

# **Untersuchungen zur Bestimmung des inhärenten katalytischen Potentials von Metall-bindenden Enzymen**

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

Vorgelegt von  
Dennis Wetzl  
aus Wernau (Neckar)

Hauptberichter : Prof. Dr. Bernhard Hauer

Mitberichter : Prof. Dr. Bernd Plietker

Vorsitzender : Prof. Dr. Albert Jeltsch

Tag der Verteidigung: 06.11.2014

**Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart**

**- 2014 -**

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit Titel „Untersuchungen zur Bestimmung des inhärenten katalytischen Potentials von Metall-bindenden Enzymen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus versichere ich, dass die hier vorgelegte Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

## **Declaration of Authorship**

I hereby certify that the dissertation entitled „Investigations on the inherent catalytic potential of metal-binding enzymes – A case study“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Wernau, den 28.05.2014

Dennis Wetzl

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am im Zeitraum vom Oktober 2010 bis Mai 2014 am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Hauer für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Dissertation. Dabei möchte ich mich vor allem auch für die zahlreichen interessanten Diskussionen und Gespräche, sowie die vielfältigen Einblicke in die Welt der Wirtschaft bedanken.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bei Dr. Bettina Nestl bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und die durch zahlreiche Diskussionen maßgeblich mit am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Reinhard Sterner für die Überlassung des tHisF Plasmids, sowie Jennifer Bolsinger für die nette Kooperation und Juliane Stahmer für die Hilfe bei den Docking Arbeiten.

Besonderer Dank gilt dem „Team Kultur“ des ITB für schöne Opern-, Theater- und Konzertbesuche, sowie lustige Abende mit gutem Essen und interessanten Gesprächen.

Darüber hinaus möchte ich allen meinen Arbeitskollegen am Institut für Technische Biochemie für die stets freundschaftliche und offene Arbeitsatmosphäre am Institut danken.

Auch möchte ich mich bei Bettina Nestl, sowie Martin Weissenborn für Hilfe beim Korrekturlesen bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken die mich über die Jahre stets unterstützt haben und ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.



„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“

**Albert Einstein**



# Inhaltsverzeichnis

<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>7</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>11</b>
<b>KURZREFERAT</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>14</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>15</b>
1.1.    BIOKATALYSE .....	15
1.2.    ENZYM-PROMISKUITÄT.....	17
1.3.    ARTIFIZIELLE ENZYMKATALYSATOREN .....	20
1.4. $\alpha$ -KETOGLUTARAT-ABHÄNGIGE OXYGENASEN .....	23
1.4.1. <i>Taurin Dioxygenase</i> .....	26
1.5.    tHISF-BASIERTE KATALYSATOR SYSTEME .....	29
1.5.1. <i>Natürliches Vorkommen der tHisF</i> .....	29
1.5.2. <i>Natürlicher Mechanismus der tHisF</i> .....	31
1.5.3. <i>Alternative tHisF Systeme</i> .....	32
1.6.    ZIELSETZUNG UND MOTIVATION .....	34
<b>2. MATERIAL &amp; METHODEN</b> .....	<b>35</b>
2.1.    MATERIALIEN.....	35
2.1.1. <i>Chemikalien</i> .....	35
2.1.2. <i>Biochemische Reagenzien &amp; Marker</i> .....	35
2.1.3. <i>Oligonukleotide (Primer)</i> .....	35
2.1.4. <i>Plasmide</i> .....	37
2.1.5. <i>E. coli-Stämme &amp; Genomische DNA</i> .....	39
2.1.6. <i>Kits</i> .....	39
2.1.7. <i>Software für das molekulare Docking</i> .....	39
2.1.8. <i>Medien &amp; Puffer</i> .....	40
2.2.    ANALYTISCHE METHODEN .....	43
2.2.1. <i>Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)</i> .....	43
2.2.2. <i>Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i> .....	44
2.3.    MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	49
2.3.1. <i>Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli (MiniPräp)</i> .....	49
2.3.2. <i>Herstellung RbCl-kompetenter Zellen</i> .....	49
2.3.3. <i>DNA Amplifikation per Polymerasekettenreaktion (PCR)</i> .....	49
2.3.4. <i>Überprüfung einer Gen-Insertion durch Kolonie-PCR</i> .....	50
2.3.5. <i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	51

2.3.6.	<i>Restriktionsverdau von DNA</i> .....	52
2.3.7.	<i>Ligation von DNA-Fragmenten mit der Hilfe der T4-DNA-Ligase</i> .....	52
2.3.8.	<i>Transformation kompetenter E. coli-Zellen</i> .....	53
2.3.9.	<i>Ortsgerichtete Mutagenese von Genen per Quik-Change PCR</i> .....	53
2.3.10.	<i>DNA-Sequenzierung</i> .....	54
2.4.	BIOCHEMISCHE METHODEN & AKTIVITÄTSTESTS.....	55
2.4.1.	<i>Proteinexpression in E. coli Zellen</i> .....	55
2.4.2.	<i>Zellaufschluss von E. coli Zellen</i> .....	56
2.4.3.	<i>Proteinaufreinigung</i> .....	56
2.4.4.	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i> .....	59
2.4.5.	<i>Aktivitätsbestimmung der TauD per Ellman's-Assay</i> .....	60
2.4.6.	<i>Umsetzungen der alternativen <math>\omega</math>-Aminocarbonsäuren</i> .....	62
2.4.7.	<i>Bestimmung der 2-Aminoethanphosphonsäure per Derivatisierung mit Fluorescamin und anschließender Fluoreszenzmessung</i> .....	63
2.4.8.	<i>Diels-Alder-Reaktionen mittels tHisF</i> .....	63
2.4.9.	<i>Michael-Addition mittels tHisF</i> .....	64
2.4.10.	<i>Aldolreaktion mittels tHisF</i> .....	65
2.4.11.	<i>Katalyse alternativer Reaktionen mittels TauD</i> .....	66
2.5.	SYNTHESEN.....	67
2.5.1.	<i>Synthese von L-2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure</i> .....	67
2.5.2.	<i>Synthese von L-2-Hydroxy-6-aminocaprinsäure</i> .....	68
2.5.3.	<i>Synthese von des Diels-Alder Produkts 44 des Azachalcons 42 und Cyclopentadien 43 als Referenz</i> .....	68
2.5.4.	<i>Synthese des Produkts der Aldolreaktion des Pyridincarbaldehyds mit Aceton</i> .....	70
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>71</b>
3.1.	AUSNUTZUNG DES KATALYTISCHEN POTENTIALS DER TAU <sub>D</sub> FÜR DIE HYDROXYLIERUNG ALTERNATIVER SUBSTRATE .....	71
3.1.1.	<i>Klonierung, Expression und Aufreinigung der TauD</i> .....	71
3.1.2.	<i>Bestimmung der Aktivität der TauD nach Eichhorn et al.</i> .....	72
3.1.3.	<i>Untersuchungen zur Substratpromiskuität der TauD</i> .....	72
3.1.4.	<i>Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der TauD</i> .....	90
3.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSNUTZUNG DES KATALYTISCHEN POTENTIALS METALLBINDENDER tHisF-VARIANTEN .....	92
3.2.1.	<i>Erstellen der tHisF Varianten HHD und NC basierend auf dem tHisF Wildtyp</i> .....	93
3.2.2.	<i>Verifikation der Diels-Alder Aktivität der tHisF Varianten HHD und NC nach Reetz et al.</i> .....	94
3.2.3.	<i>Untersuchungen zur tHisF katalysierten Michael-Addition basierend auf dem Azachalcon-System</i> .....	97



3.2.4.	<i>Untersuchungen zur Katalyse von Friedel-Crafts-Reaktionen und Nazarov-Zyklisierungen mittels Cu(II) enthaltender tHisF Varianten</i>	102
3.2.5.	<i>Untersuchungen zur tHisF katalysierten Aldolreaktion</i>	105
3.2.6.	<i>Untersuchungen zur Metallbindung der tHisF HHD und NC mittels Röntgenfluoreszenz</i>	114
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>117</b>
4.1.	AUSNUTZUNG DES KATALYTISCHEN POTENTIALS DER TAU D FÜR DIE HYDROXYLIERUNG ALTERNATIVER SUBSTRATE	118
4.1.1.	<i>Klonierung, Expression und Charakterisierung der Wildtyp TauD</i>	118
4.1.2.	<i><math>\alpha</math>-Hydroxylierung von Carbonsäuren und <math>\omega</math>-Aminocarbonsäuren durch Wildtyp TauD</i>	119
4.1.3.	<i>Klärung des Bindungsmodus der TauD mittels Mutanten</i>	120
4.1.4.	<i>Verbesserung der Umsetzung alternativer Substrate durch Mutation der Substratbindetasche</i>	122
4.1.5.	<i>Anwendbarkeit der <math>\alpha</math>-Hydroxylierung von <math>\omega</math>-Aminocarbonsäuren mittels TauD</i>	125
4.1.6.	<i>Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der TauD</i>	126
4.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSNUTZUNG DES KATALYTISCHEN POTENTIALS METALLBINDENDER THISF VARIANTEN	128
4.2.1.	<i>Untersuchungen zur Katalyse der Michael-Addition</i>	129
4.2.2.	<i>Untersuchungen zur Katalyse von Friedel-Crafts-Reaktionen und Nazarov-Zyklisierungen</i>	132
4.2.3.	<i>Untersuchungen zur tHisF katalysierten Aldolreaktion</i>	135
4.2.4.	<i>Untersuchungen zur Metallbindung in tHisF Varianten</i>	137
4.3.	PROBLEMATIK DER AUSBEUTUNG DES ALTERNATIVEN KATALYTISCHEN POTENTIALS VON ENZYMEN IM HINBLICK AUF DAS DESIGN NEUER ENZYMKATALYSATOREN	139
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>141</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>144</b>
6.1.	GENSEQUENZEN DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN ENZYME	144
6.1.1.	<i>TauD Wildtyp &amp; Varianten</i>	144
6.1.2.	<i>tHisF WT &amp; Varianten</i>	151
6.1.3.	<i>tHisF Aspartat Knock out Mutanten (Kapitel 3.2.5.1)</i>	153
6.1.4.	<i>tHisF Mutanten Phosphatbindestellen</i>	156
6.2.	EXPRESSION & AUFREINIGUNG	159
6.2.1.	<i>Äkta Aufreinigung der TauD per Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie</i>	159
6.2.2.	<i>Anionenaustauscherchromatographie der tHisF</i>	160
6.3.	LC-CHROMATOGRAMME	161
6.3.1.	<i>HPLC-ELSD Chromatogramme</i>	161
6.3.2.	<i>Umkehrphasen-HPLC zur Analyse derivatisierter zwitterionischer <math>\omega</math>-Aminocarbonsäuren mittels Fluoreszenz Messung</i>	163
6.3.3.	<i>LC-MS Chromatogramm der Michael-Additions-Reaktionen</i>	164

6.3.1.	<i>Chirale Analyse der tHisF-katalysierten Michael-Addition</i> .....	165
6.3.2.	<i>Chirale Analyse der tHisF-katalysierten Diels-Alder-Reaktion</i> .....	165
6.4.	GC/MS CHROMATOGRAMME .....	166
6.4.1.	<i>Umsetzungen der Aldolreaktion mit tHisF</i> .....	166
6.4.2.	<i>GC-MS Analyse der Friedel-Crafts Reaktionen</i> .....	168
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>169</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>180</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	Mikro
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bichinoninsäure
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ddH <sub>2</sub> O	Zweifach deionisiertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Mischung der vier Desoxyribonukleotidphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELSD	engl. Evaporative Light Scattering Detector
ESR	Elektronenspinresonanz
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
ImGP	Imidazol-Glycerolphosphat Synthase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
kD	Kilodalton
Kpi	Kaliumphosphat
LB	Luria-Bertani
nRIU	normal Refraction Index Unit (Brechungsindex Einheit)
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDB	Protein Data Bank
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TfB	Transformationspuffer
tHisF	HisF Synthase Untereinheit der ImGP aus <i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ü/N	Über Nacht

## Kurzreferat

In der hier vorgestellten Arbeit sollte, beispielhaft an zwei Modell-Systemen, untersucht werden ob und inwieweit man das katalytische Potential von Metalloenzymen nutzen kann, um alternative, sogenannte promiskuitive Reaktionen zu katalysieren. Dabei teilten sich die beiden Modell-Systeme, die Eisen-bindende Taurin Dioxygenase (TauD) und die artifizielle Kupfer-bindenden tHisF Varianten, eine HisHisAsp Triade als gemeinsames Strukturmotiv für die Koordination der Metallionen Eisen bzw. Kupfer.

Es konnte gezeigt werden, dass die natürliche Hydroxylierungsreaktion der TauD genutzt werden kann, um Carbonsäuren, die strukturell ähnlich zu den natürlichen Substraten sind, in  $\alpha$ -Position zu den entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxy-Carbonsäuren zu hydroxylieren. Dabei verlief die Hydroxylierung im Falle des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** mit guter Enantioselektivität zur Bildung von *D*-Isoserin **52** mit einem *ee*-Wert von 96 % bei einem mäßigen Umsatz von  $22,6 \pm 0,7$  %. Weiterhin konnten analoge  $\omega$ -Aminocarbonsäuren der Kettenlänge C4 - C6 mit dem TauD Wildtyp umgesetzt werden, wobei diese sowohl in Umsatz als auch *ee*-Werten der entsprechenden Produkte deutlich unter denen des  $\beta$ -Alanins **51** lagen. Anhand Struktur-basierter Untersuchungen konnte eine Variante der TauD erstellt werden, welche sowohl in Bezug auf Umsätze (Steigerung des Umsatzes von  $\beta$ -Alanin von  $22,6 \pm 0,7$  auf  $54,2 \pm 3,8$  %) als auch Enantioselektivitäten ( $10 \pm 1$  % auf  $> 96$  % bei  $\gamma$ -Aminobuttersäure) bezüglich der getesteten Substrate signifikant verbesserte Eigenschaften gegenüber dem Wildtyp aufwies. Die Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität zeigten, dass während TauD zur Katalyse alternativer Reaktionen wenig geeignet war und keine bzw. nur geringe Umsätze bezüglich der getesteten Modellreaktionen zeigte, tHisF mit zwei getesteten Modellreaktionen (der Michael-Addition und der Aldolreaktion) Umsetzungen zeigte. Jedoch konnte in weiterführenden Untersuchungen gezeigt werden, dass das artifizielle Metallzentrum der tHisF nicht an der Katalyse der entsprechenden Reaktionen beteiligt ist. So konnte im Falle der Michael-Addition gezeigt werden, dass die Reaktion weitgehend ohne Beteiligung des Enzyms sowie ohne Beteiligung des entsprechenden Metalls ablief. Die Aldolreaktion hingegen wird, analog zu entsprechenden Organokatalysatoren, von Lysin-Aminosäure-Seitenketten der tHisF katalysiert, welche sich an der Oberfläche des Enzyms befinden. Dies konnte anhand von Experimenten mit verschiedenen Varianten der tHisF, bei denen unterschiedliche mögliche reaktive Zentren per Mutagenese ausgeschaltet wurden, ermittelt werden.

## Abstract

In the work presented here, the catalytic potential of metal-binding enzymes concerning alternate, so-called promiscuous reactions, should be evaluated. Therefore, a case study with two different metal binding enzymes, the iron-binding taurine dioxygenase (TauD) and the artificially metal-binding tHisF variants formerly created by Reetz and his co-workers have been assayed in the catalysis of different model-reactions. Both enzymes share a common HisHisAsp motif for the coordination of the metals iron/copper.

It was found that the natural catalytic machinery of the TauD could be utilized to hydroxylate carboxylic acid substrates that are structurally related to the natural ones, but chemically distinct at their  $\alpha$ -position adjacent to the carboxylic acid. The hydroxylation reaction with the model substrate yielded product at a total conversion rate of  $22.6 \pm 0.7 \%$  with an enantiomeric excess of  $>96 \%$  of the corresponding product. Furthermore, higher homologues of the tested  $\omega$ -amino-carboxylic acid with chain lengths of C4 - C6 could also be converted by the wild type TauD, although at significantly lower rates and with lower enantiomeric excess in the products formed.

Based on the available structure, mutants were created and one variant was found to display significantly increased conversions for all substrates (e.g.  $\beta$ -alanine conversion increased from  $22.6 \pm 0.7$  to  $54.2 \pm 3.8 \%$ ) tested, as well as increased *ee*-values for those substrates previously not showing a pronounced enantiomeric excess ( $10 \pm 1 \%$  to  $> 96 \%$  *ee* for  $\gamma$ -aminobutyric acid conversion).

Investigations on the catalytic promiscuity have shown that, as no significant catalytic effect for the reactions tested, could be observed for the TauD, the tested reaction setup using the artificially copper-binding tHisF gave conversion for two of the tested reaction types, namely the Michael addition and the aldol reaction.

Thus further investigations did show, that for none of the reactions tested the artificial metal centre was involved in catalysis. Furthermore, the enzyme itself seems not to be involved in the catalysis of the Michael addition that gave significant conversions. For the aldol reaction, mutational studies did show that the reaction was catalyzed by lysine amino acid side chains, similar to what is reported for classical organocatalysis. This conclusion was possible after having identified different possible reactive centres and creating knock out mutants on all of these putative reactive centres, leaving the lysine residues as the only possible reactive site.

# 1. Einleitung

Die Verwendung von Katalysatoren spielt in der heutigen organischen Synthese, vor allem in deren industrieller Anwendung mit ca. 80 % aller chemischen Prozesse, eine herausragende Rolle.<sup>[1]</sup> Dabei spielen biokatalytische Prozesse mit einem Anteil von ca. 5 % an der chemischen Produktion noch eine eher untergeordnete Rolle.<sup>[2]</sup> Jedoch bietet vor allem die Biokatalyse bezüglich der möglichen synthetisch chemischen Anwendungen noch großes Wachstumspotential bzw. -chancen für die chemische Industrie. Vor allem durch ein stetig wachsendes Portfolio an bekannten Enzymen und Enzymreaktionstypen, sowie verbesserten Technologien zur Weiterentwicklung der biokatalytischen Systeme im Sinne eines „engineering“ der verwendeten Biokatalysatoren eröffnen sich mehr und mehr synthetisch-chemische Anwendungsfelder für die Biokatalyse.<sup>[3,4]</sup> Dies zeigt sich auch in der steigenden Zahl etablierter Verfahren und Prozesse zur Herstellung von Chemikalien, die zudem dazu beitragen, die Wahrnehmung und damit auch die Akzeptanz der Biokatalyse, als veritable Alternative zu klassisch chemischen Verfahren, sowohl in der Forschung, als auch in der chemischen Industrie zu erhöhen.<sup>[4-7]</sup>

## 1.1. Biokatalyse

Erste synthetische sowie industrielle biokatalytische Anwendungen finden sich bereits Anfang bis Mitte des 20. Jahrhunderts, beispielsweise in der (R)-Mandelonitril Synthese von Rosenthaler, der Herstellung von Phenylacetylcarbinol mittels gärender Hefe oder in der Synthese von Vitamin C, nach dem Reichstein Grüssner Verfahren, bei dem ein biokatalytischer Oxidationsschritt involviert ist, wobei dieser jedoch in Ganzzellsystemen erfolgte.<sup>[8-10]</sup>

Industrielle synthetische Verwendung finden Biokatalysatoren heutzutage unter anderem in der Herstellung von Bulk-Chemikalien wie Acrylamid, bei der Acrylnitril mittels einer Nitrilhydratase zum entsprechenden Acrylamid umgesetzt wird.<sup>[5]</sup> Dabei besteht der Vorteil der Verwendung von Biokatalysatoren in den milderen Reaktionsbedingungen und der höheren Selektivität, sodass es zu einer geringeren Ausbildung an Nebenprodukten wie, in dem oben genannten Beispiel zur Herstellung von Acrylamid, dem Hydrolyseprodukt Acrylsäure kommt. Ein weiteres großes Anwendungsgebiet der Biokatalyse ist die Herstellung von, meist chiralen, Zwischenprodukten wie z.B. optisch aktiver Amine, Alkohole und Säuren, als Bausteine bzw. Zwischenstufen für die chemische bzw. pharmazeutische Industrie.<sup>[5,11]</sup>

Betrachtet man die Anzahl und Anteile der an den bestehenden Anwendungen beteiligten Enzymklassen, so wird ersichtlich, dass auch heute noch Prozesse bei denen Hydrolasen, vornehmlich Lipasen und Esterasen beteiligt sind, mit ca. 60 % den Großteil der industriell relevanten biokatalytischen Prozesse ausmachen.<sup>[1]</sup> Dies ist unter anderem auch darauf zurückzuführen, dass diese Enzyme sowohl kommerziell erhältlich, als auch, bezüglich Struktur, Substratspektrum und Mechanismus, gut beschrieben sind, in ihrem Anwendungsspektrum recht weit gefasst und bezüglich Handhabung und Lagerung gut in industrielle Prozesse integrierbar sind.<sup>[7,12]</sup>

Während Lipasen häufig in der kinetischen Racematspaltung von Aminen und Alkoholen eingesetzt wurden, gibt es mehr und mehr Anwendungen bei denen die entsprechenden chiralen Alkohole und Amine direkt enzymatisch, mittels der entsprechenden Oxidoreduktasen, oder im Falle der Amine auch Transferasen, synthetisiert werden. Neben diesen Anwendungen finden sich vermehrt Beispiele in denen Enzyme verwendet werden um Verbindungen anhand von Reaktionen herzustellen, welche klassisch chemisch nicht oder nur schwer zugänglich sind. Beispiele hierfür reichen von der Addition von Ammoniak an *ortho*-Chlormandelsäure mit, im Vergleich zur entsprechenden chemischen Michael-Addition, umgekehrten Regioselektivitäten mittels einer Phenylalanin-Ammonio-Lyase, über die Desymmetrisierung von 1,3-Diketonen mittels regioselektiver Reduktion im Falle der Synthese von Zwischenstufen der Atorvastatinsynthese mittels einer entsprechenden Alkoholdehydrogenase, bis hin zur regioselektiven Umwandlung von Ketonen zu Aminen mit Hilfe einer Transaminasen.<sup>[4,13-16]</sup>

Mitverantwortlich für die aktuellen Entwicklungen in der Biokatalyse, welche von Bornscheuer und Kollegen als dritte Welle der Biokatalyse bezeichnet werden und die zu einer deutlich verbreiterten Anwendbarkeit enzymatischer Systeme in Bezug auf synthetische Problemstellungen führt, sind unter anderem auch die verbesserten Techniken bezüglich des Screenings und des Engineerings von Enzymen.<sup>[4]</sup> Während in den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts das Engineering meist auf Struktur-basierten Methoden zur Erweiterung des Substratspektrums beruhte, ist es durch die Entwicklung der Methoden zur Evolution von Enzymen von Stemmer und Arnold heutzutage möglich verschiedene Parameter der entsprechenden Enzyme maßgeblich zu adaptieren.<sup>[17-19]</sup> Dabei wurde die Technik der gerichteten Evolution durch weiterführende Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen weiter verbessert, sodass die Entwicklung von „maßgeschneiderten“ Enzymen, bei denen Parameter wie Lösungsmittel- oder Thermostabilität, Enantioselektivität und Aktivität oder aber auch das Substratspektrum verbessert wurden, heute einen deutlich geringeren Zeit- und Materialaufwand benötigen als noch zu Beginn



des 21. Jahrhunderts.<sup>[20–24]</sup> Weiterhin beigetragen zu den aktuellen Entwicklungen der Biokatalyse haben, neben der Verbesserung von Sequenzierungs- und Gen-Synthese-Techniken auch große Metagenom-Sequenzierungsprojekte wie z.B. das Saragossa-See-Projekt, durch die große Mengen an genetischen Informationen und Material zur Verfügung gestellt werden können, aus denen dann wiederum neue Biokatalysator-Systeme „rekrutiert“ werden können.<sup>[25,26]</sup>

## 1.2. Enzym-Promiskuität

Neben der Verbesserung von Enzymen für die industrielle Anwendung, steht die Untersuchung von Enzymen in Bezug auf alternative Funktionen und Reaktionstypen im Fokus aktueller Forschungsvorhaben.

Diese alternativen Enzymfunktionen werden auch Promiskuität oder „moonlighting“ Funktionen von Enzymen genannt. Das Interesse an diesen alternativen Reaktionen von Enzymen stieg über die Jahre stetig an, was unter anderem die rapide wachsende jährliche Zahl an Publikationen zu diesem Thema und die Vielzahl an verfügbaren Übersichtsartikeln (engl. Reviews) zeigt.<sup>[27–38]</sup>

Promiskuität wird, evolutionär betrachtet, unter anderem mit der funktionellen Divergenz von Enzymen in Verbindung gebracht. Dabei wird vermutet, dass durch die Rekrutierung neuer Funktionen neben der natürlichen, getrieben von evolutionärem Druck oder begünstigt durch Vorteile für den Wirtsorganismus mit der anschließenden Gen-Duplikation und darauffolgenden weiteren Diversifizierung der Enzyme, erste Schritte in Richtung eines neuen Enzyms einer funktionellen Enzymfamilie bzw. Superfamilien, wie z.B. die der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Superfamilie, getan sind.<sup>[31,33,39–41]</sup> Diesen Annahmen liegt die Idee zugrunde, dass die heute verfügbaren Enzyme auf Ur-Enzyme zurückgehen, welche als eine Art Generalisten ein breiteres Funktions- und Substratspektrum besitzen.<sup>[42,43]</sup> Dabei wird davon ausgegangen, dass bei der Entwicklung von neuen Enzymfunktionen und der divergenten Evolution, Funktionen selektiert werden, die dem Vorgänger-Enzym bereits als promiskuitive Funktion inhärent sind bzw. waren.<sup>[34,44]</sup>

Die Ursachen, die zu promiskuitivem Verhalten von Enzymen führen können, sind vielfältig. Eine der diskutierten Theorien, wie promiskuitive Reaktionen natürlicherweise ermöglicht werden können ist unter anderem das Vorhandensein verschiedener Konformationen eines Enzyms, wobei hier jeder Konformation eine unterschiedliche Reaktivität bzw. Funktion zugeordnet werden kann.<sup>[32,34]</sup> Weiterhin möglich ist, dass alternative Substrate im aktiven Zentrum durch verschiedene

Wasserstoffbrückennetzwerke gebunden werden, wobei die prinzipielle Konfiguration des aktiven Zentrums im Bezug auf die natürliche Funktion identisch bleibt und die im Anschluss analog zu den natürlichen Substraten nach dem gleichen Mechanismus umgesetzt werden (Substratpromiskuität).<sup>[34]</sup> Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung promiskuitiver Reaktionen, ist die Ausnutzung struktureller Elemente des aktiven Zentrums als alternative Reaktionszentren. So ist es beispielsweise möglich im aktiven Zentrum der Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB), welche normalerweise die Fettspaltung mittels einer katalytisch aktiven Ser-His-Asp Triade katalysiert, unter Ausnutzung des ebenfalls an der Fettspaltung beteiligten „Oxy-Anion-Holes“ Reaktionen wie die Michael-Addition oder die Aldolreaktion zu katalysieren, die jedoch für die Katalyse nicht auf das für die Fettspaltung essentielle Serin angewiesen sind.<sup>[34,45–47]</sup>

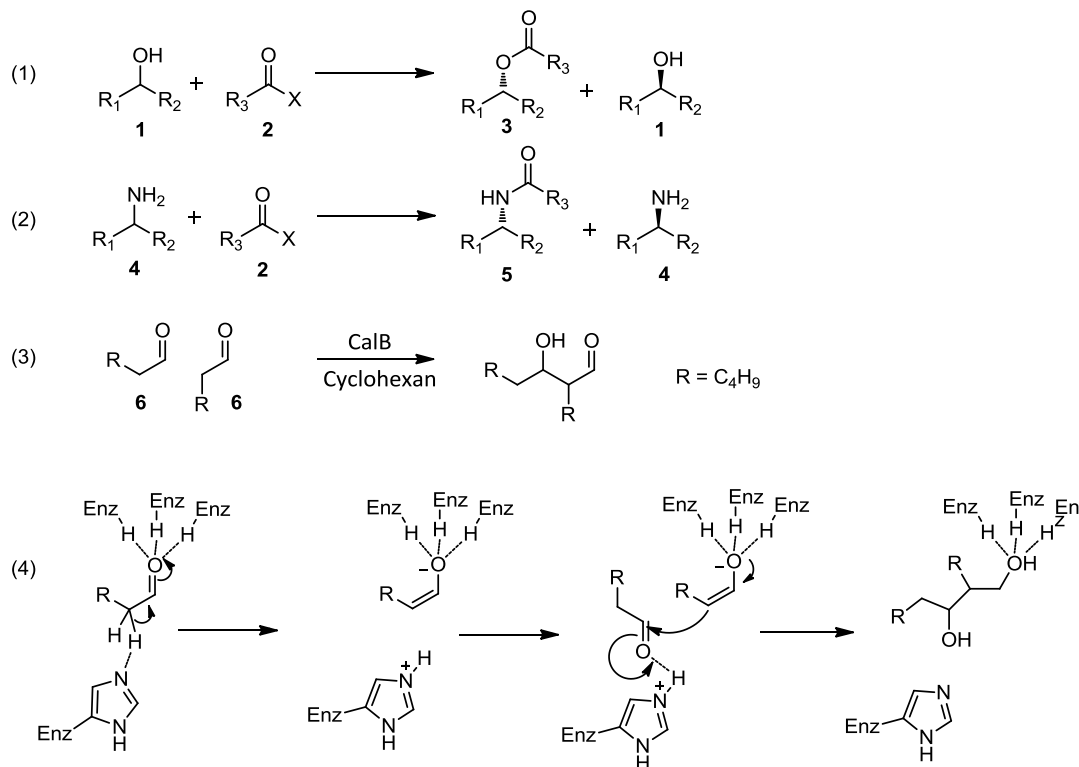
Auch der Austausch von Cofaktoren oder Aminosäuren kann zur Katalyse alternativer Reaktionen durch vorhandene Enzyme führen. Dabei können beispielsweise gebundene Metallionen oder einzelne Aminosäuren ausgetauscht und somit neue Reaktionen eingeführt werden.<sup>[34]</sup> Diese Art der Promiskuität kann jedoch auch als erster Schritt in der Herstellung artifizierender Enzyme betrachtet werden, die im nächsten Abschnitt detaillierter besprochen werden.

Die Einteilung von Promiskuität in Kategorien gestaltet sich, aufgrund der fließenden Übergänge zwischen den verschiedenen möglichen Formen, schwer, sodass bis heute noch kein einheitliches System für die Klassifizierung etabliert wurde. Hult und Berglund haben ein vereinfachtes System zur Einteilung der Promiskuität vorgeschlagen, wobei die Promiskuität von Enzymen in drei Kategorien unterteilt wird, nämlich (1) Konditions-, (2) Substrat- und (3) katalytische Promiskuität, wobei letztere noch weiter unterteilt werden kann in (3.1) zufällige katalytische Promiskuität und (3.2) induzierte katalytische Promiskuität.<sup>[30]</sup> Dabei haben sie jedoch wie auch Bornscheuer und Kazlauskas schon zuvor angemerkt, dass die Einteilung auch hier nicht absolut stattfinden kann, sondern verschiedene Arten von Reaktionen ganz oder teilweise mehreren Arten der Promiskuität zugeordnet werden können.<sup>[28,30]</sup>

Als eines der Beispiele für Konditionspromiskuität führten Berglund und Hult die Verwendung von Lipasen in organischen Lösungsmitteln zur Veresterung von Säuren an. Natürlicherweise katalysieren diese Enzyme die Spaltung von Estern zu den entsprechenden Alkoholen und den freien Fettsäuren, sind jedoch unter entsprechenden Bedingungen auch dazu in der Lage, die entsprechenden Rück-Reaktion ausgehend von entsprechenden Alkoholen **1** zu den jeweiligen Estern **3** in Anwesenheit eines geeigneten Acyl-Donors **2** zu katalysieren (Schema 1, Reaktionsgleichung (1)). Als weitergeführte

Anwendung dieser Art von Konditionspromiskuität führen sie die Lipasen-katalysierte Acetylierung von Amininen **4** zu den entsprechenden Amiden **5** an, welche eine Kombination aus Substrat- und Konditions-Promiskuität darstellt, da hier sowohl die Art der Reaktion (aufgrund der applizierten Bedingungen), als auch das verwendete Substrat von der natürlichen Reaktion verschieden sind (Schema 1, Reaktionsgleichung (2)).<sup>[30]</sup> Dieses von Berglund und Hult beschriebene Beispiel zur promiskuitiven Lipase-katalysierten Acetylierungsreaktion verdeutlicht weiterhin das synthetische sowie wirtschaftliche Potential, welches Biokatalysatoren als solche aber auch deren promiskuitive Reaktionen bieten können, da diese Reaktion Eingang in verschiedene industrielle Prozesse gefunden hat. So findet diese Art der Reaktion unter anderem bei der BASF SE, in mehreren Verfahren zur Trennung optisch aktiver Alkohole und Amine Verwendung, welche teilweise im Multi-Tonnen-Maßstab durchgeführt werden, wie z.B. bei der Darstellung optisch reinen Phenylethylamins mittels einer Lipase aus *Burkholderia plantarii*.<sup>[5,11,48]</sup> Außer diesen beiden Arten der Promiskuität ist für die oben bereits erwähnte Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) auch eine Form der katalytischen Promiskuität beschrieben. So zeigten Arbeiten von Berglund und seinen Mitarbeitern, dass die CalB in der Lage ist die Aldolreaktion von Cylohexanal **6** zu katalysieren (Schema 1, Reaktionsgleichung (3)) wobei das Enzym für diese Reaktion nicht das für die natürliche Aktivität essentielle Serin benötigt, sondern die Aktivierung der Reaktanden über das sogenannte Oxy-Anion-Hole, unter Beteiligung des Histidins der katalytischen Triade, stattfindet.<sup>[45]</sup>

In neueren Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe von Frances H. Arnold zeigen, dass man das Häm in P450 Monooxygenasen nutzen kann um damit, abstrahiert von der eigentlichen Funktion der Sauerstoffaktivierung, stereoselektive Cyclopropanierungen zu katalysieren. Dabei konnten Sie zeigen, dass mittels Mutagenese die katalytischen Eigenschaften, also sowohl die Selektivität des Katalysators, als auch dessen Reaktivität, gesteuert werden können. So konnten sie das katalytisch-synthetische Potential dieser Katalysatoren zeigen, indem sie, mittels Mutagenese des Enzyms, eine Variante des P450 Katalysators erstellten, welcher in der Lage war die Cyclopropanierung von *N,N*-Diethyl-2-phenylacrylamid zu einer Zwischenstufe von des pharmazeutischen Wirkstoffes Levomilnacipran im präparativen Maßstab zu katalysieren. Mit dieser Methode unterstrichen sie weiterhin die Vorzüge der Nutzung Enzym-basierter Katalysatoren, welche mit Hilfe gentechnischer Methoden eine Vielzahl von Katalysator-Varianten mit oft unterschiedlichen Eigenschaften zugänglich machen.<sup>[49-51]</sup>

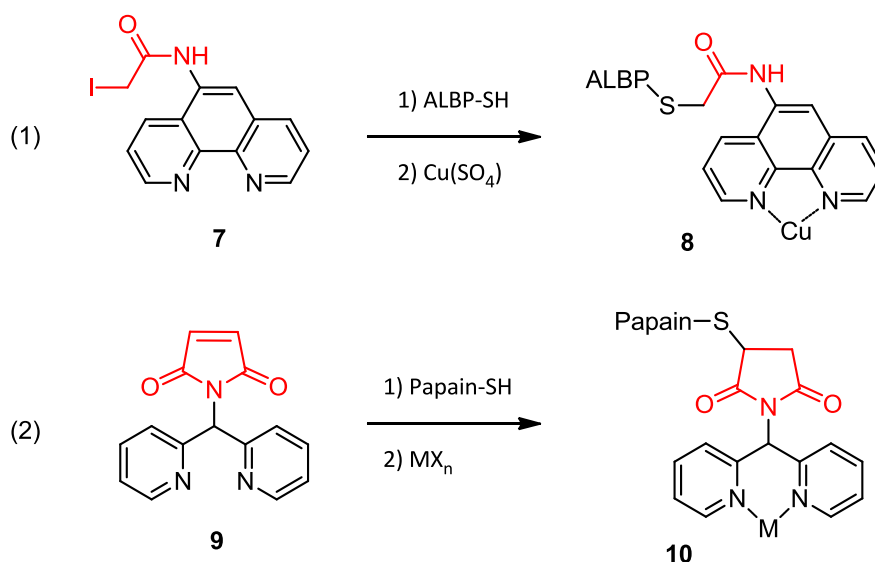


**Schema 1:** Schematische Darstellung der möglichen promiskuitiven Reaktionen von Lipasen. (1) Veresterungsreaktion von Alkoholen. (2) Acetylierung von Aminen. (3) Aldolreaktion der CalB mit Hexanal. (4) Mechanismus der CalB katalysierten Aldolreaktion nach Berglund *et al.* <sup>[45]</sup>

### 1.3. Artificielle Enzymkatalysatoren

Eine weitere Möglichkeit zur Katalyse neuer Reaktionen mit enzymatischen Systemen ist die Verwendung artifizierender Enzymkatalysatorsysteme. Diese Katalysatorsysteme bieten den Vorteil, dass sie in der Lage sind Reaktionen zu katalysieren, welche natürlicherweise mittels klassisch enzymatischer Reaktionen nicht zugänglich sind, wie beispielsweise die Katalyse diverser Übergangsmetall-katalysierter Reaktionen. Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten solche artifizierten Enzymsysteme herzustellen. Eine Möglichkeit zur Herstellung solcher Systeme ist die Kopplung chemischer Katalysatoren an enzymatische Systeme oder Proteine ohne katalytische Funktion. Bei der Herstellung dieser artifizierten Metalloenzyme, gibt es verschiedene Strategien wie die Kopplung des Metallkatalysators an den Proteinliganden durchgeführt werden kann. So gibt es einerseits die Möglichkeit einen entsprechenden chemischen Metallkatalysator oder Metall-bindenden Liganden mittels kovalenter Bindung an das Protein zu koppeln. Dabei werden nukleophile Seitenketten von Aminosäuren genutzt, welche entweder im Protein enthalten sind oder mittels Mutagenese an entsprechenden Positionen eingeführt werden, um, meist achirale, Chemokatalysatoren über entsprechende Reste an das Protein zu koppeln. Dabei werden zur Kopplung der

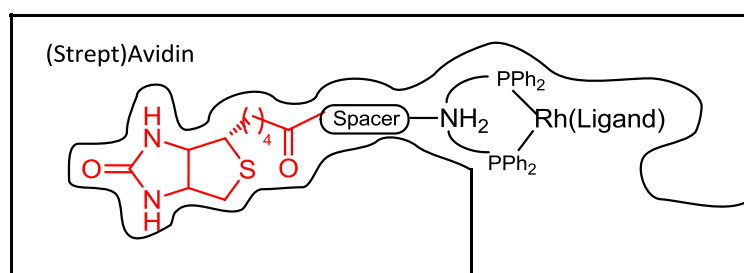
chemischen Liganden oft Reste wie zum Beispiel Iodacetamide (per nukleophiler Substitution) oder Maleimide (per Michael-Addition) genutzt. Erste Arbeiten zur kovalenten Kopplung von chemischen Metallkatalysatoren erfolgten durch Di Stefano und seine Mitarbeiter, welche einen Kupfer-bindenden Phenanthrolin Liganden **7** in ein Fettsäure-Transporter Enzym (genauer das ALBP; engl. adipocyte lipid-binding protein) über einen Iodacetamidrest am Liganden an ein im Enzym enthaltenes Cystein zum entsprechenden Enzym-Ligand Komplex **8** gekoppelt haben (Schema 2; Gleichung 1), welcher dadurch eine dem Wirtsenzym nicht inhärente Hydrolase-Aktivität erhielt.<sup>[52,53]</sup> In weiteren Arbeiten konnten unter anderem Reetz und seine Mitarbeiter die Kopplung eines Bis-Pyridyl-Liganden **9** an Papain mittels der Michael-Addition des katalytisch aktiven Cysteins an die Maleimid-Seitenkette des Liganden zeigen.<sup>[54]</sup>



**Schema 2:** Beispiele für die kovalente Kopplung chemischer Metallkatalysatoren an enzymatische Systeme. (1) Kopplung eines Phenanthrolin Liganden an das Fettsäure-Transporter-Protein ALBP mittels nukleophiler Substitution an einem Iodacetamido-Rest **7** nach Di Stefano *et al.*<sup>[55,56]</sup> (2) Kopplung des Bis-Pyridin-Liganden **9** an Papain nach Reetz *et al.*<sup>[57]</sup> Hierbei sind die jeweils an der Kopplung beteiligten Reste (Iodacetamid in (1) und Maleimid in (2)) in rot hervorgehoben.

Als zweite Möglichkeit für die Herstellung artifizieller Metalloenzyme bietet sich die supramolekulare Verankerung von chemischen Metallkatalysatoren an. Dabei wird die starke Wechselwirkung von spezifischen Molekülen mit entsprechenden Enzymen ausgenutzt, um mithilfe dieser Wechselwirkung einen chemischen Metall-Katalysator an das Enzym zu binden. Für diese Art der Kopplung wird das von Whitesides entwickelte System basierend auf der Bindung von Biotin an Avidin verwendet (Abbildung 1). Dabei ist die Wechselwirkung zwischen Biotin und dem Protein so stark, dass eine quantitative

Lokalisierung des entsprechenden Katalysators sichergestellt werden kann.<sup>[58]</sup> So konnten Whitesides und Wilson zeigen, dass durch Bindung eines prinzipiell achiralen Rhodium-Katalysators an Avidin die asymmetrische Hydrierung von Doppelbindungen möglich ist.<sup>[59]</sup> Weiterführende Arbeiten von Ward und seinen Mitarbeitern zeigten, dass der Austausch von Avidin gegen Streptavidin einen positiven Effekt bezüglich der Enantioselektivitäten der entsprechenden Reduktionsreaktionen hat, was auf die tiefere Bindungstasche des Streptavidins im Vergleich zu Avidin zurückzuführen ist. Weiterhin konnten Ward und seine Mitarbeiter zeigen, dass sowohl anhand chemischer Modifizierung der verwendeten Spacer zwischen Biotin und Ligand, als auch durch die Modifikation des Proteinliganden mittels gentechnischer Methoden, Varianten des entsprechenden artifiziellen Metalloenzym erstellt werden können, die sowohl in Bezug auf die Selektivität, als auch in Bezug auf die Aktivität des Katalysatorsystems verbesserte Eigenschaften aufweisen.<sup>[60–62]</sup> Dabei konnte gezeigt werden, dass anhand dieser Methoden auch eine Umkehr der Selektivität möglich ist.<sup>[63]</sup>



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Bindung eines Biotin-gekoppelten Rhodium-Katalysators an Avidin bzw. streptavidin. Der an das Protein koordinierende Biotin Ligand ist in rot hervorgehoben.

Die dritte mögliche Strategie für die Herstellung artifizieller Metalloenzyme ist die dative Bindung möglicher katalytisch aktiver Metalle bzw. Metallkatalysatoren an ein entsprechendes Protein. Erste Arbeiten zur dativen Bindung von Metallkatalysatoren wurden von Kaiser und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Dabei konnten sie zeigen, dass durch Austausch des gebundenen Zink-Ions in der Carboxypeptidase A gegen ein Kupfer, die natürlicherweise Peptidbindungen spaltende Carboxypeptidase A eine Oxidase-Aktivität aufweist, wobei die natürliche Hydrolase-Funktion verloren geht.<sup>[64]</sup> Weitere Arbeiten von Kokubo und seinen Mitarbeitern konnten zeigen, dass die dative Bindung von Osmiumtetraoxid an BSA zur Bildung eines katalytisch aktiven Komplexes führt, der in der Lage ist die asymmetrische Dihydroxylierung von  $\alpha$ -Methylstyrol zu katalysieren.<sup>[65]</sup>

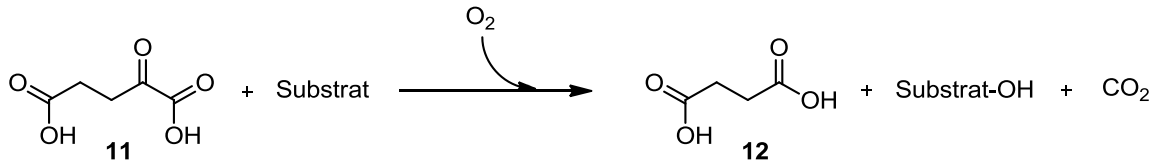
Neuere Arbeiten von Baker und seinen Mitarbeitern zeigen, dass für diese dativen Bindungen auch artifizielle Aminosäuren in Enzymen eingesetzt werden können, wobei diese einen Zwischenschritt zwischen den kovalent gebundenen chemischen Liganden und der klassischen dativen Bindung von Metallen über Aminosäuren darstellen.<sup>[66–68]</sup> Dabei können die speziellen Eigenschaften der chemischen Liganden in den Seitenketten der artifiziellen Aminosäuren involviert werden, ohne auf die Problematik der Verankerung des Liganden zu stoßen. Weitere Arbeiten von Reetz und seinen Mitarbeitern zur dativen Bindung von Kupfer mittels einer artifiziell eingeführten Metall-bindenden Triade im Falle der artifiziell Kupfer-bindenden tHisF Variante HDD werden weiter unten ausführlich diskutiert.

#### 1.4. $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Oxygenasen

Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen gehören strukturell zur Superfamilie der Cupine (von lat. *cupa* für kleines Fass) deren zahlenmäßig größte Untergruppe sie sind und die wiederum in verschiedensten Organismen sowohl der Prokaryoten, als auch der Eukaryoten vorkommen.<sup>[69,70]</sup> Die Mitglieder der Cupin Superfamilie teilen sich als gemeinsames strukturelles Element ein charakteristisches  $\beta$ -Faltblatt-Fass.<sup>[69–71]</sup> Im Falle der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen ist dieses Fass Bestandteil des sogenannten „jelly roll“ Motivs, welches als zentrales Strukturelement von den Mitgliedern dieser Familie geteilt wird.

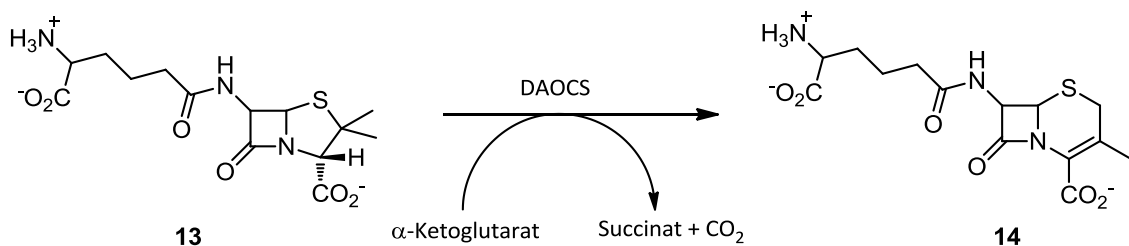
Die Superfamilie der Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen gehört zur Klasse der Nicht-Häm-Eisen(II)-abhängigen Oxygenasen. Allen Mitgliedern dieser Superfamilie ist gemein, dass sie Eisen(II)-abhängig sind und dieses über ein His<sup>1</sup>-X-Asp/Glu-X<sub>n</sub>-His<sup>2</sup> Motiv koordinieren.<sup>[72]</sup> Die Mitglieder dieser Superfamilie erfüllen in den verschiedenen Organismen eine Vielzahl verschiedenster Funktionen – vom Stoffabbau, über die Reparatur methylierter DNA bis zur oxidativen Ringerweiterung in der Synthese von Antibiotika – und akzeptieren ein breites Spektrum an Substraten, welches von Lipiden, methylierten Nukleotiden, Proteinen bis hin zu einer Vielzahl an kleinen Molekülen reicht.<sup>[73,74]</sup> Dabei katalysieren sie neben der klassischen Hydroxylierungsreaktion (Schema 3), welche sowohl für Auf- als auch Abbaureaktionen genutzt wird, auch noch andere Reaktionen wie Desaturierungen und oxidative Ringschluss- und Erweiterungsreaktionen (Schema 4).

Die meisten Mitglieder dieser Proteinfamilie katalysieren jedoch die Hydroxylierung eines Substrats, welche an die Sauerstoff-aktivierende Zersetzungsreaktion von  $\alpha$ -Ketoglutarat **11** zu Kohlenstoffdioxid und Succinat **12** gekoppelt ist (Schema 3).



**Schema 3:** Reaktionsschema  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängiger Dioxygenasen.

Eines der bekanntesten Mitglieder der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen-Oxygenasen ist die Deacetoxy-Cephalosporin-C-Synthase (DAOCS), welche die Synthese von Deacetoxycephalosporin C **14** aus Penicillin N **13** – eine Ringerweiterungsreaktion (Schema 4) – in Prokaryoten wie u.a. verschiedenen Streptomyces Arten katalysiert.<sup>[75–78]</sup> Die DAOCS war die erste  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen-Oxygenase von der eine Kristallstruktur bestimmt werden konnte, anhand welcher erste Vorhersagen bezüglich des mechanistischen Verlaufs der Reaktion der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen-Oxygenasen getroffen, sowie der Bindungsmodus der Substrate gezeigt werden konnten.<sup>[79]</sup>

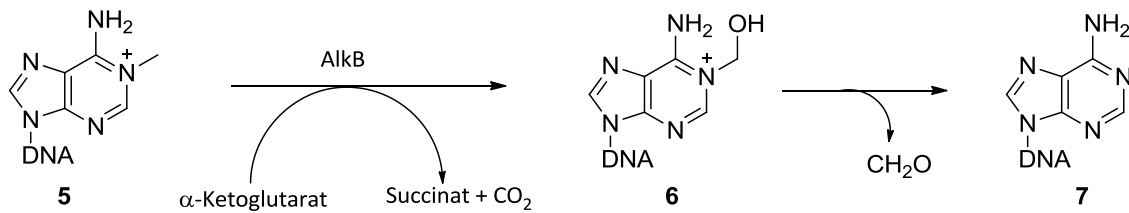


**Schema 4:** Ringerweiterungsreaktion der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen DAOCS

Die natürlichen Funktionen des Hauptteils der Familienmitglieder der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen, nämlich diejenigen die Hydroxylierungsreaktionen katalysieren, sind, wie oben bereits skizziert, funktionell sehr divers. So ist bspw. die  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen AlkB, welche Teil eines Operons in *E. coli* ist das den Wirtsorganismus vor den schädlichen Auswirkungen methylierender Reagenzien schützt, in die Reparatur alkylierter DNA involviert, indem sie *N*-methylierte Nukleobasen wieder demethyliert (Schema 5) und somit dem Wirtsorganismus eine gewisse Resistenz gegenüber



methylierenden Reagenzien wie z.B. Methyl-methansulfonat verschafft.<sup>[80,81]</sup> Die Alkylierung von Nukleobasen kann das Auslesen genetischer Informationen beeinträchtigen, was für den entsprechenden Wirtsorganismus schwerwiegende Folgen haben kann. Die AlkB-katalysierte de-Alkylierung verläuft über die Hydroxylierung der entsprechenden *N*-Alkylseitenkette der Nukleobase, wodurch ein instabiles Halbaminale entsteht, welches sich spontan zum entsprechenden Aldehyd und freien Amin zersetzt.<sup>[82,83]</sup>



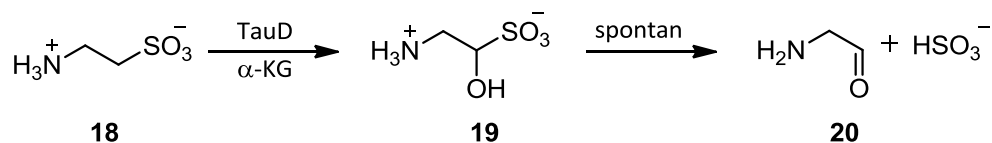
**Schema 5:** Schematische Darstellung der AlkB-katalysierten de-Methylierungsreaktion am Beispiel von *N*-Methyl-Adenin **15**. Dabei wird das *N*-Methyl-Adenin **15** zum entsprechenden Hydroxylierungsprodukt **16** umgesetzt, welches anschließend unter spontaner Abspaltung von Formaldehyd zum nativen Adenin **17** wird.

Weitere Vertreter dieser Enzymfamilie, welche die Hydroxylierung kleiner Moleküle katalysieren, sind die Prolin Hydroxylase, welche die synthetisch interessante Hydroxylierung von Prolinen und Prolinanaloga katalysiert, sowie die Taurin Dioxygenase.<sup>[84-86]</sup>

### 1.4.1. Taurin Dioxygenase

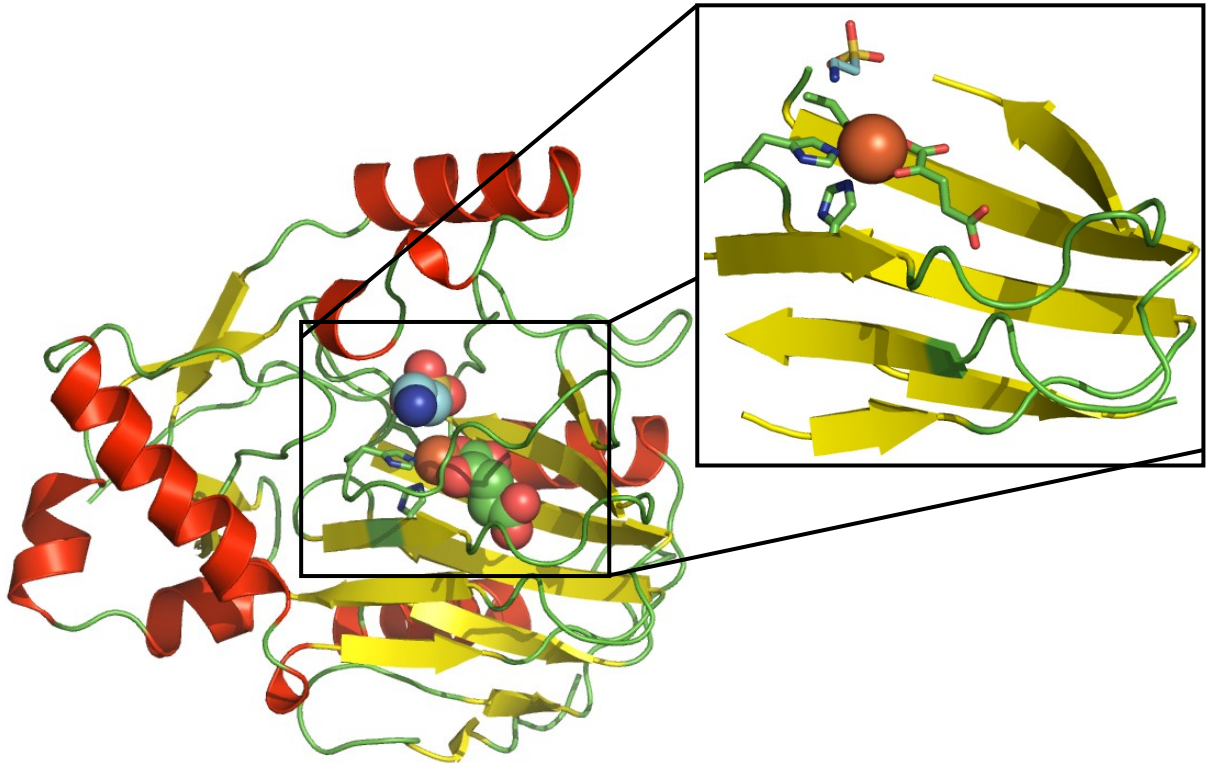
Die Taurin Dioxygenase (TauD) ist Teil der Schwefelmangel-Antwort von *E. coli* und ist Teil des *tauABCD* Gen-Clusters, welcher speziell in die Verwertung von Taurin als Schwefelquelle involviert ist.<sup>[87]</sup> Die TauD wird natürlicherweise nur exprimiert wenn für den Organismus ein Mangel an verwertbaren Schwefelquellen vorliegt.<sup>[84,87]</sup> Die Funktion des Enzyms ist es, eine Schwefelquelle zu mobilisieren, indem es das in der Natur vorkommende Taurin zu Sulfit und Aminoacetaldehyd abbaut. Taurin kommt in der Natur vor allem in Tieren und deren Exkrementen vor (außer Protozoen) und ist in anderen Reichen, etwa dem der Bakterien, wenig bis gar nicht vertreten.<sup>[88]</sup>

Der Abbau des Taurins und die damit einhergehende Mobilisierung des Sulfits als Schwefelquelle erfolgt durch die Hydroxylierung des Taurin **18** zur entsprechenden 1-Hydroxy-2-Aminoethansulfonsäure **19**, welche sich spontan zu Aminoacetaldehyd **20** und Sulfit zersetzt (Schema 6). Die Reaktion erfolgt, wie bei allen  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen unter Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinat und Kohlenstoffdioxid und ist  $\text{Fe}^{2+}$ -abhängig.

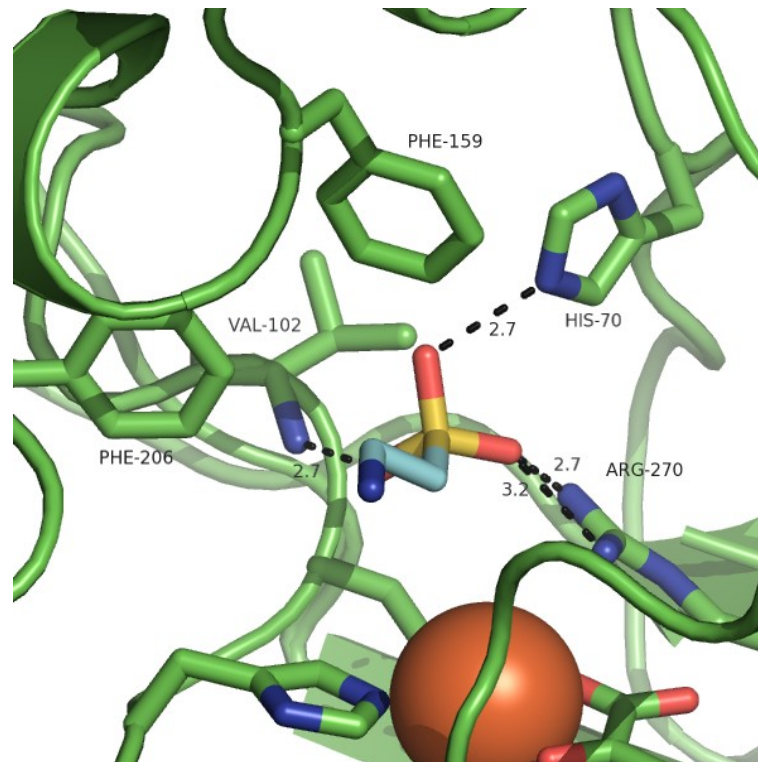


**Schema 6:** Natürliche Reaktion der Taurin Dioxygenase.

Anhand der Kristallstruktur der TauD konnte gezeigt werden, dass die TauD, wie alle  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Oxygenasen, als zentrales Strukturelement das sogenannten „jelly roll“ Motiv besitzt, in welchem sich das aktive Zentrum der TauD befindet (Abbildung 2).<sup>[89,90]</sup> Anhand der Kristallstruktur konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Aminosäuren H99, D101 und His245 die typische  $\text{His}^1\text{-X-Asp/Glu-X}_n\text{-His}^2$  (kurz: HisHisAsp) Metallbindestelle bilden an der das für die Katalyse essentielle  $\text{Fe(II)}$  gebunden wird (Abbildung 2). Die Koordination des natürlichen Substrats Taurin erfolgt über die Seitenketten der Aminosäuren R270 und H70, sowie über die N-H Bindung des Proteinerückgrats der Aminosäure V102 (Abbildung 3). Dabei bilden die Aminosäuren F159 und F206 eine Kavität für die unpolare Kohlenstoffkette des Taurins und bringen es in räumliche Nähe zum Eisen-Zentrum an dem im Laufe der Reaktion die reaktive Eisen-Oxo-Spezies gebildet wird.



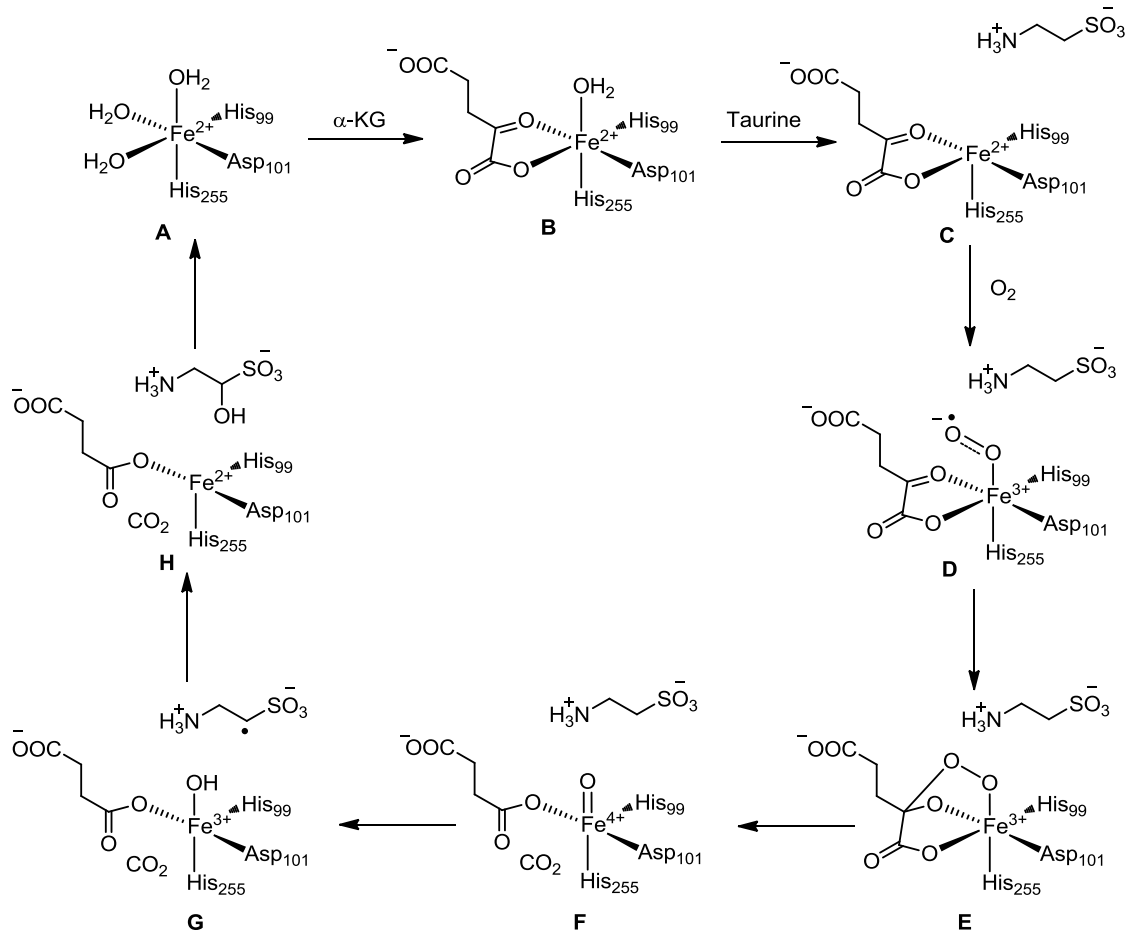
**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Kristallstruktur der TauD (PDB Code 1O57; mit  $\alpha$ -Helices in rot,  $\beta$ -Faltblätter in gelb und Loops in grün), mit den Eisen-kordinierenden Aminosäuren (H99, D101 und H255) als grüne Stäbchenmodelle, Eisen als orange Sphäre, Taurin als Sphäre in Cyan und  $\alpha$ -Ketoglutarat als grüne Sphären dargestellt. Im Kasten hervorgehoben ist das zentrale „Jelly roll“ Strukturmotiv der TauD, schematisch dargestellt ( $\beta$ -Faltblätter in gelb und verbindende Proteinschleifen („loops“) in grün) mit den Metall-kordinierenden Resten H99, D101 und H255 sowie dem Cosubstrat  $\alpha$ -Ketoglutarat als grüne Stäbchen. Das Fe(II) ist als orange Sphäre und das Substrat Taurin als Stäbchenmodell in Cyan dargestellt.



**Abbildung 3:** Substratbindung von Taurin im aktiven Zentrum der TauD. Die Sulfonsäurekoordinierenden Aminosäureseitenketten H70 und R270 sowie Peptidbindung der Aminosäure V102 des Proteinrückgrats sind als grüne Stäbchen dargestellt. Alle Abstandsmessungen sind in schwarz angezeichnet, wobei die Abstände in Ångström angegeben sind.

Der Mechanismus der TauD ist aufgrund zahlreicher Untersuchungen zu Reaktionsintermediaten und Kinetiken sehr gut bekannt (Schema 7).<sup>[91–97]</sup> Im nativen Zustand liegt ein oktaedrisch koordiniertes  $\text{Fe}^{2+}$  im Protein vor, welches einerseits von der HisHisAsp Triade des Enzyms koordiniert wird, während die übrigen Koordinationsstellen von Wassermolekülen besetzt sind (A). Im ersten Schritt der Reaktion bindet  $\alpha$ -Ketoglutarat an das Eisen im aktiven Zentrum und verdrängt dadurch zwei der Wassermoleküle (B). Im nächsten Schritt der Reaktion bindet Taurin an das Enzym, wodurch sich die Koordination des Eisens von 6-fach (oktaedrisch) auf 5-fach (quadratisch pyramidal) koordiniert verringert (C). Dabei bindet das Taurin nicht direkt an das  $\text{Fe}^{2+}$  sondern wird wie oben bereits beschrieben an Aminosäuren des Proteins koordiniert. Als nächster Schritt in der Reaktion bindet molekularer Sauerstoff an das Eisenzentrum (D) und bildet im darauffolgenden Schritt der Reaktion durch einen Angriff an die  $\alpha$ -Ketofunktion des  $\alpha$ -Ketoglutarat einen Dioxo-verbrückten Komplex (E), der anschließend zur reaktiven Eisen-Oxo-Spezies abreagiert unter Spaltung des  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinat und  $\text{CO}_2$  (F). Die so gebildete Eisen-Oxo Spezies insertiert den

Sauerstoff in die C-H Bindung des C-1 Atoms des Taurin, indem sie ein Wasserstoffatom von C-1 des Taurin abstrahiert und anschließend die Hydroxyfunktion an das so entstandene Kohlenstoffradikal bindet (**G & H**).



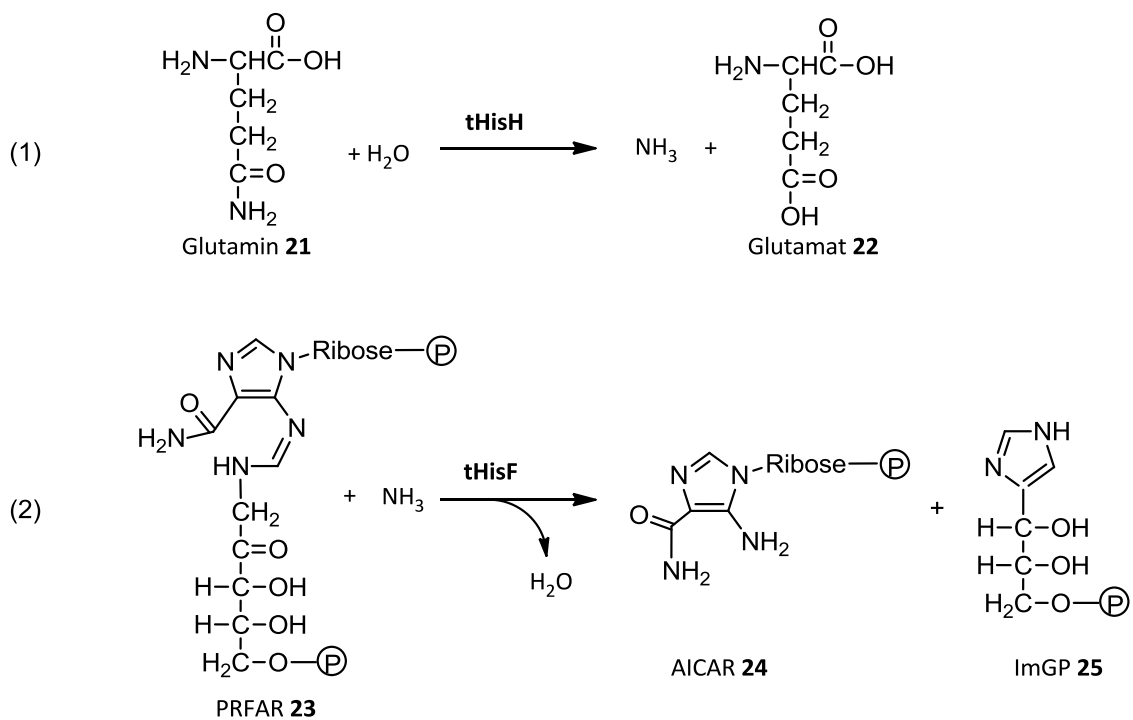
**Schema 7:** Einzelne Schritte des Reaktionsmechanismus der TauD (Abbildung adaptiert nach Price *et al.*).<sup>[94]</sup>

## 1.5. tHisF-basierte Katalysator Systeme

### 1.5.1. Natürliches Vorkommen der tHisF

Natürlicherweise ist die tHisF, aus dem thermophilen Organismus *Thermotoga maritima*, Bestandteil der Imidazol-Glycerolphosphat Synthase, einem Mitglied der Glutamin-Amidotransferase Enzymfamilie und damit an der Histidin Biosynthese und der *de novo* Purin-Biosynthese in *Thermotoga maritima* involviert.<sup>[98]</sup> Dabei fungiert sie als Synthase-Untereinheit der Glutamin-Amidotransferase (GATase), welche in Bakterien aus einem Bi-

Enzymkomplex, einer Amidase- (HisH) und einer Synthase-Untereinheit (HisF), bestehen. Prinzipiell katalysieren GATasen die Übertragung der Amido-Gruppe auf verschiedene Substrate.<sup>[99,100]</sup> Dabei besitzen beide Untereinheiten ein jeweils eigenständiges aktives Zentrum und katalysieren unterschiedliche Reaktionen (Schema 8). In der HisH Untereinheit der GATase wird das Glutamin **21** unter Freisetzung von Ammoniak zu Glutamat **22** umgesetzt (Schema 8, Reaktionsgleichung (1)). Der freigewordene Ammoniak wird in der HisF, der Synthase-Untereinheit, der GATase dann auf das Substrat übertragen. Dabei findet in der Imidazol-Glycerolphosphat Synthase der Übertrag auf ein *N*<sup>ε</sup>-((5'-Phosphoribosyl)formimino)-5-aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid (PFAR; **23**) statt, welches zu den Produkten 5-Amino-Imidazol-4-Carboxamid-Ribotid (AICAR; **24**) und Imidazol-Glycerol-Phosphat (ImGP; **25**) umgesetzt wird (Schema 8, Reaktionsgleichung (2)).

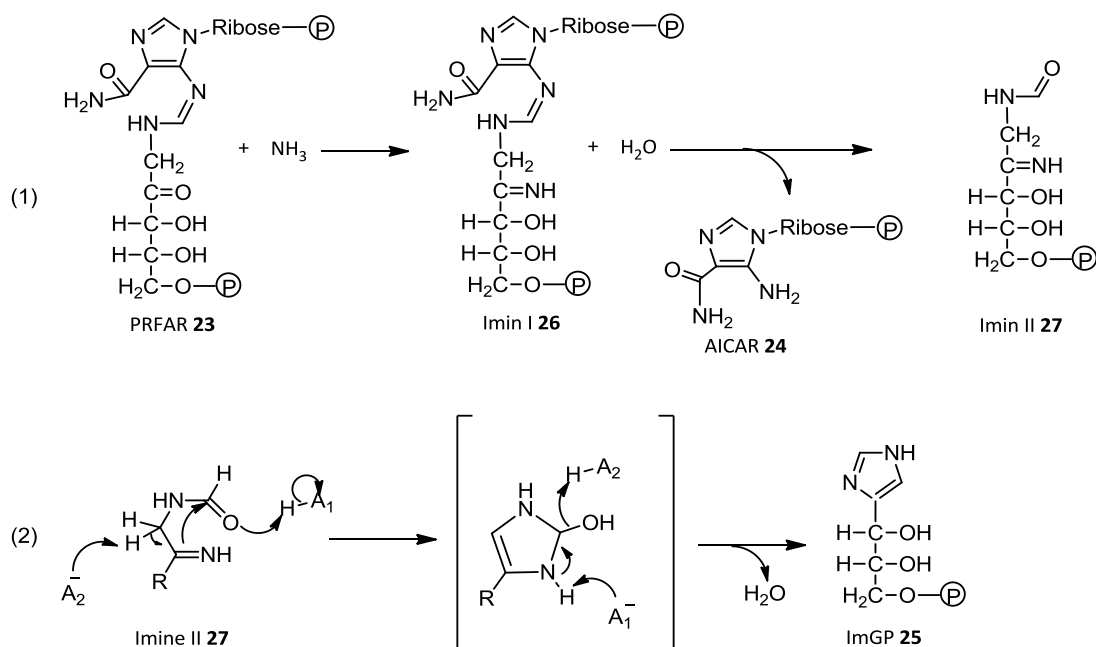


**Schema 8:** Natürliche Reaktion der Imidazol-Glycerolphosphat Synthase aus *Thermotoga maritima* deren Synthase Untereinheit die tHisF ist. Gezeigt sind die jeweiligen Einzelreaktionen der tHisH (a) und der tHisF (b). Abbildungen adaptiert von Beismann-Driemeyer *et al.*<sup>[98]</sup>

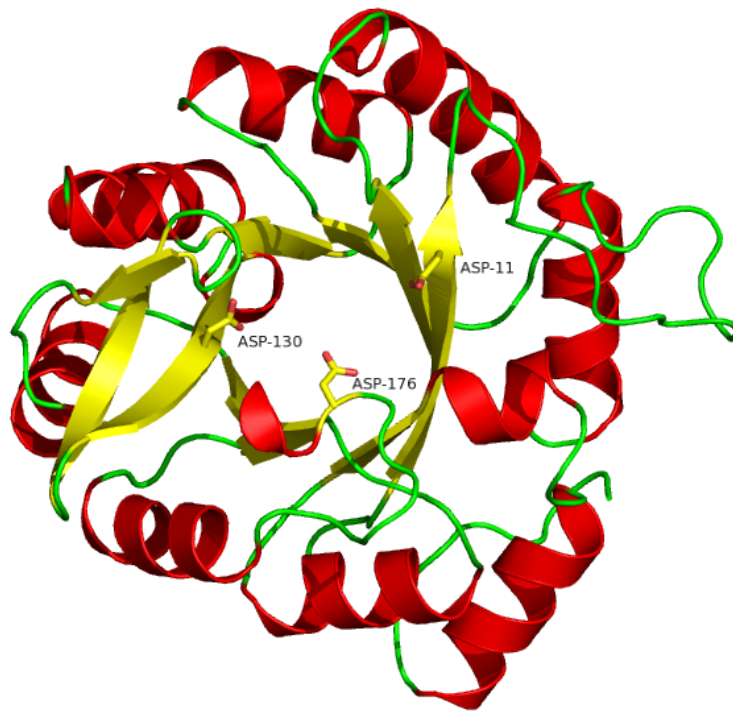
### 1.5.2. Natürlicher Mechanismus der tHisF

Basierend auf der Kristallstruktur wurde anhand von Mutationsstudien ein Mechanismus der tHisF ermittelt. Dabei wurde postuliert, dass die Reaktion nach einem generellen Säure-Base-Mechanismus verläuft, wobei die Aminosäuren D11 und D130 der tHisF dabei essentiell für die Katalyse der Reaktion sind und somit als entsprechende Säure und Base postuliert wurden, während ein weiteres Aspartat (D176) als nicht essentiell, jedoch signifikant an der Reaktion beteiligt eingestuft wurde, da dessen Entfernung zu deutlich verringerten  $k_{\text{cat}}$  Werten führte (Schema 9, Reaktionsgleichung (2)).<sup>[98,101]</sup> Dabei finden sich die entsprechenden Aspartate D11 und D130, wie anhand der Kristallstruktur ersichtlich ist, auf der Oberseite der tHisF auf gegenüberliegenden Positionen (Abbildung 4).

Im ersten Schritt der Reaktion der tHisF kondensiert das in der Reaktion der Amidase-Untereinheit (tHisH) gebildete Amin mit dem Substrat PRFAR **23** zum entsprechenden Intermediat Imin I **26**. Das aus dieser Reaktion gebildete Wasser reagiert mit dem terminalen Imin unter Abspaltung von AICAR **24** zum Imin-Intermediat Imin II **27** (Schema 9, Reaktionsgleichung (1)). Dieser zyklisiert anschließend zum zweiten Reaktionsprodukt ImGP in der postulierten Säure-Base-Reaktion (Schema 9, Reaktionsgleichung (2)).



**Schema 9:** Postulierter Reaktionsmechanismus der tHisF Untereinheit der ImGPase aus *Thermotoga maritima*. (a) Bildung des Imin-Intermediats als erster Schritt der Reaktion (b) Postulierter Säure-Base-Mechanismus der Zyklisierungsreaktion der tHisF Untereinheit. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Glycerolphosphatrest in Reaktionsgleichung (b) mit R abgekürzt. Abbildungen adaptiert nach Beismann-Driemeyer *et al.*<sup>[98]</sup>



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Kristallstruktur der Imidazol-Glycerolphosphat-Synthase Unterinheit HisF aus *Thermotoga maritima* (tHisF; PDB Code 3ZR4).

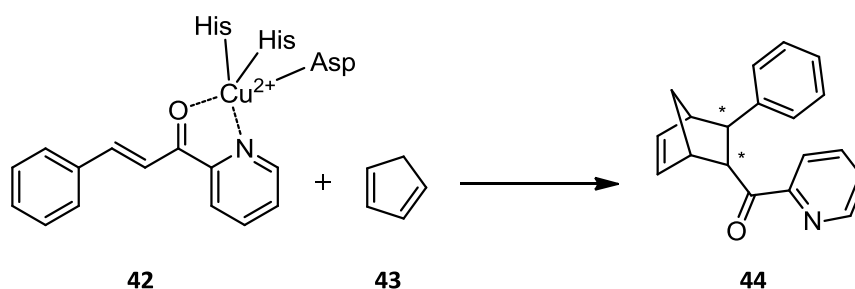
### 1.5.3. Alternative tHisF Systeme

Aufgrund der hohen Stabilität der tHisF und der guten Zugänglichkeit des Proteins bezüglich Expression und Aufreinigung, entwickelte die Arbeitsgruppe von Manfred Reetz, nachdem sie die tHisF schon zuvor als Protein zur Verankerung von chemischen Liganden genutzt hatte, eine Variante der tHisF, welche eine artifizielle Metallbindestelle enthielt.<sup>[102–104]</sup> Dabei wurde die Inkorporation der Metall-Bindestelle, im Gegensatz zu anderen Ansätzen, mittels Einführung koordinierender Aminosäuren vorgenommen. Bei der eingeführten Metall-Bindestelle handelte es sich dabei um eine HisHisAsp Triade analog der Metallbindestelle der TauD. Zur Herstellung der entsprechenden artifiziellen Metallbindenden tHisF Variante wurden im ersten Schritt kompetitiv Metall-bindende Aminosäuren wie Histidine und Cysteine auf der Oberfläche des Enzyms entfernt, sodass eine spezifische Metall-Bindung gewährleistet werden sollte. Dabei wurden vier Oberflächen-Histidine sowie ein Cystein entfernt. Eingeführt wurde die Metall-Bindestelle am katalytisch aktiven D11, indem die beiden räumlich zum D11 benachbarte Aminosäuren L50 und I52 jeweils gegen Histidine ausgetauscht wurden. Die so erhaltenen tHisF Varianten waren HHD\_4xala (HHD für die HisHisAsp Triade und 4xala für die vier



Histidine H84, H209, H228 und H244 die je gegen Alanin ausgetauscht wurden; wird im weiteren Verlauf der Arbeit mit HHD abgekürzt) und die zusätzlich noch erstellte Negativ-Kontroll-Variante NC\_4xala (kurz: NC), bei der ebenfalls die entsprechenden Oberflächen-Histidine und das Cystein durch Alanine ausgetauscht wurden, während die Reste L50 und I52 als solche belassen wurden.

Dabei konnte gezeigt anhand von ESR-Experimenten gezeigt werden, dass die neu erstellte tHisF Variante HHD zugegebenes Cu(II) an der dafür vorgesehenen, artifizell eingeführten Metall-Bindestelle koordiniert, während die NC Variante der tHisF dazu nicht in der Lage war. Jedoch konnte keine Kristallstruktur der entsprechenden HHD Variante mit gebundenem Kupfer bestimmt werden.<sup>[102]</sup> Mit den so erhaltenen artifizell Kupfer-bindenden tHisF Varianten HHD und NC konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind die in der Literatur bekannte Modell-Reaktion des Azachalcon **42** mit Cyclopentadien **43** zu katalysieren. Dabei zeigte von den getesteten Varianten nur die entsprechende HHD Variante signifikante *ee*-Werte bezüglich des gebildeten Produkts.<sup>[102]</sup>



**Schema 10:** Diels-Alder Reaktion des verwendeten Azachalcons **42** mit Cyclopentadien **43** nach Reetz *et al.*<sup>[102]</sup>

## 1.6. Zielsetzung und Motivation

Enzymatische Reaktionen bieten eine Vielzahl an Möglichkeiten für die synthetische organische Chemie, durch die Katalyse von Reaktionen die chemisch nur schwer oder gar nicht zugänglich sind bzw. nicht mit der gewünschten Selektivität verlaufen. Jedoch ist das Spektrum an verfügbaren enzymatischen Reaktionen, trotz großer Fortschritte, im Vergleich zu den klassisch organisch chemischen Methoden immer noch begrenzt. Die Fähigkeit von Enzymen Reaktionen zu katalysieren welche außerhalb ihres natürlichen Reaktionsspektrums liegen, sogenannte promiskuitive Reaktionen, bietet die Möglichkeit das Anwendungsspektrum von bereits verfügbaren Enzymen zu erweitern, ohne auf die Suche neuer Enzyme mit den entsprechenden natürlichen Funktionen angewiesen zu sein. Daher soll in der hier vorliegenden Arbeit systematisch untersucht werden, ob und inwieweit das katalytische Potential von Metall-bindenden Enzymen genutzt werden kann um Reaktionen zu katalysieren, welche außerhalb der natürlichen Funktionalität der untersuchten Enzyme liegen. Dafür soll anhand der Taurin Dioxygenase aus *E. coli* getestet werden inwieweit das Substratspektrum auf Verbindungen ausgedehnt werden kann, welche nicht das natürlicherweise verwendete Sulfonsäure-Motiv besitzen und deren Hydroxylierung zu neuen, chiralen Bausteinen führt. Im nächsten Schritt der Arbeit soll dann getestet werden inwiefern einzelne strukturelle Elemente des Enzyms genutzt werden können, um Reaktionen zu katalysieren die sich bezüglich des Mechanismus von der natürlichen Reaktion unterscheiden. Dabei soll der Fokus auf dem im aktiven Zentrum gebundenen Metallion liegen, welches als eine Art Lewis-Säure verwendet werden soll. Weiterhin soll als zweites Modell-System zur Untersuchung der Ausnutzung von Metall-bindenden Enzymen die von Reetz und seinen Mitarbeitern entwickelte, artifizell Kupfer-bindende tHisF Variante HHD getestet werden, welche, da sie basierend auf einem hyperthermophilen Enzym aus *Thermotoga maritima* entwickelt wurde, bezüglich der Stabilität gegenüber Lösungsmitteln und Temperatur eine größere Flexibilität bezüglich der möglichen zu testenden Reaktionsparameter wie eben Temperatur und Lösungsmittelkonzentration bietet. Weiterhin besitzt die tHisF HHD Variante, aufgrund der offenen Architektur des Proteins, eine im Vergleich zur TauD besser zugängliche Metall-Bindestelle, was die Bindung und Reaktion, auch sterisch anspruchsvoller Substrate, erleichtern soll.

## 2. Material & Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in den jeweils höchsten verfügbaren Reinheitsgraden von den folgenden Firmen bezogen: Alfa-Aesar (Ward Hill, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Fluka (Buchs, CH), Macherey-Nagel (Düren, DE) und Sigma-Aldrich (St. Louis, US). Chemikalien, die weder kommerziell erhältlich, noch am Institut bereits synthetisiert und damit verfügbar waren, wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst synthetisiert (Kapitel 2.5).

#### 2.1.2. Biochemische Reagenzien & Marker

**Tabelle 1:** Marker & Biochemische Reagenzien

Marker/Reagenz	Hersteller
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
GeneRuler 1kbp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE

#### 2.1.3. Oligonukleotide (Primer)

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) zur Amplifikation von Genen, oder für die Kolonie-PCR, wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried, DE) bezogen. Die erhaltenen Primer wurden abzentrifugiert (30 s, 13400 U/min) und anschließend bei 60 °C für 10 min in ddH<sub>2</sub>O gelöst (Endkonzentration 100 pmol/μl). Aliquots die in der PCR verwendet wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Arbeitskonzentration dieser Aliquots betrug 10 pmol/μl.

**Tabelle 2:** Oligonukleotide zur Gen-Amplifikation (Restriktionsschnittstellen in kursiv und fett).

Primer	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]
TauDf_NdeI	GGGATTT <b><i>CCATATG</i></b> GAGTGAACGTCTGAGCATTACC	56
TauDr_EcoRI	<b><i>CGGAATTC</i></b> TACCCCGCCCGATAAAACGG	56

**Tabelle 3:** Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese der Taurin Dioxygenase (Mutationsstellen in **rot**)

Variante	Primer	Sequenz
TauD_His <sub>6</sub>	F	CCGTTTTATCGGGCGGGG <b>AATT</b> CGAGCTCCGTCGACAAG
	R	CTTGTCGACGGAGCTCG <b>AATT</b> CCCCGCCCGATAAAACGG
TauD_F159L	F	GCGGAGCATGATTTCCGTAAATCG <b>TTG</b> CCGGAATACAAATACCGCAAAAC
	R	GTTTTGCGGTATTTGTATTCCGGC <b>AAC</b> GATTTACGGAAATCATGCTCCGC
TauD_F159Y	F	GCGGAGCATGATTTCCGTAAATCG <b>TAC</b> CCGGAATACAAATACCGCAAAAC
	R	GTTTTGCGGTATTTGTATTCCGG <b>GTA</b> CGATTTACGGAAATCATGCTCCGC
TauD_F206L	F	CAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGG <b>CTG</b> ACTACGCGAATTGTTGATG
	R	CATCAACAATTCGCGTAGT <b>CAA</b> GCCTTCATTCACAAACAGCGCCTG
TauD_F206Y	F	CAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGG <b>TAC</b> ACTACGCGAATTGTTGATG
	R	CATCAACAATTCGCGTAGT <b>GTA</b> GCCTTCATTCACAAACAGCGCCTG
TauD_H70A	F	CCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATT <b>GCG</b> CCTGTTTACCCGCATGCC
	R	GGCATGCGGGTAAACAGG <b>CGC</b> AATATGCAATTCGCCAAAACGCTGGG
TauD_H70S	F	CCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATT <b>TCC</b> CCTGTTTACCCGCATGCC
	R	GGCATGCGGGTAAACAGG <b>GGA</b> AATATGCAATTCGCCAAAACGCTGGG
TauD_R270A	F	GCCACAGCGACGGATAATGCAT <b>GCG</b> GCGACGATCCTTGGGG
	R	CCCCAAGGATCGTCGC <b>CGC</b> ATGCATTATCCGTCGCTGTGGC
TauD_R270S	F	GCCACAGCGACGGATAATGCAT <b>TCC</b> GCGACGATCCTTGGGG
	R	CCCCAAGGATCGTCGC <b>GGA</b> ATGCATTATCCGTCGCTGTGGC

**Tabelle 4:** Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese der tHisF (Mutationsstellen in **rot**)

Variante	Primer	Sequenz
tHisF_D11A	F	CGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTC <b>GCT</b> GTGAAAGACGGTCTGTGG
	R	CCACACGACCGTCTTTTAC <b>AGCG</b> GAGAGCCGCGATTATTCTTTTAGCG
tHisF_D130A	F	GGCCGTTGTCGTGGCGATA <b>GCT</b> GCAAAAAGAGTGGATGGAG
	R	CTCCATCCACTCTTTTTGC <b>AGCT</b> TATCGCCACGACAACGGCC
tHisF_T104F	F	GGACAAGGTGAGCATAAACT <b>TTC</b> GCGGCTGTGGAGAATCC
	R	GGATTCTCCACAGCCGC <b>GAA</b> GTTTATGCTCACCTTGTC
tHisF_T104W	F	GGACAAGGTGAGCATAAACT <b>TGG</b> GCGGCTGTGGAGAATCC
	R	GGATTCTCCACAGCCGC <b>CCA</b> GTTTATGCTCACCTTGTC
tHisF_G202F	F	CCACACTTCCCATCATCGCTTCC <b>TTC</b> GGTGCGGGAAAAATGGAAGCTTCC
	R	GGAAAGCTTCCATTTTTCCCGCAC <b>CGA</b> AGGAAGCGATGATGGGAAGTGTGG
tHisF_G202W	F	CCACACTTCCCATCATCGCTTCC <b>TGG</b> GGTGCGGGAAAAATGGAAGCTTCC
	R	GGAAAGCTTCCATTTTTCCCGCAC <b>CCA</b> AGGAAGCGATGATGGGAAGTGTGG
tHisF_A224F	F	GCCGACGCTGCCCTTGCG <b>TTC</b> TCTGTCTTTGCCTTCAG
	R	CTGAAGGCAAAGACAGAG <b>GAA</b> CGCAAGGGCAGCGTCGGC
tHisF_A224W	F	GCCGACGCTGCCCTTGCG <b>TGG</b> TCTGTCTTTGCCTTCAG
	R	CTGAAGGCAAAGACAGAG <b>CCAC</b> GCAAGGGCAGCGTCGGC

### 2.1.4. Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Bei allen His<sub>6</sub>-Tag-enthaltenden Proteinen, befindet sich dieser am C-Terminus des Enzyms.

**Tabelle 5:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Insert	Quelle	ITB No.
pET22b(+)	-	ITB	-
pET22b(+)_TauD	TauD (WT)	Diese Arbeit	pITB 1022
pET22b(+)_TauD_His <sub>6</sub>	TauD_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 988
pET22b(+)_TauD_F159L	TauD_F159L_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 998
pET22b(+)_TauD_F159Y	TauD_F159Y_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 997
pET22b(+)_TauD_F206L	TauD_F206L_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 1000
pET22b(+)_TauD_F206Y	TauD_F206Y_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 999
pET22b(+)_TauD_H70A	TauD_H70A_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 989
pET22b(+)_TauD_H70S	TauD_H70S_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 990
pET22b(+)_TauD_R270A	TauD_R270A_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 991
pET22b(+)_TauD_R270S	TauD_R270S_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 992
pET22b(+)_TauD_H70A_R270A	TauD_H70A_R270A_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 993

Fortsetzung **Tabelle 5:**

<b>Plasmid</b>	<b>Insert</b>	<b>Quelle</b>	<b>ITB No.</b>
pET22b(+)_TauD_H70A_R270S	TauD_H70A_R270S_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 995
pET22b(+)_TauD_H70S_R270A	TauD_H70S_R270A_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 994
pET22b(+)_TauD_H70S_R270S	TauD_H70S_R270S_His <sub>6</sub>	Diese Arbeit	pITB 996
pET28a(+)_tHisF	tHisF_His <sub>6</sub>	Prof. Sterner <sup>[98]</sup>	pITB 1023
pET28a(+)_tHisF_HHD	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_H209A_H228A_H244A	J. Bolsinger*	pITB 1001
pET28a(+)_tHisF_NC	tHisF_C9A_H84A_H209A_H228A_H244A	J. Bolsinger*	pITB 1002
pET28a(+)_tHisF_HHD_D11A	tHisF_C9A_D11A_L50H_I50H_H84A_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1003
pET28a(+)_tHisF_HHD_D130A	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_D130A_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1004
pET28a(+)_tHisF_HHD_D11A_D130A	tHisF_C9A_D11A_L50H_I50H_H84A_D130A_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1005
pET28a(+)_tHisF_NC_D11A	tHisF_C9A_D11A_H84A_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1006
pET28a(+)_tHisF_NC_D130A	tHisF_C9A_H84A_D130A_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1007
pET28a(+)_tHisF_NC_D11A_D130A	tHisF_C9A_D11A_H84A_D130A_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1008
pET28a(+)_tHisF_HHD_T104F	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_T104F_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1016
pET28a(+)_tHisF_HHD_T104W	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_T104W_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1017
pET28a(+)_tHisF_HHD_G202_F	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_G202F_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1018
pET28a(+)_tHisF_HHD_G202_W	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_G202W_H209A_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1019
pET28a(+)_tHisF_HHD_A224F	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_H209A_A224F_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1020
pET28a(+)_tHisF_HHD_A224W	tHisF_C9A_L50H_I50H_H84A_H209A_A224W_H228A_H244A	Diese Arbeit	pITB 1021

\*Analog zu Reetz *et al.* erstelltes Plasmid (Diplomarbeit Jennifer Bolsinger)<sup>[102]</sup>

### 2.1.5. *E. coli*-Stämme & Genomische DNA

**Tabelle 6:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	ITB No.
DH5a	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (?lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	ITB 4
BL21(DE3)	F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	ITB 7
JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ $\Delta$ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ $\Delta$ M15] hsdR17(rK-mK+)	ITB 3

### 2.1.6. Kits

**Tabelle 7:** In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Hersteller
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Waltham, US
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Irvine, US
Zyppy <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Irvine, US

### 2.1.7. Software für das molekulare Docking

Für das ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Docking wurde die von Baker und seinen Mitarbeitern entwickelte Software RosettaDesign 3.4 verwendet.<sup>[105]</sup> Dabei fand die Parametrisierung der zu dockenden Moleküle mit der Software Omega der Firma OpenEye statt.<sup>[106,107]</sup>

## 2.1.8. Medien & Puffer

### 2.1.8.1. Kulturmedien

Zur Anzucht von *E. coli* Zellkulturen wurden den Flüssigmedien zur Selektion, je nach enthaltenem Plasmid und der damit einhergehenden Antibiotikum-Resistenz, entweder Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 30 µg/ml) zugesetzt. Die Zugabe erfolgte nach Autoklavieren der Medien, wenn diese auf 50 °C abgekühlt waren. Zur Herstellung von Agarplatten für die Züchtung von Zellkolonien wurden dem LB-Medium 15 g/L Agar zugegeben.

#### LB - Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

#### TB - Medium

(Die Zugabe des 10 x TB-Puffers erfolgte nach dem Autoklavieren des Mediums)

Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	5 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 900 ml
10 x TB-Puffer	100 ml

#### 10 x TB-Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 M)	170 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1 M)	720 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 2.1.8.2. Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

#### Tfbl-Puffer

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



<b>TfbII-Puffer</b>	MOPS	0,21 g
	CaCl <sub>2</sub>	1,1 g
	RbCl	0,12 g
	Glycerin	15 ml
	ddH <sub>2</sub> O	100 ml
	pH 6,5	mit HCl & NaOH

### 2.1.8.3. Puffer & Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

<b>Orange DNA Loading Buffer</b>	Saccharose	2 g
	Orange G	10 mg
	ddH <sub>2</sub> O	ad 5 ml

<b>TAE-Puffer</b>	Tris	4,8 g
	Eisessig	1,14 ml
	0,5 M EDTA-Lösung	2 ml
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
	pH 8	mit HCl & NaOH

<b>1 % Agarose Lösung:</b>	Agarose	6 g
	TAE-Puffer	ad 600 ml

### 2.1.8.4. Puffer & Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

<b>6x SDS PAGE Loading Buffer</b>	Tris-HCl pH 8	350 mM
	DTT	600 mM
	Glycerol	30 % (v/v)
	SDS	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,12 % (w/v)

<b>10 x Elektrophorese-Puffer</b>	Tris	121 g
	HEPES	238 g
	SDS	10 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	Methanol	30 % (v/v)
	Essigsäure (99,8 %)	10 % (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	60 % (v/v)
	Coomassie-Brilliantblau R-250	1 g/l

<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	Methanol	30 % (v/v)
	Essigsäure (99,8 %)	10 % (v/v)
	ddH <sub>2</sub> O	60 % (v/v)
<b>Sammelgel-Puffer</b>	TRIS HCl	1 M
	SDS	0,7 % (m/v)
	pH 6,8	mit HCl & NaOH
<b>Trenngel-Puffer</b>	TRIS HCl	1,5 M
	SDS	0,38 % (m/v)
	pH 8,8	mit HCl & NaOH

### 2.1.8.5. *Puffer & Lösungen für die Proteinaufreinigung per Äkta-System*

<b>Bindepuffer A</b>	Natriumchlorid	150 mM
	Kaliumphosphatpuffer	20 mM
	Imidazol	20 mM
	ddH <sub>2</sub> O	1 L
<b>Elutionspuffer A</b>	Natriumchlorid	150 mM
	Kaliumphosphatpuffer	20 mM
	Imidazol	500 mM
	ddH <sub>2</sub> O	1 L
<b>Bindepuffer B</b>	Tris HCl	10 mM
	pH 7,4	mit HCl & NaOH
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
<b>Elutionspuffer B</b>	Tris HCl (10 mM)	10 mM
	Natriumchlorid	1 M
	pH 7,4	mit HCl & NaOH
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L

## 2.2. Analytische Methoden

Die Analyse der Biotransformationen der neuen Reaktionen mit den entsprechenden flüchtigen Substraten wurde mittels GC-MS durchgeführt (Kapitel 2.2.1.), während die Analyse der Umsetzungen der zwitterionischen Verbindungen (u.a.  $\omega$ -Aminocarbonsäuren; Kapitel 2.2.2.) mittels HPLC durchgeführt wurde.

### 2.2.1. Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)

#### 2.2.1.1. GC-MS Methode zur Analyse der neuen Reaktionen mit *tHisF*

GC-MS Analysen der Biotransformationen der neuen Reaktionen wurden an einem Gaschromatograph des Typs GC2010 (Shimadzu, Nakagyo-ku, JP), welcher an einen MS-Detektor des Typs GC-MS QP2010 (Shimadzu, Nakagyo-ku, JP) gekoppelt war, durchgeführt. Als Trägergas wurde He mit einer linearen Geschwindigkeit von 30 cm/s verwendet (linear velocity 30 cm/s). Die gaschromatographische Trennung der Substanzen erfolgte über eine DB-5MS Säule (Dimensionen: 30 m, 0,25 mm ID, 0,25  $\mu$ m FD) mit dem in Tabelle 8 gegebenen Temperaturprogramm. Die Injektortemperatur wurde auf 250 °C gesetzt, während die Ionenquellentemperatur auf 250 °C und die Interface Temperatur auf 270 °C eingestellt wurden. Die Detektion per MS Detektor erfolgte im EI-Modus (engl.: Electron Impact) bei 70 eV im Scan-Modus (Massenbereich von 40 m/z bis 500 m/z). Die Messung des Detektors wurde bei Minute 6 des Temperaturprogramms gestartet („solvent cut“: 6 min) um eine Sättigung des Detektors mit Lösungsmitteln zu verhindern.

**Tabelle 8:** GC-MS Säulen-Temperaturprogramm

Rate	Finale Temperatur	Haltezeit
-	60	3
6	120	-
10	150	-
15	170	-
20	200	-
30	320	5

## **2.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

### **2.2.2.1. Umkehrphasen-HPLC-Methode zur Analyse derivatisierter, zwitterionischer $\omega$ -Aminocarbonsäuren mittels HPLC-Fluoreszenz Messung**

HPLC Analysen von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren in geringen Konzentrationen, welche unterhalb der Detektionsgrenze der Standard-Analysenmethode (Kapitel 2.2.2.2) lagen wurden mittels Derivatisierung der entsprechenden Verbindungen mit *ortho*-Phtaldialdehyd-Reagenz (OPA) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung für die Analyse wurde das Enzym der entsprechenden zu analysierenden Biotransformationen mittels Hitzeschock (80 °C, 10 min, 850 rpm) inaktiviert und gefällt, sowie anschließend abzentrifugiert (5 min, 13400 U/min). Dem Überstand wurden anschließend 40  $\mu$ l zur HPLC-Analyse entnommen. Die Analysen erfolgte auf einem HPLC-System des Typs Agilent Infinity 1200 mit angeschlossenem Autosampler (Agilent Infinity 1200) und Fluoreszenzdetektor (Agilent Infinity 1260). Die Derivatisierung der zu analysierenden Proben der Reaktionsmischung der Biotransformationen erfolgte unmittelbar vor Injektion der Proben durch versetzen eines Aliquots der zu analysierenden Probe mit einem Aliquot OPA-Derivatisierungsreagenz, wofür das in Tabelle 9 gezeigte Injektorprogramm verwendet wurde. Dies erleichtert die Reproduzierbarkeit der Messungen, da die Derivatisierung mit OPA nicht stabil ist und sich das gebildete Derivat nach kurzer Zeit zu zersetzen beginnt.<sup>[108]</sup> Die anschließende Trennung der verschiedenen derivatisierten Reaktionskomponenten erfolgte über eine C18-Umkehrphasen-Säule (Eclipse XDB C-18; 4,6 x 150 mm; 5  $\mu$ m; Agilent) bei einem konstanten Laufmittelfluss von 1 ml/min und einer Säulenofentemperatur von 40 °C. Hierfür wurde ein Laufmittelgemisch bestehend aus den Komponenten A (40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4) und B (Methanol, Acetonitril, H<sub>2</sub>O im Verhältnis 45:45:10) verwendet, dessen Zusammensetzung in Abhängigkeit der Zeit variiert wird und dessen Zusammensetzung in dem in Tabelle 10 gezeigten Gradientenprogramm. Die Detektion der Verbindungen erfolgte mittels Fluoreszenz Messung ( $\lambda_{Abs} = 340$  nm;  $\lambda_{Em} = 450$  nm).

**Tabelle 9:** Injektorprogramm zur Derivatisierung von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren

Reihe #	Aktion
1	Draw 40 $\mu$ l from Vial 1, max. speed, def. offset
2	Eject 40 $\mu$ l into sample, max. speed, def. offset
3	Mix 60 $\mu$ l sample, max. speed, def. offset
4	Wait 1 min.
5	Draw 10 $\mu$ l from sample, max. speed, def. offset
6	Inject

**Tabelle 10:** Laufmittelgradient des Umkehrphasen-HPLC Programms zur Fluoreszenzanalyse

t [min]	% A	%B
0	100	0
20,25	59,5	40,5
25	0	100
26	0	100
27	100	0
32	100	0

### **2.2.2.2. Umkehrphasen-HPLC-Methode zur chiralen Analyse von $\alpha$ -hydroxylierten $\omega$ -Aminocarbonsäuren mittels HPLC-ELSD (Evaporative light scattering detector)**

Die Analyse  $\alpha$ -hydroxylierter  $\omega$ -Aminocarbonsäuren erfolgte an einer Agilent HPLC-Anlage mit angeschlossenem ELSD-Detektor (beides Agilent Infinity 1260 Serie). Die Probenvorbereitung erfolgte, analog der Probenvorbereitung der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Probenvorbereitung, per Hitzefällung des Enzyms aus dem Biotransformationsansatz und anschließendem Abzentrifugieren des gefällten Enzyms. Zur Analyse wurden 10  $\mu$ l der Biotransformationslösung injiziert und über eine Reprosil Chiral-AA Säule (Reprosil Chiral-AA; 4,6 x 250 mm; 8  $\mu$ m; Dr.Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) bei einem Fluss von 0,8 ml/min, einer Säulenofentemperatur von 30 °C und einem binären isokratischen Laufmittelgemisch von Methanol und Wasser (50:50) getrennt. Die Detektion der Komponenten erfolgte mittels des angeschlossenen ELSD-Detektors (Evaporator Temperatur: 50 °C; Nebulizer Temperatur: 50 °C; Gasfluss 1,6 m<sup>3</sup>/h). Bei dieser Analysenmethode ist jedoch zu beachten, dass aufgrund des physikalischen Funktionsprinzips des Detektors, welches auf der Lichtstreuung von Substanz-Partikeln durch Verdampfen der flüchtigen Probenmatrix besteht, eine Linearität

des Verhältnisses von Detektorsignal zu Probenmenge, analog zur Bestimmung optischer Dichten, nur innerhalb gewisser Konzentrationsgrenzen gegeben ist. Die Auswertung und Quantifizierung der entsprechenden Produkte erfolgte anhand von Kalibriergeraden der jeweiligen zu detektierenden Substanzen.

### **2.2.2.3. Umkehrphasen-HPLC-Methode mit gekoppletem Brechungsindexdetektor zur Analyse von $\alpha$ -hydroxylierten Carbonsäuren**

Die Analyse  $\alpha$ -hydroxylierter Carbonsäuren erfolgte an einer Agilent HPLC-Anlage mit angeschlossenem Brechungsindex-Detektor (RI; engl.: Refractive Index, beides Agilent Infinity 1200 Serie). Die Probenvorbereitung erfolgte, analog der Probenvorbereitung der in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Probenvorbereitung, per Hitzefällung des Enzyms aus dem Biotransformationsansatz und anschließendem Abzentrifugieren des gefällten Enzyms. Zur Analyse wurden 10  $\mu$ l der Biotransformationslösung injiziert und über eine Aminex HPX-87H Säule (HPX-87H; 7,8 x 300 mm; 9  $\mu$ m; BioRad, Hercules, DE) bei einem Fluss von 0,5 ml/min, einer Säulenofentemperatur von 60 °C mit 5 mM Schwefelsäure als Laufmittel getrennt. Die Detektion der Komponenten erfolgte mittels des angeschlossenen RI-Detektors (Detektortemperatur 30 °C). Die Auswertung und Quantifizierung der entsprechenden Produkte erfolgte anhand von Kalibriergeraden der jeweiligen zu detektierenden Substanzen.

#### 2.2.2.4. Umkehrphase-HPLC-Methode mit gekoppeltem Massenspektrometer (LC-MS) zur Analyse von Michael-Additions-Reaktionen

Für die Untersuchungen zu Michael-Addition verschiedener Nucleophile an das Azachalcon **42**, welche in Zusammenarbeit mit Jennifer Bolsinger im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden, wurde ein LC-MS Programm zur Analyse der entstehenden Produkte entwickelt. Die Analyse der Michael-Additions-Reaktionen erfolgte an einem Agilent LC-System der Serie Infinity 1260 mit gekoppeltem Massenspektrometer (Agilent 6130 Quadrupole LC/MS). Die Auftrennung der Probe (Injektionsvolumen 1 µl) erfolgte über eine Agilent Poroshell120-C18-Säule (Agilent Technologies; 3,0 x 50 mm; 2,7 µm) bei einem konstanten Laufmittelfluss von 0,4 ml/min und einem binären Laufmittelgemisch der Laufmittel A (H<sub>2</sub>O mit 0,1 % Ameisensäure) und B (Acetonitril) deren Verhältnis über die Zeit verändert wird (Laufmittelgradient Tabelle 11). Die Detektion der Analyten erfolgte mittels des MS-Detektors, unter den in Tabelle 12 gegebenen Detektorparameter. Die Auswertung erfolgte anhand von Flächenprozent des Gesamtchromatogramms.

**Tabelle 11:** Laufmittelgradient des LC-MS Messprogramms

t [min]	% A	%B
0 min	65	35
0,4 min	65	35
5 min	50	50
7 min	50	50
7,01	65	35
8	65	35

**Tabelle 12:** Parameter des Massenspektrometers

Parameter	Einstellung
Ionisierungsmodus	ESI (positive)
Messbereich [m/z]	150 - 600
Fragmentor	± 70
Trockengasfluss	12 L/min
Trockengastemperatur	350°C
Zerstäuberdruck	35 psi
Kapillarenspannung	± 3000 V

#### **2.2.2.5. Normalphasen-HPLC-Methode zur chiralen Analyse der tHisF katalysierten Diels-Alder-Reaktion**

Die Analyse der tHisF katalysierten Diels-Alder-Reaktion erfolgte an einer Agilent HPLC-Anlage mit angeschlossenem Diodenarray-Detektor (DAD; engl.: diode array detector) (beides Agilent Infinity 1200 Serie). Die Probenvorbereitung erfolgte, wie in Kapitel 2.4.8. beschrieben. Zur Analyse wurden 10 µl der Biotransformationslösung injiziert und über eine Daicel Chiralpak-IB Säule (Chiralpak-IB; 4,3 x 150 mm; 5 µm; Daicel, Osaka, JP) bei einem Fluss von 0,5 ml/min, bei Raumtemperatur mit einem isokratischen Laufmittelgemisch von *n*-Heptan:Isopropanol (99:1) getrennt. Die Detektion der Komponenten erfolgte mittels des angeschlossenen DAD-Detektors bei 220 nm. Die Auswertung erfolgte anhand von Flächenprozent des Gesamtchromatogramms.

#### **2.2.2.6. Normalphasen-HPLC-Methode zur chiralen zur Analyse der tHisF katalysierten Michael-Addition**

Die Analyse der tHisF katalysierten Diels-Alder-Reaktion erfolgte an einer Agilent HPLC-Anlage mit angeschlossenem Diodenarray-Detektor (DAD; engl.: diode array detector) (beides Agilent Infinity 1200 Serie). Die Probenvorbereitung erfolgte durch Extraktion der Ansätze mit zwei Mal 300 µl Ethylacetat. Dabei wurden die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel anschließend unter einem geringen Stickstoffstrom verdampft. Der Rückstand wurde anschließend in 700 µl Laufmittel (*n*-Heptan:Isopropanol 85:15) gelöst. Zur Analyse wurden 10 µl der Biotransformationslösung injiziert und über eine Reprosil Chiral-AM Säule getrennt (Reprosil Chiral-AM; 4,6 x 250 mm; 8 µm; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) bei einer Flussrate von 2 ml/min und einem isokratischen Laufmittelgemisch von *n*-Heptan:Isopropanol (85:15) getrennt und mittels des DAD-Detektors bei 220 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte anhand von Flächenprozent des Gesamtchromatogramms.



## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (MiniPräp)**

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein ZyppyPlasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, US) verwendet. Die Präparation der benötigten Zellen erfolgte durch das Anzüchten von Übernachtskulturen (5 ml Volumen) in LB-Selektionsmedium bei 37 °C und 180 U/min. Die Isolation der Plasmid-DNA Plasmide erfolgte nach Herstellerangaben. Die Konzentration der resultierenden Plasmid-Präparation wurde mittels Absorptionsmessung bei 260 nm an einem NanoDrop 1000 (Agilent, Santa Clara, US) bestimmt.

### **2.3.2. Herstellung RbCl-kompetenter Zellen**

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid Methode. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium mit den benötigten *E. coli*-Zellen aus einer Übernachtskultur inokuliert und im Schüttelinkubator bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellkultur wurde anschließend für 5 min auf Eis gelagert und dann abzentrifugiert (4 °C; 10 min; 4000 U/min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 ml TfbI-Puffer resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluß erneut abzentrifugiert (4 °C; 10 min; 4000 U/min). Nach erneutem Resuspendieren des Pellets in 5 ml TfbII-Puffer, wurden die Zellen nochmals 15 min bei 0 °C inkubiert, anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei - 80 °C gelagert.

### **2.3.3. DNA Amplifikation per Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur *in vitro* Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten (Plasmid- oder genomischer DNA) wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet.<sup>[109]</sup> Die Annealingtemperatur der in der PCR verwendeten Primer wurde für jeden Primer mithilfe des im Internet frei verfügbaren OligoCalculators berechnet.\* Die resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend per Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (Kapitel 2.3.5.).

\*(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

**Tabelle 13:** Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA mittels PCR

DNA-Templat	1 ng – 1 µg
Forward Primer (1 µM)	0,2 µM
Reverse Primer (1 µM)	0,2 µM
10 x <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> 20mM)	5 µl
<i>Pfu</i> Polymerase (2,5 U/µl)	1,25 U
dNTPs (jeweils 2,5 mM)	0,2 mM (jeweils)
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl
total	50 µl

**Tabelle 14:** PCR-Programm zur Amplifikation von DNA mittels *Pfu/Psp* DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 30
Annealing	54 – 57 °C *	1 min	
Elongation	75 °C	1 min pro 500 bp	
Zu Schritt 2			
Elongation	75 °C	1 min pro 500 bp	1

\*(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

**Tabelle 15:** PCR-Programm zur Amplifikation von DNA mittels *PfuUltra II HS* DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 30
Annealing	54 – 57 °C *	1 min	
Elongation	72 °C	15 s pro 1 kb	
Zu Schritt 2			
Elongation	72 °C	1 min pro 500 bp	1

\*(<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

### 2.3.4. Überprüfung einer Gen-Insertion durch Kolonie-PCR

Die Insertion eines Genes wurde neben Restriktionsverdaus (Kapitel 2.3.6.) auch durch Kolonie-PCR überprüft. Hierfür wurden dieselben Primer verwendet, die auch für die Amplifikation der entsprechenden Gene verwendet wurden. Einzelne Kolonien eines Ligationsansatzes wurden ausgewählt und als ganze Zellen in ein PCR-Röhrchen mit PCR-

Ansatz (Tabelle 16) überführt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel 2.3.5.) und mit UV-Licht detektiert. Sequenziert wurden die Plasmide, welche ein PCR-Produkt der entsprechenden Gen-Größe zeigten.

**Tabelle 16:** PCR-Ansatz für die Kolonie-PCR

Forward Primer (10 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0,4 $\mu$ M
10 x Polymerase Puffer (+ MgCl <sub>2</sub> 20mM)	2,5 $\mu$ l
<i>Taq</i> Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	1,25 U
dNTPs (jeweils 2,5 mM)	0,2 mM jeweils
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l
total	25 $\mu$ l

**Tabelle 17:** PCR-Programm für eine Kolonie-PCR zur Überprüfung der Gen-Klonierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	4 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 30
Annealing	54 – 57 °C *	1 min	
Elongation	72 °C	1 min pro 1 kbp	
Zu Schritt 2			
Elongation	72 °C	1 min pro 1 kbp	1

### 2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Proben aus Restriktionsverdau oder PCR erfolgte nach der Agarose-Gelelektrophorese Methode, wobei 1 %-ige Agarosegele verwendet wurden.<sup>[110]</sup> Zur Visualisierung der DNA wurden dem Gel beim Gießen 5  $\mu$ l GelRed™ (Biotum) pro 50 ml 1 %-ige Agaroselösung gegeben (Kapitel 2.1.8.3.). Als interner DNA-Standard wurden je 5  $\mu$ l GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, DE) verwendet. DNA-Proben wurden mit Loading Buffer (Kapitel 2.1.8.3) versetzt und in die entsprechenden Taschen gefüllt. Die Trennung der DNA-Proben erfolgte bei konstanter Spannung (120 V) über 30 - 45 min. Die Detektion und Dokumentation erfolgte über eine Dokumentationsstation (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE).

Zur Aufreinigung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde die gewünschten DNA-Banden aus dem jeweiligen Gel ausgeschnitten und mit einem GelExtraction Kit der Firma Zymo Research nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### **2.3.6. Restriktionsverdau von DNA**

Die Restriktion von DNA erfolgte durch Zugabe von Restriktionsenzymen der Firma Fermentas wobei die Bedingungen (verwendeter Puffer und Dauer des Restriktionsverdaus) gemäß den Angaben des Herstellers den verwendeten Restriktionsenzymen entsprechend gewählt wurden. Die anschließende Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte ebenfalls nach Vorgabe des Herstellers. Die entsprechenden Produkte des Restriktionsverdaus wurden *via* Agarosegel-Elektrophorese überprüft und aufgereinigt (Kapitel 2.3.5).

### **2.3.7. Ligation von DNA-Fragmenten mit der Hilfe der T4-DNA-Ligase**

Die T4-DNA-Ligase kann sowohl überhängende (sticky), als auch glatte (blunt) Restriktionsenden von DNA-Fragmenten verknüpfen. Für diese Reaktion wird ATP als Kofaktor für die DNA-Ligase benötigt. Die Konzentrationen der Vektoren und Inserts wurden durch Absorptionsmessung bei 260 nm im NanoDrop Spektrometer bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis von Insert zu Vektor so gewählt, dass es einem Mengenverhältnis von 3:1 entsprach und die entsprechenden Volumina zum Ligationsansatz zugegeben (Tabelle 18).

Die Ligationsansätze wurden bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert und das Enzym anschließend 10 min bei 65 °C inaktiviert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 200 µl kompetenter *E. coli* DH5α Zellen gemischt und nach einer Transformation (Kapitel 2.3.8.) auf Selektionsagarplatten ausgestrichen. Als Negativkontrolle wurde der Vektor ohne Insert ligiert. Nach Überprüfung der Insertion durch Restriktionsverdau und Kolonie-PCR (Kapitel 2.3.4.), wurden positive Klone ausgewählt und die Insertion durch DNA-Sequenzierung überprüft.

**Tabelle 18:** Reaktionsansatz einer Ligation von Vektor und Insert mit der T4-DNA-Ligase

Vektor	20-100 ng
Insert	3 :1 molares Verhältnis (Insert:Vektor)
10x T4-Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase (5 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

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

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmid DNA erfolgte durch die Hitzeschock-Methode. Hierzu wurde einem Aliquot chemisch kompetenter Zellen Plasmid DNA zugegeben und die Zellen anschließend für 45 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeschock (Inkubation der Zellen für 45 s bei 42 °C im Heizblock) mit nachfolgender Inkubation für 2 - 3 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die transformierten Zellen eine Stunde bei 37 °C und 400 U/min inkubiert, anschließend abzentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl verworfen. Das Pellet wurde in den verbleibenden 100 µl Kulturmedium resuspendiert, der komplette Ansatz auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.3.9. Ortsgerichtete Mutagenese von Genen per Quik-Change PCR**

Für die Einführung von Punktmutationen wurde die QuikChange<sup>®</sup> PCR Methode verwendet, wobei die Durchführung in Anlehnung an die Herstellerangaben der Firma Stratagene für das QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit erfolgte. Dabei werden Primer entworfen, welche ca. 25 - 45 bp lang sind und in ihrer Mitte die gewünschte Mutation enthalten. Die Nukleotidsequenz nach der gewünschten Mutation sollte mindestens ca. 15 bp betragen und auf G oder C enden. Die Schmelztemperatur sollte mindestens 78 °C betragen, wobei die Berechnung der Schmelztemperatur nach der von Stratagene in der entsprechenden Anleitung gegebenen Formel erfolgte. Zu beachten ist, dass bei der QuikChange<sup>®</sup> beide Primer dieselbe Sequenz darstellen, nur auf unterschiedlichen Strängen der DNA, sodass forward und reverse Primer komplementär zueinander sind. Im Laufe der PCR wird dann das komplette Plasmid amplifiziert und nicht wie bei der klassischen PCR nur das Zielgen, sodass der Amplifikationsschritt des PCR-Programms entsprechend länger ist als bei der normalen PCR (Tabelle 19) und auch

weniger Zyklen beinhaltet. Die Zusammensetzung der QuikChange<sup>®</sup> PCR Ansätze war jedoch analog den Ansätzen der klassischen PCR mit *Pfu/Psp* DNA-Polymerase (Kapitel 2.3.3.)

Im Anschluss an die QuikChange<sup>®</sup> PCR werden die Parentalstränge der PCR, also das ursprüngliche bakterielle Plasmid, mittels des Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. Dafür wird dem QuikChange<sup>®</sup> PCR-Ansatz 1 µl *DpnI* zugegeben, der gesamte Ansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss daran das Enzym für 20 min bei 80 °C inaktiviert. Nach der Inaktivierung des *DpnI* Restriktionsenzym wurden *E. coli* DH5α Zellen mit 5 µl des PCR Ansatzes transformiert (Kapitel 2.3.8.). Die Analyse der erhaltenen Transformanden erfolgte durch Sequenzierung der Inserts der entsprechenden, aus den erhaltenen Kolonien isolierten, Plasmide (Kapitel 2.3.10.).

**Tabelle 19:** PCR-Programm der QuikChange<sup>®</sup> PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 25
Annealing	55 °C *	1 min	
Elongation	75 °C	1 min pro 500 bp	
Zu Schritt 2			
Elongation	75 °C	1 min pro 500 bp	1

\* Annealingtemperatur hier unabhängig von der Primer-Schmelztemperatur auf 55 °C

### 2.3.10. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von isolierter Plasmid-DNA wurde bei GATC Biotech (GATC Biotech, Konstanz, DE) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Didesoxy-Methode nach Sanger.<sup>[111]</sup> Als Primer wurden die bei GATC vorhandenen Standardprimer T7 und pET-RP verwendet, welche für pET-Vektor Systeme entworfen wurden.

## **2.4. Biochemische Methoden & Aktivitätstests**

### **2.4.1. Proteinexpression in *E. coli* Zellen**

#### **2.4.1.1. Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3) per Induktion mit IPTG**

Die Expression mittels IPTG Induktion erfolgte für die TauD und die tHisF, insofern nicht anders angegeben, jeweils analog. Dafür wurde eine 5 ml Übernachtskultur mit dem entsprechenden Selektionsmarker versehen, mit den Expressionsstämmen von einer LB-Agar Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Die Inokkulation der Hauptkultur (LB-Medium) erfolgte am nächsten Tag, wobei 2 ml der Übernachtskultur verwendet wurden um 400 ml Hauptkultur zu inokkulieren. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 bei 37 °C inkubiert und anschließend mit IPTG induziert. Die Endkonzentration an IPTG betrug dabei bei der Expression der TauD 0,5 mM und bei der Expression der tHisF 1 mM. Nach Induktion wurden die Kulturen weitere 5 h bei 30 °C und 180 U/min inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellernte erfolgte an einer Zentrifuge des Typs Avanti J26S XP (BeckmannCoulter, Pasadena, US) mit einem Rotor des Typs JLA 8.100 (selber Hersteller) bei 7000 U/min für 25 min bei 4 °C.

#### **2.4.1.2. Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3) per Autoinduktion**

Die Expression mittels Autoinduktion erfolgte für die TauD und die tHisF, insofern nicht anders angegeben, jeweils analog. Dafür wurde eine 5 ml Übernachtskultur mit dem entsprechenden Selektionsmarker versehen, mit den Expressionsstämmen von einer LB-Agar Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Die Inokkulation der Hauptkultur (TB-Medium) erfolgte am nächsten Tag, wobei 2 ml der Übernachtskultur verwendet wurden um 400 ml Hauptkultur zu inokkulieren. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 bei 37 °C inkubiert und anschließend für weitere 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellernte erfolgte an einer Zentrifuge des Typs Avanti J26S XP (BeckmannCoulter, Pasadena, US) mit einem Rotor des Typs JLA 8.100 (selber Hersteller) bei 7000 U/min für 25 min bei 4 °C.

### **2.4.2. Zellaufschluss von *E. coli* Zellen**

Zum Aufschluss von *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall-Lyse der Zellen, wurden die zu lysierenden Zellen in 3 ml Aufschlusspuffer pro 1 g Zellmasse resuspendiert. Als Zellaufschlusspuffer wurde, je nach anschließendem Verwendungszweck des Zellysats, der jeweils zur Verwendung passende Puffer verwendet. So wurde bei zu lysierenden Zellen deren enthaltenes Zielprotein anschließend aufgereinigt werden sollte, der jeweils passende Bindepuffer der Proteinaufreinigungsmethode verwendet (Kapitel 2.4.3.). Der Zellaufschluss erfolgte dann mittels Ultraschall an einem Sonifier (Branson Sonifier W250) bei 80 Watt und einem Arbeitsintervall von 20 %. Der Aufschluss erfolgte bei 0 °C, jeweils vier Mal für eine Minute mit jeweils einer Minute Unterbrechung zwischen den Aufschlussintervallen. Im Anschluss daran wurden die unlöslichen Zellbestandteile in einer Zentrifuge des Typs Avanti J26S XP (BeckmannCoulter, Pasadena, US) mit einem Rotor des Typs Ja25.50 (selber Hersteller) abzentrifugiert (18000 U/min; 25 min; 4 °C).

### **2.4.3. Proteinaufreinigung**

Zur Aufreinigung von Proteinen wurden ÄKTA Systeme (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) verwendet. Dabei wurde für die Aufreinigung der Proteine (TauD und die entsprechenden Varianten) mit His<sub>6</sub>-Tag (Kapitel 2.4.3.1.) ein ÄKTApurifier System mit einem angeschlossenen Fraktionssammler des Typs Frac-950 verwendet. Die Aufreinigung der tHisF über Anionenaustauscherchromatographie (Kapitel 2.4.3.2) hingegen erfolgte an einem ÄKTAexplorer System. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Probenhandhabung bei 4 °C. Die Proben wurden jeweils unmittelbar vor der Auftragung auf die entsprechenden ÄKTA Systeme über einen Spritzenfilter filtriert (0,2 µm Porengröße), um eventuelle partikuläre Verunreinigungen (restliche Zelltrümmer o.ä.) zu entfernen.

#### **2.4.3.1. Proteinaufreinigung von His<sub>6</sub>-Tag enthaltenden Proteinen per Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie**

Die Proteinaufreinigung von His<sub>6</sub>-Tag enthaltenden Proteinen (TfdA, TauD und Varianten) erfolgte über das oben genannte ÄKTApurifier System mittels Ni-Affinitätschromatographie, bei der Proteine mit einem solchen His<sub>6</sub>-Tag über eine



Säulenmatrix mit gebundenen Ni<sup>2+</sup>-Ionen geleitet werden und an dieser Probenmatrix, aufgrund der Affinität der Histidin-Seitenketten gegenüber Ni<sup>2+</sup>, gebunden werden.

Die Aufreinigung erfolgte an einer 5ml HiTrap Chelating HP Säule (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) unter Verwendung eines binären Puffersystems (Bindepuffer A und Elutionspuffer A; Kapitel 2.1.8.5). Die Probenauftragung auf die Säule erfolgte automatisch über eine, dem ÄKTApurifer angeschlossene, Probenschleife (engl.: Loop) mit einem Volumen von 10 ml. Der Arbeitsfluss der verwendeten Methode betrug 3,5 ml/min. Die Größe der gesammelten Fraktionen betrug 10 ml bei Probenauftragung (Durchfluss) und 5 ml im Schritt der Probenelution.

Im ersten Schritt des Programms wird die Säule mit zwei Säulenvolumen Bindepuffer A equilibriert. Anschließend wird die Probe über den Loop aufgetragen, wobei diese Auftragung mit dem doppelten seines Eigenvolumens des Loops (20 ml) an Bindepuffer A durchgeführt wird. Die Säule mit der nun gebundenen Probe wird dann mit zwei Säulenvolumen gespült, um eventuell vorhandene unspezifisch bindende Proteine von der Säule zu eluieren. Die Elution des aufzureinigenden Proteins erfolgte durch einen linearen Gradienten bei dem sukzessive über acht Säulenvolumen die Pufferzusammensetzung von 100 % Bindepuffer A und 0 % Elutionspuffer A auf 20 % Bindepuffer A und 80 % Elutionspuffer A variiert wurde. Im Anschluss daran wurde die Pufferkonzentration des Elutionspuffers A in einer Stufe auf 100 % erhöht und die Säule so über zwei Säulenvolumen gespült, um eventuell vorhandene, noch nicht eluierte Proteine von der Säule zu entfernen. Alle Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Darauf folgend wurde, um das in der Proteinlösung nun vorhandene Imidazol zu entfernen, das erhaltene Zielprotein gegen einen Puffer ohne Imidazol (je nach Protein und Verwendungszweck) über Nacht dialysiert (10 kDa MWCO) und mit, je nach erhaltenem Probenvolumen, Vivaspin6 oder Vivaspin20 Säulen mit 10 kDa MWCO (Sartorius-Stedim biotech, Göttingen, DE) aufkonzentriert.

#### **2.4.3.2. Proteinaufreinigung per Anionenaustauscherchromatographie**

Die Proteinaufreinigung der tHisF, welche keinen His<sub>6</sub>-Tag enthält erfolgte mittels Anionenaustauscherchromatographie an dem oben genannten ÄKTAexplorer. Bei dieser Methode wird die Netto-Oberflächenladung von Proteinen bei einem gegebenen pH-Wert genutzt, um diese an eine geladene Trägermatrix zu binden und anschließend durch Erhöhung der Salzkonzentrationen im Puffersystem zu eluieren.

Die hierfür in dieser Arbeit verwendete Säule war bereits durch vorhergehende Arbeiten am Institut für Technische Biochemie (ITB) vorhanden. Bei dem verwendeten Säulengehäuse handelt es sich um eine Säule des Typs XK-16 (ehemals Pharmacia, Uppsala, SE; jetzt GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), während es sich bei dem verwendeten Säulenmaterial um Anionenaustauscher-Medium des Typs TOYOPEARL DEAE-650M (Tosoh, Minato, JP) handelte. Das Säulenvolumen der Anionenaustauschersäule betrug 30,4 ml. Die Probenauftragung auf die Säule erfolgte, analog zur oben beschriebenen Methode zur Aufreinigung His<sub>6</sub>-Tag enthaltender Proteine, automatisch über eine 10 ml Probenschleife (engl.: Loop). Die Aufreinigung erfolgte anhand eines binären Puffersystems (Bindepuffer B und Elutionspuffer B; Kapitel 2.1.8.5) bei einem Laufmittelfluss von 5 ml/min. Die Größe der gesammelten Fraktionen betrug 20 ml bei Probenauftragung (Durchfluss), 10 ml im Schritt des linearen Gradienten der Probenelution und 20 ml in der letzten Stufe der Elution. Im ersten Schritt der Methode wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen Bindepuffer B equilibriert und daraufhin die Probe mit 20 ml Bindepuffer B zur Probenauftragung vom Loop über die Säule geleitet. Eluiert wurde die Probe mit einem gemischten linearen und Stufengradienten. Zu Beginn der Elution wurde die Säule mit der gebundenen Probe nochmals mit zwei Säulenvolumen Bindepuffer B gewaschen, um unspezifisch bindende Proteine und andere Lysatbestandteile zu eluieren. Anschließend wurde durch einen linearen Gradienten über sechs Säulenvolumen die Konzentration des Elutionspuffers B auf 25 % erhöht und mit dieser Konzentration für weitere 0,25 Säulenvolumen gehalten. Im nächsten Schritt wurde die Konzentration des Elutionspuffers B in einer Stufe auf 100 % erhöht und die restlichen auf der Säule gebundenen Bestandteile mit zwei Säulenvolumen Elutionspuffers B eluiert. Die gewünschten Fraktionen wurde gesammelt, vereinigt, mittels PD-10 Säulen (GE Healthcare, Solingen, DE) nach Herstellerangaben mit dem gewünschten Puffer entsalzt und anschließend, je nach erhaltenem Probenvolumen, mit Vivaspin 6 oder Vivaspin20 Säulen mit 10 kDa MWCO (Sartorius-Stedim biotech, Göttingen, DE) aufkonzentriert.

#### **2.4.3.3. Hitzeschock-Aufreinigung der tHisF (Grobaufrreinigung)**

Zur groben Aufreinigung der tHisF nach der Hitzeschock Methode, wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend 30 min bei 72 °C inkubiert, wodurch die nativen *E. coli* Proteine gefällt wurden. Nach dem Hitzeschock wurden die gefällten Zellbestandteile in einer Zentrifuge des Typs Avanti J26S XP (BeckmannCoulter,

Pasadena, US) mit einem Rotor des Typs Ja25.50 (selber Hersteller) abzentrifugiert (18000 U/min; 25 min; 4 °C). Der Überstand wurde anschließend mittels PD-10 Säulen (GE Healthcare, Solingen, DE) nach Herstellerangaben mit dem gewünschten Puffer entsalzt und anschließend mit Vivaspin 6 oder Vivaspin20 Säulen mit 10 kDa MWCO (Sartorius-Stedim biotech, Göttingen, DE) auf die gewünschte Proteinkonzentration aufkonzentriert.

#### **2.4.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

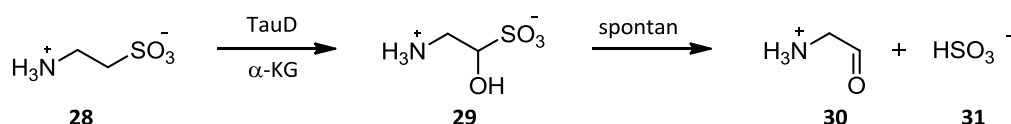
Zur Trennung und Analyse von Proteingemische wurde die von Laemmli *et al.* entwickelte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht an einer Polymermatrix (Polyacrylamid) getrennt werden.<sup>[112]</sup> Dafür wurden Proben mit 6x SDS Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die in der Probe enthaltenen Proteine zu linearisieren. Um diesen Vorgang zu unterstützen und eventuell vorhandene Disulfidbrücken zu brechen, enthält der Probenpuffer Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens. Die so denaturierten Proben wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und Spannung angelegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist hierbei abhängig von der Porengröße des Gels, der Größe sowie der Ladung der aufzutrennenden Proteine (welche durch Anlagerung von SDS-Molekülen verursacht wird), die wiederum mit der Größe und damit der möglichen Anlagerungsfläche für SDS-Moleküle korreliert.

Für die diskontinuierliche Gelelektrophorese wurden je nach Größe der zu trennenden Proteine 10 %-ige oder 12 %-ige Trenngele verwendet, welche jeweils noch mit einem Sammelgel niedrigerer Konzentration (4 % Acrylamid) zur Fokussierung der Proteinbanden überschichtet wurden. Die parallele Herstellung von vier Gelen gleicher Konzentration, erfolgte in einem Multiple Gel Caster (Hofer, Holliston, US). Zur Probenvorbereitung wurden 50 µl Proteinprobe mit 10 µl SDS-Probenpuffer (Kapitel 2.1.8.4) versetzt und zur Denaturierung für 10 min bei 95 °C inkubiert. In die Taschen des Gels wurden anschließend solche Probenvolumen an denaturierter Proteinprobe geladen, dass die Proteinmenge pro Geltasche 10 µg nicht überschritt und jede Tasche die gleiche Menge an Protein enthielt. Die Trennung der Proteinproben erfolgte an einer Elektrophoresekammer des Typs SE250 Mighty Small II Mini (Hofer, Holliston, US) nach befüllen der Kammer mit Elektrophoresepuffer (Kapitel 2.1.8.4) laut Herstellerangaben. Zur Trennung des Gels wurde eine konstante Stromstärke von 10 mA pro Gel in der Kammer angelegt, welche nach durchlaufen des Sammelgels durch die Proteinprobe auf 25

mA pro Gel erhöht wurde. Der Lauf wurde gestoppt sobald die Laufmittelfront der Proteinprobe das Gel-Ende erreicht hat. Als Größen-Standard wurden 3  $\mu$ l PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, DE) in einer extra Tasche aufgetragen. Die so erhaltenen Gele wurden über Nacht mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt und dann mittels Entfärbelösung (Kapitel 2.1.8.4) für zwei bis vier Stunden wieder entfärbt, wodurch die Proteinbanden sichtbar wurden.

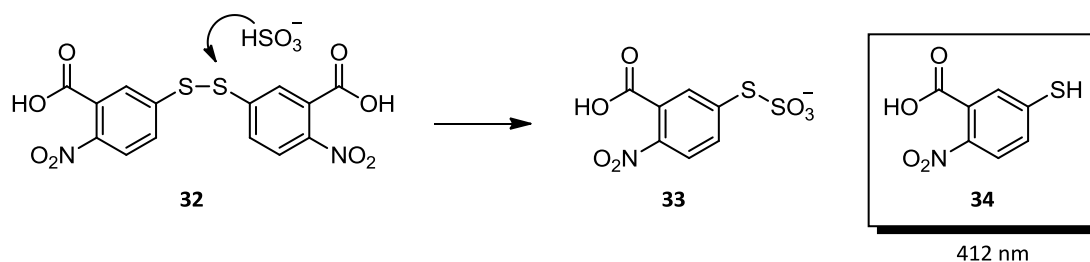
#### 2.4.5. Aktivitätsbestimmung der TauD per Ellman's-Assay

Die Bestimmung der Proteinaktivität der Taurin Dioxygenase erfolgte nach dem von Eichhorn *et al.* beschriebenen Aktivitätstest, welcher wiederum auf dem von Ellman entwickelten Nachweisreagens für Schwefelverbindungen und Sulfite, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) **32** (DTNB) beruht.<sup>[84,113–115]</sup> Die Bestimmung der Aktivität basiert auf der Bestimmung des, aus der Umsetzung von Taurin **28** mit  $\alpha$ -Ketoglutarat **11** als Cosubstrat durch die TauD gebildeten Sulfits **31** (Schema 11), wobei die Reaktion über das entsprechende hydroxylierte Intermediat **29** abläuft und zur Bildung von Aminoacetaldehyd **30** führt.



**Schema 11:** Umsetzung von Taurin mit TauD

Die Sulfid-Konzentration wird durch Reaktion des Sulfits mit DTNB bestimmt. Dabei reagiert das Sulfid mit DTNB, was zu einer Spaltung der Disulfidbrücke und einer damit einhergehenden Bildung von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure **34** führt, welche in Lösung eine charakteristische Absorption bei 412 nm aufweist (Schema 12).



**Schema 12:** Nachweisreaktion von Sulfid mit DTNB. Addition von Sulfid an DNTB **32** unter Bildung eines Äquivalents des entsprechenden 2-Nitro-5-thiobenzoessäure-Sulfid-Addukts **33** und eines Äquivalents freier 2-Nitro-5-thiobenzoessäure **34**.

Die Aktivitätsbestimmung der TauD erfolgte anhand eines leicht modifizierten Assay-Protokolls. Die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsansatzes findet sich in Tabelle 20. Zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung wurden ddH<sub>2</sub>O, Puffer (BisTris- oder Kpi Puffer je pH 7), Taurin,  $\alpha$ -KG, Ascorbinsäure und TauD in einem Eppendorf Tube vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von Fe(II)SO<sub>4</sub> gestartet. Die Reaktion wurde dann in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 30 °C und 850 U/min für 10 min inkubiert. Die Herstellung der Fe(II)SO<sub>4</sub>-Lösung erfolgte unmittelbar vor Beginn der Reaktion, um eine Oxidation des Fe(II) zu Fe(III) in Lösung vor Start der Reaktion zu verhindern, während die Ascorbinsäure-Stammlösung wöchentlich neu angesetzt und bis zur Verwendung bei 4 °C dunkel gelagert wurde. Alle Reaktionskomponenten bis auf die Fe(II)SO<sub>4</sub>-Lösung wurden auf pH 7 eingestellt.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität über die Messung der gebildeten Sulfitkonzentration wurden parallel zur Durchführung der Reaktion, einer Kunststoffküvette (Halbmikro PS des Herstellers ratiolab, Dreieich, DE) 100  $\mu$ l EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8) und 100  $\mu$ l DTNB-Lösung zusammen mit 700  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O vorgelegt. Nach Ende der Reaktion wurde der Reaktionsansatz 1:10 verdünnt und 100  $\mu$ l dieser Verdünnung in die zuvor vorbereitete Küvette überführt. Die Analysenmischung wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend an einem Photometer des Typs Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) die Absorption bei 412 nm gemessen. Zur exakten Bestimmung der Sulfitkonzentration musste die Absorption, welche durch Reaktion von den im Enzym enthaltenen SH-Gruppen mit DTNB verursacht wird, von dem Absorptionswert der Aktivitätsbestimmung abgezogen werden. Dafür wurde eine Korrekturmessung (engl.: Blank) durchgeführt. Dafür werden in einer Küvette 100  $\mu$ l EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8), 100  $\mu$ l DTNB-Lösung (1 mg/ml in 100 mM Kpi Puffer pH 7) und zusätzlich 100  $\mu$ l Formaldehyd (5 mM in ddH<sub>2</sub>O) zusammen mit 600  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O vorgelegt. Das Formaldehyd in der Lösung reagiert mit dem im Reaktionsansatz enthaltenen Sulfit, sodass dieses nicht mehr mit dem DTNB reagieren kann und die so erhaltene Absorption nur durch SH-Gruppen des Enzyms verursacht wird. Die weitere Durchführung und Messung erfolgte analog der Bestimmung der vorher beschriebenen Aktivitätsbestimmung. Der durch diese Messung erhaltene Wert wurde vom zuvor gemessenen Absorptionswert abgezogen. Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibriergeraden mit Natriumsulfit.

**Tabelle 20:** Reaktionsansatz zur Aktivitätsbestimmung der TauD nach Eichhorn *et al.* [84]

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
TauD	1 mg/ml	100 µl	0,1 mg/ml
Taurin <b>28</b>	100 mM	20 µl	2 mM
α-KG	100 mM	40 µl	4 mM
Ascorbinsäure	20 mM	20 µl	400 µM
Fe(II)SO <sub>4</sub>	10 mM	10 µl	100 µM
Puffer pH 7,0	100 mM	100 µl	10 mM
ddH <sub>2</sub> O	Lösungsmittel	710 µl	Lösungsmittel

#### 2.4.6. Umsetzungen der alternativen ω-Aminocarbonsäuren

Die Umsetzungen alternativen Substrate der TauD erfolgte anhand eines leicht modifizierten Protokolls der Aktivitätsbestimmung (Kapitel 2.4.5.). Die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsansatzes findet sich in Tabelle 21. Zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung wurden ddH<sub>2</sub>O, Puffer (BisTris- oder Kaliumphosphatpuffer je pH 7), das jeweilige Substrat, α-Ketoglutarat, Ascorbinsäure und TauD in einem Eppendorf Tube vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von Fe(II)SO<sub>4</sub> gestartet. Die Reaktion wurde dann in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 30 °C und 850 U/min über Nacht inkubiert.

Die Herstellung der Fe(II)SO<sub>4</sub>-Lösung erfolgte unmittelbar vor Beginn der Reaktion um eine Oxidation des Fe(II) zu Fe(III) in Lösung vor Start der Reaktion zu verhindern, während die Ascorbinsäure-Stammlösung wöchentlich neu angesetzt und bis zur Verwendung bei 4 °C dunkel gelagert wurde. Alle Reaktionskomponenten bis auf die Fe(II)SO<sub>4</sub>-Lösung wurden auf pH 7 eingestellt.

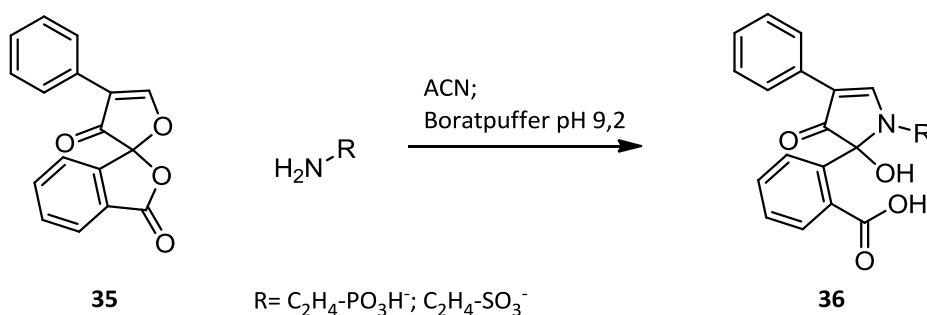
**Tabelle 21:** Reaktionsansatz Umsetzung der alternativen ω-Aminocarbonsäuren

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
TauD	12 mg/ml	100 µl	1,2 mg/ml
Substrat	100 mM	100 µl	10 mM
α-KG	100 mM	100 µl	10 mM
Ascorbinsäure	20 mM	40 µl	400 µM
Fe(II)SO <sub>4</sub>	10 mM	10 µl	100 µM
Puffer pH 7,0	X mM	100 µl	X/10 mM
ddH <sub>2</sub> O	Lösungsmittel	550 µl	Lösungsmittel

### 2.4.7. Bestimmung der 2-Aminoethanphosphonsäure per Derivatisierung mit Fluorescamin und anschließender Fluoreszenzmessung

Zur Bestimmung der Konzentration der zu Taurin analogen 2-Aminoethanphosphonsäure wurde die Methode der Derivatisierung per Fluorescamin **35** (Schema 13) verwendet, wobei für die Derivatisierung nach der von McMahon *et al.* entwickelten Methode verfahren wurde.<sup>[116]</sup>

Dafür wurde die Probe, analog der Umsetzungen der TauD mit  $\beta$ -Alanin **51** (Kapitel 2.4.6) deproteiniert und der Ansatz anschließend durch Fluoreszenzanalyse analysiert. Dafür wurden eine Probe des Reaktionsansatzes 1:10 verdünnt und dann 100  $\mu$ l dieser Probe mit 150  $\mu$ l Acetonitril versetzt, 50  $\mu$ l Borat Puffer (40 mM pH 9,2) und anschließend 50  $\mu$ l Fluorescaminelösung (5 mM in ACN) zugegeben. Die Analyse der Proben erfolgte durch Fluoreszenzmessung an einem FluoStarOmega (BMG Labtech, Ortenberg, DE). Die Absorptionswellenlänge wurde dabei auf 436 nm und die Emissionswellenlänge auf 508 nm gesetzt. Die Quantifizierung für Taurin erfolgte anhand einer Kalibriergerade.



**Schema 13:** Derivatisierung von Taurin und Taurin-Analoga per Fluorescamin **35** zum jeweils entsprechenden fluoreszierenden Derivat **36**.

### 2.4.8. Diels-Alder-Reaktionen mittels tHisF

Die Durchführung der Diels-Alder Reaktion mittels aufgereinigter tHisF erfolgte analog nach der von Reetz und seinen Mitarbeitern entwickelten Vorschrift. Dafür wurden die jeweils verwendeten tHisF Varianten mit Kupfer 2h bei 20 °C und 400 U/min vorinkubiert und anschließend 25  $\mu$ l Azachalcon-Lösung **42** (42 mM in THF) sowie 25  $\mu$ l Cyclopentadien-Lösung **43** (210 mM in THF) zugegeben und die Reaktion für 96 h bei 12 °C und 400 U/min in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert.

Nach Ende der Reaktion wurde der Reaktionsansatz zwei Mal mit je 300  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel unter einem leichten Stickstoffstrom bei Raumtemperatur evaporiert. Der Rückstand wurde in 300  $\mu\text{l}$  *n*-Heptan gelöst und per chiraler HPLC-Methode analysiert (Kapitel 2.2.2.5).

**Tabelle 22:** Reaktionsansatz der Diels-Alder-Reaktion

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
tHisF	0,52 mM (15 mg/ml)	200 $\mu\text{l}$	104 $\mu\text{M}$
Azachalcon <b>44</b>	42 mM	25 $\mu\text{l}$	1,05 mM
Cyclopentadien <b>45</b>	210 mM	25 $\mu\text{l}$	5,25 mM
Cu(II)SO <sub>4</sub>	10 mM	10 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{M}$
ddH <sub>2</sub> O	Lösungsmittel	740 $\mu\text{l}$	Lösungsmittel

#### 2.4.9. Michael-Addition mittels tHisF

Die Durchführung der Michael-Addition mittels tHisF (sowohl aufgereinigt, als auch grob aufgereinigt) erfolgte in Anlehnung an die von Reetz und seinen Mitarbeitern entwickelten Vorschrift. Dafür wurden 200  $\mu\text{l}$  der jeweils verwendeten tHisF Varianten mit Kupfer 2h bei 20 °C und 400 U/min vorinkubiert und anschließend sukzessive 590  $\mu\text{l}$  Wasser, 100  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Lösung des Azachalcons **42**, 100  $\mu\text{l}$  des Nukleophils (je nach Nukleophil als DMSO oder H<sub>2</sub>O Stammlösung) sowie 10  $\mu\text{l}$  CuSO<sub>4</sub>-Lösung (10 mM in H<sub>2</sub>O) zugegeben und die Reaktion für die dem jeweiligen Nukleophil entsprechende Reaktionszeit bei 40 °C und 850 U/min in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Eine Zusammenfassung des Reaktionsansatzes findet sich in Tabelle 23.

Nach Ende der Reaktion wurde der Reaktionsansatz zwei Mal mit je 300  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Zur Analyse wurden 10  $\mu\text{l}$  des Extrakts in 1 ml Acetonitril:Wasser Gemisch (50:50) gelöst und die Proben per LC-MS analysiert (Kapitel 2.2.2.4).



**Tabelle 23:** Reaktionsansatz der Michael-Addition

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
tHisF (in 50 mM BisTris Puffer)	0,52 mM (15 mg/ml)	200 µl	104 µM
Nukleophil	100 mM	100 µl	10 mM
Azachalcon	100 mM	100 µl	10 mM
Cu(II)SO <sub>4</sub>	10 mM	10 µl	100 µM
ddH <sub>2</sub> O	Lösungsmittel	590 µl	Lösungsmittel

#### 2.4.10. Aldolreaktion mittels tHisF

Die Untersuchungen zur Katalyse der Aldolreaktionen mittels der verwendeten tHisF Enzyme und deren Varianten erfolgte nach dem folgenden Protokoll. In einem Reaktionsgefäß wurden das entsprechende Metallsalz, sowie Wasser und das jeweilige Aldehyd vorgelegt analog den Ansätzen zur Michael-Addition, wobei sich die exakte Zusammensetzung der Reaktionsansätze in Tabelle 24 findet. Zum Starten der Reaktion wurde das Aceton **46** zugegeben und die Reaktion anschließend bei 30 °C für 48 h inkubiert. Nach Ende der Reaktionszeit, erfolgte die Extraktion mit zwei Mal 300 µl Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend per GC/MS (Kapitel 2.2.1.) analysiert.

**Tabelle 24:** Reaktionsansatz der Aldolreaktion

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
tHisF (in 50 mM BisTris Puffer)	0,52 mM (15 mg/ml)	200 µl	104 µM
Aldehyd	100 mM	100 µl	10 mM
Aceton <b>46</b>	Lösungsmittel	500 µl	Lösungsmittel
Cu(II)SO <sub>4</sub>	10 mM	10 µl	100 µM
ddH <sub>2</sub> O	Lösungsmittel	190 µl	Lösungsmittel

### 2.4.11. Katalyse alternativer Reaktionen mittels TauD

Die Durchführung der Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der TauD wurden in Anlehnung an die Umsetzungen zur Hydroxylierung der  $\omega$ -Aminocarbonsäuren durchgeführt. Dafür wurden 690  $\mu\text{l}$  Wasser, 100  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Enzympräparation der TauD, 100  $\mu\text{l}$  der Substrate der jeweiligen Reaktion (je nach Art des Substrates als DMSO- oder  $\text{H}_2\text{O}$ -Stammlösung) sowie 10  $\mu\text{l}$   $\text{Fe(II)SO}_4$ -Lösung (10 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) zugegeben und die Reaktion für 18 h (Ü/N) bei 30 °C und 850 U/min inkubiert. Eine Zusammenfassung des Reaktionsansatzes findet sich in Tabelle 25. Dabei wurden bei den Michael-Additionen zwei Substrate anstelle von einem zugegeben, sodass sich das zuzugebende Volumen an Substrat wie folgt aufteilt. 60  $\mu\text{l}$  waren das jeweilige Nukleophil, während 40  $\mu\text{l}$  das entsprechende Michael-Akzeptor Substrat waren, sodass die Endkonzentration des Michael-Akzeptor Substrats 4 mM und die des Nukleophils 6 mM betrug.

Bei den jeweiligen Friedel-Crafts-Reaktionen und Nazarov-Zyklisierungen wurde nur ein Substrat zugegeben, sodass hier die Konzentration der getesteten Substrate 10 mM betrug. Nach Ende der Reaktion wurde der Reaktionsansatz zwei Mal mit je 300  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und per GC-MS analysiert (Kapitel 2.2.1.1.).

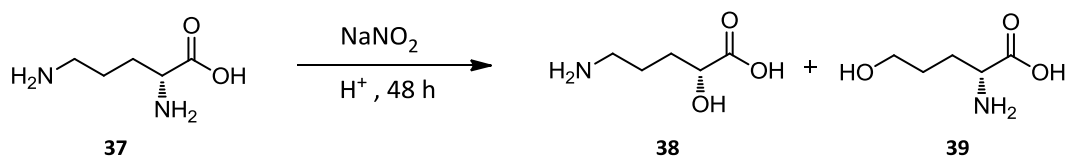
**Tabelle 25:** Reaktionsansatz der Umsetzungen der neuen Reaktionen

Komponente	Konzentration	Volumen	Endkonzentration
TauD	12 mg/ml	100 $\mu\text{l}$	1,2 mg/ml
Substrat 1	100 mM	X $\mu\text{l}$	X/10 mM
Substrat 2	100 mM	100 - X $\mu\text{l}$	(100-X)/10 mM
$\text{Fe(II)SO}_4$	10 mM	10 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{M}$
Puffer pH 7,0	X mM	100 $\mu\text{l}$	X/10 mM
ddH <sub>2</sub> O	Lösungsmittel	690 $\mu\text{l}$	Lösungsmittel

## 2.5. Synthesen

### 2.5.1. Synthese von L-2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure

Die Synthese der L-2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure **38**, welches als Referenz für die Umsetzungen von 5-Aminovaleriansäure **57** benötigt wurde, erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift in Anlehnung an Gouesnard *et al.* bei der L-Ornithin **37** mit  $\text{NaNO}_2$  zur entsprechenden L-2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure **38** umgesetzt wird, wobei auch die entsprechende 5-Hydroxy-2-aminovaleriansäure **39** entstehen kann (Schema 13).<sup>[117]</sup> Dafür wurden 1,686 g L-Ornithin **37** (10 mmol) in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  vorgelegt und auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt. Zu dieser Lösung werden langsam 10 mmol  $\text{NaNO}_2$  in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zugetropft und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 48 h gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde das restliche, noch nicht abreagierte  $\text{NaNO}_2$  durch Zugabe von Harnstofflösung (2 M) abreagiert. Dabei wurde solange Harnstofflösung zugetropft bis es zu keiner Gasentwicklung mehr kam.



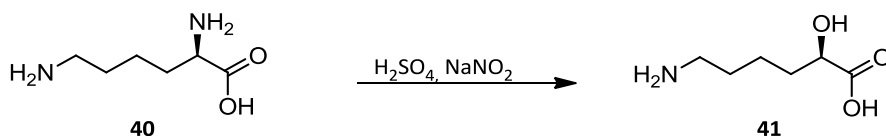
**Schema 14:** Reaktion von Ornithin **37** zu L-2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure **38**.

Die Aufreinigung des Produktes erfolgte mittels einer HPLC des Typs Infinity 1200 mit Fraktionensammler durch sammeln der gewünschten Fraktionen. Die Trennung erfolgte dabei an einer Reprosil Chiral-AA Säule (Reprosil Chiral-AA; 4,6 x 250 mm; 8  $\mu\text{m}$ ; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) mit einem binären isokratischen Laufmittelgemisch aus Methanol und  $\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 50:50 und einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min. Die Fraktionierung der Peaks erfolgte anhand der Retentionszeiten und wurde nach einem Probelauf festgelegt. Nach Ende der Fraktionierung wurden die gesammelten Fraktionen vereinigt und bei vermindertem Druck eingeeengt. Die erhaltene Referenzverbindung wurde per  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR charakterisiert.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 1,57 - 1,74$  (m, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ); 2,94 (t,  $J = 6,85$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ); 3,98 (t,  $J = 6,29$  Hz 1H,  $-\text{CH}(\text{OH})$ ) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta = 22,65(1\text{C})$ ; 30,71 (1C); 39,29 (1C); 71,40 (1C); 180,83 (1C) ppm.

### 2.5.2. Synthese von L-2-Hydroxy-6-aminocaprinsäure

Die Synthese der L-2-Hydroxy-6-aminocaprinsäure, als Referenz für die Charakterisierung der Produkte der Umsetzungen von 6-Aminocaprinsäure **58**, erfolgte nach der Literaturvorschrift von Humenik *et al.* bei der L-Lysin **40** mit NaNO<sub>2</sub> zur entsprechenden L-2-Hydroxy-6-aminocaprinsäure **41** umgesetzt (Schema 14).<sup>[118]</sup> Dafür wurden 1 g L-Lysin **40** (6,8 mmol) in 18 ml 10 %-iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelöst und auf 45 °C erhitzt. Zu dieser Lösung werden langsam 24,5 mmol NaNO<sub>2</sub> in 6,8 ml H<sub>2</sub>O über 1 h 15 min zugetropft und der Reaktionsansatz bei 45 °C für 7 h gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde das überschüssige NaNO<sub>2</sub> durch Zugabe von 40,8 mmol Harnstoff in 6,8 ml H<sub>2</sub>O gequenchet und der Reaktionsansatz für weitere 30 min inkubiert.



**Schema 15:** Umsetzung von L-Lysin zu L-2-Hydroxy-6-aminocaprinsäure

Die Aufreinigung des Produktes erfolgte mittels einer Ionenaustauschchromatographie an einer Anionenaustauschersäule des Typs Dowex. Dafür wurde die Säule zur Konditionierung mit 100 mM HCl-Lösung equilibriert und anschließend die Reaktionslösung aufgetragen. Nach der Probenauftragung wurde die Säule mit 1 L 10 mM HCl Lösung gespült und anschließend die Produkte mit 300 ml 10 % NH<sub>4</sub>OH-Lösung eluiert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte per HPLC-Analyse (Kapitel 2.2.2.2.).

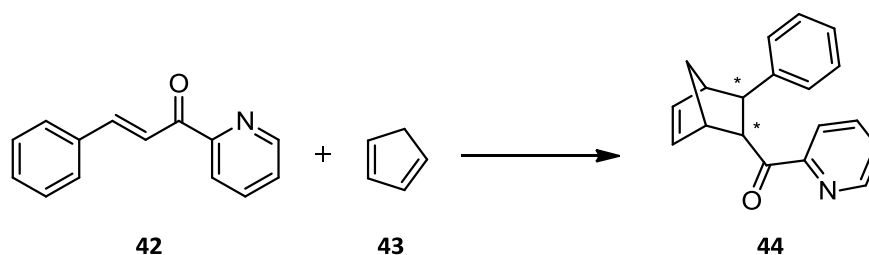
Die erhaltene Referenzverbindung wurde per <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR charakterisiert.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 1,25 - 1,78 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 2,92 (t, J=7,53Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 3,93 - 3,97 (m, 1H, -CH(OH)) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 21,30(1C); 26,70 (1C); 33,17 (1C); 39,26 (1C); 71,86 (1C); 181,35 (1C) ppm.

### 2.5.3. Synthese von des Diels-Alder Produkts **44** des Azachalcons **42** und Cyclopentadien **43** als Referenz

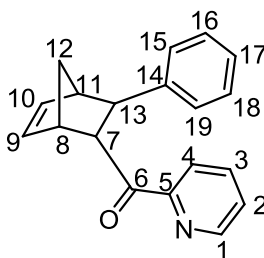
Die Synthese des racemischen Diels-Alder Produkts erfolgte in Anlehnung an die Umsetzung der Biotransformationen (Schema 16). Dabei wurden 190 ml TRIS-Puffer (10 mM, pH 7,5), sowie die beiden Substrate Azachalcon **42** (420 mM in THF) und

Cyclopentadien **43** (2,1 M) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml CuSO<sub>4</sub>-Lösung (12 mM in 10 mM TRIS-Puffer, pH 7,5) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 96 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ende der Reaktion drei Mal mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden vereinigt und unter vermindertem Druck eingengt. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde dann per Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch von Cyclohexan:Ethylacetat (4:1) getrennt und das erhaltene Produkt **44** per <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR analysiert. Die Ausbeute betrug 64,52 mg (26,06 % d.Theorie).



**Schema 16:** Reaktionsgleichung der Diels-Alder-Reaktion des Azachalcon **42** mit Cyclopentadien **43** zum entsprechenden Diels-Alder-Produkt **44**.

Die erhaltene Referenzverbindung wurde per <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR charakterisiert.

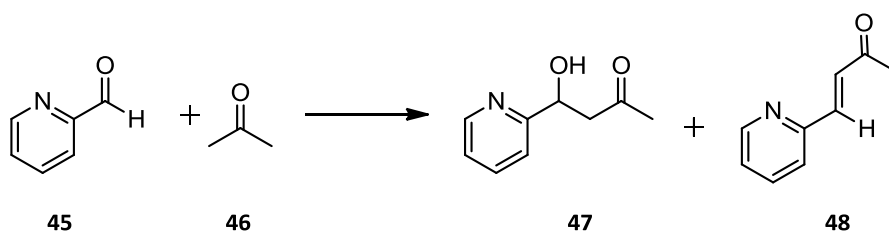


<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,54-1,63 (m, 1H, 12-H); 2,03-2,09 (m, 1H, 12-H); 3,07-3,11 (m, 1H, 11-H); 3,42-3,49 (m, 1H, 13-H); 3,53-3,65 (m, 1H, 8-H); 4,51-4,54 (m, 1H, 7-H); 5,82 (dd, J=2,8Hz, 1H, 10-H); 6,48-6,50 (m, 1H, 9-H); 7,16 (t, J=7,5Hz, 1H, 17-H); 7,27 (t, J=7,5Hz, 2H, 16-H;18-H); 7,32 (t, J=7,5Hz, 2H, 15-H;19-H); 7,41-7,46 (m, 1H, 2-H); 7,78-7,83 (m, 1H, 3-H); 8,00 (d, J=7,7Hz, 1H, 4-H); 8,67 (d, J=4,8Hz, 1H, 1-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 45,55 (1C, 13-C); 48,21 (1C, 12-C); 48,74 (1C, 8-C); 49,33 (1C, 11-C); 54,24 (1C, 7-C); 122,24 (1C, 4-C); 125,84 (1C, 17-C); 126,87 (1C, 2-C); 127,63 (2C, 15-C; 19-C); 128,40 (2C, 16-C; 18-C); 132,91 (1C, 10-C); 136,81 (1C, 3-C); 139,45 (1C, 9-C); 144,65 (1C, 14-C); 148,89 (1C, 1-C); 153,60 (1C, 5-C); 201,08 (1C, 6-C) ppm.

#### 2.5.4. Synthese des Produkts der Aldolreaktion des Pyridincarbaldehyds mit Aceton

Die Synthese der Referenzen der Aldolreaktion erfolgte in Anlehnung an die Biotransformationen. Dabei wurden 3 ml ddH<sub>2</sub>O, sowie das Substrat Pyridincarbaldehyd **45** (1 mmol; 1 ml à 1 M) und der Katalysator Lysin in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von Aceton **46** (5 ml) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 96 h bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ende der Reaktion drei Mal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden vereinigt und unter vermindertem Druck eingengt. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde dann per Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Laufmittelgemisch von Cyclohexan:Ethylacetat (4:1) getrennt und die erhaltenen Produkte **47** und **48** per <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR analysiert.



**Schema 17:** Synthese des Produkts der Aldolreaktion von Pyridincarbaldehyd mit Aceton.

Die erhaltene Referenzverbindung wurde per <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR charakterisiert.

##### Additionsprodukt **47**

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2,97 (m, 2H); 4,25 (bs, 1H, OH); 5,20 (dd, J=4 Hz, J=8,5Hz, 1H); 7,17 (m, 1H); 7,49 (m, 1H); 7,72 (m, 1H); 8,52 (m, 1H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 30,87 (1C); 50,74 (1C); 69,89 (1C); 120,36 (1C); 122,46 (1C); 136,91 (1C); 148,49 (1C); 161,31 (1C); 208,71 (1C) ppm.

##### Aldolkondensat **48**

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2,41 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>); 7,15 (d, J= 16Hz, 1H); 7,28 (m, 1H); 7,49 (d, J=8Hz, 1H); 7,53 (d, J=16Hz, 1H); 7,73 (m, 1H); 8,63 (m, 1H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28,13 (1C); 124,23 (1C); 124,36 (1C); 130,12 (1C); 136,84 (1C); 141,93 (1C); 150,19 (1C); 153,16 (1C); 198,52 (1C) ppm.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Metall-bindende Enzyme und deren inhärentes katalytisches Potential genutzt werden können, um einerseits Reaktion zu katalysieren, welche chemisch der natürlichen Reaktion gleichen, jedoch mit Substraten, die sich von den natürlichen Substraten chemisch oder strukturell unterscheiden. Andererseits sollte untersucht werden inwieweit man das katalytische Potential von Enzymen ausnutzen kann, um Reaktionen zu katalysieren, welche sich chemisch von der natürlichen Reaktion unterscheiden, indem man die Enzyme in ihrer Funktion als ganzheitlicher Katalysator mit einer Struktur-Funktions-Kopplung abstrahiert und einzelne strukturelle Elemente isoliert als katalytisch aktive Elemente betrachtet. Hierfür lag das Augenmerk dieser Arbeit besonders auf dem gebundenen Metallion als katalytisches Zentrum der verwendeten Enzyme. Dafür wurden Untersuchungen mit zwei verschiedenen enzymatischen Modellsystemen, namentlich der TauD und der tHisF durchgeführt, welche im Folgenden separat behandelt werden.

#### 3.1. Ausnutzung des katalytischen Potentials der TauD für die Hydroxylierung alternativer Substrate

##### 3.1.1. Klonierung, Expression und Aufreinigung der TauD

Die Klonierung der TauD in pET22b(+) zur Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte durch Amplifikation des Gens aus genomischer DNA von *E. coli* JM109. Dafür wurde das entsprechende Gen analog der Kolonie-PCR (Kapitel 2.3.4.) aus *E. coli* JM109 Zellen amplifiziert und per Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.3.5.) aufgereinigt. Anschließend wurden das gereinigte Fragment in pET22b(+) kloniert, wobei die beiden Bindestellen *Nde*I und *Eco*RI verwendet wurden (Kapitel 2.3.6. und Kapitel 2.3.7.). Das klonierte Gen wurde durch Sequenzierung überprüft, in den entsprechenden Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert und anschließend exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie an einem ÄKTA System (Kapitel 2.4.3.1.). SDS-Gele der Expression und des aufgereinigten Enzyms finden sich im Anhang (Kapitel 6.2). Die durchschnittlichen Proteinausbeuten an aufgereinigtem Enzym nach Aufreinigung, Dialyse und Konzentration per Vivaspin Säulen betragen ca. 40 mg TauD pro L LB-Medium.

### **3.1.2. Bestimmung der Aktivität der TauD nach Eichhorn et al.**

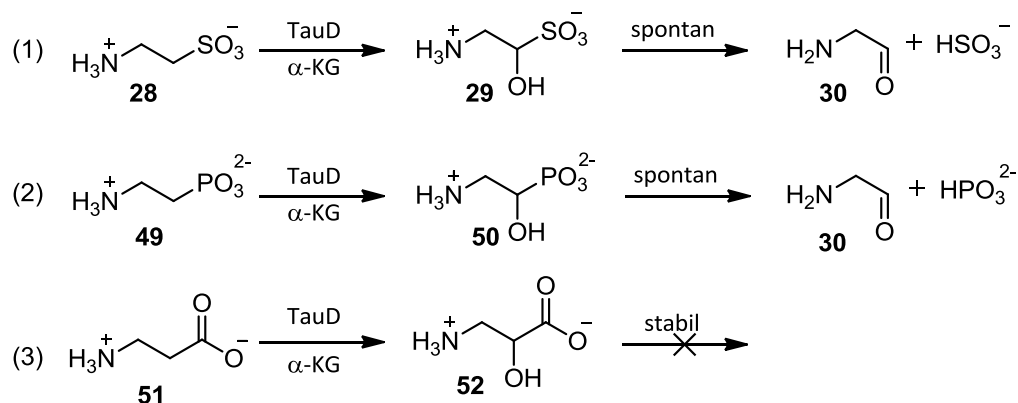
Die Funktionalität der exprimierten und aufgereinigten TauD wurde anhand des Aktivitätstest von Eichhorn *et al.* auf Aktivität überprüft.<sup>[84]</sup> Dabei wurde ein leicht verändertes Protokoll für die Biotransformationen verwendet (Kapitel 2.4.5), wobei die in der hier vorliegenden Arbeit Substratkonzentrationen von 2 mM Taurin und 4 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat verwendet wurden, sowie Ascorbinsäure in einer Konzentration von 400  $\mu$ M und Fe(II)SO<sub>4</sub> in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M zugegeben wurden.

Die ermittelten Aktivitäten lagen im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Größenordnungen der Aktivität, wobei für den TauD Wildtyp eine spezifische Aktivität von  $1,47 \pm 0,04$  U/mg Enzym bestimmt wurde, während die Aktivität für die Mutante F206Y bei  $0,71 \pm 0,04$  U/mg Enzym lag.

### **3.1.3. Untersuchungen zur Substratpromiskuität der TauD**

Im Rahmen erster Untersuchungen wurde die TauD, welche in Bezug auf Mechanismus und Struktur sehr gut charakterisiert ist (Einleitung Kapitel 1.4), kloniert, exprimiert und aufgereinigt, um mit diesem aufgereinigten Enzym zu testen inwieweit man Substrate hydroxylieren kann, welche sich chemisch von den literaturbekannten, von TauD akzeptierten, Substraten unterscheiden. Dabei sollte vorrangig untersucht werden, ob Substrate, welche im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Substraten, keine Sulfonsäure als funktionelle Gruppe besitzen auch mit der TauD umgesetzt werden können.<sup>[84]</sup> Getestet wurden hierfür Phosphonsäure- sowie Carbonsäure-Analoga des natürlichen Substrates Taurin (Schema 18, Reaktionsgleichung (2) und (3)). Dabei wurde erwartet, dass die 2-Aminoethanphosphonsäure **49** analog zum Taurin **28** in  $\alpha$ -Stellung hydroxyliert wird und anschließend, unter Bildung von 2-Aminoacetaldehyd, spontan Phosphit abspaltet. Im Vergleich dazu wurde erwartet, dass das Carbonsäure-Analogen von Taurin **28** ( $\beta$ -Alanin **51**) eine entsprechende stabile  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäure (Isoserin **52**) unter Ausbildung eines Stereozentrums formen würde.





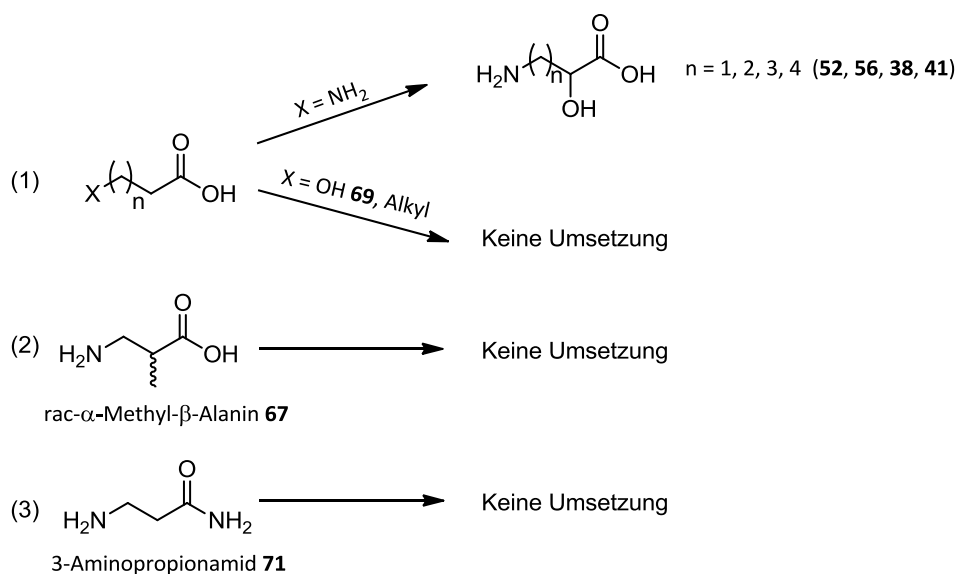
**Schema 18:** Vergleich der natürlichen Reaktion zu den möglichen alternativen Oxidationsreaktionen.

### 3.1.3.1. Untersuchungen zur $\alpha$ -Hydroxylierung von Carbonsäure-Analoga des natürlichen Substrats Taurin

In ersten Untersuchungen wurde getestet inwiefern die TauD Carbonsäureanaloge des Taurin umsetzen kann. Dafür wurden  $\omega$ -Aminocarbonsäuren der Kettenlängen C<sub>2</sub> bis C<sub>6</sub> auf Aktivität getestet (analog der Reaktionsgleichung (3) in Schema 18). Dabei erfolgte die Umsetzung nach dem in Kapitel 2.4.7. beschriebenen Protokoll. Die Enzymkonzentration der Umsetzungen betrug dabei 1,2 mg/ml und die jeweiligen Substratkonzentrationen je 10 mM. Die Reaktionsansätze wurden, insofern nicht gesondert erwähnt, über Nacht (18 h) bei 30 °C inkubiert. Es zeigte sich, dass alle getesteten  $\omega$ -Aminocarbonsäuren bis auf Glycin umgesetzt werden konnten. Die Umsätze der verschiedenen Substrate unterschieden sich hierbei jedoch deutlich, wobei die Substrate mit ungeradzahligem Kettenlänge höhere Umsätze aufwiesen als solche mit geradzahligem Kettenlänge. Alle Substrate bei denen ein Umsatz ermittelt werden konnte, wurden zum jeweiligen  $\alpha$ -hydroxylierten Produkt umgesetzt, wobei keine Nebenprodukte detektiert wurden, sodass Umsatz und Produktbildung gleichzusetzen sind. Diese These wurde durch Überprüfen der Kohlenstoffbilanz verschiedener Reaktionen bestätigt, wobei der Umsatz respektive die Abnahme an Substrat mit der Zunahme an Produkt, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der verschiedenen Messungen, identisch war. Die Charakterisierung und Quantifizierung der Produkte erfolgte, bis auf die Umsetzung von Glycin (Analyse erfolgte hier per HPLC-RI, Kapitel 2.2.2.3.), per HPLC-ELSD (Kapitel 2.2.2.2., anhand von Referenzverbindungen die entweder kommerziell erhältlich waren oder selbst

synthetisiert wurden (Eintrag #4 und #5 in Tabelle 26). Die Quantifizierung der Einträge #4 und #5 in Tabelle 26 erfolgte anhand des Substratumsatzes.

In einem erweiterten Screening wurden Substrate getestet, bei denen das Substitutionsmuster an der terminalen Position variiert wurde. Dabei wurden sowohl Carbonsäuren getestet, welche eine Hydroxyfunktion als terminale Gruppe enthielten, als auch aliphatische Carbonsäuren ohne terminalen Substituenten (Schema 19, Reaktionsgleichung (1)). Weiterhin wurden  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67** und 3-Aminopropionamid **71** getestet, um zu untersuchen inwieweit Substituenten in  $\alpha$ -Position zur Carbonsäure die Hydroxylierungsreaktion beeinflussen bzw. das Carbonsäuremotiv als solches essentiell für die Umsetzung des Substrats durch die TauD ist (Reaktionsgleichung (2) & (3) in Schema 19). Es zeigte sich, dass keines der Substrate des erweiterten Screenings mit der TauD Wildtyp zu einem mittels HPLC-ELSD nachweisbaren Umsatz führte. Eine Zusammenfassung der getesteten Substrate und erwarteten Produkte zur Substratpromiskuität der Wildtyp (WT) TauD findet sich in Tabelle 26.



**Schema 19:** Schematische Zusammenfassung der im ersten Screening mit TauD getesteten Substrate und Resultate.

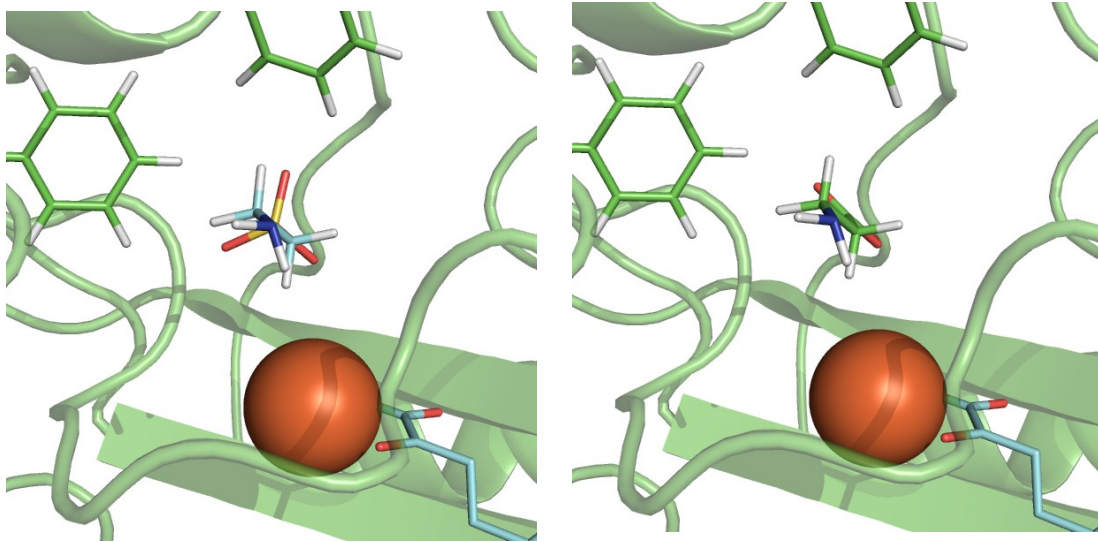
Da die Hydroxylierung der getesteten  $\omega$ -Aminocarbonsäuren (Einträge 2-5 in Tabelle 26) in  $\alpha$ -Position zur Carboxylfunktion der entsprechenden Substrate zur Ausbildung eines neuen Stereozentrums führte, sollte ferner untersucht werden inwiefern diese Reaktion stereoselektiv verläuft. Dafür wurden die *ee*-Werte der bei den entsprechenden Reaktionen gebildeten Produkte bestimmt, wobei die Analysen ergaben, dass die

Hydroxylierungsreaktion der  $\omega$ -Aminocarbonsäuren (**51**, **55**, **57**, **58**) stereoselektiv verläuft. Die erhaltenen *ee*-Werte waren jedoch, analog den Umsätzen der entsprechenden Substrate, für die unterschiedlichen Substrate verschieden. So hatten die Substrate mit ungeradzahliger Kettenlänge (Einträge #2 und #4 in Tabelle 26) ausgeprägte Enantiomerenüberschüsse von  $> 96\%$ , da die Detektionsgrenze der entsprechenden Produkte bei ca.  $2\%$  lag und das jeweils entsprechende andere Enantiomer nicht detektiert werden konnte. Hingegen zeigte die Umsetzung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure **55** (#3 in Tabelle 26) keine ausgeprägte Enantioselektivität, da hier der *ee*-Wert des gebildeten Produkts bei nur ca.  $10\%$  lag. Für die Umsetzung der 6-Aminocapronsäure **58** war zwar nur ein Produkt nachweisbar, jedoch waren die Umsatzraten schon nahe der Nachweisgrenze, welche für dieses Produkt etwas höher lag als bei den kürzerkettigen Produkten wie Isoserin **52**. Deshalb kann bezüglich der Umsetzung hier keine definierte Aussage bezüglich des *ee*-Werts des gebildeten Produkts gemacht werden. Eine Zusammenfassung der ermittelten Umsätze und der korrespondierenden *ee*-Werte der gebildeten Produkte findet sich in Tabelle 26.

Begleitend zu diesen Untersuchungen wurde eine theoretische Studie zur Bindung von  $\beta$ -Alanin **51** in TauD durchgeführt, wozu ein Docking des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** in TauD vorgenommen wurde.

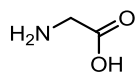
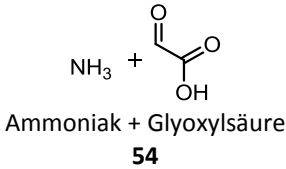
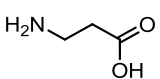
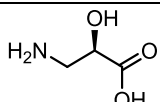
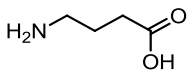
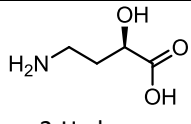
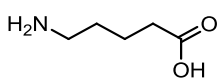
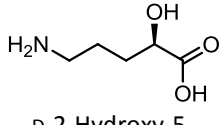
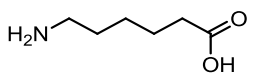
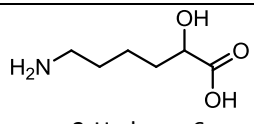
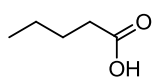
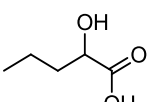
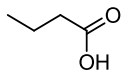
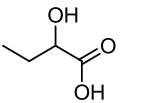

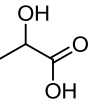
Das Docking erfolgte in Kooperation mit Juliane Stahmer, wobei als Dockingssoftware RosettaDesign verwendet wurde. Betrachtet man die Kristallstruktur der TauD mit gebundenem Taurin (Abbildung 5), so wird ersichtlich, dass Taurin eine leichte prä-Orientierung der  $\alpha$ -Wasserstoffatome in Bezug auf das aktive Eisenzentrum hat, an welchem im Verlauf der Reaktion die aktive Eisen-Oxo-Spezies gebildet wird. Interessant war nun ob bei der, im Gegensatz zur tetrahedralen Sulfonsäure des Taurin, planaren Carbonsäure des  $\beta$ -Alanins **51**, diese Orientierung bezüglich des Eisenzentrums deutlicher ausgeprägt sein würde, sodass ein enantioselektiver Verlauf der Reaktion zu erwarten war. Das Docking zeigte, dass anzunehmen ist, dass  $\beta$ -Alanin **51** eine ausgeprägte Orientierung der Kohlenstoffkette, respektive des zu hydroxylierenden  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms zum Eisenzentrum hin hat, wobei das pro-D Wasserstoffatom des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms deutlich zum Eisenzentrum hin exponiert ist (Abbildung 5). Die Resultate dieses Dockings sind in gutem Einklang mit den experimentell ermittelten Daten zu den *ee*-Werten der in den Biotransformationen identifizierten Produkte, bei denen gezeigt werden konnte, dass zumindest im Falle des  $\beta$ -Alanins **51** ausschließlich das entsprechende *D*-Isoserin **52** gebildet wird (Tabelle 26). Dies lässt darauf schließen, dass das Docking den wahren

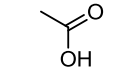
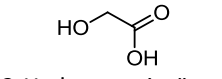
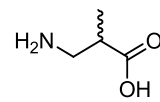
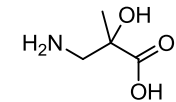
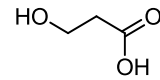
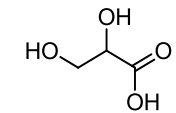
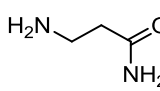
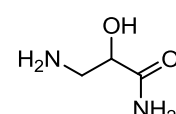
Verhältnissen im Enzym sehr nahe kommt, sodass es im weiteren Verlauf der Arbeit auch als Basis für die Auswahl von interessanten Aminosäuren zur Einführung von Mutationen, sogenannten Hot-Spots, genutzt wurde, mit denen die Aktivität der TauD gegenüber den neuen Substraten gesteigert werden sollte.



**Abbildung 5:** Vergleich der TauD mit Taurin (links) und mittels RosettaDesign gedocktem  $\beta$ -Alanin (rechts). Beide Substrate sind jeweils in Cyan als Sphären dargestellt. Das Cosubstrat  $\alpha$ -Ketoglutarat ist als Stäbchenmodell ebenfalls in Cyan dargestellt. Da in der Kristallstruktur der TauD die Wasserstoffatome des Taurin nicht angegeben sind, wurde das Taurin hier auch analog dem  $\beta$ -Alanin mittels RosettaDesign gedockt und das Docking mit der Kristallstruktur verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass das Docking mit der Kristallstruktur übereinstimmt, sodass zur in der hier vorliegenden Darstellung des Taurins in TauD das Ergebnis des Dockings verwendet wurde.

**Tabelle 26:** Ergebnisse der Umsetzung der alternativen getesteten Substrate mit TauD Wildtyp über Nacht. Jeweils mit eingesetzten Substraten und gefundenen oder erwarteten Produkten, sowie Umsatz und *ee*-Werte der jeweiligen Substrate.

#	Substrat	Produkt	Umsatz [%]	<i>ee</i> -Wert [%]
1	 Glycin <b>53</b>	 Ammoniak + Glyoxylsäure <b>54</b>	-	-
2	 β-Alanin <b>51</b>	 D-Isoserin <b>52</b>	22,6 ± 0,7	> 96
3	 γ-Aminobuttersäure <b>55</b>	 D-2-Hydroxy-γ-aminobuttersäure <b>56</b>	8,1 ± 1,3	10 ± 1
4	 5-Aminovaleriansäure <b>57</b>	 D-2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure <b>38</b>	12,1 ± 0,2	> 96
5	 6-Aminocapronsäure <b>58</b>	 D-2-Hydroxy-6-aminocapronsäure <b>41</b>	< 3	n.d.
6	 Valeriansäure <b>59</b>	 2-Hydroxyvaleriansäure <b>60</b>	-	-
7	 Buttersäure <b>61</b>	 2-Hydroxybuttersäure <b>62</b>	-	-
8	 Propionsäure <b>63</b>	 2-Hydroxypropionsäure <b>64</b>	-	-

9	 Essigsäure <b>65</b>	 2-Hydroxyessigsäure <b>66</b>	-	-
10	 $\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -alanin <b>67</b>	 $\alpha$ -Methyl-2-hydroxy- $\beta$ -alanin <b>68</b>	-	-
11	 3-Hydroxypropionsäure <b>69</b>	 3-Glycerinsäure <b>70</b>	-	-
12	 3-Aminopropionamid <b>71</b>	 3-Amino-2-hydroxy- propionamid <b>72</b>	-	-

n.d.: nicht bestimmt (engl. not determined)

### 3.1.3.2. Untersuchungen zum Bindungsmodus der alternativen Substrate

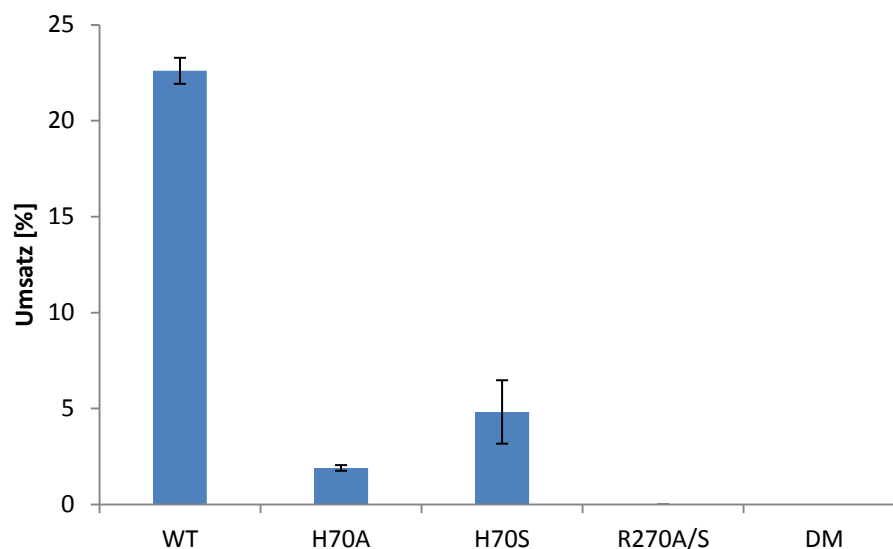
Nachdem gezeigt werden konnte, dass TauD auch alternative Substrate wie  $\omega$ -Aminocarbonsäuren hydroxylieren konnte, sollte nun experimentell geklärt werden, ob die neuen Substrate denselben Bindungsmodus wie das natürliche Substrat nutzen. Diese Untersuchung sollte zeigen ob, wie das ebenfalls zuvor durchgeführte Docking des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** mit RosettaDesign nahelegte, die alternativen Substrate an denselben Aminosäuren koordinieren wie die Sulfonsäure-Gruppe des natürlichen Substrats Taurin **28**. Dafür wurde eine kleine Mutantenbibliothek der TauD erstellt, bei der die in der Literatur beschriebenen Aminosäuren R270 und H70 der TauD, welche für die Koordination der Sulfonsäure des Taurins verantwortlich sind, jeweils durch Alanin und Serin ersetzt wurden, wobei die entsprechenden Aminosäuren sowohl einzeln (Einfachmutanten), als auch kombiniert (Doppelmutanten) ausgetauscht wurden, sodass in Summe acht Mutanten getestet wurden.<sup>[90]</sup>

Dabei wurden folgende Einfachmutanten der TauD erstellt: H70A, H70S, R270A, R270S. Desweiteren wurden folgende Doppelmutanten erstellt: H70A\_R270A, H70A\_R270S, H70S\_R270A, H70S\_R270S.

Untersucht werden sollte hierbei, nebst der Klärung der Frage ob diese Aminosäuren prinzipiell an der Bindung der alternativen Substrate beteiligt sind, auch, in welchem Maß die jeweilige Aminosäure an der Koordination der Carbonsäure beteiligt ist und ob die entsprechende Wechselwirkung durch einen Wasserstoffbrückendonator wie Serin kompensiert werden kann.

Die Erstellung der Mutanten erfolgte durch Austausch der entsprechenden Aminosäuren nach dem QuikChange<sup>®</sup> Protokoll (Kapitel 2.3.9.). Die erhaltenen Mutanten wurden, wie oben bereits für den Wildtyp der TauD beschrieben, sequenziert, exprimiert und anschließend mittels ÄKTA aufgereinigt. Zum Test der Mutanten wurden Biotransformationen mit  $\beta$ -Alanin **51** als Modellsubstrat durchgeführt, wobei die Ansätze analog denen der Biotransformationen der nativen TauD mit den alternativen Substraten erfolgten (Kapitel 3.1.3.1.). Die Umsetzungen ergaben, dass alle getesteten Mutationen an den Aminosäuren der Sulfonsäure-Bindungstasche einen negativen Einfluss auf den Umsatz des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** hatten. Dabei zeigte sich, dass der Austausch der Aminosäure R270 sowohl gegen Alanin, als auch gegen Serin zum vollständigen Verlust der Aktivität gegenüber  $\beta$ -Alanin **51** führte, sodass sowohl für die R270 Einfachmutanten, als auch für alle Doppelmutanten, keinerlei Umsatz mehr detektiert werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Aktivität der Mutanten gegenüber  $\beta$ -Alanin **51** lediglich in dem Maße verringert wurde, dass der Umsatz unter die Nachweisgrenze der verwendeten HPLC-ELSD gefallen war, wurden alle Biotransformationen der R270 enthaltenden Mutanten zusätzlich noch per HPLC-Fluoreszenz-Messung analysiert (Kapitel 2.2.2.1.), deren Sensitivität deutlich höher als die der HPLC-ELSD Methode ist. Jedoch konnte auch mit dieser Methode keinerlei Umsatz detektiert werden, sodass davon auszugehen ist, dass die entsprechenden Mutanten keinerlei signifikante Aktivität gegenüber dem getesteten Modellsubstrat haben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in Abbildung 6 die beiden Mutanten R270A und R270S, sowie alle Doppelmutanten unter jeweils einem Punkt zusammengefasst.

Für die H70 Mutanten konnte gezeigt werden, dass sowohl der Austausch gegen Alanin, als auch der Austausch gegen Serin zwar in dem Maße toleriert wurde, dass es bei beiden Mutanten noch zu einem nachweisbaren Umsatz kam, wobei es jedoch bei beiden Mutationen zu ausgeprägten Rückgängen des Umsatzes von über 75 % gegenüber dem TauD Wildtyp kam. Dabei war der Umsatz der H70A Variante mit  $1,9 \pm 0,15$  % am Detektionslimit, während der Umsatz der H70S Variante mit  $4,8 \pm 1,7$  % höher lag.



**Abbildung 6:** Ermittelte Umsätze der getesteten Mutanten über Nacht mit  $\beta$ -Alanin **51** als Modellsubstrat im Vergleich zur Wildtyp TauD (WT); **DM:** Doppelmutanten H70A/S\_R270A/S.

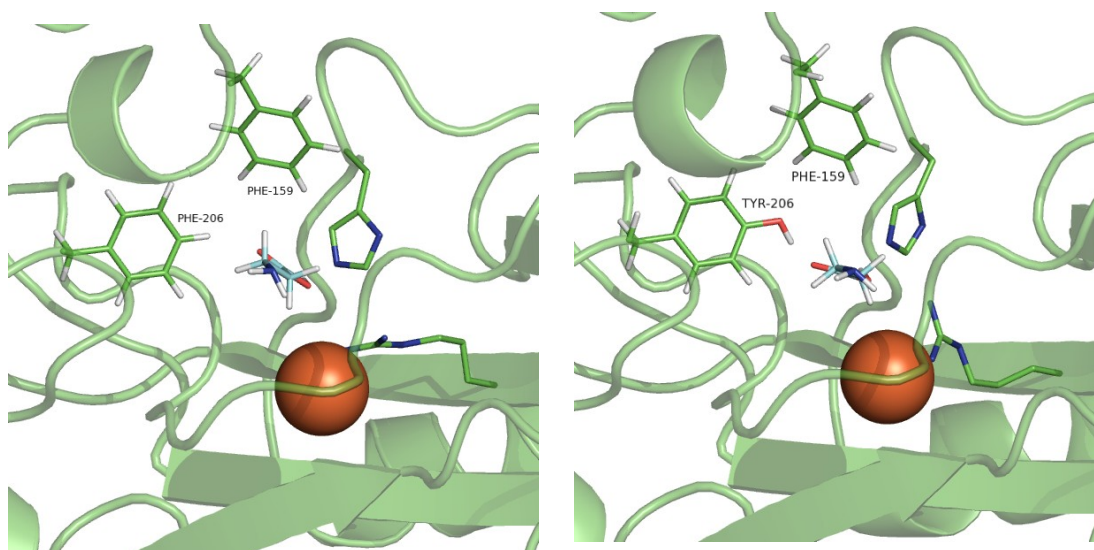
### 3.1.3.3. *Steigerung der Aktivität durch Einführung zusätzlicher Mutanten*

Nachdem die vorhergehenden Untersuchungen zum Bindungsmodus der neuen Substrate gezeigt haben, dass die neuen alternativen Substrate der TauD den gleichen Bindungsmodus verwenden wie das natürliche Substrat Taurin, sollte im nächsten Schritt, ebenfalls basierend auf dem durchgeführten Docking, HotSpots für die Einführung von Mutationen identifiziert werden, mithilfe derer die Aktivität der TauD bezüglich der neuen Substrate gesteigert werden kann. Anhand der in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zum Mechanismus der Hydroxylierung der TauD war ersichtlich, dass die Bindung des Substrats ein essentieller Schritt der Katalyse darstellt.<sup>[94]</sup> Untersucht werden sollte in diesem Rahmen inwieweit der Umsatz der alternativen Substrate durch die Einführung einer solchen Mutation gesteigert werden kann. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Mutationen an der natürlichen Sulfonsäure-Bindestelle der TauD zu einem signifikanten Verlust an Aktivität führten, wurden nun Aminosäuren gesucht die eine Möglichkeit zur Einführung einer zusätzlichen Interaktion mit den nicht-natürlichen Substraten boten. Von Interesse waren hierbei die beiden Phenylalanine F159 und F206 die, wie McCusker und Klinman zeigen konnten, an der Kopplung der Sauerstoffaktivierung durch Umsetzung des Cosubstrates  $\alpha$ -Ketoglutarat und der eigentlichen Hydroxylierungsreaktion des Substrats beteiligt sind. Dabei koordinieren diese,



wie bereits in der Einleitung erwähnt, die unpolare Kohlenstoffkette des Taurin und bringen es so in räumliche Nähe zum reaktiven Eisenzentrum.<sup>[119,120]</sup>

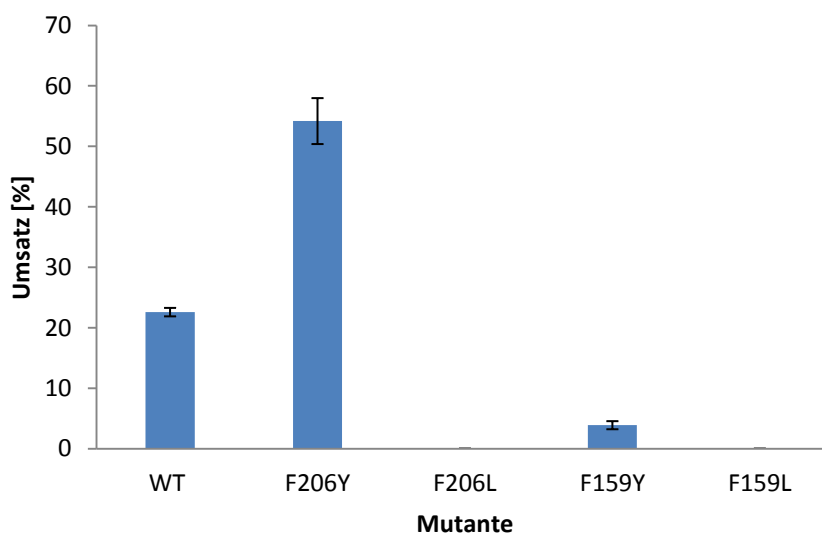
Im zuvor durchgeführten Docking des  $\beta$ -Alanin **51** zeigte sich, dass, im Gegensatz zur Bindung von Taurin in der TauD, bei der Bindung von  $\beta$ -Alanin **51** eine räumliche Nähe des Phenylalanins F206 zur Carbonsäuregruppe des Substrats entsteht. Durch Austausch dieses Phenylalanins F206 gegen ein Tyrosin konnte so im erhaltenen Model des Dockings eine mögliche neue Wasserstoffbrücke zwischen Enzym und  $\beta$ -Alanin **51** eingeführt werden (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Docking von  $\beta$ -Alanin in TauD Wildtyp (links) und in die Variante F206Y (rechts).

Zur Verifikation dieser Annahme wurden die beiden Phenylalanine 159 und 206 jeweils gegen Tyrosin ausgetauscht und zusätzlich noch Kontrollmutanten erstellt, bei denen die beiden Aminosäuren je gegen ein Leucin ausgetauscht wurden. Der Austausch gegen ein Leucin wurde für F159 bereits beschrieben und führte zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität des Enzyms bezüglich Taurin.<sup>[119]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden ob und inwiefern dieser Effekt auch für das Modells substrat  $\beta$ -Alanin **51** zu beobachten ist. Die Mutanten F159Y, F206Y, sowie F159L und F206L wurden, wie auch die Mutanten der Sulfonsäure-Bindungsstelle mittels des QuikChange<sup>®</sup> Protokolls erstellt. Nach der Verifikation der Mutation per Sequenzierung wurden entsprechende Mutanten exprimiert und anschließend mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie an einer ÄKTA aufgereinigt (Kapitel 2.4.3.1).

Alle Mutanten wurden auf Aktivität gegenüber dem Modell-Substrat  $\beta$ -Alanin **51** getestet, wobei die Ansätze wiederum analog den Ansätzen aus dem vorherigen Kapiteln erfolgten (Kapitel 3.1.3.1.). Es zeigte sich, dass während die beiden Mutanten F159L und F206L keinerlei Aktivität gegenüber dem getesteten Modells substrat mehr besaßen, die beiden Tyrosin Varianten F159Y und F206Y unterschiedliche Aktivitäten gegenüber  $\beta$ -Alanin **51** aufwiesen. So verringerte sich die Aktivität der Variante F159Y bezüglich der Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51** gegenüber dem Wildtyp auf ein Sechstel, von 22,6 % auf 3,9 % Umsatz. Die Variante F206Y hingegen zeigte einen von 22,6 % auf 54,2 % verdoppelten Umsatz relativ zum Wildtyp (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Umsätze der getesteten Phenylalanin Mutanten über Nacht mit  $\beta$ -Alanin **51** als Modells substrat im Vergleich zur Wildtyp TauD (WT).

Mit der, in Bezug auf die Umsetzung das Modells substrat  $\beta$ -Alanin **51**, verbesserten TauD Variante F206Y wurde erneut ein Screening mit den in Kapitel 3.1.3.1. getesteten Substraten durchgeführt. Dabei wurden wie auch schon in Kapitel 3.1.3.1. sowohl Umsätze der verschiedenen Substrate als auch *ee*-Werte der erhaltenen Produkte ermittelt. Es zeigte sich, dass die Variante F206Y gegenüber allen Substraten, welche schon vom Wildtyp umgesetzt wurden, einen erhöhten Umsatz, sowie bei den Substraten mit vormals geringen *ee*-Werten bezüglich der gebildeten Produkte, auch gesteigerte Enantioselektivitäten aufwies. So stieg der *ee*-Wert des gebildeten Produkts der Umsetzung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure von  $10 \pm 1$  % bei den Umsetzungen mit TauD Wildtyp auf  $> 96$  % bei der Umsetzung mit der TauD Variante F206Y. Zusätzlich dazu wurden von der F206Y Variante der TauD nun auch kurzkettinge Fettsäuren ohne terminale Aminofunktion

akzeptiert, wobei die Umsätze hier mit 3,6 % bis 5,2 % deutlich unter denen der  $\omega$ -Aminocarbonsäuren (28,1 % bis 54,2 %) lagen. Weiterhin wurden auch die beiden zusätzlichen Substrate des ersten Screenings,  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67** und 3-Aminopropionamid **71** getestet. Dabei konnte gezeigt, dass  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67** mit der neuen F206Y Variante im Gegensatz zum Wildtyp der TauD umgesetzt werden konnte, wobei der Umsatz bei  $7,1 \pm 0,9$  % lag. Dabei war ersichtlich, dass bei Einsatz des Racemats als Substrat, nur eines der beiden Enantiomere umgesetzt wurde sowie auch nur ein Produkt gebildet wurde. Allerdings konnte in Ermangelung einer Referenz, nicht abschließend geklärt werden welches das exakte Reaktionsprodukt ist und welches der beiden Enantiomere umgesetzt wurde. Für die Umsetzungen des 3-Aminopropionamids **71** mit der TauD F206Y Variante wurde zwar, wie auch für den Wildtyp, mit der HPLC-ELSD Methode zwar kein Umsatz detektiert, jedoch konnte bei nachfolgenden HPLC-Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass es zur Bildung eines Produkts kam, sodass davon auszugehen ist, dass dieses Substrat in Spuren umgesetzt wird, der Umsatz an sich jedoch deutlich unterhalb der Detektionsgrenze der Standard-Analysenmethode HPLC-ELSD liegt und damit unterhalb des signifikanten Levels ist. Eine Zusammenfassung der in diesem zweiten Screening erhaltenen Umsätze findet sich, zusammen mit den im ersten Screening erhaltenen Ergebnissen zum direkten Vergleich, in Tabelle 27. Exemplarische Chromatogramme der entsprechenden Umsetzungen finden sich im Anhang (Kapitel 6.3).

**Tabelle 27:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Screenings mit TauD WT und F206Y

#	Substrate	Umsatz [%]		ee-Wert [%]	
		WT TauD	F206Y TauD	WT TauD	F206Y TauD
<b>1</b>	Glycin <b>53</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	$\beta$ -Alanin <b>47</b>	$22,6 \pm 0,7$	$54,2 \pm 3,8$	$> 96^1$	$> 96^1$
<b>3</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure <b>55</b>	$8,1 \pm 1,3$	$37,7 \pm 4,9$	$10 \pm 1$	$> 96^1$
<b>4</b>	5-Aminovaleriansäure <b>57</b>	$12,1 \pm 0,2$	$53,5 \pm 1,1$	$> 96^1$	$> 96^1$
<b>5</b>	6-Aminocaprinsäure <b>58</b>	$< 3$	$28,1 \pm 2,8$	n.d.	$> 96^1$
<b>6</b>	Valeriansäure <b>59</b>	-	$5,2 \pm 0,6$	-	n.d.
<b>7</b>	Buttersäure <b>61</b>	-	$4,1 \pm 0,3$	-	n.d.
<b>8</b>	Propionsäure <b>63</b>	-	$3,6 \pm 0,2$	-	n.d.
<b>9</b>	Essigsäure <b>65</b>	-	-	-	-
<b>10</b>	$\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin <b>67</b>	Spuren	$7,1 \pm 0,9$	n.d.	$> 96^1$
<b>11</b>	3-Hydroxypropionsäure <b>69</b>	-	-	-	-
<b>12</b>	3-Aminopropionamid <b>71</b>	-	Spuren	-	n.d.

n.d.: nicht bestimmt

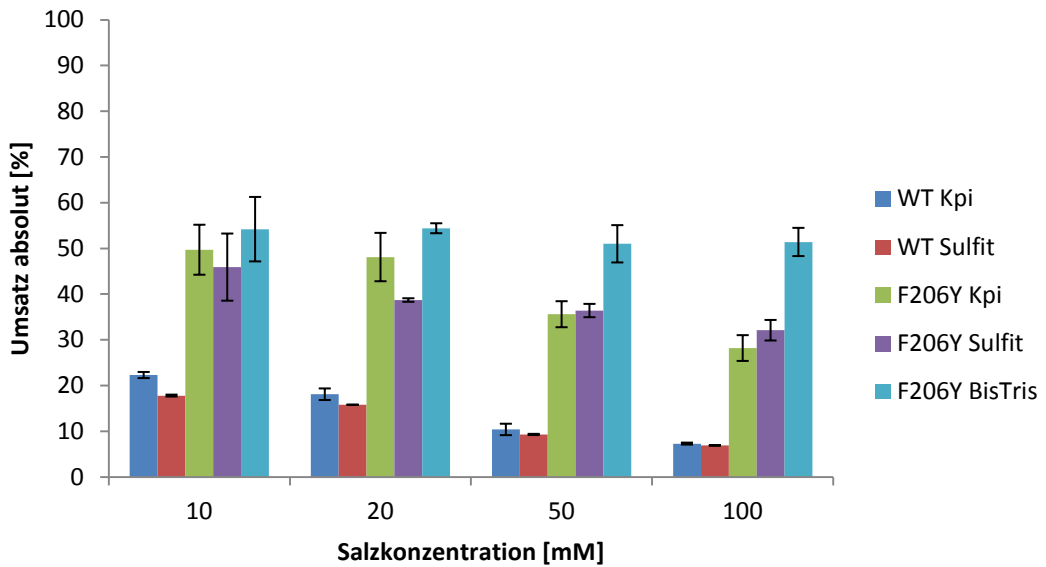
<sup>1</sup> Das andere Enantiomer wurde nicht detektiert

#### **3.1.3.4. Überprüfung der Reaktionsparameter**

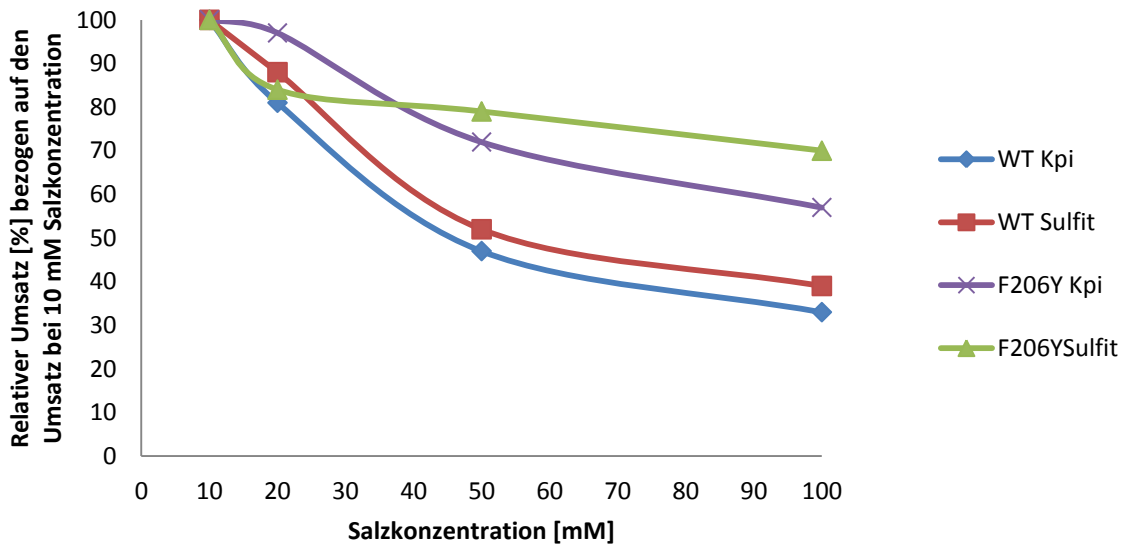
Im nächsten Schritt sollte nun getestet werden inwieweit Reaktionsparameter wie Substratkonzentration und verwendete Puffer einen Einfluss auf die Reaktion respektive die Umsätze der neuen Substrate haben.

Es wurde untersucht, ob tetraedrische Salze, die dem natürlichen Sulfonsäure-Motiv strukturell ähnlich sind, inhibitiv auf die Reaktion wirken und so die Umsätze der Substrate verringern können. Dabei wurden die Untersuchungen, wie auch schon in den vorhergehenden Studien zur Substratbindung, mit  $\beta$ -Alanin **51** als Modellsubstrat für die Umsetzungen durchgeführt, wobei sowohl TauD Wildtyp als auch die F206Y Variante der TauD getestet wurden. Als Inhibitoren wurden Kaliumphosphatpuffer und Natriumsulfit in verschiedenen Konzentrationen (10 mM, 20 mM, 50 mM und 100 mM) getestet.

Es zeigte sich, dass die getesteten Salze den Umsatz von  $\beta$ -Alanin **51** zu Isoserin **52**, in Abhängigkeit ihrer Konzentration, signifikant verringern können, während organische Puffersysteme wie BisTris, welches keine strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen Sulfonsäure-Motiv der TauD aufweist, auch in höheren Konzentrationen kaum eine signifikante inhibitive Wirkung auf den Umsatz zeigte (der Umsatzrückgang bei einer Steigerung der Pufferkonzentration auf 100 mM BisTris, relativ zum Umsatz bei 10 mM BisTris, lag bei gerade einmal 5 %). In den Abbildungen 9 und 10 finden sich die Ergebnisse der Untersuchungen. Es zeigte sich, dass Natriumsulfit im niedrigen Konzentrationsbereich einen größeren inhibativen Effekt auf die Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51** zu Isoserin **52** besitzt als Kaliumphosphat. Jedoch gleichen sich die absoluten Umsätze bei steigender Konzentration an (Abbildung 9). Auch zeigte sich, dass die TauD Variante F206Y, abgesehen von den absolut gesehen höheren Umsätzen, auch weniger sensitiv gegenüber steigenden Konzentrationen an inhibitiv wirkenden Salzen ist, sodass es bei steigenden Konzentrationen dieser Salze zu einem geringeren Rückgang des Umsatzes kommt (Abbildung 9 & 10).



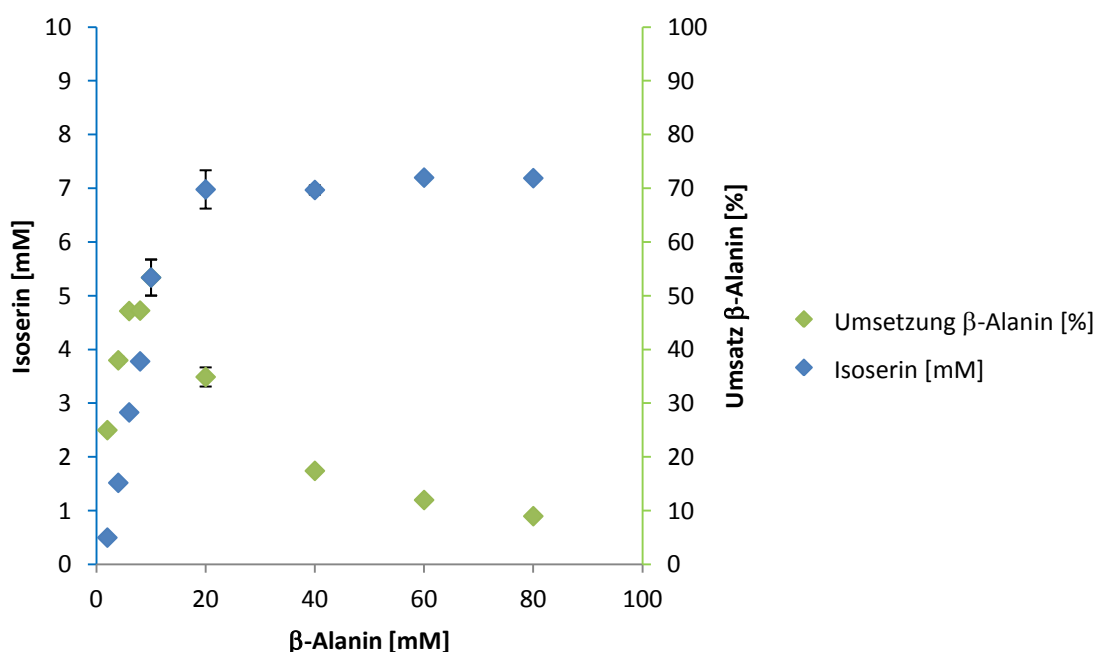
**Abbildung 9:** Absolute Umsätze [%] der Biotransformationen von  $\beta$ -Alanin **51** zu Isoserin **52** mit den TauD Varianten Wildtyp und F206Y bei verschiedenen Salzkonzentrationen. Als Vergleich wurden noch die Umsätze von F206Y mit BisTris als Puffer hinzugefügt. WT: TauD Wildtyp; F206Y: TauD F206Y; Kpi: Kaliumphosphatpuffer; Sulfit: Natriumsulfit;



**Abbildung 10:** Abhängigkeit des relativen Umsatzes an  $\beta$ -Alanin **51** von der Salzkonzentration der beiden TauD Varianten Wildtyp (WT) und F206Y relativ zum Umsatz bei 10 mM Salzkonzentration der auf 100 % gesetzt wurde. Auf die Darstellung der Fehlerbalken wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, wobei die Standardfehler der einzelnen Messpunkte im Balkendiagramm in Abbildung 9 angegeben sind.

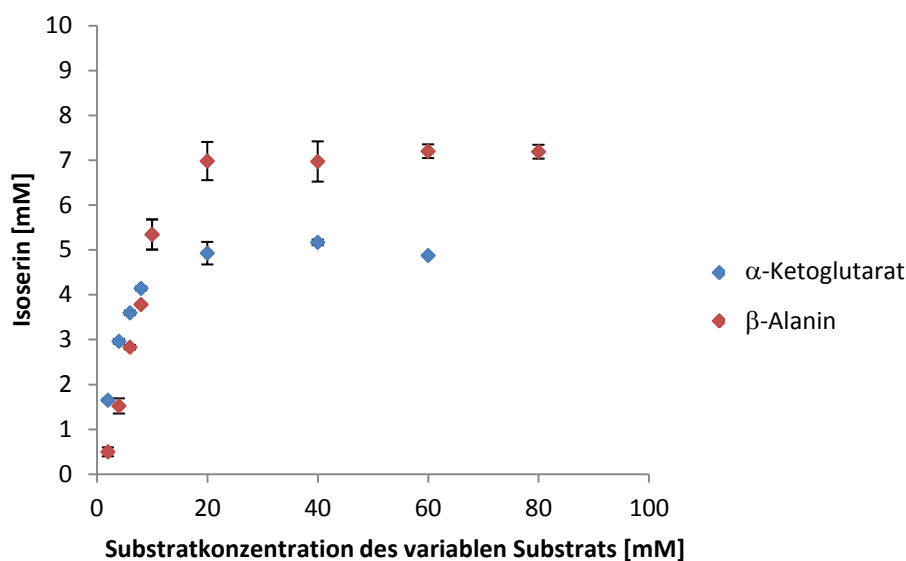
### 3.1.3.5. Bestimmung der optimalen Substratkonzentration der Biotransformationen für das Modellsubstrat $\beta$ -Alanin 51

Im nächsten Schritt der Untersuchungen zur TauD F206Y Variante sollte ermittelt werden, ob der Umsatz der TauD F206Y Variante bezüglich des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin 51 weiter gesteigert werden kann, indem man die Substratkonzentration variiert. Dafür wurden Ansätze durchgeführt, bei denen die Konzentration an  $\beta$ -Alanin 51 im Bereich von 2 mM bis 80 mM variiert wurde, während die entsprechende Konzentration des Cosubstrats  $\alpha$ -Ketoglutarat konstant bei 10 mM gehalten wurde. Es zeigte sich, dass es bei steigender Konzentration an  $\beta$ -Alanin 51 die absolute Produktkonzentration von Isoserin 52 in den Biotransformationen zwar auf ca. 7 mM gesteigert werden konnte, die Umsatzraten jedoch ihr Maximum bei einer Substratkonzentration von 10 mM  $\beta$ -Alanin 51 erreicht haben. Ab einer Substratkonzentration von 20 mM  $\beta$ -Alanin 51 kam es zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der absolut gebildeten Isoserinkonzentration. Wie aus Abbildung 11 ersichtlich wird hat das Verhältnis von Substrateinsatz zu Produktbildung ein gewisses Optimum bei einer Substratkonzentration von 10 mM (an diesem Punkt treffen sich auch die Kurven im Schaubild).



**Abbildung 11:** Relativer Substratumsatz von  $\beta$ -Alanin 51 [%] und absolute Konzentration des gebildeten Produkts Isoserin 52 [mM] relativ zur variierten  $\beta$ -Alanin-Konzentration.

Verglichen damit konnte die Produktbildung durch eine Erhöhung der Konzentration des Cosubstrats  $\alpha$ -Ketoglutarat über 10 mM hinaus nicht gesteigert werden. Dabei wurden die Umsetzungen analog denen der variierenden Konzentration an  $\beta$ -Alanin **51** durchgeführt, wobei hier jedoch die Konzentration an  $\beta$ -Alanin **51** konstant gehalten wurde und die Konzentration an  $\alpha$ -Ketoglutarat variiert wurde. Ein direkter Vergleich der Isoserinbildung in Abhängigkeit der jeweils variierten Substratkonzentration an  $\beta$ -Alanin **51** und  $\alpha$ -Ketoglutarat findet sich in Abbildung 12.



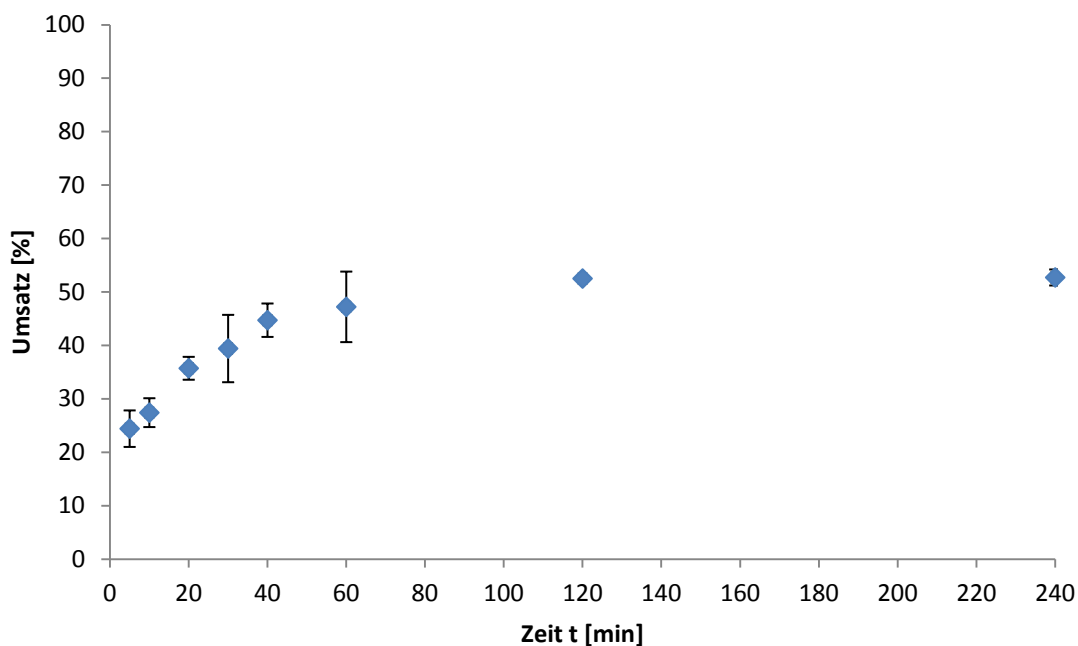
**Abbildung 12:** Bildung von Isoserin **52** in mM im Verhältnis zu variablen Substratkonzentrationen. Dabei wurde jeweils die Konzentration eines der beiden Substrate (entweder  $\alpha$ -Ketoglutarat oder  $\beta$ -Alanin **51**) variiert, während die Konzentration des jeweils anderen Substrates konstant bei 10 mM gehalten wurde.

### 3.1.3.6. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Hydroxylierung von $\beta$ -Alanin **51**

Im letzten Schritt der Untersuchungen zur Hydroxylierung alternativer Substrate und damit der Ausnutzung des natürlichen Reaktionspotentials der TauD sollte geklärt wie die Produktbildung der Hydroxylierungsreaktion der Carbonsäuren über die Zeit verläuft. Für die natürliche Reaktion der TauD wurde in der Literatur beschrieben, dass die Reaktion nach kurzer Zeit (ca. 30 min) aufgrund einer Inaktivierung des Enzyms beendet ist.<sup>[84]</sup> Dies konnte jedoch in vorläufigen Untersuchungen für die Hydroxylierung der alternativen Substrate nicht festgestellt werden, da die Produktbildung über diesen Zeitraum

hinausging. Deshalb sollte in einer Messreihe der zeitliche Verlauf der Reaktion ermittelt werden. Dafür wurden Biotransformationen mit der TauD F206Y Variante der TauD durchgeführt, da hier die Aktivität höher war. Damit einhergehend wurde erwartet, dass Umsätze bei kurzer Reaktionszeit signifikant höher wären als bei dem TauD Wildtyp, was wiederum, aufgrund der daraus resultierenden größeren Signalflächen, zu einer Verringerung der relativen Fehler in der Bestimmung der Messpunkte führen sollte. Für die Bestimmung der Messreihe wurden für jeden zu bestimmenden Zeitpunkt der Messreihe Biotransformationen durchgeführt, welche analog denen der vorhergehenden Umsetzungen von  $\beta$ -Alanin **51** waren. Jedoch wurde abweichend vom vorhergehenden Ansatz, das zugegebene Volumen von doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) um 5  $\mu$ l verringert. Dafür wurde zum Abbruch der Reaktion nach Ablauf der Reaktionszeit 5  $\mu$ l EDTA (0,5 M, pH 8) zugegeben. Das Anfangs geringere Gesamtvolumen und die damit einhergehende höhere Konzentration der eingesetzten Substrate, wurden aufgrund des geringen Ausmaßes (0,5 % des Gesamtvolumens) vernachlässigt. Der gefundene Reaktionsverlauf der Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51** zu D-Isoserin **52** findet sich in Abbildung 13. Es zeigte sich, dass analog des in der Literatur beschriebenen Reaktionsverlaufs der natürlichen Reaktion der TauD, also der Umsetzung von Taurin, ein Großteil der Reaktion innerhalb der ersten Minuten abläuft, jedoch war im Gegensatz zur Umsetzung von Taurin die Aktivität der TauD danach nicht beendet.<sup>[84]</sup> Eine Stagnation der Produktkonzentration und damit des Umsatzes trat erst nach ca. 2 h ein, was darauf schließen lässt, dass das eingesetzte Enzym zu diesem Zeitpunkt den Hauptteil seiner Aktivität eingebüßt hat. Die Messpunkte der Bestimmung waren 5, 10, 20, 30, 40, 60, 120, und 240 min. Ein weiterer Messpunkt nach 24 h wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht ins Schaubild aufgenommen, zeigte jedoch auch keine weitere signifikante Steigerung des Umsatzes an Substrat.



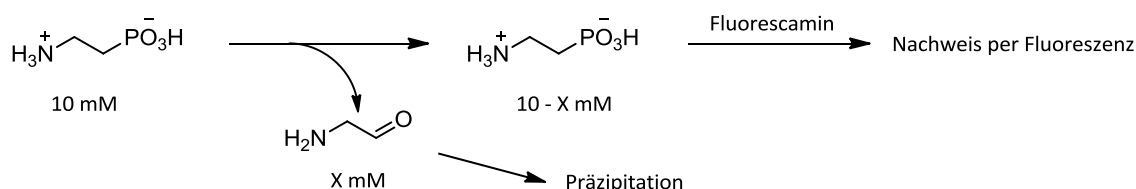


**Abbildung 13:** Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51** zu D-Isoserin **52**

### 3.1.3.7. Untersuchungen zur Umsetzung von $PO_3$ -Analoga des Taurin

Im Rahmen der Untersuchungen zur Substratpromiskuität wurde, neben den oben bereits beschriebenen Carbonsäureanaloga des Taurin, auch getestet inwiefern man ein Phosphonsäure-Analog des Taurins umsetzen kann (Kapitel 3.1.3. Schema 7, Reaktionsgleichung (2)). Dabei wurde zuerst getestet, ob der zur Bestimmung der TauD Aktivität verwendete Assay, welcher auf dem Sulfit-Nachweis nach Ellman *et al.* basiert, auch für den Nachweis von Phosphit verwendet werden kann. Jedoch zeigte sich bei initialen Untersuchungen, dass durch Zugabe von Phosphit zum Ellman's Reagenz (DTNB in Kaliumphosphatpuffer) keinerlei Signal detektiert werden konnte, weshalb nach einem alternativen Assay gesucht wurde. Dabei wurde als Assay eine Art Rücktitration getestet, bei dem per Fluoreszenzmessung die Konzentration des  $PO_3$ -Analogon des Taurins, 2-Aminoethanphosphonsäure, bestimmt wird. Diese Bestimmung erfolgte mittels Fluorescamin Derivatisierung der primären Aminofunktion der 2-Aminoethanphosphonsäure, wodurch eine fluoreszierende Verbindung entsteht (Kapitel 2.4.7.). Wie in der Literatur beschrieben wird, polymerisiert das im Laufe der Reaktion ausgebildete Aminoacetaldehyd aus, sodass dieses nicht mehr für die Derivatisierung zur Verfügung stehen sollte (Schema 20).<sup>[84]</sup> Die Derivatisierung erfolgte nach dem von

McMahon *et al.* beschriebenen Protokoll.<sup>[116]</sup> Dafür wurden die Reaktionsansätze analog der Reaktion der TauD mit den alternativen Substraten angesetzt (Kapitel 2.4.7). Nach Ende der Reaktion wurde die Derivatisierung analog dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt, jedoch wurde nach Ende der Reaktion das Protein bei 60 °C für 5 min gefällt.



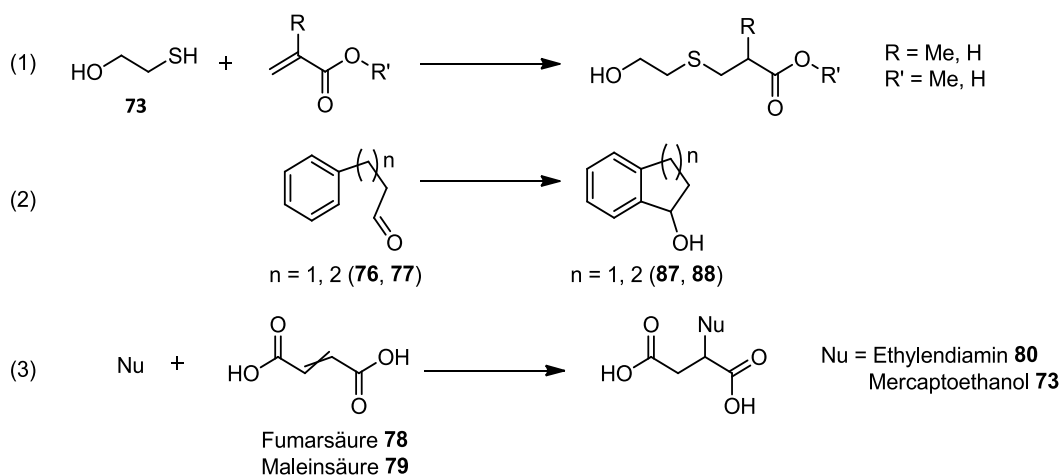
**Schema 20:** Schematische Darstellung der Umsetzung des alternativen Taurin analogen Substrats 2-Aminoethanphosphonsäure mit der TauD und anschließende Analyse per Fluoreszenz.

Die Analyse erfolgte an einem FluoroStar Fluoreszenzmessgerät. Als Kontrollreaktionen wurden einerseits Ansätze mit Zugabe von Enzym ohne Eisenzugabe durchgeführt und andererseits Ansätze mit Eisen und ohne Enzymzugabe. Die Methode wurde durch eine testweise Umsetzung von Taurin mit der TauD und anschließender Derivatisierung validiert. Es zeigte sich, dass bei der Umsetzung mit Taurin die Restkonzentration an verbleibendem Substrat noch bei ca. 70 % lag. Nach Durchführung derselben Reaktion jedoch mit 2-Aminoethanphosphonsäure betrug die Konzentration an verbleibendem derivatisierbaren Substrat noch 93 %, wobei die Quantifizierung der Reaktionsumsätze relativ zueinander erfolgte. Dabei wurde der Wert für die Reaktion ohne Eisen auf 100 % gesetzt und der Wert der Reaktion, welcher als kompletter Ansatz durchgeführt wurde, relativ dazu berechnet. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Taurin-analoge Substrat zu einem geringen Prozentsatz umgesetzt wird.

### 3.1.4. Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der TauD

Im nächsten Schritt der Untersuchungen zur Ausnutzung des katalytischen Potentials von Metalloenzymen, sollte untersucht werden inwieweit man die TauD für Reaktion außerhalb des nativen Hydroxylierungsmechanismus nutzen kann. Dafür wurden verschiedene Lewis-Säure katalysierte Reaktionen untersucht, wobei der Fokus auf Reaktionen lag, die nur einer geringen Aktivierung bedürfen. Die Ansätze erfolgten dabei nach der in Kapitel 2.4.11. gegebenen Vorschrift. Getestet wurden in diesem Zusammenhang einerseits Michael-Additionen basierend auf der Addition von Schwefelnukleophilen an Acrylate einerseits und von Mercaptoethanol **73** und Ethylendiamin **80** an die, mit dem natürlichen

Cosubstrat  $\alpha$ -Ketoglutarat strukturell verwandten, Säuren Fumar- und Maleinsäure. Weiterhin wurden auch erste Untersuchungen zu Friedel-Crafts-Reaktionen durchgeführt, wobei keine der Reaktionen einen signifikant über dem Hintergrund liegenden Umsatz zeigte. Eine schematische Darstellung der getesteten Reaktionen findet sich in Schema 19. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich, dass die Reaktionen unter den für TauD adäquaten Reaktionsbedingungen, bezüglich Temperatur (maximal 30 °C) und Reaktionsdauer (die Stabilität der TauD ist selbst bei 30 °C deutlich begrenzt) nicht durchführbar sind. Deshalb wurde als alternatives System für die Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität wie Eingangs bereits beschrieben, die von Reetz und seinen Mitarbeitern entwickelten artifiziellen Kupfer-bindenden tHisF Varianten HHD und NC gewählt die im Folgenden genauer beschrieben werden. Für diese Systeme wurde weiterhin auch anstelle des Fe(II) als Zentralion, welches bei der TauD verwendet wurde, nun Cu(II) als Zentralion verwendet. Dieses bietet unter anderem den Vorteil stabiler gegenüber Oxidation in Lösung zu sein und so auch über längere Zeiträume für die Reaktion zur Verfügung zu stehen, während Fe(II) in Lösung innerhalb weniger Minuten zu Eisen (III) oxidiert.<sup>[121]</sup>



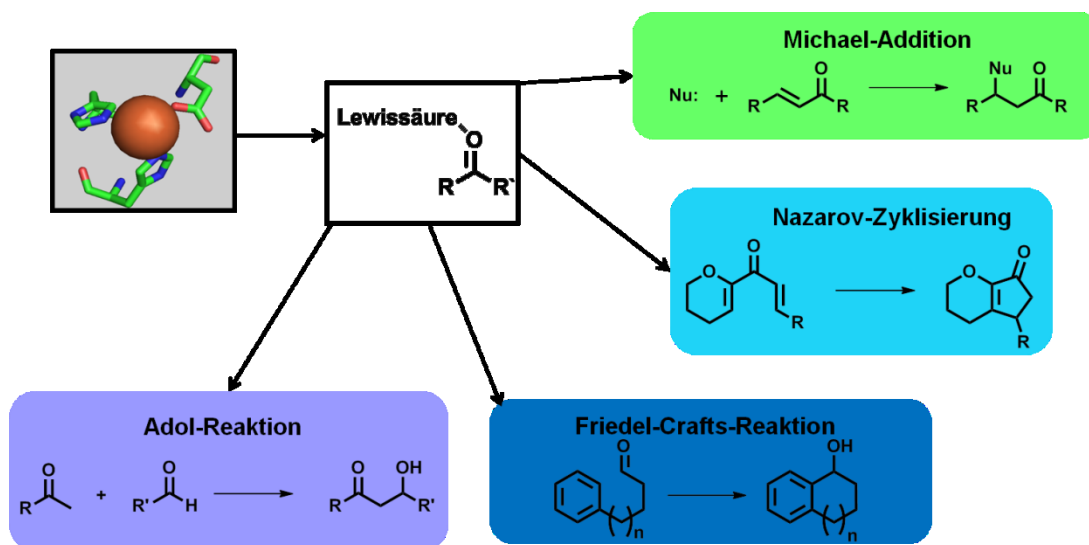
**Schema 21:** Getestete alternative Reaktionen für TauD: (1) Michael-Addition von Acrylaten mit Mercaptoethanol **73**; (2) Friedel-Crafts Reaktion von 3-Phenylpropionaldehyd **76** und 4-Phenylbutyraldehyd **77**; (3) Michael-Addition von Mercaptoethanol **73** und Ethylendiamin **80** an Fumar- und Maleinsäure.

### **3.2. Untersuchungen zur Ausnutzung des katalytischen Potentials metallbindender tHisF-Varianten**

Nachdem die Untersuchungen bezüglich der katalytischen Promiskuität der TauD abgeschlossen wurden, erfolgten die weitergehenden Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität mit den von Reetz und seinen Mitarbeitern entwickelten tHisF Varianten HHD (Abkürzung für die artifiziell eingeführte Metallbindestelle HisHisAsp) und NC (engl. Abkürzung für „negative control“; tHisF Variante ohne Metallbindestelle) Variante der tHisF.<sup>[122]</sup> Beiden Varianten gemein ist, dass bei ihnen im Vergleich zum tHisF Wildtyp Metall-bindende Reste an der Oberfläche, welche die entsprechenden Metalle kompetitiv zur Metallbindestelle binden könnten, entfernt wurden (Kapitel 1.5.3). Dabei sind vier Oberflächen-Histidine und ein Cystein jeweils durch ein Alanin ausgetauscht worden. Die HHD Variante enthält dabei, wie bereits zuvor beschrieben, eine artifiziell eingeführte Metallbindestelle bestehend aus einem HisHisAsp Aminosäuremotiv, wobei dieses zur Metallbindestelle der TauD identisch ist.

In den folgenden Untersuchungen wurde nun ermittelt, inwiefern diese Metallbindestelle der tHisF HHD als chirale Lewisäure verwendet werden kann, indem man verschiedene Metallionen bindet, welche als eigentlich katalytisch aktive Lewis-Säuren fungieren können. Dabei sollte das Protein in seiner Funktion als solches abstrahiert werden und nur als chiraler Ligand für das eigentlich reaktive Lewis-saure Metallzentrum fungieren. Weiterhin sollte untersucht werden inwiefern die tHisF Varianten HHD und NC ein inhärentes katalytisches Potential besitzen, welches, unabhängig von der Funktion als Metallbindestelle und damit chiraler Ligand für eine Lewis-Säure, basierend auf Ihrer Struktur und Funktionalität, genutzt werden kann, um neue Reaktionen zu katalysieren (Abbildung 14).

Teile dieser Arbeiten zur tHisF katalysierten Michael-Addition wurden in Kooperation mit Jennifer Bolsinger im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt, wobei sich die Kooperation hauptsächlich auf die Arbeiten zur tHisF-katalysierten Michael-Addition konzentrierte.



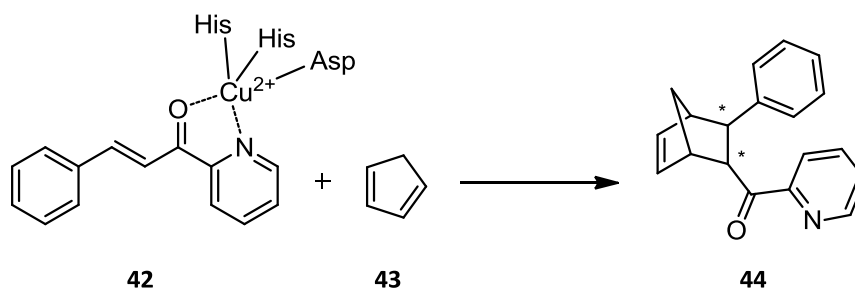
**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der neuen Reaktionen die mit der tHisF untersucht werden sollen. Dabei sind die jeweils neu gebildeten Bindungen in rot dargestellt. Schematisch dargestellt sind das HisHisAsp Motiv der tHisF als grünes Stäbchenmodell mit Cu(II) als orange Sphäre.

### 3.2.1. Erstellen der tHisF Varianten HHD und NC basierend auf dem tHisF Wildtyp

Die tHisF Varianten HHD und NC wurden ausgehend vom tHisF Wildtyp per ortsgerichteter Mutagenese nach dem QuikChange<sup>®</sup> Protokoll in Kooperation mit Jennifer Bolsinger im Rahmen ihrer Diplomarbeit, analog den von Reetz und seinen Mitarbeitern beschriebenen Varianten, hergestellt.<sup>[122]</sup> Der Wildtyp der tHisF kloniert in pET28a(+) wurde dabei von der Arbeitsgruppe von Prof. Sterner bereitgestellt.<sup>[98]</sup> Die für die Herstellung der HHD Variante benötigten Mutationen waren C9A, L50H, I50H, H84A, H209A, H228A und H244A, wobei die Mutationen C9A, H84A, H209A, H228A und H244A der Entfernung von Aminosäuren dienten, welche kompetitiv zur Metallbindestelle das später hinzugefügte Metall binden könnten und die Mutationen L50H, I50H zusammen mit dem natürlich vorkommenden D11 der tHisF die HisHisAsp Triade bilden, welche als Metallbindestelle fungiert. Für die Herstellung der NC Variante, welche keine Metallbindestelle enthielt wurden dementsprechend nur die Mutationen C9A, H84A, H209A, H228A und H244A eingeführt. Alle Mutationen wurden per Sequenzierung verifiziert.

### 3.2.2. Verifikation der Diels-Alder Aktivität der tHisF Varianten HHD und NC nach Reetz et al.

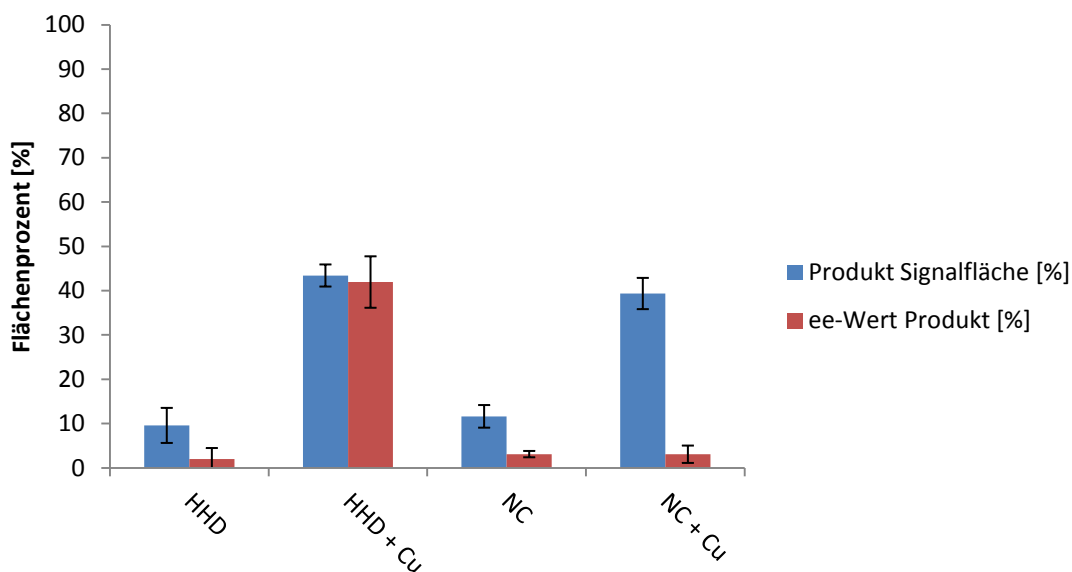
Im nächsten Schritt wurde die Aktivität der tHisF Varianten HHD und NC bezüglich der Diels-Alder Reaktion untersucht. Dabei wurde die Diels-Alder Reaktion von Cyclopentadien mit dem in Schema 20 gezeigten Azachalcon **42**, welche von Reetz und seinen Mitarbeitern für diese beiden tHisF Varianten gezeigt wurde, nachempfunden, um die Aktivität der hergestellten Varianten zu überprüfen.



**Schema 22:** Diels-Alder Reaktion des verwendeten Azachalcons **42** mit Cyclopentadien **43** nach Reetz et al.<sup>[102]</sup>

Die Umsetzungen erfolgten analog der in der Literatur beschriebenen Vorschrift, jedoch bei 13 °C anstelle von 12 °C.<sup>[102]</sup> Vor Beginn der Reaktion wurde die entsprechend verwendete tHisF Variante für 2 h bei 400 rpm und 20 °C mit dem zuzugebenden Cu(II)SO<sub>4</sub> inkubiert, um eine Äquilibration des Metallsalzes mit dem Enzym und damit eine Bindung an die Metallbindestelle, zu ermöglichen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Substrate, wobei zuerst das Azachalcon **42** und anschließend das Cyclopentadien **43** zugegeben wurden. Die Durchführung der Reaktion erfolgte mit der mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten tHisF, wobei sowohl die HHD und NC Variante getestet wurden. Als Kontrolle wurden die Umsetzungen jeweils noch mit Enzym ohne Zugabe von Cu(II)SO<sub>4</sub> durchgeführt. Bei den Ansätzen ohne Kupfer wurde das Volumen des zugegebenen Wassers um das entsprechend fehlende Volumen der Metallsalzlösung erhöht, sodass das Gesamtvolumen und damit die Konzentrationen der eingesetzten Komponenten in beiden Ansätzen gleich waren. Die erhaltenen Umsätze und Enantioselektivitäten finden sich in Abbildung 15. Dabei zeigte sich, dass die Umsätze und Enantioselektivitäten analog denen in der Literatur beschriebenen Umsätzen und Selektivitäten waren, wobei sowohl Umsatz und Selektivität geringfügig geringer waren als in der Literatur (Diskussion Kapitel 4.2). Die Analyse der Umsetzungen bezüglich der Umsätze und *ee*-Werte erfolgte per chiraler HPLC-DAD Messung (Kapitel 2.2.2.5). Die

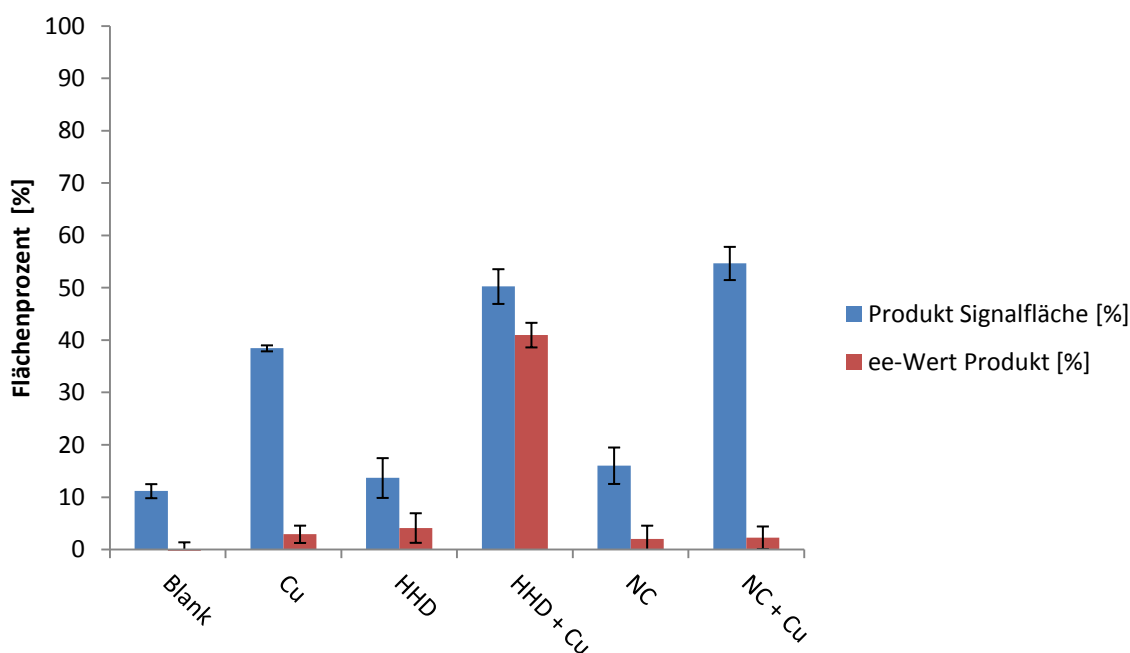
Bestimmung der Umsätze erfolgte anhand der Signalflächen, während die Zuordnung der Signale mittels synthetisierter Referenzen erfolgte (Kapitel 2.5.3).



**Abbildung 15:** Umsätze und *ee*-Werte der tHisF katalysierten Diels-Alder Reaktion nach 48 h mit mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigtem Enzym. Angaben jeweils für die HHD und NC Variante der tHisF jeweils mit Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD+Cu; NC+Cu) und ohne Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD; NC).

Zusätzlich zu den Umsetzungen mit aufgereinigter tHisF wurden die Ansätze auch noch mit grob aufgereinigter tHisF durchgeführt. Dafür wurde die verwendete tHisF nicht mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigt, sondern nach Zellaufschluss und Hitzefällung nur mittels einer PD-10 Säule entsalzt. Mit den entsprechenden grob aufgereinigten Enzympräparationen wurden dieselben Umsetzungen wie mit den entsprechenden aufgereinigten Enzympräparationen durchgeführt, um zu testen, ob diese ähnliche Aktivitäten sowie Selektivitäten zeigen und somit für das spätere Screening von neuen Reaktionen nutzbar wären, was wiederum den entsprechenden Screeningaufwand deutlich reduzieren sollte. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Kontrollreaktionen durchgeführt, bei denen anstelle der tHisF Präparation nur der für die Enzympräparation verwendete Puffer (50 mM BisTris) und zusätzlich entweder Cu(II)SO<sub>4</sub> (Abbildung 16, Eintrag Cu) oder nur ddH<sub>2</sub>O zugegeben wurden (Blank). Die Umsätze und Selektivitäten der Reaktionen, die in Abbildung 16 zusammengefasst sind, waren vergleichbar mit denen der Reaktionen mit aufgereinigtem Enzym, wobei jedoch die Umsätze geringfügig größer waren als bei den vorherigen Ansätzen. So betrug der Produktanteil bei der Umsetzung mit aufgereinigter tHisF HHD bei Zugabe von Kupfer bspw.  $43 \pm 2$  %, während bei derselben

Umsetzung mit nur durch entsalzen aufgereinigtem Enzym im zweiten Ansatz ein Produktanteil von  $50 \pm 3 \%$  festgestellt werden konnte. Die *ee*-Werte der gebildeten Produkte betragen dagegen in beiden Fällen  $41 \pm 3 \%$  für die aufgereinigte tHisF HHD bzw.  $42 \pm 2 \%$  für die entsalzte tHisF HHD und waren damit innerhalb der Fehlergrenzen identisch. Der höhere Umsatz der zweiten Umsetzung (mit entsalzter tHisF) könnte auf katalytisch aktive Verunreinigungen aus dem Zellysat zurückzuführen sein, welche weder durch die Hitzefällung noch durch den Entsalzungsschritt entfernt werden können wie z.B. DNA oder an das Protein adsorbierte Metallsalze aus dem Zellysat. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen die Grob-Aufreinigung aufgrund des Zeitvorteils für das vorläufige Screening neuer Reaktionen zur Herstellung entsprechender Enzympräparationen zu verwenden und bei positiven Treffern zur Bestimmung definierter Umsätze und Selektivitäten die entsprechenden Reaktionen mit aufgereinigter tHisF zu wiederholen.

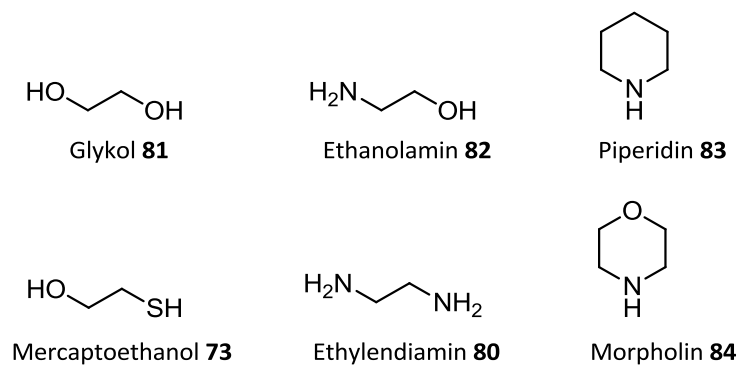


**Abbildung 16:** Umsätze und *ee*-Werte der tHisF katalysierten Diels-Alder Reaktion mit grob aufgereinigtem Enzym nach 48 h. Angaben jeweils für die HHD und NC Variante der tHisF jeweils mit Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD+Cu; NC+Cu) und ohne Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD; NC). Zusätzliche Kontrollen: Blank (nur Puffer), Cu (nur Puffer mit Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe).

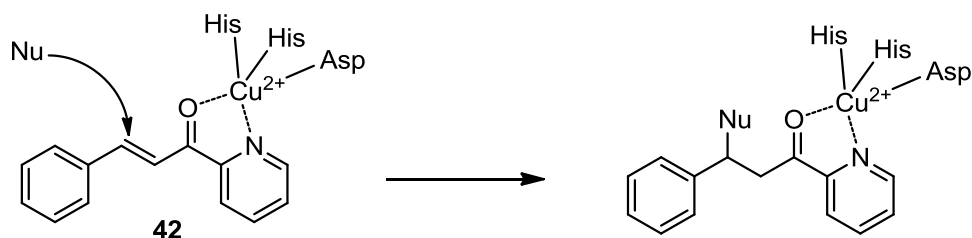


### **3.2.3. Untersuchungen zur tHisF katalysierten Michael-Addition basierend auf dem Azachalcon-System**

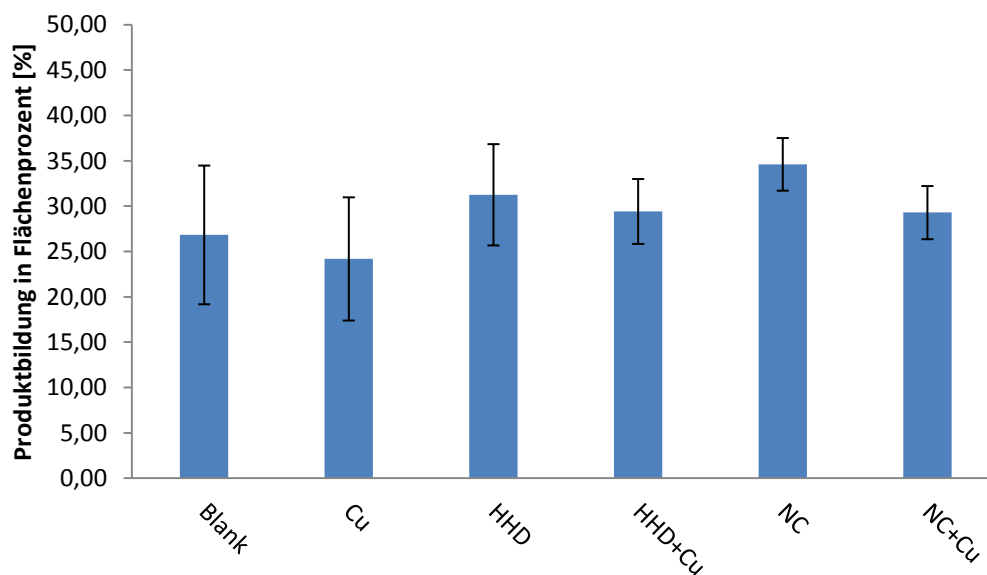
Nach der Verifikation der Diels-Alder-Aktivität der artifiziellen tHisF Varianten sollte das bereits für die Diels-Alder Reaktion verwendete tHisF Reaktionssystem nun für die Katalyse weiterer Reaktionen getestet werden. Dabei wurde als erste Reaktion die Michael-Addition getestet, bei der das in der Diels-Alder Reaktion verwendete Azachalcon **42** als Michael-Akzeptor verwendet werden sollte (Schema 23). Dabei wurden zu Beginn verschiedene Reaktionsparameter wie Temperatur (40, 60, 70, 80 °C), die Reaktionsdauer (1, 4, 20 h), pH Wert (pH 6, 7, 8) und Kupferkonzentration (0,1 mM und 1 mM) getestet (Daten hier nicht angegeben). Diese ergaben, dass als Startpunkt für die Untersuchungen zur Michael-Addition die Parameter 40 °C, 1 h, pH 7 mit 0,1 mM Kupfersulfat geeignet sind, da hier die initiale Produktbildung (Hintergrundreaktion) schon ausreichend vorhanden ist, jedoch noch Potential zur Steigerung gegeben ist. Die Ansätze der Michael-Addition erfolgten nach der in Kapitel 2.4.9. beschriebenen Vorschrift und die anschließende Analyse der Umsetzungen erfolgte mittels LC-MS (Kapitel 2.2.2.4.). Im Folgenden wurden verschiedene Nucleophile getestet (Abbildung 17), wobei nur Mercaptoethanol **73** signifikante Umsätze zeigte. Mit diesem System wurden mit den tHisF Varianten HHD und NC Biotransformationen durchgeführt, um zu untersuchen inwiefern sich das verwendete tHisF-Cu(II) Katalysatorsystem von der reinen Metallkatalyse unterscheidet. Dabei zeigte sich, dass analog der Katalyse der Diels-Alder Reaktion durch tHisF mit Kupfer, die Umsätze der tHisF katalysierten Reaktionen im Vergleich zur reinen Kupferkatalyse nicht signifikant gesteigert werden konnten (Abbildung 18). Allerdings zeigte sich, dass die Reaktion im Gegensatz zur Diels-Alder Reaktion auch ohne Metallzugabe einen signifikanten Umsatz in der Größenordnung der Metall-katalysierten Reaktion aufwies und durch Kupferzugabe sogar leicht inhibiert wird. So sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit weiterhin untersucht werden, inwiefern die Michael-Addition wirklich Metall-katalysiert ist im Sinne einer Koordination des Azachalcons **42** an die Kupferbindestelle und inwiefern diese Reaktion im Zusammenhang mit dem Enzym steht, auch in Bezug auf den stereochemischen Verlauf der Reaktion im Sinne einer Enantioselektivität des Nucleophilen Angriffs des Mercaptoethanols **73** an das Azachalcon **42**. Dafür wurde zu Beginn eine chirale Analyse der Reaktionen mittels chiraler HPLC-Analyse durchgeführt, wobei sich zeigte, dass das Reaktionsprodukt in keiner der getesteten Reaktionen einen ausgeprägten Enantiomerenüberschuss aufwies, sondern racemisch vorlag.



**Abbildung 17:** Getestete Nucleophile der initialen Untersuchungen zur tHisF katalysierten Michael-Addition an das Azachalcon **42**.

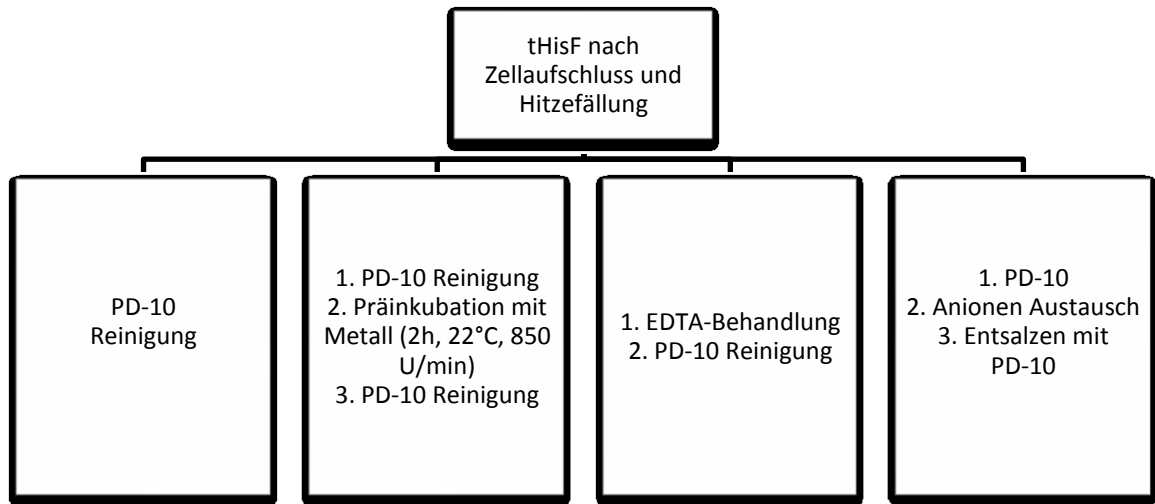


**Schema 23:** Geplanter Reaktionsverlauf der Michael-Addition der in Abbildung 17 gezeigten Nucleophile an das Azachalcon **42**.



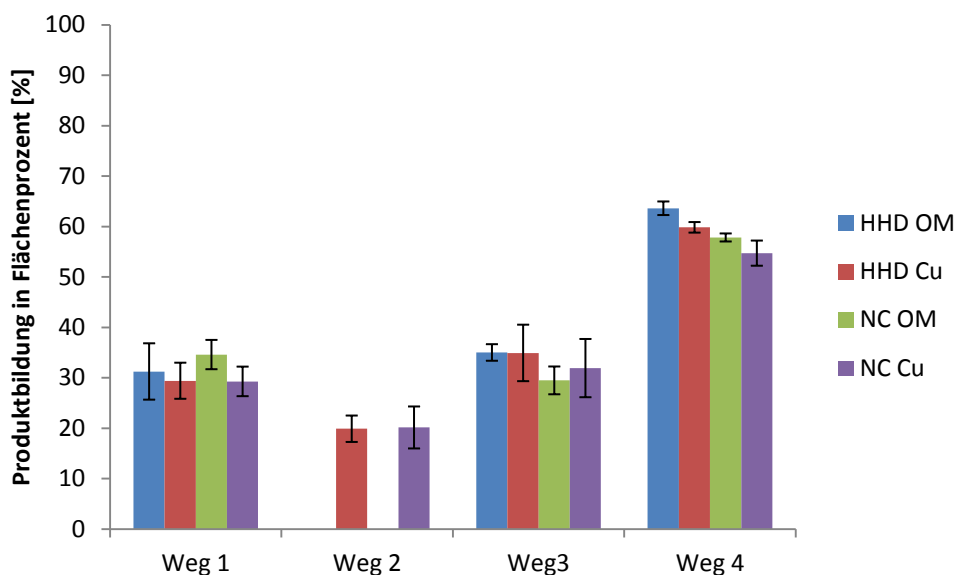
**Abbildung 18:** Umsätze der tHisF Varianten HHD und NC aus der in der Diplomarbeit von Jennifer Bolsinger Screening, jeweils mit Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD+Cu; NC+Cu) und ohne Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD; NC). Zusätzliche Kontrollen: Blank (nur Puffer), Cu (nur Puffer mit Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte nun geklärt werden ob und inwieweit das Kupfer wirklich an der entsprechenden Kupferbindestelle koordiniert bzw. welchen Einfluss eventuell vorhandene Verunreinigungen aus dem Zellysat auf die Reaktion haben können. Dafür wurden die verwendeten tHisF-Varianten HHD und NC auf verschiedenen Wegen aufgereinigt (Abbildung 19) und mit diesen aufgereinigten Enzympräparationen Biotransformationen analog der oben beschriebenen Michael-Addition mit Mercaptoethanol **73** durchgeführt. Im ersten Weg erfolgte die Grob-Aufreinigung analog der Aufreinigung der initialen Biotransformationen durch Aufschluss der Zellen, Hitzeschock und anschließendes Entsalzen mittels PD-10 Säulen. Für die zweiten Reaktionsansätze wurden die beiden Varianten HHD und NC analog der vorherigen Ansätze aufgeschlossen, Hitzeschock behandelt und entsalzt, jedoch erfolgte dann die Inkubation mit dem für die Reaktionen verwendeten Metall ( $\text{Cu(II)SO}_4$ ) und anschließend wurde das Enzym erneut entsalzt, um zu testen ob das Metall immer noch gebunden ist. Im dritten Weg wurden Enzympräparationen nach dem Zellaufschluss und Hitzefällung mit EDTA behandelt, wobei die Endkonzentration des EDTA 100 mM betrug. Dabei sollte getestet werden ob eventuell gebundene Metallionen, welche nicht durch entsalzen mittels PD-10 Säulen entfernt werden können, an den verwendeten tHisF Präparationen einen Einfluss auf die Reaktion haben. Im vierten Weg sollte untersucht werden ob eventuell vorhandene Verunreinigungen wie z.B. DNA oder Cofaktoren aus dem Zellysat von *E. coli*, welche nicht durch Hitzefällung oder einfaches, mittels PD-10 Säulen Anwendung, Entsalzen entfernt werden konnten, einen Einfluss auf die Reaktion haben. Die Analyse der Enzympräparationen per SDS-PAGE zeigte, dass auch nach der Hitzefällung bei 72 °C noch Proteinverunreinigungen in den Enzympräparationen vorhanden waren, welche jedoch durch Aufreinigung der Enzyme mittels Anionenaustauscherchromatographie deutlich reduziert werden konnten (Anhang Kapitel 6.2.2.).



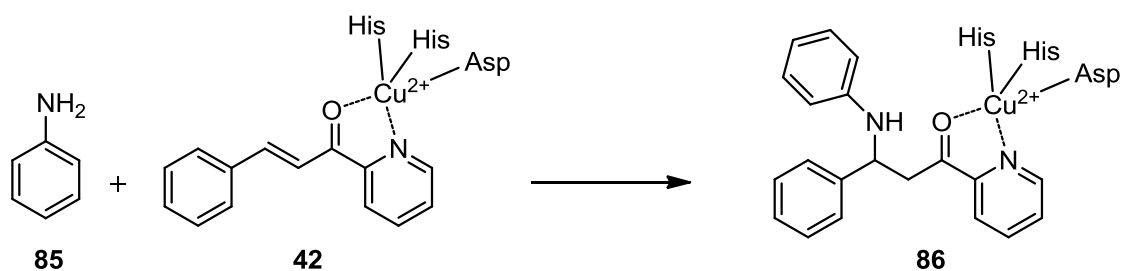
**Abbildung 19:** Verschiedene Ansätze zur Klärung der Katalyse der Michael-Addition

Die Analyse der Biotransformationen ergab, dass die Umsätze der Reaktion bezüglich der initial getesteten Reaktionen des ersten Wegs, mit denen der Umsetzungen aus der Diplomarbeit von Jennifer Bolsinger innerhalb der Fehlergrenzen identisch sind. Die Behandlung des Enzyms mit EDTA vor der Durchführung der Reaktion zeigte, ähnlich wie Inkubation des Enzyms mit Metall und anschließendem Entsalzen, keinen ausgeprägten Effekt auf die Umsetzungen, wobei die Umsätze der Reaktion mit doppelt entsalztem Enzym, unter Berücksichtigung der Fehlertoleranz, geringfügig unter denen der beiden anderen Reaktionen lagen (Abbildung 20). Die Umsetzungen mit mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigtem Enzym hingegen zeigten Umsätze, welche deutlich über denen der anderen Reaktionen lagen (vergleiche > 50 % Produkt bei den Umsetzungen mit aufgereinigter tHisF gegenüber < 40 % Produkt bei den grob aufgereinigten Enzympräparationen).

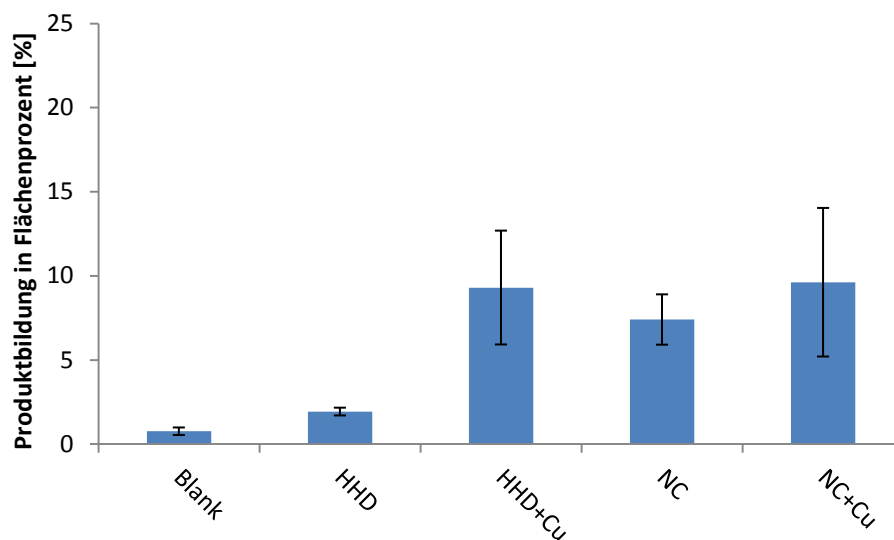


**Abbildung 20:** Vergleich der Produktbildung der vier verschiedenen Ansätze für die Michael-Addition von Mercaptoethanol **73** an das Azachalcon **42** nach 1 h (angegeben in Flächenprozent). HHD: tHisF HHD Variante; NC: tHisF NC Variante; OM: Ohne Zugabe von Metall; Cu: Mit Zugabe von Cu(II)SO<sub>4</sub>.

Weiterhin wurde das Spektrum der Nukleophile im Rahmen dieser Arbeit noch um das Stickstoffnukleophil Anilin **85** erweitert (Schema 24). Dabei konnte gezeigt werden, dass Anilin **85** als zusätzliches Nukleophil für die Reaktion genutzt werden kann, wobei die Umsätze deutlich hinter denen der Mercaptoethanol **73** Reaktion zurücklagen (Abbildung 21). Deshalb wurde die Reaktionszeit der Umsetzung hier auch von 1 h auf 24 h erhöht, sodass ein signifikanter Umsatz erreicht werden konnte. Analog der Umsetzung mit Mercaptoethanol **73** wurde auch diese Reaktion auf ihre Stereoselektivität untersucht. Die Umsetzungen erfolgten nach dem für die Michael-Addition verwendeten Reaktionsansatz jedoch mit mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigter tHisF (Kapitel 2.4.3.2.). Die Bestimmung der Umsätze erfolgte per LC-MS (Kapitel 2.2.2.4.), während die Enantiomerenüberschüsse per chiraler HPLC-Analyse erfolgten (Kapitel 2.2.2.6.). Es zeigte sich, dass abgesehen von den absolut gesehen geringeren Umsätzen und Produktbildungen, analog der Umsetzung mit Mercaptoethanol **73**, die Reaktion nicht stereoselektiv verlief. Entsprechende Beispielchromatogramme zu den Umsetzungen finden sich im Anhang (Kapitel 6.3).



**Schema 24:** Michael-Addition von Anilin **85** an das Azachalcon **42**.

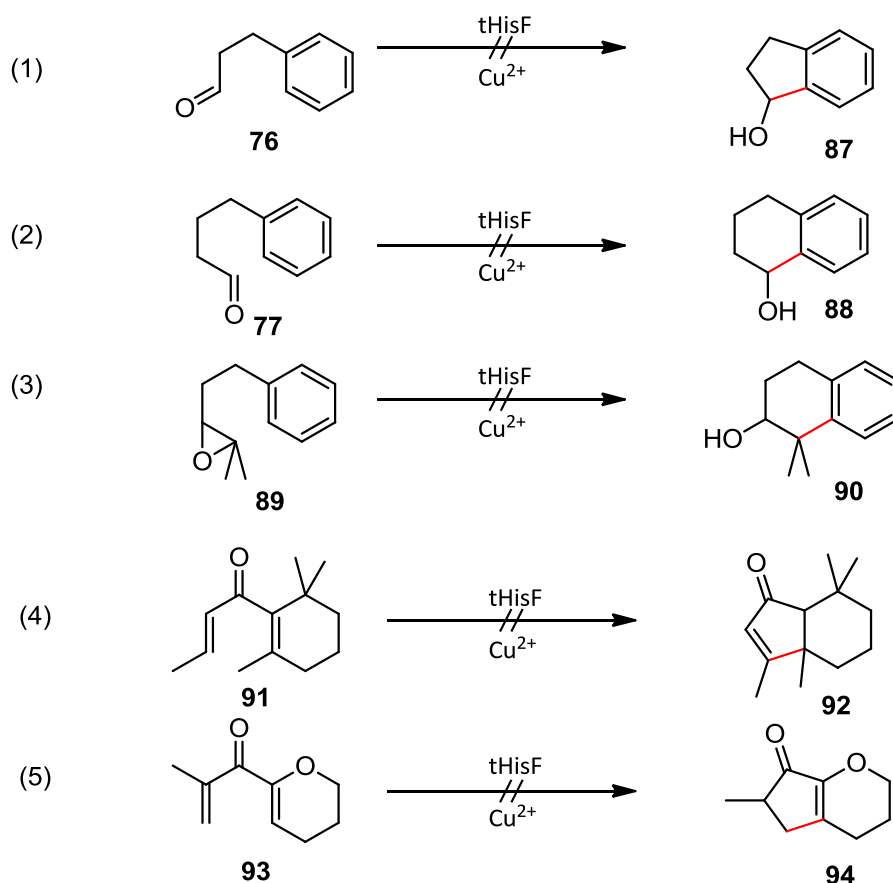


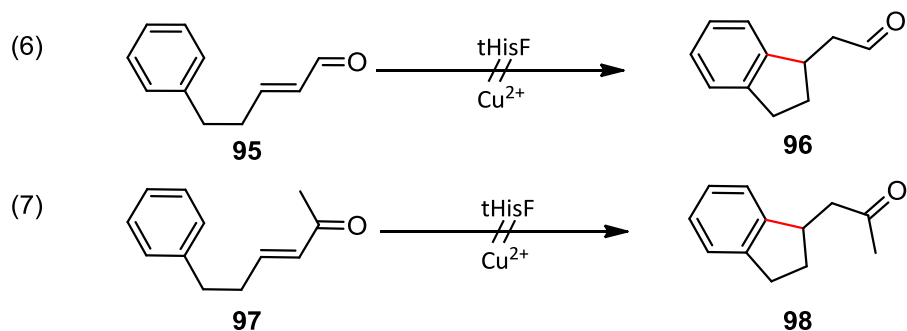
**Abbildung 21:** Produktbildung der Michael-Addition von Anilin **85** und Azachalcon **42** der aufgereinigten tHisF Varianten HHD und NC nach 24 h, jeweils mit Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD+Cu; NC+Cu) und ohne Cu(II)SO<sub>4</sub>-Zugabe (HHD; NC). Zusätzliche Kontrollen: Blank (nur Puffer).

### 3.2.4. Untersuchungen zur Katalyse von Friedel-Crafts-Reaktionen und Nazarov-Zyklisierungen mittels Cu(II) enthaltender tHisF Varianten

Im nächsten Schritt der Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob die Katalyse von weiteren Lewis-Säure-katalysierten Reaktionen wie der Friedel-Crafts-Reaktion oder der Nazarov-Zyklisierung mit dem tHisF System möglich ist. Der Vorteil dieser Reaktionen lag unter anderem daran, dass sie einerseits intramolekular ablaufen, was von Vorteil in Bezug auf den Reaktionsverlauf ist, da nicht erst zwei Moleküle einen produktiven Komplex bilden müssen. Andererseits kann hier auch nicht, wie in der Michael-Addition, das Nukleophil in seiner Nukleophilie durch Bindung an die Lewis-Säure inhibiert werden. Die Reaktionen sollten anhand der in Schema 25 gezeigten Modellsubstrate untersucht werden, wobei die Substrate durch vorhergehende Untersuchungen bezüglich der Katalyse der

entsprechenden Reaktionen mittels Brønsted-Säure analogen Enzymen, bereits am Institut verfügbar waren. Diese intramolekularen Reaktionen (Schema 25 Reaktionsgleichung (1)-(7)) wurden nun auf Umsetzungen getestet. Dabei wurden in ersten Untersuchungen verschiedene Temperaturen getestet (30 °C, 40 °C und 50 °C), wobei bei keiner der getesteten Temperaturen unter Zugabe von Metall ein Umsatz der Substrate detektierbar war. Dies kann unter anderem daran liegen, dass die Lewis-Acidität der getesteten Metalle in wässrigem Medium zu gering war. Eine andere Möglichkeit dafür, dass kein Umsatz detektierbar war, könnte sein, dass die getesteten Substrate in Lösung keine produktive Konformation einnehmen, sondern, anstelle sich produktiv im Sinne eines Übergangszustandes zu falten, eventuell aufgrund der van-der-Waals Abstoßung zu linearisieren. Deshalb wurde zusätzlich noch die Umsetzungen mit Enzymzugabe getestet, um zu überprüfen, ob das Problem der unproduktiven Faltung dadurch gelöst werden kann, dass die Moleküle durch Bindung im aktiven Zentrum der tHisF in eine produktive Konformation gebracht werden können.





**Schema 25:** Reaktionen der getesteten Substrate der Friedel-Crafts-Reaktion (Reaktionsgleichung (1), (2) und (3)), Nazarov-Zyklisierung (Reaktionsgleichung (4) und (5)) und der intramolekularen Friedel-Crafts-Reaktionen (Reaktionsgleichung (6) und (7)).

Zusätzlich zu den Umsetzungen mit  $\text{Cu(II)SO}_4$  wurde weiterhin auch getestet, ob der Wechsel des verwendeten Kupfersalzes einen Einfluss auf die Reaktion hat, weshalb als weiteres Kupfersalz für die Umsetzungen  $\text{Cu(II)(OTf)}_2$  getestet wurde. Hierbei wurde  $\text{Cu(II)(OTf)}_2$  zusätzlich zum vorher verwendeten  $\text{Cu(II)SO}_4$  getestet, um die Verfügbarkeit an freiem  $\text{Cu(II)}$  zu erhöhen da mit dem Triflat als Gegenion die Ionenpaar-Bildung minimiert werden sollte und somit die Verfügbarkeit an freier Lewis-Säure erhöht sein sollte. Die Reaktionen mit Zugabe von Enzym zeigten, wie die Umsetzungen nur mit  $\text{Cu(II)SO}_4$  oder  $\text{Cu(II)(OTf)}_2$ , keinen signifikanten Umsatz zu den entsprechenden Produkten.

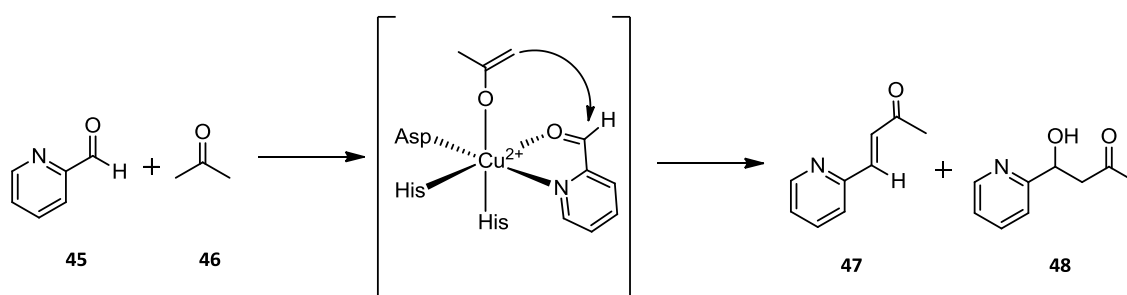
Es konnte zwar bei den intramolekularen Friedel-Crafts- bzw. Michael-Reaktionen die Bildung eines Produktpeaks detektiert werden, bei dem es sich jedoch nur um das entsprechende Wasser-Additionsprodukt des jeweiligen Substrats handelte. Dieses konnte anhand von Referenzmessungen aus vorhergehenden Arbeiten zur Katalyse der Friedel-Crafts Reaktionen mittels enzymatischer Brønsted-Säure-Katalysatoren von Stephan Hammer identifiziert werden.

Bei den Friedel-Crafts-Reaktionen (Reaktionsgleichung (1) bis (3)) konnten ebenfalls die Bildung von Produkten detektiert werden, bei denen es sich jedoch jeweils um das reduzierte Aldehyd bei den Substraten 3-Phenylpropionaldehyd **76** und 4-Phenylbutyraldehyd **77** handelte, bzw. das entsprechende Wasser-Additionsprodukt des Epoxids aus Reaktionsgleichung (3), das Diol handelte.



### 3.2.5. Untersuchungen zur tHisF katalysierten Aldolreaktion

Als vierter Reaktionstyp, welcher im Rahmen der Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität untersucht werden sollte, war die Aldolreaktion zwischen Aceton **46** und verschiedenen Aldehyden (Akzeptoren) von Interesse. Dabei war die Idee, dass das Lewis-Säure Zentrum einerseits das Aldehyd für die Reaktion aktivieren sollte und andererseits das Aceton **46**, welches in diesem Fall als Nukleophil dienen sollte, und das jeweilige Aldehyd in räumliche Nähe zueinander bringen sollte. Eine schematische Darstellung der geplanten Reaktion findet sich in Schema 26 mit den Modells substraten Pyridincarbaldehyd **45** und Aceton **46**.



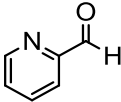
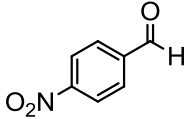
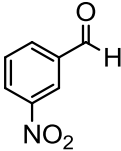
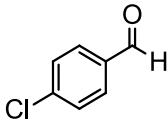
**Schema 26:** Geplanter Verlauf der Reaktion mit der Modellreaktion des Pyridincarbaldehyds **45** mit Aceton **46** am reaktiven Metallzentrum.

Um die ungünstige Gleichgewichtskonstante des Aceton **46** im Verhältnis mit seiner Enol-Form ( $pK_E = 8,3$ ) zu kompensieren, wurde die Acetonkonzentration in den verwendeten Ansätzen auf die maximal für tHisF verträgliche Konzentration erhöht. Dabei wurde in vorläufigen Experimenten ermittelt bis zu welcher Konzentration an Aceton **46** die tHisF in Lösung bleibt und nicht präzipitiert. Es zeigte sich, dass Aceton **46** in Konzentrationen bis zu 50 % toleriert werden kann, ohne dass es zu sichtbarer Enzymfällung kommt. Diese Acetonkonzentration wurde anschließend in den Ansätzen für die Aldolreaktion verwendet.

Die Ansätze für die Aldolreaktion (Kapitel 2.4.10.) erfolgten zur initialen Untersuchung der Reaktion mit grob aufgereinigter tHisF (Kapitel 2.4.3.3.) und wurden im Reaktionsvolumen von 0,5 ml oder 1,0 ml durchgeführt, wobei das Verhältnis der Reaktanden stets konstant gehalten wurde. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels GC-MS Messungen (Kapitel 2.2.1.1.) wobei die Quantifizierung immer relativ zur Gesamtfläche des GC-MS Chromatogramms erfolgte; um die jeweiligen Ansätze bezüglich ihrer Umsätze und Selektivitäten bezüglich der gebildeten Produkte miteinander zu vergleichen. Im ersten Schritt der Untersuchungen zur Aldolreaktion wurde, wie auch für die vorhergehenden

Reaktionen untersucht, inwieweit Cu(II) in der Lage ist diese Reaktion ohne Zugabe von Enzym, im Sinne einer Hintergrundreaktion zu katalysieren. Dabei wurden zwei verschiedene Kupfersalze (Cu(II)SO<sub>4</sub> und Cu(II)(OTf)<sub>2</sub>) getestet, wobei diesbezüglich jedoch kein Unterschied festgestellt werden konnte. Parallel dazu wurden erste Umsetzungen mit Enzym durchgeführt. Es zeigte sich, dass während Cu(II)SO<sub>4</sub> oder Cu(II)(OTf)<sub>2</sub> ohne Zugabe von Protein keine detektierbare Aktivität bezüglich der Aldolreaktion aufwies, die Umsetzungen mit tHisF und Kupferzugabe deutliche Umsätze von 5,6 - 39,6 % in Abhängigkeit des verwendeten Aldehyds zeigten. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle der getesteten Aldehyde (Tabelle 28) mit Aceton **46** zur Bildung von Produkten führten, jedoch die Umsätze bei den Benzaldehyd-Derivaten (**99-102**; Einträge 2-5 in Tabelle 28) signifikant geringer waren als die des Pyridincarboxyaldehyds **45**, weshalb für die weiteren Untersuchungen der Fokus auf der Umsetzung des Pyridincarboxyaldehyds als Modells substrat für die Aldolreaktion gelegt wurde.

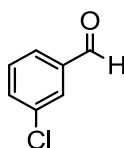
**Tabelle 28:** Umsetzungen der verschiedenen Substrate für die Aldolreaktion mit tHisF HDD und Cu(II)SO<sub>4</sub> Zugabe

#	Substrate	Umsatz [%]
		HDD
1	Pyridincarbalddehyd <b>45</b> 	39,61 ± 0,48
2	<p><i>p</i>-Nitrobenzaldehyd <b>99</b></p> 	13,96 ± 0,15
3	<p><i>m</i>-Nitrobenzaldehyd <b>100</b></p> 	7,45 ± 0,61
4	<p><i>p</i>-Chlorbenzaldehyd <b>101</b></p> 	5,59 ± 0,13

---

*m*-Chlorbenzaldehyd **102**

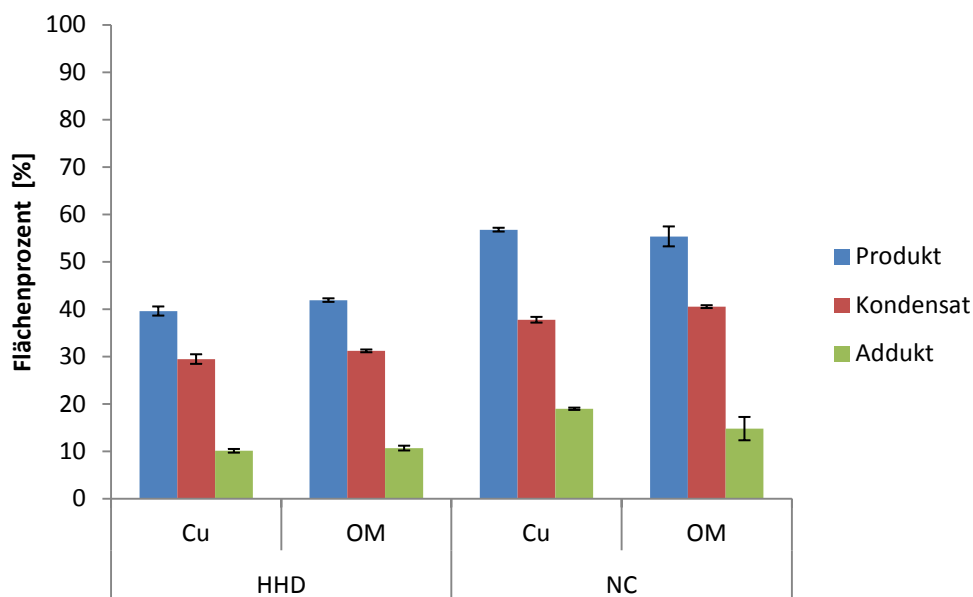
5



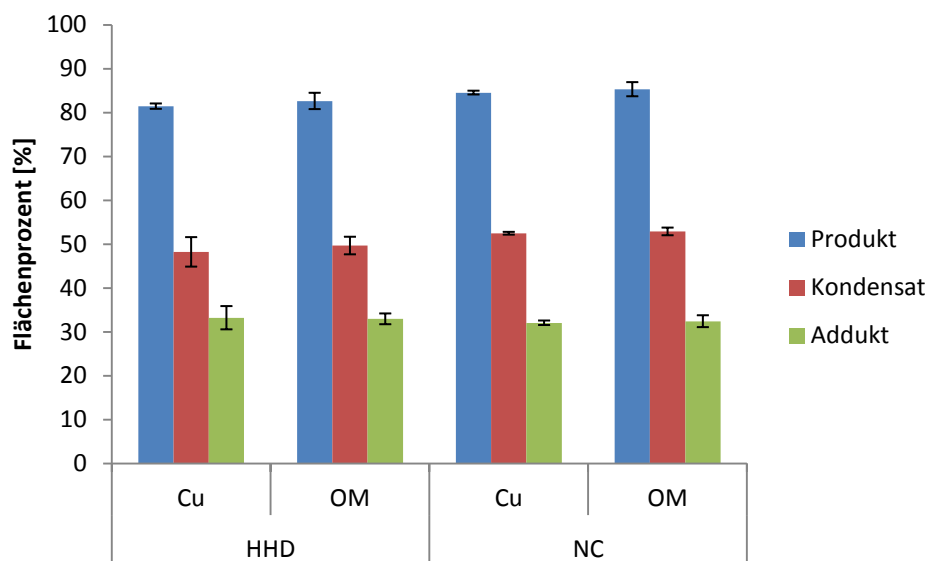
7,28 ± 0,09

---

Zu klären war nun, ob die Umsetzungen mit Cu(II) ohne Enzymzugabe unterhalb des Detektionslimits lagen und es bei der Reaktion mit Enzym und Cu(II) zu einer Beschleunigung der Reaktion und damit einer Erhöhung des Umsatzes im Laufe der Reaktionszeit kam, oder ob das ursprünglich nur als chiraler Ligand gedachte Enzym an sich imstande war die Reaktion zu katalysieren. Diesbezüglich wurden im Folgenden Umsetzungen mit Enzym ohne Zugabe von Cu(II) durchgeführt, die in Bezug auf die Umsetzungen von Enzym mit Cu(II) von  $39,61 \pm 0,9$  % auf  $41,92 \pm 0,38$  % im Falle der HDD und von  $56,78 \pm 0,39$  % auf  $55,36 \pm 2,10$  % im Falle der NC Variante, nur leicht variierte Umsätze zeigten (Abbildung 22). Im nächsten Schritt sollte nun ausgeschlossen werden, dass Verunreinigungen aus dem Zellysat wie z.B. DNA oder Cofaktoren, welche in der grob aufgereinigten tHisF Präparation noch vorhanden sein könnten, für die Katalyse der Reaktion verantwortlich sind. Dafür wurden die Umsetzungen mit aufgereinigter tHisF wiederholt, wobei die Umsätze der mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten tHisF signifikant höher waren als die der grob aufgereinigten tHisF (Abbildung 23), was wiederum vermuten ließ, dass in der grob aufgereinigten Enzympräparation Verunreinigungen enthalten sind, welche inhibitiv auf die Reaktion wirken.



**Abbildung 22:** Umsätze der Aldolreaktion nach 48 h mit grob aufgereinigter tHisF HHD und NC Variante jeweils mit Kupferzusatz (Cu) und ohne Kupferzusatz (OM). Angegeben sind jeweils der Gesamtanteil Produkt und davon die Anteile des entsprechenden Aldol Addukts und Kondensats.



**Abbildung 23:** Umsätze der Aldolreaktion nach 48 h mit aufgereinigter tHisF HHD und NC Variante jeweils mit (Cu) und ohne Kupferzusatz (OM). Angegeben sind jeweils der Gesamtanteil Produkt und davon die Anteile des entsprechenden Aldol Addukts und Kondensats.

Die Ergebnisse der ersten Untersuchungen zur Aldolreaktion ließen weiterhin darauf schließen, dass die Reaktion nicht wie Anfangs angedacht Metall-katalysiert ist sondern vom Enzym als solches katalysiert wird. Zu untersuchen war nun noch welcher Teil des Enzyms für die Katalyse zuständig war.

Die Analyse der Enzymstruktur der tHisF respektive deren artifizierter HHD Variante, basierend auf den publizierten Daten zu Struktur und natürlichem Mechanismus des tHisF Wildtyps, ergibt vier mögliche reaktive Zentren in der tHisF welche die Umsetzungen katalysieren können. Diese sind:

1. Das Metallzentrum der HHD Variante
2. Die Oberflächenlysine der tHisF
3. Die katalytische Säure-Base der natürlichen tHisF Reaktion
4. Die Phosphatbindestellen der tHisF (analog zum Oxy-Anion-Hole bei Lipasen)

Für das Metallzentrum konnte, anhand der im ersten Teil der Untersuchungen zur Aldolreaktion aufgeführten Experimente und entsprechend ermittelten Daten zu den Umsetzungen gezeigt werden, dass es nicht für die Katalyse der Aldolreaktion verantwortlich war. Um zu überprüfen, ob und inwieweit die Oberflächenlysine der tHisF durch die Bildung von Enaminen mit dem eingesetzten Aceton **46** an der Katalyse beteiligt sind, wurden Kontrollreaktionen mit freiem Lysin durchgeführt. Die Umsetzungen erfolgten analog denen der tHisF Reaktion in einem leicht modifizierten Ansatz. Als Katalysator wurde *N*- $\alpha$ -Acetyl-*L*-Lysin verwendet, bei dem die Aminofunktion in  $\alpha$ -Position zur Carbonsäure durch eine Acetylgruppe blockiert ist (analog der Einbindung des Lysins in der tHisF in die Primärstruktur des Proteins, welche ebenfalls das  $\alpha$ -Amin mittels einer Amidbindung blockiert). Dabei wurden zwei verschiedene Konzentrationen an *N*- $\alpha$ -Acetyl-*L*-Lysin untersucht. Einerseits 0,1 mM (analog der eingesetzten Konzentration an tHisF) und andererseits 1,5 mM, da in der tHisF ebenfalls mehr Lysine vorhanden sind (15 Lysine in der gesamten Struktur), welche allerdings partiell in Salzbrücken eingebunden sind.

Dabei zeigte sich, dass die Umsätze mit ca. 10 % deutlich hinter denen der tHisF katalysierten Reaktion zurücklagen, was die Vermutung zuließ, dass die Reaktion auch nicht rein durch das  $\epsilon$ -Amin des Lysins katalysiert sein konnte. Es zeigte sich jedoch, dass analoge Umsetzungen mit freiem Lysin Umsätze von ca. 90 % erzielten was wiederum in der Größenordnung der Umsätze der aufgereinigten tHisF lag. Um zu klären ob also eines der alternativen reaktiven „Zentren“ an der Katalyse der Aldolreaktion durch die tHisF beteiligt sein konnte, wurden Mutanten der tHisF erstellt bei der einerseits die natürliche Säure und Base, welche an der natürlichen Reaktion der tHisF beteiligt sind (Einleitung Kapitel 1.5), durch Alanine ausgetauscht wurden. Andererseits wurden Mutanten der tHisF erstellt, bei denen die Phosphatbindestellen in ihrer Zugänglichkeit und damit Beteiligung

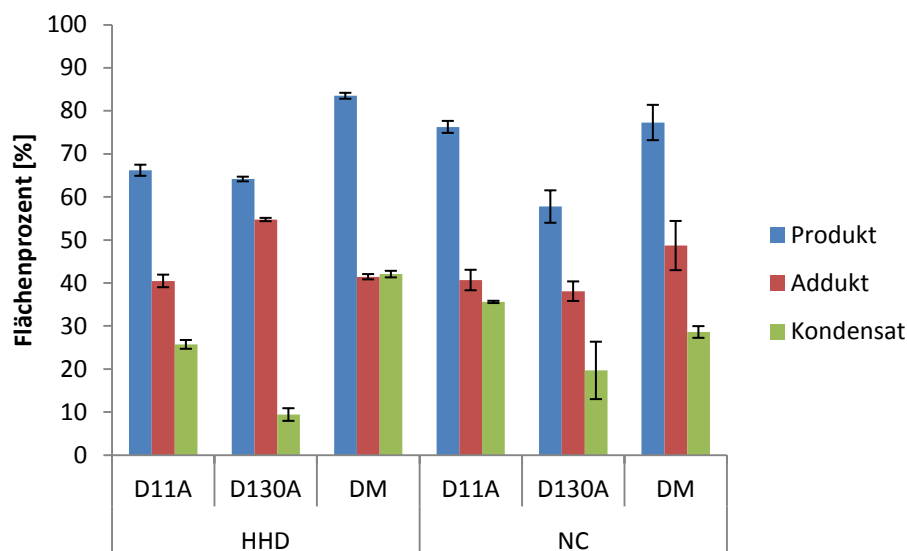
an der Katalyse eingeschränkt werden sollten indem sie durch sperrige, unpolare Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan blockiert werden sollten.

### 3.2.5.1. Erstellen einer Mutantenbibliothek zur Klärung des Mechanismus der Aldolreaktion

Im nächsten Schritt der Untersuchungen zur Aufklärung des Katalysemechanismus der durch tHisF katalysierten Aldolreaktion wurden die beiden Aspartate (D11 und D130; Abbildung 24), welche an der natürlichen Säure-Base-katalysierten Zyklisierungsreaktion des tHisF Wildtyp beteiligt sind zuerst einzeln, als dann auch kombiniert jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Die entsprechenden Mutanten wurden auf Aktivität bezüglich der Aldolreaktion untersucht, wobei bei einer Beteiligung des Säure-Base Mechanismus an der Reaktion erwartet wurde, dass die Umsätze der entsprechenden Biotransformationen deutlich unter denen der normalen HHD bzw. NC Varianten liegen sollten. Alle Mutanten wurden nach dem QuikChange<sup>®</sup> Protokoll erstellt, und anschließend in *E. coli* exprimiert. Es zeigte sich, dass alle Mutanten in löslicher Form, analog den Varianten HHD und NC, exprimierbar waren. Die Umsetzungen erfolgten analog den Umsetzungen für die tHisF HHD und NC Variante. Es zeigte sich jedoch, dass die Umsätze nicht geringer sondern tendenziell auf einem ähnlichen Niveau wie bei den vorhergehenden Umsetzungen lagen, wobei die jeweilig ermittelten Umsätze in Abbildung 25 angegeben sind.



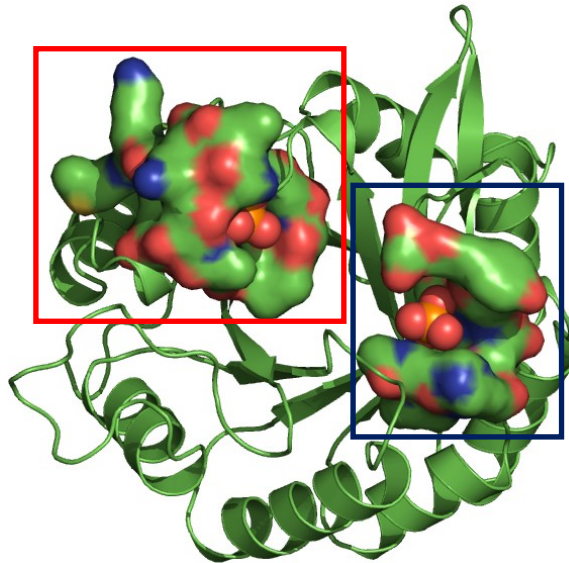
**Abbildung 24:** Schematische Darstellung der Kristallstruktur der HHD Variante der tHisF. Hervorgehoben in den roten Kästen sind die HHD Triade inklusive D11 und der ebenfalls für die natürliche Funktion (Einleitung Kapitel 1.5.2) des Enzyms essentielle Aminosäurerest D130. Zusätzlich sind alle im Enzym enthaltenen Lysine als Stäbchenmodell angezeigt (in Summe handelt es sich um 15 Lysine).



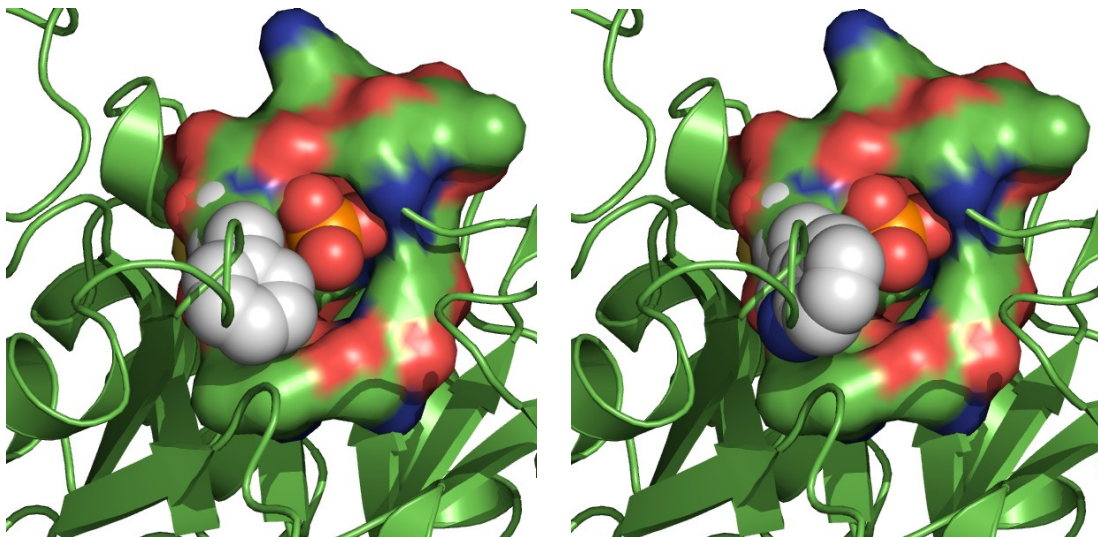
**Abbildung 25:** Umsätze der Aldolreaktion der Aspartat Knock-out Mutanten D11A und D130A und die jeweiligen Doppelmutanten D11A\_D130A (DM) der tHisF Varianten HHD und NC.

Im letzten Schritt der Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Phosphatbindestellen der tHisF an der Katalyse der Reaktion beteiligt sein können (Abbildung 26). In der Literatur gibt es Beispiele bei denen das sogenannte Oxy-Anion-Hole von Lipasen an der C=O-Aktivierung von nicht Hydrolyse-Reaktionen, durch Wasserstoffbrückenbindungen zur beteiligten Carbonylgruppe, mitwirkt.<sup>[45,123]</sup> Fraglich war nun ob dies in dem hier vorliegenden Fall in analoger Weise für die Phosphatbindestellen, welche in ihrer Art dem Oxy-Anion-Hole der Lipasen ähneln, möglich war und diese dadurch an der Katalyse beteiligt waren. Dafür wurden Mutanten erstellt, bei denen versucht wurde die entsprechende Phosphatbindestelle mit sterisch anspruchsvollen unpolaren Aminosäuren zu blockieren, da eine direkte Füllung der Bindestellen mit solchen Seitenketten aus strukturellen Gründen nicht möglich war.

Im Folgenden sind schematisch die Phosphatbindestellen und die verschiedenen HotSpots gezeigt, an welchen die Mutationen eingeführt wurden. Dabei handelte es sich um die Aminosäuren G202 und A224 für die Phosphatbindestelle 1 (Abbildung 26 roter Kasten) und die Aminosäure T104 für die Phosphatbindestelle 2 (Abbildung 26 dunkelblauer Kasten). Dabei wurden die Mutanten G202F (Mutante M 5), G202W (Mutante M 6), A224F (Mutante M1), A224W (Mutante M2), T104F (Mutante M3) und T104W (Mutante M4) erstellt und anschließend bezüglich der Aktivität der Aldolreaktion getestet.

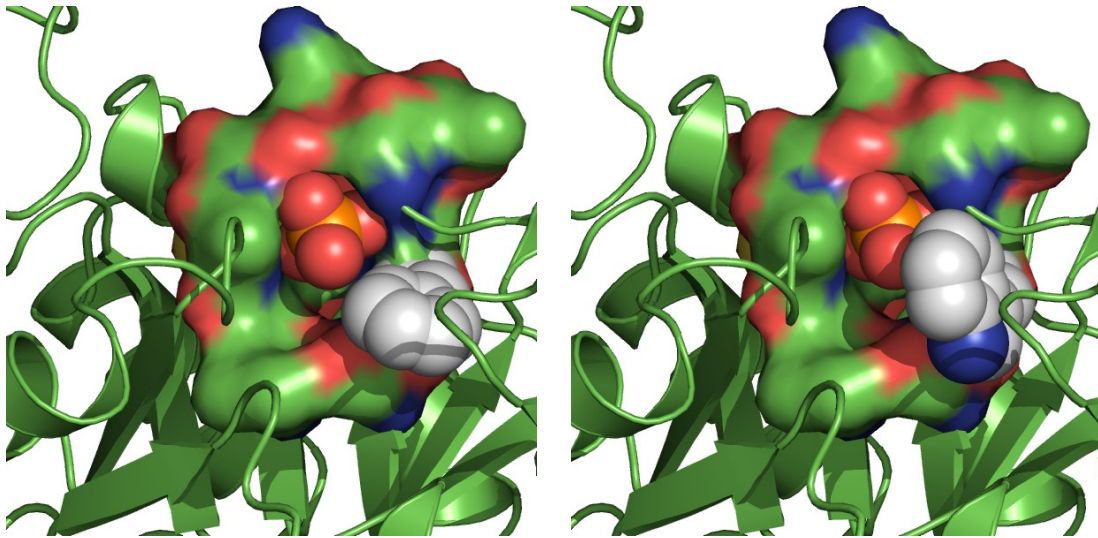


**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der tHisF mit gebundenen Phosphaten (dargestellt als orange Sphären) und den entsprechenden umgebenden Aminosäuren bzw. Bindestellen 1, in rot umrahmt und Bindestelle 2 in dunkelblau umrahmt. Beide Phosphatbindestellen sind als Proteinoberfläche dargestellt.

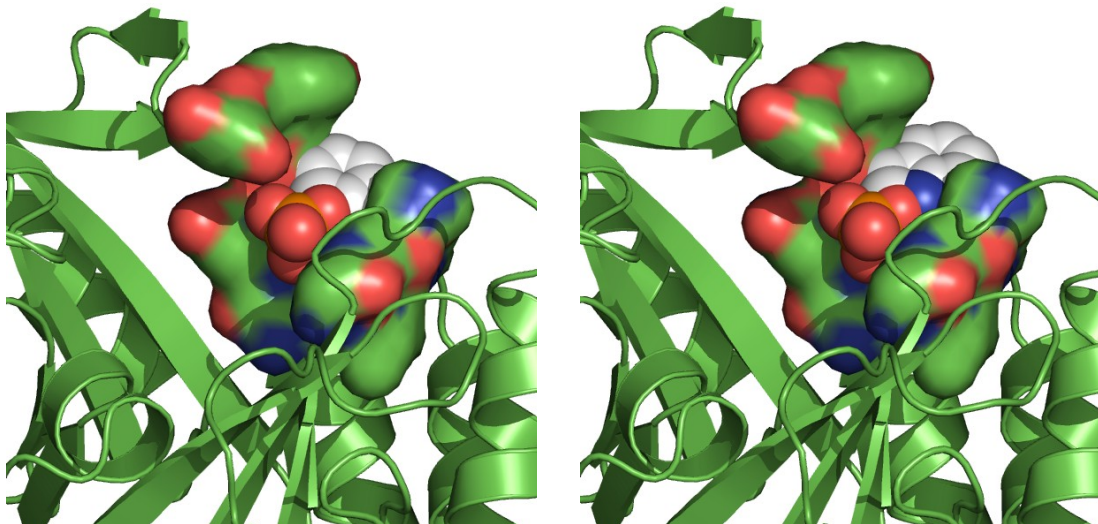


**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der tHisF mit Phosphatbindestelle 1 (Abbildung 26, roter Kasten) als Oberfläche und den Mutationen A224F (M1) und A224W (M2) jeweils in grau als Sphären dargestellt.





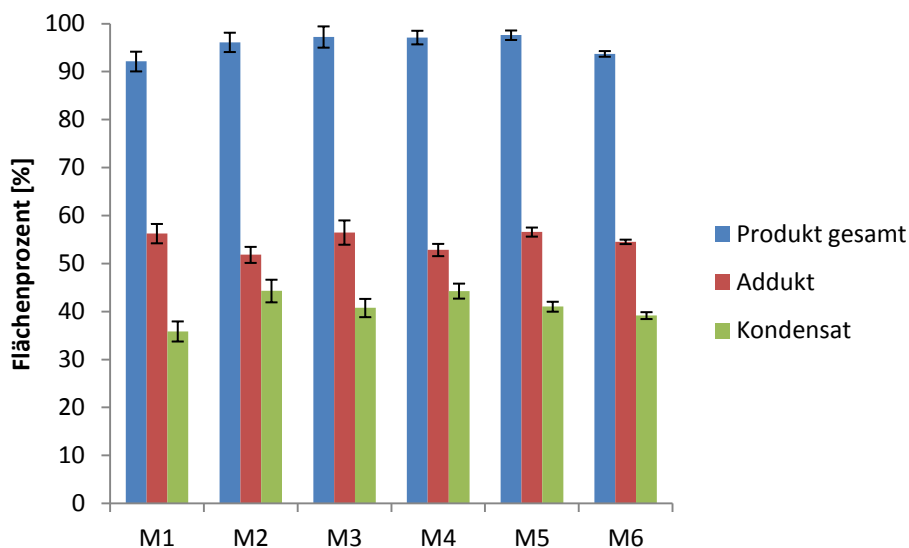
**Abbildung 28:** Schematische Darstellung der tHisF mit Phosphatbindestelle 1 (Abbildung 26, roter Kasten) als Oberfläche und den Mutationen G202F (M5) und G202W (M6) jeweils in grau als Sphären dargestellt.



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung der tHisF mit Phosphatbindestelle 2 (Abbildung 26, blauer Kasten) als Oberfläche und den Mutationen T104F (M3) und T104W (M4) jeweils in grau als Sphären dargestellt.

Alle Mutanten wurden nach dem QuikChange<sup>®</sup> Protokoll erstellt, und anschließend in *E. coli* exprimiert. Es zeigte sich, dass alle Mutanten in löslicher Form exprimierbar waren, wobei sich ein exemplarisches SDS-Gel der exprimierten und entsalzten Mutanten im Anhang finden (Kapitel 6.2). Die Umsetzungen erfolgten analog den Umsetzungen für die tHisF HHD und NC Variante. Zur Vereinfachung der Auswertung wurden die jeweiligen Mutanten nur für die HHD Variante erstellt und die erhaltenen Ergebnisse der Umsetzungen sowohl zwischen den einzelnen Mutanten, als auch mit den Ergebnissen für

die normale HHD Variante verglichen. Es zeigte sich, dass die Umsätze nicht rückläufig waren, sondern gegenüber den Umsätzen der HHD tendenziell gesteigert werden konnten (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Umsetzungen der Aldolreaktion von 2-Pyridincarbaldehyd 45 mit Aceton 46 der Phosphatbindestellen-Mutanten M1-6. Angegeben ist die Produktbildung jeweils des Gesamtprodukts und die Verteilung der Produktbildung zwischen dem Addukt und dem Kondensationsprodukt der Reaktion (Schema 26).

### 3.2.6. Untersuchungen zur Metallbindung der *tHisF* HHD und NC mittels Röntgenfluoreszenz

Nachdem die Untersuchungen zu den neuen Reaktionen ergeben haben, dass das verwendete Metallion weder essentiell für die Katalyse einiger der Reaktionen zu sein, noch spezifisch an der Metallbindestelle zu binden scheint, sollte untersucht werden inwiefern die Bindung des Metallions an die verschiedenen *tHisF* Varianten HHD und NC sich unterscheidet. Dafür wurden beide Enzyme aufgereinigt und in einem nachfolgenden Schritt, analog zur vorher beschriebenen Vorbereitung der Enzyme für die Reaktionen, mit einer substöchiometrischen Menge an  $\text{Cu(II)SO}_4$  inkubiert. Dafür wurden 3 ml einer mittels Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten Enzympräparation der Konzentration 0,52 mM mit 0,5 mM  $\text{Cu(II)SO}_4$  für 2 h bei 20 °C inkubiert. Im Gegensatz zur Vorbereitung der Enzyme für die Reaktionen wurden die Enzympräparationen in einem nächsten Schritt noch zusätzlich mittels PD-10 Säulen entsalzt und anschließend die

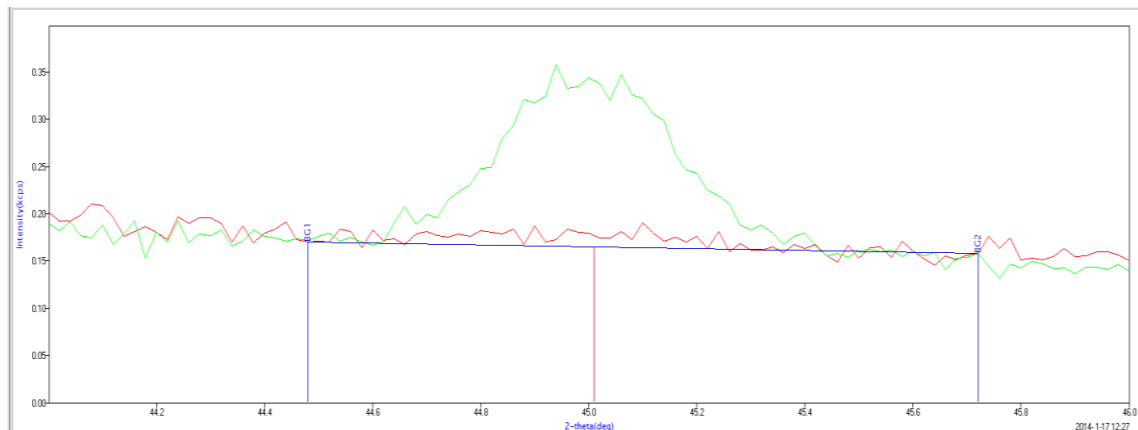
Kupferkonzentration mittels Röntgenfluoreszenz bestimmt. Für den Entsalzungsschritt wurde dafür, wie auch bei den vorherigen Aufreinigungen die Methode mit PD-10 Säulen verwendet, die auf Diffusion der Salze in eine Gelmatrix basiert, sodass die Metalle nicht durch kompetitive Komplexbildung aus dem Enzym gelöst werden (wie z.B. bei einer EDTA Behandlung der Enzyme). Die Messung der Proben sowie deren Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Firma Rigaku, einem Hersteller für Röntgenfluoreszenzgeräte (Rigaku Europe SE, Ettlingen, DE). Dabei wurden die Messungen direkt beim Hersteller in Kooperation mit Pol De Pope durchgeführt.

Bei einer spezifischen Bindung des Metalls wäre zu erwarten, dass nach dem Entsalzungsschritt ein signifikanter Unterschied in der Kupferkonzentration der tHisF HHD und NC messbar ist. Es wurde erwartet, dass während die HHD bei einer spezifischen Bindung des Cu(II) an die Metallbindestelle HisHisAsp noch einen Großteil des zugegebenen Cu(II) enthält, bei der NC Variante, welche diese Metallbindestelle nicht besitzt, der größte Teil des Cu(II) durch die Entsalzung verloren gehen sollte. Dies sollte auch eine grobe Abschätzung der Affinität des Enzyms für das verwendete Cu(II)-salz ermöglichen. Die Quantifizierung der Kupferkonzentration in den enthaltenen Enzympräparationen mittels Röntgenfluoreszenz (Abbildung 31), welche anhand von Kalibriergeraden mit Proben bekannter Cu(II)-Konzentrationen erfolgte ergab, entgegen den Anfangs getroffenen Annahmen, dass der Unterschied der Restkonzentration zwischen den beiden Präparationen der tHisF HHD und NC Variante nur ca. 35 % betrug. Während die Kupferkonzentration bei der HHD Probe 0,61 mM betrug, lag sie bei der NC Probe bei 0,41 mM. Die Messungenauigkeit zwischen den einzelnen Messungen betrug 0,6 %. Interessanterweise wurde in der Enzympräparation mehr Kupfer gefunden, als zugegeben wurde, was darauf schließen lässt, dass die Enzyme entweder schon Kupfer enthielten (aus dem Zellysat oder Medium), oder ein systematischer Messfehler vorliegt, welcher jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis hat in Bezug auf den Vergleich der unterschiedlichen Affinität der beiden tHisF Varianten.

Zu erwarten wäre gewesen, dass bei einer spezifischen Bindung des Metallions an die HisHisAsp Triade nach der Entsalzung bei der NC-Variante nur noch eine marginale Restkonzentration an Cu(II) gemessen werden kann.

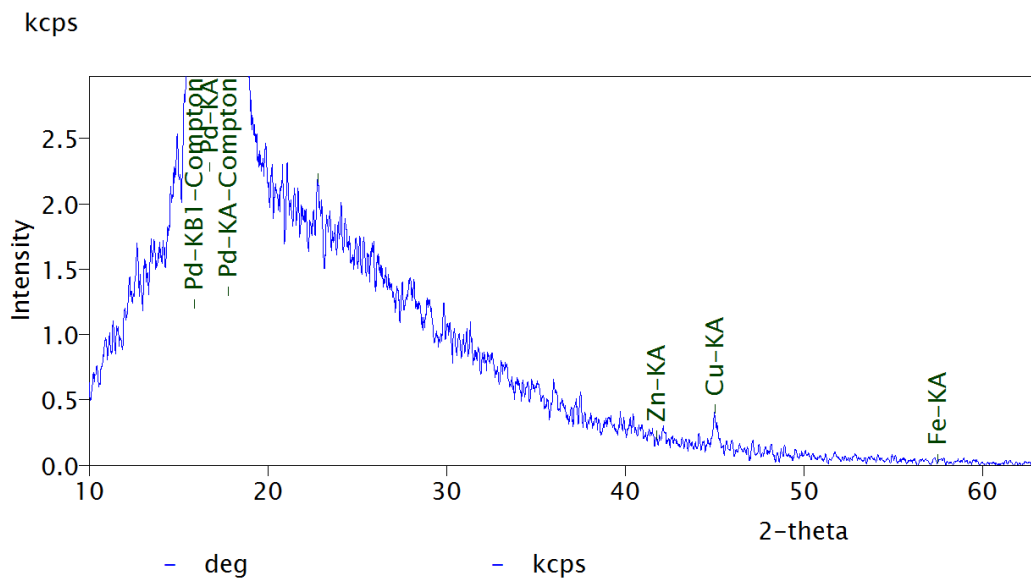
Neben der Quantifizierung des in der Enzympräparation enthaltenen Kupfers wurde in einer qualitativen Bestimmung noch ermittelt, ob neben Cu(II) noch weitere Metalle an die Enzyme gebunden waren. Dafür wurde ein Scan durchgeführt, bei dem Wellenlängen innerhalb eines bestimmten Bereichs (bezogen auf den 2-theta Winkel, welcher die dispersive Auftrennung der gemessenen Wellenlängen der Röntgenfluoreszenz angibt)

gemessen wurden, welche wiederum jeweils spezifisch unterschiedlichen Metallen zuzuordnen sind. Die Ergebnisse dieses Scans finden sich in Abbildung 32. Es zeigte sich, dass neben Kupfer keine anderen Metalle in nachweisbaren Mengen vorhanden sind, was aufgrund der Sensitivität der Methode bedeutet, dass die eventuell vorhandenen Kontaminationen mit anderen Metallen vernachlässigbar sind.



**Abbildung 31:** Einzelmessung zur Quantifizierung der Kupferkonzentration. Grüne Kurve: tHisF HHD mit  $\text{CuSO}_4$ , rote Kurve: Negativ Kontrolle (50 mM BisTris Puffer).

Heavy : Standard  
Crystal : LiF(200) : SC



**Abbildung 32:** Exemplarisches Spektrogramm zur Röntgenfluoreszenzanalyse der tHisF HHD Probe mit  $\text{CuSO}_4$ . Dabei wird die Strahlungsintensität gegen den 2-theta Winkel gemessen, welcher wiederum äquivalent zu den spezifischen Wellenlängen der Anregung der Metalle ist.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand zweier Metall-bindender Enzymsysteme und verschiedener Modellreaktionen untersucht werden, inwieweit man das katalytische Potential von Metall-bindenden Enzymen nutzen kann, um Reaktionen abseits ihres natürlichen Reaktionsspektrums, sogenannte promiskuitive Reaktionen, zu katalysieren. Diese promiskuitiven Reaktionen von Enzymen waren und sind bis heute Gegenstand intensiver Untersuchungen.<sup>[27,31,124,125]</sup> Dabei wurden im Rahmen dieser Arbeit Metall-bindende Enzyme auf zwei Arten von reaktiver Promiskuität untersucht, nämlich Substratpromiskuität und katalytischer Promiskuität, wobei die Abgrenzung zwischen diesen beiden Arten der Promiskuität keineswegs definiert, sondern meist ein fließender Übergang zwischen den beiden Feldern vorhanden ist. Bei der Substratpromiskuität erfolgt die Katalyse der Enzymreaktion mit einem alternativen Substrat, jedoch, bezüglich des Verlaufs der Reaktion (Übergangszustand etc.), weitgehend identisch mit der natürlichen Reaktion. Bei der katalytischen Promiskuität hingegen sind zunehmend andere funktionelle Gruppen, elektronische Verteilungen und Übergangszustände vorhanden, sodass sich der Verlauf der Reaktion chemisch von dem der natürlichen Reaktion unterscheidet.<sup>[28,125]</sup> Die Verteilung und Häufigkeit der beiden verschiedenen Arten der Promiskuität wurde von der Arbeitsgruppe von Dan Tawfik am Beispiel des *E. coli* Proteoms untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Substratpromiskuität deutlich häufiger auftritt als chemische Promiskuität, wobei das Auftreten chemischer Promiskuität wiederum umso häufiger ist, je ähnlicher der Bindungsmodus der entsprechenden Substrate zu demjenigen natürlicher Substrate ist.<sup>[126]</sup>

Es sollte systematisch die Möglichkeit zur Ausnutzung promiskuitiver Reaktionen Metall-bindender Enzyme anhand der Modellsysteme Taurin Dioxygenase aus *E. coli* und tHisF aus *T. maritima* untersucht werden. Im ersten Schritt der Untersuchungen sollte nun getestet werden inwiefern man das oxidative Potential der TauD nutzen kann, um nicht-natürliche Substrate im Sinne einer Substratpromiskuität zu hydroxylieren, während im nächsten Schritt getestet werden sollte inwieweit man das Metallzentrum als solches für die Katalyse chemischer Reaktionen nutzen kann, welche sich von der natürlichen Reaktion unterscheiden (katalytische Promiskuität). Es konnte gezeigt werden, dass man den natürlichen Reaktionsmechanismus der TauD nutzen kann, um die  $\alpha$ -Hydroxylierung von  $\omega$ -Aminocarbonsäuren zu katalysieren, während die Ausnutzung des Metallzentrums der TauD zur Katalyse alternativer chemischer Reaktionen kein Ergebnis lieferte. Für weitere Untersuchungen zur Ausnutzung enzymatischer Metallbindestellen zur Katalyse

alternativer Reaktionen wurden Varianten der thermostabilen tHisF mit artifiziellen Metallbindestellen gewählt, welche jedoch bezüglich der Art der Metallbindestelle – beide Enzyme enthielten eine HisHisAsp Triade – mit der TauD identisch waren. Dabei war einer der Gründe die tHisF zu wählen unter anderem der Fakt, dass die artifiziell eingeführte Metallbindestelle der tHisF sehr gut zugänglich ist. Dies birgt den Vorteil, dass nicht wie bei der TauD die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums und damit auch das Spektrum an möglichen zu testenden Substraten eingeschränkt ist. Weiterhin handelt es sich bei der tHisF um ein thermostabiles Enzym, was dem Enzym zusätzliche Stabilität gegenüber höheren Temperaturen und Lösungsmittelkonzentrationen verleiht, welche für die Untersuchungen zu Reaktionen wie der Aldolreaktion verwendet wurden.

Untersucht wurden mit der tHisF verschiedene Reaktionen, wobei von den untersuchten Reaktionstypen, nur die Michael-Addition und die Aldolreaktion signifikante Umsetzungen zeigten. Im Laufe weiterer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei diesen Reaktionen das Metall nicht an der Katalyse der Reaktion beteiligt ist, sondern die Reaktionen im Falle der Michael-Addition Größtenteils spontan abläuft, während im Falle der Aldolreaktion das Enzym als solches die Reaktion katalysiert. Weitergehende Untersuchungen bezüglich des Mechanismus der tHisF katalysierten Aldolreaktion legen nahe, dass die Oberflächen-Lysine der tHisF der katalytisch aktive Teil der tHisF bei dieser Reaktion sind.

## **4.1. Ausnutzung des katalytischen Potentials der TauD für die Hydroxylierung alternativer Substrate**

### **4.1.1. Klonierung, Expression und Charakterisierung der Wildtyp TauD**

Die Klonierung und Expression der Wildtyp TauD erfolgte wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben aus genomischer DNA von *E. coli* JM109. Die dabei erhaltene Sequenz war identisch zu der in der Literatur beschriebenen Sequenz der TauD (PDB Code 1OS7). Die Expression und Aufreinigung erfolgte dabei analog der in der Literatur beschriebenen Vorschrift für His<sub>6</sub>-Tag enthaltende Taurin Dioxygenasen.<sup>[90]</sup> Die Expression und Aufreinigung per Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie lieferte TauD in ausreichender Menge für die folgenden Experimente. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte nach dem von Eichhorn *et al.* entwickelten Assay.<sup>[84]</sup> Die erhaltene Enzympräparation war nach SDS-Analyse zu > 95 % rein und die Aktivität der TauD lag mit 1,4 U/mg Enzym innerhalb

der in der Literatur beschriebenen Größenordnung bezüglich der Aktivitäten für die TauD. Diese sind jedoch relativ breit gestreut und reichen von ca. 1,6 U/mg bis ca. 14 U/mg reinem Enzym.<sup>[84,90,95]</sup>

#### **4.1.2. $\alpha$ -Hydroxylierung von Carbonsäuren und $\omega$ -Aminocarbonsäuren durch Wildtyp TauD**

Nachdem die TauD in ausreichender Menge und in aktiver Form exprimiert wurde, wurde anschließend getestet inwiefern das Enzym genutzt werden kann um alternative Substrate zu hydroxylieren. Vorhergehende Studien konnten zeigen, dass die TauD ein, in Bezug auf die strukturelle Vielfalt, relativ breites Substratspektrum besitzt, wobei in den Untersuchungen ausschließlich Substrate berücksichtigt wurden, welche Sulfonsäuren als zentrales Strukturelement enthielten.<sup>[84]</sup> In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, dass man die Hydroxylierungsreaktion der TauD auch für alternative Substrate ohne Sulfonsäure-Motiv verwenden kann. Dabei wurde, wie bereits oben beschrieben, der Fokus auf Substrate basierend auf Carbonsäuren gelegt, da diese im Zuge der Hydroxylierung, im Gegensatz zu den Sulfonsäure-Substraten, nicht zersetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese alternativen Substrate umgesetzt werden konnten, wobei die Umsetzungen für den Wildtyp der TauD auf Carbonsäuren der Kettenlängen C3 bis C6 mit  $\omega$ -Aminosubstituenten beschränkt waren und die Umsätze mit steigender Kettenlänge des Substrats abnahmen. Weiterhin wiesen Substrate mit geradzahligem Kettenlängen, verglichen mit Substraten ungeradzahligem Kettenlänge, einen deutlich verringerten Umsatz auf. Dies könnte unter anderem auf eine schlechtere bzw. unspezifischere Bindung der Substrate im aktiven Zentrum des Enzyms zurückzuführen sein. Für diese These würde weiterhin sprechen, dass die Enantiomerenüberschüsse der entsprechenden Produkte deutlich weniger ausgeprägt sind als für die entsprechenden Produkte der Substrate mit ungeradzahligem Kettenlänge. Unklar bleibt jedoch, wie genau die Diskriminierung der Substrate stattfindet. So wäre bei rein sterischen Einflüssen zu erwarten, dass es einen mehr oder weniger linearen Verlauf der Produktbildung gibt, bei dem mit steigender Kettenlänge progressiv weniger Produkt gebildet wird. Fraglich ist, ob konformelle Unterschiede zwischen den Substraten bestehen, sodass Substrate mit einer Kettenlänge von C4, C6 usw. eventuell Konformationen im aktiven Zentrum einnehmen welche von Substraten der Kettenlängen C3 und C5 nicht eingenommen werden bzw. eingenommen werden können.

### 4.1.3. Klärung des Bindungsmodus der TauD mittels Mutanten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die TauD in der Lage ist die getesteten  $\omega$ -Aminocarbonsäuren umzusetzen, sollte nun untersucht werden, ob die Substrate auch denselben Bindungsmodus wie das natürliche Substrat Taurin nutzen. Dies wurde durch das parallel zu den ersten Untersuchungen durchgeführte Docking des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** nahegelegt. Für diese Untersuchungen wurden die beiden Aminosäuren H70 und R270 ausgewählt, da diese, wie verschiedene Arbeiten zur TauD bereits zeigten, an der Bindung der Sulfonsäure beteiligt sind. Die Seitenkette des Restes R270 dient hierbei als Gegenion zur Sulfonsäure, während die Seitenkette von H70 über eine Wasserstoffbrückenbindung an der Koordination des Substrats beteiligt ist.<sup>[89,90,92]</sup> Während es sich bei R270 um eine konservierte Aminosäure handelt, welche in verschiedenen  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen vorhanden ist, war die Aminosäure H70 nur in solchen Familienmitgliedern auffindbar, welche Sulfonsäuren (wie im Falle der hier beschriebenen TauD) oder Sulfate (im Falle der Alkylsulfatase AtsK aus *Pseudomonas putida* S-313), also tetraedrische Substrate, umsetzten.<sup>[127]</sup> Dabei wurde vermutet, dass diese Aminosäure dabei für die Präferenz der entsprechenden Enzyme bezüglich der tetraedrischen Substrate wie eben die genannten Sulfonaten oder Sulfaten gegenüber planaren Substraten wie z.B. Carbonsäuren verantwortlich ist.<sup>[89]</sup> Diesbezüglich sollten in der hier vorliegenden Arbeit nun geklärt werden ob für die Umsetzung der alternativen Substrate der TauD, welche alle das planare Carbonsäuremotiv besitzen, dieselben Reste an der Koordination der entsprechenden Säure beteiligt sind. Weiterhin sollte untersucht werden ob H70, welches beschrieben wurde für die Koordination von tetraedrischen Substraten, für die Koordination der planaren Carbonsäuren keinen Einfluss hat und dementsprechend durch nicht koordinierende Aminosäuren wie Alanin ersetzt werden kann, bzw. die Wechselwirkung der Aminosäure mit dem Substrat, sofern vorhanden, durch eine andere leicht Wasserstoffbrückenbindung-bildende Aminosäure wie Serin ersetzt werden kann. Dafür wurden Mutanten erstellt bei denen die jeweilige Aminosäure H70 und R270 je gegen Alanin als auch gegen Serin ausgetauscht wurde, sowie die jeweiligen Kombinationen davon. Es zeigte sich, dass die Aminosäure R270 essentiell für die Aktivität des Enzyms gegenüber den Carbonsäuresubstraten und damit für deren Bindung ist und die Umsätze des Enzyms bezüglich des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** durch den Austausch von R270 sowohl gegen Alanin, als auch gegen Serin nicht mehr nachweisbar waren. Dies war sowohl bei den Einzelmutanten R270A und R270S, als auch bei den jeweiligen Doppelmutanten H70A/S\_R270A/S der Fall, die ebenfalls je eine der



Mutationen enthielten. Dies zeigt, dass das Modellsubstrat  $\beta$ -Alanin **51** genau wie das natürliche Substrat Taurin über eine Salzbrücke der R270 Seitenkette koordiniert wird. Bei den Mutanten H70A sowie H70S war hingegen zu erwarten gewesen, dass der Einfluss der Mutationen sehr gering ist, da das entsprechende Substrat nicht tetraedrisch ist und so, laut der in der Literatur beschriebenen Funktion des H70, keine essentielle Beteiligung an der Bindung der planaren Substrate haben sollte. Es zeigte sich jedoch, dass beide Mutationen, sowohl H70A als auch H70S, einen signifikanten Einfluss auf den Umsatz der Modellverbindung  $\beta$ -Alanin **51** hatten, da in beiden Fällen ein deutlicher Rückgang des Umsatzes detektierbar war. Jedoch führte der Austausch des H70 gegen ein Serin zu einem weniger starken Umsatzrückgang als die Mutation H70A, wobei selbst die TauD Variante H70A noch einen detektierbaren Umsatz von  $\beta$ -Alanin zu Isoserin **52** aufwies. Im Falle des Taurins haben Hausinger und seine Mitarbeiter gezeigt, dass die Mutation H70A zu einem vollständigen Verlust der Aktivität der TauD bezüglich Taurin führt.<sup>[92]</sup> Dies legt nahe, dass der Einfluss des H70 auf die Bindung der hier untersuchten alternativen Substrate weniger entscheidend ist als bei Taurin, dass es jedoch immer noch signifikant an der Bindung der Substrate beteiligt ist. Insgesamt konnte anhand der hier durchgeführten Mutationsstudien bewiesen werden, dass die alternativen Substrate in der TauD denselben Bindungsmodus nutzen wie das natürliche Substrat Taurin, wobei der Anteil der jeweiligen Aminosäuren an der Koordination der Carbonsäuren sich von der des Taurins unterscheidet.

#### **4.1.4. Verbesserung der Umsetzung alternativer Substrate durch Mutation der Substratbindetasche**

Nachdem in den Mutationsstudien zur Bindung der alternativen Substrate anhand des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** gezeigt werden konnte, dass die alternativen Substrate über die gleichen Aminosäuren koordiniert werden wie das natürliche Substrat und folglich auch an der gleichen Stelle koordinieren, wurden, anhand eines ebenfalls durchgeführten Dockings des Modellsubstrats  $\beta$ -Alanin **51** in die TauD mittels RosettaDesign, Aminosäuren identifiziert, anhand welcher TauD Varianten erstellt werden konnten die eventuell verbesserte Bindeeigenschaften bezüglich der neuen Substrate aufweisen. Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um die beiden Phenylalanine F159 und F206, von denen bereits durch kristallographische Untersuchungen bekannt war, dass sie die Bindetasche des Substrats in der TauD bilden und vermeintlich an der Positionierung desselbigen gegenüber der reaktiven Eisen-Oxo-Spezies beteiligt sind.<sup>[90]</sup> Weitergehende Untersuchungen von McCusker und Klinman konnten diese Annahme für die Aminosäure F159 belegen und zeigen, dass F159 direkt an der Positionierung des Substrats Taurin oberhalb des reaktiven Eisenzentrums und damit an der Kopplung der Hydroxylierungsreaktion an die eigentliche Sauerstoffaktivierung beteiligt ist. Dabei zeigte sich, dass ein Austausch des F159 gegen eine Aminosäure mit einer sterisch weniger anspruchsvollen Seitenkette einen direkten negativen Einfluss auf die Aktivität der TauD hat.

Basierend auf dem in dieser Arbeit durchgeführten Docking, wurden nun Mutanten der TauD erstellt, anhand welcher die Aktivität des Enzyms bezüglich der neuen Substrate gesteigert werden sollten. Hierfür wurden die beiden Phenylalanine F159 und F206, welche wie bereits oben erwähnt, als HotSpots identifiziert wurden gegen Tyrosin ausgetauscht um eine vermeintliche positive zusätzliche Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat einzuführen und so, mittels verbesserter Bindeeigenschaften, die Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51** zu steigern. Es zeigte sich, dass die TauD Variante F206Y einen von 22,6 % auf 54,2 % gesteigerten Umsatz aufwies, während die Variante F159Y einen auf 3,9 % verringerten Umsatz bezüglich  $\beta$ -Alanin **51** zeigte.

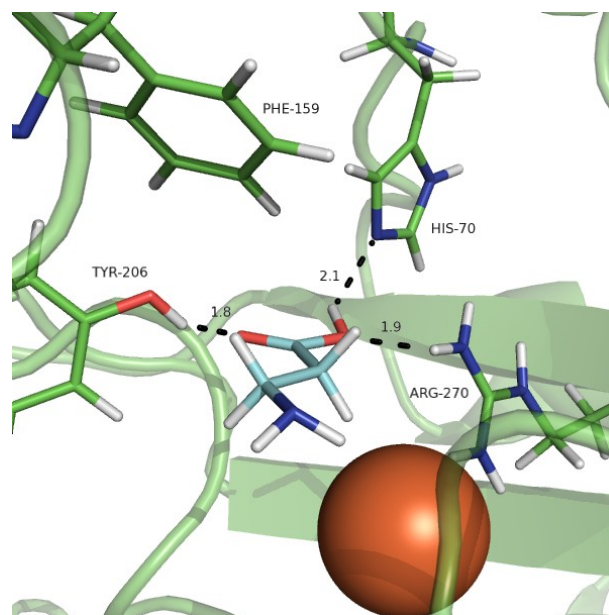
Mit der verbesserten F206Y Variante der TauD wurde im nächsten Schritt das Substratspektrum des anfänglichen Tests reevaluiert und es zeigte sich, dass alle Substrate, welche vom Wildtyp bereits umgesetzt werden konnten, erhöhte Umsätze sowie, im Falle der Substrate mit geringen *ee*-Werten in der Wildtyp Biotransformation, auch verbesserte *ee*-Werte zeigten. Neben diesen verbesserten Umsätzen und *ee*-Werten, war die Mutante

F206Y außerdem in der Lage Carbonsäuren umzusetzen, welche vom Wildtyp nicht umgesetzt werden konnten wie die aliphatischen Carbonsäuren der Kettenlänge C3 bis C5 und ebenso, wenn auch in geringem Maße eine  $\omega$ -Aminocarbonsäure mit  $\alpha$ -Methyl-Substituenten.

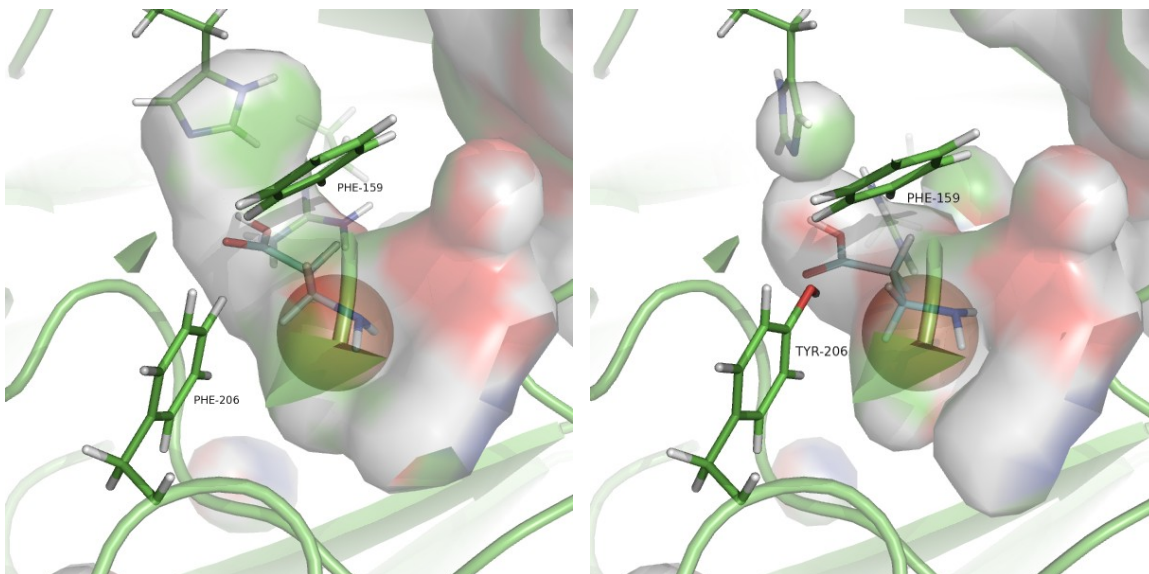
In weitergehenden Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass, analog zu den von Klinman *et al.* durchgeführten Untersuchungen zur Umsetzung von Taurin, der Austausch sowohl von F159 als auch von F206 gegen die sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäure Leucin, die Umsätze bezüglich des hier verwendeten Modellsubstrats  $\beta$ -Alanins **51** senkte, sodass keinerlei Produktbildung mehr nachweisbar war.<sup>[119]</sup> Dies ist vermutlich im Falle des hier untersuchten  $\beta$ -Alanins **51**, genau wie bei den Untersuchungen bezüglich des natürlichen Substrats Taurin, auf eine Entkopplung der Sauerstoffaktivierung von der eigentlichen Hydroxylierungsreaktion und somit geringeren Aktivität des Enzyms zurückzuführen.<sup>[119,120]</sup> Der Umsatzrückgang der Mutation F159Y hängt vermutlich damit zusammen, dass F159 direkt mit der unpolaren Kohlenstoffkette des Substrats interagiert und diese zum Eisen hin dirigiert. Der Austausch von F159 gegen ein Tyrosin hat diesbezüglich eine ungünstige Wechselwirkung der Hydroxyfunktion des dann enthaltenen Y159 mit eben dieser unpolaren Seitenkette zur Folge, was vermutlich zu einer schlechteren Bindung des Substrats und damit zu einem verringerten Umsatz führt.

Zu klären war nun worauf die gesteigerte Umsatzraten der Mutante F206Y bezüglich der neuen Substrate zurückzuführen war. Im Docking des  $\beta$ -Alanin **51** in die Mutante F206Y wurde ersichtlich, dass die Mutation F206Y wie erwartet eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxyfunktion des Tyrosins und der Carbonsäure des  $\beta$ -Alanins **51** ermöglicht, was aufgrund der damit einhergehenden verbesserten Wechselwirkung des Enzyms mit dem Substrat, eine mögliche Erklärung für die gesteigerten Umsätze der TauD F206Y gegenüber  $\beta$ -Alanin **51** sein könnte (Abbildung 33). Eine weitere Erklärung für die gesteigerte Aktivität könnte eine bessere Positionierung des Substrats über dem Eisenzentrum sein. Dabei zeigt ein Vergleich der Substratkavitäten (Abbildung 34), dass bei der Mutante F206Y im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich kleinere Kavität vorhanden ist, was unter anderem dafür verantwortlich sein kann, dass das Substrat weniger Ausweichmöglichkeiten hat und dadurch eine bessere Kopplung von Sauerstoffaktivierung und Hydroxylierung stattfindet, in Analogie zu den oben genannten Untersuchungen zum Phenylalanin 159.<sup>[119,120]</sup> Jedoch ist hierbei zu beachten, dass die kleinere Kavität unter anderem auch darauf zurückzuführen sein kann, dass die Aminosäuren der aktiven Tasche des Enzymes sich mehrheitlich auf

Proteinschleifen ,sogenannten „loops“, befinden was dazu führt, dass diese eine gewisse Flexibilität in der Positionierung besitzen und durch die zusätzliche Wechselwirkung mit dem Substrat näher an diesem positioniert werden. Für die These der zusätzlichen Wechselwirkung spricht weiterhin, dass die TauD Variante F206Y eine, in Bezug auf den TauD Wildtyp, signifikant verringerte Aktivität bezüglich der Umsetzung von Taurin besitzt. Weiterhin zeigte sich, dass die Mutante F206Y deutlich weniger anfällig für die kompetitive Bindung von tetraedrischen Salzen ist, welche die Umsetzung des Modells substrats  $\beta$ -Alanin **51** inhibieren. Dies spricht, wie auch die geringere Aktivität bezüglich des natürlichen Substrats Taurin dafür, dass die TauD Variante F206Y Anfänge einer veränderten Selektivität bezüglich des Substratspektrums zeigt, weg von tetraedrischen, hin zu planaren Substraten. Dies kann wiederum auf die zusätzliche Wechselwirkung der Substrat-Bindetasche der Variante F206Y mit dem alternativen Substrat zurückzuführen sein, welche mit dem nativen Substrat nicht möglich ist. So kann die zusätzliche Hydroxylgruppe des Tyrosin zu einer leicht repulsiven Wechselwirkung mit der Sulfonsäure des Taurins, mit einer folglich geringeren Affinität und damit Aktivität des Enzyms gegenüber der Sulfonsäure führen.



**Abbildung 33:** Docking von  $\beta$ -Alanin **51** in TauD F206Y. Y206, F159 sowie H70 und R270 als grüne Stäbchenmodelle.  $\beta$ -Alanin **51** als Stäbchenmodell in Cyan und Eisen als orange Sphäre. Alle Abstandsmessungen sind in Ångström angegeben und durch gestrichelte Linien angezeichnet.



**Abbildung 34:** Vergleich der Substratkavitäten des Modells substrats  $\beta$ -Alanin **51** in TauD Wildtyp (links) und TauD F206Y (rechts) als halb durchsichtige Oberflächen. Phenylalanin bzw. Tyrosin 206, Phenylalanin 159 sowie Histidin 70 und Arginin 270 als grüne Stäbchenmodelle.  $\beta$ -Alanin **51** als Stäbchenmodell in Cyan und Eisen als orange Sphäre.

#### **4.1.5. Anwendbarkeit der $\alpha$ -Hydroxylierung von $\omega$ -Aminocarbonsäuren mittels TauD**

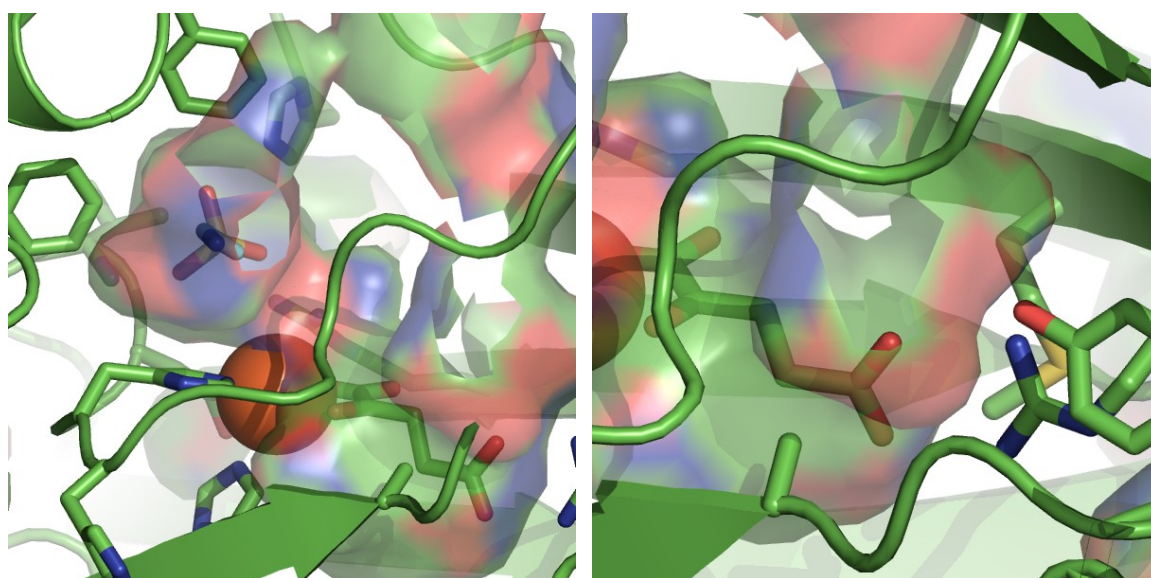
Während es für die Darstellung vor allem langkettiger  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren, die unter anderem in der kosmetischen Industrie Anwendung finden, eine Vielzahl chemischer sowie enzymatischer Zugänge gibt, sind für die Darstellung von  $\alpha$ -Hydroxy- $\omega$ -aminocarbonsäuren, zumindest was die Enzym-basierten synthetischen Zugänge betrifft, nur eine relativ geringe Zahl an geeigneten Anwendungen bekannt.<sup>[128–130]</sup> Die große Anzahl bekannter und verfügbarer Enzyme zur  $\alpha$ -Hydroxylierung von aliphatischen Carbonsäuren ist unter anderem auch darauf zurückzuführen, dass diese Enzyme am Fettsäuremetabolismus von Pflanzen beteiligt sind, wobei jedoch auch andere, nicht pflanzliche Enzyme wie P450 Monooxygenasen für die  $\alpha$ -Hydroxylierung von aliphatischen sowie arylischen Carbonsäuren beschrieben wurden.<sup>[131–135]</sup> Als Bestandteil von Glykosidantibiotika wie Amikacin und Arbekacin sowie als Bestandteil antimikrobieller Peptide wie Edein stellen die  $\alpha$ -Hydroxy- $\omega$ -aminocarbonsäuren eine interessante Stoffklasse dar.<sup>[136–138]</sup> Jedoch ist über enzymatische Zugänge für diese Verbindungen im Vergleich zu den aliphatischen  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren deutlich weniger bekannt als für die aliphatischen Carbonsäuren. Eine der gängigsten synthetischen Methoden zur

Darstellung dieser Verbindungen ist die Umsetzung der entsprechenden  $\alpha,\omega$ -Diaminocarbonsäuren mit Natriumnitrit zu den entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxy- $\omega$ -aminocarbonsäuren.<sup>[117,118,139]</sup> Vorteile dieser Methode sind ihre synthetische Simplität sowie die günstigen Ausgangsverbindungen, die auch in optisch reiner Form verfügbar sind. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, nebst der Toxizität des verwendeten Natriumnitrit, dass verschiedene Nebenprodukte gebildet werden können.<sup>[117]</sup> Mit der hier entwickelten enzymatischen Methode zur Darstellung optisch reiner  $\alpha$ -Hydroxy- $\omega$ -aminocarbonsäuren mithilfe der TauD Variante F206Y, ausgehend von den entsprechenden  $\omega$ -Aminocarbonsäuren, kann man diesen Nachteil umgehen. Weiterhin bietet die enzymatische Synthese dieser Verbindungen den Vorteil, dass, falls gefordert, das enzymatische System in einen sogenannten Pathway integriert werden kann. So könnte ein Biosyntheseweg für Isoserin **52** in ein bakterielles System implementiert werden, basierend auf dem Biosyntheseweg für  $\beta$ -Alanin **51** in Kombination mit dem hier vorgestellten System zur  $\alpha$ -Hydroxylierung basierend auf der TauD Variante F206Y.<sup>[140]</sup> Problematisch kann hierbei jedoch werden, dass es zu keinem vollständigen Umsatz des Substrats kommt, was wiederum die Aufreinigung des Produktes erschwert. Dabei kann man auf klassische Aufreinigungsmethoden wie z.B. Extraktion oder Ionenaustauscherchromatographie nicht zurückgreifen, da es sich bei beiden Verbindungen um zwitterionische Verbindungen handelt und die isoelektrischen Punkte der beiden Stoffe für eine gute Auftrennung per Ionenaustauschchromatographie zu ähnlich sind ( $\beta$ -Alanin **51** pI = 6,9; Isoserin **52** pI = 6,02).<sup>[141,142]</sup>

#### **4.1.6. Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der TauD**

Die Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität der TauD zeigten, dass bei keiner der Reaktionen eine Umsetzung gefunden werden konnte welche signifikant über dem Hintergrund lag. So zeigte sich, dass bei den Umsetzungen zur Friedel-Crafts Reaktion zu keinem detektierbaren Umsatz führte, während die Michael-Additionen keinen Umsatz zeigten, welcher oberhalb der Hintergrundreaktion lagen. Anhand der Kristallstruktur und den darin abgebildeten Kavitäten, um das für die Katalyse zu verwendende zentrale Eisenion, wird ersichtlich, dass der eingeschränkte Zugang des Metalls und die räumlich beschränkten Kavitäten inhibitiv auf die Katalyse der entsprechenden Reaktionen wirken können, indem die Substrate entweder sterisch überhaupt nicht in die Kavität passen, oder die Kavitäten durch die räumliche Beschränkung eine passende Faltung in den

entsprechenden Übergangszustand oder einen Angriff des verwendeten Nucleophils, an der dafür vorgesehenen Stelle, verhindern. So könnte einer der Gründe, warum die Michael-Addition nicht durch die TauD katalysiert wird, sein, dass durch Bindung der verwendeten Acrylsäuresubstrate an die Bindestelle des natürlichen Substrats Taurin, mögliche Nucleophile aus sterischen Gründen keinen Zugang zur Doppelbindung der Acrylsäuren haben. Dabei ist weiterhin fraglich ob bei den entsprechenden Reaktionen die Acrylsäure an der Koordinationsstelle des Taurins bindet, oder an das Eisenion koordiniert (Abbildung 35). Weiterhin ist ersichtlich, dass die Kavität in der sich das  $\alpha$ -Ketoglutarat befindet von teilweise sehr polaren Resten wie Arginin gebildet werden, welche natürlicherweise an der Koordination des  $\alpha$ -Ketoglutarats beteiligt sind (Abbildung 35, rechts). Dadurch wird die Bindung von relativ unpolaren Verbindungen wie den Substraten für die Friedel-Crafts-Reaktionen weiterhin erschwert. Desweiteren ist das normalerweise im aktiven Zentrum gebundene Fe(II), wie zuvor bereits erwähnt, nur bedingt oxidationsstabil und steht so nur einen beschränkten Zeitraum für die Katalyse zur Verfügung. Deshalb wurde, parallel zur Untersuchung der Katalyse der neuen Reaktionen mit der TauD, das entsprechende Cu(II)-bindende tHisF System, basierend auf den tHisF Varianten HHD und NC getestet. Dabei wurde im Weiteren der Schwerpunkt der Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität, also Katalyse der neuen Reaktionen auf das tHisF System gelegt.



**Abbildung 35:** Schematische Darstellung der Kavitäten der TauD, welche einen direkten Zugang zum gebundenen Eisen haben. Darstellung anhand der Kristallstruktur mit gebundenem Taurin (dargestellt als Stäbchenmodell in Cyan) und  $\alpha$ -Ketoglutarat (dargestellt als Stäbchenmodell in grün). Weiterhin sind die Aminosäureseitenketten, welche maßgeblich an der Ausbildung der Kavitäten beteiligt sind, als Stäbchenmodelle in grün dargestellt.

## 4.2. Untersuchungen zur Ausnutzung des katalytischen Potentials metallbindender tHisF Varianten

Für die Untersuchungen zur Ausnutzung des katalytischen Potentials bezüglich der katalytischen Promiskuität der Metall-bindenden HisHisAsp-Triade wurde, für weitergehende Untersuchungen, auf die von Manfred Reetz entwickelten Systeme basierend auf artifiziellen tHisF Varianten HHD und NC zurückgegriffen.<sup>[102]</sup> Dabei war die Idee der Nutzung dieser Systeme, dass man für die Untersuchungen zur enzymatischen Metallkatalyse sowohl die erhöhte Zugänglichkeit des Metallzentrums im Vergleich zur TauD als auch die erhöhte Stabilität der tHisF dahingehend ausnutzen kann, dass die Reaktionsbedingungen für chemische Reaktionen entsprechend den Reaktionsanforderungen angepasst werden können, nachdem sich gezeigt hatte, dass die TauD für derlei Untersuchungen, unter anderem aufgrund der geringen Thermostabilität und der vermutlich eingeschränkten Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für die zu testenden Substrate, nach initialen Untersuchungen bezüglich der Katalyse der neuen Reaktionen, nicht geeignet war. Weiterhin wurde für die Untersuchungen von dem in der TauD enthaltenen Fe(II) als Zentralion der Katalyse auf Cu(II) gewechselt da dieses, im Gegensatz zu Fe(II) oxidationsstabil in wässrigen Lösungen ist. Dabei wurde Cu(II) schon in vorhergehenden Untersuchungen von Roelfes, Reetz und anderen zur Lewis-Säure-Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen verwendet.<sup>[102,143–145]</sup> Getestet werden sollte nun ob mit diesem enzymatischen System Reaktionen wie die Michael-Addition, die Nazarov-Zyklisierung, die Friedel-Crafts-Reaktion und die Aldolreaktion katalysiert werden können indem die Lewis-Säure (hier das Cu(II)) die Reaktion katalysiert und das Protein als Ligand für die eventuelle Stereokontrolle der Reaktion fungiert. Basierend auf den oben bereits erwähnten Arbeiten von Reetz und seinen Mitarbeitern wurden hierfür die tHisF Varianten HHD und NC verwendet, mit der in den erwähnten Arbeiten die Modellreaktion für Lewis-Säure-Katalysatoren in Wasser, nämlich die Diels-Alder-Reaktion zwischen dem Azachalcon **42** und dem Cyclopentadien **43**, enantioselektiv durchgeführt werden konnten. So wurden im ersten Schritt der Arbeiten die Varianten tHisF HHD und NC ausgehend von Wildtyp tHisF durch QuikChange<sup>®</sup> PCR analog zu den von Reetz und seinen Mitarbeitern beschriebenen Methoden hergestellt und deren Aktivität bezüglich der beschriebenen Diels-Alder-Reaktion im Bezug auf Aktivität und Selektivität verifiziert. Es zeigte sich, dass unter Berücksichtigung gewisser Abweichungen bezüglich der in der Literatur beschriebenen Werte für Umsatz (50 % anstelle von 73 %) und Enantioselektivität (42% in den vorliegenden Arbeiten im Vergleich zu 46 % in der



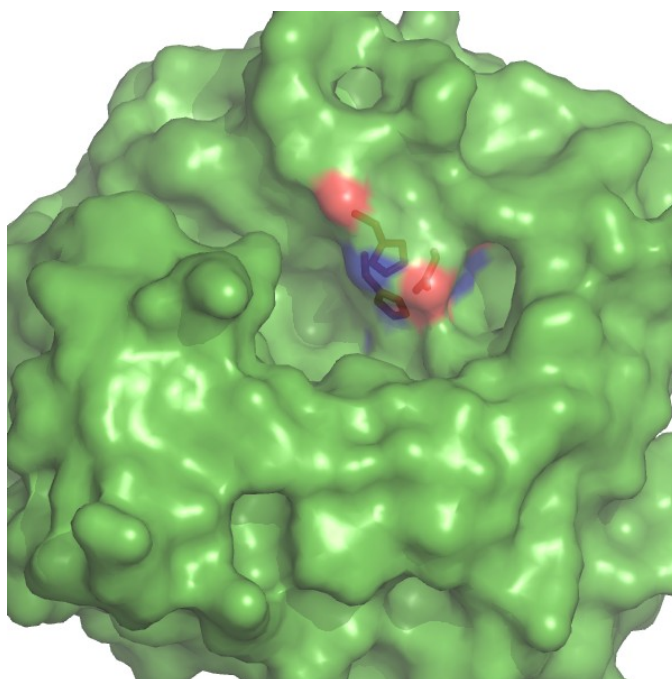
Literatur) die tHisF Varianten eine analoge Reaktivität zeigten, sodass davon auszugehen ist, dass die vorliegenden Systeme analog zu denen der in der Literatur beschriebenen Reaktionen sind.

#### **4.2.1. Untersuchungen zur Katalyse der Michael-Addition**

Im nächsten Schritt der Untersuchungen sollte nun geklärt werden ob die Michael-Addition an das, in den Untersuchungen zur Diels-Alder-Reaktion verwendete Azachalcon **42**, durch die entsprechenden tHisF Systeme katalysiert werden kann. Die Enzym-katalysierte Michael-Addition in wässrigen Systemen ist für verschiedene Enzyme der Klasse der Hydrolasen bereits mehrfach gezeigt worden, wobei hierbei häufig Acrylate als Michael-Akzeptoren verwendet wurden.<sup>[123,146–148]</sup> Ebenso wurde bereits gezeigt, dass die Michael-Addition in wässrigen Systemen auch Cu(II)-katalysiert ablaufen kann.<sup>[149]</sup>

Die Idee hinter den Untersuchungen dieser Reaktion im Rahmen dieser Arbeit war, dass das Azachalcon **42** analog zur Diels-Alder Reaktion an das Kupferzentrum der tHisF Variante HHD koordiniert, sodass der nukleophile Angriff des Nucleophils nur von einer Seite erfolgen kann, dadurch eine Stereoselektivität durch das Enzym in der Reaktion induziert wird, und zusätzlich noch das Azachalcon **42**-System für den nukleophilen Angriff durch die Koordination an das Metallzentrum aktiviert wird, womit eine Steigerung der Aktivität einhergeht. Dabei wurden in ersten Experimenten verschiedene Nucleophile getestet, wobei jedoch nur Mercaptoethanol **73** und Anilin **85** einen signifikanten Umsatz bezüglich der Michael-Addition an das Azachalcon **42** zeigte. Die chirale Analyse der Reaktion ergab, dass die Reaktion ohne eine signifikante Stereokontrolle verläuft, sodass die erhaltenen Produkte keine Enantiomerenüberschüsse aufwiesen. Geht man jedoch davon aus, dass Bindung des Azachalcon **42** spezifisch am Kupferzentrum stattfindet wäre zu erwarten gewesen, dass es zu einem stereoselektiven Verlauf der Reaktion kommt in Anlehnung an die beschriebene Diels-Alder Reaktion, da die Koordination des Azachalcon **42** analog zu der Diels-Alder-Reaktion stattfinden sollte und der Angriff des Nucleophils an das an der Metallbindestelle koordinierte Azachalcon **42** analog zu dem des Cyclopentadiens **43** erfolgen sollte. Die erweiterten Untersuchungen mit dem zusätzlichen Nucleophil Anilin **85** lieferte ein analoges Ergebnis mit einem Produkt, welches keinen Enantiomerenüberschuss aufwies, bei jedoch im Vergleich zur Reaktion mit Mercaptoethanol **73** deutlich verringerten Umsätzen. Betrachtet man die tHisF Struktur mit der eingefügten Cu(II)-Bindestelle wird ersichtlich, dass der Angriff bezüglich des Substrats theoretisch nur von einer Seite erfolgen kann, da die tHisF eine Kavität hat in der

die Cu(II)-Bindestelle liegt und in die das Substrat binden kann (Abbildung 36). Ausgehend von den Ergebnissen der Diels-Alder-Reaktion ist auch anzunehmen dass das Azachalcon **42** eine präferierte Orientierung in dieser Kavität besitzt was die Orientierung des Azachalcons **42** in dieser Kavität angeht (Pyridinrest des Azachalcons **42** links oder rechts der Metallbindestelle) da dies für die Enantioselektivität der Reaktion verantwortlich sein müsste.



**Abbildung 36:** tHisF Struktur als semi-durchsichtige Oberfläche mit der HisHisAsp Cu(II)-Bindestelle als rote Stäbchen und den entsprechenden Oberflächenteilen der koordinierenden Reste (HisHisAsp) auf der Oberfläche der tHisF in blau und rot für die Stickstoff und Sauerstoffreste der koordinierenden Aminosäuren.

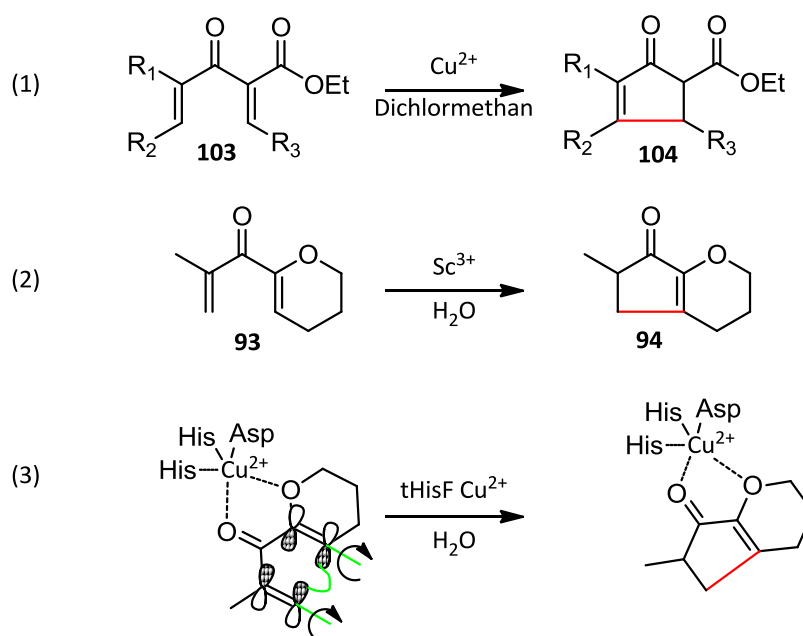
Zu klären war nun warum dies für die getestete Michael-Addition nicht der Fall war. Dafür sollte untersucht werden ob die Bindung des Cu(II) an das Metallzentrum unter den getesteten Bedingungen nicht spezifisch genug erfolgte und inwiefern verschiedene Kontaminationen einen Einfluss auf die Reaktion haben können. Dabei wurde die tHisF auf vier verschiedenen Wege aufgereinigt um die Einflüsse der Kontaminationen zu untersuchen und zu klären ob bei verschiedenen Reinigungsmethoden die Reaktion dahingehend verbessert werden kann, dass eine Stereoselektivität induziert werden kann. Dabei zeigte sich, dass die Aufreinigung per einfachem Entsalzen mittels PD-10 Säulen und die Behandlung mit EDTA keine großen Unterschiede aufwiesen. Dies lässt darauf

schließen, dass Kontaminationen mit Salzen aus dem *E. coli* Zellysat keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion haben können, da diese durch die EDTA Behandlung entfernt hätten werden müssen. Im zweiten Weg sollte getestet werden ob das Kupfersalz nicht fest an die Metallbindestelle gebunden ist, sodass es zu einer Entfernung des Cu(II) aus der Enzympräparation durch einen weiteren Entsalzungsschritt nach der Inkubation mit Kupfer kommt. Dabei wurden Umsätze gefunden, welche leicht unter denen der vorher beschriebenen Reaktionen lagen, was auf eine leichte Verringerung der Menge an intaktem Enzym durch die wiederholten Entsalzungsschritte zurückzuführen sein könnte. Bei der Umsetzung der per Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten tHisF konnte der Umsatz im Gegensatz zu den zuvor getesteten Aufreinigungsmethoden deutlich gesteigert werde von  $31,25 \pm 5,58$  % im Falle der entsalzten tHisF HHD zu  $63,62 \pm 1,34$  % im Falle der per Anionenaustauscherchromatographie aufgereinigten tHisF HHD. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Bestandteile des *E. coli* Zellysats inhibitiv auf die Reaktion wirken, welche durch diese verbesserte Aufreinigungsmethode deutlich verringert werden können. Das Vorhandensein dieser Verunreinigungen wird auch aus dem ÄKTA-Chromatogramm ersichtlich, das zeigt, dass nebst des Peaks des Zielproteins noch weitere Peaks großer Intensität im Chromatogramm vorhanden sind, die wiederum für entsprechende Verunreinigungen stehen. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass diese Banden bei der Bestimmung der Proteinkonzentration per Bradford Reagenz keine nachweisbare Menge Protein enthielten, sodass davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um DNA oder Cofaktoren aus dem Zellysat handelt. Für diese Annahme spricht weiterhin, dass die Absorption dieser Banden bei einer Wellenlänge von 260 nm die Absorption bei 280 nm meist deutlich übersteigt, während dies bei der Bande des Zielproteins nicht der Fall ist (Kapitel 6.2.2.).

Bei allen getesteten Reaktionen war jedoch, nach der chiralen Analyse der entsprechenden Umsetzungen, ersichtlich, dass die Enantioselektivität der Reaktion nicht gesteigert werden konnte und alle Reaktionen ohne signifikante Enantioselektivität verliefen. Fraglich war nun, ob das Azachalcon **42** nicht an das Kupfer bindet bzw. das Kupfer nicht an die Metallbindestelle koordiniert. Diese Selektivität der Bindung des Kupfers an das Enzym wurde später durch Messung der Kupferkonzentration per Röntgenabsorptionsfluoreszenz genauer untersucht.

#### 4.2.2. Untersuchungen zur Katalyse von Friedel-Crafts-Reaktionen und Nazarov-Zyklisierungen

Die Untersuchungen zur tHisF katalysierten Friedel-Crafts- und Nazarov-Reaktion wurden basierend auf der Annahme durchgeführt, dass die Cu(II)-bindenden tHisF Varianten als chirale Lewis-Säuren fungieren. Die Cu(II)-katalysierte Nazarov-Zyklisierung wurde bereits in der Literatur beschrieben, wobei die Reaktion **103** zu **104** hier in dem organischen Lösungsmittel Dichlormethan statt in Wasser stattfand und das Substrat eine zusätzliche Ketofunktion in  $\beta$ -Position zur eigentlichen Ketofunktion besaß (Schema 27, Reaktionsgleichung (1)).<sup>[150]</sup> Die Nazarov-Zyklisierung mit dem in dieser Arbeit verwendeten Substrat **93** wurde, für ein wässriges System beschrieben, jedoch mit Scandium als Lewis-Säure.<sup>[151]</sup> Dabei wurde das Substrat **93** gewählt, da dieses ein, zum Azachalcon **42** analoges Koordinationsmotiv besitzt, welches einen 5-Ring Chelat mit dem Cu(II)-Zentrum ermöglichen kann. Weiterhin wurde als zusätzliches Modellssubstrat noch das kommerziell erhältliche Naturstoffmolekül Damascon **91** getestet.

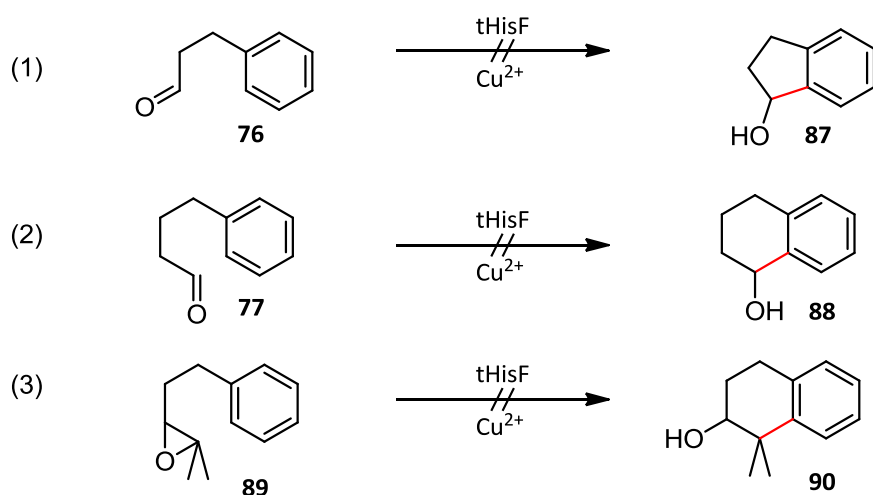


**Schema 27:** Literaturbekannte Reaktionen zur Nazarov-Zyklisierung mittel Cu(II) Katalyse (Reaktionsgleichung (1)) und in wässrigem Medium mit Sc<sup>3+</sup> (Reaktionsgleichung (2)) im Vergleich zur geplanten Katalyse der Nazarov-Zyklisierung mittels Cu(II)-bindender tHisF (Reaktionsgleichung (3)).

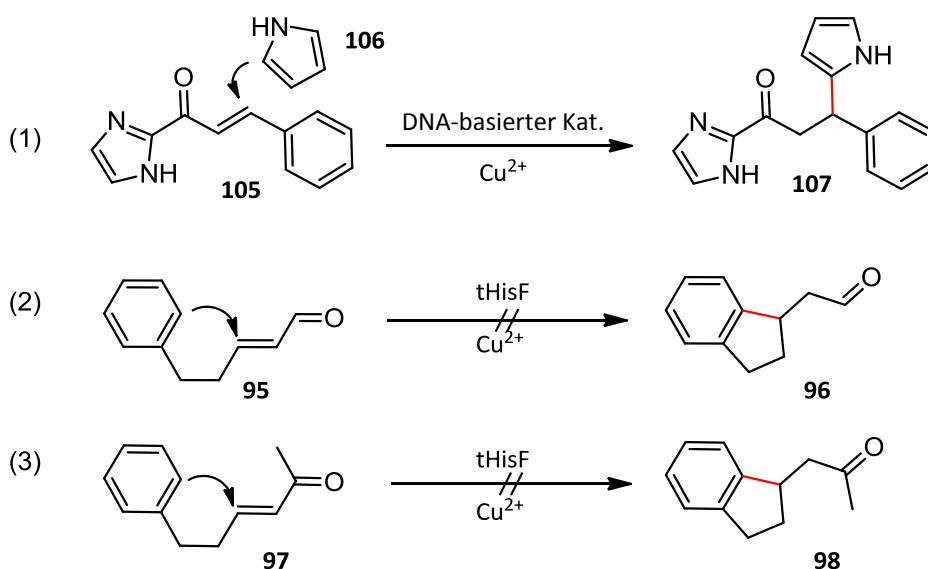
Für keine der getesteten Umsetzungen der beiden Substrate für die Nazarov-Zyklisierung mit reinem Cu(II)(OTf)<sub>2</sub> als Katalysator, noch mit den entsprechenden Cu(II)-bindenen

tHisF Varianten inklusive Cu(II) konnte unter den getesteten Bedingungen kein signifikanter Umsatz detektiert werden. Weiterhin konnte auch für die Umsetzungen zur Friedel-Crafts-Reaktion weder mit Metallsalz als Katalysator, noch mit Enzym und Metallsalz eine Produktbildung detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Lewis-Acidität des Cu(II) im wässrigen System nicht hoch genug ist um die Reaktion zu katalysieren. Während für die Cu(II) katalysierte Nazarov-Zyklisierung in der Literatur in Dichlormethan gearbeitet wurde, verwendete die Arbeitsgruppe von Kobayashi, welche die Reaktion in wässrigem Medium zeigten, Scandium als Lewis-Säure.<sup>[150,151]</sup> So ist davon auszugehen, dass die Lewis-Acidität des verwendeten Cu(II)-Salzes in Wasser zu gering ist, da die Koordination der Carbonylfunktion in Konkurrenz zur Koordination des Metalls durch H<sub>2</sub>O Moleküle stehen kann, welche in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden sind. Dies scheint bei der Verwendung von Metallsalzen Sc<sup>3+</sup> und diverse Lanthaniden wie Yb<sup>3+</sup> nicht inhibitiv bezüglich der Katalyse zu wirken, da mehrere Beispiele beschrieben wurden in denen diese beiden Metalle als Lewis-Säuren in Wasser verwendet wurden. Jedoch handelte es sich bei diesen Reaktionen oft um Varianten der Mukaiyama-Aldolreaktion, bei der aktivierte Silyl-Enolether an einen entsprechenden Aldehyd angreifen.<sup>[152-156]</sup> Ein Beispiel für Cu(II)-katalysierte Reaktionen ist die bereits oben erwähnte von der Arbeitsgruppe von Reetz für die tHisF Systeme verwendeten Diels-Alder Reaktion, welche von Engberts und seinen Mitarbeitern entwickelt wurde und welche für viele Cu(II)-basierten Katalysatorsysteme als Modellreaktion dient. Ein weiteres Beispiel ist die Friedel-Crafts-artige Addition von Indolen an das Azachalcon **42** und analoge Systeme.<sup>[157,158]</sup>

Basierend auf diesen Ergebnissen, sollte nun getestet werden ob es auch möglich ist andere Substrate für die Friedel-Crafts-Reaktion umzusetzen. Dafür wurden unter anderem zwei Aldehyde (**76** und **77**) und ein Epoxid (**89**) für die intramolekulare Friedel-Crafts-Reaktion an ein aromatisches System getestet. Zwei weitere Systeme (**95** und **97**) wurden analog den Indol-Systemen getestet bei denen eine Addition eines aromatischen Systems an ein konjugiertes Michael-System stattfindet. In der hier vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden ob diese Addition auch mit weniger elektronenreichen Systemen wie Phenylen möglich ist (Schema 28 & 29).



**Schema 28:** Geplante Umsetzungen der verschiedenen Modellsubstrate (**76**, **77** und **89**) für Friedel-Crafts-Reaktion aromatischer Systeme per tHisF.



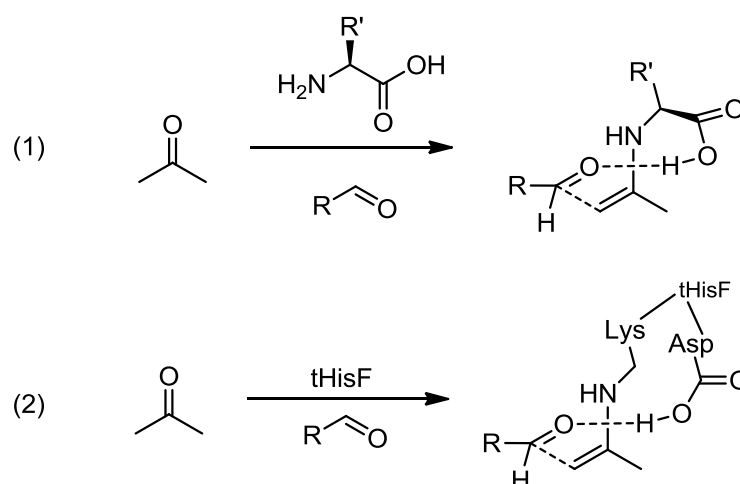
**Schema 29:** Literaturbekannte (Reaktionsgleichung (1)) und geplante Umsetzungen (Reaktionsgleichung (2&3)) zur Friedel-Crafts-Reaktion konjugierter Doppelbindungssysteme mit aromatischen Nucleophilen.

Es zeigte sich, dass diese Reaktionen, analog den Nazarov Zyklisierungen zu keiner detektierbaren Bildung an gewünschtem Produkt führten. Einzig für das 5-Phenyl-pent-2-enal **95** konnte eine Produktbildung detektiert werden, wobei es sich bei dem hier gebildeten Produkt um das entsprechende Wasser-Addukt handelte, wie aus vorhergehenden Arbeiten am Institut, bezüglich der Katalyse der Reaktion mittels Brønsted-Säure-analogen Enzymsystemen basierend auf Squalen-Hopen-Cyclasen, bekannt war.

### 4.2.3. Untersuchungen zur tHisF katalysierten Aldolreaktion

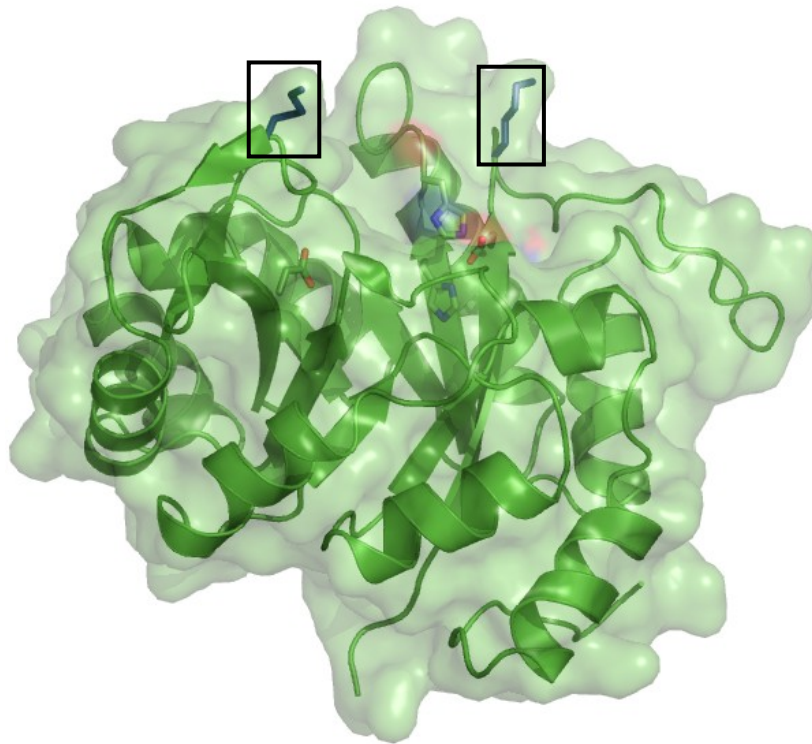
Im Rahmen der Untersuchungen zur Katalyse der Aldolreaktion von Aceton **46** mit verschiedenen Aldehyden konnte gezeigt werden, dass die tHisF und ihre Varianten in der Lage sind die entsprechende Aldolreaktion zu katalysieren. Dabei wurden in der tHisF vier mögliche reaktive Zentren identifiziert, namentlich das Metall-Zentrum, die Oberflächenlysine, der native Säure-Base-Mechanismus der tHisF, sowie die Phosphatbindestellen im Sinne eines „Oxy-Anion-Hole“. Nach ersten Untersuchungen zur Katalyse der Reaktion durch das Metall-Zentrum wurde ersichtlich, dass die initial für die Katalyse geplante Metallbindestelle an der Katalyse dieser Reaktion nicht beteiligt ist. In den folgenden Schritten wurden entsprechende „knock-out“ Mutanten erstellt bei denen die anderen vermeintlichen reaktiven Zentren ausgeschaltet wurden, indem entweder die entsprechenden Reste durch Mutagenese entfernt wurden bzw. die entsprechenden reaktiven Zentren durch sterisch anspruchsvolle Reste blockiert werden sollten. Dabei zeigte sich, dass weder der natürliche Säure-Base-Mechanismus, noch die Phosphatbindestellen der tHisF an der Katalyse der Reaktion beteiligt waren. Dies lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Oberflächen-exponierten Lysine der tHisF für die Katalyse der Reaktion verantwortlich sind (Abbildung 37). Die Aldolreaktion von verschiedenen Benzaldehyd-Derivaten mittels Aminosäuren wurde bereits mehrfach für Prolin-basierte Katalysatorsysteme gezeigt.<sup>[159,160]</sup> Interessant an den Lysinen der tHisF ist, dass sie oft in direkter Nachbarschaft ein Aspartat oder Glutamat haben, sodass sie vermutlich in eine Art Salzbrückenbindung zur Stabilisierung der tHisF involviert sind. Dies sollte jedoch tendenziell abträglich für die Reaktivität bezüglich der Aldolreaktion sein. Weiterhin interessant war, dass bei den Umsetzungen mit *N*- $\alpha$ -Acetyl-lysin, im Vergleich zur Umsetzung mit tHisF und *L*-Lysin, deutlich verringerte Umsätze gefunden wurden. Dabei ist die  $\alpha$ -Aminofunktion des Lysins, ähnlich der Einbindung des Lysin in das Proteinrückgrat, nicht verfügbar, sodass nur die  $\epsilon$ -Aminofunktion zur Verfügung steht. Zu erwarten wäre nun, dass sich die Lysine in der tHisF ähnlich wie die Aminofunktion des *N*- $\alpha$ -Acetyl-lysins verhalten. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Reaktivität der Lysine der tHisF im Vergleich zum *N*- $\alpha$ -Acetyl-lysin ist nun, dass die Carbonsäureseitenketten der Aspartate und Glutamate in Nachbarschaft zu den entsprechenden Lysinen eine aktivierende Wirkung haben, analog den Carbonsäuren der Proline oder des freien Lysins und somit eine Art Lysin-katalysierte und Proteinoberflächen-assistierte Aldolreaktion stattfindet, deren möglicher Mechanismus in Schema 30 gezeigt wird.<sup>[161–163]</sup> Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Reaktion hauptsächlich

von Lysinen an der Oberfläche katalysiert wird, welche keinen direkten Gegenpart in Form eines Aspartats oder eines Glutamats haben. Dabei sind vor allem die Lysine 13 und 146 auffällig die auf der Oberseite der tHisF auf Loops plaziert sind, sodass sie zusätzlich noch eine gewisse Flexibilität besitzen (Abbildung 37). Die Aminosäure-katalysierte Aldolreaktion ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, wobei die meisten Untersuchungen mit Katalysatorsystemen basierend auf Prolin durchgeführt wurden. Dabei verläuft die Aminosäure-katalysierte Aldolreaktion analog der Typ I Aldolase-katalysierten Reaktion meist über eine Enamin Zwischenstufe, wobei für Zink enthaltende Derivate des Prolin auch Reaktionsmechanismen beschrieben wurden welche über eine Enolat-Spezies verlaufen.<sup>[159,160,163–165]</sup> Neben der Prolin-katalysierten Aldolreaktionen wurde auch die Katalyse von Aldolreaktionen mittels anderer  $\alpha$ -Aminosäuren untersucht.<sup>[166–168]</sup> In diesem Rahmen wurden auch Aldolreaktionen mit Lysin als katalytisch aktiver Aminosäure durchgeführt.<sup>[169,170]</sup>



**Schema 30:** Vergleich des beschriebenen Mechanismus für die Aldolreaktion katalysiert durch primäre Aminosäuren (Reaktionsgleichung (1)) und der mögliche Mechanismus der tHisF katalysierten Aldolreaktion (Reaktionsgleichung (2)).<sup>[163]</sup>





**Abbildung 37:** tHisF Variante HHD als Cartoon mit semi-durchsichtiger Oberfläche dargestellt. In den schwarzen Kästen sind die Lysine K13 und K146 markiert, welche keinen augenscheinlichen Aspartat-Gegenpart haben. Weiterhin sind zur Orientierung D130 sowie die HHD Triade als grüne Stäbchen dargestellt.

#### **4.2.4. Untersuchungen zur Metallbindung in tHisF Varianten**

Die Untersuchungen zur Metallbindung in den tHisF Varianten HHD und NC ergaben, dass die Bindung des zugegebenen Kupfersalzes ( $\text{Cu(II)SO}_4$ ) nicht spezifisch an der Metallbindestelle der HHD stattfindet. Der Befund, dass die NC Variante der tHisF, welche keine HisHisAsp Triade zur Metallbindung enthält, nach dem Entsalzen noch ca. 65 % der Kupferkonzentration der Metall-bindenden HHD enthält, lässt darauf schließen, dass die Metallbindung zu einem großen Teil unspezifisch am Protein stattfindet. So haben Reetz und seine Mitarbeiter bereits anhand von 2-D Elektronenspinresonanz (ESR) Experimenten gezeigt, dass die Metallbindung teilweise an der Oberfläche der tHisF stattfindet, beschrieben jedoch nicht in welchem Ausmaß diese unspezifische Bindung stattfindet. Die Messung der absoluten Metallkonzentration lässt nun darauf schließen, dass, zumindest bei Raumtemperatur, mehr Metall unspezifisch an der Oberfläche des Enzyms bindet, als effektiv an der dafür vorgesehenen Metallbindestelle. So gelang es Reetz und seinen Mitarbeitern auch nicht, das Vorhandensein der Metallbindestelle in der

beschriebenen intakten Form durch Bestimmung einer Kristallstruktur der tHisF Variante HHD mit gebundenem Kupfer zu untermauern.<sup>[122]</sup> Als weitere offene Frage bleibt zu klären, inwiefern das zur Chelatbildung fähige Azachalcon **42** als Substrat, welches in, im Vergleich zum eigentlichen Enzym, großem Überschuss zur Reaktion hinzugegeben wird, das Metall kompetitiv zum Enzym binden kann.

Die Schwierigkeit der Einführung einer artifiziellen Metallbindestelle wird weiterhin deutlich, betrachtet man neuere Arbeiten der Arbeitsgruppe von David Baker.<sup>[66]</sup> So wurde ersichtlich, dass selbst unter Verwendung von chelatisierenden artifiziellen Aminosäuren wie dem Bipyridyl-Alanin (Bpy-Ala) als komplexierende Aminosäure die Einhaltung der Geometrie im aktiven Zentrum nicht zwangsläufig gegeben ist und die Bindung des Metalls stark von der Einhaltung der vorgesehenen Koordinationsgeometrie des Metalls durch die entsprechenden Aminosäuren abhängt. So zeigte sich im Fall der Arbeiten von Baker und seinen Mitarbeitern, dass das Strukturelement des Proteins auf dem die hauptsächlich für die Koordination verantwortliche Aminosäure Bpy-Ala konformativ nicht stabil war und damit die koordinierenden Reste nicht an den dafür vorgesehenen Platz gebracht wurden. Übertragen auf die tHisF Problematik kann man daraus schließen, dass die Einhaltung der vorgesehenen Koordination des Kupfer durch die Aminosäuren Histidin und Aspartat essentiell ist. So befinden sich im Falle der tHisF Variante HHD die jeweils koordinierenden Reste zwar auf bezüglich der Konformation des Gesamtproteins stabilen Sekundärstruktur-Elementen, jedoch ist bisher keine Kristallstruktur bekannt bei der die Konformation der koordinierenden Reste bestätigt wurde. So kann also in Lösung nicht gewährleistet werden, dass die entsprechenden koordinierenden Reste sich nicht durch Rotation vom Koordinationszentrum entfernen, oder zumindest den Bindungswinkel bezüglich des Metallions so verändern, dass die Bindung des Metalls beeinflusst wird.

Weiterhin wird aus den Arbeiten von Baker und seinen Mitarbeitern ersichtlich, dass die komplexierender Verbindungen wie Bpy-Ala, hier in Form überschüssiger freier Aminosäuren Bpy-Ala im Zellysat, das Metall kompetitiv zu den übrigen Koordinationsstellen im Enzym bindet. Im Falle der Arbeiten an der tHisF wäre dies übertragbar auf das Azachalcon **42** Substrat, welches das entsprechende Kupfer kompetitiv zur HisHisAsp Bindestelle binden könnte und verglichen mit dem Enzym im Überschuss vorliegt (10 mM Substrat im Vergleich zu ca. 0,1 mM Enzym).

### **4.3. Problematik der Ausbeutung des alternativen katalytischen Potentials von Enzymen im Hinblick auf das Design neuer Enzymkatalysatoren**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, exemplarisch anhand zweier Modellsysteme gezeigt werden, dass, wie oben bereits beschrieben, das katalytische Potential von Enzymen genutzt werden kann um promiskuitive Reaktionen zu katalysieren. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Katalyse von Reaktionen welche sich deutlich von den natürlichen Reaktivitäten der Enzyme unterscheiden um ein Vielfaches schwerer zu abzurufen ist, als Reaktionen die den natürlichen Mechanismus der Enzyme nutzen. Möchte man nun ausgehend von bestehenden Enzymen neue Katalysatoren entwerfen, welche das Enzym auf dem sie basieren, abstrahiert von der natürlichen Funktion, als Grundlage eines Katalysators neuer Reaktivität nutzen, so müssen, wie sich im Laufe der Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität zeigte, einige Grundvoraussetzungen gegeben sein.

Anhand der in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme lassen sich, für künftige Entwicklungen artifizieller Katalysatorsysteme diverse Grundregeln ableiten, welche beim Design und der Planung bzw. der Entwicklung neuer Katalysatorsysteme bedacht werden müssen, wobei dabei kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben wird, sondern diese sich auf die in dieser Arbeit aufgetretenen Problemstellungen bezogen sind. Zum Design von Proteinen bzw. Enzymkatalysatoren finden sich in der Literatur eine Vielzahl von Artikeln auf die hier im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer eingegangen werden soll, die jedoch die folgenden Überlegungen mit beeinflusst haben.<sup>[66,171–178]</sup>

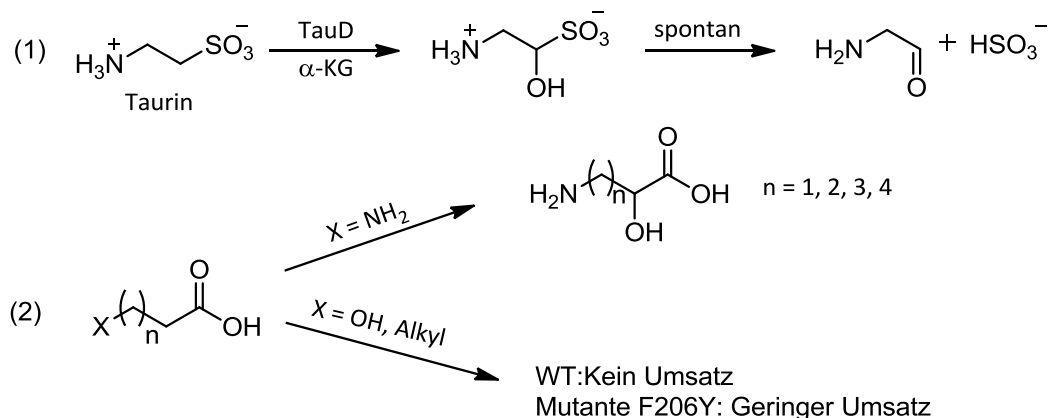
Der erste Schritt der Planung beginnt mit der Wahl eines adäquaten Proteins bzw. Protein-Scaffolds. Dabei muss bereits bedacht werden, welche Bedingungen die angedachte Reaktion benötigt in Bezug auf Lösungsmittelkonzentration, Temperatur und eventuelle Reagenzien, die die Stabilität des Proteins beeinträchtigen können. So muss ein Protein gewählt werden, welches diesen Bedingungs-Anforderungen genügt. Anschließend muss dieses gewählte Protein auf mögliche katalytisch aktive Strukturelemente untersucht werden, welche kompetitiv die angedachte Reaktion oder eventuell mögliche Nebenreaktionen der Substrate katalysieren können, wie die, im Falle der hier vorgelegten Arbeit, Lysine der tHisF. Dabei muss auch beachtet werden, dass die natürliche Funktion des gewählten Enzyms kontrollierbar sein muss und somit nicht zu unerwünschten Nebenreaktionen führt. Weiterhin muss sichergestellt werden, dass die Substrate in die dafür vorgesehene aktive Tasche binden können und diese auch für die zu testenden

Substrate zugänglich ist, sowie auch bezüglich der Polarität kompatibel mit der dafür vorgesehenen Bindetasche sind.

Dies zeigt unter anderem auch, warum katalytische Promiskuität bei Enzymen, wie bereits von Tawfik und seinen Mitarbeitern beschrieben wurde, deutlich weniger häufig ist, als die Substratpromiskuität, und deshalb auch schwerer in enzymatische Systeme zu implementieren. Die Substratpromiskuität macht sich vorhandene Bindungsmodi des Enzyms und die evolutionär ausgereifte katalytische Machinerie zunutze und ist dergestalt auch deutlich leichter abzurufen bei vorhandenen Enzymen.

## 5. Zusammenfassung

In der hier vorgestellten Arbeit sollte geklärt werden ob und inwieweit man das katalytische Potential von Metalloenzymen nutzen kann um Reaktionen zu katalysieren, welche nicht der natürlichen Reaktion der jeweiligen Enzyme entsprechen. Dabei standen unter anderem die Eisen-bindende Taurin Dioxygenase (TauD) und artifizielle Kupfer-bindenden tHisF Varianten im Fokus der Untersuchungen, wobei beide Enzyme ihre Metallionen Eisen respektive Kupfer über eine HisHisAsp Triade koordinieren. Die Taurin Dioxygenase, welche Teil der Familie der  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen ist, katalysiert die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Taurin welche zur Zersetzung desselbigen unter Freisetzung von Hydrogensulfit und Aminoacetaldehyd führt (Schema 31, Reaktionsgleichung (1)). Anhand der TauD wurde untersucht inwieweit diese genutzt werden kann um Verbindungen zu hydroxylieren, welche strukturell gesehen verwandt sind mit Taurin, jedoch chemisch so verschieden, dass sie sich im Gegensatz zu Taurin durch die Hydroxylierung nicht zersetzen (Schema 31), sodass die Hydroxyfunktion als strukturelles Element des Moleküls erhalten bleibt. Dabei wurde der Fokus auf die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Carbonsäuren gelegt. Es konnte gezeigt werden, dass die TauD in der Lage ist Carbonsäuren zu hydroxylieren, wobei die Reaktionen zwar enantioselektiv verlaufen, mit *ee*-Werten von meist  $> 96 \%$ , die Aktivität jedoch, wie bei nicht-natürlichen Reaktionen üblich, unter derjenigen der natürlichen Reaktion lag und im Falle TauD katalysierten  $\alpha$ -Hydroxylierung auf  $\omega$ -Aminocarbonsäuren beschränkt war. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde eine Aminosäure (F206) im aktiven Zentrum des Enzyms identifiziert, welche durch Mutagenese zur Verbesserung des Enzyms gegenüber den neuen Substraten führten. Diese Mutante TauD F206Y zeigte, neben der erhöhten Aktivität bezüglich der bereits vom Wildtyp akzeptierten Substrate auch ein nochmals erweitertes Substratspektrum, sodass nun auch Carbonsäuren hydroxyliert werden konnten, welche keine terminale Aminofunktion besaßen.



**Schema 31:** Gezeigt wird das Reaktionsspektrum der TauD mit der natürlichen Reaktion (Reaktionsgleichung (1)) und den in dieser Arbeit untersuchten  $\alpha$ -Hydroxylierungen von Taurin-ähnlichen Carbonsäuren.

Im nächsten Schritt der Untersuchungen sollte getestet werden inwieweit Metallzentren in Enzymen als chirale Lewis-Säuren zur Carbonylaktivierung verwendet werden können, wobei hierfür die von Reetz *et al.* entwickelten artifiziellen Kupfer-bindenden tHisF Varianten im Fokus der Untersuchungen standen. Die tHisF, welche natürlicherweise eine Untereinheit der Imidazol-Glycerolphosphat-Synthase des thermophilen Organismus *Thermotoga maritima* ist, wurde dafür von Reetz und seinen Mitarbeitern durch Mutagenese so modifiziert, dass sie ein entsprechendes, zu TauD analoges HisHisAsp Motiv zur Metallbindung enthält. Basierend auf den in diesen Arbeiten hergestellten Varianten der tHisF, wurden in der hier vorliegenden Arbeit weitergehende Untersuchungen zur Lewis-Säure-Katalyse durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Reaktionstypen untersucht wie die Nazarov-Zyklisierung, die Friedel-Crafts Reaktion, die Aldolreaktion so wie die Michael-Addition. Hierbei zeigte sich, dass unter anderem die Lewis Acidität der Metalle in Wasser ein entscheidender Faktor ist, welche im Falle der untersuchten Reaktionen zu gering war um die eigentlichen Reaktionen zu katalysieren. So war für die Nazarov-Zyklisierung und die Friedel-Crafts Reaktion bei keinem der getesteten Substrate eine Produktbildung nachweisbar, während dies für die Michael-Addition und die Aldolreaktion möglich war, deren Produktbildung jedoch nicht Metall-abhängig war. Es zeigte sich somit, dass die Lewis-Säure-Katalyse in enzymatischen Systemen prinzipiell auch in Konkurrenz zur Katalyse der Reaktionen durch Aminosäurereste des verwendeten Enzyms, in Analogie zur Organokatalyse, steht. Speziell zeigte sich dies im Fall der Aldolreaktion, die zu katalysieren die tHisF im Stande war, jedoch nicht basierend auf dem artifiziellen

Metallzentrum. Detaillierte Untersuchungen zeigten anhand von Mutageneseexperimenten, dass hier die Lysin Seitenketten der tHisF die eigentlich aktiven Katalysatoren waren.

Es konnte somit im Rahmen dieser Arbeit anhand der Untersuchungen zur Ausnutzung des katalytischen Potentials von Metalloenzymen gezeigt werden, dass die Ausnutzung alternativer Reaktivitäten deutlich leichter wird, je näher man sich entlang des natürlichen Reaktionspfades bewegt. So konnte zwar die Taurin Dioxygenase genutzt werden um alternative Substrate im Sinne einer Substratpromiskuität zu hydroxylieren, jedoch konnte das Metallzentrum der TauD sowie das Metallzentrum der tHisF nicht genutzt werden um alternative Lewis-Säure-katalysierte Reaktionen im Sinne einer katalytischen Promiskuität zu katalysieren. Diese Beobachtungen unterstreichen die bereits zuvor erwähnten Beobachtungen von Tawfik und seinen Mitarbeitern, nach denen Substratpromiskuität deutlich häufiger in der Natur vorkommt als katalytische Promiskuität.<sup>[126]</sup>

## 6. Anhang

### 6.1. Gensequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme

Im Folgenden sind die Nukelotidsequenzen der verwendeten Gene angegeben. Alle angegebenen Sequenzen sind Sequenzierungsergebnisse von verwendeten oder erstellten Plasmiden. Die Sequenzierung erfolgte wie in Kapitel 2.3.10. beschrieben.

#### 6.1.1. *TauD Wildtyp & Varianten*

##### 6.1.1.1. *TauD Wildtyp\_His<sub>6</sub>*

```
ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTTCTACGCGATCAAGCTATT
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGCCGAATTGCATATTC
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC
TGCGCGAGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTT
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA
TAAACCGTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA
```



### 6.1.1.2. *TauD\_H70A\_His<sub>6</sub>*

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTG  
CGCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGC GA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTTAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

### 6.1.1.3. *TauD\_H70S\_His<sub>6</sub>*

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTT  
CCCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGC GA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTTAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

#### 6.1.1.4. *TauD\_R270A\_His<sub>6</sub>*

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTC  
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATGCGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

#### 6.1.1.5. *TauD\_R270S\_His<sub>6</sub>*

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTC  
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATTCGCGACGATCCTTGGGGAT  
AAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

**6.1.1.6. *TauD\_H70A\_R270A\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTG  
CGCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTGCGGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATGCGGCGACGATCCTTGGGGGA  
TAAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

**6.1.1.7. *TauD\_H70S\_R270A\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGctGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGgtGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCTT  
TACCATGCGgtGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTACGCGATCAAGCTATTAC  
GCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTTCC  
CCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTGACGAGATCATCGTGCTGGATACCC  
ATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTTATT  
GAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGACC  
GGCGGTGATACACTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCTCT  
GTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCGTA  
AATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGCTG  
GCGCGAGGGCGGTGCGGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGAAC  
GCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACTAC  
GCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTTTT  
GTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAACCA  
AATGATATTGCGATTTGgGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGCCG  
ATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATGCGGCGACGATCCTTGGGGATA  
AACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCG  
CACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

**6.1.1.8. *TauD\_H70A\_R270S\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTG  
CGCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATTCGCGACGATCCTTGGGGAT  
AAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

**6.1.1.9. *TauD\_H70S\_R270S\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATT  
CCCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTCCCGGAATACAAATACCGCAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATTCGCGACGATCCTTGGGGAT  
AAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

#### **6.1.1.10. *TauD\_F159L\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTC  
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTTGCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

#### **6.1.1.11. *TauD\_F159Y\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGTCTTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGTTTTGGCGAATTGCATATTC  
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACATTT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGTACCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGCGCGAGGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTTACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTAAAGTTTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGTTTCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGATTTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGTTTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

**6.1.1.12. *TauD\_F206L\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGT'TTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGT'TTTGGCGAATTGCATATTC  
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACAT'TT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGT'TCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGGCGCGAGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTTGACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTTAAGT'TTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGT'TCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGAT'TTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGT'TTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**6.1.1.13. *TauD\_F206Y\_His<sub>6</sub>***

ATGAGTGAACGTCTGAGCATTACCCCGCTGGGGCCGTATATCGGGCGCACAAA  
TTTCGGGTGCCGACCTGACGCGCCCGTTAAGCGATAATCAGTTTGAACAGCT  
TTACCATGCGGTGCTGCGCCATCAGGTGGTGT'TTCTACGCGATCAAGCTATT  
ACGCCGCAGCAGCAACGCGCGCTGGCCCAGCGT'TTTGGCGAATTGCATATTC  
ACCCTGTTTACCCGCATGCCGAAGGGGTGACGAGATCATCGTGCTGGATAC  
CCATAACGATAATCCGCCAGATAACGACAACCTGGCATAACCGATGTGACAT'TT  
ATTGAAACGCCACCCGCAGGGGCGATTCTGGCAGCTAAAGAGTTACCTTCGA  
CCGGCGGTGATACGCTCTGGACCAGCGGTATTGCGGCCCTATGAGGCGCTCT  
CTGTTCCCTTCCGCCAGCTGCTGAGTGGGCTGCGTGCGGAGCATGATTTCCG  
TAAATCGT'TCCCGGAATACAAATACCGCAAAACCGAGGAGGAACATCAACGC  
TGGCGCGAGGCGGTTCGCGAAAAACCCGCCGTTGCTACATCCGGTGGTGCGA  
ACGCATCCGGTGAGCGGTAAACAGGCGCTGTTTGTGAATGAAGGCTACACT  
ACGCGAATTGTTGATGTGAGCGAGAAAGAGAGCGAAGCCTTGTTAAGT'TTT  
TTGTTTGCCCATATCACCAAACCGGAGT'TCAGGTGCGCTGGCGCTGGCAAC  
CAAATGATATTGCGAT'TTGGGATAACCGCGTGACCCAGCACTATGCCAATGC  
CGATTACCTGCCACAGCGACGGATAATGCATCGGGCGACGATCCTTGGGGA  
TAAACCGT'TTTATCGGGCGGGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCC  
GCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

## 6.1.2. *tHisF* WT & Varianten

### 6.1.2.1. *tHisF* Wildtyp

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGTGTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTCTGGA  
TATCACCCGCTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCCACGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCGG  
GAAAAATGGAACATTTCTTTGAAGCCTTCTTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTCACTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGAG  
TACCTCAAAAACACGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAG

### 6.1.2.2. *tHisF* HHD

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCATGA  
TCACACC GCTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCGG  
GAAAAATGGAAGCTTTCTTTGAAGCCTTCTTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAACACCACCACCACCACCTGA

### 6.1.2.3. *tHisF NC*

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTGC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTTCTGGA  
TATCACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGGAAAAGAACAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCGG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTCCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAACACCACCACCACCACACTGA



### **6.1.3. *tHisF Aspartat Knock out Mutanten (Kapitel 3.2.5.1)***

#### **6.1.3.1. *tHisF HHD D11A***

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGCTGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTGCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTTCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCT  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCCG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

#### **6.1.3.2. *tHisF HHD D130A***

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTGCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTTCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCT  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGCTGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCCG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

### **6.1.3.3. *tHisF HHD D11A D130A***

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGCTGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCTGTGGCGATAGCTGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTACCTACTCCGGAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCCG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCCGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGA ACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

### **6.1.3.4. *NC D11A***

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGCTGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCTGGA  
TATCACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCTGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTACCTACTCCGGAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCCG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCCGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGA ACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

**6.1.3.5. NC D130A**

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTTCTGGA  
TATCACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGCTGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGC GG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCCTTGAAGCCTTCCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

**6.1.3.6. NC D11A D130A**

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGCTGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTTCTGGA  
TATCACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGCTGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGC GG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCCTTGAAGCCTTCCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

#### **6.1.4. *tHisF* Mutanten Phosphatbindstellen**

##### **6.1.4.1. *tHisF* HHD M1**

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTTCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTTCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCT  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGTCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTTCGG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGTTCTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAAGTAAAAGAG  
TACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTAA  
TAA

##### **6.1.4.2. *tHisF* HHD M2**

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTTCG  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTTCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCT  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGTCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTTCGG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGTGGTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAAGTAAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

#### 6.1.4.3. *tHisF HHD M3*

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTGC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACTTCGCGGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCT  
TTGGGAGTCAGGCCGTTGTCTGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCGG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTCCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

#### 6.1.4.4. *tHisF HHD M4*

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTGC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGCGGACAAGGTGAGCAT  
AAACTGGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAACCT  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCTGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCGGTGGTGCGG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTCCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGAACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

#### **6.1.4.5. *tHisF HHD M5***

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCTTCGGTGC GG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGA ACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

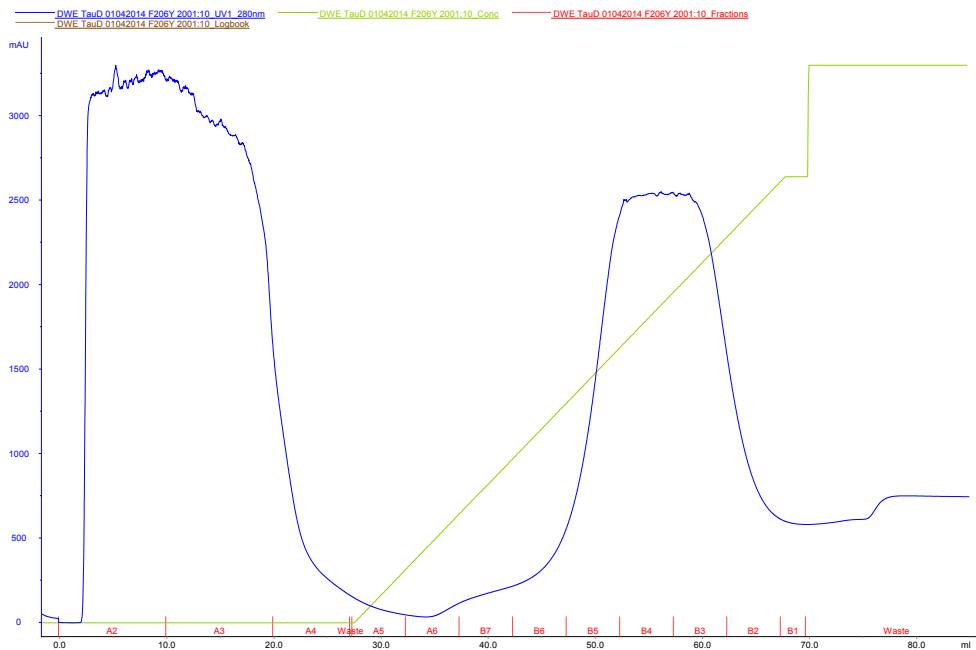
#### **6.1.4.6. *tHisF HHD M6***

CATATGCTCGCTAAAAGAATAATCGCGGCTCTCGATGTGAAAGACGGTCGTG  
TGGTGAAGGGAACGAACTTCGAAAACCTCAGGGACAGCGGTGATCCTGTCC  
AACTGGGAAAAGTTCTATTCCGAAATTTGGAATAGACGAACTCGTITTTTCATGA  
TCACACCGCGTCCGTTGAGAAGAGGAAAACCATGCTGGAACCTGGTCGAAAA  
GGTGGCCGAGCAGATCGACATTCCGTTCACTGTTGGAGGAGGTATCGCCGA  
CTTCGAAACGGCCTCGGAGCTCATTTCTCCGTGGTGC GGACAAGGTGAGCAT  
AAACACGGCGGCTGTGGAGAATCCTTCTTTGATCACACAGATCGCTCAAAC  
TTTGGGAGTCAGGCCGTTGTCGTGGCGATAGATGCAAAAAGAGTGGATGGA  
GAGTTCATGGTCTTCACCTACTCCGAAAAGAAGAACACGGGCATACTTCTGA  
GAGACTGGGTGGTTGAAGTAGAAAAGAGAGGAGCAGGAGAGATCCTGCTC  
ACCAGTATCGACAGAGACGGCACAAAATCGGGTTACGATACGGAGATGATA  
AGGTTCGTGAGGCCACTAACCACACTTCCCATCATCGCTTCCTGGGGTGC GG  
GAAAAATGGAAGCTTTCCTTGAAGCCTTTCCTGGCAGGTGCCGACGCTGCCCT  
TGCGGCTTCTGTCTTTGCCTTCAGAGAGATCGACGTGAGAGA ACTGAAAGA  
GTACCTCAAAAAGCCGGAGTGAACGTGAGACTGGAGGGGTTGCTCGAGTA  
ATAA

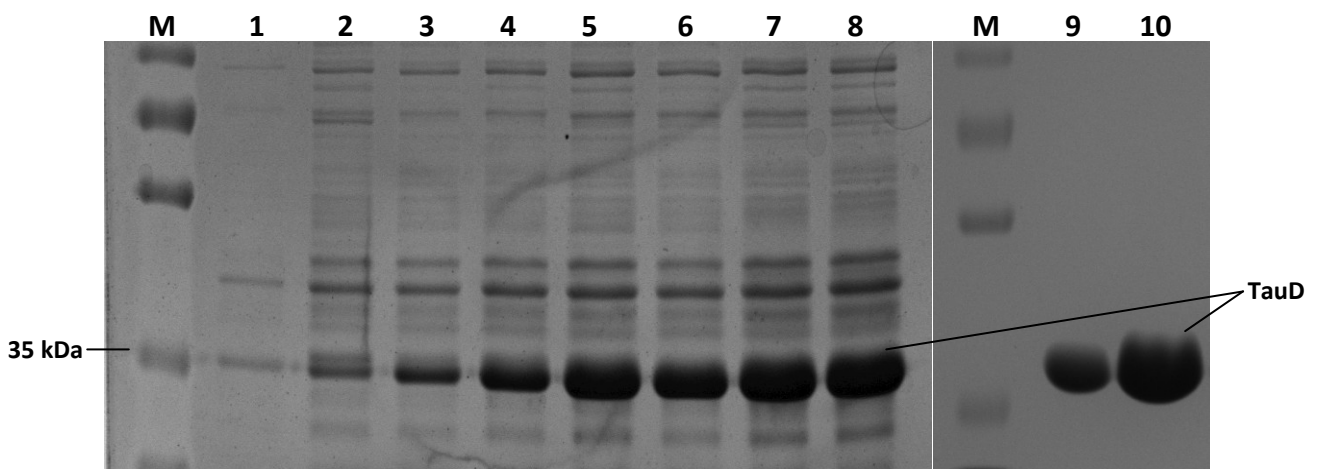
## 6.2. Expression & Aufreinigung

Im Folgenden sind exemplarische SDS-Gele der Expressionen der beiden verschiedenen Enzyme und der Mutanten sowie Äkta-Chromatogramme der entsprechenden Aufreinigungsmethoden angefügt.

### 6.2.1. Äkta Aufreinigung der TauD per Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie



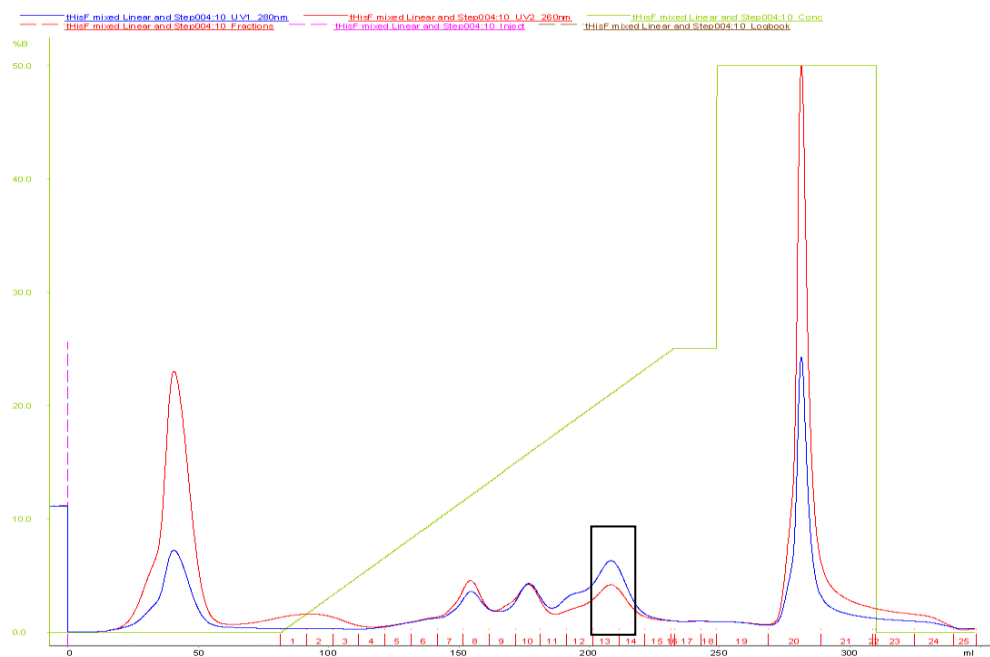
**Abbildung 38:** Äkta-Chromatogramm der Aufreinigung von TauD (Kapitel 2.4.3.1). **Blau:** Signal bei 280 nm; **Grün:** Gradient des Elutionspuffers



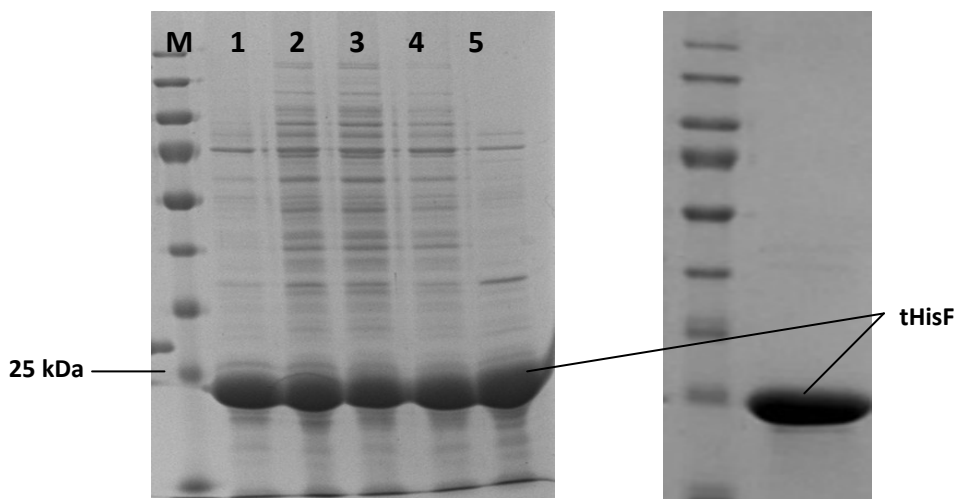
**Abbildung 39:** Exemplarische SDS-Gele (10 %) der Expression der TauD Wildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten (Spur 1-8 zu t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 18, 20, 24 h) per Autoinduktion (Kapitel 2.4.1.2.) (links) und der Aufreinigung per Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie (Spur 9-10). Die Expression der Mutanten erwies sich als äquivalent zum Wildtyp (hier nicht gezeigt).

## 6.2.2. Anionenaustauscherchromatographie der tHisF

Die tHisF wurde auf verschiedenen Wegen aufgereinigt. Dabei erfolgte die Grobaufreinigung nach der Hitzeschockmethode (Kapitel 2.4.3.3.) während die normale Aufreinigung an einem ÄKTA System per Anionenaustauscherchromatographie erfolgte (Kapitel 2.4.3.2.). In Abbildung 40 ist ein exemplarisches Äkta Chromatogramm angefügt, während sich in Abbildung 41 exemplarische SDS-Gele der Expression und Aufreinigung von tHisF Varianten finden.



**Abbildung 40:** ÄKTA-Chromatogramm der Aufreinigung von tHisF HDD (Kapitel 2.4.3.1).



**Abbildung 41:** Exemplarische SDS-Gele (12 %) der Expression der Phosphatbindestellen Mutanten der tHisF (links; M1-M5 nach Grobaufreinigung auf Spur 1 bis 5) und der Aufreinigung per Anionenaustauscherchromatographie (rechts). Die Expression der Mutanten erwies sich als äquivalent zu den Varianten HDD und NC (hier nicht gezeigt).

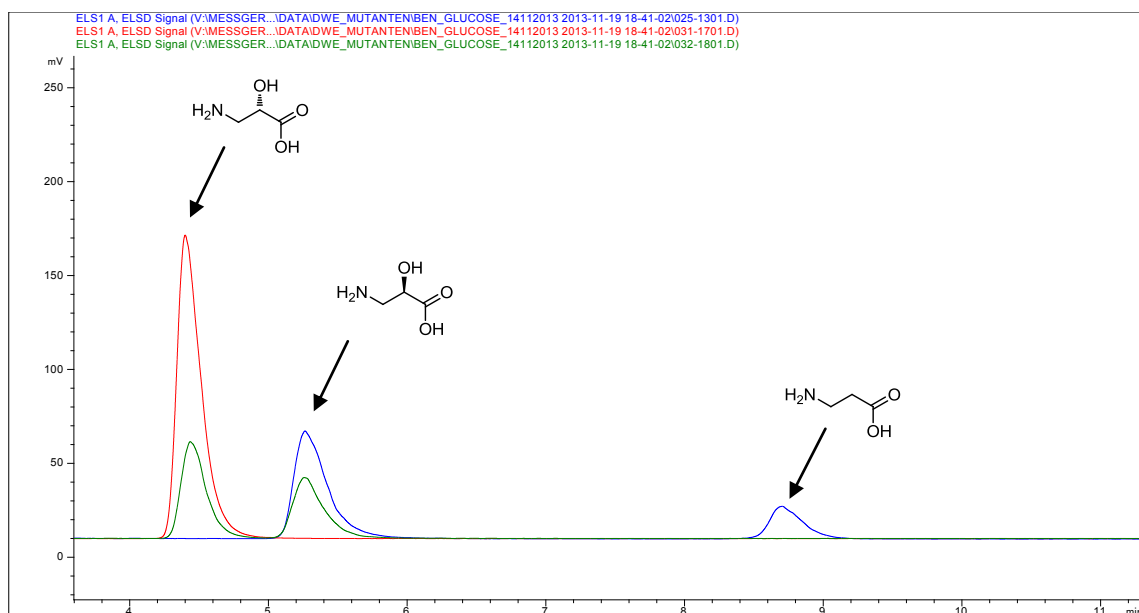


### 6.3. LC-Chromatogramme

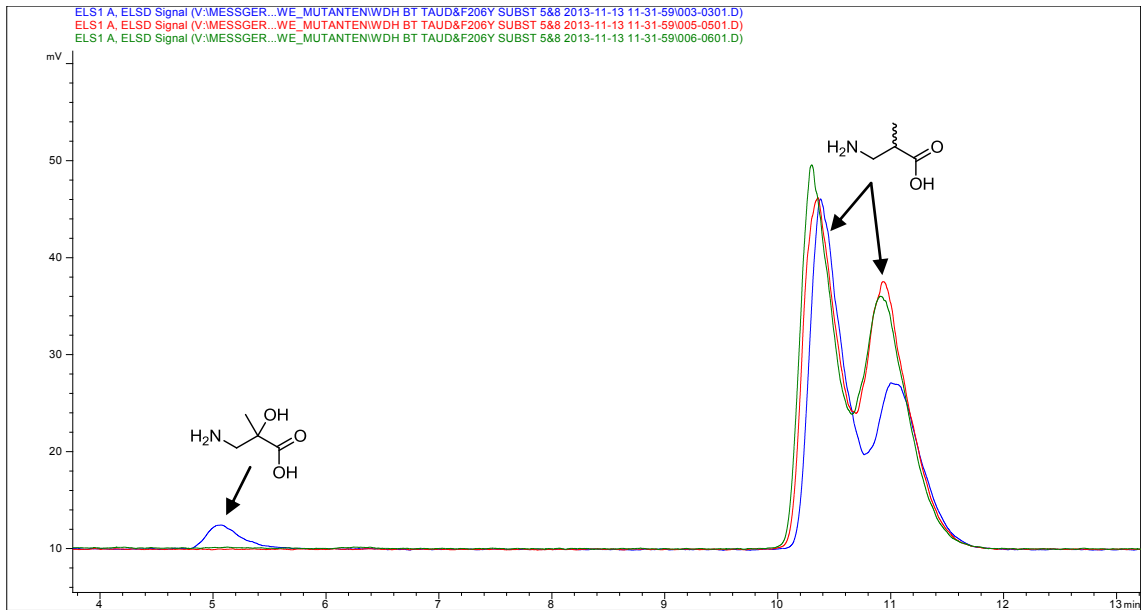
Die Analyse der Biotransformationen der Umsetzungen der alternativen Substrate der TauD erfolgte per HPLC (Kapitel 2.2.2.). Im Folgenden finden sich exemplarische Chromatogramme der Umsetzungen der Analysen.

#### 6.3.1. HPLC-ELSD Chromatogramme

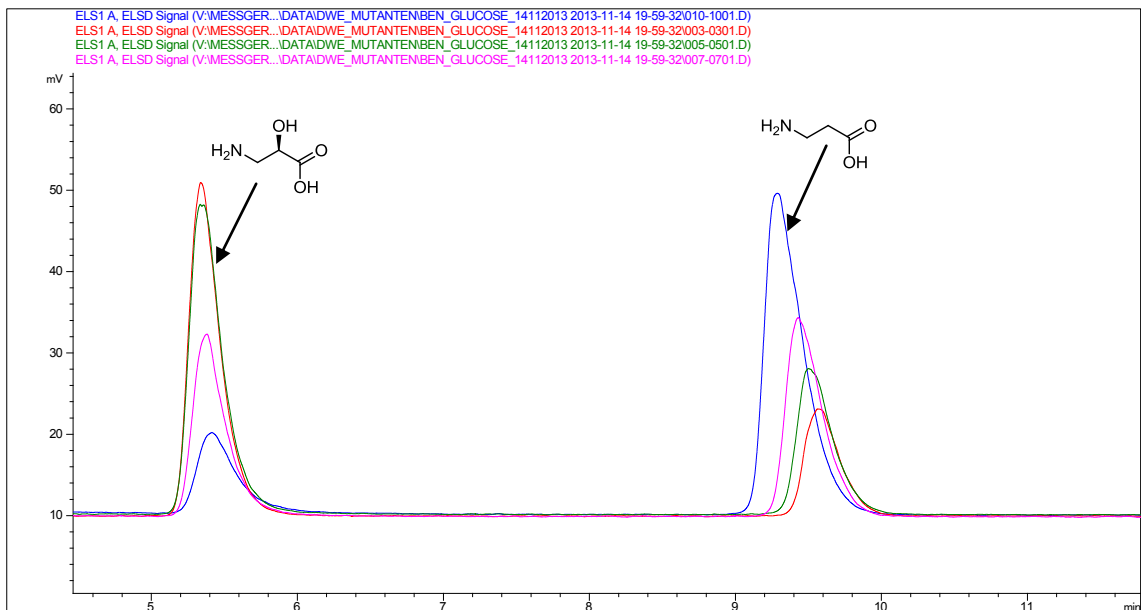
Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.2. beschrieben. Bei den Analysen ist zu beachten, dass aufgrund der physikalischen Begebenheiten der Analysenmethode eine direkte Linearität der Signalfläche zur injizierten Stoffmenge nicht gegeben ist, sodass entsprechende Kalibriergeraden mit entsprechenden Konzentrationsbereichen linearen Verhaltens erstellt werden müssen. Weiterhin sind die Retentionszeiten, vor allem des  $\beta$ -Alanins **51** bei der verwendeten Reprosil Chiral-AA Säule (Reprosil Chiral-AA; 4,6 x 250 mm; 8  $\mu$ m; Dr.Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) über einen langen Meßzeitraum nicht konstant, sodass nach vielen Messungen eine re-Evaluierung der Peaks durch Co-Injektion entsprechender Referenzen erfolgen muss.



**Abbildung 42:** Exemplarisches HPLC-ELSD-Chromatogramm der Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51**. **Blau:** Biotransformation mit TauD F206Y; **Rot:** L-Isoserin **52** Referenz **Grün:** DL-Isoserin **52** Referenz.



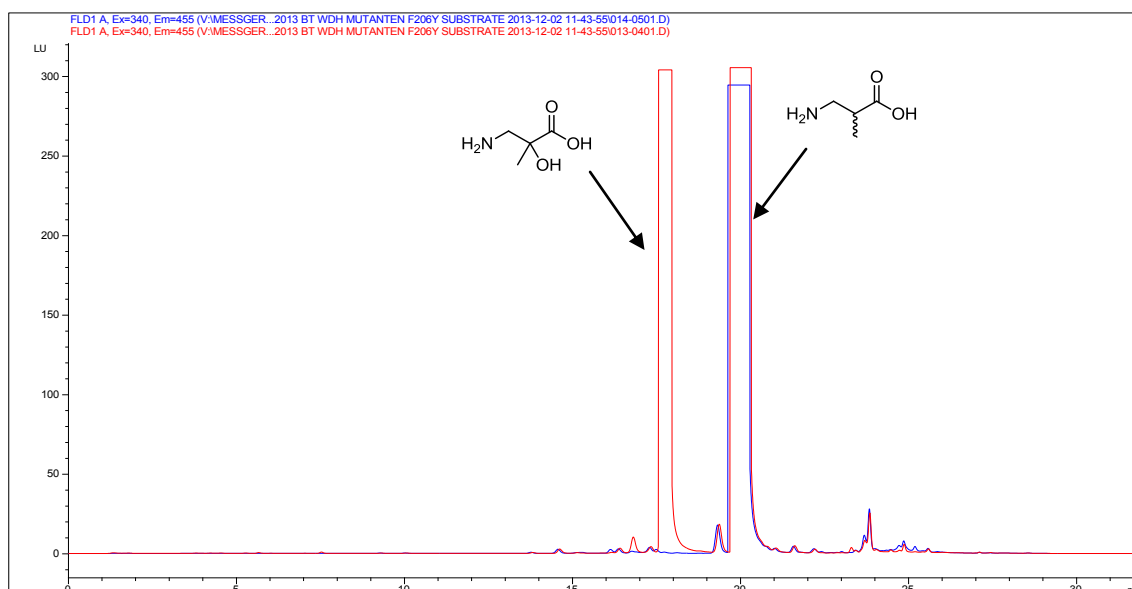
**Abbildung 43:** Exemplarisches HPLC-ELSD-Chromatogramm der Umsetzung von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67**. **Blau:** Biotransformation mit TauD F206Y; **Rot:** Biotransformation mit TauD F206Y ohne  $\alpha$ -Ketoglutarat **Grün:** Biotransformation mit TauD WT.



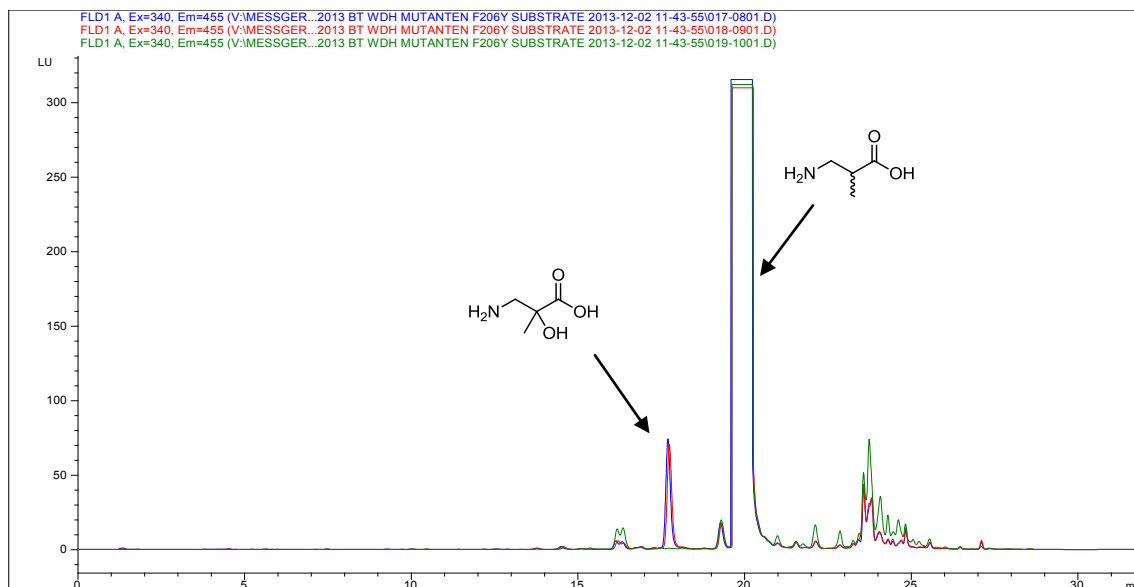
**Abbildung 44:** Exemplarisches HPLC-ELSD-Chromatogramm der Umsetzung von  $\beta$ -Alanin **51** mit der TauD F206Y bei verschiedenen Kpi Pufferkonzentrationen (**Blau:** 100 mM; **Pink:** 50 mM; **Grün:** 20 mM; **Rot:** 10 mM).

### 6.3.2. Umkehrphasen-HPLC zur Analyse derivatisierter zwitterionischer $\omega$ -Aminocarbonsäuren mittels Fluoreszenz Messung

Die Analyse erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.3. beschrieben per OPA Derivatisierung. Im Folgenden finden sich exemplarische Chromatogramme der Umsetzungen von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67** mit der TauD Variante F206Y (Abbildung 45), welche per HPLC-ELSD nachweisbare Umsätze lieferte, sowie mit dem TauD Wildtyp (Abbildung 46), welcher keine per HPLC-ELSD nachweisbaren Umsätze zeigte, jedoch ein geringes Signal in der Fluoreszenzanalyse aufwies, welches dem entsprechenden Produkt der Umsetzung mit der F206Y Variante zuzuordnen ist.



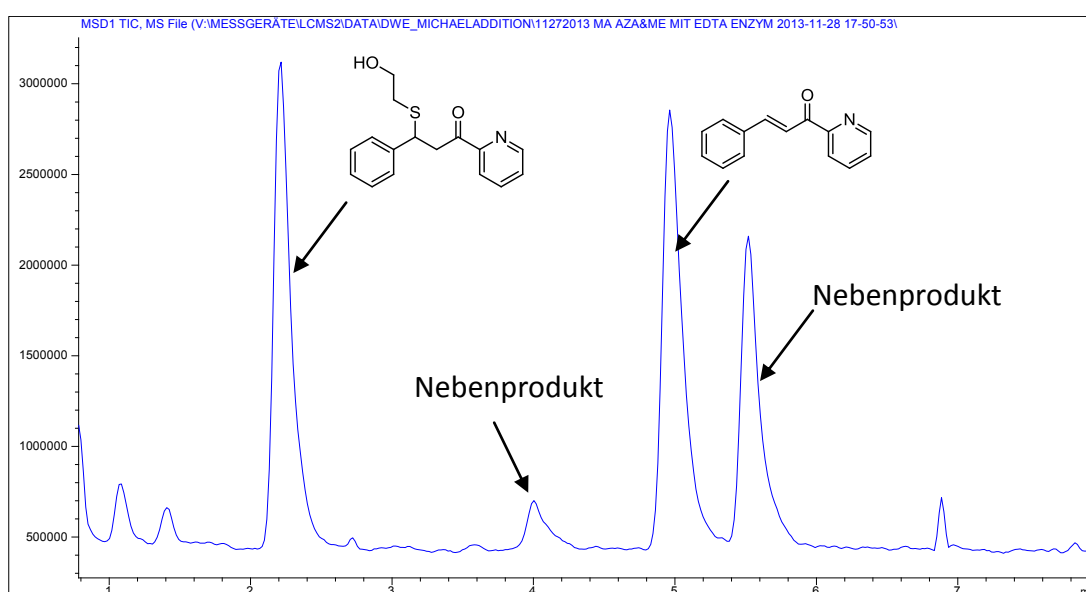
**Abbildung 45:** Exemplarisches HPLC-Chromatogramm der OPA-Fluoreszenz-Analyse der Umsetzung von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -Alanin **67** mit der TauD F206Y Variante. **Blau:**  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67** Referenz **Rot:** Biotransformationen von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -alanin **67** mit  $\alpha$ -Ketoglutarat.



**Abbildung 46:** Exemplarisches HPLC-Chromatogramm der OPA-Fluoreszenz-Analyse der Umsetzung von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -Alanin **67** mit dem TauD Wildtyp. **Blau & Rot:** Biotransformationen von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -Alanin **67** mit  $\alpha$ -Ketoglutarat; **Grün:** Biotransformationen von  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -Alanin **67** mit TauD WT ohne Zugabe von  $\alpha$ -Ketoglutarat (Negativkontrolle).

### 6.3.3. LC-MS Chromatogramm der Michael-Additions-Reaktionen

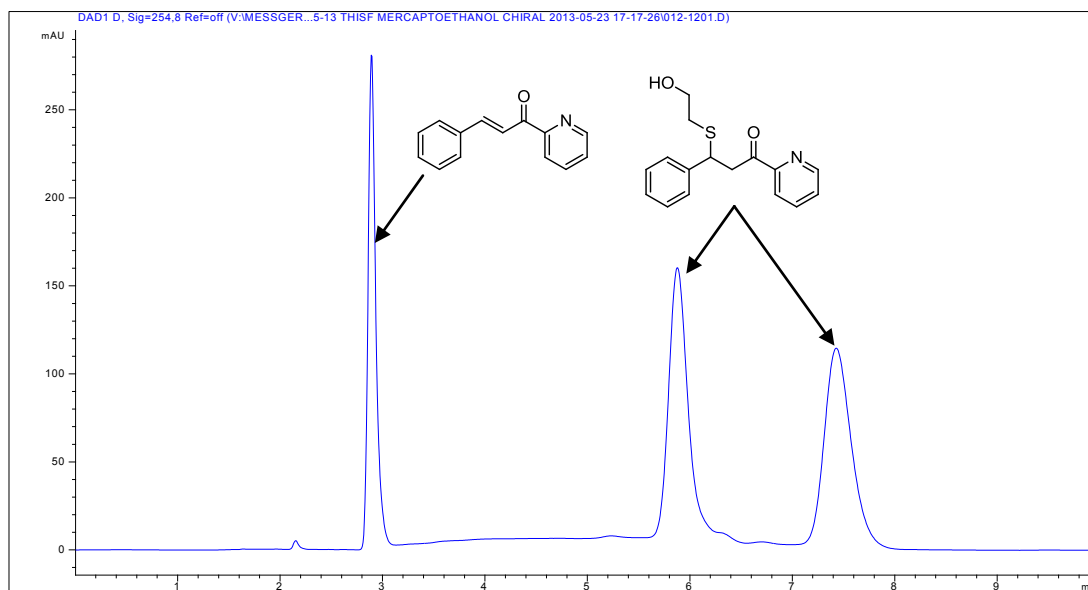
Die Analyse der Michael-Addition von Mercaptoethanol **73** an das Azachalcon **42** erfolgte nach der in Kapitel 2.2.2.6. beschriebenen Methode per LC-MS. Im Folgenden findet sich ein exemplarisches Chromatogramm der Umsetzung der Michael-Addition.



**Abbildung 47:** Exemplarisches LC-MS-Chromatogramm der Umkehrphasen-Analyse der Umsetzung des Azachalcon **42** mit Mercaptoethanol **73**.

### 6.3.1. Chirale Analyse der *t*HisF-katalysierten Michael-Addition

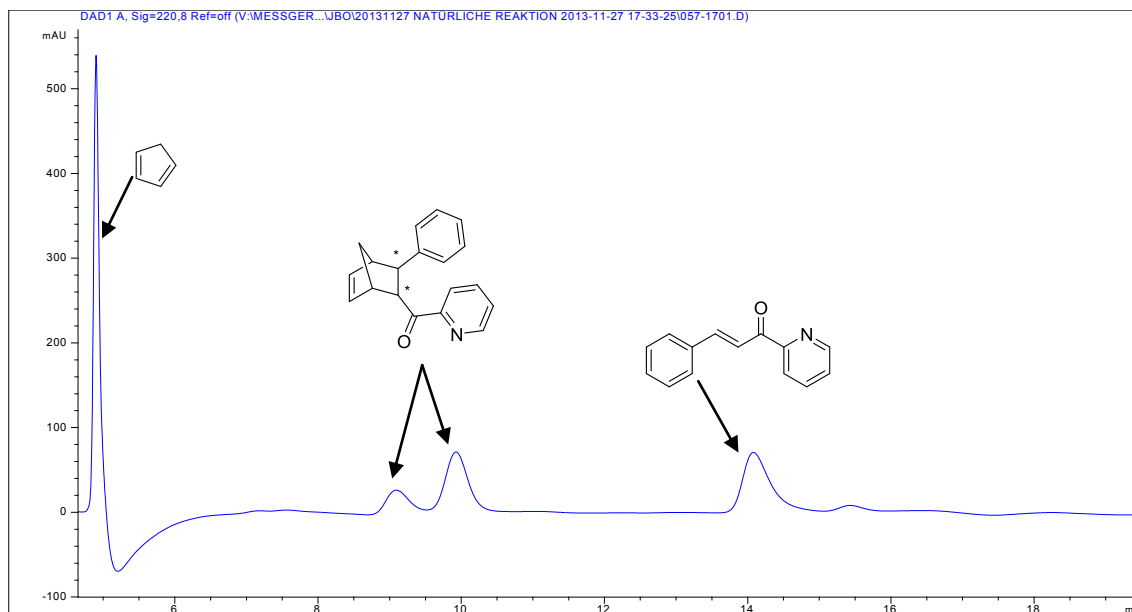
Die chirale Analyse der Michael-Addition des Azachalcons **42** mit Mercaptoethanol **73** (Kapitel 3.2.3.) erfolgte nach der in Kapitel 2.2.2.5. beschriebenen Methode per chiraler HPLC. Im Folgenden findet sich ein exemplarisches Chromatogramm der Umsetzung der Michael-Addition.



**Abbildung 48:** Exemplarisches Chromatogramm der chiralen Analyse der Michael-Addition von Mercaptoethanol **73** an das Azachalcon **42** mit den beiden Enantiomeren des Additionsprodukts und dem Substrat Azachalcon **42**.

### 6.3.2. Chirale Analyse der *t*HisF-katalysierten Diels-Alder-Reaktion

Die Analyse der Diels-Alder-Reaktion des Azachalcons **42** mit Cyclopentadien **43** (Kapitel 3.2.2.) erfolgte nach der in Kapitel 2.2.2.5. beschriebenen Methode per chiraler HPLC. Im Folgenden findet sich ein exemplarisches Chromatogramm der Umsetzung der Michael-Addition.

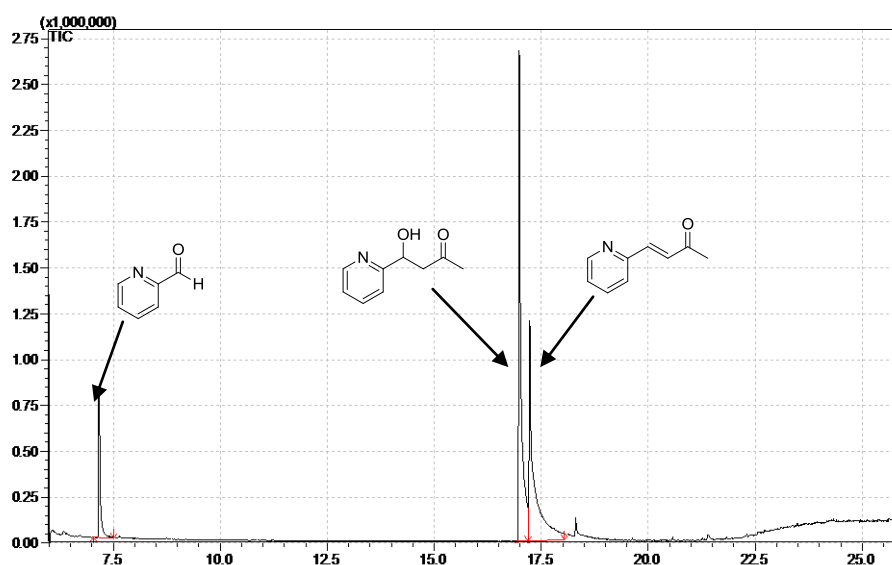


**Abbildung 49:** Exemplarisches Chromatogramm der tHisF HHD katalysierten Diels-Alder Reaktion von Cyclopentadien **43** mit Azachalcon **42**.

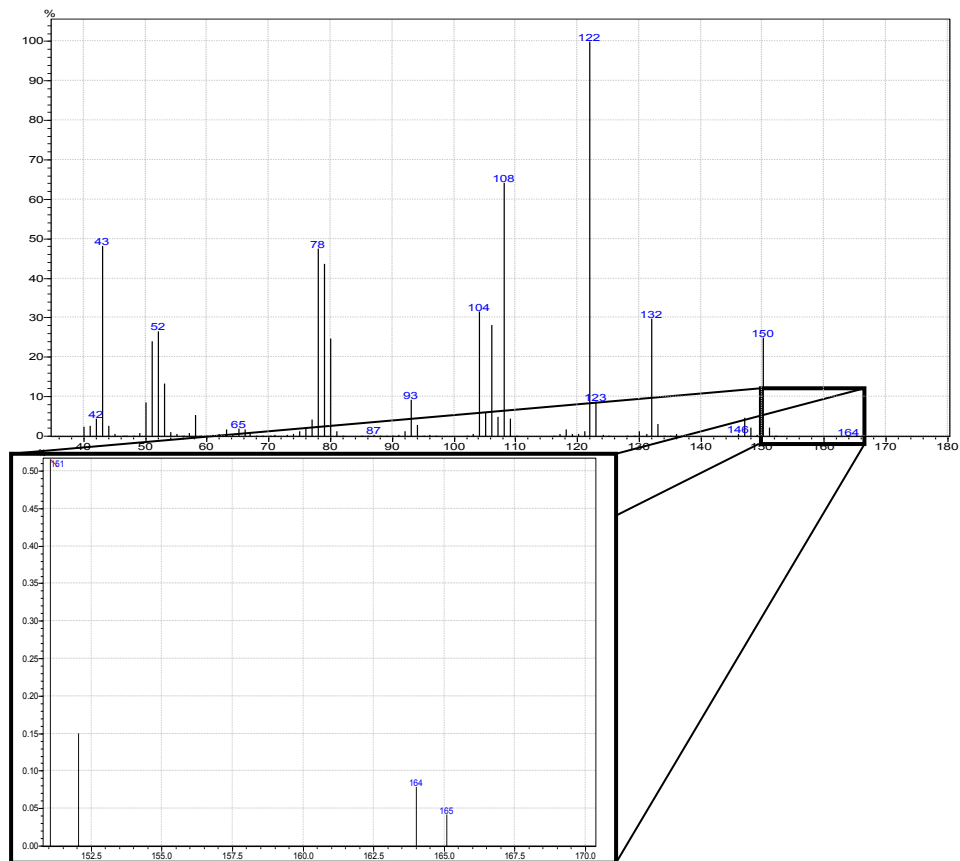
## 6.4. GC/MS Chromatogramme

### 6.4.1. Umsetzungen der Aldolreaktion mit tHisF

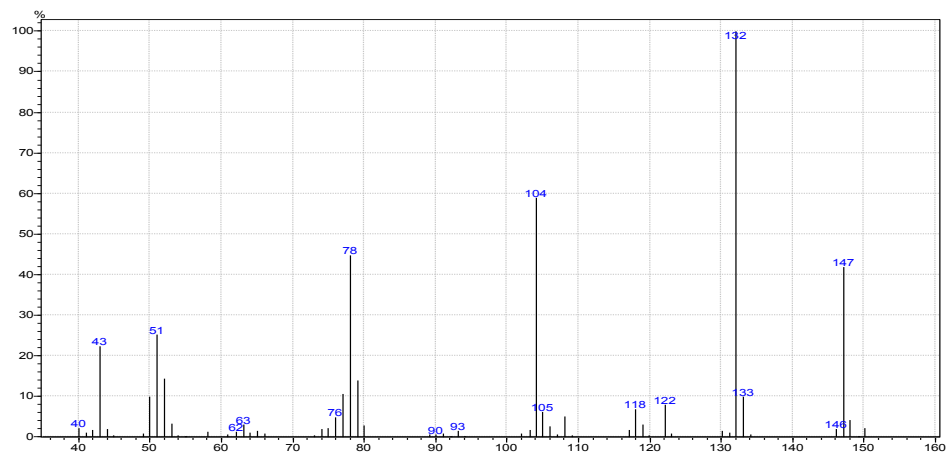
Die Umsetzung der Aldolreaktionen (Kapitel 2.4.10. und Kapitel 3.2.5.) wurden per GC-MS analysiert, wobei im Folgenden ein exemplarisches Chromatogramm der Umsetzung mit den jeweils entsprechenden Massenspektren der Produkte gezeigt ist.



**Abbildung 50:** Exemplarisches GC-Chromatogramm der GC-MS-Analyse der tHisF katalysierten Umsetzung des Pyridincarbaldehyds **45** mit Aceton **46**.



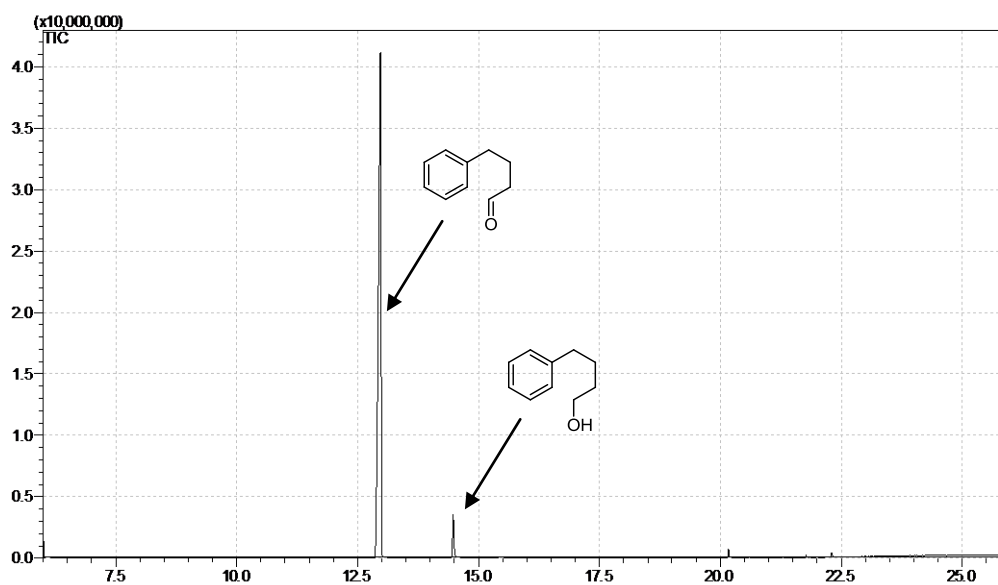
**Abbildung 51:** MS-Fragmentierungsmuster des Additionsprodukts der Aldolreaktion von Pyridincarbaldehyd **45** und Aceton **46**.



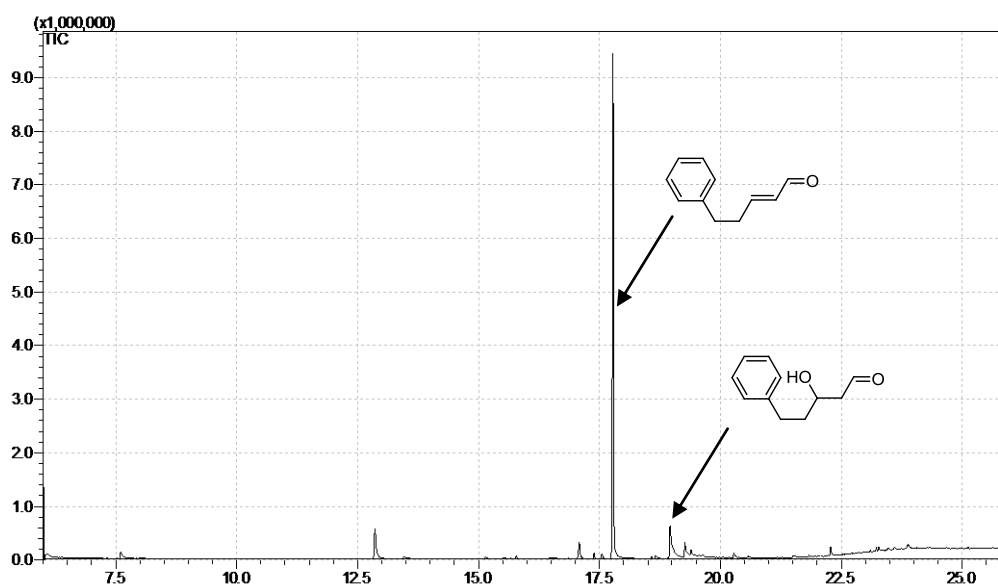
**Abbildung 52:** MS-Fragmentierungsmuster des Kondensationsprodukts der Aldolreaktion von Pyridincarbaldehyd **45** und Aceton **46**.

### 6.4.2. GC-MS Analyse der Friedel-Crafts Reaktionen

Die Umsetzung der neuen Reaktionen wurden per GC-MS analysiert. Im Folgenden finden sich exemplarische Chromatogramme der Umsetzungen der getesteten Substrate (Kapitel 3.2.4.).



**Abbildung 53:** Exemplarisches Chromatogramm der Umsetzung des 4-Phenylbutyraldehyds **77** im Zuge der tHisF katalysierten Friedel-Crafts-Reaktion, mit dem Substrat 4-Phenylbutyraldehyd **77** und dem gebildeten Nebenprodukt dem 4-Phenylbutanol **108**.



**Abbildung 54:** Exemplarisches Chromatogramm der Umsetzung des 4-Phenylbut-2-enal **95** im Zuge der tHisF katalysierten Friedel-Crafts-Reaktion, mit dem Substrat 4-Phenylbut-2-enal **95** und dem gebildeten Wasser-Additionsprodukt **109**.



## 7. Literaturverzeichnis

- [1] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2011**.
- [2] M. Braun, O. Teichert, A. Zweck, *Biokatalyse in Der Industriellen Produktion - Fakten Und Potenziale Zur Weißen Biotechnologie*, Düsseldorf, **2006**.
- [3] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chemie* **2014**, *126*, 3132–3158.
- [4] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–94.
- [5] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chemie* **2004**, *116*, 806–843.
- [6] R. Patel, *Biomolecules* **2013**, *3*, 741–777.
- [7] R. N. Patel, *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 305–325.
- [8] T. Reichstein, A. Grüssner, *Helv. Chim. Acta* **1934**, *17*, 311–328.
- [9] L. Rosenthaler, *Biochem. Z.* **1908**, *14*, 238–253.
- [10] C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.* **1921**, *115*, 282 – 310.
- [11] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, a Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–68.
- [12] P.-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, E. M. Papamichael, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1846–59.
- [13] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, a. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, et al., *Science (80-. )*. **2010**, *329*, 305–309.
- [14] B. de Lange, D. J. Hyett, P. J. D. Maas, D. Mink, F. B. J. van Assema, N. Sereinig, A. H. M. de Vries, J. G. de Vries, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 289–292.

- [15] S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. a. Sheldon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 81.
- [16] N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285–8.
- [17] W. P. C. Stemmer, *Nature* **1994**, *370*, 389–390.
- [18] F. H. Arnold, *Chem. Eng. Sci.* **1996**, *51*, 5091–5102.
- [19] O. Kuchner, F. H. Arnold, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 523–30.
- [20] M. T. Reetz, *Angew. Chemie* **2011**, *123*, 144–182.
- [21] M. T. Reetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5716–22.
- [22] M. T. Reetz, P. Soni, L. Fernández, Y. Gumulya, J. D. Carballeira, *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, *46*, 8657–8.
- [23] S. Lutz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 734–43.
- [24] T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 1-6
- [25] M. Ronaghi, *Cold Spring Harb. Lab. Press* **2001**, *11*, 3–11.
- [26] J. C. Venter, K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. a Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, et al., *Science* **2004**, *304*, 66–74.
- [27] F. Duarte, B. A. Amrein, S. C. L. Kamerlin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 11160–77.
- [28] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chemie* **2004**, *116*, 6156–6165.
- [29] R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195–201.
- [30] K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231–8.
- [31] O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498–508.

- [32] L. C. James, D. S. Tawfik, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 361–8.
- [33] A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, S. McQ Gould, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 73–6.
- [34] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471–505.
- [35] S. Copley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265–272.
- [36] A. C. Babbie, S. Bandyopadhyay, L. F. Olguin, F. Hollfelder, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 3692–4.
- [37] A. Babbie, N. Tokuriki, F. Hollfelder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 200–7.
- [38] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 91–105.
- [39] D. S. Tawfik, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 692–6.
- [40] M. E. Glasner, J. a Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 492–7.
- [41] J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 209–246.
- [42] R. A. Jensen, *Ann. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409–425.
- [43] K. Voordeckers, C. a Brown, K. Vanneste, E. van der Zande, A. Voet, S. Maere, K. J. Verstrepen, *PLoS Biol.* **2012**, *10*, e1001446.
- [44] S. G. Peisajovich, D. S. Tawfik, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 991–4.
- [45] C. Branney, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874–5.
- [46] P. Carlqvist, M. Svedendahl, C. Branney, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *ChemBiochem* **2005**, *6*, 331–6.
- [47] O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun. (Camb)*. **2004**, *435*, 1724–5.
- [48] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. für Prakt. Chemie/Chemiker-Zeitung* **1997**, *339*, 381–384.

- [49] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, *339*, 307–10.
- [50] P. S. Coelho, Z. J. Wang, M. E. Ener, S. a Baril, A. Kannan, F. H. Arnold, E. M. Brustad, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 485–7.
- [51] Z. J. Wang, H. Renata, N. E. Peck, C. C. Farwell, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Angew. Chemie* **2014**, *126*, 1–5.
- [52] D. Qi, C. M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081–111.
- [53] R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643–11652.
- [54] M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, M. Maywald, *Chim. Int. J. Chem.* **2002**, *56*, 721–723.
- [55] R. R. Davies, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11643–11652.
- [56] D. Qi, C. M. Tann, D. Haring, M. D. Distefano, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3081–111.
- [57] M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, M. Maywald, *Chim. Int. J. Chem.* **2002**, *56*, 721–723.
- [58] I. D. Kuntz, K. Chen, K. a Sharp, P. a Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9997–10002.
- [59] R. L. Baughn, O. Adalsteinsson, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 306–307.
- [60] M. Skander, C. Malan, A. Ivanova, T. R. Ward, *Chem. Comm.* **2005**, 4815–4817.
- [61] J. Collot, J. Gradinaru, N. Humbert, M. Skander, A. Zocchi, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9030–1.
- [62] M. Skander, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Loosli, A. Zocchi, T. R. Ward, C.-Neucha, **2008**, 14411–14418.
- [63] G. Klein, N. Humbert, J. Gradinaru, A. Ivanova, F. Gilardoni, U. E. Rusbandi, T. R. Ward, *Angew. Chem* **2005**, *117*, 7942–7945.
- [64] K. Yamamura, E.T. Kaiser *Chem. Comm.*, **1976**, 830–831.

- [65] T. Kokubo, T. Sugimoto, T. Uchida, S. Tanimoto, M. Okano, **1983**, 769–770.
- [66] J. H. Mills, S. D. Khare, J. M. Bolduc, F. Forouhar, V. K. Mulligan, S. Lew, J. Seetharaman, L. Tong, B. L. Stoddard, D. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13393–9.
- [67] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413–44.
- [68] C. J. Noren, S. J. Anthony-cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, I. April, *Science*, **1989**, *244*, 182–188.
- [69] J. M. Dunwell, A. Purvis, S. Khuri, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 7–17.
- [70] S. Khuri, F. T. Bakker, J. M. Dunwell, *Mol. Biol. Evol.* **2001**, *18*, 593–605.
- [71] E. Woo, J. M. Dunwell, P. W. Goodenough, A. C. Marvier, R. W. Pickersgill, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1036–1040.
- [72] R. P. Hausinger, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 21–68.
- [73] A. G. Prescott, M. D. Lloyd, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 367–383.
- [74] C. J. Schofield, Z. Zhang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 722–31.
- [75] T. Kanzaki, Y. Fujisawa, *Adv. Appl. Microbiol.* **1976**, *20*, 159–201.
- [76] M. J. Rollins, D. W. S. Westlake, S. Wolfe, S. E. Jensen, *Can. J. Microbiol.* **1988**, *34*, 1196–1202.
- [77] J. Cortés, J. F. Martín, J. M. Castro, L. Láiz, P. Liras, *J. Gen. Microbiol.* **1987**, *133*, 3165–3174.
- [78] L. Crawford, A. M. Stephan, P. C. McAda, J. A. Rambosek, C. M. J., V. A. Vinci, C. D. Reeves, *Nature* **1995**, *13*, 58–62.
- [79] K. Valegard, A. C. Terwisscha van Scheltinga, M. D. Lloyd, T. Hara, S. Ramaswamy, A. Perrakisk, A. Thompsonk, H. Lee, J. E. Baldwin, C. J. Schofield, et al., *Nature* **1998**, *394*, 804–809.
- [80] H. Kataoka, Y. Yamamoto, M. Sekiguchi, *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 1301–1307.

- [81] L. Aravind, E. V Koonin, *Genome Biol.* **2001**, *2*, RESEARCH0007.
- [82] S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, **2002**, *419*, DOI 10.1038/nature01047.1.
- [83] Y. Mishina, C. He, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8730–1.
- [84] E. Eichhorn, J. R. van der Ploeg, M. a Kertesz, T. Leisinger, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23031–6.
- [85] C. Klein, W. Hüttel, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1375–1383.
- [86] T. Shibusaki, H. Mori, A. Ozaki, *J. Synth. Org. Chem. Japan* **1999**, *57*, 523–531.
- [87] J. R. van der Ploeg, M. a Weiss, E. Saller, H. Nashimoto, N. Saito, M. a Kertesz, T. Leisinger, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5438–46.
- [88] R. J. Huxtable, *Am. Physiol. Soc.* **1992**, *72*, 101–142.
- [89] J. M. Elkins, M. J. Ryle, I. J. Clifton, J. C. D. Hotopp, J. S. Lloyd, N. I. Burzlaff, J. E. Baldwin, R. P. Hausinger, P. L. Roach, *Biochemistry* **2002**, *41*, 5185–5192.
- [90] J. R. O'Brien, D. J. Schuller, V. S. Yang, B. D. Dillard, W. N. Lanzilotta, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5548–5554.
- [91] E. Kalliri, P. K. Grzyska, R. P. Hausinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 191–7.
- [92] P. K. Grzyska, M. J. Ryle, G. R. Monterosso, J. Liu, D. P. Ballou, R. P. Hausinger, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3845–55.
- [93] J. C. Price, E. W. Barr, B. Tirupati, J. M. Bollinger, C. Krebs, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7497–508.
- [94] J. C. Price, E. W. Barr, L. M. Hoffart, C. Krebs, J. M. Bollinger, *Biochemistry* **2005**, *44*, 8138–47.
- [95] P. K. Grzyska, E. H. Appelman, R. P. Hausinger, D. a Proshlyakov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 3982–7.

- [96] P. K. Grzyska, R. P. Hausinger, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 10087–92.
- [97] J. C. Price, E. W. Barr, T. E. Glass, C. Krebs, J. M. Bollinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13008–9.
- [98] S. Beismann-Driemeyer, R. Sterner, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20387–96.
- [99] H. Zalkin, J. L. Smith, in *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, John Wiley & Sons, Inc., **1998**, pp. 87–144.
- [100] F. Massière, M.-A. Badet-Denisot, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 205–222.
- [101] D. Lang, R. Thoma, M. Henn-Sax, R. Sterner, M. Wilmanns, *Science*, **2000**, *289*, 1546–1550.
- [102] J. Podtetenieff, A. Taglieber, E. Bill, E. J. Reijerse, M. T. Reetz, *Angew. Chemie* **2010**, *122*, 5277–5281.
- [103] M. T. Reetz, M. Rentzsch, A. Pletsch, A. Taglieber, F. Hollmann, R. J. G. Mondière, N. Dickmann, B. Höcker, S. Cerrone, M. C. Haeger, et al., *Chembiochem* **2008**, *9*, 552–64.
- [104] R. Thoma, G. Obmolova, D. A. Lang, M. Schwander, P. Jenö, *FEBS Lett.* **1999**, *454*.
- [105] A. Leaver-fay, M. Tyka, S. M. Lewis, F. Lange, J. Thompson, R. Jacak, K. Kaufman, P. D. Renfrew, C. A. Smith, W. Sheffler, et al., **2011**, *487*, 545–574.
- [106] J. Kirchmair, G. Wolber, C. Laggner, T. Langer, *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1848–61.
- [107] J. Boström, J. R. Greenwood, J. Gottfries, *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, *21*, 449–62.
- [108] D. Kutlán, P. Presits, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* **2002**, *949*, 235–48.
- [109] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. a Erlich, *Science* **1988**, *239*, 487–91.
- [110] J. Sambrook, D. W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, **2000**.

- [111] F. Sanger, S. Nicklen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [112] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680 – 685.
- [113] G. L. Ellman, *Arch. . Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
- [114] J. B. Johnston, K. Murray, R. B. Cain, *Antonie Van Leeuwenhoek* **1975**, *41*, 493–511.
- [115] P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner, *Methods Enzymol.* **1983**, *91*, 49–60.
- [116] G. P. McMahon, R. O’Kennedy, M. T. Kelly, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1287–94.
- [117] Gouesnard J.-P., *Bull. La Société Chimique Fr.* **1988**, *1*, 88 – 94.
- [118] M. Humenik, Y. Huang, I. Safronov, M. Sprinzl, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4218–24.
- [119] K. P. McCusker, J. P. Klinman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 19791–5.
- [120] K. P. McCusker, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5114–20.
- [121] K. D. Welch, T. Z. Davis, S. D. Aust, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *397*, 360–9.
- [122] J. Podtetenieff, A. Taglieber, E. Bill, E. J. Reijerse, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 5151–5.
- [123] M. Svedendahl, K. Hult, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988–9.
- [124] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6032–40.
- [125] M. S. Humble, P. Berglund, *European J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3391–3401.
- [126] O. Khersonsky, S. Malitsky, I. Rogachev, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2011**, *50*, 2683–90.
- [127] I. Müller, Strukturuntersuchungen Zum Reaktionsmechanismus an Der Alkylsulfatase AtsK Aus Pseudomonas Putida S-313, Georg-August-Universität zu Göttingen, **2003**.



- [128] R. J. Yu, E. J. Van Scott, *J. Cosmet. Dermatol.* **2004**, *3*, 76–87.
- [129] D. A. Evans, M. M. Morrissey, R. L. Dorow, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4346–4348.
- [130] W. Adam, F. Heckel, C. R. Saha-mo, P. Schreier, **2002**, *661*, 17–29.
- [131] W. Adam, W. Boland, J. Hartmann-Schreier, H. Humpf, M. Lazarus, A. Saffert, C. R. Saha-mo, R. V April, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11044–11048.
- [132] M. Hamberg, I. Ponce de Leon, M. J. Rodriguez, C. Castresana, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 169–74.
- [133] M. Hamberg, I. Ponce, D. León, A. Sanz, C. Castresana, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *69*, 363–374.
- [134] M. Landwehr, L. Hochrein, C. R. Otey, A. Kasrayan, J.-E. Bäckvall, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6058–9.
- [135] M. Girhard, S. Schuster, M. Dietrich, P. Dürre, V. B. Urlacher, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 114–9.
- [136] G. Dinos, D. N. Wilson, Y. Teraoka, W. Szaflarski, P. Fucini, D. Kalpaxis, K. H. Nierhaus, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 113–24.
- [137] M. K. Kharel, B. Subba, D. B. Basnet, J. S. Woo, H. C. Lee, K. Liou, J. K. Sohng, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *429*, 204–14.
- [138] A. Czerwinski, H. Wojciechowska, A. R. Andruszkiewicz, J. Grzybowska, J. Gumeniak, E. Borowski, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1983**, *XXXVI*, 1001–1006.
- [139] U. Kristiansen, A. Hedegaard, T. Herdeis, T. M. Lund, B. Nielsen, J. J. Hansen, E. Falch, H. Hjeds, P. Krogsgaard-larsen, *J. Neurochem.* **1992**, *58*, 1150–1159.
- [140] J. E. Cronan, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 1291–1297.
- [141] O. H. Emerson, P. L. Kirk, L. Carl, A. Schmidt, *J. Biol. Chem* **1931**, 449–452.

- [142] R. Tsai, B. Testa, P. Carrupt, *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. 2* **1991**, 01, 1797–1802.
- [143] G. Roelfes, *ChemCatChem* **2011**, 3, 647–648.
- [144] A. J. Boersma, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Angew. Chemie* **2009**, 121, 3396–3398.
- [145] J. Bos, G. Roelfes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 135–143.
- [146] C. Li, X.-W. Feng, N. Wang, Y.-J. Zhou, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2008**, 10, 616.
- [147] J.-L. Wang, J.-M. Xu, Q. Wu, D.-S. Lv, X.-F. Lin, *Tetrahedron* **2009**, 65, 2531–2536.
- [148] K.-L. Xu, Z. Guan, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2011**, 71, 108–112.
- [149] L.-W. Xu, J.-W. Li, C.-G. Xia, S.-L. Zhou, X.-X. Hu, *Synlett* **2003**, 2425–2427.
- [150] V. K. Aggarwal, A. J. Belfield, *Org. Lett.* **2003**, 5, 5075–8.
- [151] M. Kokubo, S. Kobayashi, *Chem. Asian J.* **2009**, 4, 526–8.
- [152] K. Manabe, Y. Mori, T. Wakabayashi, S. Nagayama, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7202–7207.
- [153] S. Kobayashi, C. Ogawa, *Chemistry* **2006**, 12, 5954–60.
- [154] S. Kobayashi, S. Nagayama, T. Busujima, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8287–8288.
- [155] S. Kobayashi, K. Manabe, *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1373–1380.
- [156] S. Kobayashi, I. Hachiya, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3590–3596.
- [157] S. Otto, F. Bertocin, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7702–7707.
- [158] S. Otto, G. Boccaletti, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4238–4239.
- [159] K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5260–7.
- [160] J. Kofoed, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Chem. Commun. (Camb)*. **2006**, 45, 1482–4.
- [161] B. List, *Tetrahedron* **2002**, 58, 5573–5590.

- [162] S. Bahmanyar, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11273–83.
- [163] A. Bassan, W. Zou, E. Reyes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 7028–7032.
- [164] T. Machajewski, C. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1352–1375.
- [165] A. Heine, G. DeSantis, J. G. Luz, M. Mitchell, C. H. Wong, I. a Wilson, *Science* **2001**, *294*, 369–74.
- [166] A. Córdova, W. Zou, P. Dziedzic, I. Ibrahim, E. Reyes, Y. Xu, *Chemistry* **2006**, *12*, 5383–97.
- [167] A. Córdova, W. Zou, I. Ibrahim, E. Reyes, M. Engqvist, W.-W. Liao, *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 3586–8.
- [168] M. Amedjkouh, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1411–1414.
- [169] M. Lombardo, S. Easwar, F. Pasi, C. Trombini, D. D. Dhavale, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9203–9207.
- [170] Y. Watanabe, K. Sawada, M. Hayashi, *Green Chem.* **2010**, *12*, 384.
- [171] D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 447–70.
- [172] D. Baker, *The Scientist* **2006**, 26–32.
- [173] P. J. Deuss, R. den Heeten, W. Laan, P. C. J. Kamer, *Chemistry* **2011**, *17*, 4680–98.
- [174] B. Höcker, *Nature* **2012**, *491*, 204 – 205.
- [175] B. Höcker, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 224–5.
- [176] N. Koga, R. Tatsumi-Koga, G. Liu, R. Xiao, T. B. Acton, G. T. Montelione, D. Baker, *Nature* **2012**, *491*, 222–227.
- [177] M. Creus, T. R. Ward, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1835–44.
- [178] F. Rosati, G. Roelfes, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 916–927.

## Lebenslauf von Dennis Wetzl

---

**Adresse:** Ziegelstraße 16  
73249 Wernau  
Deutschland

**Nationalität:** deutsch

**Geburtsdatum:** 21. April 1986

**e-mail:** [dennis\\_wetzl@arcor.de](mailto:dennis_wetzl@arcor.de)

### Ausbildung

---

- Okt. 2010 - Mai 2014** **Doktorarbeit im Fachbereich Chemie**  
Arbeiten zum Thema „Untersuchungen zur Bestimmung des inhärenten katalytischen Potentials von Metall-bindenden Enzymen“ unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Technische Biochemie.
- Feb. 2010 - Juli 2010** **Diplomarbeit**  
Durchführung am Institut für Technische Biochemie unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Hauer mit dem Titel „Klonierung, Expression, Charakterisierung und Optimierung mikrobieller Dehydratasen“.
- Okt. 2007 - Dez. 2009** **Universität Stuttgart**  
Hauptstudium der Chemie mit den Prüfungsfächern Organische Chemie, Anorganische Chemie, Physikalische Chemie und Technische Biochemie.  
  
Diplom „mit Auszeichnung“, Note 1,0
- Okt. 2005 - Okt. 2007** **Universität Tübingen**  
Grundstudium der Chemie
- Sept. 1996 - Juni 2005** **Gymnasium**  
Besuch des Gymnasiums Plochingen