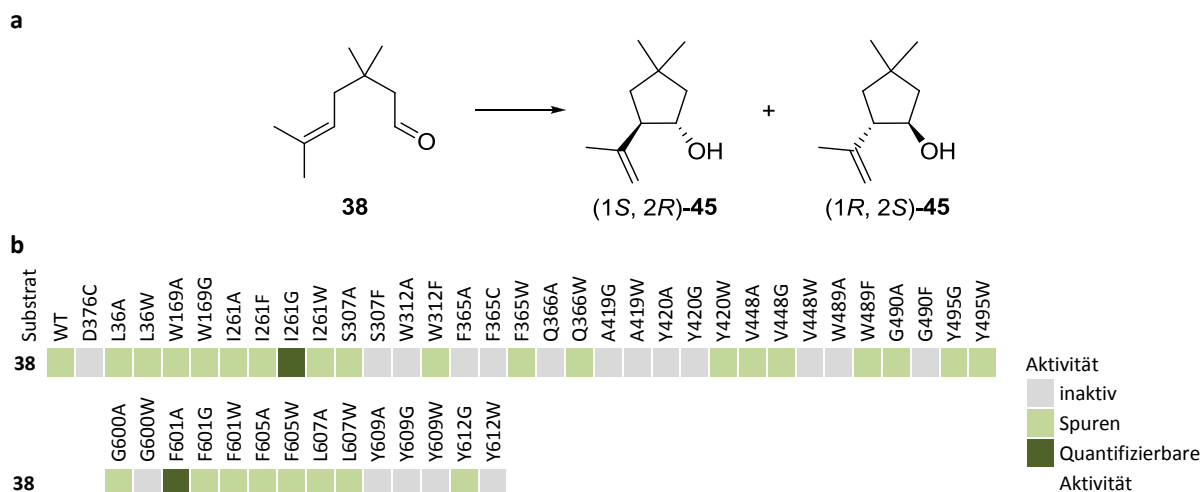
Die Synthese von 8-Methylnonenal **44** erfolgte ausgehend vom 1,7-Heptandiol **39** in fünf Stufen nach Comito *et al.*<sup>143</sup> (**Abbildung 51**, Kapitel 3.7.9)



**Abbildung 51:** Fünf-stufige Synthese von 8-Methylnonenal **44** ausgehend vom 1,7-Heptandiol **39**.

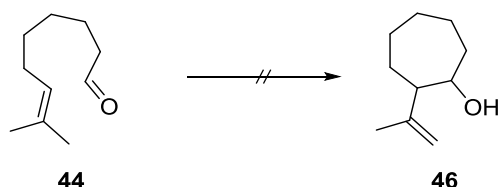
Die beiden Substrate wurden mit dem *AacSHC* Wildtyp auf Aktivität untersucht und die reduzierte *AacSHC* Mutantenbibliothek auf aktive Mutanten *gescreent*. Die Biotransformationen wurden dabei nach dem bereits beschriebenen Protokoll für 40 h bei 30°C durchgeführt (Kapitel 3.6.1.3). Die Analyse der Umsätze erfolgte an der GC-MS/FID mit Hilfe des internen Standards 1-Decanol (Kapitel 3.5.1).

Für das 3,3,6-Trimethylheptanal **38** konnte mit dem *AacSHC* Wildtyp das *trans* Produkt 2-Isopropyl-4,4-dimethyl-cyclopentanol **45** in Spuren <0,5 % nachgewiesen werden. Das Referenzprodukt wurde durch chemische Zyklisierung nach Sarkar *et al.*<sup>142</sup> mit Samariumiodid hergestellt und charakterisiert (Kapitel 3.7.8). Die Negativkontrolle in Pufferlösung und der Mutante D376C zeigte, wie auf Grund vorangegangener Ergebnisse erwartet, keine Aktivität, so dass die Katalyse der Reaktion auf das Vorhandensein der *AacSHC* mit seiner katalytisch aktiven Asparaginsäure als Brønsted-Säure zurück zu führen ist. Das *Screening* wurde mit einer komprimierten *AacSHC* Mutantenbibliothek, bestehend aus Mutanten der 19 Positionen in die jeweils kleinste und größte Aminosäure, durchgeführt. Das Ergebnis zeigt, dass für eine Reihe von Mutanten eine Aktivität in Spuren nachgewiesen werden konnte. Mit zwei Mutanten I261G und F601A wurde eine gesteigerte Aktivität detektiert und quantifiziert. Die beste Mutante ist F601G mit dem Austausch von Phenylalanin zum kleineren Alanin. Die Ausbeute betrug  $0,78 \pm 0,15$  %. Bei der Mutante I261G wurde eine nur unwesentlich geringere Ausbeute von  $0,77 \pm 0,03$  % erreicht. Bei beiden Reaktionen wurde das *trans* Produkt mit einer Selektivität von >99 % gebildet (**Abbildung 52**).



**Abbildung 52:** (a) Zyklisierung von 3,3,6-Trimethylheptenal **38** zum Fünfringprodukt 2-Isopropyl-4,4-dimethylcyclopentanol **45**. (b) Die Ergebnisse des Screenings der *AacSHC*-Bibliothek in der Prins Reaktion von 3,3,6-Trimethylheptenal **38**. Der Farbcode zeigt die Aktivität der einzelnen Mutanten. Alle Reaktionen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Untersuchung der Reaktion von 8-Methylnonenal **44** zu 2-(Prop-1-en-2-yl)cycloheptanol **46** mit dem *AacSHC* Wildtyp zeigte keinen Umsatz. Auch beim Durchforsten der komprimierten *AacSHC* Mutantenbibliothek konnte keine Mutanten mit einer Aktivität nachgewiesen werden (**Abbildung 53**).



**Abbildung 53:** Zyklisierung von 8-Methylnonenal **44** zu 2-(Prop-1-en-2-yl)cycloheptanol **46**. Mit dem *AacSHC* Wildtyp und der komprimierten *AacSHC* Mutantenbibliothek konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden.

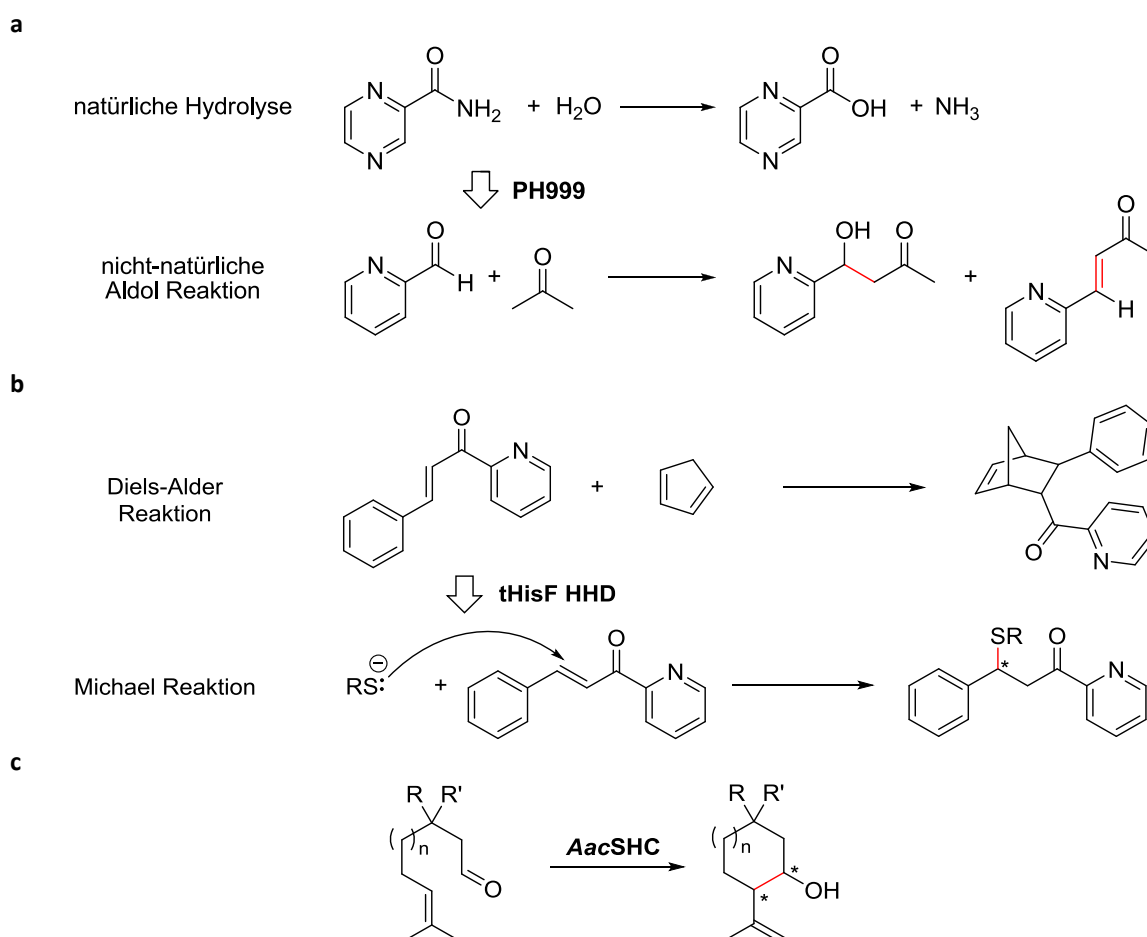
Somit konnte gezeigt werden, dass das Fünfringssubstrat 3,3,6-Trimethylheptenal **38**, wenn im Vergleich zu den Sechsringssubstraten auch mit einer wesentlich geringeren Aktivität, mit dem *AacSHC* Wildtyp und Mutanten der fokussierten *AacSHC*-Mutantenbibliothek zyklisiert werden kann. Im Gegensatz zum Fünfring- konnte für das Siebenringssubstrat 8-Methylnonenal **44** keine Aktivität für den *AacSHC* Wildtyp und die Mutanten detektiert werden. Die Katalyse der verschiedenen Substrate verläuft abhängig von der Ringgröße des resultierenden Produkts über unterschiedliche Übergangszustände. Beim Sechsring über die bereits erwähnte Sesselkonformation, welche im Vergleich zur Briefumschlagkonformation des Fünfrings oder zur verdrillten Sesselkonformation beim Siebenring, energetisch günstiger ist und in der aktiven Tasche optimal stabilisiert werden kann.

## 5 DISKUSSION UND AUSBLICK

Promiskuität, in Form von katalytischer Promiskuität und Substratpromiskuität, spielt in der Biokatalyse bei der Entwicklung von Enzymkatalysatoren mit neuen, nicht-natürlichen Aktivitäten eine wichtige Rolle.<sup>8,16,151</sup> Um die Promiskuität von Enzymen für die Katalyse von verschiedenen organischen Reaktionen ausnutzen zu können, können deren katalytischen Maschinerien weiter entwickelt und somit Biokatalysatoren als Alternative zu chemischen Katalysatoren geschaffen werden.<sup>10,152</sup> In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Säurebasierte Enzymsysteme, zwei Metalloenzyme mit Zink als Lewis-Säure und eine Zyklase mit einer katalytisch aktiven Asparaginsäure als Brønsted-Säure, untersucht. Durch Ausnutzung der katalytischen Promiskuität und Substratpromiskuität dieser Enzyme sollten Biokatalysatoren zur Aktivierung einer Carbonylgruppe in verschiedene organische Reaktionen zugänglich gemacht und selektive C-C oder C-X Bindungen aufgebaut werden. Bei der katalytischen Promiskuität von Enzymen wird, nach dem diese identifiziert oder durch Mutagenese induziert ist, die nicht-natürlichen Reaktionen über einen anderen als den natürlichen Reaktionsmechanismus des Enzyms katalysiert. Handelt es sich um Substratpromiskuität werden nicht-natürliche Substrate nach demselben Reaktionsmechanismus wie für das natürliche Substrat umgesetzt.

Im ersten Teil der Arbeit sollte das an eine His/His/Asp-Triade gebundene Zink(II) als Lewis-Säure genutzt werden. Für die Studien wurden zum einen die natürliche Zink-abhängige Pyrazinamidase PH999 von *Pyrococcus horikoshii* und zum anderen die tHisF von *Thermotoga maritima* mit der artifiziell eingeführt Zink(II)-bindenden Triade ausgewählt. Die PH999 katalysiert in der natürlichen Reaktion die Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zu Pyrazinsäure **4**, indem ein Hydroxydion durch die Aktivierung von Wasser am Zink(II) bereitgestellt wird. Als Modellreaktion wurde in dieser Arbeit die promiskuitive Aldol Reaktion katalysiert, wobei das koordinierte Zink(II) als Lewis-Säure die Carbonylgruppe des Aldol Akzeptors aktiviert (**Abbildung 54a**). In die tHisF wurde die artifizielle Metallbindende Triade, bestehend aus zwei Histidin Aminosäuren und einer Asparaginsäure, bereits während meiner Diplomarbeit<sup>145</sup> nach dem Vorbild von Reetz *et al.* in ein TIM-Barrel Proteingerüst eingeführt.<sup>42</sup> Dieser verwendete die Kupfer(II) koordinierende Variante für

die Katalyse einer selektiven Diels-Alder Reaktion. In dieser Arbeit wurde Kupfer(II) durch Zink(II) ausgetauscht und die asymmetrische Michael Reaktion mit Schwefelnucleophilen zum Aufbau neuer, chiraler C-S-Bindungen untersucht (**Abbildung 54b**). Im zweiten Teil wurde die Substratpromiskuität der Squalen-Hopane-Zyklase (*AacSHC*) aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* studiert. In voran gegangenen Arbeiten von Hammer *et al.* wurde bereits gezeigt, dass die katalytisch aktive Asparaginsäure als Brønsted-Säure die Carbonylgruppe des Substrats Citronellal **12** protonieren und somit die Prins Reaktion katalysieren kann.<sup>118</sup> Durch eine fokussierte *AacSHC*-Mutantenbibliothek der aktiven Tasche konnte zudem die Aktivität und Selektivität für die verschiedenen Zyklisierungsprodukte beeinflusst werden. Ausgehend vom Citronellal **12** wurde die Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten der Prins Reaktion zum Aufbau von Fünf-, Sechs- und Siebenring-Produkten getestet (**Abbildung 54c**).



**Abbildung 54:** Studien zur katalytischen Promiskuität mit PH999 und tHisF und zur Substratpromiskuität mit der *AacSHC* (a) Die natürliche Hydrolyse Reaktion der PH999 im Vergleich zur nicht-natürlichen Aldol Reaktion. (b) Die Diels-Alder Reaktion der artifiziiellen tHisF HHD-Mutante mit einer spezifischen Metallbindestelle und die Verwendung als Katalysator in der Michael Reaktion (c) Die Prins Reaktion katalysiert durch die *AacSHC* soll durch Variation von R und R' und n zur Variation der Ringgröße auf ihre Substratpromiskuität untersucht werden.

## 5.1 Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität von Zink(II)-bindenden Enzymen als chirale Lewis-Säuren

### 5.1.1 Expression, Reinigung und Bestimmung der Aktivität der PH999

Die Expression und Reinigung, sowie die Bestimmung der spezifischen Aktivität der PH999 aus *Pyrococcus horikoshii* erfolgte wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben. Das Gen kloniert in einen pET-21a(+)-Vektor wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. S.-H. Kim der Universität von Kalifornien zur Verfügung gestellt.<sup>69</sup> Die Expression in LB-Medium mit 0,5 mM IPTG bei einer Temperatur von 30°C und einer Expressionszeit von 5 h, sowie die anschließende Reinigung des Enzyms mittels Hitzefällung von *E. coli* Proteinen und Anionenaustauschchromatographie mit einem Äkta System lieferte den PH999 Wildtyp mit einer Reinheit >90 % in ausreichender Menge mit einer Konzentration von 1 mg/mL. Das beschriebene Protokoll konnte ebenfalls für alle in dieser Arbeit durch ortsgerichtete Mutagenese erstellte Mutanten mit Reinheiten von >90 % angewendet werden.

Die spezifische Aktivität für den PH999 Wildtyp betrug bei einer Reaktionstemperatur von 30°C  $0,18 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}/\text{min mg Enzym}$  und konnte bei Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60°C um das Vierfache auf  $0,73 \pm 0,03$   $\mu\text{mol}/\text{min mg Enzym}$  gesteigert werden. In der Literatur werden für die PH999 spezifische Aktivitäten von 17,3  $\mu\text{mol}/\text{min mg Enzym}$  bei 30°C und 357  $\mu\text{mol}/\text{min mg Enzym}$  bei 60°C beschrieben, was einer 100-fache bzw. 450-fach größeren Aktivität entspricht. Die in der Literatur beschriebenen Aktivitäten wurden in 50 mM Natriumphosphat Puffer pH 6,5 bestimmt, während die spezifischen Aktivitäten in dieser Arbeit in dem Reaktionspuffer der Biotransformationen 10 mM Bis-Tris Puffer pH 7,0 bestimmt wurden. Zudem wurde in der Literatur als ein zusätzlicher Reinigungsschritt der PH999 eine Größenaustauschchromatographie durchgeführt.<sup>69</sup> Die Aktivität einer weiteren Pyrazinamidase, mit den zu dieser Arbeit vergleichbaren Reinigungsschritten, aus *Mycobacterium smegmatis* ist bei 37°C mit 3,53  $\mu\text{mol}/\text{min mg Enzym}$  beschrieben.<sup>153</sup> Die Aktivität ist zudem stark abhängig vom pH Wert, für *Mycobacterium tuberculosis* ist beschrieben, dass die Pyrazinamidase für die Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zu Pyrazinsäure **4** einen sauren pH Wert benötigt und bei neutralem pH Wert seine Aktivität verliert.<sup>66,154,155</sup> Zudem wurde im Vergleich zur Literatur die Fünffache Menge an Pyrazinamid **3** eingesetzt, was eine zusätzliche Substratinhibierung zur Folge haben könnte.

### 5.1.2 Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der PH999

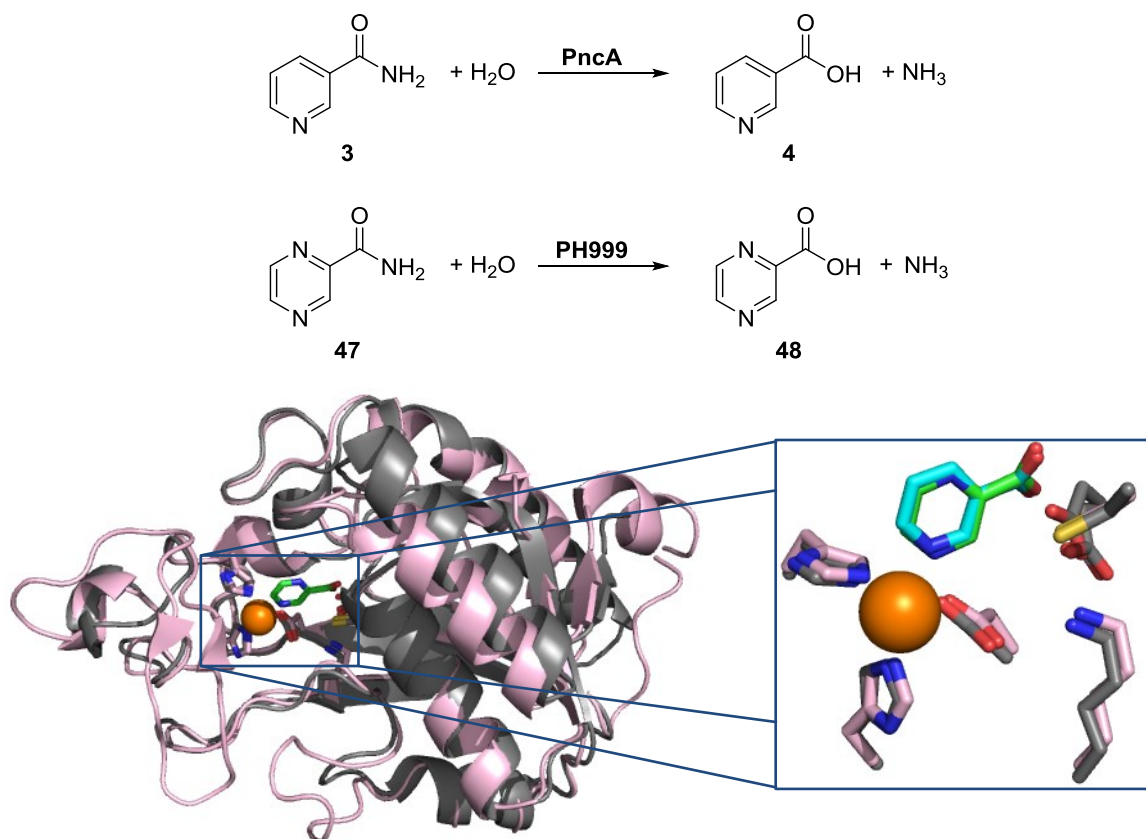
Die natürliche Reaktion der PH999 ist die Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zu Pyrazinsäure **4** unter Abspaltung von Ammoniak. Hierfür wird das Pyrazinamid **3** durch Bildung einer Thioesterbindung mit dem Cystein-Aminosäurerest in der aktiven Tasche aktiviert und der Carbonylkohlenstoff durch Wasser angegriffen. Das Zink(II) fungiert in der natürlichen Reaktion als Lewis-Säure, aktiviert das Wasser und stellt damit das benötigte Hydroxydion zur Verfügung.<sup>69</sup> In dieser Arbeit sollte untersucht werden in wie weit, das Zink(II) der PH999 als Lewis-Säure für die Aktivierung von Carbonylen verwendet und die Aldol Reaktion katalysiert werden kann. Aldol Reaktionen werden in der Natur von Aldolasen katalysiert, wobei zwei Typen mit unterschiedlichen Reaktionsmechanismen, ähnlich den Mechanismen der konventionellen Organo- und Übergangsmetallkatalysatoren, bekannt sind. Typ I Aldolasen besitzen im aktiven Zentrum eine Lysin-Aminosäure, welche analog zu Organokatalysatoren, mit dem Aldol-Donor ein Enamin bilden und dadurch die Reaktion katalysieren kann.<sup>144</sup> Auf der anderen Seite koordinieren Typ II Aldolasen als Metalloenzyme meistens Zink über eine Aminosäuretriade, welche als Lewis-Säure agiert und die Aldol Reaktion durch Bildung eines Zink(II)-Enolat mit dem Akzeptor im Übergangszustand katalysieren. Die meisten Aldolasen akzeptieren ein breites Akzeptorspektrum, sind jedoch beim Donorspektrum extrem auf hauptsächlich Dihydroxyacetonphosphat, Pyruvat oder Glycin beschränkt, was ihren Einsatz als universelle Katalysatoren für Aldol Reaktionen erschwert.<sup>2,156</sup>

Nach ausreichender Expression, erfolgreicher Reinigung und Aktivität gegenüber der natürlichen Reaktion soll PH999 in dieser Arbeit als universales Katalysatorsystem mit einem breiten Spektrum an Donorsubstraten für die Aldol Reaktion etabliert und ihr promiskuitiver Katalysemechanismus untersucht werden. Als Modellreaktion wurde 2-Pyridincarboxaldehyd **14** als Akzeptor und Aceton **15** als Donor gewählt. 2-Pyridincarboxaldehyd **14** hat eine dem Pyrazinamid **3** analoge Struktur und kann mit dem Carbonylsauerstoff und dem Stickstoff des Pyridinrings über einen Fünfring-Chelat-Übergangszustand an das Zink koordinieren. Aceton **15** kann durch die Robustheit der thermophilen PH999 als Co-Solvenz in einer Konzentration von bis zu 50 % des Reaktionsvolumens verwendet werden. Um eine höchst mögliche Enolkonzentration zu ermöglichen, kann durch diese hohe Acetonkonzentration das schlechte Keto-Enol-Gleichgewicht des Acetons **15** auf der Seite des Ketons teilweise ausgeglichen werden. In



der Pyrazinamidase PH999 sind in der aktiven Tasche durch die vorhandenen Aminosäurereste, eine His/His/Asp-Triade mit koordiniertem Zink, sowie einem Lysin und einer Asparaginsäure, beide Reaktionsmechanismen analog den Typ I und Typ II Aldolasen möglich. Für die Studie des möglichen promiskuitiven Reaktionsmechanismus wurden zwei Substitutionsmutanten und eine Negativkontrollmutante erstellt. Jede Mutante mit dem Ziel einen der beiden Mechanismen auszuschalten, bzw. beide Katalysezentren zu entfernen. Die Negativkontrollreaktion der beiden Substrate in Pufferlösung zeigte bei einer Reaktionszeit von 24h eine Aktivität von  $5,35 \pm 0,94$  % Gesamtprodukt (bestehend aus Additionsprodukt **16** und Kondensationsprodukt **17**). Durch Zugabe von  $100 \mu\text{M ZnSO}_4$  oder  $100 \mu\text{M Lysin}$  konnte die Aktivität in den Kontrollreaktionen auf  $7,75 \pm 1,17$  % und  $8,46 \pm 1,34$  % gesteigert werden. Im Vergleich zeigte der PH999 Wildtyp eine doppelt so hohe Aktivität von  $19,00 \pm 0,62$  %. Mit den Substitutionsmutanten wurde erwartet, dass abhängig vom tatsächlichen stattfindenden Katalysemechanismus eine Mutante eine erhöhte und eine Mutante eine verringerte Aktivität aufweisen. Für die Negativkontrollmutante ohne Katalysezentrum sollte keine Aktivität detektiert werden. Die experimentellen Ergebnisse zeigten jedoch für alle Mutanten innerhalb der Fehlertoleranzen zum Wildtyp vergleichbare Aktivitäten. Aus den Ergebnissen stellt sich die Frage, ob die Katalyse am aktiven Zentrum der PH999 möglich ist oder ob nicht vielmehr ein alternatives Katalysezentrum zum Beispiel an der Proteinoberfläche der PH999 für die Aktivität verantwortlich ist.

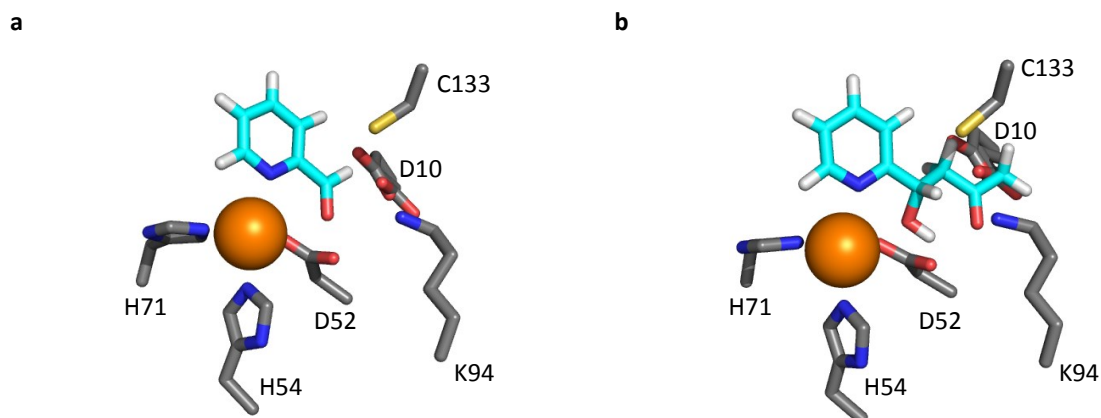
Eine Dockingstudie mit dem Substrat und dem Additionsprodukt **16** in der aktiven Tasche der PH999 soll zeigen, ob die aktive Koordination von Substrat und Übergangszustand möglich ist. Für die Dockingstudie steht die Kristallstruktur der PH999 mit dem an der Triade koordinierten Zink(II), ohne Ligand zur Verfügung. Für die Modellierung des natürlichen Substrats Pyrazinamid **3** in die aktive Tasche wurde die Nicotinamidase PncA aus *Actinetobacter baumannii*, kristallisiert mit dem Substrat Nicotinamid **47**, zur Hilfe genommen. Die beiden Enzyme PH999 und PncA besitzen eine 44 %-ige Sequenzidentität und zeigen im Strukturvergleich eine sehr gute Übereinstimmung von der Struktur und den Aminosäuren der aktiven Tasche. Zudem haben beide natürlichen Substrate Pyrazinamid **3** und Nicotinamid **47**, sowie die beiden Produkte Nicotinsäure **48** und Pyrazinsäure **4** eine sehr große Strukturähnlichkeit (**Abbildung 55**).<sup>69,157</sup>



**Abbildung 55:** Vergleich von PH999 (PDB-Code: 1IM5) und PncA (PDB-Code: 2WTA). Die PncA katalysiert in der natürlichen Reaktionen die Hydrolyse von Nicotinamid **47** zu Nicotinsäure **48**, die PH999 die Hydrolyse von Pyrazinamid **3** zur Pyrazinsäure **4**. Der Strukturvergleich von P999 (grau) und PncA (rosa), mit der Zink(II)-Bindestelle (graue und rosa Sticks) und Zink(II) (orange Sphäre) und den Aminosäuren der aktiven Seite (graue und rosa Sticks), sowie den Produkten Pyrazinsäure **4** (grün) und Nicotinsäure **48** (cyan), zeigt bei einer Sequenzidentität von 44 % eine sehr gute Übereinstimmung.<sup>69,157</sup>

Für die weitere Modellierung wurde aufgrund der Ähnlichkeit der Enzyme und Substrate angenommen, dass das Produkt der PH999, Pyrazinsäure **4** in gleicher Weise in der aktiven Tasche liegt wie die Nicotinsäure **48** in PncA. In den beiden beschriebenen Reaktionsmechanismen koordiniert das Substrat durch den Stickstoff in *meta*-Position an das Zink(II). Ausgehend vom natürlichen Substrat des PH999, Pyrazinamid **3**, erfolgte die Modellierung des 2-Pyridincoboxaldehyd **14** als Substrat und des Additionsprodukt **16** der Aldol Reaktion mit Aceton **15** in der aktiven Tasche der PH999. Das 2-Pyridincoboxaldehyd **14** wurde in der katalytisch aktiven Koordination mit dem Fünfring-Chelat Übergangszustand des Carbonylkohlenstoffs und des Stickstoffs des Pyridinrings an das Zink(II) koordiniert. Die Betrachtung der Modelle zeigt, dass das Substrat aktiv in der aktiven Tasche koordiniert werden kann und es wie erwartet nicht zu sterischen Hinderungen kommt. Beim Additionsprodukt **16** zeigt sich jedoch, dass es zu sterischen Hinderungen des Produkts mit dem Enzym kommt. Die aktive Tasche ist somit nicht

ausreichend groß für die Koordination des aktiven Übergangszustands der Aldol Reaktion von 2-Pyridincarboxaldehyd **14** mit Aceton **15** (**Abbildung 56**).



**Abbildung 56:** Modellierung (a) des Substrats 2-Pyridincarboxaldehyd **14** und (b) des Additionsprodukts **16** der Aldol Reaktion mit Aceton **15** in der aktiven Tasche der PH999. Gezeigt sind nur die Aminosäuren der aktiven Tasche mit Metallbindestelle und koordiniertem Zink(II) (orange Sphäre), sowie der katalytischen Triade bestehend aus Asp/Lys/Cys. Bei der Koordination des Produkts kommt es zu sterischen Hinderungen des Produkts mit den Aminosäuren der katalytisch aktiven Triade. Die aktive Tasche ist zu klein und somit kann keine Reaktion stattfinden.

Die Dockingstudie ist damit eine weitere Bestätigung, dass die Katalyse der Aldol Reaktion in der aktiven Tasche aufgrund der Größe der aktiven Tasche nicht möglich ist. Daraus folgend muss ein alternatives Katalysezentrum, wie zum Beispiel die Proteinoberfläche der PH999, für die Aktivität verantwortlich sein. Die Oberfläche des Enzyms besitzt ebenfalls die für die Katalyse benötigten Aminosäurereste. So finden sich zum einen Lysin-Aminosäuren mit einer benachbarten Asparagin- oder Glutaminsäure für die Katalyse nach dem Mechanismus der Typ I Aldolasen über eine Enamin-Zwischenstufe am Lysin. Zum anderen können Metallionen aus der Enzymlösung, im besonderen Zink(II) über die zahlreichen Asparagin- oder Glutaminsäure an die Proteinoberfläche koordinieren und die Reaktion im Sinne der Typ II Aldolasen als Lewis-Säure über eine Zink(II)-Enolatzwischenstufe katalysieren. Dass die Zink(II)bindestelle ohne Histidin, d.h. nur bestehend aus den Carbonsäure-Seitenketten der Asparagin- und Glutaminsäuren, möglich sind, zeigen die Beispiele der Leucin-Aminopeptidasen. So sind zum Beispiel in der Rinder Leucin-Aminopeptidase zwei Zink(II)ionen in der aktiven Tasche über eine Glu/Glu/Asp und eine Asp/Asp/Lys Triade an das Protein koordiniert.<sup>158</sup> Experimentell wurde der Zink(II)-Enolat Mechanismus durch gegen EDTA dialysierte Enzymlösung, zur Entfernung zweiwertiger Metallionen ausgeschlossen und gezeigt, dass es zu keiner Verringerung der Aktivität kommt und somit die Reaktion an den Lysinen der Enzymoberfläche analog den Typ I

Aldolasen über die Enamin-Zwischenstufe katalysiert werden muss. Der Vergleich mit freiem Lysin als Kontrollreaktion hat zudem gezeigt, dass das Proteingerüst mit Lysin und den benachbarten Asparagin- und Glutaminsäuren, welche in ihrer Funktion als Base den Akzeptor koordinieren und in die räumliche Nähe zum Donor bringen, nötig ist. Erst so ist der effektive nukleophile Angriff und damit die Bildung des Produkts möglich.

Zwar kann mit der PH999 eine Aktivitätssteigerung in der Aldol Reaktion erreicht werden, diese ist jedoch nicht wie erwartet auf die katalytische Promiskuität der aktiven Tasche zurückzuführen, sondern viel mehr auf eine Katalyse an der Enzymoberfläche. Dockingstudien haben gezeigt, dass die aktive Tasche zu klein ist, um das Wasser der natürlichen Reaktion durch ein größeres Nukleophil zu ersetzen.

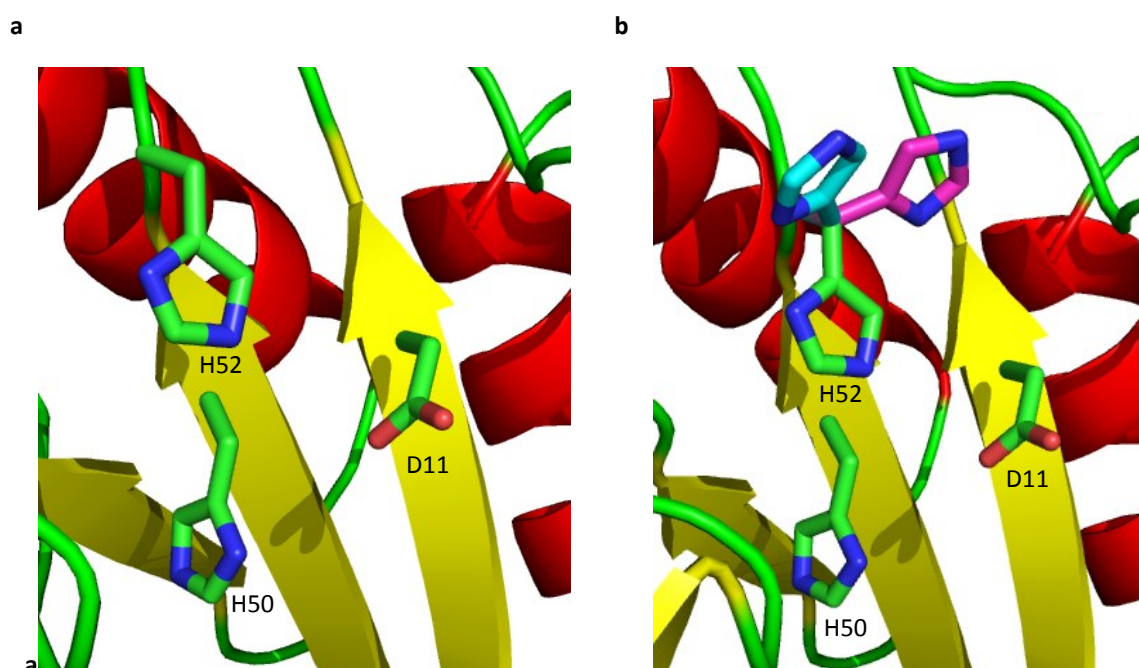
### 5.1.3 Untersuchung zur katalytischen Promiskuität der tHisF

Die Verwendung des natürlichen Zink(II)-abhängigen Enzyms PH999 für die promiskuitive Aldol Reaktion von 2-Pyridincarboxaldehyd **14** mit Aceton **15** war aus Platzgründen in der aktiven Tasche nicht möglich. Das zweite hier untersuchte System, die artifiziellen Metallkoordinierenden tHisF, hat im Vergleich zur PH999 durch die offene TIM-Barrel Struktur eine erhöhte Zugänglichkeit des aktiven Zentrums. Die beiden tHisF Varianten, HHD mit einer Metallbindestelle in Form der His/His/Asp-Triade analog der PH999 und die entsprechenden Negativkontrollmutante ohne Metallbindestelle wurden basierend auf den Arbeiten von Reetz *et al.*<sup>42</sup> während meiner Diplomarbeit<sup>145</sup> am Institut hergestellt und die beschriebene Diels-Alder Aktivität in Zusammenarbeit mit Dennis Wetzl in seiner Dissertation<sup>146</sup> bestätigt. In dem tHisF-System koordiniert Kupfer(II) an die His/His/Asp-Triade und kann mit Hilfe des Fünfring-Chelat Übergangszustand das Substrat Azachalcon **5** aktivieren und die Diels-Alder Reaktion mit Cyclopentadien **6** katalysieren. In weiterführenden Arbeiten von Dennis Wetzl wurde die Michael Reaktion des Azachalcons **5**, mit verschiedenen Nucleophilen getestet und konnte eine initiale Aktivität mit Mercaptoethanol **18** detektieren werden. Aufgrund der hohen Thiophilie des Kupfers kommt es bei Anwesenheit von Kupfer in der Reaktionslösung immer zu geringeren Umsätzen. Vermutlich wird das Mercaptoethanol **18** am Kupfer gebunden und damit der nukleophile Angriff inhibiert.<sup>146</sup> Um diesen Trend zu umgehen, wurde bereits während meiner Diplomarbeit untersucht, ob das an die tHisF HHD-Mutante koordinierte Kupfer(II) gegen die zweiwertige Metalle Mangan(II), Eisen(II) und Zink(II), welche ebenfalls als

Lewis-Säure agieren, ausgetauscht werden konnten. Mit Zink(II), welches nach Kupfer(II) in Wasser die zweitstärkste Lewis-Säure ist, konnte die Aktivität der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** im Vergleich zu Kupfer(II) und den Kontrollreaktionen innerhalb einer Stunde um das Dreifache gesteigert werden. Damit war die HHD-Mutante mit koordiniertem Zink(II) Startpunkt für weitere Untersuchungen des artifiziellen Zink(II)-bindenden tHisF-Systems in dieser Arbeit.<sup>145</sup> Nach der Bestätigung der Aktivität mit den Zink(II) koordinierenden tHisF Varianten, bei welcher auffällig ist, dass mit der HHD- und NC-Variante eine in den Fehlertoleranzen liegende gleiche Aktivität erreicht wird, wurde die Reaktion hinsichtlich ihrer Selektivität untersucht. Erwartet wurde, dass die HHD analog den Ergebnissen zur Diels-Alder Reaktion von Azachalcon **5** mit Cyclopentadien **6**, im Vergleich zu den Negativkontrollen in Pufferlösung, mit freiem Zink(II) und mit der NC-Mutante, eine deutliche Selektivität aufweist. Bei einer selektiven Zink(II) Koordination an die Triade und Bindung des Azachalcons **5** an das Zink(II) könnte der nukleophile Angriff nur von einer Seite erfolgen, da die Metallbindestelle im Inneren des TIM-Barrels der tHisF liegt. Die experimentellen Ergebnisse entsprachen nicht den Erwartungen, sondern zeigten sowohl für die HHD- als auch für die NC-Mutante eine racemische Produktbildung, sowie für die Negativkontrollreaktionen in Pufferlösung und mit freiem Zink(II) unerwartet hohe und unerklärliche *ee*-Werte.

Zuerst galt es zu klären, warum in der Michael Reaktion mit den tHisF-Mutanten keine Selektivität beobachtet werden konnte, wofür getestet wurde, wie spezifisch die Koordination von Zink(II) an die His/His/Asp-Triade ist. Mit Hilfe des colometrischen Assay mit 4-(2-Pyridylazo)resorcinol **20** (PAR), welches Zink(II) mit einer Bindungsaffinität von  $K_D = 250 \text{ nM}$  koordiniert wurde die Zink(II)koordination der HHD- und NC-Mutante bestimmt. Die vergleichbaren Ergebnisse der beiden Mutanten haben gezeigt, dass es nicht zu einer spezifischen Koordination in der HHD-Mutante kommt. Viel mehr wird das Zink(II) in der HHD- und NC-Mutante unspezifisch an der Oberfläche mit einem  $K_D$ -Wert von  $\geq 1000 \text{ nM}$  ( $\triangleq 10^{-6} \text{ M}$ ) koordiniert.<sup>148</sup> Eine teilweise Oberflächenkoordination des Kupfer(II) an der tHisF wurde bereits von Reetz *et al.* durch Elektronenspinresonanzspektroskopie gezeigt. Wie hoch der Anteil einer unspezifischen Bindung ist, wurde aber nicht bestimmt.<sup>42</sup> Dennis Wetzl zeigte zudem durch Röntgenfluoreszenzmessungen, mit welchen er die absolute Kupfer(II)konzentration in den Enzymlösungen bestimmte, dass bei Raumtemperatur mehr Kupfer(II) an der Oberfläche bindet als an der spezifischen His/His/Asp-Triade.<sup>146</sup> Die Bestimmung einer Größenordnung für die Bindungsaffinität des

Zink(II) zeigt, dass auch mit Zink keine oder nur eine geringe spezifische Koordination an die Metallbindestelle möglich ist und die Einführung einer intakten artifiziiellen Metallbindestelle gewisse Schwierigkeiten mit sich bringt. Die Triade befindet sich zwar auf zwei benachbarten  $\beta$ -Faltblättern, welche in Bezug auf die Proteinkonformation stabil sind. Die Aminosäureseitenketten können jedoch in wässriger Lösung durch Rotation verschiedene Konformationen einnehmen, mit der Folge, dass sich die Bindungswinkel für das Metallion negativ verändern und damit keine spezifische Koordination mehr möglich ist (**Abbildung 57**).



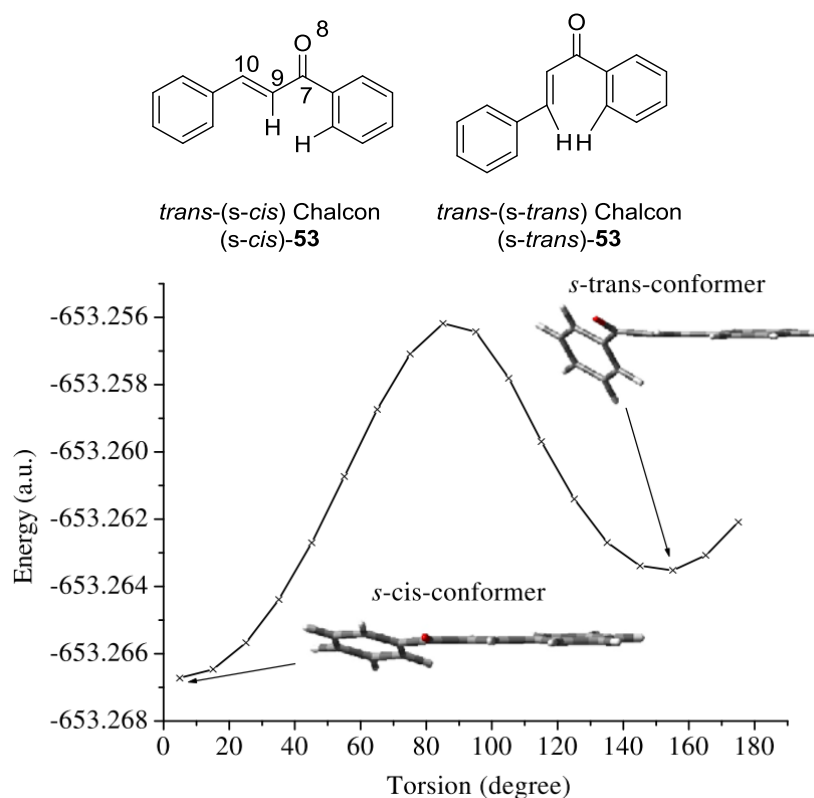
**Abbildung 57:** (a) His50/His52/Asp11-Triade als artifiziielle Metallbindestelle. (b) Zwei beispielhafte verschiedene Konformationen der Histidin Aminosäureseitenkette an Position 52, mit welcher aufgrund der Orientierung keine Metallbindung möglich wäre.

Viel mehr kommt es wahrscheinlich durch die an der Proteinoberfläche vorhandenen Asparagin- und Glutaminsäure Aminosäureseitenketten zu einer unspezifischen Koordination des Zinks. Diese hat zur Folge, dass die Aktivität der Reaktion, sowohl in der tHisF-Mutante HHD mit spezifischer Metallbindestelle, als auch in der NC-Mutante ohne Metallbindestelle deutlich ansteigt.

Im zweiten Schritt wurden die hohen Selektivitäten von ~30 % in Pufferlösung und mit freiem Zink(II) detailliert untersucht. Das Prinzip der enantioselektiven Katalyse besagt, dass die Chiralität der Produkte auf dem Einsatz von chiralen Katalysatoren beruht und

durch die Stabilität des Übergangszustands mit dem Katalysator bestimmt wird. Grundsätzlich sind mit einem chiralen Katalysator zwei Übergangszustände von Katalysator und Substrat möglich. Dabei ist unter Einsatz eines chiralen Katalysators ein Übergangszustand energetisch niedriger (*matched pair*) als der andere, bei welchem es zu sterischen Hinderungen kommt (*mismatched pair*). Aus den resultierenden, unterschiedlich stabilen Übergangszuständen folgen verschiedene Produktbildungsgeschwindigkeiten für die verschiedenen Enantiomeren und das Enantiomer mit dem stabilsten Übergangszustand wird bevorzugt gebildet. Wird eine Reaktion mit einem achiralen Katalysator durchgeführt, das heißt es kommt kein chiraler Ligand zum Einsatz, ist jeder Übergangszustand energetisch gleich und es folgt eine racemische Produktverteilung. In den Negativkontrollen der Michael Reaktion ist dies der Fall, es befindet sich kein chiraler Ligand, welcher für die Chiralität der Reaktion verantwortlich ist, in dem Reaktionsgemisch. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Chiralität der Reaktion vom Azachalcon **5** in Form einer Prochiralität des Substrats ausgeht.

Die detaillierte Betrachtung der gut charakterisierten und verwandten Chalcon-Struktur **53** zeigt, dass von den beiden möglichen Konformeren *cis* und *trans*, immer das *trans* Konformer vorliegt, da es im *cis* Konformer zu sterischen Hinderung zwischen dem Benzolring und der Carbonylgruppe kommt. Vom *trans* Konformer wiederum gibt es zwei Konformere, das *trans*-(*s-cis*) und das *trans*-(*s-trans*). Aus der Potentialkurve der berechneten Gleichgewichtsstruktur kann man erkennen, dass das *trans*-(*s-cis*)-Chalcon **53** wie angenommen planar ist. Beim *trans*-(*s-trans*), kommt es durch die sterische Hinderung zwischen den Wasserstoffatomen zu einem Torsionswinkel zwischen O8-C7-C9-C10, welcher  $5^\circ$  und  $-152^\circ\text{C}$  beträgt und ein nicht-planares Molekül zur Folge hat, welches damit prochiral ist und den nukleophilen Angriff von einer Seite begünstigt (**Abbildung 58**).<sup>159</sup>



**Abbildung 58:** Die beiden mögliche Konformere des Chalcons **53** *trans*-(*s-cis*) und *trans*-(*s-trans*), sowie die Energiepotentialkurve für den O8-C7-C9-C10 Torsionswinkel in *trans*-Chalcon **53**.<sup>159</sup>

Aus der von Gong *et al.* errechneten Energiepotentialkurve kann festgestellt werden, dass die Energiedifferenz der beiden Konformere 2,0 kcal/mol beträgt und durch eine Barriere in Höhe von 6,6 kcal/mol getrennt ist. Dadurch ist ein Übergang der beiden Konformere ineinander leicht möglich.<sup>159</sup> Der leichte Übergang der beide Konformere in Lösung wurde durch IR Studien bestätigt, diese zeigen dass sich die C=O Bande des Chalcons **53** bei ca. 1650 cm<sup>-1</sup> in zwei Banden bei 1670 cm<sup>-1</sup> für das *s-cis* und 1648 cm<sup>-1</sup> für das *s-trans* aufspaltet. Die Intensitäten der beiden Banden sind abhängig von der Polarität des Lösungsmittels, da die beiden Konformere unterschiedliche Dipolmomente von 3,25 Debye für *s-cis* und 3,80 Debye für *s-trans* besitzen. Das Gleichgewicht verschiebt sich dadurch mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels auf die Seite des *s-trans* Konformerer.<sup>160,161</sup> Studien für das Azachalcon **5** zeigen vergleichbare Ergebnisse, das planare *trans*-(*s-cis*) befindet sich mit einem Torsionswinkel von 0° in einem Energieminimum. Das *trans*-(*s-trans*) Konformer mit einem Torsionswinkel von 150° ist 1,88 kJ/mol weniger stabil, so dass auch beim Azachalcon **5** das *s-trans* Konformer als prochirales Molekül vorliegt.<sup>162</sup>



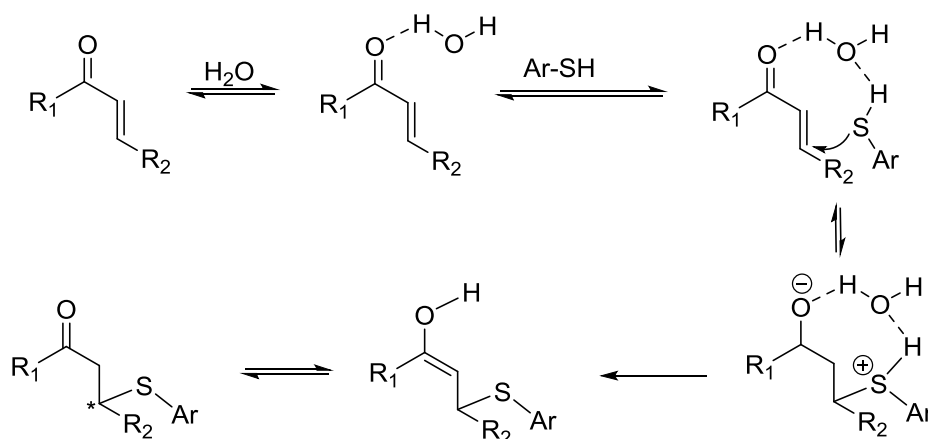
In dieser Arbeit durchgeführte IR-Studien für das Azachalcon **5** bestätigten sowohl die Anwesenheit des planare *trans*-(*s-cis*) als auch des prochirale *trans*-(*s-trans*). Somit ist mit großer Wahrscheinlichkeit das Gleichgewicht aus beiden Konformeren für die hohen Selektivitäten der Michael Reaktion in Wasser ohne Anwesenheit eines Katalysators verantwortlich. Diese Aussage wurde durch experimentelle Ergebnisse weiter gestützt indem die Umsetzungen bei insgesamt fünf verschiedenen Temperaturen (4°, 12°, 25°, 40° und 60°C) durchgeführt wurden. Mit Absenken der Temperatur sollte der Übergang der beiden Isomere ineinander durch die mangelnde Energie erschwert und somit eine Erhöhung der Selektivität beobachtet werden. Im Gegenzug sollte bei Erhöhung der Temperatur und dem damit verbundenen Einbringen von Energie, der Übergang der Konformere erleichtert werden und die Selektivität sinken. Die Ergebnisse bestätigten diese Annahme indem ein deutlicher Selektivitätsverlust bei Erhöhung der Temperatur zu beobachten war. Zusätzlich wurden die Reaktionen in Bis-Tris-HCl Puffer pH 7,0 entsprechend der Negativkontrolle der Biotransformationen durchgeführt, um den Einfluss des Puffersalzes auf die Selektivität der Reaktion zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, bei unterschiedlichen Temperaturen dasselbe Bild wie bereits in Wasser, jedoch waren die Selektivitäten allgemein geringer. Ein Grund könnte sein, dass bei Zugabe von Puffer das Wasserstoffbrücken-Netzwerk durch die Puffermoleküle gestört wird. Die Folge ist eine Destabilisierung des *s-trans* Konformers und daraus folgend geringere Selektivität im Vergleich zu Wasser als Reaktionsmedium.

#### **5.1.4 Erweiterung des Spektrums von Schwefelnukleophilen in der Michael Addition**

In einem weiteren Schritt sollte nach der initialen positiven Aktivitätssteigerung der tHisF in der Michael Reaktion von Azachalcon **5** mit Mercaptoethanol **18** das Substratspektrum der Thiole in Form von aromatischen und aliphatischen Thiolen zum Aufbau verschiedenster schwefelhaltiger Substanzen erweitert werden. Insgesamt wurden vier aromatische Thiole, 4-Methoxythiophenol **22a**, 4-Methylthiophenol **22b**, Benzylmercaptan **22c** und 4-Nitrothiophenol **22d**, sowie 1-Propanthiol **24** als aliphatisches Thiol ausgewählt.

Alle aromatischen Thionukleophile zeigten in Pufferlösung und bei Zugabe von Zink(II) bereits nach einer 1 h Reaktionszeit hohe Hintergrundreaktionen von 53 – 60 %. Eine mögliche Erklärung für diese hohen Aktivitäten ist das Prinzip der Katalysator-freien

Michael Reaktion in Wasser, welches von Khatik *et al.* beschrieben wurde. Es wurde gezeigt, dass Wasser einen begünstigenden Einfluss auf die Michael Reaktion von verschiedenen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylsubstraten mit aromatischen und aliphatischen Thiolen hat. Durch Wasserstoffbrückenbindung mit dem Wasser wird der elektrophile Charakter am  $\beta$ -Kohlenstoff des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylsubstrats gesteigert und gleichzeitig durch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thiol und Wasser die Nucleophilie des Thiols erhöht. Anschließend kann durch die doppelte Aktivierung über Wasserstoffbrückenbindungen im Übergangszustand der nucleophile Angriff und intramolekulare Protonentransfer zum konjugierten Produkt erfolgen (**Abbildung 59**).<sup>163</sup>



**Abbildung 59:** Vorgeschlagener Mechanismus zur dualen Aktivierung durch Wasser während der Thiol-Michael Reaktion.<sup>163</sup>

Die relative Wasserstoffbrücken-Bildungskapazität der unterschiedlichen Thiole hat zur Folge, dass aromatischen Thiole aktiver sind als aliphatische, welche eine geringere Sulfhydryl-Wasserstoff Acidität und deshalb eine schlechtere Wasserstoffbrücken-Bildungskapazität besitzen. Dies zeigt auch das Ergebnis mit dem getesteten aliphatischen Thiol, 1-Propanthiol **24**, welches in Pufferlösung eine geringe Aktivität von 13 % zeigte. Freies Zink(II) als Katalysator konnte die Aktivität der Michael Reaktion mit aromatischen Thiolen bereits zu einem fast vollständigen Umsatz mit bis zu 90 % und beim aliphatischen auf 70 % steigern. Der zusätzliche Einsatz der Zink(II) koordinierenden tHisF HHD-Mutante führt hingegen nicht zu einer weiteren Aktivitätssteigerung und zeigte innerhalb der Fehlertoleranzen vergleichbare Aktivitäten wie mit freiem Zink(II). Durch den Einsatz der tHisF, welche bei einer spezifischen Koordination als chiraler Ligand für das Zink(II) dienen könnte, wäre eine selektive Durchführung der Michael Reaktionen möglich. Die chirale Analyse zeigte jedoch für alle Thionucleophile, dass die Reaktion unter Bildung der

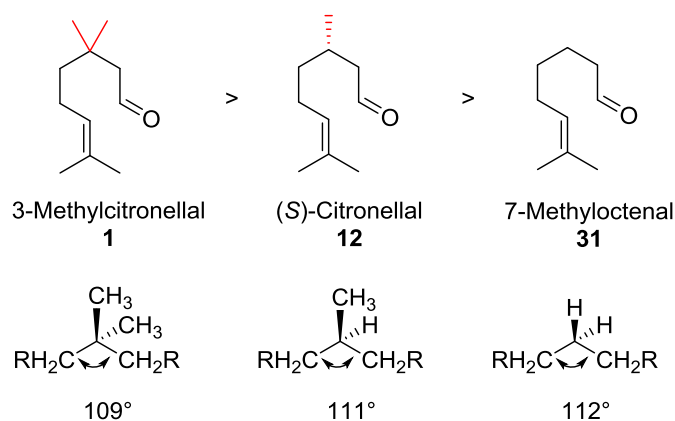
racemischen Produkte abläuft und bestätigt damit die bereits in Kapitel 5.1.3 diskutierte Hypothese, dass keine spezifische Zink(II)koordination an das Enzym stattfindet und somit auch keine Selektivität durch das Enzym als chiralen Liganden des Zink(II) induziert werden kann.

## 5.2 Squalen-Hopen Zyklase als chirale Brønsted-Säure

### 5.2.1 Prins Reaktion von Citronellal-Analoga durch Aktivierung der Carbonylfunktion

Die SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*) hat, wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde, eine große Akzeptanz gegenüber nicht-natürlichen Substraten, so können die Polyzyklisierungen von verschiedenen terminal funktionalisierten Polyenen katalysiert werden.<sup>103,115,116</sup> Bei Monozyklisierungen ist die Akzeptanz deutlich geringer, was auf die schlechte Fähigkeit der *AacSHC* die kurz-kettigen Substrate in der reaktiven Konformation zu stabilisieren zurück zu führen ist. Durch die bereits vorgestellte fokussierte *AacSHC*-Mutantenbibliothek konnten Varianten mit einer deutlich gesteigerten Aktivität für die Monozyklisierung von Geraniol und Epoxygeraniol identifiziert werden. Mit der Mutante G600F und F365C war es zum ersten Mal möglich Geraniol und mit der Mutante Y420W Epoxygeraniol zu zyklisieren. Zudem war es möglich durch die katalytisch aktive Asparaginsäure auch die Carbonylgruppe von Citronellal **12** zu protonieren und somit die Prins Reaktion zu Isopulegol **13**, einer Vorstufe des industriell wichtigen Menthol, zu katalysieren. Bemerkenswert ist dabei die hohe Stereoselektivität, die Zyklisierung von (*S*)-Citronellal **12** mit der I261A Mutante, welche selektiv zum (-)-*neoiso*-Isopulegol **13** verläuft. Die *AacSHC* Mutante ist in der Lage selektiv einen bestimmten sesselförmigen Übergangszustand des Citronellals **12** zu stabilisieren und die selektive Umsetzung zu einem Produkt zu ermöglichen.<sup>117,118</sup> Ausgehend von diesem Startpunkt, wurde das Substratspektrum der Prins Reaktion um das 3-Methylcitronellal **1** und das 7-Methyloctenal **31** erweitert. Im Vergleich zu Citronellal **12** unterscheiden sich 3-Methylcitronellal **1** und 7-Methyloctenal **31** in ihrer Struktur durch das Methylierungsmuster am C-3. In der chemischen Synthese hat die Substitution am C-3 bei der Zyklisierung zum Cyclohexanring eine entscheidende Auswirkung auf die Reaktivität der Zyklisierung. Je höher substituiert das tetraedrische C-3-Atom ist, desto kleiner ist der Winkel zwischen den beiden zu

zyklisierenden Resten und die Reaktion wird beschleunigt. Dieser chemische Effekt ist in der Literatur als Thorpe-Ingold Effekt beschrieben (**Abbildung 60**).<sup>150</sup>

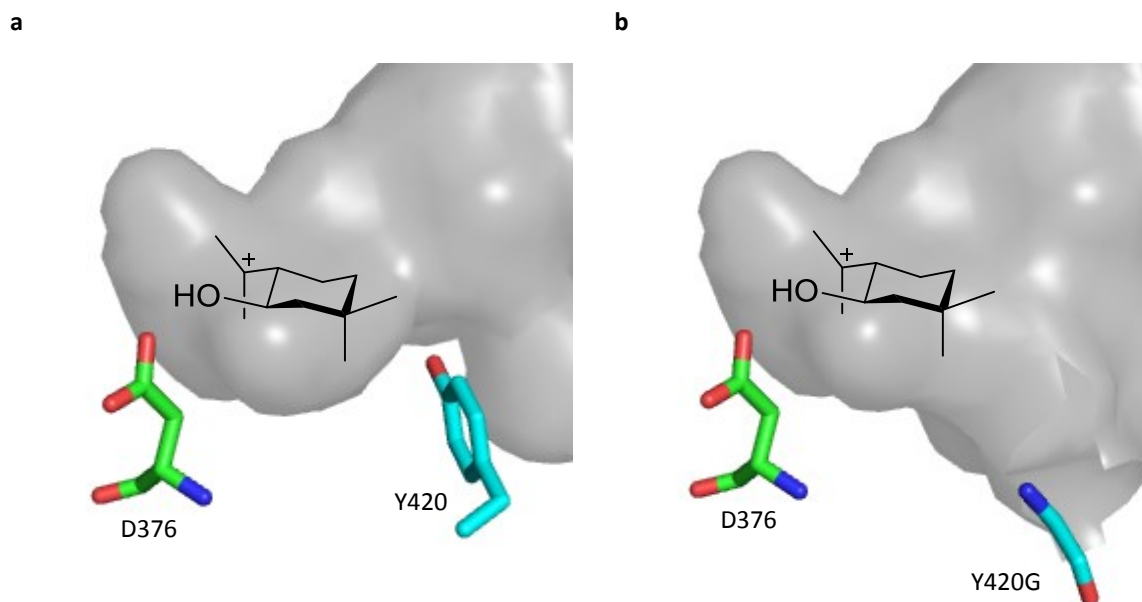


**Abbildung 60:** Struktur von 3-Methylcitronellal **1**, Citronellal **12** und 7-Methyloctenal **31** mit unterschiedlichen Methylierungsmuster am C-3. Abhängig von der Substitution am tetraedrischen Kohlenstoffatom ändert sich der Winkel zwischen den zu cyclisierenden Resten. Je größer die Substituenten werden, desto kleiner wird der Winkel zwischen den an der Zyklisierung beteiligten Resten, was zu einer Steigerung der Reaktivität der höher substituierten Substrate führt.<sup>150</sup>

Die Umsetzungen der beiden Substrate unter Einsatz der *AacSHC* und der *AacSHC*-Mutantenbibliothek mit einer Reaktionszeit von 40 h verliefen mit guten bis sehr guten Selektivitäten und es waren beachtliche Aktivitätssteigerungen zu beobachten. Sowohl für das 3-Methylcitronellal **1** als auch für das 7-Methyloctenal **31** konnten zum Citronellal **12** ( $0,59 \pm 0,03$  %) vergleichbare Aktivitäten von  $0,77 \pm 0,13$  % und  $0,69 \pm 0,07$  % erreicht werden. Alle drei Substrate sind im Verhältnis zum natürlichen Substrat Squalen **8** sehr klein, wodurch die vorgefaltete reaktive Konformation in der aktiven Tasche des Wildtyps nur schlecht stabilisiert wird. Mit der *AacSHC*-Mutantenbibliothek steht ein diverses Set an verschiedenen Formen der aktiven Tasche zur Verfügung, welche auf Mutanten mit einer gesteigerten Aktivität gegenüber einem Substrat durchsucht werden können. Als beste Mutante für *S*-Citronellal **12** wurde die I261A Mutante identifiziert. Sie weist im Vergleich zum Wildtyp eine 10-fach höheren Aktivität auf und zeigt auch für 7-Methyloctenal **31** eine sehr gute, für 3-Methylcitronellal **1** nur eine mäßige Aktivitätssteigerung. Für 7-Methyloctenal **31** wurde die Mutation I261A mit einer 29-fach gesteigerten Aktivität von  $20,17 \pm 1,28$  % ebenfalls als beste Mutante identifiziert. Die Position 261 liegt  $14 \text{ \AA}$  von der katalytisch aktiven Asparaginsäure entfernt, weshalb ihr Einfluss auf die Aktivität und Selektivität der Reaktion nicht einfach durch die direkte Strukturveränderung der aktiven Tasche und daraus folgend einer verbesserten Stabilisierung der reaktiven gefalteten Konformation erklärt werden kann. Hammer *et al.* führt als Gründe Strukturänderungen, wie zum Beispiel

die Umorientierung benachbarter Aminosäuren durch die Mutation I261A an. Das Isoleucin 261 ist mit der Ausnahme von Tryptophan W169 nur von kleinen Aminosäuren mit relativ unflexiblen Seitenketten umgeben. Studien zu den verschiedenen Aminosäuren-Seitenkettenkonformationen von W169 ausgelöst durch unterschiedliche Mutationen der Position 261 zeigt, dass durch die kleinen Aminosäuren Alanin und Glycin der für zuvor unzugängliche Rotamere der W169 benötigte Platz geschaffen wurde.<sup>117,118</sup> Diese strukturellen Veränderungen mit Neuorientierung benachbarter Aminosäureseitenketten sind wahrscheinlich auch der Grund für die Aktivitätssteigerung der I261A Mutante in der Zyklisierung von 7-Methyloctenal **31**. Die gesamte Struktur der aktiven Tasche verändert sich durch die Mutation, so dass die reaktive Konformation im Übergangszustand bei der Zyklisierung von 7-Methyloctenal **31** besser stabilisiert wird und es neben der Aktivitätssteigerung zudem zu einer Steigerung der Diastereoselektivität *trans:cis* von 59:41 im Wildtyp auf 89:11 mit der I261A Mutante kommt. Bei 3-Methylcitronellal **1** kommt es mit der I261A nur zu einer mäßigen Aktivitätssteigerung um das sechsfache im Vergleich zum Wildtyp auf  $5,09 \pm 0,57$  %. 3-Methylcitronellal **1** ist im Vergleich zu Citronellal **12** und 7-Methyloctenal **31** durch die beiden Methylgruppen am C-3 größer und die indirekten strukturellen Veränderungen sind für gute Aktivitätssteigerung nicht ausreichend. Stattdessen konnte für das 3-Methylcitronellal **1** die Mutationen des Tyrosins an der Stelle 420 gegen die kleineren hydrophoben Aminosäuren Glycin und Alanin eine 10-fache Steigerung der Aktivität auf  $9,52 \pm 0,65$  % und  $8,59 \pm 0,59$  % erreicht werden. Die Reaktion verlief zudem unter der kompletten Kontrolle der Selektivität zum *trans*-(1*R*,2*S*)-3-Methylisopulegol **2**. Die Position 420 befindet sich 9 Å von der katalytisch aktiven Asparaginsäure entfernt und hat damit durch die Größe der entsprechenden Aminosäuren-Seitenketten direkten Einfluss auf die Struktur der aktiven Tasche und damit auf die Koordination des Substrates im Übergangszustand. 3-Methylcitronellal **1** besitzt am C-3 sowohl eine axiale als auch eine äquatoriale Methylgruppe, welche im reaktiven Übergangszustand in der Y420A und Y420G Mutante keine sterische Hinderung im Vergleich zum Wildtyp vorfinden. Die damit verbundene verbesserte Stabilisierung führt zu einer Erhöhung der Aktivität und Selektivität (**Abbildung 61**). Der positive Einfluss durch die Mutation an der Position Y420 hin zu sterisch weniger anspruchsvollen Aminosäuren wie Glycin oder Alanin wurde auch in der Reaktion von *R*-Citronellal **12** von Silke Bastian in ihrer Dissertation beobachtet. Im Wildtyp kommt es zu einer schlechteren Stabilisierung der reaktive Konformation des *R*-Citronellals **12** im Vergleich zum *S*-Citronellal **12** was sich auf

die Aktivitätssteigerung und Diastereoselektivität auswirkt und durch die Mutation an der Position Y420 teilweise ausgeglichen werden kann.<sup>164</sup>



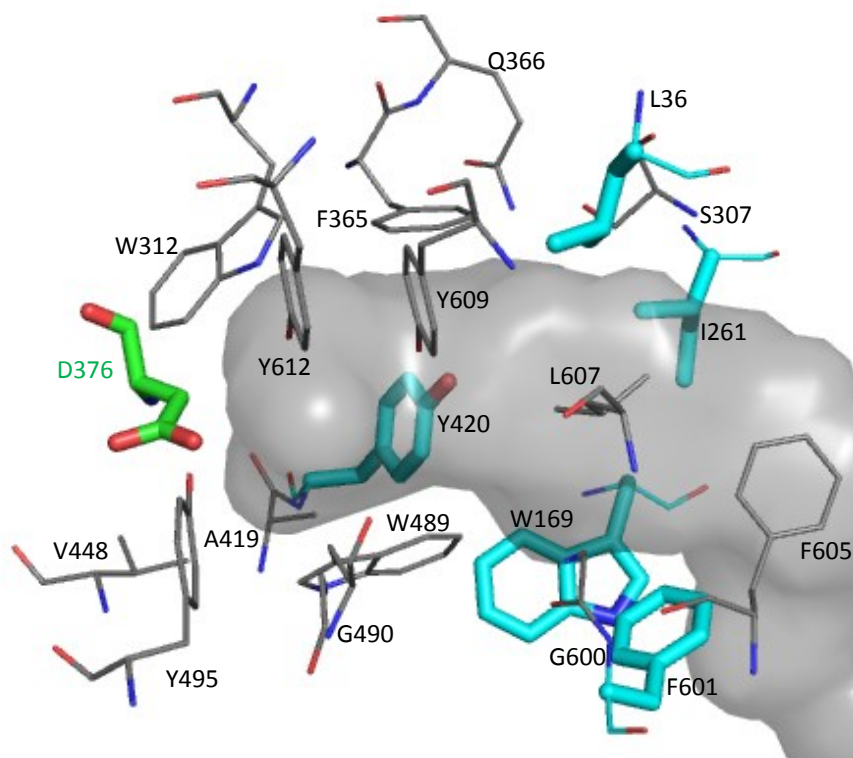
**Abbildung 61:** (a) Aktive Tasche der *AacSHC* Wildtyp mit einem Tyrosin an Position 420 (cyaner Stick), mit welchem es im Übergangszustand durch die beiden Methylgruppen des 3-Methylcitronellal **1** kommt es zu einer sterischen Hinderung mit der äquatorialen Methylgruppe kommt. (b) Mutante der *AacSHC*, in welcher das Tyrosin an Position 420 durch das sterisch weniger anspruchsvolle Glycin ersetzt und damit die sterische Hinderung der äquatorialen Methylgruppe im Übergangszustand beseitigt ist.

Die ähnlichen Ergebnisse des Wildtyps, sowie die Identifikation von unterschiedlichen Mutanten für jedes Substrat zeigen, dass die Struktur der aktiven Tasche und die damit verbundene Stabilisierung des Übergangszustands den Hauptausschlag für die Aktivität und Selektivität der Reaktion sind. Chemische Effekte, wie der Ingold-Thorpe Effekt bei einer unterschiedlichen Anzahl an Methylgruppen am C-3 des Substrats, haben bei Anwesenheit der enzymatischen Brønsted-Säure *AacSHC* einen geringen bis gar keinen Einfluss auf die Aktivität der Zyklisierung.

### 5.2.2 Erstellung von Doppelmutanten für die Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal (**1**)

Ausgehend von der initialen Aktivitätssteigerung der Zyklisierung von 3-Methylcitronellal **1** mit der Y420A und Y240G Mutante wurden mit alle Einzelmutanten, welche eine im Vergleich zum Wildtyp mindestens 3,5-fach erhöhte Aktivität aufweisen, durch systematische Kombination in Doppelmutanten vereint. Die Mutation des Tyrosins an

Position 420 in die kleinere Aminosäuren Glycin und Alanin haben vermutlich, wie bereits diskutiert, eine direkte Veränderung der Struktur der aktiven Tasche und Beseitigung von sterischen Hinderungen für die Methylgruppen an dem C-3 Atom zur Folge. Die anderen aktiveren Mutationen mit einer im Vergleich zum Wildtyp 3,5 – 10-fach gesteigerten Aktivität sind L36A, W169G, I261A und F601G. Für das Isoleucin 261 mutiert zum Alanin wurde bereits für die Umsetzung von 7-Methyloctenal **31** der Einfluss auf die Struktur und damit verbunden der Umorientierung benachbarter Aminosäuren beschrieben. Die drei weiteren Mutationen befinden sich bei detaillierter Betrachtung der Struktur in direkter Nähe zum Isoleucin 261 und haben durch ihre mit 14 Å relativ weite Entfernung von der katalytisch aktiven Asparaginsäure, vermutlich einen ähnlichen indirekten Einfluss wie I261A. (**Abbildung 62**).



**Abbildung 62:** Struktur der aktiven Tasche der AacSHC mit den Mutationen der Mutantenbibliothek. Die Mutationen mit positivem Einfluss auf die Aktivität der Prins Reaktion von 3-Methylcitronellal **1** sind in cyan hervorgehoben.

Die Kombination der Mutationen für die beiden Effekte mit direktem und indirektem Einfluss auf die Struktur der aktiven Tasche in Doppelmutanten zeigte, dass mit der I261A\_Y420G eine 47-fache Steigerung der Aktivität auf  $42,03 \pm 4,36$  % im Vergleich zum Wildtyp und eine 4-fache Steigerung im Vergleich zur Y420G Mutante ohne Verlust von

Selektivität möglich ist. Dass die Strategie der gezielten Kombination von identifizierten Einzelmutationen zu Mutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten zu einer Aktivitäts- und Selektivitätssteigerung führt, konnte für *R*-Citronellal **12** auch von Silke Bastian gezeigt werden.<sup>164</sup> Die Struktur der aktiven Tasche der *Aac*SHC kann somit durch gezielte Mutation nahezu perfekt auf ein bestimmtes Substrat angepasst werden. In dieser wird das Substrat in seiner gefalteten reaktiven Konformation stabilisiert und die katalytisch aktive Asparaginsäure kann es in seiner Funktion als spezifische chirale Brønsted-Säure selektiv protonieren und die Zyklisierung katalysieren.

### 5.2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Ringgröße in der *Aac*SHC katalysierten Monozyklisierung

Neben Sechsringen, sind in natürlichen Ringsystemen, von zum Beispiel Terpenen und Steroiden, vor allem Fünf- und Siebenringe im Kohlenstoffgerüst zu finden und damit ist ihr Aufbau auch in der Naturstoffsynthese von Bedeutung.<sup>140,165</sup> Die Prins Reaktion spielt dabei eine große Rolle und ist mit verschiedensten chemischen Katalysatoren weit verbreitet.<sup>166-168</sup> Die enzymatische Zyklisierung zu Sechsring-Produkten mit chiralen Zentren ist mit Hilfe der Squalen-Hopen Zyklasen für viele Beispiele mit verschiedenen terminal funktionalisierten Substraten gut bekannt.<sup>103,115,116</sup> Im nächsten Schritt wurde die Prins Reaktion im Hinblick auf die bei der Zyklisierung gebildete Ringgröße untersucht. Anhand von 3,3,6-Trimethylheptenal **38** und 8-Methylnonenal **44** als Modellsubstrate wurde der Aufbau von Fünfring- und Siebenring-Produkten mit der *Aac*SHC und der *Aac*SHC Mutantenbibliothek studiert. Die Zyklisierung der verschiedenen Substrate verläuft abhängig von der Ringgröße des resultierenden Produkts über unterschiedliche Konformationen des Übergangszustands. Energetisch am günstigsten ist der Aufbau eines Sechsrings über die bereits erwähnte Sesselkonformation, in welcher keine Ringspannung vorhanden ist und damit einer Spannungsenergie pro CH<sub>2</sub>-Gruppe von ~0 kJ/mol entspricht. Im Vergleich sind Fünf- und Siebenring mit einer Spannungsenergie von 5,4 kJ/mol und 3,8 kJ/mol pro CH<sub>2</sub>-Gruppe energetisch ungünstiger.<sup>169,170</sup> Sie verlaufen im Übergangszustand über die Briefumschlagkonformation beim Fünfring und über die verdrillten Sesselkonformation beim Siebenring (**Abbildung 63**).





**Abbildung 63:** Konformation des Übergangszustandes bei der Bildung von Fünf-, Sechs- und Siebenringen.

Für die Zyklisierung von 3,3,6-Trimethylheptenal **38** konnten mit dem *Aac*SHC Wildtyp Spuren <0,5 % des *trans*-Produkts nachgewiesen werden und zwei beste Mutanten I261G und F601G mit einem Umsatz von jeweils 0,8 % identifiziert werden. Für das 8-Methylnonenal **44** konnte weder mit dem *Aac*SHC Wildtyp noch mit einer Mutante der *Aac*SHC-Mutantenbibliothek eine Aktivität nachgewiesen werden. Die aktive Tasche der *Aac*SHC ist offensichtlich für die Stabilisierung der Sesselkonformation optimiert und nicht oder nur bedingt zur Stabilisierung andere Konformationen geeignet. Die erstmals gezeigte geringe Aktivität der beiden Mutanten I261G und F601A gegenüber 3,3,6-Trimethylheptenal **38** ist vermutlich, auf Grund ihrer Entfernung von der katalytisch aktiven Asparaginsäure wie bereits für Citronellal **12** und 7-Methyloctenal **31** in Kapitel 5.2.1 diskutiert, auf die Strukturänderungen und der damit verbunden Umorientierung benachbarter Aminosäuren zurückzuführen. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass es mit der *Aac*SHC möglich ist nicht-natürliche Konformation zu stabilisieren und die Zyklisierung zu katalysieren. Ausgehend von der initialen Aktivität des Wildtyp und der Einzelmutanten sollte es durch die gute Evolvierbarkeit der *Aac*SHC möglich sein diese mit Hilfe von evolutiver Methoden zu optimieren und zu effektiven Biokatalysatoren für den Aufbau verschiedenster Ringsysteme zu entwickeln.

## 5.3 Ausblick

### 5.3.1 Zink-abhängigen Metalloenzymen als enzymatische Lewis-Säuren

In dieser Arbeit wurde die Ausnutzung der katalytischen Promiskuität von Metalloenzymen anhand zweier Enzymsystem mit jeweils einer Modellreaktion untersucht. Dabei war das Ziel das am Enzym über eine His/His/Asp-Triade koordinierte Zink(II) als Lewis-Säure für die Aktivierung einer Carbonylfunktion zu verwenden und die Katalyse von wichtigen organischen Reaktionen zum Aufbau neuer Kohlenstoff-Kohlenstoff bzw. Kohlenstoff-Heteroatom Bindungen mittels enzymatischer Lewis-Säure Katalysatoren zugänglich zu

machen. In den verschiedenen Studien traten bei der Umsetzung drei Hauptprobleme auf, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden:

- die Größe der aktiven Tasche,
- die spezifische Koordination des Zink(II) an das Proteingerüst und
- die Substratauswahl.

Aus den Erkenntnissen lassen sich Schlüsse für die Voraussetzungen einer zukünftigen erfolgreichen Entwicklung von Enzymen als chirale enzymatische Lewis-Säure Katalysatoren ableiten. Zum einen spielt die Auswahl des Proteingerüsts und die damit verbundene Größe der aktiven Tasche eine wichtige Rolle. Es muss gewährleistet sein, dass die entsprechenden Substrate und der Übergangszustand der Modellreaktion aktiv koordinieren und aktiviert werden können. Zudem ist die ausreichende Größe der aktiven Tasche im Hinblick auf den Einsatz eines größeren Substratspektrums essentiell. Bei der große Auswahl an natürlichen Zink(II)-abhängigen Enzymen ist die Voraussetzung einer großen, gut zugänglichen aktiven Tasche zum Beispiel bei Aminopeptidasen oder Carboxypeptidasen gegeben, welche in der natürlichen Reaktion die Hydrolyse von Peptidbindungen im Protein oder von dessen C-terminalen Ende aus katalysieren.<sup>58,171-173</sup> Dabei sind vor allem thermophile Enzyme von Interesse, da diese auch bei den, für viele organische Reaktionen benötigten, erhöhten Temperaturen stabil sind oder größere Mengen an organischen Lösungsmitteln, welche unabdingbar sind um die Edukte in Lösung zu bringen, tolerieren können.<sup>174</sup> Wird ein artifizieller Ansatz verfolgt, um für eine bestimmte Reaktion eine enzymatische Aktivität zu generieren, ist die Wahl eines geeigneten Proteingerüsts von besonderer Bedeutung, um die erfolgreiche Einführung einer spezifischen artifiziellen Metallbindestelle zu ermöglichen. Die spezifische Metallkoordination ist wie auch Arbeiten von Baker *et al.* zeigen schwierig, da eine Rotation der koordinierenden Aminosäurereste in Lösung oft nicht auszuschließen, deren präzise Ausrichtung und explizit definiert Konformation dafür jedoch Voraussetzung ist.<sup>133</sup>

### **5.3.2 Nutzung der Squalen-Hopen Zyklase *AacSHC* als chirale Brønsted-Säure Katalysatoren**

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die *AacSHC* und ihre Mutanten mit ihrer effizienten und effektiven Protonierungsmaschinerie in Form eines *anti*-orientierten Protons der katalytisch aktiven Asparaginsäure als Brønsted-Säure Katalysator verwendet

werden können. Die *AacSHC* kann terminale C-C Doppelbindungen und Carbonylgruppen verschiedenster Substrate protonieren und damit intramolekulare selektive (Poly)zyklisierungsreaktionen katalysieren.<sup>103,111,116,118</sup> Die verschiedenen intra- und intermolekularen Reaktionen sind Ausgangspunkt für die Weiterentwicklung der *AacSHCs* als selektive Protonasen für weitere nicht-natürliche Reaktionen in der organischen Synthesechemie. Möglichkeiten zur Weiterentwicklung der *AacSHC* sind dabei die gerichtete Evolution ebenso wie das rationale Design. In verschiedenen Mutationsstudien wurde bereits gezeigt, dass die *AacSHC* eine gute Evolvierbarkeit und hohe Diversität aufweist, welche für neue, nicht-natürliche Substrate und Reaktionen weiter ausgenutzt und ausgebaut werden kann.<sup>111,118</sup> Die identifizierten Einzelmutationen können durch kombinatorische Sättigungsmutagenese zu einer Aktivitätsteigerung führen, wie das Beispiel der Prins-Reaktion von 3-Methylcitronellal **1** gezeigt hat oder eine veränderte Substratspezifität und Selektivität aufweisen.<sup>175</sup> Die Aminosäuren in einer Umgebung von 15 Å wurden hauptsächlich mit Alanin, Glycin, Tryptophan und Phenylalanin mutiert. Durch Mutation in andere hydrophobe Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin und Valin, sowie durch Identifikation von weiteren Positionen sowohl der ersten als auch der zweiten Sphäre könnte die bereits vorhandene *AacSHC*-Mutantenbibliothek ergänzen und das Substrat- und Reaktionsspektrums der *AacSHC* erweitern. Weitere interessante organische Reaktionen zum Aufbau von synthetisch relevanten C-C Bindungen, katalysiert durch eine Brønsted-Säure, wären die Michael Reaktionen, Nazarov Zyklisierungen, Friedel-Craft Reaktionen und Diels-Alder Reaktionen. Mit der daraus entstanden diversen artifiziellen Protonase-Familie wäre somit ein vielseitiger Zugang zur enzymatischen Brønsted-Säure Katalyse von asymmetrische organischen Reaktionen geschaffen.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Resch, V., Schrittwieser, J. H., Siirola, E. & Kroutil, W. Novel carbon-carbon bond formations for biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 793–799 (2011).
2. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*. (Springer-Verlag, 2011).
3. Braun, M., Teichert, O. & Zweck, A. Biokatalyse in der industriellen Produktion. *Zukünftige Technol.* **57**, (2006).
4. Jimenez-Gonzales, C. & Constable, D. J. C. *Green Chemistry and Engineering: A practical Design Approach*. (Wiley VCH, 2011).
5. MacMillan, D. W. C. The advent and development of organocatalysis. *Nature* **455**, 304–308 (2008).
6. Jaeger, K., Thiemann, V. & Antranikian, G. in *Angewandete Mikrobiologie* 135–160 (Springer-Verlag GmbH, 2006).
7. Bornscheuer, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–194 (2012).
8. Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A. & Hauer, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 3070–3095 (2014).
9. Renata, H., Wang, Z. J. & Arnold, F. H. Expanding the enzyme universe: Accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution. *Angew. Chemie Int. Ed.* **54**, 3351–3367 (2015).
10. Turner, N. J. & Reilly, E. O. Biocatalytic retrosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 285–288 (2013).
11. Breuer, M. & Hauer, B. Carbon-carbon coupling in biotransformation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 570–576 (2003).
12. Khersonsky, O., Roodveldt, C. & Tawfik, D. S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 498–508 (2006).
13. Khersonsky, O. & Tawfik, D. S. Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 471–505 (2010).
14. Kourist, R., Höhne, M. & Bornscheuer, U. Maßgeschneiderte Enzyme: Gerichtete Evolution und rationales Design. *Chemie unserer Zeit* **43**, 132–142 (2009).

15. Hult, K. & Berglund, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* **25**, 231–238 (2007).
16. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 6032–6040 (2004).
17. Sharma, S. & Kanwar, S. S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. *Sci. World J.* **2014**, 1–13 (2014).
18. Schmid, A. *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258–268 (2001).
19. Branneby, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, K. & Brinck, T. Carbon - Carbon Bonds by Hydrolytic Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 874–875 (2003).
20. Munro, A. W., Girvan, H. M., Mason, A. E., Dunford, A. J. & McLean, K. J. What makes a P450 tick? *Trends Biochem. Sci.* **38**, 140–150 (2013).
21. Vaz, a D., McGinnessy, D. F. & Coon, M. J. Epoxidation of olefins by cytochrome P450: evidence from site-specific mutagenesis for hydroperoxo-iron as an electrophilic oxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3555–3560 (1998).
22. Farinas, E. T., Alcalde, M. & Arnold, F. Alkene epoxidation catalyzed by cytochrome P450 BM-3 139-3. *Tetrahedron* **60**, 525–528 (2004).
23. Coelho, P. S. *et al.* A Serine-Substituted P450 Catalyzes Highly Efficient Carbene Transfer to Olefins In Vivo. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 485–487 (2013).
24. Coelho, P. S., Brustad, E. M., Kannan, A. & Arnold, F. H. Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes. *Science* **339**, 307–310 (2013).
25. Wang, Z. J. *et al.* Improved cyclopropanation activity of histidine-ligated cytochromeP450 enables the enantioselective formal synthesis of levomilnacipran. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 6810–6813 (2014).
26. Prier, C. K., Hyster, T. K., Farwell, C. C., Huang, A. & Arnold, F. H. Asymmetric Enzymatic Synthesis of Allylic Amines: A Sigmatropic Rearrangement Strategy. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 4711–4715 (2016).
27. Farwell, C. C., Mcintosh, J. A., Hyster, T. K., Wang, Z. J. & Arnold, F. H. Enantioselective Imidation of Sulfides via Enzyme-Catalyzed Intermolecular Nitrogen-Atom Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 8766–8771 (2014).
28. Ringenberg, M. R. & Ward, T. R. Merging the best of two worlds : artificial metalloenzymes for enantioselective catalysis. *Chem. Commun.* **47**, 8470–8476 (2011).

29. Steinreiber, J. & Ward, T. R. Artificial metalloenzymes as selective catalysts in aqueous media. *Coord. Chem. Rev.* **252**, 751–766 (2008).
30. Creus, M. & Ward, T. R. Designed evolution of artificial metalloenzymes: protein catalysts made to order. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 1835–1844 (2007).
31. Heinisch, T. & Ward, T. R. Design strategies for the creation of artificial metalloenzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 184–199 (2010).
32. Reetz, M. T. Artificial metalloenzymes as catalysts in stereoselective diels-alder reactions. *Chem. Rec.* **12**, 391–406 (2012).
33. Davies, R. R. & Distefano, M. D. A Semisynthetic Metalloenzyme Based on a Protein Cavity That Catalyzes the Enantioselective Hydrolysis of Ester and Amide Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 11643–11652 (1997).
34. Reetz, M. T. *et al.* Directed evolution of enantioselective hybrid catalysts: a novel concept in asymmetric catalysis. *Tetrahedron* **63**, 6404–6414 (2007).
35. Panella, L. *et al.* Merging homogeneous catalysis with biocatalysis; papain as hydrogenation catalyst. *Chem. Commun.* **23**, 5656–5658 (2005).
36. Reetz, M. T., Rentzsch, M., Pletsch, A. & Maywald, M. Towards the Directed Evolution of Hybrid Catalysts. *Chim. Int. J. Chem.* **56**, 721–723 (2002).
37. Carey, J. R. *et al.* A site-selective dual anchoring strategy for artificial metalloprotein design. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10812–10813 (2004).
38. Wilson, M. E. & Whitesides, G. M. Conversion of a protein to a homogeneous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with a diphosphinerhodium(I) moiety. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 306–307 (1978).
39. Ward, T. R. Artificial metalloenzymes based on the biotin-avidin technology: enantioselective catalysis and beyond. *Acc. Chem. Res.* **44**, 47–57 (2011).
40. Boersma, A. J., Megens, R. P., Feringa, B. L. & Roelfes, G. DNA-based asymmetric catalysis. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2083–2092 (2010).
41. Okrasa, K. & Kazlauskas, R. J. Manganese-substituted carbonic anhydrase as a new peroxidase. *Chem. - A Eur. J.* **12**, 1587–1596 (2006).
42. Podtetenieff, J., Taglieber, A., Bill, E., Reijerse, E. J. & Reetz, M. T. An artificial metalloenzyme: creation of a designed copper binding site in a thermostable protein. *Angew. Chemie Int. Ed.* **49**, 5151–5155 (2010).
43. Yates, P. & Eaton, P. Acceleration of the Diels-Alder Reaction by Aluminum Chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4436–4437 (1960).

44. Bosnich, B. Transition-Metal-Based Lewis Acid Catalysts. *Aldrichimica Acta* **31**, 76–83 (1998).
45. Yamamoto, H. *Lewis Acids in organic synthesis*. (Wiley VCH, 2000).
46. Enthaler, S. Rise of the zinc age in homogeneous catalysis? *ACS Catal.* **3**, 150–158 (2013).
47. Łowicki, D., Baš, S. & Mlynarski, J. Chiral zinc catalysts for asymmetric synthesis. *Tetrahedron* **71**, 1339–1394 (2015).
48. Wu, X.-F. & Neumann, H. Zinc-Catalyzed Organic Synthesis: C-C, C-N, C-O Bond Formation Reactions. *Adv. Synth. Catal.* **354**, 3141–3160 (2012).
49. Brunel, J. M. BINOL: A Versatile Chiral Reagent. *Chem. Rev.* **105**, 857–898 (2005).
50. Sakane, S., Maruoka, K. & Yamamoto, H. Asymmetric cyclization of unsaturated aldehydes catalyzed by a chiral Lewis acid. *Tetrahedron Lett.* **26**, 5535–5538 (1985).
51. Sakane, S., Maruoka, K. & Yamamoto, H. Asymmetric Cyclization of Unsaturated Aldehydes Catalyzed by a Chiral Lewis Acid. *Tetrahedron* **42**, 2203–2209 (1986).
52. Du, H. & Ding, K. Enantioselective catalysis of hetero Diels-Alder reaction and diethylzinc addition using a single catalyst. *Org. Lett.* **5**, 1091–1093 (2003).
53. Suzuki, Y., Yazaki, R., Kumagai, N. & Shibasaki, M. Direct catalytic asymmetric mannich-type reaction of thioamides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 5026–5029 (2009).
54. Kumagai, N., Matsunaga, S., Yoshikawa, N., Ohshima, T. & Shibasaki, M. Direct Catalytic enantio- and diastereoselective Aldol Reaction using a Zn-Zn-Linked-BINOL Complex: A Practical Synthesis of syn-1,2-Diols. *Org. Lett.* **3**, 1539–1542 (2001).
55. Kumagai, N. *et al.* Direct Catalytic Asymmetric Aldol Reaction of Hydroxyketones : Asymmetric Zn Catalysis with a Et<sub>2</sub>Zn/Linked-BINOL Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2169–2178 (2003).
56. Li, H., Da, C., Xiao, Y. & Li, X. Direct asymmetric Aldol Reaction of Arylketones with Arylaldehydes catalyzed by chiral BINOL-derived zincate Catalyst direct asymmetric aldol reaction of aryl ketones with aryl aldehydes catalyzed by chiral metal complex is reported for the first time. *J. Org. Chem.* **73**, 7398–7401 (2008).
57. Kaim, W. & Schwederski, B. *Bioanorganische Chemie*. (Teubner, 2005).
58. Vallee, B. L. & Auld, D. S. Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins. *Biochemistry* **29**, 5647–5659 (1990).



59. Mccall, K. A., Huang, C. C. & Fierke, C. A. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J. Nutr.* **130**, 1437–1446 (2000).
60. Ochiai, E.-I. Uniqueness of Zinc as a Bioelement. *J. Chem. Educ.* **65**, 943–946 (1984).
61. Vahrenkamp, H. Zink, ein langweiliges Element? *Chemie Unserer Zeit* **22**, 73–84 (1988).
62. Suh, J. Model studies of metalloenzymes involving metal ions as Lewis acid catalysts. *Acc. Chem. Res.* **25**, 273–279 (1992).
63. Williams, R. J. P. The Biochemistry of Zinc. *Polyhedron* **6**, 61–69 (1987).
64. Auld, D. S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **14**, 271–313 (2001).
65. Heifets, L. B., Flory, M. A. & Lindholm-Levy, P. J. Does pyrazinoic acid as an active moiety of pyrazinamide have specific activity against Mycobacterium tuberculosis? *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1252–1254 (1989).
66. Zhang, Y. & Mitchison, D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **7**, 6–21 (2003).
67. Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilchèze, C. & Jacobs, W. R. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis. *Nat. Med.* **6**, 1043–1047 (2000).
68. Scorpio, A. & Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **2**, 662–667 (1996).
69. Du, X. *et al.* Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* **40**, 14166–14172 (2001).
70. González, J. M. *et al.* *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles* **2**, 123–130 (1998).
71. Alifano, P. *et al.* Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol. Rev.* **60**, 44–69 (1996).
72. Klem, T. J. & Davisson, V. J. Imidazole glycerol phosphate synthase: the glutamine amidotransferase in histidine biosynthesis. *Biochemistry* **32**, 5177–5186 (1993).
73. Douangamath, A. *et al.* Structural evidence for ammonia tunneling across the ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub> barrel of the imidazole glycerol phosphate synthase bienzyme complex. *Structure* **10**, 185–193 (2002).

74. Beismann-Driemeyer, S. & Sterner, R. Imidazole glycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Quaternary structure, steady-state kinetics, and reaction mechanism of the bienzyme complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 20387–20396 (2001).
75. Faber, G. K. & Petsko, G. A. The evolution of a/b barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 228–234 (1990).
76. Lang, D., Thoma, R., Henn-Sax, M., Sterner, R. & Wilmanns, M. Structural Evidence for Evolution of the beta/alpha Barrel Scaffold by Gene Duplication and Fusion. *Science* **289**, 1546–1550 (2000).
77. List, F. *et al.* Article Catalysis Uncoupling in a Glutamine Amidotransferase Bienzyme by Unblocking the Glutaminase Active Site. *Chem. Biol.* **19**, 1589–1599 (2012).
78. Höcker, B., Jürgens, C., Wilmanns, M. & Sterner, R. Stability, catalytic versatility and evolution of the ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel fold. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 376–381 (2001).
79. Sterner, R. & Höcker, B. Catalytic versatility, stability, and evolution of the ( $\beta\alpha$ )<sub>8</sub>-barrel enzyme fold. *Chem. Rev.* **105**, 4038–4055 (2005).
80. Reetz, M. T. *et al.* A robust protein host for anchoring chelating ligands and organocatalysts. *ChemBiochem* **9**, 552–564 (2008).
81. Elkins, J. M. *et al.* X-ray crystal structure of *Escherichia coli* taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase complexed to ferrous iron and substrates. *Biochemistry* **41**, 5185–92 (2002).
82. Roelfes, G. & Feringa, B. L. DNA-based asymmetric catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 3230–3232 (2005).
83. Reetz, M. T. & Jiao, N. Copper-phthalocyanine conjugates of serum albumins as enantioselective catalysts in Diels-Alder reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 2416–2419 (2006).
84. Akiyama, T. Stronger Brønsted Acids. *Chem. Rev.* **107**, 5744–5758 (2007).
85. Akiyama, T., Itoh, J. & Fuchibe, K. Recent Progress in Chiral Brønsted Acid Catalysis. *Adv. Synth. Catal.* **348**, 999–1010 (2006).
86. Kampen, D., Reisinger, C. M. & List, B. Chiral Brønsted Acids for Asymmetric Organocatalysis. *Top. Curr. Chem.* **291**, 395–456 (2010).
87. Parmar, D., Sugiono, E., Raja, S. & Rueping, M. Complete Field Guide to Asymmetric BINOL-Phosphate Derived Brønsted Acid and Metal Catalysis : History and Classification by Mode of Activation ; Brønsted Acidity , Hydrogen Bonding , Ion Pairing , and Metal Phosphates. *Chem. Rev.* **114**, 9047–9153 (2014).

88. Connon, S. J. Organocatalysis mediated by (thio)urea derivatives. *Chem. Eur. J.* **12**, 5418–5427 (2006).
89. Taylor, M. S. & Jacobsen, E. N. Asymmetric catalysis by chiral hydrogen-bond donors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **45**, 1520–1543 (2006).
90. Sigman, M. S., Vachal, P. & Jacobsen, E. N. A general catalyst for the asymmetric strecker reaction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **39**, 1279–1281 (2000).
91. Sigman, M. S. & Jacobsen, E. N. Schiff base catalysts for the asymmetric strecker reaction identified and optimized from parallel synthetic libraries. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4901–4902 (1998).
92. Vachal, P. & Jacobsen, E. N. Structure-based analysis and optimization of a highly enantioselective catalyst for the strecker reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10012–10014 (2002).
93. McDougal, N. T. & Schaus, S. E. Asymmetric Morita-Baylis-Hillman reactions catalyzed by chiral Brønsted acids. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12094–12095 (2003).
94. Uraguchi, D. & Terada, M. Chiral Brønsted Acid-Catalyzed Direct Mannich Reactions via Electrophilic Activation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5356–5357 (2004).
95. Akiyama, T., Itoh, J., Yokota, K. & Fuchibe, K. Enantioselective Mannich-type reaction catalyzed by a chiral Brønsted acid. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 1566–1568 (2004).
96. Nakashima, D. & Yamamoto, H. Design of chiral N-triflyl phosphoramidate as a strong chiral Brønsted acid and its application to asymmetric Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9626–9627 (2006).
97. Schowen, K. B., Limbach, H. H., Denisov, G. S. & Schowen, R. L. Hydrogen bonds and proton transfer in general-catalytic transition-state stabilization in enzyme catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 43–62 (2000).
98. Benkovic, S. J. & Hammes-Schiffer, S. A perspective on enzyme catalysis. *Science* **301**, 1196–1202 (2003).
99. Blake, C. C. F. *et al.* Structure of Hen Egg-white Lysozym. *Nature* **206**, 757–761 (1965).
100. Warshel, A. & Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **103**, 227–249 (1976).
101. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*. (Wiley VCH, 2006).

102. Gandour, R. D. On the importance of orientation in general base catalysis by carboxylate. *Bioorg. Chem.* **10**, 169–176 (1981).
103. Hammer, S. C., Syrén, P.-O., Seitz, M., Nestl, B. M. & Hauer, B. Squalene hopene cyclases: highly promiscuous and evolvable catalysts for stereoselective CC and CX bond formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 293–300 (2013).
104. Wendt, K. U., Poralla, K. & Schulz, G. E. Structure and Function of a Squalene Cyclase. *Science* **277**, 1811–1816 (1997).
105. Smentek, L. & Hess, B. A. Compelling Computational Evidence for the Concerted Cyclization of the ABC Rings of Hopene from Protonated Squalene. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17111–17117 (2010).
106. Sato, T. & Hoshino, T. 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 Intitally Cyclized A-Ring. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 2189–2198 (1999).
107. Eschenmoser, A., Ruzicka, L., Jeger, O. & Arigoni, D. Eine stereochemische Interpretation der biogenetischen Isoprenregel bei den Triterpenen. *Helv. Chim. Acta* **275**, 1890–1904 (1955).
108. Wendt, K. U., Lenhart, A. & Schulz, G. E. The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **286**, 175–187 (1999).
109. Wendt, K. U. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: New pieces of the puzzle. *Angew. Chemie Int. Ed.* **44**, 3966–3971 (2005).
110. Wendt, K. U., Schulz, G. E., Corey, E. J. & Liu, D. R. Enzyme Mechanisms for Polycyclic Triterpene Formation. *Angew. Chemie Int. Ed.* **39**, 2812–2833 (2000).
111. Hoshino, T. & Sato, T. Squalene – hopene cyclase : catalytic mechanism and substrate recognition. *Chem. Commun.* **4**, 291–301 (2002).
112. Feil, C., Sussmuth, R., Jungz, G. & Poralla, K. Site-directed mutagenesis of putative active-site residues in squalene-hopene cyclase. *Eur. J. Biochem.* **55**, 51–55 (1996).
113. Reinert, D. J., Balliano, G. & Schulz, G. E. Conversion of Squalene to the Pentacarbocyclic Hopene. *Chem. Biol.* **11**, 121–126 (2004).
114. Dougherty, D. A. Cation- $\pi$  Interactions in Chemistry and Biology : A New View of Benzene , Phe , Tyr , and Trp. *Science* **271**, 163–168 (1966).
115. Abe, I., Tanaka, H. & Noguchi, H. Enzymatic Formation of an Unnatural Hexacyclic C 35 Polyprenoid by Bacterial Squalene Cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14514–14515 (2002).

116. Hoshino, T., Kumai, Y., Kudo, I., Nakano, S. & Ohashi, S. Enzymatic cyclization reactions of geraniol, farnesol and geranylgeraniol, and those of truncated squalene analogs having C 20 and C 25 by recombinant squalene cyclase. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 2650–2657 (2004).
117. Hammer, S. C. Zur Anwendbarkeit von Squalen-Hopen-Zyklenen als chirale Brønsted-Säuren in der asymmetrischen Katalyse. (Universität Stuttgart, 2014).
118. Hammer, S. C., Marjanovic, A., Dominicus, J. M., Nestl, B. M. & Hauer, B. Squalene hopene cyclases are protonases for stereoselective Brønsted acid catalysis. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 121–126 (2015).
119. Lenardão, E. J., Botteselle, G. V., de Azambuja, F., Perin, G. & Jacob, R. G. Citronellal as key compound in organic synthesis. *Tetrahedron* **63**, 6671–6712 (2007).
120. Mäki-Arvela, P. *et al.* Cyclization of citronellal over zeolites and mesoporous materials for production of isopulegol. *J. Catal.* **225**, 155–169 (2004).
121. Siedenburg, G. *et al.* Activation-independent cyclization of monoterpenoids. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1055–62 (2012).
122. Seitz, M. *et al.* Enzymatic Substrate specificity of a novel squalene-hopene cyclase from *Zymomonas mobilis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **84**, 72–77 (2012).
123. Dubendorff, J. W. & Studier, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**, 45–59 (1991).
124. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979).
125. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977).
126. Promega. Transforming Bacteria: Modified RbCl Method. *Subcloning Noteb.* 43–48 (2004).
127. Ling, M. M. & Robinson, B. H. Approaches to DNA mutagenesis: An overview. *Anal. Biochem.* **254**, 157–178 (1997).
128. Carnero Ruiz, C., Molina-Bolivar, J. a & Aguiar, J. Thermodynamic and structural studies of Triton X-100 micelles in ethylene glycol-water mixed solvents. *Langmuir* **17**, 6831–6840 (2001).
129. Mallia, A. K. *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **85**, 76–85 (1985).

130. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **254**, 248–254 (1976).
131. Laemmli, U. K. Group Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
132. Gallagher, S. R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 10**, Unit 10.2A (2006).
133. Mills, J. H. *et al.* Computational design of an unnatural amino acid dependent metalloprotein with atomic level accuracy. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13393–13399 (2013).
134. Sakane, S., Maruoka, K. & Yamamoto, H. Asymmetric Cyclization of Unsaturated Aldehyds Catalyzed by a chiral Lewis Aid. *Tetrahedron* **42**, 2203–2209 (1986).
135. Mikami, K., Sawa, E. & Terada, M. Asymmetric Catalysis by Chiral Titanium Perchlorate for Carbonyl-Ene Cyclization. *Tetrahedron: Asymmetry* **2**, 1403–1412 (1991).
136. Zou, Y. *et al.* Tandem cross-dimerisation/oxonia-cope reaction of carbonyl compounds to homoallylic esters and lactones. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 5647–5651 (2012).
137. Otto, S., Bertocin, F. & Engberts, J. B. F. N. Lewis Acid Catalysis of a Diels-Alder Reaction in Water. *Synlett* **118**, 7702–7707 (1996).
138. Pietra, F., Guella, G. & Mancini, I. Highly Diastereoselective, Biogenetically Patterned Synthesis of (+)-(1S,6R)-Volvatellin (= (+)-(4R,5S)-5-Hydroxy-4-(5-methyl-1-methylenhex-4-en-2-ynyl)cyclohex-1-ene-1-carbaldehyd). *Helv. Chim. Acta* **83**, 694–701 (2000).
139. Kiwus, R., Schwarz, W., Rodnagel, I. & Musso, H. Über die Hydrierung von Dispiro[2.2.2.2]deca-4,9-dien. *Chem. Ber.* **120**, 435–438 (1987).
140. Andersen, N. H. & Ladner, D. W. Cyclopentane Formation via the Ene Reaction of Olefinic Aldehydes. *Synth. Commun.* **8**, 449–461 (1978).
141. Gaoni, Y. & Wenker, E. Ring Cleavage and Oxidation Reactions of Dimethyldimedone. *J. Org. Chem.* **38**, 3809 (1966).
142. Sarkar, T. K. & Nandy, S. K. Diiodosamarium, a unique catalyst precursor for ene reactions of unsaturated carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.* **37**, 5195–5198 (1996).

143. Comito, R. J., Finelli, F. G. & Macmillan, D. W. C. Enantioselective intramolecular aldehyde  $\alpha$ -alkylation with simple olefins: Direct access to homo-ene products. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9358–9361 (2013).
144. Paradowska, J., Pasternak, M., Gut, B., Gryzłó, B. & Mlynarski, J. Direct asymmetric aldol reactions inspired by two types of natural aldolases: water-compatible organocatalysts and Zn(II) complexes. *J. Org. Chem.* **77**, 173–187 (2012).
145. Bolsinger, J. N. tHisF-Mutante für organische Reaktionen. (Universität Stuttgart, 2012).
146. Wetzl, D. Untersuchungen zur Bestimmung des inhärenten katalytischen Potentials von Metall-bindenden Enzymen. (Universität Stuttgart, 2014).
147. Majorek, K. a *et al.* Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182 (2012).
148. Xiao, Z. & Wedd, A. G. The challenges of determining metal-protein affinities. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 768–789 (2010).
149. Hunt, J. B., Neece, S. H. & Ginsburg, A. The use of 4-(2-pyridylazo)resorcinol in studies of zinc release from *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Anal. Biochem.* **146**, 150–157 (1985).
150. Jung, M. E. & Piizzi, G. gem-Disubstituent Effect : Theoretical Basis and Synthetic Applications. *Chem. Rev.* **105**, 1735–1766 (2005).
151. Davis, B. G. & Boyer, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. *Nat. Prod. Reports* **18**, 618–640 (2001).
152. Reetz, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology : Past , Present , and Future. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12480–12496 (2013).
153. Boshoff, H. I. M. & Mizrahi, V. Purification, Gene Cloning, Targeted Knockout, Overexpression, and Biochemical Characterization of the Major Pyrazinamidase from *Mycobacterium smegmatis* Purification , Gene Cloning , Targeted Knockout, Overexpression, and Biochemical Characterizatio. *J. Bacteriol.* **180**, 5809–5814 (1998).
154. Salfinger, M. & Heifets, L. B. Determination of pyrazinamide MICs for *Mycobacterium tuberculosis* at different pHs by the radiometric method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1002–1004 (1988).
155. Zhang, Y., Scorpio, A., Nikaido, H. & Sun, Z. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* **181**, 2044–2049 (1999).

156. Fessner, W.-D. *et al.* Zum Mechanismus der metallabhängigen Aldolasen der Klasse II. *Angew. Chemie* **108**, 1993–1996 (1996).
157. Fyfe, P. K., Rao, V. a, Zemla, A., Cameron, S. & Hunter, W. N. Specificity and mechanism of *Acinetobacter baumannii* nicotinamidase: implications for activation of the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 9176–9179 (2009).
158. Alberts, I. A. N. L., Nadassy, K. & Wodak, S. J. Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci.* **7**, 1700–1716 (1998).
159. Xue, Y. & Gong, X. The conformational, electronic and spectral properties of chalcones: A density functional theory study. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **901**, 226–231 (2009).
160. Hayes, W. P. & Timmons, C. J. The C=O and C=C fundamental and overtone stretching bands and the electronic absorption bands of some alpha,beta-unsaturated ketones. *Spectrochim. Acta* **24 A**, 323–334 (1968).
161. Annamalai, V., DiMauro, E. F., Carroll, P. J. & Kozlowski, M. C. Catalysis of the Michael addition reaction by late transition metal complexes of BINOL-derived salens. *J. Org. Chem.* **68**, 1973–1981 (2003).
162. Remko, M., Durinda, J. & Heger, J. Conformational analysis of 2', 3' and 4'-azachalcones by molecular orbital calculations. *J. Mol. Struct.* **72**, 197–202 (1981).
163. Khatik, G. L., Kumar, R. & Chakraborti, A. K. Catalyst-free conjugated addition of thiols to alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds in water. *Org. Lett.* **8**, 2433–2436 (2006).
164. Bastian, S. Stereoselektive enzymatische Brønsted-Säure-Katalyse unter Verwendung einer Squalen-Hopen-Cyclase. (Universität Stuttgart, 2016).
165. Andersen, N. H., Hadley, S. W., Kelly, J. D. & Bacon, E. R. Intramolecular Olefinic Aldehyde Prins Reactions for the Construction of Five-Membered Rings. *J. Org. Chem.* **50**, 4538–4545 (1985).
166. Mikami, K. & Shimizu, M. Asymmetric ene reactions in organic synthesis. *Chem. Rev.* **92**, 1021–1050 (1992).
167. Clarke, M. L. & France, M. B. The carbonyl ene reaction. *Tetrahedron* **64**, 9003–9031 (2008).
168. Han, X., Peh, G. & Floreancig, P. E. Prins-type cyclization reactions in natural product synthesis. *European J. Org. Chem.* **2013**, 1193–1208 (2013).
169. Christen, H. R. *Grundlagen der organischen Chemie.* (Sauerländer-Diesterweg/Salle, 1977).



170. Herges, P. D. R. & Klose, K. Struktur der Cycloalkane: Ringspannung. *www.chemgapedia.de* (2016).
171. Hooper, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* **354**, 1–6 (1994).
172. Adekoya, O. a & Sylte, I. The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chem. Biol. Drug Des.* **73**, 7–16 (2009).
173. Auld, D. S. Zinc Catalysis in Metalloproteases. *Structure* **89**, 29–50 (1997).
174. Littlechild, J. Thermophilic archaeal enzymes and applications in biocatalysis. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 155–158 (2011).
175. Ibach, J., Söte, S., Hoang-Bui, P. & Brakmann, S. Evolutive Optimierung von Enzymen – neue Perspektiven. *Biospektrum* **15**, 652–654 (2009).

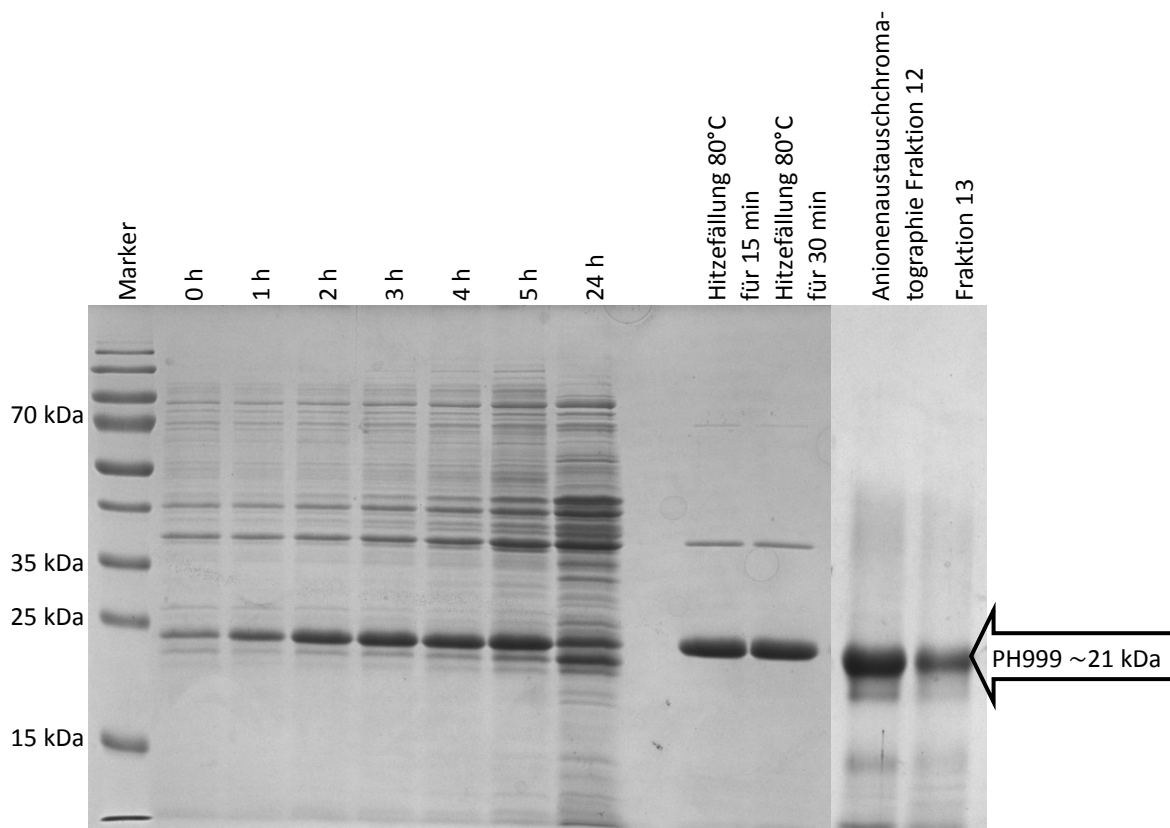


## 7 ANHANG

### 7.1 Expression und Reinigung

#### 7.1.1 PH999

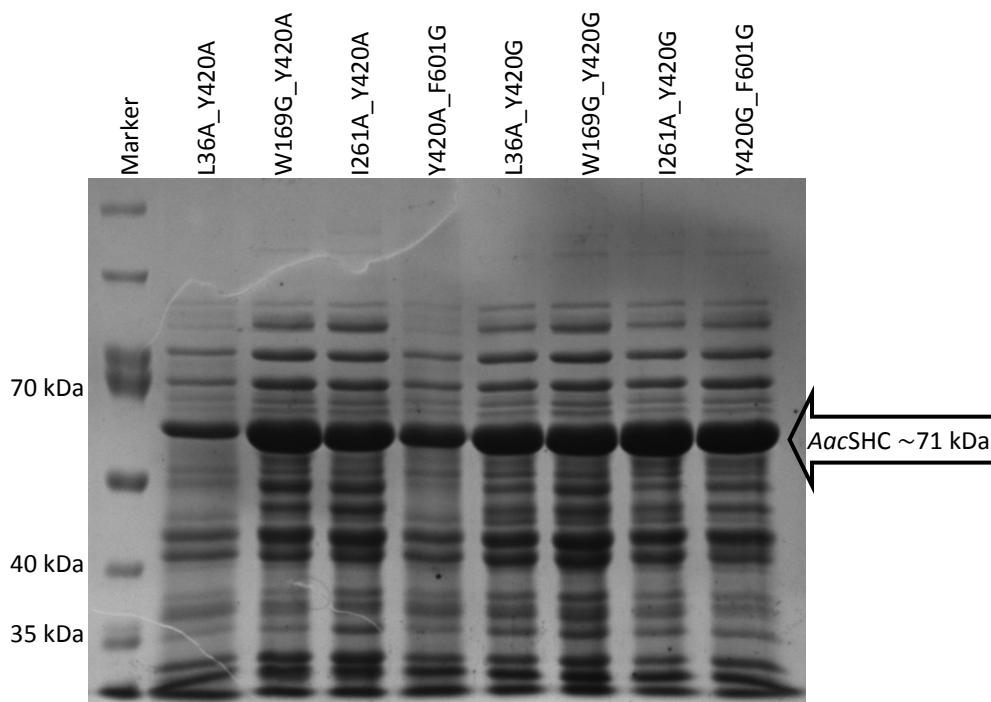
Im Folgenden ist exemplarisch ein SDS-Gel der Expression und Reinigung der PH999 dargestellt. Die Expression und Reinigung der Mutanten war äquivalent zum Wildtyp (hier nicht gezeigt) (**Abbildung 64**).



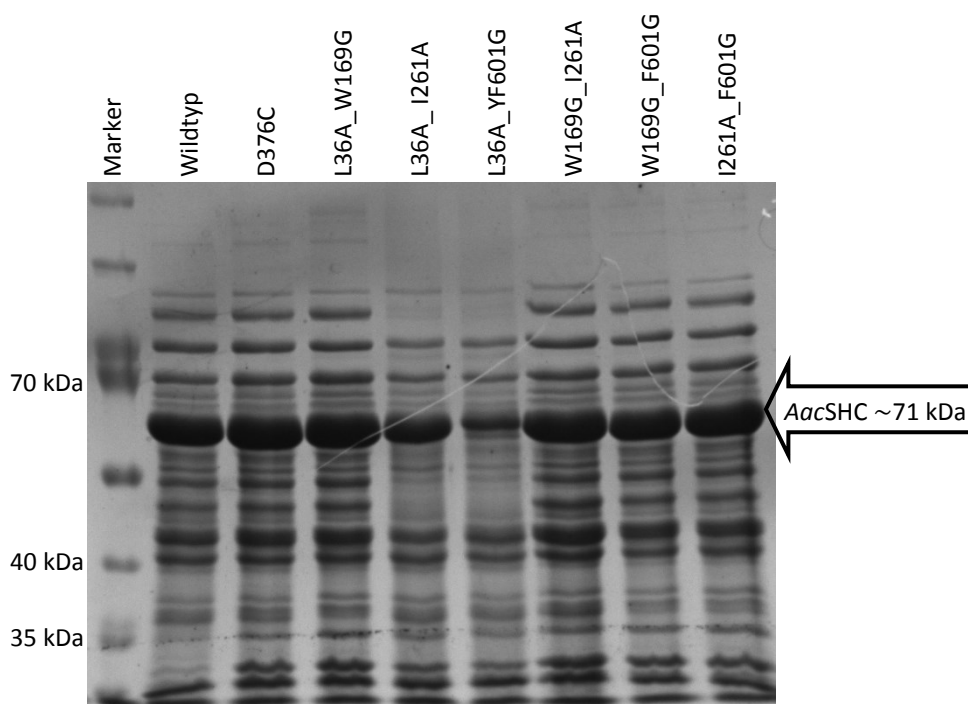
**Abbildung 64:** 15 %-iges SDS-Gel der Expression von PH999 Wildtyp in *E. coli* BL21 Rosetta (*DE3*) in LB-Medium bei 30°C und einer Induktion mit 0,5mM IPTG. Bei den Proben handelt es sich um die Probe vor der Induktion 0 h, bei den weiteren um die Proben mit Expressionszeiten von 1, 2, 3, 4, 5 h und über Nacht, sowie die Proben nach der Grobreinigung des Enzyms mittels Hitze fällung und Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit gereinigtem PH999. Als Marker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot, DE) verwendet.

### 7.1.2 *AacSHC*

Im Folgenden ist exemplarisch die SDS-Gele der Expression und Reinigung der *AacSHC* Doppelmutanten, welche im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, zusammen mit dem Wildtyp und der Knock-out Mutante dargestellt (**Abbildung 65** und **Abbildung 66**). Die Expression und Reinigung der vorhandenen Mutanten aus vorausgegangenen Arbeiten war äquivalent (hier nicht gezeigt).



**Abbildung 65:** 10 %-iges SDS-Gel der Expression von *AacSHC* Mutanten in *E. coli* BL21 (*DE3*) mittels Autoinduktion in TB-Medium bei 37°C und 18h nach der Grobreinigung mittels Hitzefällung und Anionenaustausch-chromatographie. Als Marker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot, DE) verwendet.



**Abbildung 66:** 10 %-iges SDS-Gel der Expression von AacSHC Wildtyp und Mutanten in *E. coli* BL21 (DE3) mittels Autoinduktion in TB-Medium bei 37°C und 18h und anschließender Reinigung. Als Marker wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot, DE) verwendet.

## 7.2 Gensequenzen

### 7.2.1 tHisF von *Thermotoga maritima*

Uniprot: Q9X0C6

ATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGTGTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTGTGGTGAAGGGAACGA  
ACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTGCGAACTGGGAAAGTTCTATTCCGAAATTGGA  
ATAGACGAACTCGTTTTTCTGGATATCACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGA  
GGTCGAAAAGGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCCACGACTTCG  
AAACGGCCTCGGAGCTCATTCTCCGTGGTGCGGACAAGGTGAGCATAAACACGGCGGCTGTGGAG  
AATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACTTTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGAT  
GCAAAAAGAGTGGATGGAGAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAGAAGAACACGGGCATACT  
TCTGAGAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTCACCAGTAT  
CGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATAAGGTTTCGTGAGGCCACTAACC  
ACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCGGGAAAAATGGAACATTTCTTGAAGCCTTCCCTGGC  
AGGTGCCGACGCTGCCCTTGGCGCTTCTGTCTTTCACTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGA  
ACTGAAAGAGTACCTCAAAAAACACGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGCACCACCAC  
CACCCTGA

### 7.2.2 PH999 von *Pyrococcus horikoshii*

Uniprot: O58727

ATGCCTGAAGAAGCCTTAATAGTTGTTGATATGCAGAGAGATTTTCATGCCTGGAGGAGCTCTTCC  
GGTTCCTGAGGGAGATAAGATAATTCCAAAGGTTAACGAGTACATAAGGAAGTTTAAGGAAAA  
GGGAGCTTTAATAGTGGCCACAAGGGATTGGCATCCTGAAAATCACATAAGCTTTAGGGAGAGG  
GGAGGCCCTGGCCAGGCATTGCGTTCAAACACTCCTGGTGCAGAGTTCGTGGTAGATTTACC  
GGAAGATGCCGTGATCATTTTCGAAAGCTACAGAGCCAGATAAAGAAGCATATTCTGGCTTTGAA  
GGTACAGATCTTGCGAAAATTCTAAGAGGGAATGGAGTTAAGAGAGTTTATATCTGTGGTGTG  
TACGGAGTACTGCGTCAGGGCAACGGCCTTAGACGCTCTTAAGCATGGGTTTGAAGTCTACCTCT  
TAAGGGATGCAGTAAAGGGAATCAAACCTGAAGACGAGGAGAGAGCCCTTGAGGAGATGAAAT  
CTAGAGGGATTAAGATCGTTCAGTTTTAG

### 7.2.3 Squalen-Hop-Enzym aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AacSHC)

Uniprot: P33247

ATGGCGAACAGCTGGTGAAGCGCCGGCGTATGCGCGCACCTGGATCGCGCGGTGGAATATCT  
GCTGAGCTGCCAGAAAGATGAAGGCTATTGGTGGGGCCCGCTGCTGAGCAACGTGACCATGGAAG  
CGGAATATGTGCTGCTGTGCCATATTCTGGATCGCGTGGATCGCGATCGCATGGAAAAATTCGC  
CGCTATCTGCTGCATGAACAGCGGAAGATGGCACCTGGGCGCTGTATCCGGGCGGCCCGCGGA  
TCTGGATACCACATTGAAGCGTATGTGGCGCTGAAATATATTGGCATGAGCCGCGATGAAGAAC  
CGATGCAGAAAGCGCTGCGCTTTATTAGAGCCAGGGCGGCATTGAAAGCAGCCGCGTGTTTACCC  
GCATGTGGCTGGCGCTGGTGGGCGAATATCCGTGGGAAAAGTGCCGATGGTGCCGCCGGAATT  
ATGTTTCTGGGCAAACGCATGCCGCTGAACATTTATGAATTTGGCAGCTGGGCGCGCGCACCGT  
GGTGGCGCTGAGCATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCTGCCGGAACGCGCGCGCGTGC  
CGAACTGTATGAAACCGATGTGCCGCCGCGCCGCCGCGGCGGCGAAAGGCGGCGGCGGCTGGATT  
TTTGATGCGCTGGATCGCGCGCTGCATGGCTATCAGAACTGAGCGTGCATCCGTTTCGCCCGC  
CGGCGGAAATTCGCGCGCTGGATTGGCTGCTGGAACGCCAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGC  
ATTCAGCCCGCGTGGTTTTATGCGCTGATTGCGCTGAAAATTCTGGATATGACCCAGCATCCGGCG  
TTTTATTAAGGCTGGGAAGGCTGGAACGTATGGCGTGGAACTGGATTATGGCGGCTGGATGTT  
TCAGGCGAGCATTAGCCCGGTGTGGGATACCGCCCTGGCGGTGCTGGCGCTGCGCGCGGCGGGCC  
TGCCGGCGGATCATGATCGCCTGGTGAAGCGGGCGAATGGCTGCTGGATCGCCAGATTACCGTGC  
CGGGCGATTGGGCGGTGAAACGCCCGAACCTGAAACCGGGCGGCTTTGCGTTTCAGTTTGATAAC  
GTGTATTATCCGGATGTGGATGATACCGCGGTGGTGGTGTGGGCGCTGAACACCCTGCGCCTGCCG  
GATGAACGCCGCCCGCGGATGCGATGACCAAAGGCTTTCGCTGGATTGTGGGCATGCAGAGCAG  
CAACGGCGGCTGGGGCGCGTATGATGTGGATAACACCAGCGATCTGCCGAACCATATTCCGTTTT  
GCGATTTTGGCGAAGTGACCGATCCGCCGAGCGAAGATGTGACCGCGCATGTGCTGGAATGCTTT  
GGCAGCTTTGGCTATGATGATGCGTGGAAAGTGATTCGCCGCGCGGTGGAATATCTGAAACGCG  
AACAGAAACCGGATGGCAGCTGGTTTTGGCCGCTGGGGCGTGAACCTATCTGTATGGCACCGGCGCG  
GTGGTGAGCGCGCTGAAAGCGGTGGGCATTGATACCCGCGAACCGTATATTAGAAAGCGCTGGA  
TTGGGTGGAACAGCATCAGAACCCGGATGGCGGCTGGGGCGAAGATTGCCGCGAGCTATGAAGAT  
CCGGCGTATGCCGGCAAAGGCGGAGCACCCGAGCCAGACCGCGTGGGCGCTGATGGCGCTGAT  
TGCGGGCGGCCGCGCGGAAAGCGAAGCGGCGCGCCGCGGCGTGCAGTATCTGGTGGAAACCCAGC  
GCCCCGATGGCGGCTGGGATGAACCGTATTATACCGGCACCGGTTCCCGGGCGATTTTTATCTGG  
GCTATACCATGTATCGCCATGTGTTTCCGACCCTGGCGCTGGGCCGCTATAAACAGGCGATTGAAC  
GCCGCTAA





---

## LEBENS LAUF

### JENNIFER NADINE BISCHOFF (geb. BOLSINGER)

Geboren am 17.02.1988 in Esslingen (Neckar)

---

#### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

12/2012 – 10/2016

**Promotionsstudium am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart**

Abschluss: Dr. rer. nat.

Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Thema der Dissertation: *Studien zum Einsatz von enzymatischen Lewis- und Brønsted-Säuren in Carbonyl-aktivierten organischen Reaktionen*

10/2007 – 09/2012

**Studium der Chemie, Universität Stuttgart**

Abschluss: Diplom-Chemikerin

04/2012 – 09/2012

Diplomarbeit

Institut für Technische Biochemie

Betreuer: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Thema der Diplomarbeit : *Metallbindende tHisF-Mutante für organische Reaktionen*

---

#### SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/2004 – 07/2007

**Biotechnologisches Gymnasium Käthe-Kollwitz Schule, Esslingen (Neckar)**

Abschluss: Abitur

09/1998 – 07/2004

**Albert-Schweitzer Realschule, Denkendorf**

Abschluss: Realschule

---

#### AUSZEICHNUNGEN

07/2015

**Biotrans Konferenz, Wien**

Biotrans Poster Award mit Kurzpräsentation

J. Bolsinger, L. Kühnel, B. Nestl, und B. Hauer,

„Squalene-Hopene Cyclases as Brønsted-Acid Biocatalysts for Organic Reactions“

