

Studien zur katalytischen Promiskuität von Imin-reduzierenden Enzymen

**Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität
Stuttgart genehmigte Abhandlung zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

Vorgelegt von
Maike Lenz
aus Ulm

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Ralf Takors
Vorsitzender:	Prof. Dr. Albert Jeltsch
Tag der mündlichen Prüfung:	19.04.2018

Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart
-2017-

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen veröffentlicht:

Scheller, P. N., **Lenz, M.**, Hammer, S. C., Hauer, B., Nestl, B. M. "Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones." *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3239-3242.

Lenz, M., Scheller, P. N., Richter, S. M., Hauer, B., Nestl, B. M. "Cultivation and purification of two stereoselective imine reductases from *Streptosporangium roseum* and *Paenibacillus elgii*." *Protein Expression and Purification* **2016**, *133*, 199-204.

Lenz, M., Meisner, J., Quertinmont, L., Lutz, S., Kästner, J., Nestl, B. M. "Asymmetric Ketone Reduction by Imine Reductases." *ChemBioChem* **2017**, *18*, 253-256.

Lenz, M., Borlinghaus, N., Weinmann, L., Nestl, B. M. "Recent advances in imine reductase-catalyzed reactions." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2017**, *33*:199.

Lenz, M., Fademrecht, S., Sharma, M., Pleiss, J., Grogan, G., Nestl, B. M. "New Imine Reducing Enzymes from β -Hydroxyacid Dehydrogenases by Single Amino Acid Substitutions." *Manuscript accepted in Protein Engineering, Design and Selection* **2018**.

Lenz, M., Wijma, H., Schöck R., Heinemann, P., Janssen D. B., Nestl, B. M. "Homology model-based computational development of thermostable imine reductase variants." *Manuscript in preparation*.

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Studien zur katalytischen Promiskuität von Imin-reduzierenden Enzymen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled ‘Studying the catalytic promiscuity of imine-reducing enzymes’ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 30.10.2017

Maike Lenz

Danksagung

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des spannenden Themas und die Freiheiten während des gesamten Forschungsprojektes.

Herrn Prof. Dr. Ralf Takors und Herrn Prof. Dr. Albert Jeltsch danke ich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Bettina Nestl für die ausgezeichnete Betreuung, sowie die zahlreichen Anregungen und wertvollen Ratschläge die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Jede Phase dieser Arbeit wurde intensiv, professionell und leidenschaftlich von ihr begleitet: Danke für Alles Bettina!

Herrn Dr. Bernd Nebel danke ich für die unermüdliche Unterstützung und Weitergabe seines exzellenten Wissens im Bereich der Analytik und die stetige mentale Fürsprache: Bernd, ich hab viel von dir gelernt. Danke!

Ich bedanke mich herzlich bei allen Kooperationspartnern, sowie Bachelor- und Masterstudenten, die zum Gelingen verschiedener Teilprojekte dieser Dissertation beigetragen haben. Prof. Dr. Stefan Lutz und Leann Quertinmont der Emory University in Atlanta danke ich für die Gastfreundschaft und die kompetente Einführung in die zellfreie Proteinexpression. Prof. Dr. Johannes Kästner und Jan Meisner vom Institut für Theoretische Chemie der Universität Stuttgart danke ich für den ganz anderen Blick auf die Enzym-Katalyse. Prof. Gideon Grogan und Dr. Mahima Sharma der University of York danke ich für die Kristallisation der Iminreduktase aus *Streptosporangium roseum* und den damit verbundenen hilfreichen Antworten auf vielen Fragen. Prof. Dr. Dick B. Janssen und Dr. Hein Wijma der University of Groningen danke ich für die Verdeutlichung der Relevanz und Bedeutung computer-basierter Analysen und daraus abgeleiteten Annahmen.

Apl. Prof. Dr. Jürgen Pleiss und Dr. Silvia Fademrecht danke ich für das bioinformatische Fundament verschiedener Ideen dieser Arbeit und die Begeisterung für die Umsetzungen im Labor.

Ein großer Dank gilt außerdem Herrn M. Eng. Sven Richter, der mir beim Scale-up der Kultivierung und der Reingiung eine große Hilfe war.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich mich für das vergnügliche Arbeitsklima und die produktive Zeit bedanken. Hier gilt ein ganz besonderer Dank Julia Halder und Sara Hoffmann, ohne deren vielseitige Unterstützung und Freundschaft der ein oder andere Moment schwerer gewesen wäre: Jule, Sara, es war eine so schöne Zeit mit euch! Außerdem möchte ich mich bei Dr. Stephan Hammer, Dr. Sandra Notonier, Dr. Juliane Stahmer, Dr. Jennifer Bolsinger, Dr. Lisa Kühnel und Dr. Silke Bastian bedanke, die mir das Ankommen und den Einstieg am ITB so leicht gemacht haben.

Ein ganz großer Dank gebührt meinen Freunden, die regelmäßig für die notwendige Abwechslung und den Ausgleich zum Laboralltag gesorgt haben. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Claudia Maier, der besten Freundin die man sich vorstellen kann.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie. Seit ich mich erinnern kann sind meine Eltern für mich da und unterstützen alle Ideen, Wünsche und Vorhaben. Ich bin unendlich dankbar euch zu haben. Das Gleiche gilt für meine Lieblingsschwester Tatjana. Familie kann man sich nicht aussuchen – könnte man, hätte ich auf jeden Fall euch genommen!

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	X
ABSTRACT	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 ENTWICKLUNG NEUER BIOKATALYSATOREN	1
1.2 <i>ENZYME PROMISCUITY</i>	4
1.3 BEDEUTUNG UND HERSTELLUNG CHIRALER AMINE	6
1.3.1 <i>Möglichkeiten der chemischen Synthese</i>	6
1.3.2 <i>Enzyme für die Darstellung chiraler Amine</i>	10
1.4 IMINREDUKTASEN	13
1.4.1 <i>Strukturelle und Mechanistische Eigenschaften von IREDS</i>	13
1.4.2 <i>Asymmetrische Reduktion</i>	17
1.4.3 <i>Reduktive Aminierung</i>	19
2 FRAGESTELLUNG UND MOTIVATION	24
3 MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 MATERIALIEN	25
3.1.1 <i>Chemikalien</i>	25
3.1.2 <i>Enzyme und Kits für molekular- und mikrobiologische Arbeiten</i>	25
3.1.3 <i>Verwendete Plasmidsysteme und konstruierte Plasmide</i>	26
3.1.4 <i>Primer</i>	28
3.1.5 <i>Verwendete E. coli Stämme</i>	29
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	30
3.2.1 <i>DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	30
3.2.2 <i>Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten</i>	31
3.2.3 <i>Klonierung via Gibson assembly</i>	31
3.2.4 <i>Ortsgerichtete Mutagenese: QuikChange™-PCR</i>	33
3.2.5 <i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	34
3.2.6 <i>DNA-Sequenzierung</i>	34
3.2.7 <i>Herstellung chemisch-kompetenter Zellen</i>	34
3.2.8 <i>Hitzeschock-Transformation von E. coli</i>	35
3.3 MEDIEN UND ZELLKULTUR.....	35
3.3.1 <i>Medien zur Kultivierung von E. coli</i>	35
3.3.2 <i>Stammmhaltung</i>	36
3.3.3 <i>In vitro Proteinexpression</i>	36
3.3.4 <i>In vivo Proteinexpression</i>	37
3.3.5 <i>Aufschluss von Escherichia coli-Zellen</i>	38

3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	39
3.4.1	<i>Proteinreinigung über Affinitätschromatographie</i>	39
3.4.2	<i>Proteinreinigung über Ionenaustauschchromatographie</i>	41
3.4.3	<i>Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure</i>	42
3.4.4	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	42
3.5	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT.....	44
3.5.1	<i>NADPH-Assay</i>	44
3.5.2	<i>Biotransformationen mit gereinigtem Enzym</i>	45
3.5.3	<i>Biotransformationen mit in vitro exprimiertem Enzym</i>	47
3.6	BESTIMMUNG KINETISCHER PARAMETER	47
3.7	ANALYTISCHE METHODEN.....	49
3.7.1	<i>Gaschromatographie</i>	49
3.7.2	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>	54
3.7.3	<i>Dünnschichtchromatographie</i>	55
3.7.4	<i>Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Proteinreinheit</i>	56
3.7.5	<i>Kernresonanz-Spektroskopie</i>	56
3.8	BIOINFORMATISCHE METHODEN.....	57
4	ERGEBNISSE	58
4.1	KULTIVIERUNG UND REINIGUNG ZUR HERSTELLUNG HOCHREINER BIOKATALYSATOREN.....	58
4.1.1	<i>Fed-Batch Kultivierung im 4 L-Arbeitsvolumen</i>	58
4.1.2	<i>Anwendung eines zweistufigen Reinigungsprozesses</i>	60
4.2	IRED-KATALYSIERTE REDUKTIVE AMINIERUNG	63
4.2.1	<i>Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor</i>	64
4.2.2	<i>Ketone als Carbonyl-Akzeptoren zur Synthese chiraler Amine</i>	66
4.2.3	<i>Optimierung der Reaktionsbedingungen</i>	67
4.2.4	<i>Optimierung des Biokatalysators</i>	72
4.3	IRED-KATALYSIERTE CARBONYL-REDUKTION	75
4.3.1	<i>Berechnung von Energiebarrieren für den Hydrid-Transfer in Abhängigkeit der untersuchten Substrate</i>	78
4.3.2	<i>Aufklärung der Kristallstruktur von R-IRED-Sr</i>	81
4.4	VERGLEICH VON IREDS UND B-HYDROXYSÄURE DEHYDROGENASEN	84
4.4.1	<i>Sequenzidentität und Strukturvergleich ausgewählter βHADs</i>	85
4.4.2	<i>Analyse der aktiven Taschen</i>	86
4.4.3	<i>Neue Imin-reduzierende Enzyme</i>	88
4.4.4	<i>Substratspektrum und Enantioselektivität der neuen Imin-reduzierenden Enzyme</i>	91
4.4.5	<i>Proof of Concept – Übertragung des Prinzips auf weitere βHADs</i>	94
5	DISKUSSION.....	98
5.1	ERWEITERUNG DES REAKTIONSSPEKTRUMS VON IMINREDUKTASEN	98

5.1.1	<i>Potenzial in der Katalyse von reduktiven Aminierungen</i>	98
5.1.2	<i>Unterschied in der Katalyse von C=N und C=O Bindungen</i>	105
5.2	ERWEITERUNG DES IRED-SEQUENZRAUMS MITTELS <i>ENZYME REDESIGN</i>	110
5.2.1	<i>Evolution von Iminreduktasen</i>	114
6	AUSBLICK	117
7	ANHANG	119
7.1	PROTEIN- UND DNA-SEQUENZEN DER BEARBEITETEN ENZYME.....	119
7.2	PLASMIDE (ITB-NUMMERN).....	124
7.3	KALIBRIERGERADEN	126
7.4	NMR-SPEKTREN.....	132
7.5	POSITIVKONTROLLE DER <i>IN VITRO</i> EXPRESSION	135
7.6	BESTIMMUNG KINETISCHER PARAMETER.....	136
7.7	TERTIÄRSTRUKTUR DER BEARBEITETEN ENZYME IM VERGLEICH.....	138
7.8	ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION ALLER <i>BHAD</i> VARIANTEN.....	139
8	LITERATURVERZEICHNIS	141
	CURRICULUM VITAE	146

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius	IMAC	Metall-Affinitäts- chromatographie
μ	mikro (10 ⁻⁶)	IRED	Iminreduktase
Å	Ångström	k	Kilo
ABC	Ammoniumbicarbonat	kDa	Kilodalton
AmDHs	Amin-Dehydrogenasen	L	Liter
APS	Ammoniumperoxidsulfat	LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Ara	Arabinose	M	Molar
BFM	Biofeuchtmasse	MAOs	Monoamin-Oxidasen
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	MeOH	Methanol
BSA	Bovines Serumalbumin	mg	Milligramm
BTM	Biotrockenmasse	min	Minute
bzw.	beziehungsweise	mL	Milliliter
βHAD	β-hydroxysäure Dehydrogenase	mM	Millimolar
Cm	Chloramphenicol	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
Co	Cobalt	MW	molekulare Masse
CV	Säulenvolumen	NAD(P)H	Nikotinamidadenin- dinukleotid(phosphat)
DAD	Diodenarray-Detektor	Ni	Nickel
DH	Dehydrogenase	NMR	Kernspinresonanz
ddH ₂ O	Zweifach deionisiertes Wasser	n.d.	nicht detektiert
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat	OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
DCM	Dichlormethan	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid	PDB	<i>Protein Data Base</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ppm	<i>parts per million</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RI	Brechungsindex
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss	s	Sekunde
EtOH	Ethanol	SDS	Natriumdodecylsulfat
FID	Flammenionisationsdetektor	TAs	Transaminasen
g	Gramm	TB	<i>Terrific Broth</i>
GC	Gaschromatographie	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan- 1,2-diamin
G6P	Glucose-6-Phosphat	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
h	Stunde	U	Unit [μmol/min]
HPLC	Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie	UpM	Umdrehungen pro Minute
IEX	Ionenaustauschchromatographie	z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Biokatalyse, welche die Katalyse chemischer Reaktionen mittels Mikroorganismen und Enzymen zusammenfasst, hat sich in den letzten Jahren als eine ernsthafte Alternative und Ergänzung zur rein chemischen Synthese entwickelt. Chirale Amine stellen eine Substanzklasse dar, für deren Herstellung bereits Enzyme beschrieben sind und in industriellem Maßstab eingesetzt werden. Viele Pharmazeutika, Fein- und Agrochemikalien enthalten chirale Amin-Bausteine, weshalb großes Interesse an effizienten Möglichkeiten zur selektiven Synthese dieser Verbindungen besteht. Das bisherige Enzymspektrum an Amin-synthetisierenden Biokatalysatoren konnte erst kürzlich um die Enzymfamilie der Iminreduktasen erweitert werden. Iminreduktasen (IREDs) zeigen unter den bisher beschriebenen Enzymfamilien das größte Potenzial in der Synthese einer Vielzahl strukturell unterschiedlicher, chiraler Amine. Erstmals durch ein Aktivitäts-basiertes *Screening* von mikrobiellen Stammsammlungen mit dem Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin entdeckt, konnte die Anzahl innerhalb kürzester Zeit auf über 100 erhöht werden. Neben der asymmetrischen Reduktion prochiraler Imin-Substrate konnten 2014 erste Hinweise hinsichtlich des Potenzials dieser Enzyme für die Katalyse reduktiver Aminierungen erzielt werden.

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung der katalytischen Promiskuität von Imin-reduzierenden Enzymen. Basierend auf diesen Studien sollte ein größeres Verständnis hinsichtlich Evolution und Mechanismus von Iminreduktasen generiert werden. Hierfür wurden zwei enantiokomplementäre IREDs aus *Streptosporangium roseum* (*R*-IRED-*Sr*) und *Paenibacillus elgii* (*S*-IRED-*Pe*) als Modellenzyme gewählt.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Erstellung eines Protokolls zur Herstellung und Reinigung von *R*-IRED-*Sr* und *S*-IRED-*Pe*. Das Scale-up bestehender Kultivierungsmethoden und die anschließende Kombination aus Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) und Ionenaustauschchromatographie (IEX) ermöglichten die Herstellung ausreichender Mengen reiner Enzympräparationen (>95% Reinheit). Diese wurden für alle folgenden Experimente eingesetzt, um unerwünschte, durch andere *E. coli*-Enzyme katalysierte Nebenreaktionen zu vermeiden und falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

Um das natürliche Reaktionsspektrum dieser Enzyme weiter auszuloten, wurden reduktive Aminierungen mit unterschiedlichen Carbonyl-Akzeptoren und verschiedenen Aminnucleophilen durchgeführt. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten Produktbildungen bis zu 53% mit guten bis exzellenten Selektivitäten detektiert werden. Einflussreiche Stellschrauben stellten hierbei vor allem Parameter, die die Kondensation des Imin-Intermediates förderten, dar (pH, Basizität des Aminnucleophils, Konzentration des Aminnucleophils im Verhältnis zum Carbonyl-Akzeptor).

Zusätzlich zu eindeutigen Aktivitäten in reduktiven Aminierungen konnte eine promiskuitive Aktivität für die Reduktion von C=O-Doppelbindungen festgestellt werden. Nach 24 h Inkubation der Carbonylverbindung 2,2,2-Trifluoroacetophenon mit *R*-IRED-*Sr* konnten 60% des entsprechenden Alkohols mit 96% *ee* (*S*) detektiert werden. Das Ergebnis konnte durch den Einsatz von *in vitro* exprimiertem Enzym (keine *E.coli*-basierten Dehydrogenasen im Ansatz) verifiziert werden. Theoretisch berechnete Energiebarrieren von 66,4 kJ/mol bzw. 112,6 kJ/mol für den Hydrid-Transfer von NAD(P)H zu 2,2,2-Trifluoroacetophenon bzw. Acetophenon verdeutlichten den Einfluss der Substratreaktivität auf die Katalyse. Neben der Substratreaktivität beeinflusste die CF₃-Gruppe die Bindung des Substrates. Durch Aufklärung der Kristallstruktur von *R*-IRED-*Sr* als Ternärkomplex mit NADP(H) und 2,2,2-Trifluoroacetophenon konnten zwischenmolekulare Wechselwirkungen der CF₃-Gruppe zur Riboseeinheit des NADPH-Cofaktors detektiert werden, was den erforderlichen Hydrid-Transfer stark vereinfacht.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschreibt die Anwendung des *enzyme redesign* als eine Möglichkeit des *enzyme engineering* zur Erweiterung des Sequenzraums von Iminreduktasen. Anhand verschiedener bioinformatischer Methoden wurden basierend auf Sequenz- und Strukturähnlichkeiten β -Hydroxysäure Dehydrogenasen (β HADs) als homologe, evolutionär mit IREDS verwandte Enzyme identifiziert. Für drei ausgewählten β HADs aus *Arabidopsis thaliana* (β HAD At), *Geobacter metallireducens* (β HAD Gm) und *Lactococcus lactis* (β HAD Lal) konnte bereits Aktivität der Wildtyp-Enzyme für das Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin gezeigt werden. Ein genauer Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der aktiven Taschen von β HADs und IREDS resultierte in der Identifikation von vier potenziell für die Katalyse entscheidenden Aminosäureresten. Der Austausch des als Protonen-

Donor beschriebenen Lysins in β HAD*At* durch Asparaginsäure bzw. Phenylalanin, den am häufigsten vorkommenden Aminosäuren an dieser Position in *R*-selektiven IREDs, führte zu einer 12-fachen Steigerung der Aktivität für das Modellsubstrat 2-Methylpyrrolin. Gleichzeitig wurde die Aktivität für das natürliche Substrat Glyoxylsäure 885-fach reduziert, was gesamt eine 8200-fache Änderung der katalytischen Aktivität durch den Austausch einer Aminosäure bedeutete. Das Potenzial dieser Varianten in der Imin-Reduktion wurde durch den Umsatz weiterer Imin-Substrate unterstützt. Durch eine zweite Mutation am Eingang der aktiven Tasche (F231A) konnte der Umsatz des sterisch anspruchsvolleren Substrates 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin nochmals gesteigert (Faktor 14) werden, und gleichzeitig zuvor mäßige Enantiomerenüberschüsse von 36% auf 97% *ee* (*S*) erhöht werden. Versuche mit den identischen Varianten von β HAD*Gm* und β HAD*Lal* führten zu ähnlichen Ergebnissen und demonstrierten die Möglichkeit der Übertragung des Prinzips auf weitere Enzyme der Familie der β -Hydroxysäure Dehydrogenasen. Gleichzeitig konnte durch den Austausch der komplementären Aminosäuren in *R*-IRED-*Sr* gezeigt werden, dass prinzipiell auch IREDs in β HADs umgewandelt werden können. Für die Variante *R*-IRED-*Sr*_D187K_L191N konnten bei Einsatz des β HAD-Substrates Glyoxylsäure Produktbildungen von 80% detektiert werden. Hierbei besonders zu erwähnen ist, dass das Wildtyp-Enzym *R*-IRED-*Sr* keine promiskuitive Aktivität für Ketosäuren zeigte.

Trotz dessen, dass sowohl die physiologische Rolle und damit verbunden das natürliche Substrat der als Iminreduktasen beschriebenen Enzyme, als auch der Mechanismus dieser Enzyme noch nicht bekannt ist, konnte bereits Aktivität für eine Vielzahl an strukturell diversen Imin-Substraten gezeigt werden. Die in der vorliegenden Arbeit detektierte promiskuitive Aktivität und daraus abgeleitete evolutionäre Verhältnisse erwiesen sich als guter Startpunkt für die Entwicklung weiterer Biokatalysatoren für die Reduktion prochiraler Imine. Optimierungen hinsichtlich Aktivität und Substratspezifität sind mittels weiterer (semi-)rationaler Ansätze des *enzyme engineering* denkbar.

Abstract

Biocatalysis is the chemical process through which enzymes perform reactions between organic components. The high chemo-, regio- and stereoselectivity of enzymes make them attractive catalysts for the synthesis of simple compounds and also complex natural products. Chiral amines are one of the target compounds for which classical chemical processes on industrial scale are already replaced by enzyme-catalyzed ones. Chiral amines are valuable building blocks in pharmaceutical, fine chemical and agricultural industries, further illustrated by the fact that about 40% of all pharmaceuticals comprise one or more nitrogen-containing heterocycle in their structure. The latest biocatalytic contributions in chiral amine synthesis are imine reductases (IREDs), showing great potential in the reduction of a variety of structurally different, prochiral imine substrates. Identified by activity-based screenings of microbial cell cultures the first member of this novel enzyme family of NADPH-dependent IREDs was described for the reduction of 2-methylpyrroline. To date already more than 100 IREDs are described. Next to their activity in the asymmetric reduction of prochiral imine substrates, first indications about their potential in reductive amination reactions were published in 2014.

In the course of this PhD thesis the catalytic promiscuity of imine-reducing enzymes was studied. Based on these researches more insights about evolution and mechanism of imine reductases should be gained. As starting point for all performed experiments two enantiocomplementary IREDs from *Streptosporangium roseum* (*R*-IRED-*Sr*) and *Paenibacillus elgii* (*S*-IRED-*Pe*) were chosen.

First, suitable methods in terms of enzyme production and purification were evaluated. The proteins *R*-IRED-*Sr* and *S*-IRED-*Pe* were expressed in *E. coli* up to a 4-L-cultivation scale and were purified to 95% homogeneity in two steps by immobilized metal ion affinity and anion-exchange chromatography. These highly pure enzyme preparations were applied in all following experiments to exclude unwanted side reactions catalyzed by other *E. coli*-based proteins and therefore avoiding false-positive results.

To further explore the reaction scope of IREDs reductive amination reactions were investigated selecting a substrate panel comprising aromatic and cyclic carbonyl

compounds as well as aliphatic and aromatic amine nucleophiles. After optimizing the reaction conditions, product formations up to 53% with good to excellent stereoselectivities could be reached. In this context the pH value or basicity and concentration of the amine nucleophile were the most important parameters for influencing the condensation of the imine intermediate and therefore the final product formation.

Additionally a promiscuous activity for the reduction of C=O double bonds could be determined. The fluorinated aromatic carbonyl compound 2,2,2-trifluoroacetophenone was transformed with 57.4% conversion and an excellent enantioselectivity of 96% *ee* (*S*) into the corresponding alcohol by *R*-IRED-*Sr*. The results were verified applying *in vitro* expressed enzyme in order to exclude the contribution of *E. coli* dehydrogenases. The influence of substrate reactivity on catalysis was elucidated by differences in theoretically calculated energy barriers for hydride transfers from the nicotinamide subunit of NAD(P)H to 2,2,2-trifluoroacetophenone and acetophenone, respectively. The CF₃-group in α -position to the C=O function is not only influencing the reactivity but also the binding mode of the substrate. Crystallization of *R*-IRED-*Sr* in complex with the hydrate of 2,2,2-trifluoroacetophenone suggests an interaction of the CF₃ group with the ribose 1-hydroxyl, bringing the carbonyl group closer to the nicotinamide ring of NADPH and thus may also influence the activity for this substrate.

The last part of this thesis describes the enhancement of the IRED sequence space by enzyme redesign. This approach was initiated by former found sequence and structure similarities between IREDs and β -hydroxyacid dehydrogenases (β HADs). The selected β HADs from *Arabidopsis thaliana* (β HAD*At*), *Geobacter metallireducens* (β HAD*Gm*) and *Lactococcus lactis* (β HAD*Lal*) showed already low promiscuous C=N reducing activity for different imine substrates. By a detailed comparison of the active sites of IREDs and β HADs four amino acid residues were identified as potentially important for the reduction of either C=N or C=O bonds. Site-directed mutagenesis of two of these positions in β HADs led to an increase in imine reducing activity and an enhancement in enantioselectivity. The substitution of the catalytically important lysine in β HADs with aspartic acid or phenylalanine, the most prominent amino acids in *R*-selective imine reductases at this position, led to an up to 12-fold increase in imine reducing activity using 2-methylpyrroline as model

substrate. At the same time these variants showed an 885-fold decrease in their natural activity for glyoxylic acid, resulting in an 8200-fold change in catalytic activity by a single amino acid substitution. Moreover, the enantioselectivity for more challenging imine substrates could be increased using engineered variants from 23% *ee* (*R*-IRED-*Sr*) to 97% *ee* (β HADAt_K170D/F_F231A) by opening up the entrance channel to the active site through the introduction of a second mutation. The proof of concept was confirmed by showing the same tendencies in activity for β HAD variants from different organisms. Furthermore, also IREds could be interconverted into β HADs by exchanging the respective amino acid positions. In contrast to β HAD wild-type enzymes, no promiscuous activity of wild-type *R*-IRED-*Sr* towards glyoxylic acid could be detected. The double variant *R*-IRED-*Sr*_D187K_L191N catalyzed the reduction of the chosen keto acid model substrate most efficiently with glycolic acid product formations of 80%.

These results highlight the great potential of imine reductases in chiral amine synthesis. Even though the natural substrate as well as the mechanism of these enzymes is not yet known activity for a diverse panel of cyclic imine substrates has already been demonstrated. The detected promiscuous activity and the derived evolutionary relationships thereof are an excellent starting point for the development of further biocatalysts for the reduction of prochiral imines. Optimizations in terms of activity and substrate specificity are conceivable by further (semi)rational enzyme engineering approaches.

1 Einleitung

Die Biokatalyse gewinnt seit den 80er Jahren in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, als auch im Lebensmittel- und Aromastoffbereich immer mehr an Bedeutung.^[1-5] Die Anwendung von Mikroorganismen oder isolierten Enzymen als Biokatalysatoren stellt aufgrund ihrer ausgezeichneten Selektivitäten (Chemo-, Regio- und Stereoselektivität), den für sie optimalen milden Reaktionsbedingungen (Normaldruck, niedrige Temperaturen und neutrale pH-Werte) und der einfachen Zell-basierten Synthese dieser Katalysatoren eine Alternative zur chemischen Katalyse dar.^[5] Trotz dieser Vorteile ist die Anzahl der in der Industrie etablierten Enzym-katalysierten Prozesse überschaubar, da für viele synthetisch interessante Reaktionen noch keine entsprechenden Enzyme zur Verfügung stehen.^[5] Aufgrund dessen, stellt die Entdeckung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren einen aktuellen Forschungsschwerpunkt im Bereich der Biokatalyse dar.

1.1 Entwicklung neuer Biokatalysatoren

Aufgrund der eingeschränkten Reaktionsvielfalt bisher etablierter Enzyme besteht großes Interesse an neuen Biokatalysatoren, vor allem für chemisch nur schwer oder nicht zugängliche Verbindungen. Um neuartige Biokatalysatoren zu identifizieren und zu entwickeln, haben sich verschiedene Strategien etabliert: 1) das Durchforsten der natürlichen Enzymvielfalt, 2) die *de novo* Darstellung von Enzymen mit artifiziellen katalytischen Zentren oder 3) die Anwendung des *enzyme engineering* zur Veränderung und Optimierung bereits vorhandener Enzyme für die Katalyse neuer Zielreaktionen (Abbildung 1.1). Das *enzyme engineering* muss hierbei noch weiter in die Bereiche 3a) gerichtete Evolution und 3b) rationales Proteindesign unterteilt werden (Abbildung 1.1).

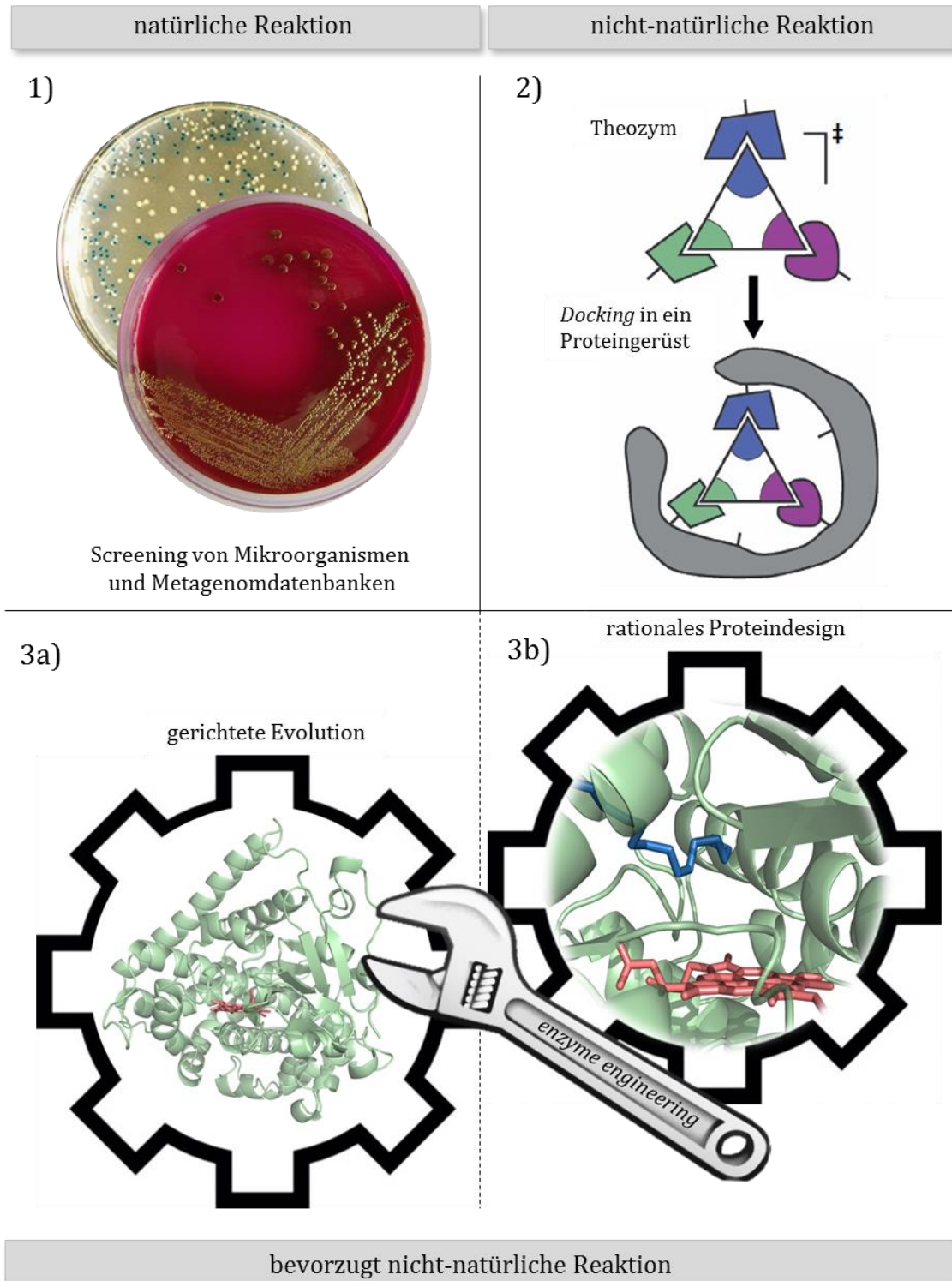


Abbildung 1.1: Möglichkeiten zur Identifizierung und Entwicklung neuer Biokatalysatoren: 1) Durchforsten der natürlichen Enzymvielfalt, 2) *de novo* Darstellung von Enzymen (modifiziert nach Hilvert *et al.*^[6]), 3a) gerichtete Evolution als Teilgebiet des *enzyme engineering* und 3b) rationales Proteindesign als Teilgebiet des *enzyme engineering*.

Bisher wurden die meisten Biokatalysatoren mit synthetisch interessanter Aktivität nach Anwendung von Strategie 1 identifiziert (Abbildung 1.1, 1). Studien von Biosynthesewegen, das *Screening* von bereits beschriebenen Mikroorganismen, als auch die Metagenomik^[7] bieten Zugang zu neuen, natürlichen Enzymen. Häufig werden mittels anschließender bioinformatischer Analysen, ausgehend von den aufgefundenen Enzymen, ganze Enzymfamilien identifiziert und aussichtsreiche Kandidaten charakterisiert. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Enzymfamilie der Iminreduktasen konnte so identifiziert werden. Limitierungen dieser Strategie sind die Anzahl vorhandener Assays zum Auffinden verschiedener Enzymaktivitäten und die zum Teil schwere Kultivierbarkeit neuer Mikroorganismen im Labor.

Für nicht-natürliche, jedoch synthetisch wertvolle Reaktionen stellt das computerbasierte Design von Enzymen eine nennenswerte Alternative dar (Abbildung 1.1, 2). Hierbei werden artifizielle katalytische Zentren auf Basis mechanistischer Überlegungen generiert, *in silico* durch Aminosäuren stabilisiert und in bekannte Proteingerüste modelliert (Theozyme).^[8] Neben der Erweiterung enzym-katalysierter Reaktionen kann diese Methodik zusätzlich zum Verständnis grundlegender Prinzipien der Enzym-Biochemie, wie Mechanismus und Proteinfaltung, beitragen.^[9] Bisher konnte ein erfolgreiches *de novo* Design jedoch nur für chemisch einfache Reaktionen gezeigt werden. Ein prominentes Beispiel stellt die von David Baker generierte Kemp Eliminase dar, welche die Basen-katalysierte Deprotonierung von Benzisoxazolen ermöglicht.^[6,10] Als Proteingerüste werden am häufigsten TIM-Barrel-Strukturen verwendet, welche sich jedoch aufgrund ihrer geringen Flexibilität nicht immer als geeignet erweisen und dadurch eine Limitierung im Bereich des *de novo* Designs darstellen.^[11] Auch wenn erste, mittels *de novo* Design erstellte Enzyme nur sehr geringe Aktivitäten zeigten, konnten sie als Startpunkt für die weitere Optimierungen mittels gerichteter Evolution genutzt werden.^[12,13]

Eine weitere elegante Alternative zur Generierung nicht-natürlicher Enzym-Funktionen stellt Strategie 3, die Anwendung des *enzyme engineering* dar (Abbildung 1.1, 3). Das *enzyme engineering* bietet verschiedene Ansätze um das Portfolio enzymatischer Katalysatoren hinsichtlich neuer Reaktivitäten und verbesserter Eigenschaften auszubauen. Für die zufällige Mutagenese mittels

Einleitung

gerichteter Evolution sind als Voraussetzung keine Sequenz-, Struktur-, oder mechanistischen Kenntnisse des Zielproteins nötig. Jedoch ist ein geeignetes (Hochdurchsatz-)Verfahren zur Selektion der erstellten Mutanten von Vorteil. Aufgrund fehlender optisch detektierbarer Substrate für die gewünschten Zielreaktionen, oder mangelnder Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind hierfür häufig keine zeit- und kosteneffizienten Möglichkeiten gegeben. In solchen Fällen ist eine Reduktion der Größe der Mutantenbibliothek mit Hilfe von (semi-)rationalen Mutationsstrategien essentiell. Hierbei werden bereits vorhandene katalytische Zentren genutzt und für die Umsetzung nicht-natürlicher, neuer Substrate angepasst. Folglich ist das am häufigsten mittels (semi-)rationalem Proteindesigns untersuchte Strukturelement die aktive Tasche eines Enzyms. Aktive Taschen zeichnen sich durch ihre Aminosäurezusammensetzung und den daraus resultierenden reaktiven Gruppen (Nukleophile, Säuren, Basen) und zwischenmolekularen Wechselwirkungen (hydrophobe Interaktionen, Disulfidbrücken- und Wasserstoffbrückenbindungen) aus.^[14] Aufgrund dieser chemischen Eigenschaften können Substratbindung, Stabilisierung des Übergangszustandes und Freigabe des gebildeten Produktes erfolgen.^[14] Minimale Änderungen in den jeweiligen Aminosäurenetzwerken können die Katalyse chemischer Transformationen hinsichtlich Aktivität und Spezifität stark beeinflussen.

1.2 *Enzyme Promiscuity*

Promiskuität beschreibt die funktionelle Divergenz eines Enzyms mehrere alternative Reaktionen zu katalysieren. Basierend auf experimentellen Daten beschreiben die Arbeitsgruppen um John Gerlt, Patricia Babbitt, Romas Kazlauskas, Karl Hult, Per Berglund, Dan Tawfik und Frances H. Arnold die promiskuitive Aktivität eines Enzyms als Schlüsselfaktor für die Evolution neuer Enzymfunktionen.^[15-20] Dem Phänomen der Promiskuität liegt evolutionär betrachtet die Idee zugrunde, dass sich alle heute verfügbaren Enzyme aus nur wenigen Ur-Enzymen, sogenannten Generalisten mit breitem Funktions- und Substratspektrum, entwickelt haben.^[21] Während ihrer divergenten Evolution wurden diese Generalisten zu verschiedenen Spezialisten selektiert, wobei manche im Vorgänger-Enzym vorhandene Aktivitäten als schwache, promiskuitive

Nebenaktivitäten erhalten wurden.^[17,21] Obwohl natürliche Proteine hinsichtlich ihrer Struktur stark konserviert sind (rund 1000 Faltungsmotive beschrieben^[22,23]) und nur eine begrenzte Zahl an katalytischen Mechanismen genutzt werden^[14] können diverse biologische Verbindungen aufgrund promiskuitiver Aktivitäten Enzym-katalysiert hergestellt werden. Promiskuität kann in vier Kategorien eingeteilt werden, wobei die Übergänge häufig fließend sind und manche Reaktionen mehreren Arten der Promiskuität zugeteilt werden können^[19]: (i) Konditions-Promiskuität, (ii) Substrat-Promiskuität, (iii) katalytische Promiskuität und (iv) Produkt-Promiskuität.

Ein Beispiel für (i) Konditions-Promiskuität stellt die Lipase-katalysierte Veresterung von Säuren in organischen Lösungsmitteln dar.^[1,20] Natürlicherweise katalysieren Lipasen die Spaltung von Estern zu den entsprechenden Alkoholen und Fettsäuren, wobei unter bestimmten Bedingungen (organisches Lösungsmittel, geeigneter Acyl-Donor) das Gleichgewicht verschoben und primär die Rückreaktion katalysiert wird.^[1] Da bei Einsatz racemischer Alkoholgemische in der Regel nur ein Enantiomer acetyliert wird, stellt diese Reaktion eine einfache und viel verwendete Möglichkeit zur Trennung optisch aktiver Alkohole dar.^[1]

Die (ii) Substrat-Promiskuität beschreibt die Fähigkeit eines Enzyms strukturell unterschiedliche Substrate zu akzeptieren, jedoch immer dieselbe chemische Reaktion zu katalysieren.^[14] Ein Beispiel hierfür stellt die von Goto *et al.* beschriebene regio- und stereoselektive Reduktion von Diketonen mittels Alkohol-Dehydrogenasen (ADHs) dar.^[24] Die ADH-vermittelte Synthese verschiedener Hydroxy-Ketone und Diole konnte durch unterschiedliche (promiskuitiven) Substratbindemodi begründet werden.^[24]

Im Vergleich dazu beschreibt die (iii) katalytische Promiskuität eines Enzyms ebenfalls die Akzeptanz unterschiedlicher Substrate, jedoch einhergehend mit der Katalyse verschiedener Reaktionen.^[14] Ein viel diskutiertes Beispiel hierfür stellt die katalytische Promiskuität von P450-Monooxygenasen dar. Die Arbeitsgruppe von Frances H. Arnold konnte mit der Cyclopropanierung von *N,N*-Diethyl-2-phenylacrylamid zu einer Zwischenstufe des pharmazeutischen Wirkstoffes Levomilnacipran^[25,26], als auch mit der Kohlenstoff-Silicium-Bindungsknüpfung zwischen Phenyltrimethylsilan und Ethyl-2-diazopropanoat^[27] zwei beeindruckende, nicht-natürliche Reaktionen der gewählten Start-Proteine demonstrieren.

Einleitung

Die als (iv) aufgeführte Kategorie der Produkt-Promiskuität beschreibt den Umsatz eines einzelnen Substrates zu unterschiedlichen Produkten, wobei ähnliche Katalyse-Mechanismen Anwendung finden.^[14] Hierfür werden beispielhaft die Arbeiten der Arbeitsgruppe um Bernhard Hauer aufgeführt, die für die Squalen-Hopen-Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*) zusätzlich zur bereits beschriebenen katalytischen Promiskuität^[28], Produkt-Promiskuität des Enzyms nachweisen konnte.^[29] Die Produktverteilung bei der *AacSHC*-katalysierten Umsetzung von Citronellal zu Isopulegol konnte durch Mutationen in der aktiven Tasche stark beeinflusst werden, sodass abhängig von den eingesetzten Varianten die Stereoisomere (-)-*iso*-Isopulegol, (+)-Isopulegol, (-)-*neo*-Isopulegol, (+)-*neo*-Isopulegol und (-)-Isopulegol mit einem Diastereomerenüberschuss bis zu >99% generiert werden konnten.^[29]

Im Zusammenhang mit Enzym-Promiskuität fällt häufig der Begriff Enzym-Superfamilie. Mitglieder einer Superfamilie weisen homologe Strukturen auf und teilen eine gemeinsame katalytische Strategie, obwohl sie ein unterschiedliches Substrat- und Reaktionsspektrum aufweisen.^[30,31] Grund für die verschiedenen Aktivitäten sind lediglich kleine Unterschiede in der Aminosäureabfolge des aktiven Zentrums.^[31] Solche, durch nur kleine Änderungen bedingte Aktivitätswechsel demonstrieren erneut die strukturelle Formbarkeit der aktiven Tasche und die daraus resultierende Vielseitigkeit von Biokatalysatoren.^[14] Durch die gezielte Veränderung von chemischen Eigenschaften (Aminosäureaustausche) in aktiven Taschen sollten bereits vorhandene katalytische Zentren für mechanistisch ähnliche Reaktionen genutzt, und für wertvolle, in der Natur noch nicht vorhandene Reaktionen adaptiert werden können.^[32] Das Einführen oder Verstärken promiskuitiver Aktivitäten mittels "Chemie-basiertem *enzyme engineering*" scheint hierbei besonders geeignet für die Bereitstellung und Nutzung neuer Biokatalysatoren zu sein.^[14,32]

1.3 Bedeutung und Herstellung chiraler Amine

1.3.1 Möglichkeiten der chemischen Synthese

Als Amine werden Derivate von Ammoniak (NH₃) bezeichnet, bei denen ein oder mehrere Wasserstoffatome durch Alkyl- oder Arylgruppen substituiert sind. Je nach Substituierungsgrad unterscheidet man zwischen primären, sekundären und

Einleitung

Aufgrund der Einfachheit und guten Verfügbarkeit der für die Reaktionen benötigten Edukte gelten sie als vielversprechende Möglichkeiten zur Produktion optisch aktiver Amine.^[34,37] Die jedoch wichtigsten Methoden der chemischen Herstellung optisch reiner Amine sind die asymmetrische Addition von Carbanionen an Aldimine (Abbildung 1.3, 4) und die asymmetrische Hydrierung von Iminen und Enaminen (Abbildung 1.3, 5).^[38]

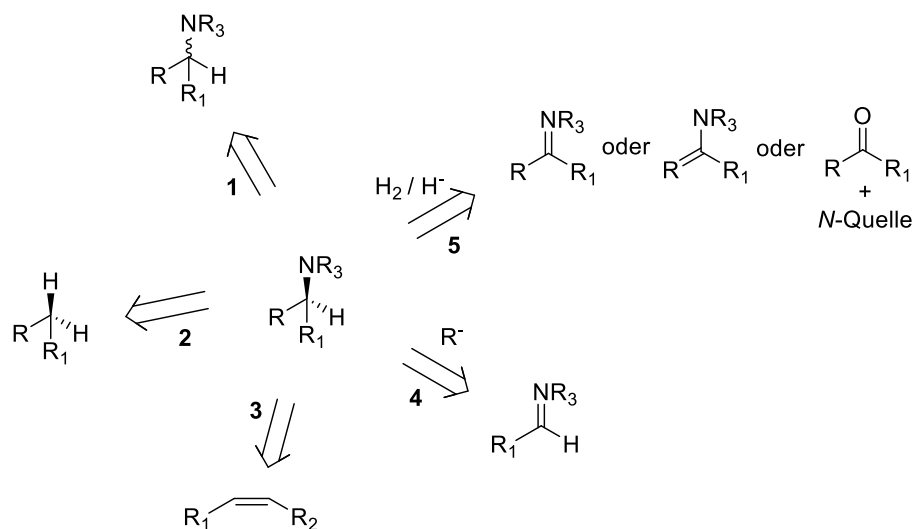


Abbildung 1.3: Strategien zur Herstellung primärer oder sekundärer α-chiraler Amine: **1** Racematspaltung mittels diastereomerer Kristallisation (kinetische Racematspaltung), **2** stereoselektive C-H Aminierung, **3** Hydroaminierung von Olefinen, **4** Asymmetrische Addition von Nucleophilen oder Radikalen, **5** asymmetrische Hydrierung von Iminen, Enaminen und Enamiden (modifiziert nach Nugent und El-Shazly^[39] und Ghislieri und Turner^[34]).

Die Schwierigkeit der asymmetrischen Hydrierung liegt in der Notwendigkeit der Aktivierung der Edukte, welche in der Regel durch Phenyl-, Benzyl-, Phosphinoyl-, oder Sulfonyl-Gruppen durchgeführt wird.^[34] Diese aktivierenden Gruppen sind meist nicht Bestandteil der gewünschten Verbindung und müssen anschließend wieder entfernt werden. Die Hydrierung erfolgt durch molekularen Wasserstoff oder organische Alternativen wie Hydrosilane, Hantzsch-Ester, Alkohole oder Säuren.^[37] Katalysiert werden asymmetrische Hydrierungen entweder durch Übergangsmetallkatalysatoren wie Ruthenium (Ru), Rhodium (Rh) und Iridium (Ir), durch Metall-organische Alternativen wie Rh-Diamin Katalysatoren, oder durch Organokatalysatoren wie chirale Phosphorsäuren.^[34,37] Bei der asymmetrischen Addition wird ein nucleophiler Angriff auf ein Carbanion zur Bildung eines aktivierten Aldimins genutzt.^[37,40] Im zweiten Schritt erfolgt die Hydrierung wie

bereits beschrieben. Die asymmetrische Addition ermöglicht im Vergleich zur klassischen asymmetrischen Hydrierung von Iminen und Enaminen zusätzlich den Zugang zu tertiären α -chiraler Aminen.^[34,39]

Aufgrund der Notwendigkeit organischer Lösungsmittel, metall-organischer Verbindungen und Schwermetallen stellen viele der aufgeführten chemischen Synthese-Methoden keine nachhaltigen Prozesse dar.^[34,38] Die genannten Stoffe sind umweltgefährdend und ihr Einsatz erfordert meist harsche Bedingungen, wie hohe Drücke und hohe Temperaturen.^[37] Des Weiteren stellt die chemo- als auch stereoselektive Katalyse eine stetige Herausforderung beim Einsatz chemischer Katalysatoren dar. Infolge der offensichtlichen Nachteile der klassischen Chemie und der stetigen Fortschritte hinsichtlich Identifizierung und Entwicklung neuer Enzyme, gewinnt die Biokatalyse immer mehr an Bedeutung in der pharmazeutischen Wirkstoffsynthese und stellt die bedeutendste Alternative zu etablierten metallo- und organo-chemischen Methoden dar.^[41] Eine Auswahl pharmazeutisch relevanter Amine, die bereits vollständig oder teilweise biokatalytisch zugänglich sind, sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

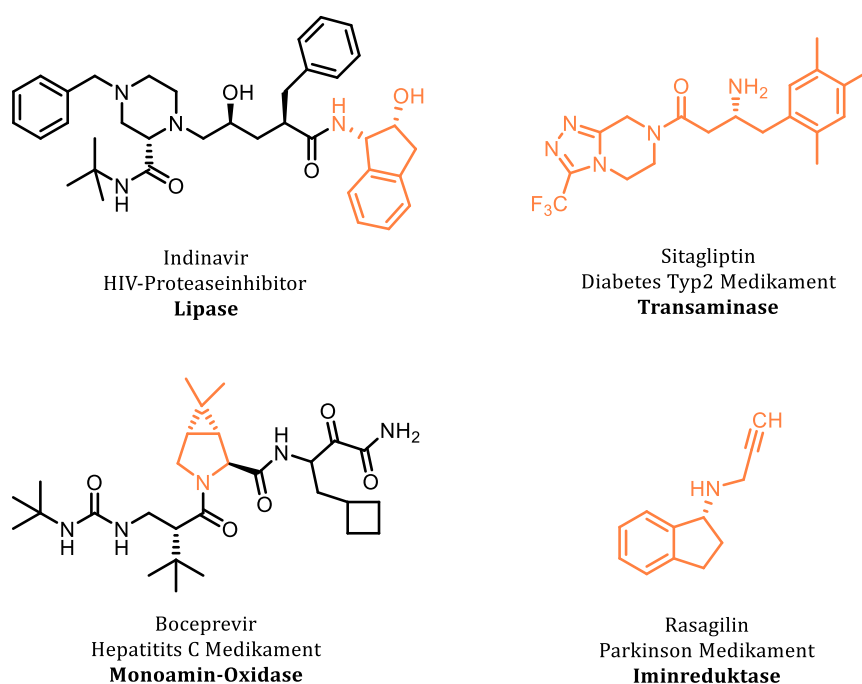


Abbildung 1.4: Pharmazeutisch relevante chirale Amine, wobei die biokatalytisch zugänglichen Bausteine der Wirkstoffe in orange dargestellt sind. Lipase, Transaminase und Monoamin-Oxidase können bereits in industriellem Maßstab eingesetzt werden.^[42-45]

1.3.2 Enzyme für die Darstellung chiraler Amine

Die für die Synthese chiraler Amine beschriebenen Enzyme sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst. Ammoniak-Lyasen sind der Vollständigkeit halber aufgeführt (Abbildung 1.5, **E**), werden aber aufgrund ihres engen Substratspektrums (Synthese natürlicher und nicht-natürlicher α - oder β -Aminosäuren) und der damit verbundenen untergeordneten Rolle für die technische Produktion von Aminen nicht weiter erläutert^[46]. Die Arbeitsgruppe um Frances H. Arnold entwickelte ganz aktuell auf Basis einer Cytochrom-P450-Monooxygenase einen neuen Biokatalysator (P411_{CHA}) für die enantioselektive Aminierung von benzyllischen C-H-Bindungen (Abbildung 1.5, **G**). Eisenkatalysatoren, bisher als schlechte Katalysatoren für C-H-Aminierungen beschrieben, konnten durch die gerichtete Evolution der umgebenden Proteinstruktur so modifiziert werden, dass Aktivität für bestimmte C-H-Aminierungen beobachtbar war.^[47] Aufgrund des bis dato eingeschränkten Substratspektrums (Tosylazid als Stickstoffquelle, Substrate zeigen immer Benzyl-Grundgerüst) wurde der Biokatalysator im Folgenden nicht weiter betrachtet. Eigenschaften und das synthetische Potenzial von Iminreduktasen (Abbildung 1.5, **F**) werden ausführlich unter 1.4 beschrieben.

Lipasen

Die Lipase-katalysierte Acylierung racemischer Amine (Abbildung 1.5, **A**) verläuft mit hoher Selektivität, sodass das nicht umgesetzte Amin mit hoher optischer Reinheit zurückbleibt. Das entstandene chirale Amid kann anschließend zum chiralen Amin hydrolysiert werden. Methoxyessigsäure konnte für die Lipase-katalysierte kinetische Racematspaltung verschiedener Amin-Substrate als bester Acyldonor identifiziert werden.^[48] Als geeignete Katalysatoren sind Lipasen aus *Burkholderia plantarii* und *Candida antarctica* (CalB) beschrieben.^[42,49] Basierend auf diesem Prinzip wurde von der BASF im Rahmen der ChiPros®-Technologie ein Prozess zur Herstellung verschiedener chiraler Amine im großtechnischen Maßstab (mehrere tausend Tonnen pro Jahr) entwickelt und patentiert.^[42,50]

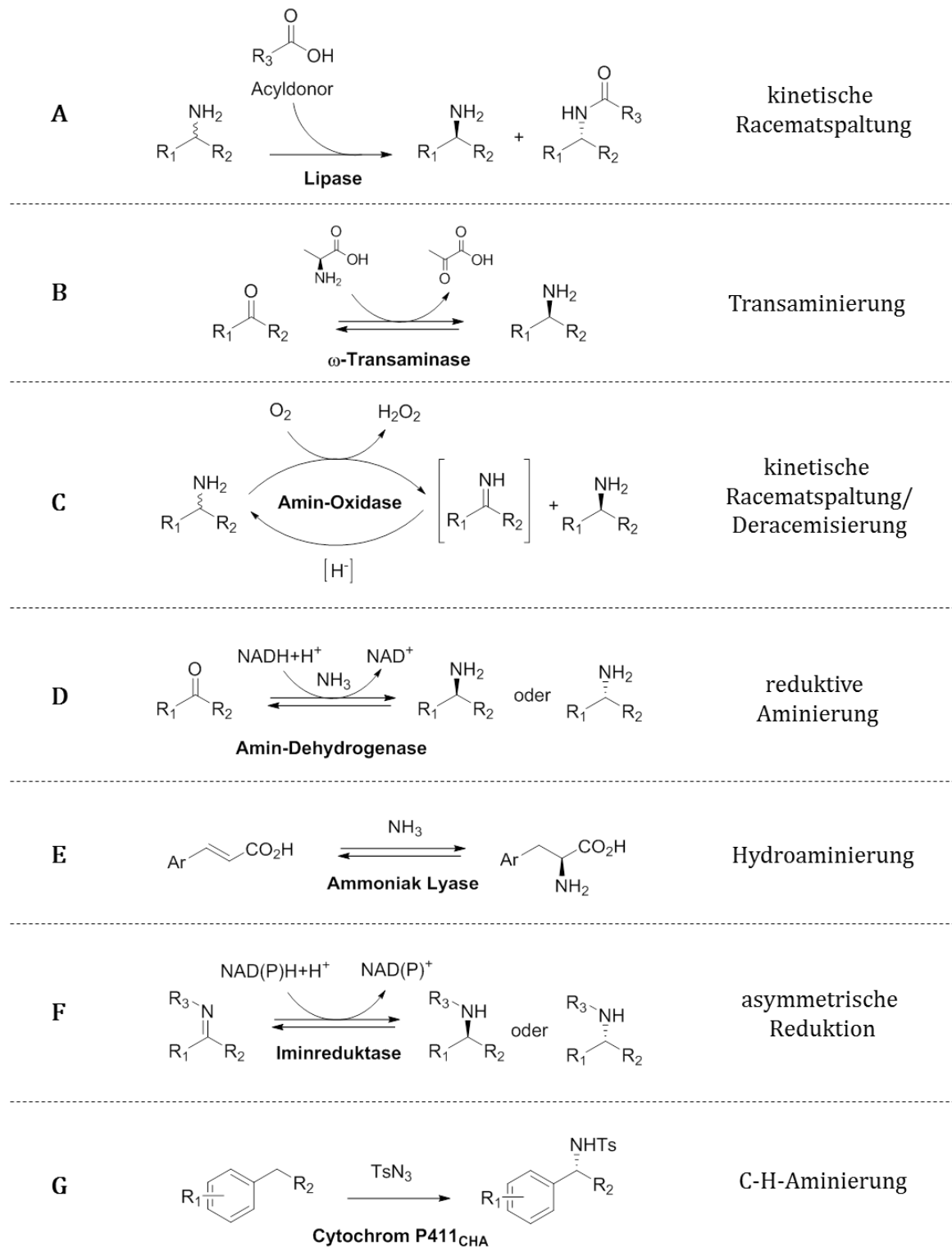


Abbildung 1.5: Enzymatische Strategien für die Synthese chiraler Amine.

Transaminasen

Transaminasen (TAs) sind Enzyme, die die Aminogruppe eines Donormoleküls (häufig Isopropylamin oder Alanin) auf die Carbonylfunktion einer

Einleitung

Akzeptorverbindung (Aldehyd oder Keton) übertragen (Abbildung 1.5, **B**). Je nach Substratmolekül differenziert man zwischen α -Transaminasen (α -TA) und ω -Transaminasen (ω -TA). Während α -TAs eine Säuregruppe in α -Position zur Carbonyl- oder Aminofunktion benötigen, akzeptieren ω -TAs im Prinzip jede Form von Keton oder Amin und stellen aus diesem Grund den häufig geeigneteren Katalysator dar.^[34,38] Die industrielle Bedeutung der ω -TA-katalysierten asymmetrischen Synthese wurde erst kürzlich eindrucksvoll mit der Synthese von Sitagliptin (Diabetes Typ2 Medikament) in einem Maßstab von 200 g/L und einem Enantiomerenüberschuss von > 99,95% demonstriert.^[43] Trotz dessen werden ω -Transaminasen aufgrund von Limitierungen wie Produktinhibierung, der Notwendigkeit eines Co-Substrates, der damit verbundenen Isolierung des Co-Produktes nach der Katalyse, und dem alleinigen Zugang zu primären Aminen nur bedingt für die Amin-Synthese eingesetzt.^[34,38]

Amin-Oxidasen

Amin-Oxidasen, genauer Monoamin-Oxidasen (MAOs) katalysieren die enantioselektive Oxidation von verschiedenen Amin-Substraten zum entsprechenden Imin (Abbildung 1.5, **C**). Als Nebenprodukt entsteht durch die Reduktion von Sauerstoff Wasserstoffperoxid. Das gebildete Imin kann anschließend chemisch mittels NH_3BH_3 wieder zum racemischen Amin reduziert werden.^[51,52] Auf diese Weise akkumuliert das unreaktive Amin nach mehreren Oxidations-Reduktions-Zyklen und theoretische Ausbeuten von 100% sind möglich.^[34] Vorrangig in der Literatur beschrieben, wird die Monoamin-Oxidase MAO-N aus *Aspergillus niger*, die in den letzten Jahren zu einem effizienten und robusten Biokatalysator evolviert wurde, welcher sich durch ein breites Substratspektrum auszeichnet.^[51] Die entwickelten Varianten ermöglichen die Synthese primärer, sekundärer und tertiärer Amine.^[51]

Amin-Dehydrogenasen

Nicotinamid-abhängige Amin-Dehydrogenasen (AmDHs) katalysieren die reduktive Aminierung eines Carbonyl-Akzeptors mit NH_3 als Amin-Donor (Abbildung 1.5, **D**). Im Vergleich zu TAs nutzen AmDHs mit NH_3 keine kostenintensiven organischen Amin-Donoren.^[34] Die ersten Amin-Dehydrogenasen wurden 2012 von Abrahamson *et al.* durch Protein-Engineering auf Grundlage einer Aminosäure-Dehydrogenase,

der Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus*, entwickelt.^[53] Erst kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Francesco Mutti die Eignung verschiedener Amin-Dehydrogenasen für die reduktive Aminierung strukturell vielfältiger prochiraler Ketone und Aldehyde zeigen.^[54] Ebenso wie bei TAs ist die Synthese sekundärer oder tertiärer Amine mittels AmDH-katalysierten Reaktionen nicht möglich.

1.4 Iminreduktasen

Imine und entsprechende Enzyme für die Reduktion dieser C=N-Doppelbindungen sind Teil vieler eu- und prokaryotischer Stoffwechselwege. Prominente Beispiele hierfür sind die Enzyme Dihydrofolatreduktase (DHFR)^[55] und Dihydroreticulinreduktase (DRR)^[56], welche in der Biosynthese von Folsäure (Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat) und Morphium (Reduktion von Dehydroreticulin zu (*R*)-Reticulin) eine bedeutende Rolle spielen. Trotz der physiologischen Relevanz dieser Enzyme konnte ihr Potenzial jedoch bisher nicht für synthetische Anwendungen genutzt werden. Grund hierfür ist das eingeschränkte und sehr spezifische Substratspektrum dieser Enzyme.^[57] Hinsichtlich synthetischer Applikationen für die stereoselektive Reduktion verschiedener prochiraler Imine stellen die im Jahr 2010 das erste Mal beschriebenen Iminreduktasen eine vielversprechende Möglichkeit dar. Die Entdeckung erfolgte nach einem klassischen, Aktivitäts-basierten *Screening* von mikrobiellen Stammsammlungen, die auf Aktivität für das Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin (2MPN) durchsucht wurden.^[58] Ergebnis waren zwei enantiokomplementäre Enzyme aus *Streptomyces* Stämmen: *R*-IRED aus *Streptomyces* sp. GF3587 und *S*-IRED aus *Streptomyces* sp. GF3546.^[58-60] Das schnell wachsende Interesse verschiedener Forschergruppen an der Proteinfamilie der Iminreduktasen resultierte in der Charakterisierung verschiedener homologer Proteine für die asymmetrische Imin-Reduktion, als auch für reduktive Aminierungen.

1.4.1 Strukturelle und Mechanistische Eigenschaften von IREDS

Mittels Sequenz-basierter Datenbanksuchen, bei denen die Gene der Iminreduktasen aus *Streptomyces* sp. GF3587 und *Streptomyces* sp. GF3546 als Templat dienten, wurden innerhalb kürzester Zeit weitere Proteine mit Iminreduktase-Aktivität

Einleitung

identifiziert. Alle bisher charakterisierten und in der Literatur beschriebenen IREDs, mit Zuordnung zu den entsprechenden Forschergruppen, sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Diese Anzahl wurde nach *Screenings* von Roche (Basel, CH) und GSK (London, GB) nochmals um knapp 100 Enzyme (20 Roche, 85 GSK) erweitert, welche jedoch lediglich mit Bezeichnungen wie IR_20 oder IR-49 in der Literatur zu finden sind.^[61,62]

Tabelle 1.1: Auflistung aller bisher charakterisierten und mit Angaben des Organismus beschriebenen Iminreduktasen.

Enzym*	Organismus	Bearbeitet von (Arbeitsgruppe)	Lit.
R-IRED-Ss	<i>Streptomyces</i> sp. G3587	Toru Nagasawa; Nicholas J. Turner	[59,63,64]
R-IRED-Sk	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Gideon Grogan	[65]
R-IRED-Sr	<i>Streptosporangium roseum</i>	Bernhard Hauer; Bettina Nestl	[66,67]
R-IRED-St	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	Bernhard Hauer; Bettina Nestl	[66,67]
R-IRED-Si	<i>Streptomyces ipomoeae</i>	Matthias Höhne	[68]
R-IRED-Pp	<i>Pseudomonas putida</i>	Matthias Höhne	[68]
R-IRED-Ao	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nicholas J. Turner	[69]
R-IRED-Ms	<i>Myxococcus stipitatus</i>	Bettina Nestl	[70]
S-IRED-Ss	<i>Streptomyces</i> sp. G3546	Toru Nagasawa; Nicholas J. Turner; Michael Müller	[60,71,72]
S-IRED-Sa	<i>Streptomyces aurantiacus</i>	Michael Müller; Dörte Rother	[72,73]
S-IRED-Pe	<i>Paenibacillus elgii</i>	Bernhard Hauer; Bettina Nestl; Matthias Höhne	[66–68]
S-IRED-Bc	<i>Bacillus cereus</i>	Gideon Grogan	[74]
S-IRED-Nh	<i>Nocardiosis holophia</i>	Gideon Grogan	[74]
S-IRED-Pl	<i>Paenibacillus lactis</i>	Gao-Wei Zheng und Jian-He Xu	[75]
S-IRED-Ao	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Nicholas J. Turner	[76]

* Stereoselektivitäten sind wie für das Modellsubstrat 2-Methylpyrrolin bestimmt angegeben

Die erste Struktur einer Iminreduktase wurde für das Enzym R-IRED-Sk aus *Streptomyces kanamyceticus* (Uniprot: Q1EQE0) gelöst. Wie nach ersten Studien der R-IRED-Ss von Mitsukura *et al.* vorgeschlagen, wurde das Vorliegen von IREDs als

Homodimere bestätigt (Abbildung 1.6).^[65] Die monomeren Untereinheiten besitzen ein Molekulargewicht von rund 30 kDa und sind aus einem N-terminalem *Rossmann fold* (charakteristisches Strukturmotiv: β - α - β - α - β für die Bindung des Nicotinamid-Cofaktors), einer C-terminalen helikalen Domäne und einer langen α -Helix, die beide Domänen verbindet, aufgebaut. Charakteristisch für IREDs ist das Ausbilden der aktiven Tasche an der Interaktionsfläche der monomeren Untereinheiten, zwischen *Rossmann fold* eines Monomers und C-terminaler helikaler Domäne des Partner-Monomers (siehe Abbildung 1.6). Dieser strukturelle Aufbau konnte durch die Aufklärung weiterer Kristallstrukturen (*S*-IRED-*Ss* (pdb|40QY), *S*-IRED-*Sa* (pdb|40QZ), *S*-IRED-*Bc* (pdb|4D3D), *S*-IRED-*Nh* (pdb|4D3S), *S*-IRED-*Ao* (pdb|5FWN) und *R*-IRED-*Ao* (pdb|5G6S)) bestätigt werden. Hierbei waren die Enzyme aus *Amycolatopsis orientalis* (*S*-IRED-*Ao*) und *Aspergillus oryzae* (*R*-IRED-*Ao*) die ersten Enzyme, die als Ternärkomplex mit dem Cofaktor NADP(H) und den Amin-Produkten (*R*)-Methyltetrahydroisoquinolin (*S*-IRED-*Ao*) bzw. (*R*)-Rasagilin (*R*-IRED-*Ao*) kristallisiert werden konnten. Die Kristallisation eines ternären Komplexes mit Imin-Substrat konnte bisher nicht realisiert werden.

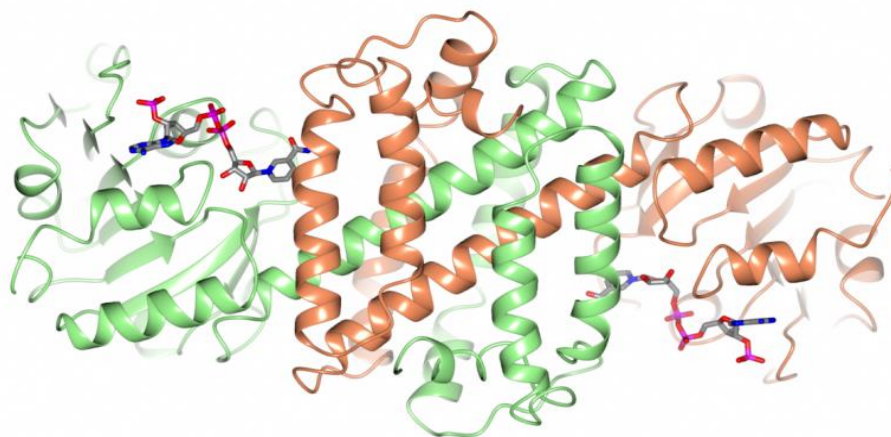


Abbildung 1.6: Kristallstruktur von *R*-IRED-*Sk* aus *Streptomyces kanamyceticus* (pdb|3ZHB).^[65] Die monomeren Untereinheiten des Homodimers sind in grün und orange dargestellt. Die Position des Cofaktors NADPH (grau) verdeutlicht die aktive Tasche an der Interaktionsfläche der monomeren Untereinheiten.

Nach Aufklärung der Kristallstruktur von *R*-IRED-*Sk* aus *Streptomyces kanamyceticus* konnte eine strukturelle Ähnlichkeit zur Hydroxyisobutyrat Dehydrogenase (Hib-DH) aus *Thermus thermophilus* HB8 (pdb|2CVZ) festgestellt werden.^[57] Ein Unterschied definiert sich durch die Ausbildung der aktiven Tasche. Hib-DHs bilden

Einleitung

keine funktionalen Homodimere aus, die aktive Tasche liegt innerhalb einer monomeren Untereinheit zwischen *Rossmann fold* und C-terminaler Domäne des selben Monomers.^[77] Ein weiterer Hinweis für die Verwandtschaft zu Dehydrogenasen lieferte das Erstellen der Iminreduktase-Datenbank (<http://www.ired.unistuttgart.de>).^[66] Alle dort aufgeführten Enzyme wurden basierend auf Sequenz-Homologien als putative Iminreduktasen definiert, sind jedoch meist bereits als Dehydrogenasen (Hydroxyisobutyrat-, Hydroxysäure-, Glycerol-3-Phosphat- oder 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen) annotiert.^[66] Bei Untersuchungen mit ausgewählten Enzymen konnte jedoch keine Aktivität für die annotierten Substrate detektiert werden.^[66] Auf Grundlage der sequentiellen und strukturellen Ähnlichkeit von IREDs und Dehydrogenasen wurde der erste katalytische Mechanismus für IREDs postuliert.^[65] In Hib-DHs fungiert Lysin als Protonen-Donor/-Akzeptor in der Reduktion/Oxidation der entsprechenden Substrate. An selber Stelle wurde in *R*-IRED-*Sk* ein Asparaginsäurerest detektiert.^[65] Für beide Enzymfamilien ist NAD(P)H als Hydrid-Donor beschrieben.^[65] Führt man diese Erkenntnisse zusammen, ergibt sich in Anlehnung an die für Dehydrogenasen beschriebene klassische Säure-Basen-Katalyse der in Abbildung 1.7 dargestellte Mechanismus.

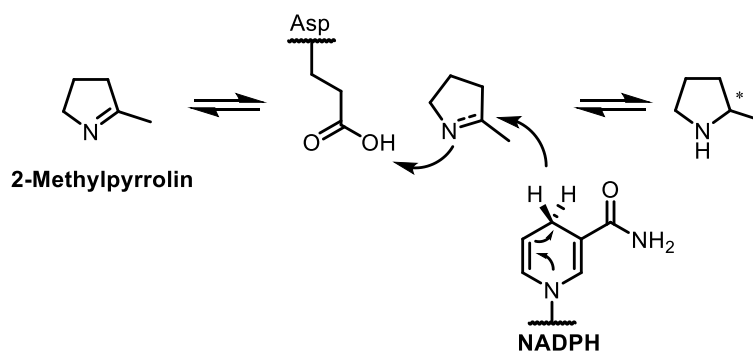


Abbildung 1.7: Von Rodríguez-Mata *et al.* vorgeschlagener Mechanismus für *R*-IRED-*Sk* aus *Streptomyces kanamyceticus* nach Vergleich mit der Hydroxysäure-Dehydrogenase aus *Thermus thermophilus* HB8. Asparaginsäure stabilisiert und protoniert das Imin-Substrat, sodass der anschließende Hydrid-Transfer von NADPH erfolgen kann (modifiziert nach Rodríguez-Mata *et al.*^[65]).

Die deutliche Verringerung der Aktivität nach Austausch der als Protonen-Donor vermuteten Asparaginsäure durch Alanin in IREDs aus *Streptomyces kanamyceticus*^[65] und *Streptosporangium roseum*^[66] demonstriert die katalytische Bedeutung dieser Aminosäureposition. Ob die genaue Aufgabe tatsächlich in der

Protonierung des Imin-Substrates liegt, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Aufgrund verschiedener Hinweise wird das Vorhandensein eines Protonen-Donors generell in Frage gestellt und diskutiert: (1) die Aminosäureposition der Asparaginsäure ist innerhalb der Enzymfamilie nicht konserviert^[66], (2) an der entsprechenden Position wurden in bisher charakterisierten IREDs auch nicht-protische Aminosäuren wie Asparagin oder Phenylalanin detektiert, jedoch vergleichbare Aktivitäten für die jeweiligen Enzyme ermittelt^[61,76], (3) eine Distanz von 8 Å zwischen der Carboxyl-Gruppe der Asparaginsäure und dem H-liefernden C₄-Atom von NADPH in *R*-IRED-*Sk* ist im Vergleich zu anderen Reduktasen sehr groß.^[57,65] Zusätzlich wird diskutiert, ob bei dem experimentell verwendeten pH-Wert von 7,0 das Imin-Substrat bereits protoniert vorliegt, und dadurch die Aufgabe der Iminreduktasen alleinig in der richtigen Positionierung des Substrates zum Hydrid-Donor NADPH besteht.^[78] Erste Einblicke bezüglich Substrat-Bindung und -Positionierung wurden nach Kristallisation der *S*-IRED-*Ao* aus *Amycolatopsis orientalis* (*S*-IRED-*Ao*) mit dem Amin-Produkt (*R*)-Methyltetrahydroisoquinolin erzielt.^[76] Mittels Mutationsstudien, welche basierend auf Analysen der Kristallstruktur durchgeführt wurden, konnten jedoch noch keine für die Katalyse entscheidenden Aminosäuren identifiziert werden.

Obwohl aus verschiedenen Stoffwechselwegen NADH-abhängige Imin-reduzierende Enzyme bekannt sind^[79], nutzen alle bisher beschriebenen Iminreduktasen NADPH als Cofaktor.^[57] Borlinghaus und Nestl konnten ganz aktuell mit Anwendung des computerbasierten Tools „CSR-SALAD“ (engl.: *Cofactor Specificity Reversal-Structural Analysis and Library Design*^[80]) für *R*-IRED-*Ms* aus *Myxococcus stipitatus* eine Umkehr der Cofaktor-Spezifität zeigen.^[70] Nach mehrereren Runden der ortsgerichteten Mutagenese konnte eine Variante mit 2900-fach gesteigerter Spezifität für NADH und einer dabei gleichbleibenden Aktivität für das Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin generiert werden.^[70] Für NADH sind deutlich mehr Cofaktor-Regenerationssysteme als für NADPH bekannt, was den Einsatz von Iminreduktasen in bestimmten Synthese-Prozessen in Zukunft erleichtern kann.

1.4.2 Asymmetrische Reduktion

Bisher ist die physiologische Funktion von Iminreduktasen in ihren Wirtsorganismen, und damit verbunden das natürliche Substrat dieser Enzyme,

Einleitung

nicht bekannt. Bei Analysen hinsichtlich des Substratspektrums konnte jedoch für alle bisher charakterisierten IREDs (vergleiche Tabelle 1.1) eine geringe Substratspezifität detektiert werden. Eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher zyklischer Imin-Substrate konnte in Ganzzell-Biotransformationen oder in Ansätzen mit gereinigtem Enzym umgesetzt werden. Zu diesen Substraten gehören fünf-, sechs- und siebengliedrige Ringsysteme, Isoquinoline, Carboline, Indole, als auch Iminiumionen dieser Verbindungen (Abbildung 1.8).

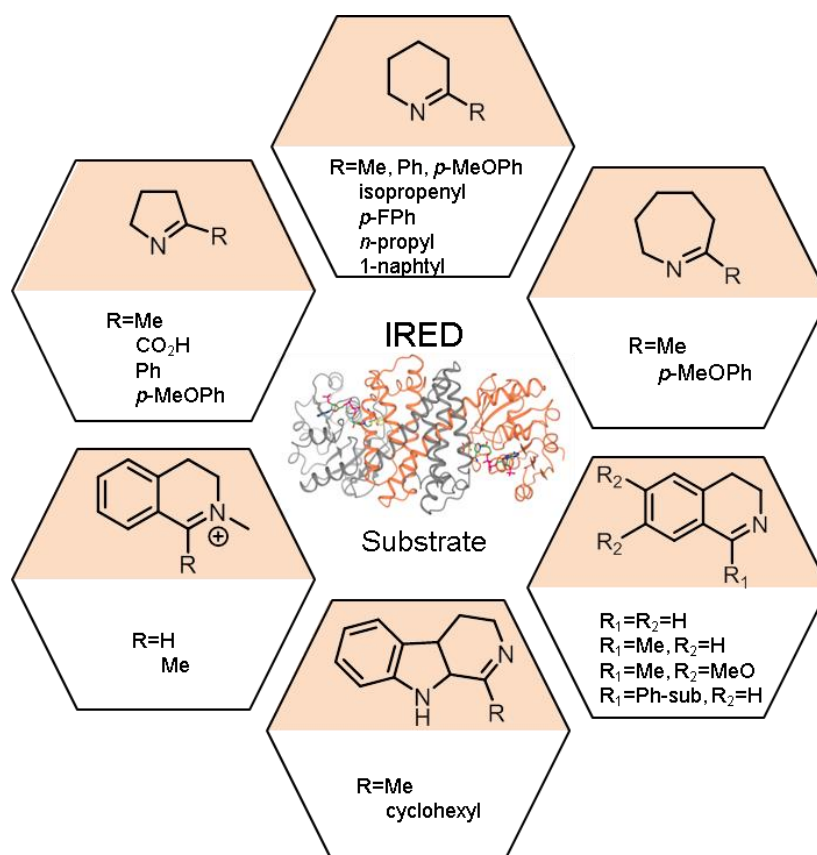


Abbildung 1.8: Strukturen zyklischer Iminsubstrate, welche von IREDs zum entsprechenden Amin reduziert werden können (modifiziert nach Lenz *et al.*^[81]).

Die Reduktion exozyklischer Imin-Substrate ist aufgrund der geringeren Stabilität (direkte Hydrolyse in wässrigem Milieu) schwieriger. Trotz dessen konnten für die exozyklischen Imine *N*-Benzylidenmethylamin und Benzophenonimin gute Aktivitäten detektiert werden.^[67,82] Die für die verschiedenen Iminreduktasen detektierten Stereoselektivitäten variieren stark. Sich strukturell ähnelnde Substrate werden von den selben Enzymen häufig mit unterschiedlichen Selektivitäten reduziert.^[61,74] Eine Erklärung für diese Ergebnisse konnte bisher jedoch noch nicht gefunden werden.

1.4.3 Reduktive Aminierung

Asymmetrische reduktive Aminierungen stellen in der Chemie eine der wichtigsten Reaktionen für die Synthese chiraler Amine dar. Die Kondensation einer Carbonylverbindung mit einem Aminnukleophil zum Imin-Intermediat und die darauf folgende Reduktion zum gewünschten Amin-Produkt werden meist *in situ* kombiniert. Beschäftigt man sich mit reduktiven Aminierungen werden die Herausforderungen der Reaktion schnell deutlich: (1) eine hohe Chemoselektivität des Reduktionsmittels ist nötig, um die Reduktion der Carbonylverbindung zum entsprechenden Alkohol zu vermeiden und (2) in wässriger Lösung ist keine hohe Stabilität nicht-zyklischer Imin-Intermediate gegeben.^[83] Des Weiteren liegt das Reaktionsgleichgewicht der Kondensations-Reaktion aufgrund der Hydrolyseanfälligkeit des Imins auf der Seite der Ausgangssubstrate.^[83] Chemiker versuchen diesen Schwierigkeiten hauptsächlich durch die Anwendung von Übergangsmetallkatalysatoren wie Ruthenium, Rhodium und Iridium in organischen Lösemitteln entgegenzuwirken.^[39,83] Diese Anwendung hat jedoch meist eine unzureichende Chemo- und Stereoselektivität zur Folge.

Der erste Durchbruch aus biokatalytischer Sicht gelang im Jahr 2013, als Codexis/Merck (US) die Herstellung verschiedener sekundärer und tertiärer Amine mittels einer durch *enzyme engineering* optimierten Aminosäure Dehydrogenase, der Opn-Dehydrogenase aus *Arthrobacter* sp., patentierte.^[84] In diesem Sinne entwickelte sich nach Entdeckung der Enzymfamilie der Iminreduktasen die Idee das Potenzial dieser Enzyme in der Reduktion verschiedener Imin-Substrate als Ausgangspunkt zur Generierung von „reduktiven Aminasen“ zu nutzen.

Die Arbeitsgruppe um Michael Müller konnte die erste IRED-katalysierte reduktive Aminierung zeigen.^[72] Nach Inkubation von 4-Phenyl-2-butanon in Methylammonium-Puffer mit der *S*-selektiven Iminreduktase aus *Streptomyces* sp. GF3546 (*S*-IRED-Ss) konnten 8,8% Umsatz zum entsprechenden Amin-Produkt mit einem Enantiomerenüberschuss von 76% detektiert werden.^[72] Dieses Potenzial von IREDs in der Katalyse reduktiver Aminierungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiter untersucht. Die Erweiterung des Substratpanels hinsichtlich Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil, sowie die Optimierungen der Reaktionsbedingungen zur Steigerung der Produktbildung sind im Manuskript *“Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and*

Einleitung

Ketones^[82] veröffentlicht und in Kapitel 4.2 erläutert. Roche (Basel, CH) konnte aufbauend auf diesen Ergebnissen das Substrat- und somit Produktspektrum IRED-katalysierter reduktiver Aminierungen nochmals erweitern.^[85] Während Untersuchungen mit 28 verschiedenen Iminreduktasen wurde neben Acetophenon, 2-Hexanon (erste getestete aliphatische Verbindung), Cyclohexanon und verschiedene Derivate davon, sowie unterschiedliche Aminnukleophile (Ammonium, Methylamin oder Butylamin) getestet.^[85] Hierbei wurden Cyclohexanon und 3-Methylcyclohexanon als beste Carbonyl-Akzeptoren, sowie Methylamin als bester Amin-Donor identifiziert.^[85] Abhängig vom eingesetzten Enzym konnten für diese Substratkombinationen Umsätze bis zu 94% detektiert werden.^[85] Zusätzlich wurde das Scale-up der Reaktionen in den präparativen Maßstab von 100 mg realisiert.^[85] Die Arbeitsgruppe von Matthias Höhne konnte während Studien zur biokatalytischen Synthese der pharmazeutisch relevanten Substanzen Rasagilin und Selegilin (Substanzen zur Behandlung von Parkinson) diese Ergebnisse bestätigen und ebenfalls Cyclohexanon und Methylamin als beste Substratkombination für IRED-katalysierte reduktive Aminierungen identifizieren.^[45] Gleichzeitig wurde erstmalig der Einsatz sekundärer Aminnukleophile und somit die Bildung tertiärer Amine gezeigt.^[45] In Reaktionen mit Cyclohexanon und sechs ausgewählten sekundären Aminnukleophilen wurden *N*-Methylpropargylamin und Pyrrolidin als geeignetste Nukleophile identifiziert.^[45] Die Zielsubstanzen *R*-Rasagilin und *S*-Rasagilin konnten in präparativem Maßstab (100 mg) mit Ausbeuten von 58% bzw. 81% und Enantiomerenüberschüssen von 90% (*R*) bzw. 72% (*S*) synthetisiert werden.

Alle bisher veröffentlichten Ergebnisse hinsichtlich IRED-katalysierter reduktiven Aminierungen wurden nach Einsatz gereinigter Enzympräparate ermittelt. Arbeiten der Gruppe von Dörte Rother zeigen, dass auch Umsätze mit Ganzzellkatalysatoren (*E. coli* mit überexprimierten IREDs) möglich sind.^[86] Mit den in Anlehnung an die Arbeiten von Roche (Basel, CH) gewählten Substratkombinationen konnten je nach verwendetem Enzym (ebenfalls aus dem Roche Panel: IR_1 bis IR_33) Umsätze bis 99% mit guten bis exzellenten Selektivitäten (bis zu 98% *ee*) gezeigt werden.^[86] Der Einsatz nicht-gereinigter Enzymvarianten für die Katalyse von reduktiven Aminierungen konnte ganz aktuell von Murray Brown und Kollegen bei GSK (GlaxoSmithKlein, London, UK) bestätigt werden.^[62] Durch die Verwendung von

Zelllysaten mit, im Vergleich zu bis dato durchgeführten Arbeiten, geringen Enzymkonzentrationen wurde hierbei vor allem das industrielle Potenzial dieser Enzyme hervorgehoben.^[62]

Der bisher ausführlichste Beitrag auf dem Gebiet der enzym-katalysierten reduktiven Aminierungen wurde ganz aktuell von Turner und Mitarbeitern in Manchester veröffentlicht.^[69] Das von ihnen für reduktive Aminierungen beschriebene Enzym aus *Aspergillus oryzae* wird als „reduktive Aminase“ (*AspRedAm*) bezeichnet, wurde jedoch basierend auf Sequenzhomologien zu den Iminreduktasen *S-IRED-Ao*^[76], *R-IRED-Ss*^[59] und *S-IRED-Ss*^[60] identifiziert. Im Vergleich zu bisher für reduktive Aminierungen eingesetzte IREDs, zeigte *AspRedAm* jedoch außergewöhnlich hohe Aktivitäten für eine Vielzahl an Substratkombinationen.^[69] Das getestete Substratpanel enthielt 32 verschiedene Carbonyl-Akzeptoren und 19 unterschiedliche Aminnukleophile. Bei der Auswahl der Substrate wurde darauf geachtet chemisch ein möglichst breites Spektrum abzudecken, weshalb zyklische, aromatische, aliphatische, sowie substituierte Aldehyde, Ketone und Amine untersucht wurden.^[69] Additiv wurden außerdem aliphatische Diamine als Aminnukleophile in das Substratpanel aufgenommen.^[69] Basierend auf relativen Aktivitäten, welche für alle möglichen Substratkombinationen bestimmt wurden, und dem eingesetzten Verhältnis von Aminnukleophil zu Carbonyl-Akzeptor, wurden die Substrate in Gruppen eingeteilt: Gruppen I-IV beinhalten die Carbonyl-Akzeptoren, Gruppen A-C die Aminnukleophile.^[69] Mit zyklischen Ketonen wurden bessere Umsätze als mit linearen Ketonen ermittelt und primäre Amine stellten die besten Aminnukleophile dar.^[69] Für die besten Kombinationen (Gruppe I mit Gruppe A) konnten Umsätze > 98% mit exzellenten Selektivitäten erzielt werden (Abbildung 1.9).

Der Aktivitäts-Unterschied von *AspRedAm* in reduktiven Aminierungen im Vergleich zu anderen Iminreduktasen wird von Aleku *et al.* auf mechanistischer Basis erklärt. Nach der Ermittlung kinetischer Daten wird für *AspRedAm* die Katalyse beider Teilreaktionen postuliert. Sowohl die Kondensation von Carbonylverbindung und Aminnukleophil, als auch die anschließende Reduktion des Imin-Intermediates findet in der aktiven Tasche des Enzyms statt.^[69] In Reaktionen mit bisher eingesetzten Iminreduktasen konnte die Produktbildung durch Bedingungen, die eine erhöhte Iminbildung fördern (pH, Verhältnis Carbonylverbindung und

Einleitung

Aminnukleophil), gesteigert werden.^[82] Während für diese Iminreduktasen somit die Abhängigkeit der Produktbildung von der Kondensation des Imin-Intermediates beschrieben ist, konnte in Reaktionen mit *AspRedAm* kein Einfluss dieser Parameter festgestellt werden. Biotransformationen bei pH 7,0 lieferten gleiche Ergebnisse wie bei pH 9,0 und je nach Substratkombination konnten Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil im Verhältnis 1:1 eingesetzt werden.^[69] Diese Ergebnisse belegen das Potenzial von Iminreduktasen in der Katalyse reduktiver Aminierungen und stellen einen guten Ausgangspunkt für weitere Optimierungen mittels gerichteter Evolution dar.

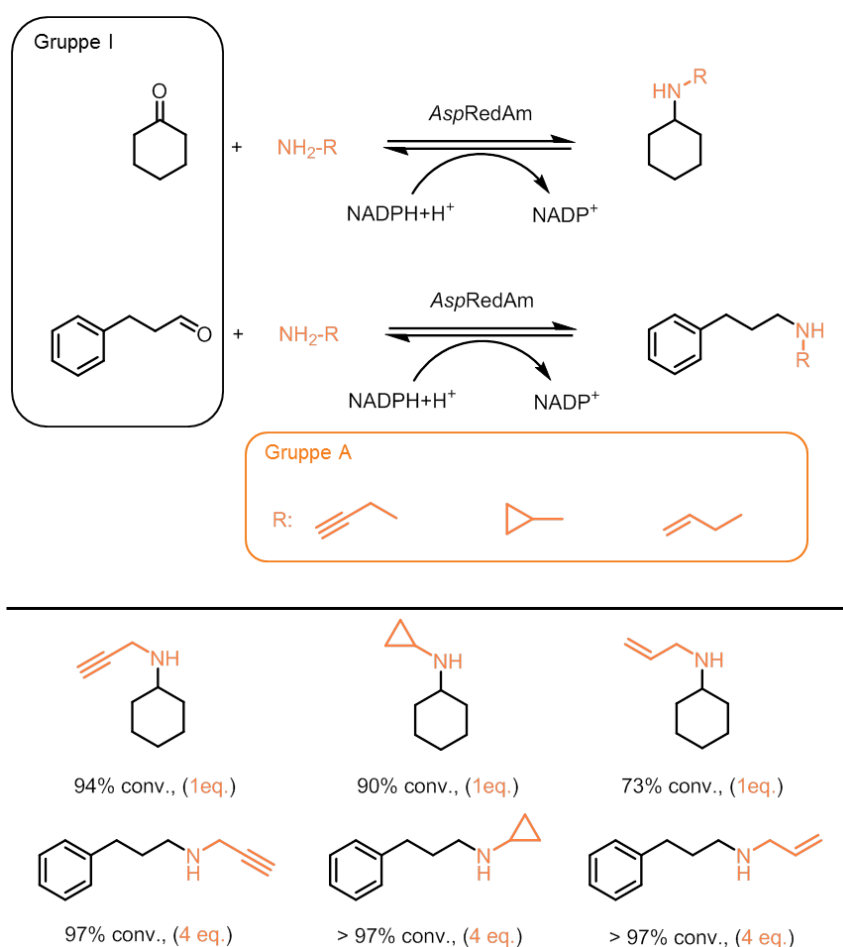


Abbildung 1.9: Ergebnisse der Biotransformationen mit *AspRedAm* nach Kombination der besten Carbonylverbindungen (Gruppe I) mit den besten Aminnukleophilen (Gruppe A) (modifiziert nach Lenz *et al.*^[81]).

In die gleiche Richtung forschend wurde in einer Kollaboration der Arbeitsgruppe von Nicholas Turner und Pfizer (Worldwide Research and Development, Connecticut, US) eine Bibliothek von 45 putativen „reduktive Aminasen“ mit

unterschiedlichen aliphatischen, zyklischen und aromatischen Ketonen, sowie verschiedenen Aminnukleophilen (Ammonium, Methylamin, Pyrrolidin, Allylamin, Benzylamin und Anilin) gescreent.^[87] Mit Produktbildungen und Selektivitäten bis zu >99% bzw. >98% *ee* konnte das Spektrum an „reduktiven Aminasen“ um mehrere Enzyme erweitert werden.^[87] Zusätzlich konnte mit isolierten Ausbeuten von 76% die Anwendung dieser Enzyme in präparativen Biotransformationen (100-125 mM Cyclohexanon, bis zu 2 Äquivalente Methylamin, Allylamin oder Pyrrolidin) gezeigt werden.^[87]

2 Fragestellung und Motivation

Die Toolbox an Enzymen, die die Synthese von chiralen Aminen erlauben, wurde jüngst um die erst 2010 neu entdeckte Enzymfamilie der Iminreduktasen erweitert. Im Rahmen der Arbeit sollten Betrachtungen der katalytischen Promiskuität zur Erweiterung des Reaktionsspektrums, als auch der Kenntnisse hinsichtlich Evolution und Mechanismus dieser Enzyme beitragen.

Iminreduktasen (IREDs) ermöglichen die stereoselektive Reduktion einer Vielzahl prochiraler zyklischer Imine zu den jeweiligen Amin-Produkten. Im Vergleich zu bisher etablierten Enzymen für die Amin-Synthese (Lipasen, Amin-Oxidasen, ω -Transaminasen) zeichnen sie sich vor allem durch ihr Potenzial in der Herstellung sekundärer und tertiärer Amine aus. Die physiologische Rolle und damit verbunden das natürliche Substrat dieser Enzyme ist bisher nicht bekannt.^[88] Ebenso konnte trotz erfolgreicher Strukturaufklärung verschiedener IREDs der genaue Mechanismus bisher nicht gelöst werden.^[65,76] Ziel dieser Arbeit war es einerseits das Reaktionsspektrum, einhergehend mit der katalytischen Promiskuität dieser Enzyme näher zu studieren. Aufgrund der Relevanz im Bereich der organischen Chemie war hier vor allem die Untersuchung der reduktiven Aminierung von Bedeutung. Außerdem wurden den C=N-Bindungen ähnliche funktionelle Gruppen wie C=O oder C=S als mögliche Zielmoleküle für Promiskuitäts-Studien angedacht. Das Ausloten der katalytischen Promiskuität sollte außerdem zur Generierung eines größeren Verständnisses hinsichtlich Evolution und Mechanismus dieser Enzyme genutzt werden. In vorherigen am Institut für Technische Biochemie durchgeführten bioinformatischen Arbeiten wurde die Sequenz- und Strukturähnlichkeit von IREDs zu β -Hydroxysäure Dehydrogenasen beschrieben.^[78] Mittels der Methode des *enzyme redesign* sollten genaue Unterschiede dieser Enzymfamilien herausgearbeitet und somit mögliche evolutionäre Wege von IREDs rückverfolgt werden. Alle Teilaspekte zusammenfassend sollte ein größeres Verständnis für diese neuartige Enzymfamilie generiert werden, sodass in Zukunft industriell relevante Transformationen im Bereich der Amin-Synthese gezielter realisiert werden können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich und Fluka (Steinheim, DE), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE), Acros Organics (Geel, BE), VWR (Darmstadt, DE), Alfa Aesar (Karlsruhe, DE), abcr GmbH (Karlsruhe, DE) und Serva (Heidelberg, DE) bezogen. Die Imin-Substrate 6-Methyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin und 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Nicholas Turner und Dr. Shahed Hussain von der Universität in Manchester zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Enzyme und Kits für molekular- und mikrobiologische Arbeiten

In Tabelle 3.1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme und Kits aufgeführt. Alle aufgeführten Enzyme wurden mit den zugehörigen Puffersystemen verwendet.

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Enzyme und Kits.

Verwendung	Enzym/Kit	Herkunft
Ortsgerichtete Mutagenese/ <i>Gibson assembly</i>	<i>PfuUltra</i> II Fusion HS Polymerase	Agilent Santa Clara, US
<i>Gibson assembly</i>	<i>Phusion</i> [®] High-Fidelity Polymerase	NEB Frankfurt, DE
<i>Gibson assembly</i>	T5 Exonuklease	NEB Frankfurt, DE
<i>Gibson assembly</i>	<i>Taq</i> DNA Ligase	NEB Frankfurt, DE
Isolierung von Plasmid-DNA	Zyppy [™] Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Irvine, US
Reinigung von Plasmid-DNA	DNA Clean and Concentrator [™]	Zymo Research Irvine, US
Gelextraktion von DNA	Zymoclean [™] Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Irvine, US

Material und Methoden

Proteinbestimmung	Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Braunschweig, DE
<i>In vitro</i> Expression	PURExpress® <i>In Vitro</i> Protein Synthesis	NEB Frankfurt, DE

3.1.3 Verwendete Plasmidsysteme und konstruierte Plasmide

Basierend auf Untersuchungen von Dr. Phillip Scheller am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart wurde für die *in vivo* Proteinexpression aller bearbeiteten Enzyme das Plasmid pBAD33 verwendet.^[89] Das pBAD-Expressionssystem ist ein strikt reguliertes, auf dem Arabinose-Operon beruhendes System, bei welchem die Transkription durch das AraC-Repressorprotein kontrolliert wird.^[90] Durch Zugabe von Arabinose wird eine Konformationsänderung des Repressors ausgelöst, welche die Transkription des Zielgens ermöglicht.^[90] Der Vektor besitzt einen pACYC184-Origin und vermittelt eine Chloramphenicol-Resistenz.^[90] Die gewünschten Gene wurden mittels *Gibson assembly* in pBAD33 kloniert (siehe 3.2.3). Nachfolgend sind die Plasmidkarten der in der Arbeit verwendeten Konstrukte dargestellt (Abbildung 3.1 A-E), wobei die Vektoren pBAD33_*R*-IRED-*Sr* und pBAD33_*S*-IRED-*Pe* im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Philipp Scheller generiert wurden.^[89] Die entsprechenden Protein- und DNA-Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Wildtypenzyme sind im Anhang der Arbeit unter 7.1 enthalten. Im Rahmen der Arbeit generierte Plasmide, die zu entscheidenden Ergebnissen führten wurden in die Stammsammlung des Institutes für Biochemie und Technische Biochemie aufgenommen und sind im Anhang unter 7.2 mit entsprechender Nummerierung (ITB-Nummern) aufgelistet.

Das für die *in vitro* Expression verwendete Kit (PURExpress® *In vitro* Protein Synthesis, siehe Tabelle 3.1) enthält für die Transkription der Templat-DNA zur entsprechenden mRNA eine T7-DNA-Polymerase. Aus diesem Grund muss bei Verwendung des Kits darauf geachtet werden, dass das zu exprimierende Gen auf einem pET-Vektor mit dem für die T7-DNA-Polymerase notwendigen T7-Promotor vorliegt. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Konstrukt pET28a_*R*-IRED-*Sr* wurde im Rahmen des EU-Projektes CHEM21 von Dr. Murray Brown von GlaxoSmithKline (UK) zur Verfügung gestellt und ist in Abbildung 3.1 F dargestellt.

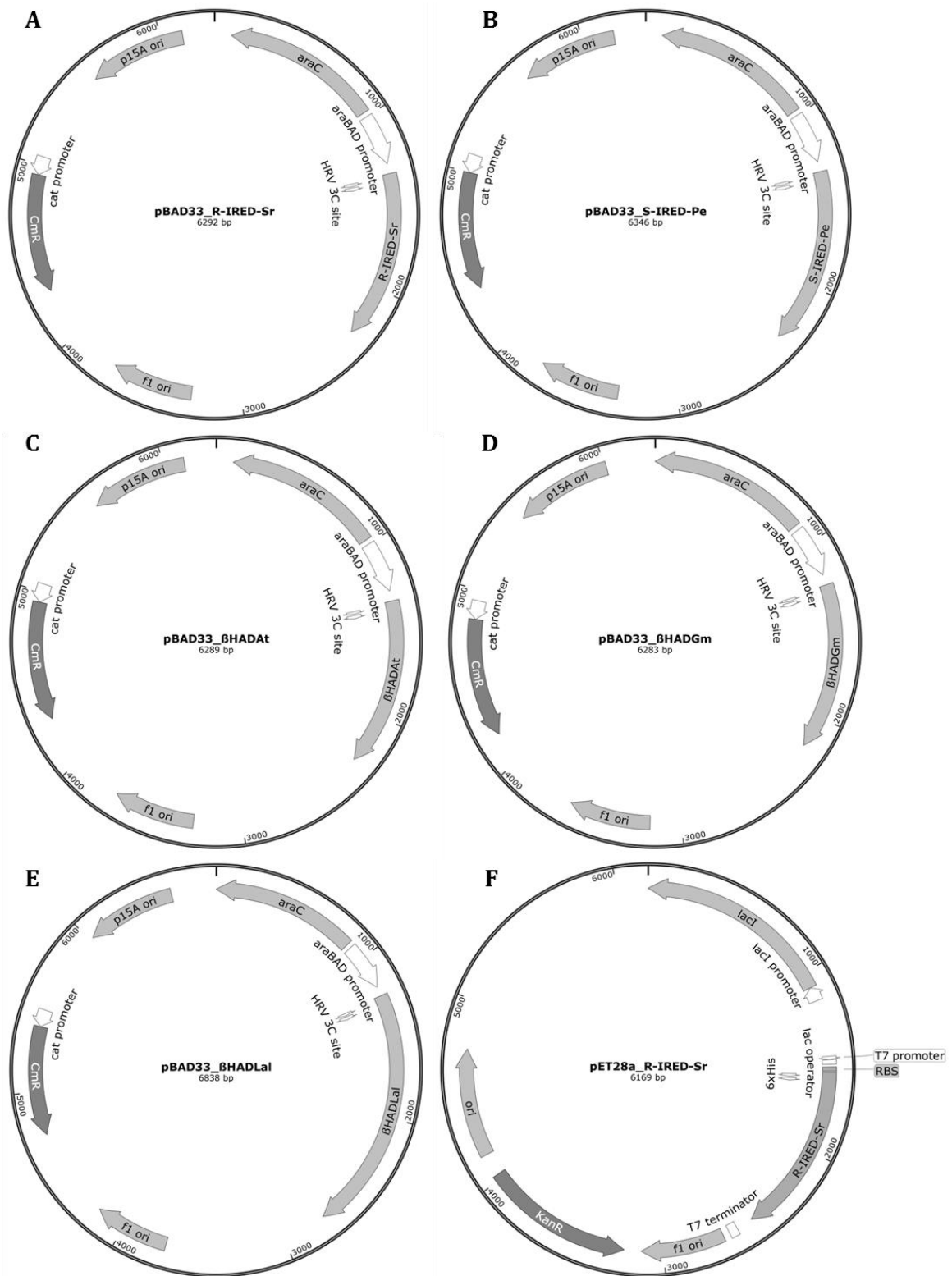


Abbildung 3.1: Vektorkarten der verwendeten Plasmide: (A) pBAD33_R-IRED-Sr; (B) pBAD33_S-IRED-Pe; (C) pBAD33_βHADat; (D) pBAD33_βHADGm; (E) pBAD33_βHADLal; (F) pET28a_R-IRED-Sr.

3.1.4 Primer

Sämtliche in der Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion International AG (Planegg, DE) bezogen. In Tabelle 3.2 sind alle verwendeten Oligonukleotide, die für die ortspezifische Mutagenese eingesetzt wurden, aufgelistet. Informationen über das verwendete DNA-Templat, als auch die mutierte Position inklusive vorgenommenem Aminosäureaustausch sind den Namen der Oligonukleotide zu entnehmen. In Tabelle 3.3 sind alle Oligonukleotide, die für entsprechende Klonierungsarbeiten mittels *Gibson assembly* benötigt wurden, aufgeführt.

Tabelle 3.2: Auflistung der für die ortspezifische Mutagenese verwendeten Oligonukleotide. Veränderte Codons für entsprechende Aminosäureaustausche sind in fett markiert.

Pos.	Name	Sequenz in 5' → 3' (<i>forward/reverse</i>)
1	<i>R-IRED-Sr_D187K</i>	CTG AGC AGC CTG TAT AAA GTT GCA CTG CTG / CAG CAG TGC AAC TTT ATA CAG GCT GCT CAG
2	<i>R-IRED-Sr_L191N</i>	GTT GCA CTG AAC GGT ATT ATG TGG GGC / GCC CCA CAT AAT ACC GTT CAG TGC AAC
3	<i>R-IRED-Sr_M137S</i>	GAT GGT GCA ATT TCT GCA ATT CCG CAG / CTG CGG AAT TGC AGA AAT TGC ACC ATC
4	<i>βHADAt_K170D</i>	GGC GCG AAG ATG GAT CTG ATC GTT AAC / GTT AAC GAT CAG ATC CAT CTT CGC GCC
5	<i>βHADAt_K170F</i>	GGC GCG AAG ATG TTT CTG ATC GTT AAC / GTT AAC GAT CAG AAA CAT CTT CGC GCC
6	<i>βHADAt_K170Y</i>	GGC GCG AAG ATG TAT CTG ATC GTT AAC / GTT AAC GAT CAG ATA CAT CTT CGC GCC
7	<i>βHADAt_N174L</i>	ATC GTT CTG ATG ATT ATG GGT AGC ATG ATG / CAT CAT GCT ACC CAT AAT CAT CAG AAC GAT
8	<i>βHADAt_S121M</i>	GAG GGT CCG GTT ATG GGC AGC AAG AAA CCG / CGG TTT CTT GCT GCC CAT AAC CGG ACC CTC
9	<i>βHADAt_F231A</i>	CCG GCG GCG CCG CTG AAG CAC CAG CAA AAA / TTT TTG CTG GTG CTT CAG CGG CGC CGC CGG
10	<i>βHADGm_K171D</i>	GGT GCA GAA ATG GAT CTG GTT GTG AAT ATG / CAT ATT CAC AAC CAG ATC CAT TTC TGC ACC

11	β HAD Gm _K171F	GGT GCA GAA ATG TTT CTG GTT GTG AAT ATG / CAT ATT CAC AAC CAG AAA CAT TTC TGC ACC
12	β HAD Gm _N175L	CTG GTT GTG CTG ATG GTT ATG GGT GGT ATG / CAT ACC ACC CAT AAC CAT CAG CAC AAC CAG
13	β HAD Lal _K184D	GGT CAT TAT GTG GAT ATG GTT CAT AAC / GTT ATG AAC CAT ATC CAC ATA ATG ACC
14	β HAD Lal _K184F	GGT CAT TAT GTG TTT ATG GTT CAT AAC / GTT ATG AAC CAT AAA CAC ATA ATG ACC
15	β HAD Lal _N188L	GTT CAT CTG GGC ATC GAG TAT GGT GAT ATG / CAT ATC ACC ATA CTC GAT GCC CAG ATG AAC

Tabelle 3.3: Auflistung aller Oligonukleotide die während Klonierungsarbeiten mittels *Gibson assembly* zur Amplifizierung verschiedener DNA-Fragmente verwendet wurden.

Pos.	Name	Sequenz in 5' → 3'	Verwendung
1	pBAD33_fwd	ATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAG	Amplifizierung
2	pBAD33_rev	TAATCTAGACTGCAGAAGCTTGGCTG	pBAD33 <i>Backbone</i>
3	β HAD At _fwd	CTTTTTTGGTACCAGGAGGATTACATATGG	Amplifizierung
4	β HAD At _rev	GCCAAGCTTCTGCAGTCTAGATTACTATTC	β HAD At - Gen
5	β HAD Gm _fwd	CTTTTTTGGTACCAGGAGGATTACATATGG	Amplifizierung
6	β HAD Gm _rev	GCCAAGCTTCTGCAGTCTAGATTATCAGCG	β HAD Gm - Gen
7	β HAD Lal _fwd	CTTTTTTGGTACCAGGAGGATTACATATGG	Amplifizierung
8	β HAD Lal _rev	GCCAAGCTTCTGCAGTCTAGATTATTAATC	β HAD Lal - Gen

3.1.5 Verwendete *E. coli* Stämme

Die Plasmidkonstruktion erfolgte mit dem *E. coli* Stamm DH5 α , welcher aufgrund seiner hohen Replikationsrate und ausgewählten Endonuklease-Mutationen (*recA*, *endA1*, *hsdR17*) für Klonierungsarbeiten besonders gut geeignet ist. Genotyp DH5 α : F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*rK*⁻, *mK*⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*.

Für die Proteinexpression wurde der *E. coli* Stamm JW5510 aus der *Keio-Collection* verwendet.^[91] Durch die Deletion aller am Arabinosestoffwechsel beteiligten Enzyme wird die Regulierung des in der Arbeit verwendeten Arabinose-induzierten Vektorsystems ermöglicht. Genotyp JW5510: F- Δ (*araD-araB*)567 Δ lacZ4787(*::rrnB-3*) λ - Δ *ygjG763::kan rph-1* Δ (*rhaD-rhaB*)568 *hsdR514*.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode um DNA *in vitro* zu vervielfältigen.^[92] Das DNA-Zielfragment wird mittels DNA-Polymerase und synthetischer Nukleotide, unter Verwendung eines entsprechenden Temperaturprogramms synthetisiert. Das Temperaturprogramm besteht aus drei, sich periodisch wiederholenden Schritten: (1) Hitzedenaturierung bei 95°C, wodurch die komplementären DNA-Stränge der zu vervielfältigenden DNA getrennt werden, (2) Primerhybridisierung (*Annealing*), wobei abhängig vom Schmelzpunkt der synthetischen Oligonukleotide die gewählten Primer an die entsprechende DNA anlagern und (3) Elongation, bei der die Primer von 5' in 3'-Richtung mittels DNA-Polymerase verlängert werden, bis das DNA-Templat wieder doppelsträngig vorliegt. Für alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCRs wurde die *PfuUltra II Fusion HS Polymerase* (Tabelle 3.1) bei einer Elongationstemperatur von 72°C eingesetzt. Der für die Amplifizierungs-PCR als Teil des *Gibson assembly* (siehe 3.2.3), als auch für die ortsgerichtete Mutagenese (siehe 3.2.4) pipettierte PCR-Ansatz ist in Tabelle 3.4 beschrieben. Das entsprechende PCR-Programm ist in Tabelle 3.5 zusammengefasst, wobei die gewählte *Annealing*-Temperatur von den eingesetzten Oligonukleotiden und die Elongationszeit von der Länge der eingesetzten Fragmente bestimmt wurden.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes bei Verwendung der *PfuUltra II Fusion HS Polymerase*.

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
10x PCR-Puffer für <i>PfuUltra II Fusion HS Polymerase</i> *	5 µL	1x
dNTPs (à 10 mM)	1,25 µL	250 µM (à dNTP)
Primer forward (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Primer reverse (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Templat-DNA	1 µL	100 pg – 50 ng
<i>PfuUltra II Fusion HS Polymerase</i>	1 µL	+
ddH ₂ O	38,75 µL	

*enthält Mg²⁺ in einer Endkonzentration von 2 mM

+ keine Angaben des Herstellers bzgl. Aktivität

Tabelle 3.5: Standard-PCR-Programm mit entsprechenden Variationen je nach Anwendung.

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
1. Denaturierung	2 min	95	1
2. Denaturierung	30 s	95	
<i>Annealing</i>	30 s	55-65*	18/40#
Elongation	15 s pro kb ⁺	72	
Finale Elongation	3 min	72	1
Kühlung	∞	8	

* variiert je nach Primerpaar

+ 15 s bei β HAD Genen, 90 s bei pBAD33 *Backbone* und ortsgerichteter Mutagenese

18 bei ortsgerichteter Mutagenese (QuikChange™-PCR), 40 bei Amplifizierungs-PCRs

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Größen-basierte Trennung von DNA-Fragmenten. Die Auftrennung wird dadurch erreicht, dass die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladene DNA mittels einer angelegten Spannung durch die Poren einer Agarosematrix transportiert wird, wobei kleinere Fragmente eine höhere Mobilität aufweisen als größere. Für die durchgeführten elektrophoretischen Trennungen wurden 1%ige (w/v) Gele und TAE-Puffer (40mM TRIS-Acetat, 10mM EDTA, pH 8,5) als Laufpuffer verwendet. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff peqGREEN (1:10 000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden im entsprechenden Verhältnis mit 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, DE) versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, DE) auf das Gel aufgetragen. Nach Durchführung von präparativen Agarosegelen wurde die DNA mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (siehe Tabelle 3.1) wiedergewonnen, wobei das Kit nach Herstellerangaben verwendet wurde.

3.2.3 Klonierung via *Gibson assembly*

Alle in der Arbeit verwendeten Expressionskonstrukte wurden mittels *Gibson assembly* kloniert. Die Methode des *Gibson assembly* wurde 2009 von Gibson und Kollegen veröffentlicht und beschreibt eine schnelle und effiziente Klonierungstechnik um mehrere DNA-Fragmente, unabhängig von Größe und

Kompatibilität der Enden miteinander zu verbinden.^[93] Grundlage hierfür sind drei unterschiedliche Enzymaktivitäten: (1) Exonuklease-Aktivität zur Generierung von Einzelstrangüberhängen am 3'-Ende der DNA-Fragmente, welche die Hybridisierung der einzelnen Fragmente durch komplementäre Enden ermöglichen, (2) DNA-Polymerase-Aktivität, um die Lücken zwischen der angelagerten Fragmente aufzufüllen und (3) Ligase-Aktivität, um die verbleibenden Einzelstrangbrüche zu ligieren.^[93]

Die Gene der bearbeiteten Enzyme wurden mit entsprechenden homologen Regionen für das pBAD33-Plasmid bei GeneArt™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) synthetisiert (siehe 7.1). In einem ersten Schritt wurden die zu klonierenden Fragmente (pBAD33 *Backbone* und β HAD-Gene) in einer Amplifizierung-PCR vervielfältigt. PCR-Ansatz und PCR-Programm sind unter 3.2.1 beschrieben und die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Alle Komponenten des darauf folgenden isothermen *Gibson assembly* sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Der entsprechend der Auflistung pipettierte Mastermix wurde in 15 μ L Aliquots bei -20°C gelagert. Die mittels Amplifizierungs-PCR generierten Fragmente wurden im Verhältnis 3:1 (Insert:Vektor) mit einer Gesamtkonzentration aller Fragmente von 0,1-0,5 pmol eingesetzt. Der Gesamtansatz, bestehend aus 15 μ L Mastermix und 5 μ L der zu ligierenden DNA-Fragmente in entsprechender Konzentration wurde bei 50°C für 1 h inkubiert. Die korrekte Amplifizierung und Ligation der Fragmente wurde durch die anschließende Sequenzierung einzelner Klone verifiziert. Das aus einem *Gibson assembly* resultierende doppelsträngige DNA-Molekül kann direkt als Templat für weitere biologische Arbeiten wie Transformation und Expression, als auch Mutagenese eingesetzt werden.

Tabelle 3.6: Bestandteile des Ansatzes für die isotherme *Gibson assembly* Reaktion.

Komponente	Stammlösung	Volumen [μL]
5x ISO Reaktionspuffer	*	320
T5 Exonuklease	10 U/ μL	0,64
<i>Phusion</i> [®] High-Fidelity Polymerase	2 U/ μL	20
<i>Taq</i> DNA Ligase	40 U/ μL	160
ddH ₂ O		699,36

* 25% (w/v) PEG-800, 500 mM TRIS/HCl (pH 7,5), 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM dNTPs (à 0,25 mM), 5 mM NAD⁺; sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C möglich

3.2.4 Ortsgerichtete Mutagenese: QuikChange[™]-PCR

Die *in vitro* Mutagenese gehört zu den wichtigsten Methoden der Molekularbiologie, da sie das gezielte Modifizieren von Gensequenzen ermöglicht.^[94] In der vorliegenden Arbeit wurde die von Stratagene (La Jolla, US) entwickelte QuikChange[™]-PCR als Mutagenisierungsmethode gewählt. Mit diesem Verfahren können positionsspezifische Aminosäureaustausche, -insertionen und -deletionen in zirkuläre Plasmide eingeführt werden. Die Änderung der genetischen Information wird durch synthetische Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation besitzen vorgenommen. Während der Elongation werden diese synthetischen Oligonukleotide durch die eingesetzte DNA-Polymerase verlängert, wodurch mutierte Plasmid-DNA mit zwei Einzelstrangbrüchen entsteht. Bevor die neu synthetisierte, mutierte Plasmid-DNA in einen Klonierungsorganismus transformiert wird (siehe 3.2.8), erfolgt ein Verdau des PCR-Ansatzes mittels der Endonuklease *DpnI* aus *Diplococcus pneumoniae* G41, welche spezifisch methylierte DNA schneidet und dadurch noch vorhandene parentale Plasmid-DNA abbaut. Die Ligation der entstandenen Einzelstrangbrüche erfolgt *in vivo* nach Transformation in den gewählten Wirtsorganismus.

Die Durchführung aller QuikChange[™]-PCRs erfolgte analog Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5. Primer wurden nach dem Standardprotokoll des QuikChange[™] *site-directed mutagenesis kit* (Stratagene/Agilent) designt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Der Restriktionsverdau erfolgte mit 2 μL *DpnI* (10 U/ μL stock-Lösung; Thermo Scientific, Waltham, US) bei 37 °C über Nacht.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Tabelle 3.1), welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse zur Abtrennung genomischer DNA und RNA basiert^[95], verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben, ausgenommen der Elution der Plasmid-DNA, welche mit 30 µL auf 60°C erwärmtem H₂O_{bidest.} durchgeführt wurde. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem Nanodrop 1000 (Agilent, Santa Clara, US) bestimmt.

3.2.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger in Gegenwart von fluoreszenzmarkierten ddNTPs^[96] und wurde von der Firma GATC Biotech (Konstanz, DE) durchgeführt. Hierfür wurden zwischen 600 ng und 1000 ng Plasmid-DNA versendet. Als Sequenzierprimer wurden die für das verwendete Plasmidsystem pBAD33 geeigneten GATC-Standardprimer pBAD-FP (5'-ATGCCATAGCATTTTTATCC) und pTrcHis-RP (5'-CTGATTTAATCTGTATCAGG) genutzt.

3.2.7 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll der 1983 publizierten Rubidiumchlorid-Methode.^[97] Es wurden kompetente Zellen der Stämme *E. coli* DH5α für durchgeführte Klonierungsarbeiten und *E. coli* JW5510 zur Proteinexpression hergestellt. Dafür wurden 100 mL LB-Medium mit den entsprechenden Zellen inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bei 37°C und 180 UpM (Inkubationsschüttler Multitron/Pro, Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert. Die bei einer OD von 0,5 geernteten Zellen (4°C, 8000 g, 15 min) wurden in 40 mL TfbI-Puffer (30mM Kaliumacetat, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% Glycerin, 1 M Essigsäure zum Einstellen auf pH 5,8) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 8000 g, 15 min) wurden die Zellen in 5 mL TfbII-Puffer (100mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% Glycerin, 1M Kaliumhydroxid zum Einstellen auf pH 6,5) aufgenommen und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Eppendorf-Tubes à 50 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.8 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von extrazellulärer, frei in der Umgebung vorliegender DNA in Bakterienzellen. Hierfür wurden die zuvor mittels chemischer Methode generierten kompetenten *E. coli* Zellen (siehe 3.2.7) auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA (1-2 µL) für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock, welcher die Aufnahme von extrazellulärer DNA ermöglicht^[98] wurde bei 42°C für 60 s im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 500 µL LB-Medium bei 37°C und 180 UpM (Inkubationsschüttler Multitron/Pro, Infors AG, Bottmingen, CH) für 1 h regeneriert. Die regenerierten Zellen (50 µL nach Transformation zirkulärer Plasmide und der komplette Ansatz nach Transformation von QuikChange™-Ansätzen) wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.3 Medien und Zellkultur

3.3.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

In Tabelle 3.7 ist die Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Komplexmedien zur Anzucht von *E. coli* aufgeführt. Die Medien wurden zur Sterilisation bei 121°C und 1,5 bar für 30 min autoklaviert. Für LB-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 20 g/L Agar zugefügt.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der Medien zur Anzucht von *E. coli*.

Bezeichnung	Bestandteil	Konzentration
<i>Lysogeny Broth</i> -Medium (LB) (pH 7,0)	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L
<i>Terrific Broth</i> -Medium (TB) (pH 7,2)	Trypton	12 g/L
	Hefeextrakt	24 g/L
	Glycerin	5 g/L
	KH ₂ PO ₄ *	2,31 g/L
	K ₂ HPO ₄ *	12,54 g/L

* der für das TB-Medium nötige Phosphatpuffer wurde als 10x konzentrierte *stock*-Lösung hergestellt, getrennt autoklaviert und anschließend im Verhältnis 1:10 mit dem TB-Medium gemischt

3.3.2 Stammhaltung

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden Flüssigkulturen 1:1 mit einer sterilen Glycerinlösung (65% (v/v) mit 25 mM TRIS-HCl, pH 8,0) in sterilen Kryoröhrchen gemischt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Startkulturen (Übernachtskulturen) wurden direkt aus den Dauerkulturen (Glycerin-stocks) inokuliert, wobei das Zellwachstum durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums selektioniert wurde (5 mL LB-Medium + 5 µL Chloramphenicol (34 mg/mL stock-Lösung in Ethanol, finale Konzentration: 34 µg/mL)).

3.3.3 *In vitro* Proteinexpression

Die zellfreie Proteinsynthese basiert auf der Tatsache, dass Zellextrakte alle Komponenten der Translationsmaschinerie in aktiver Form enthalten, wodurch mRNAs auch ohne die Integrität einer lebenden Zelle in ihre Proteinprodukte translatiert werden können.^[99] Das in der Arbeit verwendete PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit von New England Biolabs (Tabelle 3.1) basiert auf dem PURE System (*Protein Synthesis Using Recombinant Elements*), welches von Ueda und Kollegen 2001 veröffentlicht wurde.^[100] Hier wird die komplette *E. coli* Translationsmaschinerie aus rekombinant produzierten, aufgereinigten Komponenten rekonstruiert, ausgenommen der aus *E. coli* isolierten Ribosomen.^[100,101] Das System ist auf die wesentlichen Bestandteile reduziert und enthält neben den *E. coli*-Ribosomen nur wenige weitere Proteine: T7-RNA-Polymerase, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA Synthetasen, sowie die Methionyl-tRNA Formyltransferase und einige Enzyme zur Energieregeneration.^[100] Der Minimalismus des Systems und die damit verbundenen definierten Reaktionsbedingungen (keine weiteren Verbindungen, die die Reaktion stören könnten) sind ein großer Vorteil im Vergleich zu Zellextrakt-basierten Systemen. Des Weiteren sind die rekombinant hergestellten Proteine mit einem His₆-tag versehen, was die Aufreinigung des synthetisierten Proteins stark vereinfacht.

Bei der Durchführung der *in vitro* Proteinexpression ging man nach Herstellerangaben vor, wobei 10 ng/µL Templat-DNA (pET28a_R-IRED-Sr, siehe 3.1.3) und 1 U/µL Murine RNase Inhibitor (M0314S, NEB, Frankfurt am Main, DE) eingesetzt wurden. Die Proteinsynthese wurde mit Zugabe der Templat-DNA gestartet. Die Reaktion wurde bei 37°C für 2,5 h inkubiert und durch Abkühlen auf

Eis gestoppt. Die Analyse der synthetisierten Proteine wurde wie unter 3.5.3 und 3.7.1.2 beschrieben durchgeführt.

3.3.4 *In vivo* Proteinexpression

3.3.4.1 Kultivierung von E. coli in Schüttelkolben

Die untersuchten Enzyme wurden standardmäßig in 2 L-Schikanekolben mit 400 mL Arbeitsvolumen exprimiert. Hierfür wurden am Vortag Startkulturen aus den bei -80°C gelagerten Dauerkulturen gemacht (siehe 3.3.2) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die mit 400 mL TB-Medium vorbereiteten 2 L-Schikanekolben (360 mL mit 40 mL 10x Puffer) wurden mit 1% (v/v) (4 mL) Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 180 UpM inkubiert (Inkubationsschüttler Multitron/Pro, Infors AG, Bottmingen, CH). Die Selektion des Zellwachstums erfolgte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in einer finalen Konzentration von 34 µg/mL (vergleiche 3.3.2). Der Kultivierungsverlauf wurde mittels photometrischer Bestimmung der Zelldichte bei 600 nm verfolgt. Die Induktion der Kulturen erfolgte nach Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6-0,8 mit 0,02% (w/v) wässriger Arabinoselösung (400 µL einer 20% (w/v) *stock*-Lösung). Die Hauptkultur wurde für die nachfolgende Proteinexpression bei 25°C und 180 UpM (Inkubationsschüttler Multitron/Pro (Infors AG, Bottmingen, CH)) für 20 h inkubiert und mittels Zentrifugation (4°C, 9800 g, 30 min) geerntet.

3.3.4.2 Kultivierung von E. coli im Fermenter

Um große Mengen des gleichen Enzym-Batches zu generieren wurde ein Upscaling des im 2 L-Schüttelkolben etablierten Kultivierungs- und Expressionsprozesses der Iminreduktasen aus *Streptosporangium roseum* und *Paenibacillus elgii* durchgeführt. Hierfür wurde ein 7,5 L-Reaktor (Labfors, InforsHT, Bottmingen, CH) und ein Arbeitsvolumen von 4 L gewählt. Die Kulturführung war wie folgt: (1) animpfen einer 5 mL Übernachtskultur aus den bestehenden Glycerin-*stocks* (siehe 3.3.2), (2) überführen von 2 mL der Übernachtskultur in eine 50 mL-Vorkultur (250 mL Schikanekolben, 50 mL TB-Medium, 34 µg/mL Chloramphenicol) und anschließende Inkubation bei 37°C und 180 UpM (Inkubationsschüttler Multitron/Pro, Infors AG, Bottmingen, CH) bis zu einer OD_{600nm} von 7, (3) animpfen der Hauptkultur (4 L TB-Medium mit 34 µg/mL Chloramphenicol) mit 30 mL Vorkultur um eine Start- OD_{600nm} von 0,05 zu erreichen. Die Kultivierung wurde in einem Fed-Batch Prozess

durchgeführt, wobei Bedingungen und Prozessparameter basierend auf den im Schüttelkolben etablierten Prozess gewählt wurden. Das für die Kultivierung gewählte TB-Medium wurde auf pH 7,0 eingestellt und bei Bedarf durch Zugabe von 25%iger (w/v) Ammoniumlösung und 10%iger (w/v) H₃PO₄ konstant gehalten. Die Rührergeschwindigkeit wurde auf 800 UpM und die Belüftungsrate auf 2 vvm gesetzt. Die Hauptkultur wurde unter diesen Bedingungen bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 6 kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Arabinose (4 mL einer 20%igen (w/v) Lösung, finale Konzentration 0,02% (w/v)) induziert. Mit Induktion wurde die Prozesstemperatur auf 25°C reduziert und die Glycerin-Fütterung gestartet. Zu Beginn wurden 10 g/h 86% (v/v) Glycerin zugepumpt, wobei die Rate nach 5 h auf 15,5 g/h erhöht wurde. Direkt nach Induktion wurden 5 mL Antischaum-Lösung und verschiedene *Feeding*-Lösungen dem Medium zugegeben, um einem sich auf Wachstum und Expression negativ auswirkenden Nährstoffmangel vorzubeugen: (i) (NH₄⁺)₂HPO₄ (40 mg/100 mL), (ii) 20 mL 1 M MgSO₄ und (iii) 2 mL einer Spurenelemente-Lösung (0,38 g/L CaCl₂ x 2H₂O; 0,18 g/L ZnSO₄ x 7H₂O; 0,10 g/L MnSO₄ x H₂O; 20,1 g/L Na₂-EDTA; 16,7 g/L FeCl₃ x 6H₂O; 0,15 g/L CuSO₄ x 5H₂O; 0,18 g/L CoCl₂ x 6H₂O). Während des gesamten Prozesses wurden Zelldichte (OD_{600nm}), Biofeucht- und Biotrockenmasse (BFM/BTM), Proteinkonzentration und Enzymaktivität wie unter 3.4.3 und 3.5.1 erläutert ermittelt. Die Zellernte erfolgte 20 h nach Induktion mittels Zentrifugation (4°C, 9800 g, 30 min).

3.3.5 Aufschluss von *Escherichia coli*-Zellen

Das nach Expression erhaltene Zellpellet wurde in 1,5 mL Arbeitspuffer (siehe Tabelle 3.8) pro Gramm Zellen resuspendiert und 1 mL/mL DNase (5 mg/mL *stock*-Lösung) zugegeben. Der Aufschluss erfolgte mittels Hochdruckhomogenisierung an einem EmulsiFlex C-5 (Avestin, Ottawa, CAN) mit drei Zyklen á 750-1000 bar. Überstand und Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (4°C, 38000 g, 45 min) voneinander getrennt. Der Zellysat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinreinigung über Affinitätschromatographie

Die eingesetzten Enzyme wurden mittels Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, engl. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) gereinigt. Die Form der Chromatographie basiert auf der von Hearon 1948 beschriebenen Affinität von Histidinen und Cysteinen zu Übergangsmetallen wie Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} und Co^{2+} in wässriger Lösung.^[102] Um diese Affinität zu steigern werden häufig definierte Polyhistidin-*Tags* (*His-Tags* bestehend aus 5-15 Histidin Aminosäuren) N- oder C-terminal an das gewünschte Protein fusioniert. Die Reinigung erfolgt nach dem Verdrängungsprinzip: (1) Bindung der Imidazol-Seitenkette des Histidins an die immobilisierten zweiwertigen Metallionen wie Ni^{2+} oder Co^{2+} , sowie (2) Elution mit steigender Imidazol-Konzentration im Puffer.^[102] Heute ist die IMAC die am häufigsten verwendete Chromatographie-Methode zur Reinigung von rekombinant hergestellten Proteinen im Labormaßstab.^[102]

Um eine Reinigung mittels IMAC zu ermöglichen, wurden alle in der Arbeit untersuchten Enzyme N-terminal mit einem His-Tag versehen (siehe 7.1). Je nach Arbeitsvolumen der durchgeführten Kultivierung (Kolben oder Fermenter) und damit verbunden der generierten Proteinmenge wurden unterschiedliche Maßstäbe für die Reinigung gewählt: 2 mL His GraviTrap™ Talon®-Säulen (GE Healthcare, Chicago, US) mit Co^{2+} als immobilisiertem Übergangsmetall, oder drei in Reihe geschaltete 5 mL HiTrap Chelating Sepharose Säulen (GE Healthcare, Chicago, US), mit Ni^{2+} beladen. Unabhängig vom Maßstab wurde das Zellysats (Aufschluss wie unter 3.3.5 beschrieben) vor der Reinigung durch 0,45 µm Membranen gefiltert (PEsmembran, VWR, Darmstadt, DE). Die für die Reinigungen verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst und der genaue Ablauf ist im Folgenden beschrieben.

Material und Methoden

Tabelle 3.8: Für die Affinitätschromatographie verwendete Arbeitspuffer.

Enzym	Komponente*	Konzentration
IREDs	Natriumphosphat pH 7,0	50 mM
	KCl	300 mM
	Glycerin	5% (v/v)
	β -Mercaptoethanol	1 mM
β HADs	TRIS-HCl pH 8,0	50 mM
	KCl	300 mM
	Glycerin	5% (v/v)
	β -Mercaptoethanol	1 mM

* zur Proteinelution wurden die aufgeführten Puffer zusätzlich mit 10 mM und 500 mM Imidazol versetzt.

Die 2 mL His GraviTrap™ Talon®-Säulen wurden vor Verwendung mit 5 Säulenvolumen (CV, engl. *Column Volumes*) $H_2O_{\text{bidest.}}$ gewaschen und ebenfalls mit 5 CV Basispuffer (siehe Tabelle 3.8) equilibriert. Nachfolgend wurde die Säule mit filtriertem Zelllysate beladen. Die beladene Säule wurde mit 5 CV Arbeitspuffer und 10 CV Waschpuffer, welcher sich aus Arbeitspuffer und 10 mM Imidazol zusammensetzt, gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 mL Elutionspuffer (Arbeitspuffer mit 500 mM Imidazol). Die gesammelte Proteinfraction wurde mittels Ultrafiltration (Vivaspin®, PESmembran, MWCO: 10 kDA, Sartorius, Goettingen, DE) aufkonzentriert und umgepuffert, um restliches Imidazol zu entfernen und das Protein in den späteren Assaypuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 für IREds oder 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0 für β HADs) zu überführen.

Die Reinigung in größerem Maßstab wurde an einem Äkta System (ÄktaPurifier, GE Healthcare Europe, Freiburg, DE) mit drei in Reihe geschalteten 5 mL HiTrap *Chelating* Sepharose Säulen durchgeführt. Vor dem Auftragen der Probe wurden die Säulen mit 2 x 5 CV $H_2O_{\text{bidest.}}$ und 2 x 5 CV Arbeitspuffer (siehe Tabelle 3.8) bei einem Fluss von 5 mL/min gewaschen und equilibriert. Das Beladen der Säule mit 50 mL filtriertem Zelllysate erfolgte mit einem 50 mL *superloop* bei einem reduzierten Fluss von 2,5 mL/min. Um nicht-spezifisch gebundenes Protein zu entfernen wurden die

Säule im Anschluss mit 8 CV einer 4% Mischung aus Arbeitspuffer und Elutionspuffer (Arbeitspuffer mit 500 mM Imidazol) gewaschen. Die mit einem Polyhistidin-Tag versehenene Zielproteine wurden bei 40% Elutionspuffer, was einer Imidazol-Konzentration von 200 mM entspricht, eluiert. Nachfolgend wurden die Säulen mit 3 CV 100% Elutionspuffer (500 mM Imidazol) gewaschen, um restliche, auf der Säule verbliebene Proteine zu entfernen. Die Proben wurden zu jedem Zeitpunkt mittels einem automatisierten Fraktionssammlers gesammelt (5 mL Fraktionen). Iminreduktase-Fractionen waren anhand eines Peaks bei 280 nm (Proteinpeak) und einem zusätzlichen Peak bei 340 nm, welcher vermutlich auf den gebundenen Cofaktor NADPH zurückzuführen ist, zu erkennen. Entsprechende Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Vivaspin®, PESmembran, MWCO: 10 kDA, Sartorius, Goettingen, DE) aufkonzentriert und in den entsprechenden Assaypuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 für IREDs) umgepuffert.

Unabhängig von Maßstab und Methode wurde die Proteinkonzentration der gereinigten Proteine wie unter 3.4.3 beschrieben bestimmt und die Reinheit mittels SDS-PAGE (siehe 3.4.4) und Größenausschlusschromatographie (siehe 3.7.4) überprüft. Die Enzympräparation wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Proteinreinigung über Ionenaustauschchromatographie

Die Methode der Ionenaustauschchromatographie (IEX, engl. *Ion Exchange Chromatography*) wurde gewählt, um die während der Metall-Affinitätschromatographie co-eluierten Proteine abzutrennen und die Enzympräparation weiter zu reinigen. Hierzu wurde ein XK16 Säulen-Gehäuse mit 16 mL MonoQ Material (GE Healthcare Europe, Freiburg, Germany) gepackt und an einem Äkta System (ÄktaPurifier, GE Healthcare Europe, Freiburg, DE) betrieben. Zur Vorbereitung der Säule wurde diese mit 2 x 5 CV H₂O_{bidest.} und 2 x 5 CV IEX-Equilibrierungspuffer (20 mM BisTRIS, pH 7,0 mit 5% (v/v) Glycerin) gewaschen. Gleichzeitig wurde der Probenpuffer der Enzympräparation nach IMAC mittels Zentrifugation (Vivaspin®, PESmembran, MWCO: 10 kDA, Sartorius, Goettingen, DE) durch den IEX-Equilibrierungspuffer ausgetauscht. Mit Hilfe eines 5 mL *loops* wurde die Probe mit einem Fluss von 2,5 mL/min auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte

durch einen sich über 10 CV aufbauenden linearen Gradient von 0% bis 100% des IEX-Elutionspuffers (20 mM BisTRIS mit 1 M KCl, pH 7,0 mit 5% (v/v) Glycerin). Mittels eines automatisierten Fraktionssammlers wurden 1 mL Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit einem Peak bei 340 nm (vermutlich IRED-gebundenes NADPH, siehe 3.4.1) wurden vereinigt und mittels Zentrifugation (Vivaspin®, PESmembran, MWCO: 10 kDA, Sartorius, Goettingen, DE) in den Assaypuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7) überführt. Die Reinigung der Säule erfolgte mit 3 CV 100% IEX-Elutionspuffer und 70% (v/v) Ethanol. Die Proteinkonzentration der gereinigten Proteine wurde wie unter 3.4.3 beschrieben bestimmt und die Reinheit mittels SDS-PAGE (siehe 3.4.4) und Größenausschlusschromatographie (siehe 3.7.4) überprüft. Die Enzympräparation wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.3 Protein-Konzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Die kolorimetrische Bestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA) beruht auf der Interaktion von Proteinen mit zweiwertigen Kupferionen.^[103] Cystein, Tyrosin, Tryptophan, sowie Peptidbindungen reduzieren im alkalischen pH-Bereich Cu^{2+} zu Cu^+ .^[103] Je zwei Cu^+ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure einen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.^[103] Der BCA-Assay wurde mit dem Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit (Tabelle 3.1) nach Herstellerangaben durchgeführt. Kalibriergeraden wurden mit BSA (Bovines Serumalbumin) im Bereich 0,0 bis 2,0 mg/mL erstellt. Die Proben wurden dementsprechend verdünnt.

3.4.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl.: *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis*) ist die qualitative Analyse von Proteinen anhand ihrer Größe möglich.^[103,104] Durch thermische Inkubation der zu analysierenden Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) und Dithiothreitol (DTT) werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zerstört, sowie Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten, wodurch eine vollständige Linearisierung erreicht wird. SDS besitzt die Fähigkeit durch Anlagerung an Aminosäureketten die Eigenladung der Proteine vollständig zu überdecken, wodurch eine negative Gesamtladung, proportional zur Proteingröße, entsteht. Aus den unterschiedlichen Größen der Proteine resultiert eine

unterschiedliche elektrophoretische Mobilität dieser in einer Gelmatrix, die eine Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht.

Die denaturierten Proteingemische wurden in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli aufgetrennt, wobei sich das SDS-Polyacrylamidgel aus Sammel- und Trenngel zusammensetzt.^[104] Sammel- und Trenngel unterscheiden sich in ihrer Acrylamidkonzentration, sowie ihrem pH-Wert. Im Sammelgel findet eine lokale Fokussierung der Proteine statt, wodurch alle zu trennenden Moleküle den gleichen Startpunkt beim Übergang in das feinporige Trenngel besitzen. Die Rezepturen für Sammel- und Trenngele sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE nach Laemmli.^[104]

Komponente	Trenngel (12%)	Sammelgel (5%)
	Volumen [mL]	Volumen [mL]
ddH ₂ O	3,3	2,7
30% Acrylamidlösung	4	0,67
1,5 M TRIS (pH 8,8)	2,5	-
1,5 M TRIS (pH 6,8)	-	0,5
10% (w/v) SDS in H ₂ O	0,1	0,04
40% (w/v) APS in H ₂ O*	0,1	0,04
TEMED ⁺	0,004	0,004

*Ammoniumperoxodisulfat (APS) ist der Radikalstarter für die Polymerisierungsreaktion und wird bei -20°C gelagert

+ Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient als Polymerisierungskatalysator

Die Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 20 µg eingestellt und mit 6x SDS-Ladepuffer (350 mM TRIS-HCl, pH 8,0; 600 mM DTT; 30% (v/v) Glycerin; 10% (w/v) SDS; 0,12% (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Gel-Apparatur (PEQLAB system, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) eingespannt, mit 1x SDS-Laufpuffer (10x stock: 0,25 M TRIS; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS) überschichtet und mit den bei 95°C für 10 min aufgekochten Proben beladen. Zum Vergleich wurden 8 µL eines Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, DE) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad

Laboratories GmbH, München, DE), welcher unter sauren Bedingungen mit basischen oder aromatischen Aminosäuren Komplexe ausbildet, die bei einer Wellenlänge von 592 nm absorbieren.^[105] Die Gele wurden über Nacht in Färbelösung (30% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure; 2,5 g/L Coomassie Brilliant Blue R-250) inkubiert und am folgenden Tag mit 10% (v/v) Essigsäure entfärbt um nicht gebundenen Farbstoff wieder zu entfernen.

3.5 Bestimmung der Enzymaktivität

3.5.1 NADPH-Assay

Um die Aktivität der untersuchten Enzyme nach Expression und Reinigung zu überprüfen wurde die für IREDs und β HADs beschriebene NADPH-Abhängigkeit genutzt. NADPH besitzt in seiner reduzierten Form zwei Absorptionsmaxima bei 260 und 340 nm. Die oxidierte Form kann hingegen nur bei 260 nm detektiert werden. Die in der Reaktion auftretende Oxidation von NADPH bzw. Reduktion von NADP^+ kann somit photometrisch anhand der Abnahme bzw. Zunahme der Absorption bei 340 nm verfolgt werden. Da die umgesetzte Menge Cofaktor zum Substrat äquivalent ist kann so eine indirekte Bestimmung der Enzymaktivität (Substratumsatz pro Zeiteinheit) berechnet werden.

Der Aktivitäts-Assay wurde in 96 *well plates* (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE) mit einem Arbeitsvolumen von 300 μL durchgeführt und am UV/VIS-Spektrometer bei 340 bzw. 370 nm (Plattenleser, PolarStar Omega 96, BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE) vermessen. Eine Wellenlänge von 370 nm wurde für das Substrat 3,4-Dihydroisioquinolin gewählt, da bei 340 nm eine starke Eigenabsorption, zurückzuführen auf die aromatische Komponente des Substrates beobachtet wurde. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.10: Reaktionsansätze NADPH-Assay zur Bestimmung der Aktivitäten für das natürliche Substrat nach Expression und Reinigung der bearbeiteten Enzyme und Enzymvarianten.

Bestandteil	Volumen [μL]	Endkonzentration
Puffer*	75	
1,2 mM NADPH in Puffer	75	0,3 mM
40 mM Substrat in Puffer ⁺	75	10 mM
Zellysat/ gereinigtes Enzym [#]	75	0,1 bis 0,5 mg/mL 0,5 bis 3 μM

* 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0 für IREDs; 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0 für βHADs

⁺ 2-Methylpyrroline für *R-IRED-Sr*, 2,4-Dihydroisoquinolin für *S-IRED-Pe*, Glyoxylsäure für βHADAt und βHADGm und 6-Phosphogluconat für βHADLal

[#] stock-Lösungen Zellysat: 0,4 mg/mL *R-IRED-Sr*; 2 mg/mL *S-IRED-Pe*

gereinigtes Enzym: 2 μM *R-IRED-Sr*; 2 μM βHADAt ; 4 μM βHADGm ; 2 μM βHADLal

Puffer, NADPH und Substrat wurden vorgelegt, die Reaktion durch Enzymzugabe gestartet und über einen Zeitraum von 50 Messzyklen bei 30°C verfolgt. Anhand der initialen Steigung ($\Delta A/\Delta t$) im linearen Teil der Umsatzkurve kann über das Lambert-Beersche Gesetz die Enzymaktivität (EA) berechnet werden (Gleichung 1), wobei V das Reaktionsvolumen, v das Probevolumen und d die Schichtdicke darstellen. Die für NADPH eingesetzten Extinktionskoeffizienten ϵ waren 6200 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für 340 nm und 2066 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für 370 nm. Ein Unit, die Einheit der kalkulierten Enzymaktivität, wurde hierbei definiert als die Menge an Enzym die nötig ist, um 1 mmol NADPH pro Minute zu oxidieren.

$$EA = \Delta A * \frac{V}{v * \epsilon * d * \Delta t} \quad 1$$

3.5.2 Biotransformationen mit gereinigtem Enzym

Analytische Biotransformationen wurden in 5 mL Glasfläschchen mit einem Arbeitsvolumen von 1 mL durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt alle in Tabelle 3.11 aufgeführten Komponenten, wobei Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase der Cofaktor-Regeneration dienten. Enzymmengen wurden abhängig vom Reaktionstyp (natürlich vs. nicht-natürlich) gewählt und sind in Tabelle 3.11 vermerkt.

Material und Methoden

Tabelle 3.11: *Setup* der durchgeführten Biotransformationen in Abhängigkeit von Reaktionstyp und Enzym.

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration
500 mM Substrat* in Methanol	19,8	10 mM
(100 mM/1 M/5 M Aminnukleophil	99,03	10/100 / 500 mM)**
150 mM NADPH	16,5	2,5 mM
1 M Glucose-6-phosphat (G6P)	24,75	25 mM
1 kU/mL G6P-Dehydrogenase ⁺	4,95	5 U/mL
Methanol	29,7	5% (v/v) [#]
Puffer ⁺⁺	99,0	50 mM
H ₂ O	595,3 (496,3)**	-
Enzympräparation	200	0,5-10 mg/mL [°]

* je nach Reaktion und Enzym Imine, Ketosäuren oder Carbonyle

** Aminnukleophile wurden bei der Durchführung von reduktiven Aminierungen eingesetzt, spielten jedoch bei einfachen Reduktionen keine Rolle, Anpassung Menge H₂O

+ lyophilisiertes Pulver von *Leuconostoc mesenteroides* (Alfa Aesar, Karlsruhe, DE)

3% (v/v) zusätzliches Methanol, 2% (v/v) von Substrat-stock

++ Reduktion IREDs: 50 mM Natriumphosphat pH 7,0; Reduktion β HADs: 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0; reduktive Aminierung IREDs: 50 mM TRIS-HCl pH 9,0

° Reduktion 0,5 mg/mL; Reduktion 2,2,2-Trifluoroacetophenon 2,5 mg/mL; reduktive Aminierung: 2,5 oder 10 mg/mL

Als Negativkontrollen dienten standardmäßig Kontrollexperimente mit Hitzeinaktiviertem Enzym (95°C, 10 min) und bovinem Serumalbumin (BSA) als Proteinkomponente. Bei Untersuchungen der Reduktion von 2,2,2-Trifluoroacetophenon wurde als weitere Kontrolle ein Ansatz mit NADH anstatt NADPH als Cofaktor mit dem entsprechenden Cofaktor-Regenerationssystem (2,5 mM NADH, 25 mM Natriumformiat und 5 U/mL Formiat-Dehydrogenase) pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden bei 25°C und 180 UpM (Inkubationsschüttler Multitron/Pro, Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert. Die Probennahme erfolgte bis zu 48 h zu unterschiedlichen Zeitpunkten: 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 5h, 24 h und 48 h. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden jeweils 150 μL Probe genommen, abhängig vom Substrat wie unter 3.7.1.1 und 3.7.2.1 beschrieben extrahiert und für die entsprechende Analytik vorbereitet.

3.5.3 Biotransformationen mit *in vitro* exprimiertem Enzym

Die *in vitro* Expression erfolgte wie unter 3.3.3 beschrieben mit dem PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (Tabelle 3.1). Der PURE-Reaktionsansatz (25 µL) wurde direkt nach Abstoppen der Expression auf Eis mit 5 µL einer *stock*-Lösung bestehend aus 600 µM 2,2,2-Trifluoroacetophenon und 600 µM NADPH in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gemischt, sodass Substrat und Cofaktor in einer finalen Konzentration von 100 µM vorlagen. Zur Validierung der Expression wurde ein weiterer Ansatz mit dem Iminreduktase-Modells substrat 3,4-Dihydroisochinolin als Positivkontrolle pipettiert. Des Weiteren wurde eine vom Hersteller mitgelieferte Dihydrofolatreduktase aufgrund ihrer hohen Substratspezifität als Negativkontrolle mitgeführt, sodass die Reduktion von 2,2,2-Trifluoroacetophenon durch die im Kit enthaltenen Komponenten ausgeschlossen werden konnte. Die Biotransformationen wurden bei 25°C und 180 UpM (Inkubationsschüttler Multitron/Pro (Infors AG, Bottmingen, CH)) für 48 h inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Ansätze mit Methyl-*tert*-butylether (MTBE) extrahiert und mittels Gaschromatographie (siehe 3.7.1.2) oder Dünnschichtchromatographie (siehe 3.7.3) analysiert.

3.6 Bestimmung kinetischer Parameter

Durch ein kinetisches Experiment kann die katalytische Effizienz eines Enzyms (Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration) unter definierten Bedingungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Enzymkonzentration bestimmt werden. Die katalytische Effizienz ist definiert als $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$, wobei k_{cat} (Wechselzahl) die Anzahl von Substratmolekülen beschreibt, die von einem Enzym pro Zeiteinheit umgesetzt wird und K_{M} die Affinität für das untersuchte Substrat definiert. Die kinetische Analyse der einfachsten Form einer Enzymreaktion, der irreversiblen Ein-Substrat Reaktion geht auf Michaelis und Menten^[106] und Briggs und Haldane^[107] zurück. Das Reaktionsschema der Produktbildung P aus dem Substrat S ist in Gleichung 2 dargestellt.



Unter der Annahme, dass Substrat im Überschuss eingesetzt wird und dadurch Geschwindigkeit von Bildung und Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes (ES-

Komplexes) gleich groß sind, stellt sich ein Gleichgewicht für die Bildung des ES-Komplex ein (*steady state approximation*).^[107] Der Umsatz des ES-Komplexes zum Produkt (k_2) stellt unter diesen Bedingungen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion dar und ergibt folgendes Geschwindigkeitsgesetz:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M * [S]} \quad 3$$

$$\text{mit } v_{\max} = k_{\text{cat}} * [E]_0 \quad \text{und} \quad K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die initialen Geschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen, da hier die Bedingung der Substratsättigung erfüllt ist. Die Auftragung der initialen Geschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration ergibt eine Sättigungskurve mit v_{\max} als Sättigungswert und K_M als Substratkonzentration bei $v_{\max}/2$. Über die eingesetzte Enzymkonzentration $[E]_0$ kann die Wechselzahl k_{cat} und daraus folgend die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) berechnet werden (Gleichung 3).

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten für das Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin erfolgte anhand der Oxidation des Cofaktors NADPH zu NADP⁺ photometrisch bei 340 nm wie unter 3.5.1 beschrieben. Für die Reaktionen wurden Enzymkonzentrationen von 0,5 μM (IREd) oder 5 μM (βHADs) und folgende Substratkonzentrationen eingesetzt: 0 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM und 30 mM. Weitere Reaktionsbedingungen wurden mit einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von 30°C konstant gehalten. Da bei höheren Substratkonzentrationen geringere Aktivitäten beobachtet wurden, wurde die zur Auswertung genutzte Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 3) an die Substratinhibierung angepasst (Gleichung 4). Die Auswertung (*fitting* der Daten) erfolgte mittels Microsoft Excel 2010.

$$v = \frac{v_{\max} * [S]}{(K_M + [S] * (1 + \left(\frac{[S]}{K_I}\right)))} \quad 4$$

Für das Carbonyl-Substrat 2,2,2-Trifluoroacetophenon war eine photometrische Bestimmung der Enzymaktivität aufgrund der Eigenabsorption und damit

verbundenen Störsignalen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter Biotransformationen wie unter 3.5.2 beschrieben durchgeführt, wobei folgende Substratkonzentrationen eingesetzt wurden: 0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 15 mM und 30 mM. Die Reaktionen wurden über einen Zeitraum von 24 h inkubiert, wobei die Probennahme nach 0 h, 1 h, 4 h, 8 h, 14 h und 24 h erfolgte. In diesem Fall wurde 1 Unit definiert als die Menge an Enzym, die die Bildung von 1 μmol Produkt pro Minute katalysiert. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung der detektierten Substratinhibierung wie oben beschrieben (siehe Gleichung 4).

3.7 Analytische Methoden

3.7.1 Gaschromatographie

3.7.1.1 Extraktion und Probenvorbereitung

Die Biotransformationsproben (150 μL , siehe 3.5.2) wurden extrahiert und wenn für die Analytik notwendig mit Essigsäureanhydrid (AA, engl. *Acetic Anhydride*) derivatisiert. Im Folgenden sind die Extraktionsmethoden in Abhängigkeit der Substrate erläutert.

Biotransformationen mit den Iminsubstraten 2-Methylpyrrolin und 6-Methyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin wurden mit Dichlormethan (DCM) extrahiert und dabei gleichzeitig derivatisiert. Hierzu wurden 50 μL alkalische Pufferlösung (10 M KOH und gesättigte NaHCO_3 -Lösung im Verhältnis 3:17 (v/v)) vorgelegt und mit der Probe (150 μL) gemischt. Anschließend wurden 500 μL DCM, 50 μL AA und 50 μL Pyridin (Katalysator der Derivatisierungsreaktion) zum Ansatz gegeben. Die Extraktion und Derivatisierung erfolgte durch zweiminütiges Vortexen der Probe. Nach Zentrifugation zur Phasentrennung (13 000 UpM, 1 min) wurde die untere organische Phase in ein GC-Vial transferiert. Die wässrige Phase wurde nach dem gleichen Prinzip ein zweites Mal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden wie unter 3.7.1.2 beschrieben analysiert. Alle anderen mittels Gaschromatographie (GC) analysierten Substrate (Benzaldehyd, Acetophenon, Cyclohexylmethylketon, 2,2,2-Trifluoroacetophenon und 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin) und deren entsprechenden Produkte wurden mit MTBE extrahiert. Hierfür wurden 150 μL der Biotransformation mit 50 μL 5 M NaOH gemischt und zweimal mit 500 μL MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen

Phasen konnten für die Substrate Benzaldehyd, Acetophenon, 2,2,2-Trifluoroacetophenon und 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin direkt wie unter 3.7.1.2 beschrieben analysiert werden. Dahingegen mussten die Proben mit Cyclohexylmethylketon als Substrat vor der Analyse derivatisiert werden. Dafür wurden 800 μL der extrahierten Probe mit 20 μL AA und 20 μL Pyridin gemischt, für 1 h bei 70°C inkubiert und mit 200 μL 2% (v/v) wässriger Methylaminlösung gequencht.

Für die chirale GC-Analyse mussten alle generierten Produkte mit AA derivatisiert werden. Ansätze, bei denen für die quantitative Analyse keine Derivatisierung nötig war wurden nachträglich derivatisiert. 200 μL der extrahierten Proben wurden mit 20 μL AA und 20 μL Pyridin gemischt, für 1 h bei 70°C inkubiert, mit 200 μL 2% (v/v) wässriger Methylaminlösung gequencht und anschließend mit den entsprechendn chiralen Methoden (siehe Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13) gemessen.

3.7.1.2 Quantitative und chirale Analyse

Eine Großzahl der durchgeführten Biotransformationen wurde mittels Gaschromatographie (GC) analysiert. Die Detektion der eingesetzten Substrate und entsprechenden Produkte erfolgte an einem mit Flammenionisationsdetektor (FID) ausgerüsteten GC-2010 System der Firma Shimadzu (Kyōto, JP). Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s. Alle Analysen wurden bei einer Injektortemperatur von 250°C mit einem Injektionsvolumen von 1 μL im Splitmodus durchgeführt. Säulen und entsprechende Temperaturprogramme wurden basierend auf Substrateigenschaften gewählt und sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst. Die in Tabelle 3.12 aufgeführten Programme 1-4 wurden zur Quantifizierung aller in der Arbeit untersuchten Substrate und generierten Produkte genutzt, Programme 5-9 dienten der chiralen Analyse bestimmter Produkte. Die Zuordnung der Substrate/Produkte zu den entsprechenden Methoden ist in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Tabelle 3.12: Verwendete GC-Säulen und Programme.

	Säule	Temperaturprogramm			FID-Temp.	Split
		Heizrata	Ofentemperatur	Haltezeit		
1	ZB-5*		65°C	3 min	330°C	1:5
		30°C/min	109°C	-		
		1°C/min	117°C	-		
		50°C/min	325°C	3 min		
2	ZB-5*		100°C	2 min	330°C	1:5
		30°C/min	130°C	-		
		5°C/min	150°C	1 min		
		50°C/min	325°C	2 min		
3	ZB5*		100°C	2 min	330°C	1:5
		30°C/min	150°C	-		
		5°C/min	180°C	1 min		
		50°C/min	325°C	2 min		
4	HP1**		65°C	3 min	325°C	1:5
		30°C/min	109°C	-		
		1°C/min	117°C	-		
		50°C/min	325°C	3 min		
5	ChirasilDEX+		90°C	-	220°C	1:15
		10°C/min	140°C	-		
		1,5°C/min	158°C	-		
		50°C/min	220°C	3 min		
6	ChirasilDEX+		100°C	-	220°C	1:40
		5°C/min	200°C	-		
		50°C/min	220°C	3 min		
7	β -DEX 225#		70°C	2 min	220°C	1:5
		5°C/min	180°C	-		
		50°C/min	210°C	2 min		
8	β -DEX 225#		100°C	2 min	220°C	1:5
		50°C/min	130°C	-		
		1,5°C/min	150°C	-		
		50°C/min	210°C	1min		
9	ChirasilDEX+		90°C	-	220°C	1:5
		4°C/min	200°C	2 min		

* ZB-5: 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Phenomenex, Aschaffenburg, DE)

** HP1: 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent, Waldbronn, DE)

+ CP-ChirasilDEX-CB: 25m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Agilent, Waldbronn, DE)

β -DEX 225: 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Supelco, Sigma-Aldrich, Steinheim, DE)

Material und Methoden

Tabelle 3.13: Zuordnung der analysierten Substrate und Produkte zu den beschriebenen GC-Methoden.

GC-Methode*	Analysierte Substrate und Produkte
1	Carbonyle und Aminprodukte aus reduktiven Aminierungen
2	2-Methylpyrrolin, 2-Methylpyrrolidin
3	6-Methyl-2,3,4,5,-tetrahydropyridin, 2-Methylpiperidin 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin, 2-Phenylpiperidin
4	2,2,2-Trifluoroacetophenon, 2,2,2-Trifluorophenylethanol
5	Aminprodukte aus reduktiven Aminierungen: 1-Phenylethylamin, <i>N</i> -Methyl-1-phenylethylamin
6	Cyclohexylethylamin (reduktive Aminierung) 2,2,2-Trifluorophenylethanol
7	2-Methylpyrrolidin
8	2-Methylpiperidin
9	2-Phenylpiperidin

* siehe (Tabelle 3.12)

Die Identifikation und Quantifizierung aller untersuchten Verbindungen erfolgte durch den Vergleich von Retentionszeiten und Peakflächen mit den kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen. Die Retentionszeiten aller gemessenen Substrate und Produkte mit den in Tabelle 3.12 aufgeführten Methoden sind in Tabelle 3.14 zusammengefasst. Standardgeraden wurden im Bereich von 0,0 bis 12,5 mM erstellt und sind der Arbeit angehängt (siehe Kapitel 7.3, Abbildung 7.3 bis Abbildung 7.9 und Abbildung 7.11 bis Abbildung 7.12).

Tabelle 3.14: Retentionszeiten der mittels GC-Analyse gemessenen Substanzen mit den angegebenen Methoden.

eingesetztes Substrat	Retentionszeit [min]			
	Substrat	Produkt	Enantiomer (<i>R</i>)	(<i>S</i>)
Benzaldehyd mit (NH ₄) ₂ SO ₄	5,7	6,5	-	-
Benzaldehyd mit Methylamin	5,7	7,2	-	-
Acetophenon mit (NH ₄) ₂ SO ₄	6,9	6,7	17,6	17,4
Acetophenon mit Methylamin	6,9	7,3	15,1	14,6
Cyclohexylketon mit (NH ₄) ₂ SO ₄	6,5	14,5	13,5	13,1

2,2,2-Trifluoroacetophenon	4,6	6,5	3,3	3,4
Benzaldehyd	5,7	6,8	-	-
2-Methylpyrrolin	7,3	5,5	18,5	18,8
6-Methyl-2,3,4,5-tetrahydripyridin	7,8	5,8	11,7	12,1
6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydripyridin	8,6	7,2	24,3	24,1

Eine Ausnahme stellte die Analyse der Biotransformationen mit *in vitro* exprimiertem Enzym dar. Die Extraktion der 30 µL-Biotransformationen (siehe 3.5.3) mit 2,2,2-Trifluoroacetophenon als Substrat wurde wie unter 3.7.1.1 beschrieben durchgeführt, das Volumen an MTBE wurde jedoch auf 2 x 30 µL reduziert. Zur Bestimmung der Produktbildung von 2,2,2-Trifluorophenylethanol wurde ein Agilent 7890A GC/MS System (Santa Clara, US), kombiniert mit einem Flammenionisationsdetektor (7890 A), sowie einem massenselektiven Detektor (Inert MSD, 5973C) genutzt. Die parallele Analyse mit beiden Detektoren erfolgte über die Teilung des Gasflusses direkt nach der Trennung auf der Kapillarsäule (DB5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent, Santa Clara, US), wobei Helium als Trägergas diente (konstanter Druck: 17,9 psi). Je 3 µL der Proben wurden bei einem Split-Verhältnis von 1:2 injiziert und mit folgendem Temperaturprogramm gemessen: Anfangstemperatur 70°C (2 min), Erhitzen auf 109°C (30°C/min), Erhitzen auf 114°C (1 °C/min) und Erhitzen auf 310°C (50°C/min) mit einer Haltezeit von 2 min. Die Injektortemperatur lag bei 250°C und die Detektortemperatur bei 320°C. Das Massenspektrum wurde mittels Elektronenspray-Ionisation (70eV) erzeugt und im *scan mode* von 100 m/z bis 180 m/z aufgenommen. Die Quantifizierung der Produktbildung erfolgte anhand der Peakflächen, die zum internen Standard 1-Decanol normalisiert und zur Gesamt-Peakfläche relativiert wurden (Gleichung 5).

$$\text{Produktbildung [\%]} = \frac{\frac{A_P}{I_S}}{\left(\frac{A_S}{I_S} + \frac{A_P}{I_S}\right)} \times 100 \quad 5$$

mit A_P = Peakfläche Produkt und A_S = Peakfläche Substrat

3.7.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

3.7.2.1 Extraktion und Probenvorbereitung

Biotransformationen mit den Substraten 3,4-Dihydroisoquinolin und Glyoxylsäure wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert, die entsprechende Probenvorbereitung ist im Folgenden erklärt.

3,4-Dihydroisoquinolin und das entstehende Produkt 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin wurde mit MTBE extrahiert. Hierfür wurden 150 µL der Biotransformation (siehe 3.5.2) mit 50 µL 5 M NaOH gemischt und zweimal mit 500 µL MTBE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden wie unter 3.7.2.2 beschrieben direkt analysiert.

Das Abstoppen der Biotransformationen mit Glyoxylsäure als Substrat erfolgte durch Zugabe von 300 µL wässriger Schwefelsäure (50 mM H₂SO₄) zu 150 µL Probe (siehe 3.5.2) und anschließendem zweiminütigen Vortexen. Nach Filtration durch 0,45 µm Membranen (PESmembran, VWR, Darmstadt, DE) zur Entfernung von Fest- und Trübstoffen wurden die Proben wie unter 3.7.2.2 beschrieben analysiert.

3.7.2.2 Quantitative Analyse

Die Analyse der Substrate 3,4-Dihydroisoquinolin und Glyoxylsäure und den reduzierten Produkten 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin und Glykolsäure erfolgte mittels *reversed phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC). Hierzu wurde ein HPLC-System von Agilent (Agilent 1200 series, Waldbronn, DE) verwendet, welches mit einem *Degasser* (G1322A), einem quaternären Pumpensystem (G1311A), einem Säulenofen mit Temperaturkontrolle (G1316A), einer Autosamplereinheit (G1329A), als auch einem Diodenarray-Detektor (DAD, G1315D) und einem Brechungsindex-Detektor (RID, engl. *refractive index detector*, G1362A) ausgestattet ist.

Für die Auftrennung von 3,4-Dihydroisoquinolin und 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin wurde die Säule XBridgeC8 (3 x 100 mm, 3,5 µm Partikelgröße, Waters, Eschborn, DE) bei 25°C verwendet. Nach Injektion von 0,5 µL Probe erfolgte die Analyse mit einem Fluss von 0,6 mL/min isokratisch mit einem Laufmittelgemisch aus 67,5% 10 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer und 32,5% Acetonitril. Die Analytmoleküle wurden bei ihren Absorptionsmaxima von 216 nm (1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin) und 248 nm (3,4-Dihydroisoquinolin) am Diodenarray-Detektor detektiert.

Glyoxylsäure und Glykolsäure wurden mit der Ionenaustauscher-Säule Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, München, DE) am RI-Detektor analysiert. Die Parameter waren wie folgt gewählt: mobile Phase: 5 mM wässrige Schwefelsäure, isokratisch; Flussrate: 0,7 ml/min; Injektionsvolumen: 20 µL; Säulentemperatur: 70°C; Detektortemperatur: 25°C.

Die Identifikation und Quantifizierung aller untersuchten Verbindungen erfolgte durch den Vergleich von Retentionszeiten und Peakflächen mit den kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen. Mit den angegebenen Methoden waren die Retentionszeiten der mittels HPLC-Analyse gemessenen Verbindungen wie folgt: 3,4-Dihydroisoquinolin: 2,8 min, 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin: 1,6 min, Glyoxylsäure: 9,1 min und Glykolsäure: 11,4 min. Standardgeraden wurden im Bereich von 0,0 bis 12,5 mM erstellt und sind der Arbeit angehängt (siehe Kapitel 7.3, Abbildung 7.10 und Abbildung 7.13).

3.7.3 Dünnschichtchromatographie

Die Positivkontrolle der Biotransformationen mit *in vitro* exprimiertem Enzym (*R*-IRED-*Sr*-Templat und 3,4-Dihydroisoquinolin als Substrat) wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert. In der DC werden meist Normalphasen als stationäre Phasen für die Trennung eingesetzt und der Trennmechanismus beruht auf dem Prinzip der Adsorption basierend auf unterschiedlichen Polaritäten der zu analysierenden Substanzen. Für die Analyse von 3,4-Dihydroisoquinolin bzw. dem entstehenden Aminprodukt (1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin) wurden DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren, DE) und Ninhydrin-Färbereagenz (0,1 g Ninhydrin in 50 mL Ethanol) verwendet. Ninhydrin reagiert mit primären und sekundären Aminen unter Bildung eines blauvioletten bzw. gelben Farbstoffes. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität von Imin und Amin mit dem gewählten Färbereagenz erfolgte die Detektion nach Tüpfeln, ohne vorheriges Auftrennen der Substanzen. Als Kontrollen wurden Referenzsubstanzen, als auch 0 h-Proben der Biotransformationsansätze mit aufgetragen. Das Ergebnis wurde einmalig mittels HPLC-Analyse wie unter 3.7.2.2 beschrieben verifiziert.

3.7.4 Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der Proteinreinheit

Die Methode der Größenausschlusschromatographie (SEC, engl. *Size-Exclusion Chromatography*) wurde zur Überprüfung der Reinheit der Iminreduktasen nach Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie genutzt. Hierzu wurde die Säule Yarra 3 μ SEC-2000 (300 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, DE) an einem Agilent HPLC-System (Agilent 1200 series, Waldbronn, DE) genutzt. Die Ausstattung war ähnlich zu der unter 3.7.2.2 beschriebenen Anlage, wobei zusätzlich eine Autosamplereinheit mit Temperaturkontrolle (G1367B) zur Verfügung stand. Die Kalibrierung erfolgte über einen Gelfiltrationsstandard, welcher Referenzproteine unterschiedlicher Größe enthielt: Thyroglobulin (670 kDa), γ -Globulin (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Vitamin B12 (1.35 kDa) (#151-1901, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE). Die Kalibriergerade ist im Anhang dargestellt (siehe Abbildung 7.1). Als mobile Phase wurde 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 mit 100 mM NaCl und eine Flussrate von 0,2 mL/min gewählt. Die Autosamplereinheit wurde bis zur Injektion von 5 μ L der gereinigten Enzympräparation auf 8°C gehalten. Die Analyse der Proben erfolgte bei einer Säulentemperatur von 30°C für 25 min, wobei das UV-Signal bei 280 nm detektiert wurde. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte durch das Dividieren der Iminreduktase zugeordneten Peakfläche durch die Gesamtpeakfläche aller in der Präparation enthaltenen Proteine.

3.7.5 Kernresonanz-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der Iminbildung in wässriger Lösung wurde die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR, engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) genutzt. Hierfür wurden ¹H-NMR Spektren mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 500,15 MHz aufgenommen. Die finale Lösemittelzusammensetzung bestand in Anlehnung an die gewählten Biotransformationsbedingungen aus 90% D₂O, 5% d₆-DMSO und 5% wässrige Lösung mit 10 mM des Carbonyl-Akzeptors (Benzaldehyd oder Acetophenon) und 500 mM des Aminnukleophils Methylamin (vergleiche 3.5.2). Hierfür wurden 500 μ L 1 M Methylamin in D₂O mit 400 μ L D₂O und 50 μ L 100 mM Benzaldehyd/Acetophenon in d₆-DMSO gemischt und mit wässriger 1 M NaOH-Lösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Das

Volumen des Gesamtansatzes betrug 1 mL. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur gemessen und die chemische Verschiebung (δ) wurde in *parts per million* (ppm) angegeben.

3.8 Bioinformatische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf eine in vorherigen Arbeiten mittels *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführte Sequenzanalyse zurückgegriffen.^[78] Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten ausgewählter Enzyme wurden mittels *EMBOSS Needle* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) bestimmt. Ein darauf folgender struktureller Vergleich wurde mit Hilfe des *DALI Servers* (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi>) durchgeführt. Die Visualisierung von *in silico* – Analysen, -Vergleichen und Kristallstrukturen wurde mit *Pymol* realisiert.

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung und Reinigung zur Herstellung hochreiner Biokatalysatoren

Um die Iminreduktasen aus *Streptosporangium roseum* (*R*-IRED-*Sr*) und *Paenibacillus elgii* (*S*-IRED-*Pe*) in ausreichender Menge herzustellen, wurde ein Scale-up des in vorherigen Arbeiten^[89,108] etablierten Expressions- und Reinigungsprotokolles durchgeführt. Die Reinheit der Enzympräparation war vor allem bei Untersuchungen zu IRED-katalysierten reduktiven Aminierungen und der promiskutiven Carbonyl-Reduktion durch IREDs von Bedeutung. Die bei diesen Reaktionen eingesetzten Carbonyl-Substrate könnten von *E.coli*-basierten Dehydrogenasen reduziert werden, was zu unerwünschten Nebenreaktionen, bzw. zu falsch-positiven Ergebnissen führen würde.

4.1.1 Fed-Batch Kultivierung im 4 L-Arbeitsvolumen

Die Kultivierung und Expression wurde wie unter 3.3.4.2 beschrieben in *E. coli* JW5510 durchgeführt, wobei über einen Zeitraum von 24 h eine regelmäßige Probennahme zur Bestimmung von Zelldichte (OD_{600nm}), Biofeucht- und Biotrockenmasse (BFM/BTM), Proteingehalt, Enzymaktivität, als auch des Expressionslevels (SDS-PAGE) erfolgte. Die Kultivierungs- und Expressionsverläufe beider bearbeiteten Enzyme sind in Abbildung 4.1 dargestellt. 20 h nach Induktion der Expression wurde für *R*-IRED-*Sr* eine BTM von 14,5 g/L ($OD_{600nm}=22$) und für *S*-IRED-*Pe* eine BTM von 16,5 g/L ($OD_{600nm}=30$) detektiert, was einer absoluten Menge von rund 35 g Zellmasse entspricht. Die Zunahme des Expressionslevels wurde mittels SDS-PAGE überprüft und ist in den Abbildung 4.1 **C** und **D** dargestellt. Mit der Zunahme des Expressionslevels ging eine erwartete Steigerung der volumetrischen Enzymaktivität einher. Proteinkonzentrationen und daraus ermittelte spezifische Enzymaktivitäten der Zellysate lagen am Ende der Kultivierung bei 69 mg/mL und 0,43 U/mg für *R*-IRED-*Sr* und 77 mg/mL und 0,014 U/mg für *S*-IRED-*Pe*.

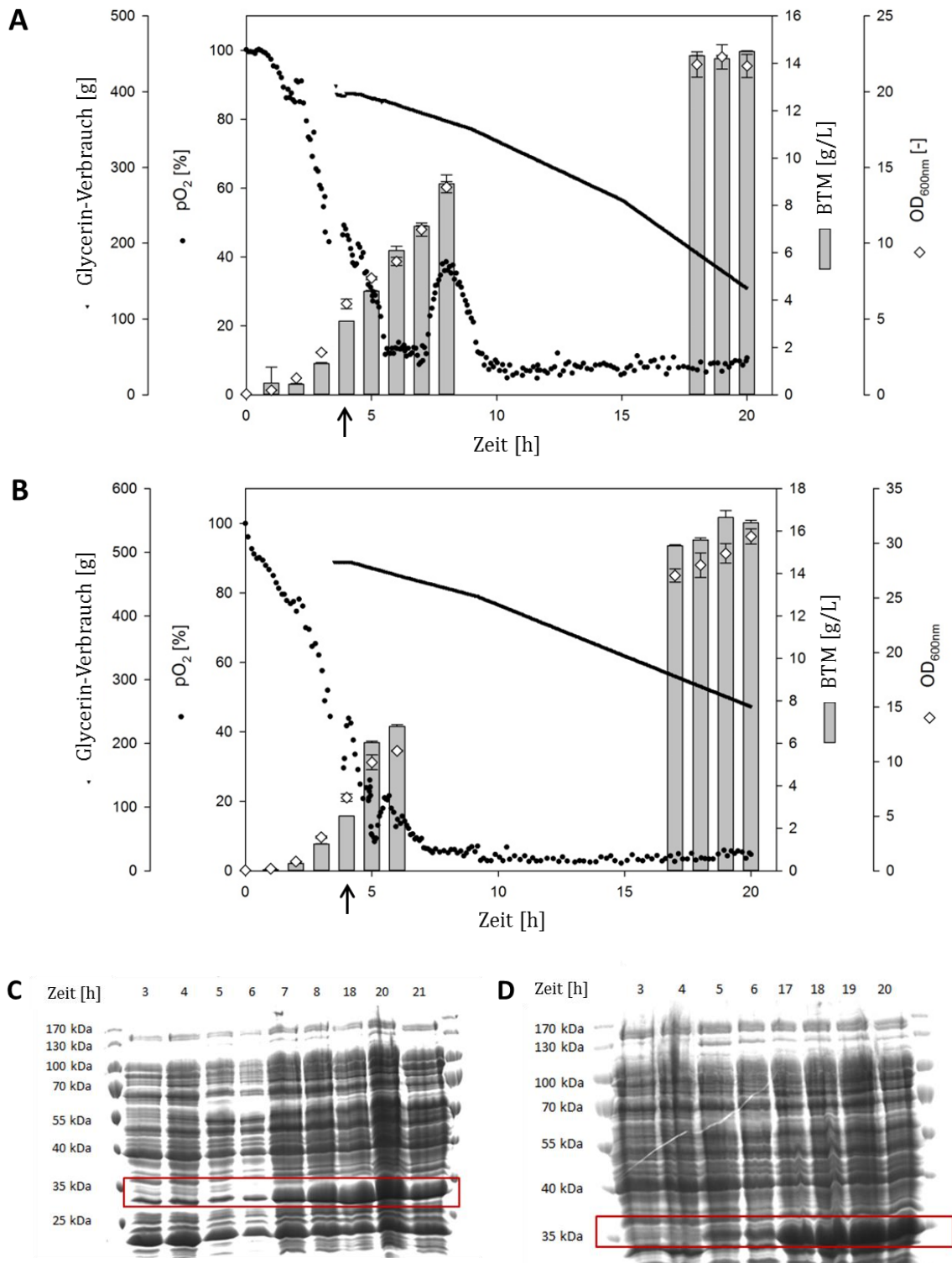


Abbildung 4.1: Verlauf der IRED-Kultivierung im 7,5 L-Reaktor. **A:** Zelldichte (Balken: BTM; \diamond OD_{600nm}) und Glycerin-Verbrauch (\blacktriangledown) gekoppelt an Gelöstsauerstoff (\bullet) bei Kultivierung von *R-IRED-Sr*. Pfeil: Induktionszeitpunkt **B:** Zelldichte (Balken: BTM; \diamond OD_{600nm}) und Glycerin-Verbrauch (\blacktriangledown) gekoppelt mit Gelöstsauerstoff (\bullet) bei Kultivierung von *S-IRED-Pe*. Pfeil: Induktionszeitpunkt. **C:** SDS-PAGE von *R-IRED-Sr* über den Kultivierungsverlauf, 5 μ g Protein pro Spur. **D:** SDS-PAGE von *S-IRED-Pe* über den Kultivierungsverlauf, 5 μ g Protein pro Spur (modifiziert nach Lenz *et. al.*, 2016)^[109].

Die nach Scale-up des Prozesses ermittelten Proteinmengen und Enzymaktivitäten waren vergleichbar mit den erhaltenen Werten im bisher etablierten Prozess (2 L-Schikanekolben, 200-400 mL Arbeitsvolumen).^[89] Eine Optimierung der Kultivierung hinsichtlich Fütterungsstrategie und Zelldichte vor Induktion sind jedoch denkbar.

4.1.2 Anwendung eines zweistufigen Reinigungsprozesses

Die Reinigung von IREDs erfolgte in bisherigen am Institut durchgeführten Arbeiten anhand Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Nutzung des N-terminal eingeführten His-*Tags* (siehe Gensequenzen in Kapitel 7.1).^[89,108] Um eine höhere Reinheit der Enzympräparation zu erreichen, wurden erste Versuche zu einer auf die IMAC folgenden Ionenaustauschchromatographie (IEX) im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Philipp Scheller durchgeführt.^[89] Beide Methoden wurden dem Maßstab der Fermentation (7,5 L-Reaktor, 4 L Arbeitsvolumen) und daraus resultierenden Proteinmengen angepasst und wie unter 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Effizienz der Reinigungsschritte wurde anhand der Bestimmung von Enzymaktivitäten (siehe 3.5.1), SDS-PAGE Analysen (siehe 3.4.4), sowie durch Größenausschlusschromatographie (SEC, siehe 3.7.4) evaluiert. Die IMAC-Läufe wurden mit drei in Reihe geschalteten, mit Ni²⁺ beladenen 5 mL HiTrap *Chelating* Sepharose Säulen durchgeführt. Die Bindung der His₆-getaggten Proteine an das Säulenmaterial wurde durch eine reduzierte Fließgeschwindigkeit (2,5 mL/min) während der Probenaufgabe optimiert. Für die Elution wurde ein Stufengradient gewählt, wobei das Zielprotein bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol eluierte (UV-Signal 280 und 340 nm). In Abbildung 4.2 ist beispielhaft ein Chromatogramm für die Reinigung von *R*-IRED-*Sr* mittels des beschriebenen Prozesses dargestellt. Die weitere Reinigung erfolgte durch Anionen-IEX unter Verwendung eines MonoQ Säulenmaterials. Hier wurde für die Elution ein linearer Gradient von 0%-100% Elutionspuffer über 10 Säulenvolumen (CV) gewählt, wobei 100% einer 1 M KCl-Konzentration entsprachen. Für die folgenden Analysen wurde ausschließlich das bei 340 nm detektierbare Zielprotein verwendet. In Abbildung 4.3 ist beispielhaft ein Chromatogramm des gewählten Reinigungsprozesses mittels IEX für die Reinigung von *R*-IRED-*Sr* veranschaulicht.

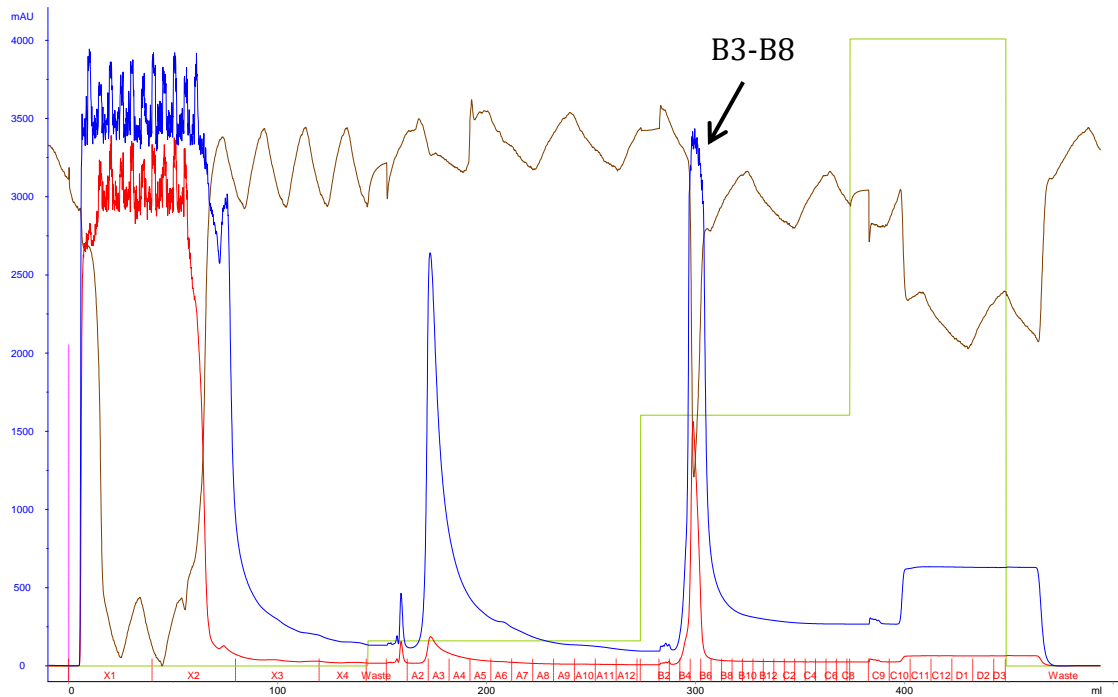


Abbildung 4.2: Chromatogramm der Reinigung von *R-IREd-Sr* mittels IMAC. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Rot: UV-Absorption bei 340 nm [mAU]. Grün: Stufengradient mit 0% Elutionspuffer, 4% Elutionspuffer (20 mM Imidazol), 40% Elutionspuffer (200 mM Imidazol), 100% Elutionspuffer (500 mM Imidazol). Braun: Leitfähigkeit [S/m]. Pfeil: Signal des eluierten Zielproteins (Fraktionen B3-B8).

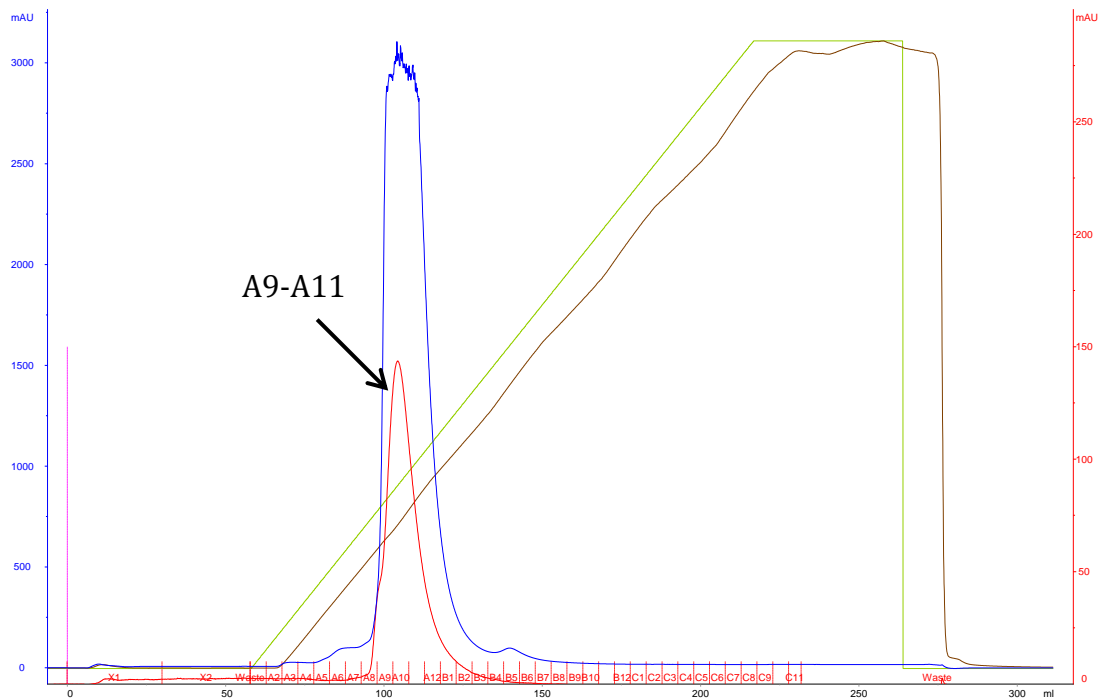


Abbildung 4.3: Chromatogramm der Reinigung von *R-IREd-Sr* mittels IEX. Blau: UV-Absorption bei 280 nm [mAU]. Rot: UV-Absorption bei 340 nm [mAU]. Grün: linearer Gradient von 0% Elutionspuffer bis 100% Elutionspuffer (1 M KCl) über 10 Säulenvolumen. Braun: Leitfähigkeit [S/m]. Pfeil: Signal des eluierten Zielproteins (Fraktionen A9-A11).

Ergebnisse

Die Qualität der Reinigungen von *R*-IRED-*Sr* und *S*-IRED-*Pe* ist in Form der erstellten Reinigungstabellen in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 zusammengefasst. Zusätzlich ist die Reinheit der Enzympräparationen nach Durchführung der unterschiedlichen Reinigungsschritte durch das in Abbildung 4.4 dargestellte SDS-PAGE verdeutlicht. Nach Durchführung der als ersten Reinigungsschritt beschriebenen IMAC konnten Ausbeuten von 68% und 87% mit spezifischen Enzymaktivitäten von 1,6 U/mg bzw. 0,07 U/mg für *R*-IRED-*Sr* und *S*-IRED-*Pe* detektiert werden (Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2). Dies bedeutet abhängig vom Enzym eine 4-fache bzw. 5-fache Steigerung der Reinheit im Vergleich zu den aufgetragenen Zelllysaten.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Reinigung von *R*-IRED-*Sr*.

	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Lysat	3445,0	0,43	1490,0	100,0	1,0
IMAC	648,0	1,56	1012,0	67,9	3,6
IEX	119,3	2,58	307,8	20,7	6,0

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Reinigung von *S*-IRED-*Pe*.

	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Lysat	3837,0	0,014	55,0	100,0	1,0
IMAC	696,0	0,071	49,2	89,5	4,9
IEX	151,6	0,241	36,6	66,6	16,8

Schon mittels IMAC konnten Reinheiten von 80-90% erreicht werden (Abbildung 4.4, Spur 2 und 5). Diese konnten durch Anwendung einer nachfolgenden IEX mit Ausbeuten von 21% und 66%, bei spezifischen Enzymaktivitäten von 2,6 U/mg bzw. 0,24 U/mg für *R*-IRED-*Sr* und *S*-IRED-*Pe* nochmals 6-fach bzw. 17-fach gesteigert werden (Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2). Das Einführen des zweiten Reinigungsschrittes führte zu einer Verbesserung der Reinheit bis zu 15%, sodass gesamt eine Reinheit von 95% erzielt werden konnte (Abbildung 4.4). Eine

Konzentrierung der finalen Enzympräparationen war für beide bearbeiteten IREDs bis zu einer Konzentration von 70-80 mg/mL möglich.

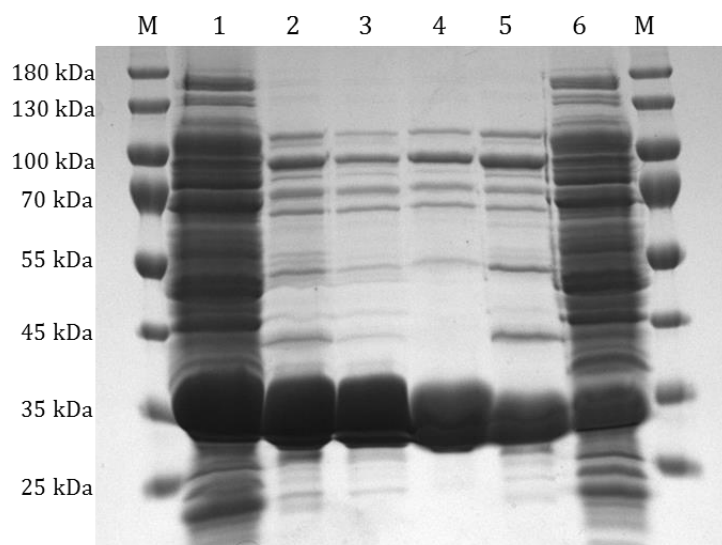


Abbildung 4.4: 12% SDS-PAGE Gel der gereinigten IREDs. M: Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ~10-180 kDa, Fermentas); 1: Zellysat *R*-IRED-*Sr*; 2: *R*-IRED-*Sr* nach IMAC; 3: *R*-IRED-*Sr* nach IEX; 4: *S*-IRED-*Pe* nach IEX; 5: *S*-IRED-*Pe* nach IMAC; 6: Zellysat *S*-IRED-*Pe*. Auftragen von 20 µg Gesamtprotein, um auch geringe Verunreinigungen zu visualisieren (aus Lenz *et. al*, 2016)^[109].

4.2 IRED-katalysierte reduktive Aminierung

Die reduktive Aminierung stellt eine der wichtigsten Reaktionen in der asymmetrischen Synthese von chiralen Aminen dar.^[35,39] 2015 konnte die Arbeitsgruppe um Michael Müller zeigen, dass Iminreduktasen neben der Reduktion zyklischer Imine auch die reduktive Aminierung von Ketonen katalysieren können. Für die Substratkombination aus 4-Phenyl-2-butanon und Methylamin konnte ein Umsatz von 8,8% mit einem Enantiomerenüberschuss von 76% gezeigt werden.^[72] Um ein größeres Verständnis für die Reaktion zu generieren, wurde die reduktive Aminierung in Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Scheller weiter untersucht. Hierfür wurden unterschiedliche Substrate studiert (siehe Reaktionsschema Abbildung 4.5).

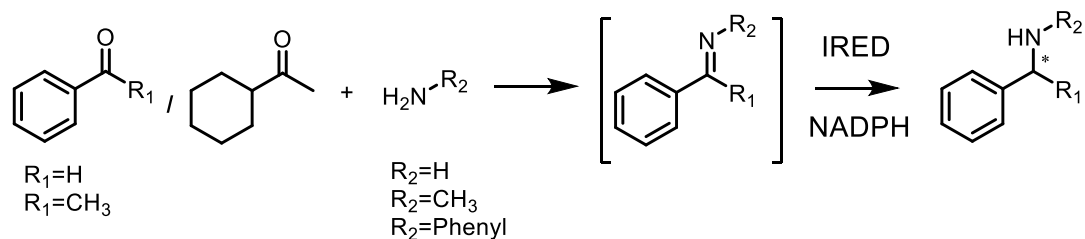


Abbildung 4.5: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung mit für die Untersuchungen der Reaktion ausgewählten Substraten. $R_1=H$: Benzaldehyd; $R_1=CH_3$: Acetophenon; Cyclohexylmethylketon; $R_2=H_2$: Ammonium; $R_2=CH_3$: Methylamin; $R_2=Phenyl$: Anilin.

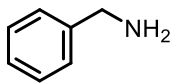
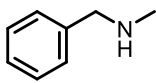
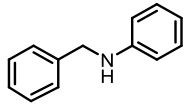
Bei der Auswahl der in Abbildung 4.5 dargestellten Substrate wurden verschiedene Faktoren berücksichtigt. Benzaldehyd stellt eine reaktive Carbonylverbindung dar, bei der durch geringe Modifikationen der Seitenkette theoretisch eine große Substratdiversität erreicht werden kann. Im Vergleich können in Reaktionen mit Acetophenon und Cyclohexylmethylketon chirale Zentren generiert werden. Die als *N*-Donor verwendeten Amine wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Nucleophilie, welche mit der Basizität und somit Reaktivität der Verbindungen einhergeht, gewählt: Ammonium < Anilin < Methylamin.

4.2.1 Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor

Die ersten Versuche mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor wurden mit zwei am Institut etablierten IREDs aus *Streptosporangium roseum* (*R*-IRED-*Sr*) und *Streptomyces turgidiscabies* (*R*-IRED-*St*) durchgeführt. Bei der Auswahl der Biokatalysatoren wurde berücksichtigt, dass die bisher charakterisierten *R*-selektiven IREDs eine ca. 10-fach höhere Aktivität im Vergleich zu *S*-selektiven Enzymen zeigen.^[61,66] Unter Verwendung von 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0), Enzymkonzentrationen von 2,5 mg/mL und äquimolaren Mengen Benzaldehyd und Aminnucleophil (je 10 mM) wurden die Biotransformationen wie unter 3.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Produktbildung in Abhängigkeit von Enzym und Inkubationszeit ist in Tabelle 4.3 dargestellt. Prinzipiell war die Katalyse der reduktiven Aminierung durch beide untersuchten IREDs möglich, wobei *R*-IRED-*Sr* das geeignetere Enzym für das ausgewählte Substratpanel darstellte. Beim Vergleich der Ergebnisse mit den unterschiedlichen *N*-Donoren wird der Einfluss der Nucleophilie des Amins deutlich. Der Einsatz des stärkeren Nucleophils Methylamin resultierte im Vergleich zu Biotransformationen mit Ammoniumsulfat nach 24 h Inkubation in 45% mehr Produkt. Die geringe Produktbildung mit Anilin als

Aminnukleophil kann auf die schlechte Löslichkeit der Verbindung, und die damit verbundene geringere Verfügbarkeit während der Biotransformation, zurückgeführt werden.

Tabelle 4.3: Produktbildung der reduktiven Aminierung mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor und äquimolaren Konzentrationen der verschiedenen Aminnukleophile bei pH 8,0 und 25°C mit zwei unterschiedlichen IREDs über eine Reaktionszeit von 24 h. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

		Produktbildung [%]					
<i>N</i> -Donor	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		$\text{CH}_3\text{-NH}_2$		Anilin		
Produkt							
Enzym	<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i>	<i>R</i> -IRED- <i>St</i>	<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i>	<i>R</i> -IRED- <i>St</i>	<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i>	<i>R</i> -IRED- <i>St</i>	
Zeit [h]							
1	-	-	5,5 ± 0,2	-	4,1 ± 0,2	-	
3	-	-	19,4 ± 1,1	-	9,6 ± 0,3	-	
5	< 1	-	30,7 ± 4,3	-	15,1 ± 0,6	-	
8	1,3 ± 0,1	-	34,6 ± 1,2	-	13,4 ± 1,3	-	
24	6,6 ± 0,3	-	51,2 ± 2,8	3,0 ± 0,3	25,9 ± 5,3	< 1	

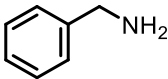
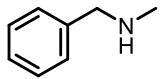
- nicht detektierbar

Um den Einfluss der Aminnukleophile auf die Iminbildung weiter zu untersuchen wurde die Konzentration dieser im Reaktionsansatz erhöht. In Biotransformationen mit *R*-IRED-*Sr* wurden Ammoniumsulfat und Methylamin in 10-fachem (100 mM) und 50-fachem (500 mM) Überschuss zugegeben. Die Parameter pH, Temperatur und Enzymkonzentration wurden konstant gehalten (pH 8,0, 25°C, 2,5 mg/mL). Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Die Erhöhung der Nukleophilkonzentration hatte vor allem bei Reaktionen mit dem schwächeren Nukleophil Ammoniumsulfat einen starken Einfluss. Nach 24 h konnte hier die Produktbildung um das 9,2-fache auf 61% gesteigert werden. Bei Einsatz von 500 mM Methylamin war eine Steigerung der Produktbildung um 18% möglich. Durch die Erhöhung der Nukleophilkonzentration lag das Gleichgewicht der Iminbildung im wässrigen Milieu mehr auf Seite der Kondensationsreaktion, wodurch mehr Substrat für die folgende IRED-katalysierte Reduktion zur Verfügung

Ergebnisse

stand, was wiederum eine höhere Produktbildung zur Folge hatte. Bei allen Reaktionen mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor wurden 5-8% Benzylalkohol als Nebenprodukt detektiert.

Tabelle 4.4: Produktbildung der reduktiven Aminierung mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor und unterschiedlichen Konzentrationen der Aminnukleophile Ammoniumsulfat und Methylamin mit *R*-IRED-*Sr* bei pH 8,0 und 25°C über eine Reaktionszeit von 24 h. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

		Produktbildung [%]					
<i>N</i> -Donor	NH_4^+			$\text{CH}_3\text{-NH}_2$			
Produkt							
<i>c</i> (<i>N</i> -Donor)	10 mM	100 mM	500 mM	10 mM	100 mM	500 mM	
Zeit [h]							
1	-	-	< 1	5,5 ± 0,2	32,8 ± 0,6	58,0 ± 3,3	
3	-	5,0 ± 0,4	15,3 ± 0,7	19,4 ± 1,1	67,2 ± 2,2	75,5 ± 0,5	
5	< 1	12,0 ± 0,4	32,8 ± 0,9	30,7 ± 4,3	72,0 ± 2,7	70,9 ± 3,2	
8	1,3 ± 0,1	21,4 ± 0,3	48,0 ± 0,8	34,6 ± 1,2	71,6 ± 3,3	73,3 ± 3,8	
24	6,6 ± 0,3	51,2 ± 2,1	60,7 ± 1,1	51,2 ± 2,8	66,2 ± 0,5	69,0 ± 4,1	

- nicht detektierbar

4.2.2 Ketone als Carbonyl-Akzeptoren zur Synthese chiraler Amine

Enzyme zeichnen sich im Vergleich zu chemischen Katalysatoren durch ihre hohe Selektivität aus.^[110,111] Um diesen Vorteil von Enzymen zu nutzen wurden neben Benzaldehyd die Ketone Acetophenon (ACE) und Cyclohexylmethylketon (CHK) als Carbonyl-Akzeptoren für die reduktive Aminierung ausgewählt. Zur Untersuchung der Reaktionen wurden unter Berücksichtigung der mit Benzaldehyd erzielten Ergebnisse die Amine Ammoniumsulfat und Methylamin in 50-fachem Überschuss (500 mM) eingesetzt. Die Biotransformationen wurden bei pH 8,0, 25°C und mit 2,5 mg/mL *R*-IRED-*Sr* durchgeführt (siehe 3.5.2). Hierbei konnte mit 15,8% die höchste Produktbildung für die Substratkombination Cyclohexylmethylketon und Ammoniumsulfat detektiert werden. Betrachtet man die Ergebnisse mit Acetophenon als Carbonyl-Akzeptor wird der Einfluss der Nukleophilie des *N*-Donors auf die Produktbildung erneut deutlich. Mit Methylamin konnten 3% mehr

Produkt detektiert werden als mit Ammoniumsulfat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 veranschaulicht.

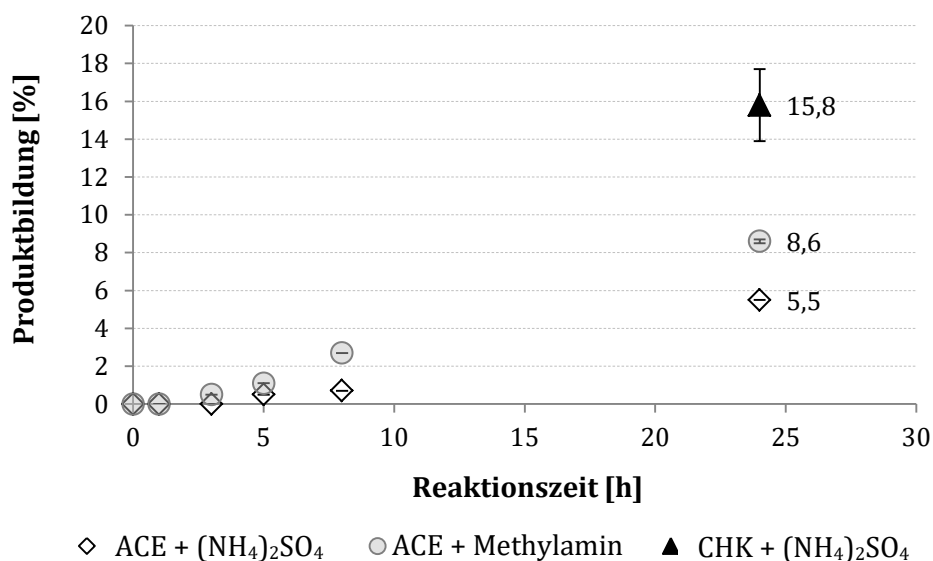


Abbildung 4.6: Produktbildung der reduktiven Aminierung mit Ketonen zur Synthese chiraler Amine. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 10 mM Acetophenon (ACE) oder Cyclohexylmethylketon (CHK), 500 mM Aminnukleophil, pH 8,0, 25°C, 2,5 mg/mL *R*-IRED-*Sr*. Für die Substratkombination CHK + Ammonium wurde keine zeitlicher Verlauf, sondern nur eine Endpunktbestimmung nach 24 h durchgeführt. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

4.2.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die reduktive Aminierung kann in zwei getrennten Teilreaktionen betrachtet werden: 1. Die Iminkondensation aus Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil, sowie 2. die anschließende Enzym-katalysierte asymmetrische Reduktion des *in situ* gebildeten Imins. Die Stabilität des Imin-Zwischenproduktes in wässriger Umgebung stellt eine bedeutende Herausforderung der Enzym-katalysierten reduktiven Aminierung dar.^[83] Durch den Einsatz verschiedener Aminnukleophile, welche sich durch unterschiedliche Reaktivitäten auszeichnen, konnte bereits ein Einfluss auf die Iminbildung und die daraus resultierende Produktbildung gezeigt werden (Tabelle 4.3). Zusätzlich führte eine Erhöhung der Nukleophilkonzentration zu einer weiteren Steigerung der Produktbildung (Tabelle 4.4). Um das Reaktionsgleichgewicht der Iminbildung noch weiter auf die Seite der Kondensation zu verschieben, wurden weitere Faktoren wie pH-Wert, Reaktionstemperatur und Reaktionszeit variiert. Außerdem wurde der Einfluss einer 3-stündigen Inkubation

Ergebnisse

von Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil vor Zugabe des Enzym-Katalysators analysiert.

Die Erhöhung des pH-Wertes von 8,0 auf 9,0 zeigte einen deutlichen Effekt auf den Umsatz der Reaktion. Nach Biotransformationen mit 2,5 mg/mL *R*-IRED-*Sr* bei 25°C konnte nach 24 h eine bis zu 10% erhöhte Produktbildung detektiert werden (Abbildung 4.7). *R*-IRED-*Sr* zeigt bei pH 9,0 eine verbleibende Restaktivität von rund 30% im Vergleich zu pH 7,0 (pH-Optimum).^[67,89] Fasst man diese zwei Ergebnisse zusammen wird deutlich, dass die geringe Iminkonzentration in wässriger Lösung limitierender ist für den Gesamtumsatz der Reaktion als die Enzymaktivität von *R*-IRED-*Sr*.

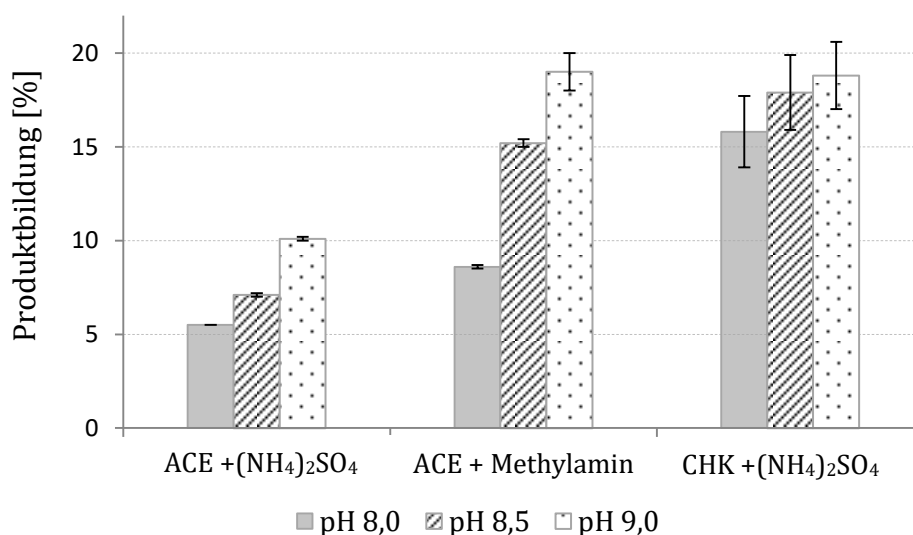


Abbildung 4.7: Produktbildung der reduktiven Aminierung mit Ketonen in Abhängigkeit des pH-Wertes der Reaktion. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt: 10 mM Acetophenon (ACE) oder Cyclohexylmethylketon (CHK), 500 mM Aminnukleophil, 25°C, 2,5 mg/mL *R*-IRED-*Sr*, 24h Reaktionszeit. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Iminkondensation wurde durch NMR-Studien weiter untersucht. Unter Berücksichtigung der in Biotransformationen verwendeten Reaktionsbedingungen wurden NMR-Messungen mit 10 mM Carbonyl-Akzeptor und 500 mM Aminnukleophil in D₂O bei verschiedenen pD-Werten durchgeführt (siehe 3.7.5). In Abbildung 4.8 sind die Ergebnisse der ¹H-Spektren nach Inkubation von Benzaldehyd und Methylamin dargestellt (siehe zusätzlich im Anhang Abbildung 7.14 bis Abbildung 7.19). Ab einem pD von 8,6, was einem pH von 8,2 entspricht

($pD = pH + 0,4^{[112]}$), konnte eine eindeutige Iminbildung detektiert werden. Bei pD 9,4 (pH 9,0) wurde mit 90% (9 mM) fast vollständiger Umsatz der Ausgangssubstrate zum entsprechenden Imin detektiert (Abbildung 4.8). Für Acetophenon als Carbonyl-Akzeptor war leider keine Bestimmung der Iminbildung anhand der mittels NMR detektierten chemischen Verschiebung möglich (siehe Anhang Abbildung 7.20). Ein Grund hierfür kann das Detektionslimit der 1H -NMR, welches bei 0,5 mM liegt, sein. Trotz den vermutlich nur geringen Mengen des Imin-Intermediates konnten Produktbildungen bis zu 20% nach Biotransformationen mit Acetophenon als eingesetzten Carbonyl-Akzeptor detektiert werden (vergleiche Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7). Hiermit wird das Potenzial von *R*-IRED-*Sr* in der Katalyse von reductiven Aminierung verdeutlicht, schon geringe Mengen an Imin-Intermediat konnten umgesetzt werden.

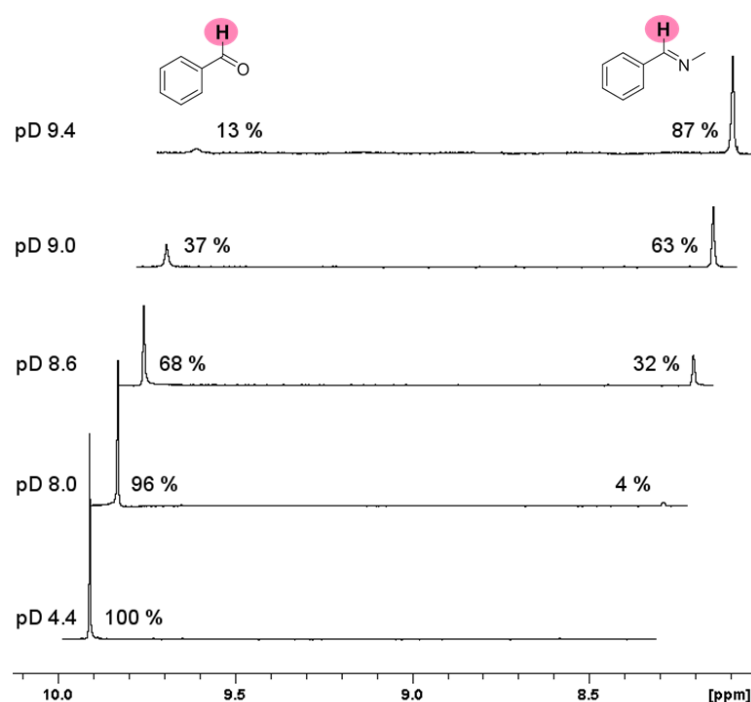


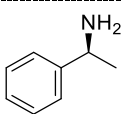
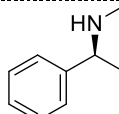
Abbildung 4.8: 1H -NMR-Spektrum zur Verfolgung der Iminbildung mittels Kondensation von Benzaldehyd und Methylamin in Abhängigkeit des pH-Wertes. Als Lösemittel für die durchgeführten NMR-Experimente wurde D_2O verwendet, weshalb pD -Werte angegeben sind: $pD = pH + 0,4^{[112]}$ Ab pH 8,2 sind wesentliche Mengen an Imin detektierbar (aus Scheller *et. al.*, 2016)^[82].

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für alle weiteren Versuche pH 9,0 als Standard- pH -Wert genutzt. Bei diesem pH -Wert wurde bei Umsätzen mit Acetophenon erneut die Konzentration der Aminnukleophile bis zu 1 M variiert, als

Ergebnisse

auch die Reaktionszeit von 24 h auf 72 h verlängert. Temperatur und Enzymkonzentration wurden in den durchgeführten Biotransformationen konstant gehalten (25°C, 2,5 mg/mL). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5 Produktbildung der reduktiven Aminierung mit Acetophenon mit Konzentrationen des *N*-Donors Ammoniumsulfat oder Methylamin bis zu 1 M. Die Reaktion wurde *R*-IRED-*Sr* bei pH 9,0 und 25°C durchgeführt und über 72 h verfolgt. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

		Produktbildung [%]					
<i>N</i> -Donor	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			$\text{CH}_3\text{-NH}_2$			
Produkt							
c (<i>N</i>-Donor)	500 mM	750 mM	1 M	500 mM	750 mM	1 M	
Zeit [h]							
24	6,8 ± 0,1	9,6 ± 0,3	10,2 ± 1,4	14,3 ± 0,4	14,7 ± 0,3	14,7 ± 0,3	
48	14,6 ± 0,4	19,0 ± 0,6	21,5 ± 0,9	29,5 ± 1,1	31,6 ± 0,4	32,3 ± 0,7	
72	22,8 ± 0,3	28,8 ± 1,6	31,4 ± 0,1	45,6 ± 0,2	49,2 ± 2,1	48,4 ± 1,3	

Bei Reaktionen mit dem schwächeren Nukleophil Ammoniumsulfat konnte erneut ein Einfluss der Nukleophilkonzentration auf die Produktbildung detektiert werden. Mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurde nach 72 h eine Produktbildung von 31% detektiert, was einer Steigerung um 8% im Vergleich zu Reaktionen mit 500 mM Ammoniumsulfat entspricht. Bei Verwendung von Methylamin als *N*-Donor konnte unabhängig von der eingesetzten Aminkonzentration eine Produktbildung von rund 47% ermittelt werden. Eine dreifach gesteigerte Reaktionszeit von 24 h auf 72 h bewirkte eine im gleichen Verhältnis gesteigerte Produktbildung von 15% auf 47%. Mit den Substratkonzentrationen 10 mM Acetophenon und 1 M Ammoniumsulfat bzw. 10 mM Acetophenon und 500 mM Methylamin wurden zur weiteren Verbesserung der Produktbildungen zweistufige Biotransformationen durchgeführt. Eine der Enzym-Katalyse vorgeschaltete dreistündige Inkubation der Substrate führte jedoch zu keiner wesentlichen Erhöhung der Produktbildung. Des Weiteren führte eine Erhöhung der Reaktionstemperatur von 25°C auf 37°C zu keiner gesteigerten

Produktbildung. Im Gegenteil, für die Substratkombination Acetophenon und Methylamin (1:50) wurde nach Biotransformationen bei pH 9,0 und 37°C mit 2,5 mg/mL *R*-IRED-Sr nur 9,4% Produkt nach 24 h Reaktionszeit detektiert, was einer Verringerung um 5% entspricht (vergleiche Tabelle 4.5).

Um den zweiten Teilschritt der Reaktion, die Enzym-katalysierte Reduktion, zu beeinflussen wurde als letzter Punkt die Katalysatormenge von 2,5 mg/mL (0,78 mol%) auf 10 mg/mL (3,1 mol%) erhöht. Die Biotransformationen wurden bei den bisher optimierten Parametern (pH 9,0, 25°C, 500 mM Aminnukleophil) durchgeführt und nach 24 h analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.9 veranschaulicht. Für alle untersuchten Substratkombinationen konnte mit Erhöhung der Katalysatorkonzentration eine Steigerung in der Produktbildung detektiert werden. Der Einsatz der 4-fachen Enzymkonzentration hatte jedoch keine Erhöhung der Produktkonzentration um den Faktor 4 zur Folge. Die größte Steigerung der Produktbildung auf 52,7% konnte für die Substratkombination Cyclohexylmethylketon und Ammoniumsulfat detektiert werden. Außerdem konnten für alle Produkte gute bis exzellente *ee*-Werte von bis zu 98% detektiert werden (Abbildung 4.9).

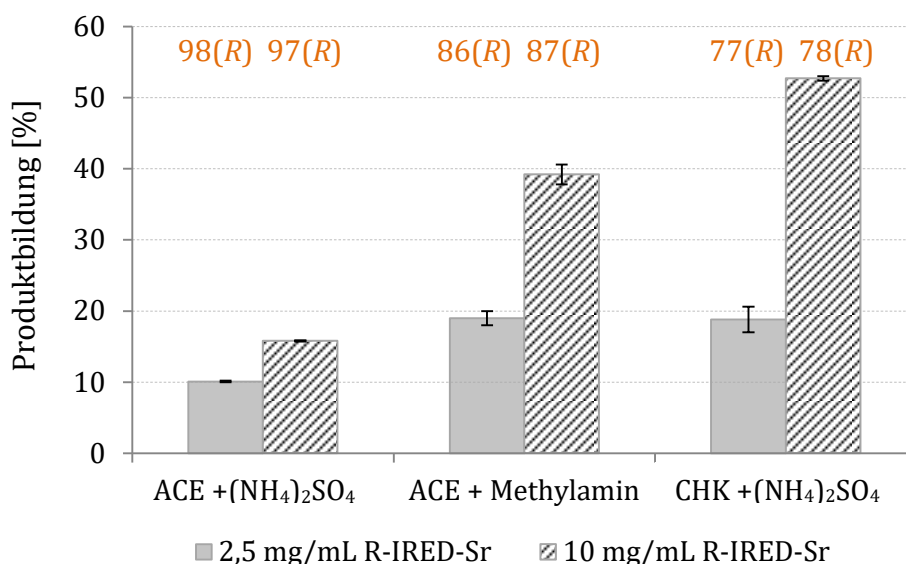


Abbildung 4.9: Produktbildung der reduktiven Aminierung mit Acetophenon (ACE) und Cyclohexylmethylketon (CHK) mit 4-fach erhöhter Enzymkonzentration unter bisher optimierten Bedingungen: 10 mM ACE/CHK, 500 mM Aminnukleophil, pH 9,0 und 25°C über 24h. Detektierte Enantiomerenüberschüsse in % sind in orange dargestellt. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

4.2.4 Optimierung des Biokatalysators

Die Stabilität des *in situ* gebildeten Imin-Zwischenproduktes stellt einen entscheidenden Parameter der Enzym-katalysierten reduktiven Aminierung dar.^[83] Die Durchführung der Reaktion in biphasischen Reaktionsgemischen (keine Hydrolyse des Imins in organischen Lösemitteln) wäre hierbei als Optimierungsstrategie denkbar. Problematisch hierbei ist die Enzym-Stabilität unter diesen nicht-natürlichen Bedingungen. Im Rahmen seiner Dissertation am Institut für Technische Biochemie konnte Dr. Philipp Scheller bereits einen deutlichen Aktivitätsverlust der Iminreduktasen *R*-IRED-*Sr*, *R*-IRED-*St* und *S*-IRED-*Pe* nach Zugabe verschiedener wassermischbarer Lösemittel (Glycerin, Methanol, Ethanol, DMSO, Acetonitril, Aceton, Isopropanol und *tert.*-Butanol) in einem Volumen von 5% (v/v) bis 25% (v/v) feststellen.^[67,89] In einer Kooperation mit Prof. Dick B. Janssen und Dr. Hein J. Wijma der University of Groningen wurde versucht die Stabilität der Iminreduktase *R*-IRED-*Sr* aus *Streptosporangium roseum* zu steigern. Das von ihnen entwickelte *in silico* Tool FRESCO (engl.: *Framework for Rapid Enzyme Stabilization by Computational libraries*) wurde genutzt um Vorschläge für temperaturstabile Mutanten zu generieren. FRESCO beinhaltet vier verschiedene Software-Module („FoldX“, „Rosetta“, „Disulfid Discovery“ und „Consensus Approach“), mit deren Hilfe Mutationen die eine erhöhte Temperaturstabilität bewirken vorhergesagt werden können.^[113] Durch die Berechnung der freien Faltungsenthalpie ($\Delta\Delta G^{\text{Fold}}$) der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym werden entsprechende Mutationen ausgewählt (geringere Faltungsenthalpie bedeutet erhöhte Stabilität der Faltung). Idealerweise zeigt eine temperaturstabile Mutante eine generell höhere Robustheit, wodurch reduktive Aminierungen in biphasischen Reaktionsgemischen möglicherweise realisiert werden können.

Nach Anwendung von FRESCO auf Basis eines Homologiemodells der Iminreduktase *R*-IRED-*Sr* (bisher ist die Notwendigkeit einer Kristallstruktur für die Anwendung von FRESCO beschrieben) konnten 150 die Thermostabilität beeinflussende Mutationen identifiziert werden. Die Priorisierung der Mutationen erfolgte anhand der Anzahl der Software-Module, mit welchen die entsprechenden Mutationen identifiziert wurden. Im Rahmen seiner Masterarbeit erstellte Peter Heinemann die 41 der Priorität 1 und Priorität 2 zugeordneten Mutanten.^[114] Das erste Screening erfolgte anhand von Ganzzellbiotransformationen mit 2-Methylpyrrolin als Substrat.

Hierbei wurden die Mutanten bei 50°C für jeweils 30 min inkubiert und folgend die verbleibende Restaktivität, welche anhand der Produktbildung bestimmt wurde, aufgenommen.^[114] Die als Hits identifizierten Varianten zeigten eine 2- bis 2,5-fach erhöhte Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp-Enzym nach Inkubation bei 50°C für 30 min.^[114] Die erhöhte Aktivität wurde nach Einführen folgender Mutationen detektiert: D45K, S203A, T233K, S308R (aus Priorität 1) und T49L, Q144P, Y162F, T213K, D263N (aus Priorität 2).^[114] Eine detaillierte Charakterisierung der positiven Varianten wurde anhand der Bestimmung von Halbwertszeiten bei 50°C und von T_{50}^{15} -Werte (Temperatur, bei der nach 15 min Inkubation noch die Hälfte der Aktivität des Enzyms vorliegt) durchgeführt. Hierbei konnten die Varianten D45K und S308R mit einer Halbwertszeit von 88 min bzw. 59 min (Wildtyp-Enzym: 0 min) und einem T_{50}^{15} -Wert von 59,5°C bzw. 60,8°C (Wildtyp-Enzym: 54,2°C) als thermostabilste Varianten identifiziert werden.^[114] Die Erhöhung des T_{50}^{15} -Wertes um ca. 5°C konnte bei beiden Varianten durch das Einführen basischer Aminosäuren realisiert werden. Die Ausbildung neuer Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zu benachbarten Aminosäuren könnte hierbei entscheidend für die erhöhte Stabilität sein. Vor allem bei der Loop-Mutation S308R können diese zusätzlichen intermolekularen Wechselwirkungen zur Verringerung der Dynamik und gleichzeitigen Erhöhung der Stabilität beitragen.

Die den Prioritäten 1 und 2 zugeordneten Mutanten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Rebekka Schöck mittels einem für IREDs entsprechend optimierten Thermofluor-Assay ein zweites Mal charakterisiert.^[115] Der Thermofluor-Assay ermöglicht die Bestimmung der Denaturierungstemperatur (T_M) von Proteinen^[116]. Entscheidender Bestandteil des Thermofluor Assays ist der Fluoreszenzfarbstoffe *Sypro Orange*, welcher sich unspezifisch an unpolare Proteinflächen anlagert.^[117] Die Oberfläche eines in seiner aktiven Konformation vorliegenden Proteins ist in wässriger Umgebung stark hydrophil/polar, weshalb zu Beginn keine Fluoreszenz messbar ist. Kommt es zur Denaturierung werden Teile des hydrophoben Kerns für die Bindung des Farbstoffes zugänglich. Die dadurch induzierte Fluoreszenz kann bei einer Wellenlänge von 520 nm (Emission, Anregung bei 450 nm) gemessen werden.^[117] Bei einer für jedes Protein spezifischen Temperatur kommt es zu einer schnellen und vollständigen Entfaltung des Proteins, was zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf der Fluoreszenzzunahme führt. Der

Ergebnisse

Wendepunkt dieser Schmelzkurve entspricht der Schmelztemperatur T_M , bei der 50% der Proteine entfaltet vorliegen.^[116] Alternativ kann T_M über das Minimum der ersten Ableitung berechnet werden.^[116] Der Thermofluor-Assay ermöglicht das Screening einer Vielzahl von Varianten im 96 *well plate* Format. Aus diesem Grund wurde Expression und Reinigung der Iminreduktasen an dieses Format angepasst und dafür optimale Bedingungen entwickelt.^[115] Folgende Enzymvarianten zeigten in der Analyse mittels Thermofluor-Assay höhere Schmelztemperaturen als das Wildtyp-Enzym: T49V (+1,8°C), T233K (+7,0°C), H264L (+4,8°C), S308R (+4,1°C) (aus Priorität 1) und T49L (+1,8°C), G60A (+2,0°C), V145K (+2,0°C), S237T (+3,8°C), H264I (+2,4°C) (aus Priorität 2).^[115] Der bereits in der Masterarbeit von Peter Heinemann identifizierte positive Effekt der Mutationen T49L, T233K und S308R konnte bestätigt werden. Die Lokalisierung der mittels Thermofluor-Assay ermittelten positiven Mutationen ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Eine einheitliche Lokalisierung, die auf besonders einflussreiche Regionen des Proteins schließen lässt ist jedoch nicht erkennbar.

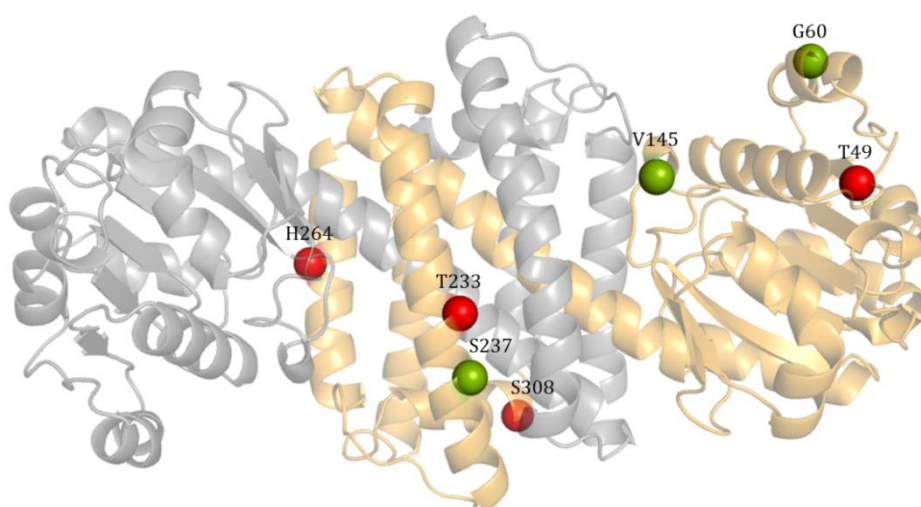


Abbildung 4.10: Lokalisierung der mittels Thermofluor-Assay identifizierten Mutationsstellen, die einen positiven Effekt im Hinblick auf die Thermostabilität des Proteins zeigen. Dargestellt ist das von Dr. Hein Wijma erstellte Homologiemodell der R-IRED-Sr. Positionen aus Priorität 1 sind in rot, aus Priorität 2 in grün dargestellt.

Die als positive Varianten ausgewählten Mutanten zeichneten sich im Vergleich zum Wildtyp-Enzym durch einen erhöhten T_M -Wert und gute, gleichbleibende Aktivitäten für das Substrat 2-Methylpyrrolin aus (mittels NADPH-Assay detektiert, siehe 3.5.1).^[115] Die ermittelten Daten wurden für erneute Berechnungen mittels FRESCO

in das aufgesetzte *Setup* eingepflegt, woraufhin sich basierend auf möglichen additiven Effekten folgende Mehrfachmutanten ergaben: Mutante 1: T49L_G60A_T233K_S237T_H264L_S308R und Mutante 2: G60A_V145K_T233K_S237T_H264L_S308R. Die Varianten mit jeweils sechs Mutationen wurden mittels *Gibson assembly* kloniert und erneut mittels Thermofluor-Assay charakterisiert.^[115] Hierbei ergab sich eine erneute Steigerung der Thermostabilität, wobei Schmelzpunkte T_M von 50,2°C (+13,8°C) und 53,6°C (+17,2°C) für Mutante 1 bzw. Mutante 2 ermittelt werden konnten.^[115] In weiteren Versuchen kann nun die mögliche Eignung dieser Varianten für IRED-katalysierte reduktive Aminierungen in biphasischen Reaktionsgemischen erfolgen und die allgemeine Robustheit dieser Varianten validiert werden.

4.3 IRED-katalysierte Carbonyl-Reduktion

Die meisten als Iminreduktasen (IREDs) charakterisierten Enzyme sind als Dehydrogenasen, hauptsächlich Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenasen, Hydroxyisobutyrat Dehydrogenasen und 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen annotiert.^[66] Neben dieser Sequenzähnlichkeit deutet der für IREDs postulierte klassische Säure-Basen-Mechanismus mit NADPH als Cofaktor^[65] auf eine Verwandtschaft zu Dehydrogenasen hin. In den zuvor untersuchten IRED-katalysierten reduktiven Aminierungen (siehe 4.2) wurde bei Einsatz von Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor Benzylalkohol (5-8%) als Nebenprodukt detektiert, was im ersten Moment auf *E. coli*-basierte Dehydrogenasen zurückgeführt wurde. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde jedoch das Reaktionsspektrum von IREDs hinsichtlich der Reduktion von C=O-Doppelbindungen weiter untersucht. Um die hohe Chemo Selektivität von IREDs für C=N-Bindungen besser zu verstehen und den Unterschied in der Katalyse von C=N- und C=O-Bindungen hervorzuheben, wurde hierfür verschiedene prochiralen Carbonyl-Verbindungen studiert. Unter Berücksichtigung elektronenziehender Gruppen, die die Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffes erhöhen wurden folgende Substrate gewählt: Acetophenon (ACE), 2,2,2-Trifluoroacetophenon (ACECF₃) und Benzoylcyanid (ACECN) wurden als Substrate eingesetzt. In Biotransformationen mit 2,5 mg/mL *R*-IRED-*Sr* und *S*-IRED-*Pe* (hochreine Enzympräparationen, siehe 4.1) konnte für das Substrat 2,2,2-Trifluoroacetophenon Aktivität detektiert werden.

Ergebnisse

Mit *R*-IRED-*Sr* konnten nach 24 h knapp 60% 2,2,2-Trifluorphenylethanol, mit einem Enantiomerenüberschuss von 96% (*S*) detektiert werden (Abbildung 4.11). Für die Substrate Acetophenon und Benzoylcyanid konnte keine Aktivität detektiert werden. Da sich ACE und ACECF₃ in ihrer Größe nur gering unterscheiden, kann dies vermutlich auf den -I-Effekt der CF₃-Gruppe, und die damit verbundene unterschiedliche Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffes zurückgeführt werden. Bei Benzoylcyanid wird aufgrund der Größe der Cyano-Gruppe eine nicht-produktive Bindung in der aktiven Tasche von *R*-IRED-*Sr* vermutet. Hinsichtlich der Reaktivität sollte ACECN ebenfalls ein gutes Substrat darstellen. Der -I-Effekt der Cyano-Gruppe ist größer, als der eines einzelnen Fluor-Atoms.^[33]

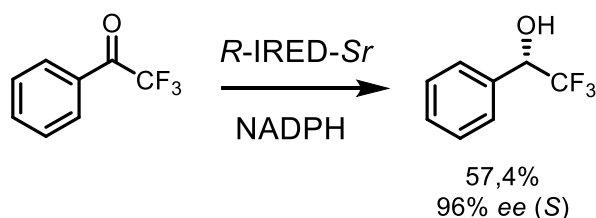


Abbildung 4.11: Reaktionsschema der IRED-katalysierten Carbonyl-Reduktion von 2,2,2-Trifluoroacetophenon zum Produkt 2,2,2-Trifluorphenylethanol nach 24 h.

Um sicher zu gehen, dass die detektierte Reduktion IRED-katalysiert war, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Alle Ergebnisse der durchgeführten Biotransformationen und Kontrollen sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Zum einen erfolgten das standardmäßig mitgeführte Kontrollexperiment mit Hitze-inaktiviertem Enzym (95°C, 10 min), um eine Reduktion durch NADPH auszuschließen. Zusätzlich konnte durch den Einsatz von BSA als Protein in Kontrollexperimenten eine durch die Proteinoberfläche vermittelte Reduktion ausgeschlossen werden (siehe 3.5.2). Des Weiteren wurde NADH als Cofaktor eingesetzt, da bei Untersuchungen mit einer Iminreduktase aus *Streptomyces ipomoeae* 91-03 (RIR-Sip) beim Vergleich der Cofaktoren für NADH eine 85-fach geringere Aktivität als für NADPH beschrieben wurde^[68]. In Biotransformationen mit NADH und dem entsprechenden Cofaktor-Regenerationssystem (siehe 3.5.2) wurde nach 24 h 40 mal weniger Produkt detektiert als in Ansätzen mit NADPH (Tabelle 4.6). Der Rückgang der Produktbildung ist ein weiteres Indiz für die IRED-katalysierte Reduktion der C=O-Verbindung.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der Carbonyl-Reduktion und den entsprechenden Kontrollen bei Verwendung des Substrates 2,2,2-Trifluoroacetophenon und den Enzymen *R*-IRED-*Sr* und *S*-IRED-*Pe*. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung angegeben.

Katalysator	Cofaktor	Produktbildung [%]	ee [%]
<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i>	NADPH	57,4 ± 0,7	96 (<i>S</i>)
<i>S</i> -IRED- <i>Pe</i>	NADPH	23,8 ± 0,2	87 (<i>S</i>)
<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i> inaktiviert	NADPH	< 1,0	-
BSA	NADPH	< 0,5	-
<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i>	NADH	1,4 ± 0,3	-
<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i> (<i>in vitro</i> exprimiert)	NADPH	4,5 ± 0,2	n.d.

n.d. nicht detektiert

Die aussagekräftigste Kontrolle stellten Biotransformationen mit *in vitro* exprimiertem Enzym dar (siehe 3.5.3). Die Methode der *in vitro* Expression wurde bei einem Forschungsaufenthalt an der Emory University in Atlanta in Zusammenarbeit mit Leann Quertinmont und Prof. Dr. Stefan Lutz erarbeitet. Bei der *in vitro* Proteinherstellung wird die Expression vom Wirtsorganismus und dessen Stoffwechsel getrennt, wodurch keine *E. coli*-basierten Dehydrogenasen vorhanden sind. In Ansätzen mit *in vitro* exprimierter *R*-IRED-*Sr* wurden rund 5% des Produktes 2,2,2-Trifluorophenylethanol detektiert (vergleiche Tabelle 4.6). Die geringere Produktbildung im Vergleich zu Biotransformationen mit *in vivo* exprimiertem Enzym ist auf die geringere Proteinmenge zurückzuführen. Die IRED-katalysierte Bildung des Produktes konnte anhand der mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle sichergestellt werden. Die erfolgreiche *in vitro* Proteinexpression von *R*-IRED-*Sr* wurde mittels der Reduktion des Modellsubstrates 3,4-Dihydroisoquinolin gezeigt (siehe Anhang 7.5). Zusätzlich wurde keine Reduktion nach Analyse der Negativkontrolle (DHFR als Enzym-Templat mit 2,2,2-Trifluoroacetophenon als Substrat, siehe 3.5.3) festgestellt, wodurch eine Reduktion durch die im *in vitro* Expressions-Kit enthaltenen Komponenten

ausgeschlossen werden kann. Insgesamt bestätigten alle durchgeführten Kontrollen, dass die detektierte Carbonyl-Reduktion IRED-katalysiert war.

Um die Affinität von *R*-IRED-*Sr* für Imine und Carbonyle zu vergleichen wurden kinetische Parameter für ACECF₃ wie unter 3.6 beschrieben aufgenommen. Die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) war mit 53,31 min⁻¹ mM⁻¹[66] für das Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin (2MPN) rund 600 mal höher als für ACECF₃ (0,085 min⁻¹ mM⁻¹, siehe Anhang Abbildung 7.22), was den Unterschied von *R*-IRED-*Sr* in der Reduktion von Iminen und Carbonyl-Substraten deutlich macht. Mit einem K_{M} von 8,78 mM war die Substrataffinität für ACECF₃ rund 8-mal schlechter als für 2MPN[66] und verdeutlicht zusätzlich den Unterschied in der Katalyse von Iminen und Carbonylen (siehe Anhang Abbildung 7.22). Die bisher bei allen charakterisierten IREDs detektierte Substratinhibierung[65,71], wurde ebenfalls für *R*-IRED-*Sr* ab einer Konzentration von 7 mM ACECF₃ beobachtet (siehe Anhang Abbildung 7.22). Das natürlich Substrat von den als Iminreduktasen charakterisierten Enzymen ist noch nicht bekannt, weshalb in ersten Veröffentlichungen zu dieser Enzymfamilie spekuliert wurde, ob die Imin-Reduktion möglicherweise eine promiskuitive Aktivität dieser Enzyme darstellt.[65] Betrachtet man die detektierten kinetischen Parameter wird jedoch deutlich, dass IREDs eher für die Imin-Reduktion, als für die Carbonyl-Reduktion evolviert wurden.

4.3.1 Berechnung von Energiebarrieren für den Hydrid-Transfer in Abhängigkeit der untersuchten Substrate

Um die Interpretation der experimentellen Ergebnisse (siehe 4.3) weiter zu stützen wurden theoretische Energiebarrieren für den Hydrid-Transfer von NAD(P)H zu verschiedenen Substraten kalkuliert. Neben den zuvor beschriebenen Carbonylverbindungen wurden zyklische und exozyklisch Imine, die bereits als gute Substrate für die am Institut charakterisierte Iminreduktasen beschrieben sind, sowie deren Iminiumionen als Substrate gewählt.[67,82] Die theoretischen Berechnungen wurden von Jan Meisner und Prof. Dr. Johannes Kästner am Institut für Theoretische Chemie der Universität Stuttgart durchgeführt und sind in der *Supporting Information* zum Manuskript "*Asymmetric Ketone Reduction by Imine Reductases*"[118] genauer erläutert. Die aktive Tasche wurde mit 1-Methylnicotinamid als Hydrid-Donor, den entsprechenden Substraten und explizit einem Molekül Wasser, eingeschlossen in eine dielektrische Umgebung modelliert. Das

Wassermolekül wurde zur Ausbildung des Übergangszustandes hinzugefügt, um mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen eine reaktive Distanz zwischen Hydrid-Donor (1-Methylnicotinamid) und den eingesetzten Substraten zu erreichen. Das Prinzip ist in Abbildung 4.12 verdeutlicht.

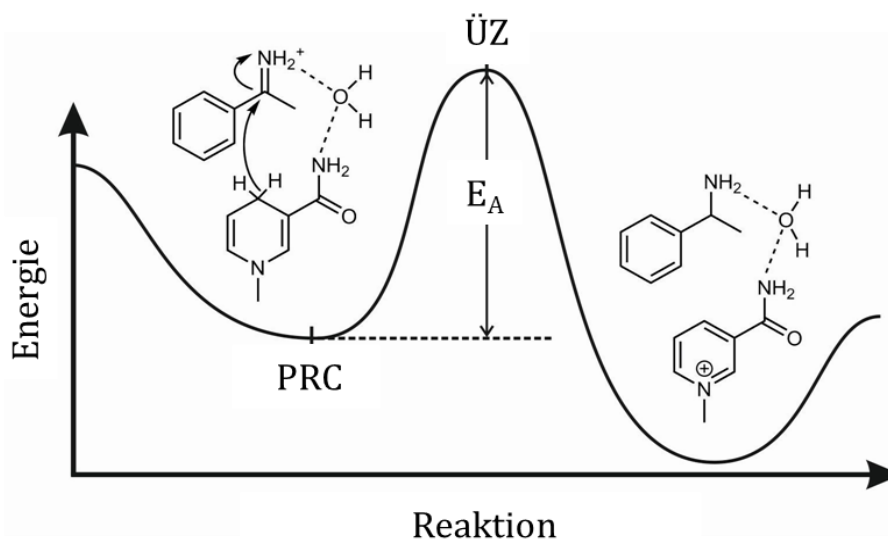
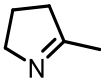
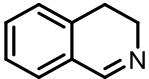
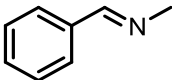
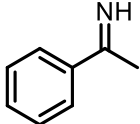
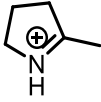
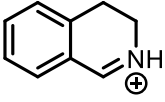
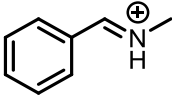
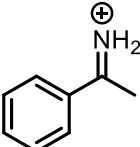
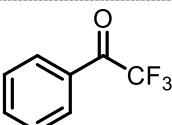
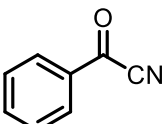
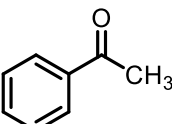


Abbildung 4.12: Beispielhaftes Energieprofil für den berechneten Hydrid-Transfer von 1-Methylnicotinamid zu 1-Phenylethylamin mit dem zusätzlich gemodelten Wassermolekül. PRC: pre-reactive complex, ÜZ:Übergangszustand, E_A : Energiebarriere (modifiziert nach Lenz *et. al*, 2016)^[118].

Im erstellten Model werden die eigentlich bei der Enzym-Katalyse auftretenden Enzym-Substrat Interaktionen, sowie die Proteinumgebung im generellen (nicht nur ein Wassermolekül vorhanden, Eigenschaften und daraus resultierende Wechselwirkungen von Aminosäuren) nicht berücksichtigt. Aufgrund dieser Limitierungen können die in Tabelle 4.7 dargestellten Ergebnisse nur relativ zueinander interpretiert werden.

Ergebnisse

Tabelle 4.7: *In silico* berechnete Energiebarrieren in kJ/mol für den Hydrid-Transfer von 1-Methylnicotinamid (katalytisch relevante Untereinheit von NAD(P)H) zu ausgewählten Imin-Substraten, Iminiumionen und Carbonyl-Substraten.

Eingabe	Verbindung	Energiebarriere [kJ/mol]
1		171,5
2		174,6
3		153,4
4		152,2
<hr/>		
5		82,6
6		69,2
7		65,3
8		58,9
<hr/>		
9		66,4
10		80,6
11		112,6

Die in Tabelle 4.7 berechneten Aktivierungsenergien zeigen zwei- bis dreifach geringere Energiebarrieren für Iminiumionen (Eintrag 5-8) als für Imine (Eintrag 1-4). Diese Unterschiede in der Substrat-Reaktivität wurden bereits in Arbeiten von Turner und Xu deutlich, die schneller Umsätze bei Einsatz von Iminiumsalzen als bei Einsatz der entsprechenden Imine feststellen konnten.^[63,75] Die berechneten Energiebarrieren für die untersuchten Carbonyl-Substrate waren höher als für die eingesetzten Iminiumionen, jedoch deutlich geringer als für die ausgewählten Imin-Substrate (Tabelle 4.7). Wie aufgrund der experimentellen Daten erwartet, wurde die Energiebarriere und somit Aktivität der Ketone am stärksten durch das Einführen der CF₃-Gruppe beeinflusst. Die untersuchten Iminreduktasen zeigten eine promiskuitive Aktivität für C=O-Doppelbindungen, wobei eine gewisse Substratreaktivität erforderlich war. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass sich der Protonierungsmechanismus von Iminreduktasen für C=N-Bindungen zu dem von C=O-Bindungen unterscheidet.

4.3.2 Aufklärung der Kristallstruktur von *R*-IRED-*Sr*

Die promiskuitive Aktivität von IREDs für C=O-Doppelbindungen konnte durch die Reaktivitäten der eingesetzten Substrate und die dadurch verringerte Energiebarriere für den Hydrid-Transfer erklärt werden (siehe 4.3.1). Neben der Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffes wird die produktive Bindung des Liganden in nächster Nähe zur katalytisch relevanten, H-übertragenden Nicotinamid-Untereinheit des Cofaktors NADPH als für die Katalyse entscheidend diskutiert. Mit der Kristallisation von *R*-IRED-*Sr* mit NADP⁺-Cofaktor und dem Substrat 2,2,2-Trifluoroacetophenon konnte die Relevanz der Bindung verdeutlicht werden. Die Kristallisation und Auflösung des ternären Komplexes wurde von Dr. Mahima Sharma und Prof. Dr. Gideon Grogan der University of York durchgeführt und ist im Manuskript "*Converting β -Hydroxyacid Dehydrogenases to Imine Reductases by Single Amino Acid Substitutions*"^[119] genauer beschrieben. Da die Kristallisation von *R*-IRED-*Sr* mit His₆-Tag nicht möglich war, erfolgte nach Expression und Reinigung die proteolytische Spaltung des Tags mittels humanem Plasma-Thrombin. Die danach erhaltenen Kristalle zeigten eine Auflösung von 1,8 Å. Die Struktur wurde nach Vergleich mit einer Monomeren-Einheit der Iminreduktase Q1EQE0 aus *Streptomyces kanamyceticus* (pdb|3ZHB)^[65] aufgelöst. Mit Hilfe des DALI^[120] servers

Ergebnisse

wurde die größte strukturelle Ähnlichkeit von *R*-IRED-*Sr* zu 3ZHB mit 65% Sequenzidentität und einem rmsd (Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung, engl. *root mean square deviation*) von 2,1 Å über 284 α -Kohlenstoffatome festgestellt. Die dimere Struktur der *R*-IRED-*Sr* ist den bisher kristallisierten IREDs^[65,69,72,74,76] sehr ähnlich. Eine monomere Untereinheit definiert sich aus N-terminaler *Rossmann-fold* Domäne, helikaler C-terminaler Domäne und einer, die zwei Domänen verbindenden, langen Helix (Abbildung 4.13). Die aktive Tasche liegt an der Interaktionsfläche der zwei Monomere, zwischen der N-terminalen Domäne eines Monomers und der C-terminalen Domäne der Partnereinheit (Abbildung 4.13).

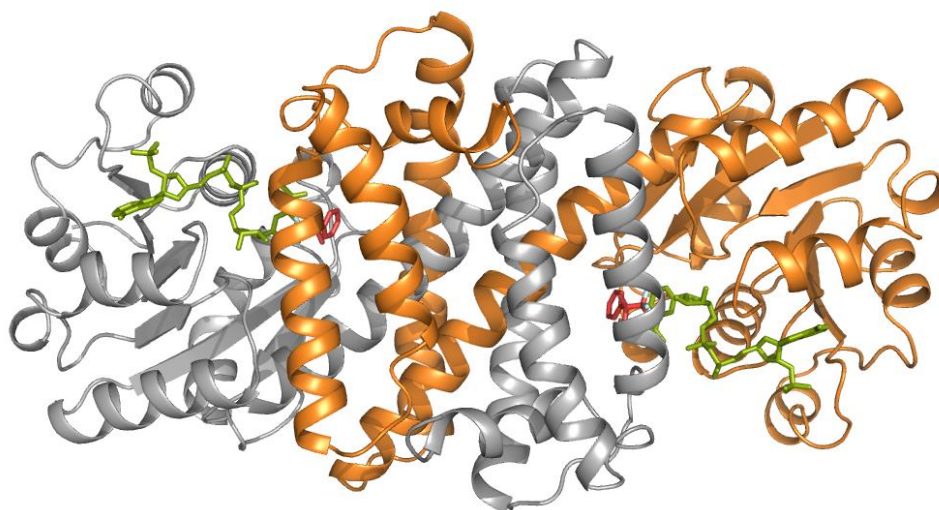


Abbildung 4.13: Gelöste Kristallstruktur der *R*-IRED-*Sr* mit den monomeren Untereinheiten in grau und orange dargestellt. Die aktive Tasche an der Interaktionsfläche der zwei Monomere ist am Cofaktor NADP⁺ in grün und dem Substrat 2,2,2-Trifluoroacetophenon in rot erkennbar (übernommen aus Lenz *et. al.*, 2018^[119]).

Eine Besonderheit stellte das Erhalten der dimeren Struktur in einer geschlossenen Konformation dar, was bisher nur für zwei weitere Iminreduktasen aus *Amycolatopsis orientalis* und *Aspergillus oryzae* erreicht werden konnte.^[69,76] Im Vergleich zu offenen Konformationen entsprechen geschlossene Konformationen eher der katalytisch aktiven Form, wodurch genauere Aussagen bezüglich wichtigen, an der Katalyse beteiligten Aminosäureresten getroffen werden können. Eine detailliertere Ansicht der aktiven Tasche ist in Abbildung 4.14 dargestellt.

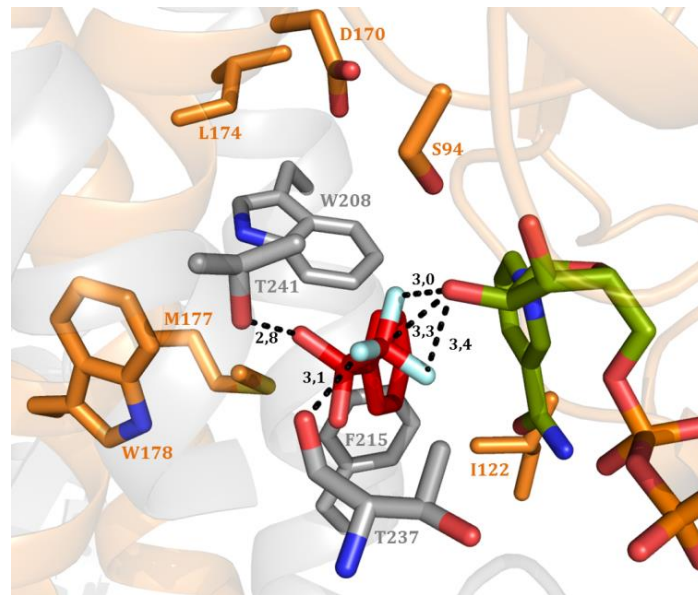


Abbildung 4.14: Darstellung der aktiven Tasche der *R*-IRED-*Sr* mit relevanten Aminosäureseitenketten, die farblich den beiden monomeren Untereinheiten zugeordnet sind. NADP⁺ und ACECF₃ sind in grün und rot dargestellt (übernommen aus Lenz *et. al.*, 2018^[119]).

Der aromatische Ring des 2,2,2-Trifluoroacetophenon-Ligand ist zwischen der Nicotinamid-Untereinheit des Cofaktors und der Seitenkette des Methionins an Position 177 positioniert (Abbildung 4.14). Die Aminosäureseitenketten der Aminosäuren Isoleucin, Tryptophan und Phenylalanin an den Positionen 122, 208 und 215 der zweiten monomeren Untereinheit tragen zur hydrophoben Umgebung bei (Abbildung 4.14). Die Positionierung des Liganden zeigt, dass die *re*-Seite des Ketons zum Nicotinamid-Ring des Cofaktors zeigt, was die Bildung des *S*-Enantiomers (siehe Tabelle 4.6) erklärt. Der Protonen-Transfer könnte durch die Seitenkette des Threonins an Position 241 erfolgen, welche nur 2,8 Å von der Carbonyl-Funktion entfernt liegt. Des Weiteren bildet der Ligand über die CF₃-Gruppe zwischenmolekulare Wechselwirkungen zur Peptidkette des Threonins an Position 237 und zur 2'-Hydroxygruppe der Ribose-Einheit des NADPH-Cofaktors aus. Die für die zwischenmolekularen Interaktionen detektierten Distanzen von ungefähr 3 Å ermöglichen eine Bindung des Liganden in nächster Nähe zur H⁻übertragenden Nicotinamid-Untereinheit des NADPH-Cofaktors (Abbildung 4.14). Die durch die CF₃-Gruppe dirigierte räumliche Positionierung des Substrates erleichtert voraussichtlich den Hydrid-Transfer von NADPH auf das untersuchte Carbonyl-Substrat.

4.4 Vergleich von IREDs und β -Hydroxysäure Dehydrogenasen

Um Funktionsweisen neu entdeckter Proteinfamilien zu verstehen, werden diese häufig mit homologen Proteinfamilien, welche sich durch ähnliche Aminosäuresequenzen definieren, verglichen. Allgemein wird angenommen, dass homologe Proteine auch ähnliche Strukturen ausbilden und vergleichbare Reaktionen katalysieren. In am Institut für Technische Biochemie von Dr. Silvia Fadernrecht durchgeführten Arbeiten^[78,121] wurden β -Hydroxysäure Dehydrogenasen (β HADs) als die den Iminreduktasen ähnlichste Proteinfamilie identifiziert. β -Hydroxysäure Dehydrogenasen sind bekannte, gut charakterisierte Enzyme, die typischerweise die Oxidation/Reduktion von C_3 -Substraten katalysieren. Im Vergleich zu Iminreduktasen unterscheiden sie sich in drei Punkten. Den ersten Unterschied macht die Lage der aktiven Tasche aus. Beide Proteinfamilien bilden Dimere als aktive Form, wobei sich jedes Monomer durch einen N-terminalen *Rossmann fold*, eine helikale C-terminale Domäne und eine lange Helix, welche die beiden Domänen miteinander verbindet, auszeichnet. Während in IREDs eine Verdrehung der Dimere stattfindet, die dafür sorgt, dass sich die aktive Tasche zwischen dem N-terminalen *Rossmann fold* des einen Monomers und der C-terminalen Domäne der Partnereinheit ausbildet (siehe 4.3.2)^[65,88], lagern sich die Dimere in β HADs so an, dass sich die aktive Tasche zwischen den beiden Domänen eines Monomers ausbildet.^[78] Den zweiten Unterschied machen die an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste aus. In β HADs werden hauptsächlich nukleophile und saure Aminosäuren beschrieben, die die Säuregruppe des Substrates koordinieren.^[78,122-124] Im Gegensatz dazu sind in IREDs hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren wie Methionin und Leucin an den entsprechenden Positionen vorhanden.^[66,78] Der dritte Unterschied zwischen IREDs und β HADs wird deutlich, wenn man den katalytischen Mechanismus betrachtet. Für beide Proteinfamilien ist eine klassische Säure-Basen-Katalyse beschrieben, wobei NAD(P)H als Hydrid-Donor fungiert. Während bei β HADs ein positiv geladenes Lysin als Protonen-Donor für die Stabilsierung des Übergangszustandes beschrieben ist^[123], ist die Protonenquelle in IREDs noch nicht identifiziert. Neben Protonenliefernden Aminosäureresten wird eine Protonierung durch Wasser bei entsprechendem pH im vorliegenden Puffersystem, oder ein Protonen-

übertragendes Aminosäure-Netzwerk (*proton relay network*) diskutiert.^[88] Um ein besseres Verständnis hinsichtlich Substratbindung, Mechanismus und Evolution von Iminreduktasen zu generieren, wurden drei β HADs aus dem von Dr. Silvia Fademrecht generierten Sequenzähnlichkeitsnetzwerk^[78,121] ausgewählt, und hinsichtlich ihrer Fähigkeit Imine zu reduzieren untersucht.

4.4.1 Sequenzidentität und Strukturvergleich ausgewählter β HADs

Die in weiteren Versuchen eingesetzten β HADs wurden basierend auf Sequenzidentitäten und dem Vorhandensein von Kristallstrukturen ausgewählt. Die Bestimmung der Sequenzidentitäten erfolgte mittels *EMBOSS Needle*^[125], wobei die Sequenz der Iminreduktase aus *Streptosporangium roseum* (*R-IRED-Sr*) als Referenz genutzt wurde. Mit den β HADs Glyoxylat-Reduktase 1 aus *Arabidopsis thaliana* (β HAD At , pdb|3DOJ) und β -Hydroxybutyrat Dehydrogenase aus *Geobacter metallireducens* (β HAD Gm , pdb|3PEF) wurden zwei Enzyme mit einer Sequenzidentität von 22% ausgewählt. Des Weiteren wurde mit der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *Lactococcus lactis* (β HAD Lal , pdb|2IYP, 14% Sequenzidentität) eine weniger identische Sequenz gewählt. Bei einem Vergleich dieser Sequenzen mit Hilfe des *DALI*^[120] servers konnten mit rmsd-Werten von 2.3 Å (292 C α -Atome), 2.2 Å (287 C α -Atome) und 3.4 Å (469 C α -Atome) neben sequentiellen, ebenfalls strukturelle Ähnlichkeiten der ausgewählten β HADs zur *R-IRED-Sr* detektiert werden. Vergleicht man die in Abbildung 4.15 dargestellten Strukturen fällt ein wesentlicher Unterschied auf. Bei der Ausbildung der katalytisch aktiven Homodimere bildet sich die aktive Tasche in IREDS an der Interaktionsfläche der beiden monomeren Einheiten aus, in β HADs innerhalb eines Monomers (Abbildung 4.15, Vergleich A und B).^[78] Des Weiteren besitzt das ausgewählte Enzym aus *Lactococcus lactis* (β HAD Lal) eine unterschiedliche Quartärstruktur im Vergleich zu β HAD At und β HAD Gm , was auf die zusätzliche, C-terminale Domäne in β HAD Lal (siehe Anhang Abbildung 7.26) zurückzuführen ist.^[126] Die zusätzliche Domäne erstreckt sich durch die helikale C-terminale Domäne des Partner-Monomers^[126], wodurch die Dimerisierung und Ausbildung der Quartärstruktur beeinflusst wird (Abbildung 4.15, Vergleich B und C).

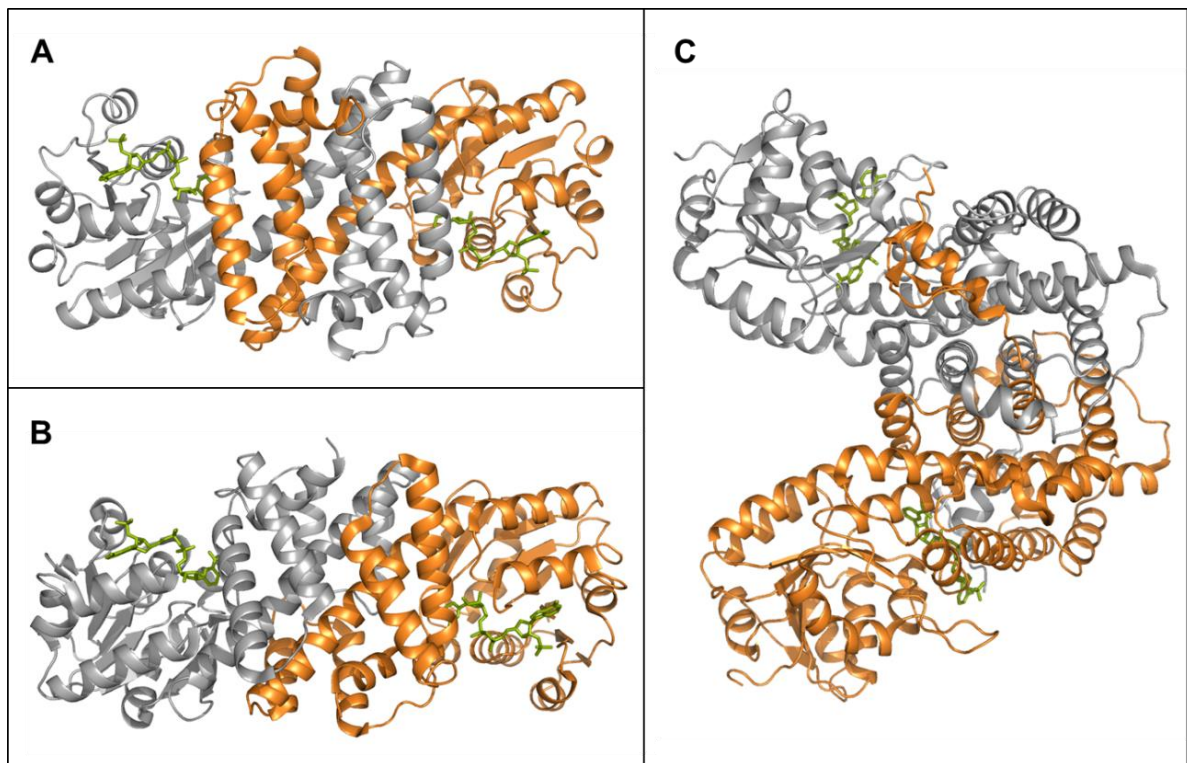


Abbildung 4.15: Vergleich der Dimer-Bildung in *R-IRED-Sr* (A), *betaHADGm* (B) und *betaHADLal* (C). Die monomeren Untereinheiten sind in orange und grau dargestellt, wobei mit Hilfe von NADP⁺ (grün) die Position der aktiven Tasche verdeutlicht wird (übernommen aus Lenz *et al.*, 2018^[119]).

4.4.2 Analyse der aktiven Taschen

Trotz ihrer Sequenz- und Struktur-Ähnlichkeit scheinen IREDs und betaHADs unterschiedliche Mechanismen und Übergangszustände für die asymmetrische Reduktion zu nutzen, was durch ihr unterschiedliches Substratspektrum deutlich wird. Dieser Unterschied muss auf die wenigen Aminosäurereste, die als charakteristisch für die jeweilige Proteinfamilien beschrieben sind, zurückzuführen sein.^[78] In betaHADs sind ein Serin und ein Phenylalanin als verantwortlich für Substraterkennung, -orientierung und -bindung beschrieben.^[123] Für Serin sind hierfür wichtige zwischenmolekulare Wechselwirkungen mit der Carboxyl-Gruppe des natürlichen Substrates beschrieben.^[123,126] Außerdem werden ein Lysin und ein Asparagin als für die Katalyse essentielle Aminosäuren beschrieben.^[123] Asparagin wird aufgrund der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen als Vermittler des für die Katalyse notwendigen Protons von Wasser zu Lysin vermutet.^[123] Im Anschluss agiert Lysin als Protonen-Donor, und überträgt ein Proton auf das entsprechende Substrat.^[123] Anhand der Überlagerung der aktiven Taschen von

β HAD*At* (Abbildung 4.16, **A**) und *R*-IRED-*Sr* (Abbildung 4.16, **B**) wurde eine ähnliche Ausrichtung der Haupt- und Seitenketten festgestellt (Abbildung 4.16).

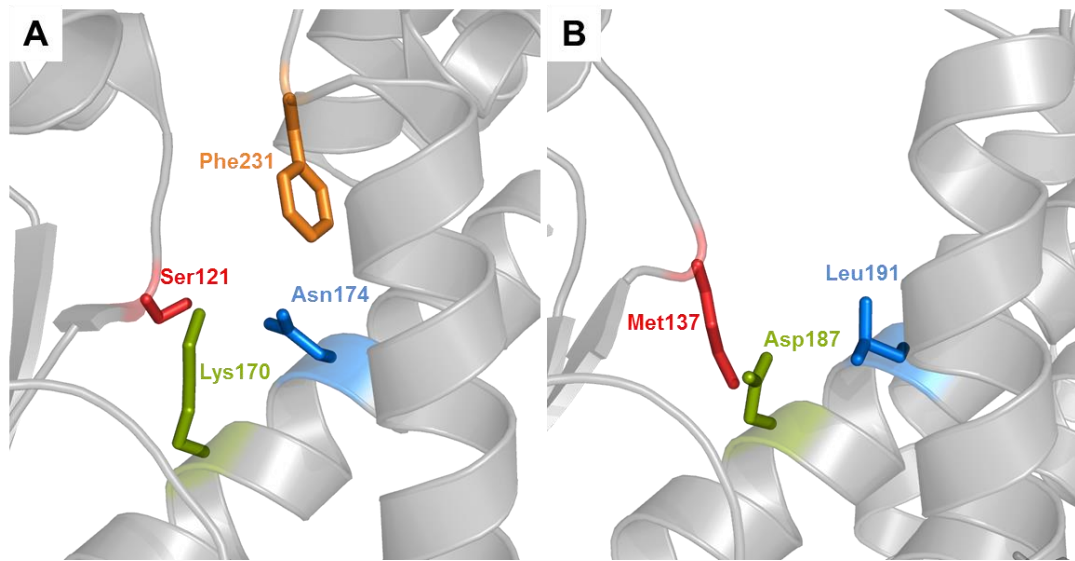


Abbildung 4.16: Vergleich der Substratbindetaschen von β HADs und IREDS. **A.** Für die Katalyse als essentiell beschriebenen Aminosäurereste in β HAD*At*. **B.** Aktive Tasche der *R*-IRED-*Sr* mit den entsprechenden Aminosäureresten aus **A**. Entsprechende Positionen sind in der gleichen Farbe illustriert.

Nach Vergleich der vier beschriebenen Aminosäurereste in β HADs mit den entsprechenden Positionen in *R*-IRED-*Sr* waren deutliche Unterschiede erkennbar (Abbildung 4.16): (i) Die Substratbindetasche von *R*-IRED-*Sr* ist deutlich hydrophober als die von β HAD*At*; (ii) Das für die Substraterkennung wichtige Serin in β HAD*At* ist in *R*-IRED-*Sr* durch ein hydrophobes Methionin ersetzt. Zusätzlich ist das für die Substratpositionierung wichtige Phenylalanin in β HAD*At* nicht vorhanden in *R*-IRED-*Sr*, was einen guten Zugang zur aktiven Tasche zur Folge hat; (iii) In IREDS sind hauptsächlich Asparagin oder Tyrosin, selten aber auch nicht-proteinogene Aminosäuren an der entsprechenden Position des katalytisch aktiven Protonen-Donors Lysin in β HADs vertreten (in *R*-IRED-*Sr*: D187). Die Notwendigkeit einer protonierenden Aminosäure in IREDS ist noch nicht geklärt. Außerdem ist das als Protonen-Vermittler beschriebene Asparagin (N174) in β HAD*At* durch ein hydrophobes Leucin in *R*-IRED-*Sr* ersetzt (generell in IREDS entweder Leucin (81%) oder Methionin (6%) an dieser Position^[78]). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Aminosäurereste K170, N174, S121 und F231 in β HAD*At*, durch die am häufigsten auftretenden Reste in IREDS an den entsprechenden Positionen ausgetauscht. Daraus ergaben sich folgende Varianten: K170D, K170F, K170Y,

Ergebnisse

N174L, S121M, F231A, die mittels ortsgerichteter Mutagenese (QuikChange™-PCR, siehe 3.2.4) generiert wurden. Die selbe Methode wurde für *R*-IRED-*Sr* angewandt, was in drei weiteren Einzelvarianten resultierte: D187K, L191N, M137S (nach IRED Standard-Nummerierung^[78], siehe auch: www.ired.unistuttgart.de). Die Kombination aller genannten Varianten führte zu entsprechenden Doppel- und Dreifachmutanten. Da die Dreifachmutanten jedoch nicht in löslicher Form exprimiert werden konnten, wurden diese nicht weiter charakterisiert.

4.4.3 Neue Imin-reduzierende Enzyme

Um die Rolle der unter 4.4.2 diskutierten Aminosäurereste in der Imin-Reduktion zu verstehen, wurden in einem ersten Schritt alle vorgeschlagenen Mutationen in β HAD*At* aus *Arabidopsis thaliana* eingefügt. Das für das Wildtyp-Enzym codierende Gen wurde bei GeneArt™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE) synthetisiert (siehe Anhang 7.1). Die gewünschten Varianten mit den entsprechenden ein-, zwei- oder dreifach Mutationen wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (QuikChange™-PCR, siehe 3.2.4) generiert. Alle Varianten wurden wie unter 3.3.4.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Co²⁺-Affinitätschromatographie (siehe 3.4.1) gereinigt. Der Austausch des Asparagins an Position 174 resultierte in unlöslichem Protein (siehe Abbildung 4.17 und im Anhang Abbildung 7.27), weshalb keine weitere Charakterisierung dieser Variante möglich war. Die Bedeutung der hohen Konservierung dieser Position in β HADs (immer Asparagin oder Glutamin) für die Katalyse konnte somit nicht weiter untersucht werden, da diese Position zusätzlich entscheiden für eine korrekte und dadurch aktive Faltung des Proteins zu sein scheint. Alle anderen Varianten konnten gut exprimiert werden und zeigten auf dem SDS-PAGE Gel vergleichbare Banden wie die Wildtyp-Enzyme *R*-IRED-*Sr* und β HAD*At* (Abbildung 4.17). Die Imin-reduzierende Aktivität der generierten Varianten, als auch der Wildtyp-Enzyme wurde mit 2MPN als Substrat untersucht. 2MPN war bei bisherigen Untersuchungen eines der am besten akzeptierten Substrate von Iminreduktasen.^[63,67] Nach Austausch des Lysins an Position 170 durch Aspartat oder Phenylalanin, den am häufigst vorkommenden Aminosäuren in *R*-selektiven IREDs an der entsprechenden Position konnte eine bis zu 12-fache Steigerung der Aktivität für 2MPN detektiert werden (Abbildung 4.17). Hingegen konnte keine Veränderung der Aktivität für

2MPN nach Austausch des Serins an Position 121 durch Methionin detektiert werden. Für die Variante β HADAt_S121M konnte eine vergleichbare Aktivität wie für das Wildtyp-Enzym β HADAt detektiert werden (Abbildung 4.17). Das für die Koordination des natürlichen Substrates von β HADs wichtige Serin (vgl. 4.4.2), hat somit keinen Einfluss auf die Substraterkennung, -orientierung und -bindung des Imin-Substrates 2MPN.

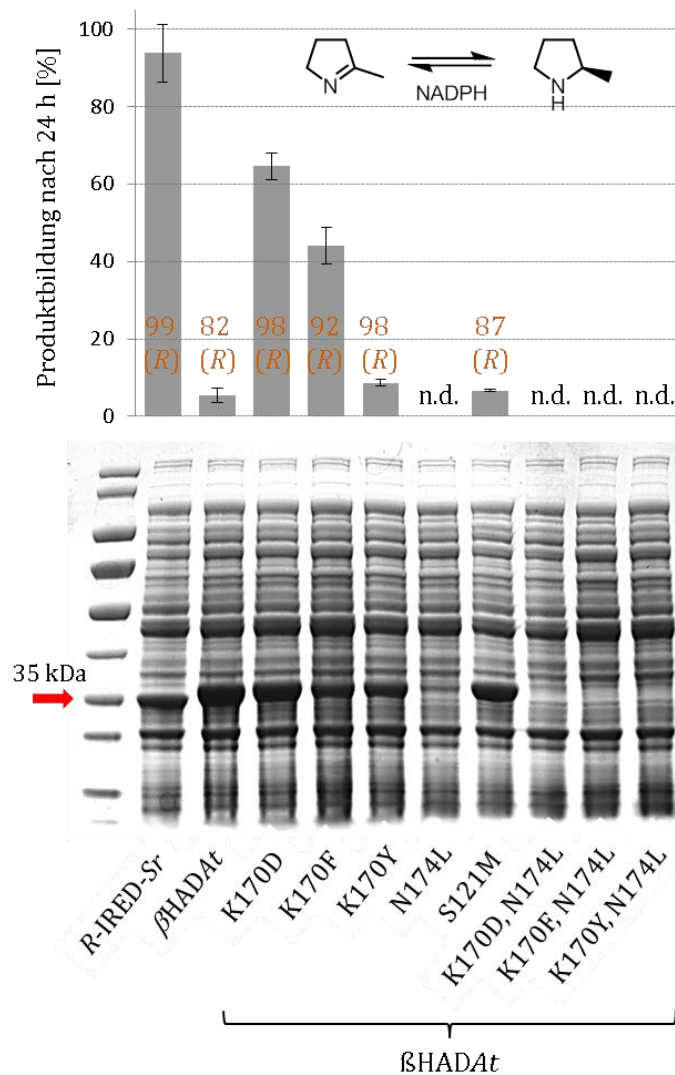


Abbildung 4.17: Expressionslevel und Ergebnisse der Biotransformationen aller erstellten Varianten im Vergleich zu den Wildtyp-Enzymen *R-IREd-Sr* und β HADAt. Biotransformationen wurden in Triplikaten mit 10 mM 2MPN als Substrat durchgeführt. Die Produktbildungen sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Die bestimmten Enantiomerenüberschüsse der Produkte sind in orange dargestellt. Beide Enzyme zeigen eine Größe von ungefähr 33 kDa (*R-IREd-Sr*: 32,6 kDa; β HADAt: 33,0 kDa). Die Größe von 35 kDa ist als Referenz mit einem roten Pfeil auf dem dargestellten SDS-Gel vermerkt. n.d.: nicht detektiert, aufgrund der Expression nicht-löslicher Proteine (übernommen aus Lenz *et. al.*, 2018^[119]).

Ergebnisse

Gleichzeitig wurde für alle erstellten Varianten die Aktivität für das natürliche Substrat überprüft. Als natürliches Substrat wurde basierend auf Literaturdaten Glyoxylsäure gewählt.^[122] Die Aktivität wurde anhand der NADPH-Abnahme bei 340 nm wie unter 3.5.1 beschrieben detektiert. Wie erwartet, konnte für Varianten mit erhöhter Aktivität für das Imin-Substrat 2MPN gleichzeitig eine verringerte Aktivität für Glyoxylsäure detektiert werden (Abbildung 4.18). Mit

70,3 U/mg liegt die Aktivität der Variante S121 im gleichen Bereich wie die Aktivität des Wildtyp-Enzyms, was erneut keinen Einfluss der Position auf die Aktivität des Enzyms bedeutet. Während sich die Iminreduktase-Aktivität für die Varianten $\beta\text{HADAt_K170D}$ und $\beta\text{HADAt_K170F}$ 12- und 8-fach steigerte, verringerte sich die Dehydrogenase-Aktivität 885- und 685-fach. Multipliziert man diese Faktoren, bedeutet dies eine bis zu 8200-fache Änderung der katalytischen Aktivität durch den Austausch von nur einer Aminosäure.

Um die neu generierte Aktivität der βHADAt Varianten für Imine mit Aktivitäten von bisher charakterisierten Iminreduktasen zu vergleichen wurden kinetische Parameter bestimmt. Die Durchführung erfolgte mit 2MPN als Substrat wie unter 3.6 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst, alle Rohdaten und berechneten Näherungen (*Fit*) unter Kapitel 7.6 angehängt (siehe Abbildung 7.23 bis Abbildung 7.25). Anhand der Daten ist erkennbar, dass die katalytische Effizienz der erstellten Varianten im Vergleich zu *R-IRED-Sr* mäßig ist. Die Wechselzahlen (k_{cat}) waren mit $0,42 \text{ min}^{-1}$ und $0,27 \text{ min}^{-1}$ bis zu 215-fach geringer als für *R-IRED-Sr*.

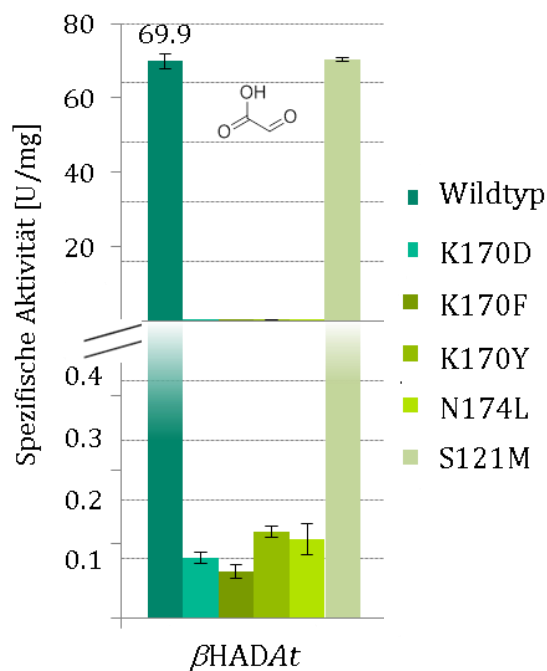


Abbildung 4.18: Aktivität von βHADAt Wildtyp-Enzym und Varianten für das natürliche Substrat Glyoxylsäure. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung dargestellt.

Trotzdem war die Affinität der Varianten für das Imin-Substrat mit K_M -Werten von 1,29 mM und 0,85 mM im selben Bereich, oder sogar besser als für *R*-IRED-*Sr* (1,31 mM).

Tabelle 4.8: Kinetische Daten für die Iminreduktase-Aktivität der Varianten β HADAt_K170D und β HADAt_K170F im Vergleich zu *R*-IRED-*Sr* mit 2-Methylpyrrolin als Modellsubstrat.

Konstante	<i>R</i> -IRED- <i>Sr</i>	β HADAt_K170D	β HADAt_K170F
K_M [mM]	1,31	1,29	0,85
v_{max} [U mg ⁻¹]	1,19	0,014	0,009
k_{cat} [min ⁻¹]	58,56	0,42	0,27
k_{cat}/K_M [min ⁻¹ mM ⁻¹]	44,84	0,32	0,31
K_I [mM]	19,11	28,96	72,93

Für das Wildtyp-Enzym β HADAt wurden aufgrund der geringen Aktivität für 2MPN keine kinetischen Parameter bestimmt. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt, jedoch vor dem *Fitting* mittels Excel gemittelt, weshalb keine Standardabweichungen angegeben sind.

4.4.4 Substratspektrum und Enantioselektivität der neuen Imin-reduzierenden Enzyme

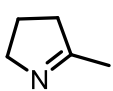
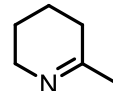
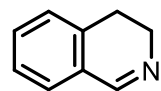
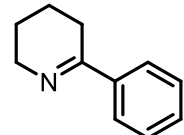
Um die Katalyse der Imin-Reduktion durch die neu generierten Enzyme zu bestätigen, wurde der Umsatz weiterer Substrate getestet. Bei der Zusammenstellung des Substratpanels wurde auf unterschiedliche Größen und den Substituierungsgrad der Imine geachtet. Zusätzlich zu 2MPN wurden 6-Methyl-2,3,4,5,-tetrahydropyridin (6MTHP), 3,4-Dihydroisoquinolin (DHQ) und 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin (6PTHP) untersucht. Biotransformationen wurden wie unter 3.5.2 beschrieben mit 0,5 mg/mL der gereinigten Enzym Varianten durchgeführt und die Produktbildung über GC und HPLC Analytik verfolgt (siehe 3.7.1 und 3.7.2).

Bereits das Wildtyp-Enzym β HADAt zeigte für alle untersuchten Substrate Aktivität mit Produktbildungen bis zu 15% (siehe Tabelle 4.9). Diese Aktivität konnte durch die Aminosäureaustausche K170D oder K170F jedoch deutlich gesteigert werden. Die Varianten β HADAt_K170D und β HADAt_K170F zeigten ähnlich wie für 2MPN eine erhöhte Produktbildung für alle untersuchten Imin-Substrate (siehe Tabelle 4.9), wobei 6PTHP jedoch ein schlechtes Substrat darstellte. Nach Vergrößerung des

Ergebnisse

Substrates von 5 C-Atomen (2MPN) auf 6 C-Atome (6MTHP) konnte eine deutliche Aktivitätssteigerung detektiert werden. Nach 24 h zeigte auch das Wildtyp-Enzym vollständigen Umsatz für 6MTHP. In durchgeführten Kontrollexperimenten mit Hitze-inaktiviertem Enzym oder BSA (siehe 3.5.2) wurden keine entsprechenden Aminprodukte detektiert.

Tabelle 4.9: Produktbildungen [%] und Selektivitäten der β HADAt Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym bei Untersuchung verschiedener Imin-Substrate.

Substrat	Produktbildung nach 24 h [%] / Enantiomerenüberschuss ee [%]			
				
Enzym Variante				
β HADAt	5,6 \pm 1,8 / 82 (R)	15,1* \pm 0,4 / 97 (R)	14,4 \pm 0,1	5,0 \pm 0,5 / n.d.
β HADAt_K170D	64,6 \pm 3,5 / 98 (R)	88,8* \pm 10,6 / >99 (R)	19,6 \pm 0,6	2,9 \pm 0,2 / 34 (S)
β HADAt_K170F	44,1 \pm 4,7 / 92 (R)	94,2* \pm 9,3 / 98 (R)	16,5 \pm 0,3	2,2 \pm 0,1 / 26 (S)
β HADAt_K170D_F231A	55,2 \pm 8,7 / >99 (R)	n.d.	n.d.	40,6 \pm 0,9 / 97 (S)
β HADAt_K170F_F231A	54,8 \pm 1,2 / >99 (R)	n.d.	n.d.	42,0 \pm 2,2 / 97 (S)

* Darstellung der Produktbildungen nach 5 h Inkubationszeiten, um den Unterschied zwischen Wildtyp-Enzym und Varianten zu verdeutlichen, da nach 24 h für alle untersuchten Enzym-Varianten vollständiger Umsatz beobachtet wurde. n.d. nicht detektiert. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung dargestellt.

Aufgrund der beobachteten geringen Aktivität für das sterisch anspruchsvolle Substrat 6PThp, wurde ein weiterer Aminosäureaustausch am Eingang der Substratbindetasche vorgenommen. Phenylalanin an Position 231 (siehe Abbildung 4.16, A) wurde durch Alanin ersetzt. Phenylalanin ist als essentiell für die Substratbindung des natürlichen Substrates Glyoxylsäure beschrieben.^[123] Um


herauszufinden, ob Phenylalanin auch für die Substratbindung von Iminen notwendig ist, oder im Gegenteil, die Bindung des größeren Substrates 6PTHP möglicherweise einschränkt, wurden Biotransformationen mit den Varianten β HADAt_K170D_F231A und β HADAt_K170F_F231A und den Substraten 2MPN und 6PTHP durchgeführt. Nach 24 h Inkubationszeit wurde nach Einsatz von 0,5 mg/mL β HADAt_K170D_F231A rund 60% des Amin-Produktes 2-Methylpyrrolidin gebildet, was im gleichen Bereich wie für die Variante β HADAt_K170D liegt (vgl. Tabelle 4.9). Basierend auf dieser Beobachtung kann eine katalytische Funktion des Phenylalanins an Position 231 für die Imin-Reduktion ausgeschlossen werden. In Biotransformationen mit den Varianten β HADAt_K170D_F231A und β HADAt_K170F_F231A und 6PTHP als Substrat konnte nach 24 h rund 40% Amin-Produkt detektiert werden, was einer 14-fachen Steigerung der Produktbildung im Vergleich zu den Varianten β HADAt_K170D und β HADAt_K170F entspricht (Tabelle 4.9). Aufgrund der Vergrößerung des Zugangs zur Substratbindetasche nach Austausch des Phenylalanins durch Alanin wird ein erleichterter Zugang für 6PTHP vermutet.

Enantiomerenüberschüsse wurden für alle Substrate mittels chiraler GC-Analyse, wie unter 3.7.1.2 beschrieben, bestimmt, wobei für alle Varianten sehr gute bis exzellente Werte detektiert wurden (Tabelle 4.9). Für die durch die Varianten β HADAt_K170D und β HADAt_K170F gebildeten Aminprodukte der Substrate 2MPN und 6MTHP konnten Werte von 92-99% *ee* für das jeweilige *R*-Enantiomer ermittelt werden. Für die gleichen Varianten konnten nur mäßige Selektivitäten von 26-34% *ee* für das Produkt des Substrates 6PTHP detektiert werden. Mit 23% *ee* ist ein ähnlicher Wert für *R*-IRED-*Sr* nach Biotransformationen mit 6PTHP als Substrat beschrieben.^[67] Das Einführen der Mutation F231A führte auffallenderweise nicht nur zu einer Steigerung der Produktbildung bei Einsatz des Substrates 6PTHP, sondern auch zu einer deutlichen Erhöhung der Enantioselektivität. Für das entsprechende Aminprodukt des Substrates 6PTHP konnten mit den Varianten β HADAt_K170D_F231A und β HADAt_K170F_F231A jeweils Werte von 97% *ee* für das *S*-Enantiomer bestimmt werden (Tabelle 4.9). Die Umkehrung der Selektivität im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten ist nicht auf eine tatsächliche Änderung der Substratbindung, sondern auf die unterschiedliche Priorisierung des Benzol-Substituent zurückzuführen.^[67]

4.4.5 *Proof of Concept* – Übertragung des Prinzips auf weitere β HADs

Um die Bedeutung der zuvor diskutierten Aminosäuren für die Katalyse der Imin-Reduktion weiter zu festigen, wurden die Mutationen der besten Varianten in β HADAt auf die Enzyme aus *Geobacter metallireducens* (β HADGm) und *Lactococcus lactis* (β HADLal) übertragen. Die Mutation N174L in β HADAt zeigte negative Auswirkungen auf die korrekte und dadurch aktive Faltung des Proteins (vgl. Abbildung 4.17). Trotzdem wurde aufgrund der beschriebenen dritten Domäne der monomeren Einheit von β HADLal (siehe Anhang Abbildung 7.26 D) und der damit verbundenen unterschiedlichen Quartärstruktur des Enzyms, das entsprechende Asparagin an den Positionen 175 in β HADGm und 188 in β HADLal ausgetauscht. Identisch wie für β HADAt wurden die für die Wildtyp-Enzyme codierenden Gene bei GeneArt™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE) synthetisiert (siehe Anhang 7.1). Die gewünschten Varianten β HADGm_K171D, β HADGm_K171F, β HADGm_N175L, β HADLal_K184D, β HADLal_K184F und β HADLal_N188L wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese (QuikChange™-PCR, siehe 3.2.4) generiert. Alle Varianten wurden wie unter 3.3.4.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Co^{2+} -Affinitätschromatographie (siehe 3.4.1) gereinigt. Wie zuvor für β HADAt beobachtet, führte der Austausch des Asparagins an Position 175 in β HADGm ebenfalls zu unlöslichem Protein (siehe Anhang Abbildung 7.28). Im Vergleich dazu wurde kein Einfluss auf die Löslichkeit von β HADLal nach Einführen der Mutation N188L beobachtet (siehe Anhang Abbildung 7.29), was die Theorie über einen unterschiedlichen Einfluss aufgrund der unterschiedlichen Quartärstruktur stärkt. Jedoch konnte trotz guter Expression der Variante β HADLal_N188L kein Einfluss der Mutation auf die Katalyse beobachtet werden. Nach 24 h Inkubation konnte keine höhere Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp-Enzym ermittelt werden (Tabelle 4.10). Alle anderen Varianten beider Enzyme konnten gut exprimiert werden und zeigten auf dem SDS-PAGE Gel vergleichbare Banden wie die Wildtyp-Enzyme β HADGm und β HADLal (siehe Anhang Abbildung 7.28 und Abbildung 7.29). Unabhängig von Sequenz- und Strukturähnlichkeit der ausgewählten β HADs, zeigten alle untersuchten Enzyme nach Austausch des katalytisch aktiven Lysins durch Aspartat oder Phenylalanin gleiche Tendenzen in der Aktivitätssteigerung für die Imin-Reduktion (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: Vergleich der Reduktion von 2-Methylpyrrolin mit verschiedenen β -Hydroxysäure Dehydrogenasen und entsprechenden Varianten.

Produktbildung nach 24 h [%]			
			
Enzym	β HAD <i>At</i>	β HAD <i>Gm</i>	β HAD <i>Lal</i>
Mutation			
Wildtyp	5,6 \pm 1,8	1,1 \pm 0,4	10,6 \pm 1,1
K \rightarrow D	64,6 \pm 3,5	8,9 \pm 2,3	35,6 \pm 3,2
K \rightarrow F	44,1 \pm 4,7	3,6 \pm 0,5	13,3 \pm 2,5
N \rightarrow L	n.d.	n.d.	4,4 \pm 0,0
K \rightarrow D, N \rightarrow L	n.d.	n.d.	2,3 \pm 0,3
K \rightarrow F, N \rightarrow L	n.d.	n.d.	1,2 \pm 0,0

n.d. nicht detektiert; die in den verschiedenen Enzymen mutierten Positionen waren wie folgt: β HAD*At*: K170, N174; β HAD*Gm*: K171, N175; β HAD*Lal*: K184, N188. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung dargestellt.

Gleichzeitig wurde für alle erstellten Varianten in β HAD*Gm* und β HAD*Lal* die Aktivität für das natürliche Substrat überprüft. Als natürliche Substrate wurden basierend auf Literaturdaten Glyoxylsäure und 6-Phosphogluconat gewählt.^[124,126] Die Aktivität wurde anhand der NADPH-Abnahme bei 340 nm wie unter 3.5.1 beschrieben detektiert. Wie aufgrund der ermittelten Ergebnisse für β HAD*At* erwartet, konnte für alle Varianten eine verringerte Aktivität für das natürliche Substrat detektiert werden (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

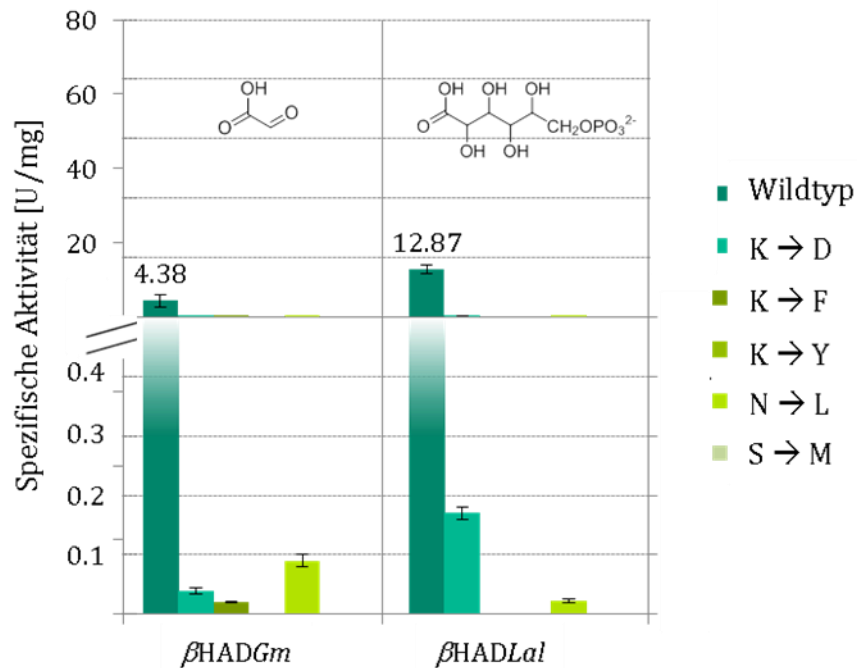


Abbildung 4.19: Aktivität der Wildtyp-Enzym und Varianten von β HADGm und β HADLa1 für die natürlichen Substrate Glyoxylsäure und 6-Phosphogluconat. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung dargestellt.

Um darüber hinaus zu sehen, ob das Prinzip auch umgekehrt anwendbar ist, wurden die in β HADs als wichtig identifizierte Aminosäurereste in *R*-IRED-Sr eingebracht. Daraus resultierende Mutanten wurden mittels QuikChangeTM-PCR (siehe 3.2.4) erstellt, in *E. coli* exprimiert (siehe 3.3.4.1) und mittels Co^{2+} -Affinitätschromatographie (siehe 3.4.1) gereinigt. Nach 24 h-Biotransformationen konnte für alle Mutanten Aktivität, mit einer Produktbildung bis zu 80% detektiert werden (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Durch das inführen des Aminosäurenetzwerkes aus β HADs in *R*-IRED-Sr wurde die Ketosäure-Reduktion durch IREDs ermöglicht. Eine Änderung der katalytischen Aktivität konnte somit auch nach dem umgekehrten Prinzip gezeigt werden.

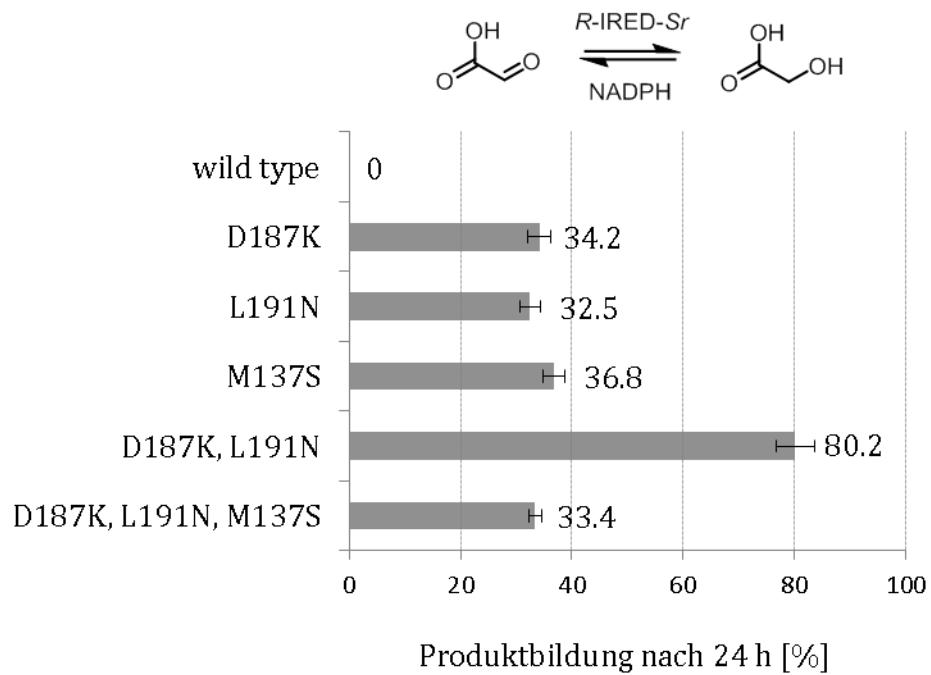


Abbildung 4.20: Produktbildung nach Biotransformationen mit *R-IRED-Sr* Wildtyp-Enzym und Varianten mit Glyoxylsäure als Substrat. Glyoxylsäure wurde als eines der natürlichen Substrate von β HADs gewählt. Alle Versuche wurden als Triplikate durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung dargestellt.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die katalytische Promiskuität von Imin-reduzierenden Enzymen näher untersucht werden. Hierbei konnte das Potenzial von Iminreduktasen (IREDs) in reduktiven Aminierungen aufgezeigt werden und zusätzlich das Reaktionsspektrum um die Reduktion von C=O-Doppelbindungen erweitert werden. Basierend auf der ermittelten promiskuitiven Aktivität für aktivierte Carbonylverbindungen und der beschriebenen Sequenzidentität zur Familie der β -Hydroxysäure Dehydrogenasen (β HADs)^[78] konnte gleichzeitig das Verständnis für Evolution und Mechanismus dieser Enzyme erweitert werden. Die Anwendung eines rationalen *enzyme engineering* Ansatzes resultierte in der Umwandlung von β HADs in Iminreduktasen und somit in der Erweiterung des IRED-Sequenzraumes. Als Startpunkt aller Untersuchungen wurden zwei enantiokomplementäre Enzyme aus *Streptosporangium roseum* (R-IRED-Sr) und *Paenibacillus elgii* (S-IRED-Pe) verwendet.

5.1 Erweiterung des Reaktionsspektrums von Iminreduktasen

5.1.1 Potenzial in der Katalyse von reduktiven Aminierungen

Reduktive Aminierungen werden in der chemischen Synthese häufig durch die geringen Chemo- und Stereoselektivitäten der chemischen Katalysatoren in organischen Lösemitteln beschränkt^[37], weshalb großes industrielles Interesse an hoch selektiven enzymatischen Alternativen besteht. Bisher beschriebene Enzyme für Enzym-katalysierte reduktive Aminierungen sind Amin-Dehydrogenasen (siehe 1.3).^[34] Limitiert sind diese reduktiven Aminierungen durch den Amin-Donor Ammoniak (NH₃), weshalb nur primäre Amine erzeugt werden können.^[34,38] Amin-Dehydrogenasen wurde ausgehend von Aminosäure-Dehydrogenasen evolviert. Inspiriert durch die Synthese von α - und β -Aminosäuren aus den entsprechenden Ketosäuren gelang der erste Durchbruch 2012 von Bommarius und Kollegen, die die Eignung der Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* als Startpunkt für die Entwicklung einer Amin-Dehydrogenase zeigten.^[53] Ein (semi)rationaler *enzyme engineering* Ansatz führte zur Katalyse der asymmetrischen Aminierung verschiedener, nicht-funktionalisierter Ketone wie Cyclohexanon und Acetophenon mit NH₃ als Amin-Donor.^[53] Die Arbeitsgruppe um Francesco Mutti konnte ganz

aktuell das Substratspektrum um eine Vielzahl an strukturell diversen Ketonen und Aldehyden erweitern.^[54] Den ersten Durchbruch hinsichtlich der Enzym-katalysierten Synthese sekundärer und tertiärer Amine erzielten Codexis/Merck (US), die ebenfalls eine Aminosäure-Dehydrogenase, die Opin-Dehydrogenase aus *Arthrobacter* sp. evolvierten.^[84] Durch das Einfügen von bis zu 29 Mutationen über 11 Runden der gerichteten Evolution konnten verschiedene Enzym-Varianten für bestimmte Zielreaktionen generiert werden.^[84] Hierbei konnte für die Substratkombination Cyclohexanon und Butylamin der höchste Umsatz von 51% mit einem Enantiomerenüberschuss von 83% *ee* (*R*) detektiert werden.^[84] Cyclohexanon wurde auch in verschiedenen, zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich IRED-katalysierten reduktiven Aminierungen weiterhin als bestes Carbonyl-Substrat identifiziert.^[127] Während Codexis für jede adressierte Reaktion eine spezielle Enzymvariante evolvieren musste, konnte für Iminreduktasen in der vorliegenden Arbeit eine breitere Anwendbarkeit hinsichtlich Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil gezeigt werden.^[82] Die Arbeitsgruppe um Michael Müller veröffentlichte 2014 die erste von Iminreduktasen katalysierte reduktive Aminierung.^[72] Die Inkubation von 4-Phenyl-2-butanon in Methylammonium-Puffer mit der *S*-selektiven Iminreduktase aus *Streptomyces* sp. GF3546 führte zu einer Produktbildung von 8,8% mit einem Enantiomerenüberschuss von 76% (*S*).^[72] Dies bedeutete eine eindrucksvolle Entwicklung in der Enzym-katalysierten Amin-Synthese, wenngleich das Optimierungspotenzial hinsichtlich Produktbildung und Substratspektrum ebenso aufgezeigt wurde.^[72] Um die Reaktion und damit verbundene limitierende Faktoren besser zu verstehen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Aktivität der Iminreduktasen aus *Streptosporangium roseum* und *Streptomyces turgidiscabies* für reduktive Aminierungen unter Verwendung verschiedener Carbonyl-Akzeptoren und Aminnukleophile untersucht. In Zusammenarbeit mit Dr. Philipp Scheller konnte für das Wildtypenzym der Iminreduktase aus *Streptosporangium roseum* je nach verwendeter Substratkombination eine Produktbildung von bis zu 70% detektiert werden, wobei sich Benzaldehyd und Methylamin als beste Substratkombination herausstellten.^[82] Im Vergleich zu bis dato veröffentlichten Ergebnissen bedeutete dies eine um ca. 60% gesteigerte Produktbildung. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte jedoch die Verwendung unterschiedlicher

Diskussion

Enzyme aus unterschiedlichen Organismen, und gleichzeitig die Wahl eines anderen Substratpanels berücksichtigt werden.^[72,82] Dass die Auswahl des Enzyms, einhergehend mit der Zusammensetzung der aktiven Tasche und die damit verbundene Substratspezifität für eine effektive Katalyse entscheidend ist, konnte in der Zwischenzeit von verschiedenen Gruppen durch weitere Arbeiten zu IRED-katalysierten reduktiven Aminierungen bestätigt werden.^[62,69,87] Entscheidende Unterschiede im Aufbau der aktiven Tasche und der an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste von „sehr guten“ bzw. „weniger geeigneten“ Iminreduktasen für die Katalyse von reduktiven Aminierungen sind bisher jedoch nicht geklärt.^[69,87]

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung nicht nur durch die Auswahl des Enzyms, sondern auch durch die gewählten Reaktionsbedingungen beeinflusst werden kann. Die Optimierung dieser Bedingungen erfolgte hauptsächlich durch die Beeinflussung des Gleichgewichtes der ersten Teilreaktion: der Kondensation von Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil zum entsprechenden Imin-Intermediat (Abbildung 5.1).

durch Optimierung der Reaktionsbedingungen beeinflusst

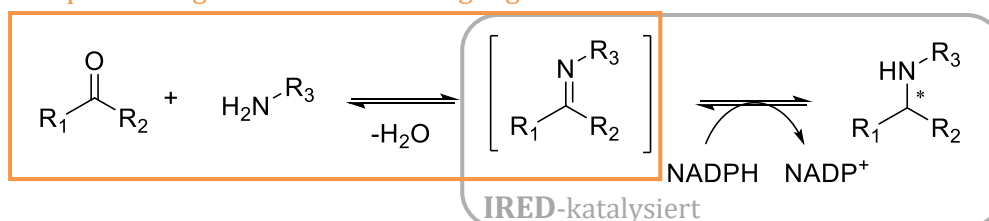


Abbildung 5.1: Prinzip der reduktiven Aminierung bestehend aus zwei Teilreaktion: 1. spontane Kondensation von Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil zum Imin-Intermediat und 2. IRED-katalysierte Reduktion des Imin-Intermediates (modifiziert nach Aleku *et al.*^[69]).

Im Vergleich zu Amin-Dehydrogenasen waren für Iminreduktasen zu diesem Zeitpunkt keine Bindestellen für das gleichzeitige Binden von Carbonyl- und Aminofunktionalitäten beschrieben^[35,127], weshalb alle durchgeführten Arbeiten unter der Annahme erfolgten, dass die Bildung des Imin-Intermediates nicht Enzym-katalysiert, sondern spontan in wässriger Umgebung erfolgt. Basizität und Konzentration des eingesetzten Aminnukleophils, sowie pH-Wert und Reaktionsdauer konnten als Stellschrauben zur Optimierung der finalen Produktbildung identifiziert werden.

Die Verwendung stärkerer Nukleophile (Methylamin>Ammoniumsulfat) führte aufgrund ihrer höheren Reaktivität zu einer stärkeren Iminbildung, was final eine

höhere Produktbildung zur Folge hatte. Die Verwendung von 10 mM Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor mit äquimolaren Mengen Ammoniumsulfat oder Methylamin resultierte nach 24 h Biotransformation in einem Unterschied von rund 45% Amin-Produkt (6% vs. 50%, vergleiche Tabelle 4.4). Gleichzeitig konnte die Iminkondensation durch die Konzentration des Aminnucleophils beeinflusst werden. Die Erhöhung der Konzentration (bis zu 100-fachem Überschuss im Verhältnis zum Carbonyl-Akzeptor getestet) zeigte hierbei vor allem bei Verwendung weniger basischer Amine einen starken Effekt. Der Einsatz von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Ammoniumsulfat bzw. Methylamin resultierte nach 24 h Biotransformation in 61% bzw. 70% Amin-Produkt. Der zuvor bei Einsatz äquimolarer Mengen der Aminnucleophile detektierte deutliche Unterschied in der Produktbildung ist nicht mehr vorhanden (vergleiche Tabelle 4.4). Bei dem reaktiveren Aminnucleophil Methylamin konnte durch die Erhöhung der Nucleophilkonzentration weniger die finale Produktbildung, jedoch die Reaktionsdauer beeinflusst werden. Nach Inkubation von *R*-IRED-*Sr* mit 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin konnte bereits nach 1 h 60% des entsprechenden Amin-Produktes detektiert werden (vergleiche Tabelle 4.4). Die optimale Konzentration des Aminnucleophils muss jedoch abhängig von Substratkombination und Enzym für jede Reaktion individuell bestimmt werden. Codexis (US) setzten bis zu 1.6 M des Aminnucleophils ein.^[84] In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch bei Verwendung von 750 mM oder 1 M Methylamin im Vergleich zu Ergebnissen mit 500 mM des Nucleophils keine weitere Steigerung der Produktbildung detektiert werden (vergleiche Tabelle 4.5). Bei sehr hohen Konzentrationen muss außerdem eine mögliche Inhibierung der Enzyme berücksichtigt werden.

Der Einsatz von 500 mM der entsprechenden Aminnucleophile führte nicht nur aufgrund des 50-fachen Überschusses, sondern gleichzeitig aufgrund der dadurch initiierten Erhöhung des pH-Wertes in den Biotransformations-Ansätzen zur Verschiebung des Gleichgewichtes der Kondensationsreaktion auf Seite des Imin-Intermediates. Die ersten Untersuchungen zu IRED-katalysierten reduktiven Aminierungen wurden zwischen pH 9,2 und pH 9,8 durchgeführt, ohne die dadurch induzierte positive Auswirkung auf die Produktbildung weiter zu analysieren.^[72] Der Zusammenhang zwischen pH-Wert und Konzentration des Imin-Intermediates

Diskussion

wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels NMR-Studien untersucht (vergleiche Abbildung 4.8). Die Inkubation von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin in D₂O resultierte bei pH 7,6 in 4%, bei pH 9,0 in 87% Imin-Produkt (Abbildung 4.8), was unter basischen Bedingungen eine deutliche Verschiebung des Gleichgewichtes der Kondensationsreaktion auf Seite des Imin-Intermediates bedeutete. Bei einer Erhöhung des pH-Wertes in Biotransformationen muss jedoch die Enzymaktivität bei den entsprechenden pH-Werten berücksichtigt werden. Alle am Institut für Technische Biochemie von Dr. Philipp Scheller charakterisierten Iminreduktasen zeigten ein pH-Optimum bei pH 7,0.^[67,89] Die in reduktiven Aminierungen eingesetzte *R*-IRED-*Sr* zeigte bei pH 9,0 eine verbleibende Restaktivität von lediglich 30%.^[67,89] Trotz dessen konnte bei Erhöhung des pH-Wertes von 8,0 auf 9,0 eine um 10% gesteigerte Produktbildung detektiert werden (vergleiche Abbildung 4.7). Diese Tatsache verdeutlicht die Bedeutung der Kondensationsreaktion von Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil im Vergleich zur Enzym-katalysierten Reduktion des Imin-Intermediates. Betrachtet man die Gesamtreaktion stellt die Iminbildung in wässriger Umgebung die größere Herausforderung der beiden Teilreaktionen dar. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes ist aufgrund der drastisch sinkenden Enzymaktivität (10% Restaktivität bei pH 9,5) und der Förderung der reversen Oxidationsreaktion^[59,60,68] jedoch nicht denkbar. Ein weiterer Hinweis dafür, dass die Gesamtreaktion hauptsächlich durch die geringe Bildung bzw. durch die Hydrolyse des Imin-Intermediates in wässrigem Milieu limitiert wird, konnte anhand der durchgeführten NMR-Studien mit Acetophenon als Carbonyl-Akzeptor und Methylamin als Aminnukleophil generiert werden. Hierbei war keine Bestimmung der Iminbildung anhand der mittels NMR detektierten chemischen Verschiebung möglich. Diese Gegebenheit ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf das bei 0,5 mM liegende Detektionslimit der ¹H-NMR zurückzuführen. Nach Inkubation von *R*-IRED-*Sr* mit Acetophenon und Methylamin über 24 h konnten rund 20% des Amin-Produktes detektiert werden (siehe Abbildung 4.7), weshalb geringe Mengen des Imin-Intermediates im Reaktionsgemisch vorhanden sein müssen. Der Umsatz von solch geringen Mengen des Imin-Intermediates verdeutlicht das Potenzial dieser Enzymklasse in der Katalyse von reduktiven Aminierungen. Der direkte Umsatz dieser hochreaktiven, exozyklischen Imin-Intermediate ist vor allem durch die Zusammensetzung der aktiven Tasche (stark hydrophob) und die dynamischen

Konformationsänderungen nach Bindung des NADPH-Cofaktors erklärbar. Die Arbeitsgruppen um Nicholas Turner und Gideon Grogan konnten in einer 2016 veröffentlichten Kristallstruktur der Iminreduktase aus *Amycolatopsis orientalis* erstmals deutliche Unterschiede in der Quartärstruktur des Apoenzyms (ohne Cofaktor) und des Holoenzym (mit Cofaktor) hervorheben.^[76] Die Bindung des Cofaktors initiiert eine Bewegung der monomeren Untereinheiten und verschiedenen *Loop*-Regionen, wodurch im Vergleich zum Apoenzym eine kleinere, „geschlossene“ aktive Tasche entsteht.^[76] Ähnliche dynamische Bewegungen wurden bereits 2004 für das Imin-reduzierende Enzym DHFR (Dihydrofolatreduktase) beschrieben.^[55] In einer solch „geschlossenen“ und gleichzeitig hydrophoben Tasche sind die Hydrolyse-labilen exozyklischen Imin-Intermediate „geschützt“ und können zum entsprechenden Amin reduziert werden. Eine weitere Verschiebung des Gleichgewichtes der Kondensationsreaktion ist durch den Einsatz von biphasischen Systemen denkbar. Hierfür muss jedoch in einem ersten Schritt eine Optimierung der Stabilität dieser Enzyme erfolgen. Erste Arbeiten zur Generierung von robusteren Iminreduktasen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (siehe 4.2.4), sind jedoch noch weiter auszubauen und zu validieren. Alternativ wäre die Identifizierung von natürlicherweise robusten Enzymen aus extremophilen Organismen möglich. Eine Katalyse in rein organischem Lösemittel und dadurch eine vollständige Eliminierung von H₂O stellt aufgrund der NADPH-Abhängigkeit von IREDs keine Option dar. Der Einsatz von 100% Lösemittel könnte nur unter Verwendung von bereits beschriebenen, nicht-natürlichen NAD-*Mimics* erfolgen.^[128]

Das Potenzial dieser Enzymklasse in der Katalyse von reduktiven Aminierungen erkennend arbeiteten in den letzten Jahren weitere Gruppe mit Nachdruck an der Generierung eines größeren Verständnisses dieser Reaktion.^[45,62,69,85-87] Hierbei konnte das Substratspektrum um eine große Anzahl chemisch und strukturell vielfältiger aliphatischer, zyklischer, aromatischer, sowie substituierter Aldehyde, Ketone und Aminnukleophile erweitert werden. Außerdem konnte das synthetische Potenzial durch effiziente Biotransformationen in präparativem Maßstab untermauert werden.^[45,62,85,87] Den wegweisendsten Beitrag lieferte die Arbeitsgruppe von Nicholas Turner, welche eine als „reduktive Aminase“ beschriebene Iminreduktase aus *Aspergillus oryzae* (*AspRedAm*) identifizierten und

Diskussion

charakterisierten.^[69] Für dieses Enzym wurde die bisher beschriebene Abhängigkeit der Produktbildung von der Kondensation des Imin-Intermediates nicht detektiert.^[69] Je nach Substratkombination konnten Carbonyl-Akzeptor und Aminnukleophil im Verhältnis 1:1 eingesetzt werden, ohne dass ein anderes Ergebnis als bei Einsatz eines 50-fachen Überschusses des Aminnukleophils erzielt wurde.^[69] Zusätzlich lieferten Biotransformationen bei pH 7,0 gleiche Produktbildungen wie bei pH 9,0.^[69] Der Unterschied wird von Aleku *et al.* auf mechanistischer Basis erklärt: für *AspRedAm* wird die Katalyse beider Teilreaktionen postuliert. Die Idee, dass sowohl Kondensation von Carbonylverbindung und Aminnukleophil, als auch die anschließende Reduktion des Imin-Intermediates in der aktiven Tasche des Enzyms stattfindet erklärt die beobachteten Aktivitätsunterschiede zu anderen bisher beschriebenen IREDs.^[69] Diese Hypothese wird durch die Bestimmung kinetischer Daten und Untersuchungen zur Produktinhibierung gestützt.^[69] Das vorgeschlagene Prinzip von Substratbindung und Freisetzung des Produktes ist in Abbildung 5.2 veranschaulicht. Basierend auf diesem Prinzip identifizierte die Arbeitsgruppe von Nicholas Turner in Kooperation mit Pfizer (Worldwide Research and Development, Connecticut, US) weitere 45 putativen „reduktive Aminasen“.^[87] Beim Einsatz dieser Enzyme sollten die während der Arbeit durchgeführten Optimierungen der Reaktionsbedingungen keinen Einfluss auf die finale Produktbildung haben. Trotz dieser neu aufgestellten Theorie konnten Aleku *et al.* jedoch nicht alle Substratkombinationen in einem äquimolaren Verhältnis einsetzen.^[69] Genaue Details über die Bindung der Carbonyl- und Aminofunktion (Größe der „Bindetaschen“ und beteiligte Aminosäuren) wären für eine genaue Interpretation der Ergebnisse hilfreich. Die immer noch für manche Substratkombinationen beschriebene Notwendigkeit eines 50-fachen Überschusses des Aminnukleophils lässt weiterhin für manche Substrate eine spontane Iminbildung in wässrigem Milieu vermuten. Für eine eindeutige Trennung von Iminreduktasen und „reduktiven Aminasen“ sind weitere strukturelle und mechanistische Untersuchungen hinsichtlich Bindung, Stabilisierung und Katalyse notwendig. Ebenso würden Details über die natürliche Funktion dieser Enzyme und mögliche Unterschiede in diesen Funktionen zu einem detaillierteren Verständnis der Unterschiede beitragen.

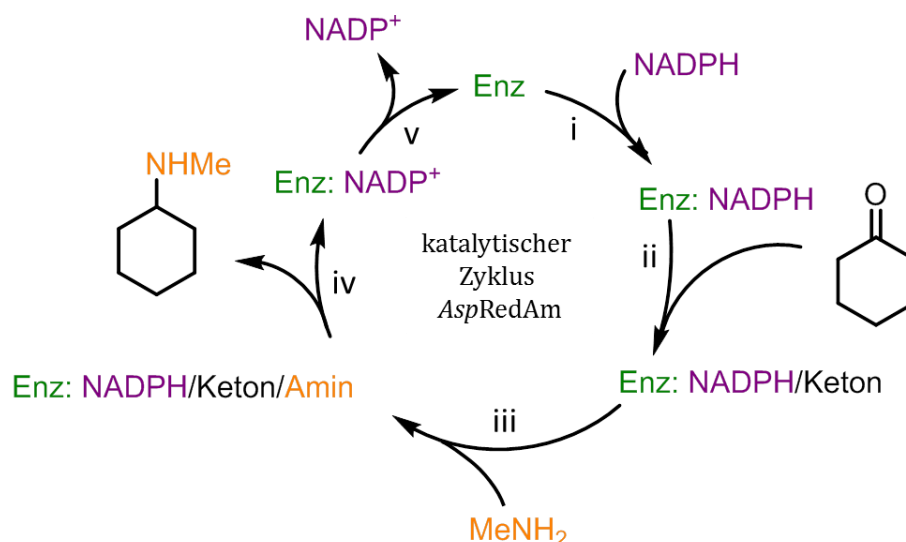


Abbildung 5.2: Modell der AspRedAm-katalysierten reduktiven Aminierung von Cyclohexanon und Methylamin. Die einzelnen Schritte von Cofaktor- und Substratbindung, sowie Freisetzung von Produkt und Cofaktor wurden basierend auf kinetischen Daten und Inhibierungsstudien postuliert: (i) Binden des Cofaktors in der N-terminalen Domäne (*Rossmann-fold*), (ii) Bindung des Carbonyl-Akzeptors, (iii) Bindung des Aminnukleophils, (iv) Katalyse der Iminbildung, anschließende Reduktion und Freisetzung des Produktes, (v) Freisetzung von NADP⁺ (modifiziert nach Aleku *et al.*^[69]).

5.1.2 Unterschied in der Katalyse von C=N und C=O Bindungen

Beim Erstellen der Iminreduktase-Datenbank (<http://www.ired.unistuttgart.de>) wurde festgestellt, dass alle als Iminreduktasen vorgeschlagenen Enzyme bereits als Dehydrogenasen (Hydroxyisobutyrat-, Hydroxysäure-, Glycerol-3-Phosphat- oder 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen) annotiert sind.^[66] Eine Aktivität dieser putativen Iminreduktasen für die annotierten Substrate konnte jedoch nicht detektiert werden.^[66] Auch Untersuchungen mit anderen Carbonyl-Substraten wie Cyclohexanon und Tetralon führten zu keiner Bildung des entsprechenden Alkohol-Produktes.^[63] In während der Arbeit durchgeführten reduktiven Aminierungen mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor wurde Benzylalkohol als Nebenprodukt detektiert. Diese vermutliche Dehydrogenase-Aktivität von IREDs wurde jedoch zuerst auf sich in der Enzympräparation befindende *E. coli*-Dehydrogenasen zurückgeführt.^[89] Auf Basis dieser Beobachtungen wurden für Versuche hinsichtlich der Promiskuität und damit verbunden dem Reaktionsspektrum von Iminreduktasen jedoch auch Carbonyl-Substrate berücksichtigt. Bei der Auswahl dieser wurde das Benzaldehyd-Grundgerüst mit verschiedenen Substituenten in α -Position zur C=O-Funktion, die unterschiedliche $-I$ -Effekte zeigen, modifiziert. Für

Diskussion

zwei enantiokomplementäre Iminreduktasen aus *Streptosporangium roseum* (*R*-IRED-*Sr*) und *Paenibacillus elgii* (*S*-IRED-*Pe*) konnte eine deutliche Aktivität für das Carbonyl-Substrat 2,2,2-Trifluoroacetophenon (ACECF₃) detektiert werden. Durch die Herstellung einer hochreinen Enzympräparation (> 95% Reinheit durch die Entwicklung eines zweistufigen Reinigungsprozess, siehe 4.1.2) und der Validierung der Ergebnisse durch Biotransformationen mit *in vitro* exprimiertem Enzym kann die Katalyse der Reduktion eindeutig auf die Iminreduktase zurückgeführt werden. Basierend auf diesen Tatsachen resultierte die Frage nach dem Unterschied dieser beiden Enzymklassen: was unterscheidet Iminreduktasen von Dehydrogenasen?

Die Inkubation von *R*-IRED-*Sr* mit ACECF₃ resultierte in 57,4% des Alkohol-Produktes 2,2,2-Trifluorophenylethanol mit einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von 96% *ee* (*S*). Für *S*-IRED-*Pe* konnten 23,8% des Produktes, mit ebenfalls einem hohen Enantiomerenüberschuss von 87% *ee* (*S*) detektiert werden. Der Unterschied in der Produktbildung ist auf die generell geringere Aktivität aller bisher charakterisierten *S*-selektiven Iminreduktasen zurückzuführen (*S*-IRED-*Pe* zeigt unabhängig vom Substrat nur ca. 10% der Aktivität von *R*-IRED-*Sr* und *R*-IRED-*St*^[89]). Auffällig hierbei war, dass von beiden, enantiokomplementären IREDs das *S*-Enantiomer des Alkohols gebildet wurde. Dies lässt eine unterschiedliche Bindung der Carbonylverbindung (gleich in beiden Enzymen) im Vergleich zu den bis dato getesteten Imin-Substraten vermuten. Neben 2,2,2-Trifluoroacetophenon wurden die Aktivitäten für die Substrate Acetophenon und Benzoylcyanid getestet, wobei für beide Substrate keine Aktivität detektiert werden konnte. Bei Benzoylcyanid kann eine mögliche Erklärung hierfür eine nicht-produktive Bindung aufgrund der Größe der Cyano-Gruppe sein. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Acetophenon (CH₃-Gruppe in α -Position zu C=O Bindung) und 2,2,2-Trifluoroacetophenon (CF₃-Gruppe in α -Position zu C=O Bindung) kaum in ihrer Größe. Der Unterschied in der Katalyse dieser beiden Substrate wird auf den -I-Effekt der CF₃-Gruppe, und die damit verbundene unterschiedliche Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffes zurückgeführt. Um diese Aussage experimentell zu validieren wurden mit Hilfe von Jan Meisner und Prof. Johannes Kästner vom Institut für Theoretische Chemie der Universität Stuttgart Energiebarrieren für den theoretischen Hydrid-Transfer von NADPH zu den

entsprechenden Substraten berechnet (siehe Abbildung 4.12). Wie erwartet, war die Energiebarriere von 66,4 kJ/mol für ACECF₃ nur ca. halb so hoch wie für Acetophenon (112,6 kJ/mol, vergleiche Tabelle 4.7). Neben den untersuchten Carbonylverbindungen wurden zusätzlich Energiebarrieren für klassische, als IRED-Modellsubstrate definierte Imine und deren Iminiumionen berechnet. Vergleicht man alle Ergebnisse wird deutlich, dass die Energiebarriere von ACECF₃ im Bereich der Energiebarrieren der Iminiumionen der ausgewählten Modellimine liegt (siehe Tabelle 4.7). Die theoretisch berechneten Energiebarrieren für die entsprechenden Imine liegen zwischen 152 und 175 kJ/mol und sind damit fast drei Mal so hoch wie für die entsprechenden Iminiumionen (vergleiche Tabelle 4.7). Diese Beobachtung stimmt mit vorherigen Arbeiten von Herbert Mayr und Kollegen überein, die den elektrophilen Charakter und die damit verbundene höhere Aktivität von Iminiumionen im Vergleich zu substituierten Iminen beschreiben.^[129] Ebenso einhergehend mit dieser Beobachtung sind die in vorherigen Arbeiten ermittelten höheren Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener Iminreduktasen bei Einsatz von Iminiumsalzen im Vergleich zu Imin-Substraten.^[63,75]

Diese Ergebnisse unterstützen die publizierte Hypothese über den Mechanismus von Iminreduktasen, welcher sich an der klassischen Säure-Basen-Katalyse von Dehydrogenasen orientiert (siehe 1.4.1, Abbildung 1.7). NAD(P)H wird als Hydrid-Donor beschrieben, wobei die Herkunft des Protons stark diskutiert wird.^[57] Hier werden einerseits Aminosäurereste als protonenlieferende Quelle genannt, wobei die dafür postulierten Positionen in der IRED-Enzymfamilie nicht konserviert vorliegen. Andererseits ist ebenso denkbar, dass H₂O als Brønsted-Lowry-Säure fungiert und das entsprechende Proton über ein definiertes Aminosäurenetzwerk zum N-Atom geleitet wird („*proton relay network*“).^[68] Als dritte Möglichkeit wird spekuliert, ob die eingesetzten Imin-Substrate bei dem für die Biotransformationen verwendeten pH-Wert von 7,0 bereits protoniert vorliegen. Hiergegen spricht jedoch, dass die während dieser Arbeit durchgeführten reduktiven Aminierungen nach Optimierung bei pH 9,0 durchgeführt wurden, bei welchem keine Protonierung der Imine in Lösung stattfinden sollte. Wahrscheinlicher ist daher, dass die Protonierung als Teil der Katalyse innerhalb der aktiven Tasche stattfindet. Aufgrund der theoretischen Berechnungen wird außerdem deutlich, dass die Protonierung und dadurch Aktivierung des Imins vor oder simultan mit dem

Diskussion

Hydrid-Transfer stattfinden muss. Die Protonierung sorgt für die Verringerung der Energiebarriere, was den nötigen Hydrid-Transfer ermöglicht. Eine umgekehrte Reihenfolge: Hydrid-Transfer vor Protonierung ist aufgrund der hohen Energiebarrieren und der schwierigen Stabilisierung des dabei entstehenden stark basischen Amid-Intermediates unwahrscheinlich.^[35]

Im Gegensatz zu Iminreduktasen ist der Mechanismus von Dehydrogenasen für eine Vielzahl an Vertretern dieser Superfamilie im Detail beschrieben. Für die meisten Dehydrogenasen ist eine klassische Säuren-Basen-Katalyse, wie in Abbildung 5.3 beispielhaft durch den Mechanismus der 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (A) und der Hydroxyglutarat-Dehydrogenasen (B) veranschaulicht, beschrieben.^[130-134] Im Fall der 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenasen (Abbildung 5.3, A) fungiert Tyrosin als katalytische Säure/Base, während Lysin und Asparaginsäurereste Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken zur Verringerung des pK_s-Wertes der Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins ausbilden.^[133] Diese Erhöhung der Säurestärke des Tyrosins ermöglicht den Protonen-Transfer.^[133] Für 2-Hydroxyglutarat Dehydrogenasen (Abbildung 5.3, B) sind verschiedene Argininreste für Substratbindung und Aktivierung beschrieben.^[132] Die Aminosäure Histidin fungiert als katalytische Säure/Base, wobei das Proton im Zusammenspiel mit Glutaminsäure an Position 264 übertragen wird (*proton relay*).^[132] Neben Tyrosin und Histidin wird häufig Lysin als die protonenliefernde Aminosäure in Dehydrogenasen beschrieben.^[123,130] Außerdem werden häufig Metallionen wie Zink (Zn²⁺) und leicht saure pH-Werte als notwendig für die Aktivierung der Carbonyl-Funktion beschrieben.^[131,133] Vergleicht man diese Möglichkeiten der Aktivierung der Carbonyl-Funktion in Dehydrogenasen mit den potenziellen Aktivierungsmöglichkeiten in Iminreduktasen werden direkte Unterschiede deutlich. Weder eine strikt als Protonen-Donor definierte Aminosäure, noch in der aktiven Tasche koordinierte Zink-Ionen wurden in Iminreduktasen bisher gefunden.

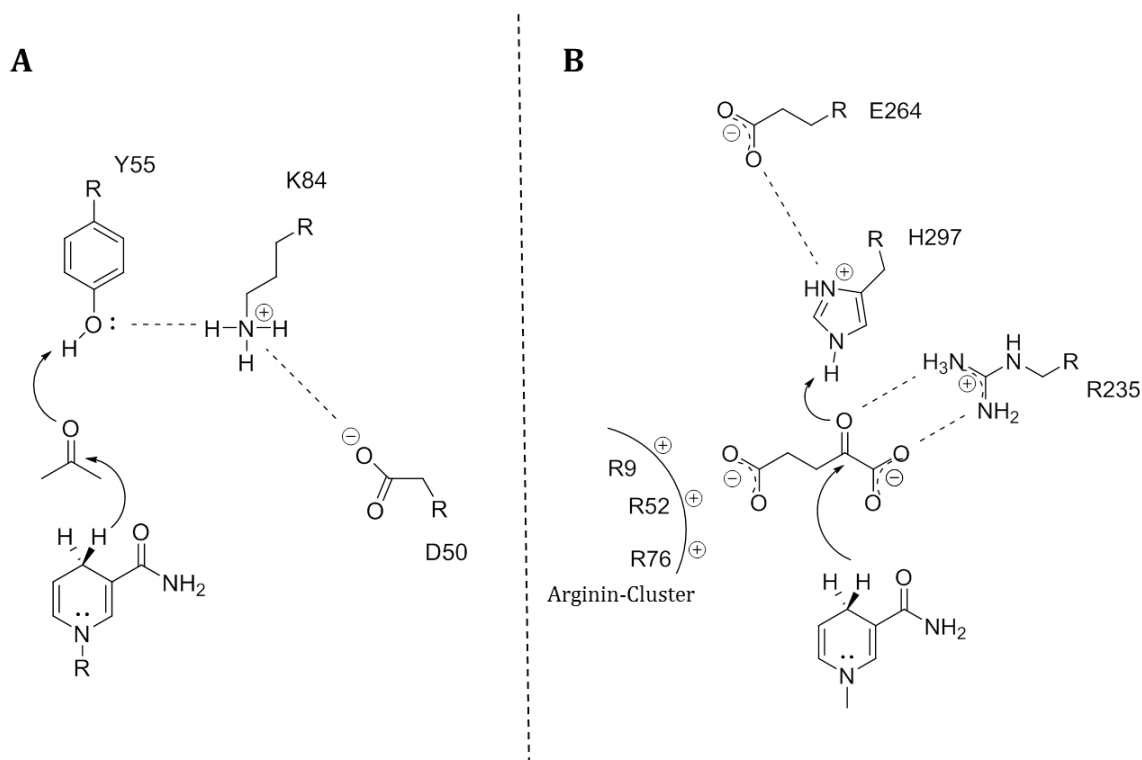


Abbildung 5.3: Beispiele zur Erläuterung des Prinzips der von Dehydrogenasen genutzten Säure-Basen-Katalyse. **A.** Mechanismus der 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase nach Schlegel *et al.*^[133] **B.** Mechanismus der 2-Hydroxyglutarat Dehydrogenase nach Matsuda *et al.*^[132]

Bei Carbonylverbindungen scheint die Aufgabe der Iminreduktase allein in der Koordination und Bindung des Substrates in nächster Nähe zum Hydrid-übertragenden NADPH-Cofaktor zu liegen. Diese Möglichkeit würde die Tatsache erklären, dass nur sehr reaktive Carbonylverbindungen, bei denen keine zusätzliche Aktivierung des Sauerstoffatoms notwendig ist, umgesetzt werden können. In diesem Fall wäre die funktionelle Gruppe in α -Position zur Carbonyl-Funktion entscheidender als die Zusammensetzung der aktiven Tasche des Enzyms. Bereits in vorherigen Studien mit unterschiedlichen Dehydrogenasen wurde gezeigt, dass elektronenziehende Substituenten die Reduktionsgeschwindigkeit positiv beeinflussen.^[135–137] Zusätzlich wurde durch die Aufklärung der Kristallstruktur der R-IRED-Sr als ternärer Komplex mit NADP⁺ und 2,2,2-Trifluoroacetophenon die Hypothese unterstützt, dass auch die Bindung des Carbonyl-Substrates in Nähe zum Cofaktor für eine erfolgreiche Katalyse entscheidend ist. Aufgrund der geringen Distanz zwischen der CF₃-Gruppe des Substrates und der 1-Hydroxyl-Gruppe der NADPH-Riboseeinheit sind intermolekulare Wechselwirkungen, die die produktive Bindung beeinflussen, wahrscheinlich (vergleiche Abbildung 4.14). Der

offensichtliche Unterschied in der Protonierungs- und Aktivierungsstrategie von Iminreduktasen (C=N) und Dehydrogenasen (C=O) wird des Weiteren durch aktuelle Arbeiten von Roth *et al.* verdeutlicht. Die Arbeitsgruppe konnte für eine Vielzahl an Glucose-Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Organismen eine promiskuitive Aktivität für Iminiumionen detektieren.^[138] Auffallend ist die Tatsache, dass nur Aktivitäten für Iminiumionen, jedoch nicht für die entsprechenden Imine beschrieben wurden.^[138] Die Notwendigkeit des direkten Einsatzes von bereits protonierten Iminium-Substraten für eine erfolgreiche Katalyse fundiert die Hypothese über unterschiedliche Protonierungs-Mechanismen in Dehydrogenasen und Iminreduktasen. Die Realisierung einer IRED-Kristallstruktur als ternärer Komplex mit einem Imin-Substrat würde zur Erklärung der identifizierten Unterschiede beitragen. Eine darauf aufbauende Strategie des rationalen Proteindesigns könnte zur Erweiterung und Verfeinerung der promiskuitiven Aktivität von IREDs für Carbonylverbindungen genutzt werden. Durch das gleichzeitige Beibehalten der Imin-reduzierenden Aktivität könnte eine Reduktase-Familie mit diversem Substrat- und Reaktionsspektrum (Reduktion von C=O- und C=N-Bindungen) generiert werden. Idealerweise könnten Mitglieder dieser Reduktase-Familie neben den bisher untersuchten Funktionalitäten auch C=S-Bindungen oder substituierte Verbindungen wie Oxime reduzieren. Im Fall einer Reduktase-Familie wäre dann eine sequentielle Steuerung der gewünschten Chemo Selektivität, z. B. über die vorliegenden Reaktionsbedingungen wünschenswert.

5.2 Erweiterung des IRED-Sequenzraums mittels *enzyme redesign*

Chirale Amine sind Bausteine von 40% aller genehmigten Pharmazeutika.^[36] Neben der Pharmaindustrie spielen sie in weiteren Industriesektoren bei der Synthese von Fein- und Agrochemikalien eine wichtige Rolle.^[34] Aus diesem Grund besteht großes Interesse an effizienten Methoden für die Synthese dieser Substanzen. Die erst kürzlich entdeckte Enzymfamilie der Iminreduktasen (IREDs) stellt hierbei eine biokatalytische Alternative zur klassischen Chemie dar (siehe 1.3). Ein detailliertes Verständnis hinsichtlich Evolution und Mechanismus dieser Enzyme konnte bisher noch nicht generiert werden. Fortschritte in diese Richtung könnten durch die

Ermöglichung des rationalen *enzyme engineering*s zur Erweiterung und Optimierung des synthetischen Potenzials dieser Enzyme führen.

In am Institut für Technische Biochemie von Dr. Silvia Fademrecht durchgeführten Sequenzanalysen wurden β -Hydroxysäure Dehydrogenasen (β HADs) als homologe Proteinfamilie zu IREDS identifiziert.^[78] Homologe Proteine zeichnen sich durch ähnliche Aminosäuresequenzen, ähnliche Strukturen und der Katalyse von vergleichbaren Reaktionen aus. Das basierend auf Sequenzvergleichen (BLAST) und anschließenden Clusteranalysen (USEARCH) erstellte Sequenzähnlichkeitsnetzwerk von IREDS und β HADs ist in Abbildung 5.4 dargestellt.^[78]

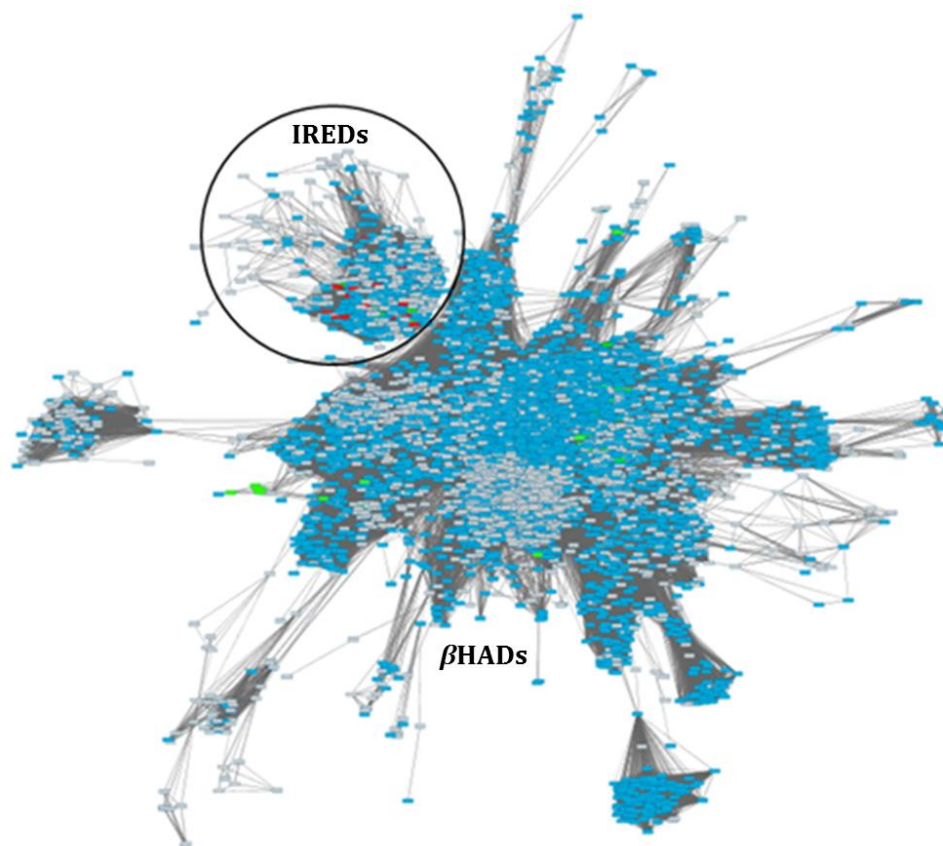


Abbildung 5.4: Sequenzähnlichkeitsnetzwerk von IREDS und verwandten Proteinen. Abgebildet sind 6767 repräsentative Sequenzen (Knoten), wobei jede der verbundenen Kanten eine Sequenzidentität von mindestens 35% bezeichnet. Alle zum Zeitpunkt der Erstellung des Netzwerkes charakterisierten IREDS sind in rot dargestellt und befinden sich in einem eigenen Subcluster (Kreis). Blau: laut GenBank annotierte β -Hydroxysäure Dehydrogenasen (β HADs). Grün: laut GenBank Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenasen oder α HADs. Grau: bei GenBank mit unspezifischen Namen wie Oxidoreduktase oder Dehydrogenase angegeben (modifiziert nach Fademrecht *et al.*^[78,121]).

Mit den während der Arbeit ermittelten Ergebnissen zur promiskuitiven Aktivität von IREDS für aktivierte Carbonylverbindungen wurden sowohl Ähnlichkeiten, als

Diskussion

auch Unterschiede in Substratbindung und Katalyse von IREDs und Dehydrogenasen deutlich (siehe 5.1.2). Basierend auf diesen Ergebnissen und der Tatsache, dass homologen Proteinfamilien häufig genutzt werden um die Funktionsweise neu entdeckter Proteine zu verstehen, erfolgte ein genauer Vergleich von Iminreduktasen und β HADs.

β HADs, zu deren Mitgliedern 3-Hydroxyisobutyrat Dehydrogenasen, Tartronat-Semialdehyd Dehydrogenasen und 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen gehören sind bekannte, gut charakterisierte Enzyme, die typischerweise die Oxidation/Reduktion von C_3 -Substraten katalysieren.^[123,139] Für die Enzymfamilie der β HADs ist mit der Katalyse von C_2 - bis C_6 -, sowie Phosphatgruppen enthaltenden Keto- und Hydroxycarbonsäuren jedoch eine sehr geringe Substratspezifität beschrieben.^[122,124,126,139] Beispielhaft sind die im Rahmen der Arbeit untersuchten Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* und *Geobacter metallireducens* für die Reduktion von Glyoxylsäure und 4-Oxobutansäure, C_2 - und C_4 -Substrate anstelle eines C_3 -Substrates, charakterisiert.^[122,124] Dieses bereits diverse Spektrum an funktionellen Gruppen, für welche eine gute Aktivität von β -Hydroxysäure Dehydrogenasen publiziert ist, konnte in der vorliegenden Arbeit um die enantioselektive Reduktion von Iminen erweitert werden. Für alle untersuchten β HADs konnte unter Beibehaltung der katalytischen Maschinerie (Lysin als Protonen- und NAD(P)H als Hydrid-Donor^[139]) bereits eine gewisse Aktivität der Wildtypenzyme für verschiedene Imin-Substrate detektiert werden (siehe Tabelle 4.10).

Eine Übersicht der Ergebnisse der durchgeführten Mutationsstudien ist in Tabelle 5.1 dargestellt. Ein genauer Vergleich der aktiven Taschen von IREDs und β HADs zeigte, dass das in β HADs als Protonen-Donor beschriebene Lysin in IREDs nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 4.16). Der Austausch von Lysin durch die in IREDs an dieser Position am häufigsten vorkommenden Aminosäuren (Asparaginsäure, Phenylalanin und Tyrosin) resultierte für die Varianten K170D und K170F in einer deutlich gesteigerten Bildung des Amin-Produktes (vergleiche Abbildung 4.17 und Tabelle 4.10). Zusätzlich führte das Einbringen des in β HADs beschriebenen katalytisch aktiven Lysins in *R*-IRED-*Sr* zu einer guten Aktivität der IRED-Variante in der Reduktion von Glyoxylsäure (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Diese Ergebnisse bestätigen den angenommenen, unter 5.1.2

erläuterten Unterschied in der Protonierungsstrategie von IREDs und Dehydrogenasen.

Tabelle 5.1: Vergleich der Carbonyl- und Iminreduktions-Aktivität von β HADat und R-IRED-Sr und Varianten davon.

adressierte Aminosäureposition	beschriebene Funktion in der natürlichen Reaktion	durchgeführter Aminosäureaustausch	C=O-Reduktion	C=N-Reduktion
βHADat				
Wildtyp		-	+++	+
S121	Substratbindung	S121M	+++	+
K170	Protonen-Donor	K170D	+	++
K170	Protonen-Donor	K170F	+	++
N174	Substratbindung	N174L	n.d.*	n.d.*
F231	Substratbindung	F231A	+	++**
R-IRED-Sr				
Wildtyp		-	-	+++
M137	n.b., konserviert (77% M)	M137S	+	+++
D187	diskutiert als Protonen-Donor	D187K	++	+
L191	n.b., konserviert (81% L)	L191N	++	++

- keine Aktivität; + schwache, promiskuitivte Aktivität; ++ gute Aktivität; +++ sehr gute Aktivität, vergleichbar mit Wildtyp-Aktivität für die natürliche Reaktion; n.d. nicht detektiert; *Expression und Reinigung der Enzym-Variante in löslicher Form nicht möglich; **gleichzeitige Erhöhung der Enantioselektivität; n.b. nicht beschrieben

Neben Lysin wurden nach Sequenz- und Strukturvergleiche der aktiven Taschen von R-IRED-Sr und β HADat drei weitere Aminosäurereste als potenziell entscheidend für die Unterschiede in Substratbindung und Protonierung identifiziert (vergleiche Abbildung 4.16). Ortsgerichtete Mutagenese von zwei dieser insgesamt vier identifizierten Reste in β HADs führte zur Erhöhung der Aktivität für verschiedene Imin-Substrate und zur Verbesserung der Enantioselektivität. Die 12-fache Steigerung der Imin-reduzierenden Aktivität von β HADs nach Austausch von Lysin durch Asparaginsäure bestärkt die Rolle dieser Position in Substraterkennung und -orientierung, in enger Verbindung mit einer Aktivierung von C=N-Bindungen. Die Aktivitätssteigerung und Erhöhung der Enantioselektivität für das sterisch anspruchsvolle Imin-Substrat 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin nach Substitution

des Phenylalanins an Position 231 wird auf die Vergrößerung des Zugangs zur Substratbindetasche zurückgeführt. Phenylalanin ist für verschiedene Mitglieder der Enzymfamilie der β -Hydroxysäure Dehydrogenasen, als auch für anderen Enzyme wie zum Beispiel der Iridoid-Synthase (Synthese von sekundären Pflanzenstoffen) als „Substrathalter“ für verschiedene Keto- und Hydroxycarbonsäure-Verbindungen beschrieben.^[123,140] Für eine produktive Fixierung von Substraten mit C=N-Funktionalitäten scheint diese Position jedoch keine Rolle zu spielen (nach Einbringen der Mutation F231A auch kein Aktivitätsverlust für das sterisch weniger anspruchsvolle Substrat 2-Methylpyrrolin, vergleiche Tabelle 4.9). Die durchgeführten kinetischen Studien zeigen außerdem eine etwas bessere Bindungsaffinität der generierten β HAD-Varianten für das Imin-Substrat 2-Methylpyrrolin als die Iminreduktase *R-IRED-Sr* (siehe Tabelle 4.8), was eine evolutionäre Verwandtschaft dieser zwei Enzymfamilien unterstreicht.

5.2.1 Evolution von Iminreduktasen

Mitglieder einer Enzym-Superfamilie definieren sich durch die divergente Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorfahren. Sie zeigen strukturell gleiche Faltungsmotive und verfolgen ähnliche katalytische Strategien, wobei Substrat- und Reaktionsspektrum stark voneinander abweichen können.^[30,141] Die Arbeitsgruppe um John Gerlt leistete mit Studien zur Enzymfamilie der Enolasen einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis von Enzym-Superfamilien.^[15,31] Mitglieder dieser Superfamilie katalysieren verschiedene chemische Reaktionen wie Racemisierungs-, Epimerisierungs- und Eliminierungsreaktionen, wobei alle Reaktionen eine Basen-katalysierte und gleichzeitig durch Metallionen stabilisierte Abstraktion eines Protons von einem Kohlenstoffatom benachbart zu einer Carbonsäure gemeinsam haben.^[15] Unter Berücksichtigung der Definition von Enzym-Superfamilien und den zuvor am Institut für Technische Biochemie durchgeführten bioinformatischen Arbeiten^[78] können Iminreduktasen und β -Hydroxysäure Dehydrogenasen als Mitglieder einer Superfamilie bezeichnet werden. Für beide Enzymfamilien ist NAD(P)H als Hydrid-Donor beschrieben, was gleichzeitig in beiden Enzymen eine NAD(P)H-Bindedomäne erfordert.^[68,139] Hierfür besitzen beide Enzymfamilien eine *Rossmann-fold* Domäne, die speziell für die Bindung von Nicotinamid-Cofaktoren beschrieben ist. Erst kürzlich konnte die

Arbeitsgruppe um Dan Tawfik zeigen, dass die Geometrie von *Rossmann-fold* Enzymen unabhängig von den genutzten Cofaktoren (SAM, NAD oder FAD) und den katalysierten Reaktionen auf einen gemeinsamen Vorfahren hindeutet.^[142] Diese Untersuchungen unterstützen die Hypothese eines gemeinsamen Ursprungs von IREDs und β HADs deutlich.

Bei der Zusammenfassung verschiedener Studien über promiskuitive Enzymfunktionen wird deutlich, dass meist nur ein Aminosäureaustausch ausreicht, um die promiskuitive Aktivität um das 10^1 - 10^3 -fache zu steigern.^[30] Zusätzlich kann der Austausch weniger Aminosäuren zu einer kompletten Änderung des katalytischen Mechanismus führen, was die Arbeitsgruppe um Romas Kazlauskas eindrucksvoll durch die vollständige Umwandlung einer Esterase in eine Hydroxynitril-Lyase durch nur zwei Aminosäureaustausche demonstrieren konnte.^[143] In der Literatur sind eine Vielzahl an Beispielen beschrieben, die aus diesem Grund bereits vorhandene promiskuitive Aktivitäten als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer katalytischer Aktivitäten nutzen.^[28,141,144]

Alle heute vorhandenen, hoch spezifischen Enzyme haben sich mutmaßlich durch natürliche Verdoppelung, kombiniert mit Mutation und Selektion aus einem gemeinsamen, viele tausende Jahre vorher existierenden Protein evolviert.^[21] Dies bedeutet, dass Enzyme, die eine bestimmte promiskuitive Aktivität aufweisen und Enzyme, die genau diese Aktivität als natürliche Reaktion zeigen einen gemeinsamen Ursprung besitzen können.^[17,21] Dieses Wissen mit der Methodik der ortsgerichteten Mutagenese kombiniert konnte im Zuge dieser Arbeit die Evolution von Iminreduktasen zu einem gewissen Teil rückverfolgt werden. Das Engineering von β HADs für die Reduktion von C=N-Bindungen resultierte in Proteinvarianten, die mögliche Zwischenprodukte in der Evolution von Iminreduktasen darstellen könnten. Der Austausch von nur einer Aminosäure in β HADs führte zeitgleich zu einer bedeutenden Steigerung der Imin-reduzierenden Aktivität und zu einer deutlichen Verringerung der natürlichen Aktivität dieser Enzyme. Das Erstellen und Screenen mehrerer Generationen von Mutanten war für diese eindeutige Veränderung der katalytischen Aktivität der untersuchten Enzyme somit nicht nötig, da sie einen stark negativen Trade-off (sofortiger, fast vollständiger Verlust der natürlichen Aktivität) zeigten.^[17] Diese Erkenntnisse stärken weiter die Vermutung, dass Iminreduktasen und Dehydrogenasen verwandte Enzyme darstellen. Der

Diskussion

Ausbau dieser Kenntnisse und die damit verbundene Entwicklung weiterer Imin-reduzierender Enzyme ist aufgrund ihres vielversprechenden synthetischen Potenzials von großem Interesse.

6 Ausblick

Nach der Entdeckung von Iminreduktasen 2010 wurden in kürzester Zeit eine Vielzahl an weiteren Enzymen dieser Enzymfamilie beschrieben und charakterisiert. Durch die schnelle Erweiterung von Substrat- und Reaktionsspektrum konnte das synthetische Potenzial dieser Enzyme, welches das heute vorhandene industrielle Interesse an der Enzymfamilie der Iminreduktasen erklärt, direkt aufgezeigt werden. Hierbei spielt vor allem der Einsatz in Enzymkaskaden und die Katalyse von reduktiven Aminierungen eine entscheidende Rolle.^[81] In der vorliegenden Arbeit wurden Optimierungen hinsichtlich der finalen Produktbildung in reduktiven Aminierungen auf Grundlage der Reaktionsbedingungen im Detail untersucht. Eine weitere Stellschraube hierfür stellt aber auch der Biokatalysator selbst dar. Mittels *enzyme engineering* kann sowohl die Aktivität (aktive Tasche), als auch die Stabilität des Enzyms optimiert werden. Eine erhöhte Enzymstabilität, die den Einsatz in biphasischen Reaktionssystemen (Verringerung der Hydrolyse des labilen Imin-Intermediates) ermöglichen würde, wäre hierbei besonders wünschenswert. Für die Erhöhung der Robustheit dieser Enzyme wäre neben den bereits initiierten Mutationsstudien (siehe 4.2.4) die Identifizierung von Iminreduktasen aus thermophilen Organismen denkbar.

Um das bereits gezeigte Potenzial dieser Enzyme jedoch vollständig nutzen zu können, wäre die Aufklärung der natürlichen Funktion von Iminreduktasen in Verbindung mit der Klärung des genauen katalytischen Mechanismus von Vorteil. Erste Kenntnisse in diese Richtung konnten bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielt werden. Um dieses Wissen weiter auszubauen, stellt die Durchführung eines Alaninscans der aktiven Tasche eine Möglichkeit dar. Der Alaninscan beschreibt ein Verfahren, bei dem durch den Austausch verschiedener Aminosäurereste gegen Alanin entscheidende Positionen für die untersuchte Proteinfunktion, -struktur und -stabilität identifiziert werden können. Zuvor am Institut für Technische Biochemie von Dr. Silvia Fademrecht durchgeführte Arbeiten beschreiben die vermutlich am Aufbau der aktiven Tasche von IREDs beteiligte Aminosäurereste (Abbildung 6.1) und könnten für einen möglichen Alaninscan adressiert werden. Dadurch könnte die Herkunft des Protons und die am für die

7 Anhang

7.1 Protein- und DNA-Sequenzen der bearbeiteten Enzyme

Alle Gene der in der Arbeit untersuchten Wildtyp-Enzyme wurden bei GeneArt™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE) für *E. coli* codon-optimiert synthetisiert. Im Vergleich zur nativen Proteinsequenz hatten die synthetisierten Proteine 21 Aminosäuren mehr aufgrund eines N-terminal eingefügten His₆-Tag und einer 3CV Protease-Schnittstelle um diesen wieder zu entfernen ('MGSSHHHHHSSGLEVLFGPA', codierte DNA-Sequenz: 'ATGGGTAGCAGCCATCAT CACCACCATCATAGCAGCGGTCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCGGCA'). Zusätzlich wurden N- und C-terminal homologe Regionen für das Plasmid pBAD33 eingefügt, um die Klonierung mittels *Gibson assembly* zu ermöglichen (siehe 3.2.3). In Tabelle 7.1 sind die synthetisierten Gene mit ihrer zugehörigen *accession numbers* aufgeführt.

Tabelle 7.1: Auflistung der synthetisierte Gene und ihren dazugehörigen *accession numbers*.

Enzym	<i>accession number</i>
R-Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	WP_012887675.1
S-Iminreduktase aus <i>Paenibacillus elgii</i>	WP_010497949.1
Glyoxylatreduktase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_566768.1
6-Phosphogluconatdehydrogenase aus <i>Lactococcus lactis</i>	P96789.3
Glyoxylat-/3-Oxopropanoat-/4-Oxobutanoat- Reduktase aus <i>Geobacter metallireducens</i>	ABB33226.1

In den im Folgenden aufgeführten DNA-Sequenzen sind Start-codons in rot, der eingefügte His₆-Tag in blau, Stop-codons in lila und für pBAD33 homologe Regionen in grau markiert.

1) R-Iminreduktase aus *Streptosporangium roseum* (R-IRED-Sr)

Native Proteinsequenz:

MRDTDVTVLGLGLMGQALAGAFKLDGHATTVWNRSEGKAGQLAEQGAVLASSARDAAE
ASPLVVVCVSDHAAVRAVLDPDGLDVLGRVNLVNLTSQTSEQARATAEWAAERGITYLDGA
IMAIQVVGTADAFLLYSGPEAAEYEAHEPTLRSLGAGTTYLGADHGLSSLYDVALLGIMWG

Anhang

TLNSFLHGAALLGTAKVEATTFAPFANRWIEAVTGFVSAYAGQVDQGAYPALDATIDTHV
ATVDHLIHESEAAGVNTELPRLVRTLADRALAGGQGGGLGYAAMIEQFRSPSA

Synthetisierte DNA-Sequenz:

CTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCTTTTTTGGTACCA
GGAGGATTACATATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATAGCAGCGGTCTGGAAGTT
CTGTTTCAGGGTCCGGCACGTGATACCGATGTTACCGTTCTGGGTCTGGGCCTGATGGGT
CAGGCACTGGCAGGCGCATTCTGAAAGATGGTCATGCAACCACCGTTTGAATCGTAGC
GAAGGTAAAGCAGGTCAGCTGGCAGAACAGGGTGCAGTTCTGGCAAGCAGCGCACGTGAT
GCAGCAGAAGCAAGTCCGCTGGTTGTTGTTTGTGTTAGCGATCATGCAGCAGTTCGTGCC
GTTCTGGATCCGCTGGGTGATGTTCTGGCAGGTCTGTGTTCTGGTTAATCTGACCAGCGGC
ACCAGCGAACAGGCACGTGCAACCGCAGAATGGGCAGCAGAACGTGGTATTACCTATCTG
GATGGTGCAATTATGGCAATTCCGCAGGTTGTGGGCACCGCAGATGCATTTCTGCTGTAT
AGCGGTCCGGAAGCAGCATATGAAGCACATGAACCGACCCTGCGTAGCCTGGGTGCAGGC
ACCACATATCTGGGTGCCGATCATGGTCTGAGCAGCCTGTATGATGTTGCACTGCTGGGT
ATTATGTGGGGCACCTGAATAGCTTTCTGCATGGTGCAGCCCTGCTGGGCACAGCAAAA
GTTGAAGCCACCACCTTTGCACCGTTTGCAAATCGTTGGATTGAAGCAGTTACCGGTTTT
GTTAGCGCATATGCCGGTCAGGTTGATCAGGGTGCATATCCGGCACTGGATGCAACCATT
GATACCATGTTGCAACCGTTGATCATCTGATTCATGAAAGCGAAGCAGCCGGTGTAAAT
ACCGAACTGCCTCGTCTGGTTCGTACCCTGGCAGATCGTGCCCTGGCTGGCGGTCAGGGT
GGTCTGGGTTATGCAGCAATGATTGAACAGTTTCGTAGCCCGAGCGCATATAAATCTAGA
CTGCAGAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGA

2) S-Iminreduktase aus *Paenibacillus elgii* (S-IRED-Pe)

Native Proteinsequenz:

MNSSNPKDNISVGSASTATNRKSVTVMGLGPMGQAMAGVFLESGYEVTVWNRTASKADE
LVAKGAIRASTVDEALAANELVILSLTDYDAMYAILEPSSANLSGKVLVNLSSDTPEKVREA
AKWLADRGARHVTGGVQVPPSGIGKPESYTYYSGPREVFEAHRESLEILTGTDIRGEDPGL
AMLYYQIQMDIFWTSMLSYLHALAVAKANGITAKQFLPYASATLSSLPQFVEFYTPRLDEG
KHPGDVDRLAMGLASVEHIVHTTEDAGIDTTLPAAVLEIFKRMENGHAGDSFTSLIEIFK
NPVRS

Synthetisierte DNA-Sequenz:

CTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGGCTAGCGAATTCGAGCTCTTTTTTGGTACCA
GGAGGATTACATATGGGTAGCAGCCATCATCATCACCATCATAGCAGCGGTCTGGAAGTT
CTGTTTCAGGGTCCGGCAAATAGCAGCAATCCGAAAGATAACATTAGCGTTGGTAGCGCA

AGCACCGCAACCAATCGTAAAAGCGTTACCGTTATGGGTCTGGGTCCGATGGGTCAGGCA
 ATGGCAGGCGTTTTTCTGGAAAGCGGTTATGAAGTTACCGTTTGAATCGTACCGCAAGC
 AAAGCAGATGAACTGGTTGCAAAGGTGCAATTCGTGCCAGCACCGTTGATGAAGCACTG
 GCAGCAAACGAACTGGTTATTCTGAGCCTGACCGATTATGATGCAATGTATGCAATTCTG
 GAACCGAGCAGCGCAAATCTGAGCGGTAAAGTTCTGGTGAATCTGAGCAGCGATAACCG
 GAAAAAGTTCGTGAAGCAGCAAATGGCTGGCAGATCGTGGTGCACGTCATGTTACCGGT
 GGTGTTTCCAGGTTCCGCCTAGCGGTATTGGTAAACCGGAAAGCTATACCTATTATAGCGGT
 CCGCGTGAAGTTTTTGAAGCACATCGTGAAGCCTGGAAATCTGACCGGTACAGATTAT
 CGTGGTGAAGATCCGGGTCTGGCAATGCTGTATTATCAGATTCAGATGGATATCTTCTGG
 ACCAGTATGCTGAGCTATCTGCATGCACTGGCCGTTGCCAAAGCAAATGGTATTACCGCA
 AACAGTTTTCTGCCGTATGCAAGCGCAACCCTGAGCAGCCTGCCGAGTTTTGTTGAATTC
 TATACACCGCGTCTGGATGAAGTAAACATCCGGGTGATGTTGATCGTCTGGCCATGGGC
 CTGGCAAGCGTTGAACATATTGTTTCATACCACCGAAGATGCAGGTATTGATACCACCCTG
 CCTGCAGCAGTTCTGGAAATCTTTAAACGTGGCATGGAAAATGGTCATGCCGGTGATAGC
 TTTACCAGCCTGATTGAAATTTTCAAAAATCCGGTGCGCAGCTAAATAATCTAGACTGCAG
 AAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGA

3) Gyloxylatreduktase aus *Arabidopsis thaliana* (β HADAt, pdb|3DOJ)

Native Proteinsequenz:

MEVGFGLGIMGKAMSMNLLKNGFKVTVWNRTLSKCDELVEHGASVCESPAEVIKKCKY
 TIAMLSDPCAALSVVFDKGGVLEQICEGKGYIDMSTVDAETSLKINEAITGKGGRFVEGPVS
 GSKKPAEDGQLIILAAGDKALFEESIPAFDVLGKRFSYLGQVNGAKMKLIVNMIMGSMNN
 AFSEGLVLADKSLSSDTLLDILDLGAMTNPMFKGKGPSMNKSSYPAPFLKHQQKDMRL
 ALALGDENAVSMPVAAAANEAFKKARSLGLGDLDFSAVIEAVKFSRE

Synthetisierte DNA-Sequenz:

CTTTTTTGGTACCAGGAGGATTACATATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATAGCA
 GCGGTCTGGAAGTTCTGTTTCCAGGGTCCGGCGATGGAAGTGGGTTTTCTGGGTCTGGGTA
 TCATGGGCAAGGCGATGAGCATGAACCTGCTGAAGAACGGTTTTCAAAGTGACCGTTTGG
 ACCGTACCCTGAGCAAATGCGATGAGCTGGTTGAGCATGGTGCAGCGTTTGCAGAGCC
 CGGCGGAAGTGATCAAGAAATGCAAGTACACCATTGCGATGCTGAGCGACCCGTGCGCGG
 CGCTGAGCGTGGTTTTTCGATAAGGGTGGCGTGCTGGAGCAGATCTGCGAGGGTAAAGGCT
 ATATTGACATGAGCACCGTTGATGCGGAAACCAGCCTGAAGATCAACGAAGCGATTACCG
 GTAAAGGTGGCCGTTTTGTGGAGGGTCCGGTTAGCGGCAGCAAGAAACCGGCGGAAGACG
 GTCAGCTGATCATTCTGGCGGCGGGTGATAAGGCGCTGTTTCGAGGAAAGCATCCCGGCGT

TTGATGTGCTGGGTAAACGTAGCTTCTACCTGGGCCAAGTGGGTAACGGCGCGAAGATGA
AACTGATCGTTAACATGATTATGGGTAGCATGATGAACGCGTTTAGCGAGGGTCTGGTTC
TGGCGGACAAGAGCGGCCTGAGCAGCGATACCCTGCTGGACATTCTGGATCTGGGCGCGA
TGACCAACCCGATGTTCAAGGGTAAAGGCCCGAGCATGAACAAAAGCAGCTATCCGCCGG
CGTTTCCGCTGAAGCACCAGCAAAAAGACATGCGTCTGGCGCTGGCGCTGGGTGATGAGA
ACGCGGTGAGCATGCCGGTTGCTGCGGCGGCGAACGAAGCGTTTAAGAAAGCGCGTAGCC
TGGGCCTGGGCGACCTGGATTTTAGCGCGGTTATTGAGGCGGTGAAGTTTAGCCGTGAGT
AATAATCTAGACTGCAGAAGCTTGGC

4) 6-Phosphogluconatdehydrogenase aus *Lactococcus lactis* (β HADLal, pdb12IYP)

Native Proteinsequenz:

MAQANFGVVGMAVMGKNLALNVESRGYTVAIYNRTTSKTEEVFKEHQDKNLVFTKLEE
FVGSLEKPRRIMLMVQAGAATDATIKSLLPLLDIGDILIDGGNTHFPDTMRRNAELADSGI
NFIGTGVSNGEKGALLGPSMMPGGQKEAYDLVAPIFEQIAAKAPQDGKPCVAYMGANGAG
HYVKMVHNGIEYGDMQLIAESYDLLKRILGLSNAEIQAIFEEWNEGELDSYLIEITKEVLKR
KDDEGEGYIVDKILDKAGNKGTGKWTSESALDLGVPLPLITESVFARYISTYKDERVKASKV
LSGPALDFSGDKKEVIEKIRKALYFSKIMSQAQGFALRKASEEFDWDLPGTIAQIWRAG
CIIRAEFLQNITDAFDKDELENNLLDDYFVDITKRYQEAVRDVVSLAVQAGTPIPTFTSAIS
YYDSYRSENLPANLIQAQRDYFGAHTYERTDKAGIFHYDWYTED

Synthetisierte DNA-Sequenz:

CTTTTTTGGTACCAGGAGGATTACATATGGGTAGCAGCCATCACCATCATCATCATAGCA
GCGGTCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCTGCAATGGCACAGGCAAATTTTGGTGTGTTG
GTATGGCAGTGATGGGTAAAAATCTGGCACTGAATGTTGAAAGCCGTGGTTATACCGTT
GCCATTTATAACCGTACCACCAGTAAAACCGAAGAGGTGTTTAAAGAACACCAGGATAA
AACCTGGTGTTTACCAAAACGCTGGAAGAATTTGTTGGTAGCCTGGAAAAACCGCGTCG
TATTATGCTGATGGTTCAGGCAGGCGCAGCAACCGATGCAACCATTAAAAGCCTGCTGCC
GCTGCTGGATATTGGTGATATTCTGATTGATGGTGGCAATACCCATTTTCCGGATACCAT
GCGTCGTAATGCAGAACTGGCAGATAGCGGTATTAACCTTTATTGGCACCGGTGTTAGCGG
TGGTGAAAAAGGTGCACTGCTGGGTCCGAGCATGATGCCTGGTGGTCAGAAAGAAGCAT
ACGATCTGGTTGCACCGATTTTTGAGCAGATTGCAGCAAAAGCACCGCAGGATGGTAAAC
CGTGTGTTGCATATATGGGTGCAAATGGTGCAGGTCATTATGTGAAAATGGTTCATAAC
GGCATCGAGTATGGTGATATGCAGCTGATTGCAGAAAGCTATGATCTGCTGAAACGTATT

CTGGGTCTGAGCAATGCAGAAATTCAGGCCATTTTTGAAGAATGGAATGAAGGTGAACT
 GGACAGCTATCTGATTGAAATCACCAAAGAAGTCCTGAAACGCAAAGATGATGAAGGCC
 AAGGTTATATCGTGGACAAAATTCTGGATAAGGCAGGTAATAAAGGCACCGGTAATGG
 ACCAGCGAAAGCGCACTGGATCTGGGTGTTCCGCTGCCTCTGATTACCGAAAGCGTTTTT
 GCACGTTATATCAGCACCTATAAAGATGAACGTGTGAAAGCAAGCAAAGTTCTGAGCGG
 TCCGGCACTGGATTTTTTCAGGTGATAAAAAAGAAGTGATCGAAAAGATTCGCAAGGCCCT
 GTATTTTAGCAAAATTATGAGCTATGCACAGGGTTTTGCACAGCTGCGTAAAGCAAGCGA
 AGAATTCGATTGGGATCTGCCGTATGGCACCATTGCACAGATTTGGCGTGCAGGTTGTAT
 TATTCGTGCAGAATTCCTGCAGAACATTACCGATGCATTTGATAAAGATAGCGAGCTGGA
 AAATCTGCTGCTGGACGATTATTTTGTGGATATTACCAAACGTTATCAAGAGGCCGTTCC
 TGATGTTGTGAGCCTGGCAGTGCAGGCAGGCACCCCGATTCCGACCTTTACCAGCGCAAT
 TAGCTATTATGACAGTTATCGCAGCGAAAACCTGCCTGCCAATCTGATTCAGGCACAGCG
 TGATTATTTCCGTGCACATACCTATGAACGTACCGATAAAGCAGGCATCTTTCACTATGA
 TTGGTATACCGAAGATTAATGATCTAGACTGCAGAAGCTTGGC

5) Glyoxylat-/3-Oxopropanoat-/4-Oxobutanoat- Reduktase aus *Geobacter metallireducens* (β HADGm, pdb3PEF)

Native Proteinsequenz:

SQKFGFIGLGIMGSAMAKNLVKAGCSVTIWNRSPEKAEELAALGAERAATPCEVVESCPVT
 FAMLADPAAAEVCFGKHGVLEGIGEGRGYVDMSTVDPATSQRIGVAVVAKGGRFLEAPV
 SSKKPAEDGTLIILAAGDRNLYDEAMPGFKMGKKIHLGDVKGGAEMKLVVNMVMGG
 MMACFCEGLALGEKAGLATDAILDVIGAGAMANPMFALKGGLIRDRNFAPAFPLKHMQK
 DLRLAVALGDRVGQPLVASAAANELFKGARAAGFGDEDFSAIFKTYER

Synthetisierte DNA-Sequenz:

CTTTTTTGGTACCAGGAGGATTACATATGGGTAGCAGCCATCACCATCATCATAGCA
 GCGGTCTGGAAGTTCTGTTTCAGGGTCCTGCAATGCAGAAATTTGGTTTTATTGGTCTGG
 GTATTATGGGTAGTGAATGGCAAAAAATCTGGTTAAAGCAGGTTGTAGCGTGACCATT
 TGGAATCGTAGTCCGGAAAAAGCAGAAGAACTGGCAGCACTGGGTGCAGAACGTGCAGC
 AACCCCGTGTGAAGTTGTTGAAAGCTGTCCGGTTACCTTTGCAATGCTGGCAGATCCGGC
 AGCAGCCGAAGAAGTTTGTTTTGGTAAACATGGTGTCTGGAAGGTATTGGTGAAGGTC
 GTGGTTATGTTGATATGAGCACCGTTGATCCGGCAACCAGCCAGCGTATTGGTGTTCAG
 TTGTTGCAAAGGTGGTCGTTTTCTGGAAGCACCGTTAGCGGTAGCAAAAAACCGGCAG
 AAGATGGCACCCCTGATTATTCTGGCAGCCGGTGATCGTAATCTGTATGATGAAGCAATGC

CTGGCTTTGAGAAAATGGGCAAAAAAATCATTACCTGGGTGATGTTGGTAAAGGTGCA
 GAAATGAACTGGTTGTGAATATGGTTATGGGTGGTATGATGGCCTGTTTTTGTGAAGG
 TCTGGCCCTGGGTGAAAAAGCCGGTCTGGCAACCGATGCAATTCTGGATGTGATTGGTGC
 CGGTGCCATGGCCAATCCGATGTTTGCCTGAAAGGTGGCCTGATTCGTGATCGCAATTT
 TGCACCGGCATTTCCGCTGAAACATATGCAGAAAGATCTGCGTCTGGCAGTTGCGCTGGG
 TGATCGTGTTGGTCAGCCGCTGGTTGCAAGCGCAGCAGCAAATGAACTGTTTAAAGGTGC
 CCGTGCAGCAGTTTTTGGTGATGAAGATTTTAGCGCAATCTTCAAAACCTATGAGCGCTG
 ATAATCTAGACTGCAGAAGCTTGGC

7.2 Plasmide (ITB-Nummern)

Table 7.1: Auflistung der im Rahmen der Arbeit generierte Plasmide, die aufgrund ihres positiven Effektes in die Stammsammlung übernommen wurden.

ITB- Nummer	Plasmid	Beschreibung	Quelle
pITB1616	pET28a(+)_R-IRED-Sr	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i>	GSK, Dr. Murray Brown
pITB1617	pBAD33_R-IRED-Sr_D170K	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 170	diese Arbeit
pITB1618	pBAD33_R-IRED-Sr_L174N	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 174	diese Arbeit
pITB1619	pBAD33_R-IRED-Sr_M120S	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 120	diese Arbeit
pITB1620	pBAD33_R-IRED-Sr _D170K_L174N	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an den Positionen 170 und 174	diese Arbeit
pITB1621	pBAD33_R-IRED-Sr _D170K_L174N_M120S	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an den Positionen 170, 174 und 120	diese Arbeit
pITB1622	pBAD33_R-IRED-Sr_T49V	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> Mutation an Position 49	Peter Heinemann ¹
pITB1623	pBAD33_R-IRED-Sr_T49L	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 49	Peter Heinemann ¹
pITB1624	pBAD33_R-IRED-Sr_G60A	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 60	Peter Heinemann ¹
pITB1625	pBAD33_R-IRED-Sr_V145K	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 145	Peter Heinemann ¹
pITB1626	pBAD33_R-IRED-Sr_T233K	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 233	Peter Heinemann ¹

pITB1627	pBAD33_R-IRED-Sr_S237T	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 237	Peter Heinemann ¹
pITB1628	pBAD33_R-IRED-Sr_H264L	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 264	Peter Heinemann ¹
pITB1629	pBAD33_R-IRED-Sr_H264I	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 264	Peter Heinemann ¹
pITB1630	pBAD33_R-IRED-Sr_S308R	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit Mutation an Position 308	Peter Heinemann ¹
pITB1631	pBAD33_R-IRED-Sr_A	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit 6 Mutationen: T49L, G60A, T233K, S237T, H264L, S308R	Rebekka Schöck ²
pITB1632	pBAD33_R-IRED-Sr_B	Iminreduktase aus <i>Streptosporangium roseum</i> mit 6 Mutationen: G60A, V145K, T233K, S237T, H264L, S308R	Rebekka Schöck ²
pITB1633	pBAD33_βHADAt	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	diese Arbeit
pITB1634	pBAD33_βHADAt_K170D	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an Position 170	diese Arbeit
pITB1635	pBAD33_βHADAt_K170F	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an Position 170	diese Arbeit
pITB1916	pBAD33_βHADAt_K170Y	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an Position 170	diese Arbeit
pITB1636	pBAD33_βHADAt_N174L	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an Position 174	diese Arbeit
pITB1917	pBAD33_βHADAt_S121M	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an Position 121	diese Arbeit
pITB1918	pBAD33_βHADAt_K170D_N174L	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an den Positionen 170 und 174	diese Arbeit
pITB1919	pBAD33_βHADAt_K170F_N174L	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an den Positionen 170 und 174	diese Arbeit
pITB1920	pBAD33_βHADAt_K170Y_N174L	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an den Positionen 170 und 174	diese Arbeit
pITB1921	pBAD33_βHADAt_K170D_N174L_S121M	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an den Positionen 170, 174 und 121	diese Arbeit

pITB1922	pBAD33_βHADAt_K170F_N174L_S121M	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an den Positionen 170, 174 und 121	diese Arbeit
pITB1923	pBAD33_βHADAt_K170Y_N174L_S121M	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutation an den Positionen 170, 174 und 121	diese Arbeit
pITB1637	pBAD33_βHADAt_K170D_F231A	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutationen an den Positionen 170 und 231	diese Arbeit
pITB1638	pBAD33_βHADAt_K170F_F231A	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Mutationen an den Positionen 170 und 231	diese Arbeit
pITB1639	pBAD33_βHADGm	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Geobacter metallireducens</i>	diese Arbeit
pITB1640	pBAD33_βHADGm_K171D	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Geobacter metallireducens</i> mit Mutation an Position 171	diese Arbeit
pITB1641	pBAD33_βHADGm_K171F	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Geobacter metallireducens</i> mit Mutation an Position 171	diese Arbeit
pITB1642	pBAD33_βHADGm_N175L	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Geobacter metallireducens</i> mit Mutation an Position 175	diese Arbeit
pITB1643	pBAD33_βHADLal	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Lactococcus lactis</i>	diese Arbeit
pITB1644	pBAD33_βHADLal_K184D	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Lactococcus lactis</i> mit Mutation an Position 184	diese Arbeit
pITB1645	pBAD33_βHADLal_K184F	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Lactococcus lactis</i> mit Mutation an Position 184	diese Arbeit
pITB1646	pBAD33_βHADLal_N188L	β-Hydroxysäure Dehydrogenase aus <i>Lactococcus lactis</i> mit Mutation an Position 188	diese Arbeit

¹ im Rahmen einer während der Arbeit betreuten Masterarbeit generiert^[114]

² im Rahmen einer während der Arbeit betreuten Bachelorarbeit generiert^[115]

7.3 Kalibriergeraden

Abbildung 7.1: Kalibriergerade der Säule Yarra 3 μ SEC-2000 mittels Gelfiltrationsstandard zur Analyse der Reinheit von IRED-Enzympräparationen. TG: Thyroglobulin (670 kDa), γ G: γ -Globulin (158 kDa), OA: Ovalbumin (44 kDa), MG: Myoglobin (17 kDa), VB: Vitamin B12 (1.35 kDa).

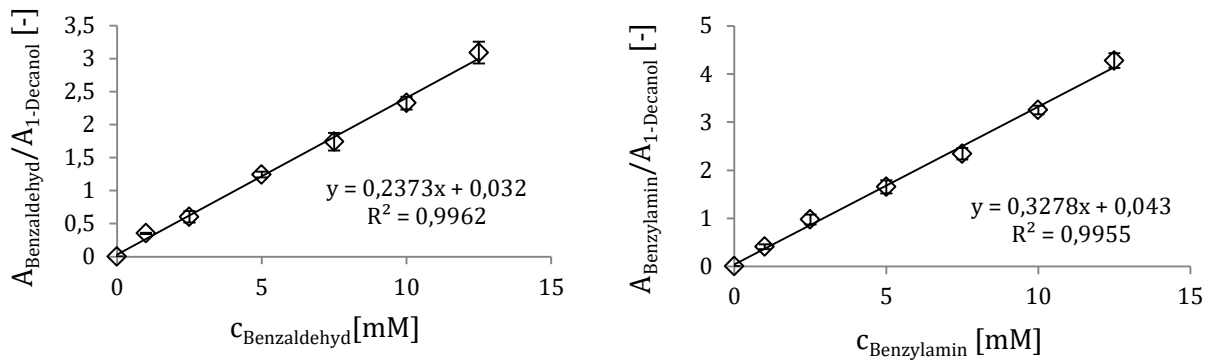


Abbildung 7.3 Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Benzaldehyd und Benzylamin mittels GC-Analyse nach reduktiven Aminierungen mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor und $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ als eingesetztes Aminnukleophil.

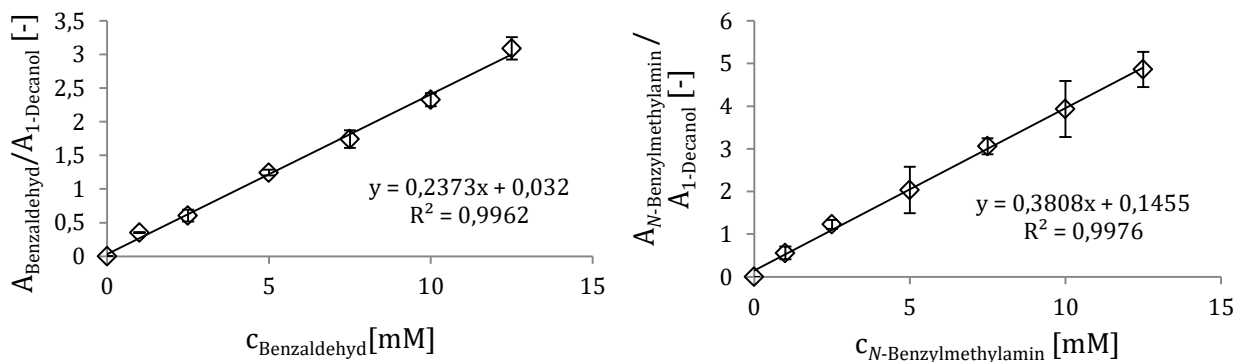


Abbildung 7.4: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Benzaldehyd und N-Benzylmethylamin mittels GC-Analyse nach reduktiven Aminierungen mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor und Methylamin als eingesetztes Aminnukleophil.

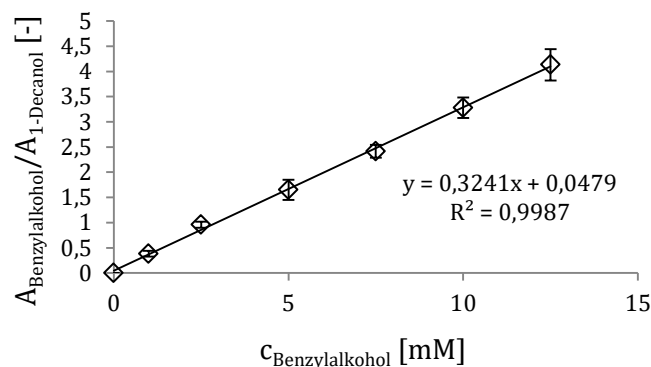


Abbildung 7.2: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Benzylalkohol und mittels GC-Analyse. Benzylalkohol wurde als Nebenprodukt in reduktiven Aminierungen mit Benzaldehyd als Carbonyl-Akzeptor beobachtet.

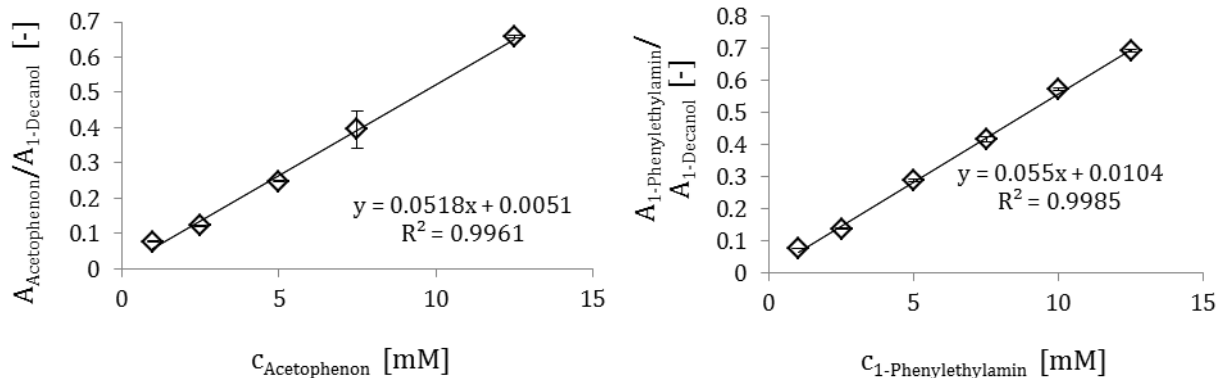


Abbildung 7.5: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Acetophenon und 1-Phenylethylamin mittels GC-Analyse nach reduktiven Aminierungen mit Acetophenon als Carbonyl-Akzeptor und $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ als eingesetztes Aminnukleophil.

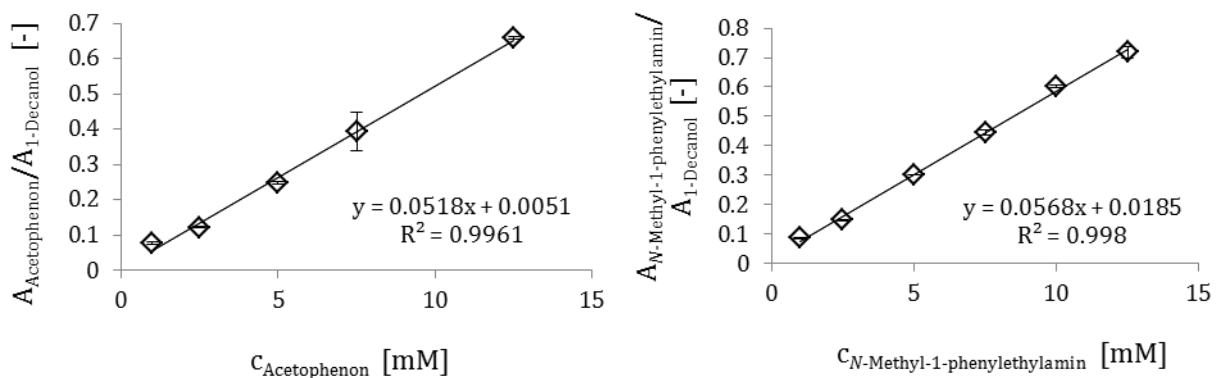


Abbildung 7.6: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Acetophenon und *N*-Methyl-1-phenylethylamin mittels GC-Analyse nach reduktiven Aminierungen mit Acetophenon als Carbonyl-Akzeptor und Methvlamin als eingesetztes Aminnukleophil.

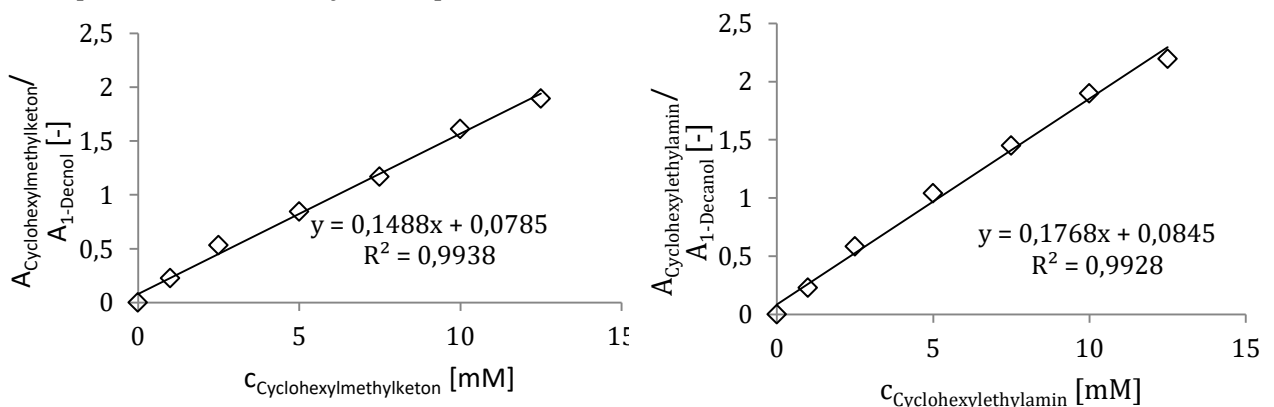


Abbildung 7.7: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Cyclohexylmethylketon und Cyclohexylethylamin mittels GC-Analyse nach reduktiven Aminierungen mit Cyclohexylmethylketon als Carbonyl-Akzeptor und $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4$ als eingesetztes Aminnukleophil.

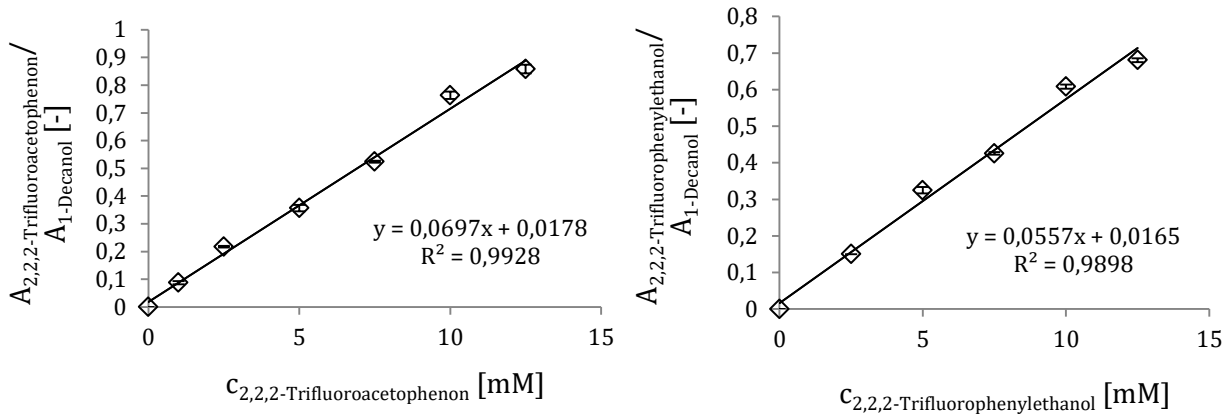


Abbildung 7.8: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von 2,2,2-Trifluoroacetophenon und 2,2,2-Trifluorophenylethanol mittels GC-Analyse nach IRED-katalysierter Reduktion des Carbonyl-Substrates

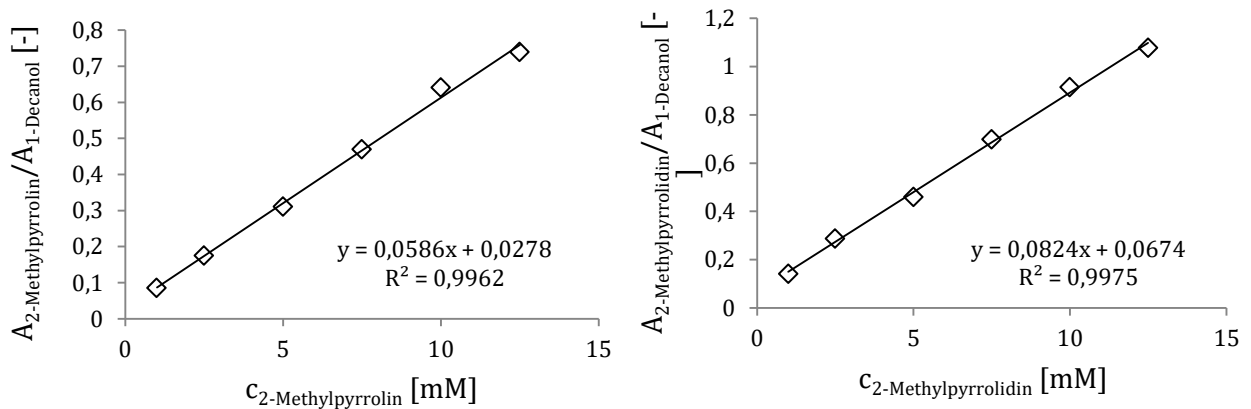


Abbildung 7.9: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von 2-Methylpyrrolin und 2-Methylpyrrolidin mittels GC-Analyse nach Enzym-katalysierter Reduktion des Imin-Substrates.

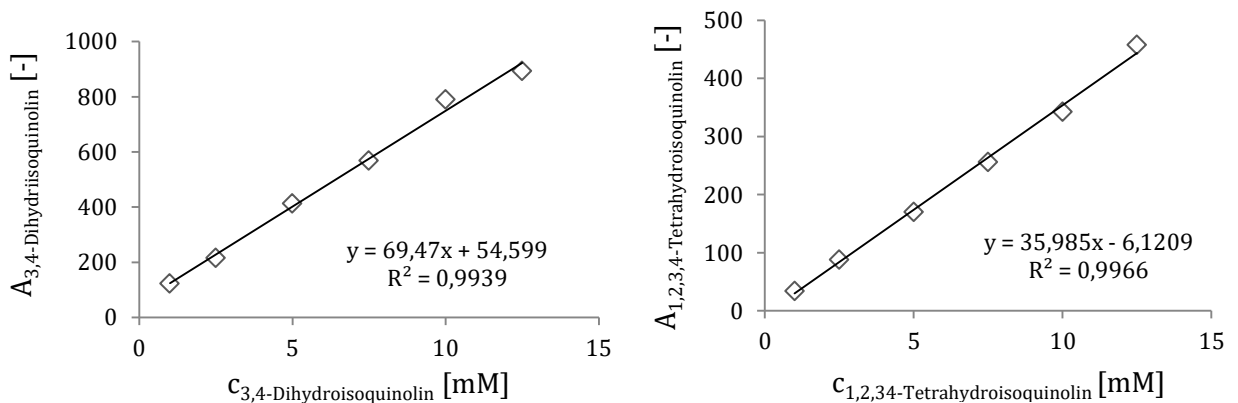


Abbildung 7.10: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von 3,4-Dihydroisoquinolin und 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin mittels HPLC-Analyse nach Enzym-katalysierter Reduktion des Imin-Substrates.

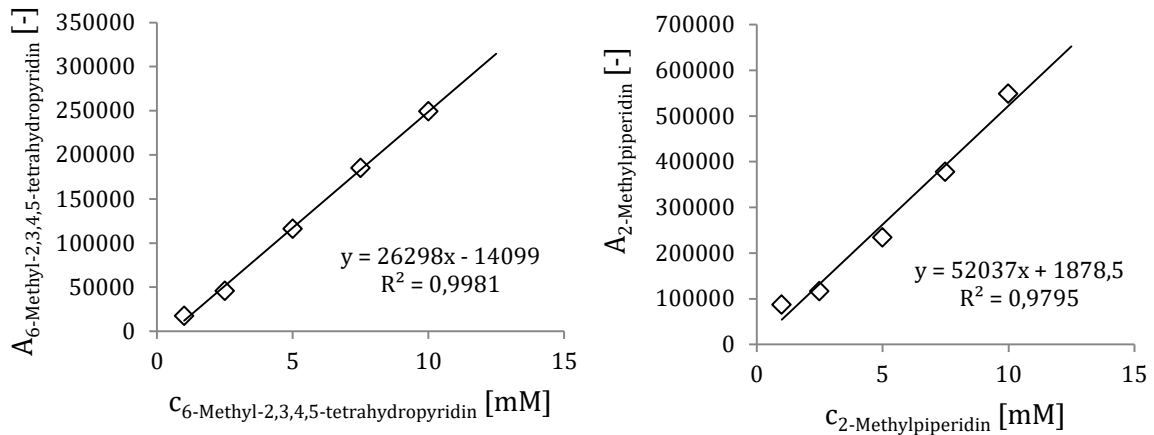


Abbildung 7.11: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von 6-Methyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin und 2-Methylpiperidin mittels GC-Analyse nach Enzym-katalysierter Reduktion des Imin-Substrates.

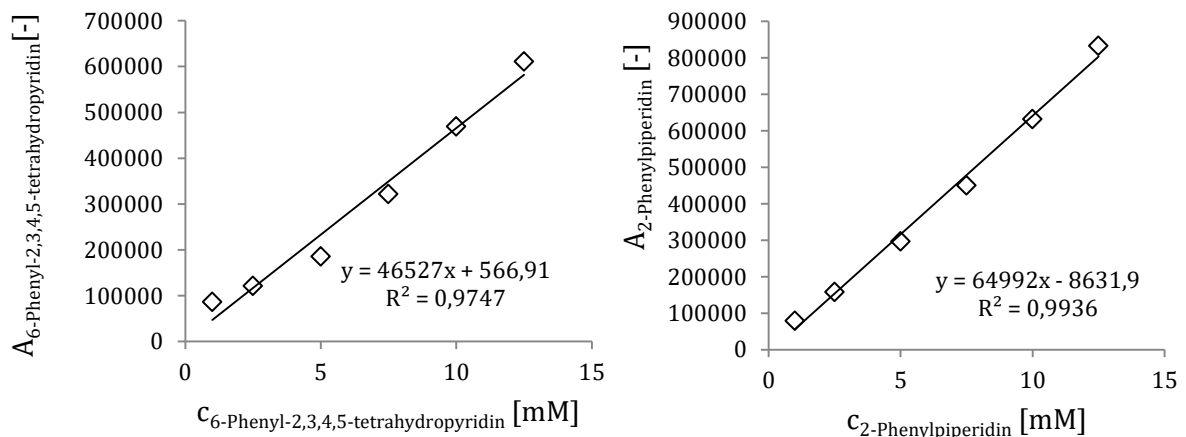


Abbildung 7.12: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von 6-Phenyl-2,3,4,5-tetrahydropyridin und 2-Phenylpiperidin mittels GC-Analyse nach Enzym-katalysierter Reduktion des Imin-Substrates.

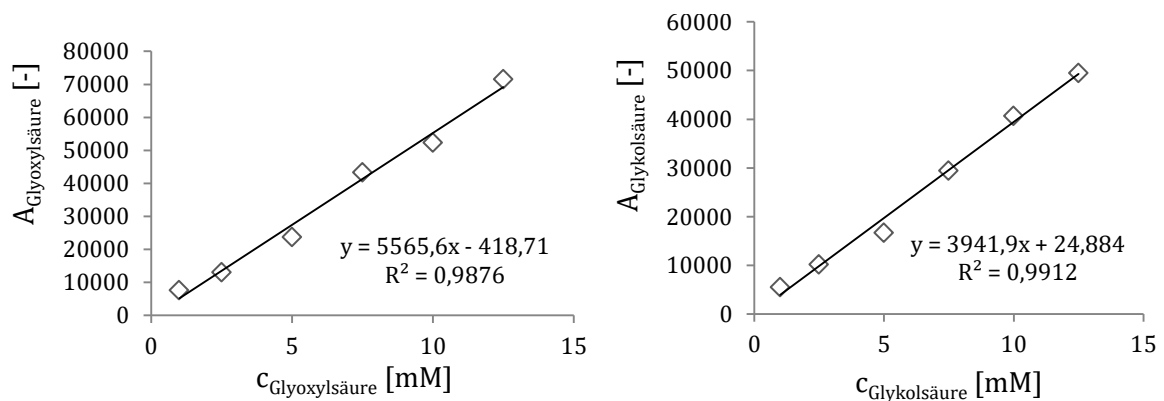


Abbildung 7.13: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Konzentrationen von Glyoxylsäure und Glykolsäure mittels HPLC-Analyse nach IRED-katalysierter Reduktion der Keto-Säure.

7.4 NMR-Spektren

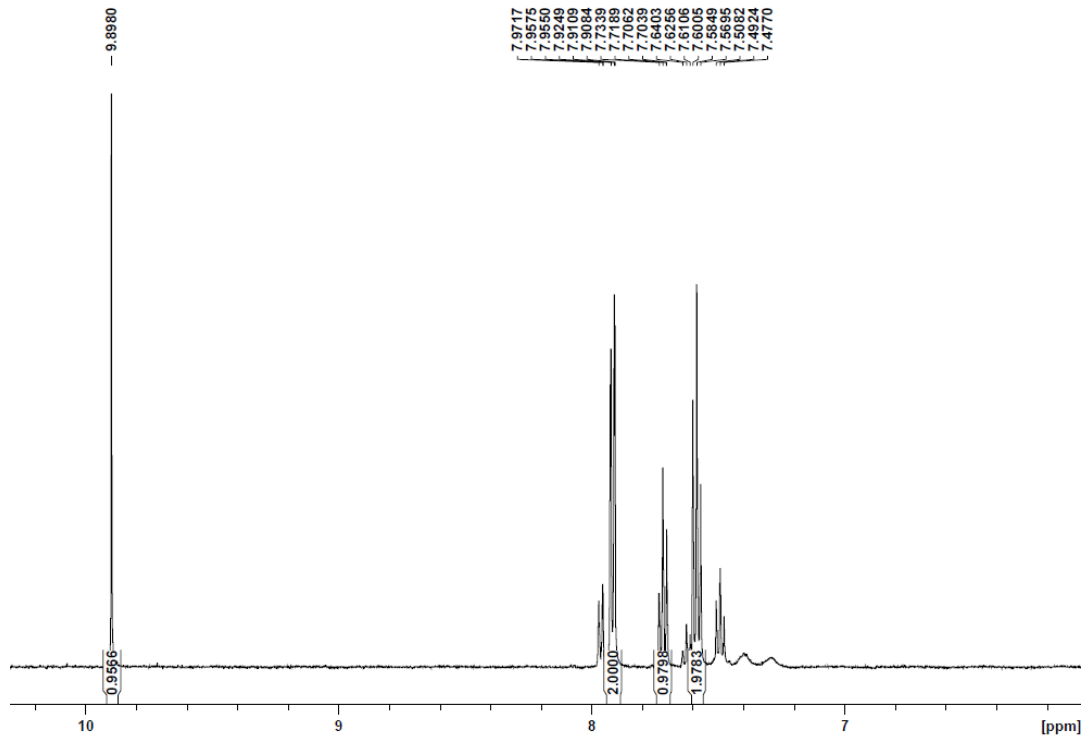


Abbildung 7.14: ^1H -NMR Spektrum von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin bei pH 4,0 und 23°C.

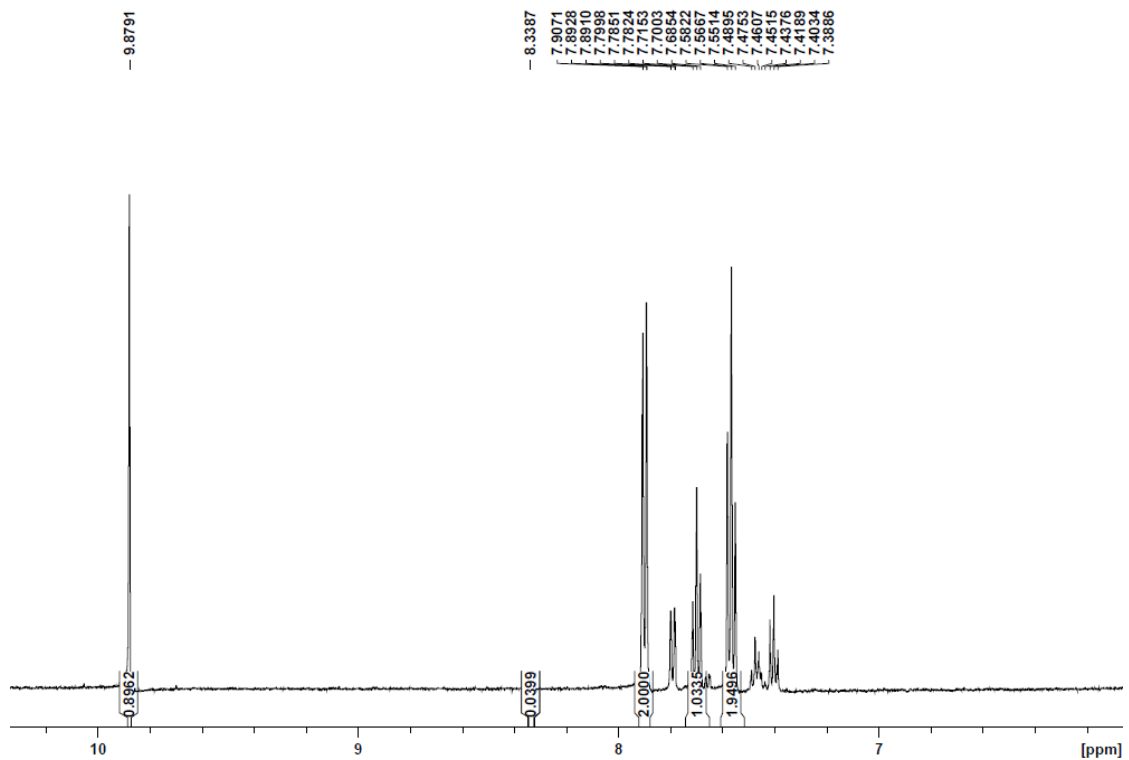


Abbildung 7.15: ^1H -NMR Spektrum von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin bei pH 7,4 und 23°C.

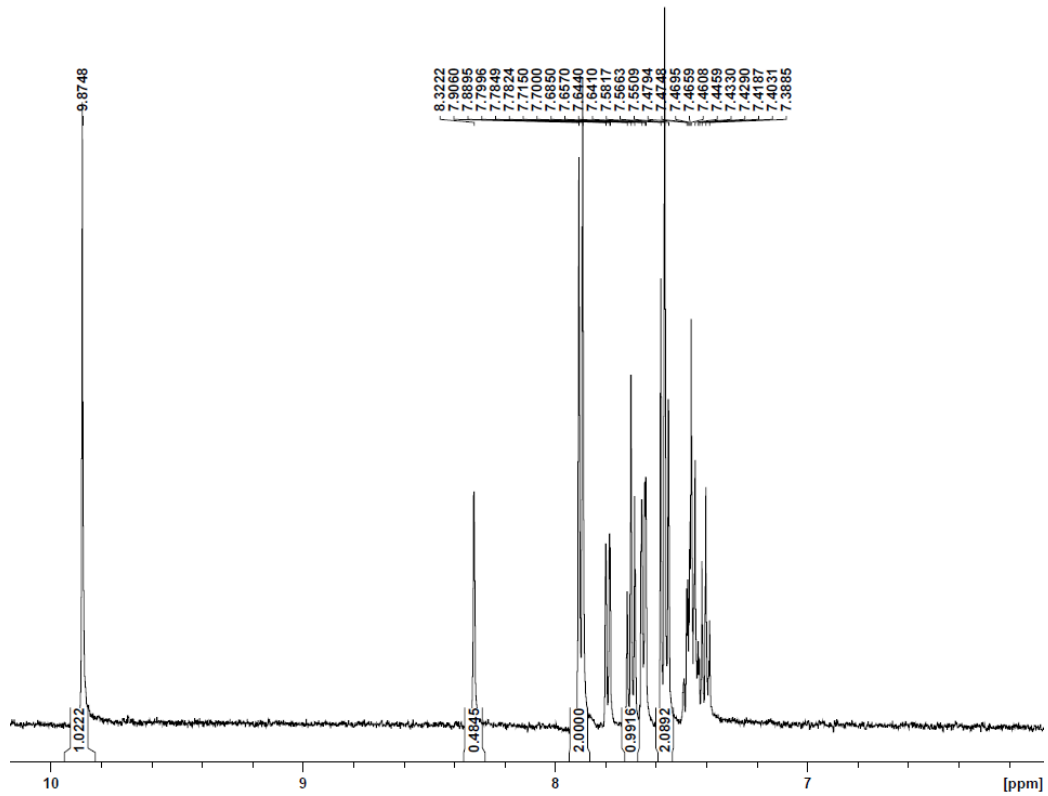


Abbildung 7.16: ^1H -NMR Spektrum von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin bei pH 8,2 und 23°C.

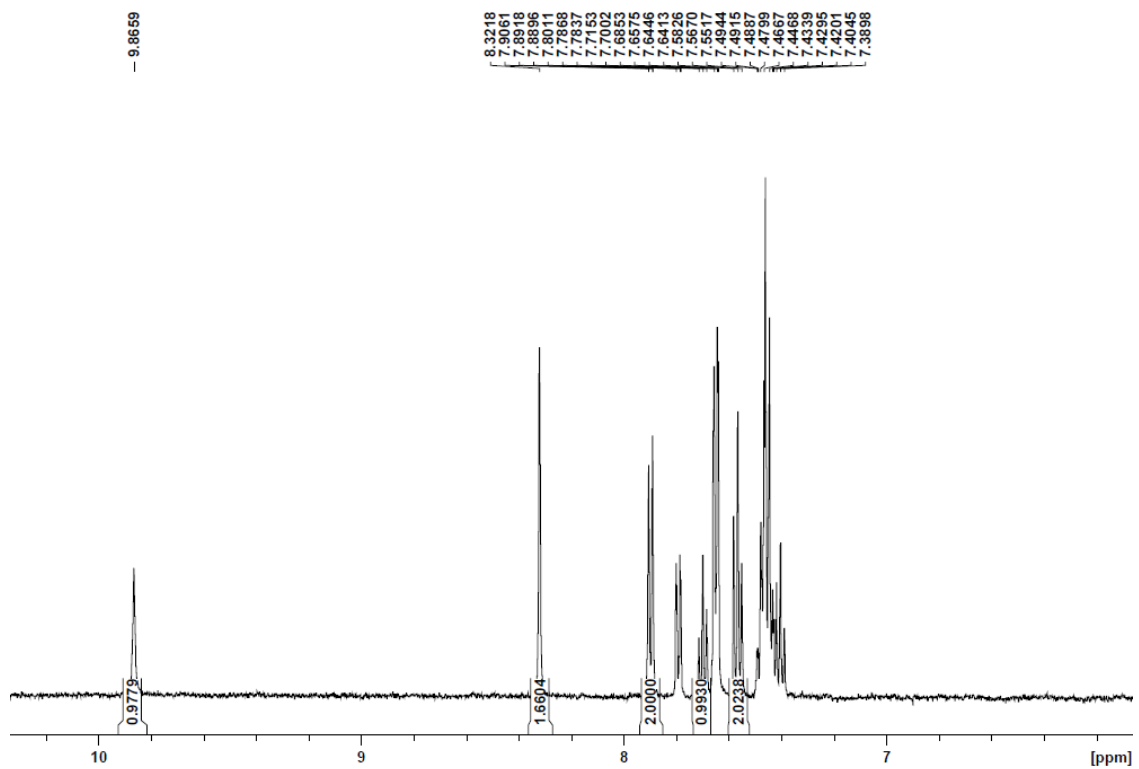


Abbildung 7.17: ^1H -NMR Spektrum von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin bei pH 8,6 und 23°C.

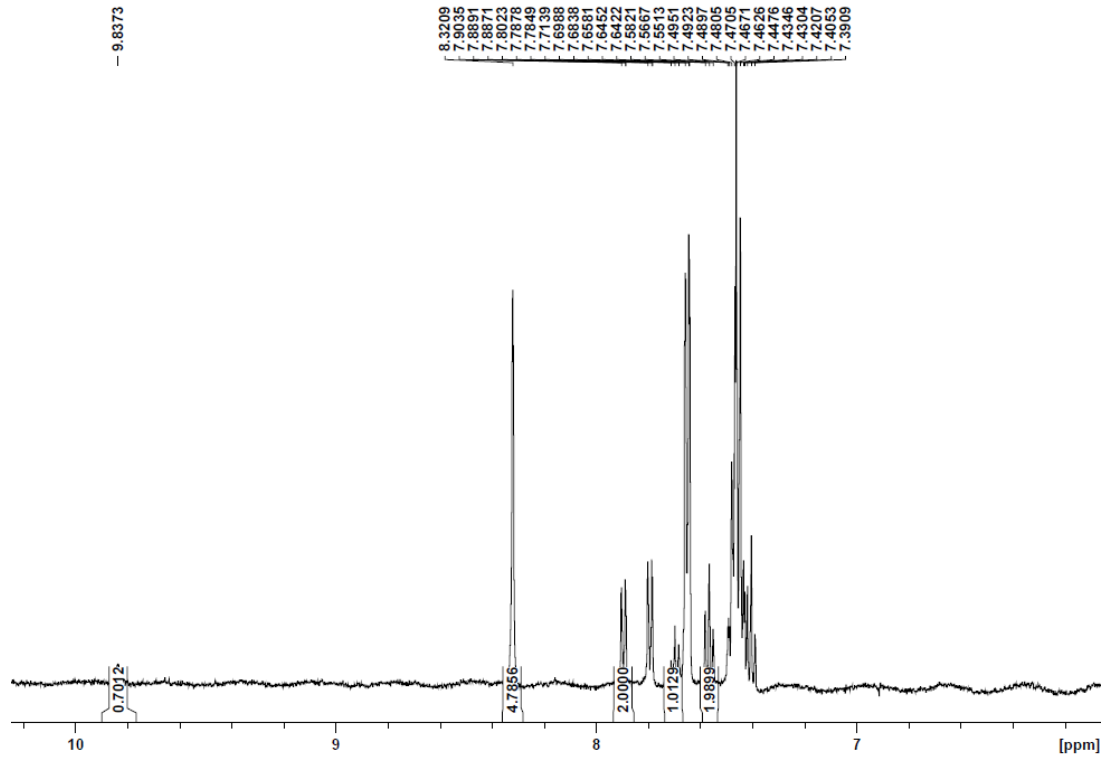


Abbildung 7.18: ^1H -NMR Spektrum von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin bei pH 9,0 und 23°C.

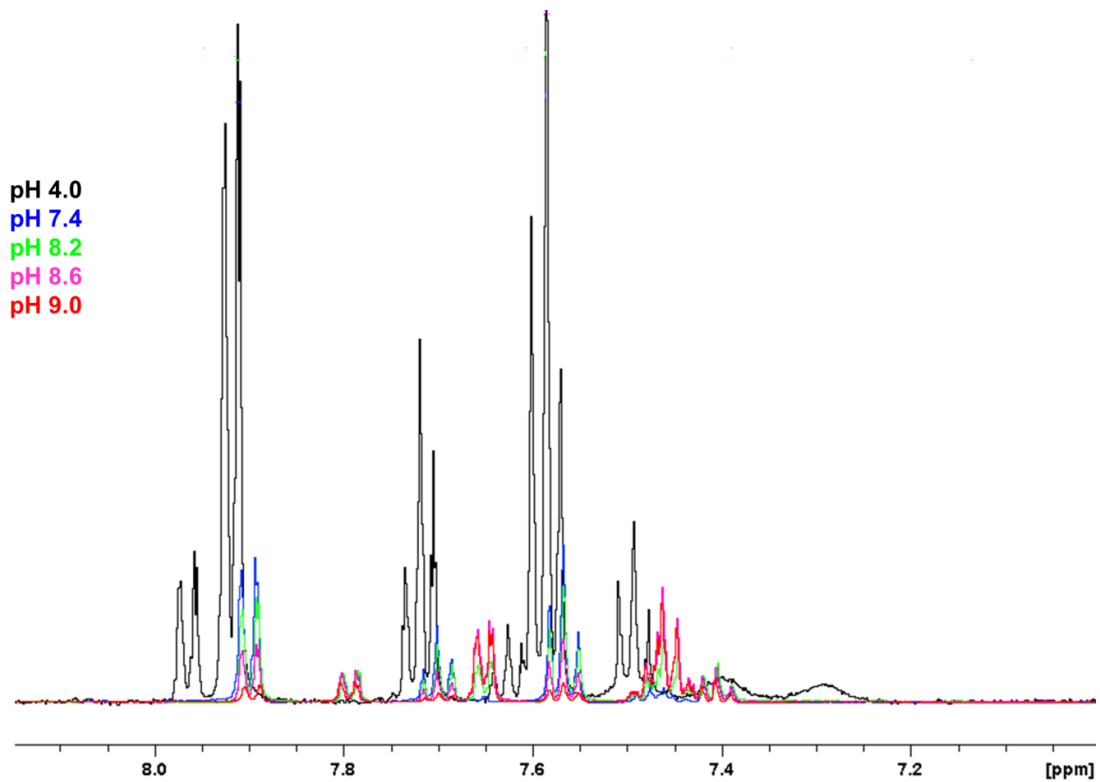


Abbildung 7.19: Überlagerung der ^1H -NMR Spektren für das aromatische Protonen-Signal nach Einsatz von 10 mM Benzaldehyd und 500 mM Methylamin bei unterschiedlichen pH-Werten (4,0 bis 9,0). Das Aromatensignal verschiebt sich aufgrund der Iminbildung.

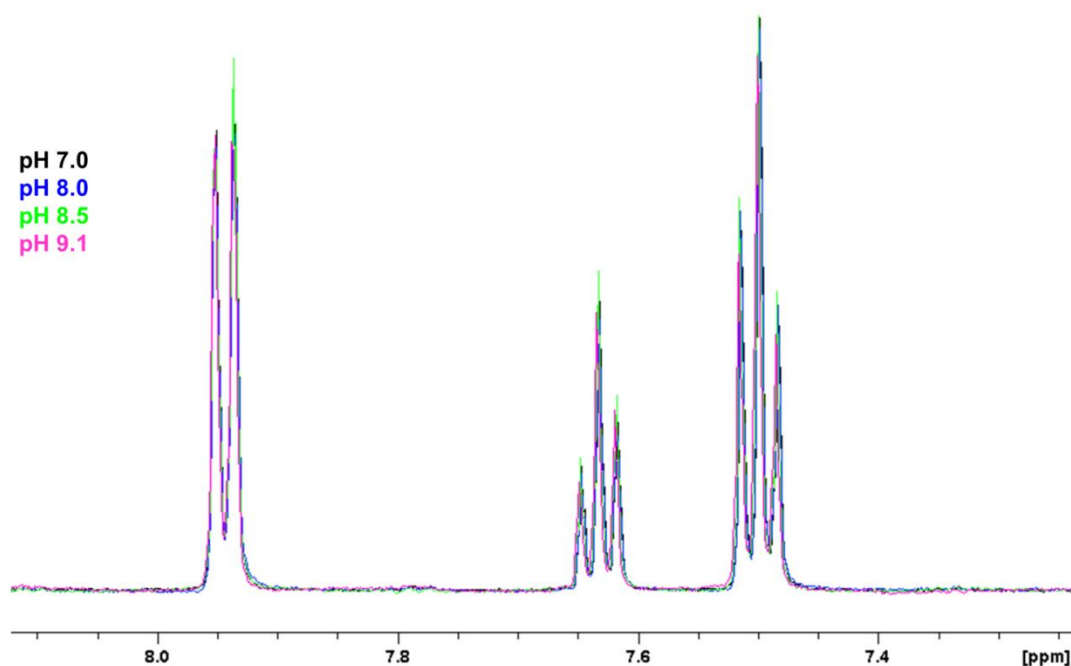


Abbildung 7.20: Überlagerung der ¹H-NMR Spektren für das aromatische Protonen-Signal nach Einsatz von 10 mM Acetophenon und 500 mM Methylamin bei unterschiedlichen pH-Werten (7,0 bis 9,1). Unabhängig vom pH-Wert konnte keine Signalverschiebung beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Iminkonzentration unter dem Detektionslimit von 500 μ M liegt.

7.5 Positivkontrolle der *in vitro* Expression

Um zu überprüfen, ob die *in vitro* Expression des *R*-IRED-*Sr* Templates erfolgreich war, wurden Biotransformationen mit 3,4-Dihydroisoquinolin (DHQ) als Model-Substrat angesetzt und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe 3.7.3). Das verwendete Färbereagenz Ninhydrin färbt das Amin-Produkt 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin gelb während das eingesetzte Imin-Substrat keine Farbreaktion auslöst (Abbildung 7.21, Spur 1 und 2). Nach 24 h konnte ein deutlicher Umsatz zum entsprechenden Amin-Produkt detektiert werden (Abbildung 7.21, Spur 4-6). Eine durch die im *in vitro* Expressions-Kit enthaltenen Komponenten ausgelöste Farbreaktion konnte durch Auftragen einer 0 h-Probe ausgeschlossen werden (Abbildung 7.21, Spur 3).

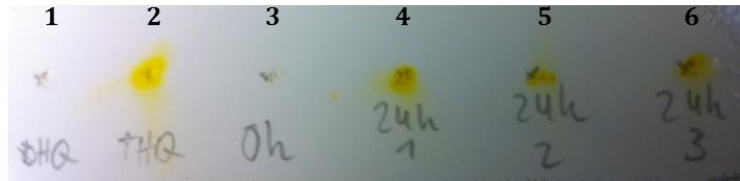


Abbildung 7.21: Dünnschichtchromatographie nach Biotransformationen mit in vitro exprimiertem Enzym (R-IRED-Sr). DHQ: 3,4-Dihydroisoquinolin, Substrat. THQ: 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin, Produkt.

7.6 Bestimmung kinetischer Parameter

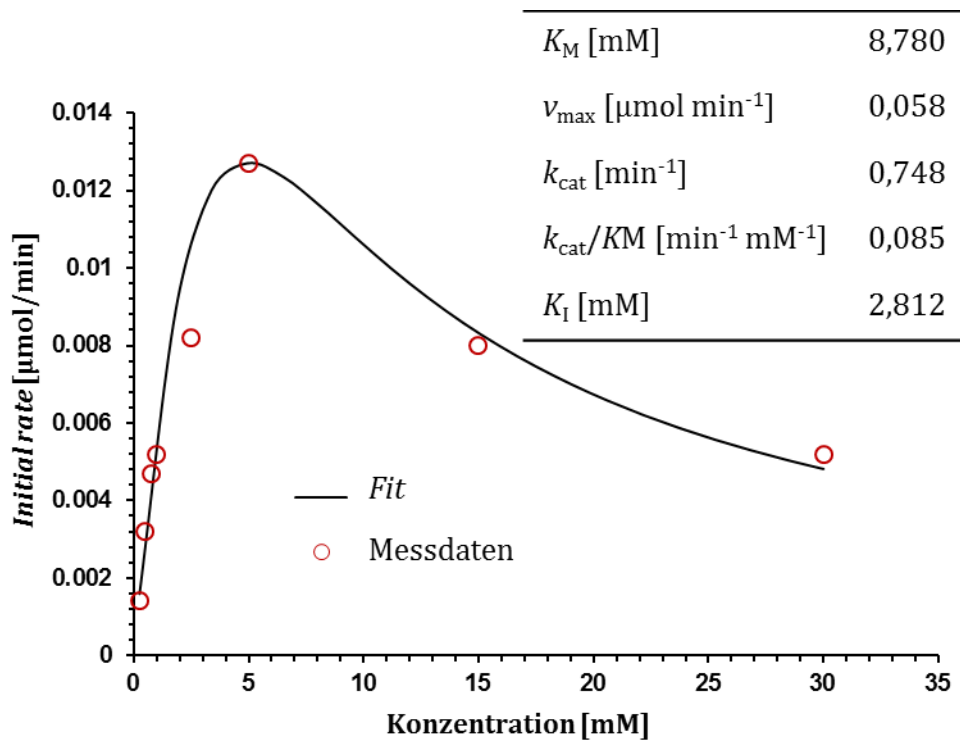


Abbildung 7.22: Michaelis-Menten-Kinetik zur Bestimmung der kinetischen Parameter von R-IRED-Sr für 2,2,2-Trifluoroacetophenon.

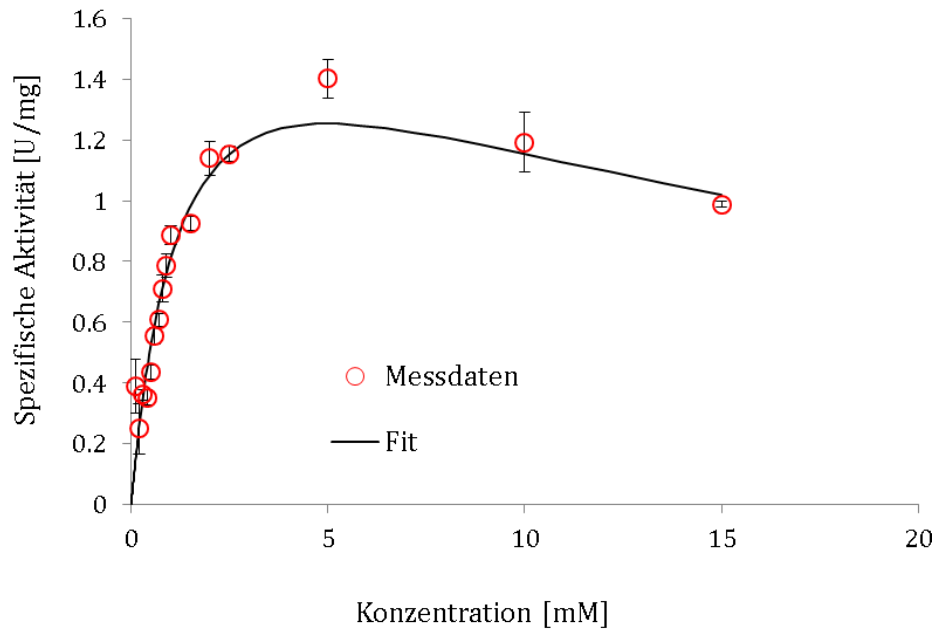


Abbildung 7.23: Michaelis-Menten-Kinetik zur Bestimmung der kinetischen Parameter von *R-IREd-Sr* für 2-Methylpyrrolin.

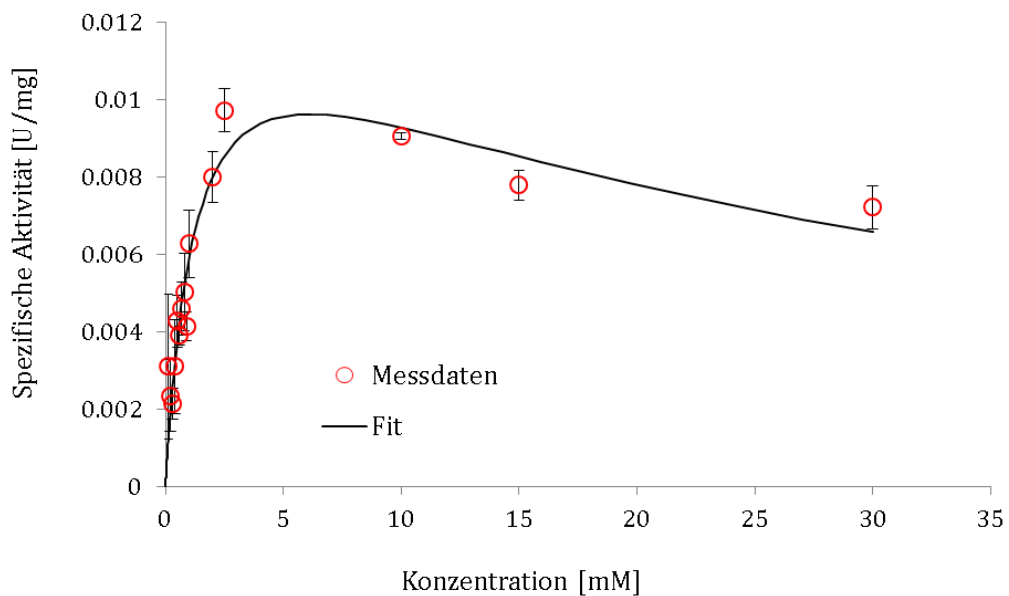


Abbildung 7.24: Michaelis-Menten-Kinetik zur Bestimmung der kinetischen Parameter von β HADA_{t_K170D} für 2-Methylpyrrolin.

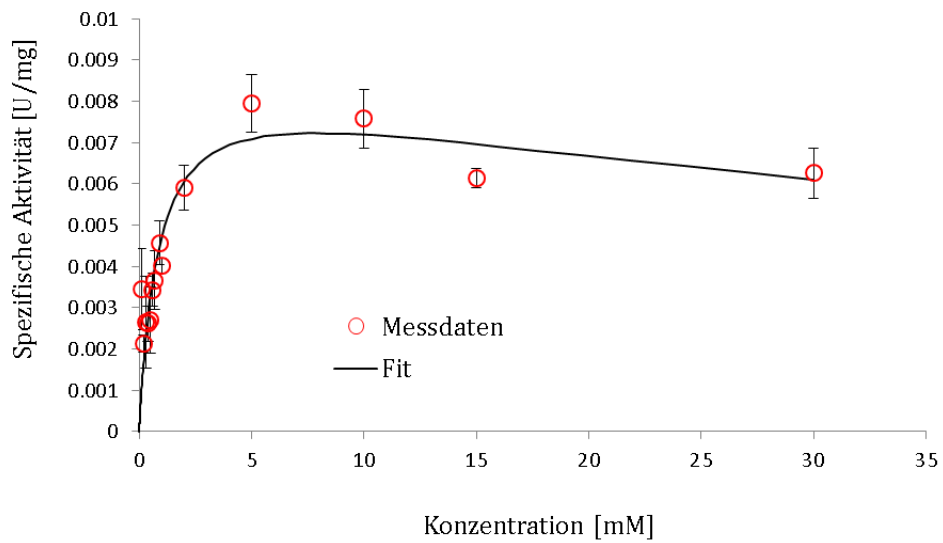


Abbildung 7.25: Michaelis-Menten-Kinetik zur Bestimmung der kinetischen Parameter von β HADAt_K170F für 2-Methylpyrrolin.

7.7 Tertiärstruktur der bearbeiteten Enzyme im Vergleich

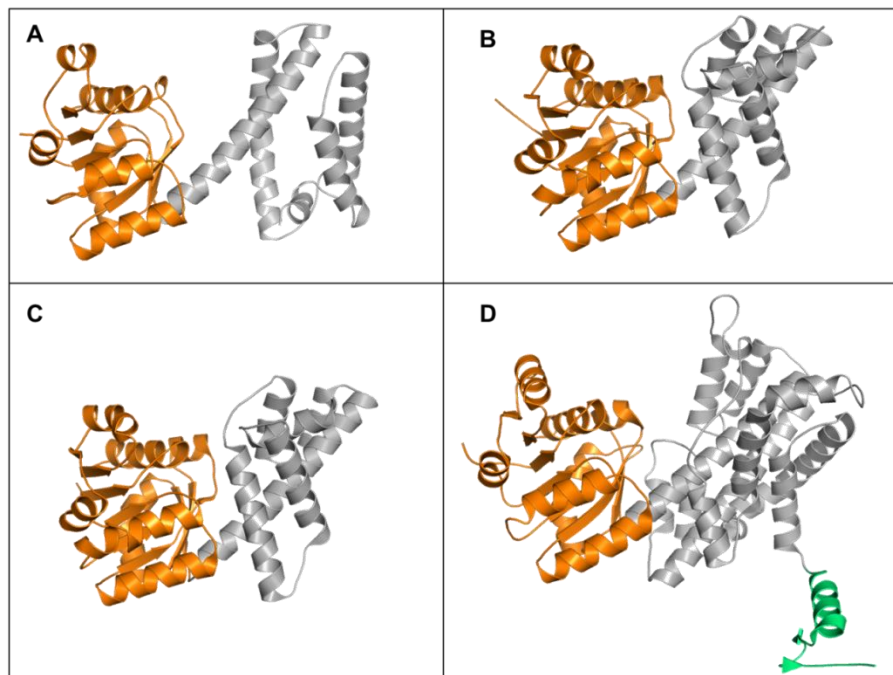


Abbildung 7.26: Nicht-aktive, monomere Untereinheiten der untersuchten Enzyme mit der für alle beschriebenen *Rossmann fold* in orange und der helikalen C-terminale Domäne in grau. **A.** *R-IRED-Sr* (pdb|5OCM). **B.** β HADAt (pdb|3DOJ). **C.** β HADGm (pdb|3PEF). **D.** β HADLal (pdb|2IYP). Die für β HADLal beschriebene dritte Domäne ist in grün dargestellt.

7.8 Überprüfung der Expression aller β HAD Varianten

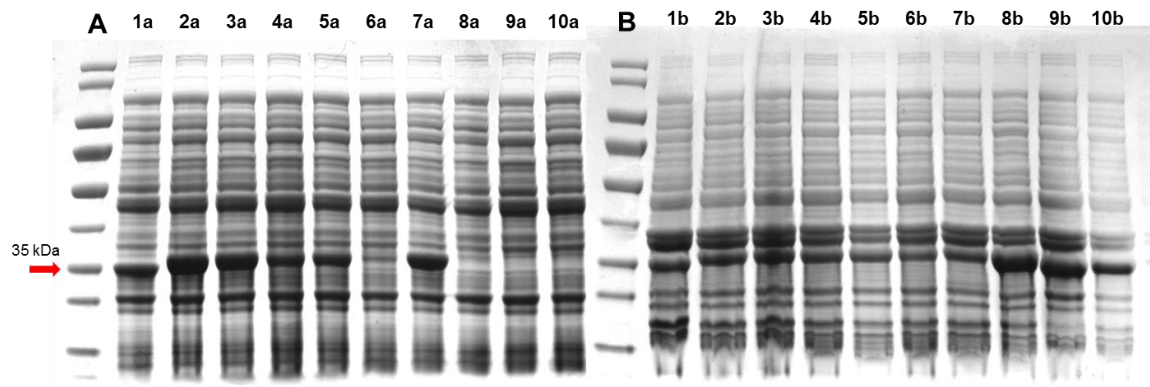


Abbildung 7.27: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von β HADAt Wildtyp-Enzym und Varianten. 1. *R*-IRED-*Sr* Wildtyp 2. β HADAt Wildtyp 3. β HADAt_K170D 4. β HADAt_K170F 5. β HADAt_K170Y 6. β HADAt_N174L 7. β HADAt_S121M 8. β HADAt_K170D_N174L 9. β HADAt_K170F_N174L 10. β HADAt_K170Y_N174L A/a. Zelllysate B/b. Zellpellet nach mechanischem Zellaufschluss. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 32,6 kDa für *R*-IRED-*Sr* und 33,0 kDa für β HADAt. Die Bande des verwendeten Größenstandards bei 35 kDa ist als Referenz mit einem roten Pfeil markiert.

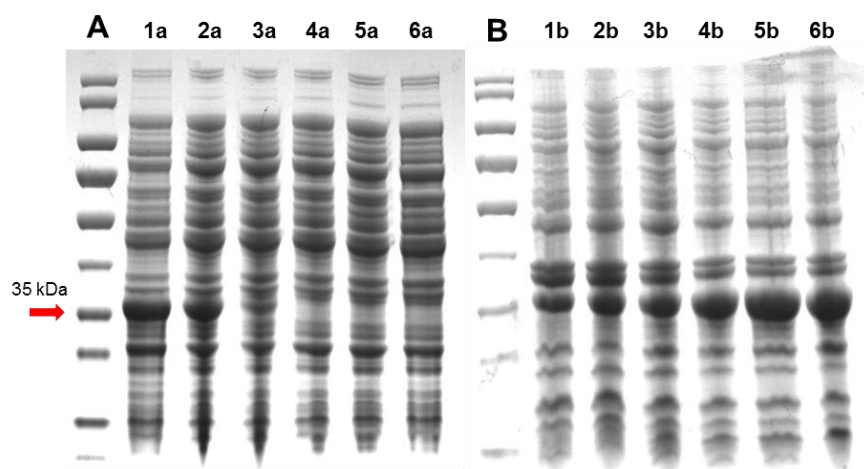


Abbildung 7.28: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von β HADGm Wildtyp-Enzym und Varianten. 1. β HADGm Wildtyp 2. β HADGm_K171D 3. β HADGm_K171F 4. β HADGm_N175L 5. β HADGm_K171D_N175L 6. β HADGm_K171F_N175L A/a. Zelllysate B/b. Zellpellet nach mechanischem Zellaufschluss. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 33,0 kDa für β HADGm. Die Bande des verwendeten Größenstandards bei 35 kDa ist als Referenz mit einem roten Pfeil markiert.

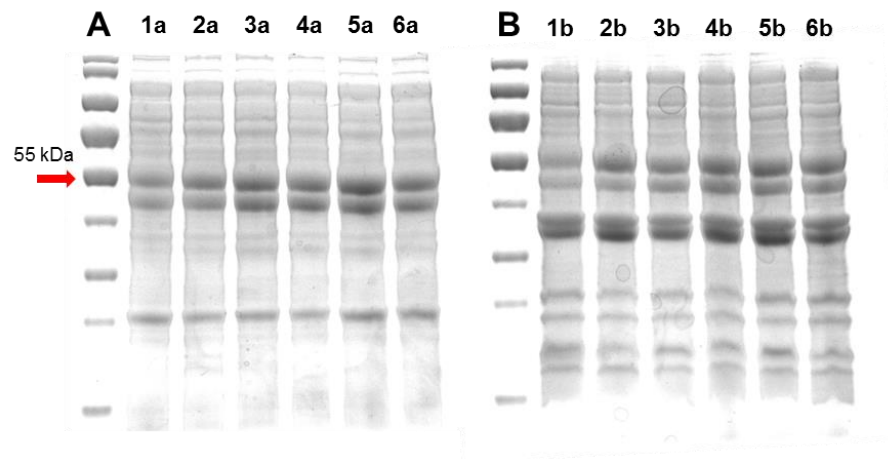


Abbildung 7.29: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von β HADLal Wildtyp-Enzym und Varianten. 1. β HADLal Wildtyp 2. β HADLal_K184D 3. β HADLal_K184F 4. β HADLal_N188L 5. β HADLal_K184D_N188L 6. β HADLal_K184F_N188L A/a. Zelllysat B/b. Zellpellet nach mechanischem Zellaufschluss. Das erwartete Molekulargewicht beträgt 59,0 kDa für β HADLal. Die Bande des verwendeten Größenstandards bei 55 kDa ist als Referenz mit einem roten Pfeil markiert.

8 Literaturverzeichnis

- [1] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [2] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–94.
- [3] B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187–193.
- [4] G. W. Huisman, S. J. Collier, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 284–292.
- [5] C. Syldatk, B. Hauer, O. May, *Biospektrum* **2001**, *2*, 145–147.
- [6] H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 221–228.
- [7] P. Lorenz, J. Eck, *Nature* **2005**, *3*, 510–516.
- [8] G. Kiss, N. Çelebi-Ölçüm, R. Moretti, D. Baker, K. N. Houk, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 5700–5725.
- [9] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 4372–4373.
- [10] Y. Kipnis, D. Baker, *Protein Sci.* **2012**, *21*, 1388–1395.
- [11] A. Bhowmick, S. C. Sharma, T. Head-Gordon, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5793–5800.
- [12] O. Khersonsky, G. Kiss, D. Rothlisberger, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. Baker, D. S. Tawfik, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 10358–10363.
- [13] N. Preiswerk, T. Beck, J. D. Schulz, P. Milovnik, C. Mayer, J. B. Siegel, D. Baker, D. Hilvert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 8013–8.
- [14] M. D. Toscano, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Angew. Chemie* **2007**, *119*, 3274–3300.
- [15] P. C. Babbitt, M. S. Hasson, J. E. Wedekind, D. R. J. Palmer, W. C. Barrett, G. H. Reed, I. Rayment, D. Ringe, G. L. Kenyon, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **1996**, *35*, 16489–16501.
- [16] M. E. Glasner, J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 492–497.
- [17] O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498–508.
- [18] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351–3367.
- [19] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032–6040.
- [20] K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231–238.
- [21] R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409–425.
- [22] G. A. Petsko, G. L. Kenyon, J. A. Gerlt, D. Ringe, J. W. Kozarich, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 372–376.
- [23] C. A. Orengo, D. T. Jones, J. M. Thornton, *Nature* **1994**, *372*, 631–634.
- [24] M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, I. Lavandera, A. A. Orden, V. Gotor, *Adv. Synth.*

- Catal.* **2009**, *351*, 1842–1848.
- [25] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science (80-.)*. **2013**, *339*, 307–10.
- [26] H. Renata, Z. J. Wang, R. Z. Kitto, F. H. Arnold, *Catal Sci Technol.* **2014**, *4*, 3640–3643.
- [27] S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science (80-.)*. **2016**, *354*, 1048–1051.
- [28] S. C. Hammer, A. Marjanovic, J. M. Dominicus, B. M. Nestl, B. Hauer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *11*, 121–126.
- [29] S. A. Bastian, S. C. Hammer, N. Kreß, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemCatChem* **2017**, DOI 10.1002/cctc.201700734.
- [30] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471–505.
- [31] P. C. Babbitt, J. Gerlt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30591–30594.
- [32] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. a Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 3070–95.
- [33] K. Peter, C. Vollhart, N. E. Shore, *Organische Chemie*, Wiley-VHC Verlag GmbH, Weinheim, **2011**.
- [34] D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2013**, *57*, 284–300.
- [35] J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655–1685.
- [36] L. M. Jarvis, *Chem. Eng. News* **2016**, *94*, 12–17.
- [37] W. Li, X. Zhang, Eds. , *Stereoselective Formation of Amines*, Springer, Berlin Heidelberg, **2014**.
- [38] M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
- [39] T. C. Nugent, M. El-Shazly, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 753–819.
- [40] V. N. Wakchaure, R. R. Mohanty, A. J. Shaikh, T. C. Nugent, *European J. Org. Chem.* **2007**, 959–964.
- [41] W. Kroutil, E. Fischereeder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Siirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751–759.
- [42] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824.
- [43] W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, *Science (80-.)*. **2010**, *329*, 305–310.
- [44] T. Li, J. Liang, A. Ambrogelly, T. Brennan, G. Gloor, G. Huisman, J. Lalonde, A. Lekhal, B. Mijts, S. Muley, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6467–6472.
- [45] P. Matzel, M. Gand, M. Höhne, *Green Chem.* **2017**, *19*, 385–389.
- [46] A. Gloge, J. Zon, A. Kovari, L. Poppe, J. Rétey, *Chem-Eur J* **2000**, *6*, 3386–3390.
- [47] C. K. Prier, R. K. Zhang, A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen, F. H. Arnold, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 629–634.

- [48] F. Balkenhohl, K. Dietrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. für Prakt. Chemie Chem.* **1997**, *339*, 381–384.
- [49] H. Ismail, R. M. Lau, F. Van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1511–1516.
- [50] U. Karl, S. Andrea, *Chem. today* **2009**, *27*, 66–69.
- [51] D. Ghislieri, A. P. Green, M. Pontini, S. C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863–9.
- [52] R. S. Heath, M. Pontini, S. Hussain, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 117–120.
- [53] M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarium, *Angew. Chemie* **2012**, *51*, 3969–72.
- [54] T. Knaus, W. Böhmer, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2017**, *19*, 453–463.
- [55] J. R. Schnell, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, *33*, 119–140.
- [56] T. Winzer, M. Kern, A. J. King, T. R. Larson, R. I. Teodor, S. L. Donninger, Y. Li, A. A. Dowle, J. Cartwright, R. Bates, et al., *Plant Sci.* **2015**, *349*, 309–312.
- [57] J. Mangas-sanchez, S. P. France, S. L. Montgomery, G. A. Aleku, H. Man, M. Sharma, J. I. Ramsden, G. Grogan, N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 19–25.
- [58] K. Mitsukura, M. Suzuki, K. Tada, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4533–5.
- [59] K. Mitsukura, M. Suzuki, S. Shinoda, T. Kuramoto, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1778–82.
- [60] K. Mitsukura, T. Kuramoto, T. Yoshida, N. Kimoto, H. Yamamoto, T. Nagasawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8079–86.
- [61] D. Wetzl, M. Berrera, N. Sandon, D. Fishlock, M. Ebeling, M. Müller, S. P. Hanlon, B. Wirz, H. Iding, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1749–1756.
- [62] G.-D. Roiban, M. Kern, Z. Liu, J. Hyslop, P. Lyn Tey, M. S. Levine, L. S. Jordan, K. Brown, T. Hadi, L. A. F. Ihnken, et al., *ChemCatChem* **2017**, DOI 10.1002/cctc.201701379.
- [63] S. Hussain, F. Leipold, H. Man, E. Wells, S. P. France, K. R. Mulholland, G. Grogan, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 579–583.
- [64] S. P. France, S. Hussain, A. M. Hill, L. J. Hepworth, R. M. Howard, K. R. Mulholland, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3753–3759.
- [65] M. Rodríguez-Mata, A. Frank, E. Wells, F. Leipold, N. J. Turner, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1372–1379.
- [66] P. N. Scheller, S. Fademrecht, S. Hofelzer, J. Pleiss, F. Leipold, N. J. Turner, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2201–2204.
- [67] P. N. Scheller, B. M. Nestl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 10509–10520.
- [68] M. Gand, H. Müller, R. Wardenga, M. Höhne, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2014**, *110*, 126–132.

- [69] G. A. Aleku, S. P. France, H. Man, J. Mangas-Sanchez, S. L. Montgomery, M. Sharma, F. Leipold, S. Hussain, G. Grogan, N. J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, DOI 10.1038/NCHEM.2782.
- [70] N. Borlinghaus, B. Nestl, *ChemCatChem* **2017**, DOI 10.1002/cctc.201701194.
- [71] F. Leipold, S. Hussain, D. Ghislieri, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3505–3508.
- [72] T. Huber, L. Schneider, A. Präg, S. Gerhardt, O. Einsle, M. Müller, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 2248–2252.
- [73] Z. Maugeri, D. Rother, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 2745–2750.
- [74] H. Man, E. Wells, S. Hussain, F. Leipold, S. Hart, J. P. Turkenburg, N. J. Turner, G. Grogan, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1052–1059.
- [75] H. Li, Z.-J. Luan, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1692–1696.
- [76] G. A. Aleku, H. Man, S. P. France, F. Leipold, S. Hussain, L. Toca-, R. Marchington, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, et al., *ACS Catal* **2016**, *6*, 3880–3889.
- [77] N. K. Lokanath, N. Ohshima, K. Takio, I. Shiromizu, C. Kuroishi, N. Okazaki, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, M. Miyano, N. Kunishima, *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 905–917.
- [78] S. Fademrecht, P. N. Scheller, B. M. Nestl, B. Hauer, J. Pleiss, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2016**, *84*, 600–610.
- [79] G. Garweg, D. von Rehren, U. Hintze, *J. Neurochem.* **1980**, *35*, 616–621.
- [80] J. K. B. Cahn, C. A. Werlang, A. Baumschlager, S. Brinkmann-Chen, S. L. Mayo, F. H. Arnold, *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 326–333.
- [81] M. Lenz, N. Borlinghaus, L. Weinmann, B. M. Nestl, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 199.
- [82] P. N. Scheller, M. Lenz, S. C. Hammer, B. Hauer, B. M. Nestl, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3239–3242.
- [83] C. Wang, J. Xiao, in *Stereoselective Form. Amin.*, **2014**, pp. 261–282.
- [84] H. Chen, J. Moore, S. J. Lier, *Engineerd Imine Reductases and Methods for the Reductive Amination of Ketone and Amine Compounds*, **2013**, WO 2013/170050 Al.
- [85] D. Wetzl, M. Gand, A. Ross, H. Müller, P. Matzel, S. P. Hanlon, M. Müller, B. Wirz, M. Höhne, H. Iding, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 2023–2026.
- [86] Z. Maugeri, D. Rother, *J. Biotechnol.* **2017**, DOI 10.1016/j.jbiotec.2017.05.015.
- [87] S. P. France, R. M. Howard, J. Steflik, N. J. Weise, J. Mangas-Sanchez, S. L. Montgomery, R. Crook, R. Kumar, N. J. Turner, **2017**, Submitted.
- [88] G. Grogan, N. J. Turner, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 1–9.
- [89] P. N. Scheller, Characterization and Application of Novel Imine Reductases – Versatile Enzymes for the Synthesis of Chiral Amines, Stuttgart, **2016**.
- [90] Guzman, L.-M, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, *J Bacteriol* **1995**, *177*, 4121–4130.

- [91] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 1–11.
- [92] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction*, **1986**.
- [93] D. G. Gibson, L. Young, R. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 343–5.
- [94] C. Mühlhardt, *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [95] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 1513–1523.
- [96] F. Sanger, S. Nicklen, *Pnas* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [97] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580.
- [98] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, *Gene* **1990**, *96*, 23–28.
- [99] A. S. Spirin, J. R. Swartz, Eds., *Cell-Free Protein Synthesis*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2008**.
- [100] Y. Shimizu, a Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751–5.
- [101] Y. Shimizu, Y. Kuruma, T. Kanamori, T. Ueda, in *Cell-Free Protein Synth. Methods Protoc.* (Eds.: K. Alexandrov, W.A. Johnston), Springer Science+Business Media, **2014**, pp. 275–284.
- [102] H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, F. Schäfer, in *Methods Enzymol.* (Eds.: R.R. Burgess, M.P. Deutscher), Elsevier Inc., **2009**, pp. 439–473.
- [103] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, a K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.
- [104] U. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [105] H. J. Chial, A. G. Splittgerber, *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 362–369.
- [106] L. Michaelis, M. L. Menten, R. S. Goody, K. A. Johnson, *Biochemistry* **1913**, *49*, 333–369.
- [107] G. E. Briggs, J. B. S. Haldane, *Biochem. J.* **1925**, *19*, 338–339.
- [108] S. Hofelzer, Charakterisierung Neuer Mitglieder Der Familie Der Iminreduktasen, Stuttgart, **2014**.
- [109] M. Lenz, P. N. Scheller, S. M. Richter, B. Hauer, B. M. Nestl, *Protein Expr. Purif.* **2016**, *133*, 199–204.
- [110] A. S. Bommarius, B. R. Riebel, *Biocatalysis*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2004**.
- [111] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2011**.
- [112] K. Mikkelsen, S. O. Nielsen, **1960**, *64*, 632–637.
- [113] H. J. Wijma, R. J. Floor, P. A. Jekel, D. Baker, S. J. Marrink, D. B. Janssen, *Protein Eng. Des. Sel.* **2014**, *27*, 49–58.
- [114] P. M. Heinemann, Erhöhung Der Thermostabilität von Iminreduktasen,

- Stuttgart, **2016**.
- [115] R. Schöck, Optimierung Und Charakterisierung Der Thermostabilität Der Iminreduktase Aus Streptosporangium Roseum, Stuttgart, **2017**.
- [116] J. E. Nettleship, J. Brown, M. R. Groves, A. Geerlof, *Methods Mol. Biol.* **2008**, *426*, 299–318.
- [117] S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, *Protein Expr. Purif.* **2013**, *91*, 192–206.
- [118] M. Lenz, J. Meisner, L. Quertinmont, S. Lutz, J. Kästner, B. Nestl, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 253–256.
- [119] M. Lenz, S. Fademrecht, M. Sharma, J. Pleiss, G. Grogan, B. M. Nestl, manuscript accepted in *Protein Engineering, Design and Selection (PEDS)*, **2018**.
- [120] L. Holm, C. Sander, *Trends Biochem Sci* **1995**, *20*, 478–480.
- [121] S. C. Fademrecht, Systematische Analyse von Familienspezifischen Proteindatenbanken Für Die Biotechnologische Anwendung, Stuttgart, **2015**.
- [122] G. J. Hoover, O. R. Van Cauwenberghe, K. E. Breikreuz, S. M. Clark, a. R. Merrill, B. J. Shelp, *Can. J. Bot.* **2007**, *85*, 883–895.
- [123] G. J. Hoover, R. Jørgensen, A. Rochon, V. S. Bajwa, A. R. Merrill, B. J. Shelp, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 2663–2671.
- [124] Y. Zhang, Y. Zheng, L. Qin, S. Wang, G. W. Buchko, R. M. Garavito, *Biochimie* **2014**, *104*, 61–69.
- [125] S. B. Needleman, C. D. Wunsch, *J. Mol. Biol.* **1970**, *48*, 443–453.
- [126] R. Sundaramoorthy, J. Iulek, M. P. Barrett, O. Bidet, G. F. Ruda, I. H. Gilbert, W. N. Hunter, *FEBS J.* **2007**, *274*, 275–286.
- [127] M. Sharma, J. Mangas-Sanchez, N. J. Turner, G. Grogan, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2011–2025.
- [128] S. A. Löw, I. M. Löw, M. J. Weissenborn, B. Hauer, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 911–915.
- [129] R. Appel, S. Chelli, T. Tokuyasu, K. Troshin, H. Mayr, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6579–6587.
- [130] U. Oppermann, C. Filling, M. Hult, N. Shafqat, X. Wu, M. Lindh, J. Shafqat, E. Nordling, Y. Kallberg, B. Persson, et al., *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *144*, 247–253.
- [131] D. S. Auld, T. Bergman, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3961–3970.
- [132] T. Matsuda, R. Yamanaka, K. Nakamura, *Tetrahedron Asymmetry* **2009**, *20*, 513–557.
- [133] B. P. Schlegel, J. M. Jez, T. M. Penning, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3538–3548.
- [134] C. Filling, K. D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jörnvall, U. Oppermann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25677–25684.
- [135] D. Zhu, Y. Yang, L. Hua, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4202–4205.
- [136] H. G. Naik, B. Yeniad, C. E. Koning, A. Heise, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4961.
- [137] C. Rodríguez, W. Borzęcka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 673–81.

- [138] S. Roth, A. Präg, C. Wechsler, M. Marolt, S. Ferlaino, S. Lüdeke, N. Sandon, D. Wetzl, H. Iding, B. Wirz, et al., *ChemBioChem* **2017**, DOI 10.1002/cbic.201700261.
- [139] R. K. Njau, C. A. Herndon, J. W. Hawes, *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *132*, 785–791.
- [140] H. Kries, L. Caputi, C. E. M. Stevenson, M. O. Kamileen, N. H. Sherden, F. Geu-Flores, D. M. Lawson, S. E. O'Connor, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *12*, 6–8.
- [141] D. M. Z. Schmidt, E. C. Mundorff, M. Dojka, E. Bermudez, J. E. Ness, S. Govindarajan, P. C. Babbitt, J. Minshull, J. A. Gerlt, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8387–8393.
- [142] P. Laurino, Á. Tóth-Petróczy, R. Meana-Pañeda, W. Li, D. G. Truhlar, D. S. Tawfik, *PLOS Biol.* **2016**, 1–23.
- [143] S. K. Padhi, R. Fujii, G. A. Legatt, S. L. Fossum, R. Berchtold, R. J. Kazlauskas, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 863–871.
- [144] J. D. Bloom, P. A. Romero, Z. Lu, F. H. Arnold, *Biol. Direct* **2007**, *2*, 7–10.

CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name Maike Lenz
Geburtsdaten 21.09.1987 in Ulm
Nationalität Deutsch

UNIVERSITÄRE UND SCHULISCHE AUSBILDUNG

10/2014 - 12/2017 **Promotion am Institut für Technische Biochemie bei
Professor Dr. Bernhard Hauer**
Universität Stuttgart
Doktorarbeit: Studien zur katalytischen Promiskuität von Imin-
reduzierenden Enzymen

10/2010 - 09/2013 **Master of Science „Enzym-Biotechnologie“**
Universität Hohenheim, Stuttgart
Masterarbeit: Screening nach Enzymen für die D-Tagatose-
Biotransformation

10/2007 – 08/2010 **Bachelor of Science „Lebensmittelwissenschaft und
Biotechnologie“**
Universität Hohenheim, Stuttgart
Bachelorarbeit: Charakterisierung neuer industrierelevanter
β-Galactosidasen aus dem Metagenom

09/1998 – 07/2007 **Abitur** am Joachim-Hahn-Gymnasium, Blaubeuren

PRAKTIKUM

02/2014 – 09/2014 Industriepraktikum bei DuPont Industrial Biosciences/ Nutrition
and Health im Bereich Forschung und Entwicklung, Aarhus,
Dänemark

05/2012 – 09/2012 Industriepraktikum bei der Firma evocatal, Düsseldorf im Bereich
Forschung und Entwicklung (mittlerweile evoxx technologies
GmbH, Monheim am Rhein)