

Asparaginsäure-vermittelte enzymatische Reaktionen

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

Vorgelegt von
Lisa C. Kühnel
aus Herrenberg

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Bernd Plietker
Vorsitzender:	Prof. Dr. Albert Jeltsch

Tag der mündlichen Prüfung:	12.05.2016
-----------------------------	------------

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

-2016-

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Asparaginsäure-vermittelte enzymatische Reaktionen“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled “Aspartic acid-mediated enzymatic reactions” is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 20.05.2016

Lisa C. Kühnel

Danksagung

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Bernhard Hauer für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung während allen Hochs und Tiefs meiner Dissertation. Dabei möchte ich mich vor allem für die positiven Lichtblicke und Motivation bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Bettina Nestl, für die ausgezeichnete Betreuung schon seit der Diplomarbeit, für ein offenes Ohr und wertvolle Tipps, auch wenn der Tag schon 48 Stunden hatte.

Auch möchte ich Dr. Bernd Nebel danken, für den unermüdlichen Einsatz am gesamten Institut und vor allem bei Fragestellungen bezüglich der Analytik.

Danke an Jule, Schnecki, Sumi und Daniel, die mir meinen Start am ITB sehr angenehm machten und mich immer unterstützt haben, persönlich wie auch im Labor. Christine und Philipp (die Schellybellis) danke ich für jegliche Hilfe bei molekularbiologischen Laborarbeiten. Marko Kirtz danke ich für sein großes Verständnis, die noch größere Geduld, sinnlose Fragen zu diskutieren (Schicksal & Co.) und Ratschläge für alle Lebenslagen.

Meinem stets gut gelaunten Laborpartner Sebastian Löw danke ich für chemische Diskussionen und zahlreiche Ratschläge im Labor und vor allem zusammen mit Philipp Trauzettel für großartige Abende in Stuttgart wie auch in Hamburg.

Durch meine wechselnden Arbeitsplätze innerhalb des Labors, bin ich vor allem Martin Weissenborn, Sara Hoffmann, Lars Hinner und Maike Lenz dankbar für die jeweilige tolle Arbeitsatmosphäre.

Fürs heitere Zusammensitzen bei kulinarischen Köstlichkeiten in der Mittagspause danke ich Sandra (Vlaci) Vlahovic, Leonie Weinmann und Philipp Trauzettel.

Ich danke Jenny Bolsinger für das Organisieren sämtlicher unterhaltsamer sportlicher Betätigung, ob es nun Skifahren oder Wandern war. Weiterhin danke ich

Sandra Vlahovic, Silke Bastian und Lars Hinner für das Motivieren zum Joggen um den Bärensee.

Ein sehr großer Dank geht an meine Wellness-Oase, Max-Philipp Fischer und Jan Klenk, für zahlreiche Hilfestellungen (Lösungen) bei Office-Problemen und für die Gute-Laune-Musik, ohne die beiden wäre das Schreiben der Dissertation wohl kaum gelungen.

Dank gilt hier auch Silvi, Philipp T., Max und Leonie für die Hilfe beim Korrekturlesen verschiedener Passagen meiner Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich allen Arbeitskollegen in den letzten vier Jahren für die tolle Arbeitsatmosphäre und den außeruniversitären Unterhaltungsfaktor, wie zum Beispiel der gemütliche Wasenabend, danken, es war wirklich eine tolle unvergessliche Zeit.

Bei meiner Mutter bedanke ich mich besonders für jegliche Freiheiten, sei es die Wahl der Schule oder des Studiums und für die herzliche Unterstützung aller getroffenen Entscheidungen. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Mädels bedanken, die immer für mich da sind, und mich als „ewige Studentin“ zu vielen Studentenparties begleitet haben und mir immer zur Seite stehen. DANKE.

-A tidy laboratory means a lazy chemist-

J.J.Berzelius

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	ENZYPROMISKUITÄT	1
1.2	SÄURE-BASE KATALYSE IN DER CHEMIE	6
1.3	ENZYMKATALYSATOREN AUF SÄURE(-BASE)-KATALYSE BASIS	7
1.3.1	<i>Haloalkan Dehalogenasen</i>	10
1.3.2	<i>Squalen-Hopen-Zyklase AacSHC</i>	16
1.4	MOTIVATION	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	MATERIALIEN	22
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	22
2.1.2	<i>Biochemische Reagenzien und Marker</i>	22
2.1.3	<i>Oligonukleotide (Primer)</i>	22
2.1.4	<i>Plasmide</i>	23
2.1.5	<i>E. coli-Stämme</i>	24
2.1.6	<i>Kits</i>	24
2.1.7	<i>Software für das molekulare Docking</i>	25
2.1.8	<i>Medien und Puffer</i>	25
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	28
2.2.1	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	28
2.2.2	<i>Herstellung RbCl-kompetenter Zellen</i>	28
2.2.3	<i>DNA Amplifikation mittels PCR (Polymerasekettenreaktion)</i>	29
2.2.4	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	30
2.2.5	<i>DNA-Sequenzierung</i>	31
2.2.6	<i>Überprüfung einer Gen- Insertion mittels Kolonie-PCR</i>	31
2.2.7	<i>Restriktionsverdau von DNA</i>	31
2.2.8	<i>Transformation kompetenter E. coli- Zellen</i>	31
2.2.9	<i>Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4- DNA- Ligase</i>	32
2.2.10	<i>Ortsgerichtete Mutagenese von Genen mit Hilfe der QuikChange PCR</i>	32
2.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	33
2.3.1	<i>Kultivierung von E. coli</i>	33
2.3.2	<i>Proteinexpression von LinB in E. coli BL21 (DE3) per Induktion mit IPTG</i>	33
2.3.3	<i>Proteinexpression von AacSHC in E. coli BL21 (DE3) per Autoinduktion</i>	33
2.3.4	<i>Zellaufschluss</i>	34
2.3.5	<i>Solubilisierung und Hitzeschock-Aufreinigung des Membranproteins AacSHC</i>	34
2.3.6	<i>Proteinaufreinigung der LinB mittels HisGraviTrap™ TALON® Chromatographie</i>	34
2.3.7	<i>SDS-PAGE</i>	35
2.3.8	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	35

2.3.9	<i>Umsetzungen von Substraten</i>	35
2.4	CHEMISCH-ANALYTISCHE METHODEN	40
2.4.1	<i>Gaschromatographie</i>	40
2.4.2	<i>NMR-Spektroskopie</i>	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	LINB	42
3.1.1	<i>Klonierung, Expression und Aufreinigung der LinB</i>	42
3.1.2	<i>Bestimmung der Aktivität des LinB Wildtyps</i>	43
3.1.3	<i>Untersuchung zur Substratspezifität der nativen LinB</i>	43
3.1.4	<i>Design und Charakterisierung der LinB-Mutantenbibliothek</i>	49
3.1.5	<i>Enantioselektivitäten der LinB und Varianten</i>	53
3.2	AACSHC.....	56
3.2.1	<i>Expression und Aktivitätstest der Mutantenbibliothek gegenüber Farnesol</i>	57
3.2.2	<i>Reaktionskontrolle der Farnesol Zyklisierung mit L607A und L607F über 48 h</i>	58
3.2.3	<i>Isolation, Identifizierung und Quantifizierung des Farnesol Zyklisierungsprodukts 37</i>	59
3.2.4	<i>Docking Studien mit PyMOL</i>	60
3.2.5	<i>Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von Geraniol</i>	61
3.2.6	<i>Isolation und Identifizierung der Zyklisierungsprodukte 39 und 40</i>	63
3.2.7	<i>Unterschiede zwischen den Varianten L607A und L607F und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion zwischen Farnesol und Geraniol</i>	64
3.2.8	<i>Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von verschiedenen Alkohol-Nukleophilen</i>	66
3.2.9	<i>Isolation und Identifizierung der Farnesol Zyklisierungsprodukte 42 und 43</i>	68
3.2.10	<i>Unterschiede zwischen den Varianten und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion</i>	68
4	DISKUSSION	72
4.1	LINB	73
4.1.1	<i>Klonierung, Expression und Aufreinigung der LinB</i>	73
4.1.2	<i>Untersuchung zur Substratpromiskuität der nativen LinB</i>	73
4.1.3	<i>Design und Charakterisierung der LinB-Mutantenbibliothek</i>	77
4.1.4	<i>Enantioselektivitäten der LinB und deren Varianten</i>	80
4.2	AACSHC	82
4.2.1	<i>Aktivitätstest der Mutantenbibliothek gegenüber Farnesol</i>	83
4.2.2	<i>Reaktionskontrolle der Farnesol Zyklisierung mit L607A und L607F über 48 h</i>	84
4.2.3	<i>Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von Geraniol</i>	85
4.2.4	<i>Unterschiede zwischen den Varianten L607A, L607F und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion mit Geraniol</i>	86

4.2.5	<i>Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von verschiedenen Alkohol-Nukleophilen.....</i>	<i>87</i>
4.2.6	<i>Unterschiede zwischen den Varianten L607A und L607F und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion mit Butanol und Pentanol.....</i>	<i>88</i>
4.2.7	<i>Erweiterung des Produktspektrums.....</i>	<i>88</i>
5	AUSBLICK.....	91
5.1	AUSNUTZUNG DES KATALYTISCHEN POTENTIALS DER LINB FÜR DIE HYDROLYSE ALTERNATIVER SUBSTRATE 91	
5.2	AUSNUTZUNG DES KATALYTISCHEN POTENTIALS DER AACSHC FÜR WEITERE INTERMOLEKULAR KATALYSIERTE REAKTIONEN	92
6	ANHANG.....	93
6.1	GENSEQUENZEN	93
6.2	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG	94
6.3	GC-CHROMATOGRAMME	95
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	100

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
<i>AacSHC</i>	Squalen-Hopen-Zyklase aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bichinoninsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E.C.	Engl.: Enzyme class, deutsch: Enzymklasse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KP _i	Kaliumphosphat
kb	Kilobase(n)
LB	Luria Bertani
LinB	LinB Haloalkan Dehalogenase aus <i>Sphingobium japonicum</i>
MD	Molecular Dynamics, molekulardynamisch

min	Minute
mM	Millimol pro Liter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	Super Optimal Broth Nährmedium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TfB	Transformationspuffer
TB	Terrific-Broth
TEMED	<i>N, N'</i> -Ethylenbis-(diacetamid)
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
μM	Mikromol pro Liter
V	Volt
V	Volumen
v/v	Volume per volume, Volumenkonzentration
w/v	Weight per volume, Massenkonzentration

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Promiskuität zweier Enzyme aus unterschiedlichen Proteinklassen, die allerdings auf eine gemeinsame, in der Biochemie sehr häufige Reaktion, die Säure-(Base)-Reaktion, zurückgreifen. Beide Enzyme verwenden die Asparaginsäure als katalytisch aktive Aminosäure, wobei Haloalkan Dehalogenasen aus der α/β -Hydrolase-Familie, die deprotonierte Form der Asparaginsäure als nukleophiles Aspartat verwenden, wohingegen die Squalen-Hopen-Zyklasen die protonierte Asparaginsäure als Brønsted-Säure nutzen. Das Substratspektrum der Dehalogenase LinB aus *Sphingobium japonicum*, das sonst nur halogenierte Alkane umfasst, sollte um alternative Substrate erweitert werden. Es konnte erfolgreich demonstriert werden, dass LinB eine eindeutige Hydrolyseaktivität gegenüber organischen Thiocyanaten und Isothiocyanaten aufweist, was auf erstmals beschriebene promiskuitive Eigenschaften der LinB schließen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass Substrate von unterschiedlicher Größe toleriert werden, um dabei Alkohole und Amine zu generieren. Mittels rationalem Design konnten Varianten erzeugt werden, die eine deutliche Verbesserung gegenüber der Bildung von Benzylamin demonstrierten. Zur Untersuchung der Art der Promiskuität, wurden sogenannte *knockout*-Mutanten der katalytischen Triade der LinB erstellt und für Studien bezüglich des Katalysemechanismus herangezogen. In der Tat konnte über die einfache Substratpromiskuität hinaus, katalytische Promiskuität der LinB in Bezug auf die organischen Isothiocyanate gezeigt werden. Anhand der Squalen-Hopen-Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*) wurden Untersuchungen bezüglich intermolekular katalysierter Reaktionen vorgenommen. Diese Fähigkeit der Etherbildung ist zwar bei der nativen *AacSHC* anhand des Substrates Farnesol bekannt, allerdings nur in geringem Umfang. So konnte mittels Varianten aus einer fokussierten Mutantenbibliothek eine 10-fache Steigerung der Produktbildung erzielt werden. Ferner konnten unter Verwendung nicht-natürlicher Substrate und unterschiedlicher Nukleophile neue, nicht-literaturbekannte intermolekular gebildete Produkte dargestellt werden. Durch die Wahl des Nukleophils und dessen Konzentration gelang es, Produktverhältnisse eindeutig zu Gunsten der intermolekular gebildeten Produkte zu verschieben.

Abstract

The present study deals with the investigation of the promiscuity of two enzymes from different protein families, which however draw on a common reaction, the acid (-base)-reaction. Both enzymes use an aspartic acid as catalytically active amino acid: haloalkane dehalogenases from the α/β -hydrolase fold family use the deprotonated form for nucleophilic attack, whereas the squalene-hopene-cyclases use the protonated form as Brønsted-acid. The substrate scope of the dehalogenase LinB from *Sphingobium japonicum*, which includes only halogenated alkanes so far, should be expanded towards alternative substrates. In this work, it was successfully demonstrated, that LinB exhibits unambiguously hydrolysis-activity towards organic thiocyanates and isothiocyanates, which indicates the promiscuous character of LinB for the first time. Different sizes of substrates were tolerated for generating alcohols and amines. Through rational design, variants could be generated, which showed a significant improvement in formation of benzylamine. To study the type of promiscuity, so-called knockout mutants were created for studies concerning the reaction mechanism. In fact, LinB demonstrated not only substrate promiscuity but additional catalytic promiscuity. With the squalene-hopene-cyclase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*AacSHC*), studies concerning intermolecular catalyzed reactions were performed. *AacSHC* is known to form ethers through intermolecular linkage, when farnesol is used as substrate, but only to a limited extent. In the present study, a 10-fold increase in product formation with variants of a focused *AacSHC* mutant library was achieved. Using non-natural substrates and an extended set of nucleophiles, new intermolecular formed products could be generated. Furthermore, it was possible to shift the product distribution clearly in favor of intermolecular formed products only with the choice of the nucleophile and its concentration.

1 Einleitung

1.1 Enzympromiskuität

Viele heute bekannte Enzyme entwickelten sich aus bereits seit langer Zeit vorhandenen Enzymen durch Genvervielfältigung. [1] Zahlreiche Studien belegen, dass Enzyme einer Superfamilie sehr ähnliche katalytische Zentren und sogar ähnliche mechanistische Merkmale verwenden, um damit ähnliche chemische Reaktionen mit jeweils verschiedenen Substraten zu katalysieren. Die Enzyme mit α/β -Hydrolase-Faltung stellen ein sehr gutes Beispiel dafür dar, wie Enzyme mit konservierten katalytischen Merkmalen, im Fall der α/β -Hydrolasen die katalytische Triade, sehr viele unterschiedliche Substrate umsetzen können (Abbildung 1).

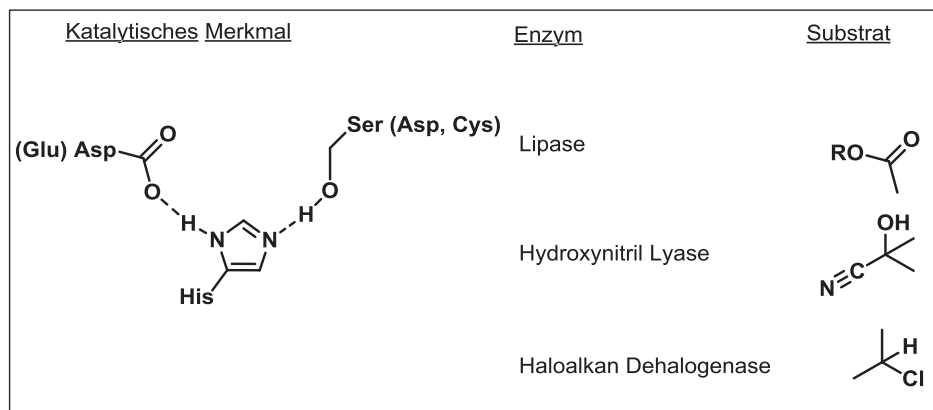
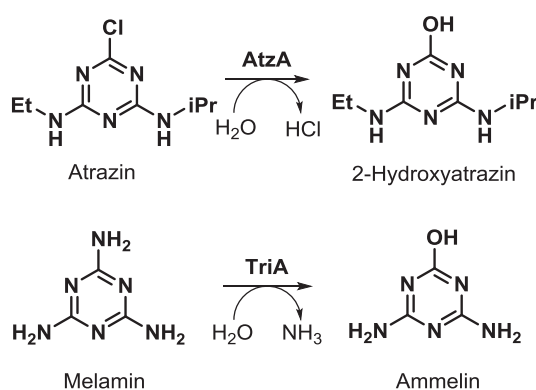


Abbildung 1 Konserviertes katalytisches Merkmal (links katalytische Triade) der unterschiedlichen Enzyme und deren Substrate, die der α/β -Hydrolase Familie angehören. [2]

α/β -Hydrolasen besitzen ein konserviertes Histidin als Base, eine Säure (Aspartat oder Glutamat) und ein Nukleophil (Serin, Asparat oder Cystein), die die katalytische Triade bilden. Allerdings werden verschiedene Reaktionen katalysiert, wie zum Beispiel die Lipase-katalysierte Hydrolyse von Estern, die Haloalkan Dehalogenase-katalysierte Hydrolyse von halogenierten Alkanen [3] oder die Freisetzung von Blausäure aus Cyanohydrinen mittels Hydroxynitril Lyasen. [4] Weitere Beispiele von Superfamilien, die die gleichen strukturellen Merkmale für die Katalyse verschiedener Reaktionen benutzen, sind in der Literatur durchaus bekannt (wie zum Beispiel die Enolase-Superfamilie). [5] Die Tatsache, dass Enzyme einer Superfamilie einen gemeinsamen Vorgänger aufweisen, jedoch unterschiedliche Substrate akzeptieren, deutet auf schon immer schlummernde promiskuitive Eigenschaften hin. Von Pro-

miskuität wird dann gesprochen, wenn ein Enzym die Fähigkeit besitzt, alternative Reaktionen, außer der bereits bekannten, zu katalysieren. Die natürlich auftretende Promiskuität wird vor allem am Beispiel der rapiden Evolution der Atrazin-Chlorhydrolase (AtzA) deutlich. [6] Dieses Enzym hydrolysiert die C-Cl Bindung von Atrazin, einem inzwischen nicht mehr verwendeten, jedoch in der Umwelt noch weit verbreiteten Herbizid (Schema 1). Diese Hydrolase unterscheidet sich in nur neun Aminosäuren von der Aminohydrolase Melamin-Hydrolase (TriA), welche die Hydrolyse der C-N Bindung von Melamin, einer Vorstufe von verschiedenen Duroplasten, katalysiert. Die hohe Sequenzidentität (98 %) der beiden Enzyme und die Ähnlichkeit der aktiven Tasche lassen darauf schließen, dass die später entdeckte Atrazin-Chlorhydrolase aus der Melamin-Hydrolase entstand. Durch Mutationen relevanter Aminosäuren konnte die Aktivität der AtzA bei TriA induziert werden. [7]



Schema 1 Chlorohydrolase-Aktivität der AtzA und Aminohydrolase-Aktivität der TriA.

Weitere Beispiele von Enzymen, die unterschiedliche Reaktionen katalysieren, aber ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren evolviert wurden, wie die Phosphotriesterase, die nachweisbare Lactonase-Aktivität besitzt [8] oder die Hydroxylase LFAH12 die aus einer FAD2 Desaturase entstand, [9] [10] wurden in der Literatur beschrieben. Auch in diesen Fällen war es durchaus möglich, die Aktivitäten der Enzyme durch gezielte Punktmutationen oder gerichtete Evolution ineinander zu überführen. Arnold *et al.* gingen daher der Frage nach, ob man nun über den Punkt der natürlichen Promiskuität hinausgehen kann und Promiskuität induzierbar ist. [11] Die Evolution eines Enzyms und die einhergehende Promiskuität sollte, mit den nun seit einigen Jahren studierten Methoden zur Proteinevolution, in kürzerer Zeit möglich sein, als die natürliche Evolution. Durchaus beschäftigen sich viele Ar-

beitsgruppen im Bereich der Biokatalyse mit Enzympromiskuität, die durch gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign induziert wird. Viele der Studien streben die Verbesserung der promiskuitiven Eigenschaft an, wenn diese schon auf geringem Niveau vorhanden ist. Die erst kürzlich entdeckte Promiskuität der Cytochrom-P450 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* (P450_{BM3}) ermöglichte die Ergänzung des schon umfassenden Reaktionsrepertoires dieser Monooxygenase, um weitere hoch interessante chemische Reaktionen. [12] [13] In den Studien wurde der natürliche Eisen-Häm-Komplex des P450_{BM3}-Enzyms genutzt, um mittels *proteinengineering* die nicht-natürliche Cyclopropanierung von Styrol zu katalysieren (Abbildung 2). Der Komplex ist in der Lage, Carbene sowie auch Nitrene zu aktivieren und auf Substrate zu transferieren. Durch das *screening* der P450_{BM3}-Mutantenbibliothek konnten Varianten identifiziert werden, die eine 50-fach gesteigerte Aktivität und verbesserte Enantioselektivitäten für die Cyclopropanierung von Styrol gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. [14] Weitere Varianten katalysierten erfolgreich durch den Nitren-Transfer die Sulfimidierung von verschiedenen Thioethern [15] und die intramolekulare C-H-Aminierung verschiedener Sulfonylazide. [16] Ohne die im Labor durchgeführte Evolution des P450_{BM3}-Enzyms wären diese synthetisch nutzvollen Aspekte wohl verborgen geblieben.

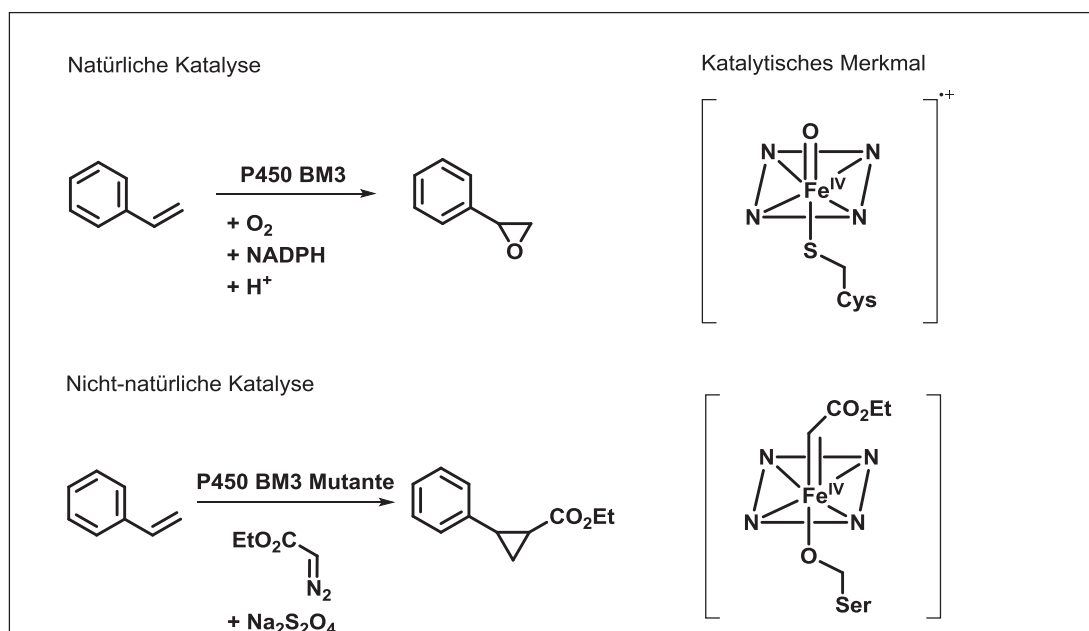


Abbildung 2 P450_{BM3} katalysierte Oxyfunktionalisierung von Styrol und die nicht-natürliche Cyclopropanierung der P450_{BM3} Varianten.

Ein weiteres interessantes Beispiel stellt die in der synthetischen Chemie relevante

C-C-Knüpfung der Halohydrin Dehalogenase HheC dar. Janssen *et al.* demonstrierten die Reversibilität der natürlichen Funktion dieses Enzyms und konnten indem C-X, C-N, C-S und C-C Bindungen aufgebaut wurden, die Vielfältigkeit der HheC unter Beweis stellen (Abbildung 3).^[17] Durch eine spezielle Methode der gerichteten Evolution, die sogenannte ProSAR (*protein sequence-activity relationships*)-Methode, konnte eine 4000-fache Verbesserung der volumetrischen Produktivität erlangt werden. Durch diese Steigerung wurde es möglich, die HheC Variante, die sich in 35 Aminosäuren vom Wildtyp unterscheidet, industriell für die Synthese einer Vorstufe von Atorvastatin, einem cholesterinspiegel-senkenden Medikament, anzuwenden.^[18]

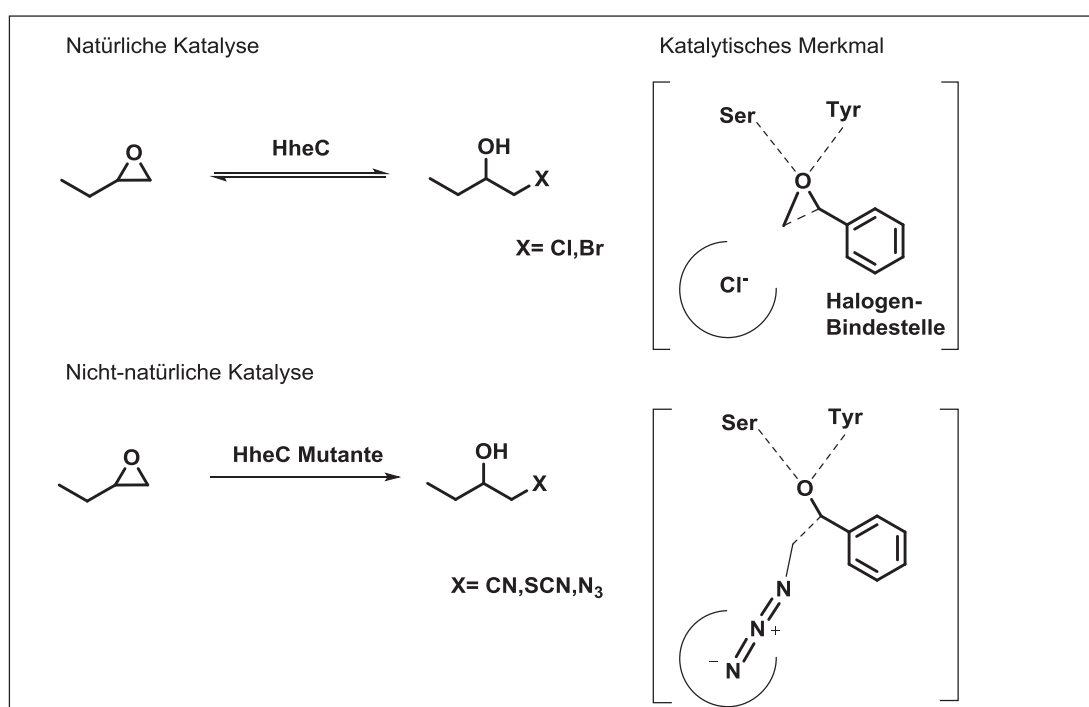


Abbildung 3 HheC katalysierte Epoxidöffnung mit Halogenen und die nicht-natürliche Epoxidöffnung mit weiteren linearen Nucleophilen.

Die neusten Arbeiten von Hammer *et al.* lieferten ein weiteres Beispiel für Enzym-promiskuität.^[19] Durch rationales Proteindesign der Squalen-Hopen-Zyklase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* konnte eine Reihe von verschiedenen neuen Zyklisierungsreaktionen, unter anderem die Prins-Zyklisierung von (*S*)-Citronellal und die Zyklisierung von Geraniol demonstriert werden. Durch das *screenen* der erstellten Mutantenbibliothek gelang es, Punktmutanten zu identifizieren, die eine deutliche Verbesserung in der Umsetzung der verschiedenen Substrate zeigten. So wies F365C eine 38-fache Steigerung des Umsatzes von Geraniol im Gegensatz zum Wildtyp auf. Die hier aufgeführten Beispiele zeigen eindeutig, dass nicht nur auf die natürliche

Evolution von Enzymen zurückgegriffen werden kann, sondern dass Promiskuität durchaus induzierbar ist. Für Studien zur Spezifität und Promiskuität von Enzymen wird daher als Ausgangspunkt oft die existierende katalytische Maschinerie verwendet, um verschiedene Funktionen des Enzyms hervorzubringen. Neue Funktionen oder eine Erweiterung der Spezifität kommen dann durch die Konformationsänderung der aktiven Tasche zustande. So kann auf den gleichbleibenden Mechanismus für verschiedene Reaktionen zurückgegriffen werden.

1.2 Säure-Base Katalyse in der Chemie

Die Säure-Base-Katalyse nimmt unter den homogenen Reaktionen in der Chemie einen großen Stellenwert ein. Durch sie wird im Allgemeinen die freie Energie eines Übergangszustandes verringert. Ein wesentliches Merkmal der Säurekatalyse ist der Transfer eines Protons auf das Substrat. Umgekehrt wird bei der Basenkatalyse ein Proton vom Substrat auf die Base übertragen.^[20] Zwei Arten der Säure-Base-Katalyse sind beschrieben. Die allgemeine Säure-Base-Katalyse liegt vor, wenn die Säure als Wasserstoffbrückendonator, bzw. die Base als Wasserstoffbrückenakzeptor agiert und somit der Übergangszustand während der Katalyse stabilisiert wird. Von spezifischer Säure-Base-Katalyse wird dann gesprochen, wenn die Säure als Protonendonator bzw. die Base als Protonenakzeptor fungiert und somit das Substrat bereits vor dem Übergangszustand protoniert bzw. deprotoniert wird. Diese beiden Arten sind jeweils stark abhängig von der Acidität des Katalysators und der Basizität des Substrates, und umgekehrt von der Basizität des Katalysators und der Acidität des Substrates. Allgemeine Brønsted-Säuren in der organischen Chemie sind relativ schwache Säuren mit eher hohen pK_s -Werten (15–30), wie zum Beispiel Thioharnstoffderivate, Harnstoffderivate oder BINOLE (Abbildung 4).^[21] Sie dienen mit Wasserstoffbrücken zur Aktivierung von Carbonyl- oder Iminfunktionen für Folgereaktionen. Thioharnstoffderivate wurden zum Beispiel erstmals für die Strecker-Synthese und des Weiteren für die Aktivierung von Iminen und α,β -unge-sättigten Verbindungen eingesetzt.^[22] Das H_8 -BINOL-Derivat wurde für die asymmetrische Morita-Baylis-Hillman-Reaktion verwendet.^[23]

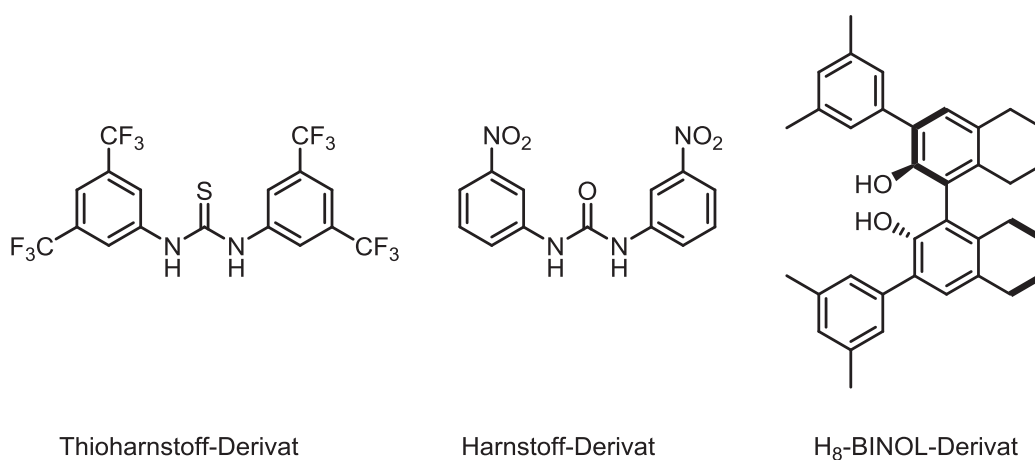


Abbildung 4 Allgemeine Brønsted-Säure Katalysatoren.

Spezifische Brønsted-Säuren dagegen, sind starke Säuren mit relativ niedrigen pK_s - Werten (-3-1) und daher in der Lage unreaktive Substrate umzusetzen. Die von BINOL-abgeleiteten Derivate (Abbildung 5), wie beispielsweise das Hydrogenphosphat und die Dicarbonsäure, wurden für indirekte Mannich-Reaktionen ^[24] ^[25] und das noch acidere *N*-Triflylphosphoramid für Diels-Alder-Reaktionen ^[26] eingesetzt.

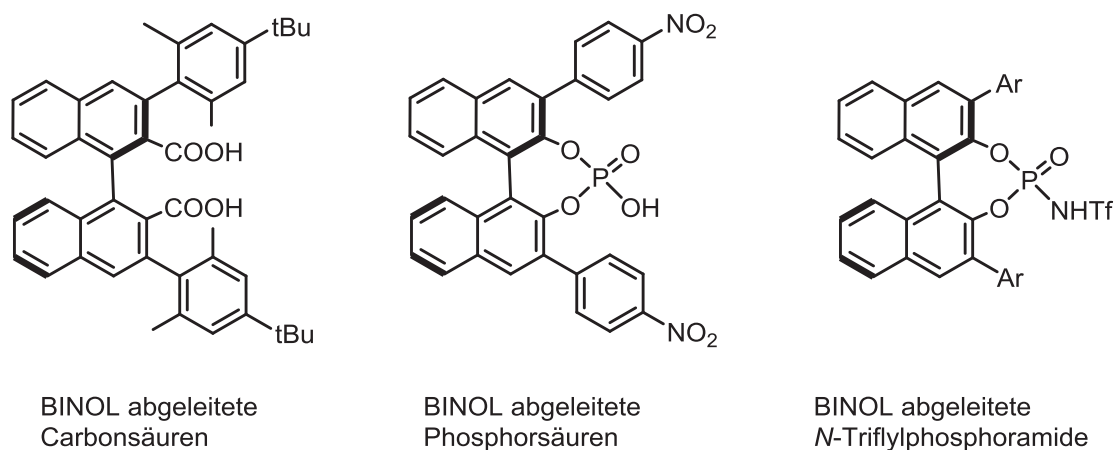


Abbildung 5 Spezifische Brønsted-Säure Katalysatoren.

1.3 Enzymkatalysatoren auf Säure(-Base)-Katalyse Basis

Die Abgrenzungen der allgemeinen Säure-Base-Katalyse und der spezifischen Säure-Base-Katalyse sind auch in der Biokatalyse bekannt. Die in der Literatur meist beschriebene enzymkatalysierte Reaktion ist die Säure-(Base)-Katalyse. Viele enzymatische Reaktionen beinhalten mindestens einen Protonen-Transfer als einen Schritt der Katalyse. In der Datenbank MACiE (*mechanism, annotation and classification in enzymes*) umfassen über 69 % der beinhaltenden enzymkatalysierten Reaktionen einen Protonen-Transfer. ^[27] Somit ist die Protonenübertragung der meist genutzte Reaktionstyp in der Biokatalyse. Bei der Übertragung eines Protons wird in vielen Fällen der Übergangszustand durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. ^[28] Tritt innerhalb eines Mechanismus die Säurekatalyse und die Basenkatalyse gleichzeitig auf, spricht man von einer Säure-Base-Katalyse. Enzyme haben daher oft basische oder saure Aminosäuren um das aktive Zentrum angeordnet, sodass sie eine konzertierte Säure-Base-Katalyse ausüben können. So besitzen die schon angesprochenen α/β -Hydrolasen saure sowie auch basische Aminosäuren im aktiven Zentrum, die im

neutralen Bereich ($\text{pH} \approx 7$) Protonen leicht abgeben oder aufnehmen können. ^[29] Zusätzlich dienen hier Aminosäuren aus dem Proteinrückgrat (*oxyanion hole*) zur Stabilisierung des Übergangszustands. Bekannte Beispiele für biologische Säure-Base-Katalysatoren werden im Folgenden erläutert. Eines dieser Beispiele ist die RNase A, die die Transphosphorylierung oder die reverse Reaktion, die Hydrolyse mittels Säure-Base-Mechanismus, katalysiert. ^[30] Die HIV-Protease verwendet ein Aspartat als Base, das ein Wassermolekül für einen nukleophilen Angriff auf das Substrat aktiviert und die zweite Asparaginsäure stabilisiert über das Proton den tetraedrischen Übergangszustand. ^[31] Die Serin-Protease beschleunigt unter Verwendung des Säure-Base-Mechanismus die Amid-Hydrolyse über die doppelte Wasserstoffbrücke aus dem Proteinrückgrat. ^[32] Unter Verwendung eines Zwei-Basen-Mechanismus katalysiert die Mandelsäure-Racemase die Racemisierung von (*R*)-Mandelsäure zu (*S*)-Mandelsäure und umgekehrt (Abbildung 6). ^[33]

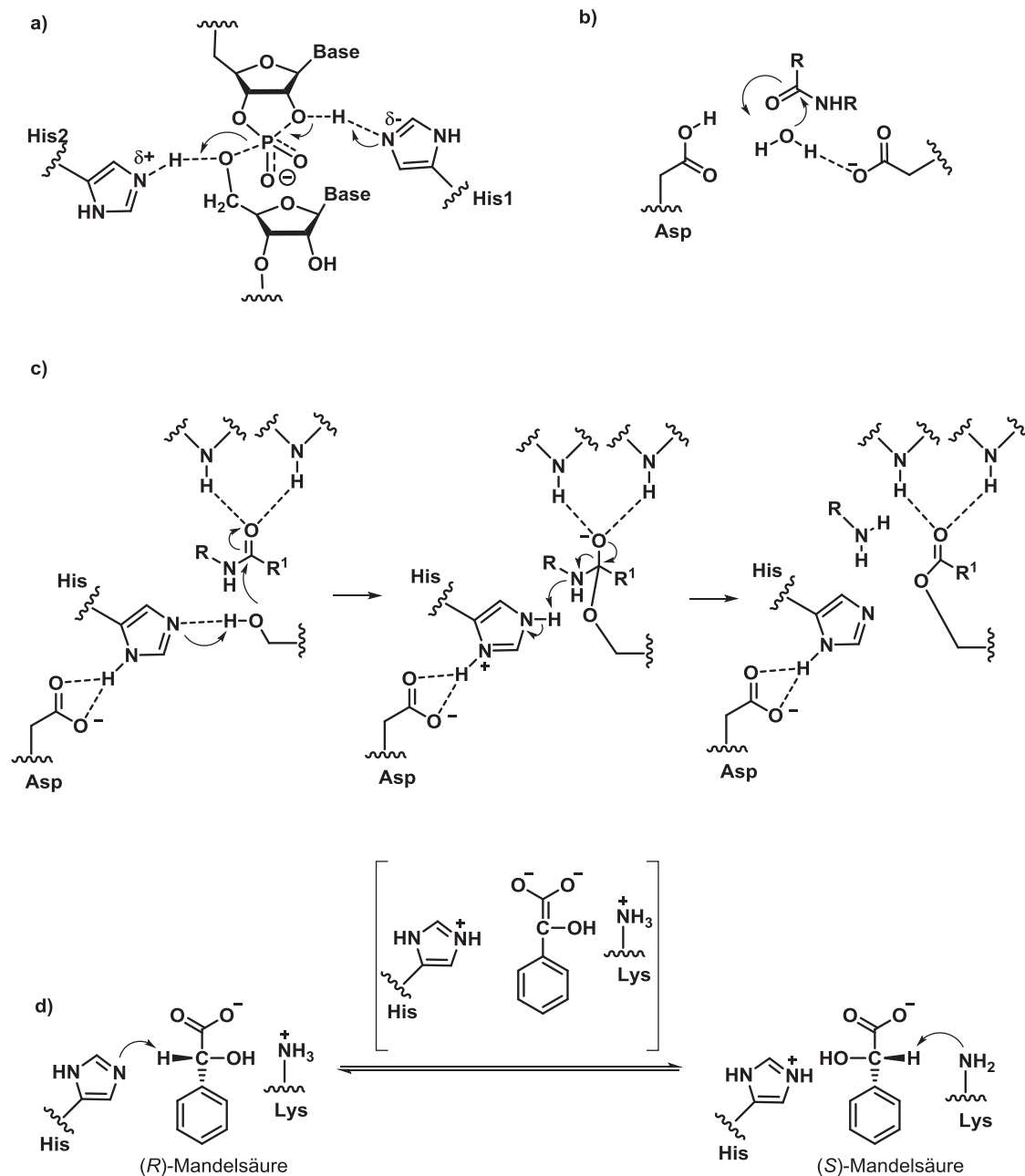


Abbildung 6 Allgemeine Säure(-Base)-Katalyse in der Biokatalyse. a) Die RNase A katalysiert die Transphosphorylierung, die beiden gezeigten Histidine wirken hier als Säure-Base-Paar, His1 abstrahiert im ersten Schritt das Proton vom Sauerstoff der Hydroxylgruppe um den nukleophilen Angriff am Phosphor der Phosphorylgruppe zu ermöglichen. His2 agiert als Säure und gibt das Proton an die Abgangsgruppe der Pentose ab. ^[30] b) Bei der HIV-Protease agiert das Aspartat als Base und aktiviert somit das Wassermolekül für den nukleophilen Angriff auf die Carbonylgruppe des Amids. Der tetraedrische Übergangszustand wird dabei durch das Proton der zweiten Asparaginsäure stabilisiert. ^[31] c) Die Serin-Protease katalysiert unter Verwendung des *oxyanion hole* (wird aus zwei Aminosäuren des Protein-Rückgrats gebildet), der katalytischen Base Histidin und des Nukleophils Serin die Hydrolyse von Amid. ^[32] Die Mandelsäure-Racemase katalysiert die Racemisierung von (R)- zu (S)-Mandelsäure, indem das Histidin das α -Proton des Substrates abstrahiert und das Lysin das entstandene Enolat zum Produkt protoniert. ^[33]

In der Enzymkatalyse sind nur wenige Fälle von spezifischer Brønsted-Säure Katalyse bekannt, da generell die Aminosäuren, eher pK_s -Werte im neutralen Bereich besitzen. Eine Ausnahme stellen die Squalen-Hopen-Zyklasen dar. Diese agieren als

direkte Brønsted-Säuren und übertragen ein Proton der katalytisch aktiven Asparaginsäure auf das Substrat. [34]

1.3.1 Haloalkan Dehalogenasen

Haloalkan Dehalogenasen (E.C. 3.8.1.5) [35] gehören zur Klasse der α/β -Hydrolasen. Sie katalysieren die hydrolytische Dehalogenierung von halogenierten Substraten zum entsprechenden Alkohol und Halogenidion. Ein Wassermolekül dient dabei als einziges Co-Substrat. Es gibt keinerlei Erkenntnis darüber, dass Haloalkan Dehalogenasen Metallionen oder andere Cofaktoren benötigen. [36] Mitglieder dieser Familie sind in der Lage chlorierte, bromierte und iodierte Substrate umzusetzen. [37] Haloalkan Dehalogenasen spielen eine große Rolle in der Industrie, da sie vor allem zum Abbau von halogenierten Lösungsmitteln im Grundwasser eingesetzt wurden. [38]

1.3.1.1 Substratspezifität

Phylogenetische Analysen von Damborsky *et al.* [39] zeigten, dass die Haloalkan Dehalogenasen (HLD) aufgrund verschiedener Substratspezifitäten und der Position wichtiger Aminosäurereste in drei Unterfamilien eingeteilt werden können: HLD I, II und III. Die meisten Enzyme die biochemisch charakterisiert sind, entstammen der HLD II Unterfamilie. Bis heute wurden 17 verschiedene Dehalogenasen biochemisch charakterisiert (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Liste der experimentell charakterisierten HLDs. [39]

Unterfamilie	Protein	Organismus	Substrate	Kat. Triade
HLD I	DhlA	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	Kurze (C ₂ -C ₄), terminal halogenierte Alkane	Asp-His-Asp Trp-Trp
	DhmA	<i>Mycobacterium avium</i>		
	DmbB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
	DppA	<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1 ^[40]		
	DrmA	<i>Mycobacterium rhodesiae</i> JS60 ^[41]		
HLD II	LinB	<i>Sphingobium japonicum</i>	Längere (C ₃ -	Asp-His-Glu Asn-Trp

	DmbA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	C ₈), α -und β -halogenierte Alkane	
	DmsA	<i>Mycobacterium smegmatis</i>		
	DhaA	<i>Rhodococcus</i> sp.		
	DbjA	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
	DmlA	<i>Mesorhizobium loti</i>		
	DatA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		Asp-His-Glu Asn-Tyr ^[42]
	DbeA	<i>Bradyrhizobium elkani</i> ^[43]		
	DmmaA	Mariner Mikroorganismus ^[44]		
HLD III	DrbA	<i>Rhodopirellula baltica</i>	undefiniert	Asp-His-Asp Asn-Trp
	DmbC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
	DmrB	<i>Mycobacterium rhodesiae</i> JS60 ^[41]		

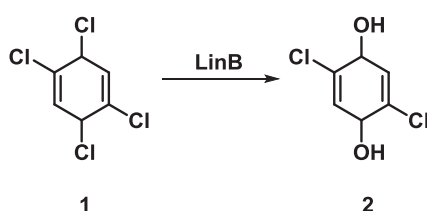
Die erste isolierte Haloalkan Dehalogenase DhIA aus *Xanthobacter autotrophicus*^[45] ist mit eine der am besten charakterisierten Dehalogenase. Die Kristallstruktur wurde Anfang der neunziger Jahre aufgeklärt^[46] ^[47] und ist für Modellberechnungen sehr beliebt. Weitere Dehalogenasen deren Kristallstruktur gelöst wurde:

- LinB aus *Sphingobium japonicum* (*Sphingomonas paucimobilis* UT26)^[48]
- DmbA aus *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv^[49]
- DhaA aus *Rhodococcus* sp.TDTM0003^[50]
- DbjA aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110^[51]
- DbeA aus *Bradyrhizobium elkani* USDA94^[52]
- DppA aus *Plesiocystis pacifica* SIR-1^[40]
- DmmaA aus einem Konsortium von marinen Mikroorganismen^[44]

Im weiteren Verlauf wird im Speziellen die in der vorliegenden Arbeit verwendete Haloalkan Dehalogenase LinB behandelt.

1.3.1.2 *LinB*

LinB wurde 1997 erfolgreich aus dem Organismus *Sphingobium japonicum* isoliert. [53] Dieser Organismus besitzt die Fähigkeit auf Lindan (γ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan) als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Lindan dient in der Landwirtschaft als Insektizid. [54] Die Haloalkan Dehalogenase *LinB* ist dabei Teil des Lindan-Abbaus in *Sphingobium japonicum*. Sie katalysiert die Umsetzung von 1,3,4,6-Tetrachlor-1,4-cyclohexadien **1** zu 2,5-Dichlor-2,5-cyclohexadien-1,4-diol **2** (Schema 2).



Schema 2 Natürliche Reaktion katalysiert durch *LinB* während des Lindan Abbaus.

Zusätzlich zu zyklischen Dienen, kann *LinB* eine Reihe an halogenierten Alkanen und Alkenen umsetzen (siehe Tabelle 1). Durch das breite Substratspektrum der *LinB* ist in der Literatur eine Vielzahl an biotechnologischen Anwendungen beschrieben, wie beispielsweise die biologische Entgiftung von Ökosystemen, [38] der Abbau von chemischen Waffen [55] und die Synthese von chiralen Intermediaten für die pharmazeutische Industrie. [56]

1.3.1.3 *Struktur*

Typisches strukturelles Merkmal einer α/β -Hydrolase sind zwei Domänen, die Hauptdomäne, sowie die Cap-Domäne. So besitzt auch *LinB* diese beiden Domänen. Die Hauptdomäne setzt sich aus acht β -Faltblättern zusammen, welche von sechs α -Helices umgeben sind. Die Cap-Domäne umfasst fünf α -Helices, die einer Uteroglobin-Faltung ähnelt. [57] Die Cap-Domäne ist flexibler als die Hauptdomäne, und verantwortlich für die Substratspezifität. Zwischen diesen beiden Domänen liegt die aktive Tasche (siehe Abbildung 7). [58]

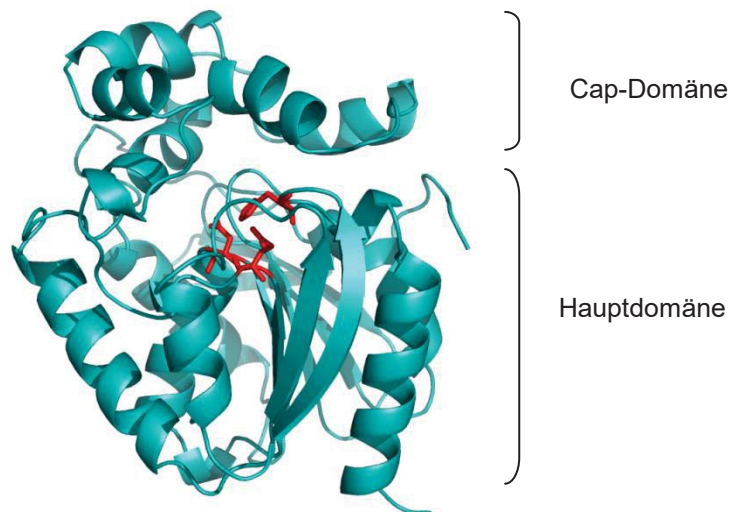


Abbildung 7 Kristallstruktur von LinB WT (PDB-Code:1K5P). Die katalytische Triade (Asp108, Glu132, His272) ist in rot dargestellt.

LinB besitzt unter den HLDs, deren Struktur aufgeklärt ist, die zugänglichste aktive Tasche. Diese ist erreichbar über insgesamt drei Tunnel. Damborsky *et al.* nutzten das Programm CAVER^[59] um diese Zugänge anhand der Kristallstruktur sichtbar zu machen. Bei LinB waren es die in Abbildung 8 gezeigten Tunnel: *upper tunnel* (blau), *lower tunnel* (rot) und der *slot tunnel* (grün). Über diese drei finden Substrat-Eintritt und Produkt-Freisetzung statt.^[60] Molekulardynamische Studien zeigten auch, dass alle drei Tunnel zum Austausch von Wassermolekülen zwischen der aktiven Tasche und dem umgebenden Lösungsmittel dienen.^[58] Die schon angesprochene Flexibilität der Cap-Domäne wurde in verschiedenen Studien untersucht und mitunter wurde Position 177 durch Sequenzalignment mehrerer Haloalkan Dehalogenasen als eine der variabelsten Aminosäuren identifiziert. Position 177 ist in der LinB am *lower tunnel* lokalisiert (Abbildung 8) und trägt ein Leucin. Durch rationale Mutagenese an dieser Position, wurden Punktmutanten mit unterschiedlich großen Aminosäuren erzeugt. Die Substitution zu großen Aminosäuren führte zur Schließung des *upper tunnels*, aber gerade die Existenz von weiteren verfügbaren Tunneln für den Produkt- und Substrataustausch in LinB erklärt die erhaltene Gesamtaktivität der LinB-Varianten, die eine große Aminosäure an der Stelle 177 tragen.^[61]

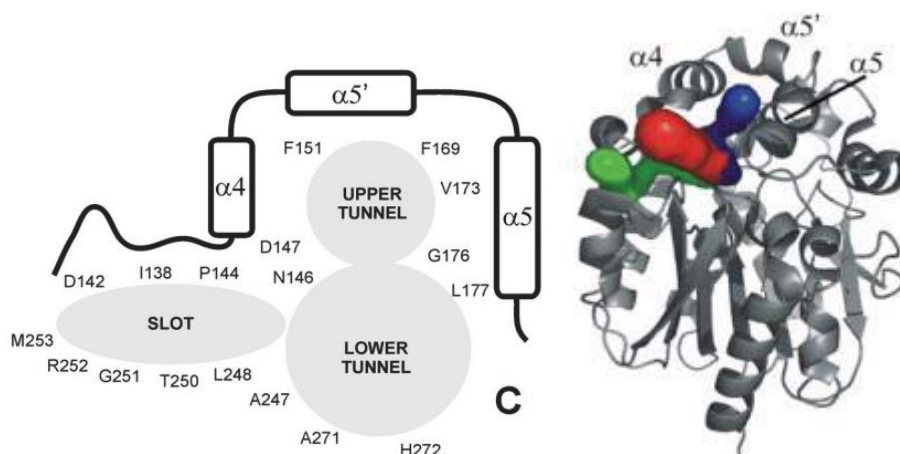


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Tunnel der LinB. ^[60]

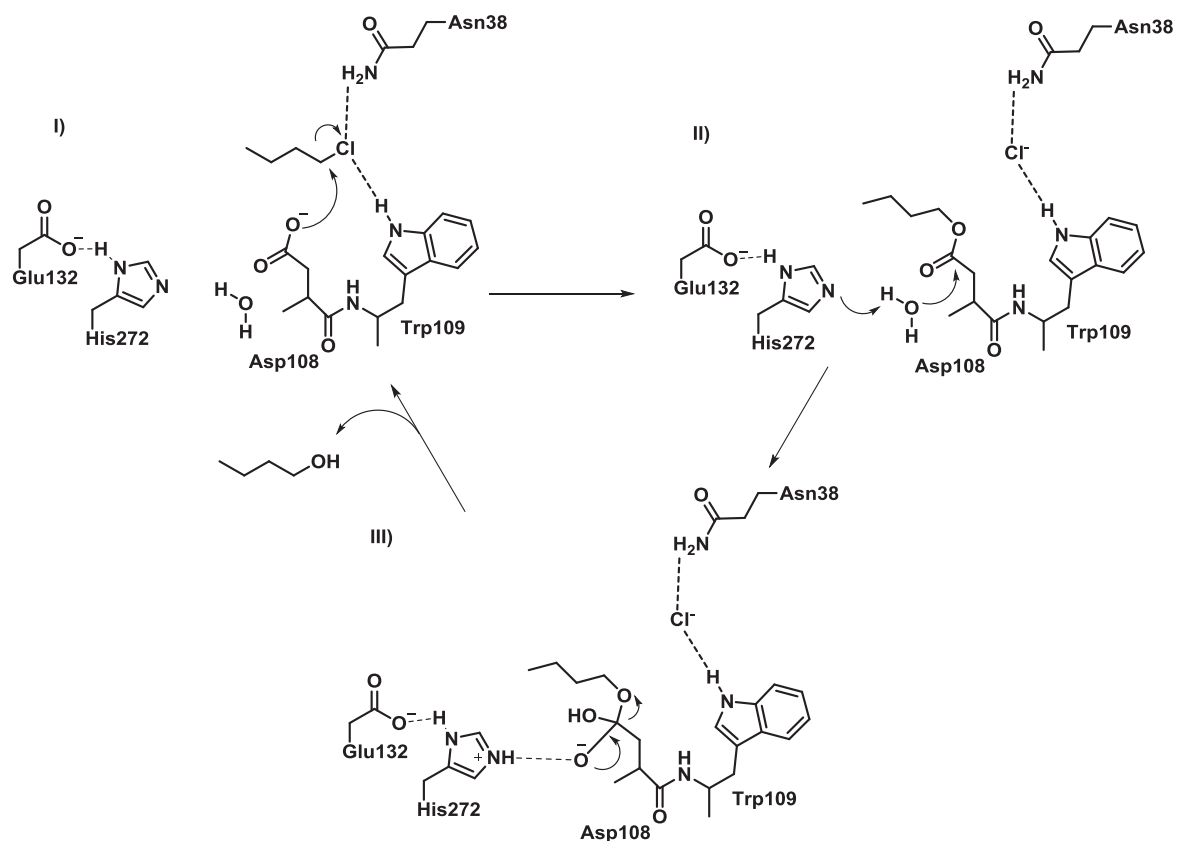
1.3.1.4 Aktives Zentrum und katalytische Triade

Die aktive Tasche der HLDs ist überwiegend mit hydrophoben Aminosäuren ausgestattet, ausgenommen der katalytische Triade, welche hydrophile Reste umfasst. LinB weist im Gegensatz zu anderen HLDs eine recht große aktive Tasche auf. ^[62] Die katalytische Triade der LinB besteht aus den drei Resten: Aspartat-Histidin-Glutamat. Aspartat dient als Nukleophil, Histidin als Base und der Glutamat-Rest als Säure, womit wie vorher der in Kapitel 1.3 beschriebene Säure-Base-Mechanismus Anwendung findet. ^[63] Zusätzlich zur katalytischen Triade gibt es zwei weitere katalytisch aktive Reste. Diese sind ein Tryptophan und ein Asparagin-Rest. Sie dienen zum einen zur Bindung des Substrates und zum anderen zur Stabilisierung des freiwerdenden Halogenidions. Zusätzlich besitzt jede Haloalkan Dehalogenase ein *oxyanion hole*, das aus zwei N-haltigen Aminosäuren gebildet wird. Durch die ausgebildeten Wasserstoffbrücken kommt es zur Stabilisierung des negativ geladenen tetraedrischen Übergangszustands. ^[64]

1.3.1.5 Mechanismus

Durch Röntgenuntersuchung ^[46] und ortsgerechte Mutagenese ^[65] wurde zum ersten Mal am Beispiel der DhIA der Mechanismus der Haloalkan Dehalogenasen vorgeschlagen. Die Katalyse der LinB verläuft analog zum Mechanismus der DhIA, nach dem angesprochenen Säure-Base-Mechanismus. In Schema 3 ist der Mechanismus

veranschaulicht: I) Das Substrat (hier 1-Chlorbutan) wird in der hydrophoben Bindetasche des Enzyms gebunden. Die zwei Aminosäuren Trp109 und Asn38 binden spezifisch das Chlorid-Ion. Die Katalyse erfolgt dann über einen S_N2 -Mechanismus mit einem nukleophilen Angriff des Asp108-Sauerstoffatoms auf das C-Atom, an dem das Halogen gebunden ist. II) Der resultierende kovalent gebundene, durch das *oxyanion hole* stabilisierte Alkyl-Enzym-Übergangszustand ist ein Ester, in welchen der Sauerstoff des Enzyms eingebaut ist. In der darauffolgenden nukleophilen Addition wird das Alkyl-Enzym-Intermediat hydrolysiert. Das Wassermolekül wird hierbei durch die katalytische Base His272 aktiviert und ermöglicht so den Angriff am Carbonylkohlenstoff des Aspartats. Während des Mechanismus stabilisiert die katalytische Säure Glu132 die Ladung am Imidazolring des Histidins. III) Der letzte Schritt des Mechanismus umfasst das Freisetzen des Alkohols und des Halogenidions und die gleichzeitige Regenerierung des Aspartats. [62]

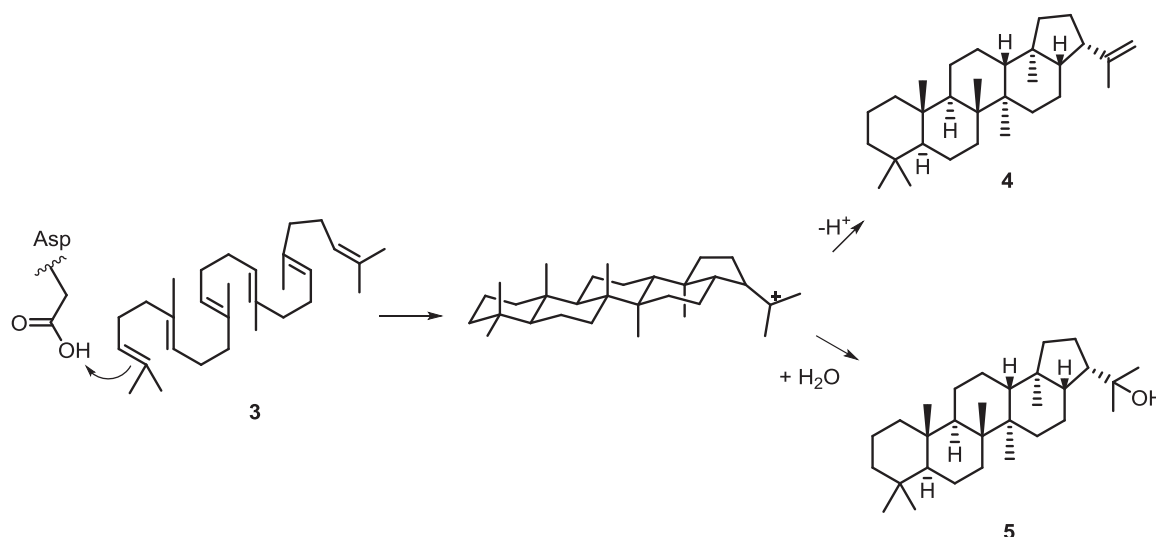


Schema 3 Reaktionsmechanismus der LinB am Beispiel von 1-Chlorbutan.

1.3.2 Squalen-Hopen-Zyklase *AacSHC*

1.3.2.1 Katalyse und Struktur der *AacSHC*

Die Squalen-Hopen-Zyklase (E.C. 5.4.99.17) aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* *AacSHC* (Terpen-Zyklase der Klasse II) katalysiert in der Natur die Zyklisierung von Squalen **3** zu Hopen **4** und Hopanol **5** (Schema 4).^[66] Diese Polyzyklisierung ist eine der anspruchsvollsten biochemischen Reaktionen, da fünf neue C-C Bindungen geknüpft und neun Chiralitätszentren gebildet werden.^[67] Die Reaktionskaskade wird durch einen Protonentransfer der katalytisch aktiven Asparaginsäure auf die terminale Isopren-Einheit des Squalens initiiert, wodurch ein reaktives Carbokation entsteht.



Schema 4 *AacSHC* katalysiert die Zyklisierung von Squalen **3** zu pentazyklischen Produkten. Hopen **4** entsteht durch Eliminierung und Hopanol **5** entsteht durch einen nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls.

Dieses Carbokation greift jeweils das π -System der benachbarten C=C-Bindung an, wobei die Zyklisierung zum größten Teil als konzertiert beschrieben wurde.^[68] ^[69] Die jeweiligen Produkte werden entweder durch Eliminierung oder spezifische nukleophile Addition eines Wassermoleküls generiert. Dieser letzte Schritt in der Katalyse wird durch ein stark ausgeprägtes Wassernetzwerk im Enzym bestimmt.^[70]^[71] Das Wassermolekül, das im Falle der Deprotonierung als Base agiert, wird von diesem Wassernetzwerk stark polarisiert und kann somit das Proton aufnehmen. Ist das Wassermolekül weniger polarisiert und befindet sich in einer alter-

nativen Position, übt es einen nukleophilen Angriff auf das Carbokation aus, wodurch es zur Bildung von Hopanol kommt.

Die *AacSHC* besteht aus einer β - und γ -Domäne, die jeweils in einer $(\alpha/\alpha)_6$ -Fass-Struktur vorliegen. Sogenannte QW-Sequenzmotive verbinden die äußeren α -Helices miteinander. Diese QW-Motive haben eine charakteristische *loop*-Struktur und besitzen konservierte Aminosäuresequenzen QxxDGGWG oder QxxDGSWG. [72] SHCs zählen zu den monotopischen Membranproteinen, da die γ -Domäne mit einer Helix in die Zellmembran bindet. An dieser gebundenen Helix befindet sich der hydrophobe Substratkanal, der als Eingang für Squalen und für die Freisetzung der zyklischen Produkte dient. Die hydrophobe aktive Tasche liegt zwischen den beiden Protein-Domänen. Am Ende dieser aktiven Tasche befindet sich die katalytisch aktive Asparaginsäure (Asp376). Diese Aminosäure ist Teil eines konservierten DxDD-Sequenzmotivs, das in allen Squalen-Hopen-Zyklasen vorkommt. Die mittlere Asparaginsäure in diesem Sequenzmotiv ist die bereits erwähnte katalytische Säure an Position 376 der *AacSHC* und für die Protonierung der C=C-Bindung verantwortlich. [72][73][74] Die ausreichend hohe Acidität dieser Asparaginsäure kommt durch die anti-Orientierung des Protons zustande. Diese Orientierung wird über ein spezielles H-Brücken-Netzwerk, das die beiden Aminosäuren H451 und Y495 sowie ein Wassermolekül ausbilden, verwirklicht (Abbildung 9). Des Weiteren befinden sich überwiegend hydrophobe aromatische und aliphatische Aminosäuren in der aktiven Tasche. Durch die Co-Kristallisation mit 2-Azasqualen als Inhibitor, konnte deutlich gezeigt werden, dass das Substrat vor der Zyklisierung schon in einer passenden reaktiven Konformation vorliegen muss. [75]

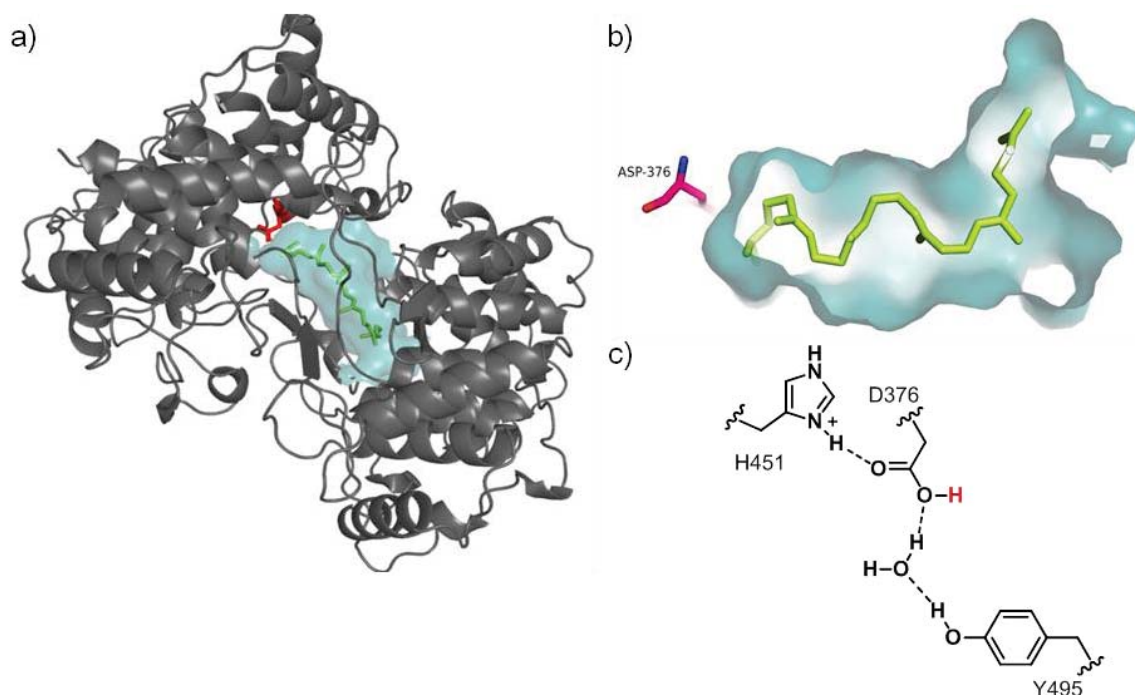


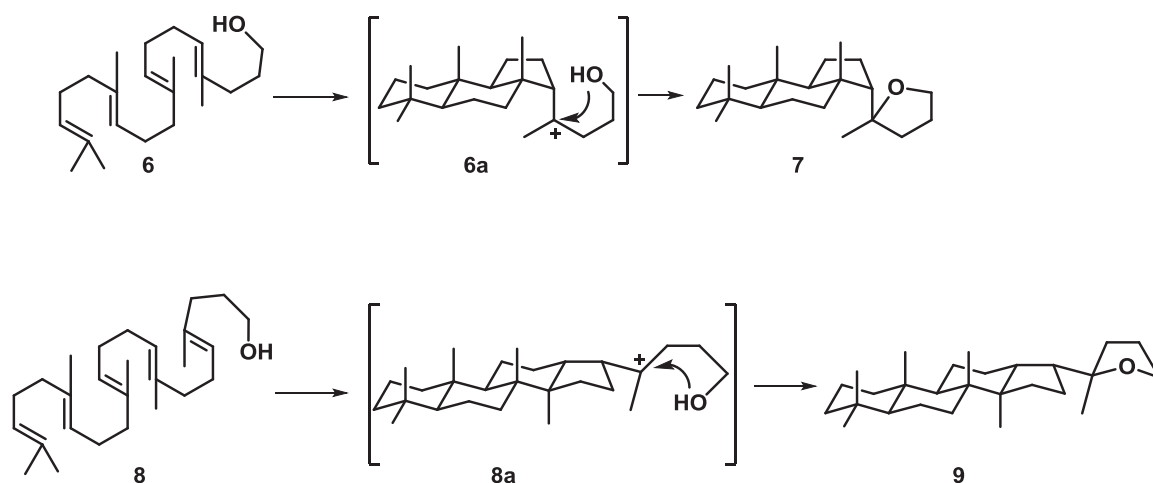
Abbildung 9 a) Kristallstruktur der *AacSHC* co-kristallisiert mit 2-Azasqualen (PDB-Code: 1UMP). b) Aktive Tasche der *AacSHC* mit der katalytisch aktiven Aminosäure Asp376 in rot, und dem co-kristallisierten Inhibitor 2-Azasqualen in grün. c) Anti-Orientierung des sauren H-Prottons (rot), die durch ein spezielles Wasserstoffbrückennetzwerk aufrechterhalten wird.

Zwischen dem linearen Substrat und dem später zyklisiertem Substrat ist während der Katalyse kaum eine Konformationsänderung zu erkennen. [75] Das aktive Zentrum dient hier als Templat und bindet das bewegliche Substrat in einer genau vorgegebenen Position. Die bei der Katalyse entstehenden Carbokationen werden durch π -Elektronensysteme der aromatischen Aminosäuren, wie Tryptophan, Phenylalanin oder Tyrosin stabilisiert. [76] Durch gezielte Punktmutationen dieser aromatischen Aminosäuren in *AacSHC* konnte in verschiedenen Studien der positive Einfluss der π -Systeme nachgewiesen werden. [77][78][79][80] Diese Kation- π -Interaktion ist durchaus auch in nicht-enzymatischen Systemen bekannt und gut studiert. [81] [82] [83]

1.3.2.2 Reaktionsspektrum

Die *AacSHC* akzeptiert neben dem natürlichen Substrat Squalen auch ein um fünf Kohlenstoffatome verlängertes Substrat. [84] Aufgrund dieser Beobachtung wurden weitere nicht-natürliche Substrate zur Zyklisierung verwendet. Hoshino und Mitarbeiter konnten erfolgreich zeigen, dass *AacSHC* auch verkürzte Substrate (C_{15} - C_{25}) akzeptiert und ein breites Produktportfolio entsteht. [85] Ein vielfältiges

Produktspektrum zeigte sich vor allem bei der Zyklisierung von Farnesol, bei der vier Produkte entstehen. Es entstehen ein Wasseradditionsprodukt und zwei Eliminierungsprodukte. Zusätzlich wurde ein weiteres Produkt geformt, das durch den nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe eines zweiten Farnesol-Moleküls an das Carbokation-Intermediat entsteht. Diese Reaktion stellte eine Neuerung im Reaktionsspektrum der *AacSHC* dar, da bis dahin keine intermolekulare Reaktion zweier Substratmoleküle beschrieben wurde. Bis dahin wurden nur intramolekulare Terminierungen von Nukleophilen beobachtet (Schema 5). ^{[79][86][87]}



Schema 5 Intramolekulare Zyklisierung mit nukleophilen Hydroxygruppen. ^[86]

Des Weiteren wurden Studien bezüglich der Zyklisierung von weiter verkürzten Squalen-Analoga mit *AacSHC* durchgeführt. Das C_{10} -Analogon Geraniol wurde von *AacSHC* nicht als Substrat akzeptiert. ^[85] Allerdings ist die Darstellung gerade von diesen monozyklischen Terpenen für die Duft- und Geschmackstoffindustrie hoch interessant. ^{[88][89]} Um dem Grund der Inaktivität bezüglich des verkürzten Squalenanalogen Geraniol nachzugehen, wurden theoretische sowie experimentelle Studien durchgeführt. ^[90] Durch MD-Simulationen wurde ersichtlich, dass Geraniol als deutlich kürzeres Substrat mehr Platz in der aktiven Tasche hat und keine für die Katalyse essentielle Sesselkonformation einnehmen kann und somit eine reaktive Bindung ausbleibt. Durch eine sukzessive Vergrößerung des Substrates zu verschiedenen Ether-Derivaten konnte eine bessere Stabilisierung und damit eine Zyklisierung des Substrates erreicht werden. Somit konnte durch *substrate engineering* die Aktivität gegenüber der Monozyklisierung von Geraniol-Derivaten gesteigert wer-

den.^[90] In diesem Ansatz wurde für eine Reaktivitätssteigerung das Substrat der aktiven Tasche angepasst, eine weitere und durchaus wünschenswerte Möglichkeit ist die Anpassung der aktiven Tasche auf das umzusetzende Substrat.

1.3.2.3 *AacSHC fokussierte aktive-Tasche-Mutantenbibliothek*

Um die aktive Tasche auf das Substrat anzupassen, wurde von Hammer *et al.*^[19] eine Umgestaltung der aktiven Tasche der *AacSHC* mit hydrophoben Aminosäuren vorgenommen (Abbildung 10). Es wurden ausschließlich Aminosäuren in der aktiven Tasche adressiert, welche keine katalytischen Fähigkeiten besitzen, die jeweils mit möglichst kleinen oder großen hydrophoben Aminosäuren substituiert wurden. Somit wurde eine fokussierte aktive-Tasche Mutantenbibliothek generiert.

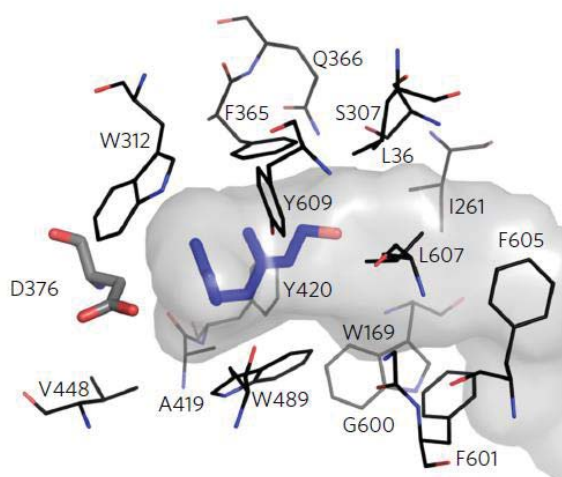


Abbildung 10 Aktive Tasche der *AacSHC* mit ausgewählten Aminosäuren für die Mutantenbibliothek.^[19]

Die Veränderung der aktiven Tasche sollte so eine Stabilisierung kleiner Moleküle wie Geraniol ermöglichen. Die Funktionalität dieser Mutantenbibliothek konnte in beeindruckenden Studien demonstriert werden. Über die erfolgreiche Zyklisierung von Geraniol und weiteren C₁₀-Analoga hinaus, zeigte diese Bibliothek durchaus eine gewisse Diversität, indem für das natürliche Substrat Squalen eine Reihe von unterschiedlich zyklisierten (mono-, di-, mehrfach-zyklisierten) Produkten beobachtet wurde.

1.4 Motivation

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei unterschiedliche Enzyme verwendet werden, indem die katalytische bzw. vorrangig die Substratpromiskuität untersucht wird. Beide Enzyme verwenden den in der Biokatalyse häufigsten Reaktionstyp, die Säure-Base-Katalyse. Während die verwendete Haloalkan Dehalogenase LinB aus *Sphingobium japonicum* einen nukleophilen Substitutionsmechanismus nutzt, verwendet die Squalen-Hopen-Zyklase AacSHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* die spezifische Brønsted-Katalyse mit direktem Protonentransfer. Beide Enzyme tragen als katalytisch aktive Aminosäure eine saure Aminosäure, die Asparaginsäure. In der LinB liegt die Asparaginsäure als Aspartat geladen vor und agiert als Nukleophil. In der AacSHC liegt die Asparaginsäure protoniert vor und ist somit in der Lage ein Proton direkt auf das Substrat zu übertragen. Da die beiden Enzyme sehr gut biochemisch beschrieben sind und Kristallstrukturdaten vorliegen, wurden rational-generierte, fokussierte Mutantenbibliotheken zur Bestimmung der Aktivität und der möglichen Promiskuität verwendet. Innerhalb der α/β -Hydrolasen zeigen viele Enzyme, wie zum Beispiel Esterasen, Lipasen und Proteasen Promiskuität. Da für die Familie der Haloalkan Dehalogenasen noch keine Substratpromiskuität beschrieben wurde, wurde LinB als Modellsystem für diese Arbeit herangezogen. Dieses Enzym soll auf Aktivität und Substratpromiskuität getestet werden, indem Substrate aus der α/β -Hydrolase-Familie und sogenannte Pseudohalogenide verwendet werden. Das Reaktionsspektrum der Squalen-Hopen-Zykласen sollte erweitert werden, um neben den sonst intramolekular katalysierten Reaktionen auch intermolekulare Reaktionen zu untersuchen. Hierfür wurde die AacSHC als Modellsystem eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in den jeweils höchsten erhaltlichen Reinheitsgraden von den folgenden Firmen bezogen: Alfa Aesar (Ward Hill, US), Carl-Roth (Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich (St. Louis, US).

2.1.2 Biochemische Reagenzien und Marker

Tabelle 2: Marker & Biochemische Standards.

Marker/ Standards	Anbieter
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoScientific, Karlsruhe, DE
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	ThermoScientific, Karlsruhe, DE

2.1.3 Oligonukleotide (Primer)

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried, DE) bezogen. Die erhaltenen Primer wurden abzentrifugiert (30 s, 13400 U/min) und in ddH₂O gelöst (Endkonzentration 100 pmol/μL). Es wurden Aliquots in einer Arbeitskonzentration von 10 pmol/μL hergestellt und diese bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Oligonukleotide zur Gen Amplifikation der LinB.

Primer	Sequenz
LinB_f_HindIII	GCTAGAAGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGCTGGG
LinB_r_Nco1	GCATCCATGGCCAGCCTCGGGCAAAGCCATTGG

Tabelle 4: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese der LinB.

Variante	Primer	Sequenz
LinB_D108S	F	GGTTGTTCTGGTCGTGCAATCCTGGG
	R	CCCAGGAATGCACGACCAGAACAACC
LinB_L177F	F	GTTCTCCCCGGAATCATCCTGCGCCCCTTAAGCG
	R	CGCTTAAGGGGCGCAGGATGATCCGGGGAGAAC
LinB_L177M	F	GTTCTCCCCGGAATGATCCTGCGCCCCTTAAGCG
	R	CGCTTAAGGGGCGCAGGATCATCCGGGGAGAAC
LinB_L177W	F	GTTCTCCCCGGAATGGATCCTGCGCCCCTTAAGCG
	R	CGCTTAAGGGGCGCAGGATCCATCCGGGGAGAAC

LinB_P144R	F R	CGAATGGGCGGATTTT CGC GAACAGGATCGCGATCTG CAGATCGCGATCCTGTTC GCG AAAATCCGCCATTTCG
LinB_Q146A	F R	GCGGATTTTCCCGAA GCG GATCGCGATCTGTTTCAGGCC GGCCTGAAACAGATCGCGATC GCG CTTCGGGAAAATCCGC
LinB_V173L	F R	GGACAATGTTTTTGTCTGAACA ACTT CTCCCCGGATTGATCC GGATCAATCCGGGGAG AAG TTGTTCGACAAAAACATTGTCC
LinB_H272F	F R	GGTCGCAGGCGCC TTTT TCATCCAGGAGG CCTCCTGGATG AAA AGGCGCCTGCGACC
LinB_N38S	F R	CCTCTTCCAGCACGGC AGT CCGACGTCGTCC GGACGACGTCGG ACT GCCGTGCTGGAAGAGG

2.1.4 Plasmide

Tabelle 5 Verwendete Plasmide für die Expression.

Plasmid	Merkmale	Resistenz	Anbieter
pET-28a(+)	T7- Promotor, lac Operator	Kanamycin	Novagen, Madison, Wisconsin, USA
pET-22b(+)	T7- Promotor, lac Operator	Ampicillin	Novagen, Madison, Wisconsin, USA

Tabelle 6 Vektorkonstrukte der LinB, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Vektorkonstrukte	Insert	Quelle	ITB No.
pET-28a(+)_LinB_WT	LinB_WT	Diese Arbeit	pITB1221
pET-28a(+)_LinB_N38S	LinB_N38S	Diese Arbeit	pITB1222
pET-28a(+)_LinB_D108S	LinB_D108S	Diese Arbeit	pITB1223
pET-28a(+)_LinB_P144R	LinB_P144R	Diese Arbeit	pITB1227
pET-28a(+)_LinB_Q146A	LinB_Q146A	Diese Arbeit	pITB1228
pET-28a(+)_LinB_V173L	LinB_V173L	Diese Arbeit	pITB1231
pET-28a(+)_LinB_L177F	LinB_L177F	Diese Arbeit	pITB1232
pET-28a(+)_LinB_L177M	LinB_L177M	Diese Arbeit	pITB1233
pET-28a(+)_LinB_L177W	LinB_L177W	Diese Arbeit	pITB1234
pET-28a(+)_LinB_H272F	LinB_H272F	Diese Arbeit	pITB1235

Tabelle 7 Vektorkonstrukte der AacSHC, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Vektorkonstrukte	Insert	Quelle	ITB No.
pET-22b(+)_AacSHC_WT	AacSHC_WT	S.Hammer ^[19]	pITB1024
pET-22b(+)_AacSHC_W169A	AacSHC_W169A	S.Hammer ^[19]	pITB1027
pET-22b(+)_AacSHC_I261A	AacSHC_I261A	S.Hammer ^[19]	pITB1028
pET-22b(+)_AacSHC_I261W	AacSHC_I261W	S.Hammer ^[19]	pITB1033
pET-22b(+)_AacSHC_S307A	AacSHC_S307A	S.Hammer ^[19]	pITB1034

2 Material und Methoden

pET-22b(+)_AacSHC_W312A	AacSHC_W312A	S.Hammer ^[19]	pITB1036
pET-22b(+)_AacSHC_F365A	AacSHC_F365A	S.Hammer ^[19]	pITB1037
pET-22b(+)_AacSHC_Q366A	AacSHC_Q366A	S.Hammer ^[19]	pITB1041
pET-22b(+)_AacSHC_Q366F	AacSHC_Q366F	S.Hammer ^[19]	pITB1042
pET-22b(+)_AacSHC_D376C	AacSHC_D376C	S.Hammer ^[19]	pITB1043
pET-22b(+)_AacSHC_A419G	AacSHC_A419G	S.Hammer ^[19]	pITB1045
pET-22b(+)_AacSHC_Y420A	AacSHC_Y420A	S.Hammer ^[19]	pITB1046
pET-22b(+)_AacSHC_Y420C	AacSHC_Y420C	S.Hammer ^[19]	pITB1047
pET-22b(+)_AacSHC_W489A	AacSHC_W489A	S.Hammer ^[19]	pITB1051
pET-22b(+)_AacSHC_G600A	AacSHC_G600A	S.Hammer ^[19]	pITB1052
pET-22b(+)_AacSHC_G600F	AacSHC_G600F	S.Hammer ^[19]	pITB1053
pET-22b(+)_AacSHC_L607A	AacSHC_L607A	S.Hammer ^[19]	pITB1058
pET-22b(+)_AacSHC_L607F	AacSHC_L607F	S.Hammer ^[19]	pITB1059
pET-22b(+)_AacSHC_Y609A	AacSHC_Y609A	S.Hammer ^[19]	pITB1061
pET-22b(+)_AacSHC_Y609W	AacSHC_Y609W	S.Hammer ^[19]	pITB1062

2.1.5 *E. coli*-Stämme

Tabelle 8 *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	ITB No.
DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	ITB 4
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> (DE3)	ITB 7

2.1.6 Kits

Die verwendeten Kits wurden jeweils den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Tabelle 9 Verwendete Kits und Anbieter.

Kit	Anbieter
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Waltham, US
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Irvine, US
Zymoclean DNA Clean & Concentrator Kit	Zymo Research Irvine, US
Zyppy Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Irvine, US

2.1.7 Software für das molekulare Docking

Für das durchgeführte Docking und die Bildgestaltung wurden die Programme YASARA ^[91] und PyMOL ^[92] verwendet.

2.1.8 Medien und Puffer

2.1.8.1 Kulturmedien

Zur Anzucht von *E. coli* Zellkulturen wurde den Flüssigmedien zur Selektion, je nach enthaltenem Plasmid und der damit gegebenen Antibiotikum-Resistenz, entweder Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/mL) oder Kanamycin (30 µg/mL) zugesetzt. Die Zugabe erfolgte nach Autoklavieren der Medien, wenn diese auf ca. 50 °C abgekühlt waren, um eine Zersetzung der Antibiotika zu verhindern.

Tabelle 10 Medien für die Anzucht von *E. coli* Zellen.

LB-Medium: (low salt)	Trypton Hefeextrakt NaCl	10.0 g 5.0 g 5.0 g
	ddH ₂ O pH 7.0	ad 1000 mL mit NaOH [1 M]
TB-Medium:	Trypton Hefeextrakt Glycerin (88 %)	12.0 g 24.0 g 4.0 mL
	ddH ₂ O 10x TB-Phosphatpuffer	ad 900 mL 100 mL nach Autoklavieren
SOC-Medium:	Trypton Hefeextrakt NaCl 250 mM KCl-Lösung 1 M Glucose	20.0 g 5.0 g 0.5 g 10.0 mL 5.0 mL
	ddH ₂ O pH 7.0	ad 1000 mL mit NaOH [1 M]
KP_i-Puffer: (Kaliumphosphatpuffer)	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	1 M 1 M
	pH 7.5	

2 Material und Methoden

10x TB-Phosphatpuffer:	KH ₂ PO ₄	0.17 M
	K ₂ HPO ₄	0.72 M
	pH 7.0	

Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

Orange G DNA Loading-Puffer:	Saccharose	2.0 g
	Orange G	10.0 mg
	ddH ₂ O	ad 5 mL
TAE-Puffer:	Tris	4.8 g
	Eisessig	1.14 mL
	0.5 M EDTA-Lösung	2.0 mL
	ddH ₂ O	ad 1000 mL
	pH 8	mit Salzsäure (37 %ig)
0.7 % Agarose:	Agarose	3.5 g
	TAE-Puffer	ad 500 mL

2 Material und Methoden

6x SDS Probenpuffer:	Tris-HCl pH 8 DTT Glycerol SDS Bromphenolblau	350 mM 600 mM 30 % (v/v) 10 % (w/v) 0.12 % (w/v)
4 x Lower Tris Puffer:	Tris SDS ddH ₂ O pH 8.8	181.7 g 4.0 g ad 1000 mL mit Salzsäure (37%ig)
4 x Upper Tris Puffer:	Tris SDS ddH ₂ O pH 6.8	60.6 g 4.0 g ad 1000 mL mit Salzsäure (37%ig)
Trenngel 15 %:	ddH ₂ O Acrylamidlösung 30 % 4 x Lower Tris Puffer SDS 10 % APS 10 % TEMED	2.3 mL 5.0 mL 2.5 mL 0.1 mL 0.1 mL 0.004 mL
Sammelgel 4 %:	ddH ₂ O Acrylamidlösung 30 % 4 x Upper Tris Puffer SDS 10% APS 10 % TEMED	1.4 mL 0.3 mL 0.25 mL 0.02 mL 0.02 mL 0.002 mL
Elektrodenpuffer:	Tris Glycin SDS ddH ₂ O	15.0 g 72.0 g 5.0 g ad 1000 mL

Coomassie-Färbelösung:	Ethanol Essigsäure (99.8 %) ddH ₂ O Coomassie-Brilliantblau R-250	30 % (v/v) 10 % (v/v) 60 % (v/v) 1 g/L
Coomassie-Entfärbelösung:	Ethanol Eisessig ddH ₂ O	30 % (v/v) 10 % (v/v) 60 % (v/v)

Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Tfbl-Puffer:	KOAc RbCl CaCl ₂ MnCl ₂ · 4 H ₂ O Glycerin ddH ₂ O	0.59 g 2.42 g 0.29 g 2.0 g 30 mL 200 mL
---------------------	---	--

2 Material und Methoden

	pH 5.8	mit Essigsäure (99.8%)
TfbII-Puffer:	MOPS	0.21 g
	CaCl ₂	1.1 g
	RbCl	0.12 g
	Glycerin	15 mL
	ddH ₂ O	100 mL
	pH 6.5	mit NaOH [1 M]

Puffer für die Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC)

Bindepuffer:	KP _i	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7.6	mit NaOH/HCl [1 M]
Waschpuffer:	KP _i	50 mM
	NaCl	150 mM
	Imidazol	5 mM
	pH 7.6	mit HCl [1 M]
Elutionspuffer:	KP _i	50 mM
	NaCl	150 mM
	Imidazol	150 mM
	pH 7.6	mit HCl [1 M]

2.2 Molekularbiologische Methoden

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

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Zyppy MiniPrep Kit verwendet. Die Präparation der *E. coli*-Zellen erfolgte durch das Anzüchten einer Übernachtskultur (5 mL Volumen) in LB-Selektionsmedium bei 37 °C und 180 U/min über Nacht. Die Isolation erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Die Konzentration der erhaltenen Plasmid-DNA wurde mittels Absorptionsmessung bei 260 nm an einem NanoDrop 1000 (Agilent, Santa Clara, US) vermessen.

2.2.2 Herstellung RbCl-kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet. Hierzu werden 100 mL LB-Medium mit den benötigten *E. coli*-Zellen in-

okuliert und im Schüttelkolben bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0.5$ inkubiert. Die Zellkultur wurde 2 min auf Eis gelagert und anschließend abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 4000 U/min). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltende Zellpellet wurde in 40 mL TfbI-Puffer suspendiert für 15 min auf Eis gelagert und danach erneut abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 4000 U/min). Nach erneutem Resuspendieren des Zellpellets in 5 mL TfbII-Puffer, wurde die Zellsuspension für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.2.3 DNA Amplifikation mittels PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerasekettenreaktion dient der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente. Das jeder PCR zugrunde liegende Prinzip beruht auf periodischer Wiederholung dreier Schritte:

Denaturierung: Durch Erhitzen der DNA-Matrize auf 95 °C werden die komplementären Einzelstränge getrennt.

Annealing: Bei Abkühlung des Reaktionsansatzes auf 37–72 °C können sich die einzelsträngigen DNA-Fragmente (Primer) an die nun einzelsträngige DNA-Matrix anlagern. Die verwendeten Primer sind komplementär zu kurzen Sequenzabschnitten am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die Annealingtemperatur hängt in erster Linie von der Länge und des GC-Gehalts der verwendeten Primer ab.

Elongation: Bei Temperaturen zwischen 68–72 °C und optimalen Pufferbedingungen synthetisieren hitzestabile DNA-Polymerasen, beginnend an den angelagerten Primern, den komplementären Strang. Die Synthese erfolgt stets von Richtung des 5' nach 3' Ende unter Verwendung zugesetzter Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTPs).

Durch jeden Zyklus wird das Amplifikat im Idealfall verdoppelt und so eine exponentielle Vervielfältigung erreicht.

2 Material und Methoden

Tabelle 11 PCR Ansatz.

10 x Polymerase-Puffer	5 µL
25 mM MgSO ₄	3 µL
Forward Primer (1 µM)	0.2 µM
Reverse Primer (1 µM)	0.2 µM
DNA-Templat	1 ng-1 µg
dNTPs (jeweils 2.5 mM)	0.2 mM jeweils
KOD Hot Start DNA Polymerase (1 U/ µL)	0.02 U/µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 12 PCR-Programm.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	20 s	} 20
Annealing	58-68	10 s	
Elongation	70	4 min	
Zu Schritt 2			
finale Elongation	70	5 min	1

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten aus einem Restriktionsverdau oder PCR erfolgte nach der Agarosegel-Elektrophorese, wobei 0.7 %-ige Agarosegele verwendet wurden. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel 0.01 % (v/v) GelRed™ hinzugegeben. Als interner DNA-Standard wurden 3 µL GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific) pro Geltasche verwendet. DNA-Proben wurden mit dem Farbstoff Orange G überschichtet und in die entsprechenden Geltaschen überführt. Die Trennung der DNA-Proben erfolgte bei konstanter Spannung (120 V) für 40 min. Die Detektion und Dokumentation erfolgte über eine Dokumentationsstation (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE). Zur Aufreinigung spezifischer DNA-Fragmente wurde das Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe des GelExtraction Kits (Zymo Research, Irvine, US) den Herstellerangaben entsprechend aufgearbeitet.

2.2.5 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. ^[93] Als Primer wurden die bei GATC vorhandenen Standardprimer T7 und pET-RP verwendet, welche für pET-Vektor-Systeme entworfen wurden.

2.2.6 Überprüfung einer Gen- Insertion mittels Kolonie-PCR

Die Insertion eines Gens wurde durch Kolonie-PCR überprüft. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in den PCR-Ansatz (Tabelle 11) überführt. Hierzu wurde allerdings die *Taq*-Polymerase anstelle der KOD Hot Start DNA Polymerase verwendet. Das PCR-Programm wurde entsprechend Tabelle 12 gewählt, mit der Änderung der Annealing Temperatur auf 50 °C. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese (2.2.4) aufgetrennt und die Banden unter UV-Licht detektiert. Die Banden, die die richtige Größe aufwiesen, wurden mit dem Zymo Gel DNA Recovery Kit aufgereinigt und die Plasmide zur Sequenzierung (2.2.5) verschickt.

2.2.7 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen der Firma Fermentas. Alle Bedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Die Produkte der Reskriktion wurden mit Agarosegelelektrophorese überprüft und aufgereinigt (2.2.4).

2.2.8 Transformation kompetenter *E. coli*- Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA, wurde die Hitzeschock-Methode verwendet. Hierzu wurde ein 50 µL-Aliquot der chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Den Zellen wurde 1 µL Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 s andauernden Hitze-

schock bei 42 °C im Wasserbad wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 500 µL SOC-Medium versetzt. Nach 30 min bei 37 °C und 180 U/min im Inkubator wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 U/min, 2 min, RT), 400 µL des Überstandes abgenommen, die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert und 100 µL der Suspension auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C über Nacht.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4- DNA- Ligase

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, die sowohl überhängende (*sticky*) als auch glatte (*blunt*) Restriktionsenden verknüpft. Der Ligationsansatz wurde mit Hilfe des T4-DNA-Ligase Ligation Protocol (New England Biolabs, Ipswich, US) laut Herstellerangaben durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde anschließend entsprechend (2.2.8) transformiert.

2.2.10 Ortsgerichtete Mutagenese von Genen mit Hilfe der QuikChange PCR

Für die Einführung von Punktmutationen wurde die QuikChange®-PCR-Methode verwendet, wobei die Durchführung den Herstellerangaben der Firma Stratagene für das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit entsprechend erfolgte. Dabei werden Primer mit der gewünschten Mutation entworfen, welche ca. 25 – 45 bp lang sind. 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® 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. Die Zusammensetzung der QuikChange®-PCR-Ansätze erfolgte analog zu den Ansätzen der klassischen PCR mit KOD Hot Start DNA-Polymerase (2.2.3). Im Anschluss an die QuikChange®-PCR werden die Parentalstränge der PCR, also das ursprüngliche bak-

terielle Plasmid, mittels des Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. Dafür wird dem QuikChange®-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* DH5 α -Zellen mit 4 μL des PCR-Ansatzes transformiert (2.2.8). Die Analyse der erhaltenen Transformanden erfolgte durch Sequenzierung der Inserts der entsprechenden Plasmide (2.2.5).

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Sämtliche *E. coli* Stämme wurden in LB- oder in TB-Medium kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wurde je nach verwendetem Plasmid Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. Für Übernachtskulturen wurden 5 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 U/min inkubiert.

2.3.2 Proteinexpression von LinB in *E. coli* BL21 (DE3) per Induktion mit IPTG

400 mL TB-Medium und 400 μL Kanamycin (30 mg/mL) wurden in einem 2 L Erlenmeyerkolben vorgelegt. Anschließend wurde mit einer Übernachtskultur von *E. coli* auf eine $\text{OD}_{600} = 0.005$ angeimpft und bei 37 °C und 180 U/min bis zu einer $\text{OD}_{600} 0.8 - 1$ inkubiert. Nach Erreichen dieses Wertes wurde die Expression durch Zugabe von 0.5 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde anschließend zwischen 16 – 20 h lang bei 30 °C und 180 U/min inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugieren in einem SLA 3000 Rotor (7000 U/min, 15 min, 4 °C).

2.3.3 Proteinexpression von *AacSHC* in *E. coli* BL21 (DE3) per Autoinduktion

400 mL TB-Medium und 400 μL Ampicillin (100 mg/mL) wurden in einem 2 L Erlenmeyerkolben vorgelegt. Anschließend wurde mit einer Übernachtskultur (4 mL) von *E. coli* inokuliert und bei 37 °C und 180 U/min 18 h inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugieren in einem SLA-3000 Rotor (7000 U/min, 15 min, 4 °C).

2.3.4 Zellaufschluss

Zellpellets wurden mit 3–5 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 (für LinB) oder 200 mM Citratpuffer pH 6.0 (für *AacSHC*) mit 0.1 mM PMSF und DNase pro 1 g Zellmasse resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall im Sonifier bei 80 Watt und einem Arbeitsintervall von 40 %. Der Aufschluss erfolgte vier Mal für eine Minute, mit jeweils 30 s Unterbrechung, unter Eiskühlung. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden in einem SS-34 Rotor abzentrifugiert (17000 U/min, 30 min, 4 °C). Das Lysat der LinB wurde an dieser Stelle weiter aufgereinigt. Der Überstand der *AacSHC* wurde verworfen und mit dem Zellpellet weiter verfahren.

2.3.5 Solubilisierung und Hitzeschock-Aufreinigung des Membranproteins *AacSHC*

Da die Squalen-Hopen-Zyklase ein membrangebundenes Enzym ist, muss sie durch ein Detergens nach dem Zellaufschluss vom Zellpellet gelöst werden. Das erfolgte im Solubilisierungspuffer (60 mM Citratpuffer, pH 6.0 mit 1 % CHAPS als Detergens) für 2 h oder maximal über Nacht bei 4 °C. Nach der Solubilisierung wurden übrige Mengen an *E. coli*-Proteinen durch einen Hitzeschock (30 min bei 50 °C) präzipitiert und durch Zentrifugation (17000 U/min, 4 °C) abgetrennt. Enzympräparationen wurden an dieser Stelle für Biotransformationen verwendet oder bis zu weiteren Verwendung aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Proteinaufreinigung der LinB mittels HisGraviTrap™ TALON® Chromatographie

Die Proteinaufreinigung von His₆-Tag enthaltenden Proteinen (LinB und Varianten) erfolgte mittels Co-Affinitätschromatographie, bei der Proteine mit einem His₆-Tag über eine Säulenmatrix mit gebundenen Co²⁺-Ionen geleitet werden und an dieser Probenmatrix, aufgrund der Affinität der Histidin-Seitenketten gegenüber Co²⁺ gebunden werden. Die Aufreinigung erfolgte an HisGraviTrap™ TALON®-Säulen (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) unter Verwendung eines vorgegebenen Puf-

fersystems (Bindepuffer, Waschpuffer und Elutionspuffer (2.1.8.1.). Es wurde entsprechend der Herstellerangaben verfahren. Darauf folgend wurde, um das in der Proteinlösung vorhandene Imidazol zu entfernen, das erhaltene Zielprotein gegen einen KP_1 -Puffer ohne Imidazol über Vivaspin6-Säulen mit 10 kDa MWCO (Sartorius-Stedim biotech, Göttingen, DE) ausgetauscht und anschließend aufkonzentriert.

2.3.7 SDS-PAGE

Zum Nachweis von Proteinen und zur Analyse ihrer Reinheit wurde eine SDS-PAGE angewandt. ^[94] Die in einem Gemisch vorhandenen Proteine werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zur Analyse der Proteine wurden 15 % Acrylamid enthaltende Trenngele hergestellt und nach der Polymerisation mit 4 %-igen Sammelgelen überschichtet. Die Proteinproben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zentrifugation der Proben (14000 U/min, 2 min, 4 °C) wurde das Gel beladen. Nach Zugabe von SDS-Elektrodenpuffer erfolgte die Elektrophorese zunächst 10 min bei 10 mA pro Gel, anschließend 1 h bei 25 mA pro Gel. Als Größenmarker diente der Proteinstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific). Die Proteinbanden wurden durch Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel eine Stunde in SDS-Färbelösung inkubiert und nach genügend starker Färbung, wieder mit SDS-Entfärbelösung entfärbt.

2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wurde das BCA-Kit von ThermoScientific verwendet und entsprechend den Herstellerangaben verfahren.

2.3.9 Umsetzungen von Substraten

2.3.9.1 Analytische Biotransformationen mit LinB

Alle Substrate wurden in einer Konzentration von 250 mM in DMSO gelöst. Daraus wurden verschiedene Stocklösungen für die Kalibrierung erstellt. Es wurde eine

250 mM Stocklösung des jeweiligen Substrats für die Biotransformation verwendet ($c_{\text{END}}(\text{DMSO}) = 1\%$). Die Enzymmenge betrug 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1.6 μM). Die Reaktion wurde in einem Glasboden Gefäß (2 mL) für verschiedene Zeiträume bei 37 °C und 750 U/min in einem Thermomixer durchgeführt. Das Endvolumen betrug 1 mL in KP_i - Puffer (50 mM, pH 7.5). Nach der Reaktion wurde direkt 1 x mit 1 mL *tert*-butylmethylether (mit 0.01% 1-Octanol als interner Standard) extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Im Falle der Verwendung von organischen Isothiocyanaten wurden zunächst 30 μL NaOH (10 M) zugegeben und dann wie oben angegeben extrahiert. Die Proben wurden mittels GC-FID Messung quantitativ analysiert.

2.3.9.2 Qualitativer Bismut-Assay

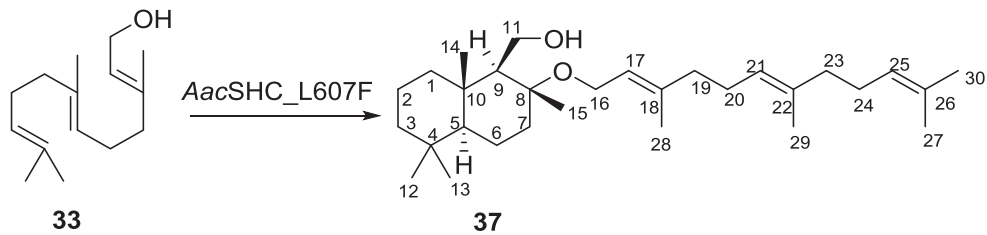
Da bei der Umsetzung von organischen Isothiocyanaten mit LinB Schwefelwasserstoff frei wurde, wurde dieser *in situ* mit Bi^{3+} abgefangen und als unlösliches Bismutsulfid (Bi_2S_3 , schwarz-braun) gefällt. Dafür wurden 2 μL $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (gesättigte Lösung in HCl-saurem Wasser) zum Biotransformationsansatz gegeben und wie in 2.3.9.1 verfahren.

2.3.9.3 Analytische Biotransformationen mit AacSHC

Farnesol wurde in einer Konzentration von 200 mM in DMSO gelöst. Diese Stocklösung wurde für die Biotransformation verwendet ($c_{\text{END}}(\text{DMSO}) = 1\%$). Die Enzymmenge betrug 1 mg/mL. Die Reaktion wurde in einem Glasboden Gefäß (2 mL) für verschiedene Zeiträume bei 65 °C und 750 U/min in einem Thermomixer durchgeführt. Das Endvolumen betrug 1 mL in Citrat-Puffer (60 mM, pH 6.0). Nach der Reaktion wurde direkt 1 x mit 1 mL *tert*-butylmethylether (mit 0.01 % 1-Octanol als interner Standard) extrahiert und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Die Proben wurden mittels GC-FID/MS quantitativ analysiert.

2.3.9.4 Präparative Biotransformationen mit AacSHC

Produkt 37

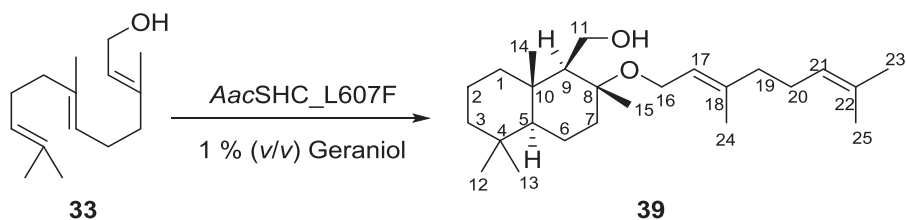


Für die Reaktion wurden ca. 40 mL Enzympräparation mit 207.5 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 2.5 mL Farnesol (200 mM DMSO Stock) für 4 Tage bei 60 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit *tert*-butylmethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingeeengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 1:12).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ 0.8 (m, 6H), 0.9 (m, 3H), 1.1-1.9 (m, 27H), 2.0 (m, 8H), 3.7 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 4.2 (s, OH), 5.1 (s, 2H), 5.2 (s, 1H) ppm.

¹³C-NMR (CDCl₃), δ 16.0 (C-29), 16.4 (C-14), 16.4 (C-28), 17.7 (C-30), 18.6 (C-2), 19.4 (C-15), 19.7 (C-6), 21.6 (C-13), 25.7 (C-27), 26.4 (C-20), 26.7 (C-24), 33.3 (C-4), 33.5 (C-12), 37.6 (C-10), 39.1 (C-7), 39.6 (C-19), 39.7 (C-23), 40.0 (C-1), 41.7 (C-3), 55.7 (C-5), 56.5 (C-16), 59.4 (C-9), 60.7 (C-11), 80.4 (C-8), 121.2 (C-17), 123.3 (C-21), 124.4 (C-25), 131.3 (C-26), 135.3 (C-22), 139.6 (C-18) ppm.

Produkt 39



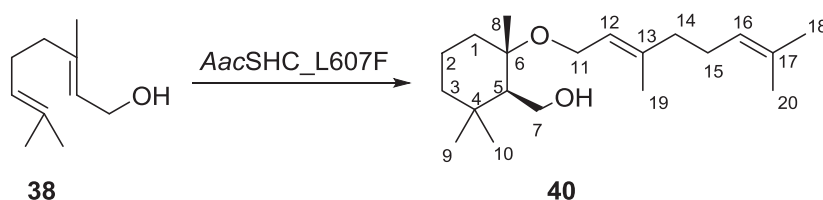
Für die Reaktion wurden ca. 40 mL Enzympräparation mit 207.5 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 2.5 mL Farnesol (200 mM DMSO Stock) und 1 % (v/v) Geraniol für 4 Tage bei 60 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit *tert*-butylmethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer einge-

engt und das überschüssige Geraniol mittels Vakuum-Destillation entfernt. Der Destillationssumpf wurde weiter mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 1:10).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ 0.8 (m, 6H), 0.9 (m, 3H), 1.1-1.9 (m, 22H), 2.0 (m, 6H), 3.7 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 4.2 (s, OH), 5.0 (s, 1H), 5.1 (s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ 15.4 (C-24), 16.7 (C-14), 17.6 (C-25), 18.4 (C-2), 18.7 (C-6), 20.6 (C-15), 24.7 (C-12), 25.4 (C-13), 28.7 (C-23), 32.2 (C-20), 32.5 (C-4), 36.6 (C-10), 38.0 (C-1), 38.5 (C-19), 39.0 (C-3), 40.7 (C-7), 54.7 (C-5), 55.5 (C-9), 58.4 (C-11), 59.6 (C-16), 79.4 (C-8), 120.1 (C-17), 122.9 (C-21), 130.6 (C-22), 138.5 (C-18) ppm.

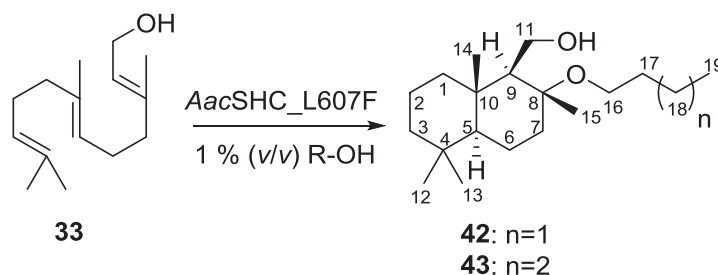
Produkt 40



Für die Reaktion wurden ca. 40 mL Enzympräparation mit 207.5 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 2.5 mL Substrat (20 mM DMSO Stock) für 4 Tage bei 60 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit *tert*-butylmethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über Na_2SO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 1:10).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3), δ 0.8 (m, 6H), 1.1 (m, 3H), 1.9 (m, 2H), 2.1 (m, 2H), 1.1-2.0 (m, 16H), 3.7 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 4.2 (s, OH), 5.0 (s, 1H), 5.2 (s, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3), δ 16.4 (C-19), 17.7 (C-20), 18.9 (C-2), 19.9 (C-8), 21.9 (C-18), 25.7 (C-4), 26.4 (C-15), 33.2 (C-9), 33.7 (C-10), 37.9 (C-1), 39.6 (C-14), 40.0 (C-3), 54.7 (C-7), 56.7 (C-25), 61.6 (C-11), 80.3 (C-6), 121.1 (C-12), 124.0 (C-16), 131.7 (C-17), 139.7 (C-13) ppm.

Produkt **42,43**

Für die Reaktion wurden ca. 40 mL Enzympräparation mit 207.5 mL Reaktionspuffer (60 mM Citrat, pH 6.0) und 2.5 mL Farnesol (200 mM DMSO Stock) und jeweils 1 % (v/v) Butanol oder 1 % (v/v) Pentanol für 4 Tage bei 60 °C in einem Rundhalskolben inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend mit *tert*-butylmethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Ethylacetat/Cyclohexan 1:10).

Produkt **42**:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ 0.7 (m, 6H), 0.9 (m, 3H), 1.1-2.0 (m, 22H), 3.3 (m, 2H), 3.8 (m, 2H), 4.2 (s, OH) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃), δ 13.9 (C-19), 16.4 (C-14), 18.6 (C-2), 19.1 (C-6), 19.5 (C-13), 19.7 (C-15), 21.6 (C-18), 32.5 (C-17), 33.3 (C-4), 33.5 (C-12), 37.6 (C-10), 39.0 (C-7), 40.0 (C-1), 41.7 (C-3), 55.7 (C-5), 59.2 (C-9), 59.6 (C-11), 60.7 (C-16), 80.2 (C-8) ppm.

Produkt **43**:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), δ 0.8 (m, 6H), 0.9 (m, 3H), 1.1-2.0 (m, 24H), 3.3 (m, 2H), 3.7 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 4.2 (s, OH)

¹³C-NMR (CDCl₃), δ 14.0 (C-20), 16.4 (C-14), 18.6 (C-2), 19.1 (C-19), 19.7 (C-6), 21.6 (C-13), 22.5 (C-15), 28.5 (C-18), 30.2 (C-17), 33.3 (C-4), 33.5 (C-12), 37.6 (C-10), 39.0 (C-7), 40.0 (C-1), 41.7 (C-3), 55.7 (C-5), 59.6 (C-9), 59.6 (C-11), 60.7 (C-16), 80.2 (C-8) ppm.

2.4 Chemisch-analytische Methoden

2.4.1 Gaschromatographie

LinB

Für die Gaschromatographie wurde ein Gaschromatograph vom Typ Shimadzu GC-2010 (Kyōto, JP) mit Flammenionisationsdetektor (FID) und ZB-5 Kapillarsäule (30 m × 250 μm × 0.25 μm, Phenomenex, US) verwendet. Als Trägergas diente Wasserstoff mit einer linearen Trägergasgeschwindigkeit von 30 cm/s. Die Injektortemperatur betrug 250 °C und die Detektortemperatur 370 °C. Für das Standard-Temperaturprogramm wurden folgende Parameter gewählt: 50 °C (1 min), Erhitzen auf 125 °C (15 °C/min) mit einer Haltezeit von 2 min, Erhitzen auf 300 °C (50 °C/min) mit einer Haltezeit von 1 min. Für die chirale Messung der Analyten wurde eine CP-Chirasil-Dex CB Kapillarsäule (25 m × 250 μm × 0.25 μm, Agilent, US) verwendet. Die Injektortemperatur betrug 200 °C und die Detektortemperatur 240 °C. Für das Temperaturprogramm wurden folgende Parameter verwendet: 90 °C, Erhitzen auf 165 °C (4 °C/min), Erhitzen auf 200 °C (40 °C/min). Quantifizierungen wurden mit 1-Octanol als internen Standard durchgeführt.

AacSHC

Des Weiteren wurde ein Gaschromatograph vom Typ Agilent 7890A GC/MS (Santa Clara, US) mit kombinierten Flammenionisationsdetektor sowie massenselektivem Detektor (Agilent 5975 Series MSD, Santa Clara, US) genutzt. Die parallele Analyse mit beiden Detektoren erfolgte über die Teilung des Gasflusses direkt nach der Trennung in der Kapillarsäule (DB-5HT, 30 m × 250 μm × 0.1 μm, Agilent, Santa Clara, US). Bei diesem System wurde Helium als Trägergas verwendet. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 275 °C sowie einer FID-Temperatur von 410 °C. Für das Standard-Temperaturprogramm wurden folgende Parameter gewählt: 70 °C (2 min), Erhitzen auf 230 °C (20 °C/min), Erhitzen auf 240 °C (20 °C/min), Erhitzen auf 270 °C (20 °C/min), Erhitzen auf 380 °C (20 °C/min) mit einer Haltezeit von 2 min. Die Quantifizierungen wurden mit 1-Octanol als internen Standard durchgeführt.

2.4.2 NMR-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der enzymatisch synthetisierten Moleküle wurde die NMR-Spektroskopie genutzt. ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 500.15 MHz vermessen. Die chemische Verschiebung (δ) in parts per million (ppm) wurde bezogen auf den Standard Tetramethylsilane ($\delta=0$ ppm).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzymklassen gewählt, die unter Verwendung der Asparaginsäure als aktive Aminosäure verschiedene Reaktionen katalysieren. Es sollte die jeweilige katalytische Promiskuität, vor allem aber die Substratpromiskuität untersucht werden. Dafür wurden Untersuchungen mit zwei unterschiedlichen Enzymen, der LinB aus *Sphingobium japonicum* als Vertreter der Haloalkan Dehalogenasen, und der AacSHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* als Vertreter der Squalen-Hopen-Zyklasen, durchgeführt, welche im Folgenden separat behandelt werden.

3.1 LinB

3.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung der LinB

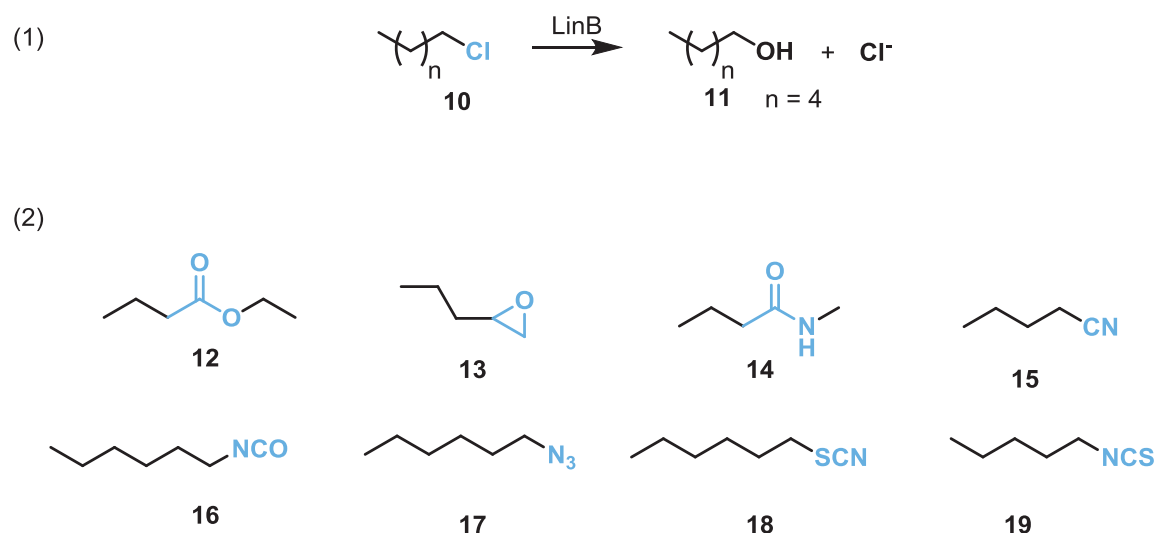
Das native LinB Gen, welches sich auf dem pUC18-Plasmid (freundlicherweise von der Arbeitsgruppe J. Damborsky, Masaryk Universität, Brünn zur Verfügung gestellt) befand, wurde mittels einer PCR (2.2.3) vervielfältigt, wobei gleichzeitig die jeweiligen Sequenzen der *Hind*III und *Nco*I Bindestellen eingefügt wurden. Anschließend wurde das Gen mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Nco*I verdaut und per Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4) aufgereinigt. Das Plasmid pET-28a(+) wurde mittels derselben Restriktionsenzyme verdaut und per Agarose-Gelelektrophorese (2.2.4) aufgereinigt. Anschließend wurde das LinB-Fragment in pET-28a(+) kloniert. Das klonierte Gen wurde mittels Sequenzierung überprüft, in den entsprechenden Expressionsstamm *E. coli* BL21 (*DE3*) transformiert und anschließend die Expression nach 2.3.2 über 19 h durchgeführt. Die Proteinaufreinigung, die nach dem Aufschluss der Zellen erfolgte, wurde mittels Co^{2+} -Affinitätschromatographie über HisGraviTrap™ TALON®-Säulen durchgeführt (2.3.6). Die durchschnittlichen Proteinkonzentrationen wurden nach 2.3.8 bestimmt. Die Menge an gewonnenem Enzym nach der Proteinaufreinigung und Aufkonzentration über Vivaspin Säulen betrug ca. 20 mg LinB pro L TB-Medium. Die Reinheit betrug > 95 % (SDS-Gel im Anhang).

3.1.2 Bestimmung der Aktivität des LinB Wildtyps

Die Aktivität des exprimierten und aufgereinigten Wildtyps wurde anhand *in vitro* Biotransformationen (2.3.9.1) mit 1-Chlorhexan als natürlichem Substrat getestet und mittels GC-FID analysiert. Die spezifische Aktivität wurde mit 0.46 ± 0.01 U/mg Enzym bestimmt.

3.1.3 Untersuchung zur Substratspezifität der nativen LinB

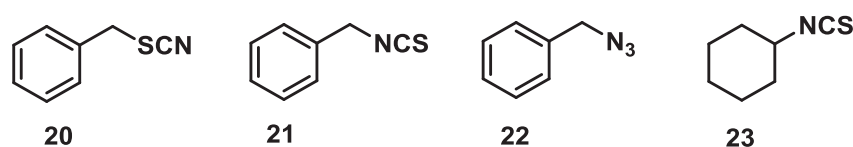
Zur Untersuchung der Substratspezifität der aufgereinigten LinB wurde diese auf die Fähigkeit dahingehend getestet, ob nicht-halogenierte Alkane als Substrate umgesetzt werden, die noch nicht literaturbekannt sind. Dabei wurde das Augenmerk auf Substrate gelegt, die Substrate anderer Mitglieder der Hydrolase-Familie darstellen, wie etwa Ester, Amide oder auch Epoxide. Zusätzlich wurden Substrate gewählt, die chemisch sehr ähnlich zu den halogenierten Verbindungen sind, wie die Pseudohalogenide Azide, Thiocyanate, Isocyanate und Isothiocyanate. Die ausgewählten Substrate, die für ein erstes *screening* ausgewählt wurden, sind in Schema 6 zusammengefasst.



Schema 6 Natürliche Reaktion der LinB (1) und alternativ getestete Substrate (2).

Ausgewählte Substrate wurden nach dem beschriebenen Protokoll unter 2.3.9.1 auf Aktivität getestet. Die Reaktionsansätze wurden mit $1.6 \mu\text{M}$ ($50 \mu\text{g/mL}$) Enzym,

2.5 mM Substrat über Nacht (16 h) bei 37 °C inkubiert. Negativkontrollen wurden jeweils mit leerem pET-28a(+)-Vektor vorgenommen. Im Rahmen erster Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass LinB keine Aktivität gegenüber den Substraten **12-16** aufwies. 1-Isocyanatohexan **16** hydrolysierte bei den gegebenen Reaktionsbedingungen ohne Enzymzugabe. Unter den getesteten Pseudohalogeniden **17-19** zeigte LinB interessanterweise eine deutliche Aktivität gegenüber 1-Thiocyanatohexan **18** und 1-Isothiocyanatopentan **19** von bis zu 30 % Umsatz nach 16 h (Tabelle 13). Allerdings stellte 1-Azidohexan **17** kein Substrat für LinB dar, da keine Umsetzung des Substrates festgestellt werden konnte. Die spezifischen Aktivitäten der nativen LinB bezüglich 1-Thiocyanatohexan **18** und 1-Isothiocyanatopentan **19** waren 30–100-fach verringert im Gegensatz zum natürlichen Substrat 1-Chlorhexan **10**. Weiterhin wurden zyklische oder benzyliche Pseudohalogenide getestet (Schema 7).



Schema 7 Weitere getestete Substrate.

Die sterisch anspruchsvolleren Substrate Benzylthiocyanat **20** und Cyclohexylisothiocyanat **23** zeigten deutlich höhere Umsätze (95 % und 71 %) als die linearen Substrate **18** und **19** (10 % und 29 %). LinB akzeptierte Azide nicht als Substrate, da auch kein Umsatz für Benzylazid **22** beobachtet werden konnte. Interessanterweise zeigte Benzylisothiocyanat **21** nur geringen Umsatz (unter 10 %) im Gegensatz zum linearen Substratanalogon 1-Isothiocyanatopentan **19** (30 %) und zum strukturell sehr ähnlichen Benzylthiocyanat **20** (95 %). Die Negativkontrolle mit leerem pET-28a(+)-Vektor zeigte keine Umsetzung der Thio- oder Isothiocyanate. Da die erwarteten Alkohole Hexanol **11**, Pentanol, Benzylalkohol und Cyclohexanol als Referenzen kommerziell erhältlich waren, wurde nicht nur die Substratabnahme gemessen, sondern zusätzlich die Produktbildung überprüft. Interessanterweise konnte bei Substraten, die eine Isothiocyanat Gruppe aufweisen, der entsprechende Alkohol nicht detektiert werden, allerdings eine klare Substratabnahme. Die Negativkontrolle zeigte nach pH-neutraler Extraktion mit MTBE neben

dem Substrat 1-Isothiocyanatopentan **19** (rt 7.8 min) und dem internen Standard 1-Octanol (ISTD) (rt 7.4 min) keinen weiteren Peak (Abbildung 11).

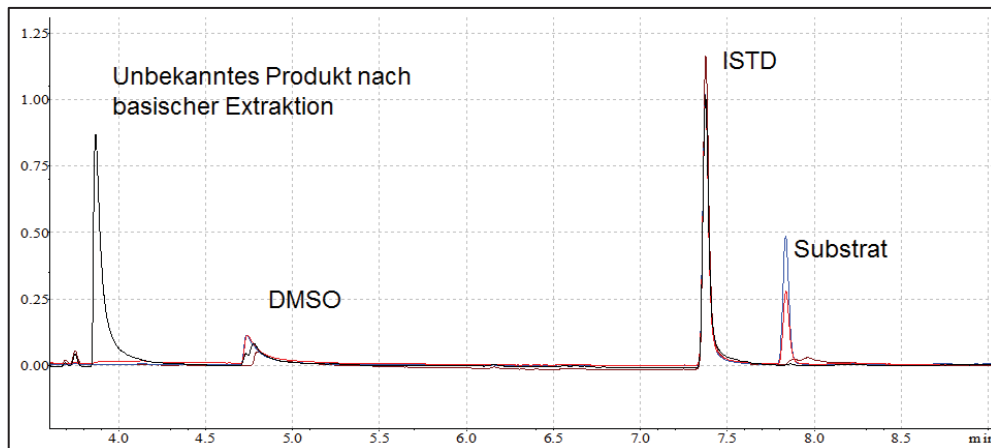


Abbildung 11 GC-Chromatogramm nach der Biotransformation von 1-Isothiocyanatopentan (Substrat) mit LinB Wildtyp. blau: Negativkontrolle mit leerem pET-28a(+) mit 1-Octanol als Standard (ISTD), rot: Umsetzung mit LinB Wildtyp, braun: erneute salzsaure Extraktion des Reaktionsansatzes mit MTBE, schwarz: erneute basische Extraktion des Reaktionsansatzes mit MTBE.

Nach der Umsetzung mit LinB Wildtyp über 16 h war eine deutliche Substratabnahme zu verzeichnen. Durch basische Extraktion (deprotonierendes Milieu) konnte ein unbekanntes Produkt detektiert werden (rt 3.9 min). Über das GC-MS Fragmentierungsmuster wurde deutlich, dass es sich um ein Amin handeln könnte. Da Amine im pH-neutralen Milieu positiv geladen vorliegen und somit kaum durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gewonnen werden können, wird durch das basische Milieu ein Proton der Aminogruppe abstrahiert und es dadurch möglich das Amin mit organischen Lösungsmitteln zu extrahieren. Durch anschließende Acetylierung mit Acetanhydrid und Auswertung des GC-MS Fragmentierungsmusters (Abbildung 12) konnte bestätigt werden, dass es sich um ein Amin handelt.

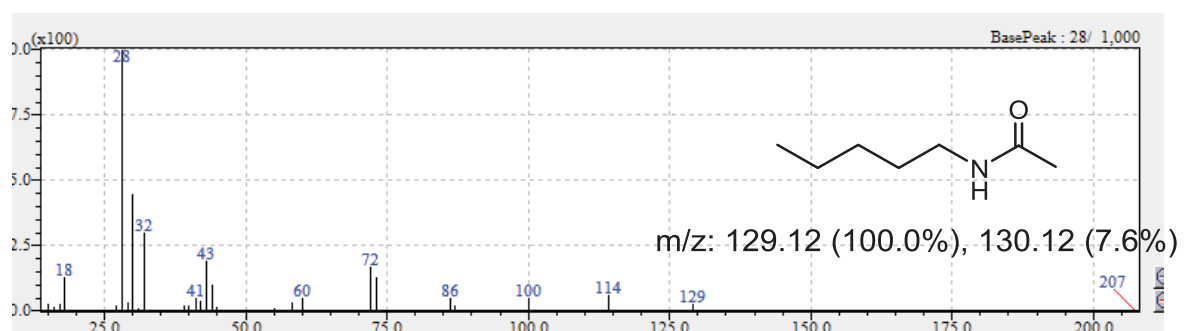
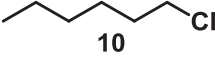
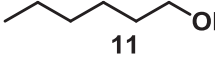
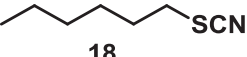
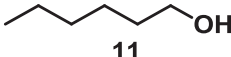
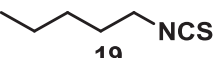
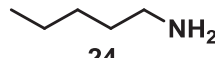
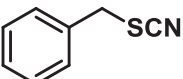
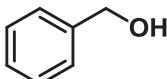
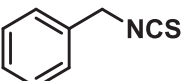
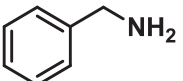
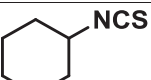
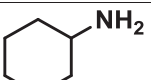


Abbildung 12 Fragmentierungsmuster des acetylierten Amins.

Für die eindeutige Identifizierung wurde das kommerziell erhältliche 1-Aminopentan **24** als Referenzstandard eingesetzt. Somit konnte die enzymkatalysierte Hydrolyse zum Amin verifiziert werden. Die Substrate Benzylisothiocyanat **21** und Cyclohexylisothiocyanat **23** zeigten als Produkte nach der *in vitro* Biotransformation jeweils Benzylamin **26** und Cyclohexylamin **27**. Tabelle 13 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse, die mit LinB Wildtyp erhalten wurden.

Tabelle 13 Ergebnisse der Umsetzungen der alternativ getesteten Substrate mit LinB Wildtyp nach 16 h. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

#	Substrat	Produkt	Produktbildung [%]	Spez. Aktivität [U/mg]
1	 10	 11	55.32 ± 1.62 *	0.46 ± 0.01
2	 18	 11	10.08 ± 0.19	0.005 ± 0.000
3	 19	 24	28.89 ± 1.08	0.015 ± 0.001
4	 20	 25	95.18 ± 1.89	0.050 ± 0.001
5	 21	 26	3.62 ± 0.08	0.002 ± 0.000
6	 23	 27	70.93 ± 0.99	0.037 ± 0.001

*: nach 1 h

Qualitativer Bismut Assay zum Nachweis eines neuen Reaktionsmechanismus

Die erhaltenen Ergebnisse implizierten an dieser Stelle einen neuen Reaktionsmechanismus für LinB in Bezug auf die Isothiocyanate, da erstmals Amine generiert wurden. Betrachtet man den Reaktionsmechanismus der LinB, wäre ein denkbare Intermediat ein an das Enzym kovalent gebundenes Thiocarbamat-Analogon, das durch den nukleophilen Angriff der katalytisch aktiven Asparaginsäure zustande kommt. Durch den Angriff eines aktivierten Wassermoleküls (aktiviert durch Histidin aus der katalytischen Triade) auf die Carbonylgruppe des Thiocarbamat-Analogons, wird somit das Aspartat des Enzyms regeneriert und unter Zerfall des Thiocarbamat-Analogons das Gas Carbonylsulfid (O=C=S) und das entsprechende

3 Ergebnisse

Amin frei. Das Amin konnte wie eben erwähnt gaschromatographisch eindeutig identifiziert werden. Um den Reaktionsmechanismus zu bekräftigen, wurde ein Assay entwickelt, der Carbonylsulfid nachweisen sollte. Die Tatsache, dass das vermutlich gebildete Carbonylsulfid in wässrigem Medium direkt zu H_2S und CO_2 zerfällt, wurde für einen qualitativen Assay ausgenutzt. Mit Bismut-Ionen sollte das *in situ* entstandene Carbonylsulfid unter Bildung eines braunen Niederschlags Bi_2S_3 abgefangen werden. Es wurden verschiedene Reaktionsansätze nach 2.3.9.2 durchgeführt. In Abbildung 13 sind die Reaktionsgefäße nach der erfolgten Biotransformation zu sehen: Die Positivkontrolle mit LinB Wildtyp und Cyclohexylisothiocyanat **23** als Substrat in Kaliumphosphatpuffer (KP_i -Puffer) (pH 7.6), zeigte als einzige den braunen Niederschlag (Abbildung 13(a)). Als Negativkontrollen dienten LinB in (KP_i -Puffer) ohne Substrat (b), KP_i -Puffer (pH 7.6) mit Cyclohexylisothiocyanat **23** ohne LinB (c), LinB in KP_i -Puffer (pH 7.6) mit Benzylthiocyanat **20** (d) und KP_i -Puffer (pH 7.6) mit Benzylthiocyanat **20** ohne LinB (e).

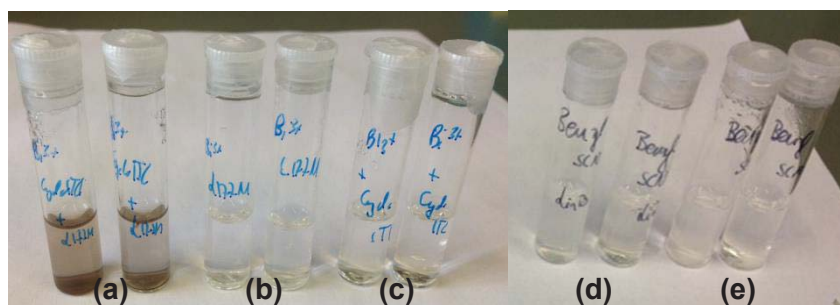


Abbildung 13 Reaktionsgefäße (a)-(e) nach der Biotransformation. (a) LinB mit Cyclohexylisothiocyanat **23** zeigte deutlich einen braunen Niederschlag, welcher auf die Bildung von Bi_2S_3 hindeutet. Bei den jeweiligen Negativkontrollen (b)-(e) war keine Braunfärbung zu erkennen.

3.1.4 Design und Charakterisierung der LinB-Mutantenbibliothek

Um ein besseres Verständnis für den Reaktionsmechanismus zu gewinnen, und die Substratspezifität zu untersuchen, wurde auf Basis von einem Sequenzalignment bezüglich konservierter und flexibler Aminosäuren innerhalb der HLD Familie, [61] mit Hilfe von rationalem Design eine fokussierte Mutantenbibliothek erzeugt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die flexible Cap-Domäne einen großen Einfluss auf die Substratspezifität hat, [61] [95] [96] wurden hier die Aminosäuren V173 (aus der ersten Sphäre der aktiven Tasche) und drei weitere P144, Q146 und L177 (Tunnel-Aminosäuren) adressiert. Insgesamt wurden sechs Varianten erstellt (Cap-Domäne Varianten). Um die hydrophobe Tasche der LinB in der Cap-Domäne weitgehend zu erhalten, wurden Aminosäuren gewählt, die sich in der Größe unterscheiden, den hydrophoben Charakter aber beibehalten (P144R, Q146A, V173L, L177F, L177M, L177W). Zur Untersuchung des postulierten Reaktionsmechanismus wurden zusätzlich Aminosäuren ausgetauscht, die Teil der katalytisch aktiven Pentade sind (D108S, H272F und N38S) und als sogenannte *knockout*-Mutanten dienen.

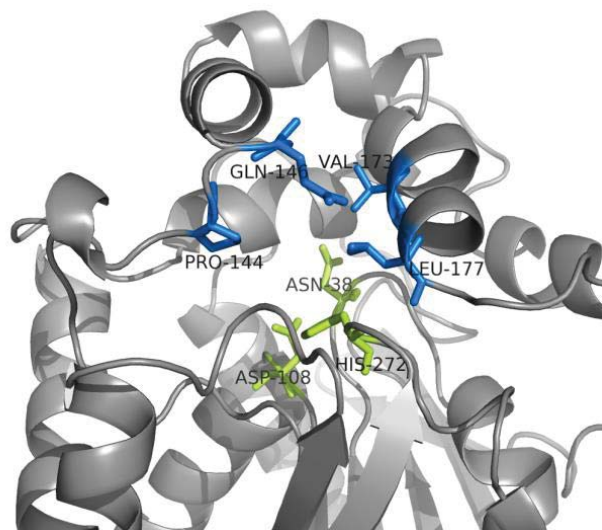




Abbildung 14 Kristallstruktur der LinB (PDB-Code 1K5P). Eingefärbte Aminosäuren wurden für die rationale Mutagenese ausgewählt. Aminosäuren in grün (Asn38, Asp108 und His272), welche Teil der Hauptdomäne sind, wurden gewählt um den Mechanismus zu studieren und Aminosäuren in blau (Pro144, Glu146, Val173 und L177) wurden gewählt um die Substratspezifität zu untersuchen.

Die Erstellung der Mutanten erfolgte durch Substitution der entsprechenden Aminosäuren nach dem QuikChange® Protokoll (2.2.10). Nach der Mutagenese wurde die Mutation durch Sequenzierung des gesamten Gens verifiziert. Die Expression er-

3 Ergebnisse

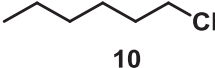
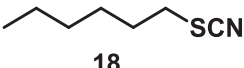
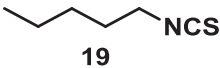
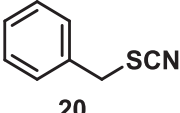
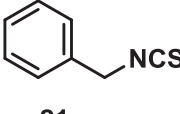
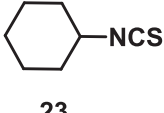
folgte identisch zu der des Wildtyps (2.3.2). Die Aktivität der Mutanten wurde nach 3.1.2 mit 1-Chlorhexan **10** als Modellsubstrat getestet. Die ersten Ergebnisse der fokussierten Mutantenbibliothek zeigten durchaus, dass das Expressionslevel stabil und die Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat (1-Chlorhexan **10**) erhalten bleibt (Tabelle 14).

Tabelle 14 Spezifische Aktivitäten der nativen LinB und zugehörige Mutanten. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Substrat	Produkt	Spezifische Aktivität [U/mg]	
 10	 11	WT	0.46 ± 0.01
		P144R	0.48 ± 0.01
		Q146A	0.46 ± 0.02
		V173L	0.52 ± 0.04
		L177F	0.50 ± 0.04
		L177M	0.49 ± 0.03
		L177W	0.50 ± 0.01

Des Weiteren wurden die spezifischen Aktivitäten der Mutanten gegenüber den alternativen Substraten mit aufgereinigtem Protein bestimmt. Einige Varianten zeigten im Gegensatz zum Wildtyp jeweils eine deutliche Steigerung oder Minderung der Aktivität. Die zusammenfassenden Ergebnisse der getesteten Substrate sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15 Substratspezifität des aufgereinigten Wildtyps LinB und zugehörige Mutanten.

	Relative Aktivitäten [% von WT]							<i>Knockout</i> -Mutanten		
	Cap-Domäne Varianten									
	WT	P144R	Q146A	V173L	L177F	L177M	L177W	N38S	D108S	H272F
 10	100	104	101	113	107	106	108	-	-	-
 18	100	35	65	61	58	52	31	-	-	-
 19	100	31	58	41	19	52	40	-	-	-
 20	100	65	93	67	54	91	34	-	-	-
 21	100	101	99	120	1313	1245	1688	-	-	-
 23	100	21	72	43	99	88	18	-	-	-

^aSpezifische Aktivitäten (U/mg Enzym) des Wildtyps LinB: 0.46 ± 0.01 (1-Chlorhexan), 0.005 ± 0.000 (1-Thiocyanatohexan), 0.015 ± 0.001 (1-Isothiocyanatopentan), 0.050 ± 0.001 (Benzylthiocyanat), 0.002 ± 0.000 (Benzylisothiocyanat), 0.037 ± 0.001 (Cyclohexylisothiocyanat)

-: Keine Aktivität

Die Cap-Domäne-Varianten (linksstehend in Tabelle 15) und der Wildtyp demonstrierten moderate bis hohe Aktivitäten gegenüber den organischen Thio- und Isothiocyanaten. L177M und Q146A setzten Benzylthiocyanat **20** annähernd mit gleicher Aktivität wie der Wildtyp um. Die restlichen Varianten in der Cap-Domäne zeigten eine deutliche, wenn auch geringere Aktivität gegenüber Benzylthiocyanat **20**. Tunnelvariante L177W zeigte hingegen einen ausgeprägten Rückgang der Aktivität gegenüber der nativen LinB. Das lineare, weniger sterisch anspruchsvolle 1-Thiocyanatohexan **18** war ein schlechtes Substrat für die Cap-Domäne Varianten,

da die Bildung von Hexanol **11** nur sehr gering war (nur ca. 3-7 %). Interessanterweise wurde Benzylisothiocyanat **21** im Gegensatz zu Benzylthiocyanat **20** nur mit bis zu 4 % nach 16 h umgesetzt. Positive Ausnahmen stellten hier die drei Varianten L177F, L177M und L177W dar. Unabhängig von der eingeführten Aminosäure an Position 177 zeigten alle die Bildung von Benzylamin **26** mit 45–61 %. L177W wurde hierbei als aktivste Variante identifiziert, die eine 15-fach höhere Produktbildung von Benzylamin **26** relativ zum Wildtyp aufwies (Tabelle 15). Dies deutet auf eine essentielle Rolle für die Substratspezifität der Position 177 hin. Im Schnitt demonstrierten die Cap-Domäne Varianten unter den getesteten Isothiocyanaten die höchste Aktivität gegenüber Cyclohexylisothiocyanat **23**. Der maximal erreichbare Umsatz war nach 5 h bereits erreicht (Abbildung 15).

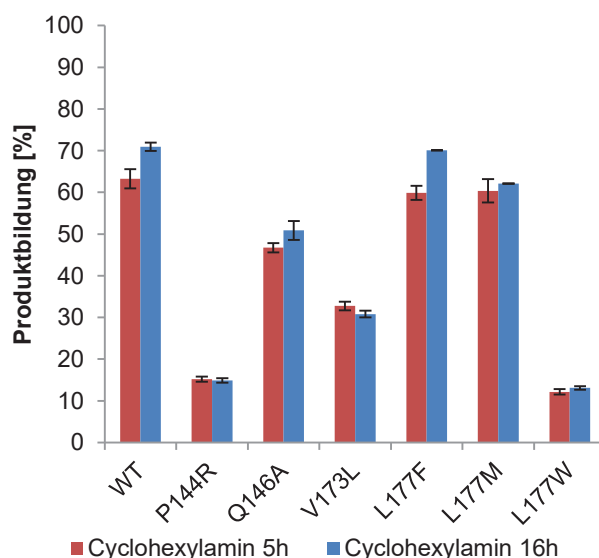
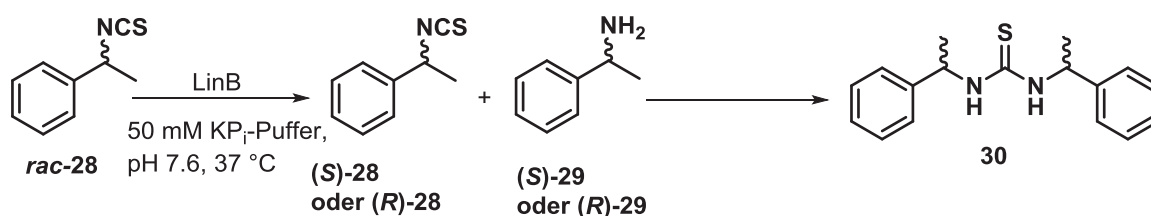


Abbildung 15 Bildung von Cyclohexylamin mit der nativen LinB und zugehörige Mutanten. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Es zeigte sich, dass die Mutanten das sterisch weniger anspruchsvolle 1-Isothiocyanatopentan **19** mit verringerten Umsätzen hydrolysierten. Die höchste Produktbildung von 1-Aminopentan **24** zeigte Q146A mit knapp 17 %. Hervorzuheben ist auch, dass der Austausch der Aminosäuren D108, H272 und N38 zum vollständigen Verlust der Aktivität führte.

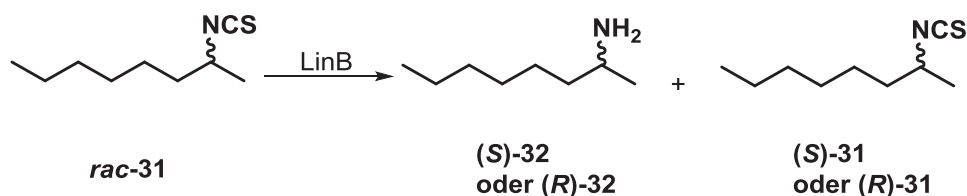
3.1.5 Enantioselektivitäten der LinB und Varianten

In folgenden Experimenten wurden die Mutantbibliothek und die native LinB auf Enantioselektivität getestet. Als Substrat wurde anfangs α -Methylbenzylisothiocyanat **rac-28** gewählt. **rac-28** wurde jeweils auch als enantiomerenreines Substrat eingesetzt. Die Biotransformation wurde nach 2.3.9.1 durchgeführt. Das resultierende α -Methylbenzylamin **29** konnte allerdings nicht detektiert werden, da die Aminogruppe direkt mit dem elektrophilen C-Atom der NCS-Gruppe des Substrats reagierte und eine Thiourea-Verbindung **30** (Schema 8) bildete, die eindeutig per GC-MS Analyse verifiziert werden konnte.



Schema 8 LinB-katalysierte Hydrolyse von **rac-28**.

Allerdings konnte durch die Biotransformationen mit den enantiomerenreinen Substraten festgestellt werden, dass LinB **(S)-28** bevorzugt hydrolysierte, da hier der Umsatz 4-fach größer war, als für das **(R)-28**. Aufgrund der Reaktivität des α -Methylbenzylamin wurde für die Aufklärung der Enantioselektivität der LinB für die folgenden Experimente 2-Isothiocyanatoctan **rac-31** als Substrat gewählt (Schema 9).

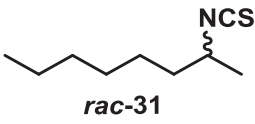
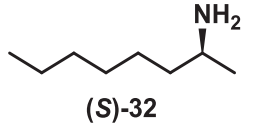


Schema 9 Hydrolyse von 2-Isothiocyanatoctan mit LinB.

Nach der *in vitro* Biotransformation nach 2.3.9.1 von **rac-31** wurde eine Derivatisierung mit Acetanhydrid der entstandenen Amine durchgeführt, um somit eine bessere Trennung auf der chiralen GC-Säule zu erlangen. Die getesteten Varianten einschließlich des Wildtyps zeigten ausschließlich (*S*)-Selektivität. Der höchste Enanti-

omerenüberschuss von (*S*)-2-Octanamin (**S**-32) wurde mit dem Wildtyp erreicht, welcher bei 97 % lag. Allerdings war der Gesamtumsatz (4.85 %) niedriger als der von Q146A, welche als beste Variante einen Umsatz von 11 % (94 % *ee*) zeigte. Interessanterweise zeigte L177W keinen stark ausgeprägten Enantiomerenüberschuss, da hier der *ee*-Wert des (*S*)-enantiomerenreinen Produktes bei 33 % lag (Tabelle 16).

Tabelle 16 Produktbildung nach der Biotransformation mit aufgereinigtem Enzym.

Substrat	Produkt	Enzym	Produktbildung (%) / (<i>ee</i>) (%)
 <i>rac</i> -31	 (<i>S</i>)-32	WT	4.85 ± 0.11 / >97 (<i>S</i>)
		P144R	9.92 ± 0.35 / >95 (<i>S</i>)
		Q146A	10.97 ± 0.61 / >94 (<i>S</i>)
		V173L	3.3 ± 0.23 / >89 (<i>S</i>)
		L177M	7.60 ± 0.24 / >83 (<i>S</i>)
		L177W	1.41 ± 0.04 / >33 (<i>S</i>)

Begleitend zu diesen Untersuchungen wurde eine theoretische Studie zur Bindung der verschiedenen Enantiomere von *rac*-31 durchgeführt, wozu ein Docking von *rac*-2-Isothiocyanatooctan *rac*-31 in die Kristallstruktur LinB Wildtyp und zum Vergleich in Tunnelvariante L177W erfolgte. Als Dockingsoftware wurde YASARA verwendet, welches mit dem Vina Algorithmus arbeitet. Im Docking ist deutlich zu erkennen, dass bei LinB Wildtyp eine unterschiedliche Ausrichtung der (*R*)- und (*S*)-Enantiomere von *rac*-31 in der aktiven Tasche zustande kommt (Abbildung 16). Dadurch hat die funktionelle Gruppe eine andere Orientierung zum nukleophilen Aspartat und den halogenid-stabilisierenden Aminosäuren. Bei Variante L177W sind

beide Enantiomere sehr ähnlich in ihrer Orientierung, gleichzeitig ist eine gestauchte Ausrichtung der Substrate in der aktiven Tasche zu erkennen.

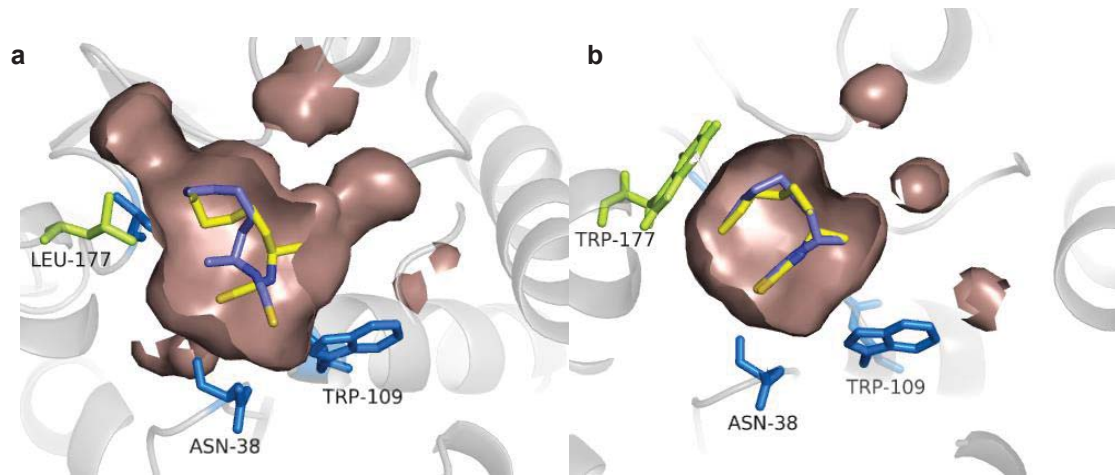
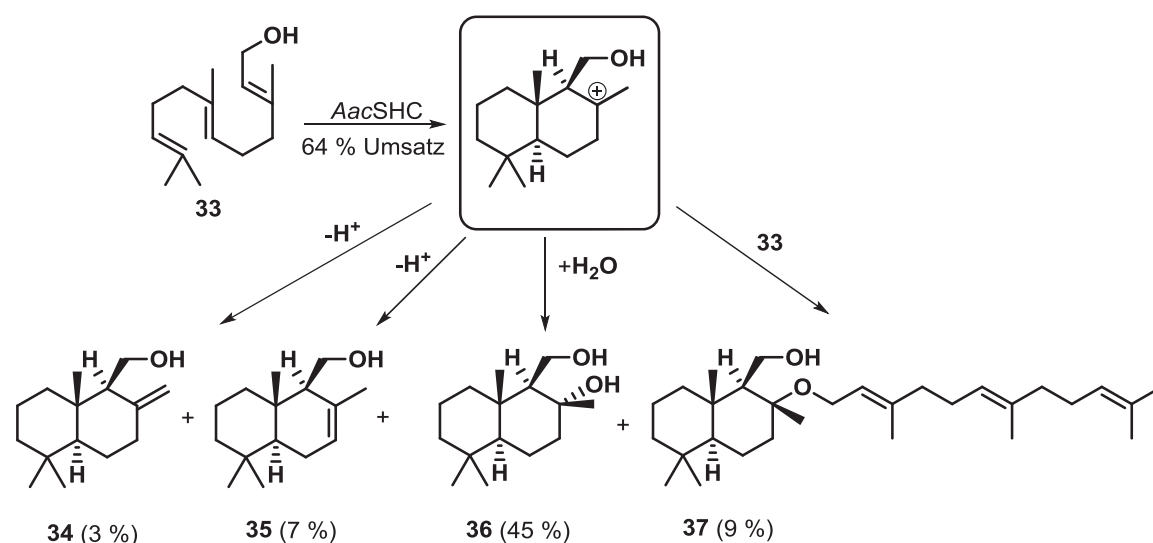


Abbildung 16 a) Schematische Darstellung der Kristallstruktur von LinB Wildtyp (PDB-Code: 1K5P) mit (*R*)-2-Isothiocyanatoctan (gelb) und (*S*)-2-Isothiocyanatoctan (lila) in der aktiven Tasche gedockt **b)** Schematische Darstellung der Kristallstruktur von LinB L177W mit (*R*)-2-Isothiocyanatoctan (gelb) und (*S*)-2-Isothiocyanatoctan (lila) in der aktiven Tasche gedockt.

3.2 AacSHC

Die Substratpromiskuität der AacSHC wurde in vorangegangenen Studien von Hoshino *et al.* [85] bezüglich verkürzter Substratanaloga von Squalen untersucht. Es konnte wie in 1.3.2.2 beschrieben, die erfolgreiche Zyklisierung des Sesquiterpens Farnesol **33** gezeigt werden. Alle Produkte wurden ausgehend von einem Carbokation-Intermediat gebildet (Schema 10). Produkte **34** und **35** kommen durch Eliminierungsreaktionen zustande, Produkt **36** durch einen selektiven nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls und Produkt **37** durch den Angriff der Hydroxygruppe des Farnesols.



Schema 10 Polyzyklisierung von Farnesol **33** mit der nativen AacSHC und die jeweiligen Ausbeuten. [85]

Produkt **37** resultiert daher aus einer intermolekularen Reaktion, die bis dahin noch nicht zum Reaktionsrepertoire der nativen AacSHC gehörte. Die vorliegende Studie wird sich im Folgenden mit intermolekular-katalysierten Reaktionen der AacSHC beschäftigen. Der Fokus lag auf dem *screening* der AacSHC Mutantenbibliothek, welche in Kapitel 1.3.2.3 erläutert wurde, gegenüber höheren Ausbeuten dieses Etherproduktes **37** und die Ausnutzung des katalytischen Potentials dieser Bibliothek gegenüber der Bildung neuer, intermolekularer Produkte.

3.2.1 Expression und Aktivitätstest der Mutantenbibliothek gegenüber Farnesol

Die Expression der nativen *AacSHC* und deren Mutanten erfolgte nach 2.3.3. Nach Solubilisierung und Hitzeschock (2.3.5) wurden die Enzympräparationen für das *screening* des Sesquiterpen Farnesol **33** verwendet. Die Biotransformation wurde nach 2.3.9.3 für 20 h durchgeführt. Die Varianten zeigten deutliche Unterschiede in Bezug auf die Produktverteilung. Die Ergebnisse der aktivsten Punktmutanten (Umsatz von Farnesol $\geq 50\%$) der fokussierten Bibliothek sind in Abbildung 17 zu sehen.

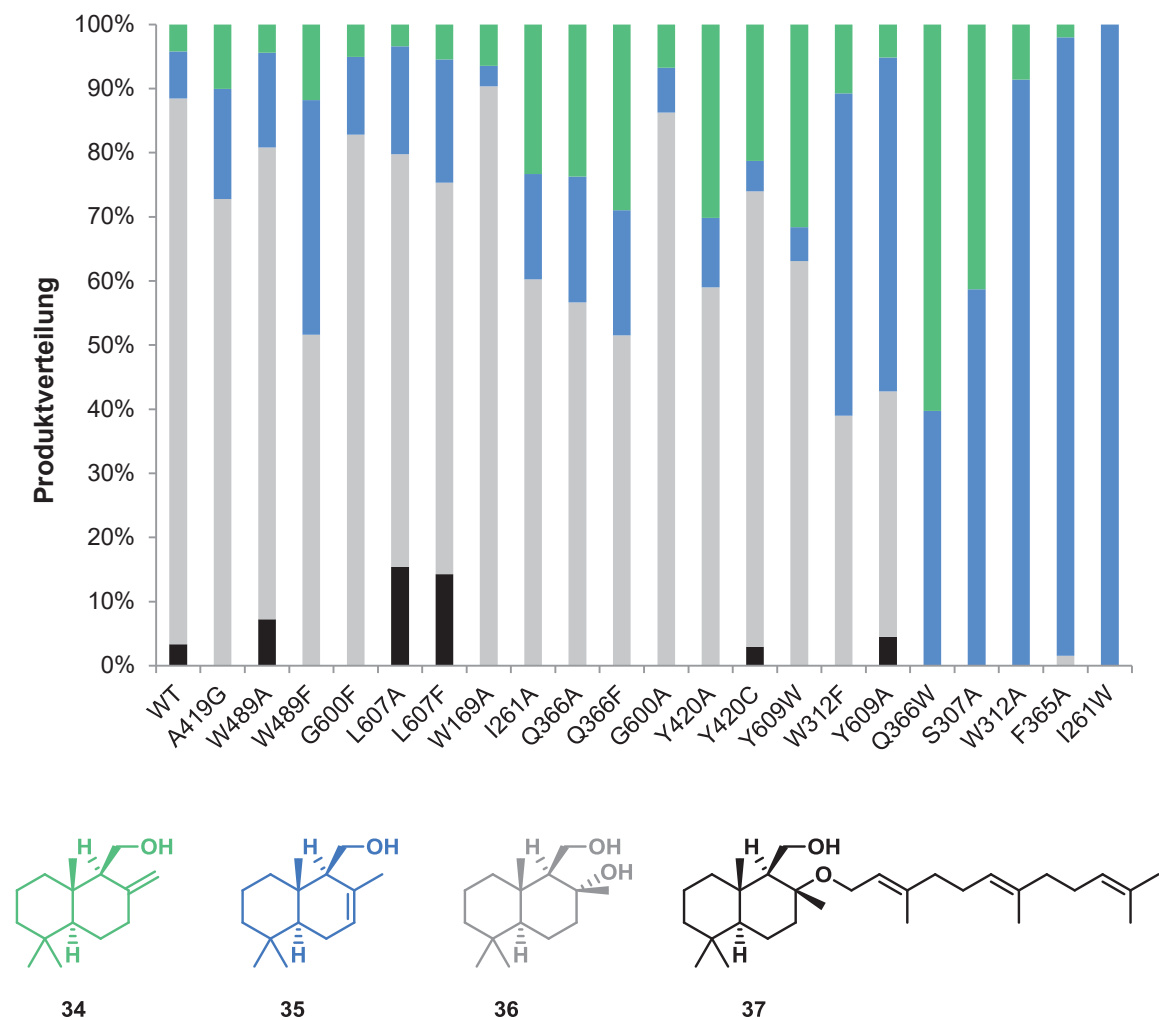


Abbildung 17 Produktverteilung [%] nach der Zyklisierung von Farnesol mit der *AacSHC* Mutantenbibliothek (2 mM Substrat, 0.01 % CHAPS, 1 mg/mL Katalysator, 20 h, 65 °C). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Auffällig ist, dass die Mehrheit der Varianten ein ähnliches Produktverteilungsmuster zeigte und keine Bildung von **37** zu verzeichnen war. Bei diesen treten **36** als Hauptprodukt, **34** und **35** als Nebenprodukte auf. Interessanterweise demonstrierten einige Varianten eine ausgeprägt hohe Selektivität gegenüber genau diesen Nebenprodukten, wie zum Beispiel F365A und I261W, welche Produkt **35** selektiv mit > 98 % bildeten. Bei Varianten Q366W, S307A, W312A und I261W war deutlich zu sehen, dass kein Additionsprodukt wie **36** oder **37** gebildet wurde. Unterschiedliche Varianten mit der Fähigkeit **37** zu bilden konnten identifiziert werden. Diese positiv getesteten Varianten W489A, Y420C, L607A, L607F und Y609A und der Wildtyp wurden in darauffolgenden Studien näher untersucht. Durch *in vitro* Bio-

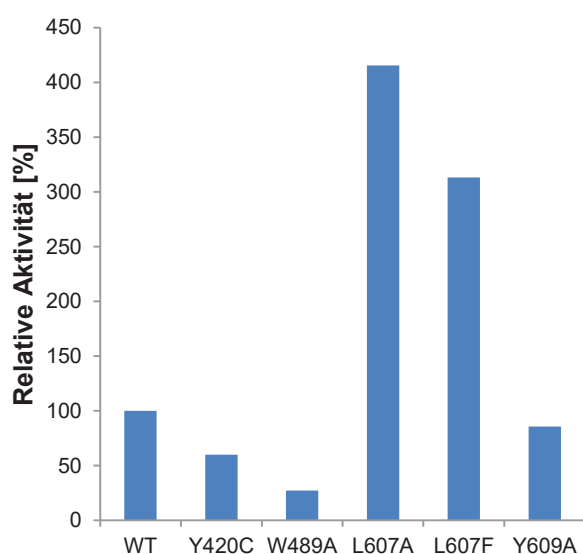


Abbildung 18 Relative Aktivität bestimmt anhand von Einfachmessungen der nativen AacSHC und zugehörige Mutanten gegenüber der Bildung von **37**.

transformationen nach 2.3.9.3 wurde ausschließlich die relative Aktivität bezüglich der Produktbildung von **37** verglichen zum Wildtyp in einer Einfachbestimmung betrachtet. Es stellte sich heraus, dass die besten Varianten L607A und L607F nach 20 h eine bis zu 4-fach höhere Produktbildung von **37** gegenüber dem Wildtyp zeigten.

3.2.2 Reaktionskontrolle der Farnesol Zyklisierung mit L607A und L607F über 48 h

Eine Reaktionskontrolle der Zyklisierung von Farnesol wurde mit den Varianten L607A und L607F durchgeführt, um den Umsatz und die Produktbildung zu verfolgen. Es wurden Proben nach 2.5 h, 4.5 h, 21 h, 29 h und 48 h genommen. Durch eine dünnschichtchromatographische Analyse wurde deutlich, dass **34–36** schneller gebildet werden als **37** (die erste nachweisbare Menge wurde nach 4.5 h detektiert).

Nach 21 h konnte die nahezu vollständige Umsetzung von Farnesol erreicht werden. Aufgrund ansteigender Bildung von nicht-identifizierbaren Nebenprodukten nach 29 h und 48 h, wurde für weitere Analysen die Biotransformationszeit von 24 h gewählt.

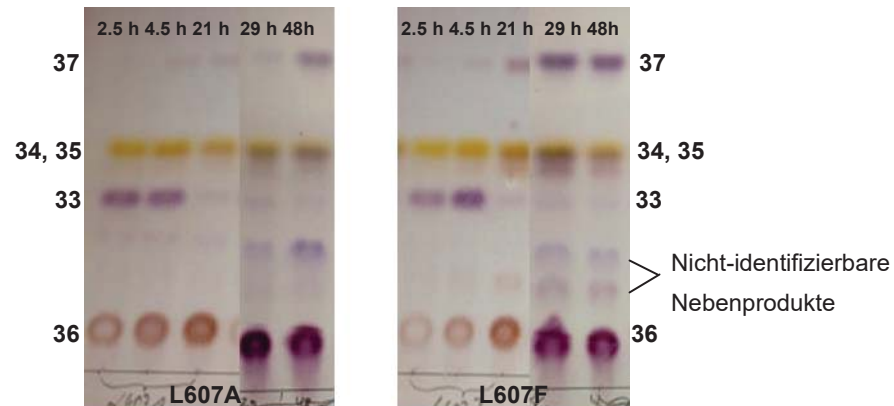


Abbildung 19 DC-Chromatogramm der Biotransformationen von Farnesol **33** mit L607A (links) und L607F (rechts).

3.2.3 Isolation, Identifizierung und Quantifizierung des Farnesol Zyklisierungsprodukts 37

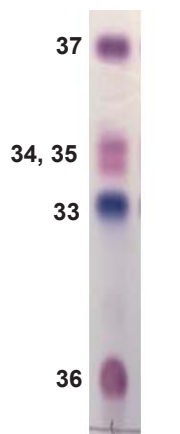
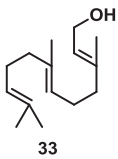
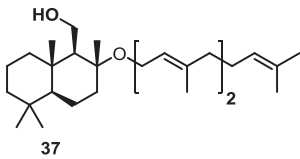


Abbildung 20 DC-Chromatogramm nach der Umsetzung von Farnesol mit AacSHC WT.

Um das Produkt zu isolieren, wurde ein Upscaling der Biotransformation nach 2.3.9.4 durchgeführt, indem 111 mg (2 mM) Farnesol mit der AacSHC (1 mg/mL) umgesetzt wurden. Die Produkte wurden mittels Säulenchromatographie mit einer Mischung aus Cyclohexan:Ethylacetat 12:1 isoliert und die Struktur mittels NMR analysiert. Die R_f -Werte wurden zu 0.6 (**34**), 0.5 (**35**), 0.1 (**36**) und 0.7 (**37**) bestimmt (Abbildung 20). Die isolierte Menge von **37** betrug 4.6 mg (4.1 % isolierte Ausbeute). Mit dem isolierten Produkt wurde eine Kalibriergerade aufgenommen und für die Quantifizierung der analytischen Biotransformationen verwendet (Tabelle 17).

3 Ergebnisse

Tabelle 17 Produktbildung nach der Zyklisierung von Farnesol mit AacSHC WT und deren Varianten (2 mM Substrat, 1 mg/mL Katalysator, 0.01 % CHAPS, 24 h, 65 °C). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Substrat	Produkt	Enzym	Produktbildung (mM)
		WT	0.08 ± 0.03
		L607F	0.78 ± 0.01
		L607A	0.30 ± 0.01

Mit Variante L607F wurde eine 10-fach höhere Produktbildung von **37** erzielt.

3.2.4 Docking Studien mit PyMOL

Unter der Verwendung der Kristallstruktur der nativen AacSHC, wurden Docking-Studien durchgeführt, um mögliche Gründe der verbesserten Umsätze von L607A und L607F gegenüber der Bildung von **37** zu untersuchen. Unter der Annahme, dass Farnesol **33** ähnlich zum Azasqualen, welches in der Kristallstruktur der AacSHC co-kristallisiert wurde, in einer sesselartigen Konformation bindet, wurde das Sesquiterpen Farnesol analog zu Azasqualen in die aktive Tasche gedockt (Abbildung 21). Es zeigte sich sehr deutlich, dass die aliphatische Seitenkette von L607 in Richtung des Kohlenstoffes exponiert ist, der die zuletzt gebildete positive Ladung trägt.

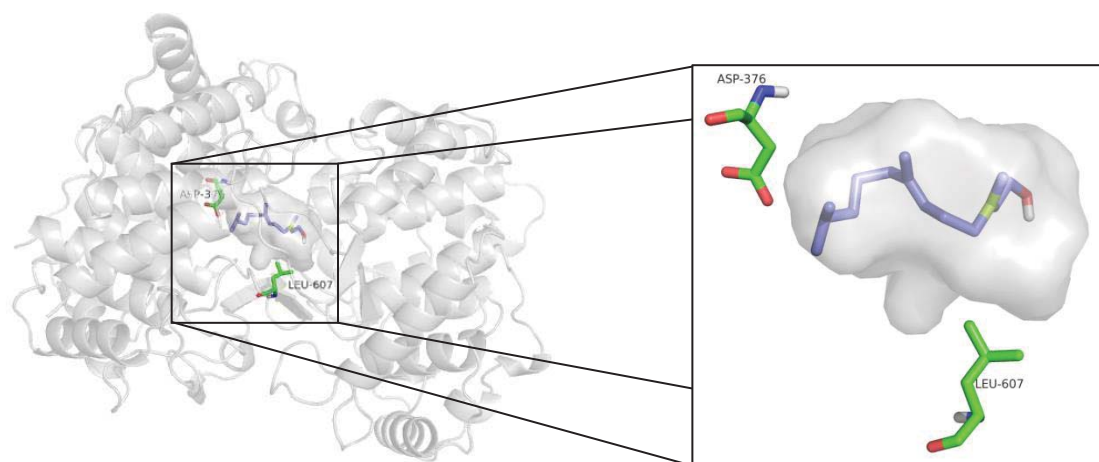


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Kristallstruktur von AacSHC WT mit Farnesol (lila) in der aktiven Tasche, in grün sind die Aminosäuren Asp376 und Leu607 dargestellt.

Die Mutationen von Leucin wurden mittels der Software PyMOL durchgeführt. Durch die Substitution von Leucin zu Phenylalanin (oder Alanin) wurde die aktive Tasche in diesem Segment deutlich verändert (Abbildung 22).

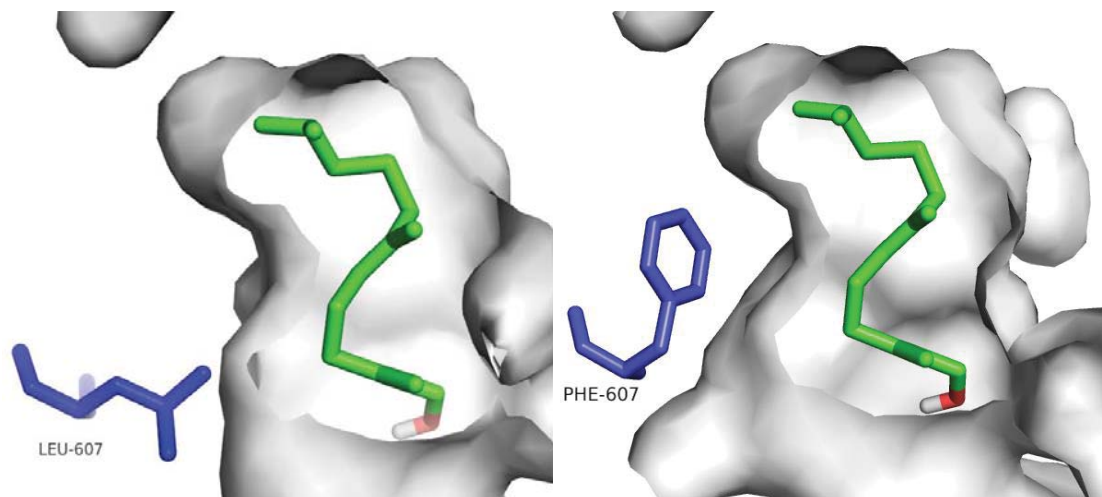
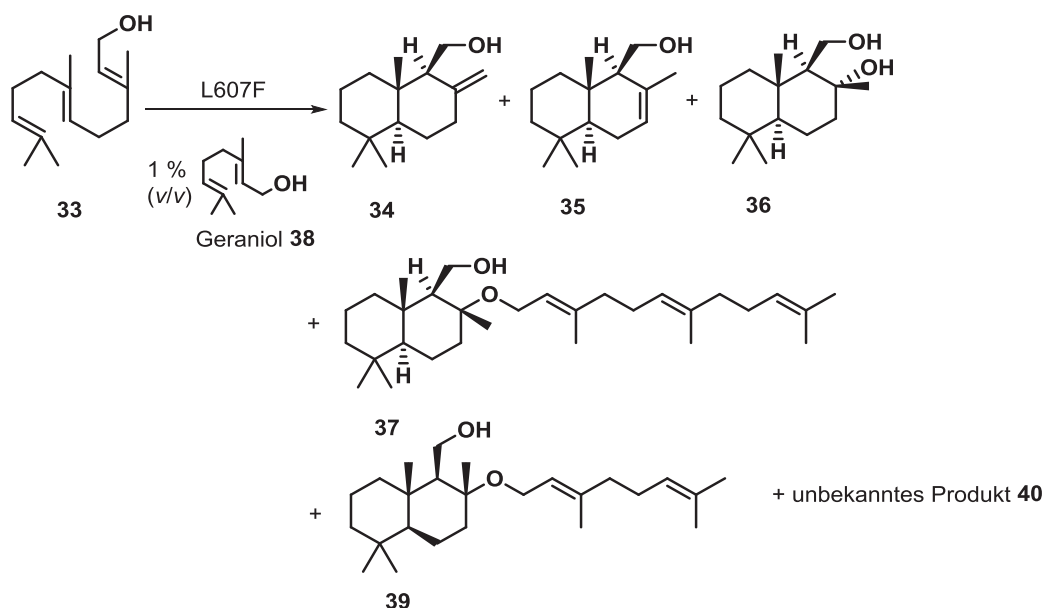


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Kristallstruktur von a) *AacSHC* WT mit Farnesol (grün) in der aktiven Tasche, in blau sind die Aminosäuren Leu607 dargestellt und b) L607F. Durch die Substitution von Leucin zu Phenylalanin ist eine Vergrößerung der aktiven Tasche zu sehen, die einen nukleophilen Angriff durch ein weiteres Molekül erleichtert.

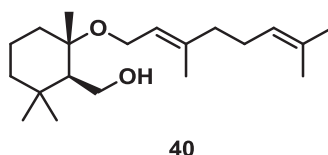
3.2.5 Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von Geraniol

Zur Erweiterung des Produktspektrums, wurde ein weiter verkürztes Terpen Geraniol **38** als weiteres Nukleophil für die intermolekulare Reaktion getestet. Hier wurde für die Biotransformationen anfangs wieder L607F gewählt, da diese Variante die höchste Aktivität gegenüber intermolekularen Reaktionen aufwies. Interessanterweise zeigte die Zyklisierung von Farnesol in Gegenwart von Geraniol neben Produkten **34-37** nach der GC-Analyse nicht nur das erwartete intermolekulare Produkt **39** (Schema 11), sondern zusätzlich ein unbekanntes Produkt **40** welches eine geringere Masse als **39** aufwies.



Schema 11 Nukleophile Addition von Geraniol an Farnesol **33** führt zur Bildung von **39** und weiteren Produkten.

Knockout-Mutante D376C zeigte keine Formation dieser Produkte, was auf eine enzymkatalysierte Reaktion schließen lässt, auch für das unbekannte Produkt **40**. Da das unbekannte Produkt laut Massenspektrum die Masse von 290 m/z aufwies, wurde vermutet, dass es sich um ein Etherprodukt handelt, das von zwei Geraniolmolekülen gebildet wurde.



Schema 12 Ein weiteres Zyklisierungsprodukt aus der Biotransformation von L607F mit Geraniol.

Untersuchung der Monozyklisierung von Geraniol mit L607F

Wie bereits erwähnt führten die Experimente mit Geraniol als Nukleophil unter anderem zu einem neuen, noch nicht bekannten Produkt **40**, welches durch die Zyklisierung von Geraniol und anschließender nukleophiler Addition eines weiteren Geraniolmoleküls zustande gekommen sein könnte. Für die Untermauerung dieser These wurde die Zyklisierung mittels L607F mit Geraniol ohne Farnesol durchgeführt. Als Substratkonzentration wurden 65 mM Geraniol gewählt (dies entspricht den 1 % Geraniol (v/v)), die in vorherigen Experimenten als Nukleophil Konzentra-

tion gewählt wurde). Produkt **40** konnte erneut per GC-MS Analyse detektiert werden.

3.2.6 Isolation und Identifizierung der Zyklisierungsprodukte **39** und **40**



Abbildung 23
DC-
Chromatogramm
der
Biotransformation
von Farnesol und
Geraniol mit
L607F.

Um die Produkte zu isolieren, wurde ein Upscaling der Biotransformation nach 2.3.9.4 durchgeführt, indem 111 mg (2 mM) Farnesol und 1 % (v/v) Geraniol (65 mM) mit der solubilisierten L607F umgesetzt wurden. Um das überschüssige Geraniol vor der Säulenchromatographie zu entfernen wurde eine Vakuum-Destillation durchgeführt. Die Zyklisierungsprodukte wurden mittels Säulenchromatographie mit einer Mischung aus Cyclohexan:Ethylacetat 9.5:1 isoliert und die Struktur mittels NMR analysiert. Die R_f -Werte wurden zu 0.50 (**37**), 0.41 (**39**), 0.38 (**40**), und 0.25 (**33**) bestimmt. Die gewonnene Menge von **40** betrug 20 mg (0.2 % isolierte Ausbeute). Mit dem isolierten Produkt **40** wurde eine Kalibriergerade aufgenommen und für die Quantifizierung der analytischen Biotransformationen verwendet. Produkt **39** konnte nicht in ausreichender Form für eine Kalibriergerade isoliert werden.

Untersuchung der Auswirkung von verschiedenen Geraniolkonzentrationen auf die Produktverteilung der Farnesol Zyklisierung

Zur Untersuchung der Auswirkung von verschiedenen Geraniolkonzentrationen auf die Produktverteilung der Farnesol Zyklisierung wurden analytische Biotransformationen nach 2.3.9.3 mit L607F durchgeführt. Die Konzentration von Geraniol wurde zwischen 1-5 % (v/v) variiert. Insgesamt konnten nach der Reaktion die schon bekannten Zyklisierungsprodukte **34-37** und **39-40** detektiert werden. Der Gesamtumsatz von Farnesol wurde nur unmerklich geringer bei steigendem Geraniol Anteil (14 % weniger Umsatz bei 5 % (v/v) Geraniol). Eine interessante Beobachtung war, dass mit steigender Konzentration an Geraniol das Produktverhält-

nis zu Gunsten von **40** verschoben wurde. Dafür wurde die Bildung von **36** geringer. Die Formation von **39** wurde dabei kaum verändert. Allerdings konnte **37** ab einem Geraniolgehalt von 2.5 % (v/v) nicht mehr detektiert werden (Abbildung 24).

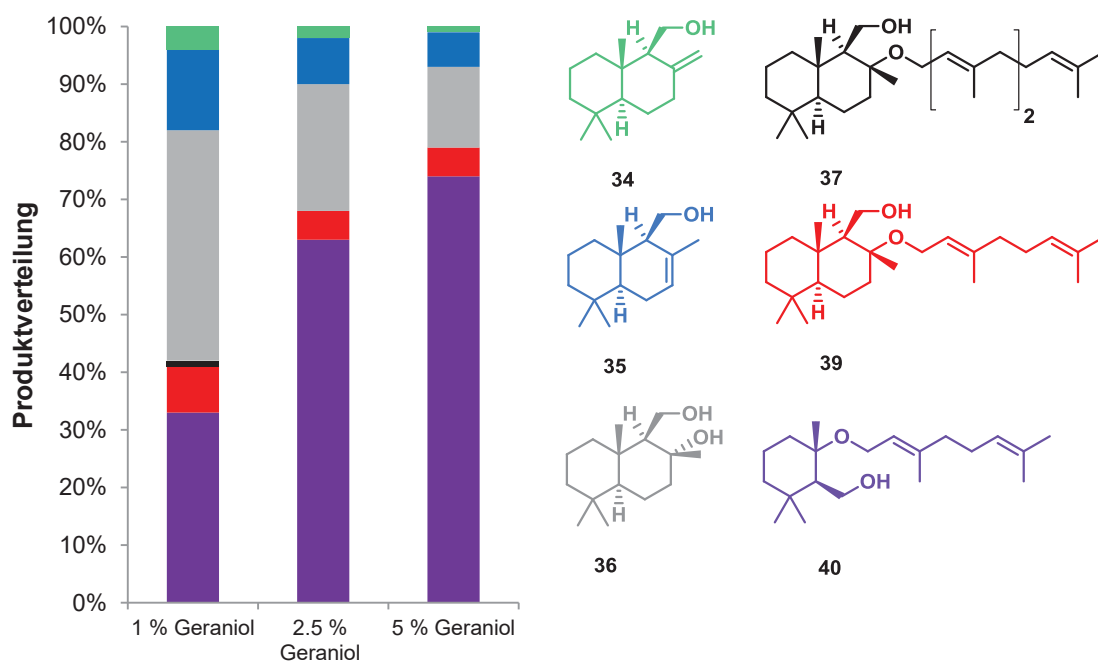


Abbildung 24 Produktverteilung [%] nach der Umsetzung von Farnesol **33** mit Variante L607F.

3.2.7 Unterschiede zwischen den Varianten L607A und L607F und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion zwischen Farnesol und Geraniol

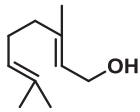
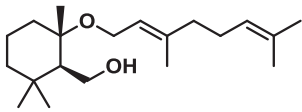
Auch hier wurde wie in den vorherigen Experimenten der Vergleich zwischen Wildtyp, L607A und L607F gezogen. Für die analytischen Biotransformationen wurde 1 % (v/v) Geraniol verwendet, da bei dieser Konzentration Produkt **37**, das auch betrachtet werden soll, noch gebildet wird. Interessanterweise zeigte nicht nur L607F die Formation von **39** und **40** sondern auch der Wildtyp und Variante L607A. In Tabelle 18 ist die Produktverteilung nach der Zyklisierung von Farnesol zu sehen.

Tabelle 18 Produktverteilung [%] nach der Zyklisierung von Farnesol mit AacSHC WT und Varianten (2 mM Substrat, 1 % (v/v) Geraniol, 0.01 % CHAPS, 1 mg/mL Katalysator, 24 h, 65 °C), Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Nukleophil	Enzym	34	35	36	37	39	40
	WT	17	17	55	-	2	9
Geraniol 1%	L607A	26	17	9	-	3	45
	L607F	4	14	40	1	8	33

Die Varianten L607A, L607F und der Wildtyp erzeugten Produkt **40** bevorzugt gegenüber **39**. Der Wildtyp zeigte nach der Biotransformation ein ähnliches Produktverhältnis wie in den vorigen Experimenten ohne zusätzliches Nukleophil. Das Wasseradditionsprodukt **36** wurde als Hauptprodukt mit 55 % und zu gleichen Teilen **34** und **35** mit 17 % gebildet. Die Aktivität des Wildtyps gegenüber den intermolekular gebildeten Produkten **39** und **40** war allerdings nur gering. Es ist hervorzuheben, dass im Gegensatz dazu, L607A eine sehr hohe Selektivität gegenüber **40** zukommt, da es mit 45 % als Hauptprodukt gebildet wurde. Das Wasseradditionsprodukt **36** war mit 9 % nur noch Nebenprodukt. Im Falle von L607F war das prozentuale Verhältnis der beiden Produkte **36** und **40** vergleichbar. Alle Enzyme demonstrierten nur eine sehr geringe Aktivität gegenüber **39**. Ein dagegen deutlicher Unterschied, der bei den Umsetzungen mit den drei Enzymen auftrat, war die Bildung von **37**, die nur bei L607F nachweisbar war. Der Gesamtumsatz von Farnesol war bei L607A am geringsten, Wildtyp und L607F zeigten 2- oder 1.5-fach höheren Umsatz. Aus den Experimenten wurde eine Aussage über die Quantität von **40** getroffen (Tabelle 19).

Tabelle 19 Produktbildung von **40** nach der Zyklisierung von Farnesol mit AacSHC WT und Varianten (2 mM Farnesol, 1 % (v/v) Geraniol, 0.01 % CHAPS, 1 mg/mL Katalysator, 24 h, 65 °C).

Substrat	Produkt	Enzym	Produktbildung (mM)
		WT	0.07 ± 0.01
		L607A	0.05 ± 0.01
		L607F	0.09 ± 0.02

3.2.8 Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von verschiedenen Alkohol-Nukleophilen

Um das katalytische Potential der *AacSHC* weiter zu untersuchen, sollten Alkohole wie Ethanol, Butanol, Pentanol und Hexanol als Nukleophile für die intermolekulare Reaktion dienen. Es wurde dazu analog vorgegangen wie in 2.3.9.3 beschrieben, mit dem Unterschied, dass den Biotransformationen 1 % (v/v) des entsprechenden Alkohols als Nukleophil zugegeben wurde. Für erste Untersuchungen wurde die beste Variante L607F als Biokatalysator gewählt. Nach 20 h Biotransformation wurde die Reaktion gestoppt und mittels GC-FID/MS analysiert. Es konnten in der Tat jeweils unbekannte Produkte neben den bereits bekannten Zyklisierungsprodukten **34-37** detektiert werden (Abbildung 25).

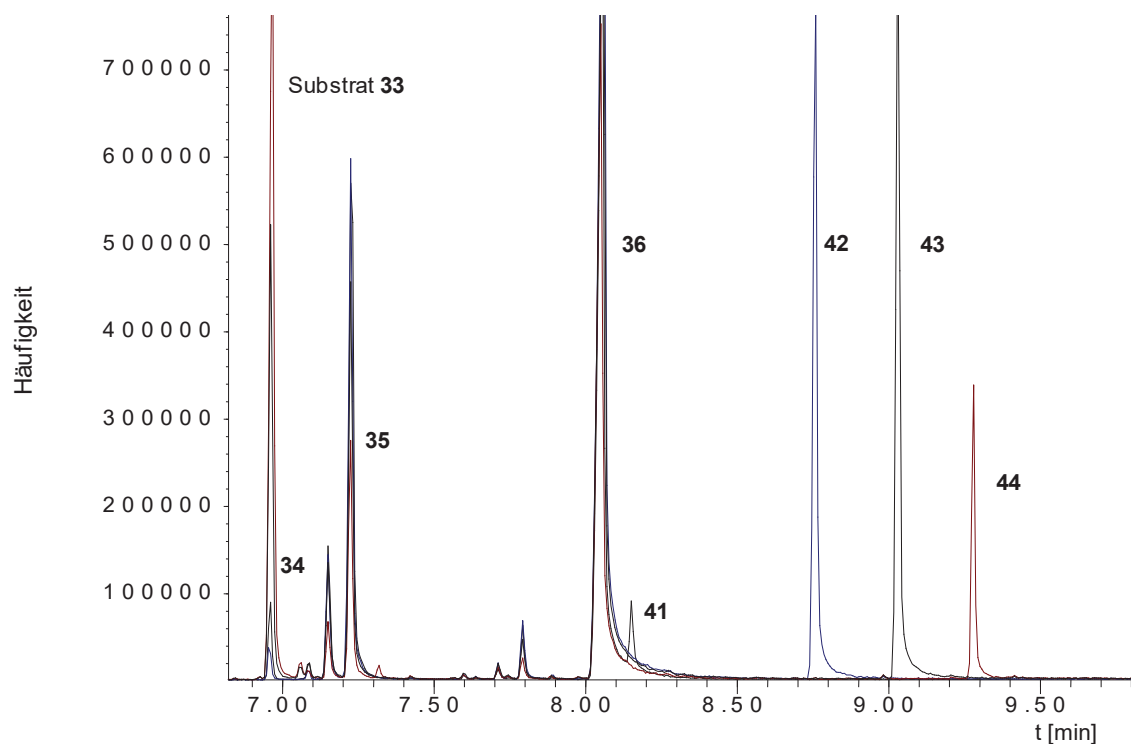
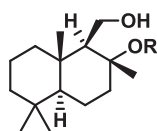


Abbildung 25 GC-Chromatogramm der Farnesol Umsetzung mit L607F. Schwarz: Biotransformation mit Ethanol, Blau: Biotransformation mit Butanol, Braun: Biotransformation mit Pentanol, Rot: Biotransformation mit Hexanol.

Anhand der Massenpeaks und Fragmentierungsmuster konnten die Etherprodukte **41-44** identifiziert werden (Schema 13).



- 41: R=C₂H₅
 42: R=C₄H₉
 43: R=C₅H₁₁
 44: R=C₆H₁₃

Schema 13 Zyklisierungsprodukte **41-44** neben **34-37** aus L607F-katalysierten Reaktionen von Farnesol mit kurzkettigen Alkoholen als Nucleophilen.

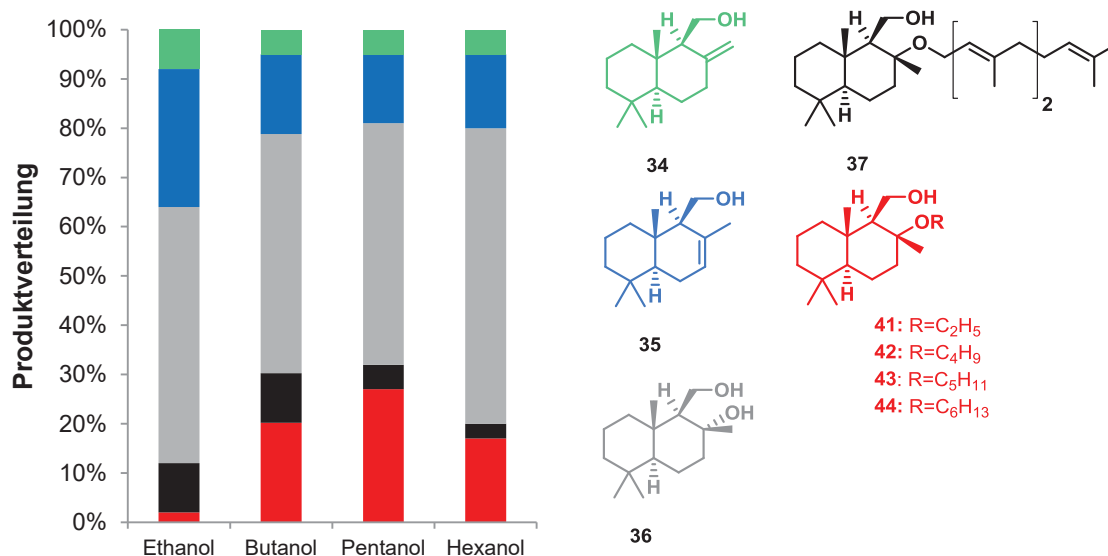


Abbildung 26 Produktverteilung [%] nach der Umsetzung von Farnesol mit L607F und 1 % (v/v) Nucleophil.

Interessanterweise verringerte sich der Gesamtumsatz von Farnesol mit steigender Kettenlänge des Nucleophils (96 % im Experiment mit Ethanol, 81 % im Experiment mit Hexanol). Unabhängig vom gewählten Nucleophil jedoch, ließ sich anhand der Produktverteilung deutlich erkennen, dass nach wie vor **36** das Hauptprodukt ist (Abbildung 26). Auffällig war, dass die Bildung des intermolekular gebildeten Produktes (**41-44**) ein Maximum bei einer Kettenlänge des Nucleophils von fünf C-Atomen erreichte, und mit fallender oder steigender Kettenlänge wieder abnahm. Die höchste Produktbildung von **37** konnte bei der Umsetzung von Farnesol mit Butanol als Nucleophil erreicht werden.

3.2.9 Isolation und Identifizierung der Farnesol Zyklisierungsprodukte 42 und 43

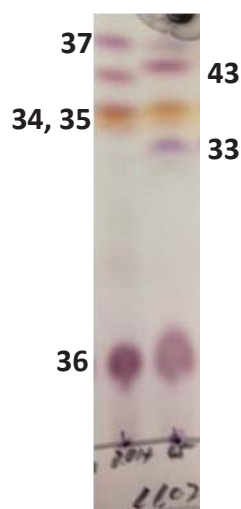


Abbildung 27 DC-Chromatogramm der Biotransformationen von Farnesol mit solubilisierter L607F.

Um die Produkte zu isolieren, wurde ein Upscaling der Biotransformation nach 2.3.9.4 durchgeführt, indem 111 mg (2mM) Farnesol mit jeweils 1 % (v/v) Butanol oder Pentanol mit der solubilisierten L607F umgesetzt wurden. Die Zyklisierungsprodukte wurden mittels Säulenchromatographie mit einer Mischung aus Cyclohexan:Ethylacetat 10:1 isoliert und die Struktur mittels NMR analysiert. Die R_f -Werte wurden zu 0.64 (**34**), 0.6 (**35**), 0.14 (**36**), 0.68 (**42**), 0.7 (**43**) und 0.77 (**37**) bestimmt. Die gewonnene Menge von **42** und **43** betrug jeweils 3.7 mg (2 % isolierte Ausbeute) und 4.6 mg (3 % isolierte Ausbeute). Mit dem isolierten Produkt wurde eine Kalibriergerade aufgenommen und für die Quantifizierung der analytischen Biotransformationen verwendet.

3.2.10 Unterschiede zwischen den Varianten und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion

Des Weiteren sollte mit den besten Varianten L607A und L607F ein Vergleich zum Wildtyp gezogen werden, inwiefern sich verschiedene Nukleophil-Konzentrationen auf die Bildung der verschiedenen Etherprodukte und die daraus resultierende Produktverteilung auswirken. Dafür wurden analytische Biotransformationen nach 2.3.9.3 durchgeführt und Butanol und Pentanol als Nukleophile gewählt und deren Konzentration von 0-2.5 % variiert.

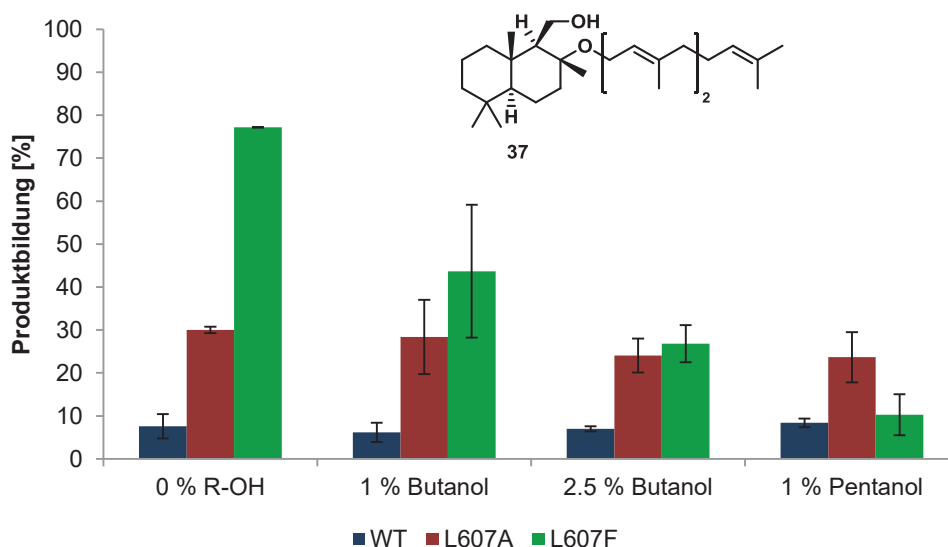


Abbildung 28 Produktbildung von **37** nach Zyklisierung von Farnesol unter Einfluss verschiedener Nukleophile und deren Konzentration.

Die Produktbildung von **37** mit verschiedenen Nukleophilen und variiertem Konzentration ist in Abbildung 28 zu sehen. Hervorzuheben ist hier Variante L607F, die die intermolekulare Reaktion zwischen zwei Farnesol-Molekülen am besten katalysierte. Ohne Zugabe eines Nukleophils zeigte Variante L607F die höchste Produktbildung von **37** mit 77 % nach 24 h. Allerdings nahm mit steigender Konzentration von Butanol oder steigender Kettenlänge des Nukleophils die Bildung von **37** deutlich ab. Zwischen den Experimenten ohne Nukleophil und 1 % Pentanol konnte eine 87 %-ige Verminderung von **37** verzeichnet werden. Interessanterweise war das Niveau der Bildung von **37** bei Wildtyp und L607A annähernd gleichbleibend, unabhängig vom gewählten Nukleophil oder dessen Konzentration.

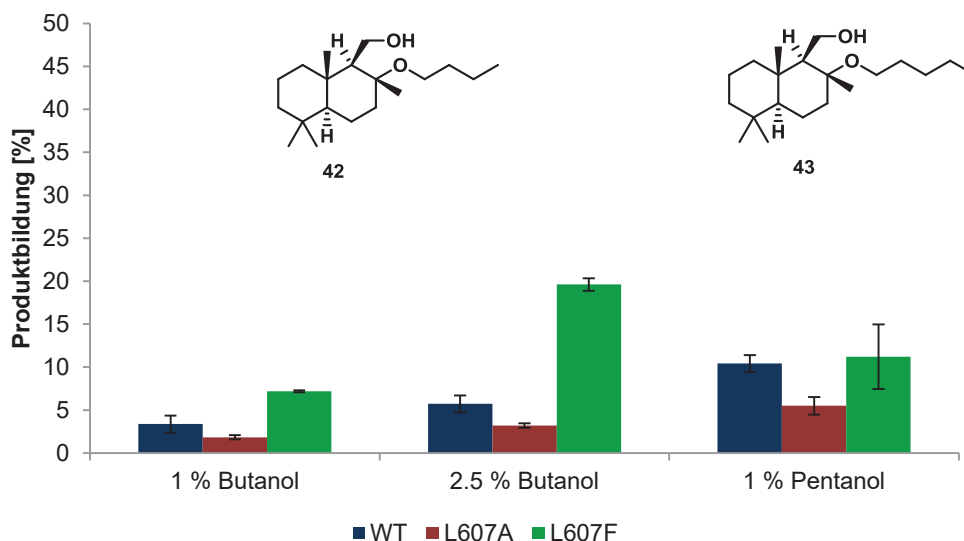


Abbildung 29 Produktbildung von **42** bzw. **43** nach Zyklisierung von Farnesol unter Einfluss verschiedener Nukleophile und deren Konzentration.

Die Produktbildung von **42** und **43** mit Butanol oder Pentanol und variiertes Konzentration ist in Abbildung 29 zu sehen. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass auch hier Variante L607F die aktivere Variante bezüglich der neu geformten Etherprodukte **42** und **43** darstellte. Im Experiment mit 2.5 % Butanol konnten 20 % **42** gewonnen werden, wobei L607A nur 3 % und der Wildtyp 6 % bildeten. In Tabelle 20 ist die Produktverteilung der verschiedenen Ansätze dargestellt. Die Varianten und Wildtyp erzeugten ohne Zugabe von Butanol oder Pentanol das Wasseradditionsprodukt **36** als Hauptprodukt. Die Bildung von Eliminierungsprodukten **34** und **35** wurde durch die Zugabe von einem Nukleophil kaum beeinträchtigt. Sobald 1 % Alkohol im Reaktionsansatz vorlag, wurde bei allen Reaktionen das Produktverhältnis verschoben, indem eine Abnahme der Produkte **36** und **37** und ein gleichzeitiges Auftreten des neuen Etherproduktes **42** bzw. **43** zu verzeichnen war. Bei erhöhter Zugabe von Butanol (2.5 % (v/v)) konnte eine noch deutlichere Verschiebung der Produktverteilung zu Gunsten des Etherproduktes **42** beobachtet werden. Wobei diese Verschiebung des Produktverhältnisses ausgeprägter bei L607F auftrat. Hier wurden als Hauptprodukte **36** und **42** mit jeweils 36 und 28 % gebildet. In Abbildung 30 ist eine grafische Darstellung zu sehen, die die eindeutige Verringerung des Wasseradditionsproduktes zeigt, je mehr Alkohol als Nukleophil zugesetzt wird.

Tabelle 20 Produktverteilung [%] nach der Zyklisierung von Farnesol mit AacSHC und Varianten (2 mM Substrat, 1-2.5 % (v/v) Nukleophil, 0.01 % CHAPS, 1 mg/mL Katalysator, 24 h, 65 °C).

Nukleophil	Enzym	34	35	36	37	42	43
-	WT	15	13	70	2	-	-
	L607A	14	24	58	4	-	-
	L607F	6	17	65	12	-	-
Butanol [1 %]	WT	14	15	66	1	4	-
	L607A	14	29	52	3	2	-
	L607F	14	27	43	7	9	-
Butanol [2.5 %]	WT	14	18	57	1	10	-
	L607A	14	29	50	3	4	-
	L607F	14	19	36	3	28	-
Pentanol [1 %]	WT	15	17	57	1	-	10
	L607A	14	26	53	3	-	4
	L607F	14	24	43	2	-	17

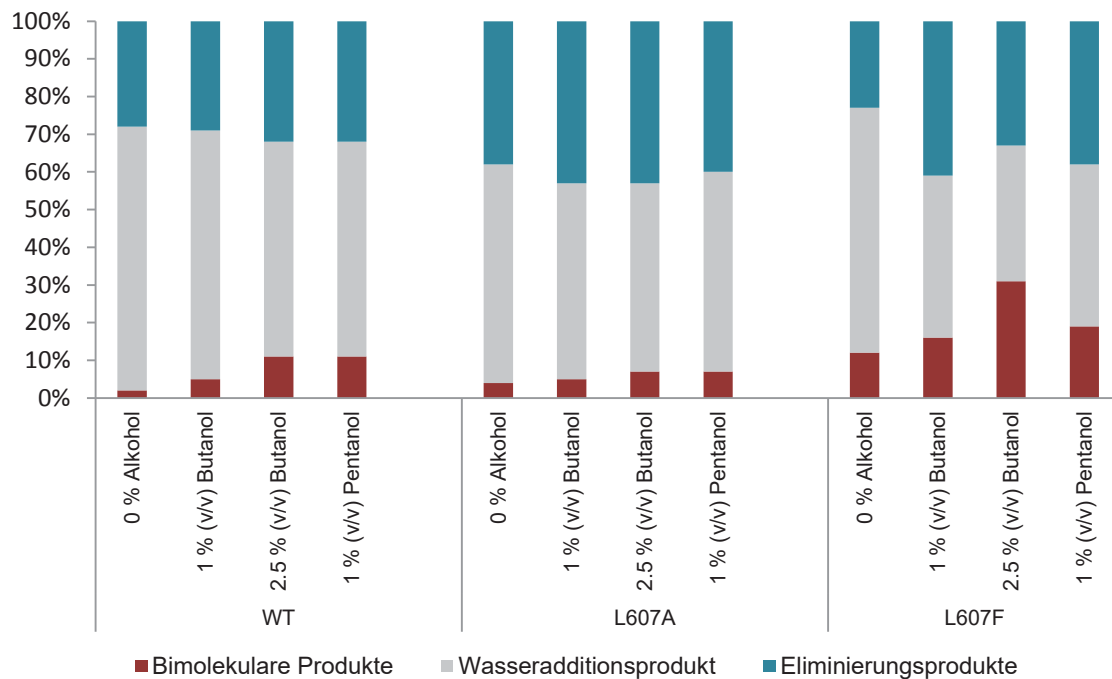


Abbildung 30 Produktverteilung [%] der Zyklisierung von Farnesol mit AacSHC und Varianten.

4 Diskussion

Die Promiskuität von Enzymen spielt in der Biokatalyse eine sehr wichtige Rolle in der Entwicklung neuer katalytischer Aktivitäten. [97] [98] [99] [100] [101] [102] Die bereits aufgeführten Beispiele zur Enzympromiskuität in Kapitel 1.1 zeigen, dass es generell möglich ist, nur unter der Verwendung der aktiven Tasche oder weiteren Strukturmerkmalen (wie Metallzentren) des Enzyms, neue Reaktivitäten durch *proteinengineering* zu generieren. Hierfür ist es essentiell, die Reaktionsmechanismen aus der Enzymologie und aus der organischen Chemie in Analogie zu setzen und deren Gemeinsamkeiten für neue Reaktionen zu nutzen. Durch die in der Biokatalyse etablierten Methoden, wie dem rationalen Design oder der gerichteten Evolution, ist es dann möglich neue Biokatalysatoren zu entwickeln. Einer der häufigsten Reaktionsmechanismen in der organischen Chemie als auch in der Natur ist der Säure-Base-Mechanismus. Zur Untersuchung der Promiskuität wurde daher der Fokus in dieser Arbeit auf Enzyme gelegt, die diesen Mechanismus nutzen. Anhand zweier Enzyme, LinB aus *S. japonicum* und SHC aus *A. acidocaldarius*, wurden die Spezifität und Promiskuität untersucht. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass jeweils das katalytische Zentrum als Ausgangspunkt für die Katalyse von nicht-natürlichen Reaktionen verwendet werden kann. In beiden Fällen konnte durch Substitution einzelner Aminosäuren die konformative Flexibilität der aktiven Tasche genutzt werden, um alternative Substrate zu binden und umzusetzen. Punktmutanten beider Enzyme waren wiederum auch in der Lage, die jeweils natürliche Reaktion zu katalysieren, was die Überschneidung von Spezifität und Promiskuität in der aktiven Tasche aufzeigt. Im ersten Schritt der Studie wurde LinB verwendet, um nicht-natürliche Substrate zu hydrolysieren. Dafür wurden Pseudohalogenide und typische Substrate der α/β -Hydrolase-Familie verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass LinB den natürlichen Reaktionsmechanismus nutzt, um die Hydrolyse von organischen Thiocyanaten zu katalysieren. Im Zuge dieser Studie konnte interessanterweise auch ein neuer Reaktionsmechanismus beschrieben werden. Es konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass LinB für die Umsetzung von Isothiocyanaten zu Aminen noch die katalytische Triade nutzt, der nukleophile Angriff des Aspartats aber nicht mehr am α -Kohlenstoff des Substrates erfolgt. Somit kann im Fall der LinB sogar von katalytischer Promiskuität gesprochen werden, da ein anderer Über-

gangszustand stabilisiert wird und eine andere Art von Bindung gespalten wird. *AacSHC* wurde verwendet um vorrangig intermolekular katalysierte Reaktionen zu studieren. Die in der Literatur schon als substratpromiskuitiv beschriebene *AacSHC*, ist in der Lage in geringem Umfang intermolekulare Reaktionen zu katalysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die fokussierte Mutantenbibliothek der *AacSHC* verwendet, um das katalytische Potential bezüglich intermolekularer Reaktionen mit neuen Nukleophilen zu erweitern. Durch die Diversität der Mutantenbibliothek wurden Varianten identifiziert, die die literaturbekannten Produkte in höheren Mengen als die native *AacSHC* bildeten und je nach Wahl des Nukleophils neue Etherprodukte generierten. Zusätzlich konnte durch die eingesetzte Menge des Nukleophils die Selektivität bezüglich der Bildung dieser Etherprodukte gesteigert werden.

4.1 LinB

4.1.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung der LinB

Die Klonierung und Expression erfolgte wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben. Die dabei erhaltene Sequenz stimmte mit den Literaturdaten überein (UniProt-P51698 (LINB_SPHPI)). Auch die Expression und Aufreinigung mittels des His₆-tags war erfolgreich. Die spezifische Aktivität wurde nach der Inkubation von 1-Chlorhexan zu 0.46 ± 0.01 U/mg Enzym bestimmt und liegt damit unterhalb der spezifischen Aktivität die in der Literatur angegeben ist (1.25 U/mg Enzym).^[61] Die spezifische Aktivität in dieser Arbeit wurde in KP_i-Puffer (pH 7.6) bestimmt, der angegebene Wert aus der Literatur wurde in Glycin-Puffer (pH 8.6) bestimmt. Allerdings ergab die Verwendung von Glycin-Puffer (pH 8.6) in der vorliegenden Studie dieselbe spezifische Aktivität wie in KP_i-Puffer (pH 7.6).

4.1.2 Untersuchung zur Substratpromiskuität der nativen LinB

LinB ist eine sehr gut charakterisierte Haloalkan Dehalogenase, die in der Natur für den Abbau des Pestizids Lindan verantwortlich ist (siehe 1.3.1.2). Darüber hinaus

besitzt LinB ein sehr breites Substratspektrum, indem chlorierte, bromierte und iodierete Alkane, die zyklisch als auch azyklisch sein können, hydrolysiert werden.^[103] In dieser Arbeit sollte nun die katalytische Vielseitigkeit gezeigt werden, indem man die Hydrolyse auch auf andere Substrate anwenden kann. Dabei wurde das Augenmerk auf Verbindungen gelegt, die Substrate anderer Mitglieder der Hydrolase-Familie darstellen, wie etwa Ester, Amide oder auch Epoxide. Zusätzlich wurden Substrate gewählt, die chemisch sehr ähnlich zu den halogenierten Verbindungen sind, wie die Pseudohalogenide Azide, Thiocyanate, Isocyanate und Isothiocyanate. Basierend auf den initialen Ergebnissen kann gesagt werden, dass LinB tatsächlich eine Substratpromiskuität aufweist, indem nicht-natürliche Substrate hydrolysiert werden. Benzylthiocyanat **20** und Hexylthiocyanat **18** wurden zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt (Tabelle 13). Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die C-S Bindung ähnlich leicht spaltbar ist wie eine C-X-Bindung (X=Cl, Br, I), was durch die Bindungsenergien bestätigt wird. Diese liegen alle im selben Rahmen (C-Cl 339 kJ/mol, C-Br 285 kJ/mol, C-I 218 kJ/mol, C-S 272 kJ/mol).^[104] LinB demonstrierte keine Aktivität gegenüber den getesteten Aziden. Daher wurde davon ausgegangen, dass das Enzym Substrate mit einer C-N Einfachbindung nicht hydrolysieren kann, obwohl die Bindungsenergie mit 305 kJ/mol im Bereich von C-Cl liegt. Um dem Grund der Inaktivität des Enzyms gegenüber Aziden nachzugehen, wurde überprüft ob LinB generell nicht in der Lage ist C-N-Einfachbindungen zu hydrolysieren, oder ob es sich bei den Aziden um einen Sonderfall handelt. Hierzu wurde ein weiterer Vertreter der Pseudohalogenide gewählt, das 1-Isothiocyanatopentan **19**. Erstaunlicherweise konnte eine enzymkatalysierte Umsetzung des Substrates verzeichnet werden, im Gegensatz zum Azid. Jedoch wurde nicht Pentanol generiert, sondern das entsprechende Pentylamin **24**. Nach diesen Beobachtungen wurde deutlich, dass LinB nicht die C_α-N Einfachbindung spaltet, da sie Azide nicht umsetzt und im Falle der Isothiocyanate nicht die C-N Bindung spaltet, sondern die N=C Doppelbindung. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde im Zuge dieser Arbeit ein neuer Reaktionsmechanismus postuliert. In Abbildung 31 ist der vorgeschlagene Mechanismus zu sehen.

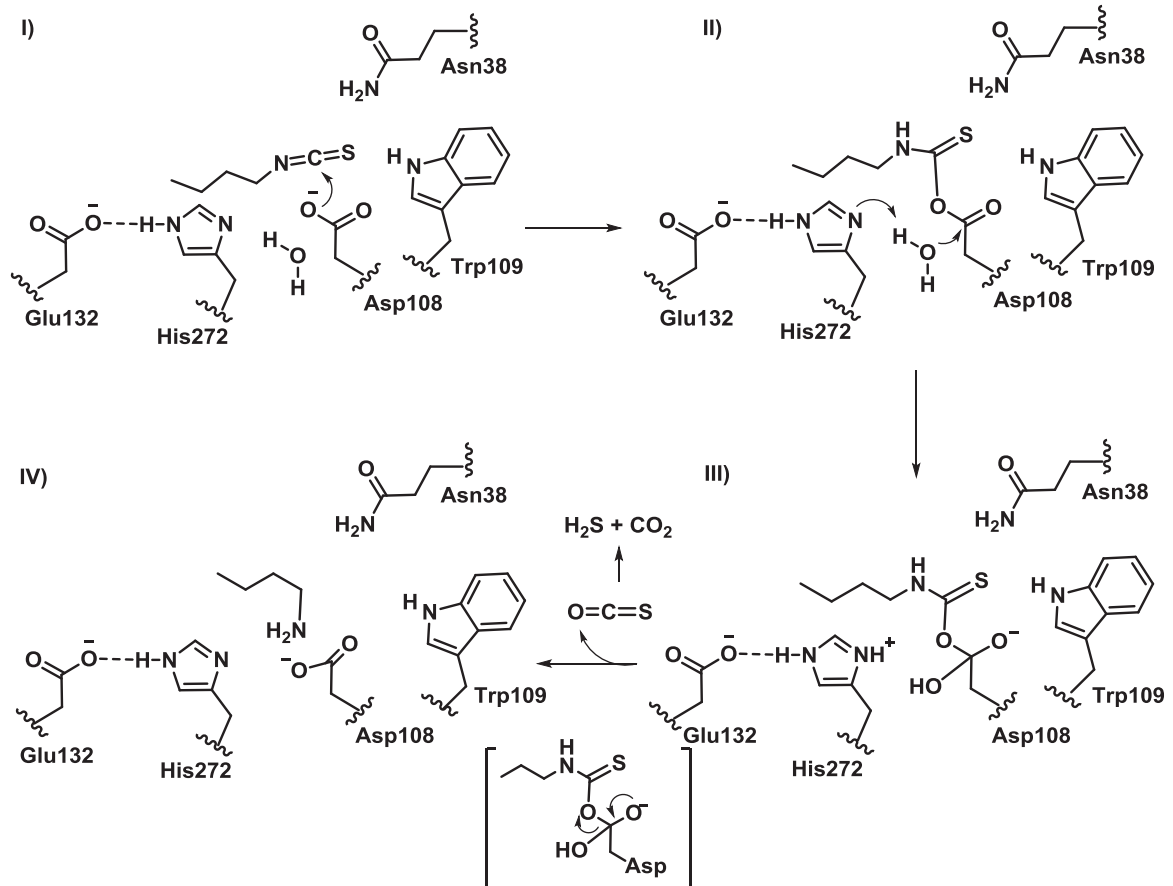


Abbildung 31 Vorgeschlagener Mechanismus der LinB bezüglich der Umsetzung von Isothiocyanaten.

I) Das nukleophile Asp108 greift am elektrophilen Kohlenstoff, welcher sich in der NCS-Gruppe befindet, an und es wird ein Thiocarbamat-Intermediat gebildet. II) Ein, durch die Base His272 aktiviertes, Wassermolekül greift an der Carbonylgruppe des Asp108 an und es bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand aus. III) Durch Umlagerung zerfällt das Intermediat zum Amin und dem gasförmigen COS. Dieses Gas zerfällt wiederum unter den gegebenen wässrigen Reaktionsbedingungen zu Schwefelwasserstoff und Kohlendioxid. IV) Im letzten Schritt wird das Asp108 regeneriert und das Amin wird freigesetzt. Für den Nachweis von Schwefelwasserstoff wurde ein qualitativer anorganischer Assay entwickelt. Das H_2S wurde *in situ* mit Bismut-Ionen abgefangen und ein schwarz-brauner Niederschlag, welcher auf Bi_2S_3 hindeutet, wurde in der Positivkontrolle deutlich. Diese Beobachtung bestätigt den postulierten Mechanismus. Das CO_2 wurde in diesem Fall nicht nachgewiesen, da der mögliche Nachweis mit Calciumhydroxid (CaCO_3) eine trübe Lösung mit weißlichem Niederschlag ergibt, der weniger eindeutig ist als der schwarze Niederschlag. Zudem

kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass sich etwas CO_2 gelöst im Puffer befindet und ein falschpositives Ergebnis hervorruft. Warum LinB nicht in der Lage ist, eine C-N-Einfachbindung zu hydrolysieren, könnte unter anderem mit weiteren Faktoren, die für einen $\text{S}_{\text{N}}2$ Mechanismus ausschlaggebend sind, erklärt werden, denn im Fall der Isothiocyanate liegen die Bindungsenergien mit 615 kJ/mol (C=N) und 536 kJ/mol (C=S) höher als beispielsweise bei C-Cl oder C-S. Trotzdem ist hier eine Katalyse mit der LinB möglich. Die Natur der Abgangsgruppe bestimmt zusätzlich die $\text{S}_{\text{N}}2$ Reaktion. Das austretende Ion nimmt das Elektronenpaar der C-X Bindung mit, daher ist die Spaltung umso leichter, je stabiler das austretende Ion ist. Das Anion ist dann stabil, wenn die Ladung über einen größeren Bereich delokalisiert ist, wie zum Beispiel beim Iodid. Zusätzlich bestimmt die Säurestärke der konjugierten Säure H-X, die Stabilität des Anions. Je höher der $\text{p}K_{\text{s}}$ -Wert H-X, desto besser ist die Abgangsgruppe. Im Fall der Halogene liegen die Säurestärken der konjugierten Säuren zwischen -9.5 für HI und -6 für HCl. Die Säurestärke der Thiocyan säure liegt bei -1.9. Die Reaktion, indem SCN^- als Ion abgespalten wird, kann somit von LinB katalysiert werden. Die Säurestärke der Isothiocyansäure HNCS liegt bei -1.3 und es wäre theoretisch möglich, den Alkohol und das NCS-Ion zu bilden. Allerdings wird hier, wie auch in der organischen Chemie, der elektrophilere Kohlenstoff vom Nukleophil (hier Aspartat) angegriffen. Zusätzlich wird bei der katalysierten Hydrolyse ein Gas (COS) frei, was immer eine Triebkraft einer Reaktion darstellt. Im Gegensatz zur Isothiocyansäure liegt die Säurestärke der Stickstoffwasserstoffsäure HN_3 bei 4.8. Daher liegt es nahe, dass das Azid im Gegensatz zu Chlorid, Bromid, Iodid oder Thiocyanat eine schlechtere Abgangsgruppe darstellt und daher die enzymkatalysierte Reaktion erschwert ist. Wenn nun davon ausgegangen wird, dass das Azid-Ion keine Abgangsgruppe darstellt, müsste der nukleophile Angriff des Aspartats am endständigen Stickstoffatom des Alkylazids stattfinden, analog zum nukleophilen Angriff des Phosphors in der Staudinger-Reaktion.^[105] Durch Reduzierung entstehen in dieser Reaktion elementarer Stickstoff und das Amin. Allerdings scheint ein ähnlicher Mechanismus nicht auf das Enzym anwendbar, da keine Substratumsetzung zu verzeichnen war. Eine Inaktivität aufgrund der sterischen oder elektronischen Ansprüche des Azids, können sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da es in den Studien von Janssen *et al.*^[17] zur Substratpromiskuität der Halohydrin Dehalogenase HheC (siehe 1.1) möglich war, Azide anstelle von

Halogeniden zur Katalyse zu verwenden. Azide können daher generell in der vorhandenen Halogenid-Bindetasche binden. Allerdings wurde in den Studien von Janssen *et al.* der nukleophile Charakter des Azids ausgenutzt, und keine Funktion als Abgangsgruppe beschrieben.

4.1.3 Design und Charakterisierung der LinB-Mutantenbibliothek

Die vorgenommenen Mutationen in der Cap-Domäne konnten via der QuikChange® Methode erfolgreich eingeführt werden. Die Expression wurde durch die vorgenommenen Mutationen nicht stark beeinflusst, da die Cap-Domäne dafür bekannt ist, flexibler zu sein als die Hauptdomäne und Mutationen besser zulässt.^[35] Die Varianten P144R, Q146A, V173L, L177F, L177M und L177W zeigten dasselbe Aktivitätslevel gegenüber Chlorhexan verglichen mit dem Wildtyp. Der Einfluss der Mutationen bezüglich der Aktivität gegenüber alternativen Substraten war jedoch sehr unterschiedlich. Die nicht natürlichen Substrate waren auch für die Varianten deutlich schlechtere Substrate. In vielen Fällen aus der Literatur zeigt sich durch Mutagenese eine Verschiebung der Aktivität in Richtung der neuen Reaktivität, und dabei eine Verschlechterung der natürlichen Aktivität.^[99] Dies ist in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall, da die originale Aktivität dominierend gegenüber der neugewonnene Reaktivität bleibt. Insgesamt wurden lineare, sterisch weniger anspruchsvolle Substrate schlechter umgesetzt als ihre sterisch anspruchsvolleren Analoga. Dies hängt damit zusammen, dass die aktive Tasche von LinB recht groß und die Bindung der kleineren Substrate und deren Stabilisierung während der Katalyse nicht effizient genug ist. Computerunterstützte Studien zeigten, dass sich bei linearen Substraten wie 1-Bromhexan oder 1-Chlorhexan zwei Moleküle in der aktiven Tasche befinden können, und sich diese beide gegenseitig an einer effizienten Katalyse hindern. Bei zyklischen Substraten befand sich während MD-Simulationen ein Substrat in der aktiven Tasche, während das andere im Tunnelbereich saß.^[106] In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis, wurde Hexylthiocyanat **13** nur mit bis zu 10 % von LinB Wildtyp umgesetzt während Benzylthiocyanat **17** einen Umsatz von 95 % nach 16 h zeigte. Variante L177W zeigte hier den geringsten Umsatz von **17** mit 32 %. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Mutation von Leucin zu Tryptophan an der Stelle

177 die aktive Tasche verkleinert und der *lower tunnel* (p1a), der im Wildtyp vorhanden ist, durch die sterisch anspruchsvolle Aminosäure geschlossen wird. ^[107] Deutlich wird dies in Abbildung 32, im Wildtyp sind drei Tunnel vorhanden, wie auch in der Einleitung unter 1.3.1.3 beschrieben, hier p1a (*upper tunnel*) p1b (*lower tunnel*) und p2 (*slot tunnel*). In der L177W Variante ist p1a nun nicht mehr zugänglich.

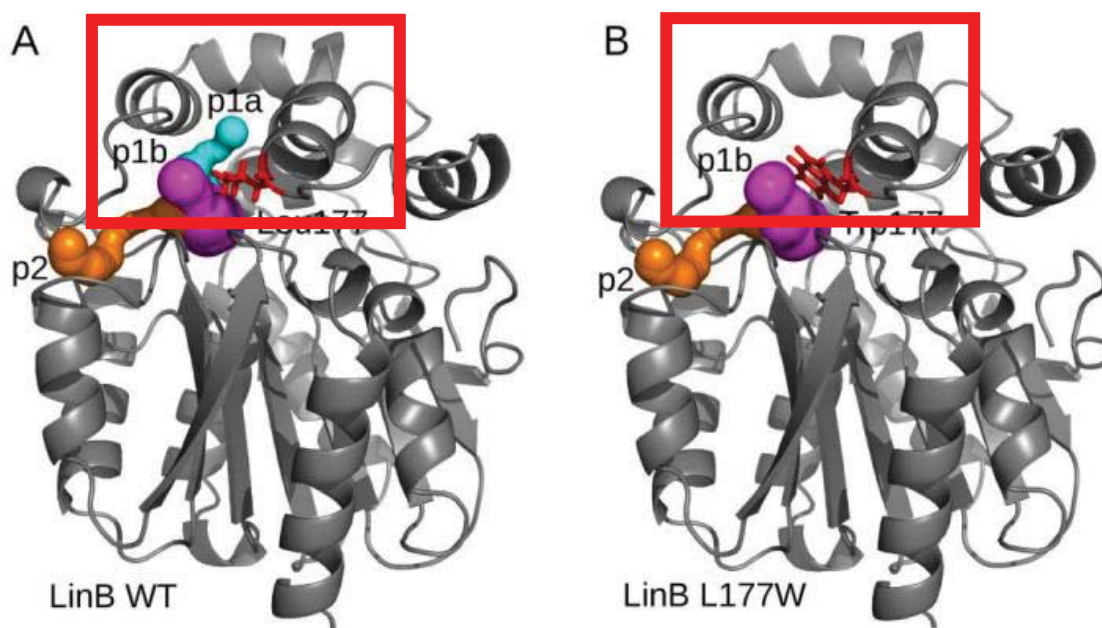


Abbildung 32 A) Kristallstruktur der LinB WT (PDB code 1MJ5) in grau mit den von CAVER berechneten Tunneln in Sphären gezeigt: p1a tunnel (cyan), p1b tunnel (magenta) und p2 tunnel (orange) B) Modellstruktur von L177W mit denselben Farb-Codes wie für LinB WT. Durch die Substitution von Leucin zu Tryptophan (rote Aminosäure) wird Tunnel p1a blockiert. ^[107]

Aus MD-Simulationen und kinetischen Studien von L177W mit 1,2-Dibromethan als Substrat geht hervor, dass der Mechanismus der Bromid-Bindung nun aus zwei Schritten besteht im Gegensatz zum normalerweise auftretenden einstufigen Bindungsmechanismus. Auch die Freisetzung der Produkte wurde verlangsamt oder sogar gehindert. ^[107] Diese Beobachtung aus der Literatur könnte auch in der vorliegenden Arbeit durchaus ein Grund dafür sein, dass L177W gegenüber den getesteten Substraten eher geringere Umsätze zeigt. Es liegt nahe, dass durch den fehlenden Tunnel eine Verzögerung der Katalyse auftritt, da nun das recht große SCN-Ion durch einen anderen Tunnel die aktive Tasche verlassen muss. Eine Unregelmäßigkeit ergibt sich allerdings, wenn man das Substrat Benzylisothiocyanat **21** betrachtet. Die Varianten inklusive Wildtyp Enzym zeigten nach 16 h kaum signifikanten Umsatz. Alleine Substitutionen an der Position L177 schienen förderlich zu sein.

L177W als beste Variante generierte das resultierende Benzylamin **26** in 15-facher Menge verglichen zum Wildtyp. Allerdings ist es an dieser Stelle schwer eine plausible Erklärung für die gesteigerte Aktivitäten der Mutanten L177F, L177W und L177M zu geben. Alle drei Aminosäuren (Methionin, Tryptophan und Phenylalanin) sind unpolar und somit von gleicher Natur wie das Leucin. Nur mit einer verbesserten Bindung und Stabilisierung des Substrates durch π - π Wechselwirkungen der Aminosäure (Phenylalanin oder Tryptophan), die der Aromatizität zu verdanken wäre, kann nicht argumentiert werden, da Methionin nicht aromatisch ist und trotzdem eine 10-fach gesteigerte Aktivität gegenüber dem Wildtyp besitzt. Strukturell kann wie oben erwähnt gesagt werden, dass L177W die aktive Tasche verkleinert, da das Tryptophan wie eine Art Deckel wirkt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch L177F einen ähnlichen Effekt aufweist, da sich die Resultate der Biotransformationen beider Varianten ähneln. Die gesteigerte Aktivität von L177M gegenüber Benzylisothiocyanat könnte möglicherweise damit erklärt werden, dass gewisse Aminosäuren in der Umgebung der Position 177 eine strukturelle Veränderung durch die Mutation zu Methionin erfahren und somit dynamische Prozesse eine große Rolle spielen. Eine weitere Erklärung für die gesteigerte Aktivität könnte auch nur von der Natur des Substrates ausgehen, denn Leucin an Position 177 sitzt zwar am Tunneleingang und damit 12.5 Å vom Nukleophil Asp108 entfernt, steht aber mit manchen Substraten in Van der Waals Kontakt. ^[61] Dies könnte eine denkbare Ursache für die verschiedenen Effekte der Mutationen darstellen. Im Allgemeinen zeigte P144R eine verringerte Aktivität gegenüber den nicht-natürlichen Substraten als zu 1-Chlorhexan **10**. Vor allem ist die Aktivität gegenüber Isothiocyanaten auffallend niedriger als die der anderen Varianten. Ein wichtiger Faktor der beachtet werden muss, wenn Proline im Enzym substituiert werden, ist die mögliche strukturelle Veränderung. Proline tragen häufig zur Ausbildung von *random coil* Strukturen bei, weil der ringförmige Aufbau eine Ausbildung einer α -Helix oder β -Faltblattstruktur nur schwer möglich macht. In LinB sitzt Prolin an der Stelle 144 am Anfang eines Loops hinter einer α -Helix. Es könnte dazu kommen, dass durch das eingeführte Arginin und damit das zusätzliche H-Atom in der Peptidstruktur eine zusätzliche H-Brücke gebildet werden kann, und somit eine abweichende Sekundärstruktur ausgebildet wird. Diese Veränderung in der Sekundärstruktur kann zu möglichen Aktivitätsminderungen führen. Allerdings zeigt sich beim Umsatz des natürlichen Sub-

strates 1-Chlorhexan keine Aktivitätsminderung. Ein weiterer Grund für die verminderte Aktivität könnte die jetzt stickstoffreiche Seitenkette sein. Durch die zusätzlichen Stickstoffatome könnten Wasserstoffbrücken gebildet werden, die vorher nicht vorhanden waren und die Katalyse beeinträchtigen. Zusätzlich liegt die Guanidin-Gruppe des Arginin im wässrigen Milieu (pH 7.6) positiv geladen vor.^[108] Durch die gewonnene positive Ladung könnte es hier zu einer Beeinträchtigung der Reaktion kommen. Die Variante V173L zeigt gegenüber den Thiocyanaten und Isothiocyanaten verminderte Umsätze im Vergleich zum Wildtyp. Dies ist damit zu erklären, dass V173 direkt in Richtung der aktiven Tasche weist und durch eine Einführung einer weiteren Methylgruppe durch Leucin zu einer Verkleinerung der aktiven Tasche führt. Die Seitenkette steht nun mehr in Wechselwirkung mit dem Substrat als vorher. Die sogenannten *knockout* Mutanten, also Mutanten bei denen eine wichtige katalytisch aktive Aminosäure ausgetauscht wurde (D108S, H272F, N38S), zeigten keine Aktivität gegenüber den getesteten Substraten (inklusive dem natürlichen Substrat 1-Chlorhexan). Dieses Ergebnis untermauert den vorgeschlagenen Mechanismus für die getesteten Isothiocyanate und zeigt dass die Katalyse tatsächlich im aktiven Zentrum durch die bekannten Aminosäuren katalysiert wird.

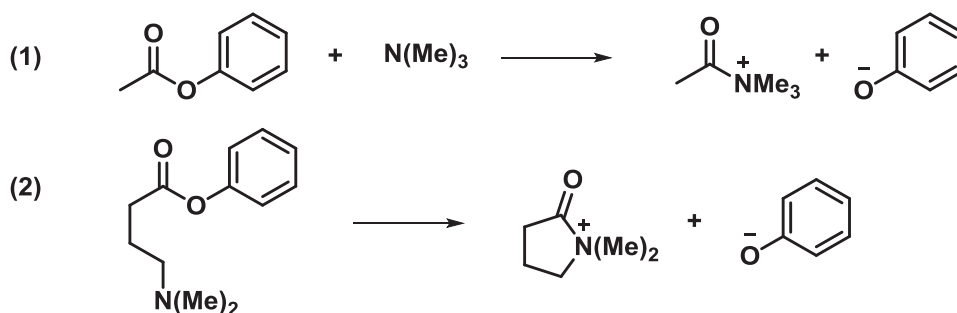
4.1.4 Enantioselektivitäten der LinB und deren Varianten

In Studien von Janssen *et al.*^[109] wurde LinB hinsichtlich ihrer Enantioselektivität experimentell und theoretisch untersucht. Die dort durchgeführten molekulardynamischen Simulationen der LinB-Substrat Komplexe indizierten eine klare Präferenz gegenüber dem jeweiligen (*R*)-Enantiomer der getesteten bromierten Alkane oder α -Bromoamide. Für das (*S*)-Enantiomer ergaben sich durch *near-attack-conformations*-Berechnungen ungünstige Winkel für den nukleophilen Angriff des Aspartats. Diese theoretisch erhaltenen Daten konnten experimentell bestätigt werden, LinB bildete bei der Hydrolyse jeweils unter Inversion den entsprechenden (*S*)-Alkohol.^[51] In der vorliegenden Arbeit zeigte die native LinB und deren Varianten allerdings (*S*)-Selektivität gegenüber dem nicht-natürlichen Substrat *rac*-2-Isothiocyanatoctan. Dies steht sehr gut im Einklang mit dem bereits postulierten Reaktionsmechanismus (Abbildung 31), da hier ein anderer

Bindungsmodus des Substrates vorliegt. Es wird nicht wie im Falle der halogenierten Substrate das α -Kohlenstoffatom angegriffen, sondern das Kohlenstoffatom der NCS-Gruppe. Es tritt somit keine Inversion der Konfiguration ein, und die Chiralität bleibt erhalten. Für die Präferenz gegenüber dem (*S*)-Enantiomer könnten günstigere sterische Wechselwirkungen gegenüber dem (*R*)-Enantiomer verantwortlich sein. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Docking-Studien ist zu erkennen, dass die Methylgruppe des (*R*)-Enantiomers direkt zum Asp108 exponiert ist (Abbildung 16), was sterische Wechselwirkungen hervorrufen kann, und daher einen schlechteren Umsatz des (*R*)-Enantiomers gegenüber dem (*S*)-Enantiomer hervorruft (Tabelle 16). Interessanterweise zeigte Variante L177W als einzige Variante nur einen moderaten Enantiomerenüberschuss von 33 %. Durch den Austausch von Leucin gegen Tryptophan wurde die aktive Tasche kleiner, und somit passt *rac*-2-Isothiocyanatooctan ***rac*-31** nicht mehr perfekt in die aktive Tasche, beide Substrate sind im Gegensatz zum Wildtyp in einer eher gestauchten Lage, was den geringen Umsatz erklären könnte (Tabelle 16). Der geringe Enantiomerenüberschuss lässt sich darauf zurückführen, dass die NCS-Gruppe beider Enantiomere in einer sehr ähnlichen Orientierung zur katalytischen Triade und den halogenid-stabilisierenden Aminosäuren N38 und W109 steht und somit keine Diskriminierung durch das Enzym gewährleistet ist. Obwohl bei diesem Docking keine Protein-Flexibilität angenommen wurde, stimmen diese Ergebnisse sehr gut mit den experimentell ermittelten Daten überein. Um diese Ergebnisse zu bekräftigen, wäre es nötig zusätzlich die Proteinflexibilität mittels molekulardynamischen Studien zu betrachten, um damit das Verhalten der Substrate im bewegenden Enzym zu studieren.

4.2 AacSHC

Die Squalen-Hopen-Zyklase, die in dieser Arbeit gewählt wurde, zeigt ein sehr breites Reaktions- und Substratspektrum, was in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde. [85] [110] [111] Eine Mutantenbibliothek der AacSHC, die die Aminosäuren in der aktiven Tasche adressiert, wurde generiert, um das Potential der SHC weiter auszuloten. [90] Durch die verschiedenen Templatstrukturen der aktiven Tasche, die bedingt durch Punktmutationen zustande kommen, können verschiedene Zyklisierungsprodukte generiert werden. Durch ganz spezielle Punktmutationen, die zur Diversität der aktiven Tasche führten, gelang es kleinere Substrate, die aufgrund ineffizienter Bindung in der aktiven Tasche nicht zyklisiert wurden, in der aktiven Tasche zu stabilisieren und umzusetzen. Dadurch konnte mittels AacSHC-Varianten erstmals der Monozyklus des Geraniols generiert werden. Allerdings wurden mit dieser Mutantenbibliothek bislang nur intramolekulare Reaktionen adressiert. Ein weiterer, nicht weniger interessanter Aspekt ist die Fähigkeit der AacSHC intermolekulare Reaktionen zu katalysieren. Intermolekulare Reaktionen sind in der Regel anspruchsvoller als intramolekulare Reaktionen, da erst zwei Reaktanden für die Reaktion aufeinander treffen müssen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei intramolekularen Reaktionen in vielen Fällen wesentlich höher als die der intermolekularen Reaktion. So zum Beispiel bei der Aminolyse von Phenylacetat mit Triethylamin (1) und der intramolekularen Zyklisierung von Phenyl-4-(dimethylamino)butanoat (2). Hier liegt eine 1200-fach erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit der intramolekularen gegenüber der intermolekularen Reaktion vor (Schema 14). [112]



Schema 14 Die intermolekulare Reaktion (1) läuft im Gegensatz zur intramolekularen (2) mit einer verminderten Reaktionsgeschwindigkeit ab.

Enzyme bringen im Fall einer intermolekularen Reaktion die Reaktanden so nahe zusammen, dass ein Enzym-Substrat Komplex entsteht, so wird eine unimolekulare Reaktion imitiert. Durch diesen Annäherungseffekt wird die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Allerdings ist die Bindung kleiner Moleküle nicht einfach, da kaum nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Enzym auftreten können. Anders ist dies bei Cofaktoren, diese sind meist größer als die eigentlichen Substrate und können so im Enzym für die Reaktion besser stabilisiert werden. [29] Daher ist die intermolekulare Reaktion im Fall der *AacSHC* sehr interessant, da normalerweise intramolekulare Reaktionen katalysiert werden und die Positionierung eines weiteren Moleküls einen zusätzlichen Energieaufwand bedeutet. In der Literatur wurde die intermolekulare Reaktion für die *AacSHC* erstmals am Beispiel von Farnesol beschrieben. [85] Daher sollte die fokussierte *AacSHC*-Mutantenbibliothek hinsichtlich der Zyklisierung von Farnesol auf Aktivität und Diversität untersucht werden.

4.2.1 Aktivitätstest der Mutantenbibliothek gegenüber Farnesol

Die fokussierte Mutantenbibliothek, die Punktmutationen aller Aminosäuren im Abstand von 15 Å zur katalytisch aktiven Asparaginsäure umfasst (insgesamt 32 Varianten), und die native *AacSHC* wurden hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber der Polyzyklisierung von Farnesol getestet. Die erhaltenen Ergebnisse für die native *AacSHC* stimmen mit den Resultaten von Hoshino überein. Das vom Wildtyp gebildete Hauptprodukt der Reaktion ist mit über 85 % das Wasseradditionsprodukt **36**. Eliminierungsprodukte **34** und **35** und das intermolekular gebildete Produkt **37** stellen Nebenprodukte mit jeweils 8 %, 4 % und 3 % dar. Die bevorzugte Bildung von Wasseradditionsprodukt **36** kommt daher, dass das Sesquiterpen Farnesol im Gegensatz zu Squalen nur etwa die Hälfte des Platzes in der aktiven Tasche einnimmt, und somit der Rest der aktiven Tasche mit Wassermolekülen aufgefüllt ist. So ist der Angriff eines Wassermoleküls gegenüber der Eliminierung eines Protons bevorzugt und führt zum genannten Hauptprodukt **36**. Nur wenige Varianten zeigten geringfügige Aktivität. Über 70 % der getesteten Varianten bildeten das Wasseradditionsprodukt **36** als Hauptprodukt (Abbildung 17). Die Varianten I261W, W312A, W312F, F365A, Q366W und Y609A die nicht das Wasseradditionsprodukt

36 als Hauptprodukt bildeten, bevorzugten eines der Eliminierungsprodukte **34** oder **35**. Bei diesen Varianten ist die aktive Tasche durch die eingeführten Aminosäuren für Wassermoleküle offensichtlich schlechter zugänglich. Variante I261W stellte sich beispielsweise als hochselektiv gegenüber der ausschließlichen Bildung des Eliminierungsprodukts **35** heraus. Fünf Varianten bildeten zusätzlich zu den genannten Hauptprodukten **34-36**, das bimolekulare Produkt **37**. Dieses ist zurückzuführen auf einen nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe des Farnesols auf das Carbokation. Mit zwei dieser fünf Varianten, namentlich L607A und L607F konnte eine 4- bzw. 10-fach höhere Produktbildung von **37** gegenüber dem Wildtyp erzielt werden (Tabelle 17). Durch die Docking-Studie wurde ersichtlich, dass die Seitenkette des Leucins in Richtung des final gebildeten Carbokation weist. Durch die Substitution von Leucin durch Alanin oder Phenylalanin wurde eine Veränderung der Tasche in diesem Segment erreicht und somit eine bessere Position für den nukleophilen Angriff eines zweiten Farnesol Moleküls geschaffen (Abbildung 22). Zusätzlich ist durch die Aromatizität des Phenylalanins davon auszugehen, dass das Carbokation besser stabilisiert wird.

4.2.2 Reaktionskontrolle der Farnesol Zyklisierung mit L607A und L607F über 48 h

Die Reaktionskontrolle ergab, dass die Bildung der Produkte **34**, **35** und **36** schneller abläuft, als die Bildung von **37**. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass intermolekulare Reaktionen meist langsamer ablaufen als intramolekulare, da hier die beiden Reaktanden erst zusammengeführt werden müssen. Eine Erhöhung der Farnesol Konzentration könnte zur schnelleren Bildung von **37** führen, da die Wahrscheinlichkeit, dass Farnesol reaktiv gebunden wird und es zur intermolekularen Reaktion kommt, höher ist.

4.2.3 Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von Geraniol

Um das katalytische Potential bezüglich der intermolekularen Reaktion der *AacSHC* Varianten weiter zu untersuchen, wurde zunächst die aktivste Variante L607F studiert. Die Untersuchungen wurden basierend auf der Annahme durchgeführt, dass Geraniol analog zu Farnesol als Nukleophil agiert und eine neue Etherspezies gebildet wird. Tatsächlich konnte das erwartete Produkt **39** neben weiteren schon bekannten Zyklisierungsprodukten erhalten werden.

Untersuchung der Monozyklisierung von Geraniol mit L607F

Neben dem gebildeten Produkt **39** wurde erstaunlicherweise ein weiteres enzymkatalysiertes Produkt **40** gebildet. Durch die Isolierung des Produktes nach präparativer Biotransformation konnte per NMR die Struktur aufgeklärt werden. Es handelte sich um ein neues intermolekular gebildetes Produkt **40**, welches nicht auf der Basis des Bizyklus von Farnesol zustande kam. Vielmehr kommt dieses Produkt durch den nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe von Geraniol auf den Monozyklus des Geraniols zustande. Aus der Literatur ist bekannt, dass der nativen *AacSHC* Geraniol **38** als Substrat dienen kann, jedoch nur unter Verwendung hoher Enzymkonzentrationen und langer Reaktionszeiten.^[19] Zwar wurde für L607F in der Literatur keine Aktivität gegenüber Geraniol beobachtet, aber in der vorliegenden Arbeit konnte Geraniol aufgrund der hohen Substratkonzentration zyklisiert werden. In den hier vorgenommenen Experimenten wurden mindestens 65 mM Geraniol verwendet. Diese hohe Konzentration treibt die Zyklisierung womöglich voran, da es gut vorstellbar ist, dass mehr als ein Geraniol Molekül in der aktiven Tasche vorliegt. Dies könnte auch gleichzeitig bedeuten, dass Wassermoleküle aus der hydrophoben Tasche von Geraniol Molekülen verdrängt werden und der nukleophile Angriff des Geraniols auf das Carbokation wahrscheinlicher wird. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da bisher bei der Zyklisierung von Geraniol weder mit der nativen *AacSHC* noch mit der Mutantenbibliothek ein intermolekular gebildetes Produkt nachgewiesen werden konnte.

Untersuchung der Auswirkung von verschiedenen Geraniolkonzentrationen auf die Produktverteilung der Farnesol Zyklisierung

Durch die Erhöhung der Geraniolkonzentration von 1 % auf 5 % (v/v) wurde die Bildung von **36** und **40** stark beeinflusst (Abbildung 24). Dies ist womöglich auf den Überschuss an Geraniol zurückzuführen. Geraniol dient wie eben erwähnt ab einer ausreichend hoher Konzentration selbst als Substrat und wird in der aktiven Tasche der *AacSHC* zyklisiert. Da bei 5 % (v/v) Geraniol die aktive Tasche sehr wahrscheinlich überwiegend mit Geraniol Molekülen besetzt ist, finden bevorzugt die Zyklisierung von Geraniol und der darauffolgende nukleophile Angriff der Hydroxygruppe des Geraniols an das Carbokation statt. Farnesol wird bei diesem Überschuss an Geraniol kaum noch zyklisiert, es entstehen insgesamt nur noch 26 % der Produkte aus dem Bizyklus des Farnesols und dafür 74 % aus dem Monozyklus des Geraniols (Abbildung 24). Zusätzlich werden womöglich Wassermoleküle aus der aktiven Tasche verdrängt, sodass Wasseradditionsprodukte weniger favorisiert sind.

4.2.4 Unterschiede zwischen den Varianten L607A, L607F und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion mit Geraniol

Variante L607A, L607F und die native *AacSHC* wurden verwendet um die Polyzyklisierung von Farnesol in Gegenwart von Geraniol zu studieren. Die Varianten demonstrierten sehr unterschiedliche Produktverhältnisse. Deutlich zu erkennen ist, dass *AacSHC* Wildtyp Farnesol als Substrat bevorzugt, da das typische Produktmuster auftritt (Tabelle 18). Die intermolekular gebildeten Produkte **39** und **40** wurden nur als Nebenprodukte gebildet. L607A katalysiert dagegen schon bei 1 % (v/v) Geraniol die Bildung von **40** bevorzugt gegenüber dem Wasseradditionsprodukt **36**. Bei L607F wiederum liegen **36** und **40** in ähnlichen Verhältnissen vor. Beide Varianten verfügen somit über eine höhere Aktivität gegenüber der Zyklisierung von Geraniol im Gegensatz zur nativen *AacSHC*.

4.2.5 Untersuchung der Zyklisierung von Farnesol mit L607F in Gegenwart von verschiedenen Alkohol-Nukleophilen

Die Untersuchungen hierzu wurden basierend auf der Tatsache durchgeführt, dass Alkohole erfolgreich in vorangegangenen Studien zur intramolekularen Terminierung der Zyklisierungsreaktion verwendet wurden. Nun war es von großem Interesse, ob lineare aliphatische Alkohole auch intermolekular zur Terminierung der Zyklisierungsreaktion eingesetzt werden können. Zunächst wurde wieder die aktivste Variante L607F studiert. Mit zunehmender Kettenlänge des zugesetzten Alkohols wurde ein verminderter Umsatz von Farnesol beobachtet. Denkbar ist eine mögliche Blockierung der aktiven Tasche durch die aliphatischen Alkohole, und den daraus resultierenden geringeren Umsatz von Farnesol. Die Bildung der intermolekular gebildeten Produkte **41-44** wurde auf Kosten des Eliminierungsproduktes **35** und des Etherproduktes **37** gesteigert. Da die kurz-kettigen Alkohole im Überschuss vorliegen und ein besseres Nukleophil darstellen als Farnesol, war die Bildung der Etherprodukte **41-44** gegenüber **37** favorisiert. Auffallend in den verschiedenen Ansätzen war, dass die verhältnismäßig größte Menge an neu gebildetem Ether mit Pentanol gewonnen werden konnte (Abbildung 26). Pentanol hat zur Ausübung des nukleophilen Angriffes wohl eine bessere Position in der aktiven Tasche als kürzer- oder länger-kettige Alkohole. Es wird womöglich durch nichtkovalente Wechselwirkungen produktiv in der aktiven Tasche gebunden und so dem Substrat (Farnesol) nahe gebracht und es folgt die intermolekulare Reaktion. Bei Ethanol ist gut vorstellbar, dass es in der hydrophoben Tasche aufgrund fehlender nichtkovalenter Wechselwirkungen nicht produktiv gebunden werden kann um eine intermolekulare Reaktion zu ermöglichen. Bei Hexanol könnte die zusätzliche Methylgruppe gegenüber Pentanol zu ungünstigen Wechselwirkungen mit manchen Aminosäuren führen und somit die Addition beeinträchtigen. Um einen tieferen Einblick in diese Ergebnisse zu erhalten, wäre eine *in silico* Analyse sehr hilfreich, in Bezug auf die Faltung der Substrate während der Reaktion.

4.2.6 Unterschiede zwischen den Varianten L607A und L607F und dem Wildtyp bezüglich der intermolekularen Reaktion mit Butanol und Pentanol

Da die Ether-Verlinkung zwischen den kurzkettigen Alkoholen und dem Bicyklus des Farnesols erfolgreich von L607F katalysiert wurde, wurde zusätzlich der Wildtyp und L607A zum Vergleich herangezogen. Die Nukleophil Konzentration wurde variiert, um Unterschiede in den Produktverhältnissen zu sehen. Während bei den Ansätzen, die von L607F katalysiert wurden, eine signifikante Abnahme von **36** und **37** und dabei eine gleichzeitige Zunahme vom jeweiligen Etherprodukt **42** oder **43** auftritt, ist bei L607A keine signifikante Abnahme von **37** zu sehen. Butanol beziehungsweise Pentanol stehen bei L607F in Konkurrenz mit dem sonst angreifenden Wasser-/Farnesolmolekül. Mit steigender Konzentration an Butanol ist es möglich die Bildung von **36** zu unterdrücken (Tabelle 20 und Abbildung 30).

4.2.7 Erweiterung des Produktspektrums

Durch die vorliegende Arbeit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass *AacSHC* ein großes katalytisches Potential offenbart. Durch die Addition von verschiedenen Nukleophilen konnten neue, nicht literaturbekannte Produkte **39-44** generiert werden, die unter anderem für die Riechstoffindustrie sehr interessant sein können. Auch die erstmals beschriebene intermolekulare Bildung von **40**, die ausgehend vom Geraniol-Monozyklus erfolgt, zeigt die beeindruckende Vielfalt der *AacSHC* (Abbildung 33). Die Punktmutanten zeigten teilweise auffallende Produktselektivitäten, wie die Formation von **40**, die noch gesteigert werden konnte, indem die Substratkonzentration erhöht wurde. Insgesamt kann durch die Wahl des Nukleophils und vor allem durch die eingesetzte Menge, die Produktselektivität hin zu Etherprodukten gesteuert werden. L607F demonstrierte in Studien von Hoshino *et al.* zur Zyklisierung von Squalen anstatt der polyzyklisierten Produkte Hopan oder Hopanol, nicht vollständig zyklisierte Produkte. Es bildeten sich nur mono- oder bityklisierte Produkte aus. ^[113] Diese Verbindungen besitzen hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu den hier aufgeführten intermolekular gebildeten Produkten (**37,39-44** Abbildung 33). Die durch das Phenylalanin an Position 607 veränderte aktive Tasche der *AacSHC* ermöglicht genau für diese Art von Struktur das

perfekte Templat. Daher zeigt L607F hier die höchste Formation solcher mono- oder bizyklischer Produkte mit längerer Seitenkette.

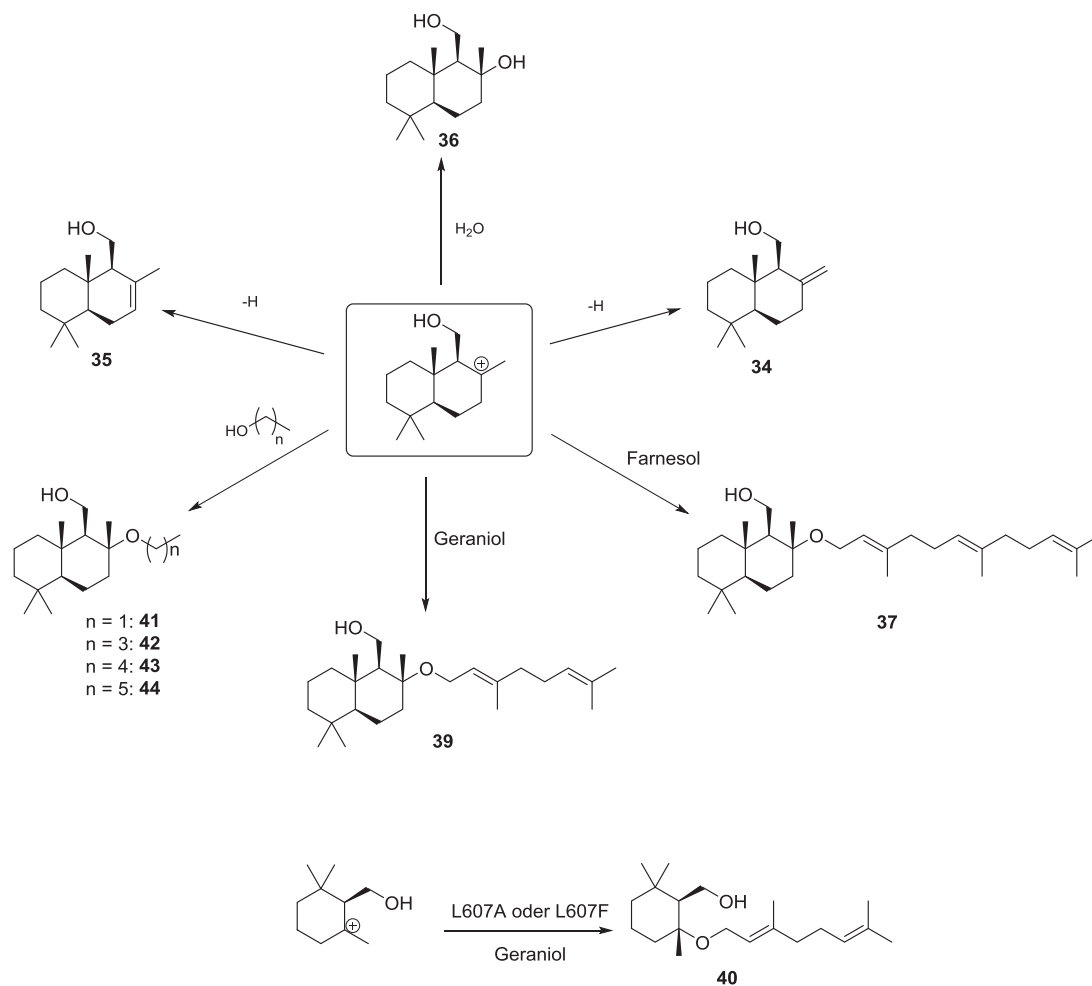


Abbildung 33 Literaturbekannte Zyklisierungsprodukte aus der Reaktion von AacSHC mit Farnesol (**34-37**) und neue, nicht literaturbekannte intermolekular gebildete Produkte (**39-44**).

Anhand der unterschiedlichen Produktselektivitäten der Varianten (Bevorzugung der Eliminierungsprodukte, des Wasserproduktes oder des bimolekularen Produktes) können tendenziell Regionen in der aktiven Tasche ausgemacht werden, die für die Bildung dieser Produkte verantwortlich sind. Diese verschiedenen Regionen der aktiven Tasche sind in Abbildung 34 dargestellt. Die blaue Region zeigt die Aminosäuren, deren Austausch meist zu Eliminierungsprodukten führte. Somit ist in diesem Bereich der Wassereintritt durch die substituierten Aminosäuren eher gehindert. Die pinkfarbene Region zeigt die Aminosäuren, deren Austausch zusätzlich zu bimolekularen Produkten führte. Die graue Region, die den größten Teil ausmacht, zeigt Aminosäuren, deren Substitution die Produktselektivität im Vergleich

zum Wildtyp nur geringfügig änderte und das Wasseradditionsprodukt das Hauptprodukt ist.

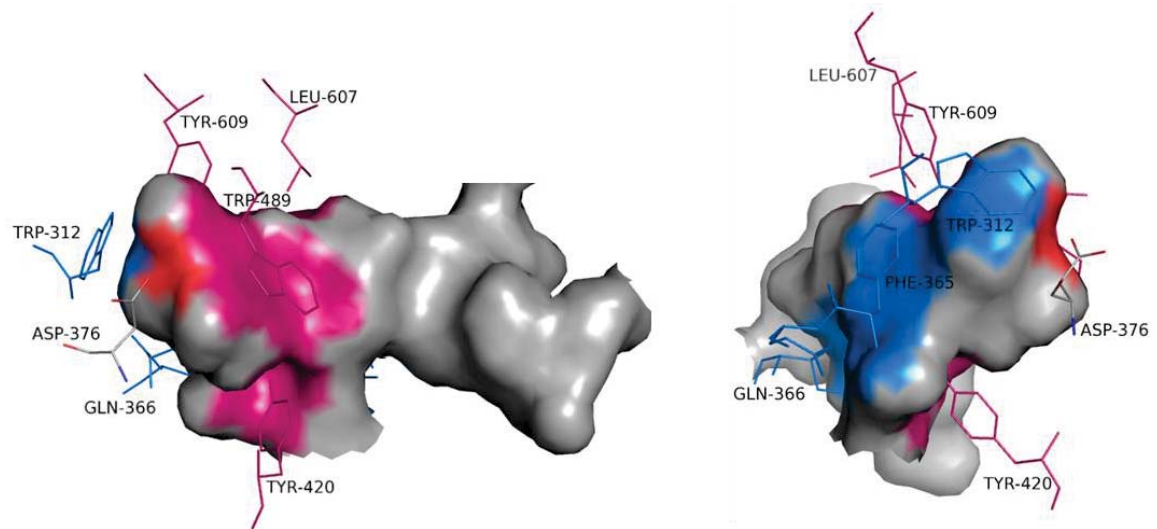


Abbildung 34 Zwei schematische Darstellungen der aktiven Tasche der AacSHC. **Blauer** Bereich: Punktmutanten in dieser Region bildeten überwiegend Eliminierungsprodukte. **Pinkfarbener** Bereich: Punktmutanten in dieser Region bildeten zusätzlich bimolekulare Produkte. **Grauer** Bereich: Punktmutanten in dieser Region bildeten überwiegend das Wasseradditionsprodukt.

5 Ausblick

5.1 Ausnutzung des katalytischen Potentials der LinB für die Hydrolyse alternativer Substrate

Es konnte gezeigt werden, dass die Haloalkan Dehalogenase LinB Substrat- sowohl als auch katalytische Promiskuität aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurden keine molekulardynamischen Studien durchgeführt, allerdings wäre dies in Bezug auf die verschiedenen Punktmutanten und die Substrate sehr interessant, und könnte durchaus dazu beitragen, weitere Positionen für neue Mutationen ausfindig zu machen um das Substratspektrum weiter auszudehnen. Die LinB-katalysierte Bildung von Aminen, stellt einen alternativen Zugang zu Aminen dar. Ausgehend von verschiedenen Substraten, sind durchaus weitere Enzyme (Transaminasen, Imin Reduktasen) bekannt, die Amine bilden. Allerdings wurde ausgehend von Isothiocyanaten bislang noch keine enzymkatalysierte Aminbildung beschrieben. Isothiocyanate kommen chemisch gebunden in vielen natürlichen Glycosiden vor und werden durch die Myrosinase in Pflanzen freigesetzt und sind daher gut verfügbar.^[114] Eine Anwendung der Promiskuität der LinB könnte sich daher in der organischen Chemie wieder finden. Isothiocyanate könnten in mehrstufigen Synthesen als Schutzgruppen für Amine dienen, um dann unter milden Bedingungen mittels der LinB entschützt zu werden. Weitere organische, meist empfindliche funktionelle Gruppen im Substrat, wie Ester oder Amide bleiben dabei unberührt und die Entschützung findet selektiv statt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Haloalkan Dehalogenasen DhaA aus *Rhodococcus rhodochrous* durch *proteinengineering* auch unter Einfluss von organischen Lösungsmitteln aktiv ist,^[115] wären Untersuchungen dieser HLD bezüglich der Promiskuität nützlich, um die Anwendung auch auf wasserempfindliche Substrate auszuweiten.

5.2 Ausnutzung des katalytischen Potentials der *AacSHC* für weitere intermolekular katalysierte Reaktionen

Intermolekulare Reaktionen sind für die organische Synthesechemie sehr interessant und die hier beschriebenen *AacSHC*-katalysierten Reaktionen könnten durchaus Anwendung in der organischen Synthesechemie finden. Reaktionen, die im Fokus stehen könnten wären zum Beispiel die Friedel-Crafts-Reaktion, die Michael-Addition und 1,2 oder 1,4-Additionen. Für die regio- und stereoselektive Katalyse könnte die *AacSHC*-Mutantenbibliothek als Startpunkt für weitere Untersuchungen in Hinblick auf bimolekulare Reaktionen dienen. Für die Katalyse ist es unter anderem essentiell, dass die in der Reaktion gebildeten Carbokationintermediate gut stabilisiert werden. Hierfür könnten neue Punkt- oder sogar Mehrfachmutanten der *AacSHC* mit geeigneten Aminosäuren, die als π -Elektronen Donoren dienen, entworfen werden. Zusätzlich wäre es durch die spezielle Templat-Struktur der aktiven Tasche möglich, beide Reaktanden gezielt zueinander auszurichten. Weiterhin könnten gezielte Doppel- oder Mehrfachmutanten die Produktselektivität zu Gunsten der bimolekularen Produkte verschieben.

6 Anhang

6.1 GenSequenzen

LinB aus *S. japonicum* UniProt: P51698

ATGAGCCTCGGCGCAAAGCCATTTGGCGAGAAGAAATTCATTGAGATCAAGGGCCGGCGCATGGCCATA
TCGATGAAGGGACCGGCGATCCGATCCTCTTCCAGCACGGCAATCCGACGTCGTCTATCTGTGGCGCAA
TATCATGCCGCATTGCGCCGGGCTGGGACGGCTGATCGCCTGTGACCTGATCGGCATGGGCGATTCCGGAC
AAGCTCGATCCGTCGGGGCCCCGAGCGTTATGCCATGCCGAGCATCGTGACTATCTCGACGCGCTGTGGG
AGGCGCTCGATCTCGGGACAGGGTTGTTCTGGTTCGTGCATGACTGGGGGTCCGTCTCGGCTTCGACTG
GGCCCCGCCACCAGCGAGCGTGTACAGGGGATTGCCATATGGAAAGCGGTCACCATGCCGCTCGAATGG
GCGGATTTTTCCCGAACAGGATCGCGATCTGTTTCAGGCCTTTCGCTCGCAGGCGGGCGAAGAATTGGTGT
TGCAGGACAATGTTTTTGTGCAACAAGTTCTCCCCGATTGATCCTGCGCCCCTTAAGCGAAGCGGAGAT
GGCCGCTATCGCGAGCCCTTCTCGCCGCCGGCGAAGCCCGTCGACCGACCTGTCTTGGCCTCGCCAA
ATCCCGATCGCAGGCACCCCGGCCGACGTGGTTCGCGATCGCCCGGACTATGCCGGCTGGCTCAGCGAAA
GCCCGATTCCGAAACTCTTCATCAACGCCGAGCCGGGACACCTGACCACGGGCCGAATACGCGACTTCTG
CCGCACATGGCCAAACCAGACCGAAAATCACGGTCGCGAGGCGCCCATTTTCATCCAGGAGGACAGTCCGGAC
GAGATTGGCGCGGCGATTGCGGCGTTTGTCCGGCGATTGCGCCCAGCATAA

Squalen-Hopen-Zyklase aus *A. acidocaldarius* UniProt: P33247

ATGGCGGAACAGCTGGTGGAAAGCGCCGGCGTATGCGCGCACCTGGATCGCGCGGTGGAATATCTGCTGAGC
TGCCAGAAAGATGAAGGCTATTGGTGGGGCCCGCTGCTGAGCAACGTGACCATGGAAGCGGAATATGTGCTG
CTGTGCCATATTCTGGATCGCGTGGATCGCGATCGCATGGAAAAATTCGCCGCTATCTGCTGCATGAACAG
CGCGAAGATGGCACCTGGGCGCTGTATCCGGGCGGCCCGCCGATCTGGATACCACCATGAAGCGTATGTG
GCGCTGAAATATATTGGCATGAGCCGCGATGAAGAACCGATGCAGAAAGCGCTGCGCTTTATTCAGAGCCAG
GGCGGCATTGAAAGCAGCCGCGTGTTCACCCGCATGTGGCTGGCGCTGGTGGGCGAATATCCGTGGGAAAAA
GTGCCGATGGTGGCCCGGAAATTATGTTTCTGGGCAAACGCATGCCGCTGAACATTTATGAATTTGGCAGC
TGGGCGCGCGCACCGTGGTGGCGCTGAGCATTGTGATGAGCCGCCAGCCGGTGTTCGCCGTGCCGGAACGC
GCGCGCTGCCGGAACGTATGAAACCGATGTGCCGCCGCGCCGCCGCGGCGGAAAGGCGGCGGcGGCTGG
ATTTTTGATGCGCTGGATCGCGCGCTGCATGGCTATCAGAACTGAGCGTGCATCCGTTTCGCCGCGCGGGCG
GAAATTCGCGCGCTGGATTGGCTGCTGGAACGCCAGGCGGGCGATGGCAGCTGGGGCGGCATTACGCCGCCG
TGTTTTATGCGCTGATTGCGCTGAAAATTCGATATGACCCAGCATCCGGCGTTTATTAAGGCTGGGAA
GGCCTGGAACGTATGGCGTGGAACTGGATTATGGCGGCTGGATGTTTCAGGCGAGCATTAGCCCGGTGTGG
GATACCGGCCTgGCGGTGCTGGCGCTGCGCGCGGCGGGCCTGCCGCGGATCATGATCGCCTGGTGAAGCG
GGCGAATGGCTGCTGGATCGCCAGATTACCGTGCCGGGCGATTGGGCGGTGAAACGCCCGAACCTGAAACCG
GGCGGCTTTGCGTTTTAGTTTTGATAACGTGTATTATCCGGATGTGGATGATACCGCCGTggtGGTgtGGGCG
CTGAACACCCTGCGCCTGCCGGATGAACGCCGCCGCCGCGATGCGATGACCAAAGGCTTTCGCTGGATTGTG
GGCATGCAGAGCAGCAACGGCGGCTGGGGCGGCTATGATGTGGATAACACCAGCGATCTGCCGAACCATATT
CCGTTTTGCGATTTTGGCGAAGTGACCGATCCGCCGAGCGAAGATGTGACCGCGCATGTGCTGGAATGCTTT
GGCAGCTTTGGCTATGATGATGCGTGGAAAGTGATTCGCCGCGCGGTGGAATATCTGAAACCGGAACAGAAA
CCGGATGGCAGCTGGTTTTGGCCGCTGGGGCGTGAACATCTGTATGGCACCGGCGCGGTGGTGGAGCGCGCTG
AAAGCGGTGGGCATTGATACCCGCGAACCGTATATTCAGAAAGCGCTGGATTGGGTGGAACAGCATCAGAAC
CCGGATGGCGGCTGGGGCGAAGATTGCCGAGCTATGAAGATCCGGCGTATGCGGGCAAAGGCGCGAGCACC
CCGAGCCAGACCGCTGGGCGCTGATGGCGCTGATTGCGGGCGGCCGCGCGGAAAGCGAAGCGGCGCGCCGC
GGCGTGCAGTATCTGGTGGAAACCCAGCGCCCGGATGGCGGCTGGGATGAACCGTATTATACCGGCACCGGG
TTCCCGGGCGATTTTTATCTGGGCTATACCATGTATCGCCATGTGTTTCCGACCTGGCGCTGGGCCGCTAT
AAACAGGCGATTGAACGCCGCTAA

6.2 Expression und Aufreinigung

Im Folgenden ist ein exemplarisches SDS-Gel der Expression des LinB Wildtyps angefügt (Abbildung 35).

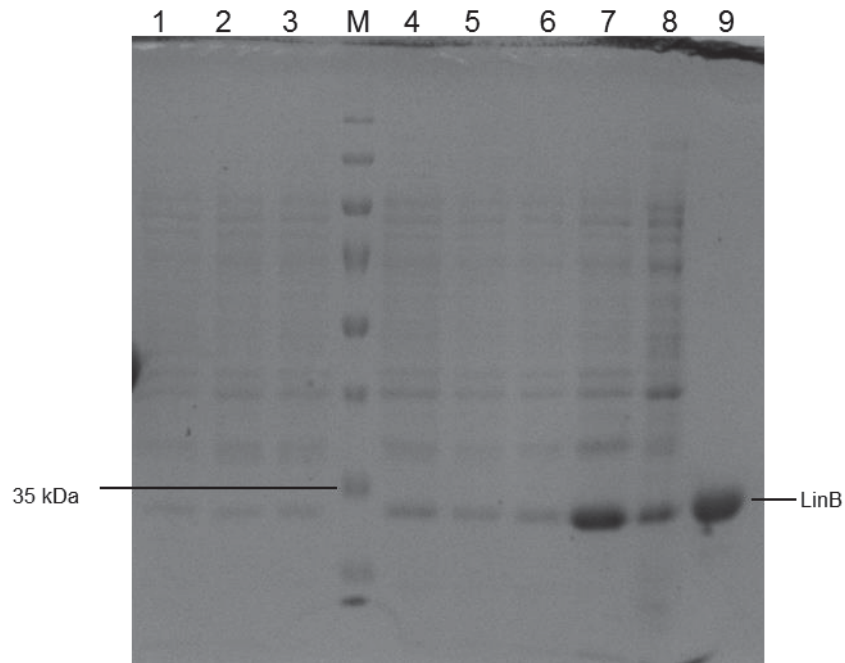


Abbildung 35 Exemplarisches SDS-Gel (15 %) der Expression von LinB Wildtyp zu verschiedenen Zeitpunkten (Spur 1-8 zu $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 19, 24$ h, M = Marker) und der Aufreinigung per Co^{2+} - Affinitätschromatographie (Spur 9). Die Expression der Mutanten erwies sich als äquivalent zum Wildtyp (hier nicht gezeigt).

6.3 GC-Chromatogramme

Die Analyse der Biotransformationen der Umsetzungen der LinB und *AacSHC* erfolgte per GC. Im Folgenden werden exemplarische Chromatogramme aufgeführt.

LinB-katalysierte Reaktionen:

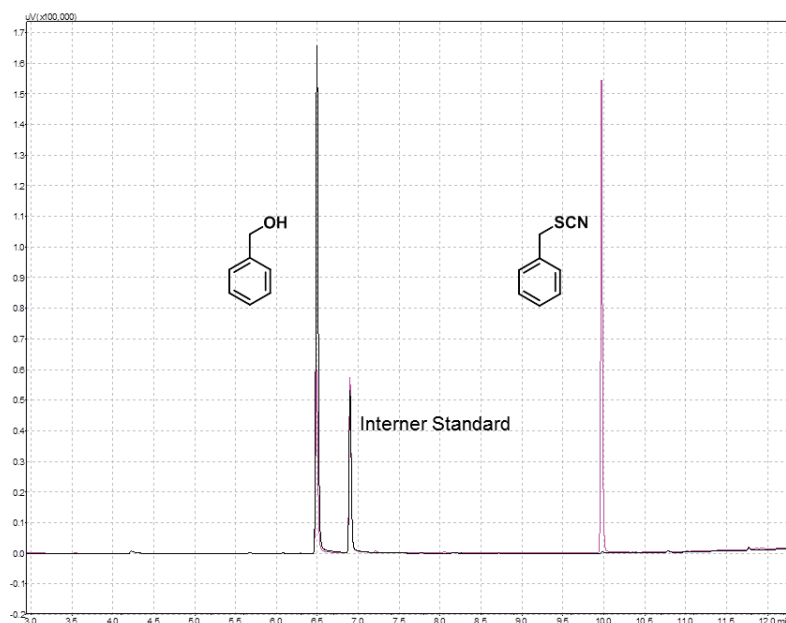


Abbildung 36 Exemplarisches GC-Chromatogramm der GC-FID-Analyse der LinB katalysierten Hydrolyse von Benzylthiocyanat **20**. Schwarz: Biotransformation von **20** mit LinB Wildtyp. Pink: Biotransformation von **20** mit L177W.

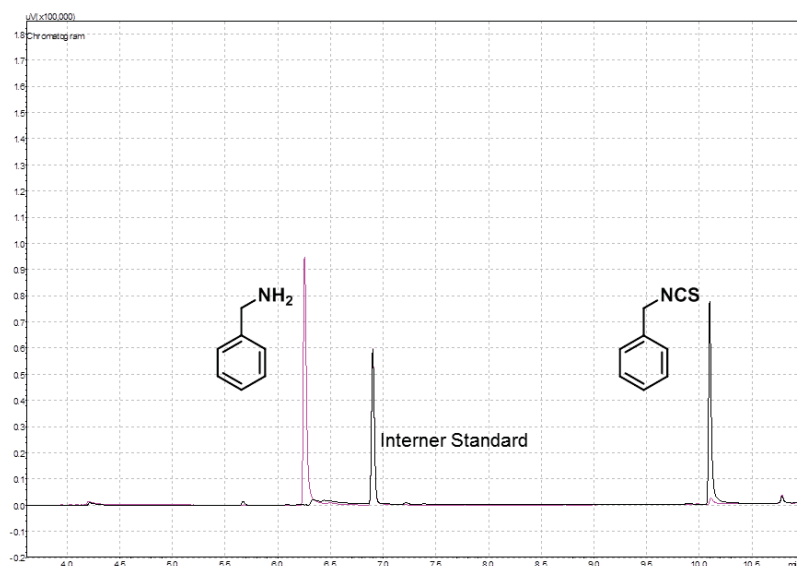


Abbildung 37 Exemplarisches GC-Chromatogramm der GC-FID-Analyse der LinB katalysierten Hydrolyse von Benzylisothiocyanat **22**. Schwarz: Biotransformation von **22** mit LinB Wildtyp. Pink: Biotransformation von **22** mit L177W.

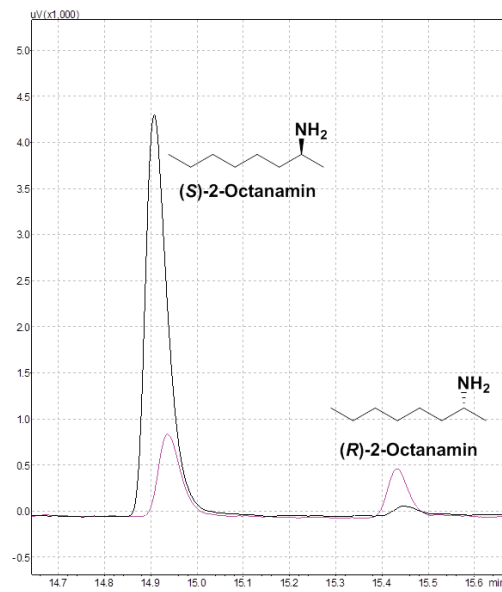


Abbildung 38 Exemplarisches GC-Chromatogramm der GC-FID-Analyse der LinB katalysierten Hydrolyse von *rac*-2-Isothiocyanato-octan **rac-31**. Schwarz: Biotransformation von **rac-31** mit LinB Wildtyp. Pink: Biotransformation von **rac-31** mit L177W.

AacSHC-katalysierte Reaktionen

Abundance

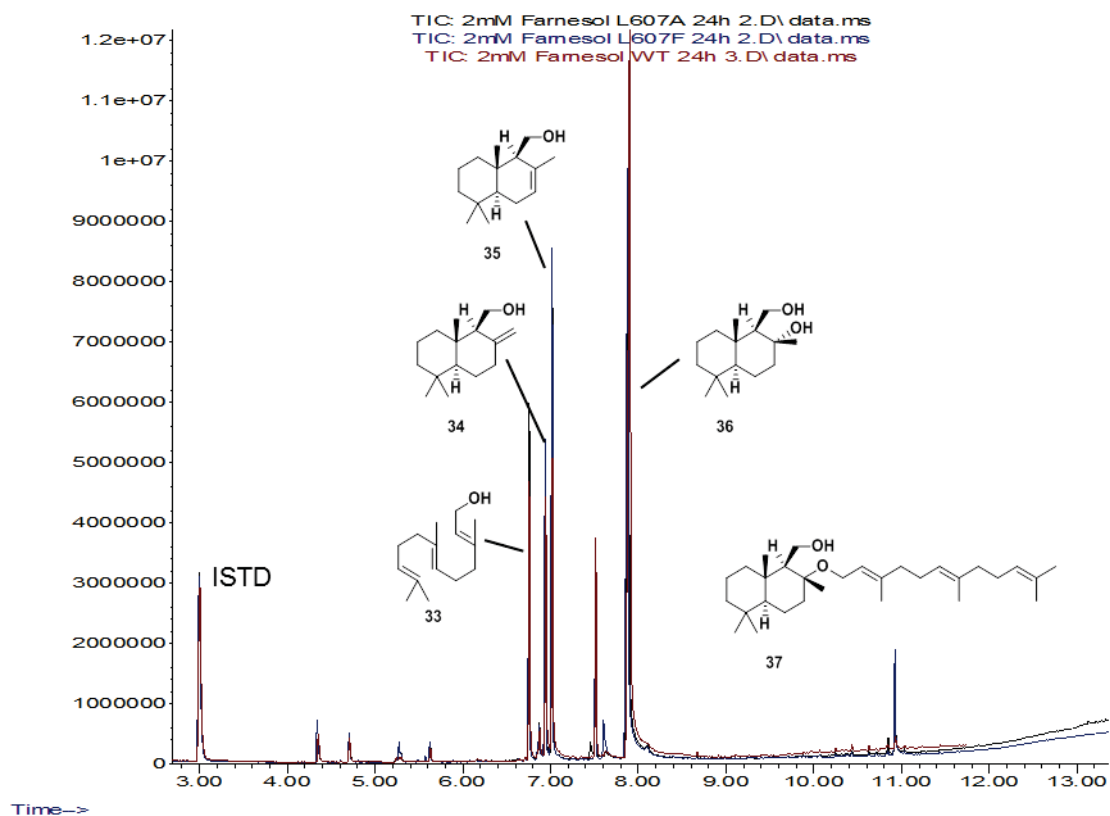


Abbildung 39 Exemplarisches GC-Chromatogramm der GC-FID/MS-Analyse der AacSHC-katalysierten Zyklisierung von Farnesol **33**. Schwarz: Biotransformation von **33** mit L607A Blau: Biotransformation von **33** mit L607F Rot: Biotransformation von **33** mit dem Wildtyp.

Abundance

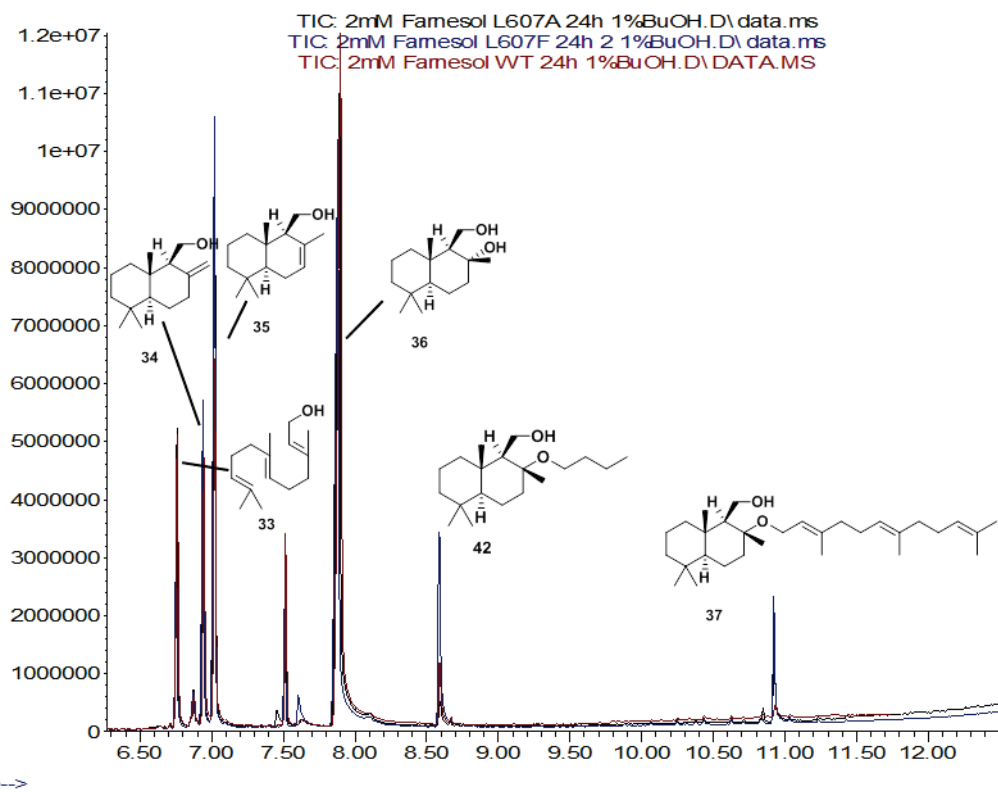


Abbildung 40 Exemplarisches GC-Chromatogramm der GC-FID/MS-Analyse der AacSHC-katalysierten Zyklisierung von Farnesol **33** mit 1 % (v/v) Butanol. Schwarz: Biotransformation von **33** mit L607A
Blau: Biotransformation von Biotransformation von **33** mit L607F Rot: Biotransformation von **33** mit dem Wildtyp.

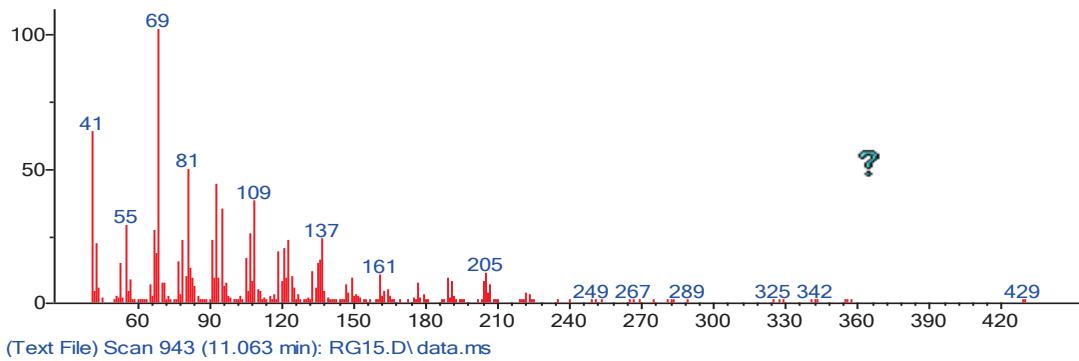


Abbildung 41 MS-Fragmentierungsmuster des bimolekularen Produkt 37.

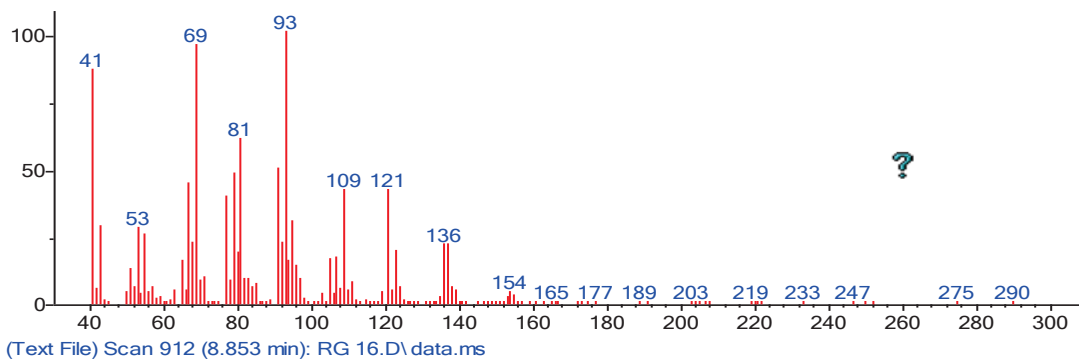


Abbildung 42 MS-Fragmentierungsmuster des bimolekularen Produkt 39.

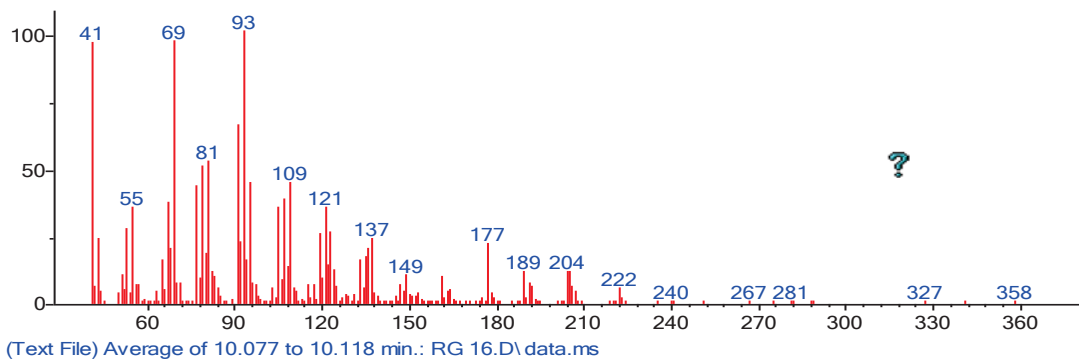


Abbildung 43 MS-Fragmentierungsmuster des bimolekularen Produkt 40.

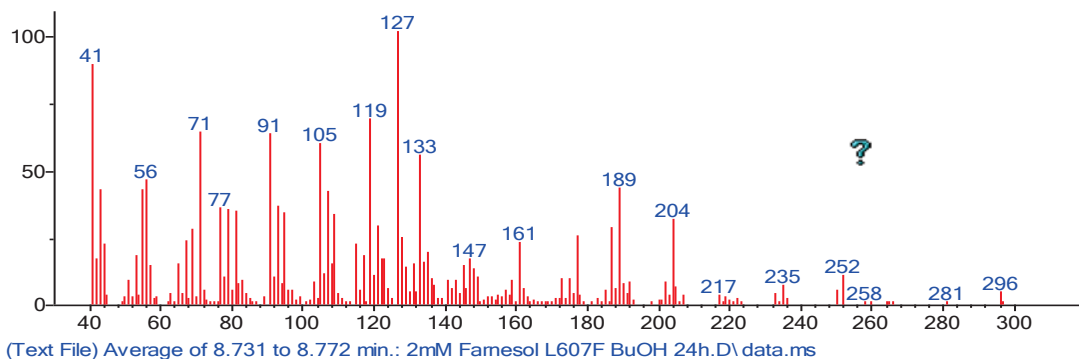


Abbildung 44 MS-Fragmentierungsmuster des bimolekularen Produkt 42.

7 Literaturverzeichnis

- [1] R. A. Jensen, *Annu. Rev. Microbiol.* **1976**, *30*, 409–425.
- [2] P. J. O'Brien, D. Herschlag, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R91-R105.
- [3] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag et al., *Protein Eng Des Sel* **1992**, *5*, 197–211.
- [4] U. G. Wagner, M. Hasslacher, H. Griengl, H. Schwab, C. Kratky, *Structure* **1996**, *4*, 811–822.
- [5] P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30591–30594.
- [6] J. L. Seffernick, L. P. Wackett, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12747–12753.
- [7] S. Noor, M. C. Taylor, R. J. Russell, L. S. Jermiin, C. J. Jackson, J. G. Oakeshott, C. Scott, *PLoS ONE* **2012**, *7*.
- [8] J. Minshull, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 775–780.
- [9] P. Broun, J. Shanklin, E. Whittle, C. Somerville, *Science (New York, N.Y.)* **1998**, *282*, 1315–1317.
- [10] J. A. Broadwater, E. Whittle, J. Shanklin, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15613–15620.
- [11] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 3351–3367.
- [12] Z. J. Wang, H. Renata, N. E. Peck, C. C. Farwell, P. S. Coelho, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 6810–6813.
- [13] 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-U33.
- [14] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science (New York, N.Y.)* **2013**, *339*, 307–310.
- [15] C. C. Farwell, J. A. McIntosh, T. K. Hyster, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8766–8771.
- [16] J. A. McIntosh, P. S. Coelho, C. C. Farwell, Z. J. Wang, J. C. Lewis, T. R. Brown, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 9309–9312.

- [17] G. Hasnaoui-Dijoux, M. Majerić Elenkov, J. H. Lutje Spelberg, B. Hauer, D. B. Janssen, *ChemBiochem* **2008**, *9*, 1048–1051.
- [18] R. J. Fox, S. C. Davis, E. C. Mundorff, L. M. Newman, V. Gavrilovic, S. K. Ma, L. M. Chung, C. Ching, S. Tam, S. Muley et al., *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 338–344.
- [19] S. C. Hammer, A. Marjanovic, J. M. Dominicus, B. M. Nestl, B. Hauer, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 121–126.
- [20] W. J. Moore, W. Paterno, *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, Walter de Gruyter, Berlin, **1990**.
- [21] S. J. Connon, *Chemistry* **2006**, *12*, 5418–5427.
- [22] M. S. Taylor, E. N. Jacobsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 1520–1543.
- [23] N. T. McDougal, S. E. Schaus, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12094–12095.
- [24] T. Akiyama, J. Itoh, K. Yokota, K. Fuchibe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 1566–1568.
- [25] T. Hashimoto, K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10054–10055.
- [26] D. Nakashima, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9626–9627.
- [27] G. L. Holliday, D. E. Almonacid, J. B. O. Mitchell, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 1261–1277.
- [28] K. B. Schowen, H. H. Limbach, G. S. Denisov, R. L. Schowen, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1458*, 43–62.
- [29] H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, J. D. Rawn, C. Biele, *Biochemie*, 4., aktualisierte Aufl. ed., Pearson Studium, München, **2008**.
- [30] T. Dissanayake, J. M. Swails, M. E. Harris, A. E. Roitberg, D. M. York, *Biochemistry* **2015**, *54*, 1307–1313.
- [31] V. Y. Torbeev, H. Raghuraman, D. Hamelberg, M. Tonelli, W. M. Westler, E. Perozo, S. B. H. Kent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 20982–20987.
- [32] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis. Regio- and stereoselective biotransformations*, 2nd ed. ed., John Wiley, Weinheim, Chichester, **2006**.
- [33] M. Nagar, S. L. Bearne, *Biochemistry* **2015**, *54*, 6743–6752.

- [34] S. C. Hammer, P.-O. Syrén, M. Seitz, B. M. Nestl, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 293–300.
- [35] J. Kmuníček, K. Hynková, T. Jedlicka, Y. Nagata, A. Negri, F. Gago, R. C. Wade, J. Damborský, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3390–3401.
- [36] D. B. Janssen, J. P. Schanstra, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1994**, *5*, 253–259.
- [37] J. Damborský, E. Rorije, A. Jesenská, Y. Nagata, G. Klopman, W. J. Peijnenburg, *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*, 2681–2689.
- [38] G. Stucki, M. Thueer, *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2339–2345.
- [39] E. Chovancová, J. Kosinski, J. M. Bujnicki, J. Damborský, *Proteins* **2007**, *67*, 305–316.
- [40] M. Hesseler, X. Bogdanović, A. Hidalgo, J. Berenguer, G. J. Palm, W. Hinrichs, U. T. Bornscheuer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1049–1060.
- [41] H. K. H. Fung, M. S. Gadd, T. A. Drury, S. Cheung, J. M. Guss, N. V. Coleman, J. M. Matthews, *Mol. Microbiol.* **2015**, *97*, 439–453.
- [42] T. Mase, H. Yabuki, M. Okai, J. Ohtsuka, F. L. Imai, Y. Nagata, M. Tanokura, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2012**, *68*, 652–654.
- [43] Y. Sato, M. Monincová, R. Chaloupková, Z. Prokop, Y. Ohtsubo, K. Minamisawa, M. Tsuda, J. Damborsky, Y. Nagata, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4372–4379.
- [44] J. J. Gehret, L. Gu, T. W. Geders, W. C. Brown, L. Gerwick, W. H. Gerwick, D. H. Sherman, J. L. Smith, *Protein Sci.* **2012**, *21*, 239–248.
- [45] S. Keuning, D. B. Janssen, B. Witholt, *J. Bacteriol.* **1985**, *163*, 635–639.
- [46] K. H. Verschueren, F. Seljée, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *Nature* **1993**, *363*, 693–698.
- [47] S. M. Franken, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, B. W. Dijkstra, *EMBO J.* **1991**, *10*, 1297–1302.
- [48] J. Marek, J. Vévodová, I. K. Smatanová, Y. Nagata, L. A. Svensson, J. Newman, M. Takagi, J. Damborský, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14082–14086.
- [49] P. A. Mazumdar, J. C. Hulecki, M. M. Cherney, C. R. Garen, M. N. G. James, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 351–362.

- [50] J. Newman, T. S. Peat, R. Richard, L. Kan, P. E. Swanson, J. A. Affholter, I. H. Holmes, J. F. Schindler, C. J. Unkefer, T. C. Terwilliger, *Biochemistry* **1999**, *38*, 16105–16114.
- [51] Z. Prokop, Y. Sato, J. Brezovsky, T. Mozga, R. Chaloupkova, T. Koudelakova, P. Jerabek, V. Stepankova, R. Natsume, van Leeuwen, Jan G E et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6111–6115.
- [52] R. Chaloupkova, T. Prudnikova, P. Rezacova, Z. Prokop, T. Koudelakova, L. Daniel, J. Brezovsky, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Sato, M. Kutý et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70*, 1884–1897.
- [53] Y. Nagata, K. Miyauchi, J. Damborsky, K. Manova, A. Ansorgova, M. Takagi, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3707–3710.
- [54] Y. Nagata, K. Hynková, J. Damborský, M. Takagi, *Protein Expr. Purif.* **1999**, *17*, 299–304.
- [55] Z. Prokop, F. Oplustil, J. DeFrank, J. Damborský, *Biotechnol J* **2006**, *1*, 1370–1380.
- [56] W. Szymański, A. Westerbeek, D. B. Janssen, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 10712–10715.
- [57] R. B. Russell, M. J. Sternberg, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 333–338.
- [58] M. Otyepka, J. Damborský, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1206–1217.
- [59] E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek et al., *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002708.
- [60] M. Petrek, M. Otyepka, P. Banas, P. Kosinova, J. Koca, J. Damborsky, *BMC Bioinform.* **2006**, *7*.
- [61] R. Chaloupková, J. Sýkorová, Z. Prokop, A. Jesenská, M. Monincová, M. Pavlová, M. Tsuda, Y. Nagata, J. Damborský, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52622–52628.
- [62] D. B. Janssen, *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8*, 150–159.
- [63] J. Damborský, J. Koca, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 989–998.
- [64] M. Bohác, Y. Nagata, Z. Prokop, M. Prokop, M. Monincová, M. Tsuda, J. Koca, J. Damborský, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14272–14280.

- [65] F. Pries, J. Kingma, M. Pentenga, G. van Pouderoyen, C. M. Jeronimus-Stratingh, A. P. Bruins, D. B. Janssen, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1242–1247.
- [66] K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, *277*, 1811–1815.
- [67] A. Eschenmoser, L. Ruzicka, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1890–1904.
- [68] B. A. Hess, L. Smentek, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1717–1720.
- [69] L. Smentek, Hess, B. Andes, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17111–17117.
- [70] T. Sato, M. Kouda, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 728–738.
- [71] T. Hoshino, S.-I. Nakano, T. Kondo, T. Sato, A. Miyoshi, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1456–1470.
- [72] K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175–187.
- [73] T. Sato, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 2189–2198.
- [74] C. Feil, R. Süssmuth, G. Jung, K. Poralla, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *242*, 51–55.
- [75] D. J. Reinert, G. Balliano, G. E. Schulz, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 121–126.
- [76] D. A. Dougherty, *Science* **1996**, *271*, 163–168.
- [77] K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 2812.
- [78] K. U. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 3966–3971.
- [79] T. Hoshino, T. Sato, *Chem. Commun. (Camb.)* **2002**, 291–301.
- [80] N. Morikubo, Y. Fukuda, K. Ohtake, N. Shinya, D. Kiga, K. Sakamoto, M. Asanuma, H. Hirota, S. Yokoyama, T. Hoshino, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13184–13194.
- [81] D. A. Dougherty, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 885–893.
- [82] Q. Zhang, K. Tiefenbacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16213–16219.
- [83] Q. Zhang, K. Tiefenbacher, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 197–202.
- [84] I. Abe, H. Tanaka, H. Noguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14514–14515.

- [85] T. Hoshino, Y. Kumai, I. Kudo, S.-I. Nakano, S. Ohashi, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2650–2657.
- [86] T. Abe, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3127–3139.
- [87] T. Hoshino, Y. Yonemura, T. Abe, Y. Sugino, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 792–801.
- [88] V. Merlini, M. Luparia, A. Porta, G. Zanoni, G. Vidari, *Nat Prod Commun* **2011**, *6*, 465–476.
- [89] E. J. Lenardao, G. V. Botteselle, F. de Azambuja, G. Perin, R. G. Jacob, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6671–6712.
- [90] S. C. Hammer, Dissertation, Universität Stuttgart.
- [91] E. Krieger, YASARA.
- [92] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC.
- [93] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [94] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [95] J. Kmuníček, K. Hynková, T. Jedlicka, Y. Nagata, A. Negri, F. Gago, R. C. Wade, J. Damborský, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3390–3401.
- [96] Y. Nagata, Z. Prokop, S. Marvanová, J. Sýkorová, M. Monincová, M. Tsuda, J. Damborský, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 2349–2355.
- [97] O. Khersonsky, D. S. Tawfik in *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 79 (Eds.: S. Mohr, C. Bakal, N. Perrimon), **2010**.
- [98] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6032–6040.
- [99] O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr Opin Chem Biol* **2006**, *10*, 498–508.
- [100] I. Nobeli, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157–167.
- [101] M. F. Mohamed, F. Hollfelder, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 417–424.

- [102] M. Giuseppe, M. Luigia, P. Elena, F. Yan, M. Luigi, *Protein Pept. Lett.* **2012**, *19*, 144–154.
- [103] Y. Nagata, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**.
- [104] F. Neufingerl, *Allgemeine und anorganische Chemie*, Bildungsverl. Eins, Troisdorf, **2006**, ; 1.
- [105] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [106] Z. Prokop, M. Monincová, R. Chaloupková, M. Klvana, Y. Nagata, D. B. Janssen, J. Damborský, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45094–45100.
- [107] L. Biedermannová, Z. Prokop, A. Gora, E. Chovancová, M. Kovács, J. Damborsky, R. C. Wade, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 29062–29074.
- [108] S. Bräse, J. Bülle, A. Hüttermann, *Organische und bioorganische Chemie. Das Basiswissen für Master- und Diplomprüfungen*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [109] A. Westerbeek, W. Szymański, H. J. Wijma, S. J. Marrink, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 931–944.
- [110] S. Neumann, H. Simon, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1986**, *367*, 723–729.
- [111] S.-I. Nakano, S. Ohashi, T. Hoshino, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2012–2022.
- [112] E. V. Anslyn, D. A. Dougherty, *Modern physical organic chemistry*, Univ. Science Books, **2006**.
- [113] T. Sato, S. Sasahara, T. Yamakami, T. Hoshino, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1660–1670.
- [114] M. G. Botti, M. G. Taylor, N. P. Botting, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20530–20535.
- [115] T. Koudelakova, R. Chaloupkova, J. Brezovsky, Z. Prokop, E. Sebestova, M. Hesseler, M. Khabiri, M. Plevaka, D. Kulik, I. K. Smatanova et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 1959–1963.