

Naphthalen Dioxygenase aus
Pseudomonas sp. NCIB 9816-4:
Systematische Analyse der aktiven Tasche

Naphthalene Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4:
Systematic Analysis of the Active Site

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

Vorgelegt von

Julia M. Halder

aus Laupheim

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser
Vorsitzender:	Prof. Dr. Ralf Takors
Tag der mündlichen Prüfung:	26.10.2017

**Institut für Biochemie und Technische Biochemie
der Universität Stuttgart**

2017

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich diese wissenschaftliche Arbeit mit dem Titel „Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4: Systematische Analyse der aktiven Tasche“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche einzeln kenntlich gemacht worden.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled “Naphthalene Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4: Systematic Analysis of the Active Site” is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, den 07.07.2017

Julia M. Halder

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer in der Zeit von Juni 2014 bis Mai 2017 am Institut für Biochemie und Technische Biochemie an der Universität Stuttgart.

Die Arbeit wurde durch das Siebte Rahmenprogramm für Forschung und technologische Entwicklung (RP7) der Europäischen Union im Rahmen des EU-Projektes BIOOX mit *grant agreement* Nummer 613849 finanziert.

Publikationsliste

Halder, J. M., Nestl, B. M. and Hauer, B. "Semirational Engineering of Naphthalene Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 towards Selective Asymmetric Dihydroxylation" DOI: 10.1002/cctc.201701262.

Danksagung

Für die Vergabe dieses spannenden Themas, die freundliche Aufnahme am Institut, die vielen konstruktiven Gespräche im Laufe der letzten Jahre und die Möglichkeit an internationalen Projekttreffen und Konferenzen teilzunehmen, möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. **Bernhard Hauer** herzlich bedanken.

Prof. Dr. **Karl-Heinrich Engesser** danke ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Zweitkorrektur und Prof. Dr. **Ralf Takors** für die freundliche Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. **Bettina M. (!) Nestl** für ihre hervorragende Betreuung, fachkundige Unterstützung und die vielen konstruktiven Diskussionen. Auch Herrn Dr. **Bernd Nebel** möchte ich an dieser Stelle danken, da er mit seinem nahezu unerschöpflichen Know-How im Bereich der Analytik und mit der tatkräftigen sowie selbstlosen Instandhaltung sämtlicher Analyse-Instrumente eine zentrale Stütze für das Institut darstellt. An beide Gruppenleiter geht ein ganz herzliches Danke für die letzten drei Jahre und „Bleibt so wie ihr seid! Ihr seid einfach klasse☺“.

Ganz herzlich möchte ich mich auch beim Biokatalyse-Labor 1 bedanken, ohnehin dem besten Labor am ITB. Hier sind ganz besonders **Maiko Lenz** und **Sara Hoffmann** zu erwähnen, welche nicht selten zu einem vergnüglichen und doch produktiven Arbeitsalltag beigetragen haben. Auch an **Nico Kress** geht ein ganz herzliches Danke, der so manche, lösungsmittelreiche Extraktionsepisode durch begleitende, amüsante Gespräche nicht zur Qual werden hat lassen.

Neben der Finanzierung hat das EU-Projekt BIOOX auch ein tolles Oxidationsteam geschaffen, wobei neben Sara Hoffmann auch **Jan Klenk** ein toller Projektpartner war, mit welchem man sich durch sämtliche *Deliverables* und *Periodic reports* kämpfen konnte.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Technische Biochemie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft. Dabei bedanke ich mich vor allem bei Herrn M. Sc. **Sven Richter** für die Unterstützung im Bereich der Fermentation.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Studenten bedanken, ohne die ich sicherlich noch weniger graue Haare hätte. Da wären die Synthesestudenten **Vassiliki Damakoudi** und **Maximilian Räuchle**, beides exzellente Chemiker, und **Laura Bendz**, sowie mein kompetenter, immer im Bart-streichelnder Bachelorstudent **Andreas Dannenberg** und meine beiden Masterstudenten **Lisa Schweizer**, die sehr kompetente und sympathische Biologin, und **Julian Ortner**, der Mann für die Loops.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann **Sebastian**, meinem Ein und Alles und meinen **Freunden**, auf die ich mich immer verlassen kann. Seit ich mich erinnern kann, sind meine **Eltern** stets für mich da gewesen, deshalb ein ganz großes DANKE auch an sie an dieser Stelle.

*Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt,
sondern durch Arbeit und eigene Leistung.*

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	POTENTIAL VON VICINALEN CIS-DIOLEN	2
1.1.1	<i>Chemische Synthese von vicinalen cis-Diolen</i>	5
1.1.2	<i>Biologische Synthese von vicinalen cis-Diolen</i>	11
1.2	RIESKE NICHT-HÄM DIOXYGENASEN	15
1.2.1	<i>Ursprung und Aufgabe in der Natur</i>	16
1.2.2	<i>Aufbau und Klassifizierung der Multikomponentensysteme</i>	18
1.2.3	<i>Mechanismus der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen</i>	21
1.2.4	<i>Protein engineering der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen</i>	23
1.3	MOTIVATION	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	VERWENDETE GERÄTE, CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHS-MATERIALEN	27
2.2	VERWENDETE ENZYME, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	27
2.3	VERWENDETE MIKROORGANISMEN	37
2.4	VERWENDETE MEDIEN	37
2.4.1	<i>Medien zur Anzucht von Escherichia coli</i>	38
2.4.2	<i>Allgemeine Puffer und Lösungen</i>	39
2.5	MIKROBIOLOGISCHE ARBEITEN	40
2.5.1	<i>Stammhaltung</i>	40
2.5.2	<i>Bestimmung der Zelldichte</i>	41
2.5.3	<i>Kultivierung von Escherichia coli im Schüttelkolben</i>	41
2.5.4	<i>Kultivierung von Escherichia coli im Fermenter</i>	42
2.5.5	<i>Reinigung von His-getaggtten Proteinen über Affinitätschromatographie</i>	42
2.5.6	<i>Ganzzell-Biotransformationen mit ruhenden Zellen</i>	45
2.5.7	<i>Biotransformationen mit aufgereinigten Enzymkomponenten</i>	45
2.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	46
2.6.1	<i>Plasmid-Isolierung von Escherichia coli</i>	46
2.6.2	<i>Ortsgerichtete Mutagenese</i>	46
2.6.3	<i>Klonierung via gibson assembly</i>	48
2.6.4	<i>Transformation von Escherichia coli durch Hitzeschock</i>	50
2.6.5	<i>Elektrophoretische Trennung und Geextraktion von DNA-Fragmenten</i>	51
2.7	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	52
2.7.1	<i>Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure</i>	52
2.7.2	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	52
2.7.3	<i>Proteinanalyse mittels Western Blot und Immundetektion</i>	54
2.8	ANALYTISCHE METHODEN	56
2.8.1	<i>Aktivitätsbasierter Agarplattendiffusionstest</i>	56

2.8.2	<i>Gaschromatographie</i>	57
2.8.3	<i>Acetylierung von Analytmolekülen</i>	58
2.8.4	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>	59
2.8.5	<i>Kernspinresonanzspektroskopie</i>	60
2.9	BIOINFORMATISCHE METHODEN	60
2.10	SYNTHESE VON REFERENZMOLEKÜLEN	61
2.10.1	<i>Metallkatalysierte asymmetrische Dihydroxylierung</i>	61
2.10.2	<i>Reduktion von α-Hydroxysäuren mit Lithiumaluminiumhydrid</i>	64
2.10.3	<i>Simmons-Smith-Oxidation</i>	65
2.10.4	<i>Dioxygenase-katalysierte asymmetrische Dihydroxylierung</i>	65
3	ERGEBNISSE	70
3.1	NAPHTHALEN DIOXYGENASE IM <i>IN VITRO</i> SYSTEM	71
3.1.1	<i>Expression und Aufreinigung über Affinitätschromatographie</i>	71
3.1.2	<i>Optimierung des in vitro Systems</i>	73
3.1.3	<i>Semi-rationales Proteindesign: Alanin-Scan und Konsensus-Varianten</i>	76
3.1.4	<i>Biotransformation im in vitro System</i>	78
3.2	NAPHTHALEN DIOXYGENASE IM <i>IN VIVO</i> SYSTEM.....	82
3.2.1	<i>Kultivierung im Schüttelkolben und Immunodetektion</i>	84
3.2.2	<i>Aufarbeitung von Biotransformationen</i>	88
3.2.3	<i>Kultivierung im Fermenter und statistische Versuchsplanung (DoE)</i>	89
3.2.4	<i>Evolvierbarkeit und semi-rationales Design der Naphthalen Dioxygenase</i>	91
3.2.5	<i>Phenylring mit Erweiterung der Substituenten-Seitenkette</i>	94
3.2.6	<i>Phenylring mit verzweigter Substituenten-Seitenkette</i>	100
3.2.7	<i>Phenylring mit ungesättigter Seitenkette</i>	101
3.2.8	<i>Phenylring mit ungesättigter Seitenkette und p-Methoxy-Gruppe</i>	108
3.2.9	<i>Monoterpen R-Limonen</i>	111
4	DISKUSSION	113
4.1	<i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNG DES MULTIKOMPONENTENKOMPLEXES NAPHTHALEN DIOXYGENASE	113
4.2	NAPHTHALEN DIOXYGENASE IM <i>IN VIVO</i> SYSTEM.....	118
4.3	BEWERTUNG DER OSMIUM-KATALYSIERTEN SHARPLESS DIHYDROXYLIERUNG <i>VERSUS</i> DER DIHYDROXYLIERUNG MITTELS RIESKE NICHT-HÄM DIOXYGENASEN.....	131
5	RESÜMEE UND AUSBLICK	134
6	ANHANG	137
6.1	GENSEQUENZ DER BEARBEITETEN ENZYME	137
6.2	PLASMIDE	137
6.3	KALIBRIERGERADEN	139
6.4	HPLC- UND GC-CHROMATOGRAMME.....	143

6.4.1	<i>Chirale NP-HPLC-Analytik</i>	143
6.4.2	<i>Chirale und achirale GC-FID/MS-Analytik</i>	144
6.5	NACHWEISE VIA SDS-PAGE UND WESTERN BLOT.....	146
6.6	UMSETZUNG VON NAPHTHALEN UND METHYLSTYROL MIT NAPHTHALEN DIOXYGENASE WILDTYP.....	146
6.7	ERWEITERUNG DER <i>IN VIVO</i> BIBLIOTHEK DER NAPHTHALEN DIOXYGENASE.....	147
7	LITERATURVERZEICHNIS	149

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius	min	Minute
Å	Ångström	OD	Optische Dichte
AD	Asymmetrische Dihydroxylierung	Os	Osmium
ADH	Alkoholdehydrogenase	<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
BAL	Benzaldehyd Lyase		
BDO	Benzol Dioxygenase	PCR	Polymerasekettenreaktion
BFM	Biofeuchtmasse	PDB	engl. <i>protein data bank</i>
bp	Basenpaar	PHAL	Pthalazin
BPDO	Biphenyl Dioxygenase	ppm	engl. <i>part per million</i>
CDO	Cumol Dioxygenase	PYR	Pyrimidin
DAD	Diodenarray-Detektor	RO	Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen
DCM	Dichlormethan	s	Sekunde
de	Diastereomerenüberschuss	SDS-	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
DHQ	Dihydroquinin	PAGE	<i>polyacrylamide gel</i>
DHQD	Dihydroquinidin	TB	engl. <i>terrific broth</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	TDO	Toluol Dioxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	UV	Ultraviolett
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	v/v	Volumen/Volumen
ee	Enantiomerenüberschuss	vvm	engl. <i>volume per volume per minute</i>
EH	Epoxidhydrolase		
EI	Elektronenionisierung	wt	Wildtyp
eV	Elektronenvolt		
g	Gramm		
GC	Gaschromatographie		
FID	Flammenionisationsdetektor		
MS	Massenspektrometrie		
h	Stunde		
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie		
IND	Indolin		
IPTG	Isopropyl β-D-1- thiogalactopyranosid		
ISTD	Interner Standard		
LB	Luria-Bertani		
μ	mikro		
m	milli		
M	molar		
nm	Nanometer		
NAD(P)H	Nicotinamidadenin- dinukleotid(Phosphat)		
NaOH	Natriumhydroxid		
NDO	Naphthalen Dioxygenase		
NMO	N-Methylmorpholinoxid		
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>		
n. d.	nicht bestimmt/detektiert		

Zusammenfassung

Die gezielte Oxyfunktionalisierung von Olefinen gehört zu den am meist gesuchten Reaktionen in der Chemie. Insbesondere die Dihydroxylierung und die daraus resultierenden chiralen, vicinalen 1,2-Diole spielen hierbei eine wichtige Rolle. So werden 1,2-Diole sowohl als chirale Liganden und Auxiliare und als chirale Synthons für Pharmabausteine sowie Agrochemikalien eingesetzt.

Eine schnelle und effiziente Möglichkeit für die stereoselektive, asymmetrische Sharpless Dihydroxylierung (AD) von C=C-Doppelbindungen ergibt sich aus der Metall-katalysierten Oxyfunktionalisierung mittels Osmium oder anderen Übergangsmetallen. Neben der guten Ausbeute und der hohen Selektivität, stellen jedoch vor allem die Toxizität der Katalysatoren, sowie auch die Überoxidation und Spaltung der generierten *cis*-Diole Herausforderungen in der Anwendung dar.

Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs) sind eine biologische Alternative zur rein chemischen, asymmetrischen Dihydroxylierung. In der Natur sind diese Multikomponentensysteme, bestehend aus einer hexameren Oxygenase, einem Elektronen-Shuttlemolekül und einer Reduktase, für die Dihydroxylierung von aromatischen Motiven verantwortlich und katalysieren den ersten Schritt im Katabolismus von Aromaten. Mit der Entdeckung dieser effizienten Biokatalysatoren wurde eine umweltfreundliche Alternative zur chemisch katalysierten Sharpless AD entdeckt. Aufgrund der Verfügbarkeit von Kristallstrukturen wurde die Naphthalen Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 als ein Vertreter der ROs für das semi-rationale Design ausgewählt und Varianten im aktiven Zentrum des Enzyms generiert. Neben der direkten Katalyse am aromatischen Ring, wurde durch Variation der Substituenten auch die allylische Mono- bzw. die *cis*-Dihydroxylierung von Alkenylresten in aromatischen Molekülen (z. B. α -Methylstyrol, Allylbenzol) und die Katalyse von C=C-Doppelbindungen in nicht-aromatischen, nicht-planaren Molekülen (z. B. *R*-Limonen) gezeigt. Aufgrund der Vielfältigkeit dieser Enzyme besteht ein gesteigertes Interesse am biotechnologischen Einsatz, um das enorme Potential und die Vielfältigkeit des biokatalytischen Repertoires dieser Katalysatoren ausschöpfen zu können.

Des Weiteren erfolgte die nähere Betrachtung der heterologen Herstellung des Biokatalystors in *Escherichia coli*, wobei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Systeme

betrachtet wurden. Hierbei stand im Fall der *in vitro* Untersuchungen das Zusammenspiel der unterschiedlichen Komponenten des Systems, das Reaktionssetup und der Einfluss des Cosolvents im Mittelpunkt. Für das optimierte *in vitro* System wurden schließlich folgende Parameter definiert: (I) Verhältnis der Komponenten mit 1 μM Oxygenase, 20 μM Ferredoxin und 5 μM Reduktase, (II) das Reaktionssetup mit 2 mM Substrat in Ethanol bei 30 °C für 2 h, und (III) der Anteil des Cosolvents Ethanol mit 5 % (v/v). Ein Alanin-Scan der zwölf *first shell* Aminosäuren lieferte im *in vitro* System bereits erste Indizien für relevante Mutagenese-Hotspots mit den Positionen A206, H295, L307, G204 und V260. Im Gegensatz zum *in vivo* System wurde im *in vitro* System eine deutlich erniedrigte Aktivität gegenüber den untersuchten substituierten Aromaten detektiert, weshalb auf eine mangelnde Stabilität der Komponenten im *in vitro* System geschlossen wurde.

Im *in vivo* System wurde zunächst die Optimierung der Expression forciert, wobei das entwickelte Expressions- und Biotransformationsprotokoll zu einer guten Reproduzierbarkeit in Ganzzellansätzen mit Standardabweichungen von unter 5 % geführt hat. Hierzu wurden frisch transformierte Zellen zur Anzucht (37 °C) in TB-Medium verwendet und bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,6-0,8 mit 0,1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid induziert. Nach 20-stündiger Expression bei 25 °C wurden eine Zellsuspension mit 0,1 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) und 20 mM Glucose (0,2 $\text{g}_{\text{BFM}}/\text{mL}$) für Ganzzellumsätze hergestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des in Ethanol gelösten Substrates gestartet und nach 20 h bei 30 °C mit der Zugabe von Lösungsmittel gestoppt.

Für die *in vivo* Untersuchung wurde ein semi-rationaler Mutageneseansatz gewählt, indem alle *first shell* Aminosäuren mit Alanin, Valin und Isoleucin (36 Varianten) ausgetauscht, sowie 25 Doppelvarianten an den Positionen A206, H295 und V260 generiert wurden. Mit dieser Bibliothek erfolgte die Identifizierung von wichtigen Struktur-Funktionsbeziehungen anhand von unterschiedlich substituierten Styrolderivaten und dem Monoterpen *R*-Limonen. Mit dem Einbringen einer Punktmutation in der aktiven Tasche konnten deutliche Veränderungen in der Reaktions- und Substratspezifität sowie in der Regio- und Stereoselektivität ($\geq 90\%$) beobachtet werden, wobei die Restaktivität gegenüber dem natürlichen Substrat Naphthalen (bis $> 99\%$) erhalten blieb. So stellten sich die Position A206,

sowie die gegenüberliegenden Positionen H295, F202, F352, V260 und L307 in der planaren, zylinderförmigen aktiven Tasche als maßgeblich für die Steuerung der Aktivität und Selektivität der NDO dar. Generell konnte eine Abnahme der Aktivität mit steigender Substituentengröße und Verzweigungsgrad (Methyl- bis Pentyl- bzw. *tert*-Butyl-Reste) detektiert werden. Gleichfalls konnte eine Tendenz für ungesättigte Substituenten am Aromaten beobachtet werden, wobei die Aktivität von mono- über *gem*-di- und *trans*-di-substituierte Seitenketten abnahm. Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Methoxystyrolderivaten konnte eine gesteigerte Spezifität und Stereoselektivität ($\geq 95\%ee$) beobachtet werden. Neben Hydroxylierungsreaktionen wurden hierbei auch Dealkylierungsreaktionen beobachtet. Die Dihydroxylierung wurde beim Vorliegen einer zum Aromaten konjugierten C=C-Doppelbindung gegenüber der *O*-Demethylierung bevorzugt. Lag die C=C-Doppelbindung isoliert zum aromatischen System vor, wurde hingegen eine Präferenz für die *O*-Demethylierung beobachtet.

Grundsätzlich hat sich die NDO als einen guten Startpunkt für die biokatalysierte, asymmetrische Dihydroxylierung erwiesen und durch die systematische Analyse der aktiven Tasche konnten essentielle Stellschrauben für die weitere Verbesserung des Katalysator identifiziert werden.

Abstract

The oxyfunctionalization of olefins is one of the most sought-after reactions in chemistry. Especially chiral vicinal 1,2-diols, afforded from asymmetric dihydroxylations, are often applied as chiral ligands, auxiliars or chiral synthons for pharmaceuticals and agrochemicals.

In chemistry, a very powerful method for the stereoselective, asymmetric dihydroxylation (AD) of C=C double bonds is represented by the metal-catalyzed oxyfunctionalization via osmium (Sharpless AD) or other transition metals. Through extensive research in this field, high yields and excellent stereoselectivities are achieved with these catalysts. But their toxicity as well as the formation of byproducts through oxidative ring fission reactions represent major limitations in their applicability.

Rieske non-heme dioxygenases (ROs) are the effective, biological alternative to the Sharpless AD. These multicomponent systems consist of a hexameric oxygenase, an electron shuttle molecule and a reductase. In nature, they dihydroxylate C=C double bonds in aromatic rings and therefore initiate degradation of arenes. Due to the availability of different crystal structures the naphthalene dioxygenase (NDO) from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 was representatively investigated for the ROs and mutations in the active site were examined. By varying the substitution pattern, the direct catalysis at the aromatic ring as well as the allylic mono- and *cis*-dihydroxylation of the alkenyl side chain of a wide range of arenes (e. g. α -methylstyrene, allylbenzene) and the catalysis of non-aromatic, non-planar molecules like *R*-limonene were shown. Due to the broad biocatalytically repertoire of these enzymes the application for biotechnological purposes is of peculiar interest.

To have a closer look at this catalyst the heterologous *in vivo* and *in vitro* expression in *Escherichia coli* was examined. Hereby, the *in vitro* investigation was focused on the interaction of the different components of the NDO, the reaction setup and the influence of the cosolvent. After optimization of the *in vitro* system the following parameters were defined: (I) ratio between the components with 1 μ M oxygenase, 20 μ M ferredoxin and 5 μ M reductase, (II) the reaction setup with 2 mM substrate in ethanol at 30 °C for 2 h, and (III) the amount of the cosolvent ethanol with 5 % (v/v).

With an alanine scan of twelve first shell amino acids in the *in vitro* system the positions A206, H295, L307, G204 and V260 seemed to be promising candidates for mutagenesis, although the allegedly low stability of the components in the *in vitro* system only led to minor product formation.

Through optimization of the *in vivo* system a protocol for the expression and whole cell biotransformation was developed, which delivered a good reproducibility with standard deviations of less than 5 %. Freshly transformed cells were cultivated in TB-medium (37°C) until an optical density of 0,6-0,8 and then induced with 0,1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. The following heterologous expression was performed for 20 h at 25 °C. For whole cell biotransformations the cells were resuspended in 0,1 mM potassium phosphate buffer (pH 7,2) containing 20 mM glucose (0,2 g_{cww}/mL). Reactions were started by adding the substrate (dissolved in ethanol) and stopped with the addition of solvent after 20 h at 30 °C.

By using a semi-rational design approach in the *in vivo* system all twelve first shell amino acid residues were exchanged with either an alanine, a valine or an isoleucine (36 single variants) and additionally, based on *in silico* docking of *R*-limonene, 25 double variants were generated by combination of the positions A206, H295 and V260. By the screening of styrene derivatives as well as the monoterpene *R*-limonene important structure and function relationships were identified. The introduction of a single point mutation in the active site of the NDO had a clear influence on the reaction and substrate specificity as well as on the regio- and stereoselectivity (≥ 90 %), while the residual activity towards the natural substrate naphthalene (up to > 99 %) was not affected. Determining influences on the activity and selectivity of the NDO were identified at position A206 as well as at opposite positions H295, F202, F352, V260 and L307 of the planar cylindrical active site. In general, the activity dropped with an increasing size of the substituent as well as with increasing degree of branching (methyl- to pentyl- or *tert*-butyl-substituents). In case of the alkenyl side chains of the arene substrates the activity decreased from mono- to *gem*-di- to *trans*-di-substituted alkenes. Further investigation of different methoxystyrene derivatives, however, showed an increase in specificity and stereoselectivity (≥ 95 %*ee*). By converting these *para*-methoxy substrates not only the allylic mono- and *cis*-dihydroxylation reactions were observed, but also the *O*-dealkylation. If the C=C double bond of the side chain was conjugated to the

aromatic system a preference for the dihydroxylation was discovered, while with an isolated C=C double bond the *O*-demethylation was detected as a major product. In terms of selectivity and specificity is the NDO a good starting point for the selective, asymmetric dihydroxylation and the systematic analysis of the active site led to the discovery of crucial set screws for further optimization of the catalyst.

1 Einleitung

In den 1950ern wurde mit der Nutzung von Mikroorganismen für die regio- und stereoselektive Hydroxylierung von Steroiden durch Pharmaunternehmen wie Upjohn und Merck ein wichtiger Meilenstein in der Entwicklung von effizienten und selektiven Biokatalysatoren erreicht.¹ Seither wächst der Prozentsatz an Bulk- und Feinchemikalien, die unter Einsatz von Biokatalysatoren produziert werden.^{2,3} Das gesteigerte Interesse an biotechnologischen Prozessen lässt sich unter anderem auf das enorme Potential und die Vielfältigkeit des biokatalytischen Repertoires zurückführen.⁴

Hierbei ist die Hydroxylierung neben der Epoxidierung als eine weitere synthetisch wertvolle Biotransformation beschrieben.² Ausgehend von einfachen prokaryotischen Lebensformen bis hin zu komplex entwickelten eukaryotischen Systemen ist die Hydroxylierung als Schlüsselreaktion im oxidativen Stoffwechsel zur Herstellung einer Vielzahl von organischen Molekülen zu finden.⁵ Dabei werden Enzyme, die ein oder mehrere Sauerstoffatome auf ihr Substrat übertragen, als Oxygenasen bezeichnet und vor allem dann eingesetzt, wenn keine oder nur eine aufwendigere, chemische Syntheseroute für das gewünschte Produkt (z. B. selektive Oxyfunktionalisierung von Steroiden) besteht oder wenn die Synthese durch den Einsatz signifikant gekürzt werden kann.⁶⁻¹⁰ Neben der Monohydroxylierung spielt auch die Dihydroxylierung und die damit einhergehende Produktion von chiralen, vicinalen 1,2-Diolen eine wichtige Rolle in der Chemie. 1,2-Diole werden als chirale Liganden, Auxiliare und chirale Synthons verwendet.¹¹ Ihre Relevanz wurde durch die Vergabe des Chemie-Nobelpreises (2001) an Barry Sharpless, der zu bedeutenden Fortschritten im Bereich der stereoselektiven Oxidationsreaktionen (Sharpless Epoxidierung, Sharpless Dihydroxylierung, Sharpless Aminohydroxylierung) beitrug, verdeutlicht.¹²

Mit Biokatalysatoren können neben einfachen C-H-Bindungen^{13,14} auch isolierte und sogar aromatische C=C-Doppelbindungen¹⁵⁻¹⁸ selektiv adressiert und hydroxyliert werden, wobei vor allem die Natur der unterschiedlichen Bindungen interessant ist. So stellt die selektive Oxidation einer C-H-Bindung in einem linearen Alkan durch ihre hohe Bindungsenergie von 416 kJ/mol eine besondere Herausforderung dar.¹⁹ Eine biokatalytische Antwort für die Hydroxylierung von C-H-Bindungen findet sich

in den Cytochrom P450 Monooxygenasen, welche durch ihre starke katalytische Maschinerie Wasserstoff aus der Bindung abstrahieren und gleichfalls eine hohe Selektivität durch eine spezifische Substratbindung erzeugen können.²⁰ Auch die rein chemischen Methoden zur selektiven Hydroxylierung von C-H-Bindungen wurden im Lauf der Zeit verfeinert, wobei dirigierende und elektronische Effekte von funktionellen Gruppen zur Steuerung der Reaktivität und der Selektivität unvermeidlich sind.²¹ Die C=C-Doppelbindung weist mit 607 kJ/mol noch eine weitaus höhere Bindungsenergie als die C-H-Bindung auf, jedoch gilt sie aufgrund ihres Elektronenreichtums als reaktiver.¹⁹ Die Dihydroxylierung einer C=C-Doppelbindung kann sowohl rein chemisch mit den von Sharpless entwickelten Osmium-Katalysatoren erreicht werden, als auch mit der biologischen Alternative, den Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs). Das wohl stabilste Motiv, in dem C=C-Doppelbindung vorkommt, stellt der Benzolring dar. Dieser ist chemisch betrachtet durch das delokalisierte π -Elektronensystem nahezu inert. Die Stabilität einer aromatischen C=C-Doppelbindung wird eindrucksvoll bei der Bestimmung der Hydrierwärme deutlich. Bei der Hydrierung der einfachen C=C-Bindung (z. B. Cyclohexen) werden 120 kJ/mol Energie freigesetzt. Bestünde ein additiver Effekt der C=C-Doppelbindungen, wäre bei der Hydrierung von Benzol die Freisetzung von 360 kJ/mol zu erwarten, gemessen werden jedoch nur 209 kJ/mol.¹⁹ Die Differenz von 151 kJ/mol stellt hierbei die Resonanzenergie dar. Zur selektiven Adressierung eines solch stabilen, aromatischen Systems sind dabei lediglich die ROs in der Lage.

1.1 Potential von vicinalen *cis*-Diolen

Das Einbringen von funktionellen Gruppen in Kohlenwasserstoffverbindungen mittels Oxidation stellt eine sehr nützliche und leistungsstarke Methode dar.²²⁻²⁴ Generell können hierbei Epoxide, Diole und Aminoalkohole gebildet werden, welche wertvolle Grundchemikalien in der Produktion von Arzneimitteln, Agro- und Feinchemikalien darstellen.²⁵ Der Einsatz von isomerenreinen Oxidationsprodukten ist bei den oft mehrstufigen Synthesen unerlässlich, um die unterschiedlichen Stereozentren der komplexen Zielverbindung zu erhalten. Bedingt hierdurch ist die oxidative Funktionalisierung von Olefinen eine der am besten untersuchten Reaktionen der organischen Chemie. Neben der oxidativen Spaltung²⁶,

Bereits 1994 entwickelten Wang und Sharpless eine effiziente Methode zur Herstellung von enantiomerenreinen Hydrobenzoin ($> 99\%ee$) im Kilogramm-Maßstab.³³ Darauf aufbauend sind sowohl asymmetrische Hydrierungen⁵¹, Michael-Additionen⁵², Cyclopropanierungen⁵³, sowie Allyl- und Crotylborierungen⁴⁸ berichtet. In der Synthese von (-)-Morphin und (+)-Majusculon wird Hydrobenzoin zur Racematspaltung eingesetzt und ermöglicht somit die enantiomerenreine Herstellung dieser komplexen Zielmoleküle.^{54,55}

Auch in der pharmazeutischen Chemie lassen sich Beispiele für potentielle Einsatzgebiete von 1,2-Diole finden (s. Abbildung 1.1). So stellt *cis*-Aminoindanol ein wichtiges Schlüsselintermediat in der Synthese des HIV-Proteaseinhibitors Indinavir (Crixivan®) dar.⁵⁶ Die stereoselektive Herstellung kann in diesem Fall durch den enzymatischen Umsatz von Inden zu (-)-*cis*-(1*S*,2*R*)-Indandiol gewährleistet werden und wurde 1995 durch Merck patentiert.⁵⁷ Für die Synthese der Seitenketten von Diltiazem (Dilzem®, Herzmedikament) und Paclitaxel (Taxol®, Krebsmedikament) werden chemisch katalysierte *cis*-1,2-Diole als zweite Stufe in der Synthese eingesetzt.⁵⁸ 2012 entwickelten Boyd und Kollegen eine chemoenzymatische Synthese zur Herstellung des Schmerzmittels (-)-Epibatidin ausgehend von einem enzymatisch katalysierten Cyclohexadiendiol.⁵⁹

Das Potential der Dihydroxylierung erstreckt sich auch auf die Modifikation von sekundären Pflanzenstoffen wie den Flavanoiden.⁶⁰⁻⁶² Ähnlich der Steroidstrukturen handelt es sich bei dieser Molekülgruppe um Mehrringsysteme, deren gezielte Hydroxylierung neue, und im Fall von Dihydroxylierungen, größtenteils unerforschte Eigenschaften hervorbringt. Natürlich vorkommende, monohydroxylierte Flavanoide sind beispielsweise für ihre Radikalfängereigenschaften und die antioxidative Aktivität bekannt.^{63,64} Des Weiteren wurden in *in vitro* Experimenten entzündungshemmende⁶⁵, antiallergene⁶⁶, antikanzerogene⁶⁷ und antivirale Effekte beim Einsatz von Flavanoiden beobachtet.^{62,63,68} Quercetin, ein Hauptvertreter der Flavonole, ist mit 60 - 75 % eines der am häufigsten vorkommenden Flavanoide, welches vom Menschen durch die Nahrung aufgenommen wird (s. Abbildung 1.1).⁶⁹ Das Grundgerüst von Flavanoiden enthält keine Hydroxylgruppen im aromatischen System und stellt somit eine interessante Ausgangsverbindung für Dihydroxylierungsreaktionen dar. Des Weiteren stellt Chrysin im Bereich der hydroxylierten Flavone eine potentiell vielversprechende Verbindung mit hoher

antioxidativer Aktivität ($IC_{50} > 200 \mu M$) dar.⁶⁸ Naringenin, hervorgehend aus einem Flavanon-Grundgerüst, wird als Antioxidans in Lebensmitteln eingesetzt und bereits auf die Tauglichkeit zur Behandlung von Adipositas und Diabetes untersucht.⁷⁰

1.1.1 Chemische Synthese von vicinalen *cis*-Diolen

Heutzutage wird die Darstellung von vicinalen Diolen hauptsächlich durch einen Zwei-Schritt Mechanismus realisiert: Epoxidierung des Alkens mit Hydroperoxid, einer Persäure oder Sauerstoff und die anschließende Hydrolyse des Epoxids.^{71,72}

Eine wesentlich effizientere und kürzere Syntheseroute zur Herstellung von 1,2-Diolen stellt die direkte Dihydroxylierung der C=C-Doppelbindung dar. Die oxidative Alken-Funktionalisierung wird hierbei vor allem durch Metalle wie Osmium, Ruthenium, Eisen oder Mangan katalysiert.^{73,74} Die osmium-katalysierte Dihydroxylierung hat sich dabei in der Forschung als eine zuverlässige und effiziente Methode zur Darstellung von *cis*-1,2-Diolen erwiesen.^{11,24,48,75}

1.1.1.1 Osmium-katalysierte asymmetrische Dihydroxylierung

Die Osmium-katalysierte asymmetrische Dihydroxylierung wurde seit ihrer Entdeckung durch Sharpless und Kollegen intensiv erforscht und stellt aufgrund der hohen Toleranz gegenüber den eingesetzten Edukten, der hohen Selektivität und den guten Ausbeuten eine Schlüsselreaktion in der organischen Synthese dar.⁷⁶

Zu Beginn wurden durch den stöchiometrischen Einsatz von Osmiumtetroxid (OsO_4) olefinische Doppelbindungen über *cis*-Osmiumester mit hohen Ausbeuten zu vicinalen *cis*-Diolen oxidiert (s. Abbildung 1.2).⁷⁷ Aus ökonomischen Gründen wurde sehr schnell daran gearbeitet, den Einsatz von Osmium in katalytischen Mengen zu realisieren.

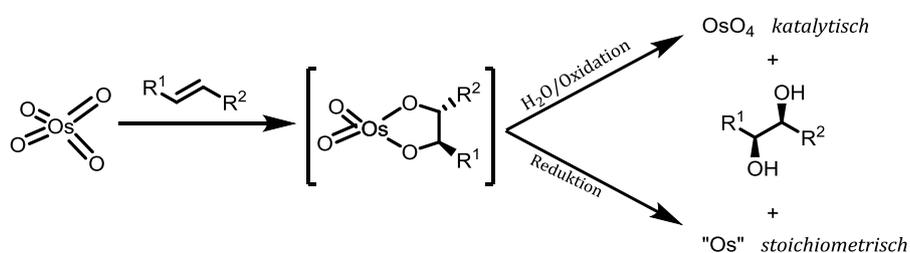


Abbildung 1.2: Osmylierung von Alkenen (mod. nach ⁴⁸)

Die Basis zum Einsatz von OsO_4 als katalytisches Reagens wurde 1908 geschaffen, indem die Reduktion von OsO_4 durch sekundäre, ungesättigte Verbindungen (Co-

Oxidantien) gezeigt wurde.⁷⁸ Die Verwendung von anorganischen Co-Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und verschiedenen Chloratverbindungen führte in den meisten Fällen zu Überoxidationen und einer daraus folgenden geringeren Ausbeute.^{79–81} Mit der Oxidation von Osmium(VI) durch *tert*-Butylhydroperoxid im Basischen oder mit dem Einsatz anderer *N*-Oxide wie *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) konnte die Ausbeute erheblich gesteigert werden.^{82,83} Der auf den sekundären Reaktionszyklus des NMOs zurückzuführende Verlust der Enantioselektivität wurde mit dem Einsatz von Kaliumhexacyanidoferrat(III) (K₃[Fe(CN)₆]) eliminiert.^{84,85} Wird K₃[Fe(CN)₆] als Co-Oxidans verwendet, läuft die Reaktion in einem heterogenen Lösungsmittel ab (s. Abbildung 1.3). Die Osmylierung des Olefins findet dabei in der organischen Phase (meist *tert*-Butanol) statt, die Reoxidation von wasserlöslichem Os(VI) zu Os(VIII) in der wässrigen Phase.⁸⁶ OsO₄ wird dadurch wieder für die Katalyse in der organischen Phase bereitgestellt.

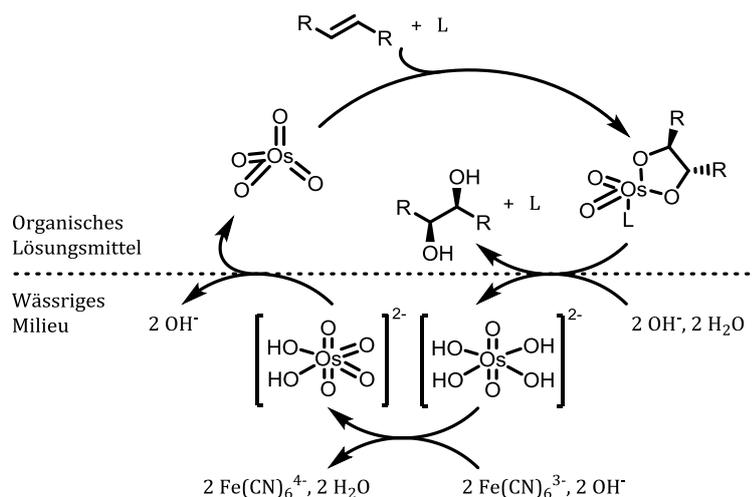


Abbildung 1.3: Reaktionszyklen der asymmetrischen Dihydroxylierung unter Verwendung von Kaliumhexacyanidoferrat(III) als Co-Oxidans (L: Ligand; R: entsprechende Substituenten des Olefins; mod. nach ²⁴)

Des Weiteren wird zur asymmetrischen Dihydroxylierung ein Ligand eingesetzt, der die Reaktion beschleunigt und die Steuerung der Stereoselektivität ermöglicht. Bereits in den 1940ern wurde von Criegee die Beschleunigung der Dihydroxylierungsreaktion unter Verwendung von Pyridin beobachtet.⁸⁷ Sharpless und Hengtes untersuchten daraufhin den Einsatz chiraler Pyridine unter Verwendung von stöchiometrischen Mengen an Osmium und beobachteten ein stets schnelleres Ablaufen der Reaktion bei erniedrigter Stereoselektivität

(~ 18 % *ee*).^{88,89} Die Bildung von instabilen Pyridin-Osmiumtetroxid-Komplexen wurde als Ursache identifiziert. Da tertiäre Amine wesentlich stabilere Komplexe mit OsO₄ bilden können, konnte mit dem Einsatz von Derivaten der natürlich vorkommenden Alkaloide aus *Cinchona*-Arten eine bedeutende Verbesserung der Stereoselektivität erzielt werden.^{76,90,91} Seither wurden mehr als 400 Alkaloide untersucht, wobei unter Verwendung der Alkaloidderivate der *Cinchona*-Arten die besten Stereoselektivitäten erzielt wurden.^{31,48} In Kombination mit Phthalazin- (PHAL), Diphenylpyrimidin- (PYR) und Anthraquinon-Analoga (AQN) sind Derivate von Dihydroquinin (DHQ) und Dihydroquinidin (DHQD) die wohl am häufigsten eingesetzten Liganden zur katalytischen *cis*-Dihydroxylierung (s. Abbildung 1.4).

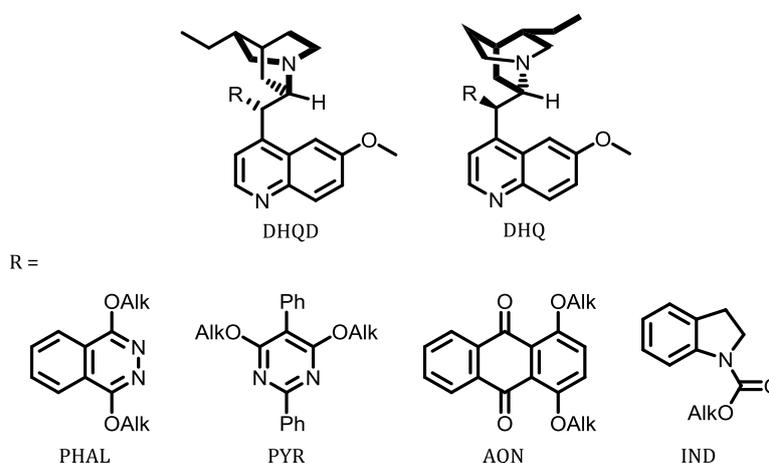


Abbildung 1.4: Häufig verwendete Liganden in der asymmetrischen Synthese (Alk = DHQD, DHQ; mod. nach ²³)

Die Wahl des eingesetzten Liganden ist von zwei Faktoren abhängig: (1) Stereoselektivität des gewünschten Produktes und (2) Substitutionsmuster des eingesetzten Olefins. Zahlreiche Studien haben sich bereits mit dem Mechanismus der asymmetrischen Dihydroxylierung auseinandergesetzt und den Einfluss des Liganden auf die Stereoselektivität teils kontrovers diskutiert.^{92,93} So kann die Bildung des Osmiumglykolats über eine [3+2]- oder eine [2+2]-Addition erfolgen. Quantenchemische Berechnungen favorisieren hierbei den Mechanismus der [3+2]-Addition, kinetische Studien gehen von einer [2+2]-Addition aus.⁹³ Beide Theorien basieren jedoch auf der Annahme, dass die Seitendifferenzierung bei der Reaktion des Olefins mit Osmiumtetroxid in der chiralen Bindetasche durch die aromatischen Reste des Liganden erzeugt wird.⁹⁴ Zwei unterschiedliche Modelle wurden für die

Orientierung des Substrates in der Bindetasche postuliert (s. Abbildung 1.5 A). Basierend auf kristallographischen Daten vertreten Corey und Kollegen die Theorie der U-förmigen Bindetasche, in der wichtige stabilisierende Effekte zwischen Substrat und Ligand von den Aryl-Aryl-Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten des Substrats und den parallelen Methoxyquinolingroupen des Liganden stattfinden.^{95,96} Sharpless hingegen postuliert eine L-förmige Bindetasche basierend auf quantenmechanischen Berechnungen, wobei der aromatische Linker zwischen den beiden Alkaloidmotiven den Boden der Tasche bildet und die Methoxyquinolinreste die senkrechten Wände.^{48,97}

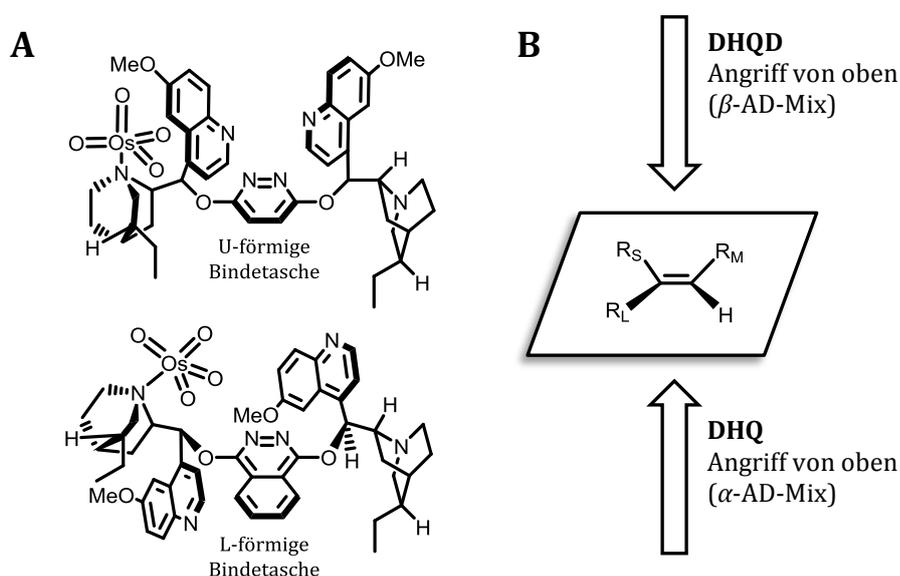
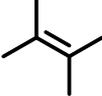


Abbildung 1.5: (A) Seitendifferenzierungs-Modelle von Corey und Sharpless, (B) Mnemonik zur Vorhersage der Stereoselektivität bei Einsatz unterschiedlicher chiraler Aminoalkohole (R_S = kleinere Variationen werden toleriert; R_M/R_L = zahlreiche mittlere und sterisch anspruchsvolle Variationen werden toleriert; AD-Mix bestehend aus $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 , $(DHQD)_2$ -PHAL und $K_2OsO_2(OH)_4$; mod. nach ^{24,98})

Die Stereoselektivität der hydroxylierten Zielverbindung kann mit einfachen Regeln und unter Zuhilfenahme eines empirischen Modells vorhergesagt werden (s. Abbildung 1.5 B).⁹⁹⁻¹⁰¹ Wird ein prochirales Alken mit einem Dihydroquinidinderivat (DHQD) umgesetzt, erhält man ein β -konfiguriertes *cis*-Diol, setzt man ein Dihydroquininderivat (DHQ) ein, wird das α -Produkt erhalten.

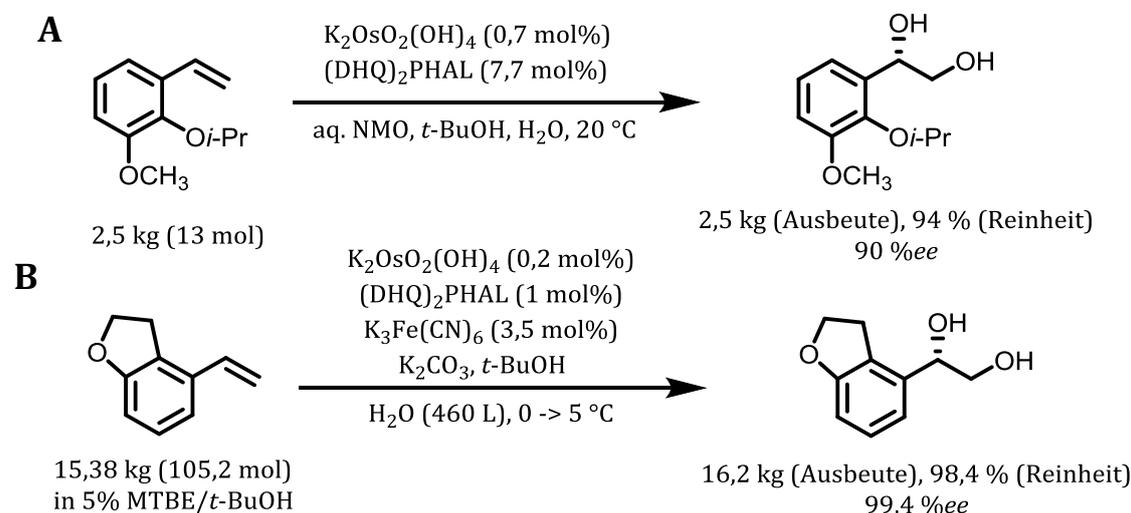
Wie bereits beschrieben ist die Wahl des Liganden auch von dem Substitutionsmuster des Olefins abhängig. Hierbei weisen die unterschiedlichen Liganden verschiedene Stereoselektivitäten auf (s. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Bevorzugt zu verwendende Liganden für die unterschiedlichen Substitutionsmuster von Olefinen (mod. nach ⁴⁸)

Olefin						
	mono	gem-di	cis-di	trans-di	tri	tetra
Bevorzugter Ligand	PYR PHAL	PHAL	IND	PHAL	PHAL	PYR PHAL
<i>ee</i> [%]	30-97	70-97	20-80	90-99.8	90-99	20-97

PHAL und PYR weisen ein breites Spektrum auf und können fünf der sechs Olefinklassen mit moderater bis exzellenter Stereoselektivität umsetzen. *Cis*-di-substituierte Olefine sowie elektronenarme C=C-Doppelbindungen stellen hingegen für die Dihydroxylierung mittels Osmiumtetroxid eine Herausforderung dar.

Der kommerziell erhältliche AD-Mix (Asymmetrische Dihydroxylierung) enthält neben dem Katalysator $K_2[OsO_2(OH)_4]$, den chiralen Alkaloidliganden (z. B. $(DHQD)_2PHAL$), $K_3[Fe(CN)_6]$ auch die Base Kaliumcarbonat zur Reoxidation des Osmiums. Diese Zusammensetzung des AD-Mixes wird am Häufigsten für *cis*-Dihydroxylierungen im kleinen Maßstab verwendet.⁴⁸ Es gibt jedoch auch industrielle Beispiele für den Einsatz des AD-Mixes. In Abbildung 1.6 sind zwei asymmetrische Dihydroxylierung im Kilogramm-Maßstab dargestellt.

**Abbildung 1.6:** (A) Umsetzung von *o*-Isopropoxy-*m*-Methoxystyrol³², (B) Schlüsselintermediat in der Synthese eines Melatonin-Rezeptor-Agonisten¹⁰²

Bei der Umsetzung von *o*-Isopropoxy-*m*-Methoxystyrol wird das entsprechende Diol mit hoher Reinheit (94 %) und hoher Stereoselektivität (90 %*ee*) erhalten.³² Bei der Synthese eines Melatonin-Akzeptor-Agonisten wurde sogar ein Reinheitsgrad von 98,4 % erhalten, bei einem Enantiomerenüberschuss von 99,4 %*ee*.¹⁰²

In der Synthese von unterschiedlichsten Pharmawirkstoffen stellt die asymmetrische Dihydroxylierung durch Osmiumtetroxid ein wichtiges Werkzeug dar. Im Folgenden werden einige Beispiele von Pharmamolekülsynthesen aufgezeigt, wobei lediglich der AD-katalysierte Schritt grafisch dargestellt ist (s. Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: *Cis*-Dihydroxylierungen als Schlüsselreaktionen in der Synthese von Pharmawirkstoffen

Name des Wirkstoffes	AD-katalysierte Reaktion	Ref.
Quinin zur Behandlung von Malaria		103
Cortistatin A verhindert die Blutgefäßbildung bei Tumoren		104
Lomaiviticin-Aglycon weist antibiotische Eigenschaften auf und wird zur Behandlung von Krebs eingesetzt		105
Trioxacarcinose A hemmt das Wachstum von Krebszellen		106,107
(S)-Oxybutynin hemmt die Wirkung von Acetylcholin		108
(-)-Ovalicin stellt einen Antitumorstoff mit antiangiogener Effekt dar		109,110

* Cbz = Benzyloxycarbonyl; TES = Triethylsilylether; MEM = 2-Methoxyethoxymethyl; TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl; TIPS = Triisopropylsilylether; BP = Biphenyl)

1.1.1.2 Metall-katalysierte asymmetrische Dihydroxylierung

Neben der Verwendung von Osmiumtetroxid zur Metall-katalysierten asymmetrischen Dihydroxylierung sind nur wenige weitere Übergangsmetalle zur selektiven *cis*-Dihydroxylierung in der Lage. Im Basischen kann mit dem Einsatz von stöchiometrischen Mengen an Kaliumpermanganat ein racemisches Gemisch von *cis*-Diolen hergestellt werden. Jedoch sind das hohe Oxidationspotential, die daraus resultierende Überoxidation und der in stöchiometrischen Mengen anfallende Braunstein problematisch in der Anwendung.⁷⁴ Der Einsatz von katalytischen Mengen an Rutheniumoxid kann bei sehr kurzen Reaktionszeiten (> 0,5 min) und niedrigen Temperaturen ebenfalls die Bildung von *cis*-Diolen beobachtet werden.¹¹¹⁻¹¹³ Neben Eisen sind weitere Metall-katalysierte Dihydroxylierungen durch Molybdän, Palladium, Cerium und Technetium beschrieben und von Bataille und Donohoe ausführlich in ihrem Review erläutert.⁷⁴

1.1.2 Biologische Synthese von vicinalen *cis*-Diolen

Für den biologischen Zugang zu vicinalen Diolen sind drei Hauptwege beschrieben: Hydrolyse von Epoxiden mittels Epoxidhydrolasen oder Halohydrin-Dehalogenasen, die Reduktion von 1,2-Diketonen durch Alkoholdehydrogenasen bzw. Reduktion von α -Hydroxyketonen durch Diacetyl-Reduktasen, sowie die Oxidation von C=C-Doppelbindungen mit Oxygenasen (s. Abbildung 1.7).

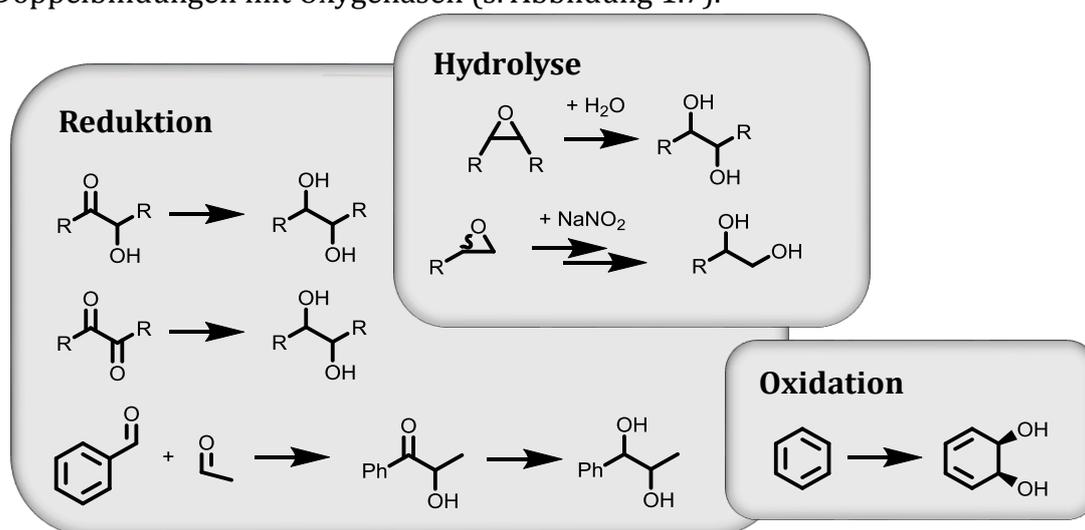


Abbildung 1.7: Biologischer Zugang zu vicinalen Diolen

Epoxidhydrolasen (EHs, EC 3.3.2.X) katalysieren die Ringöffnung von Epoxiden unter Verwendung von Wasser als Nukleophil. Sie werden sowohl zur Hydrolyse von *meso*-Epoxiden eingesetzt, wodurch eine prochirale Verbindung in eine chirale

überführt wird (*hydrolytic desymmetrization*), als auch zur biokatalytischen kinetischen Racematspaltung.^{25,114–116} In den meisten Fällen führt der Einsatz von Epoxidhydrolasen zur Bildung von vicinalen *trans*-Diolen.²³ Die wenigen Beispiele für Epoxidhydrolasen, die *cis*-1,2-Diole bilden, haben ihren Ursprung in der Forschung von Belucci und Kollegen.^{117,118} Bei der Umsetzung von *cis*-Stilben mit einer mikrosomalen EH aus Hasenleber konnten Enantiomerenverhältnisse von bis zu 94:6 (*R,R*) erreicht werden. Die Palette an mikrobiellen EHs zur Produktion von chiralen *cis*-1,2-Diolen wurde durch die Untersuchungen von Zhao und Kollegen 2004 erheblich erweitert.²⁵ Von elf neuartigen EHs setzten vier Enzyme¹ (BD8877, BD8876, BD9300, BD9883) *cis*-Stilben mit hervorragenden Selektivitäten von > 96 %*ee* (*R,R*) um. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BD8877 auch eine breite Auswahl an Substituenten am Phenylring in *meta*- und *para*-Position toleriert. Halohydrin-Dehalogenasen (HDHs, EC 4.5.1.X) werden von Mikroorganismen zum Abbau von halogenierten Kohlenwasserstoffen benötigt und gehören zu der Klasse der Lyasen. Diese Enzyme katalysieren die reversible Dehalogenierung von Halohydrinen zu Epoxiden durch einen intramolekularen nukleophilen Austausch des Halogensubstituenten an der benachbarten Hydroxyl-Gruppe. Die Halohydrin-Dehalogenase von *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC) katalysiert die enantioselective Umsetzung von aromatischen Halohydrinen zu (*R*)-Epoxiden und (*S*)-Halohydrinen.^{28,119} 2005 zeigten Hasnaoui und Kollegen, dass die Kombination aus HheC und Nitrit ein nützliches Werkzeug zur enantio- und regioselectiven Hydrolyse von Epoxiden darstellt (s. Abbildung 1.8).

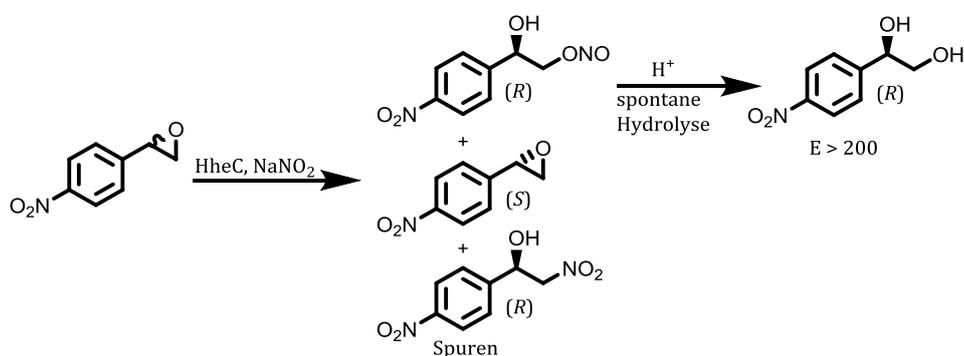


Abbildung 1.8: Racematspaltung von *p*-Nitrostyroxid durch die Halohydrin-Dehalogenase HheC und anschließende Hydrolyse zum vicinalen Diol (mod. nach ^{28,120})

¹ EHs wurden mittels *filter lift* Hybridisierung identifiziert und generisch mit BD+Nummer bezeichnet.

Bei der Umsetzung des *para*-substituierten Nitrostyrols mit HheC und Nitrit zu Nitrophenylethan-1,2-diol wurde ein Enantiomerenüberschuss von 91 %*ee* erhalten. Die Reduktion von α -Hydroxyketonen und α -Diketonen mittels Alkoholdehydrogenasen (ADHs, EC 1.1.1.X) führt ebenfalls zur Bildung vicinaler *cis*-Diole.¹²¹ Obwohl diese Enzyme bereits Anwendung in der Industrie finden, besteht weiterhin Interesse an ADHs, welche die Reduktion von sterisch anspruchsvollen Substraten wie z. B. 2-Hydroxyketonen katalysieren. Eine Alkoholdehydrogenase aus *Ralstonia* sp. DSM6428 (RADH) stellte sich bei der Untersuchung von Ketonen mit zwei sterisch anspruchsvollen Substituenten (*bulky-bulky ketones*) als ein gut geeigneter Katalysator heraus¹²² und wurde 2012 in Untersuchungen von Kulig und Kollegen auch als geeignetes Enzym zur Reduktion von sterisch anspruchsvollen 2-Hydroxyketonen identifiziert.¹²³ Arylaliphatische Ketone wie (*R*)-2-Hydroxyphenylpropanon ((*R*)-2-HPP) wurden im substratgekoppelten System mit 2-Propanol mit einer spezifischen Aktivität von 240 U mg⁻¹ sehr viel schneller reduziert als aliphatische oder aromatische Aldehyde (0,5 - 10 U mg⁻¹). Zudem konnten Stereoselektivitäten von > 99 %*de* (*R*) bestimmt werden. Im Weiteren zeigten auch die Alkoholdehydrogenasen (Anti-Prelog ADHs) von *Lactobacillus brevis* (LBADH), sowie die Dehydrogenasen (Prelog ADHs) aus *Rhodococcus ruber* (ADH-A) und *Thermoanaerobacter* sp. (ADH-T) bei der Umsetzung von 2,3-Pentandion ausgezeichnete Enantioselektivitäten beim resultierenden *cis*-Diol, (2*R*,3*R*)-Pentandiol, mit > 99 %*ee*, sowie moderate bis exzellente Diastereoselektivitäten von 62-91 %.¹²⁴ Bei der Umsetzung von aliphatischen Diketonen konnten ebenfalls *cis*-Diole mit guten Ausbeuten (40 - 80 %) und sehr hohen Stereoselektivitäten von \geq 95 % erreicht werden.¹²⁵

Eine Zwei-Schritt Synthese mit C-C-bindungsknüpfenden Enzymen und Oxidoreduktasen führte ebenfalls zur erfolgreichen Herstellung von vicinalen *cis*-Diolen.¹²⁶ Durch den Einsatz der thiamindiphosphatabhängigen Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) bzw. Benzoylformiatdecarboxylase (BFD, EC 4.1.1.7) und der Alkoholdehydrogenasen LBADH bzw. ADH-M aus *Thermoanaerobium* sp. (EC 1.1.1.2) konnten erfolgreich alle Stereoisomere des 1-Phenylpropan-1,2-diols hergestellt werden (s. Abbildung 1.9). Bei der präparativen Herstellung des (1*S*,2*S*)-*cis*-Diols konnte eine Ausbeute von 90 % mit 98 %*de* erreicht werden, die

Umsetzung zum (1*R*,2*R*)-*cis*-Diols lieferte ebenfalls eine gute Ausbeute (81 %) und einen exzellenten Diastereomerenüberschuss von 98 %.

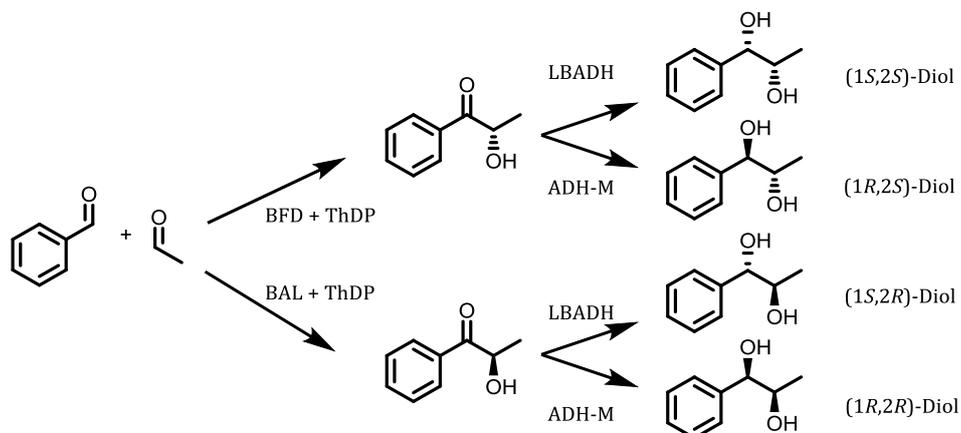


Abbildung 1.9: Zwei-Schritt Synthese zur Herstellung der vier möglichen Stereoisomere von 1-Phenylpropan-1,2-diol (BFD: Benzoylformiatdecarboxylase; BAL: Benzaldehydlyase; ThDP: Thiamindiphosphat; LBADH: Alkoholdehydrogenase von *Lactobacillus brevis*; ADH-M: Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium spec.*; mod. nach ¹²⁶)

Eine weitere Möglichkeit vicinale *cis*-Dirole darzustellen ergibt sich aus der Verwendung von Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs, EC 1.14.12). Diese Multi-enzymkomplexe (s. Kapitel 1.2) katalysieren ausgehend von molekularem Sauerstoff die selektive *cis*-Dihydroxylierung von C=C-Doppelbindungen in aromatischen und nicht-aromatischen Molekülen mit hohen Enantiomerenüberschüssen. Ihren natürlichen Ursprung finden diese Enzyme im ersten Schritt des Aromatenabbaus, wobei nach erfolgreicher Auflösung der Aromatizität das entstandene Dihydrodiol durch Intra- oder Extradiol-Dioxygenasen gespalten und dem Energiestoffwechsel zugeführt wird.¹²⁷ Rund 25 % der Biomasse weltweit besteht aus aromatischen Verbindungen, worunter auch viele xenobiotische Substanzen fallen.¹²⁸ Pharmazeutika und Agrochemikalien weisen häufig sowohl aromatische als auch nicht-aromatische Heterozyklen bzw. Benzylringe in ihrer molekularen Struktur auf und bieten sich für den Abbau durch Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen an. Des Weiteren kann eine gezielte Modifizierung des aromatischen Motivs durch diese Biokatalysatoren einen möglichen Syntheseweg stark vereinfachen.¹²⁹ Für eine Vielzahl von pharmakologischen Wirkstoffen wurden bereits Syntheserouten aufgezeigt, die von dem Motiv der *cis*-Cyclohexadiendiole ausgehen (s. Abbildung 1.10).¹³⁰ Trotz ihrer vielseitigen Anwendung wurde das Potential der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen im Bereich der Wirkstoffsynthese bis heute noch nicht ausgeschöpft.¹³¹

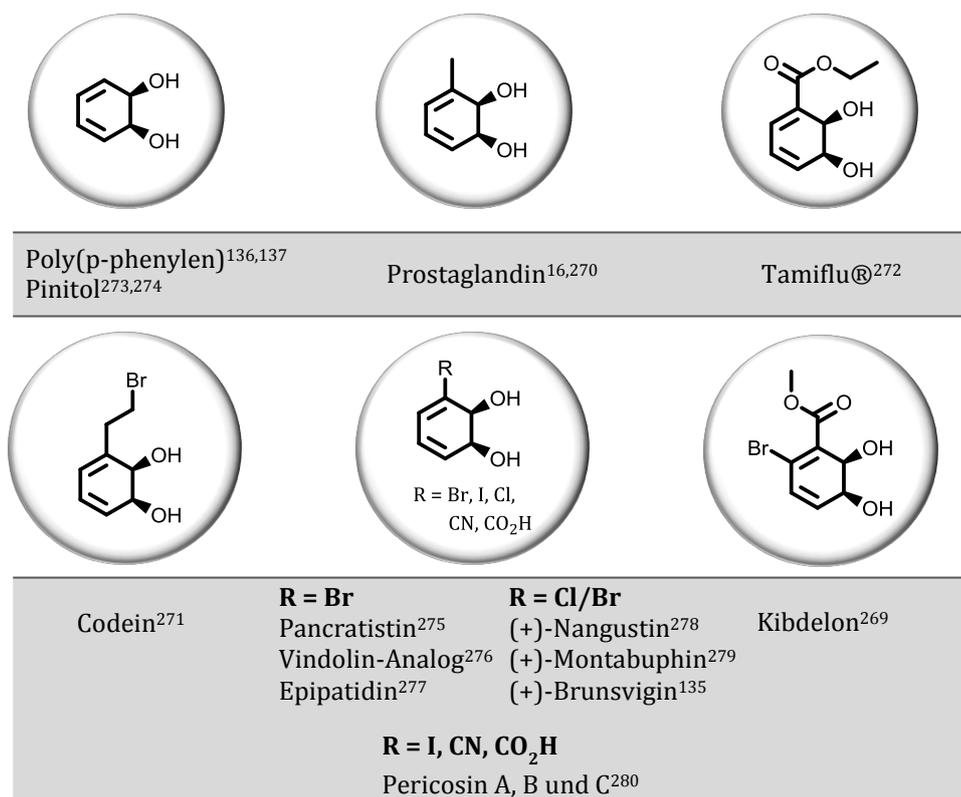


Abbildung 1.10: Überblick über biokatalytische Synthesen ausgehend von *cis*-Cyclohexandiold-Intermediaten (Reviews für weitere Recherche: ¹³²⁻¹³⁵)

Neben der Anwendung im Pharmabereich können *cis*-Diole auch in der Polymerchemie verwendet werden, indem konduktive Polymere wie z. B. Poly(p-phenylen) durch die Polymerisierung von *cis*-Dihydrocatechol biokatalytisch hergestellt werden.^{136,137}

1.2 Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen

Zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1) gehören neben einer Reihe von reduzierenden Enzymen auch oxidierende Enzyme, die Sauerstoff als Elektronendonator verwenden. Diese oxidierenden Enzyme kann man wiederum in drei Kategorien einteilen: Oxygenasen, Oxidasen und Peroxidasen. Vor allem Oxygenasen stellen wichtige Schlüsselenzyme im Katabolismus und beim Recycling von organischer Biomasse dar. Des Weiteren übernehmen sie wichtige Aufgaben wie Entgiftung und Abbau von Kohlenwasserstoffen sowie Xenobiotika. Die hohe Anpassungsfähigkeit für diese komplexe und vielfältige Aufgabe wird durch das große Substratspektrum und die breite Produktpalette dieser Enzyme eindrucksvoll gezeigt.¹³⁸ Des Weiteren können Oxygenasen in Mono- und Dioxygenasen

differenziert werden und verfügen über unterschiedliche katalytische Zentren, wobei Eisen-, Kupfer- und Flavin-abhängige Enzyme beschrieben sind. Die Häm-Gruppe und auch der verwendete Cofaktor (NADH/NADPH) stellen weitere Hilfsmittel zur Unterteilung dieser vielseitigen Enzymklasse dar. Im Fall der Eisen-abhängigen ROs ist keine Häm-Gruppe vorhanden und als initialer Elektronendonator wird der Cofaktor NADH verwendet.

1.2.1 Ursprung und Aufgabe in der Natur

In 1968 entdeckten Gibson und Kollegen erstmals die Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs), welche auch als Ring-hydroxylierende Dioxygenasen bezeichnet werden und konnten nachweisen, dass eine direkte *cis*-Addition von molekularem Sauerstoff auf das Substrat Benzol erfolgt.¹³⁹ In der Natur ist diese Reaktion eine Schlüsselreaktion zur Energiegewinnung von Bakterien, da sie den initialen Schritt im Abbau von aromatischen Molekülen darstellt (s. Abbildung 1.11).

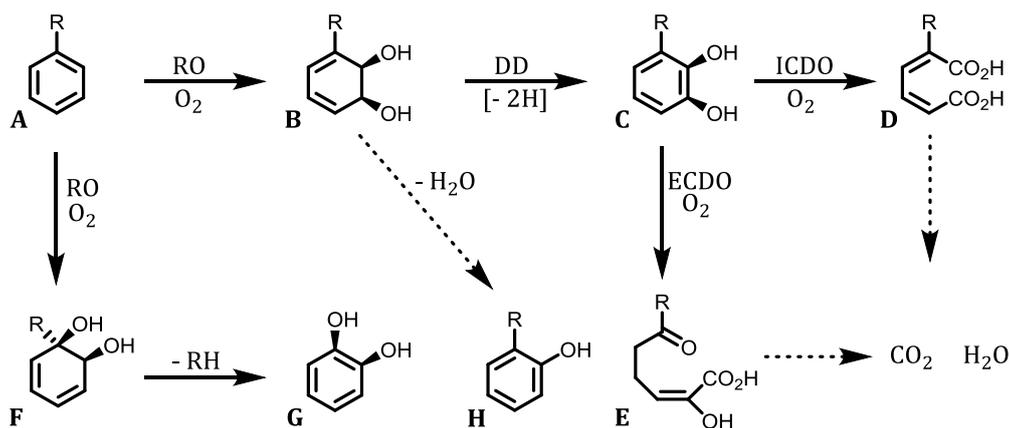


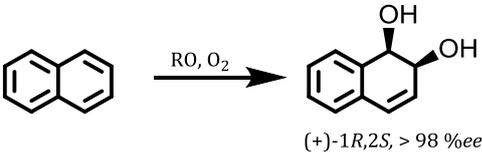
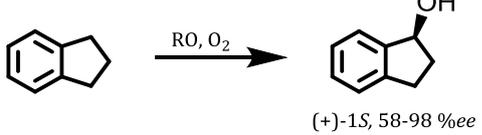
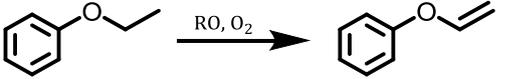
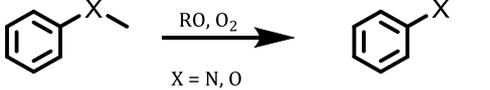
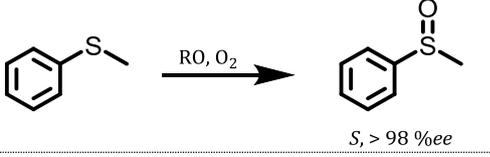
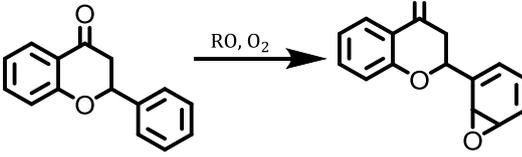
Abbildung 1.11: Mikrobieller Abbau von einfach substituierten aromatischen Substraten. Der erste Schritt im Abbau erfolgt durch ROs und resultiert in der Bildung eines Dihydrodiols (**A** \rightarrow **B**: Dearomatisierung durch Rieske Nicht-Häm Dioxygenase (RO); **B** \rightarrow **C**: Rearomatisierung durch *cis*-Diol Dehydrogenase (DD); **C** \rightarrow **D/E**: Intra-/Extradiolringspaltung durch Extradiol- (ECDO) oder Intradiol- (ICDO) Dioxygenase; mod. nach ¹⁴⁰)

Die Bildung des Dihydrodiols **B** oder **F** erfolgt durch die *cis*-Dihydroxylierung einer C=C-Doppelbindung durch Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen. Im Weiteren wird durch eine *cis*-Diol Dehydrogenase (DD) die Rearomatisierung zu **C** herbeigeführt, wobei **B** durch Eliminierung von Wasser im Sauren ebenfalls rearomatisiert werden kann (**H**). Durch eine weitere Katalyse von **C** durch Intra- oder Extradiol-Catechol Dioxygenasen (ICDO/ECDO) findet die Ringöffnung zur *cis,cis*-Muconsäure (**D**, R = H) bzw. zum Semialdehyd (**E**, R = H) statt. Bei der Umsetzung von Nitrobenzol (**A**, R =

NO₂) mit einer Nitrobenzol Dioxygenase aus *Comamonas* sp. Stamm JS765 wurde ebenfalls die Bildung des Catechols **G** sowie die spontane Eliminierung von Nitrit beobachtet.¹⁴¹ Als Gegenstand zahlreicher Untersuchungen konnte bereits eine breite Palette an aromatischen Substraten (> 300) mit ROs zu chiralen *cis*-Dihydrodiolen umgesetzt werden.^{130,142,143} In den meisten Fällen wurde dabei eine hohe Enantioselektivität (> 98 %*ee*) beobachtet.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

Neben der *cis*-Dihydroxylierung katalysieren diese Enzyme noch eine Reihe weiterer Reaktionen und zeigen somit eindrucksvoll ihr hohe Flexibilität im Bereich der Chemo- und Regioselektivität. Bei Umsetzungen mit ROs konnten sowohl allylische Monohydroxylierungen^{147,18}, Dihydroxylierungen^{148,149}, Desaturierungen¹⁵⁰, *O*- und *N*-Dealkylierungen¹⁵⁰, Sulfoxidierungen¹⁵⁰, oxidative Zyklisierungen¹⁵¹ und Epoxidierungen¹⁵² beobachtet werden (s. Tabelle 1.3). Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen werden deshalb häufig als das Nicht-Häm Analogon zu den bereits gut erforschten Cytochrom P450 Monooxygenasen bezeichnet.^{138,144,153-156}

Tabelle 1.3: Demonstration des Reaktionsraums der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (RO) anhand von ausgewählten Beispielen

Reaktion	RO-katalysierte Reaktion	Relative Ausbeute	Ref.
Dihydroxylierung	 <chem>C1=CC=C2C=CC=CC2=C1.O=O>>C1=CC=C2C(O)C(O)C=C2=C1</chem> (+)-1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> , > 98 % <i>ee</i>	> 99 %	148, 149
Allylische Monohydroxylierung	 <chem>C1=CC=C2C=CC=C1C2.O=O>>C1=CC=C2C(O)C=CC2=C1</chem> (+)-1 <i>S</i> , 58-98 % <i>ee</i>	54-67 %	147, 18
Desaturierung	 <chem>CCOC1=CC=CC=C1.O=O>>C=CCOC1=CC=CC=C1</chem>	42 %	150
<i>N</i> -/ <i>O</i> -Dealkylierung	 <chem>Cc1ccc(X)cc1.O=O>>c1ccc(X)cc1</chem> X = N, O	> 99 %	150
Sulfoxidation	 <chem>CSc1ccc(cc1).O=O>>CS(=O)c1ccc(cc1)</chem> S, > 98 % <i>ee</i>	> 99 %	150
Epoxidierung	 <chem>O=C1OC(c2ccccc2)C(=O)c3ccccc13.O=O>>O=C1OC(c2ccccc2)C(=O)c3ccccc131</chem>	1-3 %	152

Außerdem konnten mit der Carbazol 1,9a-Dioxygenase (CARDO) aus *Pseudomonas* sp. CA10 auch die Umsetzung von Heterozyklen wie Carbazol zu 2-Aminobiphenyl-2,3-diol und Dibenzofuran zu 2,2',3-Trihydroxyphenylbenzol gezeigt werden.^{157,281} Zusätzlich zu über 300 aromatischen Substraten wurden in jüngeren Untersuchungen auch Umsetzungen von nicht-aromatischen Substraten beobachtet.¹⁴⁶ So konnten von Seo und Kollegen die Bildung von Dihydrodiolen aus Flavonen und Isoflavonen mittels NDO zeigen.^{61,158} Grundsätzlich handelt es sich bei den Flavanoiden um interessante Moleküle, deren positiver Effekt auf die Gesundheit durch ihre antioxidative Wirkung bereits mehrfach gezeigt wurde.^{68,159,160} Weiterhin wird durch die selektive, biokatalytische Modifikation dieser ubiquitären Moleküle mittels eines bestimmten Hydroxylierungsmusters die Attraktivität dieser Substanzen für den Einsatz als Lebensmittelzusatzstoff erhöht.

1.2.2 Aufbau und Klassifizierung der Multikomponentensysteme

Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen sind Multikomponentensysteme¹⁶¹, welche aus bis zu drei Komponenten aufgebaut sein können: (1) einer Reduktase, welche die Elektronen durch Oxidation des natürlichen Cofaktors NAD(P)H erhält, (2) einem Ferredoxin, das die Elektronen von der Reduktase sequenziell an die Oxygenase weiterleitet und (3) einer Oxygenase, bestehend aus α - und β -Untereinheit, welche die Sauerstoffaktivierung und Hydroxylierung des Substrates durchführt (s. Abbildung 1.12).

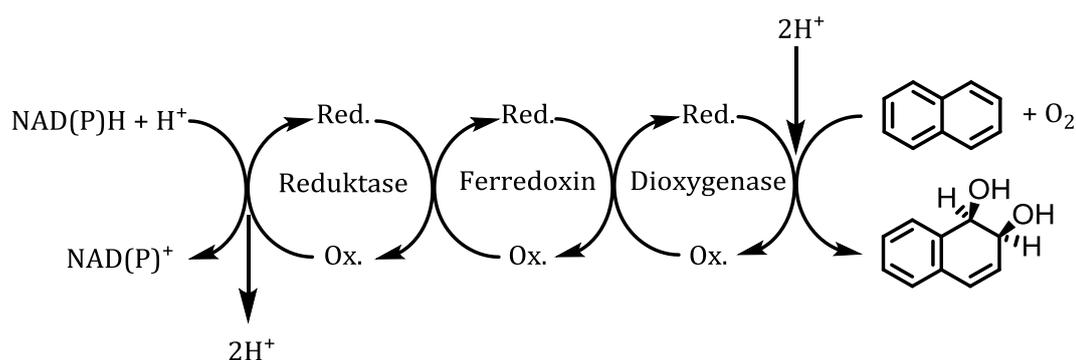


Abbildung 1.12: Elektronentransfer im Multikomponentensystem Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen am Beispiel der *cis*-Dihydroxylierung von Naphthalen zu (+)-1R,2S-Naphthalendihydrodiol (mod. nach ^{144,162})

Eine erste Klassifizierung der ROs basierend auf der Anzahl der Redoxpartner (Reduktase/Ferredoxin) und deren prosthetische Gruppen (FAD/FMN/[2Fe-2S]) wurde durch Batie und Kollegen vorgenommen.¹⁶³ Bei dieser Einteilung hatte jedoch

der Aufbau der katalytisch aktiven Dioxygenase keine Bedeutung. Im Rahmen von phylogenetischen Untersuchungen wurde deshalb eine weitere Verfeinerung der Klassifizierung basierend auf der Oxygenaseeinheit in Naphthalen-, Toluol/Biphenyl-, Benzoat- und Phthalat-Dioxygenasefamilien eingeführt.^{142,164} Im Fall der Naphthalen-, Toluol/Biphenyl-, Benzoat-Familie besteht die Quartärstruktur der Dioxygenase aus drei Heterodimeren, welche ihrerseits aus der katalytisch aktiven α -Untereinheit und der stabilisierenden β -Untereinheit bestehen.¹⁶⁵ Die Phthalat-Familie hingegen weist in der Quartärstruktur lediglich α_n -Untereinheiten auf.¹⁶⁵

Da die Anzahl an neu entdeckten Sequenzen durch die Metagenomik stetig steigt und die Einordnung in bestehende Klassifizierungen immer schwieriger wird, wurde von Chakraborty und Kollegen 2012 die Einordnung der ROs überarbeitet (s. Tabelle 1.4).¹⁶⁶ Hierbei wurde die dynamische Einteilung von Kweon *et al.*¹⁶⁷ als Grundlage verwendet und zusätzlich zur Sequenzhomologie der unterschiedlichen α -Untereinheiten und der Art der Redoxpartner auch der evolutionäre Ursprung der Dioxygenase zur Klassifizierung herangezogen.

Tabelle 1.4: Klassifizierungsschema für Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (mod. nach ^{166,167})

Klasse	Struktur			Reduktase	Beispiel
	Oxygenase α	β	Ferredoxin F		
I α		-	-	FNRc⁺ [FAD/FMN] [NAD][2Fe-2S] _{PI}	Phthalat Dioxygenase (<i>P. cepacia</i> DB01)
I $\alpha\beta$		β	-		Anilin Dioxygenase (<i>Actinobacter</i> sp. YAA)
II α		-	-	FNRn⁺⁺ [2Fe-2S] _{PI} [FAD/FMN][NAD]	-
II $\alpha\beta$		β			Benzoat 1,2-Dioxygenase (<i>Actinobacter</i> sp. ADP1)
III α	[2Fe-2S] _{Rsk} [*] [Fe ⁺²]	-	Rsk	FNRn [2Fe-2S] _{PI} [FAD/FMN][NAD]	Carbazol 1,9a-Dioxygenase (<i>P. resinovorans</i> CA10)
III $\alpha\beta$		β	[2Fe-2S] _{Rsk}		Naphthalen Dioxygenase (<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 9816-4)
IV α		-	Rsk	GR⁺⁺⁺ [FAD-NAD]	-
IV $\alpha\beta$		β	[2Fe-2S] _{Rsk}		Toluol Dioxygenase (<i>Pseudomonas putida</i> F1)
V $\alpha\beta$		β	3F4S [3Fe-4S]	GR [FAD-NAD]	Phenanthren Dioxygenase (<i>Nocardioides</i> sp. KP7)
VI $\alpha\beta$		β	Rub [Fe] _{Rub} ^{***}	n. d.	-
VII $\alpha\beta$		-	PI [2Fe-2S] _{PI} ^{**}	GR [FAD-NAD]	-

* [2Fe-2S]_{Rsk} = Cys₂His₂-Koordination des Eisen-Schwefelclusters (*Rieske type*); * [2Fe-2S]_{PI} = Cys₄-Koordination des Eisen-Schwefelclusters (*Plant type*); *** [Fe]_{Rub} = Cys₄-Koordination des Eisens (*Rubredoxin*); + FNRc = Ferredoxin-NAD Reduktase mit [2Fe-2S]_{PI} am C-Terminus; ++ FNRn = Ferredoxin-NAD Reduktase mit [2Fe-2S]_{PI} am N-Terminus; +++ GR = Glutathion Reduktase; n. d.: unbekannt Redoxpartner.

Wie bereits aus der Klassifizierung der ROs hervorgeht, spielen Eisen-Schwefelcluster in der Familie der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen eine entscheidende Rolle beim Transport der Elektronen zum mononuklearen, katalytischen Eisen. Neben [3Fe-4S] Clustern sind bei den Dioxygenasen hauptsächlich [2Fe-2S] Eisen-Schwefelcluster vertreten.¹⁶⁸ Diese können aufgrund ihrer Koordination in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden: [2Fe-2S] aus Pflanzen werden über vier Cystein-Reste koordiniert, Rieske Eisen-Schwefelcluster hingegen über je zwei Histidine bzw. Cysteine. Ein konserviertes Sequenzmotiv CXHX₁₇CX₂H macht die Lokalisierung des Clusters möglich.¹⁶⁹ Im Fall der Rieske [2Fe-2S] wird jeweils ein Eisen über zwei Histidine bzw. zwei Cysteine koordiniert. Hierbei verbleibt das Cystein-gebundene Eisen, unabhängig vom Redoxzustand des restlichen Clusters, als Fe³⁺ vorliegen, das Histidin-gebundene Eisen hingegen wird bei der Reduktion des Clusters zu Fe²⁺ reduziert (s. Abbildung 1.13 A).^{170,171}

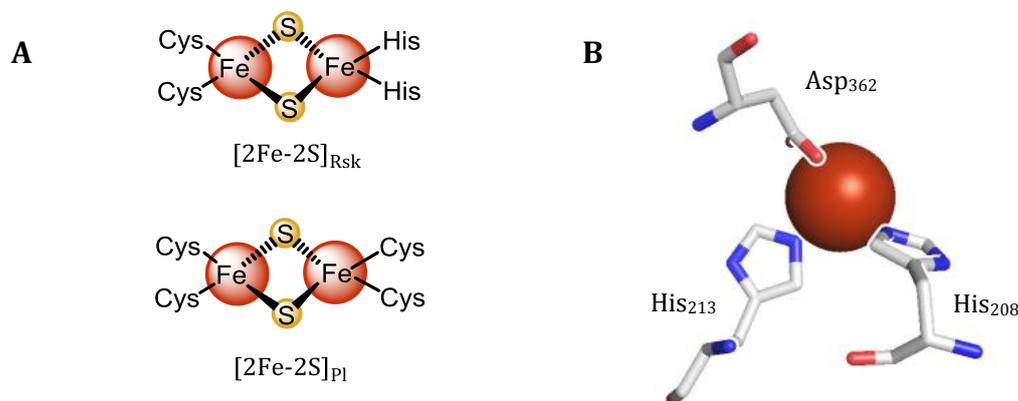


Abbildung 1.13: **A** Rieske Eisen-Schwefelcluster [2Fe-2S]_{Rsk} mit der Koordination durch Cys₂ und His₂ (oben) und pflanzliches Eisenschwefelcluster [2Fe-2S]_{Pl} mit der Koordination durch Cys₄ (unten); **B** Katalytische Triade der Naphthalen Dioxygenase (PDB: 107N) mit His₂₀₈ und His₂₁₃, sowie Asp₃₆₂ (Linien) und mononukleares Eisen (rot); mod. nach ^{172,173}

Die Reduktionspotentiale der Rieske Cluster reichen von -150 bis - 50 mV und zählen zu den pH-unabhängigen, niedrigen Redoxpotentialen.¹⁷⁴

Das katalytische Eisen wird in der α -Untereinheit der Oxygenase mittels einer His-His-Asp-Triade koordiniert. Diese Form der Koordination ist weit verbreitet und erstreckt sich von Extradiol-Catechol Dioxygenasen, α -Ketoglutarat-abhängigen Enzymen¹⁷⁵ und Pterin-abhängigen Hydroxylasen bis hin zu den Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen. In Abbildung 1.13 **B** ist das katalytische Eisen der Naphthalen

Dioxygenase mit den koordinierenden Aminosäuren His₂₀₈, His₂₁₃ und Asp₃₆₂ dargestellt.¹⁷² Der Abstand zwischen Eisen-Schwefelcluster und mononuklearem Eisen beträgt in der monomeren α -Untereinheit $\sim 44 \text{ \AA}$, bildet sich hingegen die Quartärstruktur aus, besteht zwischen dem [2Fe-2S] Cluster der benachbarten α -Untereinheit und dem katalytischen Eisen lediglich eine Distanz von $\sim 12 \text{ \AA}$. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Elektronentransfer hauptsächlich über ein Zusammenspiel zweier α -Untereinheiten verläuft.¹⁶⁹ Ein konservierter Aspartat-Rest fungiert hierbei sehr wahrscheinlich als Mediator für den Elektronentransport, indem Wasserstoffbrücken zwischen dem Histidin-Rest im Eisen-Schwefelcluster und einem Histidin-Rest in der Triade ausgebildet werden.¹⁷⁶ Ein oder zwei Wassermoleküle vervollständigen die Koordinationssphäre des Eisen-Atoms.^{155,177}

1.2.3 Mechanismus der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen

Obwohl bereits diverse strukturelle und spektroskopische Untersuchungen¹⁷⁸, sowie Experimente mit Substratanaloga durchgeführt wurden, ist der Mechanismus der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen immer noch nicht vollständig aufgeklärt (s. Abbildung 1.14).¹⁶⁹

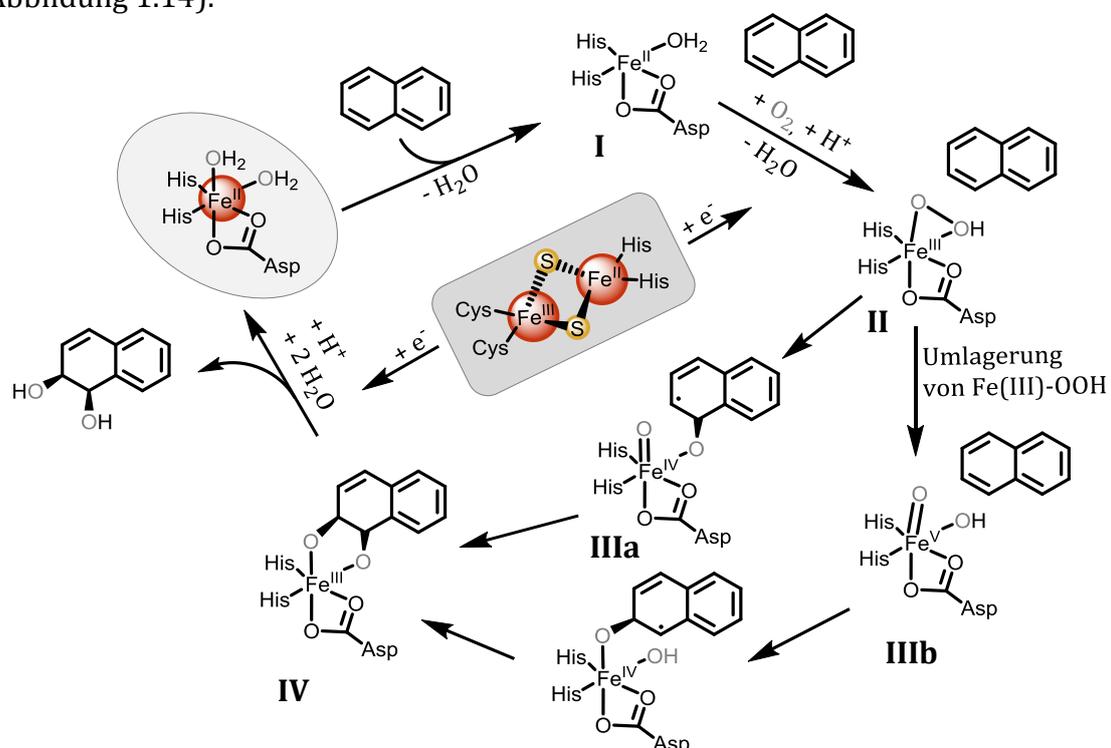


Abbildung 1.14: Möglicher Mechanismus der Dihydroxylierung durch Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (mod. nach ¹⁶⁹)

Die Herausforderungen liegen hierbei im sauerstoffsensitiven [2Fe-2S] Cluster und in der Abwesenheit eines eindeutig identifizierbaren Chromophors, wie es z. B. die Häm-Gruppe bei den P450-Monooxygenasen darstellt.¹⁶⁹ Anhand der bereits publizierten Daten und weiteren mechanistischen Hypothesen^{154,179,180} ist ein möglicher Mechanismus für die Dihydroxylierung im Folgenden diskutiert.

Als ersten Schritt im Mechanismus erfolgt die Bindung des Substrates Naphthalen, wodurch Wasser aus dem oktaedrisch koordinierten Eisen(II)-Komplex eliminiert wird (**I**). Durch die Bindung des Sauerstoffs und dem vom Rieske Cluster übertragenen Elektron auf das mononukleare Eisen entsteht ein Eisen(III)peroxid-Komplex (**II**), welcher nach Deprotonierung und Abspaltung von Wasser mittels röntgenkristallographischen Untersuchungen¹⁵¹ bereits beobachtet werden konnte. Ausgehend von diesem Komplex gibt es zwei mögliche Reaktionswege: (1) Die Spaltung der O-O-Bindung mit gleichzeitiger Substratoxidation führt zur Bildung eines Fe(IV)=O-Komplexes (**IIIa**), welcher als Analogon zum Komplex II in P450 Monooxygenasen beschrieben ist¹⁵¹ oder (2) die O-O-Spaltung findet vor der Oxidation des Substrates statt und führt zur Bildung eines Fe(V)=O(OH)-Komplexes (**IIIb**), welcher als Analogon zum Komplex I beschrieben ist.¹⁵¹ In beiden Fällen wird aus dem zunächst radikalischen Hydroxynaphthalen-Intermediat ein Eisen(III)-Alkoxyhydroxynaphthalen-Komplex (**IV**).^{154,179,180} Die Übertragung des zweiten Elektrons durch das Eisen-Schwefelcluster führt zur Reduktion des Eisens und zur Protonierung des Alkoxids, wodurch Naphthalen-Dihydrodiol als Produkt entlassen und der Ruhezustand des Enzyms wiederhergestellt wird.

Ob die Bildung des Fe(IV)- bzw. Fe(V)-Komplexes im Fall der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen für die Katalyse überhaupt notwendig ist, bleibt jedoch eine offene Frage. In 2013 haben Liu und Kollegen mit der Synthese von Fe(III)-OOH-Komplexen gezeigt, dass diese Spezies ausreichend elektrophil ist, um direkt mit Naphthalen zu reagieren.¹⁸¹ Im Zusammenspiel mit der Proteinumgebung ist im aktiven Zentrum der ROs neben der vorliegenden Eisenspezies auch das [2Fe-2S] Cluster von zentraler Bedeutung. So ist die Sauerstoffaktivierung und Substratumsatzung nur dann möglich, wenn sowohl das Rieske Cluster auch als das mononukleare Eisen reduziert vorliegen und sich Substrat in der aktiven Tasche

befindet.¹⁸² Durch weitere Untersuchungen mittels NIR-MCD² konnten Konformationsänderungen des Eisen-Schwefelclusters durch unterschiedliche Redoxzustände beobachtet werden.¹⁷⁸ Liegt das Rieske Cluster oxidiert vor, ist das Eisen(II) oktaedrisch mit einem schwachen, axialen Liganden koordiniert. Wird das Eisen-Schwefelcluster reduziert, wird der axiale Ligand stabilisiert, woraus eine stabilere Gesamtkoordination resultiert. Bei der Bindung des Substrates wird der oktaedrische Koordinationszustand in eine quadratisch pyramidale Geometrie mit der Koordinationszahl 5 überführt und Wasser wird eliminiert. Wird nun das Rieske Cluster reduziert, tritt eine Mischung unterschiedlicher Ligandenanordnung (1:2 Mischung aus trigonal bipyramidal und quadratisch pyramidal) um das Eisen auf. Diese Konformationsänderungen führen dazu, dass vor der Bindung und Aktivierung des Sauerstoffs sowohl zwei Elektronen als auch das Substrat anwesend sein müssen. Dieser Mechanismus stellt somit sicher, dass keine reaktiven Sauerstoffspezies gebildet oder entlassen werden können.

Obwohl der Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte anhand einer Reihe von kristallografischen Untersuchungen die absolute Selektivität für die Bildung von cis-Diolen festgestellt werden. Neben zahlreichen anderen Kristallstrukturen wurde die Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 ebenfalls mit *side-on bound* Sauerstoff kokristallisiert (PDB: 1O7N), weshalb auf einen Angriff des Sauerstoffs von lediglich einer Seite der Doppelbindung geschlossen werden kann.¹⁸³

1.2.4 Protein engineering der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen

Protein engineering beschreibt die Veränderung einer existierenden Proteinstruktur, um eine Verbesserung hinsichtlich der Zielanwendung zu erreichen.¹⁸⁴ Hierbei sind das rationale Proteindesign und die gerichtete Evolution zwei weit verbreitete Strategien. Auch im Bereich der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs) gibt es zahlreiche Beispiele für erfolgreiches Protein-Engineering.

Mittels der Naphthalen Dioxygenase (NDO) von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 konnten unter Zuhilfenahme der 19 vorhandenen Kristallstrukturen wichtige Positionen wie z. B. die Reste His208, His213 und Asp362 identifiziert werden, welche für die Koordination des mononuklearen Eisens verantwortlich sind.¹⁷² Des

² engl. für Nahinfrarotspektroskopie (NIR) gekoppelt mit magnetischem Röntgenschwächungs (MCD)

Weiteren wurde durch ortsgerichtete Mutagenese der essentielle Einfluss der Position 205 auf den Elektronentransfer durch Parales *et al.* (1999) beschrieben.¹⁷⁶ Auch die Steuerung der Stereoselektivität für die Hydroxylierung von aromatischen Systemen durch die Position F352 wurde durch die Generierung von Punktvarianten ermittelt.¹⁸⁵ Neben hydrophoben Aminosäuren (Ala, Gly, Val, Ile, Leu) wurde auch Threonin gegen Phenylalanin ausgetauscht und eine dem Wildtyp gegenläufige Regioselektivität beobachtet. Zusätzlich wurde von Seo und Kollegen die Position F224 als Schlüsselposition für die Erweiterung des Substratraumes hinsichtlich der Hydroxylierung von Flavonoiden über kristallographische Daten entdeckt.¹⁵⁸ Mit einer Sättigungsmutagenese an dieser Position konnte ein Umsatz von 24 % des eingesetzten Flavanons zu 8-OH-(2*S*)-Flavanon mit der Variante F224Y beobachtet werden.

Der teils starke Einfluss von einzelnen Positionen auf das Substratspektrum wird darüber hinaus am Beispiel der Biphenyl Dioxygenase (BPDO) von *Burkholderia xenoverans* LB400 deutlich.¹⁸⁶ Als Ergebnis der gerichteter Evolution wurde eine Doppelvariante T335A/F336M generiert, welche ein wesentlich breiteres Panel an chlorierten Aromaten umsetzen konnte als der Wildtyp der BPDO. Auch bei der gerichteten Evolution der Toluol Dioxygenase (TDO) von *Pseudomonas putida* ML2 konnte hinsichtlich der Umsetzung von 4-Picolin zu 3-Hydroxy-4-Picolin eine 6-fache Steigerung zum Wildtyp-Enzym beobachtet werden.¹⁸⁷ Mittels eines *DNA Shuffling* Ansatzes wurde außerdem die Aktivität der BPDO bezüglich einer Reihe von polyzyklischen Aromaten um bis zu 200-fach gegenüber dem Ursprungsenzym gesteigert.¹⁸⁸ Des Weiteren zeigten Gally *et al.* (2015) mit der Untersuchung eines vielfältigen Substratpanels die hohe Flexibilität der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen bezüglich unterschiedlicher Terpengeometrien.¹⁸⁹ Mit der Punktvariante M232A der Cumol Dioxygenase (CDO) aus *Pseudomonas fluorescens* IP01 konnte der Substratraum der ROs auf nicht-planare, nicht-aromatische Moleküle ausgeweitet werden. Hierbei wurden neben der regio- und stereoselektiven Hydroxylierung des Monoterpenes *R*-Limonen zu 1*R*,5*S*-Carveol (> 98 %*ee*) auch die Dihydroxylierung des sphärischen Monoterpens (+)- α -Pinen mit einer Produktbildung von 33 ± 7 % beobachtet. Der deutliche Einfluss der Geometrie der aktiven Tasche der RO konnte auch bei der Untersuchung des linearen Olefins Myrcen gezeigt werden. Hierbei wies die Punktvariante CDO_M232A das monohydroxylierte 2-Methyl-6-

methylenocta-2,7-dien-1-ol als Hauptprodukt auf, wohingegen bei der Umsetzung von Myrcen mit dem NDO Wildtyp eine Mischung aus 1,2- und 3,10-Dihydroxymyrcen beobachtet wurde.

Neben unterschiedlichen Mutageneseansätzen, konnte für nah verwandte Dioxygenasen wie NDO und 2-Nitrotoluol Dioxygenase bzw. 2,4-Dinitrotoluol Dioxygenase weiterhin gezeigt werden, dass Hybride zwischen α - und β -Untereinheiten der unterschiedlichen Enzyme eine veränderte Substratspezifität aufweisen.^{190,191} Auch mit dem Austausch der β -Untereinheit der Toluol Dioxygenase durch die β -Untereinheit der Toluat Dioxygenase bzw. anderen Biphenyl Dioxygenasen wurde eine Veränderung der Substratspezifität beobachtet.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Daher stellen auch die Kombination der einzelnen Teile der Multikomponentensysteme wichtige Stellschrauben für das *protein engineering* dar.¹⁹⁶

1.3 Motivation

Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs) sind in mehrfacher Hinsicht interessante Biokatalysatoren mit einem breiten Anwendungsbereich. Diese effizienten Multienzymkomplexe katalysieren in Bakterien den ersten Schritt im Abbau von Aromaten und stellen somit wichtige Schlüsselenzyme für die Energiegewinnung und die Erschließung von C-Quellen dar. Grundsätzlich ist die gezielte Oxyfunktionalisierung von Kohlenwasserstoffen eine sehr interessante und nützliche Reaktion in der Chemie. Als Biokatalysatoren mit breitem Substratspektrum und vielseitigem Reaktionsraum sind ROs deshalb eine potentielle Alternative zur klassischen Chemie (Sharpless AD).

Ziel dieser Arbeit war ein besseres Verständnis der Steuerung der Reaktions- und Substratspezifität, sowie der Regio- und Stereoselektivität der Naphthalen Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 zu generieren. Als Vertreter für die große Familie der ROs wurde die NDO ausgewählt, da bereits zahlreiche Kristallstrukturen dieses Enzyms vorliegen, welche für einen semi-rationalen Designansatz notwendig sind. Durch die systematische Analyse der aktiven Tasche sollten wichtige Struktur-/Funktionszusammenhänge identifiziert werden. Des Weiteren sollte eine Erweiterung des Substratraumes hinsichtlich der Umsetzung von nicht-planaren, nicht-aromatischen Substraten erreicht werden. Zum Erreichen

dieses Ziels sollte zunächst die heterologe Expression des Biokatalystors in *Escherichia coli* sowohl *in vitro* als auch *in vivo* optimiert und im Weiteren der Einfluss von Enzymvarianten auf ein geeignetes Substratpanel untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien wurden in mindestens analysenreiner Qualität von den Firmen Sigma Aldrich (Steinheim, DE), Carl Roth (Karlsruhe, DE), Merck sowie VWR (Darmstadt, DE), Alfa Aesar (Karlsruhe, DE) und Serva (Heidelberg, DE) bezogen.

In Tabelle 2.1 sind gesondert verwendete Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Verwendung	Chemikalie	Herkunft
Detektion von DNA	peqGREEN Fluoreszenzfarbstoff	VWR, Erlangen, DE
Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese	6x DNA-Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Größenstandard für Agarosegelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Größenstandard für SDS-PAGE	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
Sekundärer Antikörper	Pierce® Goat Anti-Rabbit IgG, Peroxidase conjugated	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

In Tabelle 2.2 sind die in der Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2.2: Verzeichnis der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Verwendung	Gerät	Herkunft
Expression	Inkubationsschüttler Multitron/Pro	Infors AG, Bottmingen, CH
	Multifors 2 Parallelbioreaktoren	Infors AG, Bottmingen, CH
Proteinreinigung	His GraviTrap™ Talon®-Säulen	GE Healthcare, Chicago, US
Dialyse	Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren	Sartorius, Göttingen, DE
Zentrifugation	Eppendorf Zentrifuge 5416	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Inkubation von Reaktionsansätzen	Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Detektion von Chemilumineszenz	Fusion-SL-Dokumentationssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE

2.2 Verwendete Enzyme, Plasmide und Oligonukleotide

In Tabelle 2.3 sind die in der Arbeit verwendeten Enzyme und Kits aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verzeichnis der verwendeten Enzyme und Kits

Verwendung	Enzym/Kit	Herkunft
Ortsgerichtete Mutagenese	KOD HotStart-Polymerase	Novagen®, Darmstadt, DE
Restriktion	<i>DpnI, NcoI, HindIII, NdeI, XmaI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Isolierung von Plasmid-DNA	Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Irvine, US
Aufreinigung von Plasmid-DNA	DNA Clean and Concentrator™	Zymo Research, Irvine, US
Bestimmung der Proteinkonzentration	Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Gelextraktion von DNA	Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Irvine, US

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den in Tabelle 2.4 beschriebenen Plasmiden gearbeitet.

Tabelle 2.4: Verzeichnis der verwendeten Plasmide

Plasmid	Größe [bp]	Charakteristik	Herkunft
pDTG141	6192	Amp ^R Gencluster aus <i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 9816-4 <i>nahAaAbAcAd</i> (<i>nahAa</i> : Reduktase; <i>nahAb</i> : Ferredoxin; <i>nahAc</i> : α -Untereinheit der Oxygenase; <i>nahAd</i> : β -Untereinheit der Oxygenase) T7-Promotor; Plasmidrückgrat von pT7-5	197
pT7-7	2481	Amp ^R T7-Promotor; Replikationsursprung <i>ColE1</i>	198
pIP107D	7670	Amp ^R Gencluster aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> IP01 <i>cumA1A2A3A4</i> (<i>cumA1</i> : α -Untereinheit der Oxygenase, <i>cumA2</i> : β -Untereinheit der Oxygenase, <i>cumA3</i> : Ferredoxin, <i>cumA4</i> : Reduktase) <i>lac</i> -Promotor; Plasmidrückgrat von pUC118	199
pJRM501	8276	Amp ^R , Tet ^R Gencluster der Benzol Dioxygenase aus <i>Pseudomonas putida</i> ML2 <i>bedC1C2BA</i> (<i>bedC1</i> : α -Untereinheit der Oxygenase, <i>bedC2</i> : β -Untereinheit der Oxygenase, <i>bedB</i> : Ferredoxin, <i>bedA</i> : Reduktase) <i>tac</i> -Promotor; Plasmidrückgrat von pKK223-3	199

pT7_BPDO	6576	Amp ^R Gencluster der Biphenyl Dioxygenase aus <i>Burkholderia xenoverans</i> LB400 <i>bphA1A2A3A4</i> (<i>bphA1</i> : α -Untereinheit der Oxygenase, <i>bphA2</i> : β -Untereinheit der Oxygenase, <i>bphA3</i> : Ferredoxin, <i>bphA4</i> : Reduktase) T7-Promotor; Plasmidrückgrat von pT7-5	GeneArt®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
pDTG601		Amp ^R Gencluster der Toluol Dioxygenase aus <i>Pseudomonas putida todC1C2BA</i> (<i>todC1</i> : α -Untereinheit der Oxygenase, <i>todC2</i> : β -Untereinheit der Oxygenase, <i>todA</i> : Ferredoxin, <i>todB</i> : Reduktase) T7-Promotor; Plasmidrückgrat von pT7-5	200
pQE31_NahAcAd	5386	Amp ^R pQE31_NahAcAd mit N-terminalem His-Tag an der α -Untereinheit der NDO T5-Promotor; Plasmidrückgrat von pQE31	Vorarbeiten am ITB
pQE31_NahAb	3752	Amp ^R pQE31_NahAb mit N-terminalem His-Tag am Ferredoxin der NDO T5-Promotor; Plasmidrückgrat von pQE31	Vorarbeiten am ITB
pQE31_NahAa	4424	Amp ^R pQE31_NahAa mit N-terminalem His-Tag an der Reduktase der NDO T5-Promotor; Plasmidrückgrat von pQE31	Vorarbeiten am ITB
pETDuet TM -1	5420	Amp ^R 2x T7-Promotor; Replikationsursprung <i>ColE1</i>	Novagen®, Darmstadt, DE
pCOLADuet TM -1	3719	Kan ^R 2x T7-Promotor; Replikationsursprung <i>ColA</i>	Novagen®, Darmstadt, DE
pETDuet_NahAaAb	6516	Amp ^R Reduktase und Ferredoxin der NDO T7-Promotor; Plasmidrückgrat von pETDuet TM -1	Diese Arbeit
pETDuet_NahAa	6334	s. pETDuet_NahAaAb ohne Ferredoxin	Diese Arbeit
pCOLADuet_NahAcAd	5453	Kan ^R α - und β -Untereinheit der NDO T7-Promotor; Plasmidrückgrat von pCOLADuet TM -1	Diese Arbeit
pCOLADuet_NahAc	5001	s. pCOLADuet_NahAcAD ohne β -Untereinheit	Diese Arbeit

Im nachfolgenden Abschnitt sind die Plasmidkarten der in der Arbeit verwendeten Konstrukte dargestellt (s. Abbildung 2.1-6). Die Gensequenzen befinden sich im Anhang unter Kapitel 6.1.

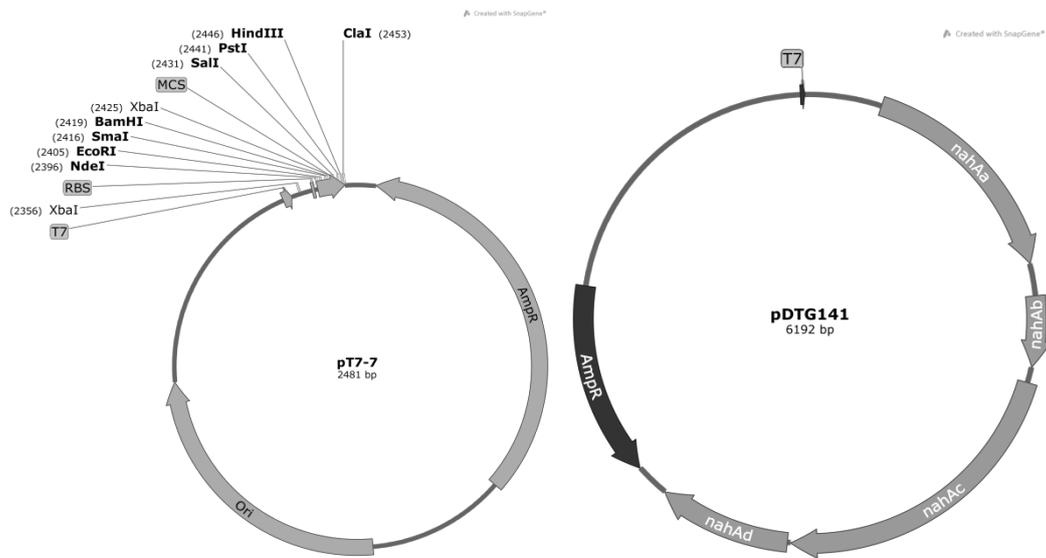


Abbildung 2.1: Plasmidkarte von pT7-7 (Leervektor mit 2481 bp; T7-Promotor: 2318-2337 bp, RBS: 2384-2389 bp, MCS: 2397-2455 bp, Amp^R: 42-902 bp, *ColE1* ori: 1207-1826 bp)¹⁹⁸ und pDTG141 mit dem Gencluster der Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (6192 bp; T7-Promotor: 6151-6170 bp, *nahAa*: 317-1303 bp, *nahAb*: 1447-1761 bp, *nahAc*: 1832-3181 bp, *nahAd*: 3196-3780 bp, Amp^R: 3930-4790 bp)¹⁹⁷

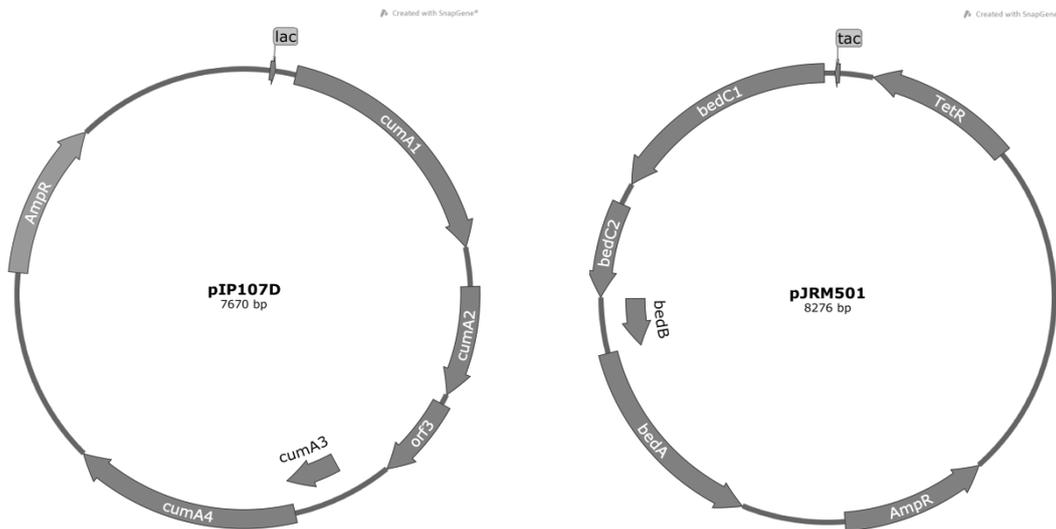


Abbildung 2.2: Plasmidkarte von pIP107D mit dem Gencluster der Cumol Dioxygenase aus *Pseudomonas fluorescens* IP01 (7670 bp; lac-Promotor: 143-172 bp, *cumA1*: 284-1663 bp, *cumA2*: 1878-2483 bp, *cumA3*: 3231-3560 bp, *cumA4*: 3557-4792 bp, Amp^R: 5870-6730 bp)¹⁹⁹ und pJRM501 mit dem Gencluster der Benzen Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* ML2 (8276 bp; tac-Promotor: 43-71 bp, *bedA*: 4646-5878 bp, *bedB*: 5878-6201 bp, *bedC1*: 6904-8256 bp, *bedC2*: 6210-6773 bp, Tet^R: 267-1157 bp, Amp^R: 3177-4037 bp)¹⁹⁹

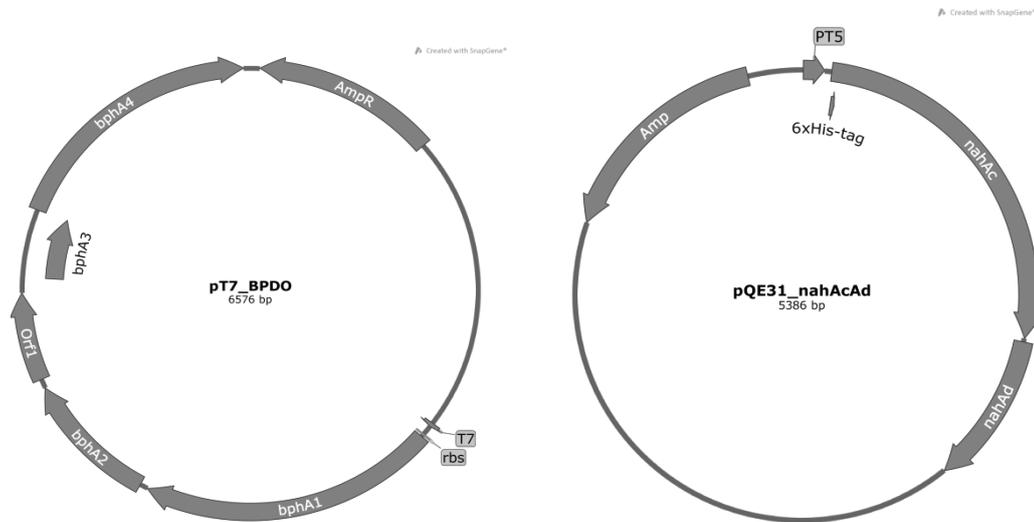


Abbildung 2.3: Plasmidkarte von pT7_BPDO mit dem Gencluster der Biphenyl Dioxygenase aus *Burkholderia xenoverans* LB400 (6576 bp; T7-Promotor: 2318-2337 bp, RBS: 2384-2388 bp, *bphA1*: 2398-3777 bp, *bphA2*: 3815-4455 bp, *bphA3*: 4994-5323 bp, *bphA4*: 5320-6546 bp, Amp^R: 45-902 bp) von GeneArt® und pQE31_NahAcAd mit der His-getaggtten α- und β-Untereinheit der Naphthalen Dioxygenase (5386 bp; T5-Promotor: 7-87 bp, *NahAc_{His}*: 115-1512 bp, *NahAb*: 1527-2111 bp, Amp^R: 4321-5181 bp)

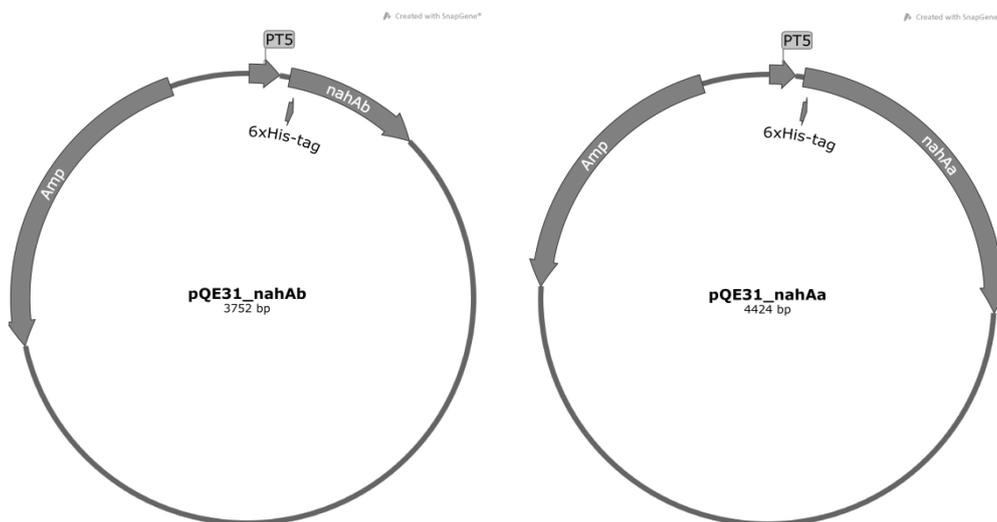


Abbildung 2.4: Plasmidkarte von pQE31_NahAb mit dem N-terminal His-getaggtten Ferredoxin der Naphthalen Dioxygenase (3752 bp; T5-Promotor: 7-87 bp, *NahAb_{His}*: 115-1512 bp, Amp^R: 2687-3547 bp) und pQE31_NahAa mit der N-terminal His-getaggtten Reduktase der Naphthalen Dioxygenase (4424 bp; T5-Promotor: 7-87 bp, *NahAa_{His}*: 115-1149 bp, Amp^R: 3359-4219 bp)

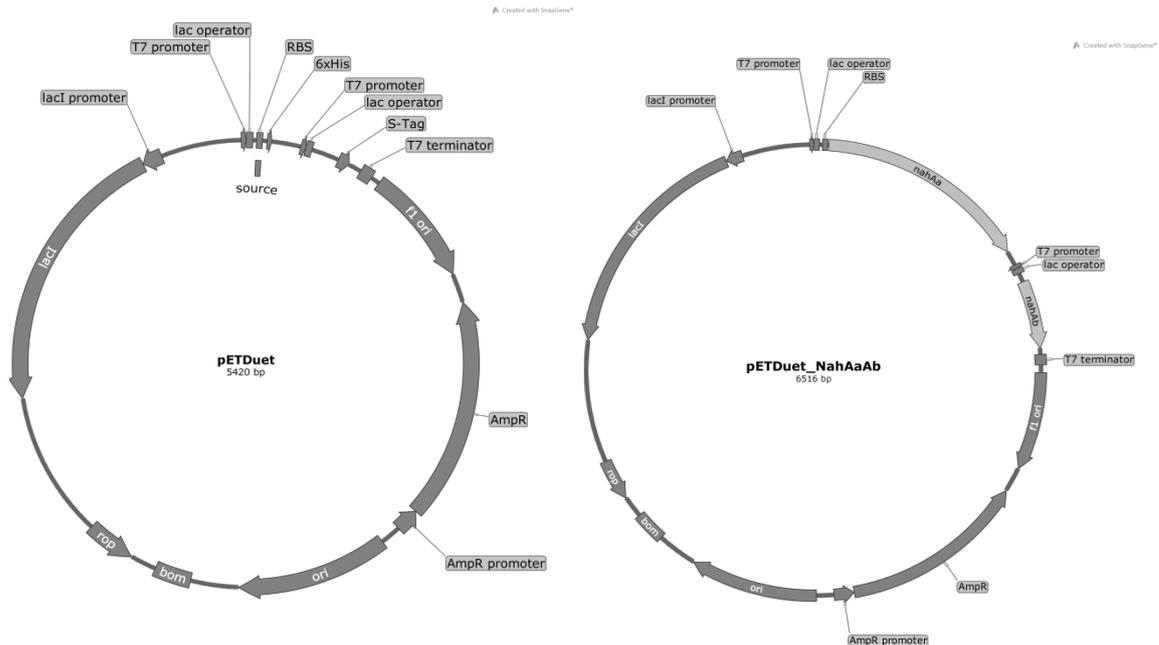


Abbildung 2.5: Plasmidkarte von pETDuet™-1 (Leervektor mit 5420 bp; T7-Promotor-1: 5404-5420 bp, MCS-1: 69-168 bp, T7-Promotor-2: 214-230 bp, MCS-2: 297-438 bp, *ColE1* ori: 547-994 bp, Amp^R: 1119-1976 bp) und pETDuet_NahAaAb mit der Reduktase und Ferredoxin der Naphthalen Dioxygenase (6516 bp; T7-Promotor-1: 6500-2 bp, *NahAa*: 71-1057 bp, T7-Promotor-2: 1128-1146 bp, *NahAb*: 1214-1528 bp, Amp^R: 2212-3072 bp)

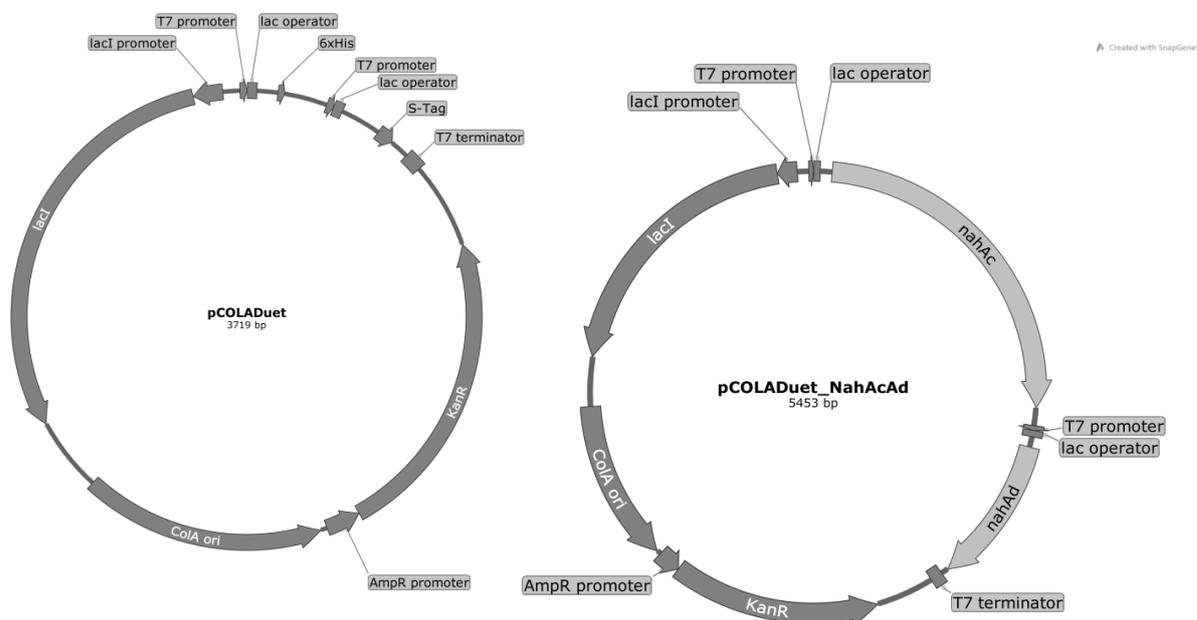


Abbildung 2.6: Plasmidkarte von pCOLADuet™-1 (Leervektor mit 3719 bp; T7-Promotor-1: 3730-3719 bp, MCS-1: 68-168 bp, T7-Promotor-2: 214-230 bp, MCS-2: 297-438 bp, *ColA* ori: 1664-2299 bp, Kan^R: 739-1554 bp) und pETDuet_NahAcAd mit α - und β -Untereinheit der Naphthalen Dioxygenase (5453 bp; T7-Promotor-1: 5437-2 bp, *NahAc*: 75-1424 bp, T7-Promotor-2: 1496-1514 bp, *NahAd*: 1582-2166 bp, Kan^R: 2473-3288 bp)

Oligonukleotide

Sämtliche in der Arbeit beschriebenen Oligonukleotide wurden von Metabion International AG (Planegg, DE) synthetisiert. In Tabelle 2.5 sind die für die ortsspezifische Mutagenese verwendeten Oligonukleotide basierend auf der Templat-DNA pDTG141 dargestellt.

Tabelle 2.5: Verzeichnis der für die ortsspezifische Mutagenese verwendeten Oligonukleotide (basierend auf Distanz zum kokristallisierten Substrat Inden in PDB 107N (4 - 6 Å), Hydrophobizität der ausgetauschten Aminosäuren (G/A/V/I) und sterischen Effekten; Austausch in fett dargestellt)

Pos.	Name	Sequenz in 5' → 3' (Primer forward/Primer reverse)
1	JDE_NDO_F202G	CCC GCG GAA AAC GGT GTG GGA GAT GCA TAC/ GTA TGC ATC TCC CAC ACC GTT TTC CGC GGG
2	JDE_NDO_F202A	CCC GCG GAA AAC GCT GTG GGA GAT GCA TAC/ GTA TGC ATC TCC CAC AGC GTT TTC CGC GGG
3	JDE_NDO_F202V	CCC GCG GAA AAC GTT GTG GGA GAT GCA TAC/ GTA TGC ATC TCC CAC AAC GTT TTC CGC GGG
4	JDE_NDO_F202I	CCC GCG GAA AAC ATT GTG GGA GAT GCA TAC/ GTA TGC ATC TCC CAC AAT GTT TTC CGC GGG
5	JDE_NDO_H295A	GGA TTT ATC GCA GCG CCC TCA ACT GCA CCG/ CGG TGC AGT TGA GGG CGC TGC GAT AAA TCC
6	JDE_NDO_H295V	GGA TTT ATC GCA GCG TCC TCA ACT GCA CCG/ CGG TGC AGT TGA GGA CGC TGC GAT AAA TCC
7	JDE_NDO_H295I	GGA TTT ATC GCA GCA TCC TCA ACT GCA CCG/ CGG TGC AGT TGA GGA TGC TGC GAT AAA TCC
8	JDE_NDO_N297A	C AGC CAC CTC GCC TGC ACC GTT TTC CCG AAC/ GTT CGG GAA AAC GGT GCA GGC GAG GTG GCT G
9	JDE_NDO_N297V	C AGC CAC CTC GTC TGC ACC GTT TTC CCG AAC/ GTT CGG GAA AAC GGT GCA GAC GAG GTG GCT G
10	JDE_NDO_N297I	C AGC CAC CTC ATC TGC ACC GTT TTC/ GAA AAC GGT GCA GAT GAG GTG GCT G
11	JDE_NDO_F352A	CTG TTC AGC GAA CGG CAG GGC CTG CTG/ CAG CAG GCC CTG CCG TTC GCT GAA CAG
12	JDE_NDO_F352V	GTT CAG CGA ACG GTG GGG CCT GCT GGC TTC/ GAA GCC AGC AGG CCC CAC CGT TCG CTG AAC
13	JDE_NDO_F352I	GTT CAG CGA ACG ATT GGG CCT GCT GGC TTC/ GAA GCC AGC AGG CCC AAT CGT TCG CTG AAC
14	JDE_NDO_A206G	CTT TGT GGG AGA TGG ATA CCA CGT GGG TTG/ CAA CCC ACG TGG TAT CCA TCT CCC ACA AAG
15	JDE_NDO_A206V	CTT TGT GGG AGA TGT ATA CCA CGT GGG TTG/ CAA CCC ACG TGG TAT ACA TCT CCC ACA AAG
16	JDE_NDO_A206I	CTT TGT GGG AGA TAT ATA CCA CGT GGG TTG/ CAA CCC ACG TGG TAT ATA TCT CCC ACA AAG
17	JDE_NDO_V209A	GAG ATG CAT ACC ACG AGG GTT GGA C/ G TCC AAC CCT CGT GGT ATG CAT CTC
18	JDE_NDO_V209G	GAG ATG CAT ACC ACG GCG GTT GGA CGC/ GCG TCC AAC CGC CGT GGT ATG CAT CTC
19	JDE_NDO_V209I	GAG ATG CAT ACC ACA TTG GTT GGA CGC ACG/ CGT GCG TCC AAC CAA TGT GGT ATG CAT CTC

Material und Methoden

20	JDE_NDO_L253A	GGC ATG GGT GTG GCG TGG GAC GGA TAT TCA GG/ CC TGA ATA TCC GTC CCA CGC CAC ACC CAT GCC
21	JDE_NDO_L253V	GGC ATG GGT GTG GTG TGG GAC GGA TAT TCA GG / CC TGA ATA TCC GTC CCA CAC CAC ACC CAT GCC
22	JDE_NDO_L253I	GGC ATG GGT GTG ATC TGG GAC GGA TAT TCA GG/ CC TGA ATA TCC GTC CCA GAT CAC ACC CAT GCC
23	JDE_NDO_L307A	CAA CAG CAT GGT GAC CTG CTC GGG TG/ CA CCC GAG CAG GTC ACC ATG CTG TTG
24	JDE_NDO_L307V	CAA CAG CAT GGT CAC CTG CTC GGG TG/ CA CCC GAG CAG GTC ACC ATG CTG TTG
25	JDE_NDO_L307I	CAA CAG CAT GAT TAC CTG CTC GGG TG/ CA CCC GAG CAG GTC ATC ATG CTG TTG
26	JDE_NDO_G204A	GAA AAC TTT GTG GCT GAT GCA TAC CAC GTG/ CAC GTG GTA TGC ATC AGC CAC AAA GTT TTC
27	JDE_NDO_G204V	GAA AAC TTT GTG GTG GAT GCA TAC CAC/ GTG GTA TGC ATC CAC CAC AAA GTT TTC
28	JDE_NDO_G204I	GAA AAC TTT GTG ATT GAT GCA TAC CAC GTG/ GAA AAC TTT GTG ATT GAT GCA TAC CAC GTG
29	JDE_NDO_F224A	TCG GGG GAG TCT ATC GCC TCG TCG CTC GCT GGC/ GCC AGC GAG CGA CGA GGC GAT AGA CTC CCC CGA
30	JDE_NDO_F224V	TCG GGG GAG TCT ATC GTC TCG TCG CTC GCT GGC/ GCC AGC GAG CGA CGA GAC GAT AGA CTC CCC CGA
31	JDE_NDO_F224I	TCG GGG GAG TCT ATC ATC TCG TCG CTC GCT GGC/ GCC AGC GAG CGA CGA GAT GAT AGA CTC CCC CGA
32	JDE_NDO_V260A	GGA TAT TCA GGT GCG CAT AGC GCA GAC TTG/ CAA GTC TGC GCT ATG CGC ACC TGA ATA TCC
33	JDE_NDO_V260G	GGA TAT TCA GGT GGG CAT AGC GCA GAC TTG/ CAA GTC TGC GCT ATG CCC ACC TGA ATA TCC
34	JDE_NDO_V260I	GGA TAT TCA GGT ATC CAT AGC GCA GAC TTG/ CAA GTC TGC GCT ATG GAT ACC TGA ATA TCC
35	JDE_NDO_W358A	CTG CTG GCT TCG CGG AAA GCG ACG ACA ATG/ CAT TGT CGT CGC TTT CCG CGA AGC CAG CAG
36	JDE_NDO_W358V	CTG CTG GCT TCG TGG AAA GCG ACG ACA ATG/ CAT TGT CGT CGC TTT CCA CGA AGC CAG CAG
37	JDE_NDO_W358I	CTG CTG GCT TCA TTG AAA GCG ACG ACA ATG/ CAT TGT CGT CGC TTT CAA TGA AGC CAG CAG

In Tabelle 2.6 sind die für die ortsspezifische Mutagenese verwendeten Oligonukleotide basierend auf der Templat-DNA pQE31_NahAcAd dargestellt.

Tabelle 2.6: Verzeichnis der für die ortsspezifische Mutagenese verwendeten Oligonukleotide (basierend auf der Konsensussequenz der „Iron sulfur proteins - Bet v1-like“-3DM-Datenbank von BioProduct)

Pos.	Name	Sequenz in 5' → 3' (Primer forward/Primer reverse)
1	JDE_NDO_A197F	C AAC TGG AAG TTT CCC GCG GAA AAC/ GTT TTC CGC GGG AAA CTT CCA GTT G
2	JDE_NDO_P198A	C TGG AAG GCA GCC GCG GAA AAC TTT G/ CAA AGT TTT CCG CGG CTG CCT TCC AG
3	JDE_NDO_V203C	CG GAA AAC TTT TGC GGA GAT GCA TAC C/ G GTA TGC ATC TCC GCA AAA GTT TTC CG
4	JDE_NDO_V203A	CG GAA AAC TTT GCG GGA GAT GCA TAC C/ G GTA TGC ATC TCC CGC AAA GTT TTC CG

5	JDE_NDO_G204S	G GAA AAC TTT GTG AGC GAT GCA TAC CAC/ GTG GTA TGC ATC GCT CAC AAA GTT TTC C
6	JDE_NDO_L217I	C GCG TCT TCG ATT CGC TCG GGG GAG/ CTC CCC CGA GCG AAT CGA AGA CGC G
7	JDE_NDO_R218L	CG TCT TCG CTT CTC TCG GGG GAG TC/ GA CTC CCC CGA GAG AAG CGA AGA CG
8	JDE_NDO_S219A	CT TCG CTT CGC GCG GGG GAG TCT ATC/ GAT AGA CTC CCC CGC GCG AAG CGA AG
9	JDE_NDO_M242F	CA GGC TTG CAA TTC ACC TCC AAA TAC GGC/ GCC GTA TTT GGA GGT GAA TTG CAA GCC TG
10	JDE_NDO_T243R	GC TTG CAA ATG CGC TCC AAA TAC GGC/ GCC GTA TTT GGA GCG CAT TTG CAA GC
11	JDE_NDO_S244A	C TTG CAA ATG ACC GCC AAA TAC GGC AGC/ GCT GCC GTA TTT GGC GGT CAT TTG CAA G
12	JDE_NDO_S248H	C TCC AAA TAC GGC CAC GGC ATG GGT GTG/ CAC ACC CAT GCC GTG GCC GTA TTT GGA G
13	JDE_NDO_M250S	GGC AGC GGC AGC GGT GTG TTG TG/ CA CAA CAC ACC GCT GCC GCT GCC
14	JDE_NDO_L253F	GG CAT GGG TGT GTT TTG GGA CGG ATA TTC/ GAA TAT CCG TCC CAA AAC ACA CCC ATG CC
15	JDE_NDO_W254F	C ATG GGT GTG TTG TTT GAC GGA TAT TCA G/ C TGA ATA TCC GTC AAA CAA CAC ACC CAT G
16	JDE_NDO_N297H	CGC AGC CAC CTC CAC TGC ACC GTT TTC CCG/ CGG GAA AAC GGT GCA GTG GAG GTG GCT GCG
17	JDE_NDO_V300I	CTC AAC TGC ACC ATT TTC CCG AAC AAC/ GTT GTT CGG GAA AAT GGT GCA GTT GAG
18	JDE_NDO_C309G	GC ATG CTG ACC GGC TCG GGT GTT TTC/ GAA AAC ACC CGA GCC GGT CAG CAT GC
19	JDE_NDO_S310T	G CTG ACC TGC ACC GGT GTT TTC AAA G/ C TTT GAA AAC ACC GGT GCA GGT CAG C
20	JDE_NDO_K314R	CG GGT GTT TTC CGT GTA TGG AAC CCG/ CGG GTT CCA TAC ACG GAA AAC ACC CG
21	JDE_NDO_N317H	C AAA GTA TGG CAC CCG ATC GAC GC/ GC GTC GAT CGG GTG CCA TAC TTT G
22	JDE_NDO_S360Q	GC TTC TGG GAA CAG GAC GAC AAT GAC/ GTC ATT GTC GTC CTG TTC CCA GAA GC
23	JDE_NDO_N363G	GAA AGC GAC GAC GGT GAC AAT ATG G/ C CAT ATT GTC ACC GTC GTC GCT TTC
24	JDE_NDO_D364E	GC GAC GAC AAT GAA AAT ATG GAA ACA G/ C TGT TTC CAT ATT TTC ATT GTC GTC GC
25	JDE_NDO_M366W	C AAT GAC AAT TGG GAA ACA GCT TCG/ CGA AGC TGT TTC CCA ATT GTC ATT G

In Tabelle 2.7 sind die für die Klonierungsarbeiten via *gibson assembly* benötigten Oligonukleotide aufgelistet.

Material und Methoden

Tabelle 2.7: Verzeichnis der die für die Klonierungsarbeiten via *gibson assembly (ga)* benötigten Oligonukleotide (fw: Primer *forward*; rv: Primer *reverse*)

Pos.	Name	Sequenz in 5' → 3'	Verwendung
1	JDE_pCOLA_Ac_fw	ACTTTAATAAGGAGATATACCATGGATG AATTACAATAATAAAATCTTGGTAAG	Amplifizierung von NahAc für <i>ga</i> in pCOLADuet
2	JDE_pCOLA_Ac_rv	TTAAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTTTA GCGATCAGTAGTCTTC	
3	JDE_pCOLA_Ad_fw	GTATAAGAAGGAGATATACATATG ATGATCAATATTCAAGAAGAC	Amplifizierung von NahAd für <i>ga</i> in pCOLADuet
4	JDE_pCOLA_Ad_rv	TGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCTAGGTCA CAGAAAGACCATCAG	
5	JDE_pETDuet_Aa_fw	ACTTTAAGAAGGAGATATACCATGG AACTCCTCATAACAACC	Amplifizierung von NahAa für <i>ga</i> in pETDuet
6	JDE_pETDuet_Aa_rv	TTAAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTCA GATCCCACCGGGATAG	
7	JDE_pETDuet_Ab_fw	GTATAAGAAGGAGATATACATATG ACAGTAAAGTGGATTGAAG	Amplifizierung von NahAb für <i>ga</i> in pETDuet
8	JDE_pETDuet_Ab_rv	TGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCTAGGTTA GCTCAAATCAATCATTACG	

In Tabelle 2.8 sind die für die Sequenzierung der hergestellten Plasmide benötigten Oligonukleotide aufgelistet.

Tabelle 2.8: Verzeichnis der für die Sequenzierung der hergestellten Plasmide benötigten Oligonukleotide (Sequenzierung durchgeführt durch GATC Biotech, Konstanz, DE)

Pos.	Name	Sequenz in 5' → 3'	Verwendung
1	CGA_pDTG141_1	GCCGACGAAATTGTCACTCAC	Sequenzierung von pDTG141
2	CGA_pDTG141_2	GCGATGGTTGAAGCGTTG	
3	CGA_pDTG141_3	GGTAAGTGAATCTGGTCTGAGC	
4	CGA_pDTG141_4	GCAAATGACCTCCAAATACGG	
5	CGA_pDTG141_5	CTCCAACCTGGGCTGAGTTC	
6	CGA_pDTG141_6	AAGCATTGGTAACTGTCAGACC	
7	JDE_pETDuet_seq1	CGATCTTCCCCATCGGTGATG	Sequenzierung von Duetvektoren
8	JDE_pETDuetA4A3_seq2	GTGAGCATCGGTGCAGAAC	
9	JDE_pCOLA_seq1	CATTCGATGGTGTCCGGGATC	
10	JDE_pCOLAA1A2_seq2	GGTGTATTGTCCAGCCTCC	
11	JDE_pCOLAA1A2_seq3	GGCAGATCTATGAGCCGAG	
12	JDE_pETDuetAaAb_seq2	GCGATTGCACAACTCGCC	
13	JDE_pCOLAAcAd_seq2	CAGGCTTGCAAATGACCTCC	
14	JDE_pCOLAAcAd_seq3	CCACGACTCTGCTTTGCAAC	
15	JDE_pETDuetAaAb_seq3	GTTCCGATTTAGTGCTTTACGGC	
16	JDE_pETDuetAaAb_seq4	GGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC	

Weitere Sequenzierprimer sind der Doktorarbeit von Christine Gally (2016) zu entnehmen.²⁰¹

Die generierten, mutagenen Plasmide sind im Anhang in Kapitel 6.2 beschrieben.

2.3 Verwendete Mikroorganismen

In Tabelle 2.9 sind die in der Arbeit verwendeten *Escherichia coli* - Wildtypstämme aufgeführt.

Tabelle 2.9: Verzeichnis der verwendeten *Escherichia coli* - Wildtypstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL-1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, DE
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>E. coli</i> JM109(DE3)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>relA1, supE44, λ-, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>], lDE3	Promega GmbH Mannheim, DE
<i>E. coli</i> M15(pREP4)	F-, Φ80Δ <i>lacM15, thi, lac-, mtl-, recA+</i> , Km ^R	Qiagen, Hilden, DE
<i>E. coli</i> Tuner™(DE3)pLysS	F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen®, Darmstadt, DE

E. coli XL-1 blue und *E. coli* DH5α wurden für die Propagierung von Plasmiden während der molekularbiologischen Arbeiten verwendet. *E. coli* JM109(DE3) wurde zur Expression der *in vivo* Plasmide eingesetzt und *E. coli* M15(pREP4) zur Expression der His-getaggten Einzelkomponenten des Dioxygenasesystems. pREP4 führt hierbei zur Expression des *lac*-Repressor Proteins, wodurch eine genaue Steuerung des T5-Promotors ermöglicht wird. Um den Selektionsdruck für pREP4 aufrechtzuerhalten, wurde während der Kultivierung Kanamycin (C_{End}: 25 µg/mL_{H2O}) hinzugegeben. *E. coli* Tuner™(DE3)pLysS wurde zur Expression der auf Duetvektoren klonierten Naphthalen Dioxygenase verwendet. Dieser Stamm ermöglicht ein regulierbares Expressionslevel der Zielproteine durch die Variation der Induktorkonzentration (IPTG). Zusätzlich wird durch die Co-Expression von pLysS T7-Lysozym exprimiert, welches die basale Expression der T7-RNA Polymerase verhindert.

2.4 Verwendete Medien

Alle Nährmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurden dem Medium 15 g/L Agar hinzugefügt. Hitzeempfindliche Medienzusätze wie Antibiotika wurden mit einem

0,2 µm Filter sterilfiltriert und nach Abkühlen des Nährmediums auf ~ 50 °C hinzugegeben.

2.4.1 Medien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der Komplexmedien zur Anzucht von *Escherichia coli* aufgeführt (s. Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Komplexmedien zur Anzucht von *Escherichia coli* und die verwendeten Medienzusätze

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
<i>Luria Bertani</i> -Medium (LB)	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
	Ampicillin	100 µg/mL
<i>Terrific Broth</i> -Medium (TB)	Trypton	12 g/L
	Hefeextrakt	24 g/L
	Glycerin	5 g/L
	Kaliumphosphatpuffer (10x)*	89 mM (1x)
	Ampicillin	100 µg/mL
Kaliumphosphatpuffer (10x)	KH ₂ PO ₄ (0,17 M)	23,1 g/L
	K ₂ HPO ₄ (0,72 M)	125,4 g/L

*Die Stammlösung des Kaliumphosphatpuffers wurde separat autoklaviert und dem sterilen Medium hinzugefügt.

In Tabelle 2.11 ist die Zusammensetzung des Minimalmediums zur Anzucht von rekombinanten *E. coli*-Zellen beschrieben.²⁰² Das vollständige Medium besteht aus vier separat hergestellten Lösungen.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des Minimalmediums (MSB) zur Anzucht von rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
Lösung A	KH ₂ PO ₄	136,1 g/L
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	177,99 g/L
Lösung B	Nitrilotriessigsäure	10 g/L
	Kaliumhydroxid	7,5 g/L
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O*	29,6 g/L
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O*	3,3 g/L
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	9,3 mg/L
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	99 mg/L
	<i>Metal solution 44</i>	50 mL/L

mit 10 M Natronlauge auf pH 6,8 einstellen		
Lösung C	(NH ₄) ₂ SO ₄	200 g/L
Metal solution 44 (100 mL)	EDTA	250 mg
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O*	1095 mg
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O*	500 mg
	MnSO ₄ · H ₂ O*	154 mg
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O*	39,2 mg
	Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O*	24,8 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O*	17,7 mg
mit 3-4 Tropfen 1 M Schwefelsäure versetzen		

*Salze separat in destilliertem Wasser lösen

Zur Fertigstellung des Mediums wurden die folgende Anteile der Lösungen zu sterilem, bistdestillierten Wasser hinzugegeben: 5,16 % A, 2,58 % B und 1,94 % C.

2.4.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

In Tabelle 2.11 sind die in der Arbeit verwendeten, allgemeinen Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 2.12: Verzeichnis der in der Arbeit verwendeten, allgemeinen Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
Assaypuffer _{in vitro}	KH ₂ PO ₄	50 mM
	K ₂ HPO ₄	50 mM
	mittels pH-Elektrode auf pH 7 einstellen	
	Glycerin	10 %(v/v)
	Dithiothreitol	10 mM
Assaypuffer _{in vivo} (pH 7,2)	KH ₂ PO ₄	100 mM
	K ₂ HPO ₄	100 mM
	mittels pH-Elektrode auf pH 7,2 einstellen	
	Glucose-Monohydrat	20 mM
	Ampicillin	100 µg/mL
TFBI-Puffer (pH 5,8)	Rubidiumchlorid	100 mM
	Mangan(II)-chlorid	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	Calciumchlorid	10 mM
	Glycerin	15 %(v/v)
	mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen	
TFBII-Puffer (pH 8)	MOPS	10 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Calciumchlorid	75 mM
	Glycerin	15 %(v/v)

Material und Methoden

		mit Kaliumhydroxid auf pH 8 einstellen
TAE-Puffer	Tris-Acetat (pH 8)	40 mM
	EDTA	1 mM
6x SDS-Ladepuffer	Tris-HCl (pH 8)	350 mM
	Dithiothreitol	600 mM
	Glycerin	30 %(v/v)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 %(w/v)
	Bromphenolblau	0,12 %(w/v)
10x SDS-Laufpuffer (pH 8,3)	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	1 %(w/v)
Coomassie-Färbelösung	Ethanol	30 %(v/v)
	Essigsäure	10 %(v/v)
	Coomassie Brilliantblue R-250	2,5 g/L
Coomassie- Entfärbelösung	Essigsäure	10 %(v/v)
10x Transferpuffer	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
1x Transferpuffer	10x Transferpuffer	10 %(v/v)
	Methanol	20 %(v/v)
10x TBS-Puffer (7,4)	Natriumchlorid	1,5 M
	Kaliumchlorid	0,03 M
	Tris	0,5 M
		mit HCl auf pH 7,4 einstellen
1x TBS-T	10x TBS	10 %(v/v)
	Tween 20	0,1 %(v/v)

2.5 Mikrobiologische Arbeiten

2.5.1 Stammhaltung

Für die Herstellung von Glycerinkulturen wurden 500 µL einer ü/N-Kultur in ein steriles Kryoröhrchen gegeben, mit 500 µL einer sterilen Glycerin/Wasser_{dest.}-Lösung (60 %(v/v)) versetzt und bei - 80 °C gelagert.

Da für eine erfolgreiche Expression neu transformierte Zellen notwendig sind, wurde im experimentellen Ablauf auf isolierten Plasmide zurückgegriffen. Diese wurden in Wasser_{bidest.} bei - 20 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) erfolgte durch photometrische Detektion bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Messung wurde in Küvetten durchgeführt, wobei als Referenz und zum Erstellen von Verdünnungen das jeweilig zur Kultivierung eingesetzte Medium verwendet wurde.

2.5.3 Kultivierung von *Escherichia coli* im Schüttelkolben

Für die Expression der Dioxygenasen in *Escherichia coli* JM109(DE3) wurden verschiedene Varianten getestet (s. Kapitel 3.2.1). Neben dem Kulturmedium wurden auch die Expressionstemperatur und -zeit variiert. Im Folgenden ist der als Standardprotokoll verwendete Expressionsablauf für *in vivo* Versuche beschrieben. Kompetente *E. coli* JM109(DE3)-Zellen wurde zunächst mit dem gewünschten Plasmid transformiert (s. Kapitel 2.6.4) und über Nacht bei 37 °C auf selektiven LB-Agarplatten inkubiert. Am selben Tag wurden 2 L Schikanekolben mit 450 mL TB-Medium vorbereitet und autoklaviert. Vor Inokulation des Kulturmediums mit einer Einzelkolonie von der Platte wurden 50 mL Kaliumphosphatpuffer (10x, s. Tabelle 2.10) und 500 µL Ampicillin-Stocklösung ($c_{\text{Stock}} = 100 \text{ mg/mL}_{\text{H}_2\text{O}}$) zur Fertigstellung des Nährmediums hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer $OD_{600\text{nm}} \sim 0,7$ bei 37 °C und 100 min^{-1} im Inkubationsschüttler (s. Tabelle 2.2). Daraufhin wurde mit 50 µL einer wässrigen IPTG-Lösung ($c_{\text{Stock}} = 1 \text{ M}$) induziert und bei 25 °C für 20 h exprimiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei $6000 \times g$ für 20 min bei 4 °C.

Für die heterologe Expression von His-getaggten Enzymkomponenten kam *E. coli* M15(pREP4) zum Einsatz. Auch hier wurden kompetente *E. coli* M15(pREP4)-Zellen zunächst mit dem gewünschten Plasmid transformiert. Für die Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks des pREP4-Plasmids wurden LB-Agarplatten verwendet, die sowohl 100 µg/mL Ampicillin ($c_{\text{Stock}} = 100 \text{ mg/mL}_{\text{H}_2\text{O}}$) als auch 30 µg/mL Kanamycin ($c_{\text{Stock}} = 300 \text{ mg/mL}_{\text{H}_2\text{O}}$) enthielten. Die restliche Vorgehensweise entspricht dem für *in vivo* Versuche beschriebenen Protokoll.

2.5.4 Kultivierung von *Escherichia coli* im Fermenter

Im Rahmen der Expressionsoptimierung der Naphthalen Dioxygenase wurde *E. coli* JM109(DE3)_pDTG141 im 1 L - Maßstab in Multifors-2 Parallelbioreaktoren (Infors AG, Bottmingen, CH) kultiviert.

Als Vorkultur wurden 50 mL LB-Übernachtskultur inklusive 50 µL Ampicillin ($c_{\text{Stock}} = 100 \text{ mg/mL}_{\text{H}_2\text{O}}$) mit einer Kolonie frisch transformierter Zellen (*E. coli* JM109(DE3)_pDTG141, s. Kapitel 2.6.4) inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Batch-Fermentation erfolgte in 800 mL LB-Medium, wobei nach Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin mit einer Start-OD_{600nm} von ~ 0,03 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von ~ 1 kultiviert wurde. Nach Induktion mit 80 µL einer wässrigen IPTG-Lösung ($c_{\text{Stock}} = 1 \text{ M}$) wurden die mittels eines teilfaktoriellen Versuchsplans (DoE) bestimmten Parameterkombinationen zur Optimierung der Expression untersucht (s. Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Untersuchte Faktoren zur Expressionsoptimierung der Naphthalen Dioxygenase mittels statistischer Versuchsplanung

Faktor	Grenzen	Kombinationen		
Temperatur	18 - 30 °C	30 °C/0,4 vvm/1000 rpm	30 °C/1,6 vvm/300 rpm	4 h
		18 °C/0,4 vvm/300 rpm	18 °C/1,6 vvm/1000 rpm	
Zeit	4 - 20 h	24 °C/1,0 vvm/650 rpm*	24 °C/1,0 vvm/650 rpm*	
Belüftung	0,4 - 1,6 vvm	18 °C/0,4 vvm/300 rpm	18 °C/1,6 vvm/1000 rpm	12 h
Rührerdrehzahl	300 - 1000 rpm	30 °C/0,4 vvm/300 rpm	30 °C/1,6 vvm/1000 rpm	20 h
		18 °C/0,4 vvm/1000 rpm	18 °C/1,6 vvm/300 rpm	

* Zentrumspunkt als biologisches Duplikat

Nach der jeweiligen Expressionsdauer wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (6000 x g/20 min/4 °C) geerntet und in Biotransformationen als ruhende Zellen (s. Kapitel 2.5.6) auf ihre Aktivität hin untersucht.

2.5.5 Reinigung von His-getaggtten Proteinen über Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der einzelnen Enzymkomponenten wurde ein Sonderfall der Affinitätschromatographie, die Metallchelatchromatographie (IMAC³), verwendet. Für diese Methode wird die chemische Affinität zwischen immobilisierten Metallionen und den sich in der Umgebung befindlichen gelösten Molekülen

³ engl. *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*

genutzt.¹⁹⁹ Um die Affinität der gelösten Moleküle zu den entsprechenden Metallionen wie z. B. Kobalt und Nickel zu steigern, werden diese mit Protein-*Tags* versehen. Kurze Histidin-reiche Abschnitte im Proteinen oder definierte, N- oder C-terminal fusionierte His-*Tags* (5-15 Histidine) ermöglichen eine effiziente und schnelle Aufreinigung von Proteinen aus aufgeschlossenen Zellextrakten.^{203–205} His-*Tags* sind die am häufigsten verwendeten Markierungen in der Metallchelatechromatographie.^{205,206} Die Imidazol-Seitenkette des Histidins weist eine hohe Affinität für zweiwertige Kobalt- oder Nickelionen auf und bildet Metallchelatekomplexe aus.²⁰⁷ Zur Immobilisierung der Metallionen wird häufig Nitrioloessigsäure-Agarose (NTA) verwendet. Die Reinigung erfolgt dann nach dem Verdrängerprinzip, indem der Gehalt an Imidazol im Elutionspuffer ständig erhöht wird, bis sogar gut gebundene, getaggte Proteine von der Säule eluieren.

Das mittels des Expressionsprotokolls für *in vitro* Versuche erhaltene Zellpellet (s. 2.5.3) wurden im doppelten Volumen mit dem jeweiligen Aufschlusspuffer (s. Tabelle 2.14) resuspendiert. Alle verwendeten Puffer wurden im Kühlraum gelagert und sämtliche Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt.

Tabelle 2.14: Verwendete Pufferlösungen für die Affinitätschromatographie (mod. nach ²⁰⁸)

Enzymkomponente	Komponente	Konzentration
Oxygenase (TGE-Puffer)	Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM
	Glycerin	5 % (v/v)
	Ethanol	5 % (v/v)
	Natriumchlorid	500 mM
	β -Mercaptoethanol	2 mM
Ferredoxin (PG-Puffer)	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5)	50 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Natriumchlorid	500 mM
	β -Mercaptoethanol	2 mM
Reduktase (TG-Puffer)	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Natriumchlorid	500 mM

Danach erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall (5 min/40 % Intensität) auf Eis und die Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen über zwei Zentrifugationsschritte (4 °C/75 000 xg/45 min). Der erhaltene Überstand wurde vor dem Aufbringen auf die Säule durch Filtration (0,45 μ m) weiter gereinigt. Als

Chomatographie-Säulen wurden His GraviTrap™ Talon®-Säulen (GE Healthcare, Chicago, US) verwendet. Diese wurden zunächst mit 4 Säulenvolumen (CV) bidestilliertem Wasser gewaschen und mit 8 CV des entsprechenden Aufschlusspuffers inklusive 5 mM Imidazol äquilibriert. Danach wurde die Säule mit filtriertem Zelllysat beladen. Die Elution der Zielproteine erfolgte nach dem in Tabelle 2.15 beschriebenen Schema.

Tabelle 2.15: Ablauf der Reinigung mittels His GraviTrap™ Talon®-Säulen

Enzymkomponente	Reinigungsschritte			
Oxygenase (TGE-Puffer)	1.	2 CV TGE mit	5 mM Imidazol	} sammeln
	2.	2 CV TGE mit	10 mM Imidazol	
	3.	4 CV TGE mit	50 mM Imidazol	
	4.	4 CV TGE mit	150 mM Imidazol	
	5.	5 CV TGE mit	300 mM Imidazol	
Ferredoxin (PG-Puffer)	1.	2 CV PG mit	5 mM Imidazol	} sammeln
	2.	2 CV PG mit	10 mM Imidazol	
	3.	2 CV PG mit	50 mM Imidazol	
	4.	3 CV PG mit	150 mM Imidazol	
	5.	4 CV PG mit	300 mM Imidazol	
Reduktase (TG-Puffer)	1.	2 CV TG mit	5 mM Imidazol	} sammeln
	2.	2 CV TG mit	10 mM Imidazol	
	3.	6 CV TG mit	50 mM Imidazol	
	4.	4 CV TG mit	300 mM Imidazol	

Die His GraviTrap™ Talon®-Säulen wurden im Weiteren mit 2 CV bidestilliertem Wasser sowie 2 CV wässrigem 20 %(v/v)-Ethanol gewaschen und bei 6 °C im Kühlraum gelagert.

Die gesammelten Proteinfractionen wurden nach erfolgter Reinigung mittels Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren dialysiert, um restliches Imidazol zu entfernen und um die Proteine in den für die Biotransformation verwendeten Assaypuffer *in vitro* (s. Tabelle 2.12) zu überführen. Hierzu wurden die Proteinfractionen im Verhältnis 1:2 mit Assaypuffer *in vitro* verdünnt und bei 7000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Füllstand < 2 mL). Der Durchfluss wurde verworfen und das verbliebene Lysat mit 15 mL Assaypuffer *in vitro* verdünnt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugations-schritt (4 °C/7000 x g/20 min). Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt, wobei im letzten Konzentrationsschritt die Proteine bis auf ein Volumen von 1 mL aufkonzentriert wurden. Da die Lagerung, insbesondere Einfrier- und Auftauvorgänge,

die Stabilität der Proteine nachteilig beeinflussen, wurden die erhaltenen Proteinfraktionen vor der Lagerung bei - 20 °C aliquotiert. Hierzu wurde die Proteinkonzentration der Fraktionen bestimmt (s. Kapitel 2.7.1) und wie folgt aliquotiert: 25 µM Oxygenase, 250 µM Reduktase und 500 µM Ferredoxin.

2.5.6 Ganzzell-Biotransformationen mit ruhenden Zellen

Das mittels des Expressionsprotokolls für *in vivo* Versuche erhaltene Zellpellet (s. 2.5.3) wurde zunächst im Assaypuffer_{*in vivo*} (s. Tabelle 2.12) resuspendiert. Je nach Versuchsaufbau wurden Biofeuchtmasskonzentrationen von 0,05 bis 0,2 g_{BFM}/mL eingestellt und in 20 mL Headspace-Vials mit 980 µL vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL Substrat (50x Stammlösung in Ethanol) gestartet. Die Standardsubstratkonzentration betrug 10 mM Substrat ($c_{\text{Stock}} = 500 \text{ mM}$ in Ethanol). Die Reaktionszeit wurde in Screeningversuchen auf 20 h gesetzt, wobei die Reaktionsansätze bei 30 °C und 180 rpm horizontal geschüttelt wurden. Nach 20 h wurde der Reaktionsansatz in ein 2 mL Eppendorf-Tube überführt und mit 2x 500 µL MTBE mit 1 mM internem Standard (1-Octanol/3-Phenylphenol in MTBE) extrahiert. Hierzu wurden 500 µL des Lösungsmittels auf den Reaktionsansatz gegeben, 1 min gevortext und für 10 min bei 20 °C und 20 000 x *g* zentrifugiert. Danach wurden 350 µL der organischen Phase abgenommen und in ein GC-Vial überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei beim zweiten Extraktionsschritt 400 µL der organischen Phase abgenommen wurden. Bis zur chromatographischen Analyse wurden die Proben bei - 20 °C gelagert.

2.5.7 Biotransformationen mit aufgereinigten Enzymkomponenten

Die unter 2.5.5 beschriebenen Proteinfraktionen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit entsprechendem Volumen an Assaypuffer_{*in vitro*} versetzt. In Tabelle 2.16 ist das Pipettierschema für die *in vitro* Reaktionsansätze dargestellt.

Tabelle 2.16: Pipettierschema für *in vitro* Reaktionsansätze ($V_{\text{gesamt}} = 500 \text{ µL}$)

Komponente	Konzentration der Stammlösung [mM]	Volumen im Reaktionsansatz [µL]
Assaypuffer _{<i>in vitro</i>} *	s. Tabelle 2.12	395
NADH in Assaypuffer _{<i>in vitro</i>}	100 mM	25
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ in H ₂ O _{bidest.} **	5 mM	5

Material und Methoden

Oxygenase in Assaypuffer _{in vitro}	25 µM	20
Ferredoxin in Assaypuffer _{in vitro}	500 µM	20
Reduktase in Assaypuffer _{in vitro}	250 µM	10
Substrat in Ethanol	40 mM	25

* Aufgrund des enthaltenen Dithiothreitol sollte der Puffer bzw. der Pufferzusatz immer frisch hergestellt werden.

**Die Eisenlösung sollte ebenfalls frisch zubereitet werden, da Fe²⁺ mit Luftsauerstoff zu Fe³⁺ oxidiert.

Die Reaktionen wurden in 2 mL Glas-Vials angesetzt und bei 500 rpm und 30 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, DE) für 2 h inkubiert. Abgestoppt wurden die Reaktionen durch Zugabe von 350 µL MTBE mit internem Standard (1-Octanol/3-Phenylphenol in MTBE). Daraufhin wurden die Ansätze für 1 min gevortext und für 5 min bei 20 °C und 7000 min⁻¹ zentrifugiert. Anschließend wurden 300 µL des Lösungsmittels abgenommen und in ein GC-Vial überführt. Im zweiten Extraktionsschritt erfolgte die erneute Zugabe von 350 µL MTBE. Nach Durchmischung und Zentrifugation wurden 350 µL MTBE abgenommen und mit dem ersten Reaktionsschritt vereint. Bis zur chromatographischen Analyse wurden die Proben bei - 20 °C gelagert.

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

2.6.1 Plasmid-Isolierung von *Escherichia coli*

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert.¹⁹⁹ Gefällte Proteine und Zelltrümmer werden abzentrifugiert und die verbleibende Nukleinsäuremischung wird chromatographisch über eine Silikasäule von genomischer DNA und RNA abgetrennt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgte mit sterilem Wasser (60 °C/bidest.). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde bei - 20 °C gelagert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben isoliert (s. Tabelle 2.3).

2.6.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Im Zuge des Proteindesigns stellt die ortsgerichtete Mutagenese eine wichtige PCR-basierte Methode dar, um die gezielte Änderung der DNA-Sequenz eines Gens zu erreichen.²⁰⁹⁻²¹¹ Mit diesem Verfahren können sowohl Aminosäureaustausche, -deletionen als auch -insertionen in zirkuläre Plasmide eingeführt werden. Im ersten

Schritt wird eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die eingesetzten Primerpaare sind hierbei komplementär zueinander und unterscheiden sich von der zirkulären Templat-DNA lediglich in der zu erzeugenden Mutation. Im Laufe der PCR werden diese Oligonukleotide eingebaut und in der Elongationsphase von der DNA-Polymerase erweitert. Als Ergebnis der *in vitro* Reaktion liegen sowohl methylierte, parentale DNA-Plasmide (Templat) und nicht methylierte, mutagene DNA-Plasmide mit Einzelstrangbrüchen vor. Bevor die Plasmide in den Klonierungsorganismus (*E. coli* DH5 α /XL-1 blue) transformiert werden, erfolgt deshalb der Verdau der Plasmide mittels der Endonuklease *DpnI* aus *Diplococcus pneumoniae* G41. Dieses Restriktionsenzym schneidet spezifisch methylierte DNA und führt somit zum Abbau der eingesetzten Plasmid-DNA. Als finaler Schritt erfolgt die Transformation des Restriktionsansatzes in den Klonierungsorganismus, welcher die vorhandenen Einzelstrangbrüche ligiert und das transformierte Plasmid weiter vervielfältigt. Die Mutagenese-PCR (auch *QuikChange*[™]) wurde mit der KOD-HotStart-Polymerase von Novagen[®] (Merck, Darmstadt, DE) durchgeführt. Das Design der Primer und die Bedingungen der PCR wurden gemäß dem Anwenderprotokoll (Nr.: TB341) von Novagen[®] gewählt. Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 2.17 beschrieben und wurde der Auflistung entsprechend pipettiert.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die ortsgerichtete Mutagenese

Bestandteile	Volumen [μ L]	Endkonzentration
PCR-Puffer für KOD-HS-Polymerase (10x)	5	1x
MgSO ₄ (25 mM)	3	1,5 mM
dNTPs (à 2 mM)	5	0,2 mM (à dNTP)
H ₂ O _{bidest.}	32	
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	1,5	0,3 μ M
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	1,5	0,3 μ M
Templat-DNA*	1	100 pg - 50 ng
KOD-HotStart-Polymerase (1 U/ μ L)	1	0,02 U

* Templat-DNA: pDTG141

In Tabelle 2.18 ist das verwendete Standardprotokoll für die ortsgerichtete Mutagenese dargestellt. Die Wahl der Annealing-Temperatur wurde hierbei von den eingesetzten Oligonukleotiden (s. Kapitel 2.2) bestimmt.

Tabelle 2.18: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese (*: variiert je nach Primerpaar)

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
1. Denaturierung	2 min	95	1
2. Denaturierung	20 s	95	
Annealing	30 s	50/55/60*	20
Elongation	3 min	70	
Finale Elongation	7	70	1
Kühlung	∞	8	

Nach Ablauf der Mutagenese-PCR wurden dem PCR-Ansatz laut Standardprotokoll 1 µL der Restriktionsendonuklease *DpnI* (Stock: 10 U/µL; Thermo Scientific, Waltham, US) hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Je nach Bedarf wurden sowohl die Menge des Restriktionsenzym (bis zu 3 µL) als auch die Inkubationszeit (bis zu 16 h) variiert.

2.6.3 Klonierung via *gibson assembly*

Das *gibson assembly* stellt eine effiziente und schnelle Klonierungsmethode dar, um mehrere DNA-Fragmente mit zueinander überlappenden Enden in einer isothermen Reaktion zu verbinden.^{212,213} Für diese Klonierungstechnik werden drei unterschiedliche Enzymaktivitäten benötigt: (1) Eine Exonuklease, welche Einzelstrangüberhänge am 3'-Ende generiert und damit das Annealing der unterschiedlichen Fragmente durch komplementäre Enden ermöglicht, (2) eine DNA-Polymerase, die die Lücken zwischen den angelagerten Fragmenten auffüllt und (3) eine DNA-Ligase, welche die verbleibenden Einzelstrangbrüche⁴ ligiert. Das Ergebnis des *gibson assemblys* ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül.

Das Duet-Vektorsystem pETDuet/pCOLADuet wurde auf seine Eignung zur Expression der Naphthalen Dioxygenase hin getestet. In den *low copy*-Vektor pCOLADuet wurden die α- und β-Untereinheiten kloniert, pETDuet (*high copy*) wurde als Grundgerüst für die Redoxpartner gewählt.

Zunächst wurden die Leervektoren in *E. coli* XL-1 blue transformiert, vermehrt und isoliert (s. 2.6.4/2.6.1). Danach erfolgte die Linearisierung der Plasmide durch einen präparativen Restriktionsverdau (s. Tabelle 2.24).

⁴ engl. *nicks*

Tabelle 2.19: Linearisierung von zirkulären Plasmiden mittels Restriktionsendonukleasen

Komponente	Volumen [μL]	Konzentration
Plasmid Miniprep	20	10-15 μg
Puffer	2,5	1x
Restriktionsenzym A/B	2 μL^*	10 U
H ₂ O _{bidest.}	0,5	

* Das Verhältnis der Restriktionsenzyme wurde mit dem *DoubleDigest Calculator* von Thermo Fisher Scientific ermittelt.

Für die Linearisierung der Leervektoren pETDuet und pCOLADuet wurden *NcoI* und *HindIII* verwendet, der Restriktionsverdau von pETDuet_nahAa und pCOLADuet_nahAc erfolgte mit den Endonukleasen *NdeI* und *XmaI*. Die Linearisierungsansätze wurden bei 37 °C für 16 h inkubiert.

Die Gene *nahAc*, *nahAd*, *nahAa* und *nahAb* wurden mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.7 in einer Amplifizierungs-PCR vermehrt. Der PCR-Ansatz entspricht der Zusammensetzung für die ortsgerichtete Mutagenese (s. Tabelle 2.17). Abhängig vom gewünschten Zielprodukt wurde das Temperaturprogramm wie folgt angepasst.

Tabelle 2.20: PCR-Programm für die Amplifizierungs-PCR

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur [°C]	Anzahl der Zyklen
1. Denaturierung	2 min	95	1
2. Denaturierung	20 s	95	
Annealing	30 s	50/58/60*	25
Elongation	28 s (<i>nahAc</i>); 10 s (<i>nahAd</i>) 21 s (<i>nahAa</i>); 4 s (<i>nahAb</i>)	70	
Finale Elongation	7 min	70	1
Kühlung	∞	8	

* variiert je nach Primerpaar

Die Linearisierungs- und PCR-Ansätze wurden mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (s. Kapitel 2.6.5). Danach wurde die DNA-Konzentration (NanoDrop ND-1000-Spektrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) bestimmt. Für das *gibson assembly* wurden die generierten Fragmente im Verhältnis 1:3 (Vektor:Insert) eingesetzt, wobei die Mindestmenge bei 100 ng pro Fragment lag. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2.21 beschrieben.

Tabelle 2.21: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für das *gibson assembly*

Komponente	Stammlösung	Volumen [μL]
5x ISO Reaktionspuffer	s. Tabelle 2.22	320
T5 Exonuklease	10 U/ μL	0,64
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	2 U/ μL	20
Taq DNA Ligase	40 U/ μL	160
H ₂ O _{bidest.}		699,36

Der fertige Mastermix aliquotiert (à 15 μL) bei -20 °C gelagert. Die Zusammensetzung des ISO Reaktionspuffers ist in Tabelle 2.22 beschrieben.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung des 5x ISO Reaktionspuffers für das *gibson assembly*

Komponente	Stammlösung	Menge
25 %(w/v) PEG-8000	PEG-8000	1,5 g
500 mM Tris/HCl (pH 7,5)	1 M Tris/HCl (pH 7,5)	3000 μL
50 mM MgCl ₂	2 M MgCl ₂	150 μL
50 mM DTT	1 M DTT	300 μL
1 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP	100 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP	60 μL
5 mM NAD	100 mM NAD	300 μL

Der konzentrierte Reaktionspuffer wurde sterilfiltriert, zu à 100 μL aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Für das *gibson assembly* wurden je 15 μL des Reaktionsansatzes auf Eis aufgetaut und zügig mit 5 μL der zu ligierenden DNA vermischt, für 1 h bei 50 °C inkubiert und in *E. coli* XL-1 blue transformiert. Im Weiteren wurden die korrekte Amplifizierung der Fragmente und die anschließende Ligation mittels Sequenzierung einzelner Klone verifiziert.

2.6.4 Transformation von *Escherichia coli* durch Hitzeschock

Für die Hitzeschocktransformation wurden zunächst chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen der verwendeten Stämme *E. coli* DH5 α , *E. coli* XL1 blue, *E. coli* JM109(DE3) und *E. coli* Tuner™(DE3)pLysS hergestellt.

Dazu wurden 100 mL LB-Medium mit 1 % (v/v) ü/N-Kultur (37 °C/180 min⁻¹/16 h) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5-0,6 kultiviert. Danach erfolgte die Zellernte (4 °C/8000 x g/15 min) und das erhaltene Pellet wurde mit TFBI - Puffer (s. Tabelle 2.12/0 °C/40 mL) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation

auf Eis und einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C/8000 g/10 min) wurden die Zellen vorsichtig in TFBII - Puffer (s. Tabelle 2.12/0 °C/2 mL) resuspendiert und für 15 min auf Eis gelagert. Daraufhin wurden die Zellen schnellstmöglich in vorgekühlte Eppendorf-Tubes à 50 µL aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.

Vor der Hitzeschocktransformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA⁵ für weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42 °C für 90 s. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Minuten auf Eis abgekühlt und mit 500 µL LB-Medium versetzt. Die Regeneration der Zellen erfolgte für eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer. Bei der Transformation von zirkulären Plasmiden wurden 50 µL der Zellsuspension auf selektiven Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Bei der Transformation von mutagenen Plasmiden mit Einzelstrangbruch wurden hingegen 100 µL der regenerierten Zellen auf selektiven Agarplatten ausplattiert und inkubiert.

2.6.5 Elektrophoretische Trennung und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch den Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe, sogenannte Marker, kann die Größe der untersuchten DNA-Fragmente bestimmt werden. Die Auftrennung basiert hierbei auf zwei Faktoren: (1) Die ausgebildete Agarosegelmatrix erlaubt die Unterscheidung von Fragmenten aufgrund ihrer Mobilität, wobei kleinere DNA-Stränge mobiler sind als große und (2) die negative Ladung der DNA, welche bei Anlegen einer Spannung die gerichtete Wanderung der Fragmente durch das Gel ermöglicht.

Es wurden ausschließlich 1 %(w/v)ige Agarosegele zur Analyse von DNA-Fragmenten verwendet. Die Agarose wurde eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen an TAE-Puffer (s. Tabelle 2.12) versetzt. Zur vollständigen Lösung der Agarose wurde die Gelmischung für 2-3 min bei 900 Watt in der Mikrowelle gekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf ~ 40 °C wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff peqGREEN (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) im Verhältnis 1:10 000 hinzugegeben und die Gellösung zum Auspolymerisieren in die Gelapparatur gegossen. Nach 30 min bei Raumtemperatur

⁵ Gehalt an eingesetzter Plasmid-DNA: 1 µL für die Transformation von zirkulären Plasmiden; 10 µL für die Transformation von Mutagenese-Plasmiden mit Einzelstrangbruch

war das Gel auspolymerisiert und konnte mit dem Laufpuffer (1x TAE) überschichtet werden. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific, Waltham, US) versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (s. Tabelle 2.1) auf das Gel aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 100-120 V. Nach einer Stunde Laufzeit wurden die Gele unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

Bei der Durchführung von präparativen Agarosegelen wurde die DNA nach erfolgreicher Auftrennung mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo Research wiedergewonnen. Das Kit wurde dazu nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) beruht auf der Interaktion von Proteinen mit zweiwertigen Kupferionen.²¹⁴ Im Alkalischen werden bei Anwesenheit von Proteinen zweiwertige Kupferionen quantitativ zu Cu⁺-Ionen reduziert. Jeweils zwei dieser Cu⁺-Ionen bilden mit einem Molekül Bicinchoninsäure einen violetten Komplex aus, welcher bei 562 nm detektiert werden kann.

Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (s. Tabelle 2.3). Als Proteinstandard für die Kalibriergerade im Bereich 0 - 2 mg/mL (s. Abbildung 6.1) diente in Wasser gelöstes Rinderserumalbumin.

2.7.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)⁶ wird zur Auftrennung und molekularen Größenbestimmung von Proteingemischen verwendet.^{215,216} Die zu analysierenden Proteine werden unter anderem mit dem anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, wodurch es zur Denaturierung der Proteine kommt. Des Weiteren führt das im Probenpuffer vorhandene Dithiothreitol zur Reduktion und Spaltung von Disulfidbrücken. Schlussendlich sorgt die Anlagerung von SDS an die denaturierten Proteine dafür,

⁶ engl. *Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Eletrophoresis*

dass jedes Protein eine zu seiner Größe proportionale, negative Ladung erhält. Wie schon bei der Agarose-Gelelektrophorese wird somit eine Unterscheidung der Proteine aufgrund ihrer Größe und Ladung möglich.

Das diskontinuierliche Verfahren nach Laemmli²¹⁶ ist die am häufigsten verwendete Elektrophorese-Methode. Das Polyacrylamidgel besteht hierbei aus zwei unterschiedlichen Gelen: dem Sammel- und dem Trenngel. Das 5 %ige Sammelgel ist dabei zur Fokussierung der Proteine notwendig, die Trennung wird durch das 10 bzw. 12 %ige Trenngel erreicht. In Tabelle 2.23 sind die Rezepturen für Trenn- und Sammelgele (ausreichend für zwei Gele) aufgelistet.

Tabelle 2.23: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE nach Laemmli²¹⁶

Komponente	Trenngel (10/12 %)	Sammelgel (5 %)
	Volumen [mL]	Volumen [mL]
H ₂ O _{bidest.}	4 / 3,3	2,7
30 % Arylamidlösung*	3,3 / 4	0,67
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 / 2,5	-
1,5 M Tris (pH 6,8)	- / -	0,5
10 % (w/v) SDS in H ₂ O _{bidest.}	0,1 / 0,1	0,04
40 % (w/v) APS in H ₂ O _{bidest.} **	0,1 / 0,1	0,04
TEMED**	0,004 / 0,004	0,004

* Acrylamid/Bis-Acrylamid (37,5:1)

** Ammoniumperoxodisulfat (APS) ist der temperatursensible Radikalstarter für die Polymerisationsreaktion und wird in Aliquots bei -20 °C gelagert. Tetramethylethylendiamin (TEMED) dient als Polymerisierungskatalysator und wird als Reinsubstanz dazugegeben.

Für die SDS-PAGE wurde die Proben auf einen Proteingehalt von 1 µg/µL standardisiert (s. Kapitel 2.7.1) und mit 6x SDS-Ladepuffer (s. Tabelle 2.12) im Verhältnis von 1:5 versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden diese bei 95 °C für 5 min gekocht, zentrifugiert (RT/7000 x g/10 s) und danach auf Eis abgekühlt. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Gelapparatur eingespannt und mit 1x SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 2.12) überschichtet. Nach Entfernen des Taschenkamms wurden 5 µL eines kommerziellen Molekulargewichtsmarkers (s. Tabelle 2.1) und die vorbereiteten Proben aufgetragen. Zum Sammeln der Proteine im Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 10 mA pro Gel für 15 min angelegt, danach wurde die Spannung auf 20-25 mA pro Gel erhöht. Die Gelelektrophorese wurde bei Erreichen der Proteinlauffront am Gelende beendet. Nach erfolgreicher Trennung

der Proteine erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden mittels Coomassie Brilliant Blue R-250.

Der Farbstoff bildet im Säuren mit basischen oder aromatischen Aminosäureresten Farbstoff-Protein-Komplexe aus, welche im sichtbaren Bereich bei einer Wellenlänge von 592 nm absorbieren.²¹⁷ Die Gele wurden in eine Coomassie-Färbelösung (s. Tabelle 2.12) für mehrere Stunden inkubiert, wodurch das gesamte Gel blau gefärbt wurde. Um den nicht Protein gebundenen Farbstoff wieder zu entfernen, erfolgte anschließend die Inkubation in der Coomassie-Entfärbelösung (s. Tabelle 2.12) auf einem Kipp-Schüttler bei Raumtemperatur. Die Entfärbelösung wurde entfernt, sobald eine deutliche Differenzierung der blauen Proteinbanden vom Gelhintergrund möglich war.

2.7.3 Proteinanalyse mittels Western Blot und Immundetektion

Als Western Blot bezeichnet man die Übertragung⁷ von Proteinen auf eine Trägermembran. Auf die Membran übertragene Proteine werden anschließend über einen immunologischen Antikörpernachweis (Immundetektion) nachgewiesen. Hierbei handelt es sich meist um einen gekoppelten Antikörpernachweis, welcher aus einem primären, Antigen spezifischen Antikörper und einem sekundären Reporterantikörper besteht.

Dem Blot-Verfahren vorausgehend findet eine Auftrennung der zu untersuchenden Proteine durch eine SDS-PAGE (s. Kapitel 2.7.2) statt. Das erhaltene Gel wird nach folgendem Schema (s. Abbildung 2.7) als Sandwich in das Transfersystem gelegt, wobei durch Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten elektrischen Feldes die Proteine aus dem Gel und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden.²¹⁸

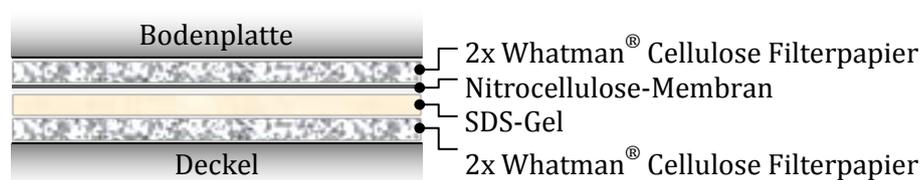


Abbildung 2.7: Aufbau des Western Blot-Sandwiches

Die Whatman® Cellulose Filterpapiere wurden zunächst in Transferpuffer (s. Tabelle 2.12) gelegt und möglichst frei von Luftblasen mit den anderen Bestandteilen zu

⁷ engl. *Blotting*

einem Sandwich zusammengefügt. Für die Übertragung wurde eine Spannung von 15 V für 45 min angelegt. Nach erfolgtem Transfer auf die Membran fand die Detektion über einen spezifischen Antikörpernachweis statt.

In dieser Arbeit war der Nachweis von nicht-getagten Proteinen (Nachweis der α - und β -Untereinheiten der Naphthalen Dioxygenase) notwendig, weshalb ein speziell für die katalytische Einheit des Multikomponentensystems hergestellter, proteinspezifischer Antikörper generiert wurde. Hierzu erfolgte die Reinigung der Dioxygenase wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben und das gereinigte Protein wurde als Antigen an Pineda Antikörper-Service (Berlin, DE) übergeben. Über die durch das Antigen ausgelöste Immunantwort⁸ konnten funktionale, primäre Antikörper für die Naphthalen Dioxygenase erhalten werden. Gekoppelt wurden dieser mit einem sekundären Reporterantikörper Ziege-anti-Hase IgG konjugiert mit einer Peroxidase (s. Tabelle 2.1).

Für die Absättigung freier Bindestellen auf der Nitrocellulose-Membran wurde diese mit einer Blockierlösung bestehend aus 4 % (w/v) Milchpulver gelöst in 1x TBS-Puffer (s. Tabelle 2.12) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde überschüssiges Milchpulver durch dreimaliges Waschen (3x 15 min/RT) mit 1x TBS-T entfernt. Für die Bindung des Primärantikörpers wurde erneut eine 4 % (w/v)ige Milchpulverlösung in 1x TBS-Puffer hergestellt und im Verhältnis von 1:5000 mit Primärantikörper versetzt. Nach Inkubation auf einem Kippschüttler über Nacht bei 6 °C erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1x TBS-T (3x 15 min/RT). Danach wurde der Sekundärantikörper im Verhältnis 1:10 000 in einer 4 % (w/v)igen Milchpulverlösung in 1x TBS-Puffer gelöst und für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Membran nochmals mit 1x TBS-T (3x 15 min/RT) gewaschen.

Für die Entwicklung der Membran wurde ein *enhanced chemiluminescence* Nachweis (ECL) verwendet. Hierfür wurden zunächst folgende Lösungen hergestellt (s. Tabelle 2.24).

Tabelle 2.24: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für den ECL-Nachweis

Lösung	Komponente	Konzentration
Lösung A	0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)	200 mL
	Luminol	50 mg
Gekühlt lagern !		

⁸ Die polyklonalen Antikörper wurden durch die Immunantwort von Kaninchen hergestellt.

Lösung B	4-Hydroxycimtsäure	11 mg
	DMSO	10 mL
Dunkel lagern !		
Mastermix	Lösung A	4 mL
	Lösung B	0,4 mL
	35 % H ₂ O ₂	1,2 µL

Der Mastermix wurde für 2 min unter Schwenken mit der Membran inkubiert und die resultierende Chemilumineszenz anschließend mit einem Fusion-SL-Dokumentationssystem (Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE) detektiert.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Aktivitätsbasierter Agarplattendiffusionstest

Für eine erste Charakterisierung der generierten Enzymvarianten wurde ein aktivitätsbasierter Agarplattendiffusionstest mit Indol als Substrat durchgeführt. Die spontane Dimerisierung des Wasser-Eliminationsproduktes Indoxyl führt zur Bildung des blauen Farbstoffes Indigo (s. Abbildung 2.8).

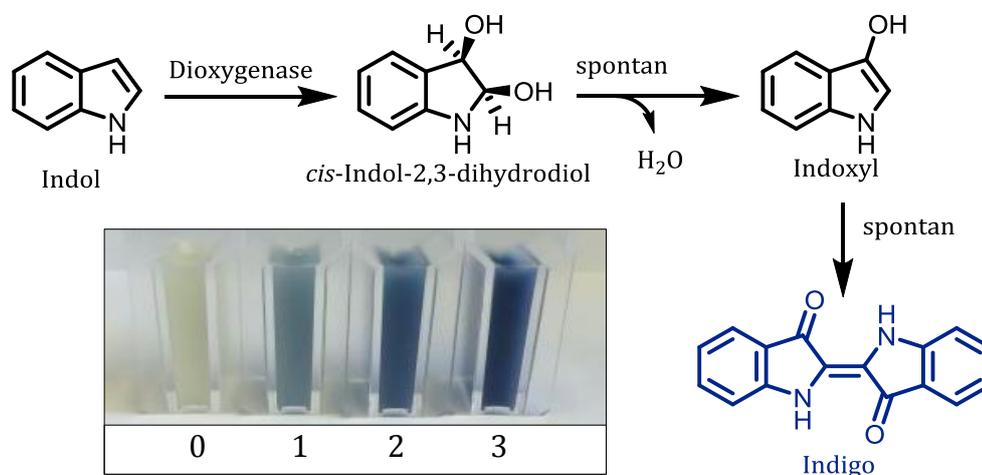


Abbildung 2.8: Aktivitätsbasierter Agarplattendiffusionstest mit Indol als Indikatorsubstrat (0-3: Farbskala zur Auswertung)

Für den Indol-Assay wurden frisch transformierte *E. coli*-Zellen auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und für 30 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einer 10 % (w/v) Indollösung (in Aceton) versetzt. Dazu wurden runde Filterplättchen unter dem Abzug mit der Indollösung getränkt und im Deckel der jeweiligen Petrischalen platziert. Die Farbentwicklung wurde nach 24 h grafisch dokumentiert.

2.8.2 Gaschromatographie

Für die Analyse von Biotransformationen und Syntheseprodukten wurde ein Gaschromatograph (GC-2010/plus, Shimadzu, Kyōto, JP) verwendet. Die Detektion von Analytmolekülen erfolgte entweder mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) oder einem Massenspektrometer (MS-QP2010, Shimadzu, Kyōto, JP).

Die Gaschromatographie an der GC/FID-2010 erfolgte mit einer ZB-1 Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Phenomenex, Torrance, US) und Wasserstoff als Trägergas. Die Injektortemperatur lag bei 250 °C, die Detektortemperatur bei 330 °C. Bei allen Analysen wurde bei einem Injektionsvolumen von 1 μL mit einem Split von 1:10 gearbeitet.

Temperaturprogramm_FID_1 (*Pressure: 50,2 kPa*)

Die Säule wurde für 1 min bei 70 °C äquilibriert, mit 15 °C/min auf 120 °C erhitzt und weiter mit einer Rate von 50 °C/min auf die Endtemperatur von 320 °C erhitzt. Daraufhin wurde die Temperatur 2 min bei 320 °C gehalten.

Analysierte Substrate Toluol, *tert*-Butylbenzol, α-Methylstyrol, trans-β-Methylstyrol, Allylbenzol, 4-Allylanisol, 4-Methoxystyrol

Temperaturprogramm_FID_2 (*Linear velocity: 40 cm/s*)

Die Säule wurde für 0,5 min bei 80 °C äquilibriert, mit 50 °C/min auf 90 °C erhitzt und für 11 min konstant gehalten. Weiterhin erfolgte die Erhöhung der Temperatur mit einer Rate von 50 °C/min auf die Endtemperatur von 320 °C. Die Endtemperatur wurde 2 min gehalten.

Analysierte Substrate Ethylbenzol (nach Derivatisierung mit Essigsäureanhydrid), 1-Phenylpentan

Temperaturprogramm_FID_3

Für die Analyse von *R*-Limonen und den hydroxylierten Produkten des Monoterpens wurde eine HP-5MSi Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent, Santa Clara, US) verwendet. Für die Analysen wurde bei einem Injektionsvolumen von 1 μL ein Split von 1:5 gewählt.

Die Säule wurde für 1 min bei 70 °C äquilibriert, mit 15 °C/min auf 230 °C erhitzt und weiter auf eine Endtemperatur von 325 °C mit einer Rate von 50 °C/min erhitzt. Die Endtemperatur wurde für 2 min gehalten.

Analysierte Substrate *R*-Limonen

Für die chirale GC-Analyse von 1-Phenylethanol wurde eine ChiraSil-Dex CB Kapillarsäule (25 m × 250 µm × 0,25 µm, Agilent, Santa Clara, US) und Wasserstoff als Trägergas verwendet. Die Injektortemperatur lag bei 225 °C, die Detektortemperatur bei 225 °C. Bei allen Analysen wurde bei einem Injektionsvolumen von 1 µL mit einem Split von 1:10 gearbeitet.

Temperaturprogramm_chiralFID (*Linear velocity: 30 cm/s*)

Die Säule wurde für 1 min bei 70 °C äquilibriert, mit 10 °C/min auf 100 °C erhitzt und weiter auf eine Endtemperatur von 225 °C mit einer Rate von 30 °C/min erhitzt.

Die Gaschromatographie an der GCMS-QP2010 erfolgte mit einer ZB-5 Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Phenomenex, Torrance, US) und Helium als Trägergas. Das Massenspektrum wurde mit einer Elektronenspray-Ionisation (70 eV) erzeugt, wobei die Injektortemperatur bei 280 °C, die Temperatur der Ionenquellen bei 200 °C und die Interfacetemperatur bei 250 °C lag. Bei allen Analysen wurde bei einem Injektionsvolumen von 1 µL mit einem Split von 1:10 gearbeitet.

Temperaturprogramm_MS (*Linear velocity: 30 cm/s*)

Die Säule wurde für 1 min bei 70 °C äquilibriert, mit 10 °C/min auf 280 °C erhitzt und für zwei Minuten gehalten. Mit einer Heizrate von 40 °C/min wurde weiter auf die Endtemperatur von 310 °C geheizt. Die Endtemperatur wurde für 2 min gehalten.

Analysierte Substrate *R*-Limonen, *tert*-Butylbenzol

2.8.3 Acetylierung von Analytmolekülen

Zur Derivatisierung von Analytmolekülen wurde eine Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid verwendet. Bei der Acetylierung wird die Stabilität der zu analysierenden Moleküle durch den Schutz der instabilen Gruppen erhöht. Des Weiteren wird die Polarität der OH-Gruppen reduziert und die Flüchtigkeit erhöht. Pyridin wird häufig als basischer Katalysator verwendet, um die Reaktion zu katalysieren und um als Lösungsmittel zu dienen.²¹⁹ Dabei reagiert Pyridin mit entstehenden sauren Nebenprodukten, kann aber auch mit dem Derivatisierungsreagenz selbst reagieren.

Für die Derivatisierung von Ethylbenzol wurden 50 µL des in MTBE extrahierten Reaktionsansatzes mit 100 µL einer Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:1)-Mischung

versetzt und bei 70 °C für 1 h inkubiert. Die Messung der derivatisierten Proben erfolgte zeitnah auf der GC-FID.

2.8.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Analyse des natürlichen Substrates Naphthalen wurde mittels *reversed phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) durchgeführt. Hierzu wurde eine HPLC-Anlage von Agilent (Agilent 1200 series, Waldbronn DE) verwendet. Die Anlage umfasst einen Degasser (G1315D), ein quaternäres Pumpsystem (G1311A), einen Säulenofen mit Temperaturkontrolle (G1316A), eine Autosamplereinheit (G1329A) und einen Diodenarray-Detektor (DAD, G1315D). Für die Auftrennung der Analytmoleküle wurde eine Eclipse XDB-C18 Säule (5 µm, 4.6 x 150 mm, Agilent, Santa Clara, US) verwendet und mittels eines Gradienten-Programmes bei 20 °C gefahren. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 0,9 mL/min und es wurde 1 µL Probe injiziert. Die Detektion der Umsetzungen erfolgte bei 270 nm.

Tabelle 2.25: HPLC-Gradienten-Methode zur Analyse von Naphthalen-Umsetzungen.

Zeit [min]	Anteile der verwendeten Lösungsmittel	
	H ₂ O + 0,1 % (v/v) Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	70	30
1	70	30
4	30	70
8	2	98
8,01	70	30
10	70	30

Die chirale HPLC-Analytik erfolgte mit einer zum RP-HPLC-System analogen System, wobei dieses als *normal phase* HPLC (NP-HPLC) betrieben wurde. Zur Auftrennung der Enantiomere wurde eine Chiralpak® IB Säule (5 µm, 150 x 4.6 mm, Daicel, Illkirch, Fr) verwendet. Die mobile Phase bestand aus einer Mischung von *n*-Hexan und Ethanol (98:2) und wurde mit einer Flussrate von 0,9 mL/min isokratisch gefahren. Es wurden 10 µL Probe injiziert und der Säulenofen wurde auf 20 °C temperiert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm. In Tabelle 2.26 sind die Retentionszeiten der jeweiligen Enantiomerepaare aufgelistet.

Tabelle 2.26: Retentionszeiten der Enantiomerenpaare (NP-HPLC)

Substrat	Analyt	Retentionszeit [min]
Styrol	<i>S</i> -1-Phenyl-1,2-ethandiol	21,6
	<i>R</i> -1-Phenyl-1,2-ethandiol	22,6
α -Methylstyrol	<i>S</i> -2-Phenyl-1,2-propandiol	16,2
	<i>R</i> -2-Phenyl-1,2-propandiol	15,6
trans- β -Methylstyrol	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol	15,1
	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1-Phenylpropan-1,2-diol	15,7
Allylbenzol	<i>S</i> -2-Phenyl-1,2-propandiol	16,2
	<i>R</i> -2-Phenyl-1,2-propandiol	15,6
4-Methoxy-Styrol	<i>R</i> -1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol	37,1
	<i>S</i> -1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol	38,8

2.8.5 Kernspinresonanzspektroskopie

Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR⁹) wurde zur Überprüfung der Identität von chemisch und biochemisch hergestellten Verbindungen verwendet. Protonen (¹H) und Kohlenstoff (¹³C)-NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 500 Spektrometer bei 500,15 MHz und 125,76 MHz gemessen. Die chemische Verschiebung (δ) wurde in *parts per million* (ppm) angegeben und auf den internen Standard Tetramethylsilan ($\delta = 0$ ppm) bezogen. Für die Identifizierung und Zuordnung von komplexeren Signalen wurden des Weiteren auch 2D-NMR-Methoden eingesetzt.

2.9 Bioinformatische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sequenzalignments und Datenbankanalysen (Konsensussequenz) durchgeführt. Für die Überlagerung von Sequenzdaten wurde der Webservice *Clustal Omega* mit den Standardeinstellungen verwendet. Als Datenbank für die Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen wurde im Zuge des EU-Projektes BIOOX (<http://bioox.wpengine.com/>) von dem Projektpartner Bio-Product eine Datenbank erstellt, welche als Basis für Konsensussequenz- sowie Konservierungsanalysen diente.¹⁰ Die 3DM-Datenbank basiert auf einer Sequenz-Struktur-Analyse der eingepflegten Sequenzen und vergibt für Aminosäurereste, die sich im dreidimensionalen Raum an der gleichen Stelle befinden, eine einheitliche

⁹ engl. *Nuclear Magnetic Resonance*

¹⁰ Iron sulfur proteins - Bet v1-like (2014); <https://3dm.bio-product.nl/> mit 8100 Sequenzen

Nummerierung. So können vergleichbare Aminosäurepositionen in den verschiedensten Sequenzen identifiziert werden.

Des Weiteren wurden *in silico* - Analysen durchgeführt und energieminierte Kristallstrukturen mit einer Reihe von Substraten gedockt. Die Docking-Experimente wurden mit YASARA¹¹ durchgeführt. Die Energieminimierung erfolgte in einer mit Wasser gefüllten Simulationszelle, wobei das Wasser für das Docking mit AutoDock Vina wieder entfernt wurde. Sämtliche Berechnungen wurden mit dem AMBER *force field* durchgeführt.

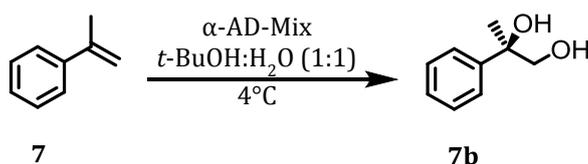
Die Visualisierung von *in silico* - Analysen und Kristallstrukturen wurde mit Pymol realisiert.

2.10 Synthese von Referenzmolekülen

Die Synthese von Referenzmolekülen wurde sowohl mittels Reinigung des Zielmoleküls aus präparativen Biotransformationen als auch mittels chemischen Synthesen erzielt.

2.10.1 Metallkatalysierte asymmetrische Dihydroxylierung

Im Folgenden wird das Standardprotokoll für die asymmetrische Dihydroxylierung mittels α - oder β -AD-Mix nach Sharpless beschrieben.

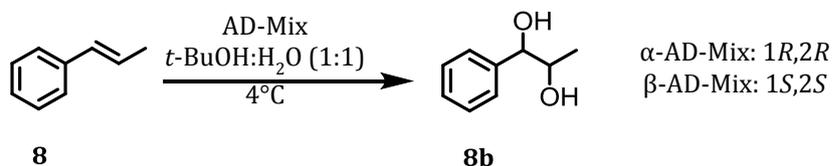


1,4 g AD-Mix (α oder β , 1,8 mmol) wurden in 5 mL *tert*-Butanol-Wasser (1:1) bei RT gelöst und es wurde 1 mmol Substrat hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 6 °C im Kühlraum gerührt und danach mit 0,5 g Natriumhydrogensulfit und 20 mL Wasser_{dest.} versetzt. Die Synthese wurde für weitere 30 min bei RT gerührt und mit 3x 10 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Nach der Säulenchromatographie (Gradient von Cyclohexan:Ethylacetat 1:1 zu reinem Ethylacetat) wurde *S*-2-Phenyl-

¹¹ www.yasara.org

1,2-propandiol als farbloses Öl erhalten. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁰

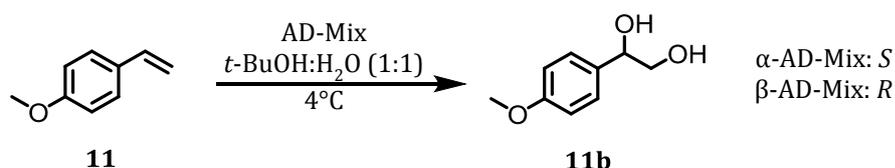
¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 1.53 (s, 3H), 2.17 (br s, 2H), 3.63 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.36 (m, 2H), 7.45 (m, 2H) und ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 26.0, 71.1, 74.8, 125.0, 127.2, 128.4, 144.9.



Der Synthese für die beiden Enantiomere des dihydroxylierten *trans*-β-Methylstyrols, (1*S*,2*S*)-1-Phenylpropan-1,2-diol (β-AD-Mix) und (1*R*,2*R*)-1-Phenylpropan-1,2-diol (α-AD-Mix), wurde vor der Inkubation im Kühlraum noch 1 mmol Methansulfonamid hinzugefügt. Nach Extraktion und Entfernen des Lösungsmittels konnten 111 mg des 1*R*,2*R*-Diols (73 % Ausbeute) und 75 mg des 1*S*,2*S*-Diols (50 % Ausbeute) isoliert werden. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁰

Für 1*R*,2*R*-Diol ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 1.061 (d, 3H), 3.843-3.895 (m, 1H), 4.372-4.387 (d, 1H), 4.798 (s, OH), 7.319-7.375 (m, 5H) und ¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 18.8, 72.3, 79.5, 126.8, 128.2, 128.5, 141.0.

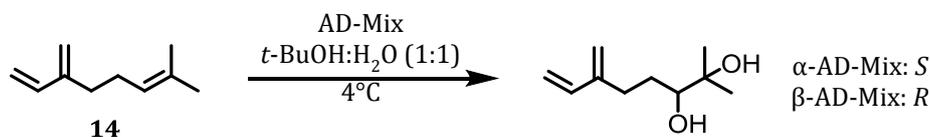
Für 1*S*,2*S*-Diol ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 1.083 (d, 3H), 3.829-3.916 (m, 1H), 4.373-4.398 (d, 1H), 4.680 (s, OH), 7.304-7.365 (m, 5H) und ¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 18.8, 72.2, 79.5, 126.8, 128.2, 128.5, 141.0.



Der Synthese für die beiden Enantiomere des dihydroxylierten 4-Methoxystyrols, *R*-1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol (β-AD-Mix) und *S*-1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol (α-AD-Mix), wurde vor der Inkubation im Kühlraum noch 1 mmol Methansulfonamid hinzugefügt. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²¹

R-Diol (weißer Feststoff, 90 % Ausbeute) ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 2.21 (br s, 2H), 3.65 (dd, *J* = 8.2, 11.6 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 3.69, 11.18 Hz, 1H), 3.8 (s, 3H), 4.76 (dd, *J* = 8.53, 8.44 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.86 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) und ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 55.3, 68.1, 74.2, 113.9, 127.3, 132.6, 159.4

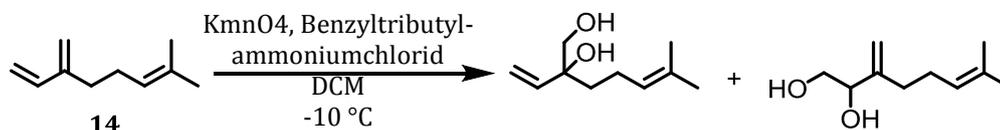
S-Diol (weißer Feststoff, 96 % Ausbeute) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 2.27$ (br s, 2H), 3.58 (dd, $J = 8.2, 11.3$ Hz, 1H), 3.64 (dd, $J = 3.53, 11.15$ Hz, 1H), 3.8 (s, 3H), 4.76 (dd, $J = 3.98, 8.28$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 8.83$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 8.47$ Hz, 1H) und $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 55.3, 68.1, 74.3, 113.9, 127.3, 132.6, 159.4$.



Zur Herstellung von 2-Methyl-6-methylenoct-7-en-2,3-diol wurde Myrcen eingesetzt und nach dem Standardprotokoll vorgegangen. Nach der Säulenchromatographie (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) wurde 2-Methyl-6-methylenoct-7-en-2,3-diol als farbloses Öl erhalten. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.¹⁸⁹

R-(β -AD-Mix, gelbes Öl, 30 % Ausbeute) und S-Diol (α -AD-Mix, gelbes Öl, 40 % Ausbeute) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 1.15$ (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.45-1.56 (m, 1H), 1.62-1.72 (m, 1H), 1.94 (br s, 1H), 2.24-2.32 (m, 1H), 2.50-2.58 (m, 1H), 3.40 (dd, $J = 1.77, 10.73$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 5.94$ Hz, 2H), 5.08 (dd, $J = 11.33, 20.94$ Hz, 1H), 5.27 (d, $J = 17.70$ Hz, 1H), 6.38 (dd, $J = 10.59, 17.69$ Hz, 1H) und $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 23.2, 26.5, 28.5, 30.2, 73.1, 78.2, 113.6, 116.0, 138.7, 146.1$.

Im Folgenden wird die Mangan-katalysierte Synthese von 1,2- und 3,10-Dihydroxymyrcen ausgehend von Myrcen beschrieben.²²²



16.5 mmol Kaliumpermanganat wurden in 500 mL Dichlormethan vorgelegt und mit 16.5 mmol Benzyltributylammoniumchlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei RT gerührt und anschließend auf -10°C abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe des Eduktes Myrcen (36 mmol). Die Synthese wurde für 1 h mit steter Kontrolle der Temperatur gerührt, wobei die Bildung von Braunstein beobachtet werden konnte. Aufgearbeitet wurde das Reaktionsgemisch mit 5 g Natriumhydroxid in 80 ml Wasser, 5 g Natriumdisulfit in 100 ml Wasser und 5,5 ml Schwefelsäure in 100 ml Wasser. Die Zugabe der verschiedenen Lösungen erfolgte nacheinander und durch langsames Hinzutropfen. Danach wurde der Syntheseansatz über einen Büchnertrichter filtriert. Die organische Phase wurde mit insgesamt 500 mL Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Cyclohexan:Ethylacetat 1:1) aufgereinigt. 1,2-Dihydroxymyrcen

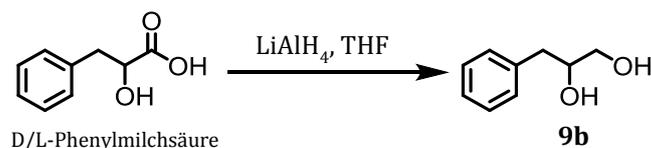
und 3,10 - Dihydroxymyrcen wurden als gelbes Öl erhalten. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²²

Für 1,2-Dihydroxymyrcen (5,7 % Ausbeute) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 1.61$ (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.94-2.20 (m, 4H), 2.93 (br s, 2H), 3.53 (dd, $J = 7.64, 11.46$ Hz, 1H), 3.69 (dd, $J = 3.49, 11.35$, 1H), 4.19 (dd, $J = 3.28, 7.86$ Hz, 1H), 4.97 (s, 1H), 5.10 (t, 1H), 5.14 (s, 1H) und $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 17.7, 25.7, 26.6, 32.6, 65.6, 75.1, 110.9, 123.7, 132.2, 148.2$.

Für 3,10 - Dihydroxymyrcen (3,7 % Ausbeute) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 1.46$ -1.55 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.60-1.66 (m, 1H), 1.67 (s, 3H), 1.94-2.10 (m, 2H), 2.72 (br s, 2H), 3.47 (t, 2H), 5.11 (t, 1H), 5.26 (dd, $J = 1.74, 10.69$ Hz, 1H), 5.36 (dd, $J = 1.26, 17.29$ Hz, 1H), 5.80 (dd, $J = 10.82, 17.29$ Hz, 1H) und $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 17.7, 22.0, 25.7, 36.8, 68.8, 76.3, 115.2, 124.2, 132.2, 140.7$.

2.10.2 Reduktion von α -Hydroxysäuren mit Lithiumaluminiumhydrid

Die Synthese von 3-Phenyl-1,2-propandiol ausgehend von Phenylmilchsäure erfolgte nach der Vorschrift zur Reduktion von α -Hydroxysäuren mittels Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH_4).²²³ Für 1 Mol Alkohol wurden 0,75 Mol LiAlH_4 eingesetzt. Als Edukte für die Synthese wurden sowohl ein racemisches Gemisch aus D/L-Phenylmilchsäure als auch reine L-Phenylmilchsäure verwendet.

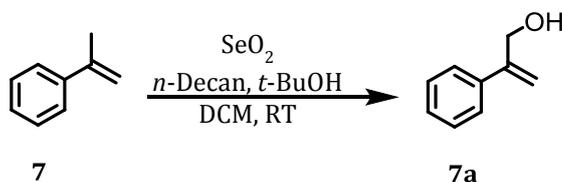


Unter Schutzatmosphäre (N_2) wurden 0,22 g LiAlH_4 (5.85 mmol) in 15 mL trockenem THF vorgelegt. Auch 2.8 mmol Edukt (D/L- oder L-Phenylmilchsäure) wurden in 15 mL trockenem THF gelöst und langsam unter Rühren der LiAlH_4 Lösung zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 1 h unter Rückfluss gerührt. Daraufhin wurde die Reaktion mit Eiswasser gequencht, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu erkennen war. Das entstandene Aluminiumhydroxid wurde mit 10-%iger Schwefelsäure gelöst und die wässrige Phase dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO_4 getrocknet, filtriert und weiter im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat, 2:1) und als weißer Feststoff erhalten. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^{224,225}

Weißer Feststoff (57 % Ausbeute für Racemat, 82 % Ausbeute für *S*-Enantiomer) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 2.66$ -2.79 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.46 (dd, $J = 7.10, 11.40$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 3.12, 11.43$ Hz, 1H), 3.86-3.94 (m, 1H), 7.15-7.28 (m, 5H) und $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) $\delta = 39.7, 66.0, 73.1, 126.6, 128.6, 129.3, 137.8$.

2.10.3 Simmons-Smith-Oxidation

Die allylische Monohydroxylierung von α -Methylstyrol wurde mittels einer Simmons-Smith-Oxidation erzielt, beschrieben im Patent EP 1537913 A1.²²⁰



In einem 100 mL Rundkolben wurden 12,5 mL *n*-Decan, 6,45 mL *tert*-Butanol und 50 mL Dichlormethan vorgelegt. In diesem Lösungsmittelgemisch wurden sowohl 1 mmol Selendioxid (111 mg) als auch 1,5 mmol Essigsäure (86,6 μ L) gelöst. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei RT gerührt und 49,7 mmol des Eduktes α -Methylstyrol (6,5 mL) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für weitere 71 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum abgetrennt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Ethylacetat, 5:1) aufgereinigt. 3-Hydroxyphenylpropen konnte als gelbliches Öl gewonnen werden. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁰

Für 3-Hydroxyphenylpropen (2 % Ausbeute) $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ = 1.43 (s, 1H), 4.55 (s, 2H), 5.36 (d, J = 1.27 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 7.29-7.37 (m, 3H), 7.44-7.46 (m, 2H) und $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ = 65.0, 112.6, 126.1, 127.9, 128.5, 138.5, 147.3.

2.10.4 Dioxygenase-katalysierte asymmetrische Dihydroxylierung

Die biologische Synthese von Diolen wurde in präparativen Biotransformationen (60-160 mL) mit ruhenden Zellen durchgeführt (s. Kapitel 2.5.6). Waren die Ausbeuten zu gering für eine spektroskopische Analyse, erfolgte die Auswertung mittels Gaschromatographie. Durchgeführte, präparative Biotransformationen sind in Tabelle 2.27 dargestellt.

Tabelle 2.27: Präparative Biotransformationen mit rekombinanten, induzierten *Eschichia coli*-Zellen

Rekombinanter Stamm	Eingesetzte(s) Substrat/-menge	Analysemethode
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pDTG141 → Naphthalen Dioxygenase	α -Methylstyrol (153,6 mg) Allylbenzol (177,2 mg)	GCMS NMR
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pIP107D → Cumol Dioxygenase	Styrol (62,5 mg) α -Methylstyrol (70,9 mg)	GCMS GCMS
<i>E. coli</i> JM109(DE3)_pDTG601 → Toluol Dioxygenase	Diphenylmethan (133,3 mg) Toluol (73,7 mg)	NMR GCMS

Präparative Umsetzung von α -Methylstyrol mit Naphthalen Dioxygenase

26 g induzierte Biofeuchtmasse wurden in 130 mL Assaypuffer *in vivo* (s. 2.5.6) resuspendiert, mit 153,6 mg α -Methylstyrol versetzt und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Danach erfolgte die Extraktion mittel MTBE (3x 130 mL). Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt mit der GCMS vermessen. Sowohl das mono- als auch das dihydroxylierte Produkt konnten detektiert werden. Die Auftrennung der beiden Produkte wurde mittels Säulenchromatographie durchgeführt. Nach der Chromatographie war jedoch der Produktverlust so hoch, dass lediglich ein Nachweis über die Dünnschichtchromatographie möglich war. Die Produkte wurden deswegen mittels chemisch synthetisierten oder kommerziellen Standards identifiziert (s. Abbildung 2.9).

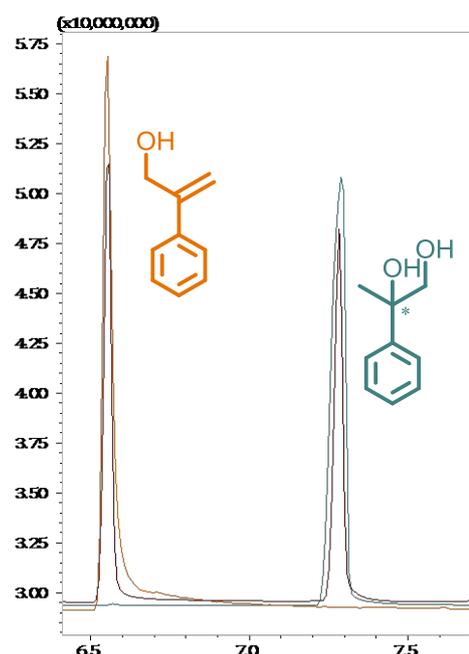


Abbildung 2.9: GCMS-Chromatogramm der präparativen Umsetzung von α -Methylstyrol mit NDO_{wt} (in schwarz)

Präparative Umsetzung von Allylbenzol mit Naphthalen Dioxygenase

30 g induzierte Biofeuchtmasse wurden in 150 mL Assaypuffer *in vivo* (s. 2.5.6) resuspendiert, mit 177,2 mg Allylbenzol versetzt und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Umsetzung von α -Methylstyrol mit NDO_{wt}. Das erhaltene Rohprodukt konnte mittels NMR identifiziert werden und stellte sich als 3-Phenylpropan-1,2-diol heraus. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁶

Für 3-Phenylpropan-1,2-diol ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 2.01 (br s, 2H), 2.66-2.76 (m, 2H), 3.46 (dd, J = 7.32, 11.46 Hz, 1H), 3.63 (dd, J = 2.93, 11.51 Hz, 1H), 3.86-3.96 (m, 1H), 7.12-7.2 (m, 3H), 7.21-7.28 (m, 2H) und ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 38.8, 65.0, 71.9, 125.6, 127.6, 127.7, 128.3, 136.6.

Präparative Umsetzung von α -Methylstyrol und Styrol mit Cumol Dioxygenase

Je 12 g induzierte Biofeuchtmasse wurden in 60 mL Assaypuffer *in vivo* (s. 2.5.6) resuspendiert, mit 62,5 mg Styrol bzw. 70,9 mg α -Methylstyrol versetzt und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Umsetzung von α -Methylstyrol mit NDO_{Wt}. Die Menge der erhaltenen Rohprodukte für beide Umsetzungen war zu gering für die säulenchromatographische Auftrennung, sodass eine erste Identifizierung der Produkte mittels GCMS erfolgte (s. Abbildung 2.10).

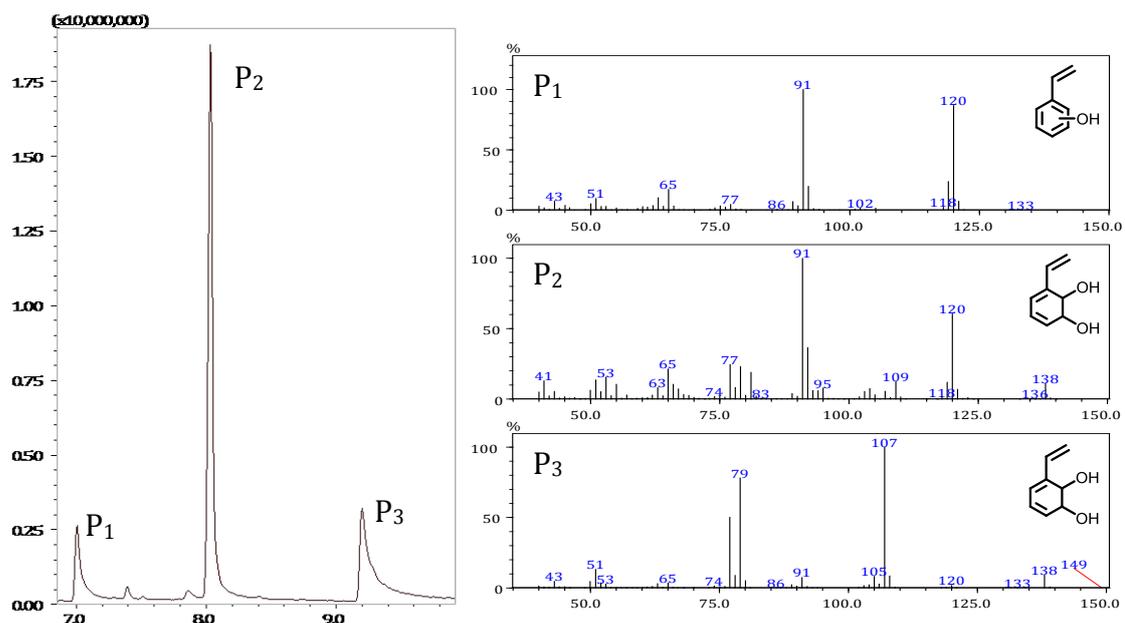


Abbildung 2.10: (Li) GCMS-Chromatogramm der präparativen Umsetzung von Styrol mit CDO_{Wt}, (Re) Fragmentierungsmuster der unterschiedlichen Produktpeaks

Die Analyse der Fragmentierungsmuster führt zu der Annahme, dass die Cumol Dioxygenase sowohl am Substituenten dihydroxyliert als auch am Ring. Hierbei stellt P₁ das Wasser-Eliminationsprodukt dar (Phenol-Form), P₂ das Dihydrodiol-Produkt und P₃ konnte mittels kommerziellem Standard als 1-Phenyl-1,2-ethandiol identifiziert werden.

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei der Umsetzung von α -Methylstyrol und bestätigt somit Vorarbeiten am ITB, worin der Wildtyp der Cumol Dioxygenase als ring-spezifische Dioxygenase beschrieben wurde.²⁰¹ Die Identifizierung der Produkte erfolgte auch hier über GCMS und den resultierenden Fragmentierungsmustern der Produkte (s. Abbildung 2.12).

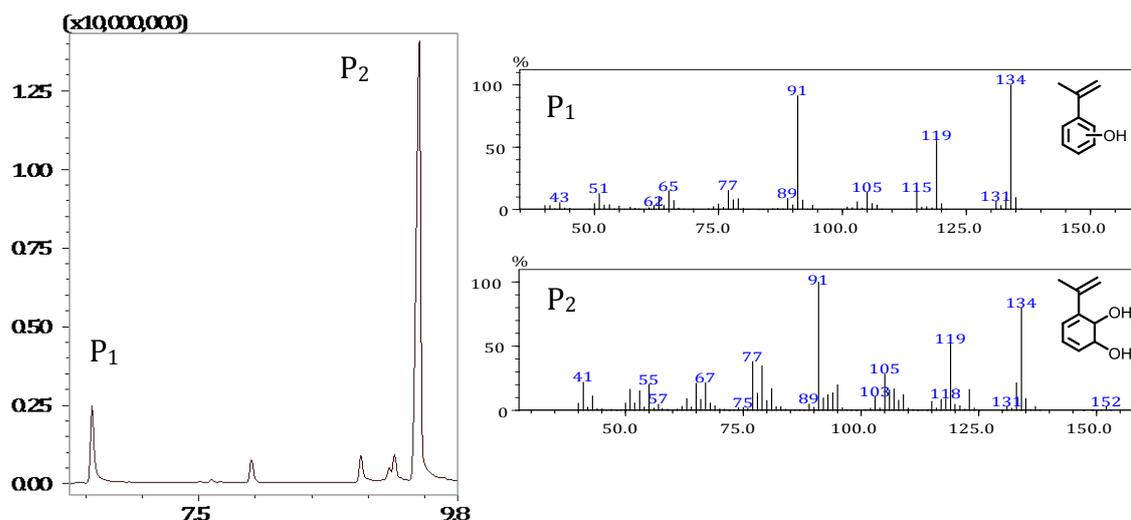


Abbildung 2.12: (Li) GCMS-Chromatogramm der Umsetzung von α -Methylstyren mit Cumol Dioxygenase, (Re) Fragmentierungsmuster der unterschiedlichen Produktpeaks

Bei der Umsetzung von α -Methylstyrol konnte keine Dihydroxylierung des Substituenten beobachtet werden. P₁ stellt vermutlich das Wasser-Eliminationsprodukt dar (Phenol-Form), P₂ das Dihydrodiol-Produkt.

Präparative Umsetzung von Diphenylmethan mit Toluol Dioxygenase

15,9 g induzierte Biofeuchtmasse wurden in 79,5 mL Assaypuffer *in vivo* (s. 2.5.6) resuspendiert, mit 133,3 mg Diphenylmethan versetzt und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Umsetzung von α -Methylstyrol mit NDO_{Wt}. Das erhaltene Rohprodukt konnte mittels NMR identifiziert werden und stellte sich als 3-Benzyl-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol heraus. Die NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.²²⁸

Für 3-Benzyl-3,5-Cyclohexadien-1,2-diol ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 3.46 (s, 2H), 3.69 (d, J = 6.21 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 51.9 Hz, 2H), 5.53 (d, J = 4.81 Hz, 1H), 5.64 (dd, J = 2.88, 9.57 Hz, 1H), 5.75-5.82 (m, 1H), 7.16-7.23 (m, 3H), 7.25-7.33 (m, 2H) und ¹³C NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ = 40.3, 68.2, 68.7, 120.0, 123.0, 125.9, 128.2, 128.9, 129.5, 139.8, 141.6.

Präparative Umsetzung von Toluol mit Toluol Dioxygenase

Je 16 g induzierte Biofeuchtmasse wurden in 80 mL Assaypuffer *in vivo* (s. 2.5.6) resuspendiert, mit 73,7 mg Toluol versetzt und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Umsetzung von α -Methylstyrol mit NDO_{Wt}. Die Menge des erhaltenen Rohproduktes war zu gering für die säulen-

chromatographische Auftrennung, sodass eine erste Identifizierung der Produkte mittels GCMS erfolgte (s. Abbildung 2.13).

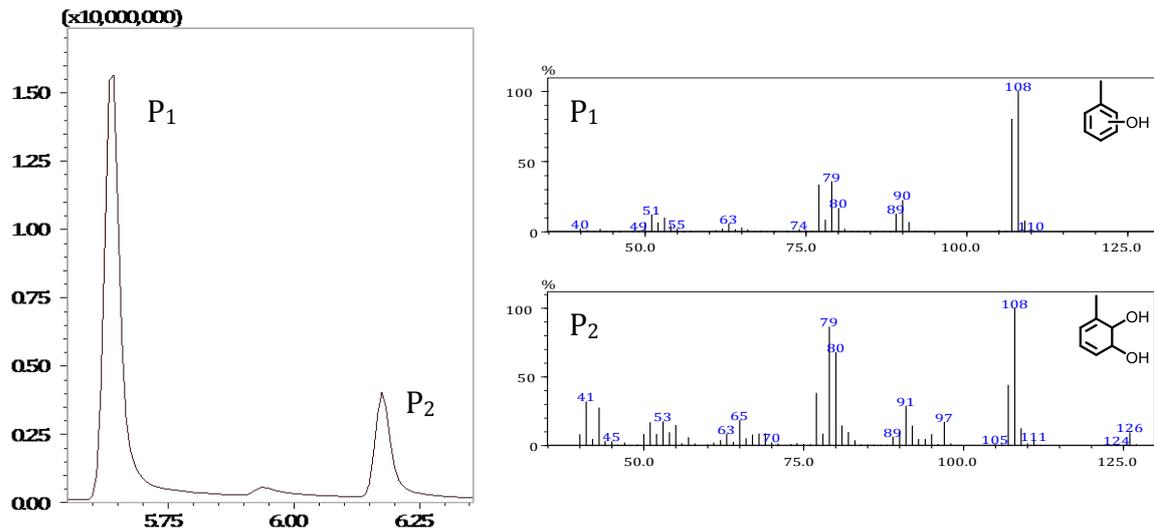
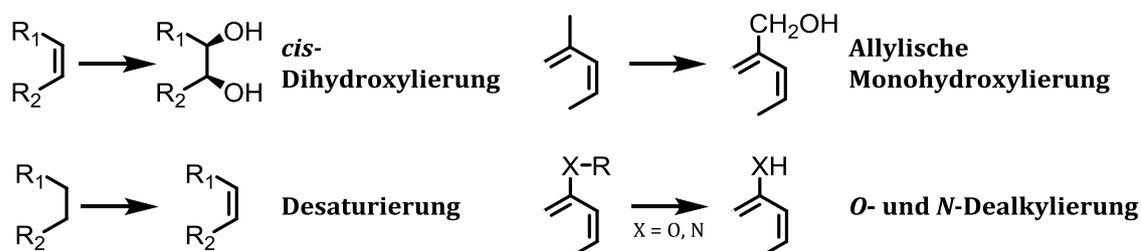


Abbildung 2.13: (Li) GCMS-Chromatogramm der Umsetzung von Toluol mit Toluol Dioxygenase, (Re) Fragmentierungsmuster der unterschiedlichen Produktpeaks

Die Umsetzung von Toluol mit der Toluol Dioxygenase lieferte zwei Produktpeaks: P₁ das Wasser-Eliminationsprodukt, welches im Sauren entsteht und P₂ das in der Literatur beschriebene Dihydrodiol.

3 Ergebnisse

Im Weiteren sind die experimentellen Arbeiten beschrieben, wobei der folgende Reaktionsraum mit den Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen erschlossen wurde.



Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit eine breite Palette an Substraten untersucht, die sich in Substrate mit aromatischem Motiv (**I**), Monoterpene (**II**) und Sesquiterpene (**III**) gliedern lässt (s. Abbildung 3.1).

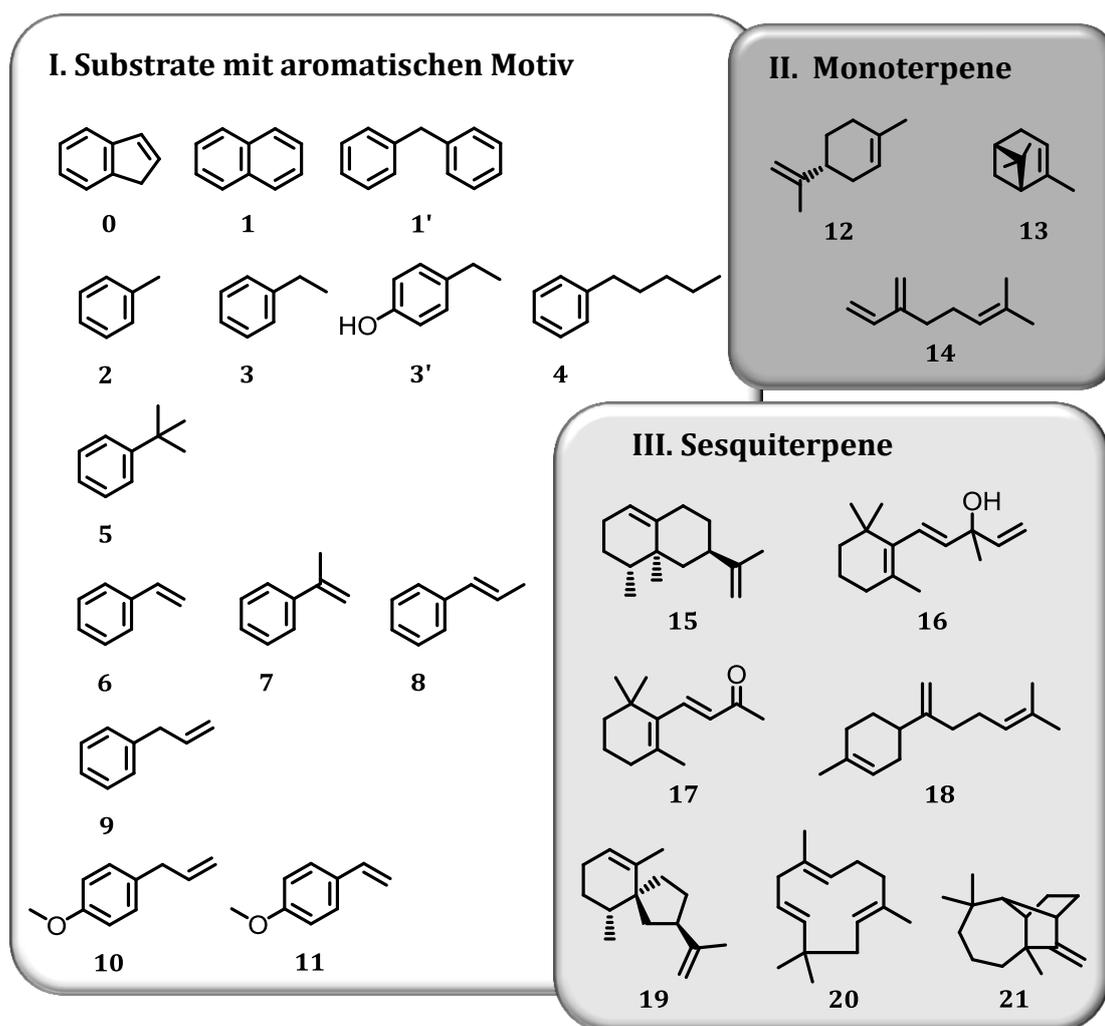


Abbildung 3.1: Übersicht der untersuchten Substratpalette

3.1 Naphthalen Dioxygenase im *in vitro* System

3.1.1 Expression und Aufreinigung über Affinitätschromatographie

Für die heterologe Expression in *E. coli* M15(pREP4) wurden die einzelnen Komponenten, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, exprimiert. Zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer wurde die Bildung der Zielproteine über eine SDS-PAGE über 20 h verfolgt. In Abbildung 3.2 ist der Expressionsverlauf der Reduktase und Oxygenasekomponenten über die Zeit dargestellt.

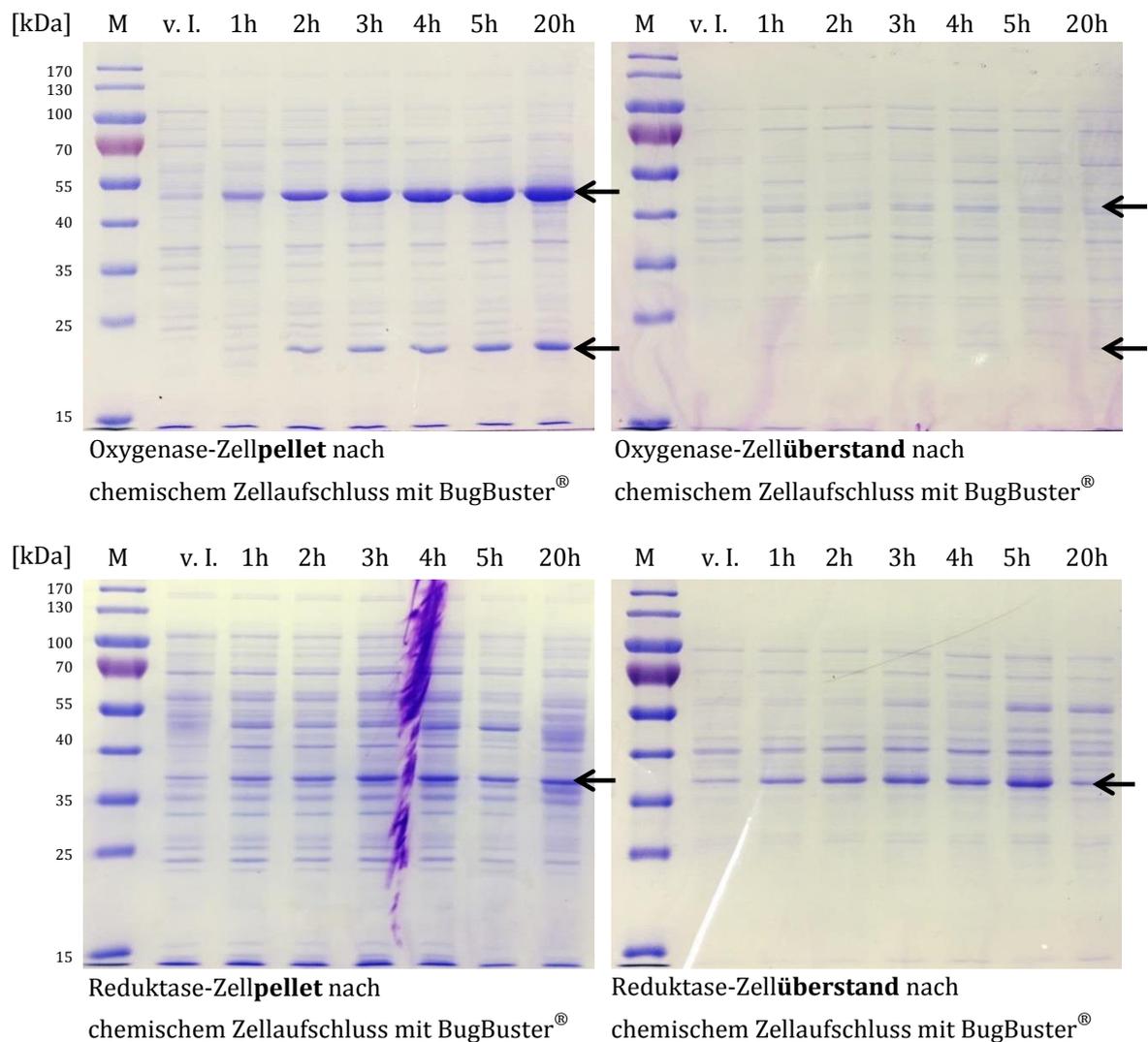


Abbildung 3.2: 12 %ige SDS-PAGE des Expressionsverlaufs der His-getaggtten Reduktase und Oxygenasekomponenten der NDO_{wt} in *E. coli* M15(pREP4) über 20 h. (Li. o./re. o.: Oxygenase-Zellpellet/Zellüberstand; Li. u./re. u.: Reduktase-Zellpellet/Zellüberstand; schwarze Pfeile markieren die exprimierten Zielproteine (α -Untereinheit: 50 kDa, β -Untereinheit: 22 kDa, Reduktase: 37 kDa); Proteingehalt mittels BCA standardisiert auf 15 μ g/Spur)

Da die Proben durch ein chemisches Aufschlussverfahren lysiert wurden, kam es im Fall der Oxygenase zur Akkumulation der Zielproteine im Zellpellet. Im Weiteren

erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall, wodurch die Oxygenase in der löslichen Fraktion detektiert werden konnte. Nichtsdestotrotz zeigte die ansteigende Proteinkonzentration der Zielproteine, dass eine Expressionsdauer von 20 h für die Herstellung der Zielproteine geeignet ist.

Die Reinigung der His-getaggten Komponenten wurde wie in Kapitel 2.5.5 durchgeführt. Zur Ermittlung der Zielfraktionen wurden zunächst alle erhaltenen Elutionfraktionen gesammelt und mit einer SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis für die Zielfraktionen ist in Abbildung 3.3 für die Oxygenase, das Ferredoxin und die Reduktase der Naphthalen Dioxygenase dargestellt.

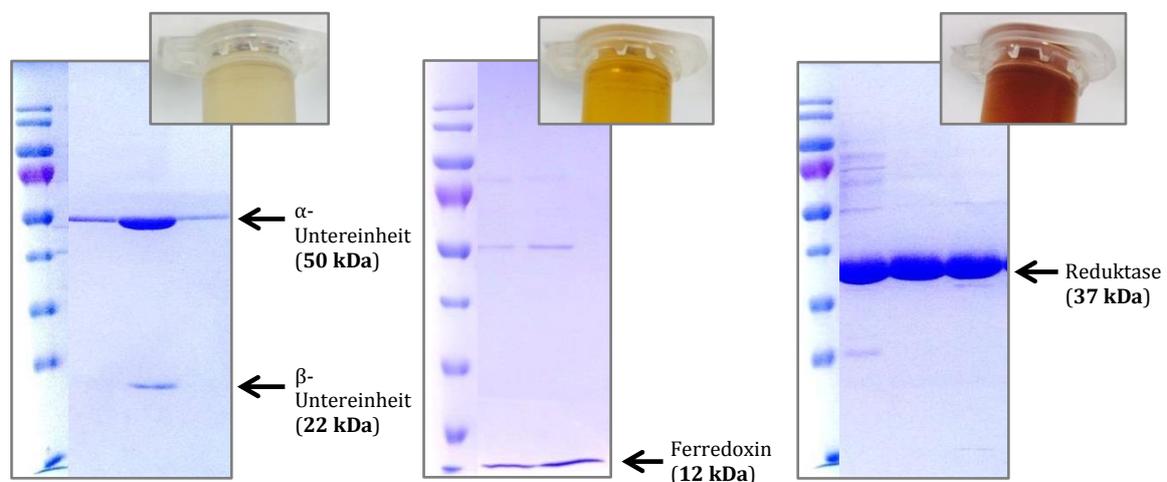


Abbildung 3.3: Ergebnis der IMAC-Reinigung des Multikomponentensystems Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (**Li**: Gereinigte Oxygenase, **Mi**: Gereinigtes Ferredoxin, **Re**: Gereinigte Reduktase; Eppendorf-Tubes zeigen die Kolorierung der eluierten Zielfraktion an; Proteingehalt mittels BCA standardisiert auf 15 µg/Spur)

Im Fall der Oxygenase ist nur die α -Untereinheit getaggt, die β -Untereinheit weist jedoch eine starke Affinität zur α -Untereinheit auf, sodass diese gemeinsam eluieren. Neben der Herstellung von gereinigten Proteinfractionen für *in vitro* Versuche wurde die Reinigung der Reduktase und Oxygenase noch aus einem weiteren Grund verfolgt. Bei der Analyse des *in vivo* Systems wurde keine (Über)expression des Multikomponentensystems beobachtet, weshalb eine Reihe von Optimierungsversuchen durchgeführt wurde, jedoch ohne eine deutliche Expression der Zielproteine zu erhalten. Da im *in vivo* System keine spezifischen Tags verwendet wurden, wurde der spezifische Nachweis mittels eines Protein-spezifischen Antikörpers angestrebt. Da der Nachweis lediglich für denaturierte Proteine (mittels SDS-PAGE) notwendig war, wurden die Antigene (Oxygenase und Reduktase) mittels His-Tag gereinigt und als denaturierte Antigene an Pineda Antikörper-

Service (Berlin, DE) zur Herstellung der Antikörper übergeben. In Abbildung 3.4 sind die gereinigten Antigenproben dargestellt.

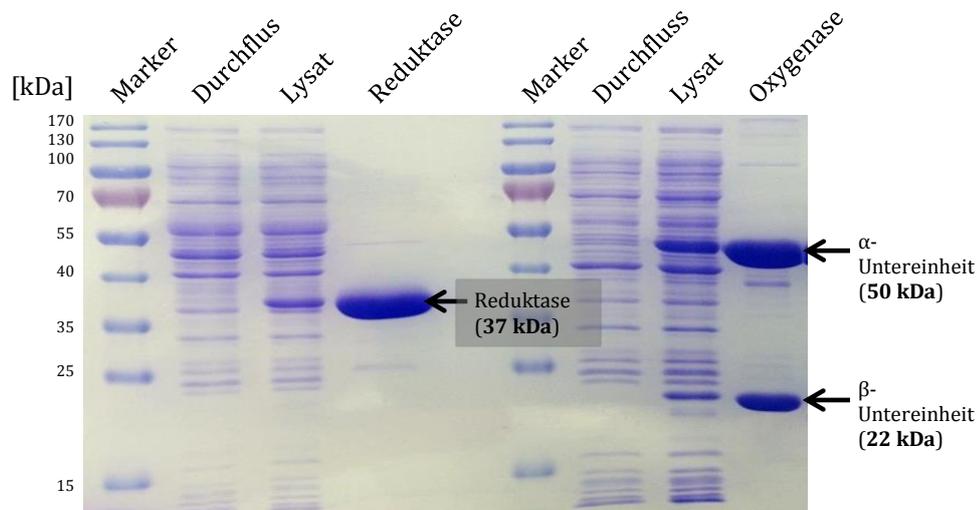


Abbildung 3.4: 12 %ige SDS-PAGE der IMAC-Reinigung der His-getaggten Reduktase und Oxygenasekomponenten der NDO_{wt} in *E. coli* M15(pREP4) (Proteingehalt mittels BCA standardisiert auf 15 $\mu\text{g}/\text{Spur}$)

Die Funktionsüberprüfung der spezifischen Protein-Antikörpers ist in Kapitel 3.2.1 dargestellt.

3.1.2 Optimierung des *in vitro* Systems

Bei der Optimierung des *in vitro* Systems wurden drei Parameter untersucht:

- Verhältnisse der Einzelkomponenten
- Reaktionszeit und
- eingesetztes Cosolvens zur Verbesserung Substratlöslichkeit

Von weiteren Optimierungsparametern wurde abgesehen, da das verwendete Puffersystem für verwandte Naphthalen Dioxygenasen bereits in der Literatur beschrieben ist.²⁰⁸ Gerade im Bezug auf die Stabilität der reduktiven Partner Ferredoxin und Reduktase gibt es in der Literatur bereits zahlreiche Hinweise auf die unterschiedlichen Stabilitäten²²⁹⁻²³¹ der einzelnen Komponenten, weshalb in den meisten *in vitro* Untersuchungen ein Überschuss der Redoxpartner gewählt wurde.^{182,208} Mit dieser Grundlage wurden unterschiedliche Kombinationen der drei Komponenten der Naphthalen Dioxygenase getestet. Als **I** wird hierbei die Kombination von 1 μM Oxygenase, 20 μM Ferredoxin und 5 μM Reduktase bezeichnet, als **IV** die Kombination von 1 μM Oxygenase, 12 μM Ferredoxin und 3 μM Reduktase. In Abbildung 3.5 sind Zeitverläufe der *in vitro* Umsetzungen des natürlichen Substrates Naphthalen (**1**) und Styrol (**6**) über 2 h bei 30 °C dargestellt.

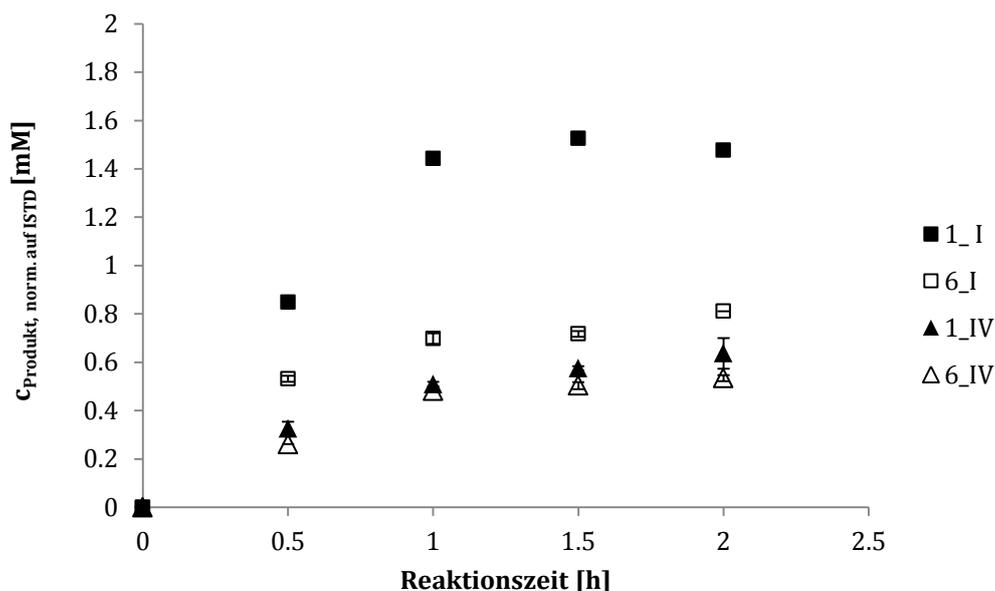


Abbildung 3.5: Zeitverlauf der *in vitro* Umsetzungen von 2 mM Naphthalen (**1**) und Styrol (**6**) zu den korrespondierenden Diolen (1,2-Naphthalendihydrodiol (**1a**) und 1-Phenylethan-1,2-diol (**6a**)) mit unterschiedlichen Kombinationen aus Oxygenase:Ferredoxin:Reduktase (**I**: 1:20:5 μM ; **IV**: 1:12:3 μM) (Normierung der Peakflächen für Umsetzungen und die Kalibriergerade erfolgte auf 1 mM 1-Octanol als internen Standard. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.)

Lagen Ferredoxin und Reduktase mit 20 μM und 5 μM im Überschuss vor, wurden $1,48 \pm 0,02 \text{ mM}$ 1,2-Naphthalendihydrodiol gebildet. Wurde der Überschuss auf 12 μM bzw. 3 μM reduziert, sank die Ausbeute um mehr als die Hälfte auf $0,64 \pm 0,06 \text{ mM}$ **1a**. Dieser Effekt zeichnet sich bei der Umsetzung von Styrol ebenfalls ab, jedoch war die Auswirkung bei einer allgemein schlechteren Umsetzung des nicht-natürlichen Substrates weniger stark zu beobachten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde **I** als geeignete Komponentenkombination für weitere Experimente verwendet.

Generell konnte das getestete *in vitro* System für die Untersuchung von verschiedenen Enzymvarianten eingesetzt werden, da mit rund 74 % Umsatz des natürlichen Substrates sowohl bessere als auch schlechtere Varianten identifiziert werden können. Bei der Umsetzung von nicht-natürlichen Substraten wurden mit $\sim 41 \%$ Umsatz ebenfalls moderate Ausbeuten erhalten.

Im Bezug auf die Reaktionsdauer wurde ein Zeitfenster von 1,5 bzw. 2 h für die Biotransformationen gewählt, welche nachfolgend als Endpunktbestimmungen durchgeführt wurden.

Als dritter Parameter wurde das verwendete Cosolvens zur Lösung der meist hydrophoben Substrate untersucht. Bereits in vorangegangenen Studien²³² konnte

der große Einfluss des Lösungsmittels auf die Aktivität in *in vitro* Umsätzen gezeigt werden. Zur Untersuchung des Einflusses des Cosolvens wurden neben wasser-nichtmischbaren Lösungsmitteln wie Dodecan, Cyclohexan und Dichlormethan auch wassermischbare Lösungsmittel wie DMSO, Tetrahydrofuran, Acetonitril, Aceton, Isopropanol, Methanol und Ethanol untersucht. Außerdem wurden unterschiedliche Volumenprozent (1-20 % (v/v)) der zehn Lösungsmittel bei der Umsetzung von Styrol (**6**) getestet (s. Abbildung 3.6).

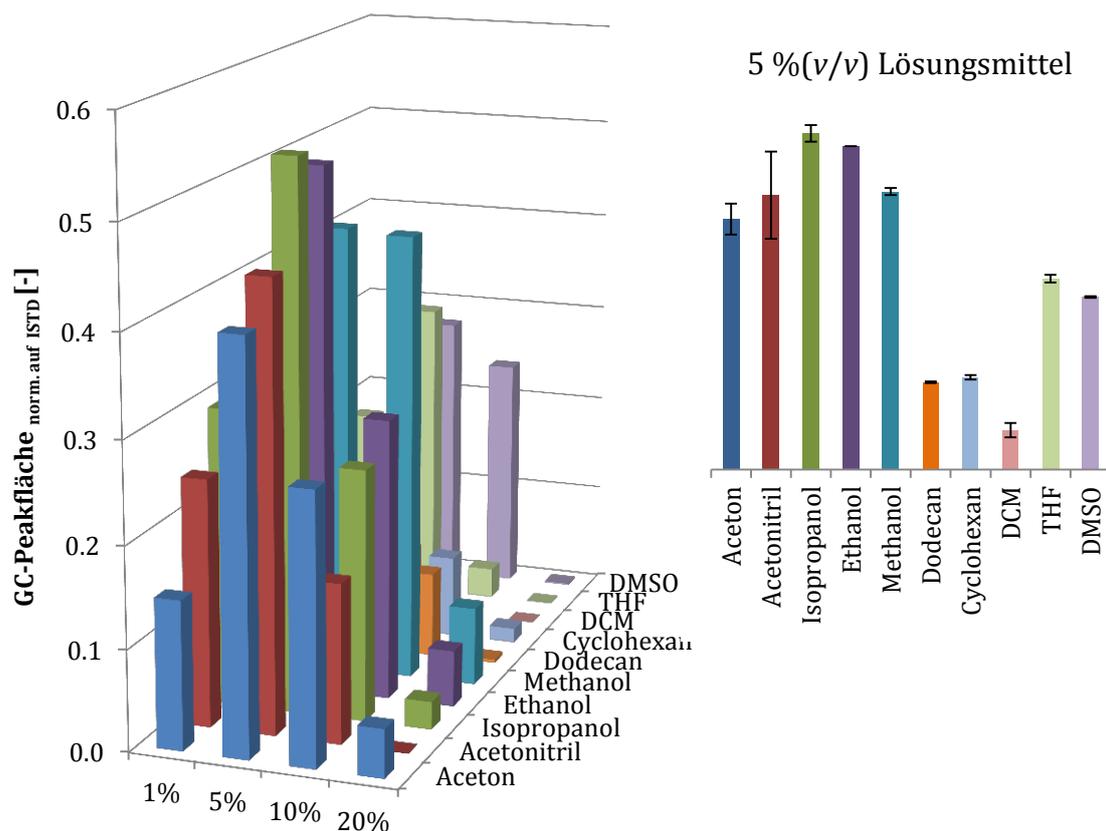


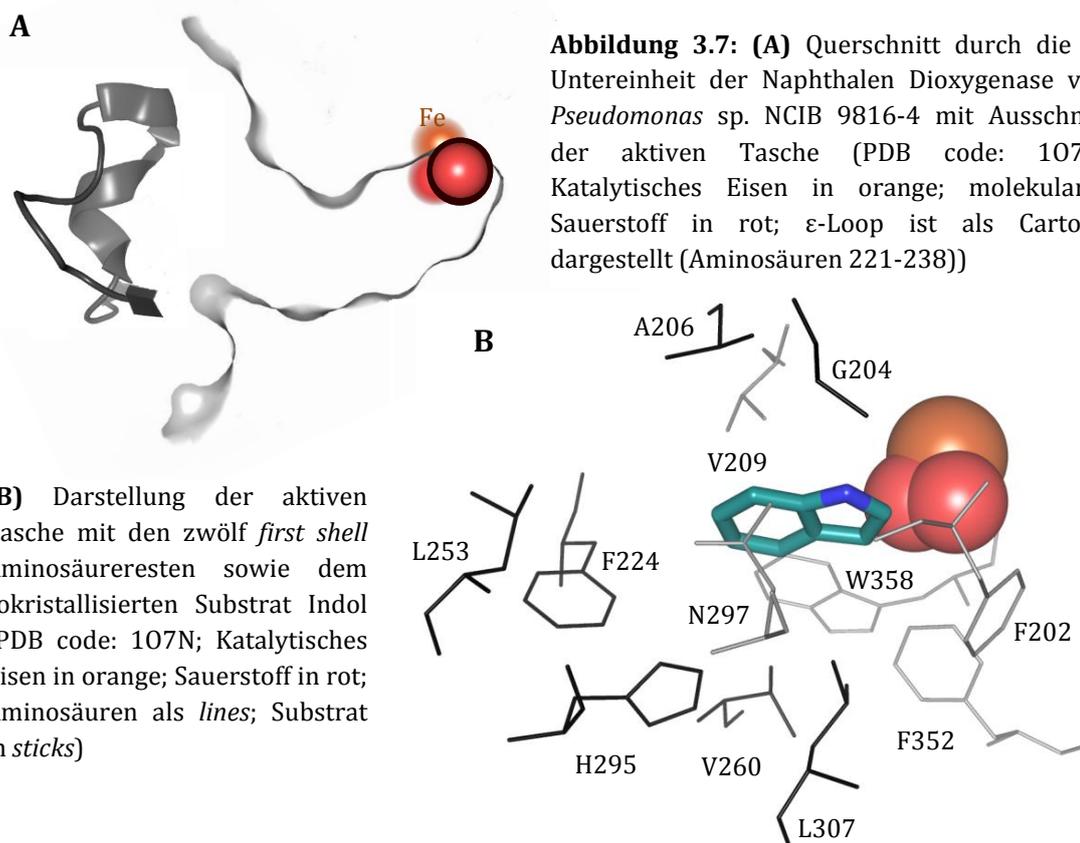
Abbildung 3.6: Effekt von unterschiedlichen wassermischbaren und nicht-wassermischbaren Lösungsmitteln und deren prozentualen Anteil (1-20 % (v/v)) auf die Aktivität der Naphthalen Dioxygenase im *in vitro* System (**I**) nach einer Reaktionsdauer von 1,5 h bei 30 °C (**Re. o.:** Darstellung der Aktivitäten bei Einsatz von 5 % (v/v) Lösungsmittel). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Grundsätzlich wurde die Aktivität beim Einsatz von nicht-wassermischbaren Lösungsmitteln am Stärksten reduziert. Aceton, Acetonitril, Isopropanol, Ethanol und Methanol zeigten hingegen durchwegs gute Aktivitäten, beim Einsatz von Tetrahydrofuran und DMSO wurde eine Reduktion der Aktivität um den Faktor zwei beobachtet. Des Weiteren konnte der Volumenanteil des Lösungsmittels als kritischer Parameter identifiziert werden. Bei allen getesteten Lösungsmitteln konnten die höchsten Aktivitäten mit einem Volumenanteil von 5 % (v/v) erzielt

werden. Methanol stellte hierbei eine Ausnahme dar, da es als einziges Lösungsmittel auch beim Einsatz von 10 % (v/v) die gleiche Aktivität gegenüber dem Einsatz von 5 % (v/v) aufwies. Durch die Erhöhung des Cosolvens-Anteils von 1 % (v/v) auf 5 % (v/v) Ethanol konnte die Aktivität um den Faktor zwei gesteigert werden.

3.1.3 Semi-rationales Proteindesign: Alanin-Scan und Konsensus-Varianten

Zur Identifizierung von Mutagenese-Hotspots in der aktiven Tasche der Naphthalen Dioxygenase wurden insgesamt zwölf Positionen adressiert und mittels QuikChange™-Mutagenese in Alanin oder Glycin überführt. Die untersuchten Positionen stellen *first shell* Aminosäuren dar und bilden somit die Oberfläche der aktiven Tasche. Da es sich bei der Geometrie des aktiven Zentrums um eine planare, zylinderförmige Struktur handelt, wurden die Aminosäurereste durch ihre Entfernung vom kokristallisierten Substrat kategorisiert (s. Abbildung 3.7).



Im Abstand von vier Ångström befinden sich die Reste F202, H295, N297, F352 und A206. In Richtung des Substrateinganges sind die fünf Ångström entfernten Aminosäuren V209, L253, L307 und G204 zu finden. F224, V260 und W358 sind bereits sechs Ångström vom kokristallisierten Substrat Indol entfernt.

3.1.4 Biotransformation im *in vitro* System

Das Screening der Alanin- bzw. Glycinvarianten wurde mit einem reduzierten Satz an Substraten getestet: α -Methylstyrol (**7**), Styrol (**6**), Toluol (**2**) und 4-Allylsiol (**11**). Die Ergebnisse der *in vitro* Umsetzungen sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

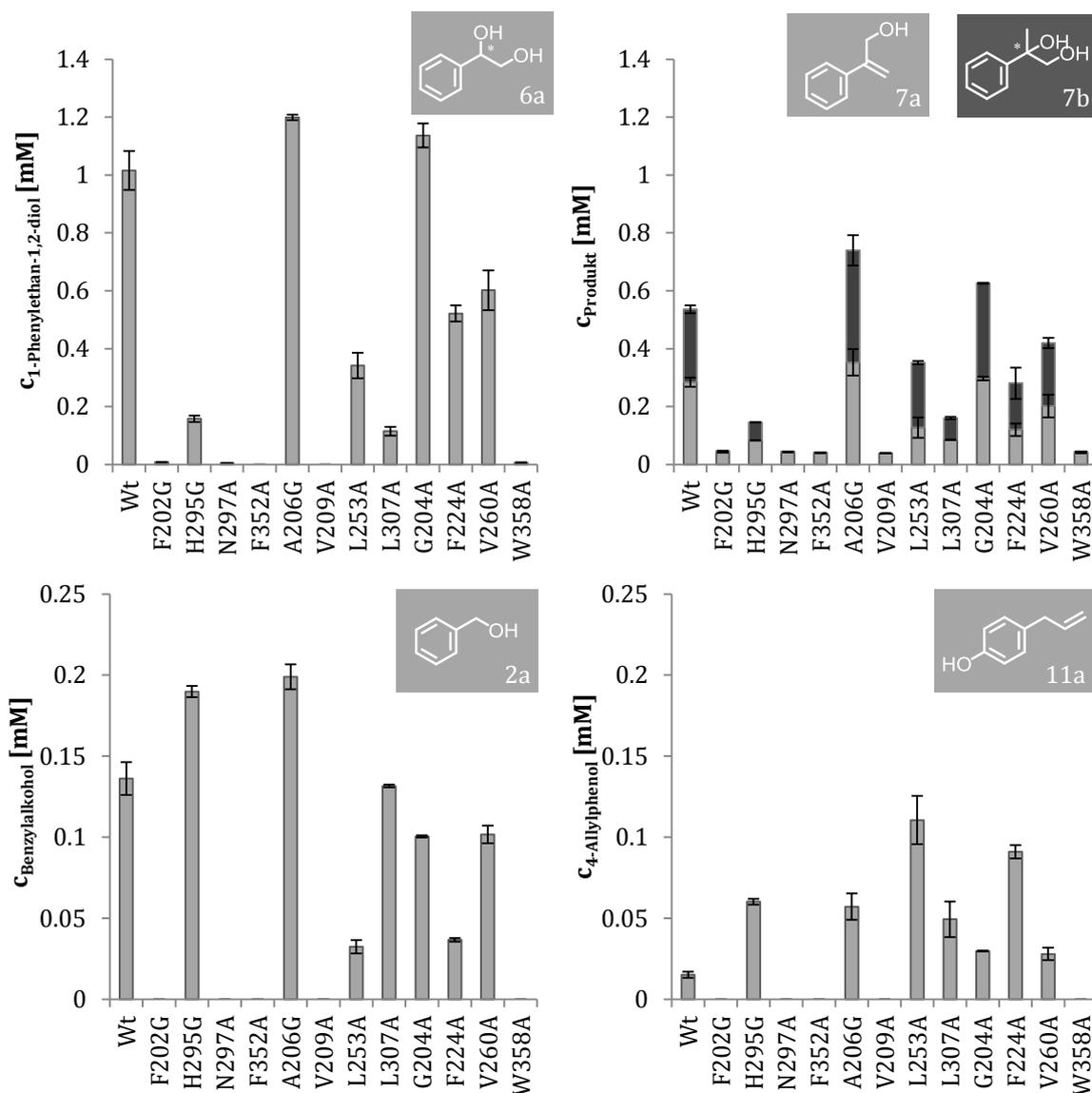


Abbildung 3.9: *In vitro* Biotransformationen von 2 mM α -Methylstyrol (**7**, rechts oben) und Styrol (**6**, links oben), sowie Toluol (**2**, links unten) und 4-Allylsiol (**11**, rechts unten) mit den korrespondierenden hydroxylierten Produkten (**7a**: 3-Hydroxyphenylpropen, **7b**: 2-Phenylpropan-1,2-diol, **6a**: 1-Phenylethan-1,2-diol, **2a**: Benzylalkohol und **11a**: 4-Allylphenol) mit dem gereinigten Enzymkomplex (1 μ M Oxygenase, 20 μ M Ferredoxin, 5 μ M Reduktase) bei 30 °C für 2 h. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Generell konnte von **6** über **7** hinzu **2** und **11** eine Abnahme der Aktivität beobachtet werden. So zeigten der Wiltyp und die Varianten bei der Umsetzung von Styrol mit 50-60 % die höchsten Aktivitäten (oben links). Die Punktmutationen A206G und G204A lieferten mit $1,2 \pm 0,01$ mM bzw. $1,14 \pm 0,04$ mM für das Diol **6a** rund 20 %

mehr Produkt als der Wildtyp. Bei der Umsetzung des verzweigten Alkens **7** war ein ähnlicher Aktivitätsverlauf über den untersuchten Mutationsraum zu beobachten. Wiederum waren die höchsten Umsätze bei A206G und G204A zu finden. Des Weiteren konnten auch bei den Varianten V260A, F224A und L253A moderate Produktkonzentrationen nachgewiesen werden. Die erzielten Aktivitäten und die Analyse der entsprechenden Stereoselektivitäten von **6a** und **7b** sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Weitere Aktivitätseinbußen ließen sich bei der Katalyse von Toluol feststellen, wobei das allylisch monohydroxylierte Produkt Benzylalkohol (**2a**) entstand. Die *O*-Demethylierung von 4-Allylanisol (**10**) zeigte die geringsten Produktbildungsraten mit einem Umsatz von maximal 5 %.

Die Glycin-Variante an Position 206 zeigte bei den untersuchten Hydroxylierungsreaktionen eine deutliche Aktivität gegenüber den eingesetzten Substraten, wobei in allen Fällen eine Aktivitätssteigerung gegenüber des Wildtyps zu beobachten war. Dies konnte auch für die Varianten H295G, L253A, L307A, G204A, F224A und V260A festgestellt werden. Keine der Varianten zeigte eine dem Wildtyp gegenläufige Regio- oder Stereoselektivität, sie unterschieden sich jedoch in ihrer Aktivität gegenüber den eingesetzten Substraten (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: *In vitro* Produktbildung der Substrate **6** und **7** mit der NDO Bibliothek unter Standardbedingungen (n. d.: nicht detektiert; n. a.: nicht auswertbar, da Umsatz zu gering; * NK_1: Umsetzung mit hitze-inaktiviertem Wildtyp; ** NK_2: Assay ohne Zugabe von Protein)

Varianten	Styrol		α -Methylstyrol	
	c _{6a} [mM]	ee _R [%]	c _{7ab} [mM]	ee _S [%]
NDO _{Wt}	1,02 ± 0,07	86 ± 0	0,54 ± 0,01 (53:47 7a:7b)	77 ± 2
F202G	n. d.	n. d.	0,05 ± 0,00 (88:12 7a:7b)	n. a.
H295G	0,16 ± 0,01	n. a. ⁺	0,15 ± 0,00 (57:43 7a:7b)	76 ± 4
N297A	n. d.	n. d.	0,04 ± 0,00 (94:6 7a:7b)	n. d.
F352A	n. d.	n. d.	0,04 ± 0,00 (96:4 7a:7b)	n. d.
A206G	1,20 ± 0,01	81 ± 0	0,74 ± 0,05 (48:52 7a:7b)	79 ± 0
V209A	n. d.	n. d.	0,03 ± 0,00 (100:0 7a:7b)	n. d.
L253A	0,34 ± 0,04	94 ± 1	0,35 ± 0,01 (36:64 7a:7b)	81 ± 0
L307A	0,11 ± 0,02	n. a. ⁺	0,16 ± 0,00 (53:47 7a:7b)	88 ± 1
G204A	1,14 ± 0,04	83 ± 1	0,63 ± 0,00 (47:53 7a:7b)	67 ± 1
F224A	0,52 ± 0,03	90 ± 0	0,28 ± 0,05 (43:57 7a:7b)	78 ± 1
V260A	0,60 ± 0,07	77 ± 0	0,42 ± 0,02 (48:52 7a:7b)	67 ± 1
W358A	n. d.	n. d.	0,04 ± 0,00 (100:0 7a:7b)	n. d.
NK_1*/NK_2**	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Des Weiteren wurden die erstellten Varianten ausführlich im *in vivo* System getestet und im Weiteren in Kapitel 3.2 diskutiert.

Die Positionen der Konsensus-Varianten in der α -Untereinheit werden im Folgenden in unterschiedliche Gruppen basierend auf Strukturelementen eingeteilt: Umgebung des katalytischen Eisens (**B**), aktive Tasche (**C**), Interaktion mit β -Untereinheit (**D**), Loopregion (**E**) und zentrales β -Faltblatt (**F**) (s. Abbildung 3.10).

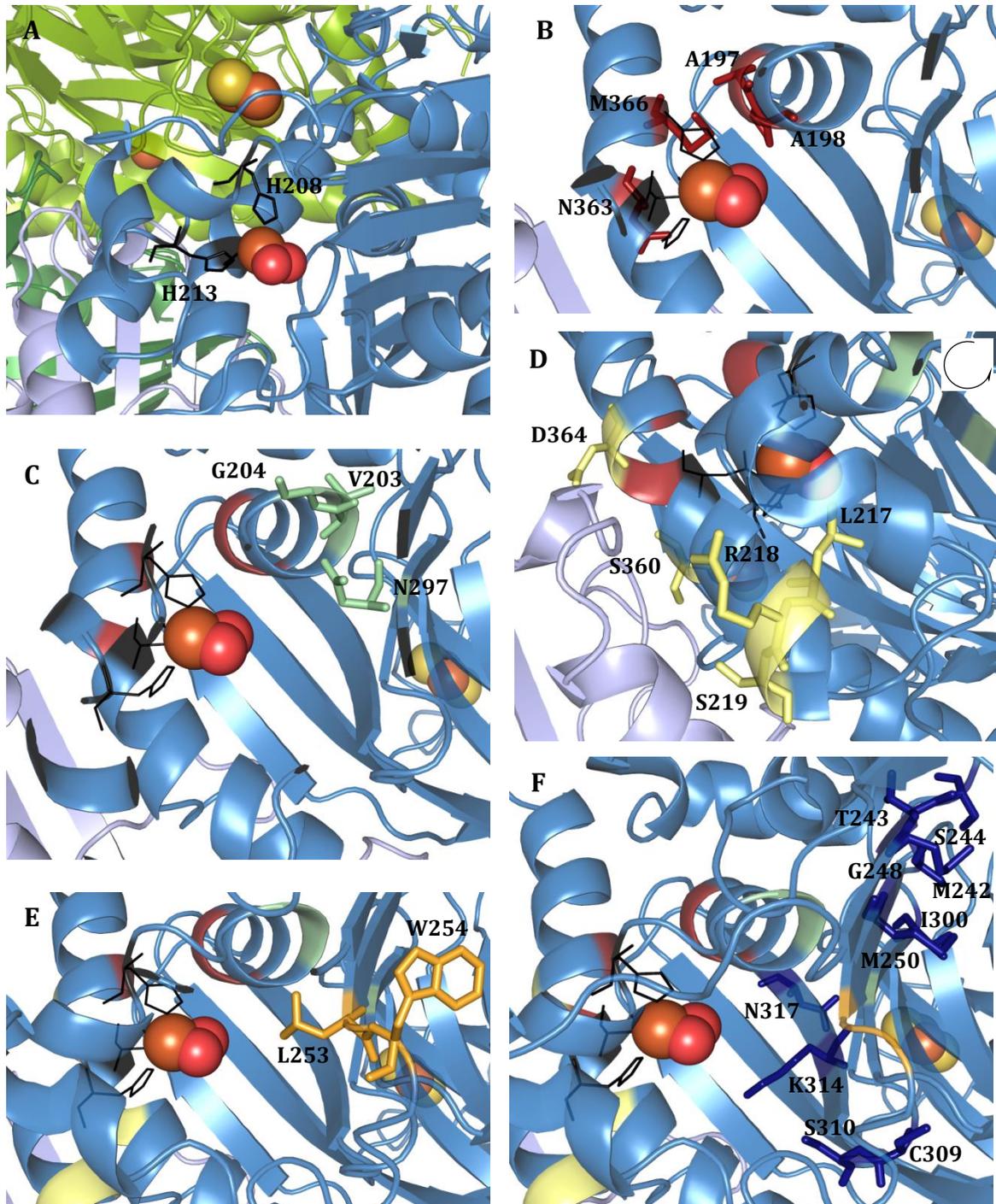


Abbildung 3.10: α -Untereinheit der NDO (PDB code: 107N) mit molekularem Sauerstoff (rot), dem katalytischen Eisen (orange), dem Eisen-Schwefel-Cluster (rot/orange) und der koordinierenden Triade (*lines*, schwarz) bestehend aus His208, His213 und Asp362. Mutierte Aminosäurereste sind als *sticks* dargestellt. (A) α -Untereinheit, (B-F) Varianten nach Strukturmerkmalen eingeteilt.

Die Enzymvarianten wurden mit Styrol (6) getestet und lieferten die in Abbildung 3.11 dargestellten Ergebnisse.

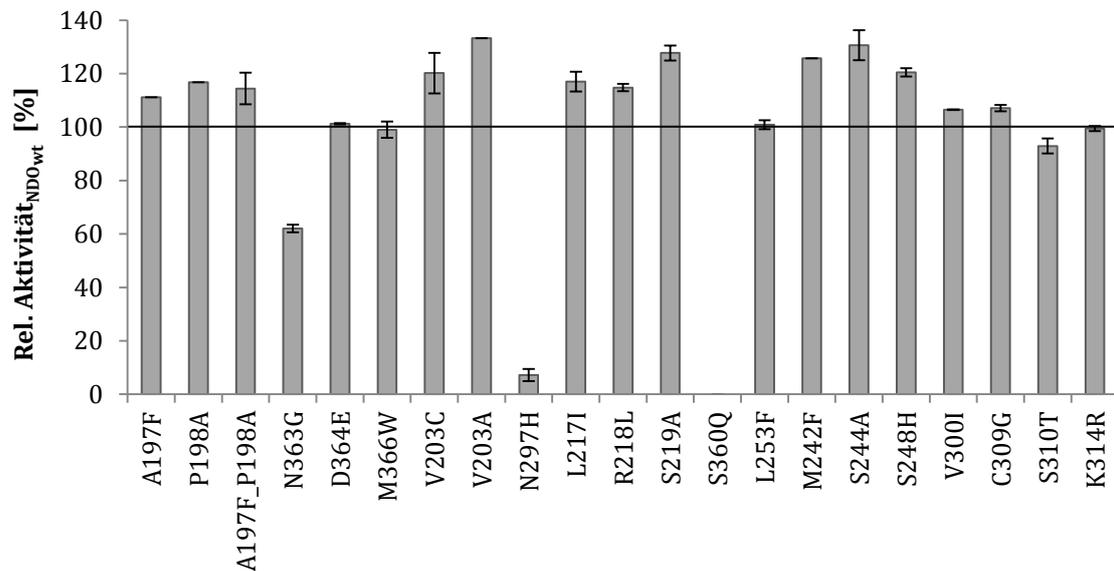


Abbildung 3.11: Relative prozentuale Aktivität der *in vitro* Umsetzung von Styrol mit den Konsensussequenz-Varianten der Naphthalen Dioxygenase bezogen auf den Wildtyp. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Varianten A197F und P198A, sowie die resultierende Doppelmutante A197F_P198A zeigten eine erhöhte Aktivität (+ 20 %) gegenüber dem Wildtyp-Enzym und sind basierend auf dem hoch konservierten Motiv gewählt worden. Der Austausch von Asparagin an Position 363 zu Glycin führte hingegen zu einer Reduktion der Aktivität auf 60 % bezogen auf NDO_{wt}. Die Eigenschaft der Carbonsäureamid-Seitenketten eine zwitterionische Struktur auszubilden, könnte für den Elektronentransfer oder für die Bildung von stabilisierenden Wasserstoffbrücken notwendig sein und die starke Reduktion der Aktivität erklären. Des Weiteren liegt diese Position in direkter Nachbarschaft zur Eisenkoordinierenden Asparaginsäure 362 und könnte dadurch die Koordination des katalytischen Eisens beeinflussen. Der Austausch eines Methionins gegen ein Alanin an Position 366 erzeugte keine Veränderung der Aktivität gegenüber dem Wildtyp. Die Alanin- bzw. Cysteinsubstitution an Position V203 trug zu einer Aktivitätssteigerung von bis zu ~ 40 % gegenüber dem Wildtyp bei. Diese Aminosäureposition liegt auf einer helikalen Struktur in der aktiven Tasche nahe des koordinierenden Eisens. Die Kavität der Tasche kann durch die Substitution eines Valins gegen ein Alanin vergrößert werden und dadurch sterisch die Umsetzung von Styrol begünstigen. Bei der Betrachtung der beiden Punktvarianten fällt auf, dass V203C

lediglich eine Steigerung von 20 % erzielt. Hierbei könnte die Ausbildung von Disulfidbrücken ein störender Effekt sein. Die Position 297 liegt ebenfalls in der aktiven Tasche, rund vier Ångström vom kokristallisierten Indol (PDB code: 1O7N) entfernt. Der Austausch des Asparagins gegen ein Histidin führte nahezu zu einer Inaktivierung des Enzyms. Für die Variante G204S liegen keine Aktivitätsdaten vor, da die Expression nicht erfolgreich war.

Die Aminosäurepositionen L217, R218L, S219 und S360 liegen an der Oberfläche der α -Untereinheit und könnten laut Quartärstruktur an der Interaktion mit der β -Untereinheit beteiligt sein. Der Austausch zu kleineren hydrophoben Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin und Alanin führte zu einer Aktivitätssteigerung von bis zu 35 % (S219A). Bei der Umsetzung von Styrol mit S360Q hingegen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Durch die Substitution von Leucin gegen Phenylalanin an Position 253 wurde die Wildtyp-Aktivität reproduziert. Eine weitere Position im Loopbereich der NDO (E), W254F, konnte nicht funktionell exprimiert werden.

Die Varianten im zentralen β -Faltblatt zeigten ganz unterschiedliche Ausprägungen, wobei die Expression der Varianten T243R, M250S und N317H nicht möglich war. Der Austausch von Methionin an Position 242 gegen ein Phenylalanin erzielte eine Aktivitätssteigerung von ~ 40 % gegenüber dem Wildtyp. Der gleiche Phänotyp wurde bei der Umsetzung mit Variante S244A beobachtet. Mit dem Austausch des Serins an Position 248 gegen Histidin konnte eine 30 %ige Steigerung gegenüber der Wildtyp-Aktivität erreicht werden. Mit Isoleucin und Glycin an den Positionen V300I und C309G wurde die Aktivität um rund 10 % gegenüber der NDO_{wt} gesteigert. Der Einsatz der großen hydrophoben Aminosäure Tryptophan gegen Serin an Position 310 resultierte in einer Wildtyp ähnlichen Aktivität von rund 93 % Produktbildung. Der gleiche Effekt konnte bei dem Austausch von Lysin gegen Arginin an Position 314 beobachtet werden.

3.2 Naphthalen Dioxygenase im *in vivo* System

Eine Auswahl der Substrate (s. Kapitel 3) wurden zunächst mit einer Palette von Wildtypenzymen untersucht, um ein geeignetes Enzymtemplat für Mutagenesestudien zu identifizieren. Im Folgenden sind die untersuchten Enzyme

aufgeführt: Cumol Dioxygenase aus *Pseudomonas fluorescens* IPO1 (CDO), Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (NDO), Benzol (BDO) und Toluol (TDO) Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* ML2, sowie Biphenyl Dioxygenase aus *Burkholderia xenoverans* LB400 (BPDO). In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Biotransformationen mit ruhenden Zellen dargestellt.

Tabelle 3.3: *In vivo* Biotransformationen mit ruhenden Zellen (0,2 mg_{BFM}/mL) von unterschiedlichen Substraten (10 mM) bei 30 °C über 20 h (Strukturen der Substrate sind in Abbildung 3.1 dargestellt.)

Umsatz [%]	1	1'	3	3'	9	10	15	16	17	18	19	20	21
NDO	86	-	++	-	+	++	-	-	-	-	-	-	-
CDO	83	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
TDO	> 99	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BDO	93	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
BPDO	94	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
pT7-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : nicht detektiert; +: neue Peaks im GC-Chromatogramm; ++: deutliche Abnahme des Substratpeaks und neue Peaks im GC-Chromatogramm; +++: kein Substratpeak detektiert und neue Peaks im GC-Chromatogramm

Als Positivkontrolle wurde Naphthalen (**1**) umgesetzt, wodurch die funktionelle Expression der unterschiedlichen Dioxygenasen sichergestellt werden konnte. Des Weiteren wurde der Leervektor pT7-7 als Negativkontrolle unter gleichen Bedingungen untersucht, womit mehrere Parameter überprüft werden konnten: (**I**) Verdunstung des Substrates, (**II**) Zersetzung, Katalyse durch wirtseigene Enzyme oder Autokatalyse und (**III**) Temperatureffekte aufgrund der Analytik.

Bei den Substraten **1'**, **3**, **3'**, **9** und **10** wiesen die Dioxygenasen unterschiedliche Präferenzen auf. Diphenylmethan (**1'**), Ethylbenzol (**3**) und Allylbenzol (**9**) wurden von allen Enzymen mit großer Akzeptanz umgesetzt. Bei der Umsetzung von 4-Ethylphenol (**3'**) konnten nur bei der Umsetzung mit der Toluol Dioxygenase Produktpeaks beobachtet werden. Auch die Umsetzung von 4-Allylanisol (**10**) wurde nur mit einer Dioxygenase, der NDO, festgestellt. Gegenüber den getesteten Sesquiterpenen (**15-21**) zeigte keines der untersuchten Enzyme Aktivität.

Da die Standardisierung des Biokatalysators nur gravimetrisch erfolgt und keine Konzentrationsbestimmung des katalytisch aktiven Enzymkomplexes möglich ist, wurde zunächst mittels SDS-PAGE eine proteinchemische Analyseverfahren gewählt. Die untersuchten Gencluster stehen alle unter der Kontrolle von starken Promotoren (*T7/lac/tac*), weshalb eine Überexpression der Gene erwartet wurde. In Abbildung 3.12 sind die löslichen Fraktionen nach Zellaufschluss mit Ultraschall

der untersuchten Dioxygenasekonstrukte in *E. coli* JM109(DE3) vor und nach Induktion dargestellt.

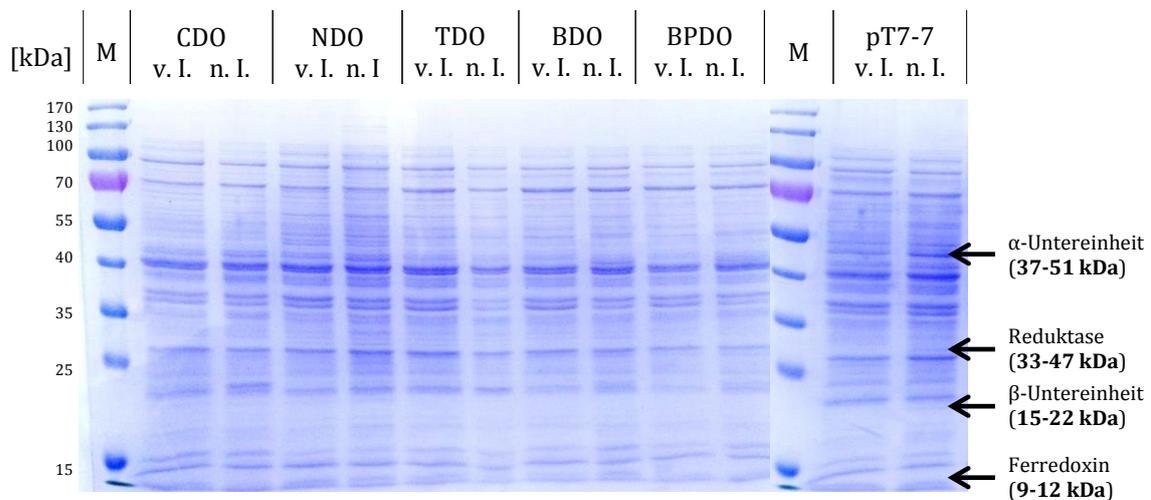


Abbildung 3.12: 12 %ige SDS-PAGE der löslichen Fraktion vor (v. I.) und nach (n. I.) Induktion von *E. coli* JM109(DE3) mit verschiedenen Dioxygenasekonstrukten (CDO, NDO, TDO, BDO, BPDO) und dem Leervektor pT7-7 (Expressionsbedingungen: 2 h bei 30 °C in LB-Medium, Induktion mit 0,1 mM IPTG; Proteingehalt mittels BCA standardisiert auf 15 µg/Spur)

Wie aus Abbildung 3.12 ersichtlich wird, konnte bei keinem der untersuchten Konstrukte eine Überexpression auf dem SDS-PAGE Gel festgestellt werden. Die Abwesenheit von Dioxygenase-spezifischen Proteinbanden in den induzierten Proben steht hierbei im Gegensatz zur hohen Aktivität, welche bei Umsetzungen mit Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen im *in vivo* System beobachtet werden kann. Da alle untersuchten Dioxygenasen dieselbe Problematik aufwiesen, wurde bei den folgenden Untersuchungen der Fokus auf die Naphthalen Dioxygenase gelegt. Dieses Enzym wurde aufgrund seines breiten Substratspektrums¹⁴⁴ und dem Vorliegen von zahlreichen Kristallstrukturen, welche für einen rationalen Designansatz notwendig sind, als am Besten geeignet angesehen.

3.2.1 Kultivierung im Schüttelkolben und Immunodetektion

In ersten Vorversuchen wurden die eigenen Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen. Zur Überprüfung des Reaktionssetups wurde eine Untersuchung von Yu *et al.* (2001) herangezogen.²³³ Hierzu wurden der Naphthalen Dioxygenase Wildtyp (NDO_{wt}) zusammen mit der Punktvariante NDO_H295I unter verschiedenen Expressionsbedingungen untersucht. Neben dem Expressionsmedium (MSB/LB) und der Expressionstemperatur (18/30 °C), wurde auch die Expressionsdauer

(2/12/20 h) variiert. Die erzielten Produktkonzentrationen für die *in vivo* Bio-transformationen sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

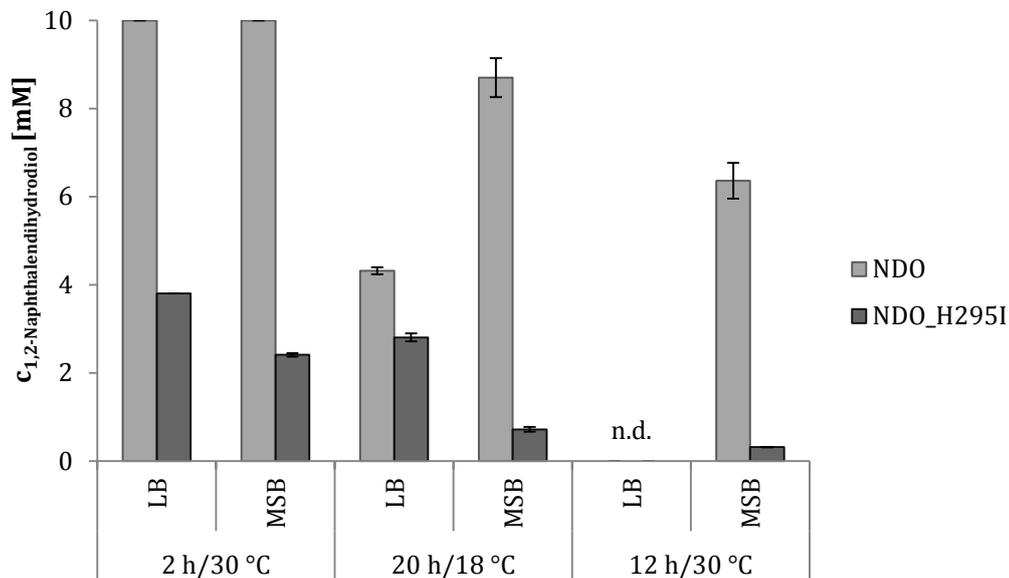


Abbildung 3.13: *In vivo* Umsetzung von 10 mM Naphthalen zum korrespondierenden Dihydrodiol mit ruhenden Zellen (0,2 mg_{BFM}/mL) bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Wahl des Mediums, Komplex(LB)- oder Minimal(MSB)-Medium, schien im Fall einer 2-stündigen Induktion bei 30 °C keinen Einfluss auf die Aktivität zu haben. Bei Biotransformationen mit dem NDO_{WT} konnten > 99 % Produktbildung beobachtet werden, mit der Isoleucin-Variante H295I konnten 3,80 ± 0,00 bzw. 2,41 ± 0,04 mM Dihydrodiol detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturdaten von Yu *et al.* (2001) überein.²³³ Bei den Parameterkombinationen 20 h/18 °C und 12 h/30 °C wurden niedrigere Produktkonzentrationen detektiert. Nach der Analyse der Proben mittels SDS-PAGE zeigte sich bei allen Umsätzen ein ähnliches Bild wie in Abbildung 3.12. Um den Einfluss unterschiedlicher Expressionsparameter und die Steuerung der Zielproteinbildung besser zu verstehen, wurde im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Schweizer eine umfangreiche Optimierungsstudie durchgeführt.²³⁴ Trotz einer intensiven Untersuchung von Expressionsmedium (Komplex/Minimal), -temperatur (18-30 °C), -zeit (4-20 h), -wirt (*E. coli* BL21(DE3)/*E. coli* JM109(DE3) und -vektor (pT7-7/pET-22b(+)/pJOE575-1) konnte keine Überexpression der Zielproteine erreicht werden. Da dennoch der Nachweis des Zielproteins als essentiell angesehen wurde, musste auf eine spezifischere Nachweismethode zurückgegriffen werden. Deshalb erfolgte die Immunodetektion der Zielproteine mit den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Proteinantikörpern.

Zunächst sind die Ergebnisse des Oxygenase-spezifischen Proteinantikörpers dargestellt (s. Abbildung 3.14).

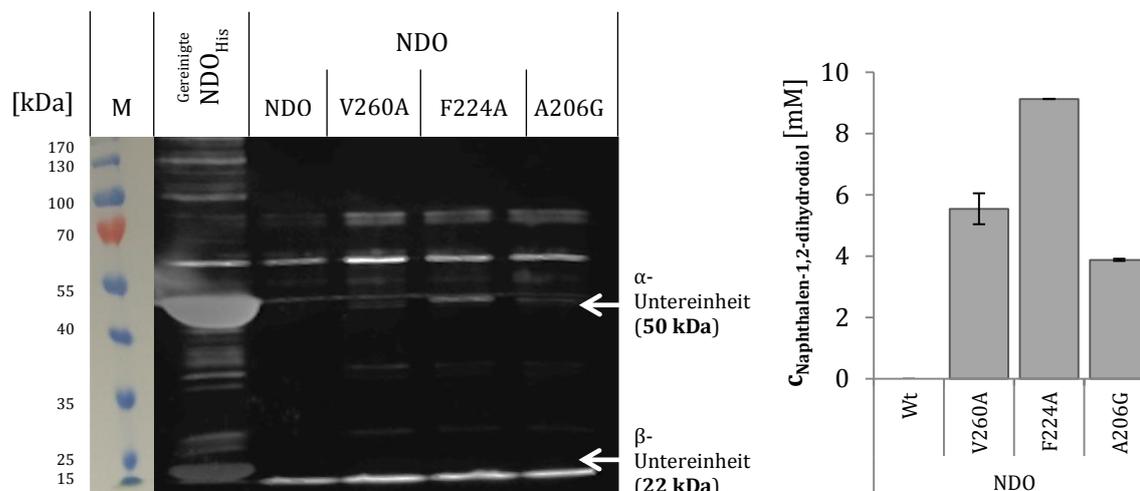


Abbildung 3.14: (Li.) Western Blot nach ECL-Nachweis der gereinigten Naphthalen Dioxygenase und *in vivo* exprimierten Varianten sowie NDO_{wt}; (Re.) Umsetzungen der geblotteten Varianten und NDO_{wt} (0,2 mg_{BFM}/mL) mit 10 mM Naphthalen bei 30 °C für 20 h. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Obwohl der Protein-spezifische Antikörper eine relativ hohe Hintergrundaktivität für andere *E. coli* Proteine aufweist, kann ein halbquantitativer Nachweis über die Menge an produziertem Zielprotein getroffen werden. So lässt sich beispielsweise die Abwesenheit der Aktivität im Fall der Umsetzung mit dem NDO_{wt} erklären, da hier auf dem Western Blot keine Bande zu sehen ist und demnach auch keine Dioxygenase exprimiert wurde. Der Aktivitätsunterschied der drei anderen Enzymvarianten korreliert ebenfalls mit der Menge an produzierten Protein. So erscheint bei der aktivsten Variante, NDO_F224A, eine deutliche Bande im Western Blot.

Die Überprüfung der Expression der Reduktase war mit dem hergestellten Proteinantikörper nicht möglich, da ein zu starkes Hintergrundsignal erzeugt wurde (s. Anhang 6.5).

Die Notwendigkeit für eine Standardisierung bzw. eine Stabilisierung der Expression des Multikomponentensystems wird am Beispiel der Cumol Dioxygenase (CDO) Variante M232A_I288F deutlich. Diese Variante der CDO wurde im Zuge der Untersuchungen von *R*-Limonen (**12**) generiert, basierend auf einem Vergleich mit der NDO und soll hier stellvertretend die unstete Expression der ROs verdeutlichen. Es wurden zehn separate Expressionen im 100 mL Maßstab in LB-Medium für 2 h

bei 30 °C durchgeführt und anschließend die Aktivität mit der Umsetzung von 10 mM Naphthalen (**1**) überprüft. In Abbildung 3.15 ist das Ergebnis der zehn separaten Expressionen (**A**), sowie die der gemittelte Umsatz daraus (**B**) dargestellt.

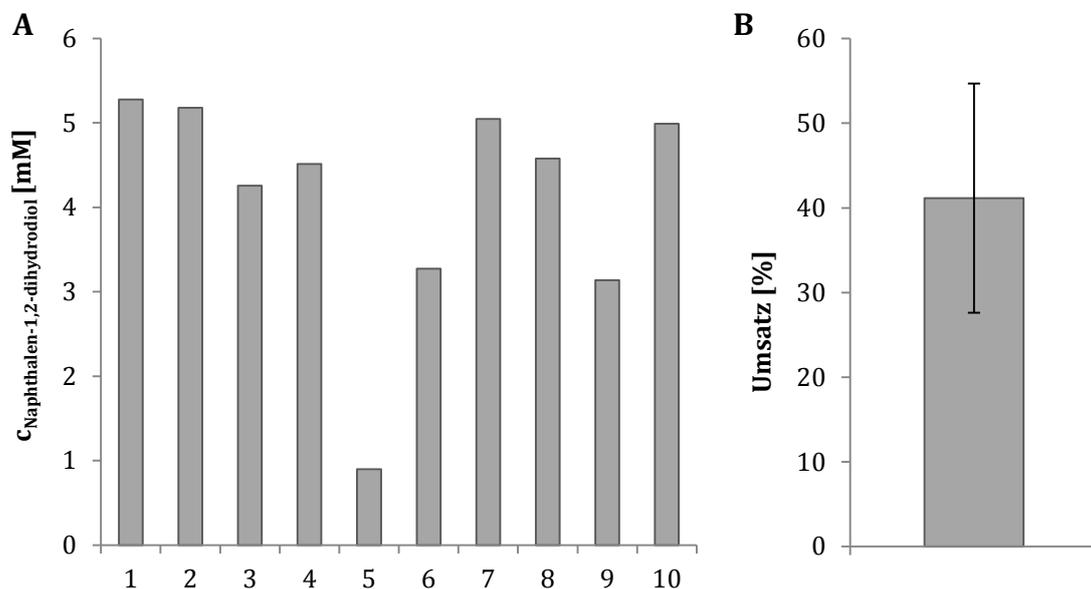


Abbildung 3.15: *In vivo* Biotransformation von 10 mM Naphthalen mit zehn separat exprimierten Klonen (1-10) der Cumol Dioxygenase CDO_M232A/I288F (**A**) und der gemittelte Umsatz (**B**) (Expressionsbedingungen: 2 h bei 30 °C in LB-Medium, Induktion mit 0,1 mM IPTG)

Betrachtet man die Gesamtabweichung über die zehn Klone, so liegt diese bei 32 %. Vergleicht man jedoch Klon **1** und **5** liegt die Standardabweichung bei über 80 %. Dies macht die Notwendigkeit deutlich, ein stabiles Expressionssystem für die Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen zu entwickeln. Da derzeit keine genauere Quantifizierung des Katalysators möglich ist, wurde ein Standardprotokoll zur Expression von Varianten entwickelt, welches reproduzierbare Ergebnisse liefert und die Abweichungen zwischen separaten Expressionsreihen auf ein Minimum reduziert (s. Abbildung 3.16). Durch dieses Protokoll können Enzymvarianten verlässlich in ihrer Gesamtheit (Aktivität, Selektivität und Eignung zur heterologen Expression) beurteilt werden. Die Standardabweichungen in unterschiedlichen Versuchsreihen lagen mit dem beschriebenen Protokoll in den meisten Fällen $\leq 5\%$ und bis auf wenige Ausnahmen (Abweichung $\leq 20\%$) lagen alle Standardabweichungen bei $\leq 10\%$.

<p>Aktivitätsbasierter Agarplattendiffusionstest</p> <ul style="list-style-type: none"> → frisch transformierter <i>E. coli</i> JM109(DE3) → 10 % (v/v) Indollösung → 2 h Inkubation bei RT 	
<p>Expression in 2 L Schikanekolben</p> <ul style="list-style-type: none"> → eine Kolonie frisch transformierter <i>E. coli</i> JM109(DE3) → 0,1 mM IPTG und Expression für 18 h bei 25°C 	
<p>In vivo Biotransformation</p> <ul style="list-style-type: none"> → 0,2 mg_{BFM}/mL Zellsuspension in 100 mM KPi (pH 7,2) mit 20 mM Glucose 	

Abbildung 3.16: Expressionsprotokoll für heterolog exprimierte Dioxygenasen

3.2.2 Aufarbeitung von Biotransformationen

Für eine verlässliche Produktaufarbeitungen mittels Extraktion wurde untersucht, ob die Extraktion des Überstandes^{189,235,236} oder die Extraktion des gesamten Biotransformationsansatzes sich besser eignet. Stellvertretend für die aromatischen Substrate wurde Naphthalen (**1**) und für die Terpene Myrcen (**14**) mit dem Wildtypenzym Cumol Dioxygenase (CDO_{wt}) und der Punktvariante CDO_M232A getestet (s. Abbildung 3.17).

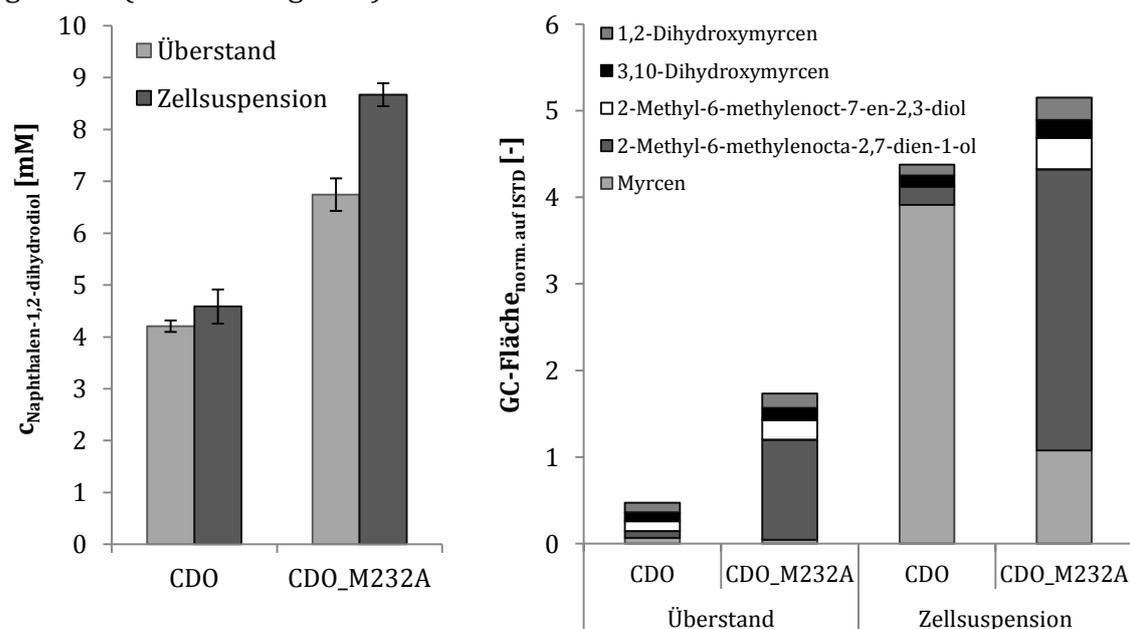


Abbildung 3.17: *In vivo* Biotransformation von 10 mM Naphthalen (**1**, links) bzw. Myrcen (**14**, rechts) zu den korrespondierenden Produkten mit dem Cumol Dioxygenase Wildtyp und der Variante CDO_M232A (Expressionsbedingungen: 2 h bei 30 °C in LB-Medium, Induktion mit 0,1 mM IPTG). Experimente wurden als Triplikate durchgeführt.

Generell wurden bei der Extraktion des gesamten Reaktionsansatzes (Zell-suspension) höhere Substrat- und Produktkonzentrationen beobachtet. Bei den Umsetzungen mit **1**, welches als Stellvertreter für die aromatischen Substrate gewählt wurde, konnten bis zu 22 % mehr Produkt extrahiert werden. Dies zeigt bereits eine deutliche Verbesserung gegenüber der Extraktion des reinen Überstandes, da in der Membran oder der Zelle verbliebene Substrat- bzw. Produktmoleküle extrahiert werden. Die erhöhten Konzentrationen an Produkt und Substrat wurden bei der Umsetzung des Monoterpens **14** wesentlich stärker wahrgenommen. So wurde die Extraktion des verbliebenen Substrates verbessert, jedoch nicht reproduzierbar, was sehr wahrscheinlich durch die hohe Flüchtigkeit des Monoterpens erklärt werden kann. Allerdings wurde der Gehalt an hydroxylierten Produkten um bis zu 65 % (2-Methyl-6-methylenocta-2,7-dien-1-ol) gesteigert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Extraktion des gesamten Reaktionsansatzes für die weiteren Versuche verwendet.

3.2.3 Kultivierung im Fermenter und statistische Versuchsplanung (DoE)

Für die Optimierung der Expression der Naphthalen Dioxygenase im Fermenter wurde ein teilfaktorieller Versuchsplan verwendet (s. Tabelle 2.13). Folgende Parameter wurden hierzu variiert: Expressionstemperatur (18 - 30 °C), Expressionsdauer (4 - 20 h), Belüftungsrate (0,4 - 1,6 vvm) und Rührerdrehzahl (300 - 1000 rpm). Hierbei wurden diejenigen Expressionsbedingungen als optimal angesehen, bei welchen die Produktkonzentration maximal war. Die Aktivitäten der Ganzzell-Biotransformationen der unterschiedlichen Parameterkombinationen für **1** sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Untersuchte Faktoren zur Expressionsoptimierung (Statistische Versuchsplanung) und Aktivitäten des Naphthalen Dioxygenase Wildtyps gegenüber Naphthalen

Faktor	Grenzen	Kombinationen / c _{1,2-Naphthalendihydrodiol} [mM]	
Temperatur	18 - 30 °C	30 °C/0,4 vvm/1000 rpm → 4,63 ± 0,23 mM	30 °C/1,6 vvm/300 rpm → 5,61 ± 0,41 mM
		18 °C/0,4 vvm/300 rpm → 4,36 ± 0,02 mM	18 °C/1,6 vvm/1000 rpm → 3,68 ± 0,00 mM
Zeit	4 - 20 h	24 °C/1,0 vvm/650 rpm* → 6,85 ± 0,19 mM	24 °C/1,0 vvm/650 rpm* → 6,51 ± 0,01 mM
Belüftung	0,4 - 1,6 vvm	18 °C/0,4 vvm/300 rpm → 8,28 ± 0,04 mM	18 °C/1,6 vvm/1000 rpm → 10,92 ± 0,16 mM

Rührerdrehzahl	300 - 1000 rpm	30 °C/0,4 vvm/300 rpm	30 °C/1,6 vvm/1000 rpm	20 h
		→ 6,32 ± 0,05 mM	→ 6,48 ± 0,01 mM	
		18 °C/0,4 vvm/1000 rpm	18 °C/1,6 vvm/300 rpm	
		→ 7,67 ± 0,04 mM	→ 10,20 ± 0,28 mM	

* Zentrumspunkt als biologisches Duplikat

Mithilfe der Statistiksoftware MODDE (Umetrics, SWE) wurde ein Modell für den Aktivitätsverlauf aus den in Tabelle 3.4 dargestellten Eckpunkten generiert. Mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,97$ wies das berechnete, quadratische Modell eine gute Näherung für die Messwerte auf. Q^2 dient als weiterer Parameter zur Beurteilung der Modellqualität und beschreibt die Eignung des Modells für die Vorhersage von nicht experimentell ermittelten Werten. Mit $Q^2 = 0,59$ war das Modell noch für eine Vorhersage geeignet. Je näher Q^2 an einen Wert von 1 heranreicht, desto besser ist das erstellte Modell für die Vorhersage von Werten im untersuchten Reaktionsraum geeignet. In Abbildung 3.18 ist das Modell basierend auf der Aktivität bei Umsetzungen von 10 mM Naphthalen (**1**) dargestellt.

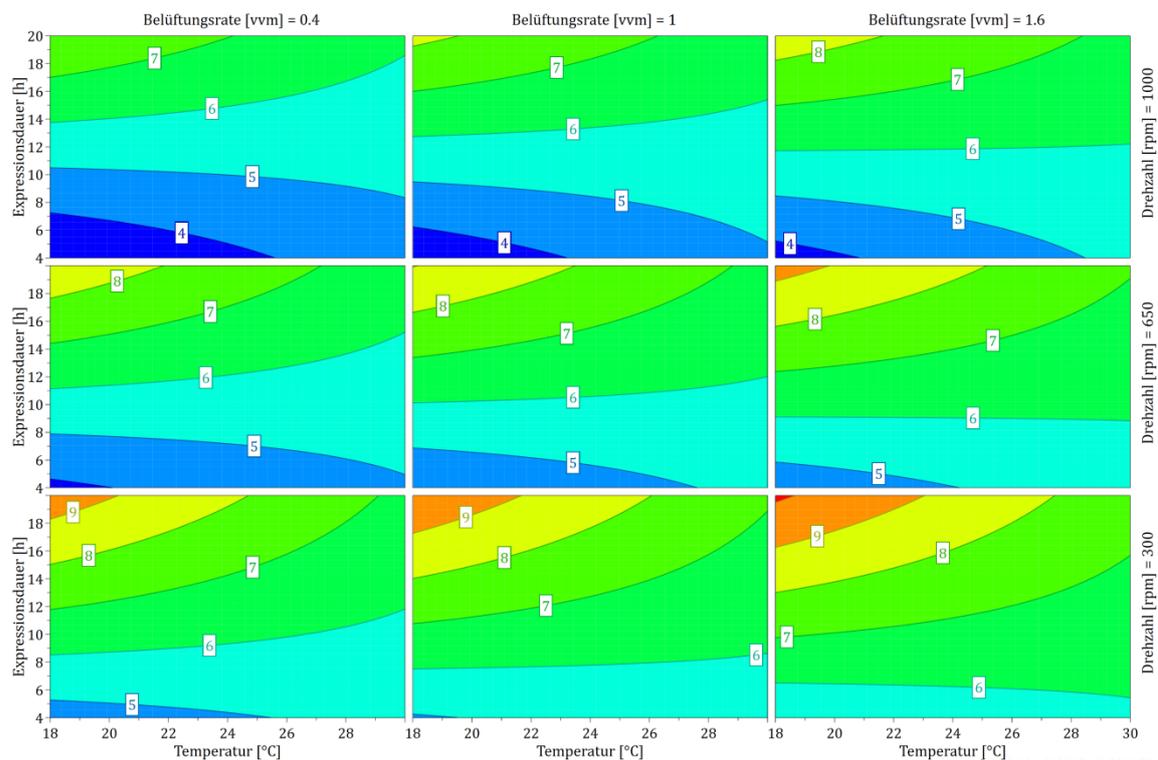


Abbildung 3.18: 4D Konturdiagramm der *in vivo* Umsetzung von 10 mM Naphthalen (**1**) zum korrespondierenden Dihydrodiol (**1a**) mit ruhenden Zellen der Naphthalen Dioxygenase (0,1 mg_{BFM}/mL) bei 30 °C nach 22 h (< 4 mM Produkt (**blau**) bis 10 mM Produkt (**rot**)).

Wie bereits bei der Expression in Schüttelkolben zeigte sich auch bei der Untersuchung im Fermenter, dass eine niedrige Expressionstemperatur in Verbindung mit einer längeren Expressionsdauer zu guten bis exzellenten Produktkonzentrationen (5 - 10 mM) führt. Des Weiteren konnte bei Anwendung einer niedrigen Rührerdrehzahl (Vermeidung von Scherstress) und einer hohen Belüftungsrate (1,6 vvm) eine hohe Toleranz gegenüber den Parametern Expressionstemperatur und Expressionsdauer (s. Abbildung 3.18, unten rechts) beobachtet werden.

Zusätzlich zur Umsetzung von Naphthalen wurde auch das nicht-natürliche Substrat α -Methylstyrol (7) mit der generierten Biomasse und unterschiedlichen Parameterkombinationen getestet. Hierzu wurden Zeitverläufe über 4 h aufgenommen, welche im Anhang in Abbildung 6.20 zu finden sind.

3.2.4 Evolvierbarkeit und semi-rationales Design der Naphthalen Dioxygenase

Für die Untersuchungen im *in vivo* System wurden die in Kapitel 3.1.3 bereits beschriebenen Aminosäurepositionen übertragen und erweitert. In Tabelle 3.5 ist die generierte Variantenbibliothek der Naphthalen Dioxygenase dargestellt.

Tabelle 3.5: *In vivo* Bibliothek der Naphthalen Dioxygenase bestehend aus 36 Einzelvarianten

Pos.	202	295	297	352	206	209	253	307	204	224	260	358
Kons. [%]*	33	19	38	54	30	31	40	27	20	56	-	20
Substitution	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A
	V	V	V	V	V	G	V	V	V	V	G	V
	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
	4 Ångstrom				5 Ångstrom				6 Ångstrom			

*Konservierung des Aminosäurerestes basierend auf der Analyse von 8100 Dioxygenase-Sequenzen mithilfe der 3DM Datenbank von Bio-Product

Des Weiteren wurden Doppelvarianten generiert, welche basierend auf *in silico* Analysen (YASARA, AutoDock Vina) mit *R*-Limonen identifiziert wurden. Die Simulationszelle (PBD code: 107N) wurde dabei wie folgt definiert: $x = 14 \text{ \AA}$, $y = 15 \text{ \AA}$ und $z = 15 \text{ \AA}$ entfernt vom C_{β} der Position 307. In Abbildung 3.19 ist die aktive Tasche der NDO dargestellt.

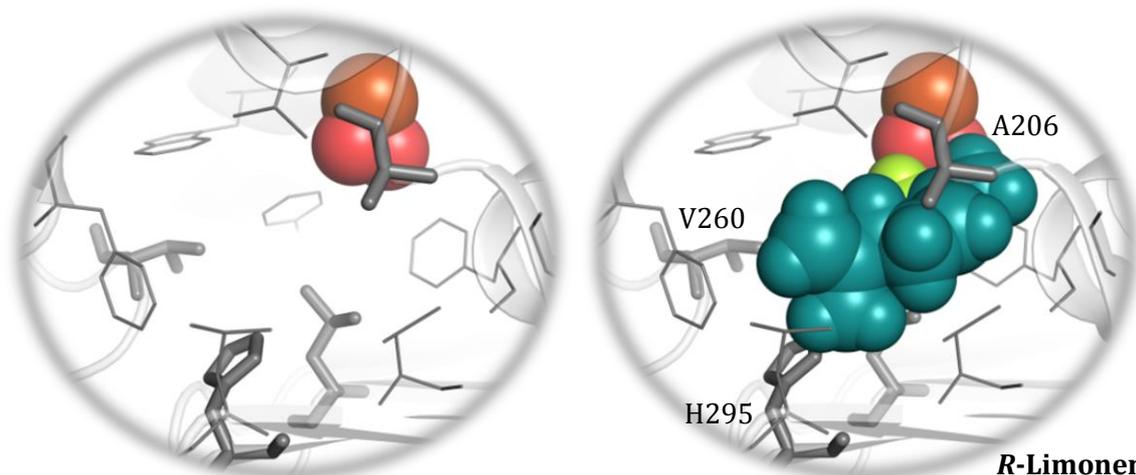


Abbildung 3.19: Kristallstruktur (PDB code: 107N) der Naphthalen Dioxygenase (**links**) und Docking-Ergebnis mit *R*-Limonen (**rechts**) mit Positionen V260, H295 und A206 in *sticks*.

Aufgrund der Docking-Ergebnisse mit dem Monoterpen *R*-Limonen (**12**) wurden die in Abbildung 3.21 dargestellten Doppelvarianten als Erweiterung der NDO-Bibliothek generiert.

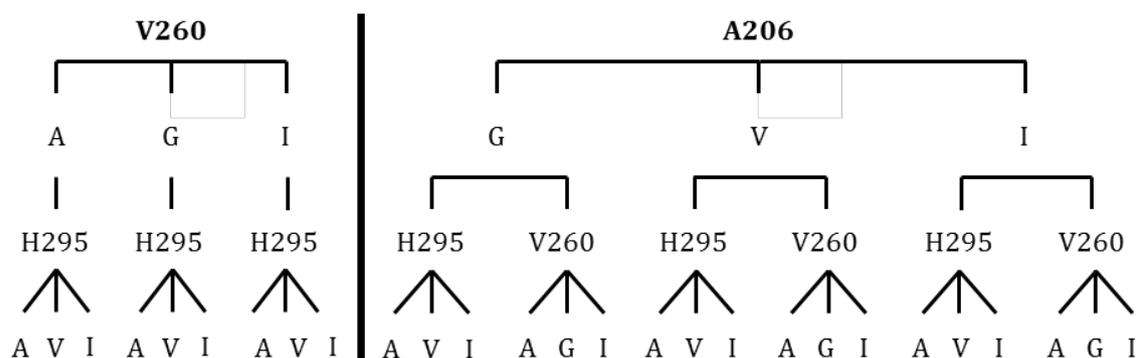


Abbildung 3.20: Erweiterung der *in vivo* Bibliothek der Naphthalen Dioxygenase bestehend aus 26 Doppelvarianten

Die NDO-Bibliothek wurde zunächst auf ihre Funktionalität überprüft, wobei sowohl der aktivitätsbasierte Agarplattendiffusionstest mittels Indol sowie die Umsetzung mit dem natürlichen Substrat Naphthalen (**1**) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse des Indol-Assays für die Einzelvarianten sind in Abbildung 3.21 dargestellt. 25 von 36 Einzelvarianten zeigten noch Aktivität gegenüber Indol, wobei 14 Einzelvarianten Wildtyp-Aktivität aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei elf der getesteten NDO-Varianten keine Aktivität gegenüber Indol beobachtet. Bei der Untersuchung der 26 Doppelvarianten (A206I_V260I konnte nicht generiert werden) wiesen lediglich 17 der 26 Varianten Aktivität in Form der typischen Blaufärbung auf (s. Abbildung 6.21)

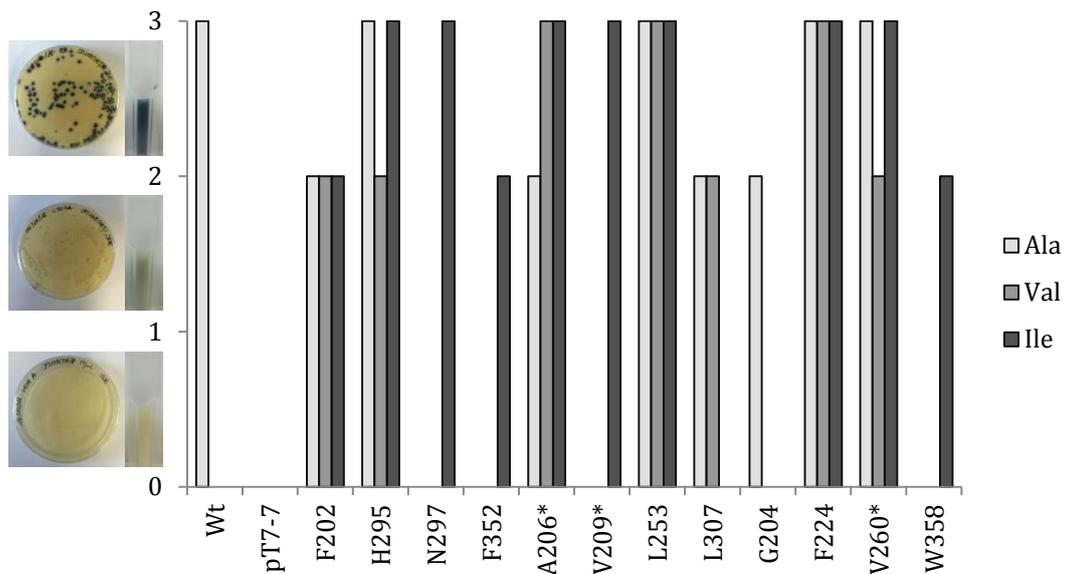


Abbildung 3.21: Indol-Assay der Einzelvarianten der NDO-Bibliothek mit 10 % (w/v) Indol (*: Gly). Da der Indol-Assay ausschließlich auf nicht-induzierter Expression des T7-Promotors beruht und somit sehr stark vom Zellhintergrund abhängt, wurde die Funktionalität der NDO-Bibliothek zusätzlich in *in vivo* Biotransformationen mit dem natürlichen Substrat Naphthalen (**1**) überprüft (s. Abbildung 3.22).

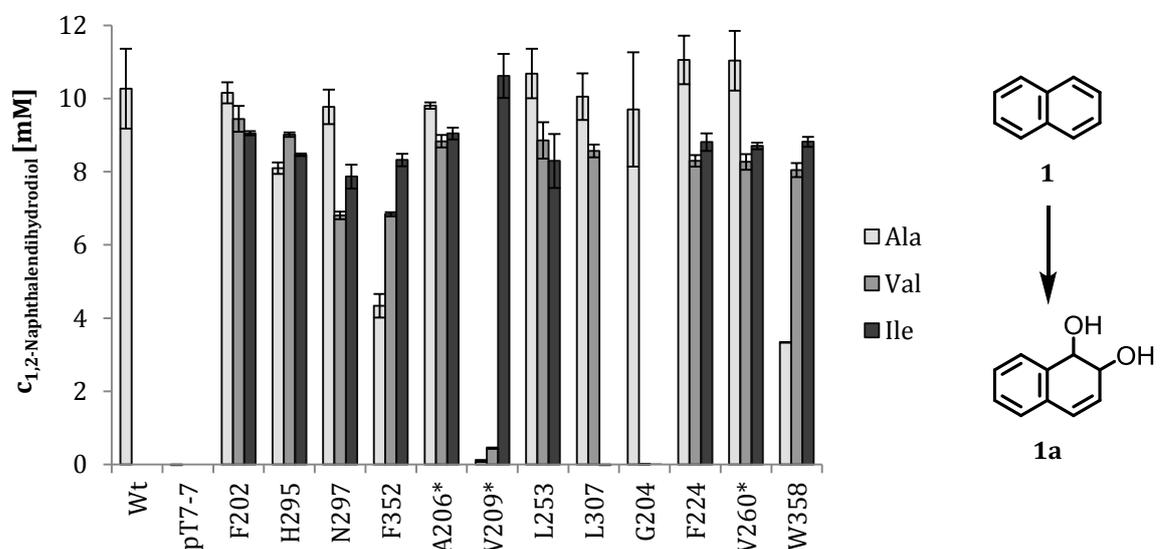
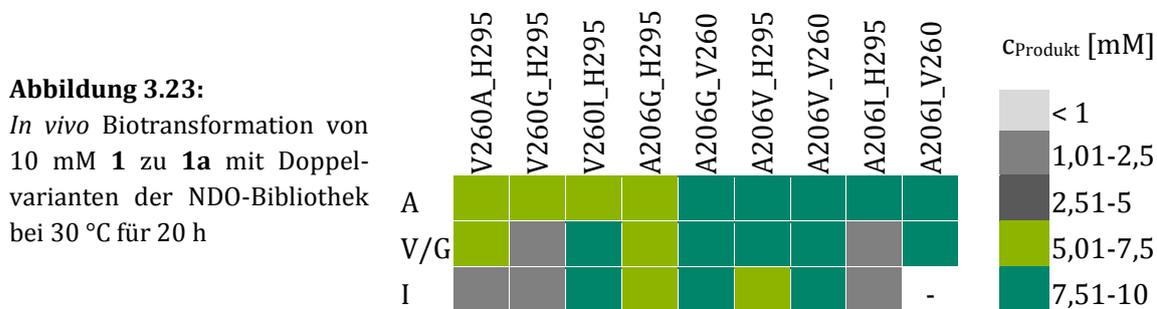


Abbildung 3.22: *In vivo* Biotransformation von 10 mM Naphthalen zu 1,2-Naphthalendihydrodiol mit Einzelvarianten der NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h (*: Gly). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Im Gegensatz zum Agarplattendiffusionstest konnte in der Biotransformation mit induzierten, ruhenden Zellen für 34 der Einzelvarianten das erwartete Produkt 1,2-Naphthalendihydrodiol (**1a**) nachgewiesen werden. Lediglich die Einzelvarianten NDO_L307I und NDO_G204I zeigten keine Aktivität nach 20 h. Des Weiteren konnte

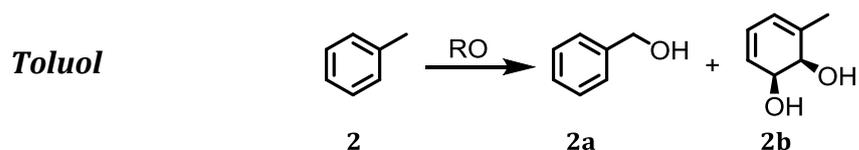
für Position 209 mit dem Austausch von Valin gegen die kleineren hydrophoben Aminosäuren Alanin und Glycin ein drastischer Aktivitätseinbruch beobachtet werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen des Indol-Assays überein. Im Gegensatz dazu konnten in den *in vivo* Biotransformationen für die Positionen 297, 352 und 358 deutliche Umsätze mit Naphthalen (**1**) nachgewiesen werden, obwohl der Indol-Assay ein negatives Ergebnis lieferte. So wurde beispielsweise für die Varianten W358A und W358V keine Indigo-Bildung beobachtet, mit ruhenden Zellen konnte aber $3,3 \pm 0,0$ bzw. $8,0 \pm 0,2$ mM **1a** detektiert werden. Die Funktionsüberprüfung der Doppelvarianten erfolgte ebenfalls mit der Umsetzung von **1** und ist in Abbildung 3.23 dargestellt.



Hierbei konnte bei allen Doppelvarianten eine Umsetzung von **1** zu **1a** beobachtet werden. Auch diese Ergebnisse stimmen nur teilweise mit den Effekten des Indol-Assays überein. So konnte im Fall der NDO_V260G_H295A keine Blaufärbung durch spontane Dimerisierung des Indoxyls festgestellt werden, bei der Umsetzung von **1** wurden jedoch $7,4 \pm 0,1$ mM **1a** detektiert.

Von 61 NDO-Varianten konnten somit 59 aktive Enzymvarianten identifiziert werden, welche in der Lage waren das natürliche Substrat **1** mit 2,5 bis > 99 % umzusetzen.

3.2.5 Phenylring mit Erweiterung der Substituenten-Seitenkette



Die Umsetzung von Toluol (**2**) zu Toluol-*cis*-2,3-dihydrodiol (**2b**) wurde bereits mit der Toluol Dioxygenase in der Literatur gezeigt.²²⁵ Die Biotransformationen mit dem

NDO_{Wt} und der Variantenbibliothek resultierten dabei in dem monohydroxylierten Benzylalkohol (**2a**) (s. Abbildung 3.24).

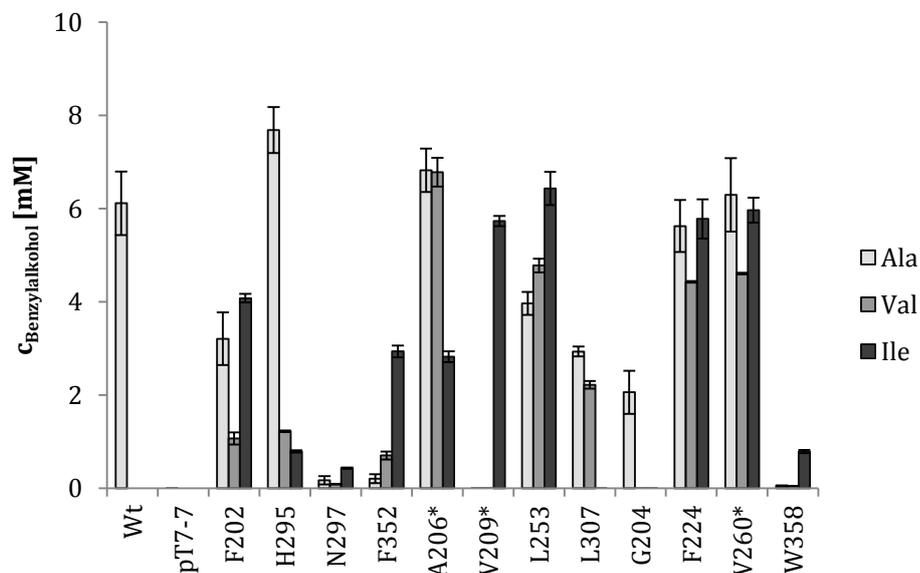
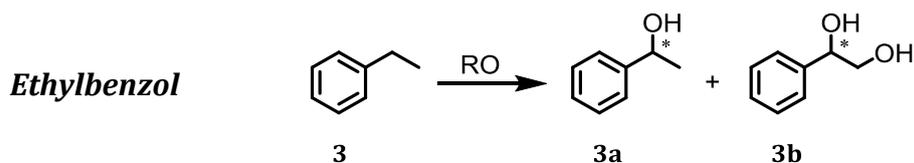


Abbildung 3.24: *In vivo* Biotransformation von 10 mM **2** zu **2a** mit dem NDO_{Wt} und der NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h (*: Gly). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Das beste Ergebnis konnte mit der Punktvariante H295A erreicht werden und stellte eine 26 %ige Steigerung gegenüber dem Wildtyp dar. Der Austausch gegen kleinere (Glycin) und größere (Isoleucin) Aminosäuren führte hingegen zu einem Aktivitätsverlust. Die Position 295 gehört neben 202, 297 und 352 zu den Positionen, die mit ~ 4 Å dem katalytischen Eisen am Nächsten sind. Die Variation des Asparagins an 297, sowie die Austausche von Phenylalanin Aminosäuren an den Positionen 202 und 352, führten zu einer Reduktion der Aktivität, wobei die Variante F352I wieder einen Anstieg in der Aktivität zeigte.



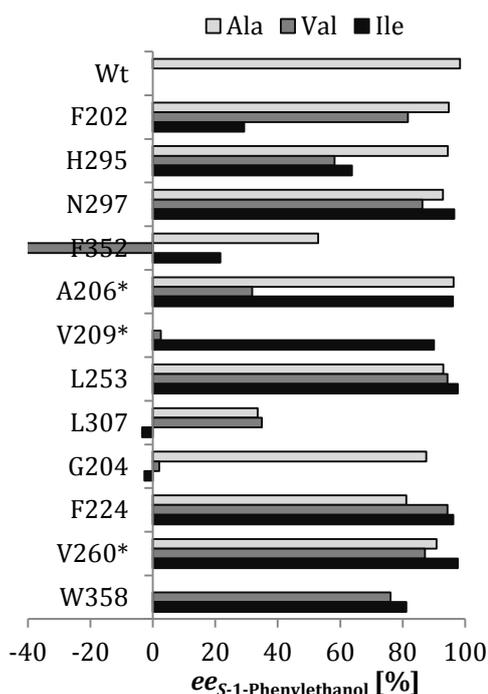
Ethylbenzol (**3**) wurde sowohl zum monohydroxylierten Produkt, 1-Phenylethanol (**3a**), als auch zum dihydroxylierten Produkt, 1-Phenylethan-1,2-diol (**3b**),

umgesetzt. Hierbei wurde das notwendige Intermediat Styrol zur Bildung des Diols bereits über GC-MS detektiert.²³⁷ In Tabelle 3.6 sind die Umsätze und die resultierenden Produktverteilungen der getesteten Einzelvarianten, sowie die erreichten Stereoselektivitäten für das monohydroxylierte Produkt **3a** dargestellt.

Tabelle 3.6: (Li) Umsätze und Produktverteilung der Einzelvarianten der NDO-Bibliothek und (Re) Stereoselektivitäten für das monohydroxylierte Produkt **3a**

	Umsatz [%] und Produktverteilung (3a:3b)			Ala	Val	Ile
	Ala	Val	Ile			
NDO	50 (67:33)					
pT7-7	n. d.					
F202	33 (70:30)	20 (67:33)	31 (74:26)			
H295	52 (70:30)	11 (77:23)	60 (73:27)			
N297	9 (79:21)	5 (92:8)	12 (57:43)			
F352	3 (77:23)	15 (74:26)	14 (52:48)			
A206*	60 (69:31)	66 (89:11)	22 (89:11)			
V209*	n. d.	1 (92:8)	65 (54:46)			
L253	31 (70:30)	31 (80:20)	53 (87:13)			
L307	34 (61:39)	11 (86:14)	1 (84:16)			
G204	15 (71:29)	1 (91:9)	16 (73:27)			
F224	22 (68:32)	30 (83:17)	1 (91:9)			
V260*	55 (74:26)	12 (80:20)	38 (61:39)			
W358	n. d.	4 (72:28)	55 (73:27)			

* statt A/V entsprechend G ausgetauscht;
n. d.: nicht detektiert



Das Screening der NDO-Bibliothek zeigte, dass vor allem die Positionen A206 und F352 Einfluss auf den Umsatz von **3** haben. Mit der Variante NDO_A206V konnte die Aktivität gegenüber dem Wildtyp um 32 % erhöht werden und die Regioselektivität zugunsten von **3a** auf $5,9 \pm 0,05$ mM (89 %) verschoben werden. Die höhere Aktivität bzw. die gesteigerte Regioselektivität wirkte sich jedoch negativ auf die Stereoselektivität aus, so wurden mit der Punktvariante lediglich 32 %*ee* für das *S*-Enantiomer erreicht. Mit dem Austausch von Alanin gegen Isoleucin konnte die Regioselektivität im gleichen Maße unter Beibehaltung der Wildtyp-Stereoselektivität von > 96 %*ee* beeinflusst werden. In Abbildung 3.25 ist das Docking-Ergebnis des NDO_{Wt} und der Punktvarianten NDO_A206V bzw. NDO_A206I dargestellt.

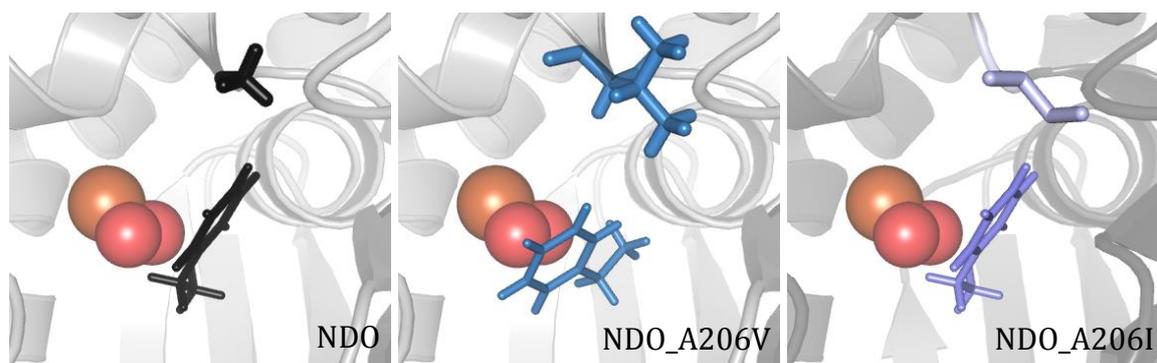


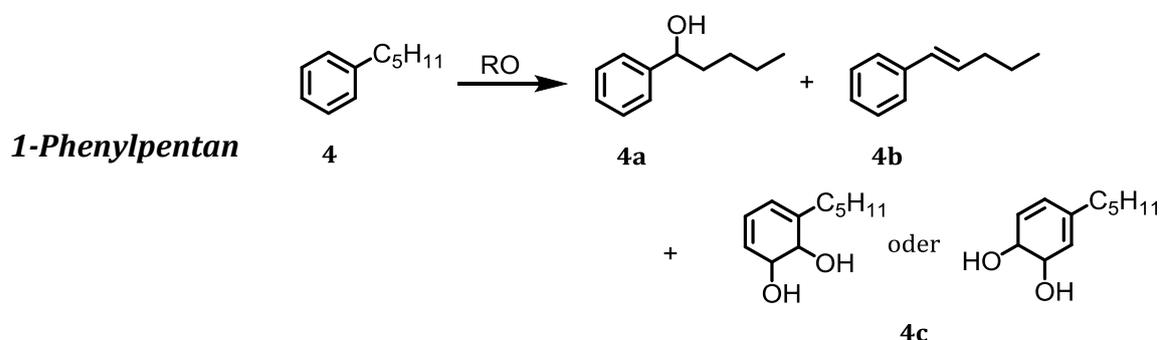
Abbildung 3.25: *In silico* Analyse mittels YASARA AutoDock vina des NDO_{wt} und den Punktvarianten A206V/I mit Ethylbenzol (PDB code: 107N; $x = 14 \text{ \AA}$, $y = 15 \text{ \AA}$ und $z = 15 \text{ \AA}$ entfernt vom C _{β} der Position 307; Ethylbenzol und mutierte Aminosäure in *sticks*; Eisen in orange, molekularer Sauerstoff in rot)

Durch das Docking ließen sich erste Indizien für die deutlich veränderte Regio-selektivität der Valin-Variante erkennen. Die Koordinationsebene des Substrates wurde *in silico* stark gedreht, sodass die Ethylgruppe stärker gegenüber dem aktivierten Sauerstoff exponiert war. Die erniedrigte Stereoselektivität könnte durch diese Verschiebung und die daraus resultierende höhere Dynamik in der aktiven Tasche erklärt werden. Des Weiteren nimmt das energetisch favorisierte Rotamer des Isoleucins bei der Punktvariante NDO_A206I eine ähnliche Position wie beim Wildtyp ein, weshalb vermutlich die vergleichsweise hohe Stereoselektivität von $> 96 \%ee$ beobachtet werden konnte.

Im Weiteren wurde der Einfluss des Phenylalanins 352 auf die Stereoselektivität bestätigt.²³⁵ Die Aktivität der Valin-Variante war zwar mit $1,1 \pm 0,07 \text{ mM}$ für **3a** stark erniedrigt (15 % Umsatz), konnte jedoch im Bereich der Stereoselektivität nahezu eine Inversion von $98 \%ee$ (*R*) auf $42 \%ee$ (*S*) für **3a** erzeugen. Wird Phenylalanin mit Alanin oder Isoleucin ersetzt, wurde ebenfalls eine Erniedrigung der Stereoselektivität beobachtet. Der Effekt der kleineren bzw. größeren hydrophoben Aminosäure war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie der des Valin-Austausches. Dies könnte unter anderem durch die Sterik bzw. Orientierungsmöglichkeiten des Substrates bedingt sein, da Alanin die Kavität der aktiven Tasche zu stark vergrößert (schlechte Koordination bzw. Wildtyp-Verhalten) und Isoleucin eine zu geringe Erweiterung der Tasche erlaubt.

Grundsätzlich ist die allylische Monohydroxylierung gegenüber der Dihydroxylierung bevorzugt. Dies kann durch die eingangs erwähnte, notwendige Bildung des Intermediats Styrol im Fall der Dihydroxylierungsreaktion bedingt sein.

Im Gegensatz zur Katalyse des Alkohols ist für die Bildung des Diols ein Zwei-Schritt-Mechanismus notwendig: Desaturierung und Dihydroxylierung. Dies könnte auch ein Grund für die gegenläufige Stereoselektivität des Diol-Produktes (*S* für Alkohol und *R* für Diol) im Vergleich zum Alkohol sein. Bei der Umsetzung von Ethylbenzol (**3**) wurde der Enantiomerenüberschuss für das Produkt **3a** nicht untersucht, jedoch konnte bei der direkten Umsetzung von Styrol zum entsprechenden Diol ein Überschuss des *R*-Enantiomers festgestellt werden. Diese Beobachtung wirft Fragen über den Ablauf der Desaturierung und der anschließenden Dihydroxylierung auf. Würde das Intermediat aus der Tasche entlassen und für die weitere Katalyse erneut in der aktiven Tasche positioniert werden, wäre eine vergleichbare Stereoselektivität zu erwarten.



Mit fünf C-Atomen wurde mit 1-Phenylpentan (**4**) der größte Substituent untersucht. Grundsätzlich konnten nur sehr geringe Aktivitäten gegenüber diesem Substrat beobachtet werden, wobei sich die Anzahl von aktiven Varianten auf sechs beschränkte. Lediglich durch den Austausch mit kleinen hydrophoben Aminosäuren (Alanin, Glycin) konnte ein Umsatz des Substrates detektiert werden (s. Abbildung 3.26).

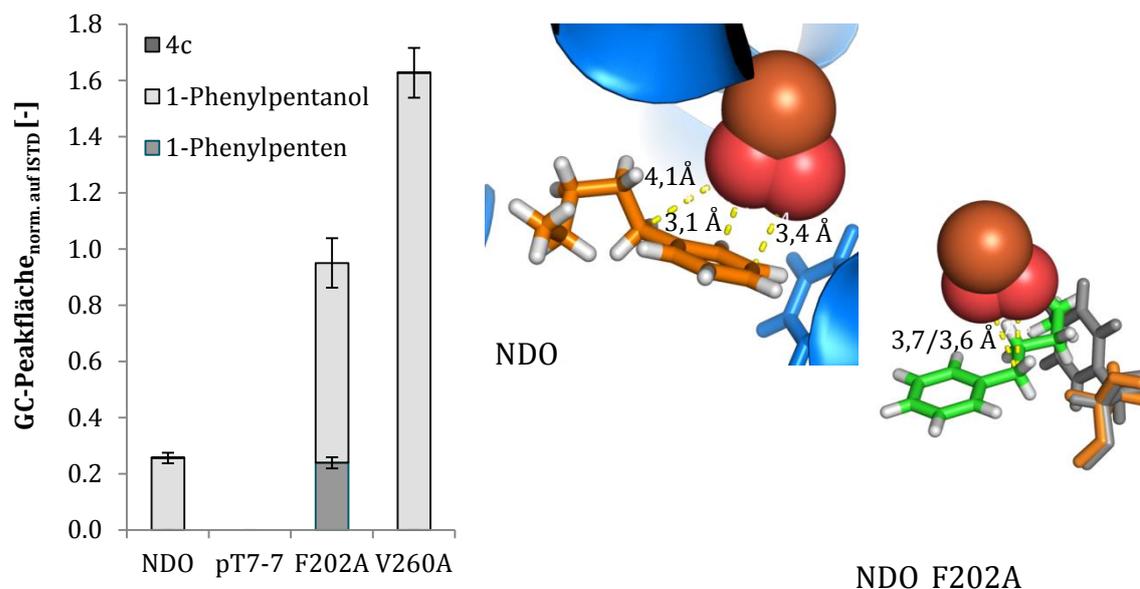


Abbildung 3.26: (Li) *In vivo* Biotransformation von 10 mM 1-Phenylpenta-1,3-dien (**4**) zu 1-Phenylpenta-1,3-diol (**4a**), 1-Phenylpenta-1,4-dien (**4b**) und 3- oder 4-Pentylcyclohexa-3,5-dien-1,2-diol (**4c**) mit dem NDO_{wt} und ausgewählten Varianten der NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h und (Re) *in silico* Analyse mittels YASARA AutoDock vina des NDO_{wt} (oben) und der Punktvariante NDO_F202A (unten) mit **4** (PDB code: 1O7N; x = 14 Å, y = 15 Å und z = 15 Å entfernt vom C_β der Position 307; 1-Phenylpenta-1,3-dien und mutierte Aminosäure in sticks; Eisen in orange, molekularer Sauerstoff in rot). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Aktivität des Wildtyps konnte mit dem Austausch des Phenylalanins an Position 202 um den Faktor 4,75 gesteigert werden. Des Weiteren wurde neben der allylischen Monohydroxylierung zum entsprechenden Alkohol **4a** die Änderung der Reaktionsspezifität in Form des Desaturierungsproduktes 1-Phenylpenta-1,4-dien **4b** beobachtet. Die Desaturierung könnte durch eine neue Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche ermöglicht worden sein (s. Abbildung 3.26, rechts unten). Durch den Austausch der aromatischen hydrophoben Aminosäure Phenylalanin (grau) gegen ein Alanin (orange) wurde die Kavität der aktiven Taschen ins Innere des Proteins verlängert und eine um 180 ° gedrehte Koordination des 1-Phenylpentans im Gegensatz zum Wildtyp ermöglicht. Hierdurch könnte der Substituent näher am Sauerstoff positioniert werden (~ 3,6 Å) und dadurch die neue Reaktivität ermöglichen. Der Austausch des Valins an Position 260 gegen ein Alanin führte weiter zu einer Steigerung der Aktivität (9-fach erhöht). Sowohl der NDO_{wt} als auch die Punktvariante NDO_V260A wiesen noch weitere Produktpeaks auf, welche auf die Bildung von 3- bzw. 4-Pentylcyclohexa-3,5-dien-1,2-diol (**4c**) hindeuten. Da die detektierte Signalintensität für **4c** sehr gering war, wurde die weitere Analyse des vermeintlichen Diol-Produktes **4c** ausschließlich

über das Fragmentierungsmuster der GCMS näher charakterisiert (s. Abbildung 3.27).

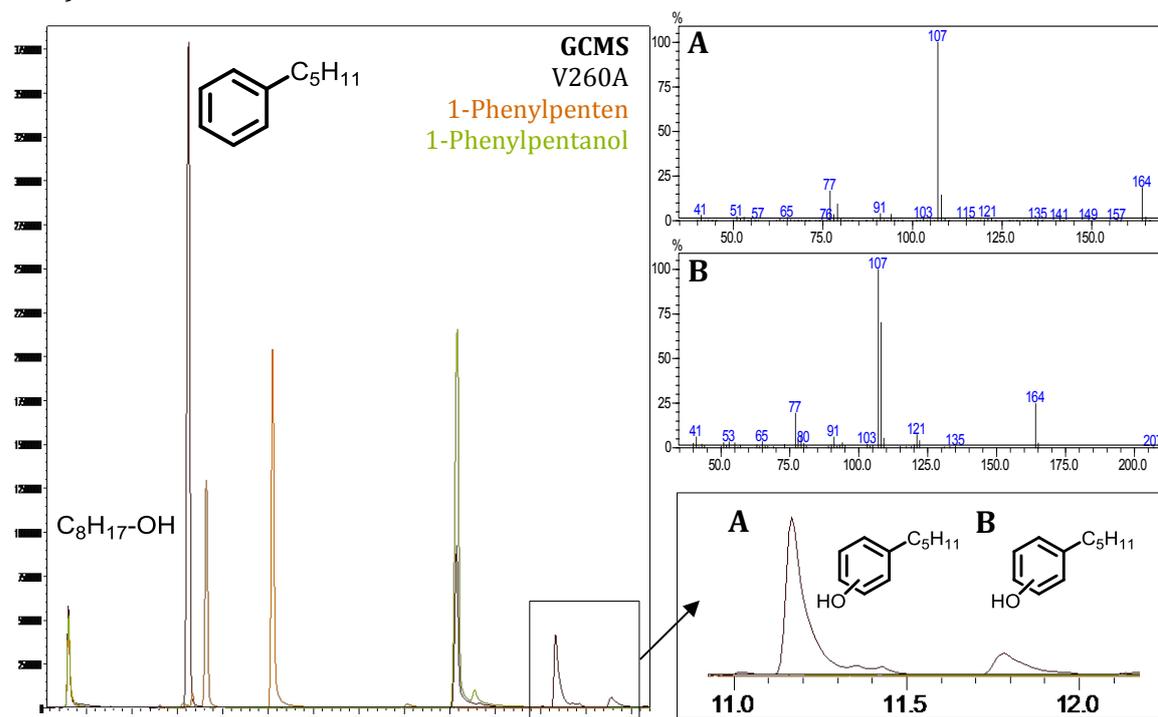
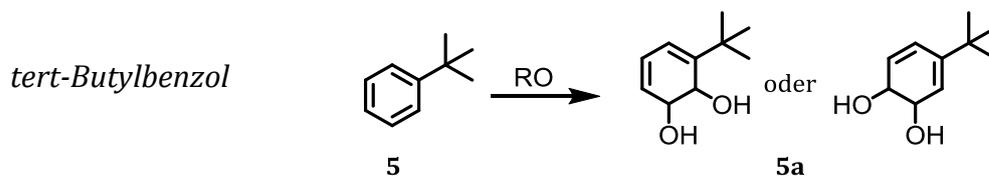


Abbildung 3.27: (Li) GCMS-Chromatogramm der analytischen Umsetzung von 1-Phenylpentan (**4**) mit der Punktvariante NDO_V260A (in schwarz) und den kommerziellen Standards von 1-Phenylpentanol (**4a**, in grün) und 1-Phenylpentan (**4b**, in orange); (Re) GCMS-Fragmentierungsmuster der zwei nicht identifizierten Peaks **A** und **B**

Basierend auf der Analyse des Fragmentierungsmusters konnten die phenolischen Wasser-Eliminierungsprodukte von 3- bzw. 4-Pentylcyclohexa-3,5-diene-1,2-diol (**4c**) detektiert werden. Dass auch der NDO_{Wt} vermeintliche Spuren des Diols aufweist, scheint bei der Betrachtung des Docking-Ergebnisses mit **4** (s. Abbildung 3.26, rechts) plausibel. Der Abstand des Aromaten von **4** zum aktivierten Sauerstoff lag mit 3,1 bzw. 3,4 Å in einem zur Katalyse geeigneten Bereich.

Trotzdem kann aufgrund der niedrigen Aktivitäten von einer schlechten Koordination des Substrates ausgegangen werden, wofür unter Anderem die vielen Rotationsebenen des Substituenten verantwortlich sein können.

3.2.6 Phenylring mit verzweigter Substituenten-Seitenkette



Neben der Elongation der Seitenkette wirkte sich auch eine Verzweigung der Seitenkette in Form einer *ter*-Butyl-Gruppe sehr drastisch auf die beobachtete Aktivität aus. Bis auf die Alanin-Variante NDO_L307A konnte bei keiner der Varianten oder dem NDO_{wt} Aktivität festgestellt werden. (s. Abbildung 3.28).

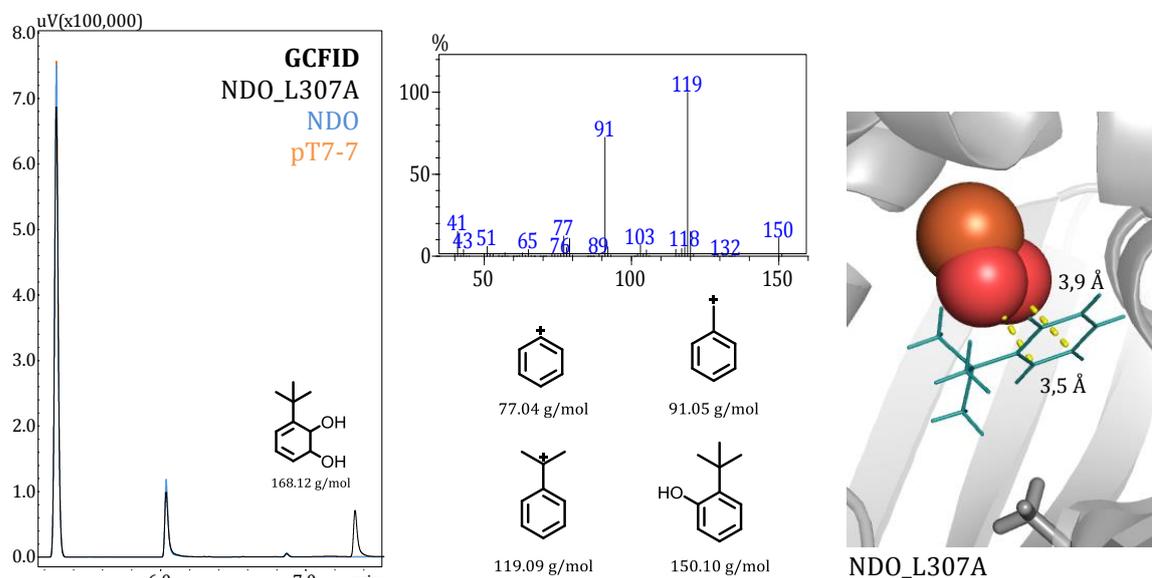
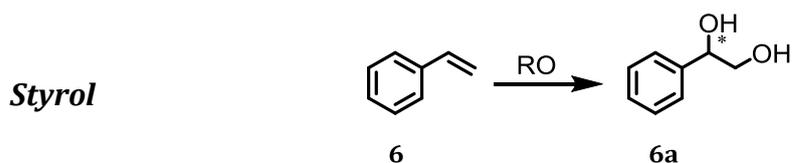


Abbildung 3.28: (Li) GCFID-Chromatogramm der analytischen Umsetzung von *tert*-Butylbenzol (**5**) mit der Punktvariante NDO_L307A (in schwarz), dem NDO_{wt} (in blau) und der Negativkontrolle mit dem Leervektor pT7-7 (in orange); (Mi) GCMS-Fragmentierungsmuster des vermeintlichen Diols **5a** mit charakteristischen Fragmenten als Strukturformal dargestellt; (Re) *In silico* Analyse mittels YASARA AutoDock vina der Punktvariante NDO_L307A mit **5** (PDB code: 107N; x = 14 Å, y = 15 Å und z = 15 Å entfernt vom C_β der Position 307; *tert*-Butylbenzol und mutierte Aminosäure in *sticks*; Eisen in orange, molekularer Sauerstoff in rot)

Auch die detektierte Aktivität der L307A-Variante war sehr gering, weshalb eine Charakterisierung des Produktes nur mittels GCMS und der Analyse des Fragmentierungsmusters möglich war. Aufgrund der detektierten Fragmente und der Docking-Ergebnisse lag die Vermutung nahe, dass die Alanin-Variante **5** zu **5a** katalysiert. Des Weiteren schien eine Positionierung des Substrates in der aktiven Tasche so möglich zu sein, dass ein akzeptable Distanz von 3,5 bzw. 3,9 Å für den Transfer der Sauerstoff-Atome auf den Aromaten bestand.

3.2.7 Phenylring mit ungesättigter Seitenkette

Styrol (**6**), α -Methylstyrol (**7**) und *trans*- β -Methylstyrol (**8**) wurden ausgewählt, um den Einfluss einer ungesättigten Substituenten-Seitenkette und verschiedenen Methylierungsmustern zu untersuchen.



Styrol (**6**) wurde von den meisten Varianten mit moderaten bis exzellenten Umsätzen (4 - 9 mM) zum entsprechenden 1-Phenylethan-1,2-diol (**6a**) umgesetzt. Hierbei konnten mit dem Austausch gegen Alanin bzw. Glycin an den Positionen 202, 206 und 295 Verbesserungen hinsichtlich der Gesamtaktivität erreicht werden (s. Abbildung 3.29).

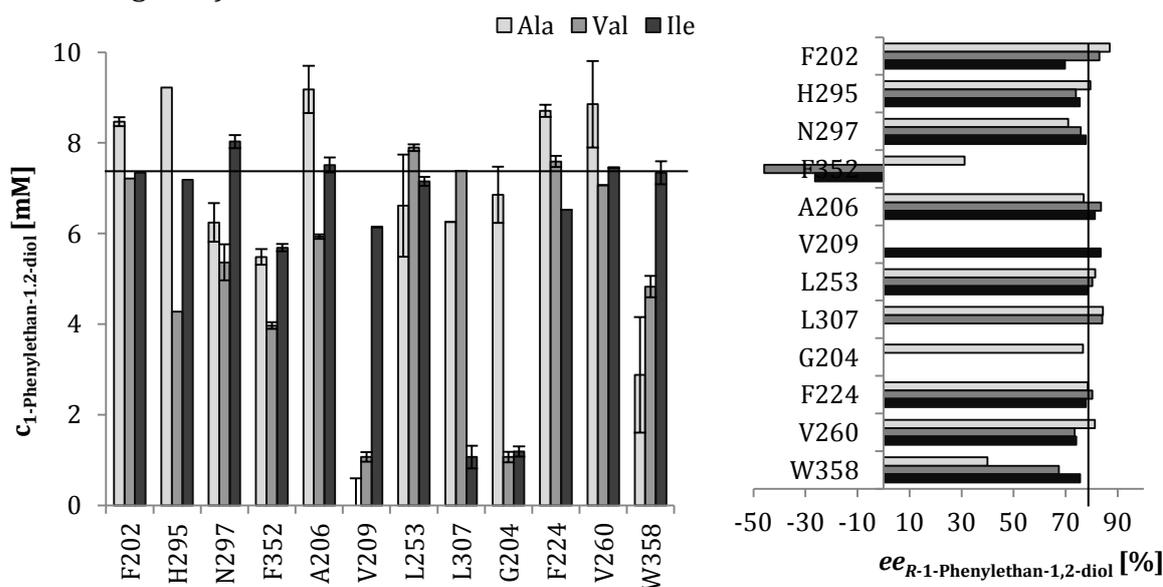


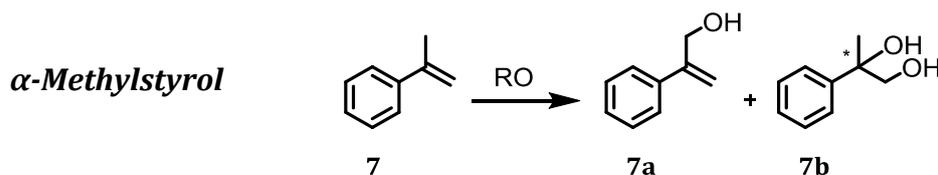
Abbildung 3.29: (Re) *In vivo* Biotransformation von 10 mM Styrol (**6**) zu 1-Phenylethan-1,2-diol (**6a**) mit dem NDO_{wt} (schwarzer Strich) und der NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h und (Li) Stereoselektivitäten für das dihydroxylierte Produkt **6a** mit dem NDO_{wt} als schwarzer Strich. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Die Alanin-Varianten H295A, F224A und V260A sowie die Glycin-Variante A206G zeigten bis zu 92 % Umsatz. Des Weiteren bleibt zu vermerken, dass der Austausch des Asparagins zu Isoleucin an Position 297 nicht wie bei der Umsetzung von Ethylbenzol zur Ausbildung einer inaktiven Variante führte, sondern Wildtyp-Verhalten beobachtet wurde. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass trotz des gleichen zu erwartenden Produktes unterschiedliche Mechanismen für die Umsetzung von **3** und **6** bestehen könnten. Im Fall der Position W358 führte die Vergrößerung der ausgetauschten Aminosäure (Ala zu Val zu Ile) zur Wiederherstellung der Wildtyp-Aktivität. Im Gegensatz dazu konnte beim Austausch von Glycin an Position 204 gegen Valin bzw. Isoleucin einem Einbruch der Aktivität beobachtet werden, womit die Effekte bei der Umsetzung des natürlichen Substrates Naphthalen (**1**) bestätigt

wurden. Eine Vermutung für diese Phänomen stellte die Störung der Elektronik in der Umgebung des mononuklearen Eisens dar. So wurde von Parales *et al.* (1999) die Asparaginsäure an Position 205 als essentiell für den Elektronentransfer beschrieben.¹⁷⁶ Durch Einsatz von größeren Aminosäuren an Position 204 könnte dieser Transfer gestört werden.

Im Fall der Stereoselektivität wurde bei den meisten Varianten eine Präferenz des *R*-Enantiomers festgestellt. Der NDO_{Wt} zeigt mit 78 %*ee* (*R*) bereits eine moderate Stereoselektivität, welche mit der Einzelvariante NDO_F202A auf 87 %*ee* (*R*) gesteigert werden konnte. Wie bereits bei Ethylbenzol (**3**) konnte beim Einsatz der Valin- bzw. Isoleucin-Variante an Position 352 die Stereoselektivität mit 46 %*ee* (*S*) bzw. 26 %*ee* (*S*) nahezu invertiert werden.

α -Methylstyrol (**7**) wird zu dem monohydroxylierten 3-Hydroxyphenylpropen (**7a**) und dem dihydroxylierten 2-Phenylpropan-1,2-diol (**7b**) umgesetzt.



In Tabelle 3.7 sind die Umsätze mit den Einzelvarianten und dem NDO_{Wt}, sowie die erreichten Stereoselektivitäten für das Diol-Produkt **7b** dargestellt.

Tabelle 3.7: (Li) Umsätze und Produktverteilung der Einzelvarianten der NDO-Bibliothek und (Re) Stereoselektivitäten für das dihydroxylierte Produkt **7b** mit NDO_{Wt} als schwarzer Strich

	Umsatz [%] und Produktverteilung (3a:3b)				ee _{S-2-Phenylpropan-1,2-diol} [%]
	Ala	Val	Ile		
NDO	53 (47:53)				
pT7-7	n. d.				
F202	55 (40:60)	39 (48:52)	36 (50:50)		
H295	50 (22:78)	35 (22:78)	50 (18:82)		
N297	44 (37:63)	37 (58:42)	44 (74:26)		
F352	3 (77:23)	40 (7:93)	55 (13:87)		
A206*	68 (45:58)	67 (76:24)	67 (75:25)		
V209*	n. d.	n. d.	50 (47:53)		
L253	54 (36:64)	46 (56:44)	63 (47:53)		
L307	44 (35:65)	60 (31:69)	n. d.		
G204	46 (45:55)	n. d.	n. d.		
F224	41 (44:56)	46 (53:47)	48 (52:48)		
V260*	53 (34:66)	56 (34:66)	61 (45:55)		
W358	n. d.	25 (39:61)	55 (39:61)		

* statt A/V entsprechend G ausgetauscht;
n. d.: nicht detektiert

Mit der Position 206 wurde die aktivste Variante für das Substrat **7** identifiziert, wobei bis zu 68 % Umsatz erreicht werden konnten. Jedoch wies diese Variante weder eine erhöhte Stereo- noch eine erhöhte Reaktionspezifität auf. Im Gegensatz dazu wurde der Einfluss der Einzelvariante NDO_F352V auf die Selektivität bestätigt, die Produktverteilung konnte zugunsten des Diol-Produktes **7b** (13:87) verschoben werden, die Wildtyp-Aktivität blieb dabei erhalten. Sämtliche Aminosäureaustausche an Position H295 wiesen eine ähnliche Reaktionsspezifität auf und zeigten vermehrt die Bildung von **7b**. Des Weiteren konnte unter Verwendung der Alanin-Variante die Stereoselektivität für das *S*-Enantiomer von 55 auf 71 %*ee* (*S*) erhöht werden. Auch die Substitution an den Positionen F202 und V260 bewirkte eine Steigerung der Stereoselektivität, im Fall des Austausches des Phenylalanins an Position 202 wurde ein Enantiomerenüberschuss von 80 %*ee* (*S*) detektiert. Mit dem Einsatz der Variante NDO_V260G konnte der Enantiomerenüberschuss weiter auf 87 %*ee* (*S*) erhöht werden. Jedoch wiesen sowohl die Einzelvarianten an Position 202 sowie an Position 260 keine hohe Reaktionsselektivität auf, die Bildung des monohydroxylierten Produktes **7a** sowie des dihydroxylierten Produktes **7b** wurde zu gleichen Teilen beobachtet. Der Austausch des Valins an Position 209 gegen Alanin oder Glycin führte bisher bei jeder Umsetzung zu einer drastischen Reduktion der Aktivität, welche durch den Austausch mit Isoleucin teilweise wiederhergestellt werden konnte. Diese Beobachtung wurde ebenfalls bei der Umsetzung von **1** und **3** festgestellt. Da in unmittelbarer Nähe zu dieser Position eines der Eisen-koordinierenden Histidine (H208) lokalisiert ist, liegt auch hier wieder die Vermutung nahe, dass die empfindliche Elektronik der komplexen Katalysemaschinerie durch Aminosäure-Austausche an Position V209 gestört wird. Wie bereits bei der Umsetzung von **6** konnte bei den Punktvarianten G204V bzw. G204I keine Aktivität beobachtet werden. Auch hier wird ein störender Effekt, sterisch oder elektronisch, vermutet. Der Austausch gegen größere Aminosäuren an dieser Position könnte zur Relokalisierung des Proteinrückgrats führen, wodurch die Distanzen für den Elektronentransfer über die Position D205 gestört werden.

Mit der Umsetzung von **7** mit der erweiterten *in vivo* NDO-Bibliothek bestehend aus Doppelvarianten konnte keine weitere Steigerung der Aktivität beobachtet werden,

allerdings wurden Effekte auf die Reaktions- und Stereoselektivität detektiert. In Abbildung 3.31 sind die besten Doppelvarianten und der NDO_{Wt} dargestellt.

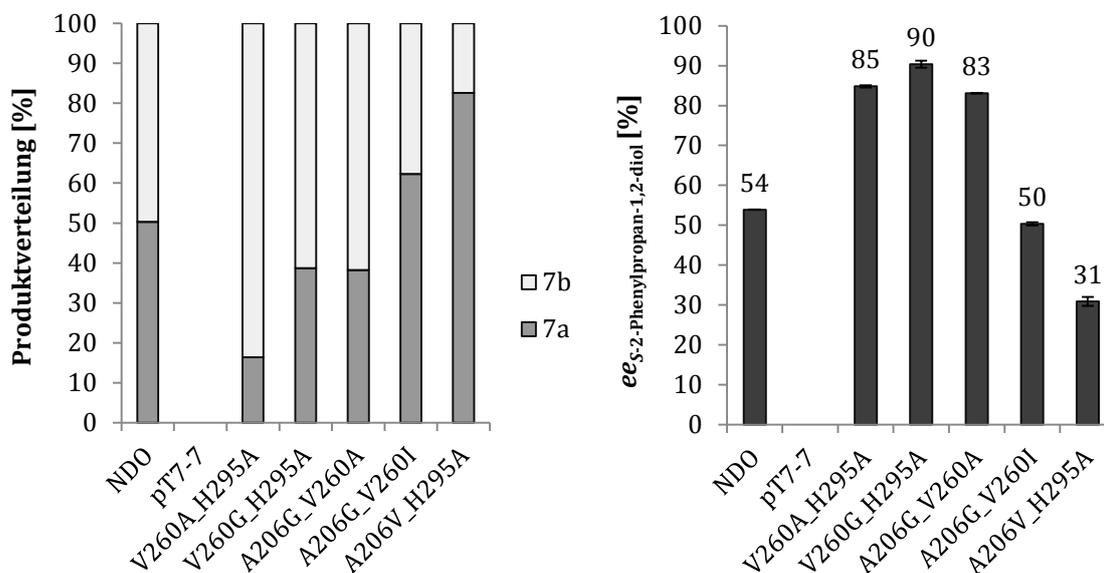
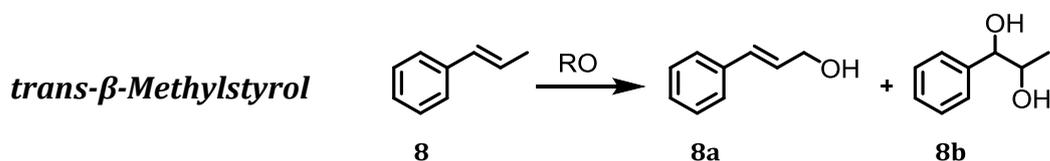


Abbildung 3.30: (Li) Produktverteilung der *in vivo* Umsetzungen von 10 mM α -Methylstyrol (**7**) zu 3-Hydroxyphenylpropan (**7a**) und 2-Phenylpropan-1,2-diol (**7b**) bei 30 °C für 20 h und (Re) Stereoselektivitäten für das Diol-Produkt **7b**. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Durch die Kombination der Positionen V260 und H295 und der Generierung der Doppelvariante V260A_H295A konnten die positiven Effekte hinsichtlich der Produktverteilung und der Stereoselektivität beibehalten bzw. leicht gesteigert werden. Die Doppelvariante V260G_H295A zeigte mit einem Enantiomerenüberschuss von 90 %*ee* (*S*) die höchste Präferenz für das *S*-Enantiomer und konnte somit die hohe Selektivität der Glycin-Variante mit der hohen Reaktionsselektivität der Einzelvariante H295A verbinden. Wurde die Position 206, welche bei der Umsetzung von **7** die Bildung des Alkohols **7a** bevorzugt wurde, mit Position H295 kombiniert, resultierte dies in einer starken Präferenz für das monohydroxylierte Produkt mit einem einhergehenden Verlust der Stereoselektivität für das Diol-Produkt **7b**.

Gerade bei Reaktionsräumen, die sehr nah beieinander liegen (Methylgruppe und C=C-Doppelbindung in **7**), ist eine exzellente und präzise Koordination des Substrates für eine hohe Reaktionsselektivität notwendig. Die Identifizierung von vier Positionen, welche alle über die ganze Länge der aktiven Tasche verteilt sind, aber dennoch einen deutlichen Einfluss auf die Katalyse von **7** zeigen, lässt auf ein komplexes Koordinationsnetzwerk schließen. Die richtige Kombination von diesen

Positionen könnte demnach zu einer hohen Reaktions- und Stereoselektivität führen. Dass bereits der Grundstein hierfür gelegt ist, lässt sich an der Abwesenheit des am Ring hydroxylierten Produktes erkennen. Durch die Evolution der aktiven Tasche kann keine produktive Konformation für eine Ringhydroxylierung mehr generiert werden.



Bei der Umsetzung von *trans*- β -Methylstyrol (**8**) wurden sowohl der monohydroxylierte Zimtalkohol (**8a**) als auch das dihydroxylierte Produkt **8b**, 1-Phenylpropan-1,2-diol, detektiert. Der NDO_{wt} zeigte absolute Reaktionsspezifität, wodurch mit $2,3 \pm 0,3$ mM der Alkohol **8a** als alleiniges Produkt beobachtet werden konnte. Bei der Untersuchung der NDO-Bibliothek wurden Positionen identifiziert, welche auch die Bildung des Diols **8b** möglich machten. So wurde vor allem beim Austausch von aromatischen Aminosäuren ein Shift in der Reaktionsselektivität festgestellt. Der Austausch des Phenylalanins an Position 202 gegen ein Alanin lieferte mit 23 % Umsatz und einer Produktverteilung von 31:69 (**8a**:**8b**) die aktivste Diol produzierende Variante. Die Kavität der aktiven Tasche wurde durch den Austausch des Phenylalanins der Länge nach gestreckt und vermutlich wird dem Substrat bzw. der endständigen Methylgruppe deshalb erlaubt weiter am Eisen vorbeigeführt zu werden, wodurch die C=C-Doppelbindung für die Katalyse exponiert wird. Ein ähnliches Szenario konnte für den Austausch des Phenylalanins an Position 352 beobachtet werden. Die Punktvarianten F352V und F352I wiesen lediglich das dihydroxylierte Produkt **8b** auf. Neben der bereits mehrfach erwähnten Position 206 konnte auch bei der Umsetzung von **8** mit den Punktvarianten V260A bzw. V260G die Bildung des Diol-Produktes **8b** beobachtet werden. Die Punktvariante NDO_V260G zeigte mit einem Umsatz von 21 % die höchste Selektivität für **8b** mit 8:92 (**8a**:**8b**). Die erzeugte Reaktionsselektivität konnte mit der *in silico* Analyse in Einklang gebracht werden (s. Abbildung 3.31).

Zum Teil konnten exzellente Stereoselektivitäten für das produzierte Diol **8b** erreicht werden. So wiesen alle Varianten der Position 202 einen Enantiomerenüberschuss größer 87 %*ee* (*S,S*), im Fall der NDO_F202A wurde die Selektivität auf > 99 %*ee* für das (*S,S*)-Enantiomer erhöht. Außerdem konnte der

Einfluss auf die Stereoselektivität der Position 352 weiter bestätigt werden. Bei der Umsetzung von **8** wurde die Stereoselektivität für das produzierte Diol auf bis zu 19 %*ee* (*R,R*) invertiert.

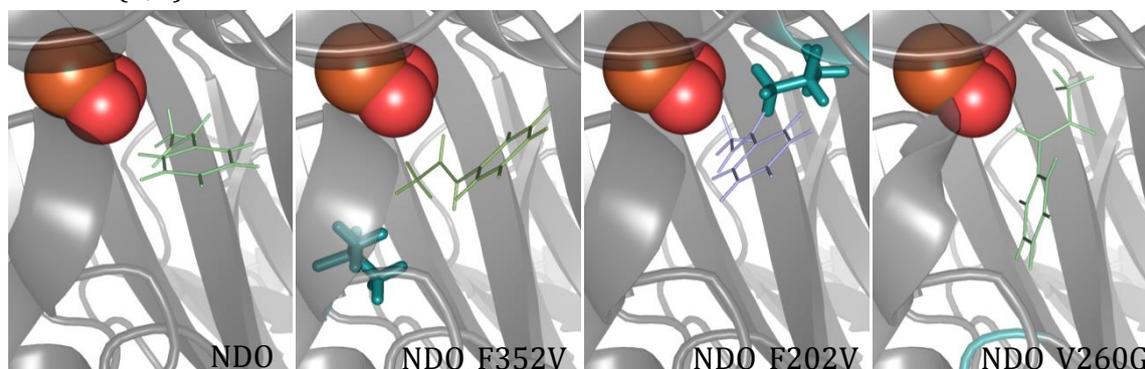
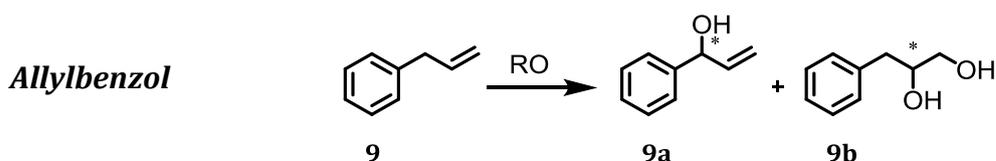


Abbildung 3.31: *In silico* Analyse mittels YASARA AutoDock vina des NDO_{wt} und unterschiedlicher Punktvarianten mit *trans*- β -Methylstyrol (PDB code: 107N; $x = 14 \text{ \AA}$, $y = 15 \text{ \AA}$ und $z = 15 \text{ \AA}$ entfernt vom C $_{\beta}$ der Position 307; *trans*- β -Methylstyrol und mutierte Aminosäure in *sticks*; Eisen in orange, molekularer Sauerstoff in rot)

Die Analyse von *trans*- β -Methylstyrol lieferte zwei Hypothesen: (1) aromatische Aminosäuren sind wichtig für die Steuerung der katalytischen Maschinerie (Stabilisierung der Koordination von Substraten über π - π -Wechselwirkungen) und (2) Erweiterung der Kavität der aktiven Tasche lässt mehr Rotation des Substrates zu und ermöglicht dadurch neue Reaktionsselektivität.



Bei der Umsetzung von Allylbenzol (**9**) wurden die Bildung von 1-Phenylallylalkohol (**9a**) und 3-Phenylpropan-1,2-diol (**9b**) beobachtet. Das Hauptprodukt der Umsetzungen von sämtlichen Varianten wurde als das Diol-Produkt **9b** identifiziert (s. Anhang Abbildung 6.22). Wiederum kristallisierten sich die Positionen 202, 206 und 260 als maßgeblich für die Steuerung der Selektivität heraus. Bei einem Umsatz von 52 % wurde bei der Einzelvariante NDO_A206G eine Produktverteilung von 19:81 (**9a**:**9b**) detektiert und könnte als Startpunkt für das

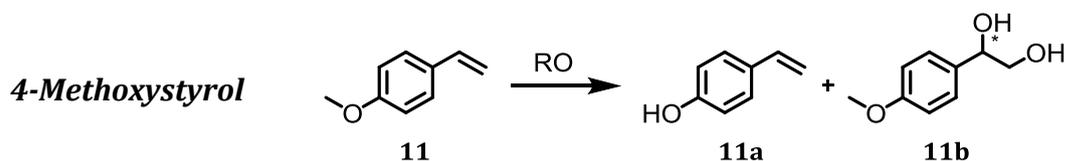
protein engineering der NDO in Richtung Monohydroxylierung im Fall einer endständigen Doppelbindung dienen.

Die Stereoselektivität war sowohl bei den Einzel- als auch bei den Doppelvarianten durchgehend $> 86\%ee$ (*R*), bei den meisten Variante sogar $> 95\%ee$ (*R*). Als einzige Ausnahme stellte sich die Einzelvariante NDO_F352I heraus, welche wie schon in vorangegangenen Untersuchungen, einen starken Einfluss auf die Selektivität ausübte und diese auf $41\%ee$ (*R*) senkte.

Grundsätzlich konnte beobachtet werden, dass bei einer endständigen C=C-Doppelbindung bzw. einer nicht-konjugierten Doppelbindung zum aromatischen System die Dihydroxylierung bevorzugt wurde. Des Weiteren wurden exzellente Stereoselektivitäten erreicht, was auf eine stabile Koordination des Substrates hinweist.

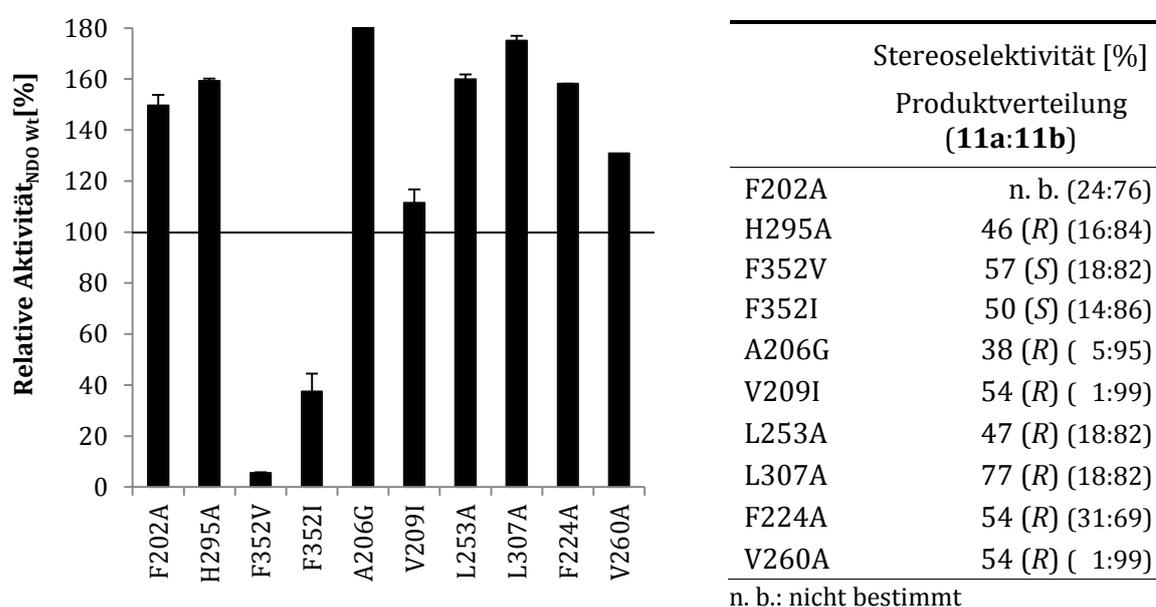
3.2.8 Phenylring mit ungesättigter Seitenkette und *p*-Methoxy-Gruppe

Um den Einfluss einer weiteren Substitution am Phenylring auf die Reaktionsspezifität (Dihydroxylierung *versus* *O*-Demethylierung) zu untersuchen, wurden 4-Methoxystyrol (**11**) und 4-Allylanisol (**10**) ausgewählt.



Die Umsetzung von 4-Methoxystyrol (**11**) resultierte in 4-Vinylphenol (**11a**) als Produkt der Demethylierungsreaktion und 1-(4-Methoxyphenyl)-ethan-1,2-diol (**11b**) als Produkt der Dihydroxylierungsreaktion. Bei allen untersuchten Varianten wurde eine Präferenz für die Dihydroxylierung der konjugierten Doppelbindung beobachtet. Dabei stellten sich die in Abbildung 3.8 aufgeführten Varianten als besonders geeignet heraus.

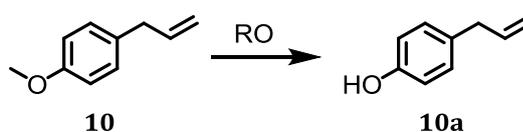
Abbildung 3.8: Relative Aktivität zum NDO_{wt} von ausgewählten *in vivo* Biotransformationen mit ruhenden Zellen (0,2 mg_{BFM}/mL) bei der Umsetzung von 4-Methoxystyrol (**11**, links) mit Stereoselektivitäten und Produktverteilung (rechts)



Mit dem Einsatz der Punktvariante A206G wurde die Aktivität um den Faktor zwei gegenüber dem Wildtyp erhöht. Des Weiteren zeigte diese Variante eine ausgezeichnete Reaktionsselektivität von 5:95 (**11a:11b**). Im Gegensatz dazu wurde durch die Methoxy-Gruppe die Stereoselektivität gegenüber der Umsetzung von Styrol (**6a** mit 80 %*ee* (R)) drastisch gesenkt. Die Einzelvariante NDO_L307A wies bei ebenfalls gutem Umsatz (175 %) mit 77 %*ee* (R) die höchste Stereoselektivität auf. Durch den Austausch des Phenylalanins an Position 352 wurde die Aktivität stark gesenkt, im Fall der Stereoselektivität konnte wieder eine Inversion hinzu 57 %*ee* (S) beobachtet werden.

Zeigten die Varianten bei Allylbenzol (**9**) noch absolute Reaktionsselektivität für die Dihydroxylierung der isolierten Doppelbindung, veränderte sich die Reaktionsselektivität beim Einbringen einer Methoxy-Gruppe bei der Untersuchung von 4-Allylanisol (**10**) deutlich.

4-Allylanisol



Bei der Umsetzung von 4-Allylanisol (**10**) wurde lediglich das demethylierte 4-Allylphenol (**10a**) detektiert. Hierbei resultierte jede eingebrachte Variation zur Wildtyp-Sequenz in der Reduktion der Aktivität (s. Abbildung 3.32).

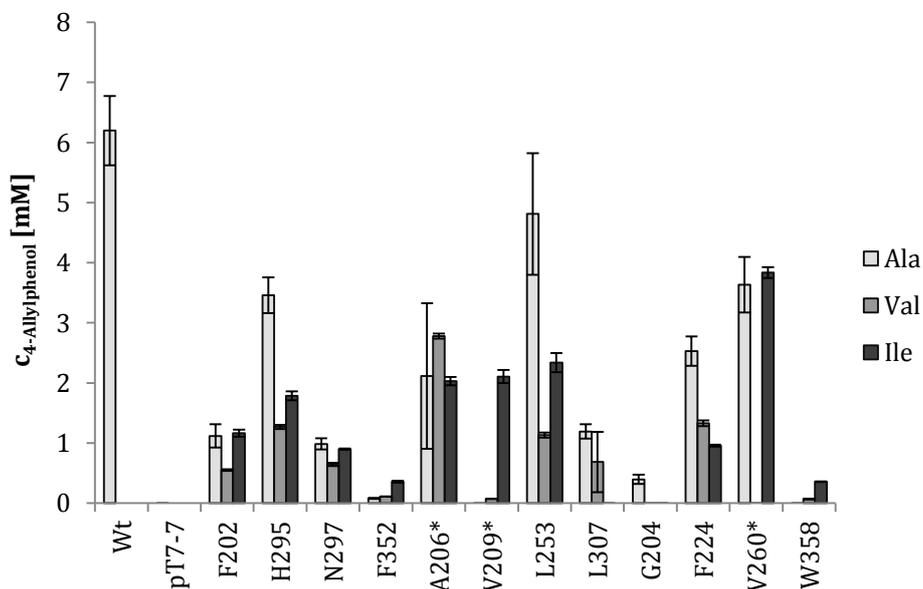


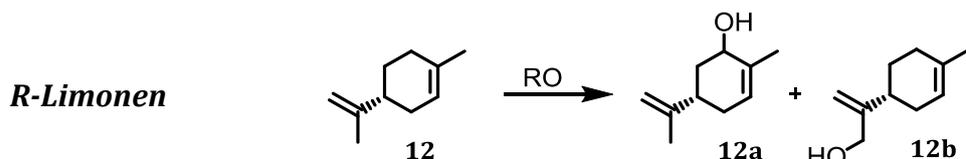
Abbildung 3.32: *In vivo* Biotransformation von 10 mM 4-Allylanisol (**10**) zu 4-Allylphenol (**11a**) mit dem NDO_{Wt} und der NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h (*: Gly). Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Bei der Umsetzung von Allylbenzol (**9**) wurde NDO_A206G als eine der besten und aktivsten Varianten identifiziert, wurde dem Substrat ein weiterer Substituent in Form einer Methoxy-Gruppe hinzugefügt, nahm die Aktivität stark ab. Allein eine Variation am Eingang der aktiven Tasche, NDO_L253A, konnte an die Wildtyp-Aktivität anknüpfen. Grundsätzlich war der NDO_{Wt} mit $6,2 \pm 0,6$ mM 4-Allylphenol (**10a**) am Besten für die Umsetzung von **10** geeignet. Jedoch bleibt zu hinterfragen, warum der polarere Teil des Substrates bevorzugt in die hydrophobe Tasche geleitet wird und als Hauptprodukt **10a** zu beobachten ist. Die Orientierung des Substrates, bei welcher der unpolare, ungesättigte Substituent in produktiver Koordination zum Eisen koordiniert werden würde, hätte den Vorteil, dass der polare Teil des Substrates nicht die hydrophobe Tasche passieren müsste. Diese Konformation scheint jedoch nicht favorisiert zu sein, da dies zu einer Dihydroxylierung des Substrates führen würde. Neben dem Einfluss der Polarität spielt auch die für die Reaktion notwendige Energie eine Rolle. So bleibt die Frage offen, ob die Demethylierung der Dihydroxylierung nur deshalb vorgezogen wird, weil die Dihydroxylierung einer isolierten Doppelbindung energetisch aufwändiger ist als die

Demethylierung einer Methoxy-Gruppe.

3.2.9 Monoterpen *R*-Limonen

R-Limonen wurde als Sonde für die Erweiterung des Substratraumes hinsichtlich nicht-aromatischer, nicht-planarer Moleküle verwendet. Die NDO-Bibliothek und die Erweiterung der Bibliothek bestehend aus Doppelvarianten wurde *in vivo* mit ruhenden Zellen untersucht.



Die Umsetzung von *R*-Limonen (12) resultierte in den monohydroxylierten Produkten Carveol (12a) und Mentha-1,8-dien-10-ol (12b). In Abbildung 3.33 sind die aktivsten Varianten und der NDO_{Wt} dargestellt.

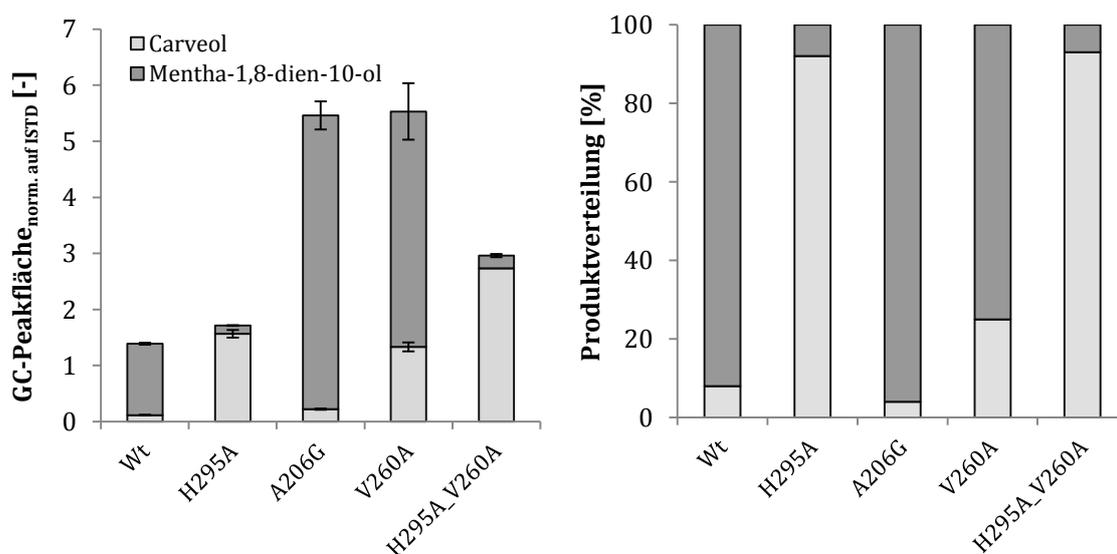


Abbildung 3.33: (Li) *In vivo* Umsetzungen von 10 mM *R*-Limonen (12) zu Carveol (12a) und Mentha-1,8-dien-10-ol (12b) mit NDO_{Wt} und Varianten bei 30 °C für 20 h und **(Re)** Prozentuale Verteilung der Produkte. Alle Experimente wurden als Triplikate durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Wiederum zeigten sich die Positionen 295, 206 und 260 als Schlüsselpositionen zur Steigerung der Selektivität und Aktivität. Mit der Alanin-Variante an Position H295 wurde die Produktverteilung gegenüber dem Wildtyp invertiert. Mit dem Austausch von Alanin gegen Glycin und Valin gegen Alanin wurden mit NDO_A206G bzw. NDO_V260A zwei sehr aktive Varianten (verglichen mit dem NDO_{Wt}) generiert. Hierbei wurde bevorzugt das monohydroxylierte Produkt Mentha-1,8-dien-10-ol (12b) gebildet. Wird nun eine für Carveol (12a) selektive Variante mit einer sehr

aktiven Variante, NDO_V260A, kombiniert, war ein additiver Effekt der Eigenschaften zu erkennen. Die Selektivität von H295A blieb erhalten und wurde mit der Aktivität von NDO_V260A verbunden.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential des Biokatalysators Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 im *in vitro* und *in vivo* System hinsichtlich der Eignung zur heterologen Expression in *Escherichia coli*, sowie die Steuerung der Selektivität und Spezifität durch das Einbringen von Punktmutationen in die aktive Tasche untersucht. Hierdurch wurden sechs Positionen identifiziert, die für die Steuerung der Selektivität und Spezifität verantwortlich sind.

4.1 *In vitro* Untersuchung des Multikomponentenkomplexes Naphthalen Dioxygenase

Im Zuge der *in vitro* Untersuchungen wurden verschiedene Aspekte des Enzymsystems beleuchtet: (1) Katalyse im zellfreien Milieu, (2) Beurteilung der Stabilität der Einzelkomponenten und (3) Einfluss von Aminosäureaustauschen in der *first shell* gegen kleinere hydrophobe Aminosäuren (Ala, Val, Ile), sowie Aminosäureaustausche basierend auf der Konsensussequenz.

Katalyse im zellfreien Milieu: Reaktionssetup

Für die Untersuchung der Naphthalen Dioxygenase (NDO) wurde eine Variantenbibliothek bestehend aus zwölf Alanin bzw. Glycin-Varianten der aktiven Tasche generiert und die entsprechenden Oxygenasen über Affinitätschromatographie gereinigt (s. Kapitel 3.1.3). Bei der Umsetzung von Naphthalen (**1**) mittels des gereinigten NDO_{wt} konnte innerhalb von 2 h 75 % Umsatz des Substrates detektiert werden. Durch dieses Reaktionssetup ist es möglich, sowohl Verbesserungen als auch Verschlechterungen gegenüber dem NDO_{wt} durch eingebrachte Mutationen festzustellen. Allgemein zeigten *in vitro* Varianten im Vergleich zu den *in vivo* getesteten, entsprechenden Alanin bzw. Glycin-Varianten eine deutlich geringere Aktivität in den durchgeführten Biotransformationen. So setzte die Punktvariante NDO_A206G, eine der aktivsten Varianten des NDO_{wt}, *in vivo* 70 % des eingesetzten Substrates (10 mM Toluol) um, bei der *in vitro* Umsetzung von Toluol mit derselben Variante wurde lediglich ein Umsatz von 10 % detektiert. Dieses Phänomen konnte

auch bei anderen Varianten festgestellt werden und könnte auf eine mangelnde Stabilität des Multienzymkomplexes im *in vitro* System hindeuten. Grundsätzlich kann bei Mehrkomponentensystemen eine geringere spezifische Aktivität als bei Einzelkomponentensystemen in gereinigter Form festgestellt werden (nmol statt μmol).²³⁸

Katalyse im zellfreien Milieu: Kopplungseffizienz

Des Weiteren ist bei Mehrkomponentensystemen auch die Kopplungseffizienz zwischen verbrauchtem Cofaktor und der stattgefundenen Produktoxidation mit in Betracht zu ziehen. Deshalb wurde in *in vitro* Experimenten mit einem 2,5-fachen Überschuss an Cofaktor gegenüber der eingesetzten Substratmenge gearbeitet. Ist jedoch die Kopplungseffizienz niedrig, kann durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Bildung die Aktivität in *in vitro* Ansätzen stark reduziert werden.²⁰⁸ So wurde in *in vitro* Biotransformationen die Bildung von H_2O_2 beobachtet, wenn (I) die Kopplungseffizienz der Redoxpartner mit der katalytischen Oxygenase niedrig ist, oder wenn (II) die Redoxpartner im Überschuss vorlagen.²⁰⁸ Da sich im untersuchten *in vitro* System keine Katalase befand, ist eine Inaktivierung der katalytisch aktiven Dioxygenase durch Reaktion des H_2O_2 mit dem mononuklearen Eisen möglich.²³⁹ Die irreversible Inaktivierung der Dioxygenase wurde von Lee (1999) als eine Fenton-Reaktion beschrieben, wobei durch die Reaktion von H_2O_2 mit dem mononuklearen Eisen stark oxidative Spezies wie Hydroxyl-Radikale entstehen. So konnten Jouanneau und Kollegen (2006) bei der Untersuchung einer Naphthalen Dioxygenase aus *Sphingomonas* sp. CHY-1 eine stark vom Substrat abgängige Kopplungseffizienz beobachten.²⁰⁸ Wurden bei der Umsetzung des natürlichen Substrates Naphthalen $460 \pm 20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Sauerstoff aufgenommen, konnte die Bildung von $418 \pm 20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Dihydrodiol beobachtet werden, was einem Koeffizienten von 1,03 entspricht. Die Veränderung des Substrates hinsichtlich eines zusätzlichen aromatischen Ringes (Anthracen) reduzierte das Verhältnis auf 0,36. Verfügte das Substrat bereits über Hydroxy-Gruppen, wie im Fall von 1,2-Benz[α]anthracen-diol, verschlechterte sich die Kopplungseffizienz weiter auf $< 0,01$. Gerade im *in vitro* System ist deshalb eine gute

Kopplung wichtig, da keine wirtseigenen Enzyme das potentiell entstehende Wasserstoffperoxid abbauen können.

Stabilität der Einzelkomponenten: Verhältnis von Oxygenase, Ferredoxin und Reduktase

Im Zuge der Optimierung des *in vitro* Systems wurden die Verhältnisse der unterschiedlichen Komponenten variiert: (I) mit 1 μM Oxygenase, 20 μM Ferredoxin und 5 μM Reduktase sowie (VI) mit 1 μM Oxygenase, 12 μM Ferredoxin und 3 μM Reduktase. Das Elektronenshuttle-Molekül Ferredoxin wurde dabei stets im Überschuss zugegeben. Bereits 1994 konnten Tan und Kollegen zeigen, dass die Zugabe von Ferredoxin im Überschuss sich als aktivitätssteigernd auf die Benzol Dioxygenase (BDO) von *Pseudomonas putida* ML2 auswirkte.²⁴⁰ So steigerte ferner die Zugabe von gereinigtem Ferredoxin zu einem Zellextrakt der BDO exponentiell die detektierte Aktivität: bei Zugabe von 10 μg Ferredoxin konnte eine Aktivität von 20 nmol/min beobachtet werden, bei der Zugabe von 50 μg Ferredoxin bereits eine Aktivität von 65 nmol/min. Wurde zusätzlich gereinigte Reduktase hinzugegeben, konnte auch hier bei Zugabe von 10 μg gereinigtem Enzym ein linearer Anstieg der Aktivität bis auf 20 nmol/min beobachtet werden. Jedoch wurde ein geringerer Einfluss auf die Aktivität verzeichnet als bei der Zugabe von Ferredoxin. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Ferredoxin um das entscheidende Bottleneck in der Elektronentransportkette handelt. Der Vollständigkeit halber wurde auch der Effekt einer weiteren Zugabe der Oxygenase untersucht, wobei jedoch keine Aktivitätssteigerung beobachtet werden konnte. Die Untersuchungen von Tan und Kollegen wurden durch weitere Studien unterstützt, in welchen ein Überschuss an Ferredoxin und Reduktase für die Erhöhung der Aktivität notwendig war.²⁰⁸ Des Weiteren konnte bei der industriellen Produktion von Indigo durch Genencor gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression des Ferredoxins in einer höheren Produktausbeute resultierte.²⁴¹

Stabilität der Einzelkomponenten: Verhältnis von Oxygenase, Ferredoxin und Reduktase

Die Reinigung der hexameren Dioxygenase ($\alpha_3\beta_3$) wurde lediglich über einen His-Tag an der α -Untereinheit bewerkstelligt. Es wurde stets davon ausgegangen, dass die Affinität der β -Untereinheit zu der großen α -Untereinheit für eine gemeinsame Reinigung ausreicht. Die erniedrigte Aktivität in den *in vitro* Experimenten könnte deshalb mitunter das Resultat eines bestehenden Missverhältnisses von α - und β -Untereinheit (1 : < 1) sein. In den meisten Dioxygenasen wird der β -Untereinheit nämlich eine stabilisierende Funktion zugeschrieben, wobei in manchen Fällen auch ein Einfluss auf die Substratspezifität durch die Untersuchung von Hybridenzymen beobachtet werden konnte.²⁴² Aufgrund der Reinigung könnte die nicht-kovalent gebundene β -Untereinheit bei der Reinigung zumindest teilweise vor der Zielfraktion eluiert worden sein.

Einfluss von Aminosäureaustauschen in der aktiven Tasche

Da die zwölf *in vitro* generierten Varianten auch in das *in vivo* System übertragen wurden, werden die beobachteten Effekte der unterschiedlichen Aminosäureaustausche im *in vivo* System in Kapitel 4.2 diskutiert.

Einfluss von Aminosäureaustauschen basierend auf der Konsensussequenz

Bei der Umsetzung des Modellsubstrates Styrol (**6**) mit den 24 generierten Konsensusvarianten konnte bis auf wenige Ausnahmen (N363G, N297H, S360Q) mit allen untersuchten Varianten eine mit dem Wildtyp der Naphthalen Dioxygenase vergleichbare oder leicht verbesserte Aktivität (bis ~ 130 %) erzielt werden. Varianten, die basierend auf dem Sequenzmotiv NWK-x(**3**)-[ED]-[NQ]-x(**3**)-[DE]-x-Y-H²⁰¹ (s. Kapitel 3.1.3) generiert wurden, zeigten dabei die stärksten Effekte.

Der erste variable Abschnitt (x(3)) wurde mit A197F, P198A und der Doppelvariante A197F_P198A untersucht, wobei eine 10-20 %ige Steigerung der Aktivität erreicht werden konnte.

Der nächste variable Abschnitt (x(3)) enthält die Positionen 202-204. Hierbei konnte für die Position F202 eine starke Reduktion der Aktivität in den *in vitro* Versuchen festgestellt werden. Phenylalanin stellt in der Tasche der NDO eine zentrale Aminosäure dar, durch deren Austausch bereits ein Regioshift in der

Dihydroxylierung von aromatischen Substraten beobachtet werden konnte.¹⁸⁵ Die Varianten an Position V203 mit den Aminosäuren Cystein bzw. Alanin, zeigten eine deutliche Steigerung (bis zu 30 %) beim Umsatz von Styrol (**6**). Da sich die Position V203 in unmittelbarer Nachbarschaft zur, als Elektronenbrücke fungierenden, Asparaginsäure 205 befindet, könnte durch den Einsatz einer kleinen hydrophoben Aminosäure eine verbesserte Positionierung von D205 begünstigt werden. Der essentielle Einfluss der Position 205 auf den Elektronentransfer wurde von Parales *et al.* (1999) bereits beschrieben.¹⁷⁶ Weitere Substitutionen im Sequenzbereich um die Position D205 in dieser Arbeit verdeutlichen die Sensibilität dieser Region. Die Aktivität wurde vor allem dann stark erniedrigt, wenn bestehende Aminosäuren gegen größere Aminosäuren ausgetauscht wurden (z. B. G204V/L).

Am Ende des Motivs befindet sich eine weitere variable Region x mit der Position 206. Dabei konnte der Austausch des vorhandenen Alanins gegen ein Glycin die Aktivität um ~ 20 % steigern. Der Einfluss der Position 206 wurde auch in anderen Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen untersucht, wobei ebenfalls der Ansatz über einen Sequenzvergleich gewählt wurde. Durch Aminosäureaustausche an der korrespondierenden Position konnte eine deutliche Erweiterung des Substratspektrums, sowie die generelle Beibehaltung bzw. Steigerung der Aktivität beobachtet werden.¹⁸⁹ Gally und Kollegen konnten in Untersuchungen der Cumol Dioxygenase (CDO) zeigen, dass der Austausch des Methionins an der entsprechenden Position 206 (CDO: M232) gegen ein Alanin den Umsatz des sterisch anspruchsvollen (+)- α -Pinens zum korrespondierenden Diol ermöglichte. Jedoch scheinen noch weitere Strukturmerkmale bzw. Positionen in der aktiven Tasche für den erweiterten Substratraum verantwortlich zu sein, da die Untersuchung der strukturell und sequenzell ähnlichen Benzol Dioxygenase (BDO)¹⁴ mit der entsprechenden Punktvariante BDO_M220A keine Erweiterung des Substratraumes zur Folge hatte.

Abschließend kann für die *in vitro* Untersuchungen eine positive Bilanz gezogen werden. Im Rahmen der Optimierung des *in vitro* Systems konnte durch die Umsetzung mit unterschiedlichen Verhältnissen an Oxygenase und Redoxpartnern die Redoxkette als wichtige Stellschraube für die Aktivität identifiziert werden. Der

¹⁴ Sequenzidentität: 64 % mit Cumol Dioxygenase; 32 % mit Naphthalen Dioxygenase

für die Erhöhung der Aktivität notwendige Überschuss an Ferredoxin und Reduktase lieferte neue Ansätze hinsichtlich des *protein engineering*s für die Generierung von stabileren Redoxvarianten oder der Entwicklung von Hybridsystemen.

Weiterhin besteht der Vorteil des entwickelten *in vitro* Systems darin, dass eine weitere Umsetzung der Produkte durch wirtseigene Enzyme unterbunden wird und zukünftig die Analyse von unbekanntem Substanzen erleichtert werden wird.

Außerdem konnten bereits im *in vitro* System relevante Mutagenese-Hotspots mit den Positionen A206, H295, L307, G204 und V260 identifiziert werden. Des Weiteren wurden bei der Untersuchung der Konsensusvarianten mit Styrol Positionen identifiziert, welche zu einer Aktivitätssteigerung führten. Die Kombination von Varianten in der aktiven Tasche mit entsprechenden Konsensussequenzvarianten könnte deshalb eine weitere Optimierungsmöglichkeit des Mehrkomponentensystems NDO darstellen.

4.2 Naphthalen Dioxygenase im *in vivo* System

Heterologe Expression der Naphthalen Dioxygenase

Im Rahmen der *in vivo* Experimente wurde zunächst die stabile, heterologe Expression des Multikomponentenkomplexes in *Escherichia coli* (*E. coli*) untersucht, da dies einen essentiellen Faktor für reproduzierbare Ergebnisse in Ganzzellumsätzen darstellt.

Die heterologe Expression von Oxygenasen stellt deshalb eine Herausforderung dar, weil nicht nur ganze Gencluster transkribiert und translatiert werden müssen, sondern auch eine geeignete Rate zwischen den unterschiedlichen Komponenten gefunden werden muss.^{243,244} Im Fall der untersuchten Naphthalen Dioxygenase (NDO) wurden eine Reihe von Optimierungsversuchen unternommen, um die Überexpression des Multikomponentensystems zu forcieren und dadurch im *in vivo* System einen Ansatz für einen photometrischen, quantifizierbaren Nachweis des Katalysators zu generieren.¹⁷⁶ Jedoch konnte trotz einer breit angelegten Palette an Parametern, welche von der Untersuchung von verschiedenen Vektoren über unterschiedliche *E. coli* Stämme, bis hin zur Kombination verschiedener Expressionsbedingungen reichte, keine sichtbare Expression des Multikomponentenkomplexes mittels SDS-PAGE erlangt werden. Jedoch können mit dem

in dieser Arbeit etablierten Expressionprotokoll hohe Produktausbeuten und eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden. Das Unvermögen die NDO in quantifizierbaren Mengen zu exprimieren scheint sich nicht auf die verwandten, *CDOlike/TDOlike* Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen zu erstrecken. So konnte beispielsweise die Biphenyl Dioxygenase (BPDO) in *E. coli* BL21(pLysS) überexprimiert und mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden.¹⁸⁸ Die Optimierung der Expression der BPDO wurde weiterhin von Que *et al.* (2013) untersucht, wobei neben der Expressionstemperatur und der Induktorkonzentration auch der Einfluss des Kulturmediums untersucht wurde.²⁴⁵ Wie auch in dieser Arbeit wurde die höchste Aktivität in Ganzzellumsätzen mit Zellen erreicht, welche bei tiefen Temperaturen (15-20 °C) exprimiert wurden. Des Weiteren konnte kein deutlicher Effekt durch die Variation der Induktorkonzentration festgestellt werden. Im Vergleich von Komplex- und Minimalmedium wirkte sich in den Untersuchungen von Que *et al.* (2013) der Einsatz des Minimalmediums positiv auf die Aktivität aus, in dieser Arbeit hingegen wurde das Komplexmedium als geeigneter identifiziert.

Grundsätzlich ist die heterologe Expression stark vom eingesetzten Expressionsorganismus abhängig und kann sich, besonders im Fall von oxidierenden Enzymen, negativ auf die Wirtsvitalität auswirken.²⁴⁶ So wurde bei der heterologen Überexpression einer Alkan Hydroxylase von *Pseudomonas putida* (*P. putida*) in *P. putida* und *E. coli* die Membranzusammensetzung und das Wachstum des Expressionswirts stark verändert bzw. beeinträchtigt.^{247,248} Des Weiteren spielen bei der heterologen Herstellung von Zielproteinen auch Faktoren wie *in vivo* Cofaktorrecycling, Substrataufnahme und Toxizität der Substrate eine große Rolle.²⁴⁹ So weisen unterschiedliche Expressionswirte eine hohe Varianz an verfügbarem Cofaktor in der Zelle auf. Der Gehalt an NADH bzw. NADPH nimmt von *Bacillus subtilis* über *E. coli* hin zu *P. putida* ab.²⁵⁰ Zu klären bleibt jedoch, in welchem Wirt, abzüglich der wirtzeigenen Zellmaschinerie, der höchste Gehalt an reduziertem Cofaktor verfügbar ist. Die Problematik der Cofaktorregeneration wurde in dieser Arbeit auf ein Minimum reduziert, da zum Einen mit ruhenden Zellen gearbeitet wurde und zum Anderen Glucose für die Aufrechterhaltung der Cofaktorregeneration bereit stand. Das so optimierte System scheint verglichen mit anderen Protokollen in der Literatur als geeignet für die heterologe Herstellung der NDO. So konnte in *in vivo* Untersuchungen mit der Punktvariante NDO_F224A ein

Umsatz von > 99 % des natürlichen Substrates Naphthalen (10 mM) innerhalb von 20 h erreicht werden, was der Wildtyp-Aktivität entspricht. Im Gegensatz dazu wurde von Seo *et al.* (2013) für dieselbe Variante lediglich ein Umsatz von 6,8 % für Naphthalen berichtet.²⁵¹

Dennoch bleibt zu überlegen, ob *E. coli* der geeignete Expressionsorganismus darstellt. *P. putida* weist eine höhere Toleranz gegenüber aromatischen Substraten auf, welche normalerweise toxisch für *E. coli* und andere Organismen sind.²⁵² Deshalb findet in vielen Untersuchungen die Trennung von Fermentation und Biotransformation statt, da sonst das Zellwachstum zu stark beeinflusst werden würde.²⁵² So konnte mit immobilisierten *P. putida*-Zellen die Toluol Dioxygenase heterolog exprimiert werden und rund 85 g/L enantiomerenreines Produkt bei der Umsetzung von Toluol zum korrespondierenden Produkt erzielt werden.²⁵³ Die hohe Ausbeute in Umsetzungen von aromatischen Substraten verdeutlicht den Optimierungsbedarf bei den Umsetzungen von Terpenen. So konnte mit einer heterolog exprimierten Toluol Dioxygenase in *P. putida* Limonen zu Perillaalkohol mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 0,2 g L⁻¹ h⁻¹ umgesetzt werden.²⁵⁴ Verglichen mit der Umsetzung von *R*-Limonen durch die Cumol Dioxygenase Variante CDO_M232A, welche heterolog in *E. coli* exprimiert wurde, konnte lediglich eine Raum-Zeit-Ausbeute von 0,04 g L⁻¹ h⁻¹ erreicht werden.²⁰¹ Dies entspricht einer um den Faktor fünf erniedrigten Raum-Zeit-Ausbeute. Neben der erhöhten Toleranz gegenüber den eingesetzten Substraten könnte sich *Pseudomonas* sp. auch aus evolutiven Gründen besser für die heterologe Expression eignen, da ein Großteil der charakterisierten ROs aus Pseudomonaden stammt.¹⁶⁶

Evolvierbarkeit der Naphthalen Dioxygenase

Die Naphthalen Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 weist eine enorme Vielfalt im Bereich der Reaktions- und Substratspezifität auf. So wurden neben Dihydroxylierungen und allylischen Monohydroxylierung auch Desaturierungen, Dealkylierungen, sowie Sulfoxidierungen beobachtet.¹⁴⁴ Des Weiteren sind bereits eine Vielzahl von Kristallstrukturen mit kokristallisierten Substraten publiziert, welche die produktive Koordination des Substrates eindrucksvoll verdeutlichen (s. Abbildung 4.1).

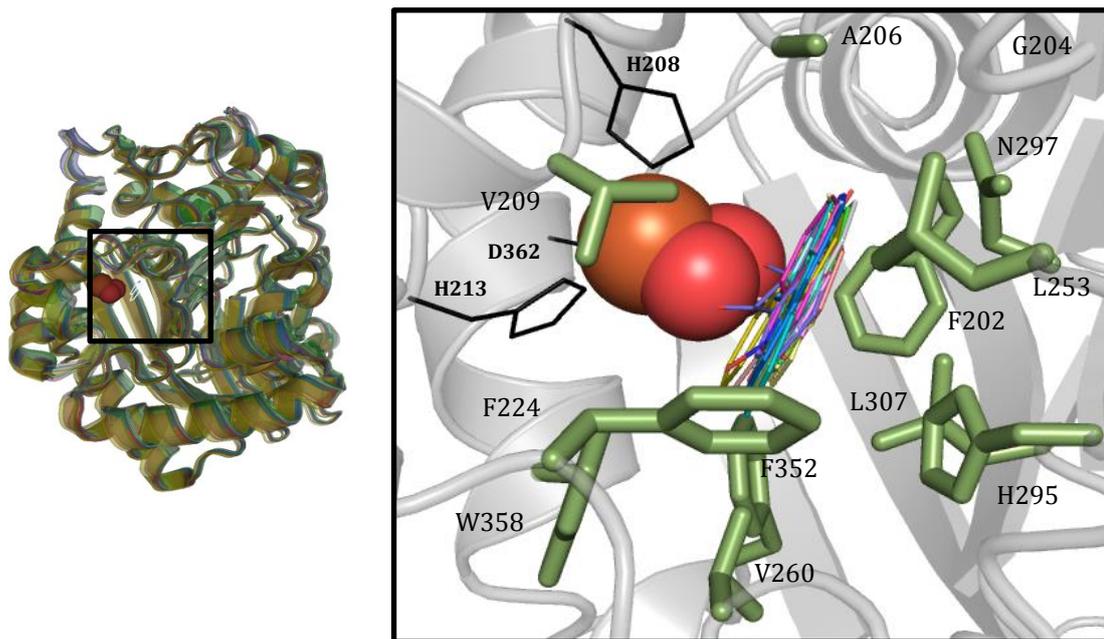


Abbildung 4.1: Überlagerung von 19 Kristallstrukturen der Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (PDB code: 1EG9, 1O7G, 1O7M, 1O7N, 1O7P, 2HMK, 2HMN, 2HMO, 4HJL, 4HKV, 4HM0, 4HM1, 4HM2, 4HM3, 4HM4, 4HM5, 4HM6, 4HM7, 4HM8; *first shell* Aminosäuren in *sticks*, His-Asp-Triade in *lines*, Sauerstoff in rot und Eisen in orange)

Unabhängig vom katalysierten Reaktionstyp befindet sich das Substrat in allen Kristallstrukturen in derselben Koordinationsebene, wodurch auf einen hohen Konservierungsgrad der produktiven Konformation geschlossen werden kann.²⁵⁵ Neben der Sterik wurde auch der Einfluss der Elektronik von verschiedenen Substraten untersucht, wobei von Kerridge und Kollegen festgestellt werden konnte, dass viel mehr sterische als elektronische Einflüsse für eine erfolgreiche Katalyse entscheidend sind.²⁵⁶ Ein weiteres Indiz für die Relevanz der Größe der Tasche liefern die Untersuchungen von Ferraro *et al.* (2006) mit der Kristallisation der Punktvariante NDO_F352V (PDB code: 2HMN) und dem kokristallisierten Substrat Anthracen.²⁵⁷ Durch den Austausch des Phenylalanins gegen ein Valin konnte z. B. das Substrat Phenanthren tiefer in der Tasche platziert werden, wodurch ein Regioshift bei der Dihydroxylierung von 3,4- zu 1,2-*cis*-Phenanthrendihydrodiol zu beobachten war. Auch der Austausch eines Methionins zu einem Alanin in der Cumol Dioxygenase (CDO) Variante CDO_M232A lieferte statt der beim CDO_{wt} beobachteten Ringdihydroxylierung (~ 70 %) die Dihydroxylierung an der Vinylgruppe des untersuchten Substrats Styrol.¹⁸⁹ Im Zuge einer Sättigung der Position 232 wurde der vorherrschende Einfluss der Sterik weiter verdeutlicht, da mit der kleineren Aminosäure Glycin die größte Regioselektivität erzeugt wurde. In

der vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren auch der Effekt von kleinen Substratmodifikation hinsichtlich der Stereoselektivität beobachtet werden. Durch das Vorhanden sein einer zusätzlichen Methylgruppe wurde beispielsweise die Stereoselektivität invertiert. So wurde bei der Umsetzung von Styrol (**6**) das *R*-Enantiomer gebildet, bei der Umsetzung von α -Methylstyrol (**7**) trat hingegen eine erhöhte Enantioselektivität für das *S*-Enantiomer auf.

Grundsätzlich weisen Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen eine ähnliche Topologie der aktiven Tasche auf, weshalb die Vermutung naheliegt, dass Aminosäureaustausche basierend auf artverwandten Enzymen, welche die gewünschte Eigenschaft beherbergen, zu der Übertragung der gewünschten Funktion führen können. Für eine weitere Betrachtung der Übertragbarkeit von Reaktivitäten unterschiedlicher Dioxygenasen ist in Tabelle 4.1 sowohl die Konsensussequenz der drei prominentesten Familien in der aktiven Tasche dargestellt, als auch die Konsensussequenz der einzelnen Familien 107MA (*NDOlike*), 1ULIC (*BDO/TDOlike*) und 3GZXA (*CDOlike*).

Tabelle 4.1: Konsensussequenz von sieben relevanten *first shell* Aminosäuren basierend auf der 3DM Datenbank*

NDO- Sequenz	Konsensus- Sequenz	107MA NDOlike	1ULIC BDO/TDOlike	3GZXA CDOlike
202	F	F	F	F
206	M	A	G	M
224	-	F	-	-
260	-	-	-	-
295	A	H	A	G
307	L	L	L	L
352	F	F	F	F

* basierend auf 8100 Dioxygenase-Sequenzen

Ein Beispiel für die erfolgreiche Übertragung einer spezifischen Reaktivität stellt die CDO Punktvariante CDO_M232A dar. Hierbei konnte bei der Umsetzung von Styrol durch den Austausch des Methionins (*CDOlike*) gegen ein Alanin (A206, *NDOlike*) die Substituentenspezifität der NDO auf die CDO übertragen werden. Die Übertragung der Reaktivität ist jedoch nicht immer gegeben, wie die Studie von Yu *et al.* (2001) zeigte.²³³ Hierbei wurde durch den Austausch von korrespondierenden Aminosäuren

nur eine bedingte Übertragbarkeit der Reaktions- und Substratspezifität der 2-Nitrotoluol Dioxygenase auf die NDO beobachtet.²³³

Die Konsensussequenz sowie die sechs in dieser Arbeit identifizierten Aminosäure-Hotspots in der NDO werden im Folgenden bezüglich ihres Einflusses auf die Regioselektivität, Reaktionsspezifität, Stereoselektivität und Aktivität diskutiert (s. Abbildung 4.2).

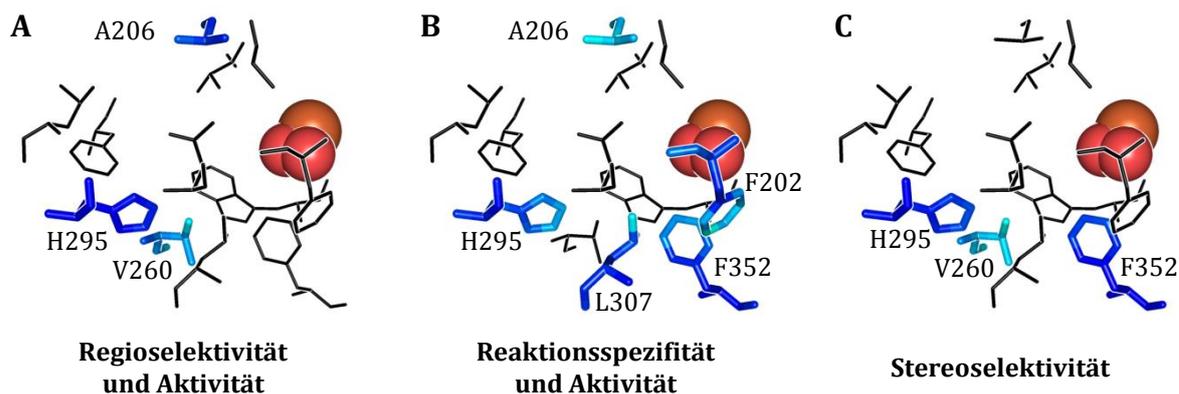


Abbildung 4.2: *First shell* Aminosäuren der aktiven Tasche der Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4; (A) Positionen, welche die Regioselektivität und Aktivität beeinflussen, (B) Positionen, welche die Reaktionsspezifität und Aktivität beeinflussen, (C) Positionen, welche die Stereoselektivität beeinflussen (PDB code: 107N; *first shell* Aminosäuren in Lines, jeweils wichtige Aminosäuren in Sticks, Sauerstoff in rot und Eisen in orange)

Aus der Konsensussequenz in Tabelle 4.1 der *first shell* Aminosäuren wird deutlich, dass die Positionen 202, 307 und 352 über alle Familien hinweg hoch konserviert sind. Wirft man nun einen Blick auf die erhaltenen Ergebnisse für Mutationen an diesen Stellen, kann man sowohl Auswirkungen auf die Aktivität als auch auf die Selektivität beobachten.

Phenylalanin 202

Der Austausch des Phenylalanins 202 gegen eine kleinere hydrophobe Aminosäure führte bei Substraten mit gesättigten Substituenten zu einer Aktivitätssteigerung und zu einem Shift in der Reaktionsspezifität. So konnte bei der Umsetzung von 1-Phenylpentan (**4**) neben dem monohydroxylierten Hauptprodukt **4a** auch das Desaturierungsprodukt **4b** detektiert werden. Des Weiteren konnte bei der Umsetzung von Styrol (**6**) mit der Variante NDO_F202A sowohl eine Steigerung der Aktivität auf 85 % Umsatz als auch eine Steigerung der Stereoselektivität auf 87 %*ee* (*R*) beobachtet werden. Der Effekt der erhöhten Stereoselektivität wurde auch bei der Umsetzung von α -Methylstyrol (**7**) festgestellt, wobei die Stereoselektivität für

das Diol-Produkt 2-Phenylpropan-1,2-diol (**7b**) von 55 auf 80 %*ee* (*S*) angehoben wurde. Weiterhin zeigte die Alanin-Variante eine exzellente Selektivität bei der Umsetzung von *trans*- β -Methylstyrol (**8**) mit > 99 %*ee* (*S,S*) für 1-Phenylpropan-1,2-diol (**8b**). Die Methylgruppe in α -Methylstyrol (**7**) und *trans*- β -Methylstyrol (**8**) scheint hierbei einen entscheidenden Effekt auf die Stereoselektivität zu haben, da im Gegensatz zum (*R*)-Diol-Produkt des Styrols eine deutliche Präferenz für das *S*-Enantiomer festgestellt wurde. Hierbei scheinen der hohe Konservierungsgrad der produktiven Konformationsebene (s. Abbildung 4.1) und daher die Geometrie der aktiven Tasche bzw. die Sterik des Substrats ein wichtiges Indiz für die zu erwartende Selektivität zu sein. Weiterhin konnte durch die Adressierung der konservierten Position 202 verdeutlicht werden, dass gerade konservierte Positionen einen entscheidenden Einfluss auf Reaktivität und Selektivität haben, ohne einen sofortigen Aktivitätsverlust nach sich zu ziehen. Allerdings zeigten Untersuchungen von Parales *et al.* (2001) auch, dass sich der Konservierungsgrad einer Position auf die Akzeptanz gegenüber Aminosäureaustauschen auswirken kann, indem beispielsweise für die Punktvariante NDO_F202L keine Aktivität beobachtet werden konnte.¹⁶² Obwohl durch den Aminosäureaustausch an Position 202 mehr Platz in der aktiven Tasche geschaffen wurde, konnte die Umsetzung von größeren Substraten wie 4-Allylanisol (**10**) oder *R*-Limonen (**12**) mit Varianten an der Position F202 nicht beobachtet werden.

Phenylalanin 352

Mit der Adressierung der ebenfalls konservierten Position F352 wurde ein starker Einfluss auf die Stereoselektivität festgestellt, welcher mit einer Reduktion in der Aktivität einherging. In nahezu allen Umsetzungen wurde die Wiederherstellung der Wildtyp-Aktivität mit Zunahme der Größe der ausgetauschten Aminosäure (Ala, Val, Ile) beobachtet, weshalb auf einen stabilisierenden Effekt des Phenylalanins geschlossen wurde. Hierfür sind vermutlich π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Motiven der Substrate und des Phenylalanins verantwortlich. Des Weiteren können die beobachteten Shifts in der Stereoselektivität auch auf sterischen Effekten basieren, da der Austausch des Phenylalanins Platz für eine Drehung des Substrates schaffen könnte. So wurde bei der Umsetzung von Ethylbenzol (**3**) mit NDO_F352V nahezu eine Inversion der Stereoselektivität von

98 %*ee* (*R*) hin zu 42 %*ee* (*S*) für 1-Phenylethanol (**3a**) beobachtet. Des Weiteren stellten Parales *et al.* (2000) den Einfluss der Position 352 auf die Regioselektivität fest, wobei im Fall der Umsetzung von Phenylbenzol mit der Variante NDO_F352V ein Shift von *cis*-Biphenyl-2,3-dihydrodiol hin zu *cis*-Biphenyl-3,4-dihydrodiol detektiert wurde.¹⁸⁵

Durch die Eliminierung von Phenylalanin in der aktiven Tasche (F202, F352) wurde der dirigierende Einfluss der aromatischen Aminosäure im Bezug auf Selektivität und Reaktivität verdeutlicht. Für nicht-aromatische Substrate scheint diese Steuerung nicht zutreffend zu sein, da weder ein aktivitäts- noch selektivitätssteigernder Effekt durch den Austausch des Phenylalanins bei Umsetzungen des Monoterpens *R*-Limonen zu beobachten war.

Leucin 307

Die Adressierung der Position 307, welche basierend auf der Konsensussequenz ebenfalls als konserviert angesehen werden kann, führte zu deutlichen Aktivitätseinbußen bei der Umsetzung von nicht-natürlichen Substraten wie Ethylbenzol (**3**), Styrol (**6**) und Allylbenzol (**9**). Wurden die Austausche von Alanin und Valin in den meisten Fällen unter hohem Aktivitätsverlust noch akzeptiert, so wurde bei der Substitution des Leucins durch ein Isoleucin ein vollständiger Aktivitätsverlust beobachtet. Die Umsetzung des natürlichen Substrates war bei den Punktvarianten NDO_L307A und NDO_L307V nahezu vollständig, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Koordination des aromatischen Moleküls weiterhin gegeben ist. Im Gegensatz dazu wurde bei der Umsetzung von nicht-natürlichen Substraten eine deutliche Reduktion der Aktivität beobachtet, wenn Leucin gegen kleinere Aminosäuren ausgetauscht wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Position L307 einen wichtigen Beitrag zur Steuerung der Substratspezifität liefert. Ein weiterer Hinweis hierfür stellt die Umsetzung von *tert*-Butylbenzol (**5**) dar. Basierend auf massenspektrometrischen Daten scheint die Variante NDO_L307A in der Lage zu sein das entsprechende Dihydrodiol-Produkt zu katalysieren und ist somit als einzige Variante in der Lage, das sterisch anspruchsvolle Substrat *tert*-Butylbenzol für die Katalyse koordinieren zu können.

Des Weiteren haben auch die variablen Positionen 206, 295 und 260 Einfluss auf die Katalyse der unterschiedlichen Aromaten gezeigt. Hierbei wurden bei der *in silico*

Analyse mittels 3DM unterschiedliche Konservierungsgrade festgestellt. Die Positionen 206 und 295 weisen einen Konservierungsgrad von 30 bzw. 19 % auf, wohingegen die Position 260 auf einer flexiblen Loopstruktur sitzt und deshalb keine Konservierung aufweist.

Alanin 206

Die Position A206 zeigte in dieser Arbeit vor allem Einfluss auf die Aktivität und führte in den meisten Fällen zu einem Wildtyp-ähnlichen Umsatz des eingesetzten Substrates. Von den sechs identifizierten Positionen liegt diese Aminosäure als einzige gegenüber vom zentralen β -Faltblatt der α -Untereinheit und nimmt die Rolle einer Stellschraube in der aktiven Tasche ein. Diese Beobachtung wird durch den Einfluss der korrespondierenden Position 232 in der Cumol Dioxygenase am Regioshift des Substrats Styrol mit dem Aminosäureaustausch von Methionin gegen Alanin verdeutlicht.¹⁸⁹

Histidin 295

Auch die Substitution des Histidins an Position 295 wirkte sich häufig aktivitätssteigernd aus. Bei der Umsetzung des Monoterpens *R*-Limonen (**12**) konnte beispielsweise die Regioselektivität beeinflusst werden und ein Regioshift von Mentha-1,8-dien-10-ol (**12b**) hin zu Carveol (**12a**) beobachtet werden. Mit den Einzelvarianten NDO_H295A/V/I konnte für die Substrate **2**, **3**, **6**, und **12** eine Aktivitätssteigerung von bis zu 40 % gegenüber dem Wildtyp der NDO beobachtet werden. In Untersuchungen von Yu *et al.* (2001) wurde bei Doppel- und Dreifachvarianten, bei welchen auch die Position H295 adressiert wurde, ebenfalls eine Änderung der Regioselektivität beobachtet.²³³ In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch die Doppelvariante A206I_H295I bestätigt, mit welcher die Reaktionsspezifität von 77 % für das monohydroxylierte 1-Phenylethanol (**3a**) auf ~ 90 % **3a** erhöht werden konnte. Im Fall der Einzelvariante H295A wurde bei der Umsetzung von *R*-Limonen (**12**) nahezu eine Inversion der Produktverteilung erreicht, wobei statt des Alkohols Mentha-1,8-dien-10-ol (**12b**) fast ausschließlich Carveol (**12a**) produziert wurde. Die Wichtigkeit der Position 295 in Verbindung mit N297 wird ebenfalls in den Untersuchungen zur Umsetzung von flavanoiden Strukturen deutlich.¹⁵⁸ Hierbei wurde die Stabilisierung des Übergangszustandes durch die Wasser-vermittelte Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen

zwischen der Carbonylfunktion des Flavons und den Positionen H295/N297 mittels *in silico* Analysen beobachtet. Da die Koordination des Wassermoleküls zwischen dem Substrat und den *first shell* Aminosäuren für die Katalyse wichtig erscheint und die Kavität keine Drehung des Substrates zulässt, argumentieren die Autoren, dass deshalb Isolavon erst nach Öffnung des Substratzuganges (NDO_F224Y) umgesetzt werden konnte.²⁵¹ Ob die Position N297 tatsächlich für die Stabilisierung notwendig ist, bleibt unklar, da der Austausch des Asparagins N297 in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Katalyse von Naphthalen (**1**) und Styrol (**6**) gezeigt hat, jedoch bei der Umsetzungen von aromatischen Substraten mit größeren Substituenten bzw. nicht-aromatischen Substraten stets ein deutlicher Aktivitätseinbruch zu beobachten war.

Valin 260

Als weitere Stellschraube für Aktivität und Selektivität konnte die Position V260 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um eine Aminosäure, die strukturell nicht konserviert ist, da sie in einer variablen Loopregion lokalisiert ist. Bei der Umsetzung von gesättigten Substituenten konnte vor allem bei sterisch anspruchsvollen Substraten wie 1-Phenylpentan (**4**) und bei der Umsetzung von des Monoterpens *R*-Limonen (**12**) eine Öffnung des Substratraumes erreicht werden. Des Weiteren wurde im Fall von Styrol (**6**) eine Aktivitätssteigerung gegenüber dem Wildtyp festgestellt. Der Einfluss auf die Stereoselektivität wird am Beispiel der Punktvariante NDO_V260G für die Umsetzung von α -Methylstyrol (**7**) weiter verdeutlicht, indem die Stereoselektivität für das Diol-Produkt (**7b**) auf 87 %*ee* (*S*) angehoben werden konnte. Der Einfluss auf Aktivität und Selektivität der Position 260 wurde neben der Position F202 bereits bei der Dihydroxylierung von Phenylbenzol beobachtet.¹⁸⁵

Des Weiteren wird in der Literatur die Position F224 als eine einflussreiche Position für die produktive Koordination von größeren Substraten postuliert. Ebenfalls auf einer flexiblen, nicht konservierten Loopstruktur lokalisiert, handelt es sich bei der Position 224 um eine nicht konservierte Aminosäure (s. Tabelle 4.1). So konnten Seo und Kollegen durch die Substitution des Phenylalanins gegen Tyrosin die Umsetzung von (*2S*)-Flavanon beobachten.²⁵¹

Grundsätzlich beobachteten Carredano und Kollegen (2000) bei der Untersuchung von Indol die große Relevanz von Aminosäuren mit aromatischem Charakter (F224,

F202, F352, W358 und H295).²⁵⁸ In dieser Arbeit wurde bei der Untersuchung der aromatischen Substrate **0-11** jedoch kein eindeutig positiver Effekt auf die Aktivität oder Selektivität im Fall des Phenylalanins 224 bzw. Tryptophans 358 festgestellt. Trotz einer Vergrößerung der Kavität konnte der Substratraum nicht auf sterisch anspruchsvollere Terpengeometrien erweitert werden. Jedoch beschrieben Seo *et al.* (2013) die Position 224 als eine wichtige Kontrollfunktion am Eingang der aktiven Tasche, wodurch der erfolgreiche Umsatz von flavanoiden Strukturen mit der Punktvariante F224Y begründet wurde.

In Abbildung 4.3 werden für die Katalyse wichtige Aminosäurepositionen (F202, A206, V260, H295, L307, F352) bezüglich ihrer Effekte auf Regioselektivität (I), Reaktionsspezifität (II), Stereoselektivität (III) und Aktivität (IV) auf das untersuchte Substratpanel dargestellt.

	I	II	III	IV
		F202 H295 A206	F202 F352	F202 V260 H295 A206
		F202 F352 A206 L307	V260 F352	V260 H295 A206
		F202 H295	F352 H295	A206
		A206 L307	L307	H295 A206 L307
	V260 H295 A206			V260 H295 A206

Abbildung 4.3: Einflüsse der generierten Punktvarianten der NDO auf die Regioselektivität (I), Reaktionsspezifität (II), Stereoselektivität (III) und Aktivität (IV) auf das untersuchte Substratpanel

Die Umsetzung von aromatischen Molekülen mit unterschiedlich großen Alkylresten wurde vor allem durch den Aminosäureaustausch von A206 beeinflusst. Des Weiteren zeigten vor allem die Positionen 202 und 352 mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin deutlichen Auswirkungen auf die Reaktionsspezifität und

Aktivität, wobei sehr wahrscheinlich durch den Wegfall der π - π -Wechselwirkungen mehrere Variationsmöglichkeiten für eine produktive Koordination der Substrate ermöglicht wurden. Außerdem trägt der Austausch des Phenylalanins zu einer Erweiterung der aktiven Tasche bei, welcher zumindest im Fall von planaren Molekülen zu einem Regioshift führte.¹⁸⁵

Die Aminosäureaustausche an der Position H295 lieferten ebenfalls Veränderungen im Bereich der Selektivität und Aktivität, wobei mit dem Austausch des Histidins eine Aminosäure mit potentiell geladener Seitenkette gegen ungeladene, hydrophobe Aminosäuren ausgetauscht wurde. Histidin kann durch den Imidazol-Rest innerhalb des physiologischen pH-Bereiches seine Ladung wechseln, da der pK_a -Wert der Imidazol-Gruppe von 6,0 entsprechend bei pH 6,0 zu 50 % protoniert vorliegt bzw. bei einem pH-Wert von pH 8,0 neutral ist. Des Weiteren weisen verwandte Dioxygenasen an dieser Position bereits kleine hydrophobe Aminosäuren wie Alanin oder Glycin auf.

Im Fall der Position 260 kann keine Aussage über das Substitutionmuster in der Dioxygenase-Familie gemacht werden, da es sich hierbei um eine variable Position in einem Loop am Eingang der aktiven Tasche (A, AS 253-263) handelt (s. Abbildung 4.4).

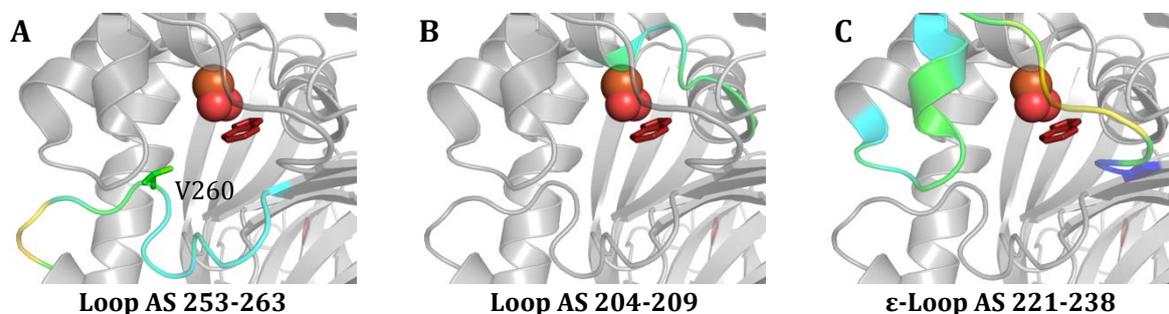


Abbildung 4.4: Variable Loopbereiche in der aktiven Tasche der Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (PDB code: 1O7N; Koloration der Loopbereiche nach B-Faktor; Sauerstoff in rot und Eisen in orange)

Grundsätzlich kann die Flexibilität der Loops (A-C) in der aktiven Tasche der NDO basierend auf den B-Faktoren der Kristallstruktur eingeschätzt werden. Neben dem N- und C-Terminus sind flexible Loopstrukturen die beweglichsten Regionen bei der Kristallisation eines Proteins. In den meisten Fällen geht deshalb auch die Denaturierung des Proteins von hier aus. Neben der Beweglichkeit von peripheren Strukturelementen wie z. B. Oberflächenloops ist die Flexibilität der aktiven Tasche eine Voraussetzung für die Erniedrigung der Aktivierungsenergie und das

schnellere Ablaufen der katalysierten Reaktion essentiell.²⁵⁹ Des Weiteren wurden Konformationsänderungen bei der Bindung von Substraten oder spezifischen Liganden beobachtet. Aufgrunddessen stellen flexible Loopregionen interessante Startpunkt für die Mutagenese dar.²⁶⁰ So konnten Reich und Kollegen (2014) die Erhöhung der Thermostabilität der Enreduktase NCR von *Zymomonas mobilis* durch Variation von zwei Oberflächenloops erreichen.²⁶¹

Da sich bei den Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen vor allem sterisch anspruchsvolle Substrate als herausfordernd dargestellt haben, könnte auch der Ein- und Auslass dieser Substanzen sich als problematisch herausstellen. Eine vermeintlich weiteres Indiz für die Wichtigkeit von Loopbereichen in Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen und deren möglicher Einfluss auf den Substratraum kann anhand des Vergleichs der Kristallstrukturen von ND*o*like bzw. CD*o*like/TD*o*like α -Untereinheiten beobachtet werden (s. Abbildung 4.5).

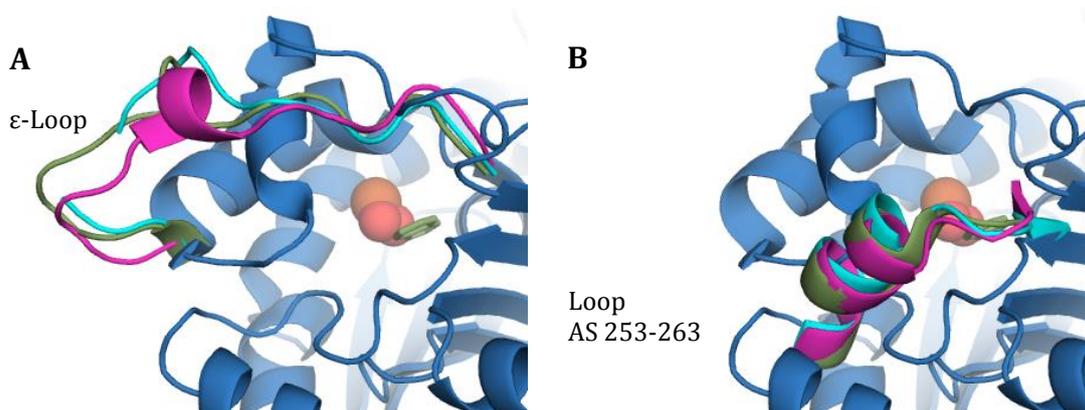


Abbildung 4.5: Variable Loopbereiche **A** und **B** in der aktive Tasche der Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (Blau; PDB code: 1O7N), Cumol Dioxygenase von *Pseudomonas fluorescens* IP01 (Pink; PDB code: 1WQL), Biphenyl Dioxygenase von *Burkholderia xenoverans* LB400 (Oliv; PDB code: 2XR8) und Toluol Dioxygenase von *Pseudomonas putida* ML2 (Türkis; PDB code: 3EN1)(Sauerstoff in rot und Eisen in orange; Indol in Sticks)

So können CD*o*like¹⁸⁹ und TD*o*like Dioxygenasen²⁶² bereits Monoterpene mit guten Ausbeuten umsetzen, ND*o*like Dioxygenasen scheinen hierbei durch ihre unterschiedlichen Loopmorphologien in der Substratgeometrie limitiert zu sein.

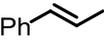
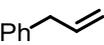
4.3 Bewertung der Osmium-katalysierten Sharpless Dihydroxylierung versus der Dihydroxylierung mittels Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen

Die osmium-katalysierte Sharpless Dihydroxylierung stellt derzeit die am häufigsten verwendete Methode zur Herstellung von *cis*-1,2-Diolen dar. Der rein chemische Weg soll hierbei mit der Dihydroxylierung durch Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs) verglichen werden, um zu sehen, inwieweit die Biokatalysatoren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit entwickelt wurden und welches Potential noch ausgeschöpft werden kann.

Vor allem die große Toleranz der Metall-katalysierten Dihydroxylierung gegenüber einer Vielzahl von funktionellen Gruppen durch den Einsatz des AD-Mixes ist hervorzuheben. Wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 erläutert, können Alkene mittels Osmiumtetroxid mit hohen Ausbeuten und exzellenten Stereoselektivitäten umgesetzt werden. Neben der bereits gut untersuchten und erfolgreich durchführbaren Dihydroxylierung von mono-, *trans*-di-, *gem*-di- und trisubstituierten Olefinen stellt die stereoselektive Oxyfunktionalisierung von *cis*-disubstituierten aliphatischen, aromatischen und cyclischen Olefinen allerdings immer noch eine Herausforderung für die Sharpless Dihydroxylierung dar.⁴⁸ Des Weiteren zählen auch elektronendefiziente Alkene und allylische sowie homo-allylische Alkohole zu den anspruchsvolleren Edukten.²⁶³

Mit den ROs wurde bereits ein breite Palette an aromatischen Substraten (> 300) umgesetzt, wobei ihre Flexibilität im Bereich unterschiedlichster funktioneller Gruppen und Reaktionstypen unter Beweis gestellt wurde.¹⁴⁵ In dieser Arbeit wurde unter anderem die Selektivität von verschiedenen Punktvarianten gegenüber unterschiedlich substituierten Aromaten untersucht, wobei in Tabelle 4.2 einige Beispiele für Dihydroxylierungsreaktionen mittels Osmiumtetroxid und ROs im Vergleich dargestellt sind.

Tabelle 4.2: Vergleich von Ausbeuten und Stereoselektivitäten bei der Umsetzung von aromatischen Substraten mit ungesättigten Seitenketten (**6-9**) mittels Osmiumtetroxid und Naphthalen Dioxygenase Varianten

Substrat	Sharpless Dihydroxylierung			Naphthalen Dioxygenase*		
	Ausbeute [%]	ee [%]	Ref.	theo. Ausbeute [%]	ee [%]	Variante
	> 80	97	²⁶⁴	92 85	79 (<i>R</i>) 87 (<i>R</i>)	H295A F202A
	90	94	²⁶⁴	37	88 (<i>S</i>)	V260G
	95	84-95	²⁶⁵	22	95 (<i>S,S</i>)	F202V
	80	n. d.	²⁶⁶	49	96 (<i>R</i>)	V260G

* Punktvarianten in dieser Arbeit generiert

Aus Tabelle 4.2 wird deutlich, dass für die Umsetzung von monosubstituierten Olefinen wie Styrol (**6**) gute Ausbeuten und exzellente Stereoselektivitäten mittels Osmiumtetroxid erreicht werden können. Mit dem α - bzw. β -AD-Mix wurden mit 97 %*ee* sehr hohe Stereoselektivitäten erreicht, wobei durch den Austausch des chiralen Liganden sowohl das *S*- als auch das *R*-Enantiomer gewonnen werden konnte. Auch bei der Umsetzung von Styrol (**6**) mit Punktvarianten der NDO konnten hohe Ausbeuten und moderate bis hohe Stereoselektivitäten von bis zu 87 %*ee* (*R*) erreicht werden.

Mit α -Methylstyrol (**7**) wurde ein *gem*-di-substituierter Aromat untersucht, wobei das Substitutionsmuster keinen Einfluss auf die Katalyse mittels Osmiumtetroxid zeigte, jedoch die Ausbeute der RO-katalysierten Reaktion durch die Bildung des allylischen Alkohols 3-Hydroxyphenylpropen (**7a**) beeinträchtigt wurde. Trotz exzellenter Stereoselektivitäten von 88 %*ee* (*S*) sank die Ausbeute deshalb auf ~ 37 %. Diese Beispiele verdeutlichen die Robustheit der Sharpless Dihydroxylierung gegenüber unterschiedlichen Substituenten, da die Ausbeute nicht durch Nebenaktivitäten erniedrigt wird.

Im Fall von *trans*-di-substituierten Aromaten konnte mit der Punktvariante NDO_F202V ein exzellenter Enantiomerenüberschuss von 95 %*ee* (*S,S*) 1-Phenylpropan-1,2-diol (**8b**) erreicht werden, wobei die Ausbeute auf 22 % sank. Im Gegensatz dazu wurden mittels Sharpless AD-Mix sowohl exzellente Ausbeuten als auch Stereoselektivitäten erreicht.

Bei der Umsetzung von Allylbenzol (**9**), einem Aromaten mit isolierter Doppelbindung, wurden für beiden Katalysatoren gute Ausbeuten beobachtet. Im Fall der Punktvariante NDO_V260G konnten des Weiteren exzellente Stereoselektivitäten von 96 %*ee* (*R*) detektiert werden.

Mit dem von Sharpless entwickelten AD-Mix lässt sich eine breite Palette von Olefinen stereo- und regioselektiv dihydroxylieren. Des Weiteren können mit der rein chemisch Variante hohe Ausbeuten erreicht werden. Jedoch kann bei der Entwicklung des AD-Mixes auf fast 25 Jahre Ligandenforschung zurückgeblickt werden, weshalb die in Tabelle 4.2 gezeigten Ausbeuten und Selektivitäten als optimierte Reaktionen angesehen werden können.

Mit der Untersuchung der Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen wurden für die Dihydroxylierung von Olefinen noch größtenteils unerforschte Biokatalystoren für diese Problemstellung untersucht. Diese Enzyme werden vor allem im Bereich der Aromaten-Dihydroxylierung eingesetzt, worin sich die effiziente und wirkungsvolle Katalysemaschinerie dieser Enzyme widerspiegelt. Neben der Adressierung des stabilsten Motivs in der organischen Chemie können sie hierbei auch regioselektive Katalyse am Ring durchführen. Mittels *protein engineering* wurde nun die Grundlage für eine Weiterentwicklung dieser vielversprechenden Enzyme für die selektive asymmetrische Dihydroxylierung gelegt.

5 Resümee und Ausblick

Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen (ROs) stellen durch ihre hohe Reaktionsvielfalt und ihren flexiblen Substratraum vielversprechende Biokatalysatoren für die Anwendung als Produzenten von Pharmabausteinen und Agrochemikalien dar.^{132,144,173,267}

In dieser Arbeit wurde sowohl ein *in vitro* als auch ein *in vivo* System dieser Mehrkomponentenkomplexe etabliert, wodurch eine weitere Optimierung für entsprechende Zielanwendungen ermöglicht wird. Die Ergebnisse der *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen lieferten vergleichbare Effekte für die getesteten Varianten, weshalb die Analyse von unbekanntem Zielmolekülen ohne den komplexen Zellhintergrund mittels des *in vitro* Systems ermöglicht wird. Des Weiteren konnten im Rahmen der systematischen Analyse der aktiven Tasche der Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 sechs *Hotspot*-Positionen identifiziert werden, welche Auswirkungen auf die Reaktionsspezifität, Regio- und Stereoselektivität gezeigt haben. Die Untersuchung einer diversen Substratpanels führte zu folgenden generellen Beobachtungen: (1) Erweiterung des Alkylsubstituenten in Gegenwart eines Aromaten erniedrigt die Aktivität, (2) Verzweigung des Alkylsubstituenten führt zur Adressierung des aromatischen Systems, (3) Alkenylreste mit konjugierter C=C-Doppelbindung führen zu Diol-Produkten und werden gegenüber der Demethylierung einer Methoxygruppe in *para*-Stellung bevorzugt, (4) *gem*-di-substituierte Alkenylreste führen zu einer Mischung aus mono- und dihydroxylierten Produkten, (5) *trans*-di-substituierte Alkenylreste werden bevorzugt monohydroxyliert und (6) isolierte C=C-Doppelbindungen in Alkenylresten resultieren in Diol-Produkten, wenn keine Methoxygruppe in *para*-Stellung für die Demethylierung vorhanden ist.

Um das Potential der ROs noch weiter auszuschöpfen, werden im Folgenden Strategien vorgeschlagen, welche sich zum Einen auf das Substratspektrum und zum Anderen auf das *protein engineering* dieser Enzyme konzentrieren.

Substratspektrum

Im Rahmen von früheren Untersuchungen wurde die natürliche Reaktion der ROs, die Dihydroxylierung am aromatischen Ring, schon mit einer Vielzahl an

verschiedenen Substitutionen am Aromaten untersucht, wobei eine breite Akzeptanz gegenüber unterschiedlichsten Arenen gezeigt werden konnte.¹³¹ Da das biosynthetische Potential der generierten Dihydrodiolen bei Weitem noch nicht ausgeschöpft ist, wäre die Entwicklung von nachfolgenden Funktionalisierungsreaktionen oder von enzymatische Kaskaden ein interessanter Weg zu neuen Synthesebausteinen (s. Abbildung 1.1, I).

Des Weiteren stellt die Oxyfunktionalisierung von Olefinen ein interessantes Forschungsgebiet dar. Hierbei kann das Potential der ROs hinsichtlich ihres breiten Reaktionsraumes, welcher von Mono- bzw. Dihydroxylierungen über Sauerstoff-abhängige Desaturierungen bis hin zu Sulfoxidierungen reicht, noch weiter aufgespannt werden und neben der Adressierung einer aromatischen C=C-Doppelbindung die Katalyse von einfachen Olefinen forciert werden (s. Abbildung 1.1, II).

I) Modifikation von Dihydrodiolen¹³¹

II) Reduktion des natürlichen Motivs auf C-C-Doppelbindung

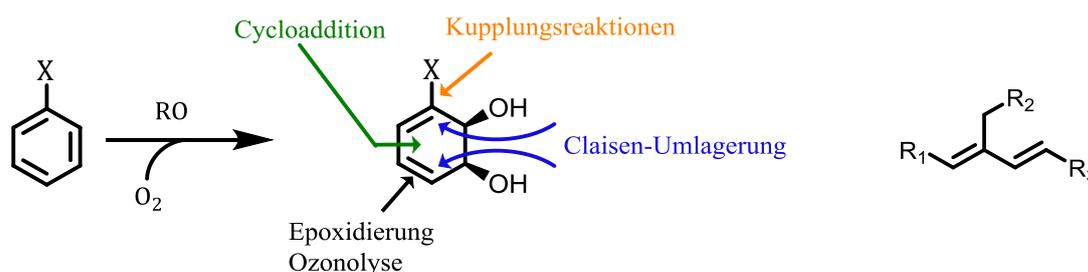


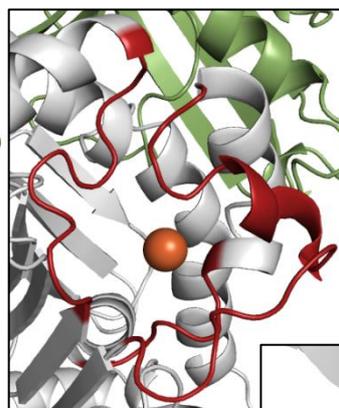
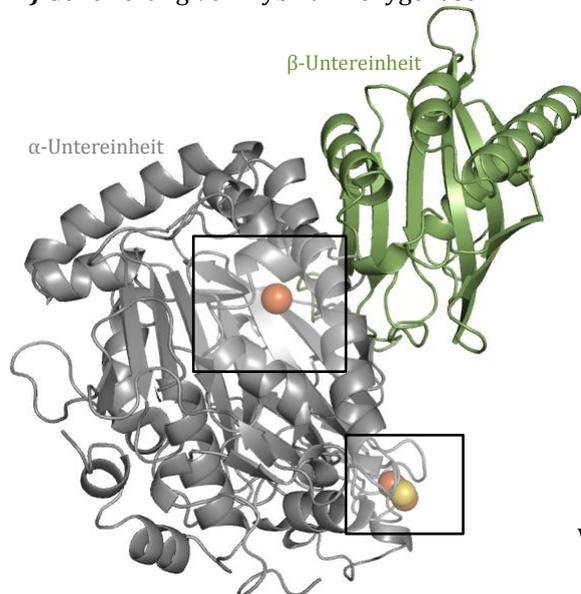
Abbildung 5.1: (I) Cycloaddition, Kupplungsreaktionen, Claisen-Umlagerung, Epoxidierung und Ozonolyse als Funktionalisierungsmöglichkeiten von aromatischen 1,2-Dihydrodiolen und (II) die Reduktion des aromatischen Motivs auf eine C=C-Doppelbindung

Die Multikomponentenkomplexe bieten durch ihre zahlreichen Bestandteile und den komplexen Mechanismus unterschiedlichste Angriffstellen für das *protein engineering*.

Zunächst ist die katalytisch aktive Komponente, die Dioxygenase selbst, ein offensichtlicher *engineering hotspot*. Hierbei eröffnet sich durch den heterodimeren Charakter der Dioxygenase die Möglichkeit zur Erstellung von Hybrid-Enzymen, wobei die α -Untereinheit mit einer β -Untereinheit einer verwandten RO kombiniert werden kann (s. Abbildung 5.2, III). Das Potential von Hybriden konnte bereits im Fall der Biphenyl Dioxygenase gezeigt werden, wobei sich die Spezifität der Hybrid-Dioxygenase zur Wildtyp-Spezifität unterschied.²⁶⁸ Des Weiteren bieten auch Strukturmerkmale wie flexible Loopregionen (Kontrolle des Substratzugangs/Produktfreigabe) und das Eisen-Schwefel-Cluster (Steuerung des

Redoxpotentials entlang der Elektronentransportkette) potentielle Stellschrauben für die Generierung von maßgeschneiderten Oxidationsenzymen (s. Abbildung 5.2, IV und V).

III) Generierung von Hybrid-Dioxygenasen



V) Redoxpotential und Kupplungseffizienz

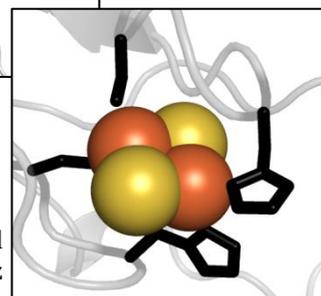


Abbildung 5.2: Potentielle Stellschrauben für das *protein engineering* in Rieske Nicht-Häm Dioxygenasen

Neben rationalen und semirationalen Design-Ansätzen erscheinen mit einem geeigneten Screening-System auch die Methoden der gerichteten Evolution (z. B. *DNA Shuffling*, *error prone PCR*) als vielversprechende Werkzeuge zur Optimierung dieser vielfältigen Biokatalysatoren.

6 Anhang

6.1 Gensequenz der bearbeiteten Enzyme

- Naphthalen Dioxygenase aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (**NDO**)
Das Gencluster *nahAcAdAbAd* der Naphthalen Dioxygenase ist unter der GenBank Nummer M83949.1 abrufbar.
- Cumol Dioxygenase aus *Pseudomonas fluorescens* IP01 (**CDO**)
Das Gencluster der Cumol Dioxygenase ist unter der GenBank Nummer D37828.1 verfügbar.
- Toluol Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* ML2 (**TDO**)
Das Gencluster *todC1C2BA* der Toluol Dioxygenase ist unter der GenBank Nummer AB828709.1 verfügbar.
- Benzol Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* ML2 (**BDO**)
Das Gencluster *bedC1C2BA* der Benzol Dioxygenase ist unter der GenBank Nummer AF148496.1 verfügbar.
- Biphenyl Dioxygenase aus *Burkholderia xenoverans* LB400 (**BPDO**)
Das Gencluster *bphA1A2A3A4* der Biphenyl Dioxygenase ist unter der GenBank Nummer CP000272.1 verfügbar.

6.2 Plasmide

Tabelle 6.1: Verzeichnis der Wildtyp-Plasmide

ITB-Nr.	Plasmidname	Insert	ITB-Nr.	Plasmidname	Insert
pITB1009	pDTG141	NDO Gencluster	pITB1420	pQE31_NahAcAd	His-getaggte NDO-Oxygenase
pITB1014	pJRM501	BDO Gencluster	-	pQE31_NahAb	His-getaggtetes NDO-Ferredoxin
pITB1419	pDTG601	TDO Gencluster	-	pQE31_NahAa	His-getaggte NDO-Reduktase
pITB1418	pT7-BPDO	BPDO Gencluster	pITB1423	pETDuet_NahAaAb	NDO-Ferredoxin und -Reduktase
pITB1011	pIP107D	CDO Gencluster	pITB1424	pCOLADuet_Nah AcAd	NDO-Oxygenase

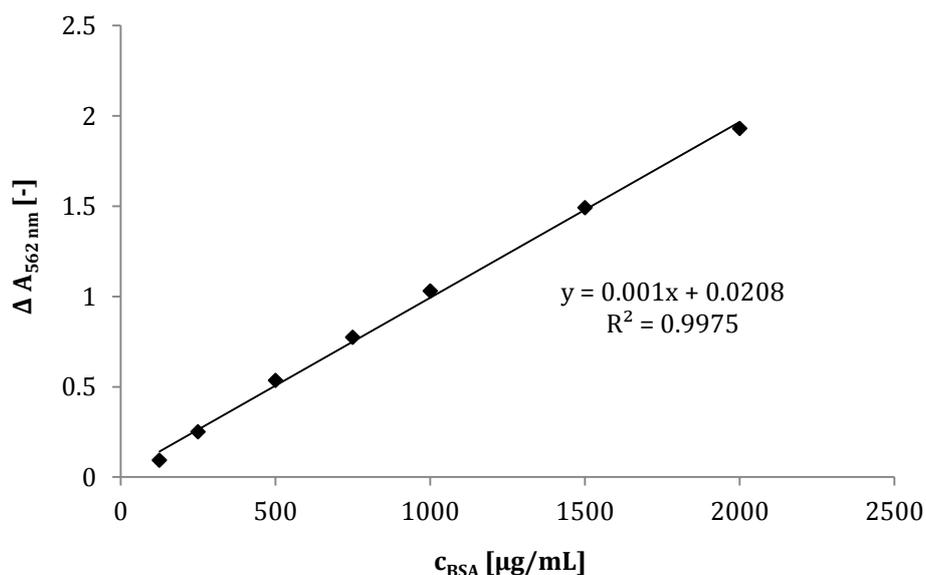
Tabelle 6.2: Verzeichnis der Einzelvarianten der Naphthalen Dioxygenase

ITB-Nr.	Plasmidname	Mutation	ITB-Nr.	Plasmidname	Mutation
pITB1462	pDTG141_F202A	F202A	pITB1425	pQE31_NDO_A197F	A197F
pITB1463	pDTG141_F202V	F202V	pITB1426	pQE31_NDO_P198A	P198A
pITB1464	pDTG141_F202I	F202I	pITB1427	pQE31_NDO_V203C	V203C
pITB1465	pDTG141_H295A	H295A	pITB1428	pQE31_NDO_V203A	V203A
pITB1466	pDTG141_H295V	H295V	pITB1429	pQE31_NDO_G204S	G204S
pITB1467	pDTG141_H295I	H295I	pITB1430	pQE31_NDO_L217I	L217I
pITB1468	pDTG141_N297A	N297A	pITB1431	pQE31_NDO_R218L	R218L
pITB1469	pDTG141_N297V	N297V	pITB1432	pQE31_NDO_S219A	S219A
pITB1470	pDTG141_N297I	N297I	pITB1433	pQE31_NDO_M242F	M242F
pITB1471	pDTG141_F352A	F352A	pITB1434	pQE31_NDO_T243R	T243R
pITB1472	pDTG141_F352V	F352V	pITB1435	pQE31_NDO_S244A	S244A
pITB1473	pDTG141_F352I	F352I	pITB1436	pQE31_NDO_S248H	S248H
pITB1474	pDTG141_A206G	A206G	pITB1437	pQE31_NDO_M250S	M250S
pITB1475	pDTG141_A206V	A206V	pITB1438	pQE31_NDO_L253F	L253F
pITB1476	pDTG141_A206I	A206I	pITB1439	pQE31_NDO_W254F	W254F
pITB1477	pDTG141_V209A	V209A	pITB1440	pQE31_NDO_N297H	N297H
pITB1478	pDTG141_V209G	V209G	pITB1441	pQE31_NDO_V300I	V300I
pITB1479	pDTG141_V209I	V209I	pITB1442	pQE31_NDO_C309G	C309G
pITB1480	pDTG141_L253A	L253A	pITB1443	pQE31_NDO_S310T	S310T
pITB1481	pDTG141_L253V	L253V	pITB1444	pQE31_NDO_K314R	K314R
pITB1482	pDTG141_L253I	L253I	pITB1445	pQE31_NDO_N317H	N317H
pITB1483	pDTG141_L307A	L307A	pITB1446	pQE31_NDO_S360Q	S360Q
pITB1484	pDTG141_L307V	L307V	pITB1447	pQE31_NDO_N363G	N363G
pITB1485	pDTG141_L307I	L307I	pITB1448	pQE31_NDO_D364E	D364E
pITB1486	pDTG141_G204A	G204A	pITB1449	pQE31_NDO_M366W	M366W
pITB1487	pDTG141_G204V	G204V	pITB1450	pQE31_NDO_F202G	F202G
pITB1488	pDTG141_G204I	G204I	pITB1451	pQE31_NDO_H295A	H295A
pITB1489	pDTG141_F224A	F224A	pITB1452	pQE31_NDO_N297V	N297V
pITB1490	pDTG141_F224V	F224V	pITB1453	pQE31_NDO_F352I	F352I
pITB1491	pDTG141_F224I	F224I	-	pQE31_NDO_A206G	A206G
pITB1492	pDTG141_V260A	V260A	pITB1455	pQE31_NDO_V209A	V209A
pITB1493	pDTG141_V260G	V260G	pITB1456	pQE31_NDO_L253A	L253A
pITB1494	pDTG141_V260I	V260I	pITB1457	pQE31_NDO_L307A	L307A
pITB1495	pDTG141_W358A	W358A	pITB1458	pQE31_NDO_G204A	G204A
pITB1496	pDTG141_W358V	W358V	pITB1459	pQE31_NDO_F224A	F224A
pITB1497	pDTG141_W358I	W358I	-	pQE31_NDO_V260A	V260A
			pITB1461	pQE31_NDO_W358A	W358A

Tabelle 6.3: Verzeichnis der Doppelvarianten der Naphthalen Dioxygenase

ITB-Nr.	Plasmidname	Mutation
pITB1498	pDTG141_V260A_H295A	V260A, H295A
pITB1499	pDTG141_V260A_H295V	V260A, H295V
pITB1500	pDTG141_V260A_H295I	V260A, H295I
pITB1501	pDTG141_V260G_H295A	V260G, H295A
pITB1502	pDTG141_V260G_H295V	V260G, H295V
pITB1503	pDTG141_V260G_H295I	V260G, H295I
pITB1504	pDTG141_V260I_H295A	V260I, H295A
pITB1505	pDTG141_V260I_H295V	V260I, H295V
pITB1506	pDTG141_V260I_H295I	V260I, H295I
pITB1507	pDTG141_A206G_H295A	A206G, H295A
pITB1508	pDTG141_A206G_H295V	A206G, H295V
pITB1509	pDTG141_A206G_H295I	A206G, H295I
pITB1510	pDTG141_A206G_V260A	A206G, V260A
pITB1511	pDTG141_A206G_V260G	A206G, V260G
pITB1512	pDTG141_A206G_V260I	A206G, V260I
pITB1513	pDTG141_A206V_H295A	A206V, H295A
pITB1514	pDTG141_A206V_H295V	A206V, H295V
pITB1515	pDTG141_A206V_H295I	A206V, H295I
pITB1516	pDTG141_A206V_V260A	A206V, V260A
pITB1517	pDTG141_A206V_V260G	A206V, V260G
pITB1518	pDTG141_A206V_V260I	A206V, V260I
pITB1519	pDTG141_A206I_H295A	A206I, H295A
pITB1520	pDTG141_A206I_H295V	A206I, H295V
pITB1521	pDTG141_A206I_H295I	A206I, H295I
pITB1522	pDTG141_A206I_V260A	A206I, V260A
pITB1523	pDTG141_A206I_V260G	A206I, V260G

6.3 Kalibriergeraden

**Abbildung 6.1:** Exemplarische Kalibriergerade zur Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bicinchoninsäure (BCA).

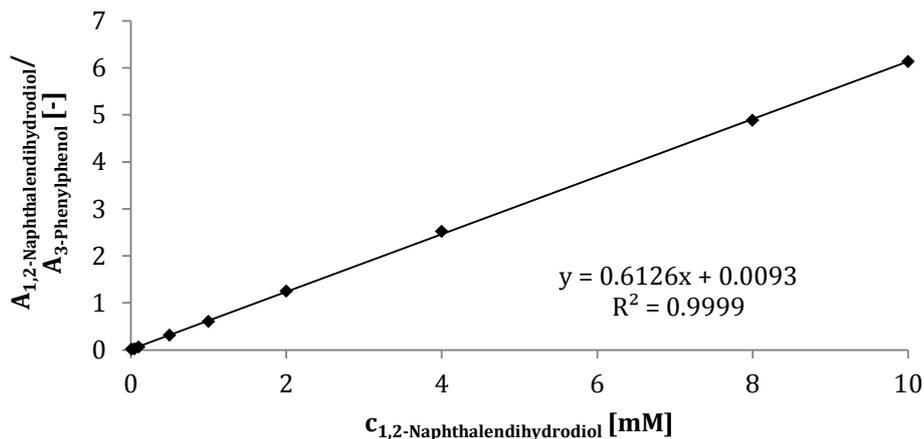


Abbildung 6.2: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von 1,2-Naphthalendihydrodiol (1a)

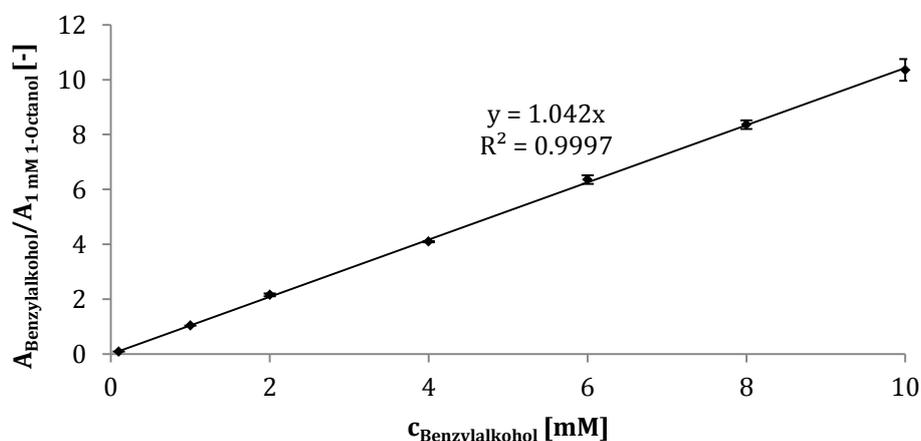


Abbildung 6.3: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von Benzylalkohol (2a)

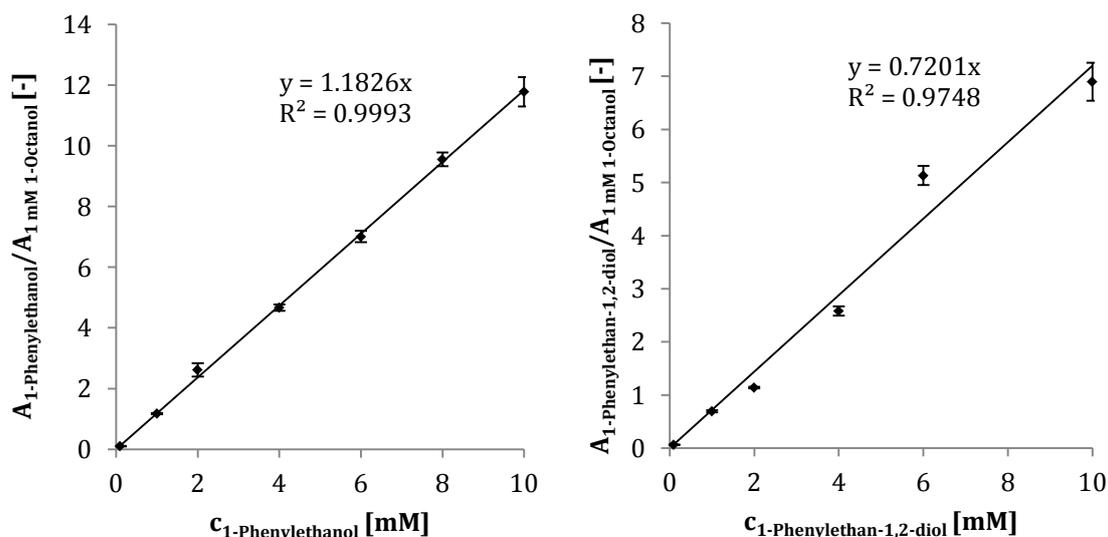


Abbildung 6.4: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von acetyliertem 1-Phenylethanol (3a) und acetyliertem 1-Phenylethan-1,2-diol (3b)

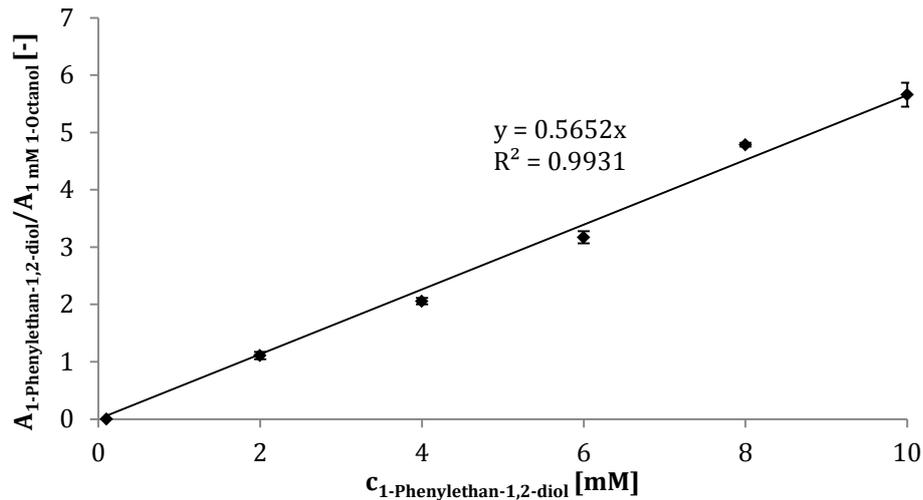


Abbildung 6.5: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von 1-Phenylethan-1,2-diol (6a)

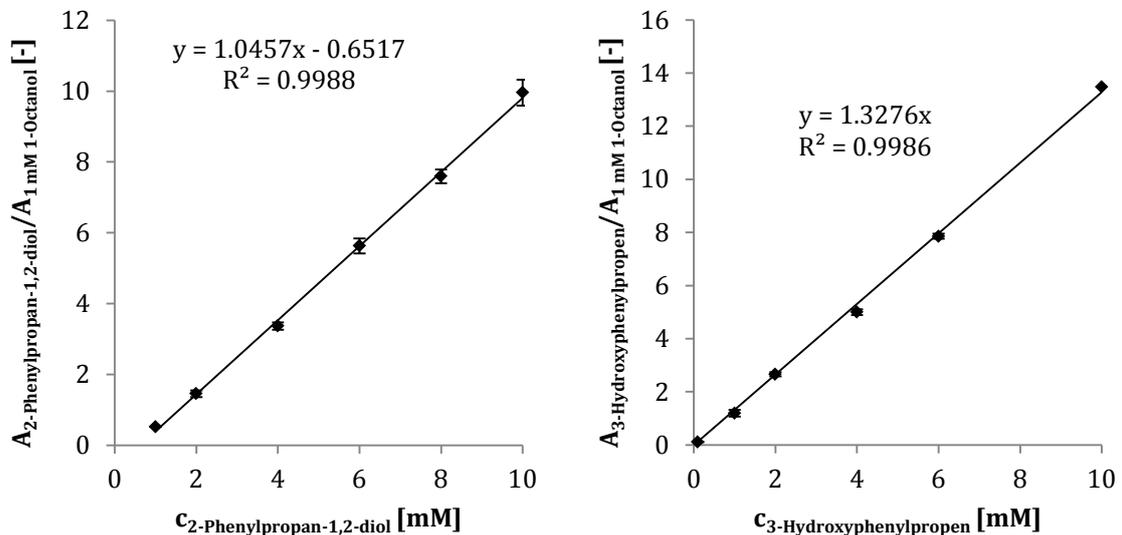


Abbildung 6.6: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von 2-Phenylpropan-1,2-diol (7b) und 3-Hydroxyphenylpropen (7a)

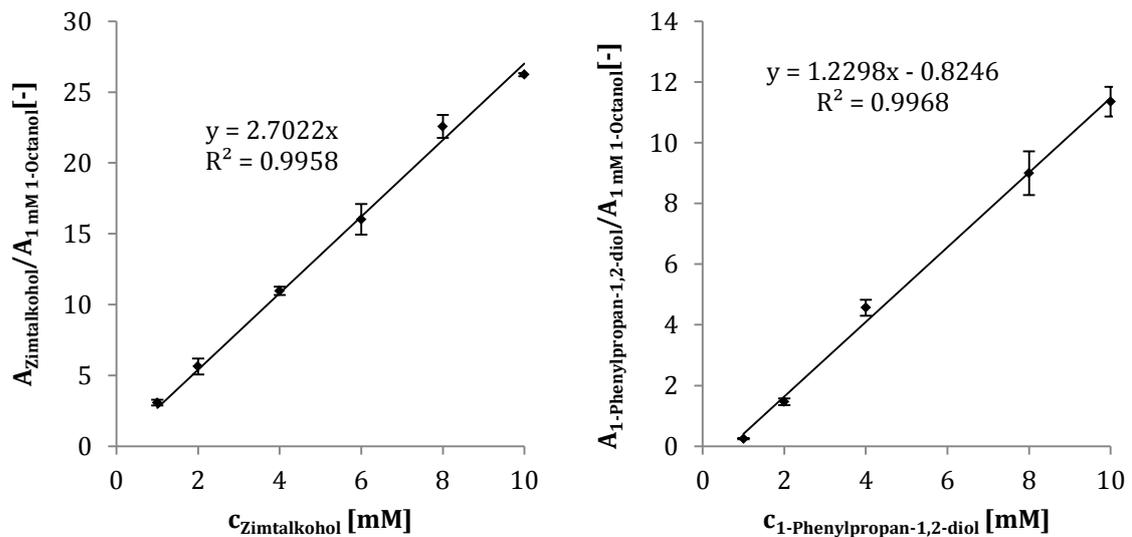


Abbildung 6.7: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von Zimtalkohol (8a) und 1-Phenylpropan-1,2-diol (8b)

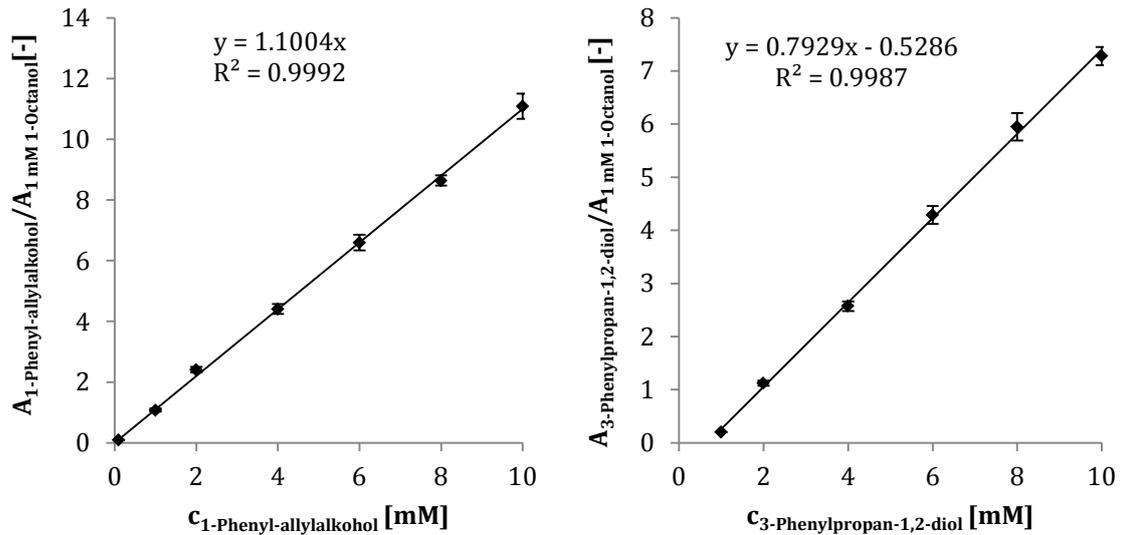


Abbildung 6.8: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von 1-Phenyl-allylalkohol (9a) und 3-Phenylpropan-1,2-diol (9b)

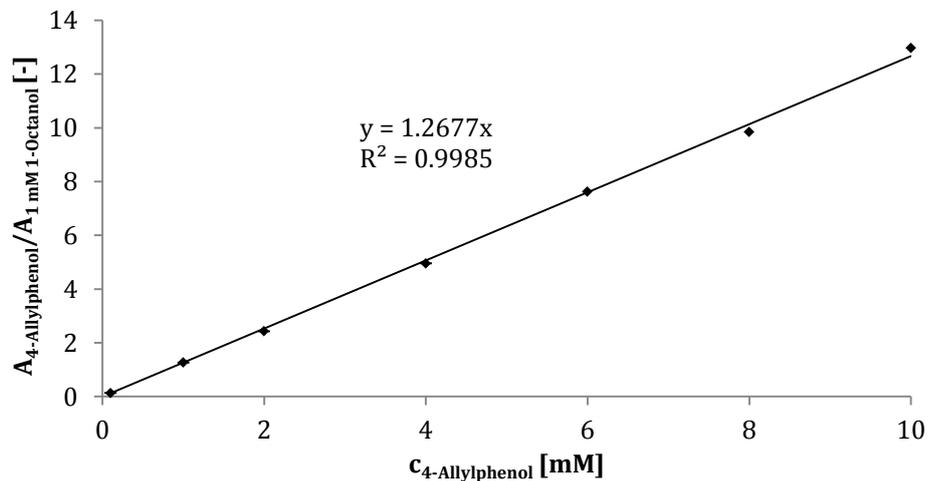


Abbildung 6.9: Kalibriergerade zur Bestimmung der molaren Konzentration von 4-Allylphenol (10a)

6.4 HPLC- und GC-Chromatogramme

6.4.1 Chirale NP-HPLC-Analytik

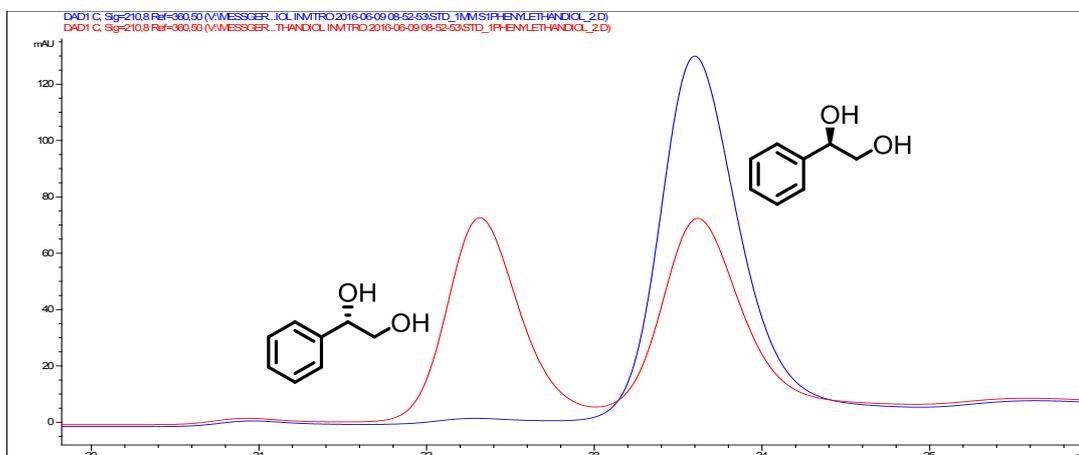


Abbildung 6.10: HPLC-Chromatogramm der chiralen NP-HPLC-Analytik von 1-Phenylethan-1,2-diol (**6a**) mit racemischem Standard (rot) und enantiomerenreinem *R*-1-Phenylethan-1,2-diol (blau)

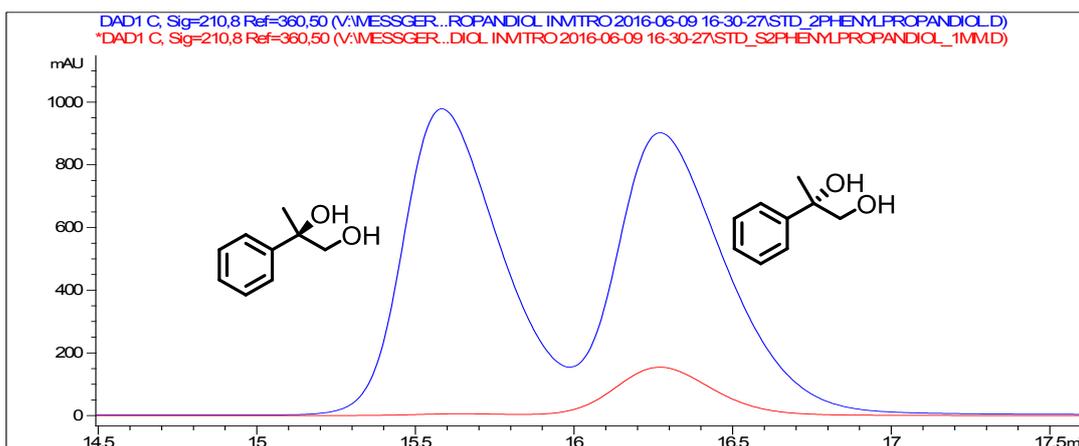


Abbildung 6.11: HPLC-Chromatogramm der chiralen NP-HPLC-Analytik von 2-Phenylpropan-1,2-diol (**7b**) mit racemischem Standard (blau) und enantiomerenreinem *S*-2-Phenylpropan-1,2-diol (rot)

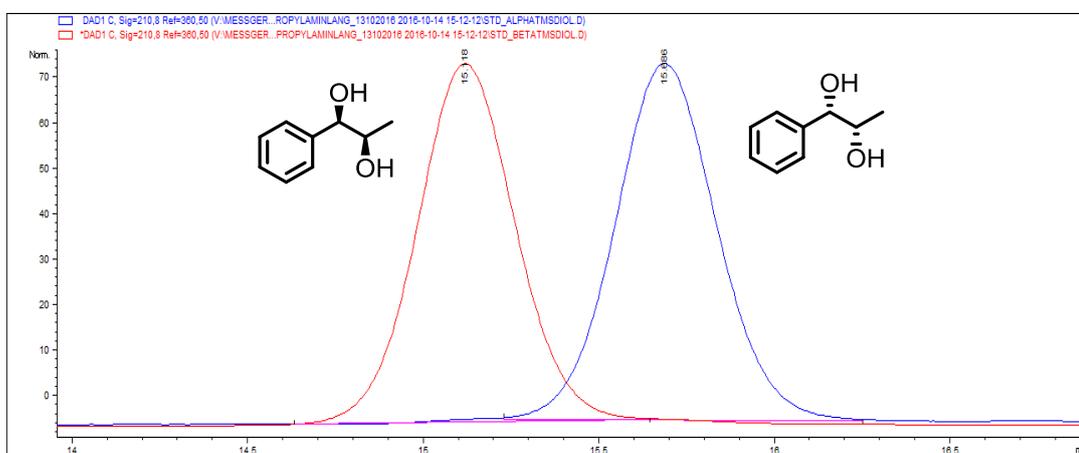


Abbildung 6.12: HPLC-Chromatogramm der chiralen NP-HPLC-Analytik von 1-Phenylpropan-1,2-diol (**8b**) mit (1*R*,2*R*)-1-Phenylpropan-1,2-diol (rot) und (1*S*,2*S*)-1-Phenylpropan-1,2-diol (rot)

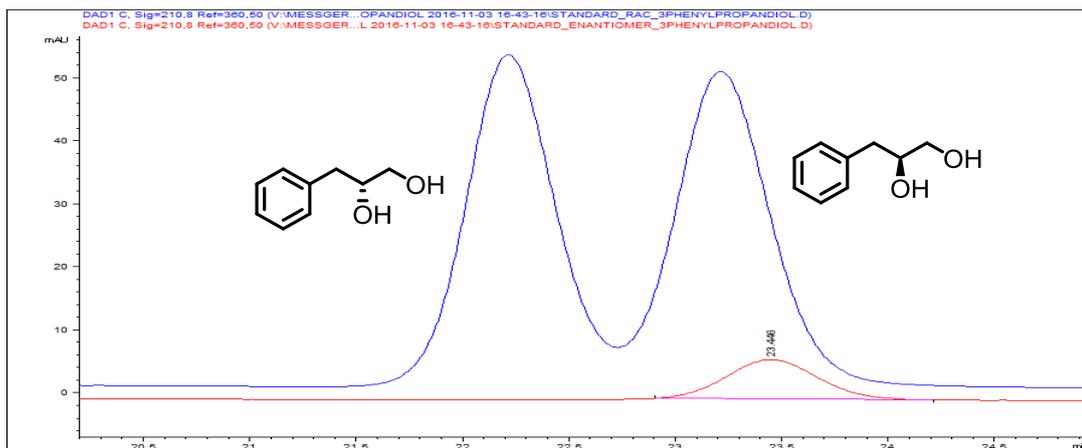


Abbildung 6.13: HPLC-Chromatogramm der chiralen NP-HPLC-Analytik von 3-Phenylpropan-1,2-diol (**9b**) mit racemischem Standard (blau) und enantiomerenreinem *S*-3-Phenylpropan-1,2-diol (rot)

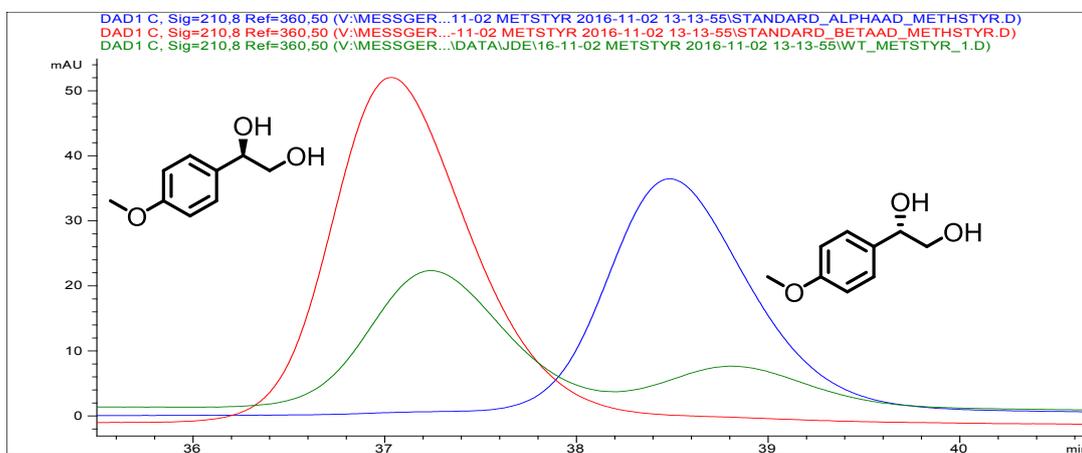


Abbildung 6.14: HPLC-Chromatogramm der chiralen NP-HPLC-Analytik von 1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol (**11b**) mit *R*-1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol (rot) und *S*-1-(4-Methoxyphenyl)ethan-1,2-diol (blau) (Grün: Biotransformation mit NDO_{WT})

6.4.2 Chirale und achirale GC-FID/MS-Analytik

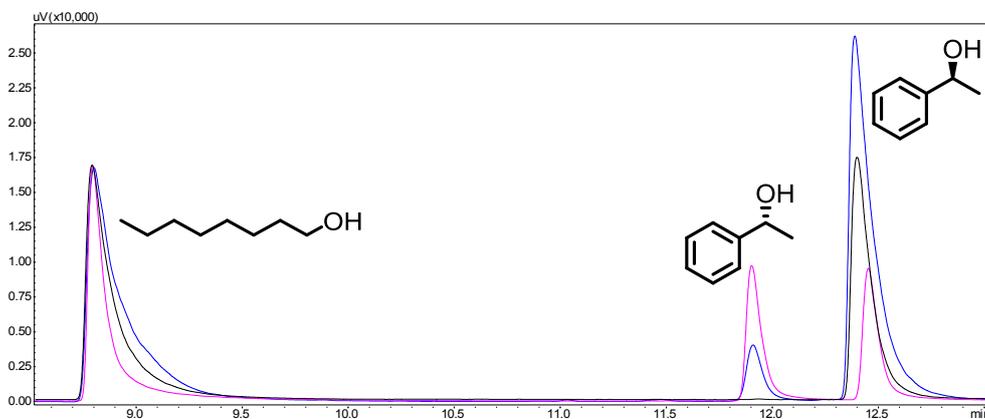


Abbildung 6.15: GC-Chromatogramm der chiralen GC-FID-Analytik von 1-Phenylethanol (**3a**) mit racemischem 1-Phenylethanol (pink), *S*-1-Phenylethanol (schwarz) und *in vivo* Biotransformation mit NDO_{F224A} (blau)

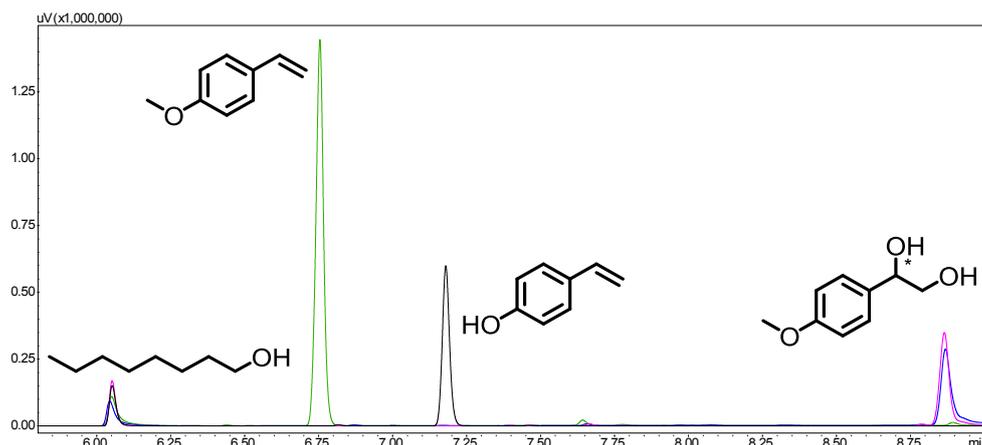


Abbildung 6.16: GC-Chromatogramm der achiralen GC-FID-Analytik von 4-Methoxystyrol (**11**) mit 4-Vinylphenol (**11a**, schwarz), (4-Methoxyphenyl)-ethan-1,2-diol (**11b**, blau), *in vivo* Biotransformation mit dem Leervektor pT7-7 (grün) und *in vivo* Biotransformation mit dem NDO_{WT} (pink)

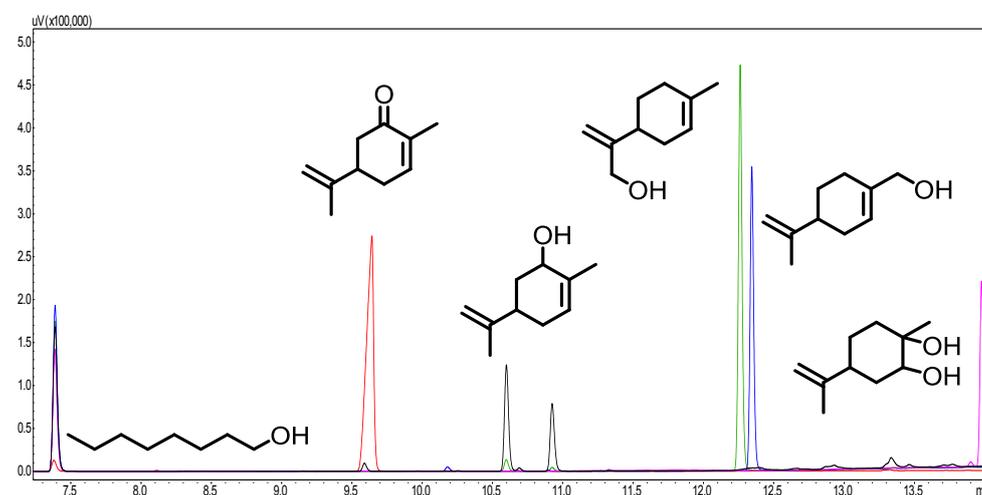


Abbildung 6.17: GC-Chromatogramm der achiralen GC-MS-Analytik von *R*-Limonen (**12**) mit den Standards Carveol (**12a**, schwarz), Mentha-1,8-dien-10-ol (**12b**, grün), Carvon (rot), Perillaalkohol (blau) und Limonen-1,2-diol (pink)

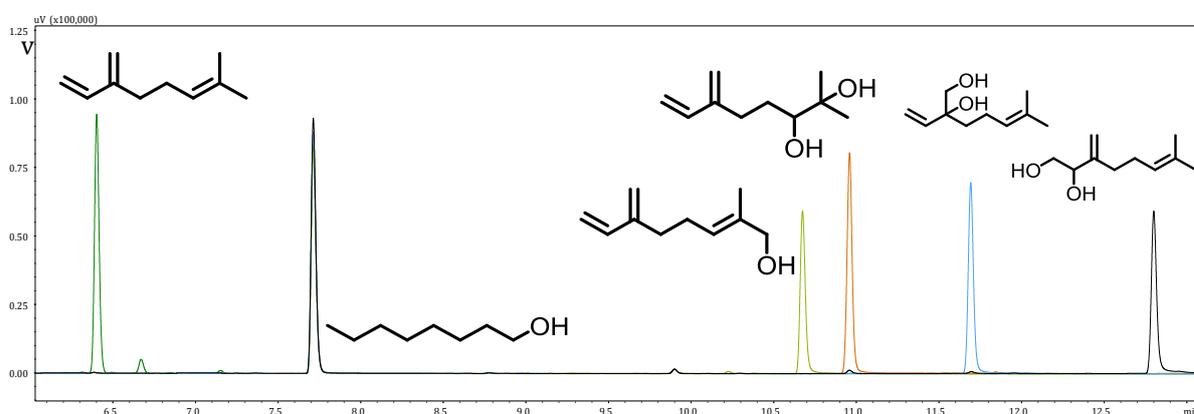


Abbildung 6.18: GC-Chromatogramm der achiralen GC-FID-Analytik von Myrcen (**14**, dunkelgrün) mit den Standards 2-Methyl-6-methylenocta-2,7-dien-1-ol (hellgrün), 2-Methyl-6-methylenoct-7-en-2,3-diol (braun), 3,10-Dihydroxymyrcen (blau) und 1,2-Dihydroxymyrcen (schwarz)

6.5 Nachweise via SDS-PAGE und Western Blot

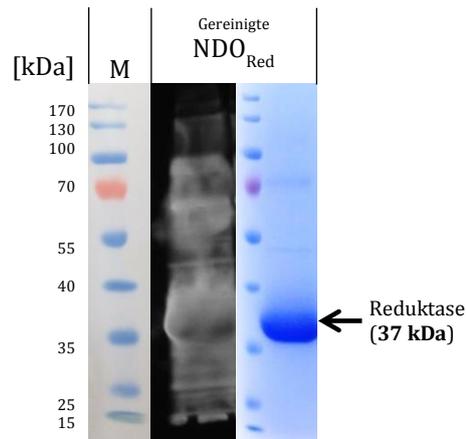


Abbildung 6.19: (Li.) Western Blot nach ECL-Nachweis der gereinigten Reduktase des Multikomponentenkomplexes NDO und (Re.) SDS-PAGE Gel der gereinigten Reduktase der NDO_{wt}

6.6 Umsetzung von Naphthalen und α -Methylstyrol mit Naphthalen Dioxygenase Wildtyp

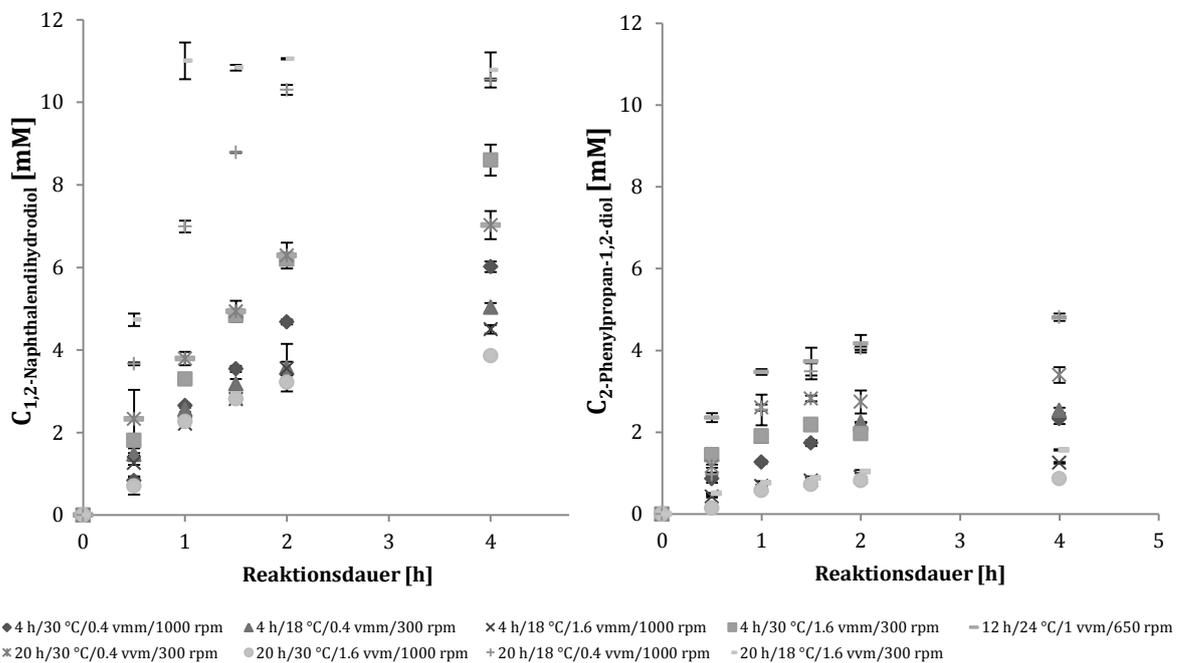


Abbildung 6.20: *In vivo* Biotransformation von 10 mM Naphthalen (1, links) bzw. α -Methylstyrol (7, rechts) zu den korrespondierenden Produkten mit dem Naphthalen Dioxygenase Wildtyp

6.7 Erweiterung der *in vivo* Bibliothek der Naphthalen Dioxygenase

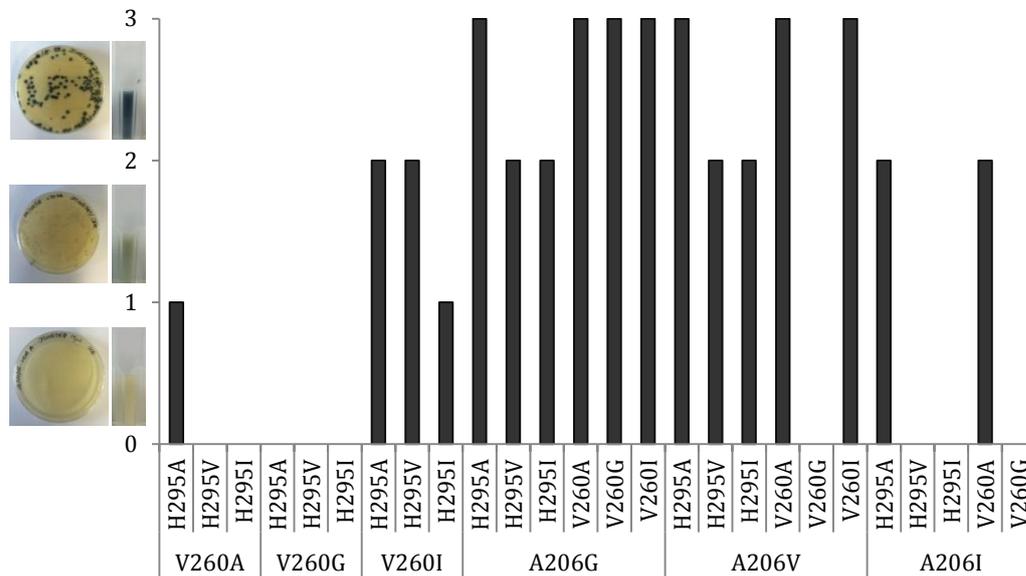


Abbildung 6.21: Indol-Assay der Doppelvarianten der NDO-Bibliothek mit 10 % (w/v) Indol

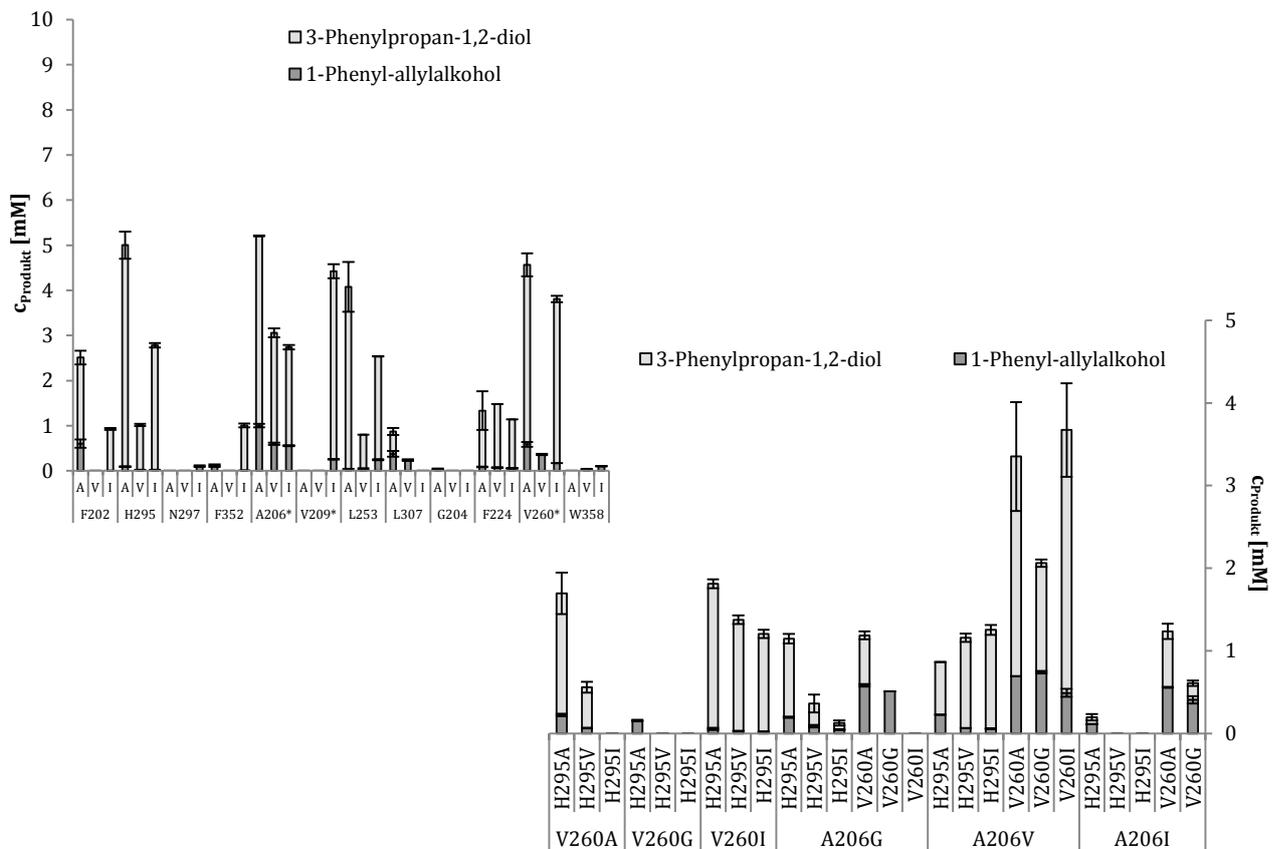


Abbildung 6.22: *In vivo* Biotransformation von 10 mM Allylbenzol (9) zu 1-Phenyl-allylalkohol (9a) und 3-Phenylpropan-1,2-diol (9b) NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h

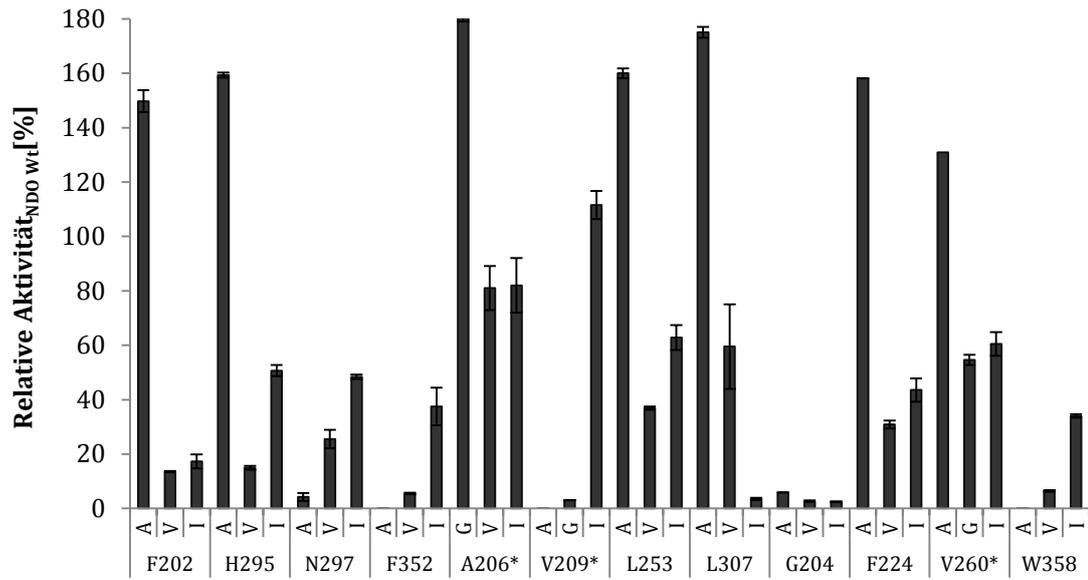


Abbildung 6.23: Relative Aktivität der *in vivo* Biotransformation von 10 mM 4-Methoxystyrol (**11**) mit der NDO-Bibliothek bei 30 °C für 20 h (*: Gly)

7 Literaturverzeichnis

- (1) Reetz, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12480–12496.
- (2) van Beilen, J. B.; Duetz, W. A.; Schmid, A.; Witholt, B. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21* (4), 170–177.
- (3) Wohlgemuth, R. *N. Biotechnol.* **2009**, *25* (4), 204–213.
- (4) Winder, C. L.; Cornmell, R.; Schuler, S.; Jarvis, R. M.; Stephens, G. M.; Goodacre, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (1), 387–401.
- (5) Holland, H. L.; Weber, H. K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (6), 547–553.
- (6) Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K.; Schallmey, A.; Bühler, B. *Green Chem.* **2011**, *13* (2), 226–265.
- (7) Holland, H. L. *Steroids* **1999**, *64* (3), 178–186.
- (8) Lochyński, S.; Kowalska, Katarzyna Wawrzeńczyk, C. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17* (3), 181–186.
- (9) Duetz, W. A.; Bouwmeester, H.; van Beilen, J. B.; Witholt, B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61* (4), 269–277.
- (10) Khatri, Y.; Girhard, M.; Romankiewicz, A.; Ringle, M.; Hannemann, F.; Urlacher, V. B.; Hutter, M. C.; Bernhardt, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88* (2), 485–495.
- (11) Bhowmick, K. C.; Joshi, N. N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17* (13), 1901–1929.
- (12) Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (12), 2024–2032.
- (13) Peters, M. W.; Meinhold, P.; Glieder, A.; Arnold, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (44), 13442–13450.
- (14) Hoffmann, S. M.; Weissenborn, M. J.; Gricman, Ł.; Notonier, S.; Pleiss, J.; Hauer, B. *ChemCatChem* **2016**, *8* (8), 1591–1597.
- (15) Suenaga, H.; Watanabe, T.; Sato, M.; Ngadiman; Furukawa, K. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (13), 3682–3688.
- (16) Hudlicky, T.; Luna, H.; Barbiera, G.; Kwart, L. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4735–4741.
- (17) Gibson, D. T.; Parales, R. E. *Environ. Biotechnol.* **2000**, *11* (11), 236–243.
- (18) Wackett, L. P.; Kwart, L. D.; Gibson, D. T. *Biochemistry* **1988**, *27* (4), 1360–1367.

- (19) Köhl, O. In *Organische Chemie: für Biochemiker, Lebenswissenschaftler, Mediziner, Pharmazeuten...*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2012; pp 1–10.
- (20) Frey, P. A. *Chem. Rev.* **1990**, *90* (7), 1343–1357.
- (21) Lewis, J. C.; Bergman, R. G.; Ellman, J. A. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (8), 1013–1025.
- (22) Punniyamurthy, T.; Velusamy, S.; Iqbal, J. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (6), 2329–2364.
- (23) Chang, D.; Zhang, J.; Witholt, B.; Li, Z. *Biocatal. Biotransformation* **2004**, *22* (2), 113–131.
- (24) Zaitsev, A. B.; Adolfsson, H. *Synthesis (Stuttg)*. **2006**, No. 11, 1725–1756.
- (25) Zhao, L.; Han, B.; Huang, Z.; Miller, M.; Huang, H.; Malashock, D. S.; Zhu, Z.; Milan, A.; Robertson, D. E.; Weiner, D. P.; Burk, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (36), 11156–11157.
- (26) Van Ornum, S. G.; Champeau, R. M.; Pariza, R. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (7), 2990–3001.
- (27) Halland, N.; Braunton, A.; Bachmann, S.; Marigo, M.; Jørgensen, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (15), 4790–4791.
- (28) Janssen, D. B.; Majerić-Elenkov, M.; Hasnaoui, G.; Hauer, B.; Lutje Spelberg, J. H. *Biochem. Soc. Trans.* **2006**, *34* (Pt 2), 291–295.
- (29) Keith, J. A.; Henry, P. M. *Angew. Chemie* **2009**, *121* (48), 9200–9212.
- (30) Xia, Q.-H.; Ge, H.-Q.; Ye, C.-P.; Liu, Z.-M.; Su, K.-X. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (5), 1603–1662.
- (31) Moitessier, N.; Henry, C.; Len, C.; Postelb, D.; Chapleura, Y. *J. Carbohydr. Chem.* **2003**, *22* (1), 25–34.
- (32) Ahrgren, L.; Sutin, L. *Org. Process Res. Dev.* **1997**, *1* (6), 425–427.
- (33) Wang, Z.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (26), 8302–8303.
- (34) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2483–2547.
- (35) Rubin, A. E.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36* (23), 2637–2640.
- (36) Schwarz, M.; Reiser, O. *Angew. Chemie* **2011**, *123* (45), 10679–10681.
- (37) Baerns, M.; Behr, A.; Brehm, A.; Gmehling, J.; Hinrichsen, K.-O.; Hofmann, H.;

- Onken, U.; Palkovits, R.; Renken, A. *Technische Chemie*, 2. Auflage.; WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2013; p. 581.
- (38) Tse, M. K.; Schröder, K.; Beller, M. In *Modern Oxidation Methods*; Bäckvall, J. E., Ed.; Wiley VCH: Weinheim, 2010; pp 1–36.
- (39) Rebsdatt, S.; Mayer, D. *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* **2012**, 547–572.
- (40) Wu, C. Y.; Kobylinski, T. P.; Bozik, J. E. Preparation of propylene glycol from propylene. US 4308409 A, December 29, 1981.
- (41) J, P. D. Preparation of ethylene glycol. US2770656 A, November 13, 1956.
- (42) Maerkl, R. D.; Harder, W. D. Verfahren zur Herstellung von Ethylenglykol. EP 0245771 A2, November 19, 1987.
- (43) Weiss, M.; Sun, S. Synthesis of hydroxylated hydrocarbons. US 20060229475 A1, October 12, 2006.
- (44) Tietz, W.; Schulze, J.; Boerner, A.; Shuklov, I.; Kuehlein, K. Production of optically pure propane-1,2-diol, US20140212957 A1, July 31, 2014.
- (45) Kakimoto, Y.; Oka, Y. Method for production of ethylene glycol, US 6417411 B2, July 9, 2002.
- (46) Weyler, W.; Dodge, T. C.; Lauff, J. J.; Wendt, D. J. Microbial production of indigo. US6190892 B1, November 20, 1995.
- (47) Steingruber, E. Indigo and Indigo Colorants in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- (48) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483–2547.
- (49) Lewis, S. E. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (22), 2821–2830.
- (50) Okano, K. *Tetrahedron* **2011**, *67* (14), 2483–2512.
- (51) Wink, D. J.; Kwok, T. J.; Yee, A. *Inorg. Chem.* **1990**, *29* (24), 5006–5008.
- (52) Crosby, J.; Stoddart, J. F.; Sun, X.; Venner, M. R. W. *Synthesis (Stuttg)*. **1993**, *1993* (1), 141–145.
- (53) Mash, E. A.; Torok, D. S. *J. Org. Chem.* **1989**, *54* (1), 250–253.
- (54) Taber, D. F.; Sikkander, M. I.; Storck, P. H. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (11), 4098.
- (55) Taber, D. F.; Neubert, T. D.; Rheingold, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (42), 12416–12417.
- (56) Buckland, B. C.; Drew, S. W.; Connors, N. C.; Chartrain, M. M.; Lee, C.; Salmon, P. M.; Gbewonyo, K.; Zhou, W.; Gailliot, P.; Singhvi, R.; Olewinski, R. C.; Sun, W.-J.;

- Reddy, J.; Zhang, J.; Jackey, B. A.; Taylor, C.; Goklen, K. E.; Junker, B.; Greasham, R. L. *Metab. Eng.* **1999**, *1* (1), 63–74.
- (57) Chartrain, M.; Jackey, B. A.; Heimbuch, B.; Taylor, C. S. Conversion of indene to (1S)-amino-(2R)-indanol free of any stereoisomer by combination of fermentation of *Rhodococcus* sp. ATCC 55805 and chemical steps. US 5871981 A, February 16, 1999.
- (58) Choudary, B. M.; Chowdari, N. S.; Madhi, S.; Kantam, M. L. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (5), 1736–1746.
- (59) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Kaik, M.; McIntyre, P. B. A.; Stevenson, P. J.; Allen, C. C. R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (14), 2774–2779.
- (60) Overwin, H.; González, M.; Méndez, V.; Cárdenas, F.; Seeger, M.; Hofer, B. *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *81*, 63–71.
- (61) Seo, J.; Kang, S.; Kim, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 219–228.
- (62) Shindo, K.; Kagiya, Y.; Nakamura, R.; Hara, A.; Ikenaga, H.; Furukawa, K.; Misawa, N. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *23* (1), 9–16.
- (63) Middleton Jr, E. In *Flavonoids in the Living System*; Springer, 1998; pp 175–182.
- (64) Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74* (4), 418–425.
- (65) Wang, X.; Wang, Z.; Sidhu, P. S.; Desai, U. R.; Zhou, Q. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0116409.
- (66) Kawai, M.; Hirano, T.; Higa, S.; Arimitsu, J.; Maruta, M.; Kuwahara, Y.; Ohkawara, T.; Hagihara, K.; Yamadori, T.; Shima, Y. *Allergol. Int.* **2007**, *56* (2), 113–123.
- (67) Uda, Y.; Price, K. R.; Williamson, G.; Rhodes, M. J. *Cancer Lett.* **1997**, *120* (2), 213–216.
- (68) Kagami, O.; Shindo, K.; Kyojima, A.; Takeda, K.; Ikenaga, H.; Furukawa, K.; Misawa, N. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *106* (2), 121–127.
- (69) Hollman, P. C. H.; Arts, I. C. W. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80* (7), 1081–1093.
- (70) Alam, M. A.; Subhan, N.; Rahman, M. M.; Uddin, S. J.; Reza, H. M.; Sarker, S. D. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* **2014**, *5* (4), 404–417.
- (71) Werle, P.; Morawietz, M.; Lundmark, S.; Sörensen, K.; Karvinen, E.; Lehtonen, J. Alcohols, polyhydric in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-

- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- (72) Kaebisch, G. D.; Malitius, H.; Raupach, S.; Truebe, R.; Wittmann, H. Verfahren zur Hydroxylierung von kürzerkettigen aliphatischen Mono- oder Diolefinen. DE2937840, April 2, 1981.
- (73) Michaelis, D. J. *Iron as a Powerful Catalysts for Transition Metal- Catalyzed Reactions*, 2010.
- (74) Bataille, C. J. R.; Donohoe, T. J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 114–128.
- (75) Beller, M.; Doebler, C.; Mehlretter, G. Preparation of 1,2-diols, used e.g. as a solvent or intermediate for polymers, agrochemicals, cosmetics and pharmaceuticals, by hydroxylation of an olefin in the presence of oxygen and an osmium, ruthenium or manganese compound. DE19920038 A1, October 26, 2000.
- (76) Hentges, S. G.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (12), 4263–4265.
- (77) Fieser, L. F.; Fieser, M. *Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley-Verlag: New York-London-Sidney, 1976, pp. 759-764.
- (78) Makowka, O. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1908**, *41* (1), 943–944.
- (79) Milas, N. A.; Sussman, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58* (2), 1302–1304.
- (80) Hofmann, K. A. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1912**, *45* (3), 3329–3336.
- (81) Bäckvall, J. E. *Modern Oxidation Methods*; 2005.
- (82) Sharpless, K. B.; Akashi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98* (7), 1986–1987.
- (83) McIntosh, J. A. V; Schneider, W. P. Hydroxylation of delta-pregnenes. US 2769824 A, November 6, 1956.
- (84) Singh, M. P.; Singh, H. S.; Arya, B. S.; Singh, A. K.; Sisodia, A. K. *Indian J. Chem.* **1975**, *13*, 112.
- (85) Minato, M.; Yamamoto, K.; Tsuji, J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (2), 766–768.
- (86) Hoi-Lun, K.; Sorato, C.; Ogino, Y.; Hou, C.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (21), 2999–3002.
- (87) R., C.; B., M.; H., W. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1942**, *550*, 99.
- (88) Berrisford, D. J.; Bolm, C.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34* (10), 1059–1070.
- (89) Zaitsev, A. B.; Adolfsson, H. *Synthesis (Stuttg)*. **2006**, No. 11, 1725–1756.
- (90) Cleare, M. J.; Hydes, P. C.; Griffith, W. P.; Wright, M. J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1977**, *9*, 941–944.

- (91) Griffith, W. .; Skapski, A. .; Woode, K. .; Wright, M. . *Partial coordination in amine adducts of osmium Tetraoxide: X-ray molecular structure of quinuclidinetetraoxo-osmium(VIII)*; 1978; 31.
- (92) DelMonte, A. J.; Haller, J.; Houk, K. N.; Sharpless, K. B.; Singleton, D. A.; Strassner, T.; Thomas, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (41), 9907–9908.
- (93) Deubel, D. V.; Frenking, G. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (9), 645–651.
- (94) Muñiz, K. *Chemie unserer Zeit* **2006**, *40*, 112–124.
- (95) Corey, E. J.; Noe, M. C.; Sarshar, S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (18), 2861–2864.
- (96) Corey, E. J.; Noe, M. C.; Grogan, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (28), 4899–4902.
- (97) Fristrup, P.; Tanner, D.; Norrby, P. *Chirality* **2003**, *15* (4), 360–368.
- (98) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (10), 2768–2771.
- (99) Vanhessche, K. P. M.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (23), 7978–7979.
- (100) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (10), 2768–2771.
- (101) Döbler, C.; Mehlretter, G. M.; Sundermeier, U.; Beller, M. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *621* (1), 70–76.
- (102) Siva Prasad, J.; Vu, T.; Totleben, M. J.; Crispino, G. A.; Kacsur, D. J.; Swaminathan, S.; Thornton, J. E.; Fritz, A.; Singh, A. K. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7* (6), 821–827.
- (103) Raheem, I. T.; Goodman, S. N.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (3), 706–707.
- (104) Lee, H. M.; Nieto-Oberhuber, C.; Shair, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16864–16866.
- (105) Woo, C. M.; Gholap, S. L.; Lu, L.; Kaneko, M.; Li, Z.; Ravikumar, P. C.; Herzon, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (41), 17262.
- (106) Smaltz, D. J.; Myers, A. G. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (20), 8554–8559.
- (107) Smaltz, D. J.; Švenda, J.; Myers, A. G. *Org. Lett.* **2012**, *14* (7), 1812–1815.
- (108) Gupta, P.; Fernandes, R. A.; Kumar, P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (22), 4231–4232.

- (109) Yamaguchi, J.; Hayashi, Y. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (13), 3884–3901.
- (110) Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. *Organische chemie*, 4.; John Wiley & Sons: New York, 2005.
- (111) Plietker, B. *Synthesis (Stuttg.)*. **2005**, *15*, 2453–2472.
- (112) Shing, T. K. M.; Tai, V. W.-F.; Tam, E. K. W. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1994**, *33* (22), 2312–2313.
- (113) Neisius, N. M.; Plietker, B. *J. Org. Chem.* **2008**, 3218–3227.
- (114) Archelas, A.; Furstoss, R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (2), 112–119.
- (115) Morisseau, C.; Hammock, B. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *45* (1), 311–333.
- (116) Reetz, M. T.; Zheng, H. *ChemBioChem* **2011**, *12* (10), 1529–1535.
- (117) Bellucci, G.; Capitani, I.; Chiappe, C.; Marioni, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *16*, 1170–1171.
- (118) Bellucci, G.; Capitani, I.; Chiappe, C.; Marioni, F. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *16*, 1170–1171.
- (119) Lutje Spelberg, J. H.; van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Bosma, T.; Kellogg, R. M.; Janssen, D. B. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10* (15), 2863–2870.
- (120) Hasnaoui, G.; Lutje Spelberg, J. H.; de Vries, E.; Tang, L.; Hauer, B.; Janssen, D. B. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (9), 1685–1692.
- (121) Zhong, G. *Angew. Chemie* **2003**, *115* (35), 4379–4382.
- (122) Lavandera, I.; Kern, A.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; de Wildeman, S.; Kroutil, W. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (15), 6003–6005.
- (123) Kulig, J.; Simon, R. C.; Rose, C. A.; Husain, S. M.; Hackh, M.; Ludeke, S.; Zeitler, K.; Kroutil, W.; Pohl, M.; Rother, D. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2* (8), 1580–1589.
- (124) Kurina-Sanz, M.; Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Orden, A. A.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (11–12), 1842–1848.
- (125) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Giovannini, P. P.; Guerrini, A.; Medici, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (6), 1854–1856.
- (126) Kihumbu, D. Stereoselektive Diolsynthese mit Lyasen und Oxidoreduktasen – Entwicklung eines kontinuierlichen Verfahrens, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2007.
- (127) Gibson, D. T. *Microbial degradation of organic compounds.*; Marcel Dekker Inc., 1984, p. 553.

- (128) Sathyanarayanan, N.; Nagendra, H. G. **2014**, *10* (2), 68–75.
- (129) Shindo, K.; Nakamura, R.; Osawa, A.; Kagami, O.; Kanoh, K.; Furukawa, K.; Misawa, N. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *35* (4), 134–141.
- (130) Johnson, R. A. *Org. React.* **2004**, 117.
- (131) Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Synlett* **2009**, *5*, 685.
- (132) Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (11), 3117–3132.
- (133) Boyd, D. R.; Sharma, N. D. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *19*, 31–42.
- (134) Boyd, D. R.; Bugg, T. D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (2), 181–192.
- (135) Banwell, M. G.; Kokas, O. J.; Willis, A. C. *Org. Lett.* **2007**, *9* (18), 3503–3506.
- (136) Ballard, D. G. H.; Courtis, A.; Shirley, I. M.; Taylor, S. C. *Macromolecules* **1988**, *21* (2), 294–304.
- (137) Ballard, D. G. H.; Courtis, A.; Shirley, I. M.; Taylor, S. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, No. 17, 954–955.
- (138) Blank, L. M.; Ebert, B. E.; Buehler, K.; Bühler, B. *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *13* (3), 349–394.
- (139) Gibson, D. T.; Koch, R.; Kallioli, R. E. *Biochemistry* **1968**, *7* (7), 2653–2662.
- (140) Boyd, D. R.; Bugg, T. D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (2), 181–192.
- (141) Lessner, D. J.; Johnson, G. R.; Parales, R. E.; Spain, J. C.; Gibson, D. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68* (2), 634–641.
- (142) Gibson, D. T.; Parales, R. E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (3), 236–243.
- (143) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Allen, C. C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12* (6), 564–573.
- (144) Resnick, S.; Lee, K.; Gibson, D. *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *17* (5–6), 438–457.
- (145) R. Boyd, D.; N. Sheldrake, G. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15* (3), 309.
- (146) Hudlicky, T. *Ald Acta* **1999**, *32*, 35–62.
- (147) Gibson, D. T.; Resnick, S. M.; Lee, K.; Brand, J. M.; Torok, D. S.; Wackett, L. P.; Schocken, M. J.; Haigler, B. E. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (10), 2615–2621.
- (148) Jeffrey, A. M.; Yeh, H. J.; Jerina, D. M.; Patel, T. R.; Davey, J. F.; Gibson, D. T. *Biochemistry* **1975**, *14* (3), 575–584.
- (149) Jerina, D. M.; Daly, J. W.; Jeffrey, A. M.; Gibson, D. T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *142* (1), 394–396.
- (150) Resnick, S. M.; Gibson, D. T. *Biodegradation* **1993**, *4* (3), 195–203.
- (151) Sydor, P. K.; Barry, S. M.; Odulate, O. M.; Barona-Gomez, F.; Haynes, S. W.;

- Corre, C.; Song, L.; Challis, G. L. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (5), 388–392.
- (152) Han, J.; Kim, S.-Y.; Jung, J.; Lim, Y.; Ahn, J.-H.; Kim, S.-I.; Hur, H.-G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (9), 5354–5361.
- (153) Que, L. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (3), 182–184.
- (154) Costas, M.; Mehn, M. P.; Jensen, M. P.; Que, L. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (2), 939–986.
- (155) Koehntop, K. D.; Emerson, J. P.; Que, L. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10* (2), 87–93.
- (156) Company, A.; Gómez, L.; Costas, M. In *Iron-containing Enzymes: Versatile Catalysts of Hydroxylation Reactions in Nature*; de Visser, S. P., Kumar, D., Eds.; RSC Publishing, 2011; pp. 148–203.
- (157) Nojiri, H.; Nam, J.-W.; Kosaka, M.; Morii, K.-I.; Takemura, T.; Furihata, K.; Yamane, H.; Omori, T. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (10), 3105–3113.
- (158) Seo, J.; Kang, S.; Ryu, J.; Lee, Y.; Park, K. D.; Kim, M.; Won, D.; Park, H.; Ahn, J.; Chong, Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 1451–1462.
- (159) Shindo, K.; Kagiya, Y.; Nakamura, R.; Hara, A.; Ikenaga, H.; Furukawa, K.; Misawa, N. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *23* (1), 9–16.
- (160) Chun, H.-K.; Ohnishi, Y.; Shindo, K.; Misawa, N.; Furukawa, K.; Horinouchi, S. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *21* (3), 113–121.
- (161) Axcell, B. C.; Geary, P. J. *Biochem. J.* **1975**, *146* (1), 173–183.
- (162) Parales, R. E.; Lee, K.; Resnick, S. M.; Lessner, D. J.; Gibson, D. T. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (6), 1641–1649.
- (163) Batie, C. J.; Ballou, D. P.; Correll, C. C. *Chem. Biochem. flavoenzymes* **1991**, *3*, 543–556.
- (164) Werlen, C.; Kohler, H.-P. E.; van der Meer, J. R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (8), 4009–4016.
- (165) Gibson, D. T.; Parales, R. E. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (3), 236–243.
- (166) Chakraborty, J.; Ghosal, D.; Dutta, A.; Dutta, T. K. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *30* (4), 419–436.
- (167) Kweon, O.; Kim, S.-J.; Baek, S.; Chae, J.-C.; Adjei, M. D.; Baek, D.-H.; Kim, Y.-C.; Cerniglia, C. E. *BMC Biochem.* **2008**, *9* (11).
- (168) Cammack, R.; Gay, E.; Shergill, J. K. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *192*, 1003–1022.
- (169) Barry, S. M.; Challis, G. L. *ACS Catal.* **2013**, *3* (10), 2362–2370.
- (170) Zu, Y.; Couture, M. M.-J.; Kolling, D. R. J.; Crofts, A. R.; Eltis, L. D.; Fee, J. A.; Hirst,

- J. Biochemistry* **2003**, 42 (42), 12400–12408.
- (171) Kuila, D.; Fee, J. A. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261 (6), 2768–2771.
- (172) Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. *Structure* **1998**, 6 (5), 571–586.
- (173) Ferraro, D. J.; Gakhar, L.; Ramaswamy, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338 (1), 175–190.
- (174) Cospers, N. J.; Eby, D. M.; Kounosu, A.; Kurosawa, N.; Neidle, E. L.; Kurtz, D. M.; Iwasaki, T.; Scott, R. A. *Protein Sci.* **2002**, 11 (12), 2969–2973.
- (175) Wetzl, D.; Bolsinger, J.; Nestl, B. M.; Hauer, B. *ChemCatChem* **2016**, 8 (7), 1361–1366.
- (176) Parales, R. E.; Parales, J. V.; Gibson, D. T. *J. Bacteriol.* **1999**, 181 (6), 1831–1837.
- (177) Parales, R. E. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 30 (5), 271–278.
- (178) Ohta, T.; Chakrabarty, S.; Lipscomb, J. D.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (5), 1601.
- (179) Bugg, T. D. H.; Ramaswamy, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12 (2), 134–140.
- (180) Abu-Omar, M. M.; Loaiza, A.; Hontzeas, N. *Chem. Rev.* **2005**, 105 (6), 2227–2252.
- (181) Liu, L. V.; Hong, S.; Cho, J.; Nam, W.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135 (8), 3286.
- (182) Wolfe, M. D.; Parales, J. V.; Gibson, D. T.; Lipscomb, J. D. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (3), 1945–1953.
- (183) Karlsson, A.; Parales, J. V.; Parales, R. E. *Science* **2014**, 1039 (2003).
- (184) Bommarius, A. S.; Blum, J. K.; Abrahamson, M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15 (2), 194–200.
- (185) Parales, R. E.; Resnick, S. O. L. M.; Yu, C.; Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Gibson, D. T. *J. Bacteriol.* **2000**, 182 (19), 5495–5504.
- (186) Kumar, P.; Mohammadi, M.; Viger, J.; Barriault, D.; Gomez-gil, L.; Eltis, L. D.; Bolin, J. T.; Sylvestre, M. *J. Mol. Biol.* **2011**, 405 (2), 531–547.
- (187) Sakamoto, T.; Joern, J. M.; Arisawa, A.; Arnold, F. H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67 (9), 3882–3887.
- (188) Zielinski, M.; Kahl, S.; Standfuß-Gabisch, C.; Cámara, B.; Seeger, M.; Hofer, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72 (3), 2191–2199.
- (189) Gally, C.; Nestl, B. M.; Hauer, B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, 54 (44), 12952–

- 12956.
- (190) Parales, J. V.; Parales, R. E.; Resnick, S. M.; Gibson, D. T. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (5), 1194–1199.
- (191) Parales, R. E.; Emig, M. D.; Lynch, N. A.; Gibson, D. T. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (9), 2337–2344.
- (192) Harayama, S.; Rekik, M.; Timmis, K. N. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1986**, *202* (2), 226–234.
- (193) Jun, H.; Akiko, S.; Shinsaku, H.; Kensuke, F. *Gene* **1994**, *138* (1), 27–33.
- (194) Hurtubise, Y.; Barriault, D.; Sylvestre, M. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (22), 5828–5835.
- (195) Chebrou, H.; Hurtubise, Y.; Barriault, D.; Sylvestre, M. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (16), 4805–4811.
- (196) Ge, Y.; Eltis, L. D. *J. Bacteriol.* **2003**, *185* (18), 5333–5341.
- (197) Suen, W.-C. Gene expression of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 in *Escherichia coli*, The University of Iowa, 1991.
- (198) Tabor, S.; Richardson, C. C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82* (4), 1074–1078.
- (199) Aoki, H.; Kimura, T.; Habe, H.; Yamane, H.; Kodama, T.; Omori, T. *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, *81* (3), 187–196.
- (200) Zylstra, G. J.; Gibson, D. T. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (25), 14940–14946.
- (201) Gally, C. Enzymatic asymmetric dihydroxylation of alkenes, Universitaet Stuttgart, 2010.
- (202) Gibson, D. T.; Hensley, M.; Yoshioka, H.; Mabry, T. J. *Biochemistry* **1970**, *9* (7), 1626–1630.
- (203) Schmitt, J.; Hess, H.; Stunnenberg, H. G. *Mol. Biol. Rep.* **1993**, *18* (3), 223–230.
- (204) Hengen, P. N. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20* (7), 285–286.
- (205) Porath, J.; Carlsson, J. A. N.; Olsson, I.; Belfrage, G. *Nature* **1975**, *258*, 598–599.
- (206) Arnau, J.; Lauritzen, C.; Petersen, G. E.; Pedersen, J. *Protein Expr. Purif.* **2006**, *48* (1), 1–13.
- (207) Hage, D. S. *Clin. Chem.* **1999**, *45* (5), 593–615.
- (208) Jouanneau, Y.; Meyer, C.; Jakoncic, J.; Stojanoff, V.; Gaillard, J.; Syst, B.; Grenoble, F.-. *Biochemistry* **2006**, 12380–12391.
- (209) Ling, M. M.; Robinson, B. H. *Anal. Biochem.* **1997**, *254* (2), 157–178.
- (210) Hutchison, C. A.; Phillips, S.; Edgell, M. H.; Gillam, S.; Jahnke, P.; Smith, M. *J. Biol.*

- Chem.* **1978**, 253 (18), 6551–6560.
- (211) Mühlhardt, C. *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*, 7. Auflage.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2013.
- (212) Gibson, D. G.; Young, L.; Chuang, R.-Y.; Venter, J. C.; Hutchison, C. A.; Smith, H. O. *Nat. Methods* **2009**, 6 (5), 343–345.
- (213) Gibson, D. G.; Smith, H. O.; Hutchison III, C. A.; Venter, J. C.; Merryman, C. *Nat. Methods* **2010**, 7 (11), 901–903.
- (214) Smith, P. K.; Krohn, R. II; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, Md.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, 150 (1), 76–85.
- (215) Weber, K.; Osborn, M. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244 (16), 4406–4412.
- (216) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680–685.
- (217) Chial, H. J.; Splittgerber, A. G. *Anal. Biochem.* **1993**, 213 (2), 362–369.
- (218) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, 76 (9), 4350–4354.
- (219) Novagen, User Protocol TB340.
- (220) Kobayashi, S.; Oono, K.; Sano, A. Palladium catalyst composition. EP1537913 A1, June 8, 2005.
- (221) Matsumura, K.; Arai, N.; Hori, K.; Saito, T.; Sayo, N.; Ohkuma, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (28), 10696–10699.
- (222) Fauchet, V.; Miguel, B. A.-S.; Taran, M.; Delmond, B. *Synth. Commun.* **1993**, 23 (18), 2503–2510.
- (223) Schwetlick, K. *Organikum*, WILEY-VCH Verlag, 2001.
- (224) Robinson, P. L.; Barry, C. N.; Kelly, J. W.; Evans Jr, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107 (18), 5210–5219.
- (225) Wang, A.; Jiang, H. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (7), 2321–2326.
- (226) Worthy, A. D.; Sun, X.; Tan, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (17), 7321–7324.
- (228) Bui, V. P.; Hansen, T. V.; Stenstrøm, Y.; Hudlicky, T.; Ribbons, D. W. *New J. Chem.* **2001**, 25 (1), 116–124.
- (229) Grinberg, A. V; Hannemann, F.; Schiffler, B.; Müller, J.; Heinemann, U.; Bernhardt, R. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2000**, 40 (4), 590–612.
- (230) Johnson, P. W.; Canale-Parola, E. *Arch. Mikrobiol.* **1973**, 89 (4), 341–353.
- (231) Hugo, N.; Armengaud, J.; Gaillard, J.; Timmis, K. N.; Jouanneau, Y. *J. Biol. Chem.*

- 1998**, 273 (16), 9622–9629.
- (232) Scheller, P. N. Characterization and application of novel imine reductases, **2016**.
- (233) Yu, C.; Parales, R. E.; Gibson, D. T. **2001**, 94–103.
- (234) Schweizer, L. Expressionsoptimierung und Untersuchung der Naphthalen Dioxygenase von *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 bezüglich ihrer Eignung zur selektiven Hydroxylierung von Terpenen, Universitaet Stuttgart, 2015.
- (235) Parales, R. E.; Resnick, S. M.; Yu, C.; Derek, R.; Sharma, N. D.; Gibson, D. T.; Resnick, S. O. L. M.; Boyd, D. R. *J. Bacteriol.* **2000**, 185 (19), 5495–5504.
- (236) Jiang, H.; Parales, R. E.; Lynch, N. A.; Gibson, D. T.; Acteriol, J. B. **1996**, 178 (11), 3133–3139.
- (237) Lee, K.; Gibson, D. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62 (9), 3101–3106.
- (238) Parales, R. E.; Resnick, S. M. In *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*; CRC Press, 2006.
- (239) Lee, K. *J. Bacteriol.* **1999**, 181 (9), 2719–2725.
- (240) Tan, H. M.; Joannou, C. L.; Cooper, C. E.; Butler, C. S.; Cammack, R.; Mason, J. R. *J. Bacteriol.* **1994**, 176 (9), 2507–2512.
- (241) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*; Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- (242) Parales, R. E.; Resnick, S. M. In *Pseudomonas*; Ramos, J. L., Levesque, R. C., Eds.; Springer US, 2006; p. 287.
- (243) Staijen, I. E.; van Beilen, J. B.; Witholt, B. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267 (7), 1957–1965.
- (244) Murdock, D.; Ensley, B. D.; Serdar, C.; Thalen, M. *Nat. Biotechnol.* **1993**, 11 (3), 381–386.
- (245) Qu, Y.; Xu, B.; Zhang, X.; Ma, Q.; Zhou, H.; Kong, C.; Zhang, Z.; Zhou, J. *Biochem. Eng. J.* **2013**, 72, 54–60.
- (246) Fuhrer, T.; Sauer, U. *J. Bacteriol.* **2009**, 191 (7), 2112–2121.
- (247) Nieboer, M.; Kingma, J.; Witholt, B. *Mol. Microbiol.* **1993**, 8 (6), 1039–1051.
- (248) Chen, Q.; Janssen, D. B.; Witholt, B. *J. Bacteriol.* **1996**, 178 (18), 5508–5512.
- (249) Van Beilen, J. B.; Duetz, W. A.; Schmid, A.; Witholt, B. *Trends Biotechnol.* **2003**, 21 (4), 170–177.
- (250) Fuhrer, T.; Sauer, U. *J. Bacteriol.* **2009**, 191 (7), 2112–2121.

- (251) Seo, J.; Ryu, J.; Han, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 693–704.
- (252) Hilterhaus, L.; Liese, A. *Enzym. Catal. Org. Synth. Third Ed.* 1585–1606.
- (253) Sinisterra, J. V; Dalton, H. **1996**.
- (254) Molina, G.; Pimentel, M. R.; Pastore, G. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97 (5), 1851–1864.
- (255) Lee, K.; Brand, J. M.; Gibson, D. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 212 (1), 9–15.
- (256) Kerridge, A.; Willetts, A.; Holland, H. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, 6 (1), 59–65.
- (257) Ferraro, D. J.; Okerlund, A. L.; Mowers, J. C.; Ramaswamy, S. *J. Bacteriol.* **2006**, 188 (19), 6986–6994.
- (258) Carredano, E.; Karlsson, a.; Kauppi, B.; Choudhury, D.; Parales, R. E. E.; Parales, J. V. V.; Lee, K.; Gibson, D. T. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. *J Mol Biol* **2000**, 296 (2), 701–712.
- (259) Hammes-Schiffer, S.; Benkovic, S. J. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, 75, 519–541.
- (260) Nestl, B. M.; Hauer, B. *ACS Catalysis.* 2014, 4 (9), 3201–3211.
- (261) Reich, S.; Kress, N.; Nestl, B. M.; Hauer, B. *J. Struct. Biol.* **2014**, 185 (2), 228–233.
- (262) Duetz, W. A.; Fjällman, A. H. M.; Ren, S.; Jourdat, C.; Witholt, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67 (6), 2829–2832.
- (263) Sundermeier, U.; Döbler, C.; Beller, M. *Mod. Oxid. Methods* **2004**.
- (264) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. a; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M.; Xu, D. Q.; Zhang, X. L. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768–2771.
- (265) Kobayashi, S.; Endo, M.; Nagayama, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (48), 11229–11230.
- (266) Minato, M.; Yamamoto, K.; Tsuji, J. *J. Org. Chem.* **1990**, 55 (2), 766–768.
- (267) Hudlicky, T.; Thorpet, A. J. **1996**, 109, 1993–2000.
- (268) Zielinski, M.; Backhaus, S.; Hofer, B. *Microbiology* **2002**, 148 (8), 2439–2448.
- (269) Endoma-Arias, M. A. A.; Hudlicky, T. *A short synthesis of nonracemic iodocyclohexene carboxylate fragment for kibdelone and congeners*; 2011; Vol. 52.
- (270) Hudlicky, T.; Natchus, M. G.; Nugent, T. C. *Synth. Comm.* **1992**, 22 (1), 151–157.
- (271) Omori, A. T.; Finn, K. J.; Leisch, H.; Carroll, R. J.; Hudlicky, T. *Synlett* **2007**, 18,

- 2859–2862.
- (272) Fabris, F.; Collins, J.; Sullivan, B.; Leisch, H.; Hudlicky, T. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (12), 2619–2627.
- (273) Ley, S. V.; Sternfeld, F.; Taylor, S. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (2), 225–226.
- (274) Ley, S. V.; Sternfeld, F. *Tetrahedron* **1989**, *45* (11), 3463–3476.
- (275) Tian, X.; Hudlicky, T.; Königsberger, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (12), 3643–3644.
- (276) Froese, J. **2016**.
- (277) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Kaik, M.; McIntyre, P. B.; Stevenson, P. J.; Allen, C. C. R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (14), 2774–2779.
- (278) Kokas, O. J.; Banwell, M. G.; Willis, A. C. *Tetrahedron* **2008**, *64* (27), 6444–6451.
- (279) Matveenko, M.; Banwell, M. G.; Willis, A. C. *Org. Lett.* **2008**, *10* (20), 4693–4696.
- (280) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Acaru, C. A.; Malone, J. F.; O'Dowd, C. R.; Allen, C. C. R.; Stevenson, P. J. *Org. Lett.* **2010**, *12* (10), 2206–2209.
- (281) Sato, S. I.; Nam, J.-W.; Kasuga, K.; Nojiri, H.; Yamane, H.; Omori, T.; *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (15), 4850–4858.