

Synthese von Stickstoff-Heterozyklen unter Einsatz von Enzymen und Metallkatalysatoren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

von

Nadine Zumbrägel, M. Sc.

geboren am 21.02.1991 in Osnabrück

Bielefeld, Dezember 2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Gröger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Bielefeld unter Leitung von Prof. Dr. Harald Gröger und am *Institute of Scientific and Industrial Research* (ISIR) der Universität Osaka (Oktober 2017 bis Dezember 2017) in der Zeit vom Oktober 2015 bis Dezember 2018 angefertigt. Die Finanzierung dieser Arbeit erfolgte durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes „Biotechnologie 2020+, Nächste Generation biotechnologischer Verfahren“ (Fördernummer: 031A184A) sowie des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) und *Japan Society for Promotion of Science* (JSPS) im Rahmen des gemeinsam geförderten Projektes „DAAD PPP Japan 2017/2018“ (Fördernummer: 57345562).

Die Dissertation wurde selbstständig verfasst und hat in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung noch nicht einer anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegen. Es wurden keine anderen als die in dieser Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Die Dissertation wurde von der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld auf Basis der Promotionsordnung vom 1. Juli 2011 genehmigt.

.....

Nadine Zumbrägel

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht, zur Veröffentlichung eingereicht oder wurden im Rahmen von Konferenzen vorgestellt:

PUBLIKATIONEN

N. Zumbärgel, D. Wetzl, H. Iding, H. Gröger

Asymmetric biocatalytic reduction of cyclic imines: design and application of a tailor-made whole-cell catalyst,
Heterocycles **2017**, *95*, 1261-1271.

N. Zumbärgel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger

Enantioselective reduction of sulfur-containing cyclic imines through biocatalysis,
Nat. Commun. **2018**, *9*, 1949 (DOI: 10.1038/s41467-018-03841-5).

N. Zumbärgel, M. Sako, S. Takizawa, H. Sasai, H. Gröger

Vanadium-Catalyzed Dehydrogenation of *N*-Heterocycles in Water,
Org. Lett. **2018**, *20*, 4723-4727.

N. Zumbärgel, H. Gröger

Merging Heterocyclic Chemistry and Biocatalysis in One-Pot Processes through Compartmentalization of the Reaction Steps,
Bioengineering **2018**, *5*, 60 (DOI: 10.3390/bioengineering5030060).

M. Sako, T. Aoki, N. Zumbärgel, L. Schober, H. Gröger, S. Takizawa, H. Sasai

Chiral Dinuclear Vanadium Complex-mediated Oxidative Coupling of Resorcinols,
J. Org. Chem. DOI: 10.1021/acs.joc.8b02494 (als *just accepted* Manuskript online veröffentlicht).

N. Zumbärgel, K. Wagner, N. Weißing, H. Gröger

Biocatalytic Reduction of 2-Monosubstituted 3-Thiazolines using Imine Reductases,
J. Heterocycl. Chem. zur Publikation angenommen.

N. Zumbärgel, H. Gröger

One-Pot Synthesis of a 3-Thiazolidine through Combination of an Asinger-type Multi-Component-Condensation Reaction with an Enzymatic Imine Reduction,
J. Biotechnol. zur Veröffentlichung eingereicht.

N. Zumbärgel, P. Machui, J. Nonnhoff, H. Gröger

Enantioselective Biocatalytic Reduction of 2*H*-1,4-Benzoxazines using Imine Reductases,
J. Org. Chem. zur Veröffentlichung eingereicht.

BUCHKAPITEL

S. Wedde, J. E. Choi, K. Oike, N. Zumbrägel, M. Biermann, H. Gröger

Recent Developments of Enzymatic Oxidations in:

Green Oxidations in Organic Synthesis,

Wiley VCH, Kapitel 16, zur Veröffentlichung eingereicht.

VORTRÄGE

N. Zumbrägel, D. Wetzl, H. Iding, H. Gröger

Process Development of Imine Reductase-Catalyzed Enantioselective Synthesis of Cyclic Amines,

ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016, September 2016, Aachen (ausgewählter Posterbeitrag zu einem Kurzvortrag).

N. Zumbrägel, H. Gröger

Enantioselective Synthesis of Cyclic Amines via Whole Cell-Catalysis with Overexpressed Imine Reductases,

4th Cebitec Retreat, September 2017, Bad Sassendorf.

N. Zumbrägel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger

Enantioselective Reduction of Sulfur-Containing Cyclic Imines through Biocatalysis,

1st Biocascades Symposium & 8th International CeBiTec Research Conference (ICRC 2018), April 2018, Bielefeld.

N. Zumbrägel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger

Biocatalytic Reduction of Heterocyclic Imines and Acyclic Hetero-Imines,

Biocatalysis Gordon Research Conference 2018, Juli 2018, Biddeford (einer von 4 zum Vortrag ausgewählten Posterbeiträgen aus 140 Posterbeiträgen).

N. Zumbrägel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger

Merging Heterocyclic Chemistry & Biocatalysis: Enantioselective Reduction of Sulfur-containing Cyclic Imines Prepared *via* Asinger-type Multicomponent Reaction,

7th International Conference on Multicomponent Reactions and Related Chemistry, August 2018, Düsseldorf.

POSTERPRÄSENTATIONEN

N. Zumbrägel, D. Wetzl, H. Iding, H. Gröger

Process Development of Imine Reductase-Catalyzed Enantioselective Synthesis of Cyclic Amines,

ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen 2016, September 2016, Aachen.

N. Zumbrägel, H. Gröger

Imine Reductase-Catalyzed Reduction of Sulfur-Containing Heterocyclic Imines,

BIOTRANS 2017, Juli 2017, Budapest.

N. Zumbrägel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger

Biocatalytic Reduction of Heterocyclic Imines and Acyclic Hetero-Imines,

Biocatalysis Gordon Research Conference 2018, Juli 2018, Biddeford.

Auszeichnung des Posters mit dem Poster-Award.

DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Gröger, der mir die Möglichkeit gab eine Vielzahl spannender Themengebiete zu bearbeiten und unter anderem als weitere Generation an den 3-Thiazolinen zu arbeiten. Herzlichen Dank für die hervorragende Betreuung, die hilfreichen Diskussionen zu den einzelnen Themengebieten, das Vertrauen in meine Arbeit und die damit verbundenen Freiheiten zur Gestaltung der verschiedenen Projekte.

Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die Finanzierung dieser Arbeit danke ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes „Biotechnologie 2020+, Nächste Generation biotechnologischer Verfahren“ (Fördernummer: 031A184A) sowie dem Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) und der *Japan Society for Promotion of Science* (JSPS) im Rahmen des gemeinsam geförderten Projektes „DAAD PPP Japan 2017/2018“ (Fördernummer: 57345562). Außerdem danke ich dem DAAD für die Förderung meiner Teilnahme an der Biocatalysis Gordon Research Conference 2018 im Rahmen des Kongressreiseprogramms.

Prof. Dr. Hiroaki Sasai von der Universität Osaka danke ich für herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Rahmen meines Auslandsaufenthaltes in Japan und die Möglichkeit meine Kompetenzen auf dem vielseitigen Themengebiet der Vanadium-Katalyse zu erweitern - ありがとうございます。

Dr. Hans Iding und Dr. Dennis Wetzl der F. Hoffmann-La Roche AG danke ich für die Bereitstellung der Plasmide mit den Genen für die Iminreduktasen und den hilfreichen wissenschaftlichen Austausch in den letzten Jahren.

Prof. Dr. Stefan Huber von der Ruhr-Universität Bochum danke ich für Durchführung der DFT-Berechnungen und die Einführung in Gaussian 09 im Rahmen von zwei Besuchen in Bochum. Dr. Christian Merten von der Ruhr-Universität Bochum danke ich die Aufklärung der absoluten Konfiguration eines 3-Thiazolidins. Beiden danke ich herzlich für die erfolgreiche Kooperation.

Bei Herrn Prof. Dr. Hartmut Niemann möchte ich mich für die Kooperation zur Aufklärung der Struktur einer Iminreduktase und die damit verbundenen hilfreichen Diskussionen bedanken. Christina Geerds und Timo Meyer danke ich für die Durchführung der Experimente in diesem Kooperationsprojekt und die Einblicke in die Welt der Proteinkristallographie.

Für die Vermessung einer Vielzahl von NMR- und MS-Proben möchte ich Dr. Andreas Mix, Peter Mester, Dr. Jens Sproß, Heinz-Werner Patruck und Sandra Heitkamp danken. Dem Team des Chemikalienlagers um Heike Kosellek danke ich zudem für die zügige und stets zuverlässige Bestellung von Chemikalien und Materialien. Außerdem möchte ich bei der Mechanischen Werkstatt für die zuverlässige Anfertigung spezieller Gerätschaften bedanken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Tobias Betke, Franziska Kühn, Jana Löwe, Jannis Nonnhoff, Matthias Pieper, Dr. Philipp Rommelmann, Lukas Schober und Michael Stricker.

Im Rahmen meiner Arbeit hat mich zudem eine Vielzahl von Studenten bzw. Auszubildenden unterstützt, denen ich für ihre tolle Arbeit danken möchte. Im Rahmen eines Forschungspraktikums haben mich Theresa Tabarelli, Lara Pfaff, Eugenia Werner, Lukas Schober, Dario Duwe, Tobias Zwafing und Josip Garic unterstützt. Annamaria Latus und Ingo Kröger haben im Rahmen ihrer Ausbildung großartige Ergebnisse erzielt und Karla Wagner danke ich die Bearbeitung eines Teilprojektes im Rahmen ihrer Bachelorarbeit sowie für ihre Unterstützung als Hiwi. Jannis Nonnhoff, Paul Machui, Nils Weißing und Mentor Hyseni danke ich zudem für die gelungene Teamarbeit bei der Bearbeitung von Teil- bzw. Folgeprojekten im Rahmen ihrer Masterarbeiten.

Dem gesamten Sasai Lab, insbesondere Dr. Makoto Sako und H. D. P. Wathsala, danke ich für die schöne und unvergessliche Zeit in Japan - ありがとうございます。

Alle Mitglieder der „OC1 Familie“ haben mir auf ihre Art und Weise die Zeit in diesem Arbeitskreis versüßt, die ich sehr genossen habe. Vielen Dank für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, den fachlichen Austausch, die Unterstützung im Labor und die zahlreichen freizeithlichen Aktivitäten. Angelika Bendick möchte ich für ihre zuverlässige Hilfe bei der Bewältigung bürokratischer Aufgaben innerhalb der Universität und für ihre schokoladigen Aufmerksamkeiten in den Postfächern zu diversen Festen danken. Dr. Anke Hummel und Melissa Kracht danke ich für die zuverlässige Beratung bei allen meinen Fragen im S1 Bereich, die eine Vielzahl an Problemen lösen konnten. Dr. Daniel Bakonyi, Dr. Marc Biermann und Wilko Greschner möchte ich insbesondere für ihre Hilfsbereitschaft und ihre konstruktiven Ideen zu Beginn meiner Zeit in dieser Arbeitsgruppe danken. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Thomas Geisler und Anika Hegemann bedanken, die für so ziemlich jedes Problem im Labor eine Lösung hatten. Thomas Geisler und Matthias Pieper danke ich außerdem für ihre frühmorgendliche Pünktlichkeit und den Schnack zum Start des Labortages. Dr. Philipp Rommelmann, Tobias Betke und Matthias Pieper danke ich sowohl für die große Hilfsbereitschaft im Labor, als auch die vielen Gespräche über Gott und die Welt in den letzten Jahren. Ein großer Dank geht zudem an das einzigartige „Girls Lab“. Vielen Dank an Ji Eun Choi und Keiko Oike für das Vermitteln von einigen Brocken Japanisch bzw. Koreanisch und die schöne gemeinsame Zeit.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Jana Löwe bedanken, die mir nicht nur als Teampartnerin im Labor zur Seite stand, sondern auch zahlreiche Dienstreisen mit mir bestritten und zu Kurzurlaube verlängert hat. Vielen Dank für die musikalische Untermalung der letzten Jahre, unsere unschlagbare Aufgabenteilung auf Reisen und die entstandene tolle Freundschaft, die ich nicht mehr missen möchte. Für die unvergessliche Zeit möchte ich mich außerdem bei Niklas Adebar, Alessa Hinzmann, Franziska Kühn, Jannis Nonnhoff, Carmen Plass, Lukas Schober, Michael Stricker, Florian Uthoff, Severin Wedde, Dr. Yasunobu Yamashita und Hilmi Yavuzer bedanken.

Meinen liebsten Mädels Luisa, Anna, Nele und Verena danke ich für ihre wunderbare, langjährige Freundschaft und ihr Verständnis für meinen Arbeitswahn. Ich bin froh jederzeit auf euch zählen zu können.

Tobias danke ich für seine Liebe und Unterstützung in jeder Lebenslage. Danke, dass du immer für mich da bist und mit mir das perfekte Team bildest.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir von klein auf den Rücken gestärkt hat. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Heike und Peter, sowie meiner Oma Margret bedanken, die mich bedingungslos unterstützen und meinen Weg voller Begeisterung begleiten. Ich bin froh euch an meiner Seite zu haben!

*Be practical as well as generous in your ideals.
Keep your eyes on the stars and keep your feet on the ground.*

Theodore Roosevelt

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Motivation und Zielsetzung	4
3. Optimierung und Prozessentwicklung von Iminreduktase-katalysierten Reaktionen	6
3.1 Stand der Wissenschaft.....	6
3.1.1 Bedeutung chiraler zyklischer Amine	6
3.1.2 Chemische Methoden zur enantioselektiven Darstellung von Aminen.....	7
3.1.3 Biokatalytische Methoden zur enantioselektiven Darstellung von Aminen ..	11
3.1.4 Iminreduktasen	15
3.2 Motivation und Zielsetzung	19
3.3 Ergebnisse und Diskussion	21
3.3.1 Einleitende Versuche & Analytik.....	21
3.3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen	22
3.3.2.1 Variation der Reaktionsparameter in Biotransformationen	22
3.3.2.2 Thermofluor-Assay	24
3.3.3 Untersuchungen der Enzymkinetik	27
3.3.3.1 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante	27
3.3.3.2 Untersuchung von Substratinhibierung bzw. -deaktivierung	28
3.3.3.3 Untersuchung von Produktinhibierung bzw. -deaktivierung	29
3.3.4 Ganzzell-Katalyse	30
3.3.4.1 Konstruktion von Ganzzell-Katalysatoren	30
3.3.4.2 Evaluierung der Ganzzell-Konstrukte	32
3.3.4.3 Cosolventien-Screening	34
3.3.5 Prozessentwicklung.....	35
3.4 Ausblick	40
4. Biokatalytische Reduktion S- und O-haltiger zyklischer Imine.....	41
4.1 Stand der Wissenschaft.....	41
4.1.1 Bedeutung chiraler S- und O-haltiger zyklischer Amine.....	41
4.1.2 3-Thiazolidine	42
4.1.2.1 Forschungsarbeiten zur Reduktion der 3-Thiazoline	43
4.1.2.2 Asinger-Synthese.....	44
4.1.3 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazine und 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazine .	45
4.1.3.1 Chemische Methoden zur Reduktion von 2 <i>H</i> -1,4-Benzothiazinen und 2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazinen	46
4.2 Motivation und Zielsetzung	49
4.3 Ergebnisse und Diskussion	51
4.3.1 Substratsynthesen	51

4.3.1.1	Synthese von 3-Thiazolinen 3	51
4.3.1.2	Synthese von 2 <i>H</i> -1,4-Benzothiazinen 5	52
4.3.1.3	Synthese von 2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazinen 7	52
4.3.2	Versuche zur chemischen Reduktion der 3-Thiazoline.....	53
4.3.3	Synthese der Referenzverbindungen	55
4.3.3.1	Synthese von 3-Thiazolidinen 4	55
4.3.3.2	Synthese von 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazinen 6	55
4.3.3.3	Synthese der racemischen 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazine 8	56
4.3.4	Analytik.....	56
4.3.5	Biokatalytische Reduktion von 3-Thiazolinen 3	57
4.3.5.1	Kolorimetrischer pH-Shift-Assay.....	57
4.3.5.2	Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität	60
4.3.5.3	Biotransformationen von 3-Thiazolinen 3	61
4.3.5.4	Prozessentwicklung der IRED-katalysierten Reduktion von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (3f)	63
4.3.5.5	Bestimmung der absoluten Konfiguration von 4f	64
4.3.5.6	Biokatalytische Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline <i>rac</i> - 3g-h	65
4.3.6	Biokatalytische Reduktion von 2 <i>H</i> -1,4-Benzothiazinen 5	68
4.3.6.1	Kolorimetrischer pH-Shift-Assay.....	68
4.3.6.2	Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität	69
4.3.6.3	Biotransformationen von 2 <i>H</i> -1,4-Benzothiazinen 5	70
4.3.6.4	DFT-Berechnungen zur Evaluation der unterschiedlichen Aktivitäten	72
4.3.7	Kristallisation und Aufklärung der Struktur einer Iminreduktase	73
4.3.7.1	Aufreinigung der IRED für die Untersuchung der Stabilität.....	73
4.3.7.2	Untersuchung der Stabilität der IRED08	74
4.3.7.3	Untersuchung der Stabilität der IRED08 in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren	75
4.3.7.4	Aufreinigung der IRED08 für die Kristallisationsexperimente	77
4.3.7.5	Cokristallisation der IRED08 mit NADPH und Aufklärung der Struktur.....	78
4.3.8	Biokatalytische Reduktion von 2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazinen 7	79
4.3.8.1	Kolorimetrischer pH-Shift-Assay.....	79
4.3.8.2	Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität	80
4.3.8.3	Biotransformationen von 2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazinen 7	81
4.3.8.4	Prozessentwicklung der IRED-katalysierten Reduktion von 3-Phenyl-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin (7a).....	82
4.4	Ausblick	84

5. Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse in Eintopf-Synthesen	85
5.1 Stand der Wissenschaft.....	85
5.1.1 Kombination von Chemo- und Biokatalyse	85
5.1.2 Reaktionstechnische Strategien zur Vermeidung von Inkompatibilitäten von Katalysatoren oder Reagenzien	88
5.2 Motivation und Zielsetzung	91
5.3 Ergebnisse und Diskussion	93
5.3.1 Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse durch Kompartimentierung der Reaktionsschritte	93
5.3.1.1 Kompartimentierungsansatz	93
5.3.1.2 Studien zur Degussa-Variante der Asinger-Reaktion innerhalb der PDMS-Hülse	94
5.3.1.3 Diffusions-Effizienz	95
5.3.1.4 Studien zur biokatalytischen Reduktion	97
5.3.1.5 Kompartimentierte Eintopf-Synthese	98
5.3.2 Sequentielle Eintopf-Synthese zur Darstellung des 3-Thiazolidins 4f	99
5.3.2.1 Sequentieller Reaktionsansatz	99
5.3.2.2 Studien zur Degussa-Variante der Asinger-Reaktion im Kolben	100
5.3.2.3 Studien zur biokatalytischen IRED-Reduktion in Gegenwart der Edukte der Asinger-Synthese	101
5.3.2.4 Sequentielle Eintopf-Synthese	102
5.4 Ausblick	104
6. Biokatalytische Reduktion von Iminen mit zusätzlichen Stickstoffatomen 105	105
6.1 Stand der Wissenschaft.....	105
6.1.1 Bedeutung des Hydrazin-Strukturmotivs.....	105
6.1.2 Chemische Methoden zur Darstellung von Pyrazolidinen	106
6.2 Motivation und Zielsetzung	110
6.3 Ergebnisse und Diskussion	112
6.3.1 Synthese von Hydrazonen 10	112
6.3.2 Synthese der Referenzverbindungen	112
6.3.3 Untersuchung der Stabilität von Hydrazonen im wässrigen Medium.....	113
6.3.4 Analytik.....	115
6.3.5 Biokatalytische Reduktion von Hydrazonen	115
6.3.5.1 Kolorimetrischer pH-Shift-Assay.....	115
6.3.5.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität	117
6.3.5.3 Biotransformationen von Hydrazonen 10	118
6.4 Ausblick	120

7. Vanadium-katalysierte Dehydrierung von <i>N</i>-Heterozyklen in Wasser	121
7.1 Stand der Wissenschaft.....	121
7.1.1 Bedeutung von Chinolinen	121
7.1.2 Methoden zur Dehydrierung von <i>N</i> -Heterozyklen	122
7.1.3 Vanadium-Katalyse	124
7.2 Motivation und Zielsetzung	127
7.3 Ergebnisse und Diskussion	129
7.3.1 Katalysator-Screening	129
7.3.2 Einfluss des Reaktionsgefäßes auf die Dehydrierung des Amins 14a	131
7.3.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen	132
7.3.3.1 Optimierung der Katalysator- und Substratbeladung.....	132
7.3.3.2 Untersuchung des Einflusses von Tensiden und Cosolventien	134
7.3.3.3 Einfluss der Reaktionszeit unter Luftatmosphäre	135
7.3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Oxidationsmitteln	136
7.3.4 Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (14a) im 1 mmol Maßstab	138
7.3.5 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Vanadium-katalysierten Dehydrierung	139
7.3.6 Erweiterung des Substratspektrums	141
7.4 Ausblick	143
8. Zusammenfassung	144
9. Abstract	148
10. Experimenteller Teil	152
10.1 Allgemeine chemische Methoden	152
10.2 Allgemeine biochemische Methoden und verwendete Lösungen	155
10.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Transformation von Plasmiden.....	159
10.2.2 AAV2: Expression von Iminreduktasen	159
10.2.2.1 Expression in TB-Medium	159
10.2.2.2 Expression in Autoinduktions-Medium	159
10.2.3 AAV3: Gefriertrocknen von Zellen	160
10.2.4 AAV4: Zellaufschluss und Gewinnung des Zellrohextrakts	160
10.2.5 AAV5: Bradford-Assay	160
10.2.6 AAV6: SDS-PAGE.....	160
10.2.7 AAV7: Spektrophotometrische Bestimmung der IRED-Aktivität in Mikrotiterplatten.....	161
10.2.8 AAV8: Spektrophotometrische Bestimmung der GDH-Aktivität	162
10.3 Übersicht der verwendeten Iminreduktasen	163
10.3.1 Überprüfung der Überexpression der Iminreduktasen per SDS-PAGE.....	164

10.4	Optimierung und Prozessentwicklung Iminreduktase-katalysierter Reaktionen	165
10.4.1	Analytik.....	165
10.4.2	Aufreinigung der IRED20 per Ni-NTA.....	166
10.4.3	Einleitende Biotransformationen	167
10.4.4	Reaktionsparameterscreening zur Optimierung der Reaktionsbedingungen	167
10.4.4.1	Variation der Reaktionsparameter in Biotransformationen	167
10.4.4.2	Thermofluor-Assay	169
10.4.5	Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante	170
10.4.6	Untersuchungen von Substratinhibierung bzw. -deaktivierung	171
10.4.7	Untersuchungen von Produktinhibierung bzw. -deaktivierung	171
10.4.8	Konstruktion der Ganzzell-Katalysatoren	172
10.4.8.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	172
10.4.8.2	Restriktionsverdau	173
10.4.8.3	Ligation	173
10.4.8.4	Plasmidpräparation.....	174
10.4.8.5	Probeverdau	174
10.4.9	Evaluierung der Ganzzell-Konstrukte.....	174
10.4.10	Cosolventien-Screening	175
10.4.11	Prozessentwicklung.....	176
10.5	Biokatalytische Reduktion <i>S</i> - und <i>O</i> -haltiger zyklischer Imine.....	177
10.5.1	Synthese von Substraten.....	177
10.5.1.1	AAV9: α -Chlorierung von Aldehyden und Ketonen	177
10.5.1.1.1	2-Chlor-2-methylpropanal.....	177
10.5.1.1.2	3-Chlor-3-methyl-2-butanon	178
10.5.1.1.3	2-Chlor-2-methylpropiophenon.....	178
10.5.1.2	AAV10: Synthese von 3-Thiazolinen 3	179
10.5.1.2.1	2,2-Dimethyl-3-thiazolin (3a)	179
10.5.1.2.2	2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolin (3b)	179
10.5.1.2.3	2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (3c)	180
10.5.1.2.4	2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolin (3d)	180
10.5.1.2.5	3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (3e)	181
10.5.1.2.6	2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (3f)	181
10.5.1.3	AAV11: Synthese von 2 <i>H</i> -1,4-Benzothiazinen 5	182
10.5.1.3.1	2,2-Dimethyl-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazin (5a).....	182
10.5.1.3.2	2,2,3-Trimethyl-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazin (5b)	183
10.5.1.3.3	2,2-Dimethyl-3-phenyl-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazin (5c)	183
10.5.1.4	Synthese von 2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazinen 7	184

10.5.1.4.1	3-Phenyl-2 <i>H</i> -benzoxazin (7a)	184
10.5.1.4.2	1-(2,3-Difluor-6-nitrophenoxy)propan-2-on	184
10.5.1.4.3	7,8-Difluoro-3-methyl-2 <i>H</i> -benzoxazin (7b)	185
10.5.2	Versuche zur chemischen Reduktion von 3-Thiazolinen.....	186
10.5.2.1	Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid	186
10.5.2.2	Reduktion mit DIBAL	186
10.5.2.3	Reduktion mit Natriumborhydrid	186
10.5.2.4	Reduktion mit NaB(Boc-Pro) ₃ H.....	187
10.5.2.5	Reduktionen mit Hantzsch-Ester	187
10.5.2.6	Reduktion mit Palladium auf Aktivkohle.....	188
10.5.2.7	Reduktion mit Zinkstaub	188
10.5.3	Synthese von Referenzverbindungen.....	189
10.5.3.1	AAV12: Synthese von 3-Thiazolidinen 4	189
10.5.3.1.1	2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolidin (4b).....	189
10.5.3.1.2	<i>rac</i> -2,2,4-Trimethyl-3-thiazolidin (<i>rac</i> - 4c)	189
10.5.3.1.3	<i>rac</i> -2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolidin (<i>rac</i> - 4d)	190
10.5.3.1.4	<i>rac</i> -3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (<i>rac</i> - 4e)	190
10.5.3.1.5	<i>rac</i> -2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (<i>rac</i> - 4f) .	191
10.5.3.2	AAV13: Synthese von 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazinen 6	191
10.5.3.2.1	2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazin (6a)	191
10.5.3.2.2	<i>rac</i> -2,2,3-Trimethyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazin (<i>rac</i> - 6b)	192
10.5.3.2.3	2,2-Dimethyl-3-phenyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazin (<i>rac</i> - 6c)	192
10.5.3.3	Synthese von 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazinen 8	193
10.5.3.3.1	<i>rac</i> -3-Phenyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzoxazin (<i>rac</i> - 8a).....	193
10.5.3.3.2	<i>rac</i> -7,8-Difluor-3-methyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -benzoxazin (<i>rac</i> - 8b)	194
10.5.4	Analytik.....	194
10.5.4.1	Umsatzbestimmung von 3-Thiazolinen 3b-f	194
10.5.4.2	AAV14: Derivatisierung von 3-Thiazolidinen 4 mit Phenylisocyanat....	196
10.5.4.2.1	<i>rac</i> -2,2,4-Trimethyl- <i>N</i> -phenylthiazolidin-3-carboxamid (<i>rac</i> - 9c)	197
10.5.4.2.2	<i>rac</i> -2,2,4,5,5-Pentamethyl- <i>N</i> -phenylthiazolidin-3-carboxamid (<i>rac</i> - 9d)	197
10.5.4.2.3	<i>rac</i> -3-Methyl- <i>N</i> -phenyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan-4- carboxamid (<i>rac</i> - 9e)	198

10.5.4.2.4	<i>rac</i> -2,2,3-Trimethyl- <i>N</i> -phenyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan-4-carboxamid (<i>rac</i> - 9f).....	198
10.5.4.3	Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von 3-Thiazolidinen.....	199
10.5.4.4	Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses von 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzothiazinen 6a-c	199
10.5.4.5	Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses von 3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazinen 8a-b	201
10.5.5	AAV15: Expression der IREDs in Deep-Well-Platten.....	203
10.5.6	AAV16: Kolorimetrischer pH-Shift-Assay.....	203
10.5.7	Spektrophotometrischer Aktivitätsassay	204
10.5.8	Biotransformationen von 3-Thiazolinen 3b-f	206
10.5.9	Präparative Biotransformation von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (3f).....	207
10.5.10	Biotransformationen 2-monosubstituierter 3-Thiazoline	208
10.5.10.1	Biotransformation von <i>rac</i> - 3h und chemische Reduktion zur Bestimmung des stereochemischen Reaktionsverlaufs der biokatalytischen Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline	208
10.5.10.2	Semipräparative Biotransformation von <i>rac</i> -2-Isopropyl-5,5-dimethyl-3-thiazolin (<i>rac</i> - 3g).....	209
10.5.11	Biotransformationen von 2 <i>H</i> -1,4-Benzothiazinen 5a-c	209
10.5.12	Aufreinigung der IRED08 und Stabilitätstest für die Kristallisationsexperimente	210
10.5.12.1	Aufreinigung der IRED08.....	210
10.5.12.2	Stabilitätstest der IRED08	212
10.5.12.3	Stabilitätstest der IRED08 in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren	212
10.5.13	Biotransformationen von 2 <i>H</i> -1,4-Benzoxazinen	213
10.5.14	Präparative Biotransformation von 3-Phenyl-2 <i>H</i> -benzoxazin (7a) ..	214
10.6	Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse in Eintopf-Synthesen	215
10.6.1	Analytik.....	215
10.6.2	Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse durch Kompartimentierung der Reaktionsschritte	216
10.6.2.1	Herstellung von PDMS-Hülsen.....	216
10.6.2.2	Synthese des 3-Thiazolins 3f in unterschiedlichen Reaktortypen ..	217
10.6.2.3	Studien zur Diffusions-Effizienz.....	217
10.6.2.4	Studien zur biokatalytischen Reduktion des 3-Thiazolins 3f	218
10.6.2.5	Kompartimentierte Eintopf-Synthese	219
10.6.3	Sequentielle Eintopf-Synthese zur Darstellung eines 3-Thiazolidins	220

10.6.3.1	Studien der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion im 4.5 mmol Maßstab	220
10.6.3.2	Biokatalytische Reduktion in Gegenwart der Edukte der Asinger-Reaktion	220
10.6.3.3	Sequentielle Eintopf-Synthese	221
10.7	Biokatalytische Reduktion von Iminen mit zusätzlichen Stickstoffatomen	222
10.7.1	Synthese von Hydrazonen 10	222
10.7.1.1	(1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (10a)	222
10.7.1.2	(2,3-Dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-yliden)hydrazin (10b)	222
10.7.2	Versuch zur Synthese der Referenzverbindungen 11	223
10.7.2.1	AAV17: Chemische Reduktion mit Boran-Trimethylamin Komplex.	223
10.7.2.1.1	<i>rac</i> -1-(3-Chlorphenyl)ethanol	223
10.7.2.1.2	<i>rac</i> -1-Indanol	224
10.7.3	Charakterisierung der gebildeten Azine 12	224
10.7.3.1	(1 <i>E</i> ,2 <i>E</i>)-1,2-Bis(1-(3-chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (12a)	224
10.7.3.2	(1 <i>E</i> ,2 <i>E</i>)-1,2-Bis(2,3-dihydroinden-1-yliden)hydrazin (12b)	225
10.7.4	Untersuchung der hydrolytischen Stabilität der Hydrazone	225
10.7.5	Analytik	226
10.7.5.1	AAV18: Acylierung von Hydrazonen 10	226
10.7.5.1.1	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)acetohydrazid (13a) ...	226
10.7.5.1.2	(<i>E</i>)- <i>N</i> -(2,3-Dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-yliden)acetohydrazid (13b)	226
10.7.5.2	Bestimmung des Umsatzes von Hydrazonen 10 zu Azinen 12	227
10.7.6	Kolorimetrischer pH-Shift-Assay	227
10.7.7	Spektrophotometrischer Aktivitätsassay	228
10.7.8	Biotransformationen von Hydrazonen 10	229
10.8	Vanadium-katalysierte Dehydrierung von <i>N</i> -Heterozyklen in Wasser	229
10.8.1	Analytik	229
10.8.2	Synthese der Vanadium-Komplexe	229
10.8.2.1	Vanadium-Komplex (<i>S</i>)- D	230
10.8.3	Katalysator-Screening	230
10.8.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Dehydrierung von 14a	231
10.8.5	AAV19: Dehydrierung mit dem Vanadium-Komplex (<i>S</i>)- D	232
10.8.6	Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (14a) im 1 mmol Maßstab	233
10.8.7	Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus	233
10.8.7.1	Dehydrierung von 14a unter inerten Bedingungen	233
10.8.7.2	Untersuchung zur Bildung von Wasserstoffperoxid als Kupplungsprodukt	234

10.8.8 Erweiterung des Substratspektrums der Dehydrierung mit Vanadium-Komplex (S)-D	234
11. Anhang – Studien zur oxidativen Kupplung monozyklischer Phenole	236
11.1 Einleitung	236
11.2 Ergebnisse und Diskussion	237
11.2.1 Substratsynthesen	237
11.2.2 Oxidative Kupplung monozyklischer Phenole	238
11.2.2.1 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (20a)	239
11.2.2.2 Oxidative Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (20b)	240
11.2.2.3 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (20c)	240
11.2.2.4 Oxidative Kupplung von 2,5-Dimethylphenol (20d)	241
11.2.2.5 Oxidative Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (20e)	241
11.3 Experimenteller Teil	244
11.3.1 Substratsynthesen	244
11.3.1.1 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (20b)	244
11.3.1.2 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (20c)	245
11.3.2 Oxidative Kupplung monozyklischer Phenole	245
11.3.2.1 AAV20: Oxidative Kupplung zur Synthese racemischer Referenzen	245
11.3.2.1.1 <i>rac</i> -4,4',6,6'-Tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (<i>rac</i> - 21a)	246
11.3.2.1.2 <i>rac</i> -3,3'-Diallyl-4,4',6,6'-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (<i>rac</i> - 21b)	246
11.3.2.1.3 <i>rac</i> -4,4',6,6'-Tetramethyl-3,3'-dipropyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (<i>rac</i> - 21c)	247
11.3.2.1.4 <i>rac</i> -3,3',4,4',6,6'-Hexamethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (<i>rac</i> - 21e)	247
11.3.2.2 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (20a)	247
11.3.2.3 Oxidative Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (20b)	248
11.3.2.4 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (20c)	249
11.3.2.5 Oxidative Kupplung von 2,5-Dimethylphenol (20d)	249
11.3.2.6 Oxidative Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (20e)	250
12. Anhang – Gen-, Proteinsequenzen und Plasmidkarten	251
12.1 Iminreduktasen	251
12.2 Glucose-Dehydrogenase	265
12.3 Ganzzell-Katalysatoren	266
13. Abkürzungsverzeichnis	267
14. Literaturverzeichnis	270

1. EINLEITUNG

Stickstoff-Heterozyklen gehören zu den bedeutendsten pharmazeutischen Strukturelementen und waren im Jahr 2014 in 59% aller von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen niedermolekularen Arzneimitteln (*small-molecule drugs*) als Struktur motive präsent.^[1] Durchschnittlich enthält jeder Arzneistoff 2.3 Stickstoffatome und die Arzneimittel, die mindestens einen Stickstoff-Heterozyklus enthalten, weisen mit durchschnittlich 3.1 Stickstoffatomen pro Arznei sogar mehr Stickstoffatome auf.^[1] Diese Zahlen legen eindrucksvoll die Bedeutung von Stickstoff-Heterozyklen für die pharmazeutische Industrie dar, von denen einige ausgewählte Beispiele in Abbildung 1.1 dargestellt sind.^[2]

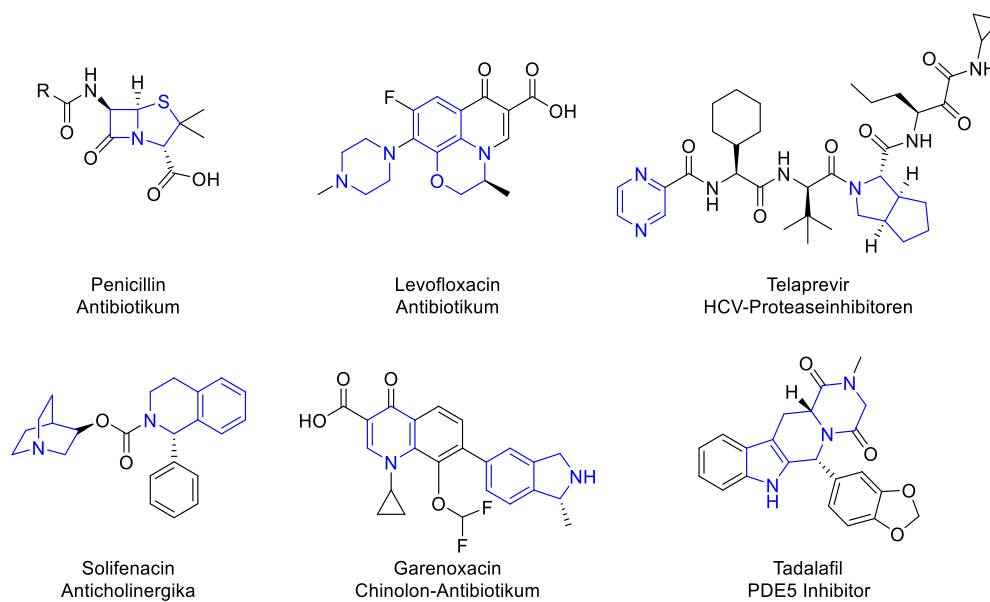


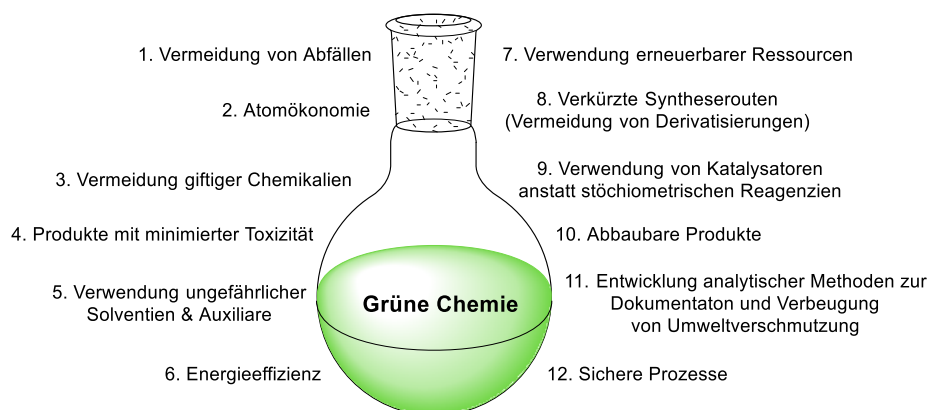
Abbildung 1.1. Ausgewählte Pharmazeutika, die mindestens einen Stickstoff-Heterozyklus enthalten

Die Notwendigkeit der Etablierung von nachhaltigen Syntheserouten unter anderem auch zur Darstellung von Stickstoff-Heterozyklen wird deutlich, wenn man sich mit der Umweltbelastung beschäftigt, die durch die chemische Industrie entsteht. Der *Environmental-Factor* (*E-Faktor*) gibt die Abfallmasse (in kg) pro kg Produkt an und wurde von Sheldon im Zuge der Etablierung der „Grünen Chemie“ entwickelt.^[3] Je höher der *E-Wert* für einen chemischen Prozess ist, desto höher ist die Menge an Abfall, die hierbei entsteht und so höher ist entsprechend der negative Einfluss auf die Umwelt. Bei der Berechnung des *E-Faktors* wird Wasser als wiederverwendbares Solvens außer Acht gelassen.^[3] Die Darstellung der *E-Faktoren* aufgeteilt auf die chemischen Industriesegmente zeigt, dass im Bereich der Herstellung von Pharmazeutika und Feinchemikalien eine Reduktion des Abfalls erforderlich ist, um die Prozesse „grüner“ und nachhaltiger zu gestalten (Tabelle 1.1).^[3-6]

Tabelle 1.1. *E*-Faktoren in der chemischen Industrie^[3-6]

Industriesegment	Produktion [t a ⁻¹]	E-Faktor [kg _{Abfall} kg _{Produkt} ⁻¹]
Öl-Raffination	10 ⁶ -10 ⁸	< 0.1
Bulkchemikalien	10 ⁴ -10 ⁶	< 1-5
Feinchemikalien	10 ² -10 ⁴	5-50
Pharmazeutika	10-10 ³	25-(> 100)

Der Begriff der „Grünen Chemie“ wurde 1991 von Anastas und Kollegen für die US-amerikanische Umweltschutzbehörde EPA (*United States Environmental Protection Agency*) geprägt. Die Anforderungen an eine grüne Synthese wurden hierbei in den „12 Prinzipien der Grünen Chemie“ zusammengefasst (Abbildung 1.2).^[4,7-9]

**Abbildung 1.2.** Die 12 Prinzipien der Grünen Chemie^[4,7-9]

Das Konzept der Grünen Chemie wurde in den vergangenen Jahrzehnten sowohl von der chemischen Industrie, als auch von akademischen Arbeitsgruppen aufgegriffen. Über die Etablierung von Reaktionen und Prozessen, die den Anforderungen der Grünen Chemie entsprechen, kann somit die Nachhaltigkeit gefördert werden.^[4,5,7-9] Eine Vielzahl moderner Katalyse- und Synthesemethoden bzw. die Verknüpfung mehrerer solcher Reaktionen eignen sich zur Entwicklung nachhaltiger Syntheserouten.

Die Biokatalyse stellt eine moderne Katalysmethode dar, die viele der Kriterien, die an die Grüne Chemie gestellt werden, erfüllt. Aufgrund ihrer hohen Chemo-, Regio- und Stereoselektivität sind Enzyme geeignete Katalysatoren, die in der Regel keine Schutzgruppenchemie und Aktivierung funktioneller Gruppen erfordern. Enzyme arbeiten zudem unter milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, Atmosphärendruck, wässriges Solvens), werden aus einer erneuerbaren Ressource gewonnen und sind abbaubar.^[10] Ein eindrucksvolles Beispiel einer industriellen Anwendung der Biokatalyse im Pharmabereich ist die Optimierung der Sitagliptin-Synthese von Merck und Codexis, die 2010 von der EPA mit dem *Greener Reaction Conditions Award* ausgezeichnet wurde.^[11] Der ursprüngliche Prozess zur Darstellung von Sitagliptin, das zur Behandlung von Diabetes

Typ 2 eingesetzt wird, wies mit einer Hochdruck-Hydrierung bei 17 bar unter Einsatz eines Rhodium-Katalysators, eines Kristallisationsschrittes zur Aufreinigung und der Notwendigkeit zur Abreicherung des Rhodiums Nachteile auf. Merck und Codexis entwickelten gemeinsam eine optimierte (*R*)-selektive Transaminase für die Überführung des Ketons in das entsprechende enantiomerenreine Amin als biokatalytische Alternative zur Hydrierung und konnten somit die Abfallmenge um 19% reduzieren und die Produktivität des Prozesses um 53% erhöhen^[11-14] (siehe Kapitel 3.1.3). Die Biokatalyse zeigt zudem den Erfolg der Verzahnung verschiedener Wissenschaftsfelder wie Biologie, Biochemie und Chemie zur Etablierung nachhaltiger Syntheserouten auf. Hierbei ist insbesondere der Fortschritt im Bereich der *directed evolution* zur Optimierung von Proteinen zu nennen,^[15] auf dem Arnold Pionierarbeit leistete und dafür mit dem Nobelpreis für Chemie 2018 ausgezeichnet wurde.^[16,17]

Multikomponentenreaktionen (MCR) erfüllen ebenfalls eine Vielzahl der Anforderungen an eine Grüne Chemie. MCR weisen eine hervorragende Atomökonomie und Energieeffizienz auf, da sie die Darstellung eines Produktes aus mindestens drei Reaktanden in einem Schritt ermöglichen. Im Idealfall enthält dabei das Produkt einen Großteil bzw. im Idealfall alle Atome der Edukte.^[18] Mit Hilfe von Multikomponentenreaktionen kann somit einem Reaktionsschritt eine große strukturelle Diversität und molekulare Komplexität aufgebaut werden.^[18,19] Eine Vielzahl von MCRs kann zudem unter milden Reaktionsbedingungen in Gegenwart umweltfreundlicher Solventien durchgeführt werden.^[18]

Als weitere moderne Katalysmethode ist zudem die Vanadium-Katalyse zu nennen. Vanadium kommt in der Natur in demselben Maß vor wie Zink und weist eine relativ geringe Toxizität im Vergleich zu anderen Schwermetallen auf.^[20,21] Zudem ist Vanadium, das physiologisch von Vanadium-bindenden Proteinen in aquatischen tierischen Organismen akkumuliert wird,^[22] mit Proteinen kompatibel und eignet sich daher auch zur Kombination von Chemo- und Biokatalyse. Dies konnte bereits eindrucksvoll von der Arbeitsgruppe um Akai in einer dynamisch kinetischen Racematspaltung von sekundären Alkoholen gezeigt werden.^[23-26] Die positiven Eigenschaften des Metalls haben zudem dazu geführt, dass eine Vielzahl von Reaktionen unter Verwendung von Vanadium-Katalysatoren erfolgreich etabliert wurden.^[27] Der Arbeitsgruppe um Sasai gelang es bifunktionale, dinukleare Vanadiumkomplexe zu etablieren, welche die oxidative Kupplung von 2-Naphthol mit hoher Aktivität und Selektivität katalysieren.^[28-35] Über die Etablierung der oxidativen Kupplung von 2-Naphthol unter Verwendung der dinuklearen Vanadiumkomplexe in Wasser als umweltfreundliches Solvent^[36] wurde das Potential der Vanadium-Katalyse zur nachhaltigen Synthese verdeutlicht (siehe Kapitel 7.1.3).

2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Stickstoff-Heterozyklen sind insbesondere für die pharmazeutische Industrie von herausragender Bedeutung, sodass die Etablierung nachhaltiger Synthesemethoden sowohl akademisch zur Erweiterung von Synthese-Werkzeugen als auch industriell zur Einführung neuer Prozesse von großem Interesse ist. Insbesondere die Verzahnung verschiedener Wissenschaftsfelder wie Biochemie und Chemie als auch verschiedener Katalysemethoden weist großes Potential zur Etablierung nachhaltiger Syntheserouten auf. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von Stickstoff-Heterozyklen unter Einsatz nachhaltiger Synthese- und Katalysemethoden. Als Methoden kommen im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die Biokatalyse und Vanadium-Katalyse sowie Multikomponentenreaktionen im Rahmen der Heterozyklenchemie zur Darstellung der Edukte zum Einsatz (Abbildung 2.1).

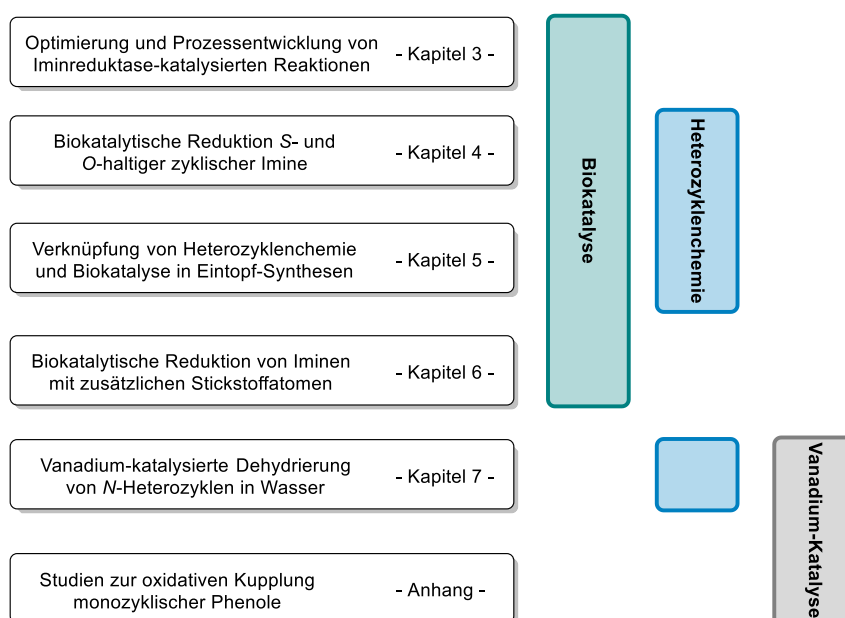


Abbildung 2.1. Gliederung der Arbeit unter Berücksichtigung der verwendeten Synthese- bzw. Katalysemethoden

Einen Einstieg in die Thematik der biokatalytischen Synthese von Stickstoff-Heterozyklen bietet die neue Klasse der Iminreduktasen (IREDs). Das Potential dieser Enzymklasse zur Darstellung zyklischer sowie azyklischer Amine konnte bereits gezeigt werden, wurde bis dato aber noch nicht ausgeschöpft. Insbesondere gab es zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Berichte zum Einsatz der Iminreduktasen im präparativen Maßstab.^[2] Im dritten Kapitel dieser Arbeit sollte daher die Optimierung und Prozessentwicklung Iminreduktase-katalysierter Reaktionen erfolgen. Am Beispiel eines zyklischen Imins sollte das Potential der IREDs zur Nutzung im präparativen Maßstab aufgezeigt werden (Abbildung 2.1).

Zyklische Amine mit zusätzlichen Heteroatomen wie Schwefel oder Sauerstoff stellen ebenfalls bedeutende Struktur motive dar, von denen insbesondere 3-Thiazolidine hervorzuheben sind. Eine elegante Methode zur enantioselektiven Darstellung dieser Heterozyklen stellt die Reduktion der entsprechenden zyklischen Imine dar, die jedoch im Falle der Reduktion von 3-Thiazolinen bisher nur mit moderaten Ausbeuten und geringen Enantioselektivitäten realisiert werden konnte. Daher sollte im vierten Kapitel dieser Arbeit die biokatalytische Reduktion schwefel- und sauerstoffhaltiger zyklischer Imine als Alternative zu chemischen Syntheserouten untersucht werden sowie die erste hoch enantioselektive Reduktion von 3-Thiazolinen etabliert werden (Abbildung 2.1).

Aufbauend auf der Etablierung einer biokatalytischen Methode zur enantioselektiven Reduktion von 3-Thiazolinen, beschäftigt sich das fünfte Kapitel dieser Arbeit mit der Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse in Eintopf-Prozessen. Im Rahmen dieses Projektes soll eine Variante der Asinger-Reaktion als Multikomponentenreaktion mit einer biokatalytischen Reduktion kombiniert werden, um aus einfachen und kostengünstigen Startmaterialien in einem Schritt eine wertvolle, enantiomerenreine Verbindung darzustellen (Abbildung 2.1).

Der Fokus im sechsten Kapitel der vorliegenden Arbeit liegt auf der Erweiterung des Substratspektrums zur biokatalytischen Darstellung zyklischer Amine mit zusätzlichen Heteroatomen. Aufgrund der Bedeutung von Pyrazolidinen und Hydrazinen als Struktur motive, sollte in initialen Experimenten die Eignung der etablierten biokatalytischen Methode zur Reduktion der azyklischen Analoga von 2-Pyrazolinen, den Hydrazonen, untersucht werden (Abbildung 2.1).

Eine alternative Methode zur Dehydrierung von *N*-Heterozyklen zur Darstellung von Chinolinen als bedeutende Struktur motive unter milden Reaktionsbedingungen sollte im siebten Kapitel dieser Arbeit unter Einsatz von Vanadium-Katalyse etabliert werden (Abbildung 2.1).

Im Anhang dieser Arbeit sind zudem die Ergebnisse der oxidativen Kupplung monozyklischer Phenole unter Anwendung von Vanadium-Katalyse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, zusammengefasst (Abbildung 2.1).

3. OPTIMIERUNG UND PROZESSENTWICKLUNG VON IMINREDUKTASE-KATALYSIERTEN REAKTIONEN

3.1 Stand der Wissenschaft

3.1.1 Bedeutung chiraler zyklischer Amine

Enantiomerenreine Bausteine sind in der Pharmaindustrie von fundamentaler Bedeutung. Dies lässt sich am Beispiel des Medikamentes Contergan verdeutlichen. Der Wirkstoff Thalidomid, der ein chirales Amin enthält, wurde im Ende der 1950er und in den 1960er Jahren unter dem Handelsnamen Contergan in racemischer Form als Schlaf- und Beruhigungsmittel vertrieben. Zu der damaligen Zeit war jedoch nicht bekannt, dass nur das (*R*)-Enantiomer des Thalidomids eine sedative Wirkung besitzt, wohingegen das (*S*)-Enantiomer eine teratogene Wirkung hat, die sich in Fehlbildungen bei Föten äußerte (Abbildung 3.1).^[37] Diese Entdeckung hatte zusammen mit Vorlagen der U.S. FDA sowie des Europäischen Ausschusses für Arzneispezialitäten einen enormen Bedarfsanstieg an enantioselektiven Syntheserouten zur Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen zur Folge.

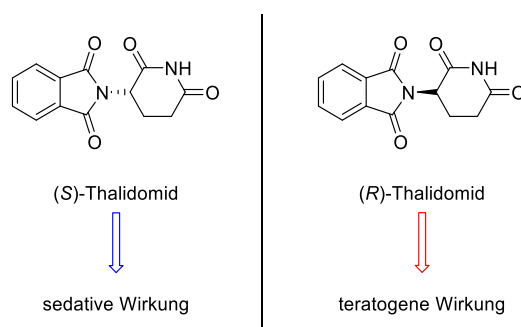


Abbildung 3.1. Übersicht der Enantiomere des Thalidomids und deren unterschiedliche Wirkung^[37]

Schätzungen zufolge enthalten heutzutage 40% aller *active pharmaceutical ingredients* (APIs) und 20% aller Agrochemikalien ein chirales Amin als Strukturmotiv.^[2,38] Eine Vielzahl von Pharmazeutika tragen zudem ein chirales zyklisches Amin als Strukturmotiv (Abbildung 3.2), sodass entsprechend die Etablierung von Syntheserouten zur Darstellung chiraler zyklischer Amine von großem Interesse ist. Die große Bedeutung von chiralen Aminen als Struktur motive kann dabei auf die hohe Dichte an Strukturinformation dieser funktionellen Gruppe zurückgeführt werden, die durch ihre Tendenz zur Bildung von Wasserstoffbindungen noch verstärkt wird.^[39]

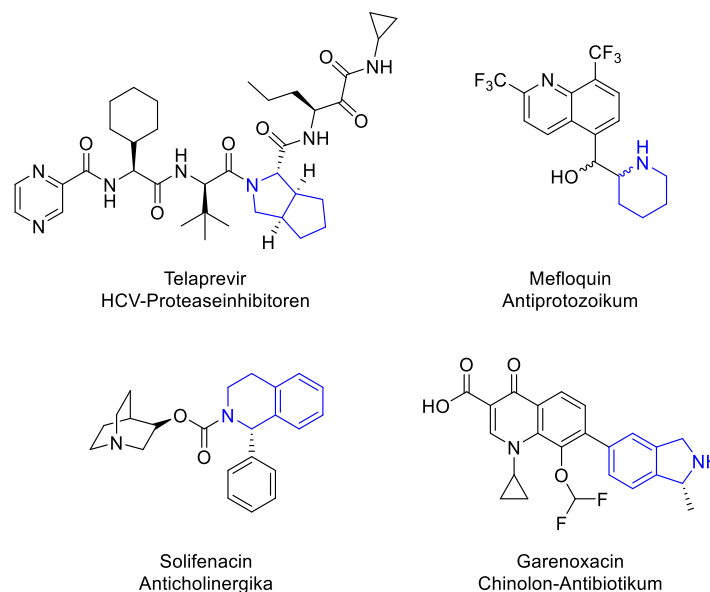


Abbildung 3.2. Ausgewählte Pharmazeutika, die ein chirales zyklisches Amin als Strukturmotiv enthalten (blau markiert)

3.1.2 Chemische Methoden zur enantioselektiven Darstellung von Aminen

Klassisch-chemische Methoden zur enantioselektiven Darstellung von Aminen umfassen insbesondere diastereomere Kristallisationen, enantioselektive Reduktionen von Iminen oder Enaminen, C-H-Insertionen und nukleophile Additionen (Abbildung 3.3).^[38,39]

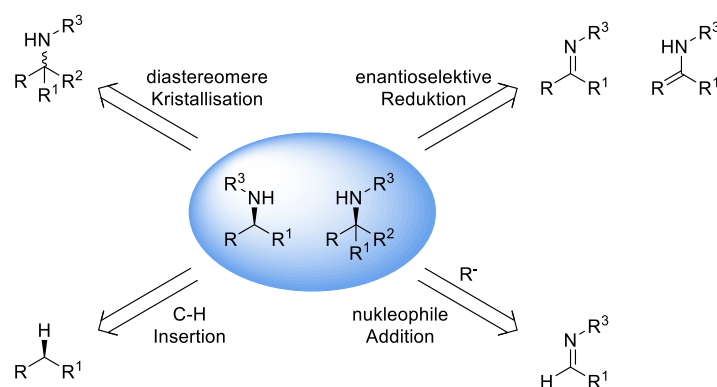
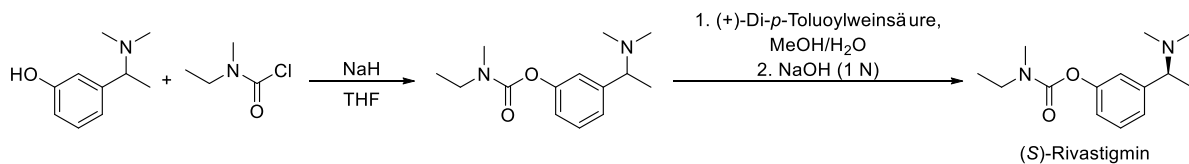


Abbildung 3.3. Chemokatalytische Synthesestrategien zur enantioselektiven Darstellung von Aminen^[38,39]

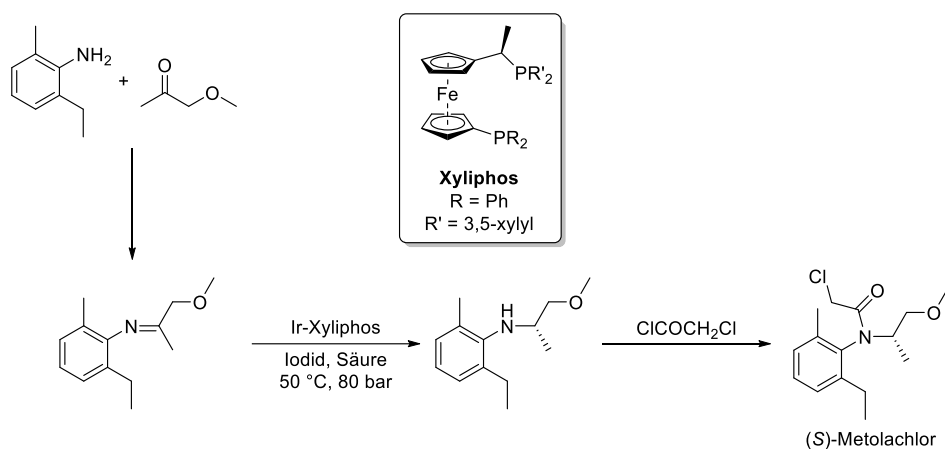
Bei der diastereomeren Kristallisation von Aminen werden chirale Carbonsäuren verwendet, welche die Amine in diastereomere Salze überführen. Die anschließende Auftrennung und Hydrolyse ermöglicht die Darstellung chiraler Amine. Die Limitierung dieser Methode ist die Begrenzung der Ausbeute auf maximal 50%.^[38] Ein bekanntes Beispiel der diastereomeren Kristallisation ist die Darstellung des Antidementivums (S)-Rivastigmin ausgehend von dem racemischen Amin. Das gewünschte (S)-Enantiomer

des Rivastigmins wird durch Kristallisation mit (+)-Di-*p*-Toluoylweinsäure, Trennung der diastereomeren Salze und anschließende Freisetzung des Amins erhalten (Schema 3.1).^[40]



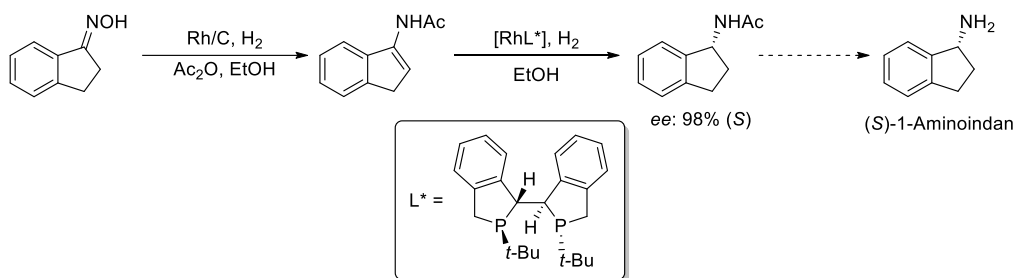
Schema 3.1. Diastereomere Kristallisation zur Darstellung von (S)-Rivastigmin^[40]

Eine weitere chemische Methode zur Darstellung chiraler Amine ist die Hydrierung von Iminen mittels Übergangsmetallkatalysatoren. Der wohl bekannteste Prozess hierbei ist die Darstellung des Herbizids Metolachlor, der im Multitausend-Tonnen-Maßstab durchgeführt wird (Schema 3.2).^[41-44]



Schema 3.2. Prozess zur Darstellung von (S)-Metolachlor^[41,42]

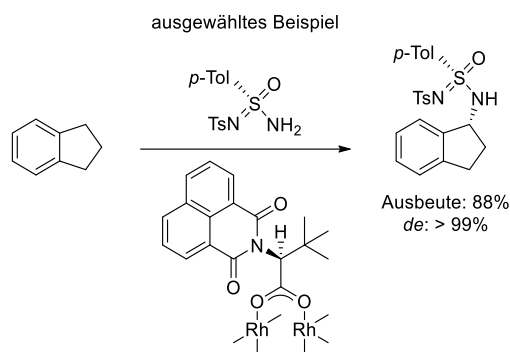
Die Hydrierung von Enamiden kann ebenfalls zur Darstellung chiraler Amine genutzt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Synthese von (S)-1-Aminoindan durch Hydroacylierung des Ketoxims und anschließende Reduktion des *N*-Acetylenamids durch Rhodium-Katalyse (Schema 3.3).^[45]



Schema 3.3. Synthese von (S)-1-Aminoindan durch Rhodium-katalysierte Reduktion des *N*-Acetylenamids^[45]

Die C-H-Insertion ermöglicht die direkte Umwandlung einer C-H-Bindung in eine C-N-Bindung und ist eine weitere Methode zur chemischen Darstellung chiraler Amine.^[46] Liang *et al.* nutzten Sulfonimidamide als Stickstoffquelle in Kombination mit einem chiralen

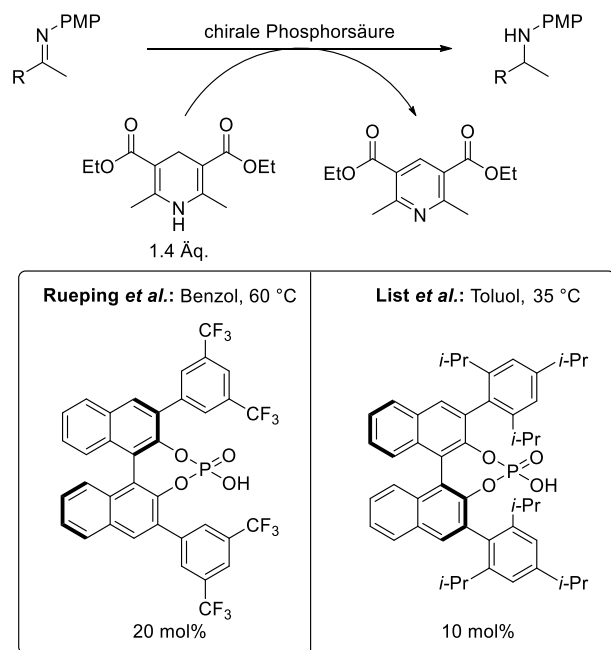
Rhodium-Kataysator und konnten die Produkte der C-H-Aminierung in guten bis exzellenten Diastereoselektivitäten erhalten (am Beispiel von Indan, siehe Schema 3.4).^[47]



Schema 3.4. C-H-Insertion am Beispiel des Indans unter Einsatz eines Sulfonimidamids und einem chiralen Rhodium-Katalysator^[47]

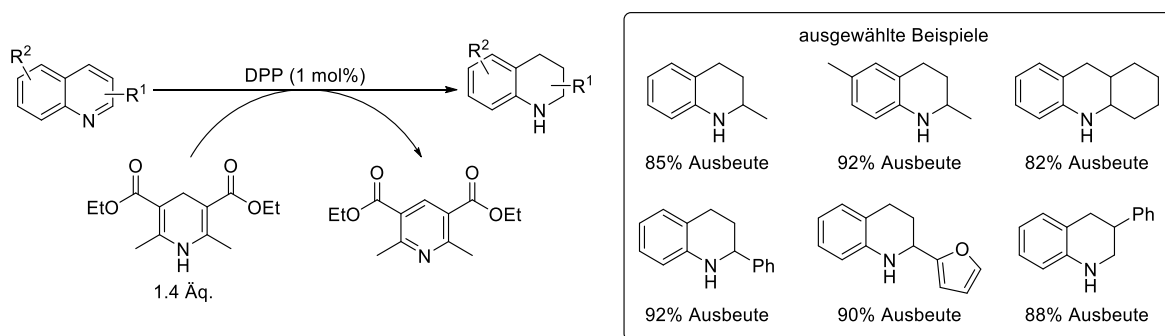
Die Hydroaminierung von Alkenen und Alkinen ist ebenfalls eine Möglichkeit zur enantioselektiven Darstellung von Aminen, welche aufgrund der Simplizität der Edukte interessant ist und somit aus atomökonomischer Sicht eine hervorragende Bilanz aufweist.^[48-50]

Eine organokatalytische Methode zur enantioselektiven Reduktion von Iminen ist die biomimetische Reduktion mittels Hantzsch-Ester (HEH) als Analoga natürlicher Cofaktoren wie NADH, NADPH und FADH₂ und Brønsted-Säuren als Katalysatoren.^[51-55] Ein Nachteil in der Verwendung des Hantzsch-Esters gegenüber natürlich vorkommender Cofaktoren ist, dass dieser nicht regeneriert werden kann und daher in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden muss. Bereits 1989 publizierten Singh *et al.* die enantioselektive Reduktion von Iminen unter Einsatz von Hantzsch-Ester und Brønsted-Säuren mit moderaten Enantioselektivitäten (bis zu 63% *ee*).^[56] Rueping *et al.* berichteten 2005 die enantioselektive Reduktion von Ketiminen unter Einsatz chiraler binolischer Phosphorsäuren in Kombination mit Hantzsch-Ester als Hydridquelle. In dieser Arbeit konnten die Autoren eine Reihe *p*-Methoxyphenyl (PMP)-geschützter Arylmethylketimine unter Einsatz von 20 mol% der chiralen Phosphorsäure in moderaten bis guten Ausbeuten (46-91%) und Enantioselektivitäten (70-84% *ee*) zu den entsprechenden Aminen reduzieren (Schema 3.5).^[57] Parallel gelang der Arbeitsgruppe um List mit 10 mol% einer modifizierten chiralen Phosphorsäure ebenfalls die Reduktion PMP-geschützter Ketimine unter milderer Bedingungen mit guten Ausbeuten (80-98%) und Enantioselektivitäten (80-93%) (Schema 3.5).^[58]



Schema 3.5. Reduktion PMP-geschützter Ketimine mit Hantzsch-Ester und chiralen Phosphorsäuren als Katalysator^[57,58]

Im Jahr 2010 berichtete die Arbeitsgruppe um Wang die enantioselektive Reduktion von ungeschützten *ortho*-Hydroxyarylalkylketiminen mit Hantzsch-Estern^[59] und kurz darauf die Reduktion von *N*-3,4,5-Trimethoxyphenyl (TMP) geschützten *ortho*-Hydroxybenzophenonketiminen.^[60] Unabhängig voneinander berichteten die Arbeitsgruppen um You und Antilla die Reduktion von α -Iminestern mit Hantzsch-Estern.^[61,62] Der Arbeitsgruppe um Antilla gelang es zudem das Substratspektrum um *N*-Acetyl-geschützte Imine zu erweitern, die als Schutzgruppe im Vergleich zur PMP-Gruppe einfacher abgespalten werden kann.^[63] Darüber hinaus eignen sich Hantzsch-Ester zur reduktiven Aminierung.^[58,64–68] Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Darstellung zyklischer Amine durch Reduktion unter Einsatz des Hantzsch-Esters als Hydridquelle.^[51,52,54,55] So gelang es Rueping *et al.* unter Verwendung von Diphenylphosphat (DPP) als Brønsted-Säure Chinoline mit guten Ausbeuten zu den entsprechenden Tetrahydrochinolinen zu reduzieren (Schema 3.6).^[55]



Schema 3.6. Brønsted-Säure-katalysierte Transferhydrierung von Chinolinen^[55]

Die organokatalytische Transferhydrierung eignet sich zudem zur Reduktion *S*- und *O*-haltiger zyklischer Imine, die in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben ist.

3.1.3 Biokatalytische Methoden zur enantioselektiven Darstellung von Aminen

Neben den erwähnten chemokatalytischen Methoden zur Darstellung chiraler Amine, gewinnen biokatalytische Methoden zur Synthese chiraler Amine zunehmend an Bedeutung. Die Vorteile der Biokatalyse, die bereits in Kapitel 1 erläutert wurden, machen den Einsatz der biokatalytischen Methoden besonders im Pharmabereich attraktiv.^[69] Zur Darstellung primärer Amine eignen sich insbesondere Lipasen, Amin-Dehydrogenasen, ω -Transaminasen und Ammoniak-Lyasen, die im Folgenden erläutert werden (Abbildung 3.4). Darüber hinaus können auch Iminreduktasen und Amin-Oxidasen zur Synthese primärer Amine verwendet werden.

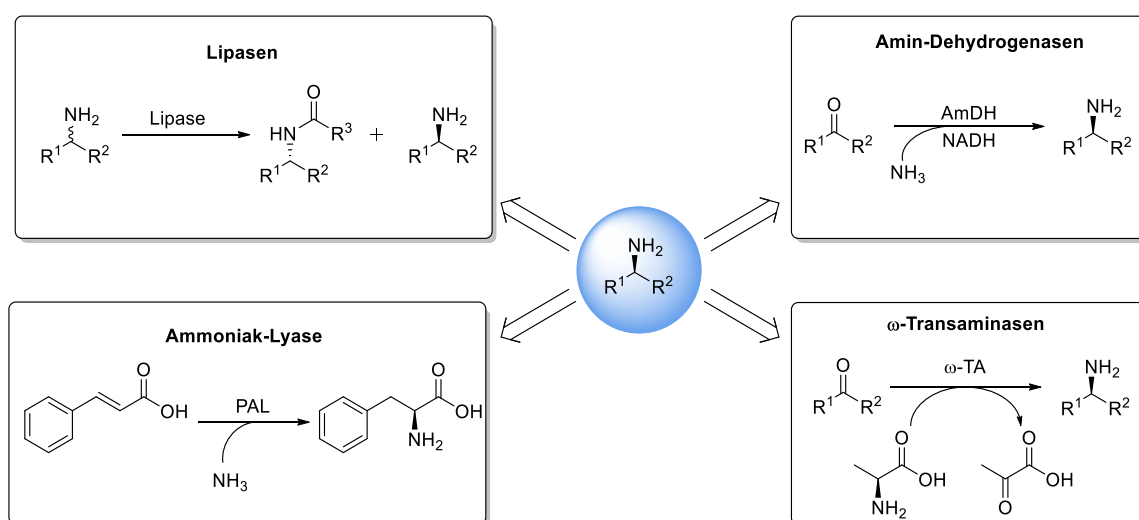
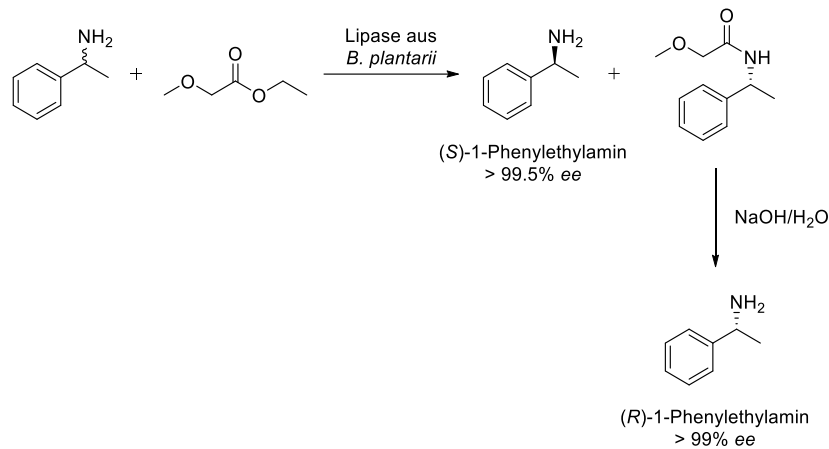


Abbildung 3.4. Übersicht der bedeutendsten biokatalytischen Routen zu primären Aminen^[2,38]

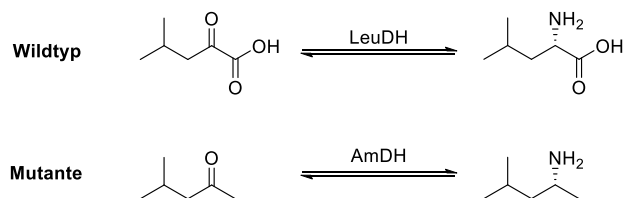
Lipasen gehören zur Klasse der Hydrolasen und katalysieren eine Bildung bzw. Spaltung eines Esters oder Amids. Da es sich bei dieser Reaktion um eine kinetische Racematspaltung handelt, bei der nur ein Enantiomer umgesetzt wird, beträgt die Ausbeute maximal 50% (Abbildung 3.4).^[38] Im industriellen Bereich finden Lipasen bereits seit den 1990er Jahren Verwendung. Ein bekanntes Beispiel ist die Produktion enantiomerenreiner chiraler Amine von BASF, die im Tonnen-Maßstab durchgeführt wird.^[70] Unter Verwendung der Lipase aus *Burkholderia plantarii* wird in einem Schritt das racemische 1-Phenylethylamin mit Ethylmethoxyacetat zum (*R*)-Amid umgesetzt, wodurch das (*S*)-1-Phenylethylamin in exzellenter Enantioselektivität erhalten wird. Nach Abtrennung des Amids und anschließender Hydrolyse im Basischen wird auch das (*R*)-Enantiomer des 1-Phenylethylamins mit exzellenter Enantioselektivität erhalten.

(Schema 3.7).^[70] Ein weiterer Vorteil dieses Prozesses ist das weitgefächerte Substratspektrum der Lipase, sodass derselbe Prozess auch zur Darstellung anderer enantiomerenreiner Amine verwendet werden kann.^[70]



Schema 3.7. Von BASF patentierte Darstellung der enantiomerenreinen Amine (S)-1-Phenylethylamin und (R)-1-Phenylethylamin unter Einsatz der Lipase aus *B. plantarii*^[70]

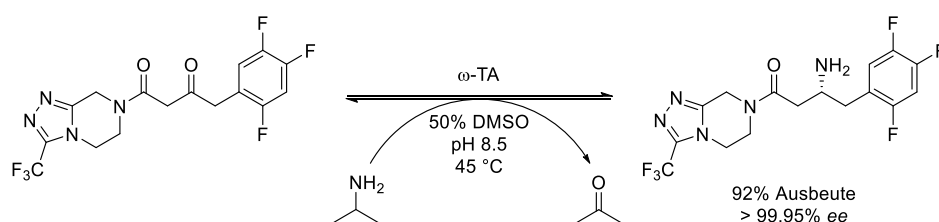
Eine weitere Enzymklasse zur Darstellung chiraler, primärer Amine sind die NADH-abhängigen Amin-Dehydrogenasen (AmDH), die enantioselektiv die reduktive Aminierung von Ketonen katalysieren (Schema 3.8). Anfang 2000 beschrieben Itoh *et al.* eine natürlich vorkommende Amin-Dehydrogenase aus *Streptomyces virginiae*, die sich zur reduktiven Aminierung einer Reihe aliphatischer und aromatischer Ketone eignet, allerdings nur geringe Enantioselektivitäten aufweist.^[71] Die Arbeitsgruppe um Bommarius entwickelte ausgehend von Aminosäure-Dehydrogenasen, welche die oxidative Desaminierung der Aminosäure und die reduktive Aminierung der entsprechenden α -Ketosäure katalysieren,^[72] unter Anwendung des *combinatorial active-site saturation test* (CAST)^[73] Amin-Dehydrogenasen. Mit diesem Ansatz gelang es Bommarius und seinen Kollegen ausgehend von der Leucin-Dehydrogenase aus *Bacillus stercorophilus* eine (R)-selektive Amin-Dehydrogenase zu generieren, die Methylisobutylketon als Analoga des Leucins mit hoher Aktivität und Selektivität reduktiv aminierte (Schema 3.8).^[74]



Schema 3.8. Vergleich der Wildtyp-Reaktion (Leucin-Dehydrogenase) und Reaktion der erzeugten Amin-Dehydrogenase.^[74]

In Folgeexperimenten gelang es der Gruppe zudem eine Phenylalanin-Dehydrogenase aus *Bacillus badius* durch Einführung von zwei Punktmutationen (K77M/N276V) in eine Amin-Dehydrogenase zu überführen, die *p*-Fluorphenylacetone als Substrat akzeptiert.^[75]

ω -Transaminasen (ω -TA) stellen eine weitere bedeutungsvolle Enzymklasse zur Darstellung primärer Amine dar, welche die Umsetzung von Ketonen zu primären Aminen durch Übertragung der Aminogruppe von einem Aminodonor auf ein Keton katalysieren (Abbildung 3.4). Transaminasen sind Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) abhängig, welches als intermediärer Aminakzeptor fungiert.^[76,77] Bei der Übertragung der Aminogruppe stehen Aminodonor, Aminakzeptor, Produkt und Nebenprodukt im Gleichgewicht, sodass dieses zum Erreichen guter Umsätze auf die Produktseite verschoben werden muss. Eine Möglichkeit hierzu ist der Einsatz von L-Alanin als Aminodonor, das in der Transaminierungsreaktion in Pyruvat überführt wird und dem Gleichgewicht über eine Lactat-Dehydrogenase (LDH) entzogen werden kann. Die LDH ist wiederum NADH-abhängig, dass über ein weiteres Enzym, beispielsweise eine Glucose-Dehydrogenase (GDH) regeneriert werden muss. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Isopropylamin als Aminodonor, das in der Transaminierungsreaktion in Aceton überführt wird, durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann und so das Gleichgewicht auf die Produktseite verschiebt.^[76-78] Ein bekanntes Beispiel für die Anwendung einer Transaminase im industriellen Bereich ist die biokatalytische Synthese des Antidiabetikums Sitagliptin, durch Merck und Codexis.^[11-13] Merck und Codexis entwickelten gemeinsam durch Anwendung von *Computational Modelling* und iterativer gerichteter Evolution eine optimierte (*R*)-selektive Transaminase, die 27 Mutationen enthält, und eine deutlich höhere Aktivität und Stabilität aufweist. Diese biokatalytische Überführung des Ketons in das entsprechende enantiomerenreine Amin (Schema 3.9) weist im Vergleich zu der chemischen Hochdruck-Hydrierung (17 bar) eine um 19% verringerte Abfallmenge auf. Außerdem konnte die Produktivität des Prozesses durch die biokatalytische Transformation um 53% erhöht werden.^[11-14]



Schema 3.9. Biokatalytischer Schlüsselschritt der optimierten Sitagliptinsynthese unter Einsatz einer ω -Transaminase^[11-13]

Als weitere Enzymklasse zur Darstellung chiraler primärer Amine bzw. Aminosäuren sind noch die Ammoniak-Lyasen zu nennen. Formal addieren Ammoniak-Lyasen freies Ammoniak an die Doppelbindung α,β -ungesättigter Carbonsäuren wie Zimtsäure (Abbildung 3.4). So kann die Hydroaminierungsreaktion zur Darstellung einer Vielzahl natürlicher und unnatürlicher Aminosäuren sowie deren Derivaten genutzt werden.^[79-86]

Im Vergleich zu der Vielzahl an Enzymklassen, die sich zur biokatalytischen Darstellung primärer Amine eignen, ist die Anzahl an Enzymklassen zur Darstellung sekundärer und tertiärer Amine deutlich geringer. Aminoxidasen und Iminreduktasen (Abbildung 3.5) stellen die am meisten untersuchten Enzymklassen zur Synthese sekundärer und tertiärer chiraler Amine dar und werden daher im Folgenden näher erläutert.

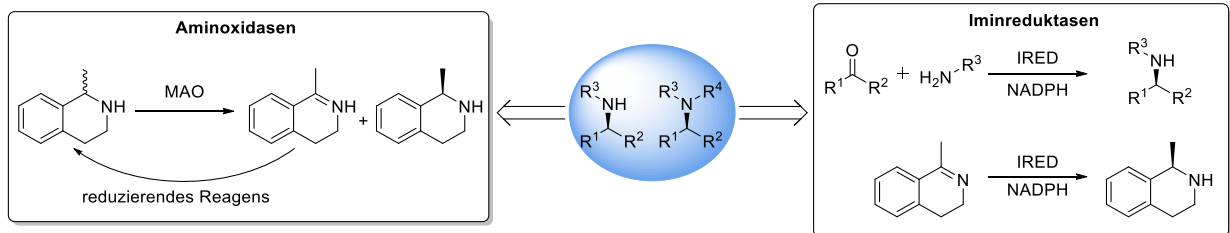
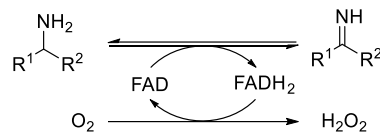


Abbildung 3.5. Übersicht der bedeutendsten biokatalytischen Routen zu sekundären und tertiären Aminen^[2,38]

Aminoxidasen gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und werden in zwei Klassen eingeteilt: Typ I Aminoxidasen, die Kupfer-abhängig sind, und Typ II Aminoxidasen als Flavin-abhängige Enzyme. Monoaminoxidasen (MAO) sind Flavin-abhängige Aminoxidasen und katalysieren die Oxidation von Aminen zu Iminen unter simultaner Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid (Schema 3.10).^[38]



Schema 3.10. Oxidative Desaminierung durch Aminoxidasen^[38]

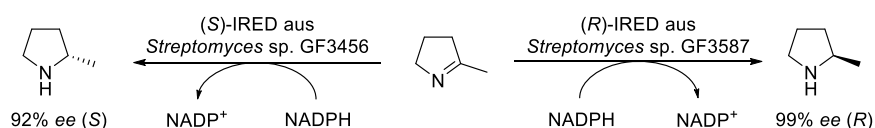
Schilling *et al.* identifizierten 1995 die Monoaminoxidase aus *Aspergillus niger* und beschrieben die Klonierung sowie Expression dieses Gens.^[87,88] Sablin *et al.* konnten eine hohe Aktivität dieses Enzyms für primäre, aliphatische Monoamine und eine geringe Aktivität für Benzylamin zeigen.^[89] Der Gruppe um Turner gelang es durch Kombination von gerichteter Evolution, rationalem Design und Hochdurchsatz Screening eine Vielzahl an Varianten der Monoaminoxidase aus *Aspergillus niger* zu erhalten, die eine größere Substratbreite sowie höhere Aktivität und Selektivität aufweisen.^[90-95] Die ersten erzeugten Mutanten erlaubten zunächst die Deracemisierung von primären Aminen (α -Methylbenzylamin und dessen Derivaten),^[90,91] im Laufe der Zeit konnten aber auch Varianten zur Umsetzung von sekundären^[91,92,96] und tertiären^[93,95] Aminen gefunden werden. Zur Deracemisierung mittels Monoaminoxidasen wird beispielsweise die (*S*)-selektive MAO in Kombination mit einem nichtselektiven Reduzierungsreagenz (Aminboran) eingesetzt, sodass das nicht umgesetzte (*R*)-Enantiomer akkumuliert.^[38,97] Durch das Lösen der Kristallstrukturen einiger Mutanten konnten die Effekte einzelner Mutationen bestimmt werden, welches den Aufbau gezielter Bibliotheken ermöglichte.^[95,98] Mit dem Ziel der Zugänglichkeit zu den (*S*)-Aminen wurden (*R*)-selektive MOAs durch Protein-Engineering aus D-Aminosäureoxidasen und D-Nikotinoxidasen entwickelt.^[99,100]

Außerdem konnten Monoaminoxidasen bereits erfolgreich in Kaskadenreaktionen in Kombination mit ω -Transaminasen eingesetzt werden.^[101,102] Auch industriell werden Monoaminoxidasen erfolgreich zur Deracemisierung eingesetzt, beispielsweise zur Synthese eines Schlüsselintermediats von Boceprevir, das als Hepatitis-C-Virus (HCV)-Proteaseinhibitor eingesetzt wird.^[14,103]

3.1.4 Iminreduktasen

Trotz der Vielzahl von Iminen als oxidierte Intermediate in Stoffwechselwegen waren bis vor einigen Jahren nur wenige Imin-reduzierende Enzyme bekannt, welche lediglich speziell funktionalisierte Imine reduzieren konnten.^[104-107] Aufgrund der hydrolytischen Instabilität der Imine wurde deren Potential als Vorläufer zu chiralen Aminen außerdem lange Zeit nicht ausgeschöpft. Einige Forschungsgruppen konnten Stämme mit Imin-reduzierenden Enzymen identifizieren jedoch nicht die Enzyme selbst.^[108-112] Aufgrund der mangelnden Bekanntheit Imin-reduzierender Enzyme entwickelte die Gruppe um Ward artifizielle Metalloenzyme mit der Eigenschaft, stereoselektiv Imine zu reduzieren.^[113-116]

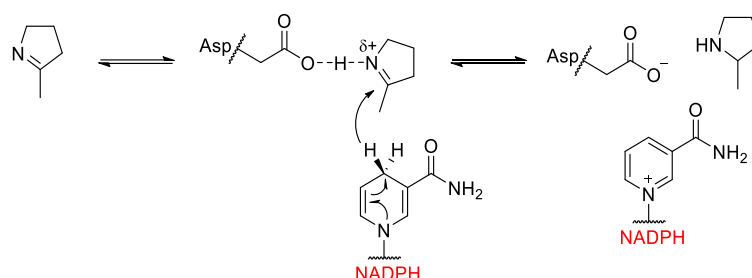
Im Jahr 2010 gelang es Mitsukura *et al.* durch das Screening von 688 Mikroorganismen auf die Reduktion des zyklischen Imins 2-Methyl-1-pyrrolin jeweils einen *Streptomyces* Stamm mit hoch (*R*)- bzw. (*S*)-selektiven Imin-reduzierenden Eigenschaften zu identifizieren und diesen als Ganzzell-Katalysator zu verwenden.^[117] Des Weiteren konnten Mitsukura *et al.* erstmalig die (*R*)-^[118] und (*S*)-selektiven Iminreduktasen^[119] (IREDs) der *Streptomyces*-Stämme identifizieren und charakterisieren (Schema 3.11).



Schema 3.11. Reduktion von 2-Methyl-1-pyrrolin unter Einsatz von Iminreduktasen (IREDs)^[118,119]

Die identifizierten Iminreduktasen liegen als homodimere Enzyme mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten um 30 kDa vor, weisen ein pH Optimum im neutralen Bereich und eine strikte NADPH-Spezifität auf. Die von den IREds katalysierten Reaktionen sind reversibel, allerdings ist die Rückreaktion, die Oxidation des Amins, deutlich langsamer und findet nur im Basischen (pH > 10) statt. Im Rahmen ihrer Arbeiten konnten Mitsukura *et al.* jedoch nur Aktivität für die Reduktion von 2-Methyl-1-pyrrolin mit der (*R*)-selektiven Iminreduktase aus *Streptomyces* sp. GF3587 nachweisen.^[118] Für die (*S*)-selektive Iminreduktase aus *Streptomyces* sp. GF3456 wurde ebenfalls nur ein sehr eingeschränktes Substratspektrum beschrieben.^[119]

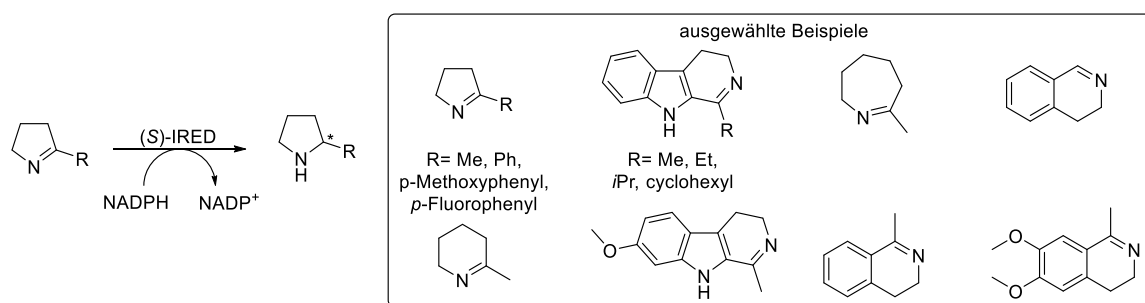
Im Jahr 2013 konnte die erste Kristallstruktur einer dritten Iminreduktase, einer (*R*)-selektiven IRED aus *Streptomyces kanamyceticus*, gelöst werden. Auf Basis dessen konnte ein Mechanismus für die Iminreduktion durch die Iminreduktase postuliert werden. Demnach ist ein Aspartat in der aktiven Tasche des Enzyms an der katalytischen Protonierung des Imins beteiligt und ermöglicht so die Hydridübertragung des NADPH (Schema 3.12). Diese Vermutung konnte durch ortsspezifische Mutagenese bestätigt werden. Ein Austausch des Aspartats an dieser Stelle durch Alanin oder Asparagin führte zu einem inaktivem Enzym.^[120]



Schema 3.12. Von Rodríguez-Mata *et al.* postulierter Mechanismus zur Iminreduktion durch die Iminreduktase^[120]

Im Vergleich zur Struktur der (*R*)-selektiven Iminreduktase aus *Streptomyces kanamyceticus* haben (*S*)-selektive Iminreduktasen aus *Streptomyces sp.* GF3546,^[121] *Streptomyces aurantiacus*,^[121] *Bacillus cereus* BAG3X2^[122] und *Nocardiopsis halophila*^[122] anstelle des Aspartats einen Tyrosinrest an dieser Position der aktiven Tasche.^[121,122] Mittlerweile wurden auch aktive Iminreduktasen, bei denen eine nicht-protische Aminosäure (Asparagin, Phenylalanin) an dieser Stelle der aktiven Tasche positioniert ist, beschrieben.^[123,124] Der allgemeine Mechanismus der Iminreduktase-katalysierten Reaktion konnte daher noch nicht endgültig geklärt werden.

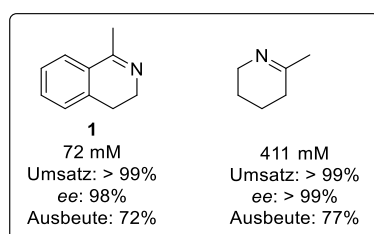
In Folgearbeiten optimierten Leipold *et al.* die Überexpression der (*S*)-selektiven IRED aus *Streptomyces sp.* GF3546 von Mitsukura *et al.*^[119] und untersuchten in der Formulierung eines Ganzzell-Katalysator das Potential des Enzyms. In diesem Zusammenhang konnten Leipold *et al.* hohe Aktivitäten für ein breites Substratspektrum und hohe Selektivitäten dieser Iminreduktase nachweisen (Schema 3.13).^[125]



Schema 3.13. Übersicht des Substratspektrums zur Reduktion zyklischer Imin unter Einsatz der (*S*)-Iminreduktase aus *Streptomyces sp.* GF3546^[125]

Diese vielversprechenden Ergebnisse zur Reduktion zyklischer Imine unter Einsatz der wenigen bekannten Iminreduktasen weckte sowohl bei akademischen als auch bei industriellen Forschungsgruppen ein großes Interesse an der neuen Enzymklasse. Durch Sequenzhomologiesuche der bereits vorhandenen IRED-Gene konnte seit 2014 eine Vielzahl von Iminreduktasen identifiziert und für eine Vielzahl von Aminsynthesen angewendet werden.^[121-124,126-147] Um bei der Vielzahl an mittlerweile bekannten Iminreduktase-Sequenzen einen Überblick behalten zu können, haben die Gruppen um Hauer und Pleiss die *Iminreductase Engineering Database* (<https://ired.biocatnet.de>) erstellt, in der putative IRED Sequenzen (mehr als 1400) durch Sequenzhomologie in Unterfamilien gruppiert sind.^[126,132] Die physiologischen Substrate und Bedeutungen der identifizierten Iminreduktasen sind jedoch immer noch unklar.^[120] Die nun als Iminreduktasen bezeichneten Proteine wurden zuvor als 6-Phosphogluconat-Dehydrogenasen, Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenasen oder Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenasen annotiert. Allerdings zeigen die Proteine für diese putativen Substrate keine Aktivität und auch die Oxidation von Alkoholen oder Reduktion von Carbonylverbindungen kann durch Iminreduktasen nicht katalysiert werden.^[126,127]

In ihrer Arbeit identifizierten Wetzl *et al.* 20 neue bakterielle Iminreduktasen und setzten diese erfolgreich zur Reduktion einer Vielzahl zyklischer Imine ein. Die Reduktion konnte für zwei ausgewählte Beispiele durch schrittweise Zugabe des Substrates auch im präparativen Maßstab erfolgreich durchgeführt werden (Schema 3.14).^[124,129]

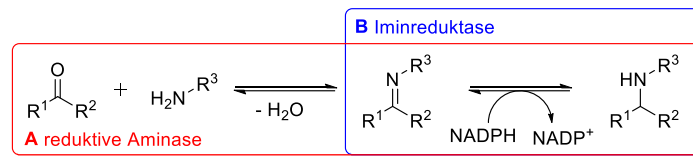


Schema 3.14. Ergebnisse von Wetzl *et al.* zur Reduktion zyklischer Imine im präparativen Maßstab (*Fed Batch*)^[124,129]

Li *et al.* identifizierten eine weitere (*R*)-selektive Iminreduktase aus *Paenibacillus lactis* und konnten diese erfolgreich zur Reduktion von 3*H*-Indolen und 3*H*-Indoliodiden bis zu einer Substratkonzentration von 100 mM anwenden.^[130,139] 2017 identifizierten Li *et al.* zudem eine weitere Iminreduktase aus *Stackebrandtia passauensis* (SnIR), die eine deutlich erhöhte Aktivität für 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) zeigt und konnten diese erfolgreich zur Reduktion des zyklischen Imins **1** bis zu einer Substratkonzentration von 100 mM einsetzen.^[140] Maugeri *et al.* gelang es außerdem Iminreduktasen in *micro-aqueous* Systemen anzuwenden, um die geringe Löslichkeit der organischen Verbindungen im Wässrigen zu umgehen.^[134]

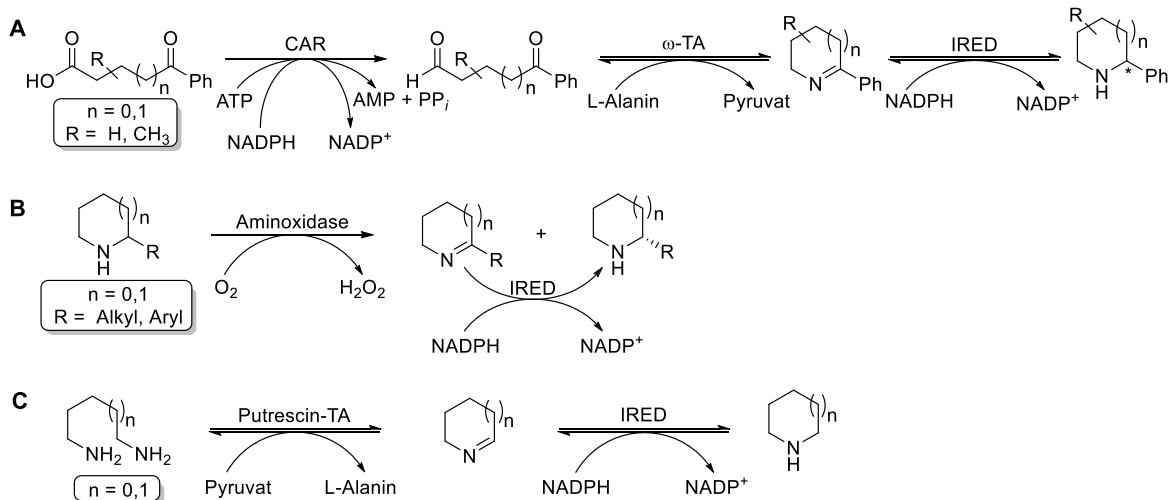
Während die Reduktion zyklischer Imine durch Iminreduktasen in der Regel mit sehr guten Aktivitäten, Umsätzen und Selektivitäten verbunden ist,^[124] ist die reduktive Aminierung,

die als weitere Anwendung der Iminreduktasen von vielen Forschungsgruppen untersucht wurde, aufgrund der hydrolytischen Instabilität der azyklischen Imine mit niedrigen bis guten Umsätzen verbunden. Ein erstes *Proof of Concept* für die reduktive Aminierung unter Einsatz von Iminreduktasen konnten Huber *et al.* bereits 2014 leisten, allerdings mit geringen Umsätzen.^[121] Ein sehr umfassendes Screening von 28 IREDs in Hinblick auf die reduktive Aminierung mit einer Vielzahl von Ketonen und Aminen wurde unter anderem von Wetzl. *et al.* durchgeführt.^[129] 2017 wurde außerdem mit der reduktiven Aminase eine weitere Untergruppe der Iminreduktasen beschrieben, die neben der Iminreduktion auch die Iminbildung katalysieren (Schema 3.15).^[148-151]



Schema 3.15. Vergleich von reduktiver Aminase und Iminreduktase **A** Katalyse von Iminbildung und Iminreduktion durch die reduktive Aminase **B** Reduktion des spontan gebildeten Imins durch die Iminreduktase^[148]

Aufgrund der strikten Spezifität der Iminreduktasen zur Reduktion von C=N-Doppelbindungen konnten IREDs bereits erfolgreich in Enzymkaskaden eingesetzt werden. France *et al.* entwickelten eine Eintopf-Kaskade zur Darstellung von chiralen mono- und disubstituierten Piperidinen und Pyrrolidinen ausgehend von Ketosäuren durch Kombination einer Carbonsäurereduktasen (CAR), einer ω -Transaminase und einer (*R*)- bzw. (*S*)-selektiven Iminreduktase (Schema 3.16A).^[136] Ein weiteres Beispiel ist die Deracemisierung von Pyrrolidinen und Piperidinen durch Kombination einer Aminoxidase und einer Iminreduktase (Schema 3.16B).^[133] Außerdem konnten heterozyklische Amine durch Kombination einer Putrescin-Transaminase und einer Iminreduktase aus Diaminen erfolgreich dargestellt werden (Schema 3.16C).^[152]

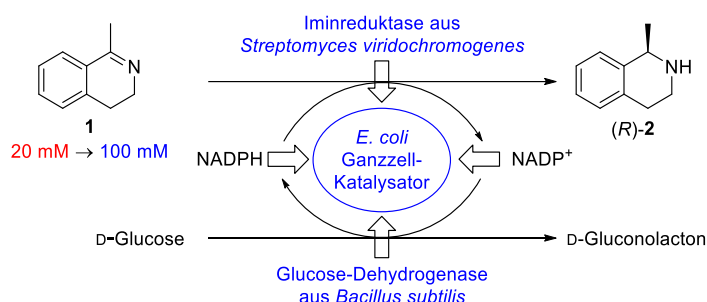


Schema 3.16. Beispiele für Kaskadenreaktionen mit Iminreduktasen^[133,136,152]

3.2 Motivation und Zielsetzung

Die vielversprechenden Ergebnisse anderer Forschungsgruppen zur Reduktion zyklischer Imine unter Einsatz der Iminreduktasen zeigen bereits das mögliche Potential dieser relativ neuen Enzymklasse auf. Allerdings wurden die beschriebenen Iminreduktase-katalysierten Reduktionen in den meisten Fällen nur in geringen Substratkonzentration (bis zu 20 mM) mit isolierten Enzymen oder in Ganzzell-Katalyse, ohne gleichzeitige Überexpression der Glucose-Dehydrogenase zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors und bei einer hohen Biomassebeladung durchgeführt.^[134] Ausnahmen hierbei sind *Fed Batch* Prozesse mit isolierten Enzymen, die mit höheren Gesamt-Substratkonzentration durchgeführt wurden.^[124,129] Die Arbeiten von Li *et al.* zur Anwendung einer neu identifizierten IRED zur Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) stellt eine weitere Besonderheit dar,^[140] die nach der Veröffentlichung der Ergebnisse der Autorin zu diesem Projekt^[146] erschienen sind.

Die Prozessentwicklung von IRED-katalysierten Reaktionen zur Darstellung zyklischer Amine stellte daher eine Herausforderung dar. Um das Potential der Iminreduktasen in Hinblick auf eine Prozesschemie, potentielle industrielle Anwendungen sowie eine Kombination von klassischer Heterozyklenchemie und Biokatalyse zu evaluieren, ist das Ziel dieses Projektes eine Prozessentwicklung der IRED-katalysierten Darstellung zyklischer Amine. In diesem Hinblick sollen Effizienz, Raum-Zeit-Ausbeute und Enantioselektivität bei gleichzeitig möglichst geringer Katalysatorbeladung optimiert werden. Die Prozessentwicklung der biokatalytischen Darstellung zyklischer Amine erfolgt in diesem Projekt beispielhaft an der Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) unter Einsatz der Iminreduktase aus *Streptomyces viridochromogenes*.^[124] Zur Regeneration des Cofaktors NADPH wird eine Glucose-Dehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis*^[153] verwendet (Schema 3.17).



Schema 3.17. Zielsetzung der Prozessentwicklung zur Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**)

Mit dem Ziel der Entwicklung eines effizienten Prozesses zur IRED-katalysierten Reduktion des zyklischen Imins **1** soll zunächst eine Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt und daraufhin die Kinetik der Enzymreaktion im Detail untersucht werden. Da ganze Zellen die einfachste Formulierung eines Enzyms darstellen und einen Prozess

kostengünstiger gestalten können, indem Schritte wie der Zellaufschluss und die Aufreinigung des Enzyms entfallen,^[154-156] soll im Anschluss an die Optimierung ein Ganzzell-Katalysator etabliert werden. Da solche „Designer-Zellen“ in der Vergangenheit bereits erfolgreich für eine Vielzahl von Biotransformationen eingesetzt wurden,^[157] erfolgt der finale Schritt dieses Teilprojektes, die Entwicklung eines effizienten Prozesses, unter Verwendung eines maßgeschneiderten Ganzzell-Katalysators (Abbildung 3.6).

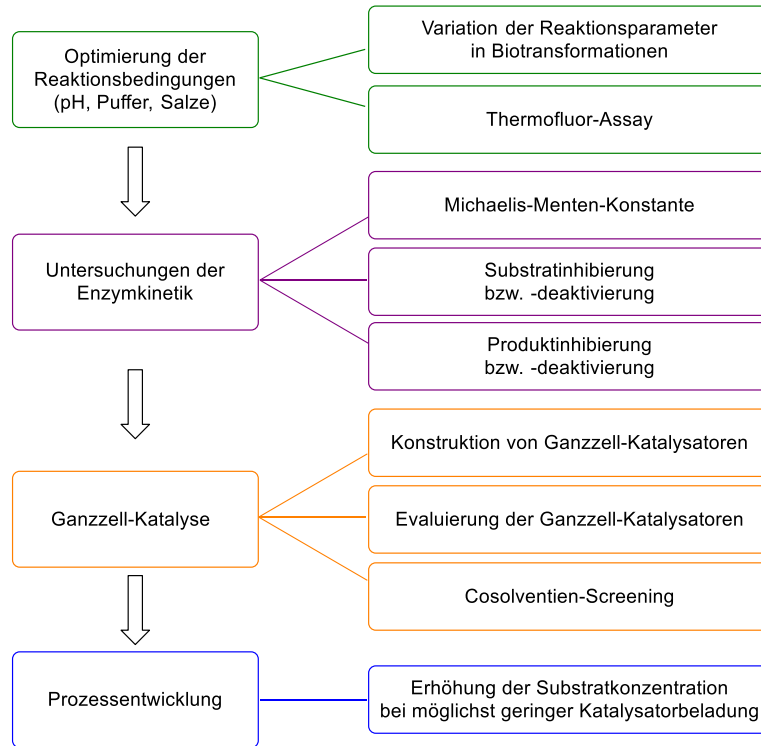


Abbildung 3.6. Übersicht des Projektes zur Optimierung und Prozessentwicklung einer Iminreduktase-katalysierten Reaktion

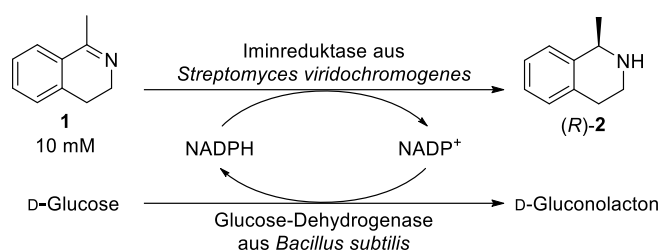
3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Einleitende Versuche & Analytik

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen IRED-katalysierter Reduktionen zyklischer Imine wurde zunächst eine Modellreaktion betrachtet. In diesem Zusammenhang wurde die Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) ausgewählt. Als Biokatalysator für diese Modellreaktion wurde aus den 31 vorhandenen IREDs^[121,124,129] die Iminreduktase aus *Streptomyces viridochromogenes*^[124] (im Folgenden abgekürzt mit IRED20) ausgewählt, da diese die Umsetzung des Imins **1** mit hoher Enantioselektivität katalysiert.^[124]

Zunächst wurde eine Analytik zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses per SFC-HPLC etabliert. Hierzu wurde das unterschiedliche Absorptionsverhalten von Edukt und Produkt berücksichtigt sowie der Umsatz über das Verhältnis des Produktintegrals im Vergleich zur Summe der Integrale von Edukt und Produkt ermittelt (siehe Kapitel 10.4.1).

Im Anschluss daran wurden einleitende Biotransformationen mit der aufgereinigten IRED20 unter Verwendung einer Glucose-Dehydrogenase (GDH) aus *Bacillus subtilis*^[158] zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors NADP⁺ und insgesamt drei Negativkontrollen durchgeführt. Die erste Negativkontrolle wurde ohne Iminreduktase durchgeführt, um ausschließen zu können, dass die GDH aus *Bacillus subtilis* eine Imin-reduzierende Aktivität besitzt. Die zweite Negativkontrolle wird ohne Zugabe der GDH durchgeführt, um deren Einfluss zur *in situ* Cofaktor-Regenerierung zu überprüfen. Die dritte Negativkontrolle wird in Abwesenheit beider Enzyme durchgeführt. Die initialen Biotransformationen wurden im 0.5 mL Maßstab unter den in der Literatur angegeben optimalen Reaktionsbedingungen (30 °C, K_P pH 7) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Nach einer Reaktionszeit von 15.5 h konnte in Gegenwart von IRED und GDH ein Umsatz des Imins **1** von 97% mit einer Enantioselektivität zugunsten des (*R*)-Enantiomers mit > 99% ee nachgewiesen werden. Alle drei Negativkontrollen zeigen erwartungsgemäß keinen Umsatz. Eine Aktivität der GDH zur Reduktion des Imins kann daher ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.1. Einleitende Biotransformation und Negativkontrollen zur IRED-katalysierten Reduktion des Imins **1**

Eintrag	Umsatz [%]	ee [%]
IRED20 (0.1 mg mL ⁻¹), GDH (2U)	97	> 99
Negativkontrolle 1: ohne IRED20	0	-
Negativkontrolle 2: ohne GDH	0	-
Negativkontrolle 3: ohne IRED20, ohne GDH	0	-

3.3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Mit dem Ziel einer Prozessentwicklung zur Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) soll zunächst eine Optimierung der Reaktionsbedingungen (Puffersystem, Salzgehalt und pH-Wert) in Hinblick auf eine optimale Aktivität sowie Stabilität der IRED aus *Streptomyces viridochromogenes* durchgeführt werden. Um den Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Aktivität und Stabilität der Iminreduktase zu untersuchen, wurden zwei Methoden genutzt. Zum einen wurde der Einfluss der Reaktionsparameter in Anhängigkeit von der Zeit im Verlauf von Biotransformationen untersucht. Zum anderen wurde der Thermofluor-Assay genutzt, um den Einfluss verschiedener Reaktionsparameter auf den Schmelzpunkt der Iminreduktase zu untersuchen und somit den Einfluss der Reaktionsparameter auf die Stabilität der Iminreduktase zu untersuchen. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Variation von Reaktionsparameter auf den Verlauf der Biotransformation erläutert und daraufhin die Ergebnisse des Thermofluor-Assay diskutiert.

3.3.2.1 Variation der Reaktionsparameter in Biotransformationen

Der Einfluss unterschiedlicher Reaktionsparameter (Puffersystem, Salzkonzentration und pH-Wert) auf die IRED-katalysierte Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) wurde zeitabhängig untersucht. Hierzu werden jeweils 5 identische Proben angesetzt und die Biotransformationen nach unterschiedlichen Reaktionszeiten gestoppt. Um den Einfluss der Reaktionsparameter auf die Iminreduktase optimal validieren zu können, wurde die aufgereinigte Iminreduktase (siehe Kapitel 10.4.2) verwendet. Zunächst wurde der

Einfluss verschiedener Puffer im pH-Bereich 6-8 mit einer konstanter Pufferkonzentration von 100 mM auf die Umsetzung des zyklischen Imins **1** untersucht (Abbildung 3.7). In Gegenwart der Puffersysteme Kaliumphosphat (KPi), Natriumphosphat (NaPi), TRIS, Bicin und HEPES wurden nach 5 bzw. 6 h gute bis exzellente Umsätze erreicht. Im Vergleich dazu wurden in den Puffersystemen Triethylamin (TEA), MOPS, MES und BisTris über einen Zeitraum von 5 h nur Umsätze von maximal 40% nachgewiesen (Abbildung 3.7).

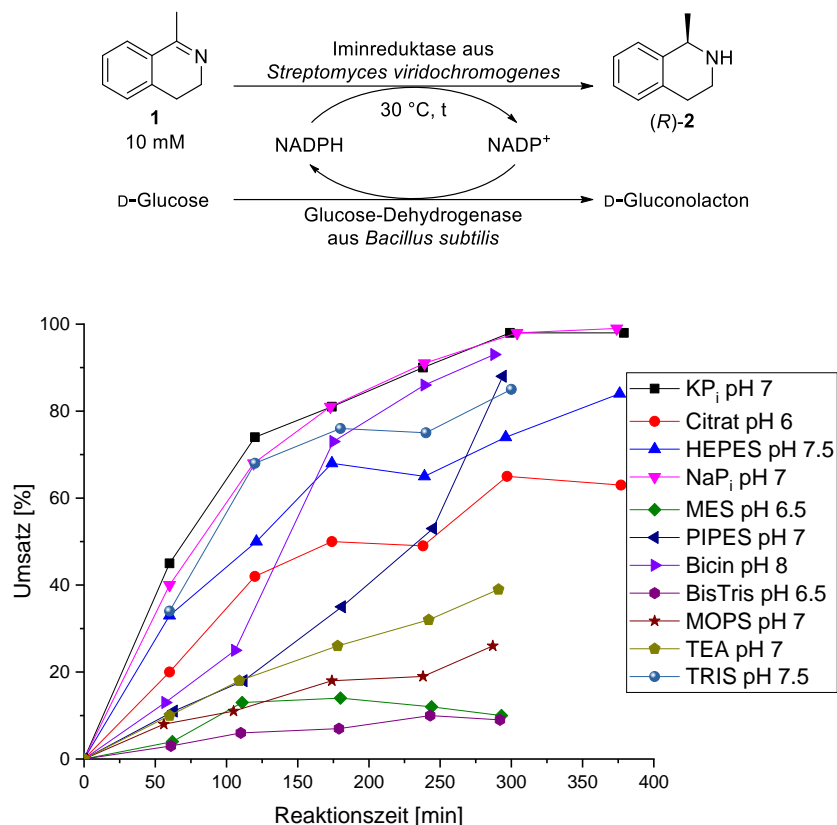


Abbildung 3.7. Biotransformationen von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) unter Variation der Puffersysteme bei konstanter Pufferkonzentration (100 mM)

Bereits in dieser einleitenden Untersuchung zur Variation der Puffersysteme konnte gezeigt werden, dass Kaliumphosphat und Natriumphosphat die besten Puffersubstanzen sind und ein pH-Wert von 7 für die IRED-katalysierte Reduktion zyklischer Imine ideal ist (Abbildung 3.7). Der Einfluss der Salzkonzentration auf die biokatalytische Reduktion des zyklischen Imins **1** unter Einsatz der IRED aus *S. viridochromogenes* wurde daher in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer bei pH 7 unter Variation der Natriumchlorid-Konzentration (0-200 mM) untersucht. Hierzu wurden Biotransformationen bei einer Substratkonzentration von 10 mM für 4 h bei 30 °C durchgeführt und daraufhin der Umsatz per SFC-HPLC bestimmt (Abbildung 3.8). Die Umsätze variieren zwischen 78 und 90% nach einer Reaktionszeit von 4 h, wobei der höchste Umsatz in Abwesenheit von Natriumchlorid bestimmt wurde (Abbildung 3.8, linker Balken). Daher wurde 100 mM Kaliumphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 7 ohne Zusatz von Salzen im Rahmen der Untersuchungen zur Aktivität der IRED als bestes Reaktionsmedium ausgewählt.

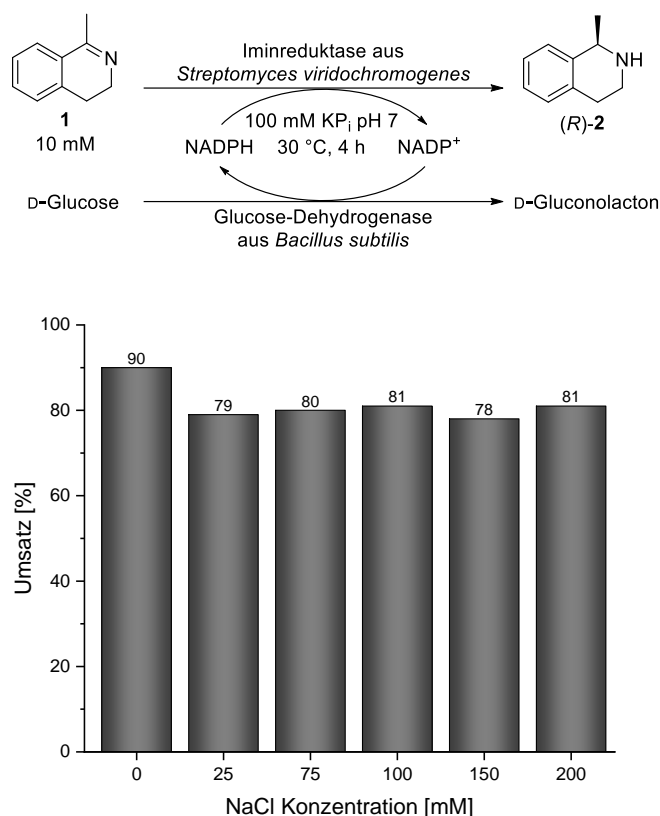


Abbildung 3.8. Biotransformationen von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) unter Variation der Natriumchlorid-Konzentration

3.3.2.2 Thermofluor-Assay

Der Thermofluor-Assay, der von Pantoliano *et al.* entwickelt wurde,^[159] ermöglicht ein Hochdurchsatz-Screening zur Untersuchung des Einflusses einer Vielzahl an Reaktionsparametern auf die Stabilität eines Enzyms durch die Bestimmung der Thermostabilität eines Proteins in Abhängigkeit von der Proteinumgebung.^[160] Der Proteinlösung wird ein Fluoreszenzfarbstoff (SYPRO Orange) zugesetzt, dessen Fluoreszenz in wässriger Lösung gequencht wird. Durch eine schrittweise Temperaturerhöhung der Proben wird das Protein denaturiert und die hydrophoben Bereiche des Proteins werden für den Farbstoff zugänglich, sodass die Fluoreszenzintensität steigt. Da die Fluoreszenzintensität im Idealfall in einem kurzen Temperaturbereich stark ansteigt, erhält man eine sigmoidale Kurve. Der Wendepunkt dieser sigmoidalen Kurve ist als die Schmelztemperatur (T_m) des Proteins definiert, bei der 50% des Proteins denaturiert vorliegt.^[160] Der Einfluss von Reaktionsparametern auf die Stabilität des Enzyms kann durch Vergleich der Schmelztemperaturen schließlich qualitativ bestimmt werden, da eine Erhöhung des Schmelzpunktes mit einer höheren Stabilität und eine Abnahme des Schmelzpunktes mit einer verringerten Stabilität verbunden ist.^[160] Der Thermofluor-Assay wurde mit der aufgereinigten Iminreduktase aus *S. viridochromogenes* in Gegenwart verschiedener Puffersysteme, Salzgehalte und pH-Werte durchgeführt. Als Referenz dient

jeweils die Schmelztemperatur der IRED20 in Wasser ($T_m = 31\text{ °C}$). Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Puffersysteme (jeweils 100 mM) auf die Stabilität des Enzyms untersucht (Abbildung 3.9).

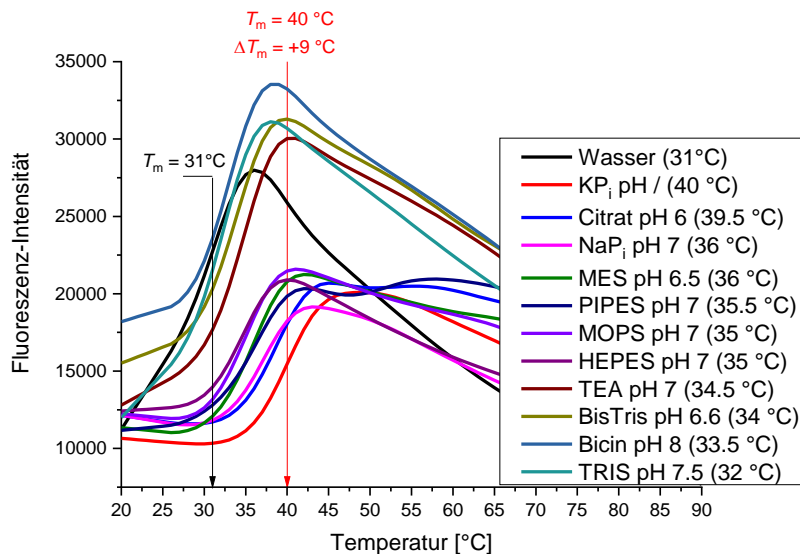


Abbildung 3.9. Thermofluor-Assay zur Untersuchung des Einflusses verschiedener 100 mM Puffersysteme auf die Stabilität der IRED20

Im Vergleich zur Referenz in Wasser haben alle getesteten Puffersysteme einen positiven Einfluss auf die Stabilität der Iminreduktase, der sich in einer Erhöhung der Schmelztemperatur äußert. Da die Schmelztemperatur in TRIS Puffer pH 7.5 nur um 1 °C erhöht ist gegenüber der Referenz (Wasser), ist die Erhöhung der Stabilität nicht signifikant. Der höchste Anstieg im Schmelzpunkt ($\Delta T_m = +9\text{ °C}$) konnte für Kaliumphosphat-Puffer pH 7 bestimmt werden, der somit von allen Puffersystemen den stärksten stabilisierenden Effekt auf die IRED20 hat (Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der Biotransformationen. Kaliumphosphat-Puffer stellt somit das ideale Puffersystem in Hinblick auf Aktivität und Stabilität der IRED20 dar. Anschließend wurde der pH Bereich (pH 6-8) in 100 mM Kaliumphosphat Puffer näher untersucht (Abbildung 3.10). Alle getesteten Kaliumphosphat-Puffer im pH Bereich 6-8 haben einen stabilisierenden Einfluss auf die Iminreduktase, wobei der höchste Anstieg in der Schmelztemperatur der IRED20 bei pH 6 und pH 7 (jeweils $\Delta T_m = +9\text{ °C}$) ermittelt wurde. Aufgrund dessen wurde ein pH-Wert von 7 in Kombination mit Kaliumphosphat als Puffersystem als optimal ausgewählt.

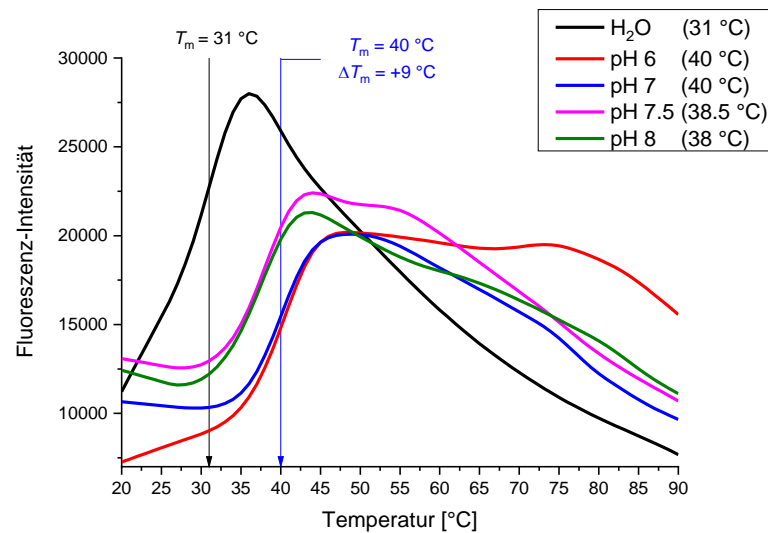


Abbildung 3.10. Thermofluor-Assay zur Untersuchung des Einflusses verschiedener pH-Werte in 100 mM KPi

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Pufferkonzentration des Kaliumphosphat-Puffers bei einem pH-Wert von 7 auf die Stabilität der Iminreduktase aus *S. viridochromogenes* untersucht. Hierzu wurden Pufferkonzentrationen von 10-500 mM untersucht: Eine Erhöhung der Pufferkonzentration korreliert mit einer Erhöhung der Schmelztemperatur. Demnach hat eine hohe Pufferkonzentration einen stabilisierenden Einfluss auf das Enzym, bei einer Pufferkonzentration von 500 mM konnte demnach ein Anstieg in der Schmelztemperatur von $\Delta T_m = +14.5$ °C gegenüber der Referenz in Wasser bestimmt werden (Abbildung 3.11). Allerdings sind sehr hohe Pufferkonzentrationen von beispielsweise 500 mM in Biotransformationen nicht praktikabel, sodass eine 100 mM Konzentration des Kaliumphosphat-Puffers als Kompromiss ausgewählt wurde, die mit den Ergebnissen zur Aktivität der IRED in Biotransformationen korreliert.

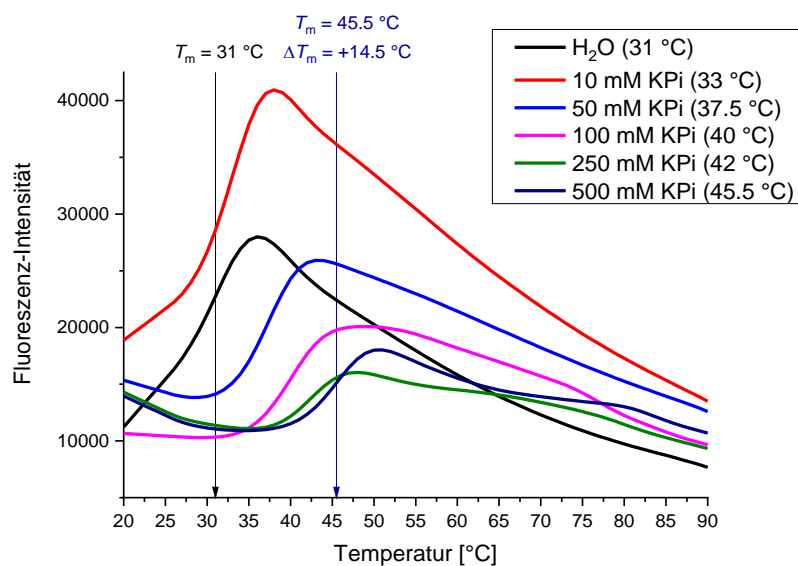


Abbildung 3.11. Thermofluor-Assay zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Pufferkonzentrationen in KPi pH 7

Über den Thermofluor-Assay konnte somit das ideale Puffersystem, die Pufferkonzentration sowie der pH-Wert für die IRED20 identifiziert werden. Die Ergebnisse des Thermofluor-Assay zur Optimierung der Stabilität der Iminreduktase stimmen mit den Ergebnissen der Biotransformationen zur optimalen Aktivität der IRED überein. Daher wurde 100 mM Kaliumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 7 für die weitere Prozessentwicklung verwendet.

3.3.3 Untersuchungen der Enzymkinetik

Im Anschluss an die Auswahl der idealen Reaktionsparameter in Hinblick auf Puffersystem, Salzgehalt und pH-Wert wurde die Enzymkinetik der biokatalytischen Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroschinolin (**1**) mit der IRED aus *S. virodochromogenes* im Detail untersucht. Genaue Kenntnisse der Michaelis-Menten-Konstante sowie Einflüsse möglicher Substrat- oder Produktinhibierungen bzw. -deaktivierungen sind für eine effektive Prozessentwicklung sowie das Upscaling einer Reaktion als Ziel dieses Projektes von großer Bedeutung.

3.3.3.1 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante

Mit dem Ziel die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) der IRED20 zur Reduktion des Substrates **1** zu bestimmen, wurden zunächst die Aktivitäten des aufgereinigten Enzyms bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen spektrophotometrisch bei 340 nm und einer Reaktionstemperatur von 30 °C bestimmt. Über die Auftragung der Aktivität bzw. Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration und eine nichtlineare Anpassung dieser Kurve (Abbildung 3.12) kann die Maximalgeschwindigkeit (v_{max}) sowie der K_m bestimmt werden. Die Michaelis-Menten-Konstante entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist. Aus der Kurvenanpassung ergab sich ein K_m von 0.225 mM. Aufgrund der geringen Löslichkeit von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) konnten bei einer Cosolventkonzentration von 4% v/v Methanol nur Substratkonzentrationen bis 2 mM untersucht werden, da das Substrat oberhalb dieser Konzentration nicht mehr löslich ist. Aufgrund des geringen K_m für die Umsetzung des Substrates **1**, ist die maximale Geschwindigkeit der Iminreduktase bereits bei einer geringen Substratkonzentration von 0.45 mM erreicht. Die geringe Löslichkeit des Imins **1** hat somit keinen negativen Einfluss auf den Reaktionsverlauf im Hinblick auf Löslichkeitsprobleme. Bei der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante konnte für Substratkonzentrationen über 0.5 mM bereits ein Abfall in der Reaktionsgeschwindigkeit der IRED20 aufgezeigt werden, was auf eine Inhibierung des Enzyms durch das Substrat schließen lässt, die im Folgenden näher untersucht wurde.

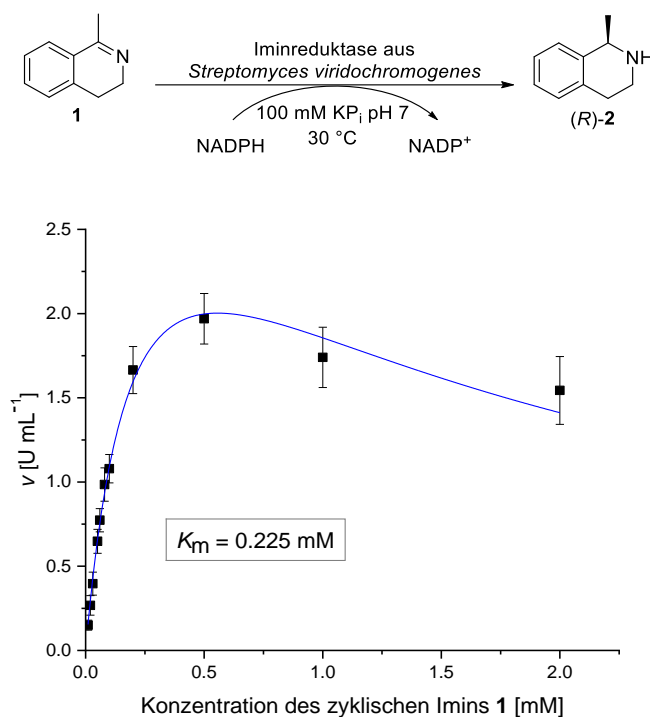


Abbildung 3.12. Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der IRED20 gegen die Substratkonzentration des zyklischen Imins **1** zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante

3.3.3.2 Untersuchung von Substratinhibierung bzw. -deaktivierung

Aufgrund der vorliegenden Inhibierung der IRED20 durch 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), die sich in der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratkonzentrationen über 0.5 mM äußert, wurde der Einfluss des Substrates **1** auf die Stabilität der IRED20 untersucht. Im Falle einer Deaktivierung des Enzyms durch das Substrat würde die Reaktionsgeschwindigkeit nach Inkubation des Enzyms mit dem Substrat sinken. Zur Untersuchung einer möglichen Deaktivierung des Enzyms wurde die aufgereinigte IRED20 für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Imins **1** (0.5-2 mM) bei 30 °C inkubiert und anschließend die Enzymaktivität spektrophotometrisch bestimmt (Abbildung 3.13). Die Aktivität des Enzyms nach zweistündiger Inkubation des Enzyms mit dem Substrat **1** lag in demselben Größenbereich wie die Aktivität ohne Vorinkubation von Enzym mit Substrat ($t=0$). Dementsprechend beeinflusst das zyklische Imin **1** die Stabilität der Iminreduktase aus *S. viridochromogenes* nicht negativ und es liegt keine Deaktivierung, sondern lediglich eine Substratinhibition vor. Aufgrund der geringen Substratlöslichkeit im wässrigen Medium ist die Auswirkung einer Substratinhibierung, die mit erhöhter Substratkonzentration weiter ansteigen würde, für die Prozessentwicklung und das Upscaling der IRED-katalysierten Reaktion vermutlich gering. Die Enzymaktivität ist im Bereich der löslichen Substratkonzentrationen trotz Inhibierung mit mindestens 1.7 U mL⁻¹ hoch genug für eine effektive Reduktion des Substrates **1** zum entsprechenden Produkt **2** (Abbildung 3.13).

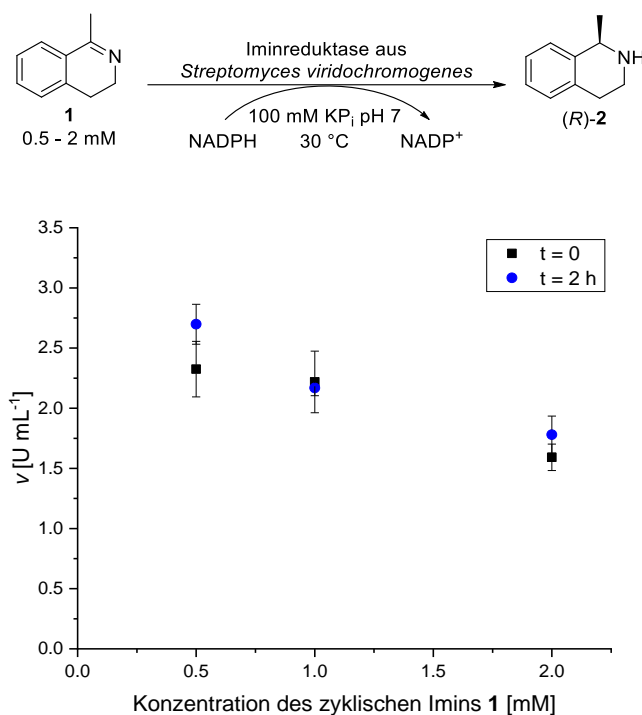


Abbildung 3.13. Untersuchung von Substratinhibition bzw. -deaktivierung der IRED20 durch das zyklische Imin **1**

3.3.3.3 Untersuchung von Produktinhibition bzw. -deaktivierung

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Produktes **2** auf die Aktivität und Stabilität der Iminreduktase untersucht. Hierzu wurde die Aktivität der Iminreduktase bei einer Substratkonzentration mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart unterschiedlicher Produktkonzentrationen bestimmt. Zur Untersuchung einer möglichen Produktinhibition bzw. -deaktivierung der IRED20 wurde die Aktivität des aufgereinigten Enzyms bei einer Substratkonzentration **1** von 0.5 mM in Gegenwart von 0.5-2.0 mM Produkt *rac*-**2** einmal direkt und einmal nach zweistündiger Inkubation von Enzym und Produkt bei 30 °C spektrophotometrisch bestimmt. Mit steigender Produktkonzentration ist sowohl zum Zeitpunkt $t=0$, als auch nach zweistündiger Inkubation von Enzym und Produkt keine Abnahme in der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zu erkennen, sodass eine Inhibition bzw. Deaktivierung des Enzyms durch das Produkt *rac*-**2** bei diesen Konzentrationen ausgeschlossen werden kann (Abbildung 3.14).

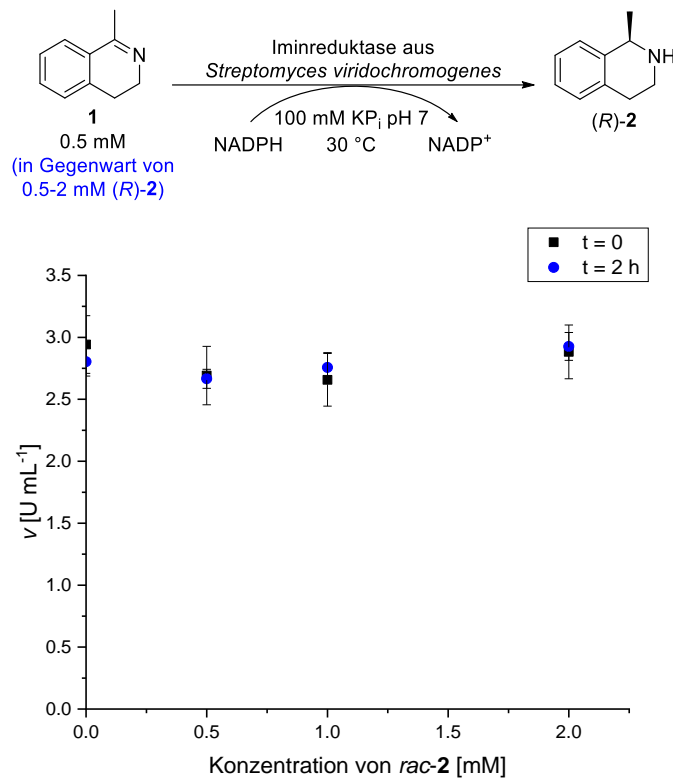


Abbildung 3.14. Untersuchung von Produktinhibierung bzw. -deaktivierung der IRED20 durch *rac*-**2**

3.3.4 Ganzzell-Katalyse

Im Anschluss an die Kinetikstudie der biokatalytischen Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisoquinolin (**1**) durch die Iminreduktase aus *S. viridochromogenes* wurden im nächsten Schritt verschiedene Ganzzell-Katalysator-Konstrukte erstellt und evaluiert mit dem Ziel eine „Designer-Zelle“ zur effektiven Prozessentwicklung zu etablieren. Vorteile der Verwendung von Ganzzell-Katalysator-Konstrukten sind eine Reduzierung der Prozesskosten, da Aufreinigungsschritte der Enzyme entfallen. Zudem steigt potentiell die Stabilität der Enzyme in der nativen Umgebung.^[154–156] Um den Nachteil einer generellen Diffusionslimitierung durch die Verwendung eines Zwei-Zell-Systems zu minimieren, wurden beide für diesen Prozess benötigten Enzyme, die Iminreduktase und die Glucose-Dehydrogenase, in einer Zelle überexprimiert.

3.3.4.1 Konstruktion von Ganzzell-Katalysatoren

Für die Überexpression zweier Enzyme in einer *E. coli*-Zelle gibt es mehrere Möglichkeiten: Einerseits können die Gene, die für die zu überexprimierenden Enzyme codieren, über zwei verschiedene Plasmide in eine *E. coli*-Zelle transformiert werden (Abbildung 3.15A). Bei einem solchen Zwei-Plasmid-Konstrukt müssen beide Plasmide über unterschiedliche *origin*

of replication (ori) und Antibiotikaresistenzen verfügen.^[161] Eine weitere Möglichkeit zur Überexpression zweier Enzyme in einer *E. coli*-Zelle ist die Transformation von einem Plasmid mit zwei *Multiple Cloning Sites* (MCS) (Abbildung 3.15B). Außerdem könnte ein Fusionsprotein zur Überexpression zweier Enzyme verwendet werden.

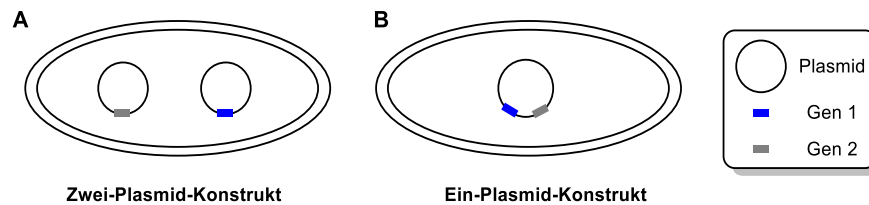


Abbildung 3.15. Möglichkeiten zur Überexpression von zwei Enzymen in einer *E. coli*-Zelle

Mit dem Ziel der Entwicklung des besten Ganzzell-Konstruktes wurden zwei verschiedene Ein-Plasmid-Systeme und ein Zwei-Plasmid-System konstruiert. Für das Zwei-Plasmid-System wurde die Iminreduktase aus *S. viridochromogenes* in einem pET22b(+)-Vektor (pBR322 origin, Ampicillin-Resistenz) und die Glucose-Dehydrogenase, aufgrund der hohen Aktivität zur Reduktion von NADP⁺, in dem *low copy*-Plasmid pACYCDuet-1 (P15A origin, Chloramphenicol-Resistenz) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Dieses Konstrukt wird der Einfachheit halber im Folgenden mit GZK1 abgekürzt. Für die Konstruktion der beiden Ein-Plasmid-Systeme wurde ein pETDuet-1 Vektor (pBR322 origin, Ampicillin-Resistenz) verwendet, der ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3) transformiert wurde. Für das Gen in der zweiten MCS ist eine erhöhte Expressionsrate zu erwarten, da dieses Gen zum Teil auch vom Ribosom, welches *upstream* der ersten MCS bindet, abgelesen wird und ein Terminator der Transkription nur *downstream* der zweiten MCS vorliegt. Daher werden beide Möglichkeiten eines Ein-Plasmid-Konstrukts mit den verschiedenen Genen erstellt und untersucht. Eine Übersicht aller drei erstellten Ganzzell-Katalysator-Konstrukte ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

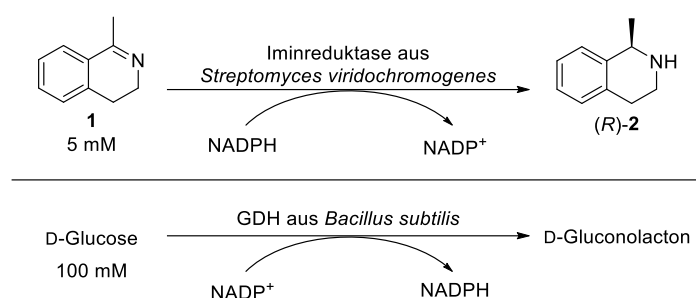
Tabelle 3.2. Übersicht der verwendeten Ganzzell-Katalysatoren (GZK), die in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurden

GZK	Plasmid
GZK1	pET22b_IRED20 & pACYCDuet_GDH
GZK2	pETDuet_GDH_IRED20
GZK3	pETDuet_IRED20_GDH

3.3.4.2 Evaluierung der Ganzzell-Konstrukte

Im Anschluss an die Konstruktion der drei verschiedenen Ganzzell-Konstrukte wurden diese evaluiert um die beste „Designer-Zelle“ zur IRED-katalysierten Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) zu identifizieren. Nach der Expression aller drei Ganzzell-Konstrukte wurden diese zunächst aufgeschossen und die Zellrohextrakte (ZRE) gewonnen. Aufgrund des sehr ähnlichen Molekulargewichts der IRED20 (32.5 kDa) und der GDH (28.1 kDa) ist eine Unterscheidung der Expressionsbanden beider Proteine per SDS-PAGE nicht möglich, sodass auf die Darstellung der SDS-PAGE verzichtet wurde. Die Aktivität der ZREs gegenüber der Oxidation von D-Glucose sowie der Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) wurde zudem spektrophotometrisch untersucht. Zur Bestimmung der Aktivität der GDH zur Oxidation von D-Glucose wurde die Zunahme von NADPH spektrophotometrisch untersucht, wohingegen zur Bestimmung der IRED-Aktivität zur Reduktion des zyklischen Imins **1** die Abnahme von NADPH spektrophotometrisch verfolgt wurde (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3. Aktivitäten der Zellrohextrakte der Ganzzell-Katalysatoren (GZK1-3) zur Oxidation von D-Glucose und Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**)



GZK	GDH Aktivität [U mL ⁻¹]	IRED Aktivität [U mL ⁻¹]
GZK1	152.4	4.9
GZK2	188.3	4.3
GZK3	429.8	4.3

Die bestimmten Aktivitäten der ZREs der Ganzzell-Katalysatoren zur Reduktion des zyklischen Imins liegen zwischen 4.3 U mL⁻¹ und 4.9 U mL⁻¹. Die höchste Aktivität zur Oxidation von D-Glucose wurde mit dem GZK3 nachgewiesen, welche deutlich höher ist gegenüber der Aktivität der anderen beiden Konstrukte. In diesem dritten Konstrukt befindet sich die GDH in der zweiten MCS, aufgrunddessen wurde diese in höherem Maß exprimiert und hat eine höhere Aktivität. Da die Glucose-Dehydrogenase nur zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors NADPH eingesetzt wird, ist eine solch hohe Aktivität wie beim GZK3 nicht notwendig.

Mit dem Ziel der Identifikation des besten Ganzzell-Konstruktes wurden daraufhin analytische Biotransformationen mit einer Katalysatorbeladung von 1 mg mL^{-1} der GZKs bei einer Substratkonzentration des zyklischen Imins **1** von 10 mM durchgeführt (Abbildung 3.16). Der zeitabhängige Umsatz mit dem Ganzzell-Konstrukt GZK1 ist deutlich höher als der Umsatz mit den Konstrukten GZK2 und GZK3. So wurde mit dem GZK1 bei einer geringen Biokatalysatorbeladung von 1 mg mL^{-1} bereits nach einer Reaktionszeit von 5 h ein Umsatz von 53% nachgewiesen, wohingegen der Umsatz der Konstrukte GZK2 und GZK3 mit 28% und 21% nur etwa halb so hoch ist. Der Ganzzell-Katalysator GZK1 stellte demnach den besten der konstruierten Katalysatoren dar. Hierbei handelt es sich um das Zwei-Plasmid-System, das durch die Wahl verschiedener Vektoren und die damit verbundene Plasmidkopienzahl ein „Feintuning“ der Expression beider Enzyme ermöglicht. Für das folgende Cosolventien-Screening und die Prozessentwicklung wurde daher das Zwei-Plasmid-Konstrukt (GZK1) als beste „Designer-Zelle“ verwendet.

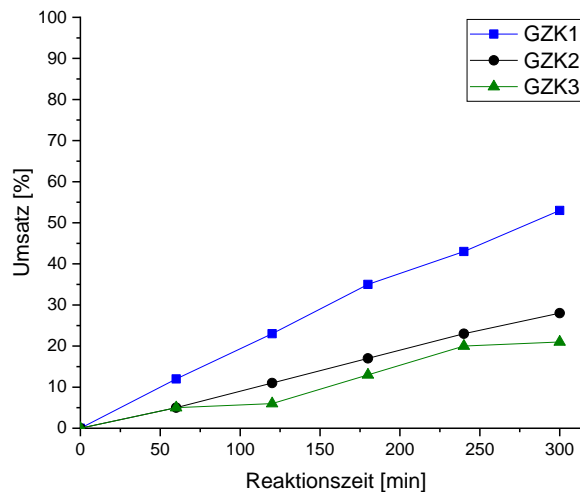
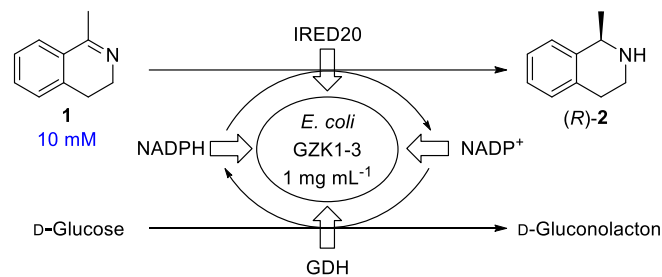


Abbildung 3.16. Analytische Biotransformationen des zyklischen Imins **1** unter Einsatz der Ganzzell-Katalysatoren GZK1-3

3.3.4.3 Cosolventien-Screening

Im Anschluss an die Auswahl des besten Ganzzell-Katalysators wurde ein Cosolventien-Screening mit diesem Konstrukt durchgeführt. Der Verlauf der Biotransformationen unter Verwendung eines *E. coli*-Ganzzell-Katalysators kann durch Cosolventien in anderer Weise beeinflusst werden als der Verlauf von Biotransformationen unter Verwendung eines aufgereinigten Enzyms. Als Beispiel lässt sich hier die Verwendung von Methanol als Cosolvent nennen, welches durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) zu Formaldehyd umgesetzt werden kann und so einen negativen Einfluss auf die Reaktion haben könnte. Diese Nebenreaktion durch ADHs ist insbesondere bei Ganzzell-Katalysatoren nicht zu vernachlässigen und kann den Verlauf einer Biotransformation negativ beeinflussen. Zur Evaluation des besten Cosolvents für die Prozessentwicklung wurden analytische Biotransformationen (0.5 mL Maßstab) bei einer Substratkonzentration des zyklischen Imins **1** von 20 mM und einer Katalysatorbeladung von 2 mg mL⁻¹ in Gegenwart unterschiedlicher wassermischbarer Cosolventien (Methanol, 2-Propanol, Ethanol und Dimethylsulfoxid (DMSO)) durchgeführt (Abbildung 3.17).

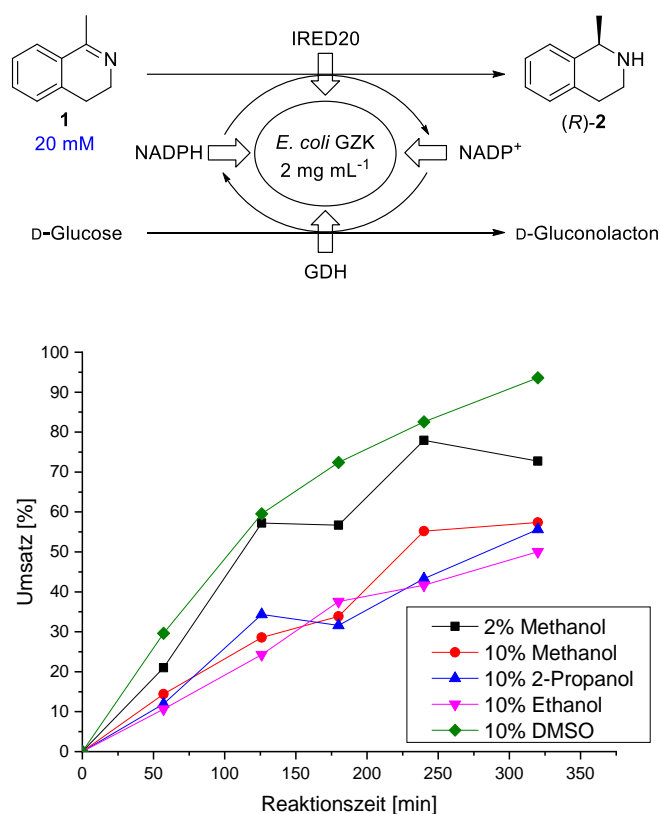


Abbildung 3.17. Biotransformationen unter Verwendung des Ganzzell-Katalysators in Gegenwart mit Wasser mischbarer Cosolventien (2-10% v/v)

Der beste zeitabhängige Umsatz wurde mit 10% v/v DMSO als Cosolvent erreicht mit dem bereits nach einer Reaktionszeit von 5.5 h ein Umsatz von 94% bestimmt wurde. Gute Umsätze von 78% des zyklischen Imins **1** wurden zudem bei einer Cosolventkonzentration von 2% v/v Methanol nach einer Reaktionszeit von 4 h nachgewiesen. Eine Erhöhung der

Cosolventkonzentration von Methanol beeinflusst den Verlauf der Biotransformation von **1** negativ und führt zu geringeren Umsätzen von 57% nach einer Reaktionszeit von 5 h. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Umsetzung von Methanol durch *E. coli* eigene ADHs zu giftigem Formaldehyd sein. Ebenfalls nur moderate Umsätze um 50% wurden zudem unter Verwendung von 10% v/v 2-Propanol bzw. Ethanol als Cosolvent nachgewiesen (Abbildung 3.17). Demnach stellt bei einer Cosolventkonzentration von 10% v/v nur DMSO ein geeignetes Cosolvent für die biokatalytische Iminreduktion unter Verwendung von Ganzzell-Katalysatoren dar. Da die Entfernung von DMSO aus Reaktionen jedoch oftmals problematisch ist und in Gegenwart von Methanol bei einer Cosolventkonzentration von 2% v/v ebenfalls gute Umsätze beobachtet wurden, wurde außerdem Methanol (neben DMSO) als geeignetes Cosolvent zur biokatalytischen Iminreduktion ausgewählt. Hierbei ist zu beachten, das Methanol nur als geeignetes Cosolvent in Betracht kommt, wenn eine geringe Cosolventkonzentration zur Löslichkeit des Edukts ausreicht.

3.3.5 Prozessentwicklung

Der letzte Schritt dieses Teilprojektes bestand in der Entwicklung eines effizienten Prozesses zur Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) bei einer hohen Substratkonzentration und gleichzeitig geringer Katalysatorbeladung. Die Prozessentwicklung wurde im vergrößerten Labormaßstab in einem Gesamtvolumen von 40 mL bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C durchgeführt. Der pH-Wert der Biotransformation sinkt aufgrund der äquimolaren Bildung von D-Gluconsäure durch Hydrolyse des D-Gluconolactons, das als Coprodukt bei der *in situ*-Regeneration des Cofaktors NADP⁺ gebildet wird (Abbildung 3.18A). Über die automatisierte Zugabe von Natronlauge durch ein TitroLine[®]-System (Abbildung 3.18B) wird der pH-Wert während der gesamten Reaktion konstant bei pH 7 gehalten. Da der Verbrauch an Natronlauge äquimolar zur Umsetzung des zyklischen Imins **1** ist, kann über die zeitabhängige Dosierung der Natronlauge auch der Reaktionsverlauf des präparativen Ansatzes verfolgt und die initiale Reaktionsgeschwindigkeit berechnet werden.

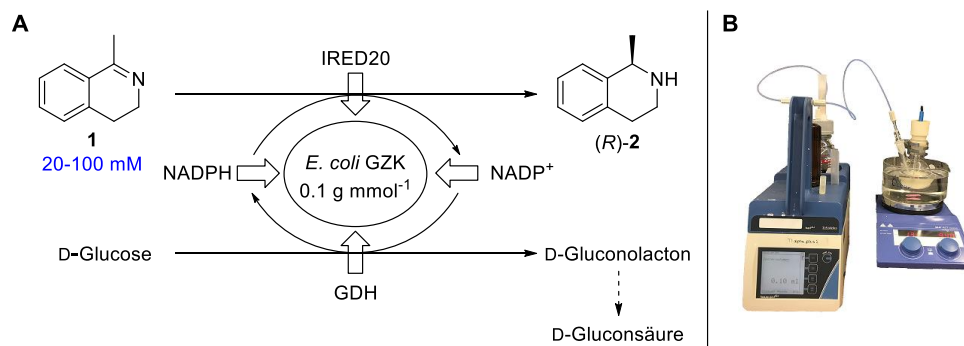


Abbildung 3.18. **A** Übersicht der Prozessentwicklung **B** TitroLine[®]-System zur Konstanthaltung des pH-Wertes

Mit dem Ziel die Effizienz des Upscalings bewerten zu können, wurden die Experimente im präparativen Maßstab bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen (20-100 mM) bei einem gleichbleibenden Verhältnis von Ganzzell-Katalysator zu Substrat (0.1 g Biokatalysator pro mmol Substrat) unter Verwendung von Methanol als Cosolvent (1-2% v/v) durchgeführt (Abbildung 3.18A).

Das erste Experiment zur Prozessentwicklung wurde bei einer Substratkonzentration von 20 mM und einer Katalysatorkonzentration von 2 mg mL⁻¹ (0.1 g lyophilisierte Zellen pro mmol Substrat) für 24 h durchgeführt (Abbildung 3.19).

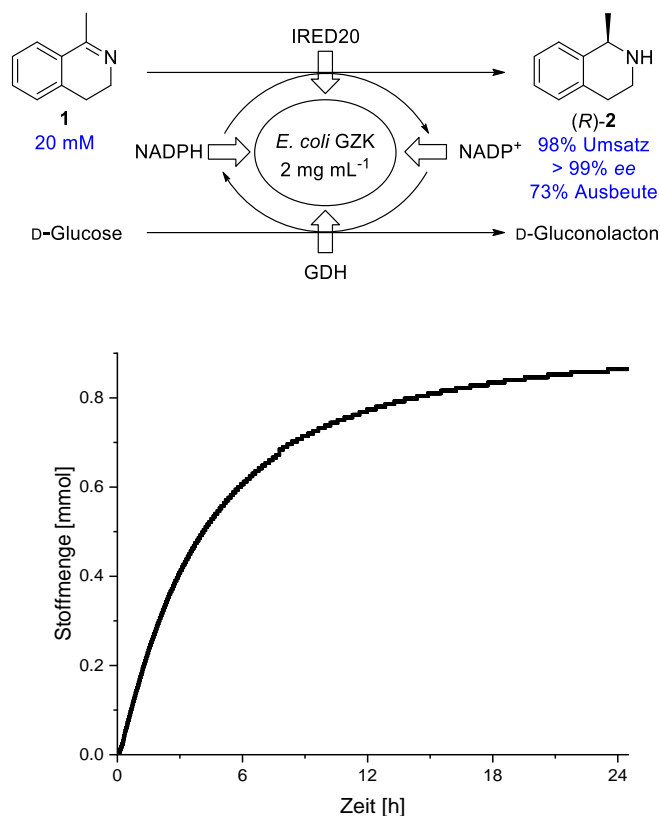


Abbildung 3.19. Präparative Biotransformation von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) bei einer Substratkonzentration von 20 mM

Wie an dem Verbrauch der Natronlauge zu erkennen ist, verlief die Umsetzung des zyklischen Imins **1** in den ersten 5 h linear und näherte sich dann immer mehr einer Asymptote um 0.85 mmol an (Abbildung 3.19). Der Verbrauch an Natronlauge war demnach leicht erhöht gegenüber der eingesetzten Stoffmenge (0.8 mmol). Dieser beobachtete Unterschied liegt im Fehlerbereich des TitroLine®-Systems und wurde bereits in einer Vielzahl von präparativen Biotransformationen unter Anwendung des TitroLine®-Systems zur Konstanthaltung des pH-Wertes in der Arbeitsgruppe beobachtet. Der per SFC-HPLC bestimmte Umsatz dieses präparativen Ansatzes von 98% korrelierte ebenfalls mit dem Verbrauch der Natronlauge. Der Enantiomerenüberschuss betrug > 99% ee zugunsten des (*R*)-Enantiomers von 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin ((*R*)-**2**).

Nach der Aufarbeitung wurde das Produkt (*R*)-**2** mit einer Ausbeute von 73% isoliert (Abbildung 3.19).

Im nächsten Schritt der Prozessentwicklung wurde die Substratkonzentration auf 50 mM erhöht bei gleichbleibendem Katalysator-Substrat-Verhältnis und einer Reaktionszeit von 24 h (Abbildung 3.20).

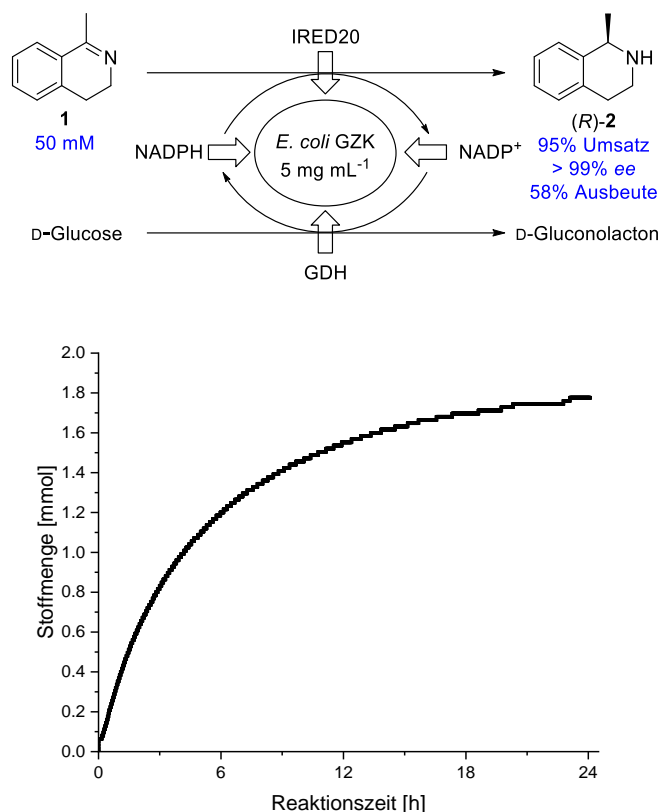


Abbildung 3.20. Präparative Biotransformation von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) bei einer Substratkonzentration von 50 mM

Der Verbrauch der Natronlauge verlief ebenfalls bei der präparativen Biotransformation mit einer Substratkonzentration von 50 mM des zyklischen Imins **1** in den ersten 4 h linear und näherte sich dann über den gesamten Reaktionszeitraum einer Asymptote um 1,8 mmol an. Ein vollständiger Umsatz des Substrats **1** entspricht einem Natronlaugeverbrauch von 2,0 mmol, daher lag der Verbrauch an Natronlauge in diesem präparativen Ansatz unter dem erwarteten und suggerierte somit einen Umsatz von lediglich 89%. Per SFC-HPLC wurde jedoch ein nahezu quantitativer Umsatz von 95% und ein ee > 99% für (*R*)-**2** bestimmt (Abbildung 3.20). Demnach lag in diesem Experiment eine Diskrepanz zwischen dem bestimmten Umsatz und dem Verbrauch an Natronlauge vor. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin ((*R*)-**2**) wurde nach Aufarbeitung mit einer Ausbeute von 58% isoliert.

Im letzten Schritt der Prozessentwicklung dieses Teilprojektes wurde die Substratkonzentration auf 100 mM erhöht bei einem gleichbleibend geringen Katalysator-Substrat-Verhältnis von 0.1 g lyophilisiertem Ganzzell-Katalysator pro mmol Substrat (Abbildung 3.21).

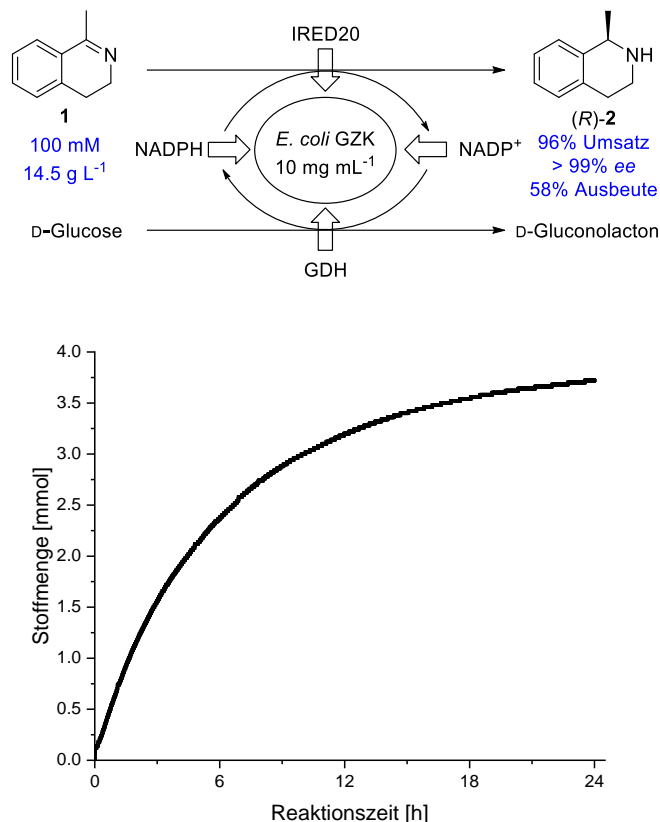


Abbildung 3.21. Präparative Biotransformation von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) bei einer Substratkonzentration von 100 mM

Für die präparative Biotransformation von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) bei einer Substratkonzentration von 100 mM wurde per SFC-HPLC ein Umsatz von 96% mit einem Enantiomerenüberschuss > 99% ee zugunsten des Amins (*R*)-**2** bestimmt. Der Natronlaugeverbrauch des TitroLine®-Systems entsprach einem leicht verringerten Umsatz von 93%, was jedoch im Fehlerbereich des Systems liegt. Wie bei den anderen präparativen Reaktionen verlief der Verbrauch an Natronlauge in der Anfangszeit (bis zu etwa 5 h) linear und flachte dann immer weiter ab. Nach Aufarbeitung wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 58% isoliert.

Aufgrund des guten Verlaufs der Prozessentwicklung bis hin zu einer Substratkonzentration von 100 mM, welches einer Substratbeladung von 14.5 g L⁻¹ entspricht, wurde im Anschluss an die erfolgreiche Entwicklung des Prozesses eine Analyse der Effizienz des Biokatalysators durchgeführt. Anhand des anfänglich linearen Verbrauchs an Natronlauge wurde über das Anlegen einer Tangente sowie die Bestimmung der Steigung die spezifische Aktivität des Ganzzell-Katalysators bestimmt. Außerdem wurde die Produktbildung ins Verhältnis zur Menge an verwendetem Biokatalysator gesetzt (Abbildung 3.22).

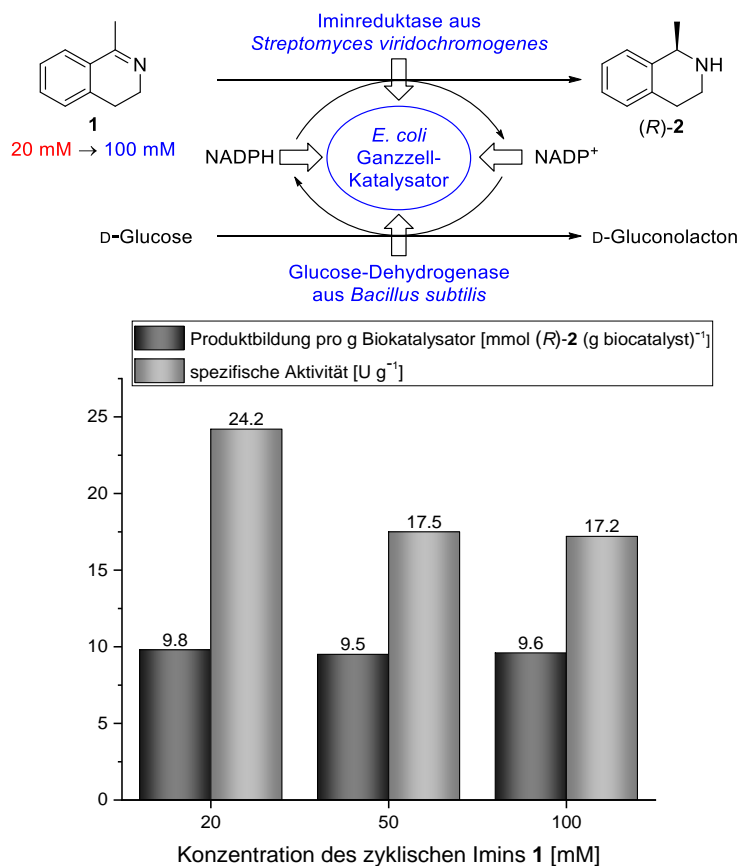


Abbildung 3.22. Effizienz des Ganzzell-Katalysators in präparativen Biotransformationen zur Reduktion des zyclischen Imins **1**

Unabhängig von der verwendeten Substratkonzentration (20-100 mM) lag die Produktbildung (R)-**2** pro g Biokatalysator in demselben Größenbereich um 9.6 mmol (R)-**2** pro Gramm Ganzzell-Katalysator. Lediglich die spezifische Aktivität sank mit Erhöhung der Substratkonzentration von 20 auf 50 mM leicht ab. Im Vergleich dazu blieb die spezifische Aktivität trotz einer Verdoppelung der Substratkonzentration von 50 auf 100 mM konstant. Selbst bei hohen Substratkonzentrationen von 100 mM hatte der Ganzzell-Katalysator demnach eine hohe spezifische Aktivität von 17.2 U pro g lyophilisiertem GZK, was für eine hohe Effizienz des Katalysators spricht. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Substrats **1** im Wässrigen fiel die spezifische Aktivität trotz der im Rahmen der Untersuchungen der Enzymkinetik nachgewiesenen Substratinhibierung bei einer Erhöhung der Substratkonzentration vermutlich nicht weiter ab.

Die Ergebnisse dieses Projektes zur Optimierung und Prozessentwicklung der biokatalytischen Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) wurde gemeinsam mit Wetzl und Iding im Journal *Heterocycles* veröffentlicht: N. Zumbrägel, D. Wetzl, H. Iding, H. Gröger *Heterocycles* **2017**, 95, 1261-1271.^[146]

3.4 Ausblick

Im Rahmen dieses ersten Projektes der vorliegenden Dissertation konnte anhand einer Modellreaktion ein effizienter Prozess im präparativen Maßstab zur biokatalytischen Darstellung zyklischer Amine unter Einsatz von Iminreduktasen etabliert werden. Hierzu wurden zunächst die optimalen Reaktionsparameter identifiziert und daraufhin die Etablierung des geeigneten Ganzzell-Konstrukts bewerkstelligt. Die Ergebnisse dieses Projektes sollen im Rahmen der folgenden Projekte, die auf der Verwendung von Iminreduktasen als Biokatalysatoren beruhen, genutzt werden, um direkt auf optimale Reaktionsbedingungen zurückgreifen zu können. Außerdem soll das in diesem Projekt etablierte beste Ganzzell-Konstrukt als Modell weiterer Ganzzell-Katalysatoren für präparative Experimente in den folgenden Projekten verwendet werden.

4. BOKATALYTISCHE REDUKTION S- UND O-HALTIGER ZYKLISCHER IMINE

4.1 Stand der Wissenschaft

4.1.1 Bedeutung chiraler S- und O-haltiger zyklischer Amine

Zyklische Amine mit einem Schwefel- oder Sauerstoffatom in der heterozyklischen Struktur sind sowohl in der Natur als auch in der Medizin von herausragender Bedeutung. So enthielten 2014 59% aller durch die U.S. FDA zugelassenen Pharmazeutika mindestens einen Stickstoff-Heterozyklus^[1] und 25% aller Medikamente, die 2011 auf dem Markt waren, enthielten ein Schwefelatom.^[162] Entsprechend stellen zyklische Amine mit zusätzlichen Heteroatomen wie beispielsweise Schwefel oder Sauerstoff bedeutende Strukturmodule dar und die Entwicklung von Syntheserouten zur Darstellung dieser Verbindung ist wissenschaftlich von großem Interesse. In Abbildung 4.1 sind eine Reihe von schwefel- bzw. sauerstoffhaltigen zyklischen Aminen, die eine pharmazeutische Aktivität haben, dargestellt. In dieser Arbeit lag der Fokus auf den 3-Thiazolidinen als fünfgliedrige *N,S*-Heterozyklen, sowie den 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazinen, die im Folgenden näher erläutert werden.

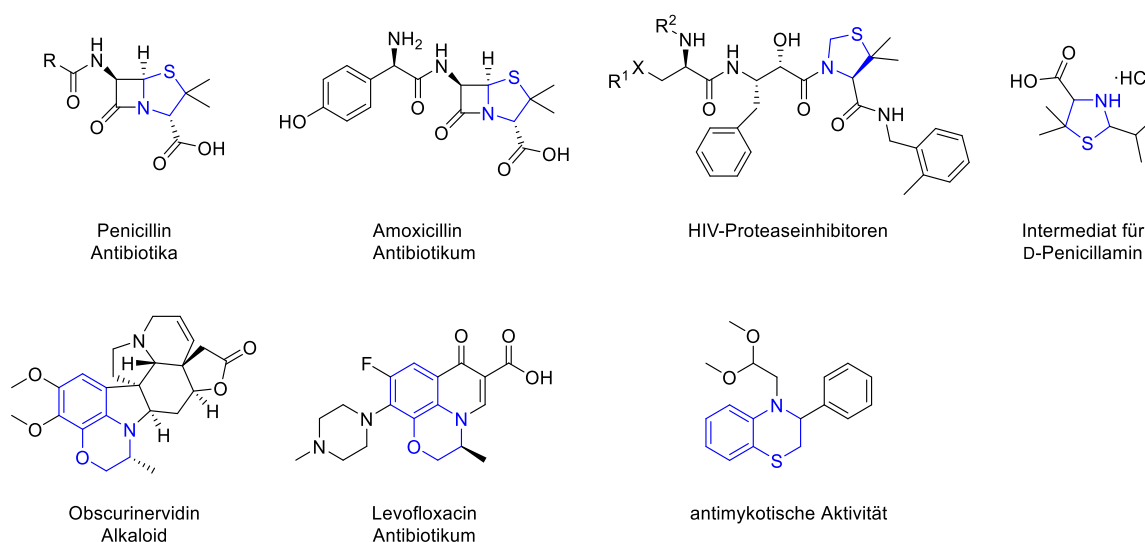


Abbildung 4.1. Ausgewählte S- bzw. O-haltige zyklische Amine mit pharmazeutischer Aktivität oder Intermediate für Pharmazeutika

4.1.2 3-Thiazolidine

3-Thiazolidine als Vertreter der fünfgliedrigen schwefelhaltigen zyklischen Amine sind wichtige Strukturmodule in einer Reihe von Life Science Molekülen. So kommen 3-Thiazolidine als eine der zwei heterozyklischen Rahmenstrukturen in Penicillinen und von Penicillinen abgeleiteten β -Lactam Antibiotika wie beispielsweise Amoxicillin vor.^[163] Außerdem sind 3-Thiazolidine Strukturmodule in einer Reihe von HIV-Proteaseinhibitoren^[164] und stellen ein Schlüsselintermediat in der industriellen Synthese der nicht-proteinogenen Aminosäure D-Penicillamin dar (Abbildung 4.2).^[165] Des Weiteren zeigten *spiro*-3-Thiazolidine Aktivitäten gegenüber humanen Tumorzelllinien^[166] und alkyl-substituierte 3-Thiazolidine sind als radioprotektive Agenzien von medizinischer Bedeutung.^[167,168] Neben medizinischen Anwendungsgebieten wurde die Relevanz von 3-Thiazolidinen auch im Bereich der Pestizide^[169] und Aromastoffe^[170] beschrieben (Abbildung 4.2).

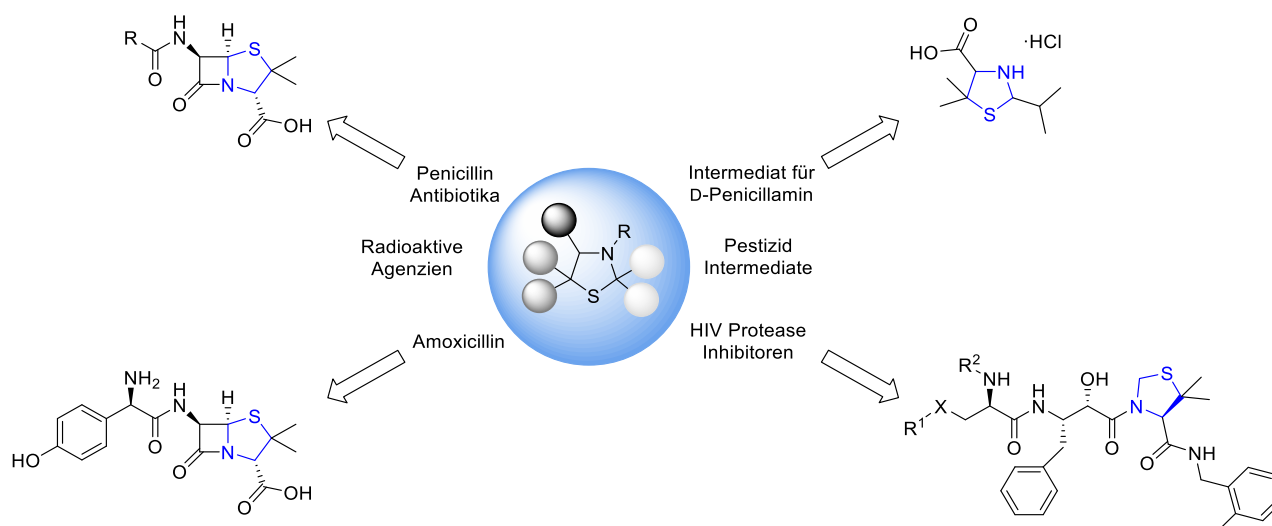
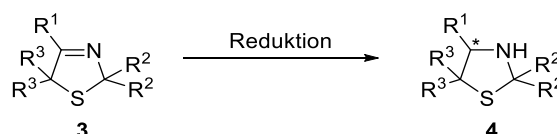


Abbildung 4.2. Anwendungsgebiete von 3-Thiazolidinen^[163-170]

Konzeptionell sind 3-Thiazolidine **4** unabhängig vom Substitutionsmuster über eine Reduktion der C=N-Doppelbindung der entsprechenden 3-Thiazoline **3** zugänglich (Schema 4.1). 3-Thiazoline **3** können wiederum sehr elegant über eine Variante der Asinger-Reaktion dargestellt werden (siehe auch 4.1.2.2).^[171-176]



Schema 4.1. Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** durch Reduktion der entsprechenden 3-Thiazoline **3**

4.1.2.1 Forschungsarbeiten zur Reduktion der 3-Thiazoline

Trotz der guten Verfügbarkeit der 3-Thiazoline **3** sind die Mehrzahl an Versuchen zur Reduktion dieser Verbindungen seit den 1950er Jahren fehlgeschlagen (Abbildung 4.3). Diese nicht erfolgreichen Forschungsarbeiten umfassen eine Vielzahl der standardisierten Technologien zur Iminreduktion. Die etablierte Hydriertechnologie mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre ist zur Reduktion der 3-Thiazoline **3** aufgrund einer Vergiftung des Katalysators durch den Schwefel nicht geeignet.^[174,177] Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Figueras, die eine Vergiftung von Metallen auf Metallträgerkatalysatoren durch Schwefel berichtete.^[178] Eine Reihe anderer etablierter Reduktionsmethoden wie die Verwendung von Natrium in Alkohol, Natrium in Gegenwart von flüssigem Ammoniak oder Aluminium in Gegenwart von Kaliumhydroxid bzw. feuchtem Ether lieferten keine eindeutigen Ergebnisse.^[174] Unter Verwendung von Metallhydriden wie Natriumborhydrid und Lithiumaluminiumhydrid ist eine Reduktion der 3-Thiazoline **3** zu beobachten, die allerdings mit einer Ringöffnung des *N,S*-Acetals des 3-Thiazolidins **4** verbunden ist.^[174,177,179] Die einzige Ausnahme, die eine Darstellung der 3-Thiazolidine **4** aus den 3-Thiazolinen **3** erlaubt, ist die Reduktion mit Catecholboran.^[179] Diese Reduktionsmethode liefert die entsprechenden 3-Thiazolidine **4** allerdings nur in geringen bis moderaten Ausbeuten und sehr geringen Enantioselektivitäten mit Enantiomerenüberschüssen von bis zu 4% ee.^[179] Ein weiterer Nachteil dieser Reduktionsmethode ist die Notwendigkeit eines großen Überschusses des teuren und technisch unvorteilhaften Catecholborans (Abbildung 4.3).

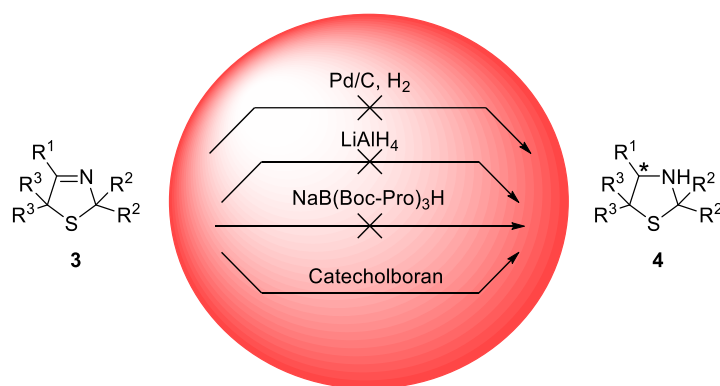
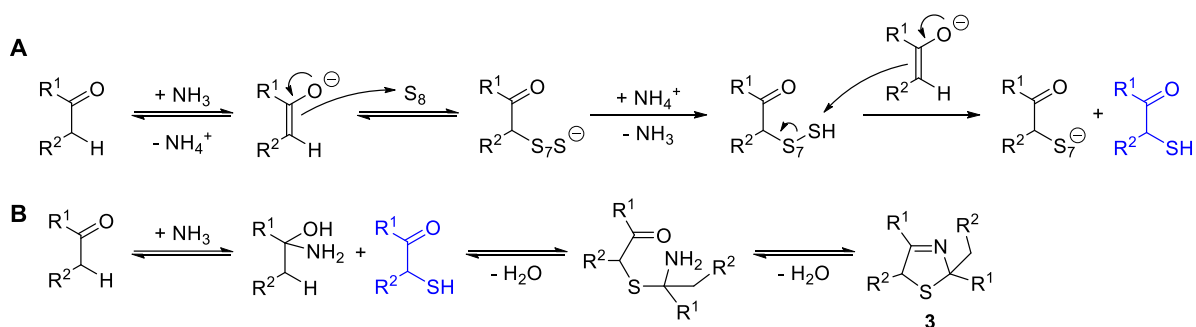


Abbildung 4.3. Übersicht der untersuchten chemokatalytischen Ansätze zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3**^[174,177,179]

Die Etablierung einer generellen, vom Substitutionsmuster unabhängigen und enantioselektiven Reduktionsmethode zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** stellt daher eine Herausforderung dar, die von großem Interesse ist.

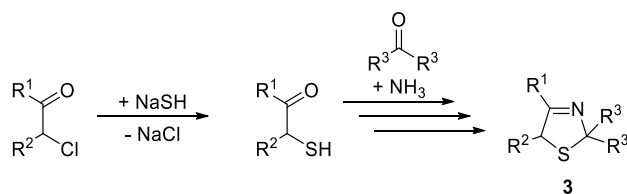
4.1.2.2 Asinger-Synthese

Im Jahr 1956 berichtete Asinger erstmals die Darstellung von 3-Thiazolinen **3**, nachdem er Ammoniak, Schwefel und aliphatische bzw. arylaliphatische Ketone, die ein α -H-Atom tragen, miteinander umsetzte.^[171] Im ersten Schritt der Asinger-Reaktion als Multikomponentenreaktion kommt es zur Bildung einer α -Mercaptocarbonylverbindung aus einem Keton oder einem Aldehyd (Oxokomponente) und elementarem Schwefel (Schema 4.2A). Asinger postulierte im nächsten Schritt die Bildung eines α -Aminoalkohols aus einem weiteren Äquivalent der Oxokomponente und Ammoniak. Der gebildete α -Aminoalkohol reagiert daraufhin mit der in Schritt A gebildeten α -Mercaptocarbonylverbindung unter Wasserabspaltung zu einem *N,S*-Halbacetal. Unter erneutem Wasseraustritt erfolgt schließlich der Ringschluss (Schema 4.2B).^[172]



Schema 4.2. Reaktionsmechanismus der Synthese von 3-Thiazolinen gemäß Asinger^[172]

Die Degussa AG entwickelte eine universelle Variante der Asinger-Reaktion, die Natriumhydrogensulfid als Schwefelatomdonor und eine α -halogenierte Carbonylkomponente nutzt (Schema 4.3).^[173,175,176] Dies erleichtert die Substitution in α -Position und die damit verbundene *in situ*-Ausbildung des Thiols. Außerdem können über diesen Syntheseweg erhöhte Ausbeuten für 3-Thiazoline **3** mit unterschiedlichen Substituenten in 2- und 5-Position, durch die Wahl eines α -chlorierten Aldehyds bzw. Ketons erreicht werden.



Schema 4.3. Degussa-Variante der Asinger-Reaktion^[173,175,176]

4.1.3 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazine und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine

3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazine als weitere Vertreter der schwefelhaltigen zyklischen Amine zeigten unter anderem antimykotische Aktivität (Abbildung 4.4),^[180] sodass auch die Darstellung dieses Strukturmotiv von großem Interesse ist. Während lediglich die Anwendung eines 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazins in der Literatur beschrieben ist, ist das Anwendungsgebiet der entsprechenden sauerstoffhaltigen zyklischen Amine deutlich größer. 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine sind Struktur motive in einer Reihe biologisch und pharmazeutisch aktiver Verbindungen wie erfolgsversprechender Antidepressiva, Calcium-Antagonisten, anti-inflammatorischer, antibakterieller, antimikrobieller sowie antinozizeptiver Agenzien.^[181–189] Bekannte Beispiele von Pharmazeutika, die ein 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin als Strukturmotiv tragen, sind Levofloxacin^[188] und Obscurinervidin^[189] (Abbildung 4.4).

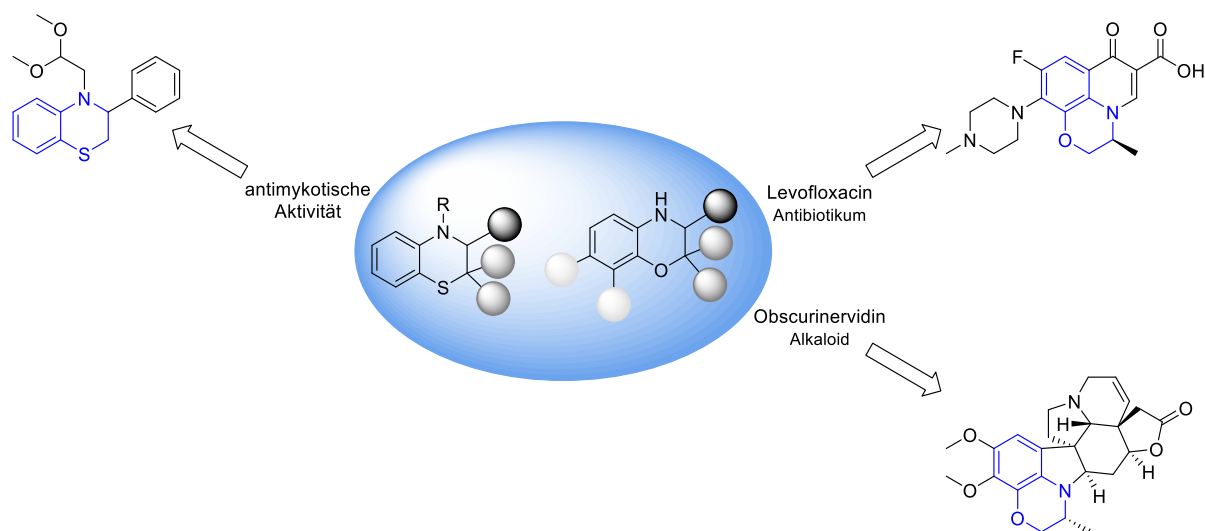
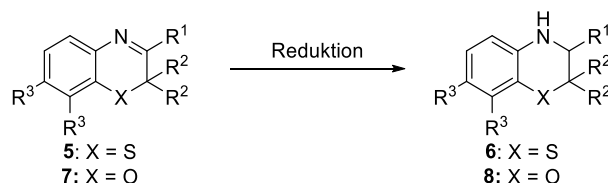


Abbildung 4.4. Anwendungsgebiete von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazinen^[180,188,189]

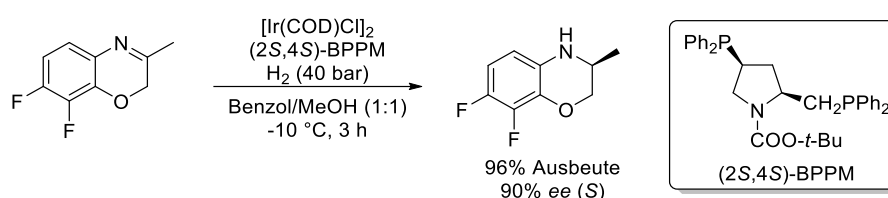
Aufgrund der Bedeutung dieser chiralen Struktur motive ist das Interesse zur Entwicklung von enantioselektiven Syntheserouten zur Darstellung von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen **6** und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazinen **8** groß. Da die entsprechenden zyklischen Imine leicht zugänglich sind, stellen die 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** attraktive Substrate zur Synthese der entsprechenden S- bzw. O-haltigen zyklischen Amine über eine Reduktion dar (Schema 4.4).



Schema 4.4. Darstellung von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen **6** und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazinen **8** durch Reduktion der entsprechenden zyklischen Imine **5** bzw. **7**

4.1.3.1 Chemische Methoden zur Reduktion von 2H-1,4-Benzothiazinen und 2H-1,4-Benzoxazinen

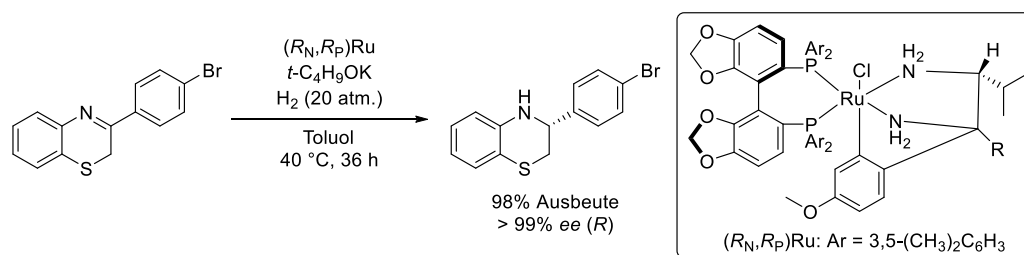
Die asymmetrische Reduktion von 2H-1,4-Benzoxazinen mittels Übergangsmetall-katalysierter Hydrierung wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht.^[190–197] Unter Verwendung verschiedener Iridium-Komplexe konnten 2H-1,4-Benzoxazine mit hohen Enantioselektivitäten und Umsätzen zu den entsprechenden 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazinen umgesetzt werden.^[191,192,195] So berichteten Satoh *et al.* 1998 eine enantioselektive Hydrierung zur Darstellung eines Schlüsselintermediats des Levofloxacin unter Verwendung eines Iridium-Komplexes mit einer hoher Ausbeute von 96% und einem Eantiomerenüberschuss von 90% ee zugunsten des gewünschten (S)-Enantiomers (Schema 4.5).^[191]



Schema 4.5. Enantioselektive Hydrierung zur Darstellung eines Schlüsselintermediats von Levofloxacin^[191]

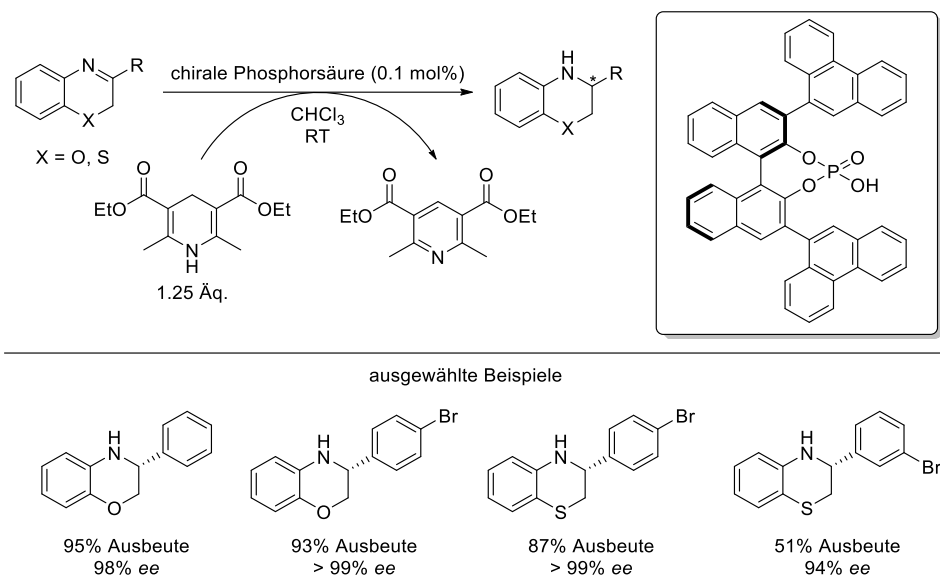
Neben Iridium-Komplexen konnten Ruthenium-Komplexe^[193,197] und Eisen-Brønstedtsäure-Katalysatoren^[194] erfolgreich zur Hydrierung von Benzoxazinen eingesetzt werden. Eine metallfreie Hydrierung unter Verwendung von Tris(Pentafluorphenylboran) wurde zudem kürzlich publiziert, welche die entsprechenden 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazine allerdings nur in moderaten Enantioselektivitäten lieferte.^[198]

Im Vergleich zu der Vielzahl an publizierten Methoden zur Übergangsmetall-katalysierten bzw. metallfreien Hydrierung von 2H-1,4-Benzoxazinen sind nur wenige Methoden zur Übergangsmetall-katalysierten Hydrierung der Schwefel-Analoga veröffentlicht. Arai *et al.* gelang es 2013 eine Methode zur Hydrierung von 2H-1,4-Benzoxazinen unter Verwendung von Ruthenium-Katalysatoren zu entwickeln und diese erfolgreich auf die Hydrierung von 2H-1,4-Benzothiazinen zu übertragen. Dadurch konnte die erste Übergangsmetall-katalysierte Hydrierung eines 2H-1,4-Benzothiazins realisiert werden (Schema 4.6).^[193]



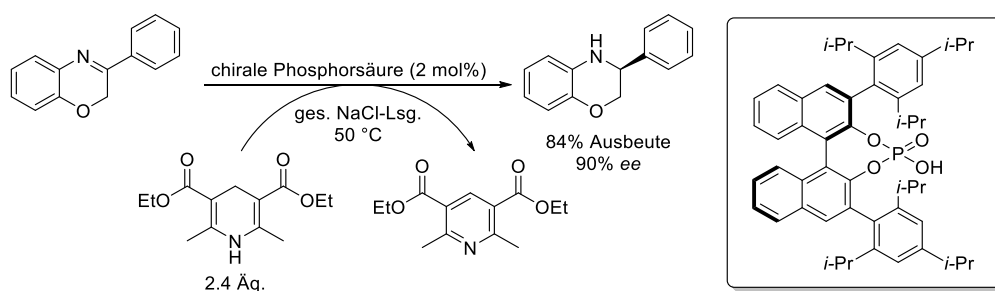
Schema 4.6. Ruthenium-katalysierte Hydrierung eines 2H-1,4-Benzothiazins^[193]

Die asymmetrische Transferhydrierung unter Verwendung des Hantzsch-Esters (HEH) als Hydridquelle und Brønsted-Säuren als Katalysatoren (siehe auch Kapitel 3.1.2) stellt eine organokatalytische Methode zur Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen und 2*H*-1,4-Benzoxazinen dar, die 2006 erstmals von Rueping *et al.* für diese Substrate beschrieben wurde.^[199] Diese Methode erlaubt die hoch enantioselektive Darstellung der entsprechenden Dihydroverbindungen bei einer sehr geringen Katalysatorbeladung von 0.1 mol% der chiralen Phosphorsäure und zeigt für beide Substanzklassen ein breites Substratspektrum (Schema 4.7).^[199]



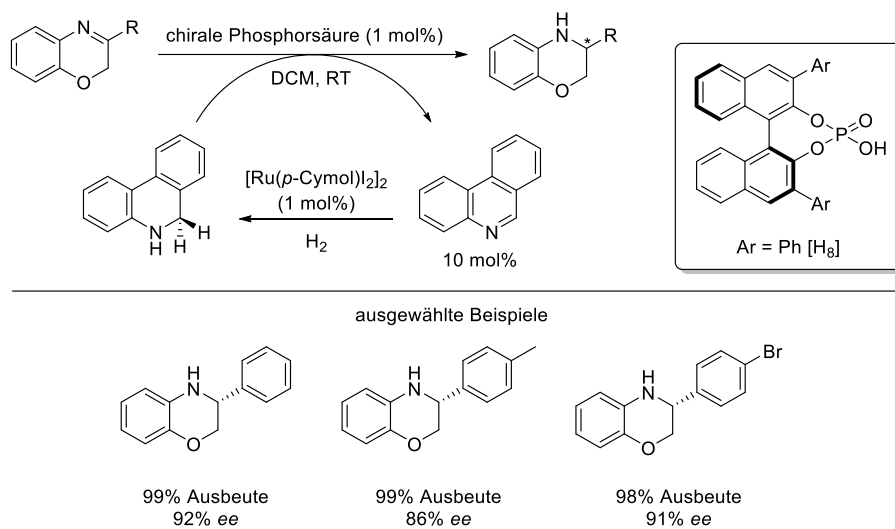
Schema 4.7. Organokatalytische Transferhydrierung von 2*H*-1,4-Benzothiazinen und 2*H*-1,4-Benzoxazinen^[199]

Im Anschluss an die Erweiterung der organokatalytischen Transferhydrierung auf Benzothiazine und Benzoxazine entwickelten mehrere Arbeitsgruppen Konzepte zur Immobilisierung der Brønsted-Säuren, beispielsweise in Form mikroporöser Polymernetzwerke^[200,201], metallorganischer Materialien^[202] oder der Immobilisierung auf einem festem Polymer^[203] und nutzten diese erfolgreich zur Reduktion von 2*H*-1,4-Benzoxazinen. Rueping *et al.* gelang es zudem die biomimetische Reduktion mittels Hantzsch-Ester für die Reduktion zyklischer Imine im Wässrigen zu etablieren und diese erfolgreich auf die Reduktion eines Benzoxazins anzuwenden (Schema 4.8).^[204]



Schema 4.8. Biomimetische Reduktion eines 2*H*-1,4-Benzoxazins mittels Hantzsch-Ester im Wässrigen^[204]

Ein Nachteil der biomimetischen Reduktion mittels Hantzsch-Ester (HEH) ist die Notwendigkeit der stöchiometrischen Verwendung dieses Reduktionsmittels, da es im Gegensatz zur Regeneration natürlicher Cofaktoren keine Möglichkeit zum Recycling des Hantzsch-Esters gibt. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelten Chen *et al.* eine biomimetische Transferhydrierung mit Dihydrophenanthridin als NAD(P)H-Analogon, welches über einen Ruthenium-Katalysator regeneriert werden kann und somit in katalytischen Mengen eingesetzt werden kann. Diese Methode liefert die entsprechenden 3,4-Dihydro-2*H*-benzoxazine mit hohen Enantioselektivitäten (> 87% ee) in sehr guten Ausbeuten von mindestens 95% (Schema 4.9).^[205]



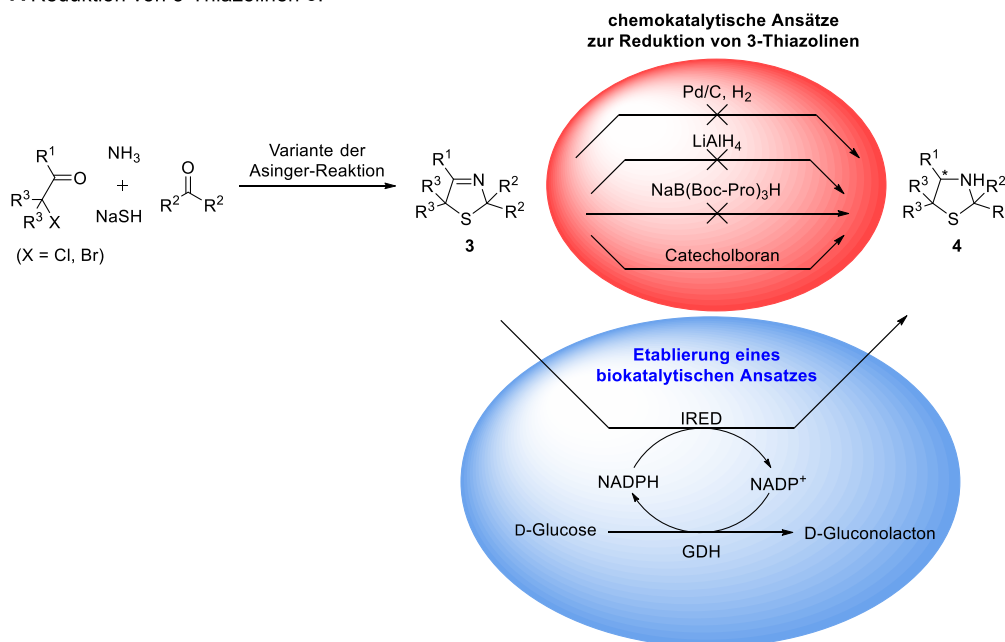
Schema 4.9. Asymmetrische Transferhydrierung mit Dihydrophenanthridin als NAD(P)H-Analogon^[205]

4.2 Motivation und Zielsetzung

Aufgrund der fundamentalen Bedeutung von 3-Thiazolidinen **4** als Strukturmodule und der Limitierung synthetischer Routen zu dieser Verbindungsklasse (Abbildung 4.5A) ist die Etablierung einer generellen Syntheseroute unabhängig vom Substitutionsmuster von großem Interesse. Dabei stellt insbesondere die Reduktion der entsprechenden zyklischen Imine **3**, die in einer Multikomponentenreaktion über die Degussa-Variante der Asinger-Reaktion dargestellt werden können, eine elegante Herangehensweise dar. Neben der Entwicklung einer generellen Syntheseroute stellt zudem die Etablierung einer hoch enantioselektiven Route eine weitere Herausforderung dar.

Auf der Basis der literaturbeschriebenen erfolgreichen Nutzung von Iminreduktasen zur Reduktion einer Vielzahl zyklischer Imine (siehe auch Kapitel 3.1.4),^[2,118,124–126,134,206] sowie des erfolgreichen Einsatzes dieser Enzymklasse in der Optimierung und Prozessentwicklung IRED-katalysierter Reaktionen (siehe Kapitel 3)^[146], wurde die Eignung der IREDs zur Reduktion von 3-Thiazolidinen **3** untersucht (Abbildung 4.5A).

A Reduktion von 3-Thiazolidinen **3**:



B Reduktion von 2H-1,4-Benzothiazinen **5** und 2H-1,4-Benzoxazinen **7**:

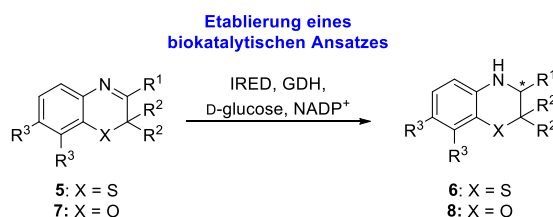


Abbildung 4.5. Limitierungen der chemischen Reduktion von 3-Thiazolidinen **3** und Zielsetzung des Projektes zur biokatalytischen Reduktion S- und O-haltiger zyklischer Imine

Da der Einfluss weiterer Heteroatome auf die Reduktion zyklischer Imine durch Iminreduktasen bisher nicht untersucht wurde, stellt zudem die Entwicklung einer Plattformtechnologie zur Reduktion zyklischer Imine mit mehreren Heteroatomen eine weitere Herausforderung dar. Aufgrund dessen soll neben der biokatalytischen Reduktion von 3-Thiazolidinen **3** auch die IRED-katalysierte Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5**, als weitere Verbindungsklasse mit einem schwefelhaltigen zyklischen Imin, sowie die Reduktion von 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** als Vertreter von sauerstoffhaltigen zyklischen Iminen untersucht werden (Abbildung 4.5B). Ein Vorteil der IRED-katalysierten Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** gegenüber der organokatalytischen Reduktion mit Hantzsch-Ester besteht in der katalytischen Verwendung des teuren Cofaktors NADPH aufgrund der *in situ*-Regeneration des NADPH über die Glucose-Dehydrogenase.

Mit dem Ziel der Entwicklung der IRED-katalysierten Reduktion von 3-Thiazolidinen **3**, sowie 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** sollen zunächst geeignete Substrate synthetisiert werden. Für die 3-Thiazoline **3** soll daraufhin die chemokatalytische Reduktion evaluiert werden, indem neben den bereits in Kapitel 4.1.2.1 erwähnten Methoden weitere literaturbekannte Methoden zur Reduktion von Iminen untersucht werden. Es folgt die chemische Synthese der racemischen Referenzverbindungen zur Etablierung von geeigneten Methoden zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses. Im Anschluss an diese Arbeiten kann die Untersuchung der biokatalytischen Reduktion der S- und O-haltigen zyklischen Imine erfolgen. Im Vorfeld der Biotransformationen wird jeweils zunächst ein pH-Shift-Assay zur Identifizierung geeigneter Iminreduktasen sowie die Bestimmung der spektrophotometrischen Aktivität durchgeführt. Außerdem werden initiale Prozessentwicklungen für ausgewählte Substrate durchgeführt, um die Effizienz der etablierten Technologie zu demonstrieren (Abbildung 4.6).

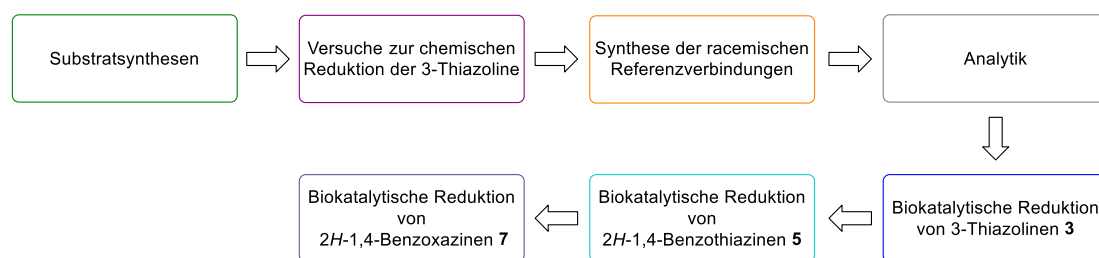
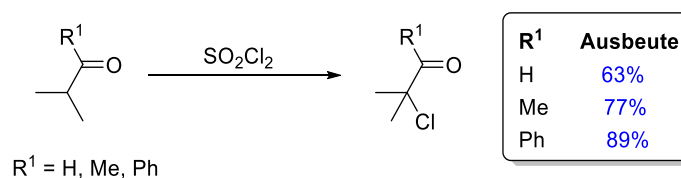


Abbildung 4.6. Übersicht des Projektes zur biokatalytischen Reduktion S- und O-haltiger zyklischer Imine

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Substratsynthesen

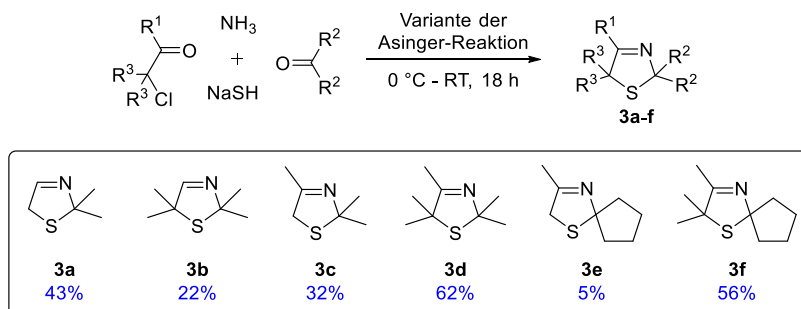
Zur Untersuchung der biokatalytischen Reduktion S- und O-haltiger zyklischer Imine wurden zunächst 3-Thiazoline **3**, 2H-1,4-Benzothiazine **5** und 2H-1,4-Benzoxazine **7** nach Literaturvorschriften synthetisiert. Für die Synthese der 3-Thiazoline **3** und der 2H-1,4-Benzothiazine **5** werden α -chlorierte Aldehyde bzw. Ketone benötigt, die zunächst über eine α -Chlorierung des Aldehyds oder Ketons mit Sulfurylchlorid synthetisiert wurden. Über diese von Stevens *et al.* adaptierte Methode^[207] wurden 2-Chlor-2-methylpropanal, 3-Chlor-3-methyl-2-butanon und 2-Chlor-2-methyl-1-phenyl-1-propanon in guten isolierten Ausbeuten erhalten (Schema 4.10).



Schema 4.10. α -Chlorierung von Aldehyden bzw. Ketonen mit Sulfurylchlorid

4.3.1.1 Synthese von 3-Thiazolinen **3**

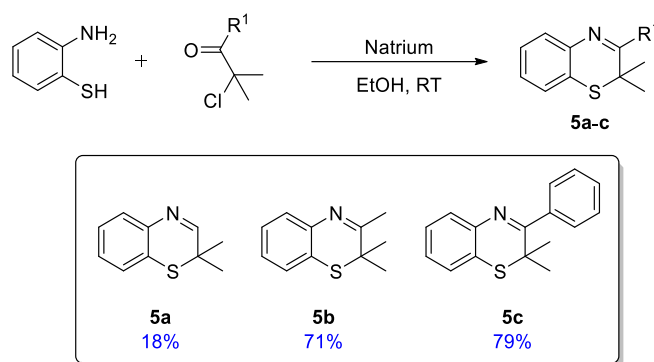
Die Darstellung der 3-Thiazoline **3a-f** erfolgte nach der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion^[173,175] unter Verwendung eines α -chlorierten Aldehyds bzw. Ketons, wässriger Ammoniaklösung, Natriumhydrogensulfid und einem weiteren Keton. Über eine Substitution in α -Position entsteht zunächst das Thiol, welches mit Ammoniak und dem Keton zum 3-Thiazolin kondensiert. Über die Kombination von vier verschiedenen α -chlorierten Aldehyden bzw. Ketonen (α -Chloracetaldehyd, 2-Chlor-2-methylpropanal, Chloraceton und 3-Chlor-3-methyl-2-butanon) und Aceton sowie Cyclopentanon als Ketone wurden sechs verschiedene 3-Thiazoline mit geringen bis guten isolierten Ausbeuten (5-62%) erhalten (Schema 4.11).



Schema 4.11. Synthese der 3-Thiazoline **3a-f**

4.3.1.2 Synthese von 2H-1,4-Benzothiazinen **5**

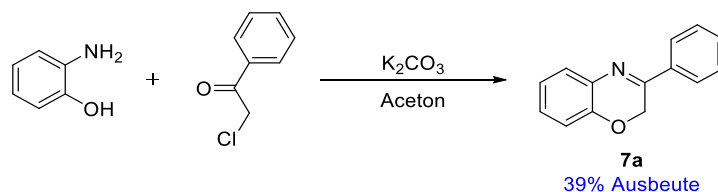
Die Darstellung von drei verschiedenen Benzothiazinen **5a-c** erfolgte nach einer Vorschrift von Gröger^[208] über eine der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion analoge Kondensationsreaktion. Zunächst erfolgt die Deprotonierung des Thiols des 2-Aminothiophenols durch Natriummethanolat. Über eine Substitution in α -Position unter Abspaltung von Natriumchlorid und die anschließende Kondensation unter Wasserabspaltung erfolgt die Bildung des 2H-1,4-Benzothiazins **5**. Mit dem zuvor synthetisierten α -chlorierten Aldehyd sowie den beiden α -chlorierten Ketonen wurden die drei 2H-1,4-Benzothiazins **5a-c** nach destillativer oder säulenchromatographischer Aufreinigung in moderaten bis guten isolierten Ausbeuten (18-79%) erhalten (Schema 4.12).



Schema 4.12. Darstellung der 2H-1,4-Benzothiazine **5a-c**

4.3.1.3 Synthese von 2H-1,4-Benzoxazinen **7**

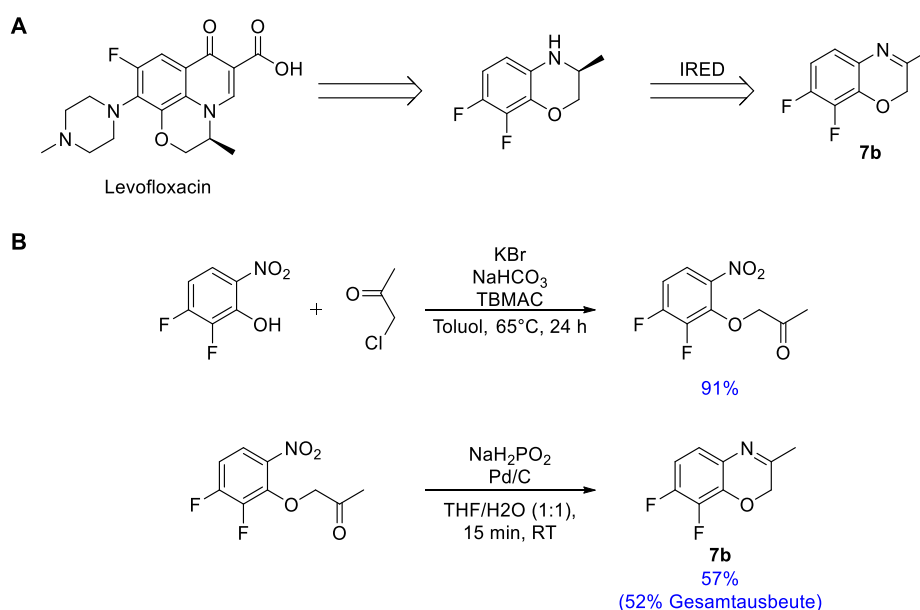
Die Synthese von zwei 2H-1,4-Benzoxazinen **7a** und **7b** erfolgte auf unterschiedlichen Reaktionswegen. Das Benzoxazin **7a** wurde über eine der Benzothiazin analoge Syntheseroute nach Shridhar *et al.*^[209] dargestellt. Hierbei wird der Alkohol des 2-Aminophenols zunächst mit Kaliumcarbonat deprotoniert, anschließend erfolgt die Substitution mit α -Bromacetophenon und per Kondensation und Abspaltung von Wasser erfolgt schließlich der Ringschluss zum 2H-1,4-Benzoxazin **7a**. 3-Phenyl-2H-1,4-benzoxazin (**7a**) wurde mit einer isolierten Ausbeute von 39% erhalten (Schema 4.13).



Schema 4.13. Synthese von 3-Phenyl-2H-1,4-Benzoxazin (**7a**)

Außerdem wurde das zyklische Imin **7b** als Vorstufe eines Schlüsselintermediats des Antibiotikums Levofloxacin dargestellt. Anhand dieses Substrats **7b** sollte die Eignung von

Iminreduktasen zur Darstellung des pharmazeutisch relevanten Levofloxacin-Intermediats untersucht werden (Schema 4.14A). Die Darstellung des 7,8-Difluoro-3-methyl-2H-1,4-benzoxazin (**7b**) erfolgte über zwei Stufen. Zunächst wurde 1-(2,3-Difluor-6-nitroxy)propan-2-on mit einer Ausbeute von 91% nach Lopez-Iglesias *et al.*^[210] über eine Veretherung aus 2,3-Difluor-6-nitrophenol und Chloraceton erhalten. Die zweite Stufe wurde nach Battistoni *et al.*^[211] durchgeführt. Hier erfolgt zunächst die Reduktion zum Amin, gefolgt von der Kondensation zu **7b**. Das 2H-1,4-Benzoxazin **7b** konnte somit mit einer Gesamtausbeute von 52% über zwei Stufen erfolgreich dargestellt werden (Schema 4.14B).



Schema 4.14. **A** Retrosynthetischer Zugang zum Antibiotikum Levofloxacin über eine IRED-katalysierte Reduktion des Benzoxazins **7b**. **B** Synthese des 2H-1,4-Benzoxazins **7b**

4.3.2 Versuche zur chemischen Reduktion der 3-Thiazoline

Zu Beginn der Arbeiten mit den 3-Thiazolinen **3** wurde eine Reihe von chemischen und chemokatalytischen Methoden zur Reduktion dieser Verbindungen getestet. Das Ziel dieser chemischen Reduktionsversuche war das Auffinden der bestmöglichen Route zur Darstellung der racemischen 3-Thiazolidine **4**, welche als Referenzverbindungen benötigt wurden. Hierzu wurden einerseits Methoden unter Abwandlung von Reaktionsparametern wie Reaktionszeit und Reaktionstemperatur getestet, die bereits in der Literatur als nicht erfolgreich zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** beschrieben wurden (siehe auch Kapitel 4.1.2.1). Zum anderen wurden weitere literaturbekannte Methoden zur Reduktion von Iminen untersucht.

Zunächst wurde die Reduktion des 3-Thiazolidins **3c** mit Metallhydriden wie Lithiumaluminiumhydrid, Natriumborhydrid, *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschütztem

Natriumborhydrid und Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) untersucht. Da in der Literatur bereits eine Ringöffnung des *N,S*-Acetals der 3-Thiazolidine **4** unter Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid, Natriumborhydrid sowie Boc-geschütztem Natriumborhydrid beschrieben wurde,^[174,177,179] wurden diese Reduktionen mit kürzeren Reaktionszeiten und verringerten Reaktionstemperaturen durchgeführt. Im Falle der Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid wurden erneut eine Ringöffnung und weitere Spaltprodukte beobachtet, wohingegen das 3-Thiazolin **3c** mit Natriumborhydrid und Boc-geschütztem Natriumborhydrid unter milderer Reaktionsbedingungen nicht umgesetzt wurde. Bei der Reduktion mit DIBAL^[212] konnte ebenfalls kein Umsatz des 3-Thiazolins **3c** beobachtet werden (Abbildung 4.7). Darüber hinaus wurde die organokatalytische Transferhydrierung des 3-Thiazolins **3a** mit Hantzsch-Ester und Diphenylphosphat^[213] bzw. Schreiners Thioharnstoff Katalysator^[214] unter Variation der Katalysatorbeladung untersucht. Allerdings konnte **3a** auch mit dieser Methode nicht umgesetzt werden (Abbildung 4.7). Wie bereits in der Literatur beschrieben^[174,177] wurde das 3-Thiazolin **3c** auch über eine Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre nicht umgesetzt. Als weitere Methode zur Reduktion des 3-Thiazolins **3c** wurde Zinkstaub verwendet.^[215] Allerdings konnte auch mit dieser Methode kein Umsatz des 3-Thiazolins **3c** nachgewiesen werden (Abbildung 4.7).

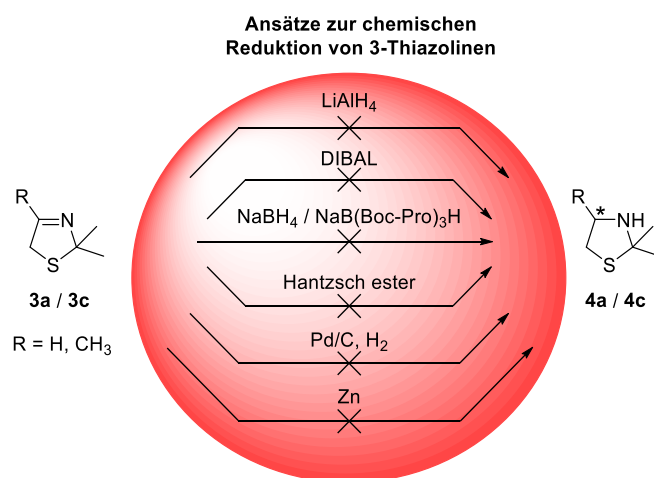


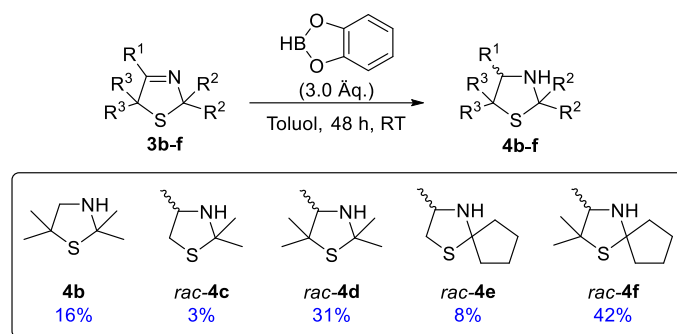
Abbildung 4.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der Ansätze zur chemischen Reduktion der 3-Thiazolidine **3**

Von allen getesteten und literaturbekannten Methoden zur Reduktion von 3-Thiazolidinen **3** ist die Reduktion mit Catecholboran^[179] als einzige zur Darstellung der racemischen 3-Thiazolidine **4** geeignet und wurde daher zur Synthese der racemischen Referenzen herangezogen. Dies verdeutlicht den Bedarf der Entwicklung einer generellen, vom Substitutionsmuster unabhängigen Reduktionsmethode zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4**.

4.3.3 Synthese der Referenzverbindungen

4.3.3.1 Synthese von 3-Thiazolidinen **4**

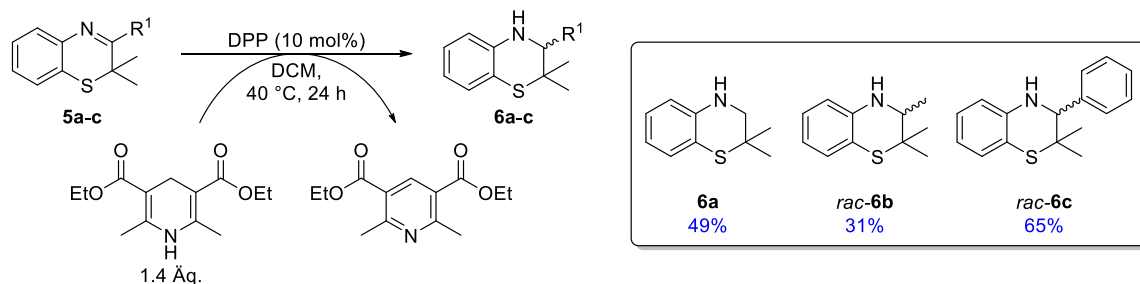
Die Darstellung der 3-Thiazolidin-Referenzen **4b-f** erfolgte anhand der Reduktion der 3-Thiazoline **3b-f** mit Catecholboran nach Gröger^[208] bzw. einer abgewandelten Vorschrift von Reiners *et al.*^[179] Die zyklischen Amine **4b-f** konnten in schlechten bis moderaten Ausbeuten (3-42%) erfolgreich isoliert werden (Schema 4.15). Die schlechten Ausbeuten dieser Reduktion unterstreichen erneut das Interesse an der Etablierung einer allgemeinen Methode zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4**. 2,2-Dimethyl-3-thiazolidin **4a** konnte als einzige Referenz anhand dieser Methode jedoch nicht erfolgreich dargestellt werden.



Schema 4.15. Synthese der 3-Thiazolidine **4b-f** durch Reduktion der entsprechenden zyklischen Imine **3b-f**

4.3.3.2 Synthese von 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzothiazinen **6**

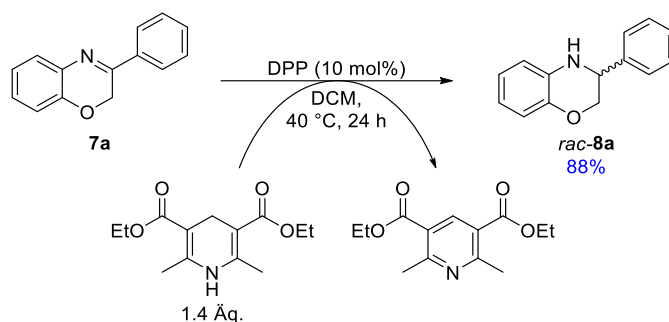
Die Darstellung der 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzothiazine **6a-c** erfolgte durch organokatalytische Reduktion der 2H-1,4-Benzothiazine **5a-c** mit Hantzsch-Ester und Diphenylphosphat (DPP) als nicht-chirale Brønsted-Säure nach Rueping *et al.*^[213] Zunächst erfolgt eine katalytische Protonierung des Stickstoffatoms des Imins, gefolgt vom Hydrid-Transfer des Hantzsch-Esters. Die racemischen Referenzen **6a-c** konnten mit moderaten bis guten isolierten Ausbeuten (31-65%) dargestellt werden (Schema 4.16).



Schema 4.16. Synthese der 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzothiazine **6a-c**

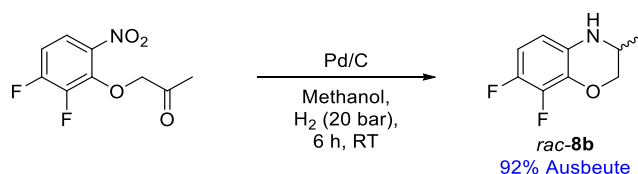
4.3.3.3 Synthese der racemischen 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazine **8**

Die racemischen 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazine *rac*-**8a-b**, welche als Referenzen für die Analytik benötigt wurden, wurden auf zwei verschiedenen Routen synthetisiert. Die Synthese von *rac*-3-Phenyl-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin (**8a**) erfolgte analog zur Synthese der 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzothiazinen **6a-c** über die biomimetische Reduktion mit Hantzsch-Ester und DPP.^[213] Das 3,4-Dihydro-2H-1,4-benzoxazin *rac*-**8a** konnte mit einer guten Ausbeute von 88% erfolgreich isoliert werden (Schema 4.17).



Schema 4.17. Darstellung von *rac*-3-Phenyl-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazin (*rac*-**8a**) über biomimetische Reduktion

Die Synthese des racemischen Levofloxacin-Intermediats **8b** erfolgte direkt über das Intermediat 1-(2,3-Difluor-6-nitroxy)propan-2-on, welches bereits zur Synthese des zyklischen Imins **7b** verwendet wurde. Das racemische Amin **8b** konnte über eine Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre bei 20 bar im Hochdruck-Autoklaven nach Lopez-Iglesias *et al.*^[210] mit einer guten Ausbeute von 92% erhalten werden (Schema 4.18).



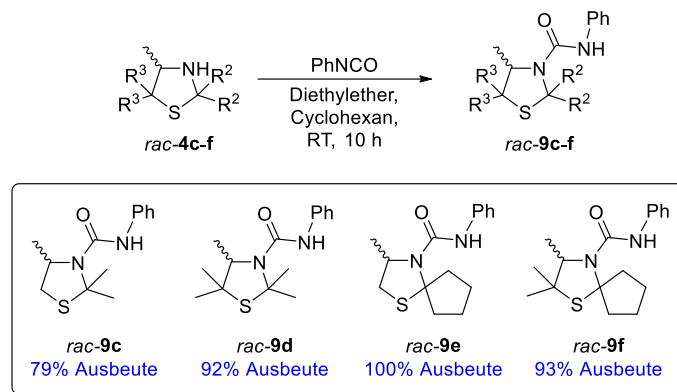
Schema 4.18. Synthese von *rac*-7,8-Difluoro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-benzoxazin (*rac*-**8b**)

4.3.4 Analytik

Mit den vorliegenden S- bzw. O-haltigen zyklischen Iminen und den entsprechenden zyklischen Aminen wurde im nächsten Schritt eine geeignete Analytik zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses etabliert.

Die Bestimmung des Umsatzes der 3-Thiazoline **3b-f** zu den entsprechenden 3-Thiazolidinen **4b-f** erfolgt über Gaschromatographie unter Verwendung einer nicht-chiralen Säule. Der Umsatz wurde über das Verhältnis des Produktintegrals im Vergleich zur Summe der Integrale von Edukt und Produkt ermittelt, wobei die

unterschiedliche Ionisation von Edukt und Produkt berücksichtigt wurde (siehe Kapitel 10.5.4.1). Da keine Auftrennung der Enantiomere der 3-Thiazolidine per chiraler GC erreicht werden konnte, wurden die racemischen 3-Thiazolidine *rac-4c-f* zunächst nach Reiners *et al.*^[179] mit Phenylisocyanat (PhNCO) derivatisiert (Schema 4.19).



Schema 4.19. Derivatisierung der 3-Thiazolidine *rac-4c-f* mit Phenylisocyanat

Die Enantiomere der in exzellenten Ausbeuten erhaltenen Carbamoylderivate *rac-9c-f* (Schema 4.19) konnten zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse schließlich per SFC-HPLC aufgetrennt werden (siehe Kapitel 10.5.4.3).

Die Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses der Reduktion der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7a-b** zu den entsprechenden zyklischen Aminen erfolgte in einem kombinierten Ansatz per SFC-HPLC. Der Umsatz wurde jeweils über das Verhältnis des Produktintegrals im Vergleich zur Summe der Integrale von Edukt und Produkt ermittelt und die unterschiedliche Absorption von Edukt und Produkt berücksichtigt (siehe Kapitel 10.5.4.4 und 10.5.4.5).

4.3.5 Biokatalytische Reduktion von 3-Thiazolinen **3**

4.3.5.1 Kolorimetrischer pH-Shift-Assay

Um zu testen ob Iminreduktasen geeignete Biokatalysatoren zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3** sind, wurde zunächst ein pH-Shift-Assay durchgeführt. Ziel dieses Assays war es innerhalb relativ kurzer Zeit einen qualitativen Eindruck zu erhalten welche der 31 rekombinanten Iminreduktasen,^[121,124,129] die in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert wurden, zur biokatalytischen Reduktion der 3-Thiazoline **3a-f** geeignet sind. Der verwendete Far assay wurde in der Arbeitsgruppe um Sieber entwickelt^[216] und basiert auf dem Farbumschlag des pH-Indikators Bromthymolblau (BTB), welcher einen p*K*_s-Wert von 7.1 aufweist. Bei pH-Werten unterhalb von pH 6 ist eine wässrige Bromthymolblau-Lösung gelb, während die Lösung bei einem neutralen pH grün und bei pH-Werten oberhalb von pH 8 blau gefärbt ist (Abbildung 4.8).

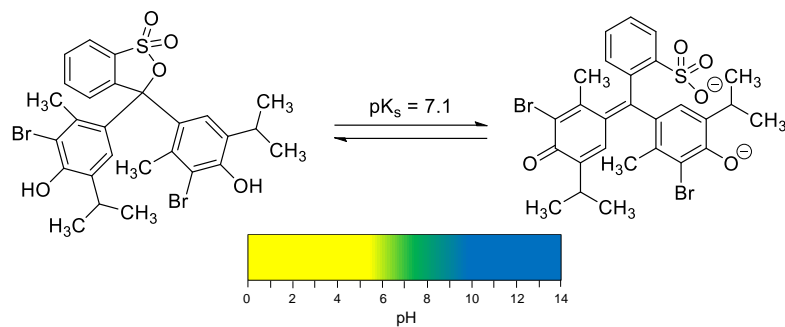
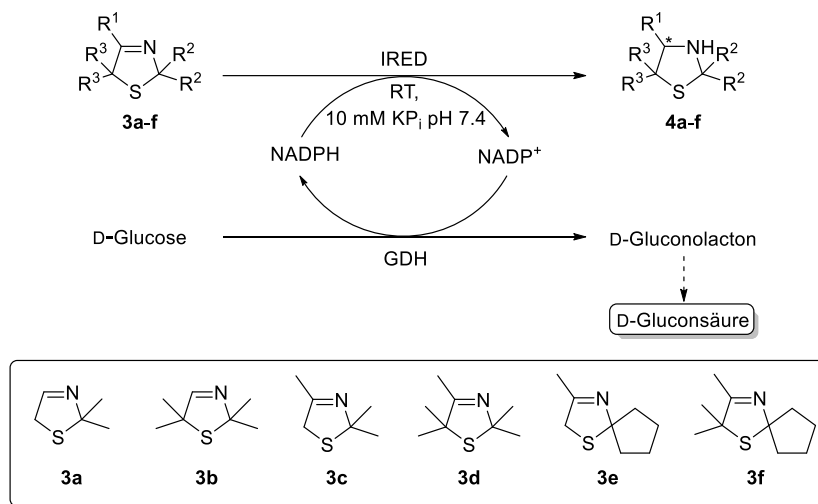


Abbildung 4.8. Strukturen und Färbung von Bromthymolblau in Abhängigkeit vom pH-Wert

Eine Reduktion des Substrates durch die IRED führt über den Verbrauch von NADPH und *in situ*-Regeneration des Cofaktors durch die GDH sowie die damit verbundene Oxidation von D-Glucose zur Bildung von D-Gluconsäure, die einen Abfall des pH-Wertes der Lösung zur Folge hat (Schema 4.20).



Schema 4.20. Biokatalytische Reduktion von 3-Thiazolinen **3a-f** unter Einsatz von Iminreduktasen und *in situ*-Regeneration des Cofaktors mit der GDH

Dementsprechend kann mit dem kolorimetrischen pH-Shift-Assay anhand des qualitativen Farbumschlags von grün zu gelb ein indirekter Hinweis auf die erfolgreiche biokatalytische Reduktion unterschiedlicher Substrate, wie beispielsweise 3-Thiazoline **3**, erhalten werden. Für alle synthetisierten 3-Thiazoline **3a-f** konnten Farbumschläge von grün zu gelb in Kombination mit einer Reihe von Iminreduktasen beobachtet werden. Beide Negativkontrollen ohne Iminreduktase zeigten jeweils keinen Farbumschlag was darauf hindeutet, dass sowohl die GDH als auch Proteine, die von dem *E. coli*-Stamm exprimiert wurden, keine Nebenaktivität zur Reduktion der 3-Thiazolone **3a-f** zeigen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay der 3-Thiazoline **3a-f**

Substrat	Potentiell positive IREDs	Negativ	pET22b_leer
3a	IRED05, IRED27	negativ	negativ
3b	IRED05, IRED06, IRED08, IRED13, IRED19, IRED24, IRED27, IRED28, IRED29	negativ	negativ
3c	IRED08, IRED24, IRED27,	negativ	negativ
3d	IRED08, IRED24, IRED27	negativ	negativ
3e	IRED08, IRED24	negativ	negativ
3f	IRED08	negativ	negativ

Potentiell positive IREDs zeigten einen deutlichen Farbumschlag von grün nach gelb innerhalb von 24 h. Negativ: ohne Zugabe von IRED-ZRE, pET22b_leer: Verwendung des ZRE ohne Expression der IRED. Für eine bessere Lesbarkeit wurden die IREDs^[121,124,129] durchnummeriert (Kapitel 10.3).

Fotografien der Mikrotiterplatten zur Identifikation der vielversprechendsten IREDs für die Reduktion des 3-Thiazolins **3f** sind beispielhaft in Abbildung 4.9 gezeigt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h war ein deutlicher Farbumschlag von grün nach gelb für die IRED8^[124] (siehe Abbildung 4.9) zu erkennen, wohingegen kein Farbumschlag beider Negativkontrollen zu erkennen war. Anhand des pH-Shift-Assay wurden die vielversprechendsten IREDs zur Reduktion der Imine **3a-f** favorisiert und im nächsten Schritt spektrophotometrisch die Aktivität dieser IREDs für die Substrate **3a-f** bestimmt.

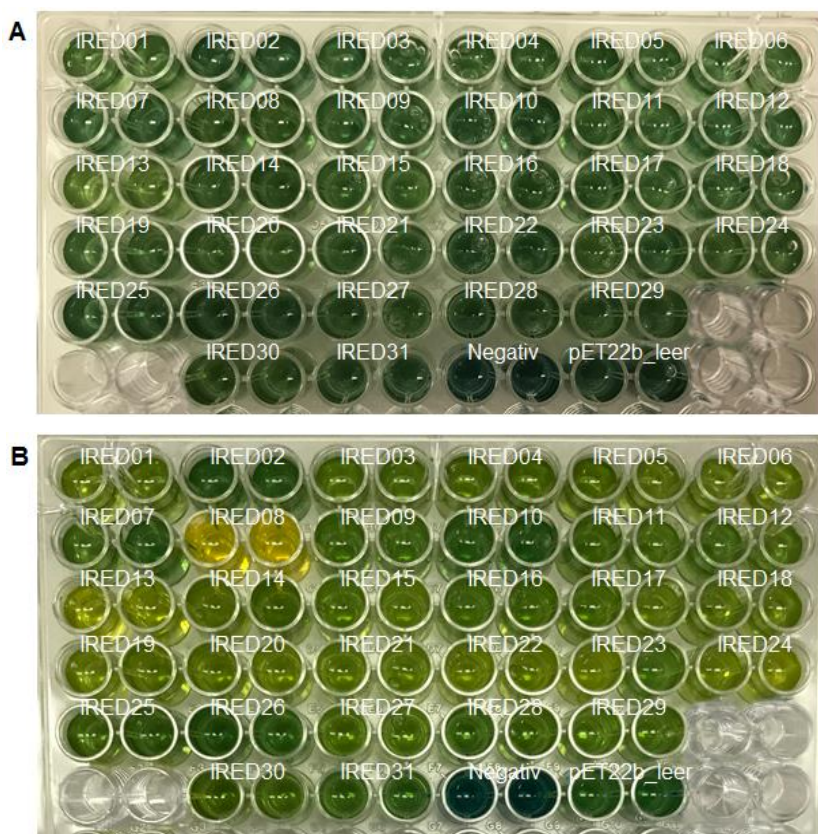


Abbildung 4.9. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay zur Identifikation potentiell positiver IREDs zur Reduktion des 3-Thiazolins **3f**. **A** Zeitpunkt t=0 **B** Zeitpunkt t=24 h

4.3.5.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Die spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte über die Messung der Abnahme des Cofaktors NADPH für 60 s bei 340 nm und einer Substratkonzentration der 3-Thiazoline **3a-f** von 1 mM. Über die Proteinkonzentration des Rohextrakts wurde die Aktivität in die spezifische Aktivität (U mg^{-1} Ganzzell-Protein (GZP)) umgerechnet (siehe Kapitel 10.2.7). Die spezifischen Aktivitäten der Iminreduktasen zur Reduktion der 3-Thiazoline **3a-f** sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

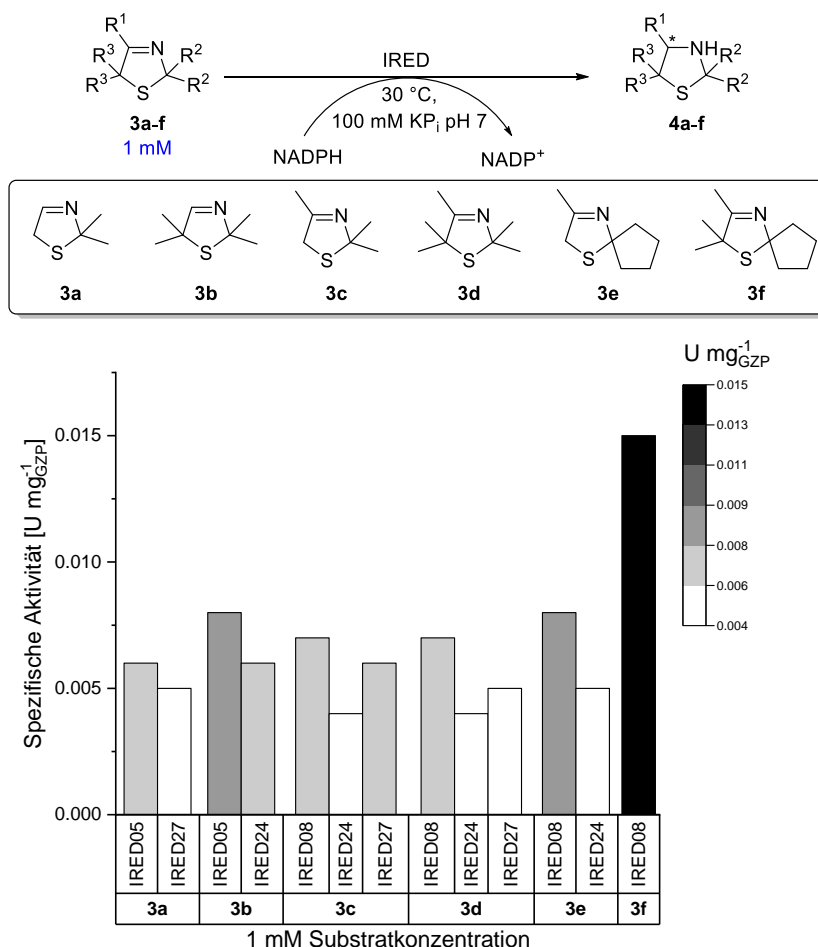


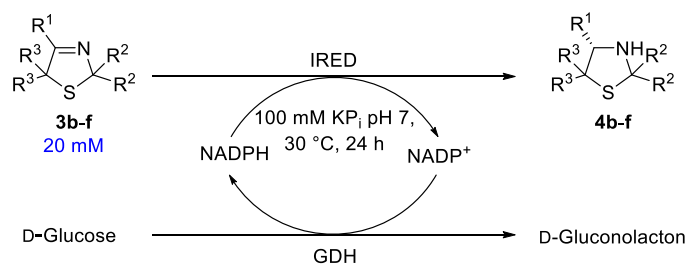
Abbildung 4.10. Spezifische Aktivität der Iminreduktasen zur Reduktion der 3-Thiazoline **3a-f**

Es konnten für alle untersuchten IREDs in Kombination mit den zyklischen Iminen **3a-f** Aktivitäten ermittelt werden. Die höchste Aktivität von 0.015 U mg^{-1} GZP konnte für die Reduktion des *spiro*-zyklischen 3-Thiazolins **3f** mit der IRED08^[124] nachgewiesen werden. Diese Aktivität ist im Durchschnitt zwei bis dreifach erhöht gegenüber den Enzymaktivitäten zur Reduktion der restlichen untersuchten 3-Thiazoline **3a-e**. Für jedes Substrat konnte mindestens eine Iminreduktase identifiziert werden, deren spezifische Aktivität zur Reduktion des 3-Thiazolins **3a-f** über 0.005 U mg^{-1} GZP lag (Abbildung 4.10). Anhand der Ergebnisse des spektrophotometrischen Aktivitätstests wurden die vielversprechendsten Kombinationen aus Iminreduktasen und 3-Thiazolinen ausgewählt und in Biotransformationen untersucht.

4.3.5.3 Biotransformationen von 3-Thiazolinen **3**

Die priorisierten Iminreduktasen wurden im nächsten Schritt in Biotransformationen im 10 mL Maßstab bei einer Substratkonzentration von 20 mM bei 30 °C eingesetzt. Zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors wurde auch hier die GDH sowie D-Glucose als Cosubstrat verwendet (Tabelle 4.2). Nach einer Reaktionszeit von 24 h konnte die Bildung aller 3-Thiazolidine **3b-f** nachgewiesen werden. Die Iminreduktasen zeigten eine perfekte Produktelektivität ohne unerwünschte Nebenreaktionen wie eine Ringöffnung, die für klassisch-chemische oder chemokatalytische Reduktionsmethoden beschrieben ist. In den Biotransformationen konnten jeweils höhere Aktivitäten der IRED08 für die 3-Thiazoline mit Methylgruppen als Substituenten am Rest R³ nachgewiesen werden im Vergleich zu den 3-Thiazolinen mit Wasserstoffatomen an R³. Daher musste für die Reduktion der 3-Thiazoline **3c** und **3e**, die Wasserstoffatome an der Position R³ enthalten, eine höhere Biokatalysatorbeladung der IRED08 von 5 mg mL⁻¹ zum Erreichen guter Umsätze verwendet werden (Tabelle 4.2, Einträge 2, 4).

Tabelle 4.2. Biotransformation der 3-Thiazoline **3b-f** unter Einsatz von Iminreduktasen



Eintrag	Substrat	IRED ^a	Umsatz [%]	ee [%] ^b
1		IRED05 ^c	29	-
		IRED24 ^c	83	-
2		IRED08 ^c	89	99 (S)
3		IRED08 ^d	82	99 (S)
		IRED24 ^c	12	99 (S)
4		IRED08 ^c	91	97 (S)
		IRED24 ^c	87	99 (S)
5		IRED08 ^d	98	96 (S)

^azur besseren Lesbarkeit wurden die IREDs^[121,124,129] durchnummeriert (Kapitel 10.3), die verwendeten Ganzzell-Proteinkonzentrationen sind in Fußnote c und d angegeben; ^bdie absolute Konfiguration von (S)-**4f** wurde von Merten durch VCD und die absolute Konfiguration der anderen 3-Thiazolidine in Analogie zu den Daten der chiralen SFC-HPLC bestimmt; ^c5 mg mL⁻¹; ^d1.2 mg mL⁻¹

Im Vergleich dazu konnten bereits bei einer Biokatalysatorbeladung von 1.2 mg mL^{-1} der IRED08 hohe Umsätze mit den 3-Thiazolinen **3d** und **3f** von 82% bzw. 98%, die Methylgruppen an der Position R^3 tragen, nachgewiesen werden (Tabelle 4.2, Einträge 3, 5). Darüber hinaus konnten höhere Aktivitäten und Umsätze für die *spiro*-zyklischen 3-Thiazoline **3e** und **3f** erreicht werden im Vergleich zu den analogen 3-Thiazolinen **3c** und **3d** mit Methylgruppen an der Position R^2 (Tabelle 4.2, Einträge 3-5). In Analogie zur Bestimmung der höchsten Aktivität der IRED08 in Kombination mit dem Substrat **3f**, konnte auch der höchste Umsatz von 98% mit dieser Kombination erreicht werden (Tabelle 4.2, Eintrag 5). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass Methylgruppen an der Position R^3 und ein *spiro*-zyklisches Gerüst an der Position R^2 die geeignetsten Substituenten zur IRED-katalysierten Reduktion der 3-Thiazoline **3** darstellen. Negativkontrollen der Biotransformationen ohne IRED zeigten für alle Substrate keine Umsätze. Die zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors verwendete GDH zeigt entsprechend keine Aktivität zur Iminreduktion, was Beobachtungen von Roth *et al.* widerspricht.^[217] Iminreduktasen sind demnach geeignete Biokatalysatoren zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3**. Darüber hinaus katalysieren IREDs die Reduktion der untersuchten prochiralen 3-Thiazoline **3c-f** mit hoher bis zu exzellenter Enantioselektivität (96-99% *ee*) unabhängig vom Substitutionsmuster an den Positionen R^2 und R^3 (Tabelle 4.2, Einträge 2-5). Die biokatalytische Reduktion unter Einsatz von Iminreduktasen stellt somit die erste Methode einer hoch enantioselektiven Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** über eine Reduktion der C=N-Doppelbindung der entsprechenden 3-Thiazoline **3** dar. Aufgrund des Mangels an enantiomerenreinen Referenzverbindungen, welches zudem die Problematik der Darstellung dieser unterstreicht, wurde die absolute Konfiguration des 3-Thiazolidins (*S*)-**4f** von Merten über eine Kombination von *vibrational circular dichroism* (VCD) und quantenmechanischen Berechnungen bestimmt (siehe Kapitel 4.3.5.5).^[218] So konnte das bevorzugt gebildete Enantiomer der anderen 3-Thiazolidine **4c-e** in Analogie zu den SFC-HPLC Daten ebenfalls als (*S*)-konfiguriert ermittelt werden. Die bevorzugte Bildung der (*S*)-Enantiomere entspricht der zuvor publizierten Selektivität der Iminreduktasen IRED08 und IRED24.^[124,129] Die Möglichkeit zur Reduktion monozyklischer als auch *spiro*-zyklischer 3-Thiazoline mit hohen Umsätzen und Enantioselektivitäten unterstreicht den Wert dieser biokatalytischen Technologie. Da *spiro*-zyklische Struktur motive in der medizinischen Chemie von großer Bedeutung sind,^[219,220] könnte diese biokatalytische Methode potentiell in der Zukunft zur Darstellung von Bibliotheken strukturell hoch diverser (*S*)-*spiro*-heterozyklischer Amine für die Entwicklung von Medikamenten genutzt werden.

4.3.5.4 Prozessentwicklung der IRED-katalysierten Reduktion von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**)

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der biokatalytischen Reduktion von 3-Thiazolinen **3** unter Einsatz von Iminreduktasen wurde im nächsten Schritt die Effizienz dieser biokatalytischen Methode in einer Prozessentwicklung anhand der Reduktion des 3-Thiazolins **3f** aufgezeigt. Hierzu wurde in Analogie zu den Arbeiten im vorherigen Teilprojekt ein *E. coli*-Ganzzell-Katalysator konstruiert (siehe Kapitel 3.3.4), der sowohl die IRED08 als auch die GDH zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors in einer Zelle überexprimiert. Da die besten Ergebnisse im ersten Projekt mit dem Zwei-Plasmid-Konstrukt erzielt wurden (siehe Kapitel 3.3.4), wurden auch hier beide Gene auf verschiedenen Plasmiden in die *E. coli*-Zelle eingebracht. Die Reaktion im vergrößerten Labormaßstab (40 mL) wurde bei einer Substratkonzentration von 100 mM, was einer Substratbeladung von 18 g L⁻¹ entspricht und einer Katalysatorbeladung von 10 g L⁻¹ der lyophilisierten Zellen (0.1 g pro mmol Substrat) durchgeführt (Abbildung 4.11A). Zur Konstanthaltung des pH-Wertes bei pH 7 wurde wiederum eine TitroLine®-Apparatur verwendet (Abbildung 4.11B).

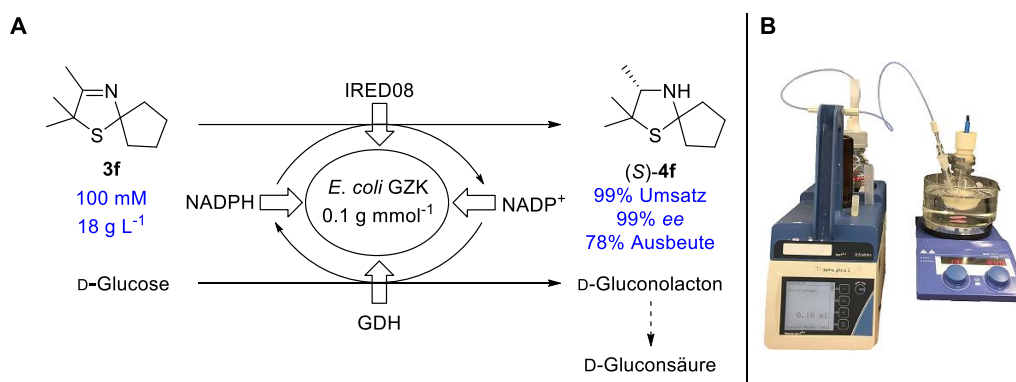


Abbildung 4.11. A Prozessentwicklung der Reduktion von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**) B TitroLine®-System zur Konstanthaltung des pH-Wertes

Auch im vergrößerten Labormaßstab verlief die Reduktion des 3-Thiazolins **3f** reibungslos, sodass nach einer Reaktionszeit von 30 h bei 30 °C ein exzellenter Umsatz von 99% zum entsprechenden zyklischen Amin (S)-**4f** mit einem Enantiomerenüberschuss von 99% bestimmt werden konnte. Zudem wurde das Produkt (S)-**4f** mit einer Ausbeute von 78% und einer Reinheit von 97%, die per ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt wurde, erfolgreich isoliert. Das Ergebnis dieser Prozessentwicklung unterstreicht die Effizienz und Wert der entwickelten biokatalytischen Methode zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3**, welche die erste hoch enantioselektive Reduktionsmethode zur Synthese von 3-Thiazolidinen **4** darstellt.

4.3.5.5 Bestimmung der absoluten Konfiguration von **4f**

Die absolute Konfiguration des 3-Thiazolidins **4f** aus dem Experiment im vergrößerten Labormaßstab wurde von Kreienborg und Merten an der Ruhr-Universität Bochum bestimmt.^[218] Hierzu wurde zunächst das IR- und VCD-Spektrum von **4f** aufgenommen (siehe Abbildung 4.12A). Für das Enantiomer (*S*)-**4f** wurde zudem auf dem MMFF-Theorielevel mit der Software Spartan 14^[221] eine Konformationsanalyse durchgeführt. Alle so erhaltenen acht Konformere wurden anschließend weiteren Geometrieoptimierungen, gefolgt von DFT-Spektrenberechnungen (B3LYP 6-311+G**) mit der Software Gaussian 09^[222] unterzogen. Die relative freie Gibbs Energie ΔG_{298K} und die korrespondierenden Boltzmann-Gewichtungen der beiden besetzten Konformere sind in Abbildung 4.12B dargestellt. Daraufhin wurde das IR- und VCD-Spektrum über die Zuordnung der Lorentzischen Form des Dipols und der Rotationsstärke für jedes Konformer simuliert und die Spektren anschließend Boltzmann-gewichtet. Der direkte Vergleich der erhaltenen simulierten und gemessenen Spektren zeigte eine sehr gute Übereinstimmung, sodass die absolute Konfiguration als (*S*)-**4f** bestimmt wurde.

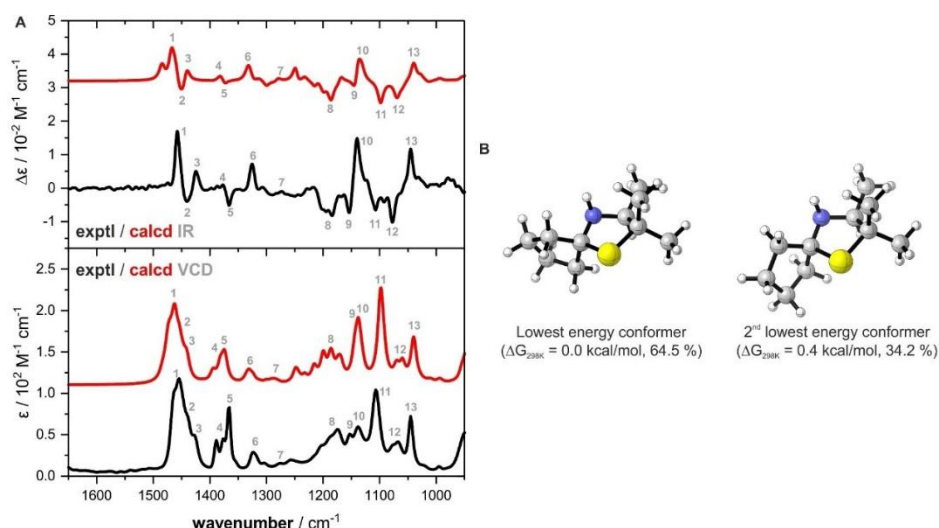


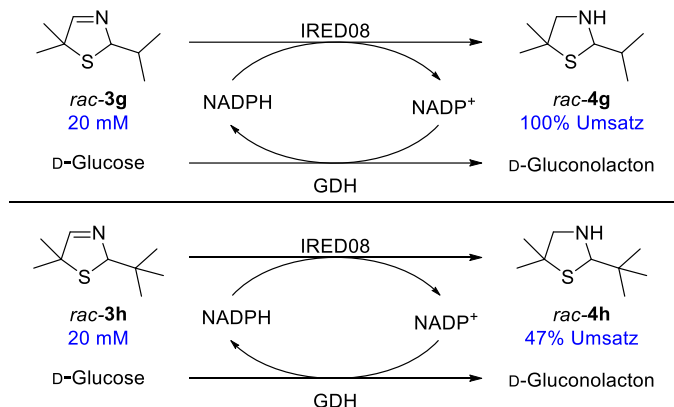
Abbildung 4.12. Bestimmung der absoluten Konfiguration des 3-Thiazolidins (*S*)-**4f** **A** Vergleich der experimentellen und berechneten IR- und VCD-Spektren von (*S*)-**4f** mit einzelner Zuordnung von charakteristischen Banden **B** Strukturen der zwei Hauptkonformere von (*S*)-**4f** sowie die dazugehörige freie Gibbs Energie ΔG_{298K} und die Boltzmann-Gewichtung^[218]

Die Ergebnisse zur biokatalytischen Reduktion der 3-Thiazoline **3** unter Einsatz von Iminreduktasen wurden im Journal *Nature Communications* veröffentlicht: N. Zumbärgel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1949 (DOI: 10.1038/s41467-018-03841-5).^[218]

Die weiteren Ergebnisse, die im Rahmen dieser Veröffentlichung publiziert wurden, werden im Kapitel 4.3.6 vorgestellt.

4.3.5.6 Biokatalytische Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline *rac-3g-h*

Aufbauend auf der von der Autorin etablierten biokatalytischen Methode zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3** untersuchte Wagner in ihrer Bachelorarbeit unter Betreuung der Autorin die IRED-katalysierte Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline.^[223] In ihrer Arbeit synthetisierte Wagner zwei racemische 3-Thiazoline *rac-3g*, *rac-3h* sowie die racemischen Referenzverbindungen *rac-4g* und *rac-4h*. Mit den Verbindungen etablierte Wagner daraufhin eine geeignete Analytik zur Bestimmung der Umsätze von *rac-3g-h* und der Enantiomerenüberschüsse der 3-Thiazolidine **4g-h**. Eine Auftrennung der Enantiomere der 3-Thiazoline *rac-3g-h* war jedoch nicht erfolgreich. Im kolorimetrischen pH-Shift-Assay, der Bestimmung der spektrophotometrischen Enzymaktivität und in initialen Biotransformationen konnte Wagner zudem zeigen, dass IREDs ebenfalls geeignete Katalysatoren zur Reduktion der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline *rac-3g-h* sind.^[223] Weißing griff diese Ergebnisse in seiner Masterarbeit auf und konnte die IRED08 unter den von ihm untersuchten Iminreduktasen als besten Biokatalysator zur Reduktion der zyklischen Imine *rac-3g-h* identifizieren. Unter Verwendung des Zellrohextrakts der IRED08 konnte Weißing in Biotransformationen einen quantitativen Umsatz des 3-Thiazolins *rac-3g* und einen Umsatz von 47% zur Reduktion des 3-Thiazolins *rac-3h* bestimmen (Abbildung 4.21).^[224]

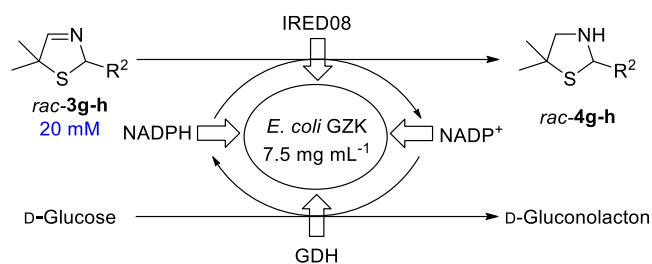


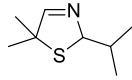
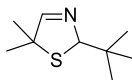
Schema 4.21. Zusammenfassung der Ergebnisse von Weißing^[224]

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Bearbeitung des Teilprojektes zur Reduktion der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline *rac-3g-h* anhand der Ergebnisse von Wagner^[223] und Weißing^[224] fortgeführt. Hierfür wurden zunächst Biotransformationen der beiden 2-monosubstituierten zyklischen Imine *rac-3g-h* unter Verwendung des bereits zur Prozessentwicklung von **3f** verwendeten Ganzzell-Katalysators durchgeführt. In diesem Ganzzell-Konstrukt sind sowohl die IRED08 als auch die GDH einem Zwei-Plasmid-System in einer Zelle überexprimiert. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität der IRED08 zur Reduktion von *rac-3g* und *rac-3h*^[224] wurden die Biotransformationen bei einer Substratkonzentration von 20 mM in Gegenwart von 7.5 mg mL⁻¹ des Ganzzell-

Katalysators durchgeführt (Tabelle 4.3). Nach einer Reaktionszeit von 24 h bei 30 °C konnte für das Isopropyl-substituierte 3-Thiazolin *rac-3g* ein guter Umsatz von 77% nachgewiesen werden. Der Umsatz des sterisch anspruchsvolleren *tert*-Butyl-substituierten 3-Thiazolins *rac-3h* war mit 21% geringer (Tabelle 4.3, Einträge 1, 2). Im nächsten Schritt wurde der stereochemische Verlauf der Reduktion der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline untersucht. Sowohl ein enantioselektiver Reaktionsverlauf, welcher den Umsatz auf maximal 50% limitieren würde, als auch eine nicht enantioselektive Reduktion, die einen eleganten Zugang zu 2-monosubstituierten 3-Thiazolidinen ermöglicht, wären von präparativem Interesse. Über die Vermessung der derivatisierten 3-Thiazolidine per SFC-HPLC konnten die Erkenntnisse von Wagner und Weißing, dass die Enantiomere beider zyklischen Amine **4g** und **4h** im gleichen Verhältnis vorliegen,^[223,224] bestätigt werden (Tabelle 4.3, Einträge 1, 2).

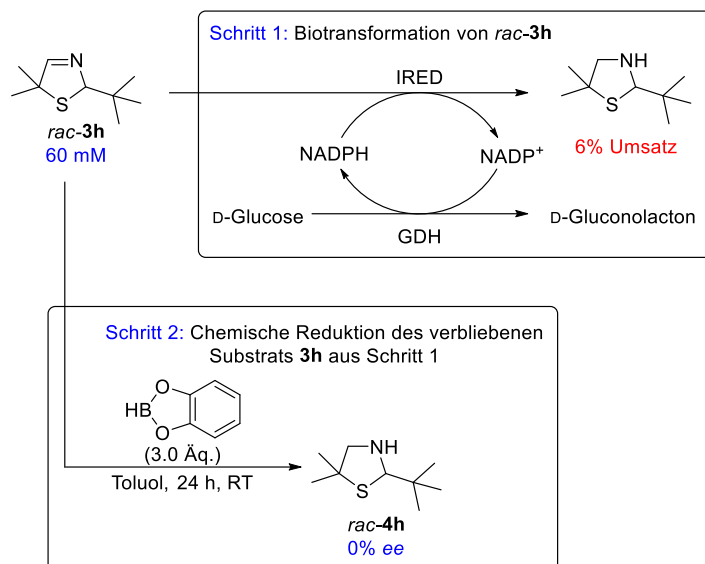
Tabelle 4.3. Biotransformationen der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline *rac-4g-h* unter Einsatz eines Ganzzell-Katalysators.



Eintrag	Substrat	Umsatz [%]	ee des Produkts [%]
1	 <i>rac-3g</i>	77	0
2	 <i>rac-3h</i>	21	0

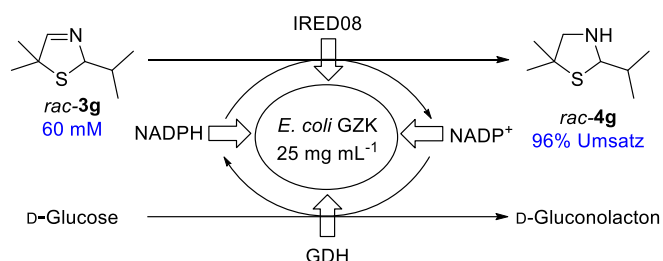
Da das stereogene Zentrum der 3-Thiazolidine in diesem Fall ein Acetal-ähnliches Kohlenstoffatom darstellt wäre eine Racemisierung denkbar, auch wenn diese aufgrund der neutralen Reaktionsbedingungen unwahrscheinlich ist. Um eine mögliche Racemisierung der 3-Thiazolidine **4g** und **4h** ausschließen zu können, war eine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses der Edukte **3g-h** nach der Biotransformation erforderlich. Da eine Auftrennung der Enantiomere der 3-Thiazoline *rac-3g-h* per chiraler GC allerdings nicht möglich war,^[223] wurde stellvertretend eine Biotransformation des racemischen 3-Thiazolidins *rac-3h* mit Zellrohextrakt der IRED08 durchgeführt und bei einem geringen Umsatz von 6% gestoppt. Nach der Auftrennung des Eduktes und Produktes durch Säulenchromatographie, wurde eine chemische (nicht enantioselektive) Reduktion des verbleibenden Substrates **3h** mit Catecholboran durchgeführt. Nach entsprechender Derivatisierung mit Phenylisocyanat wurde daraufhin der

Enantiomerenüberschuss des isolierten 3-Thiazolidins **4h** bestimmt. Da beide Enantiomere im gleichen Verhältnis vorlagen (Schema 4.22), kann von einer nicht enantioselektiven Reduktion der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline *rac-3g-h* durch die Iminreduktasen ausgegangen werden.



Schema 4.22. Bestimmung des stereochemischen Reaktionsverlaufs der IRED-katalysierten Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline

Neben der Charakterisierung der IRED-katalysierten Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline *rac-3g-h* stellte die Entwicklung einer effizienten Reduktion dieser Verbindungen ein weiteres Ziel dar. Hierzu wurde eine Biotransformation im semipräparativen Maßstab (10 mL) bei einer Substratkonzentration des Isopropyl-substituierten 3-Thiazolins *rac-3g* von 60 mM unter Verwendung des Ganzzell-Konstrukts durchgeführt (Schema 4.23). Nach einer Reaktionszeit von 65 h konnte ein nahezu vollständiger Umsatz von 96% zum racemischen 3-Thiazolidin *rac-4g* nachgewiesen werden (Schema 4.23). IREDs stellen demnach ebenfalls geeignete Biokatalysatoren zur eleganten und effizienten Darstellung 2-monosubstituierter 3-Thiazolidine dar.



Schema 4.23. Biotransformation des 3-Thiazolins *rac-3g* im semipräparativen Maßstab

Im Rahmen dieses Teilkapitels konnte die biokatalytische Reduktionstechnologie ebenfalls auf 2-monosubstituierte 3-Thiazoline *rac-3g-h* übertragen werden, welche die entsprechenden 3-Thiazolidine in moderaten bis hohen Umsätzen lieferte. Die Ergebnisse

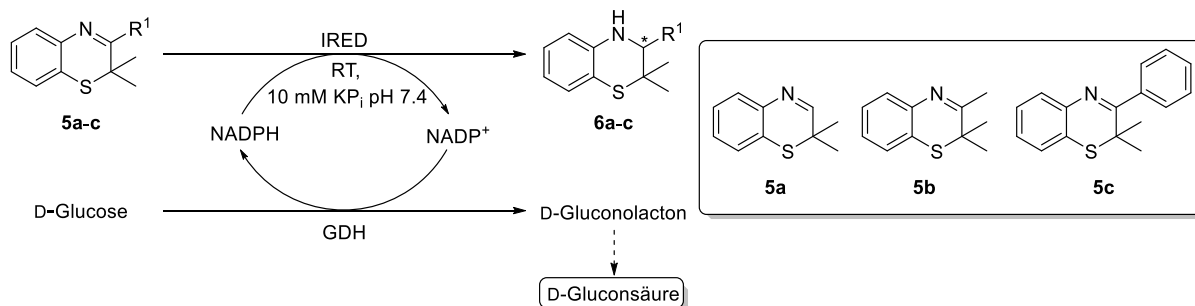
hierzu wurden gemeinsam mit der Ergebnissen der Abschlussarbeiten von Wagner^[223] und Weißing^[224] als Manuskript im *Journal of Heterocyclic Chemistry* zur Publikation angenommen: N. Zumbrägel, K. Wagner, N. Weißing, H. Gröger, *J. Heterocycl. Chem.*, zur Publikation akzeptiert.^[225]

4.3.6 Biokatalytische Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5**

Im Anschluss an die erfolgreiche biokatalytische Reduktion der 3-Thiazoline **3** wurde die Reduktion weiterer schwefelhaltiger zyklischer Imine anhand von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** untersucht.

4.3.6.1 Kolorimetrischer pH-Shift-Assay

Um einen ersten Eindruck zu erhalten ob Iminreduktasen ebenfalls geeignete Biokatalysatoren zur Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** darstellen und um zu priorisieren welche IREDs näher untersucht werden sollten, wurde analog zu den Arbeiten mit den 3-Thiazolinen **3** zunächst ein Screening der synthetisierten 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** und aller 31 rekombinant vorliegenden IREDs anhand des pH-Shift-Assay durchgeführt (Schema 4.24).



Schema 4.24. Biokatalytische Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** unter Einsatz von Iminreduktasen und *in situ*-Regeneration des Cofaktors mit der Glucose-Dehydrogenase

Farbumschläge von grün nach gelb konnten für die Substrate **5a-c** in Kombination mit einer Reihe von IREDs identifiziert werden. Zudem war ein geringeres Volumen des IRED-Zellrohextrakts von 10 µL zum Erreichen deutlicher Farbumschläge im Vergleich zu den 3-Thiazolinen **3** ausreichend. Dies lässt bereits eine höhere Aktivität der IREDs zur Reduktion der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** schließen. Für das sterisch anspruchsvolle Substrat **5c**, welches ein Phenylrest am prochiralen Kohlenstoffatom trägt, konnten im Vergleich zu den Substraten **5a** und **5b** weniger IREDs gefunden werden, die einen deutlichen Farbumschlag zeigten. Für alle Benzothiazine **5a-c** konnten für die Negativkontrollen keine Farbumschläge beobachtet werden, sodass auch hier vermutlich

keine anderen Proteine, die von dem *E. coli*-Stamm exprimiert werden, eine Nebenaktivität zur Iminreduktion aufweisen (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c**

Substrat	Potentiell positive IREDS	Negativ	pET22b_leer
5a	IRED02, IRED05, IRED06, IRED08, IRED13, IRED14, IRED21, IRED22, IRED24, IRED25, IRED28, IRED30, IRED31	negativ	negativ
5b	IRED01, IRED04, IRED05, IRED08, IRED09, IRED12, IRED13, IRED14, IRED18, IRED21, IRED22, IRED27, IRED28, IRED30	negativ	negativ
5c	IRED05, IRED08, IRED28, IRED29	negativ	negativ

Potentiell positive IREDS zeigten einen deutlichen Farbumschlag von grün nach gelb innerhalb von 24 h. Negativ: ohne Zugabe von IRED-ZRE, pET22b_leer: Verwendung des ZRE ohne Expression der IRED. Für eine bessere Lesbarkeit wurden die IREDS^[121,124,129] durchnummeriert (Kapitel 10.3).

4.3.6.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität zur Reduktion der Substrate **5a-c** erfolgte mit den anhand der Ergebnisse des kolorimetrischen pH-Shift-Assay favorisierten IREDS über die spektrophotometrische Messung der Abnahme von NADPH. Aufgrund der geringen Löslichkeit der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** wurden die Aktivitäten der IREDS bei einer verringerten Substratkonzentration von 0.5 mM bestimmt (Abbildung 4.13). Für alle untersuchten IREDS konnten in Kombination mit den Substraten **5a-c** Aktivitäten ermittelt werden. Die Aktivitäten zur Reduktion der zyklischen Imine **5a** und **5b** sind etwa um den Faktor 10 höher als die Aktivität zur Reduktion des 3-Thiazolins **3f**, welches von allen 3-Thiazolinen die höchste Aktivität aufwies. Die spezifische Aktivität zur Reduktion des sterisch anspruchsvollen Substrats **5c** ist zudem etwa um den Faktor 10 erhöht gegenüber den Aktivitäten zur Reduktion der Thiazoline **3a-e** (Abbildung 4.13 im Vergleich zu Abbildung 4.10). Die Beobachtung einer geringeren Aktivität der Iminreduktasen zur Reduktion fünfgliedriger Ringe im Vergleich zu sechsgliedrigen Ringen deckt sich mit Beobachtungen der Gruppe um Turner.^[125,128] Anhand der Ergebnisse des spektrophotometrischen Aktivitätstest wurden die vielversprechendsten Kombinationen aus Iminreduktasen und Benzothiazinen **5a-c** ausgewählt und in Biotransformationen untersucht.

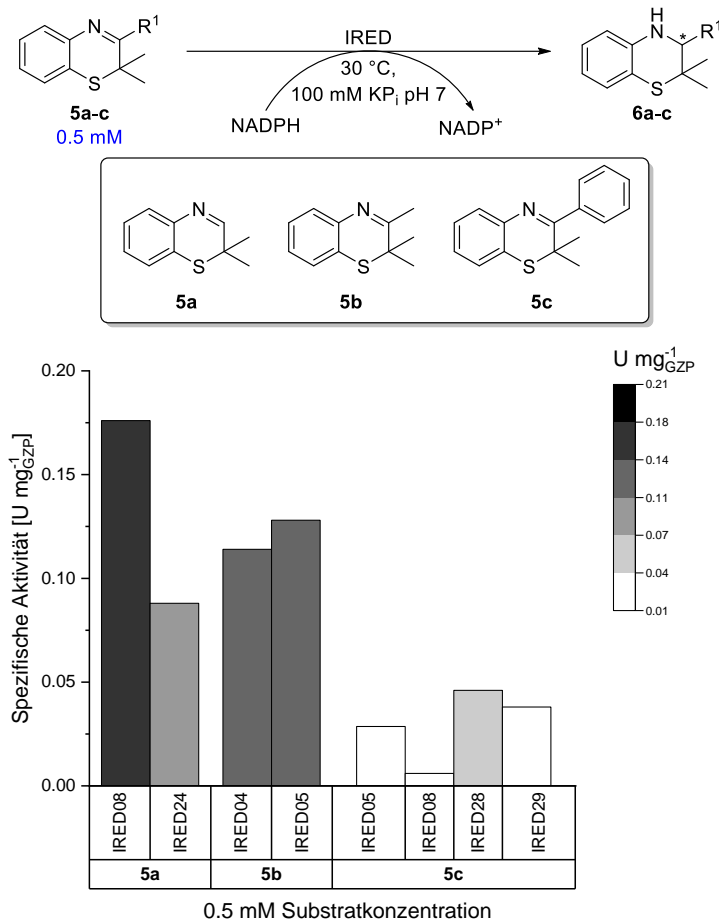
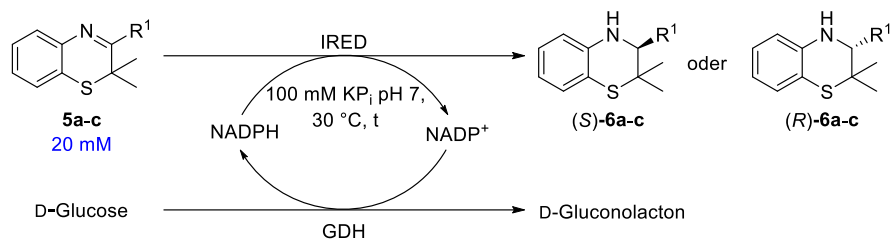
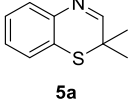
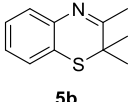
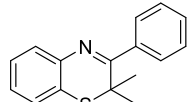


Abbildung 4.13. Spezifische Aktivität der Iminreduktasen zur Reduktion der Benzothiazine **5a-c**

4.3.6.3 Biotransformationen von *2H*-1,4-Benzothiazinen **5**

Aufgrund der vielversprechenden Aktivitäten der IREDs zur Reduktion von *2H*-1,4-Benzothiazinen **5** auch mit sterisch anspruchsvollen Substituenten wurden im nächsten Schritt Biotransformationen mit den anhand des Farbausassays sowie des Aktivitätsassays ausgewählten IREDs durchgeführt. Die biokatalytischen Umsetzungen erfolgten bei einer Substratkonzentration der Benzothiazine **5a-c** von 20 mM im 0.5 mL Ansatz unter *in situ*-Regeneration des Cofaktors NADPH über die GDH (Tabelle 4.5). Unter nicht optimierten Reaktionsbedingungen wurden alle zyklischen Imine **5a-c** zu den entsprechenden Dihydro-*2H*-1,4-benzothiazinen **6a-c** mit moderaten bis quantitativen Umsätzen umgesetzt. Für die Umsetzung des sterisch anspruchsvollen Benzothiazins **5c** wurde eine höhere Biokatalysatorbeladung als zur Reduktion des *2H*-1,4-Benzothiazins **5b** benötigt, was mit den bestimmten Enzymaktivitäten korreliert (Tabelle 4.5). Die Negativkontrollen ohne Iminreduktasen zeigten wiederum keine Umsätze, sodass die verwendete GDH auch keine Aktivität zur Reduktion der *2H*-1,4-Benzothiazinen **5** aufweist.

Tabelle 4.5. Biotransformation der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** unter Einsatz von Iminreduktasen

Eintrag	Substrat	Zeit [h]	IRED ^a	Umsatz [%]	ee [%] ^b
1	 5a	8	IRED08 ^c	> 99	-
			IRED24 ^c	> 99	-
2	 5b	4	IRED04 ^d	96	83 (S)
			IRED05 ^d	95	91 (R)
			IRED05 ^c	40	99 (R)
3	 5c	6	IRED08 ^c	6	99 (S)
			IRED28 ^c	50	99 (R)
			IRED29 ^c	34	99 (R)

^azur besseren Lesbarkeit wurden die IREDs^[121,124,129] durchnummeriert (Kapitel 10.3), die verwendeten Ganzzell-Proteinkonzentrationen sind in Fußnote c und d angegeben; ^bdie absolute Konfiguration wurde in Analogie zur absoluten Konfiguration von (S)-4f per chiraler SFC-HPLC bestimmt; ^c0.6 mg mL⁻¹; ^d0.2 mg mL⁻¹

Darüber hinaus katalysieren IREDs die Reduktion der Benzothiazine **5a-c** mit hohen bis exzellenten Enantioselektivitäten (83-99% ee) und ermöglichen einen Zugang zu beiden Enantiomeren der 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen **6** mit hoher Enantioselektivität (Tabelle 4.5, Einträge 2, 3). Außerdem konnte eine höhere Enantioselektivität der IREDs zur Reduktion des sterisch anspruchsvolleren Substrat **5c** mit einer Phenylgruppe am prochiralen Kohlenstoffatom, im Vergleich zum Substrat **5b** mit einer Methylgruppe am prochiralen C-Atom, nachgewiesen werden (Tabelle 4.5, Einträge 2 und 3). Die Iminreduktasen IRED05, IRED28 und IRED29 wurde als die geeignetsten der untersuchten Enzyme zur Reduktion des sterisch anspruchsvollen Substrats **5c** identifiziert (Tabelle 4.5, Eintrag 3). Iminreduktasen stellen demnach ebenfalls geeignete Biokatalysatoren zur Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** dar, sodass die entwickelte biokatalytische Reduktionsmethode unter Verwendung von IREDs eine Plattformtechnologie zur Reduktion von schwefelhaltigen zyklischen Iminen darstellt. Ein Vorteil der IRED-katalysierten Reduktion der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** gegenüber der organokatalytischen Reduktion unter Verwendung von Hantzsch-Ester als Hydriddonor, ist der Einsatz des Cofaktors NADPH in katalytischen Mengen. Im Vergleich hierzu muss der Hantzsch-Ester bei der organokatalytischen Reduktion mindestens in stöchiometrischer Menge eingesetzt werden.^[199]

4.3.6.4 DFT-Berechnungen zur Evaluation der unterschiedlichen Aktivitäten

Wie bereits erwähnt, sind die Aktivitäten der Iminreduktasen zur Reduktion der 2H-1,4-Benzothiazine **5** erhöht gegenüber den Enzymaktivitäten zur Reduktion der 3-Thiazoline **3**. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die Reduktion dieser zyklischen Imine unter Verwendung des Hantzsch-Esters gemacht. Während die Reduktion der 2H-1,4-Benzothiazine **5** mit guten Ausbeuten möglich ist, konnten keine Umsetzungen mit den 3-Thiazolinen **3** unter Verwendung dieser organokatalytischen Methode beobachtet werden. Sowohl die bio- als auch die organokatalytische Reduktion verwendet ein Dihydropyridin als Hydriddonor, welches im Falle der enzymatischen Reduktion der Cofaktor NADPH und für die organokatalytische Reduktion der Hantzsch-Ester ist. Um diese Beobachtungen verstehen zu können, hat Huber von der Ruhr-Universität Bochum in einem Kooperationsprojekt mittels DFT-Berechnungen (B3LYP 6-311+G**) unter Verwendung der Software Gaussian 09^[222] die Übergangszustände dieser Reduktionen simuliert.^[218] Hierzu wurden ein Dihydropyridin-Analogon, das N-protonierte 3-Thiazolin **3b** sowie das N-protonierte 2H-1,4-Benzothiazin **5a** für die Berechnungen verwendet. Die Aktivierungsenergien der berechneten Übergangszustände der Reduktionen liegen bei 23 kcal mol⁻¹ für das 3-Thiazolin **3b** (Abbildung 4.14A) und bei 19 kcal mol⁻¹ für das 2H-1,4-Benzothiazin **5a** (Abbildung 4.14B). Obwohl diese Gas-Phase Kalkulationen auf vereinfachten Modellen beruhen, ist die höhere Aktivierungsenergie zur Reduktion der 3-Thiazoline **3** in Übereinstimmung mit den experimentellen Beobachtungen der Aktivitätsbestimmungen und der nicht erfolgreichen organokatalytischen Reduktion mit dem Hantzsch-Ester als Hydriddonor.^[218]

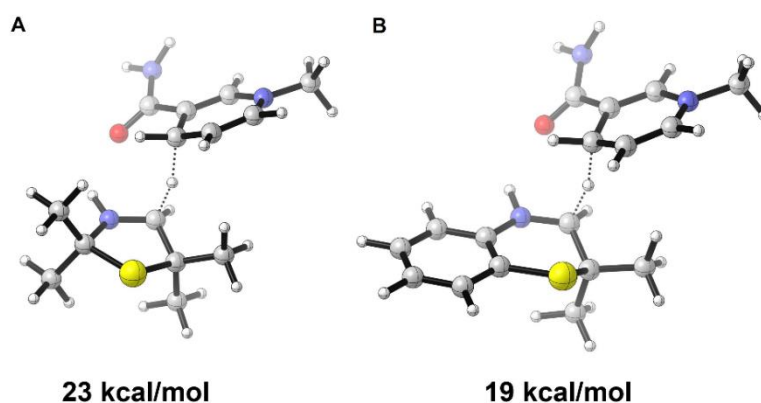


Abbildung 4.14. Per DFT-Kalkulation berechnete Übergangszustände der Reduktion des **A** 3-Thiazolins **3b** und des **B** 2H-1,4-Benzothiazins **5a** mit einem Dihydropyridin-Analogon als Reduzierungsreagenz in der Gasphase (die relative freie Gibbs Energie ΔG_{298K} ist angegeben)^[218]

Über die Wiederholung der Berechnungen mit dem intrinsischen Solvatisierungsmodell *solvation model based on density* (SMD) konnte Huber den Trend in den Differenzen der unterschiedlichen Aktivierungsbarrieren in Wasser (17 kcal mol⁻¹ vs. 13 kcal mol⁻¹), zur

Simulation der IRED-katalysierten Reduktion und in Chloroform (20 kcal mol⁻¹ vs. 15 kcal mol⁻¹), zur Simulation der organokatalytischen Reduktion, bestätigen.^[218]

Die Ergebnisse zur biokatalytischen Reduktion der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** unter Verwendung der IREDs sowie die von Huber durchgeführten DFT-Berechnungen sind ebenfalls im Rahmen der bereits erwähnten Veröffentlichung im Journal *Nature Communications* erschienen: N. Zumbrägel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 1949 (DOI: 10.1038/s41467-018-03841-5).^[218]

4.3.7 Kristallisation und Aufklärung der Struktur einer Iminreduktase

Anhand der DFT-Berechnungen konnten die experimentell beobachteten Unterschiede in den Aktivitäten der IREDs zur Reduktion der 3-Thiazoline **3** und 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** sowie die Unterschiede der organokatalytischen Reduktion bereits nachvollzogen werden. Insbesondere für die biokatalytische Reduktion konnte jedoch anhand dieser Berechnungen keine Erklärung für die Beobachtungen geliefert werden. Möglicherweise unterscheiden sich die Positionen in denen die Substrate **3** und **5** in der aktiven Tasche liegen deutlich, sodass über unterschiedliche Interaktionen eventuell die Unterschiede in den Aktivitäten der IRED-katalysierten Reduktion der 3-Thiazoline **3** und 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** erklärt werden könnten.

Mit dem Ziel eine Erklärung für die unterschiedlichen Aktivitäten der biokatalytischen Reduktionen zu finden, wurde in einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe um Niemann der Universität Bielefeld die Struktur der IRED08, welche im Rahmen der biokatalytischen Reduktion schwefelhaltiger zyklischer Imine die aktivste Iminreduktase darstellte, gelöst. Hierzu wurde die Aufreinigung der Iminreduktase und Vorexperimente zur Stabilität des Enzyms von der Autorin vorgenommen, während die Kristallisationsexperimente, die Vermessung der erhaltenen Kristalle und die Strukturaufklärung von Geerds und Meyer der Arbeitsgruppe Niemann geleistet wurden.

4.3.7.1 Aufreinigung der IRED für die Untersuchung der Stabilität

Mit dem Ziel zunächst die Stabilität der aufgereinigten Iminreduktase aus *Mycobacterium smegmatis* bei Raumtemperatur und 4 °C als Vorexperiment der Kristallisationen zu untersuchen, wurde die IRED08 zunächst per Nickel-Affinitätschromatographie mit Tropfsäulen und Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie) anhand des ÄKTA™ Systems aufgereinigt. Die IRED konnte in einer guten Reinheit erhalten werden, was durch SDS-PAGE überprüft wurde (Abbildung 4.15).

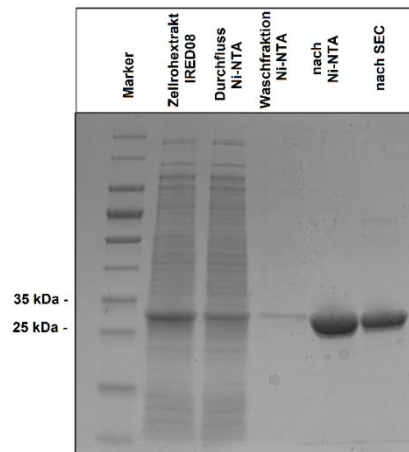


Abbildung 4.15. SDS-PAGE der Aufreinigung der IRED08 zur Untersuchung der Stabilität des Enzyms

4.3.7.2 Untersuchung der Stabilität der IRED08

Für die Proteinkristallisation ist eine Kenntnis der Proteinstabilität bei 4 °C und Raumtemperatur, bei denen die Kristallisationsexperimente durchgeführt werden, entscheidend. Daher wurde die Stabilität der IRED08 sowohl bei einer Lagerung bei 4 °C und Raumtemperatur über einen Zeitraum von 14 Tagen per SDS-PAGE untersucht. Bei einer Temperatur von 4 °C war das Protein über einen Zeitraum von 14 Tagen stabil und es konnte kein Proteinabbau beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Lagerung des aufgereinigten Proteins bei Raumtemperatur bereits am fünften Tag nur noch sehr wenig Protein nachgewiesen werden und am siebten Tag ist entsprechend der SDS-PAGE kein Protein mehr vorhanden (Abbildung 4.16). Dies lässt auf die Anwesenheit von Proteasen vermuten. Allerdings konnten ungewöhnlicherweise keine degradierten Fragmente bei geringeren Molekulargewichten auf der SDS-PAGE nachgewiesen werden.

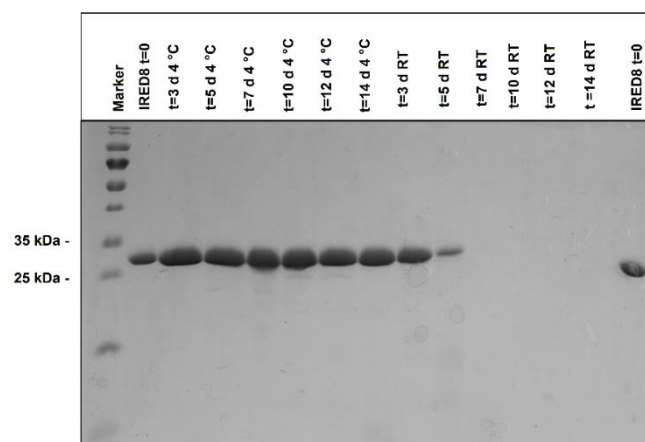


Abbildung 4.16. SDS-PAGE des Stabilitätstests der IRED08 bei 4 °C und Raumtemperatur über einen Zeitraum von 14 Tagen

4.3.7.3 Untersuchung der Stabilität der IRED08 in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren

Aufgrund der Instabilität der IRED08 bei Raumtemperatur wurde überprüft, ob die Anwesenheit von Proteaseinhibitoren einen positiven Einfluss auf die Stabilität des Proteins bei Raumtemperatur hat. Hierzu wurden sechs verschiedene Proteaseinhibitoren bzw. Mischungen von Inhibitoren über einen Zeitraum von neun Tagen getestet. Als Kontrolle wurde zudem die Stabilitätsuntersuchung in Abwesenheit von Proteaseinhibitoren untersucht.

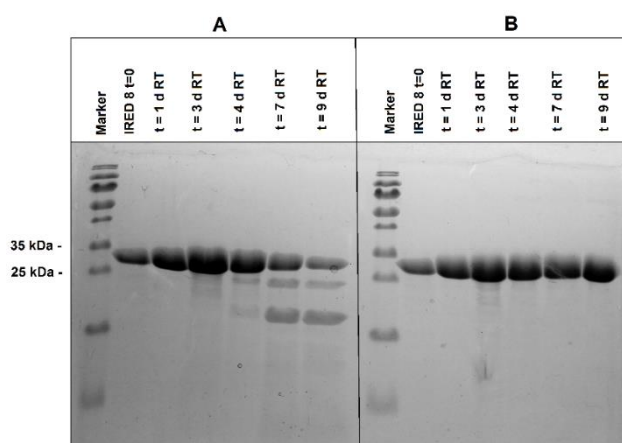


Abbildung 4.17. SDS-PAGE zur Untersuchung der Stabilität der IRED08 in Gegenwart von Proteaseinhibitoren **A** Kontrolle **B** cOmplete™ + EDTA

Im Gegensatz zum ersten Stabilitätstest bei Raumtemperatur konnte in diesem Kontrollexperiment ein Abbau des Enzyms per SDS-PAGE nachgewiesen werden, die bereits am dritten Tag zu beobachten ist (Abbildung 4.17A). In Gegenwart der kommerziellen Mischung an Proteaseinhibitoren cOmplete™, die Serin- und Cysteinproteasen inhibiert, unter Zusatz von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Metalloproteaseninhibitor konnte der Abbau des Proteins verhindert werden und die Iminreduktase war über neun Tage bei Raumtemperatur stabil (Abbildung 4.17B). In Anwesenheit des Cysteinproteaseinhibitors Iodacetamid wurde ein leichter Abbau der Iminreduktase ab Tag 3 beobachtet (Abbildung 4.18A). Unter Verwendung von Leupeptin, welches als Inhibitor von Cystein-, Serin- und Threoninproteasen wirkt, konnte keine Steigerung in der Stabilität gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 4.18B).

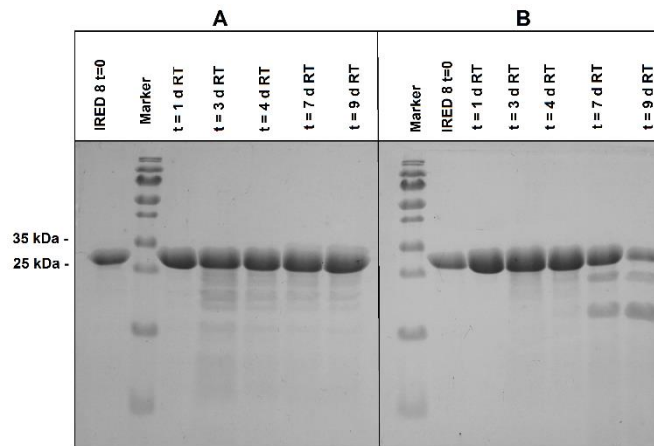


Abbildung 4.18. SDS-PAGE zur Untersuchung der Stabilität der IRED08 in Gegenwart von Proteaseinhibitoren **A** Iodacetamid **B** Leupeptin

Keine Stabilitätssteigerung der Iminreduktase bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von neun Tagen wurde ebenfalls für den Serinproteaseinhibitor Aprotinin bestimmt (Abbildung 4.19A). Die Anwesenheit des Metalloproteaseninhibitors EDTA in Kombination mit Iodacetamid (Cysteinproteaseinhibitor) verhinderte den Abbau des Proteins, sodass die IRED08 bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von neun Tagen stabil war (Abbildung 4.19B).

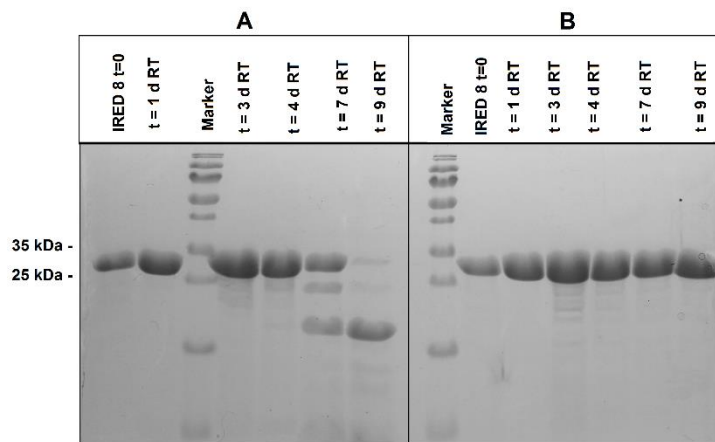


Abbildung 4.19. SDS-PAGE zur Untersuchung der Stabilität der IRED08 in Gegenwart von Proteaseinhibitoren **A** Aprotinin **B** EDTA + Iodacetamid

In Gegenwart von Phenylmethylsulfonylfluorid, welches als Inhibitor von Serin- und Cysteinproteasen wirkt, wurde ein Abbau des Proteins ab dem dritten Tag beobachtet (Abbildung 4.20).

Eine Stabilisierung des Proteins bei Raumtemperatur konnte entsprechend nur in Gegenwart der Proteaseinhibitormischungen cOmplete™ und EDTA bzw. EDTA und Iodacetamid nachgewiesen werden. Für die Kristallisationsansätze wurden daher EDTA in Kombination mit Iodacetamid als Proteaseinhibitoren zur Stabilisierung der Iminreduktase ausgewählt.

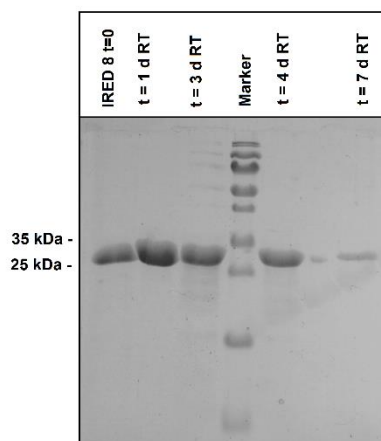


Abbildung 4.20. SDS-PAGE zur Untersuchung der Stabilität der IRED08 in Gegenwart von Phenylmethylsulfonylfluorid als Proteaseinhibitor

4.3.7.4 Aufreinigung der IRED08 für die Kristallisationsexperimente

Neben der Verwendung von Proteaseinhibitoren zur Stabilisierung der Iminreduktase bei Raumtemperatur wurde die Aufreinigung des Enzyms für die Kristallisationsexperimente modifiziert. Über die abgeänderte Aufreinigung sollten möglichst alle Proteasen aus der Proteinlösung entfernen werden. Hierzu erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie im Anschluss an die Nickel-Affinitätschromatographie gefolgt von einer Gelfiltration als dritten Aufreinigungsschritt. Das Protein wurde erneut in hoher Reinheit erhalten, was durch SDS-Page überprüft wurde (Abbildung 4.21).

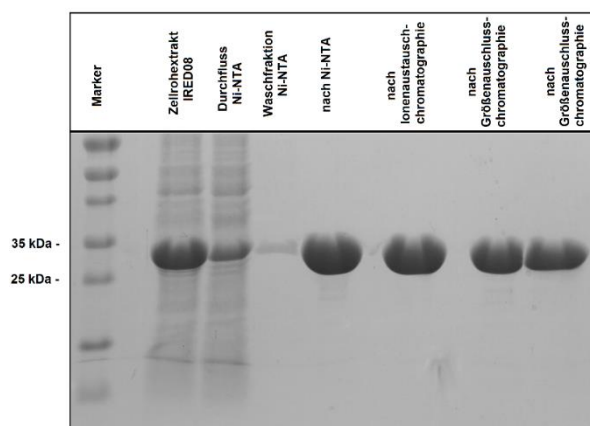


Abbildung 4.21. SDS-PAGE der Aufreinigung der IRED08 als Vorbereitung der Kristallisationsexperimente

Außerdem wurde eine massenspektrometrische Analyse der Gesamtmasse des Proteins durchgeführt, um zu überprüfen ob das Protein homogen oder heterogen, beispielsweise aufgrund von posttranslationalen Modifikationen, vorliegt. Die Homogenität des aufgereinigten Proteins konnte über massenspektrometrische Analyse bestätigt werden (siehe Kapitel 10.5.12.1). Das aufgereinigte, homogene Protein wurde anschließend in

Kristallisationsexperimenten eingesetzt, die von der Arbeitsgruppe um Niemann durchgeführt wurden.

4.3.7.5 Cokristallisation der IRED08 mit NADPH und Aufklärung der Struktur

Im Rahmen der Kristallisationsexperimente von Geerds und Meyer wurden zunächst die Kristallisationsbedingungen optimiert. Mit den optimierten Reaktionsbedingungen wurden die Kristallisationen durchgeführt und die erhaltenen Kristalle am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) vermessen. Die Kristallstruktur der IRED08 kokristallisiert mit NADPH konnte daraufhin von Meyer mit einer Auflösung von 1.55 Å aufgeklärt werden. Bei der asymmetrischen Einheit handelt es sich um ein Dimer (Abbildung 4.22A).^[226]

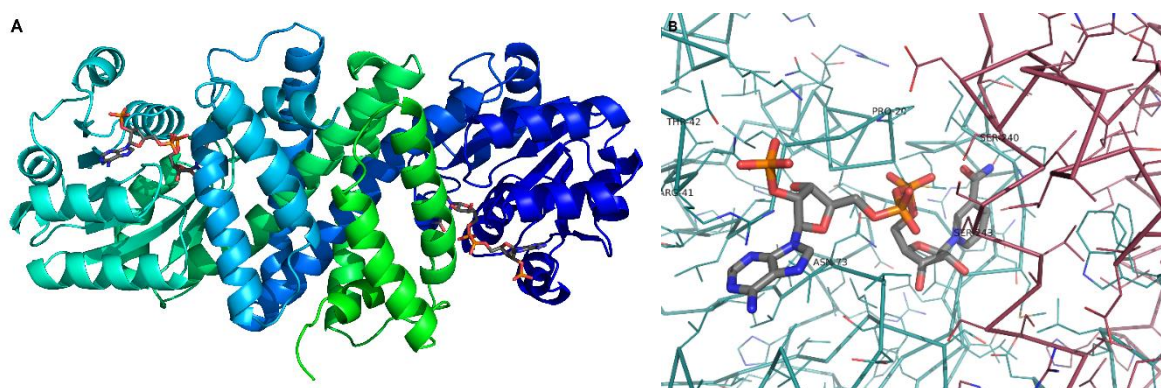


Abbildung 4.22. Struktur der IRED08 im Komplex mit NADPH **A** Inhalt der asymmetrischen Einheit **B** Position von NADPH in der aktiven Tasche

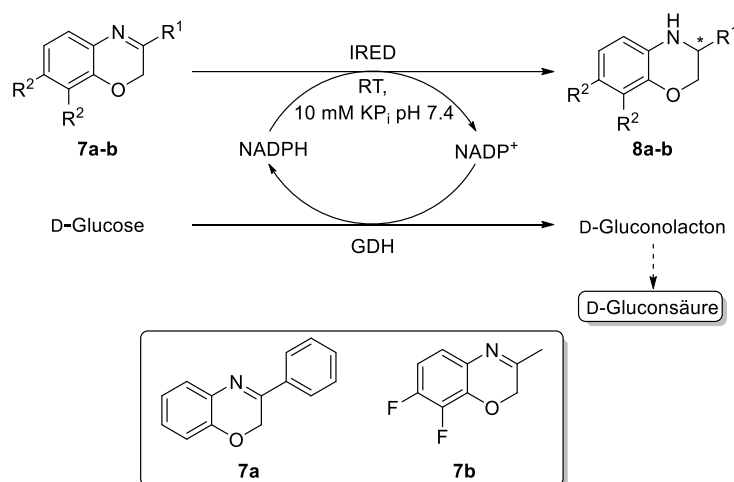
Die aktive Tasche des Proteins, in dem das NADPH gebunden ist, wird aus zwei Untereinheiten des Proteins gebildet, ist gut zugänglich und scheint relativ groß zu sein. Das NADPH ist zudem über zahlreiche Interaktionen mit Aminosäureresten beider Untereinheiten in der aktiven Tasche positioniert (Abbildung 4.22B).^[226] Um Aussagen über die Positionen der 3-Thiazoline **3** bzw. 2H-1,4-Benzothiazine **5** und Interaktionen mit Aminosäureresten in der aktiven Tasche machen zu können, die möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedlichen Aktivitäten der IREDs zur Reduktion dieser Verbindungen liefern, werden von Meyer Cokristallisationsexperimente mit dem 3-Thiazolin **3f** und dem 2H-1,4-Benzothiazin **5b** durchgeführt. Außerdem werden Soakingexperimente mit diesen Substraten und den vorhandenen Kristallen der IRED08 von Meyer durchgeführt. Nach Abschluss der Experimente dieses Teilprojekts ist zudem eine Veröffentlichung dieser Ergebnisse geplant.

4.3.8 Biokatalytische Reduktion von 2H-1,4-Benzoxazinen **7**

Nach der erfolgreichen Etablierung einer effizienten und hoch enantioselektiven biokatalytischen Methode zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3** sowie der Ausweitung auf weitere schwefelhaltige zyklische Imine wie 2H-1,4-Benzothiazine **5** sollte die Reduktion von sauerstoffhaltigen zyklischen Iminen zur Erweiterung der Plattformtechnologie untersucht werden. Aufgrund der Relevanz von 2H-1,4-Benzoxazinen **7** als Struktur motive erfolgten die Untersuchungen mit diesen als potentielle Substrate der Iminreduktasen.

4.3.8.1 Kolorimetrischer pH-Shift-Assay

Analog zu den Arbeiten mit den schwefelhaltigen zyklischen Iminen wurde auch zur Identifikation und Priorisierung geeigneter Iminreduktasen zur Reduktion der Benzoxazine ein pH-Shift-Assay mit den synthetisierten Verbindungen **7a-b** und den 31 IREDs durchgeführt (Schema 4.25).



Schema 4.25. Biokatalytische Reduktion von 2H-1,4-Benzoxazinen **7a-b** unter Einsatz von Iminreduktasen und *in situ*-Regeneration des Cofaktors mit der Glucose-Dehydrogenase

Für die Substrate **7a** und **7b** konnten Farbumschläge von grün nach gelb in Kombination mit einer Reihe von IREDs identifiziert werden. Analog zum kolorimetrischen pH-Shift-Assay der 2H-1,4-Benzothiazine **5** war ein Volumen von 10 μ L des Zellrohextrakts der IREDs zur Identifikation eindeutiger Farbumschläge ausreichend. Für beide Benzoxazine **7a** und **7b** wurden jeweils vier IREDs für die folgenden Untersuchungen priorisiert. Die Negativkontrollen zeigten wiederum keine Farbumschläge, sodass die GDH und andere Proteine, die von dem *E. coli*-Stamm exprimiert werden, vermutlich keine Nebenaktivität zur Iminreduktion aufweisen (Tabelle 4.6). Darüber hinaus wurde eine unerwartete und nicht erklärbare Braunfärbung aller Screeningansätze für das Substrat **7b** nach 24 h beobachtet.

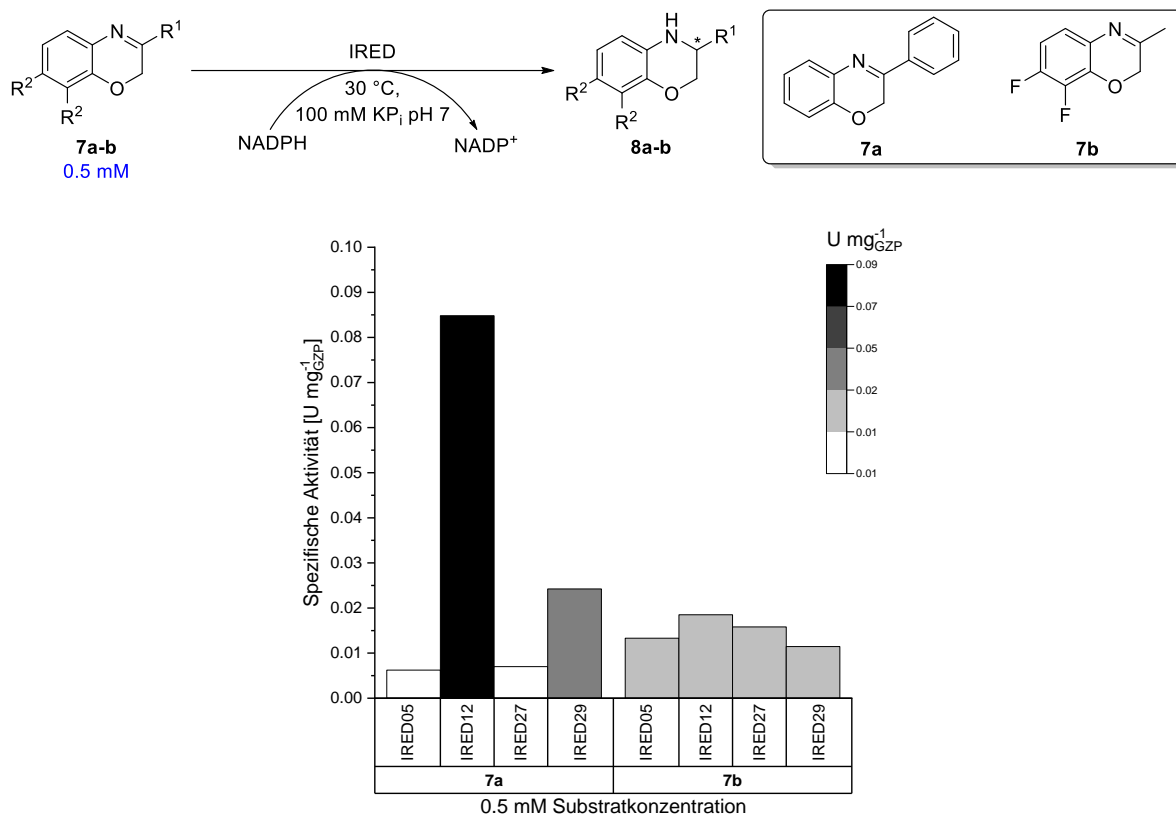
Tabelle 4.6. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7a-b**

Substrat	Potentiell positive IREDs	Negativ	pET22b_leer
7a	IRED05, IRED12, IRED27, IRED29	negativ	negativ
7b	IRED05, IRED12, IRED27, IRED29	negativ	negativ

Potentiell positive IREDs zeigten einen deutlichen Farbumschlag von grün nach gelb innerhalb von 9 h-24 h. Negativ: ohne Zugabe von IRED-ZRE, pET22b_leer: Verwendung des ZRE ohne Expression der IRED. Für eine bessere Lesbarkeit wurden die IREDs^[121,124,129] durchnummeriert (Kapitel 10.3).

4.3.8.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der priorisierten IREDs zur Reduktion der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** erfolgte im nächsten Schritt. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Imine **7a** und **7b** wurden die Aktivitäten der IREDs bei einer Substratkonzentration von 0.5 mM bestimmt (Abbildung 4.23). Für alle untersuchten IREDs wurden in Kombination mit den 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7a** und **7b** Aktivitäten nachgewiesen.

**Abbildung 4.23.** Spezifische Aktivität der IREDs zur Reduktion der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7a-b**

Die höchste Aktivität konnte mit 0.085 U mg⁻¹_{GZP} zur Reduktion von 3-Phenyl-2*H*-1,4-benzoxazins (**7a**) in Kombination mit der IRED12 nachgewiesen werden. Mit den Iminreduktasen IRED05 und IRED27 konnten hingegen nur moderate Aktivitäten zur Reduktion des Substrates **7a** nachgewiesen werden, die in demselben Größenbereich lagen wie die Aktivitäten zur Reduktion der Thiazoline **3a-e**. Die Aktivitäten zur Reduktion des

Imine **7b** sind moderat und liegen zwischen den Aktivitäten der IRED29 und der IRED27 zur Reduktion des Substrates **7a** (Abbildung 4.23).

4.3.8.3 Biotransformationen von 2H-1,4-Benzoxazinen **7**

Die vielversprechenden spezifischen Aktivitäten der Iminreduktasen zur Reduktion der 2H-1,4-Benzoxazine **7a-b** motivierten die Autorin im nächsten Schritt Biotransformationen im 0.5 mL Maßstab bei Substratkonzentrationen der zyklischen Imine **7a-b** von 20 mM unter Verwendung der GDH zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors durchzuführen (Tabelle 4.7). Unter nicht optimierten Reaktionsbedingungen wurden beide 2H-1,4-Benzoxazine **7a** und **7b** in moderaten bis quantitativen Umsätzen (19-100%) zu den entsprechenden zyklischen Aminen mit einer exzellenten Produktselektivität umgesetzt. Die Negativkontrollen ohne Iminreduktasen zeigten auch hier keine Umsätze, sodass die verwendete GDH keine Aktivität zur Reduktion der 2H-1,4-Benzoxazine **7** aufweist. Sehr geringe Biokatalysatorbeladungen von 0.6 mg mL⁻¹ bzw. 1.2 mg mL⁻¹ der IRED-Zellrohextrakte reichten aus, um moderate bis quantitative Umsätze zu erreichen.

Tabelle 4.7. Biotransformation der 2H-1,4-Benzoxazine **7a-b** unter Einsatz von Iminreduktasen

Eintrag	Substrat	Zeit [h]	IRED ^a	Umsatz [%]	ee [%] ^b
1	 7a	15	IRED05 ^c	19	52 (R)
			IRED12 ^c	> 99	99 (S)
			IRED29 ^c	29	81 (S)
2	 7b	19.5	IRED05 ^d	21	72 (R)
			IRED12 ^d	84	26 (R)
			IRED27 ^d	26	60 (R)
			IRED29 ^d	20	71 (R)

^azur besseren Lesbarkeit wurden die IREDs^[121,124,129] durchnummeriert (Kapitel 10.3), die verwendeten Ganzzell-Proteinkonzentrationen sind in Fußnote c und d angegeben; ^bdie absolute Konfiguration von (S)-**8a** wurde über die spezifische Rotation und Vergleich mit den Literaturwerten bestimmt. Die absolute Konfiguration von (R)-**8b** wurde über Vergleich mit den HPLC Daten von Lopez-Iglesias^[210] per chiraler SFC-HPLC bestimmt; ^c0.6 mg mL⁻¹; ^d1.2 mg mL⁻¹

Darüber hinaus katalysieren Iminreduktasen die Reduktion des 3-Phenyl-2H-1,4-benzoxazins (**7a**) mit moderaten bis exzellenten Enantioselektivitäten (52-99% ee) und zeigen eine enantiokomplementäre Produktbildung. Dies ermöglichte einen Zugang zu

beiden Enantiomeren unter Verwendung verschiedener IREDs (Tabelle 4.7, Eintrag 1). Im Gegensatz hierzu katalysieren Iminreduktasen die Reduktion des Substrates **7b** nur mit geringen bis hohen Enantioselektivitäten (21-72% ee) und ermöglichen nur einen Zugang zum (*R*)-Enantiomer des zyklischen Amins **8b** (Tabelle 4.7, Eintrag 2). Da zur Synthese des Levofloxacin das entsprechende (*S*)-Enantiomer von **8b** benötigt wird, konnte über die IRED-katalysierte Reduktion bisher nicht das richtige Enantiomer für die Synthese von Levofloxacin bereitgestellt werden. Mit dem Ziel der Synthese eines pharmazeutischen Intermediats könnte in zukünftigen Arbeiten *directed evolution* zum Auffinden einer (*S*)-selektiven IRED zur Reduktion des zyklischen Imins **7b** angewendet werden. Im Rahmen dieser Biotransformationen wurde außerdem eine Änderung der Enantioselektivität der Iminreduktasen IRED12 und IRED29 in Abhängigkeit von den verwendeten Substraten **7a** bzw. **7b** beobachtet. Für beide IREDs ist die Bildung des (*S*)-Enantiomers in Kombination mit dem Substrat **7a**, welches eine Phenylgruppe an der Position R¹ und Wasserstoffatome an R² trägt, bevorzugt (Tabelle 4.7, Eintrag 1). Im Gegensatz dazu katalysieren beide IREDs in Kombination mit dem Substrat **7b**, welches an der Position R¹ eine weniger sterisch anspruchsvolle Methylgruppe trägt und an der Position R² zwei Fluoratome trägt, bevorzugt die Bildung des (*R*)-Enantiomers. Außerdem fällt auf, dass die IRED12 eine geringere Enantioselektivität zur Reduktion von **7b** im Vergleich zum zyklischen Imin **7a** aufweist (Tabelle 4.7, Eintrag 1 und 2). Möglicherweise können die Substrate **7a** und **7b** aufgrund ihres unterschiedlichen Substitutionsmusters verschiedene Interaktionen in der aktiven Tasche der IRED ausbilden, sodass die Reduktion mit sehr unterschiedlichen Enantioselektivitäten verläuft. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten in zukünftigen Untersuchungen Protein-Liganden-Docking durchgeführt werden, um einen Eindruck über die Interaktionen der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** im aktiven Zentrum der IREDs zu erhalten.

4.3.8.4 Prozessentwicklung der IRED-katalysierten Reduktion von 3-Phenyl-2*H*-1,4-benzoxazin (**7a**)

Aufgrund der positiven Ergebnisse der biokatalytischen Reduktion von 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** unter Einsatz von Iminreduktasen sollte im nächsten Schritt die Effizienz dieser biokatalytischen Methode in einer Prozessentwicklung anhand der Reduktion von 3-Phenyl-2*H*-1,4-benzoxazin (**7a**) aufgezeigt werden. In Analogie zu den Arbeiten im vorherigen Projekt wurde daher zunächst ein *E. coli*-Ganzzell-Katalysator konstruiert (siehe Kapitel 3.3.4), der sowohl die IRED12 als auch die GDH zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors in verschiedenen Plasmiden in einer Zelle überexprimiert. Die Reaktion im vergrößerten Labormaßstab (40 mL) wurde bei einer Substratkonzentration von 50 mM, was einer Substratbeladung von 10 g L⁻¹ entspricht, einer geringen Biokatalysatorbeladung des lyophilisierten Ganzzell-Katalysators von

0.1 g pro mmol Substrat **7a** und einer Reaktionstemperatur von 30 °C durchgeführt (Abbildung 4.24A). Zur Konstanthaltung des pH-Wertes bei einem Wert von pH 7 wurde erneut eine TitroLine®-Apparatur verwendet (Abbildung 4.24B).

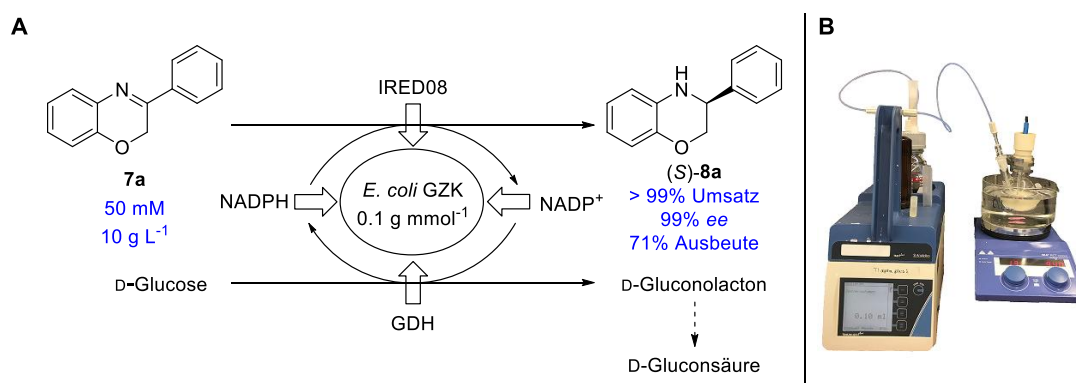


Abbildung 4.24. A Prozessentwicklung der Reduktion von 3-Phenyl-2H-1,4-benzoxazin (**7a**)
B TitroLine®-System zur Konstanthaltung des pH-Wertes

Auch im präparativen Maßstab verlief die Reduktion von 3-Phenyl-2H-1,4-benzoxazin (**7a**) reibungslos, sodass nach einer Reaktionszeit von 26 h ein quantitativer Umsatz und eine exzellente Enantioselektivität von 99% zugunsten des (S)-Enantiomers des zyklischen Amins **8b** nachgewiesen konnten. Nach Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt (S)-**8b** zudem mit einer Ausbeute von 71% und einer Reinheit von 98%, die per ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt wurde, isoliert werden (Abbildung 4.24). Die Ergebnisse dieses Experiments im präparativen Labormaßstab unterstreichen erneut den Wert und die Anwendbarkeit der im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit entwickelten biokatalytischen Methode zur Reduktion sauerstoffhaltiger zyklischer Imine. Im Rahmen dieses Projekts konnte somit eine Plattformtechnologie zur hoch enantioselektiven Reduktion zyklischer Imine mit zusätzlichen Heteroatomen entwickelt werden.

Die Ergebnisse zur biokatalytischen Reduktion der 2H-1,4-Benzoxazine **7** unter Verwendung der IREDs wurden gemeinsam mit den Ergebnissen der Abschlussarbeiten von Machui^[227] und Nonnhoff^[228], die jeweils die IRED-katalysierte Reduktion eines weiteren 2H-1,4-Benzoxazins untersucht haben, in einem Manuskript im *Journal of Organic Chemistry* zur Veröffentlichung eingereicht: N. Zumbrägel, P. Machui, J. Nonnhoff, H. Gröger, *J. Org. Chem.* zur Veröffentlichung eingereicht.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieses Kapitels konnte eine biokatalytische Methode zur Reduktion von schwefel- und sauerstoffhaltigen zyklischen Iminen erfolgreich etabliert werden und die Effizienz dieser Technologie wurde in verschiedenen präparativen Reaktionen demonstriert. Nach jahrzehntelangen größtenteils erfolglosen Versuchen zur enantioselektiven Reduktion von 3-Thiazolinen **3** konnte diese Problematik im Rahmen des Projektes über die Entwicklung einer biokatalytischen Methode gelöst werden. Diese biokatalytische Reduktionsmethode stellt bislang die erste Methode zur hoch enantioselektiven Reduktion von 3-Thiazolinen **3** dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Methode als Plattformtechnologie für die Reduktion einer Vielzahl von *S*- und *O*-haltigen zyklischen Iminen genutzt werden kann. In Folgearbeiten wäre insbesondere die Identifikation von (*R*)-selektiven IREDs zur Darstellung von (*R*)-3-Thiazolidinen, sowie die IRED-katalysierte Darstellung des (*S*)-Intermediats des Levofloxacins **8b** interessant. Außerdem wäre die Durchführung von Dockingstudien zur Evaluation der Beobachtungen dieses Teilprojektes in zukünftigen Experimenten von großem Interesse. So könnte anhand von Protein-Liganden-Docking möglicherweise eine Erklärung für die höhere Aktivität der IREDs zur Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** im Vergleich zu 3-Thiazolinen **3** aufgrund unterschiedlicher Interaktionen im aktiven Zentrum des Enzyms gefunden werden. Darüber hinaus könnte eventuell eine Erklärung für die Änderung der Enantioselektivität der IRED12 und IRED29 im Rahmen der Reduktion der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** gefunden werden. Mit dem Ziel die Prozesse zur biokatalytischen Reduktion *S*- und *O*-haltiger zyklischer Imine unter Einsatz von Iminreduktasen weiter zu optimieren, wäre zudem die Etablierung einer Hochzelldichtefermentation der Ganzzell-Katalysatoren von großem Interesse, um die Kosten pro Gramm Biokatalysator zu reduzieren. Die Durchführung der Biotransformationen unter Fermentationsbedingungen im Hinblick auf die Entwicklung eines technisch optimierten Prozesses wäre ebenfalls interessant.

5. VERKNÜPFUNG VON HETEROZYKLENCHEMIE UND BIOKATALYSE IN EINTOPF-SYNTHESEN

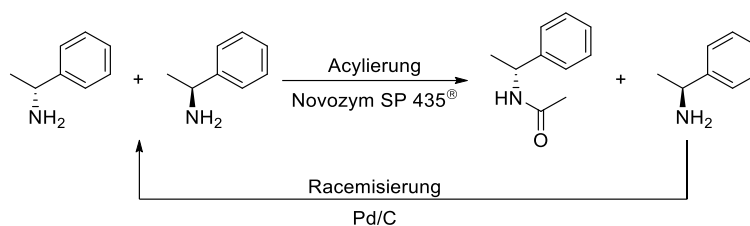
5.1 Stand der Wissenschaft

5.1.1 Kombination von Chemo- und Biokatalyse

Die Entwicklung chemoenzymatischer Eintopf-Synthesen insbesondere für industriell relevante Verbindungsklassen weckt immer größeres Interesse. Über die Kombination chemokatalytischer bzw. chemischer Reaktionen mit biokatalytischen Schritten in einer Eintopf-Synthese kann die Isolierung von Intermediaten vermieden werden. Die Minimierung des Solventverbrauchs und die damit verbundene Reduktion an Abfall ermöglicht zudem eine erhöhte Ressourceneffizienz mehrstufiger Eintopf-Kaskaden.^[229] Darüber hinaus entstehen durch die Kombination von Chemo- und Biokatalyse keinerlei Probleme durch instabile oder schwer handhabbare Intermediate. Über die Verschiebung von Reaktionsgleichgewichten können zudem die Umsätze und Enantiomerenüberschüsse erhöht werden.^[230] Allerdings gehen auch eine Vielzahl von Herausforderungen mit chemoenzymatischen Eintopf-Synthesen einher, die während der Etablierung dieser Kaskaden zu berücksichtigen sind. Unter anderem gibt es kein generelles Konzept oder eine allgemeine Herangehensweise zur Etablierung solcher Kaskadenreaktionen, sodass hohe Entwicklungskosten und eine lange Entwicklungsphase unter Umständen von Nöten sind.^[229]

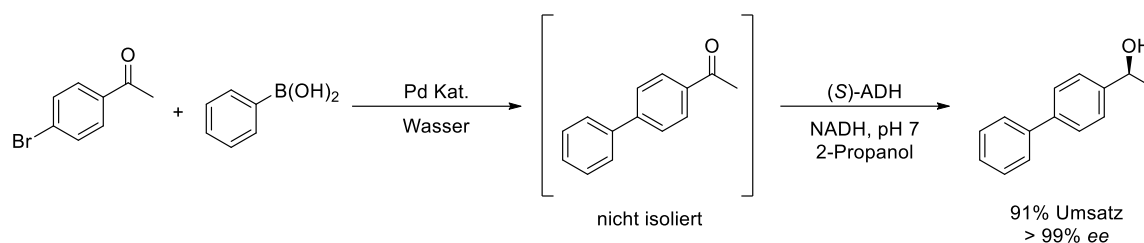
1980 berichtete die Arbeitsgruppe um van Bekkum die erste Kombination von Chemo- und Biokatalyse, in dem sie erfolgreich eine Kaskade zur Synthese des Zuckeralkohols D-Mannitol ausgehend von D-Glucose über die Kombination einer enzymkatalysierten Isomerisierung und einer heterogenen metallkatalysierten Hydrierung entwickelten.^[231]

Die Entwicklung der dynamisch kinetischen Racematspaltung (DKR) stellt die erste breit angewandte Technologie chemoenzymatischer Eintopf-Synthesen dar, die sowohl von einer Vielzahl akademischer Arbeitsgruppen als auch der Industrie untersucht wurde.^[232-236] Ein Grund für die initiale Entwicklung der dynamisch kinetischen Racematspaltung unter Kombination von Chemo- und Biokatalyse als angewandte Eintopf-Technologie ist vermutlich die Aktivität und Stabilität von Lipasen in organischen Solventien. Reetz *et al.* beschrieben als erste die dynamisch kinetische Racematspaltung von 1-Phenylethylamin über die Kombination einer Lipase-katalysierten Acylierung und einer Metall-katalysierten Racemisierung (Schema 5.1).^[236]



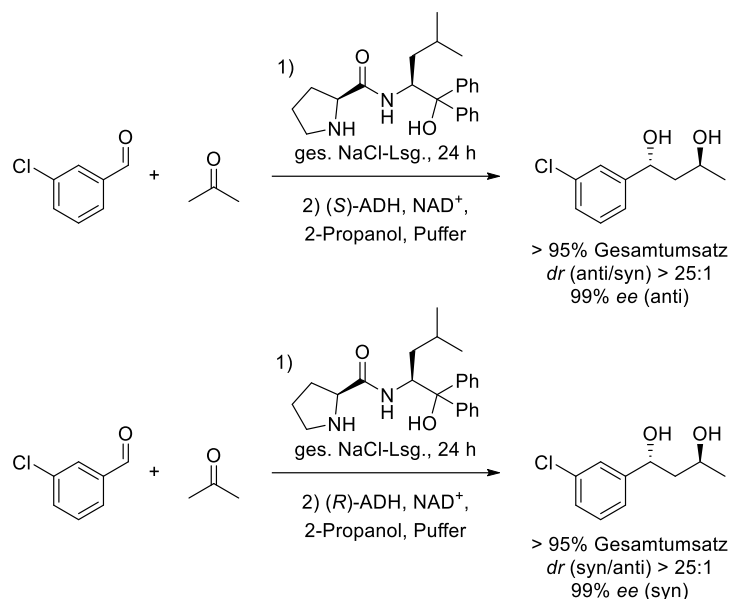
Schema 5.1. Dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) eines chiralen Amins^[236]

Die Kombination von homogenen Metallkatalysatoren mit Enzymen wurde zunächst in sequentiellen Eintopf-Prozessen durchgeführt. Ein Beispiel hierfür ist die von Simons *et al.* etablierte Kombination der Metall-katalysierten Hydrierung und der Acylase-katalysierten Racematspaltung zur Synthese von L-Aminosäuren.^[237] Burda *et al.* kombinierten zudem erfolgreich eine Suzuki-Kreuzkupplung mit einer biokatalytischen Ketonreduktion durch eine Alkoholdehydrogenase in einem sequentiellen Eintopf-Prozess (Schema 5.2).^[238]



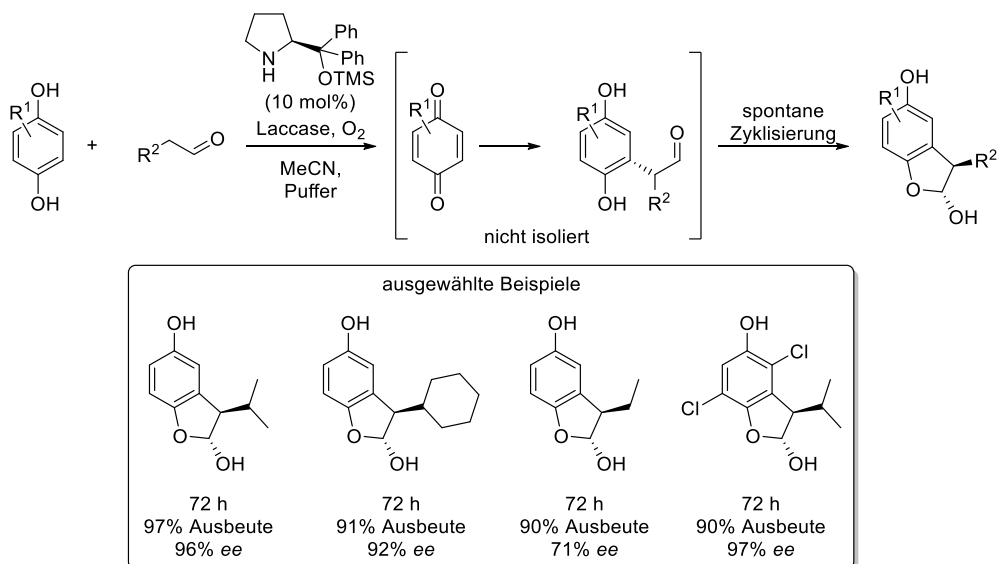
Schema 5.2. Kombination einer Suzuki-Kreuzkupplung und einer biokatalytischen Ketonreduktion in einer sequentiellen Eintopf-Synthese^[238]

Der Anstieg an Arbeiten zur Kombination von Organo- und Biokatalyse lässt sich unter anderem auf die Fortschritte im Bereich der asymmetrischen Organokatalyse der letzten Jahre zurückführen. So wurde das Potential zur Verwendung von Organokatalysatoren in chemoenzymatischen Eintopf-Reaktionen beispielsweise über die Kombination von Aldolreaktionen mit biokatalytischen Transformationen anhand von Redoxenzymen sowohl im sequentiellen als auch simultanen Modus beschrieben.^[239-241] Rulli *et al.* konnten erfolgreich die Eintopf-Synthese von 1,3-Diolen mit hohen Umsätzen sowie exzellenten Diastereo- und Enantioselektivitäten ($dr > 25:1$, bis zu 99% ee) unter Verknüpfung von Organo- und Biokatalyse im sequentiellen Modus etablieren (Schema 5.3).^[240] Im Jahr 2017 publizierten Rulli *et al.* zudem die Synthese von 1,3-Diolen durch simultane Organo- und Biokatalyse.^[241] Ein weiteres Beispiel stellt die von Simon *et al.* etablierte Kombination einer organokatalytischen Mannich-Reaktion und einer biokatalytischen Ketonreduktion in einer Eintopf-Synthese dar.^[242]



Schema 5.3. Eintopf-Synthese von 1,3-Diolen durch Verknüpfung von Organo- und Biokatalyse^[240]

Ein Beispiel der Verknüpfung von Organo- und Biokatalyse im simultanen Modus, bei der die enzymatische Umsetzung im ersten Schritt erfolgt, ist die Synthese von 3-substituierten 2,3-Dihydrobenzofuran-2,5-diolen von Suljić *et al.* Zunächst erfolgt die Laccase-katalysierte Oxidation von 1,4-Dihydrobenzol zum entsprechenden Chinon, welches in einer Michael-Reaktion mit einem Aldehyd das gewünschte Produkt mit hohen Ausbeuten von bis zu 97% und exzellenten Enantioselektivitäten bis zu 99% ee liefert (Schema 5.4).^[243]



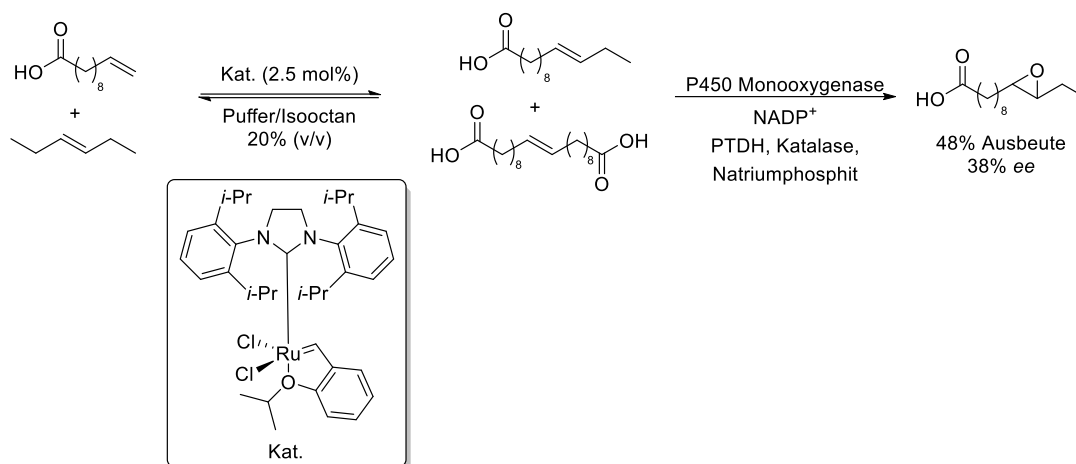
Schema 5.4. Simultane Eintopf-Synthese zur Synthese von 3-substituierten 2,3-Dihydrobenzofuran-2,5-diolen mit der biokatalytischen Transformation als ersten Schritt^[243]

5.1.2 Reaktionstechnische Strategien zur Vermeidung von Inkompatibilitäten von Katalysatoren oder Reagenzien

Eine Herausforderung bei der Etablierung von Eintopf-Synthesen zur Kombination von Chemo- und Biokatalyse stellt die Kompatibilität der einzelnen Reaktionssysteme dar.^[229] Inkompatibilitäten im Hinblick auf Cokatalysatoren wie stöchiometrische Mengen von Metallsalzen, hohe Substratbeladungen oder Unlöslichkeiten von Substraten können eine Deaktivierung einer der katalytischen Spezies verursachen und somit eine erfolgreiche Eintopf-Synthese erschweren. Um solche Inkompatibilitäten zu umgehen, wurden eine Vielzahl reaktionstechnischer Strategien entwickelt,^[229] die im Folgenden näher erläutert werden. Das größte Vorbild für die Entwicklung von Strategien zur Vermeidung von Inkompatibilitäten von Katalysatoren oder Reagenzien stellt die biologische Kompartimentierung als Konzept der Natur dar. Diese erlaubt lebenden Organismen die Metabolisierung, die Vermehrung, die Aufrechterhaltung der Zellstrukturen und die Kommunikation mit ihrer Umgebung in einem großen „Eintopf“-System.^[229] Anhand dieser Inspiration wurden eine Vielzahl von Strategien entwickelt um die bereits erwähnten Inkompatibilitäten zu umgehen. Beispiele hierfür sind die Verwendung biphasischer Systeme, supramolekularer Chemie, artifizierender Metalloenzyme, Immobilisierungen von Chemo- bzw. Biokatalysatoren oder die Möglichkeit zur räumlichen Trennung mittels Flowchemie.^[229]

Heidlindemann *et al.* konnten die bereits erwähnte Eintopf-Synthese von 1,3-Diolen unter Kombination von Organo- und Biokatalyse zudem räumlich kompartimentiert durchführen. Hierfür nutzten die Autoren Superabsorber zur Immobilisierung des Biokatalysators und des Cofaktors und führten den Prozess in einem Zwei-Phasen-System aus flüssiger organischer und fester wässriger Phase durch. Über die Immobilisierung des Organokatalysators gelang es den Autoren zudem die Synthese der 1,3-Diole im Flow durchzuführen.^[244]

Ein weiteres interessantes Beispiel für die Verwendung eines biphasischen Systems ist die von Denard *et al.* etablierte Kombination eines Grubbs-Hoveyda Metathese-Katalysators der zweiten Generation mit einer P450-BM3 Monooxygenase. Über diese chemoenzymatische Synthese konnten die Autoren eine Kreuzmetathese-Epoxidation ungesättigter Fettsäuren mit Ausbeuten von bis zu 48% realisieren (Schema 5.5). Da die enzymatische Reaktion irreversibel ist, verschiebt sich das Gleichgewicht der reversiblen Metathesereaktion auf die Produktseite und erhöht somit die Ausbeute gegenüber der hypothetischen Ausbeute der berechneten Einzelreaktionen.^[245]



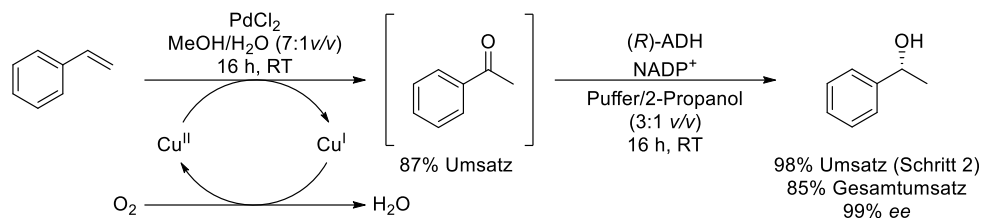
Schema 5.5. Zwei-Phasen-System zur Kombination einer Metathesereaktion mit einer enzymatischen Epoxidation^[245]

Eine Vielzahl von Strategien beschäftigt sich zudem mit der Immobilisierung von Katalysatoren auf Nanopartikeln, mesoporösem Silika, Polymerkugeln oder auch in tetraedrischen supramolekularen Clustern.^[246-249] Kürzlich entwickelte die Arbeitsgruppe um von Langermann die Kompartimentierung von Enzymen und Cofaktoren in UV-gehärteten Polyurethanen als Polymermatrix.^[250] Die Wissenschaftler entwickelten so eine Alternative zur Verwendung von Polydimethylsiloxan (PDMS) als Polymermatrix der Arbeitsgruppe um Ansorge-Schumacher.^[251]

Die Verwendung artifizieller Metalloenzyme stellt über die Einbindung eines Metallkatalysators in die Proteinstruktur eine weitere Möglichkeit dar den Katalysator vor den Umgebungsbedingungen zu schützen.^[229] Hier kommt insbesondere die Verwendung von Streptavidin als Proteingerüst zum Einsatz, an welches der Metallkatalysator über einen Biotinlinker gekoppelt wird. Dieses Konzept nutzte insbesondere die Arbeitsgruppe von Ward um eine Vielzahl an Tandemreaktionen mit verschiedenen Enzymen zu realisieren.^[252]

Außerdem konnte in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden, dass die räumliche Trennung von Reaktionen durch PDMS-Hülsen eine geeignete Strategie zur Durchführung von Eintopf-Reaktionen mit inkompatiblen Reaktionsschritten darstellt. Die Kompartimentierung mit den PDMS-Membranen wurde von der Arbeitsgruppe um Bowden zur Kombination chemokatalytischer und klassisch-chemischer Reaktionen, beispielsweise Wacker-Tsuji Oxidation mit Palladium-katalysierter Homokupplung, entwickelt.^[253-255] In der Arbeitsgruppe um Gröger konnte die Eignung der räumlichen Kompartimentierung anhand der PDMS-Hülsen für nicht kompatible chemo- und biokatalytische Reaktionen anhand der Kombination einer Wacker-Oxidation und einer biokatalytischen Ketonreduktion gezeigt werden.^[256] In dieser Arbeit führten Sato *et al.* zunächst die Wacker-Oxidation innerhalb der PDMS-Hülse durch, daraufhin wurde der biokatalytische Reaktionsansatz in das äußere Kompartiment gegeben um die Diffusion des Acetophenons

und die anschließende ADH-katalysierte Ketonreduktion zu ermöglichen. Die Autoren konnten so den gewünschten Alkohol mit einem hohen Gesamtumsatz von 85% und exzellenter Enantioselektivität (99% ee) isolieren. Insbesondere die sequentielle Durchführung war für den Erfolg dieser Eintopf-Synthese entscheidend (Schema 5.6).^[256]



Schema 5.6. Sequentielle Kombination von Wacker-Oxidation und biokatalytischer Keton-Reduktion unter Verwendung der Kompartimentierung mit PDMS-Hülsen^[256]

Die PDMS-Technologie zur räumlichen Trennung inkompatibler Reaktion wurde mittlerweile für die Kombination eine Reihe weiterer Metall-katalysierter Reaktionen (wie Suzuki-Reaktion und Wacker-Oxidation) und Biotransformationen (beispielsweise Halogenasen, Transaminasen und Amin-Dehydrogenasen) erfolgreich eingesetzt^[257–259] und stellt ein weiteres Konzept zur Vermeidung von Inkompatibilitäten von Katalysatoren oder Reagenzien dar.

5.2 Motivation und Zielsetzung

Im vorherigen Kapitel konnte die erste hoch enantioselektive Reduktion von 3-Thiazolidinen **4** erfolgreich etabliert werden (siehe Kapitel 4.3.5). Die 3-Thiazoline **3**, welche als Substrate für diese biokatalytische Reduktion dienen, können wiederum elegant über die Degussa-Variante der Asinger Reaktion als Multikomponentenreaktion aus einfachen und kostengünstigen Startmaterialien dargestellt werden (siehe Kapitel 4.1.2.2).^[173,175,176] Bisher erfolgte die enantioselektive Darstellung der 3-Thiazolidine **4** in einer Zweitopf- und Zwei-Schritte-Kaskade mit einer Aufarbeitung per Destillation oder Säulenchromatographie nach der Asinger-Synthese und einer weiteren Aufarbeitung nach dem biokatalytischen Schritt zur Isolation des 3-Thiazolidins **4** (Abbildung 5.1).^[218]

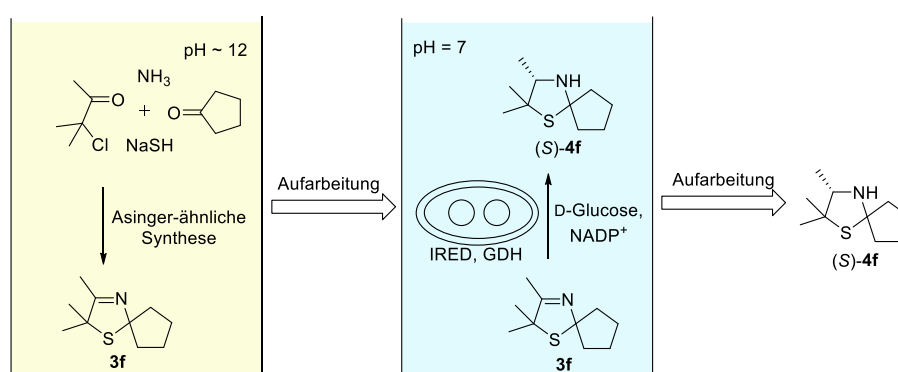
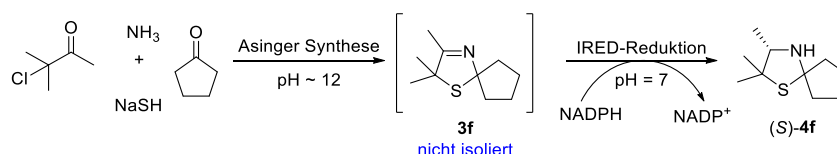


Abbildung 5.1. Im vorherigen Kapitel etablierte Darstellung der chiralen 3-Thiazolidine am Beispiel der Synthese von (S)-**4f**^[218]

Mit dem Ziel der Kombination von Heterozyklenchemie bzw. einer Multikomponentenreaktion und der biokatalytischen Iminreduktion sollte in diesem Kapitel eine Eintopf-Prozess zur Darstellung von chiralen 3-Thiazolidinen **4** ausgehend von einfachen und kostengünstigen Startmaterialien etabliert werden. Die Verknüpfung beider Reaktionen sollte beispielhaft an der Synthese des *spiro*-3-Thiazolidins **4f** erfolgen. Da die Variante der Asinger-Reaktion bei einem basischen pH-Wert von etwa 12 abläuft, wohingegen die biokatalytische Reduktion unter Verwendung der Iminreduktasen ein pH-Optimum von 7 hat, sind beide Reaktion bereits auf den ersten Blick nicht kompatibel miteinander (Schema 5.7).



Schema 5.7. Zielsetzung dieses Projektes: Enantioselektive Synthese von 3-Thiazolidinen im Eintopf-Prozess durch die Verknüpfung einer Variante der Asinger-Synthese und der IRED-katalysierten Reduktion

Daher wurden im Rahmen dieses Projektes zwei Konzepte entwickelt, um die Inkompatibilität der beiden Einzelreaktionen zu umgehen und erfolgreich die Eintopf-Synthese des 3-Thiazolidins **4f** ausgehend von Cyclopentanon, Ammoniak, Natriumhydrogensulfid und 3-Chlor-3-methyl-2-butanon zu etablieren. Im ersten entwickelten Konzept erfolgt eine Kompartimentierung der Reaktionsschritte, wohingegen im zweiten Konzept eine sequentielle Reaktionsführung verfolgt wird. Hierzu wurden für jedes Konzept zunächst die Einzelreaktionen, bestehend aus der Variante der Asinger-Synthese, der biokatalytischen Reduktion und der Diffusion durch die PDMS-Membran, im Falle der kompartimentierten Reaktion, im Detail untersucht. Daraufhin sollte eine kompartimentierte sowie eine sequentielle Eintopf-Synthese realisiert werden (Abbildung 5.2).

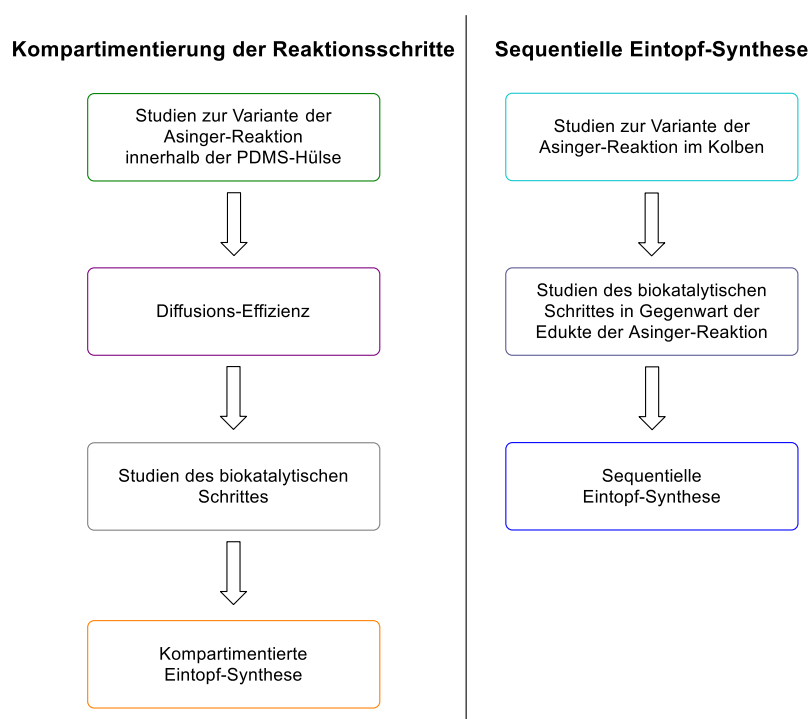


Abbildung 5.2. Übersicht des Projektes zur Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse in Eintopf-Synthesen

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse durch Kompartimentierung der Reaktionsschritte

5.3.1.1 Kompartimentierungsansatz

Aufgrund der unterschiedlichen pH-Optima der Variante der Asinger-Reaktion (pH 12) und der biokatalytischen Reduktion unter Einsatz von Iminreduktasen (pH 7) sind die Einzelreaktionen nicht kompatibel miteinander (Schema 5.7). Inspiriert durch die erfolgreiche Verwendung von PDMS-Hülsen zur Kombination von Chemo- und Biokatalyse mit inkompatiblen Einzelreaktionen^[256-259] wurde ein Kompartimentierungsansatz unter Verwendung von PDMS-Hülsen verfolgt. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass PDMS permeabel für hydrophobe Verbindungen und größtenteils impermeabel für wasserlösliche Komponenten ist.^[253-259] Daher wurde im Folgenden die Verwendung von PDMS-Hülsen zur Kompartimentierung der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion und der IRED-katalysierten Reduktion untersucht. Hierbei sollten der Biokatalysator sowie Natriumhydrogensulfid die Membran nicht passieren können, wohingegen das 3-Thiazolin **3f** die PDMS-Membran überwinden kann, nachdem es in der Asinger-Reaktion gebildet wurde und somit als Substrat der biokatalytischen Transformation dienen kann (Abbildung 5.3).

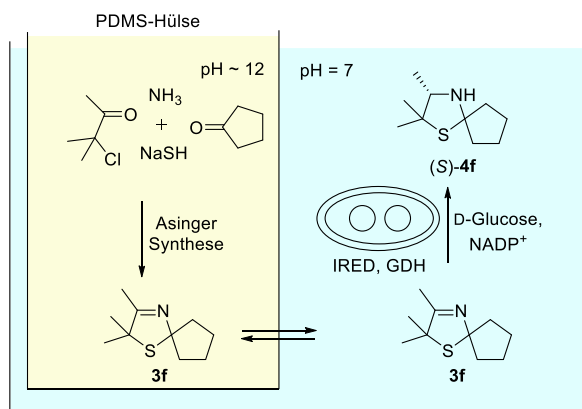


Abbildung 5.3. Konzept der Eintopf-Synthese des 3-Thiazolidins (S)-**4f** durch Kompartimentierung der Einzelreaktionen

5.3.1.2 Studien zur Degussa-Variante der Asinger-Reaktion innerhalb der PDMS-Hülse

Zur Etablierung der kompartimentierten Eintopf-Synthese des 3-Thiazolidins (*S*)-**4f** wurde im ersten Schritt die Asinger-Multikomponentenreaktion innerhalb der PDMS-Hülse untersucht. Als Benchmark dient hierbei das Ergebnis der Synthese von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**) im 200 mmol Maßstab im Kolben unter langsamen Zutropfen des α -chlorierten Ketons und Kühlung in Gegenwart von Dichlormethan (Kapitel 4.3.1.1). Hierbei konnte eine isolierte Ausbeute von 56% und somit auch mindestens ein Umsatz von 56% erreicht werden (Abbildung 5.4A, Benchmark). Wird die Synthese jedoch im kleineren Maßstab (4.5 mmol) in einem Glasgefäß bei Raumtemperatur ohne schrittweise Addition des α -chlorierten Ketons durchgeführt, um die nachfolgenden Experimente mit der PDMS-Hülse zu simulieren, bei dem eine Kühlung nicht möglich ist, fällt der Umsatz auf 41% ab (Abbildung 5.4A, Kontrolle). Aufgrund der Sensibilität der PDMS-Hülsen gegenüber Scherkräften, die mit höherer Rührgeschwindigkeit bei Verwendung eines Magnetrührkerns innerhalb der Hülse ansteigen, wurde die erste Multikomponentenreaktion innerhalb der PDMS-Hülse bei einer geringen Rührgeschwindigkeit unter Verwendung eines Magnetrührkerns durchgeführt. Hierbei konnte jedoch nur ein sehr geringer Umsatz von 3% nach einer Reaktionszeit von 18 h bei Raumtemperatur nachgewiesen werden (Abbildung 5.4A, Hülse (Magnetrührkern)). Dieser geringe Umsatz konnte auf die unzureichende Durchmischung des Zwei-Phasen-Systems der Reaktion zurückgeführt werden.

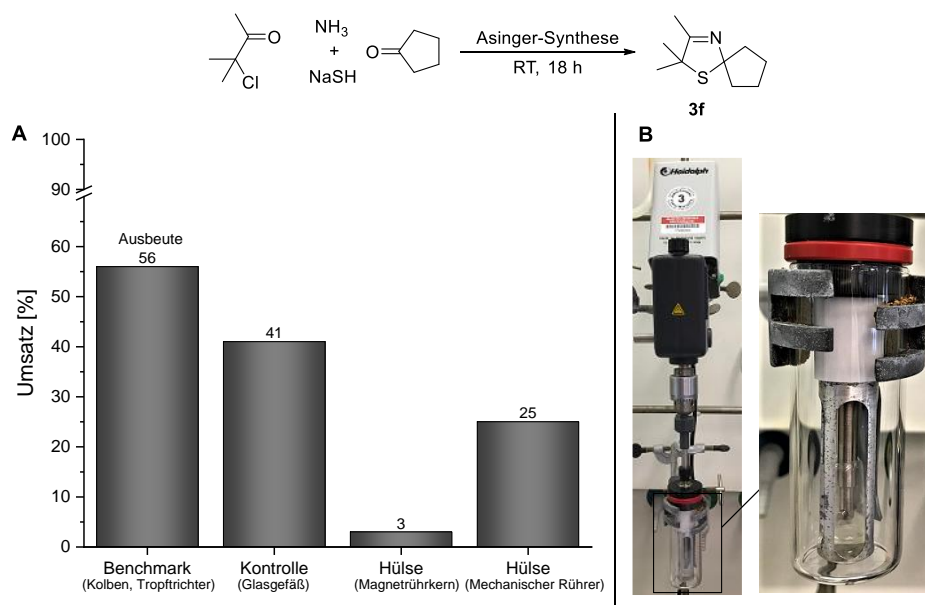


Abbildung 5.4. A Degussa-Variante der Asinger-Reaktion in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen
B Mechanischer Rührer zum Erreichen einer hohen Rührgeschwindigkeit in der PDMS-Hülse

Daraufhin wurde ein eigens dafür angefertigter mechanischer Rührer, der auf einem kerngezogenen Präzisions-Glasgerät (KPG) Rührer beruht (Abbildung 5.4B), verwendet. Dieser mechanische Rührer erlaubt hohe Rührgeschwindigkeiten bei gleichzeitig geringen Scherkräften. Der Umsatz der Multikomponentenreaktion innerhalb der PDMS-Hülse konnte unter Verwendung dieses mechanischen Rührers signifikant auf 25% erhöht werden (Abbildung 5.4A, Hülse (Mechanischer Rührer)), welches einen vielversprechenden Startpunkt für die Anwendung in der kompartimentierten Eintopf-Reaktion zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** unter Verwendung der PDMS-Hülsen darstellt.

5.3.1.3 Diffusions-Effizienz

Die Diffusion des 3-Thiazolins **3f** durch die PDMS-Membran stellt einen weiteren kritischen Punkt bei der Verwendung von PDMS-Hülsen dar, der vor der Durchführung des Eintopf-Prozesses untersucht wurde. Die Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels wirkt sich positiv auf die Diffusion des 3-Thiazolins **3f** aus, was mit den Ergebnissen von Uthoff *et al.* korreliert.^[257] Aus diesem Grund hat die Autorin wassermischbare Cosolventien, die von der Iminreduktase toleriert werden, zur Erhöhung der Diffusion des zyklischen Imins **3f** in Betracht gezogen. In Kapitel 3.3.4.3 konnte bereits gezeigt werden, das Methanol und Dimethylsulfoxid geeignete Cosolventien für die IRED-katalysierte Reduktion unter Verwendung eines *E. coli*-Ganzzell-Katalysators darstellen. Um eine möglichst hohe Diffusionsrate von **3a** zu erreichen, ist eine hohe Konzentration des Cosolvents im äußeren Kompartiment von Vorteil. Um die maximale Konzentration an Cosolvent zu evaluieren, die vom Ganzzell-Konstrukt zur Reduktion des 3-Thiazolins **3f** toleriert wird, wurden Biotransformationen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an Methanol bzw. DMSO bei 30 °C für 18 h durchgeführt (Abbildung 5.5). Hierfür wurde erneut das System verwendet, bei der die IRED08 und die GDH in einem Zwei-Plasmid-System in einer Zelle überexprimiert vorliegen (siehe Kapitel 4.3.5.4).^[218] In Gegenwart von 10% v/v Methanol konnte allerdings nur ein geringer Umsatz des 3-Thiazolins **3f** zum entsprechenden zyklischen Amin **4f** von 25% nachgewiesen werden. Methanol ist demnach als Cosolvent in hohen Konzentrationen nicht geeignet für den vorgesehenen Eintopf-Prozess. Ein guter Umsatz von 83% nach einer Reaktionszeit von 18 h konnte bei einer Cosolventkonzentration von 20% v/v DMSO nachgewiesen werden. Allerdings fällt der Umsatz bei einer weiteren Erhöhung der DMSO-Konzentration auf 30% v/v drastisch auf 3% ab (Abbildung 5.5). Als Kompromiss zwischen einer hohen Konzentration an Cosolvent und hohem Umsatz wurde daher eine Konzentration von 20% v/v DMSO für den Eintopf-Prozess ausgewählt.

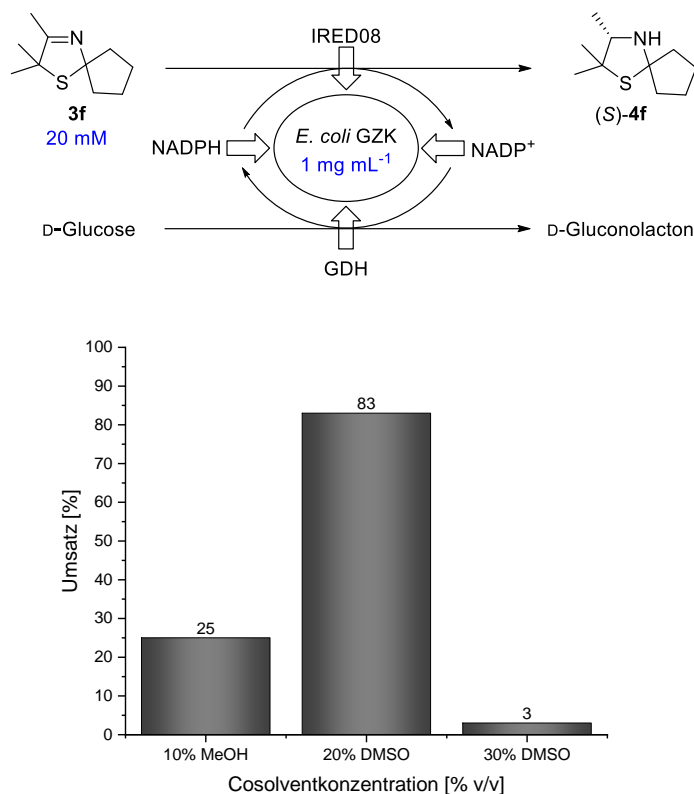


Abbildung 5.5. Biokatalytischen Reduktion des 3-Thiazolins **3f** unter Verwendung eines *E. coli*-Ganzzell-Katalysators in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen Methanol oder Dimethylsulfoxid

Im nächsten Schritt wurde mit der optimalen Cosolventkonzentration die Diffusion des 3-Thiazolins **3f** durch die PDMS-Membran untersucht. Bei Verwendung einer wässrigen Lösung mit 20% v/v DMSO konnte allerdings nur eine geringe Diffusion von 24% in das äußere Kompartiment nach 22 h nachgewiesen werden. Daraufhin wurde die Diffusion des zyklischen Imins **3f** mit purem DMSO untersucht und eine gute Diffusion von 60% nach einer Zeit von 6 h nachgewiesen. Aufgrund der Notwendigkeit zur Durchführung des Diffusionsschrittes mit reinem DMSO im äußeren Kompartiment muss die kompartimentierte Eintopf-Reaktion zudem im sequentiellen Modus durchgeführt werden.

Im Rahmen der Experimente zur Untersuchung der Membrangängigkeit des 3-Thiazolins **3f**, konnte auch eine Diffusion von Cyclopentanon und 3-Chlor-3-methyl-2-butanon, die als Substrate im ersten Schritt der Kaskade dienen (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4), nachgewiesen werden. Einerseits erfordert dies ebenfalls die Durchführung der Eintopf-Synthese zur Darstellung des 3-Thiazolidins **4f** im sequentiellen Modus, andererseits sollte bereits im Voraus der Einfluss der Edukte des ersten Reaktionsschrittes auf die biokatalytische Reduktion untersucht werden.

5.3.1.4 Studien zur biokatalytischen Reduktion

Um den Einfluss der Reaktanden der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion auf die biokatalytische IRED-Reduktion zu untersuchen, wurden Biotransformationen des 3-Thiazolins **3f** in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen (5 bzw. 20 mM) von Cyclopentanon oder 3-Chlor-3-methyl-2-butanon unter Verwendung des Ganzzell-Katalysators mit 20% v/v DMSO bei 30 °C für 18 h durchgeführt (Abbildung 5.6). Die Biotransformationen verliefen auch in Gegenwart von 5 bzw. 20 mM Cyclopentanon bzw. 3-Chlor-3-methyl-2-butanon reibungslos mit einem Umsatz von 70% in Gegenwart von 20 mM Cyclopentanon. In Anwesenheit von 20 mM des α -chlorierten Ketons als Additiv wurde ebenfalls ein guter Umsatz von 60% bestimmt. Im Vergleich zur biokatalytischen Reduktion ohne Additive, für die ein Umsatz von 83% bestimmt wurde (Abbildung 5.6), konnte in beiden Fällen ein leichter Abfall im Umsatz nachgewiesen werden. Über eine Verlängerung der Reaktionszeit oder eine Erhöhung der Biokatalysatorbeladung könnte diesem Abfall im Umsatz in dem Eintopf-Prozess entgegengewirkt werden.

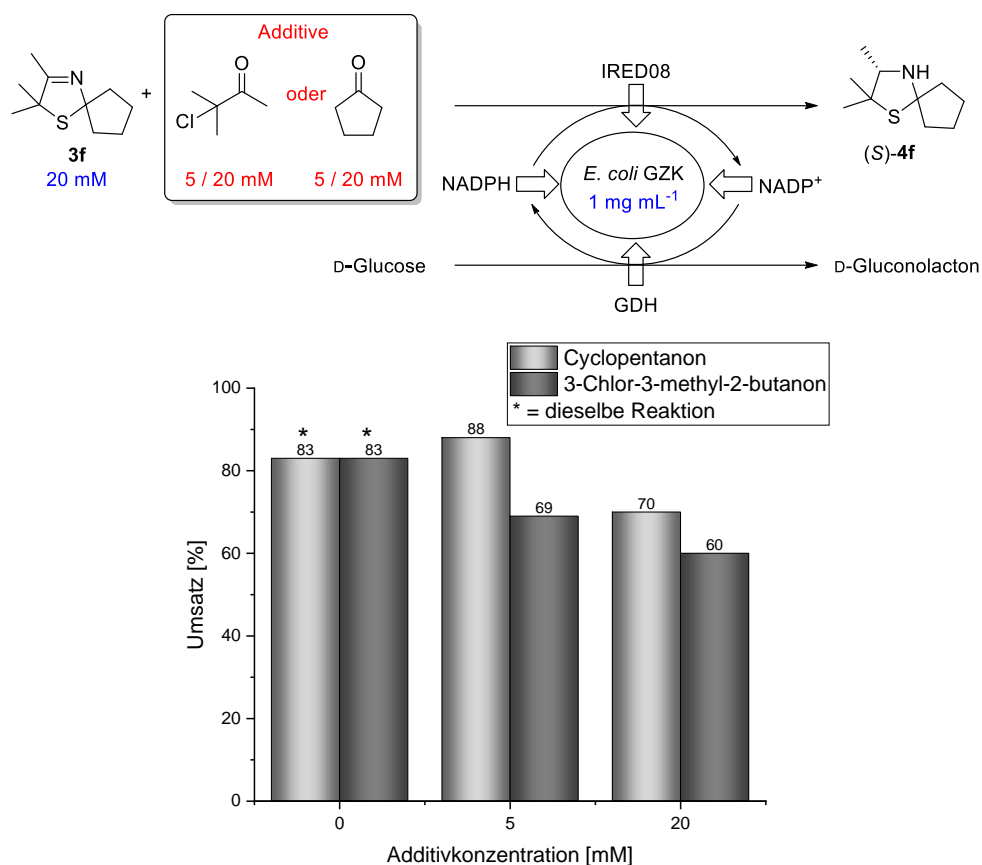


Abbildung 5.6. Biotransformationen des 3-Thiazolins **3f** in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Cyclopentanon bzw. 3-Chlor-3-methyl-2-butanon

5.3.1.5 Kompartimentierte Eintopf-Synthese

Mit den optimierten Einzelreaktionen zur Eintopf-Synthese von (*S*)-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan ((*S*)-**4f**) wurde im nächsten Schritt der anvisierte Prozess durchgeführt (Abbildung 5.7). Aufgrund der Notwendigkeit der Verwendung von reinem DMSO im Diffusionsschritt sowie der Membrangängigkeit von Cyclopentanon und des α -chlorierten Ketons als Edukte der Asinger-Reaktion wurde die Kaskadenreaktion sequentiell durchgeführt. Zunächst erfolgte die Variante der Asinger-Reaktion innerhalb der PDMS-Hülse für 18 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das äußere Kompartiment mit DMSO aufgefüllt, um die Diffusion des 3-Thiazolins **3f** in das zweite Reaktionsmedium zu ermöglichen. Nach 6 h wurden Puffer, D-Glucose, NADP⁺ und der lyophilisierte Ganzzell-Katalysator in das äußere Medium gegeben, sodass die DMSO Konzentration auf 20% v/v reduziert wurde. Die Biotransformation wurde daraufhin für 24 h bei 30 °C durchgeführt. Das gewünschte 3-Thiazolidin (*S*)-**4f** wurde mit einem Gesamtumsatz von 13% und einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von 99% ee zugunsten des (*S*)-Enantiomers gebildet und wurde mit einer Ausbeute von 12% und einer Reinheit von 97% (bestimmt durch ¹H-NMR-Spektroskopie) isoliert (Abbildung 5.7).

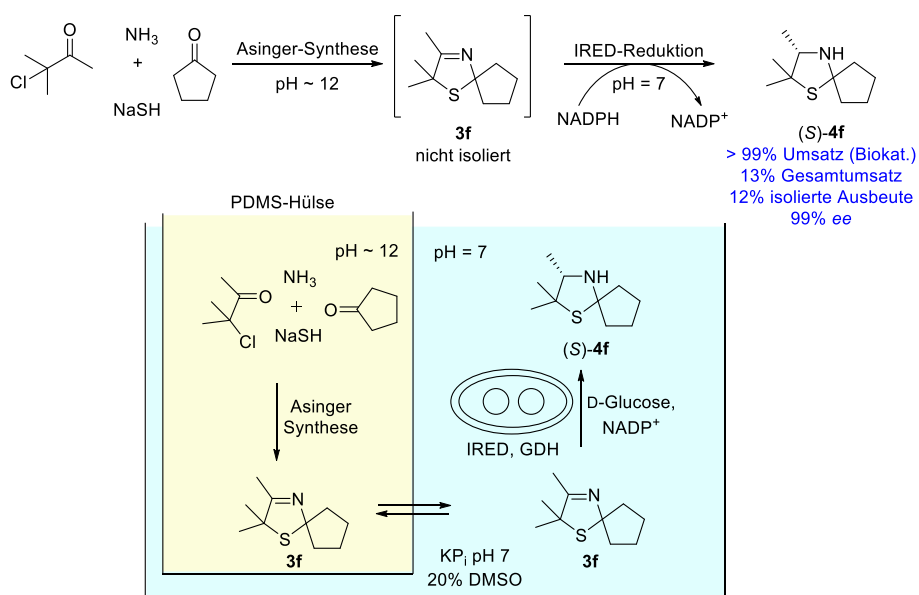


Abbildung 5.7. Eintopf-Prozess zur Synthese von (*S*)-**4f** unter Kompartimentierung der Einzelreaktionen mit PDMS-Hülsen

Obwohl der Gesamtumsatz mit 13% relativ gering ist, korreliert dieser sehr gut mit dem erwarteten Gesamtumsatz, der aus den Umsätzen der einzelnen Reaktionen berechnet werden kann. Nach Extraktion des äußeren Kompartiments des Eintopf-Prozesses konnte ein vollständiger Umsatz der biokatalytischen Reduktion nachgewiesen werden. Dementsprechend stellt die Biotransformation in dieser Kaskade keinen limitierenden Schritt dar, welches erneut den Wert der etablierten biokatalytischen Reduktionstechnologie unterstreicht. Der erwartete Umsatz aus den ersten beiden

Reaktionsschritten unter Berücksichtigung eines Umsatzes von 25% in der Asinger-Reaktion und einer Diffusion des 3-Thiazolins von 60% in das äußere Reaktionsmedium beträgt 15% und weicht somit nur um 2% vom beobachteten Gesamtumsatz ab. Neben der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion stellt die Diffusion des 3-Thiazolins **3f** durch die PDMS-Membran eine weitere starke Limitierung in diesem Prozess dar. Durch eine sequentielle Reaktionsführung, die ebenfalls untersucht wurde, könnte dieser limitierende Schritt vermieden werden. Diese Eintopf-Synthese stellt nach bestem Wissen der Autorin den ersten *Proof of Concept* der Kombination einer Heterozyklenbildung über eine klassisch-chemische Multikomponentenreaktion unter stark basischen Bedingungen mit einer biokatalytischen Transformation dar. Die Kaskade ermöglicht außerdem die Darstellung eines enantiomerenreinen *spiro*-zyklischen Amins ausgehend von *low cost* Edukten in einer Eintopf-Synthese.

Die Ergebnisse dieses Teilkapitels zur Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse zur Darstellung des 3-Thiazolidins (*S*)-**4f** in einem Eintopf-Prozess unter Kompartimentierung mit PDMS-Hülsen wurden als Artikel im Journal *Bioengineering* veröffentlicht: N. Zumbrägel, H. Gröger, *Bioengineering* **2018**, 5, 60 (DOI: 10.3390/bioengineering5030060).^[260]

5.3.2 Sequentielle Eintopf-Synthese zur Darstellung des 3-Thiazolidins **4f**

5.3.2.1 Sequentieller Reaktionsansatz

Nach der Etablierung des ersten Eintopf-Prozesses zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** durch Kompartimentierung der Einzelreaktionen im sequentiellen Modus wurde ein optimierter Eintopf-Prozess unter Verwendung eines weiteren Reaktionskonzepts realisiert. Die Limitierungen des ersten Konzepts bestanden im geringen Umsatz der Variante der Asinger-Reaktion innerhalb der PDMS-Hülse und der unvollständigen Diffusion des 3-Thiazolins **3f**. Darüber hinaus war die Etablierung eines leicht zu handhabenden Prozesses, der ebenfalls im großen Maßstab anwendbar und durchführbar ist, von großem Interesse. Mit diesem Ziel wurde ein sequentieller Eintopf-Prozess ohne räumliche Trennung der Einzelreaktion in Betracht gezogen. Ebenfalls beispielhaft an der Synthese von (*S*)-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan ((*S*)-**4f**), sollte hierbei zunächst die Synthese des 3-Thiazolins **3f** über die Multikomponentenreaktion erfolgen. Nach Anpassung des pH-Wertes sollte daraufhin die Biotransformation durchgeführt werden (Abbildung 5.8). Zur Etablierung des sequentiellen Eintopf-Prozesses wurden im ersten Schritt ebenfalls die einzelnen Reaktionsschritte unabhängig vom pH-Wert im Detail untersucht.

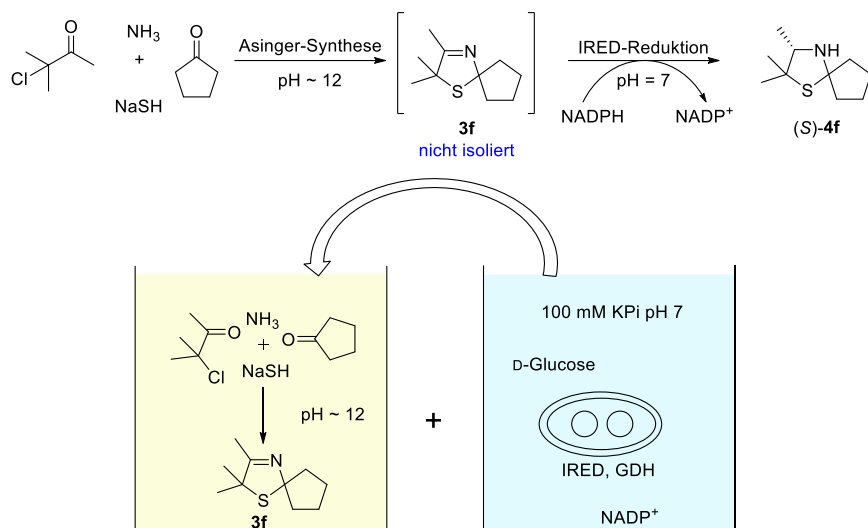
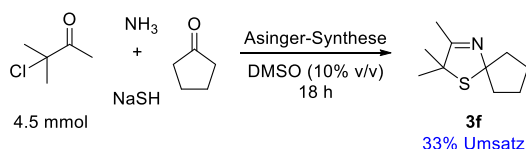


Abbildung 5.8. Konzept der sequentiellen Eintopf-Synthese zur Darstellung von (S)-4f

5.3.2.2 Studien zur Degussa-Variante der Asinger-Reaktion im Kolben

Die Variante der Asinger-Reaktion wurde in der Regel unter Verdünnung in Dichlormethan durchgeführt.^[179] Da Dichlormethan nicht kompatibel mit Biokatalysatoren ist, wurde die Multikomponentenreaktion als Teil der bereits etablierten Eintopf-Synthese in Abwesenheit von Dichlormethan durchgeführt. Ein weiterer Punkt, der in diesem Reaktionsschritt zu berücksichtigen war, ist das Zwei-Phasen-System aus wässriger und organischer Phase. Die Durchmischung der Phasen hatte einen bedeutenden Einfluss auf den Reaktionsverlauf und damit den Umsatz der Reaktion, insbesondere in kleinen Maßstäben. Bereits im Rahmen der Etablierung des ersten Eintopf-Prozesses konnte gezeigt werden, dass DMSO auch in verhältnismäßig hohen Konzentrationen ein geeignetes Cosolvent für die biokatalytische Umsetzung ist (Kapitel 5.3.1.3).^[260] Daher wurde die Degussa-Variante der Asinger Reaktion für die Etablierung des sequentiellen Prozesses im 4.5 mmol Maßstab in einem Kolben unter schrittweise Zugabe des α -chlorierten Ketons bei einer Temperatur zwischen 0-10 °C im Kolben durchgeführt. Zudem wurde 3-Chlor-3-methyl-2-butanon vor der Zugabe mit DMSO verdünnt, um eine finale Gesamtkonzentration von 10% v/v DMSO im Reaktionsansatz zu erhalten (Schema 5.8).



Schema 5.8. Variante der Asinger-Reaktion im 4.5 mmol Maßstab

Allerdings konnte auch unter diesen Bedingungen nur ein moderater Umsatz von 33% zum gewünschten 3-Thiazolin **3f** nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Umsatz der Multikomponentenreaktion innerhalb der PDMS-Hülse, welche 25% betrug (siehe

Kapitel 5.3.1.2),^[260] wurde somit eine Verbesserung in diesem Reaktionsschritt erreicht. Da die Edukte der Multikomponentenreaktion zudem kostengünstig und kommerziell erhältlich sind, ist ein moderater Umsatz am ehesten in diesem Schritt des Prozesses akzeptabel.

5.3.2.3 Studien zur biokatalytischen IRED-Reduktion in Gegenwart der Edukte der Asinger-Synthese

Zur Durchführung des Eintopf-Prozesses im sequentiellen Modus wurde im nächsten Schritt die Kompatibilität der biokatalytischen IRED-Reduktion des zyklischen Imins **3f** mit den Edukten der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion bei einer Cosolventkonzentration von 10% v/v DMSO untersucht. Hierzu wurden Biotransformationen bei einer Konzentration des zyklischen Imins **3f** von 20 mM in Gegenwart derselben Konzentrationen von Cyclopentanon, 3-Chlor-3-methyl-2-butanon bzw. Natriumhydrogensulfid-Monohydrat für 18 h bei 30 °C durchgeführt (Abbildung 5.9). Es wurde wiederum der Ganzzell-Katalysator verwendet, bei der die IRED08 und die GDH in einem Zwei-Plasmid-System in einer Zelle überexprimiert vorliegen (siehe Kapitel 4.3.5.4).^[218]

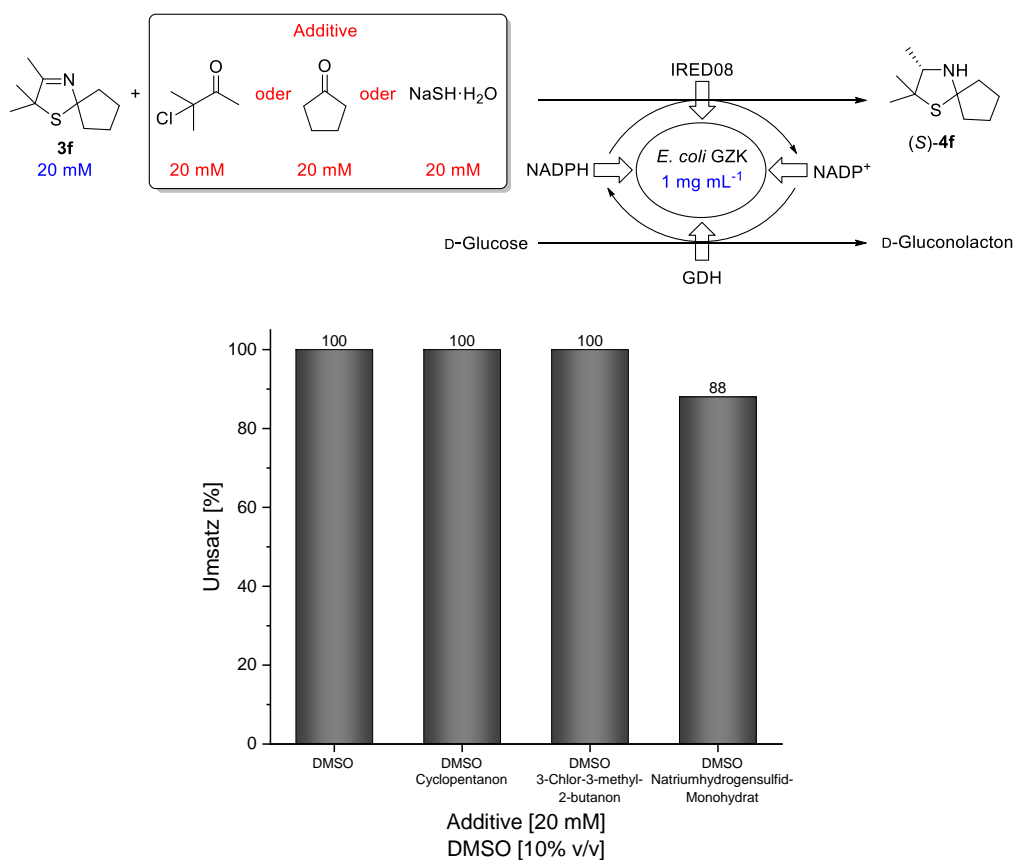


Abbildung 5.9. Biotransformationen des 3-Thiazolins **3f** in Gegenwart von 20 mM Cyclopentanon, 3-Chlor-3-methyl-2-butanon oder Natriumhydrogensulfid-Monohydrat

Die IRED-katalysierte Reduktion in Gegenwart von Cyclopentanon und des α -chlorierten Ketons verläuft analog zur Kontrollreaktion ohne die Edukte der Multikomponentenreaktion mit jeweils quantitativem Umsatz (Abbildung 5.9). Die Umsätze im biokatalytischen Schritt unter Verwendung von 10% v/v DMSO konnten somit im Vergleich zur Verwendung von 20% v/v DMSO bei der kompartimentierten Eintopf-Synthese verbessert werden (siehe Kapitel 5.3.1.4).^[260] Außerdem wurde auch in Gegenwart von 20 mM Natriumhydrogensulfid-Monohydrat ein hoher Umsatz von 88% zugunsten des zyklischen Amins (S)-**4f** beobachtet (Abbildung 5.9). Dieser geringe Abfall im Umsatz im Vergleich zum quantitativen Umsatz der Kontrolle (Abbildung 5.9, linke Säule) könnte in der sequentiellen Kaskadenreaktion beispielsweise durch eine verlängerte Reaktionszeit ausgeglichen werden.

5.3.2.4 Sequentielle Eintopf-Synthese

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse zur biokatalytischen Reduktion des 3-Thiazolins **3f** in Gegenwart der Edukte der Multikomponentenreaktion wurde daraufhin der sequentielle Eintopf-Prozess zur Darstellung von **4f** im 4.5 mmol Maßstab durchgeführt (Abbildung 5.10). Im ersten Schritt erfolgte die Variante der Asinger-Reaktion, wobei die schrittweise Addition von 3-Chlor-3-methyl-2-butanon unter Konstanthaltung der Reaktionstemperatur zwischen 0-10 °C und Verdünnung mit DMSO zum Erreichen einer finalen Cosolventkonzentration von 10% v/v DMSO durchgeführt wurde. Nach Zugabe des α -chlorierten Ketons wurde die Reaktionslösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und daraufhin wurden Puffer, D-Glucose, NADP⁺, *E. coli*-Ganzzell-Katalysator und DMSO (um eine Gesamtkonzentration von 10% v/v DMSO zu erhalten) zugegeben und die Mischung für 24 h bei 30 °C gerührt. Die maximale Konzentration des 3-Thiazolins **3f** im biokatalytischen Schritt betrug damit 90 mM bei einem Volumen von 50 mL (Abbildung 5.10). Die Kaskadenreaktion verlief mit einem Gesamtumsatz von 26% zugunsten des zyklischen Amins **4f** und exzellenter Enantioselektivität von 99% ee zugunsten des (S)-Enantiomers. Nach Aufarbeitung konnte das Produkt (S)-**4f** zudem mit einer Ausbeute von 26% und einer Reinheit von 97% (bestimmt durch ¹H-NMR-Spektroskopie) isoliert werden (Abbildung 5.10). Per GC-Analyse der organischen Phase nach der Extraktion des Reaktionsgemisches mit Dichlormethan konnte zudem ein quantitativer Umsatz des 3-Thiazolins **3f** zum zyklischen Amin (S)-**4f** nachgewiesen werden, was erneut den Wert der von der Autorin etablierten biokatalytischen Technologie unterstreicht.

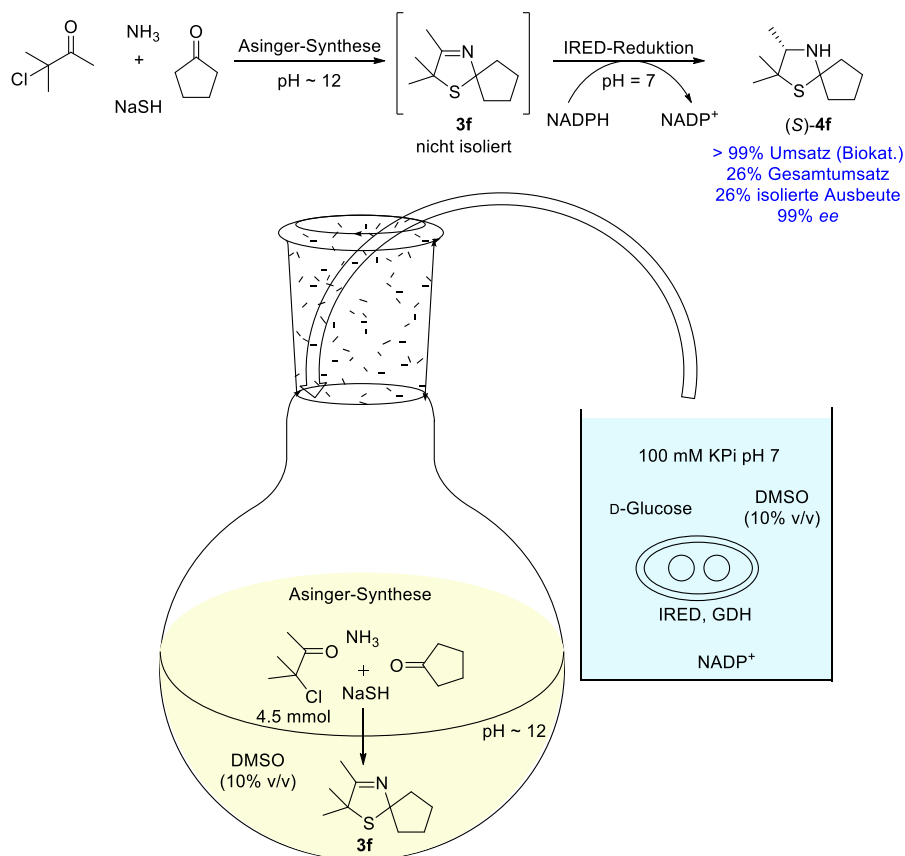


Abbildung 5.10. Sequentielle Eintopf-Synthese zur Darstellung von (S)-**4f**

In diesem Eintopf-Prozess stellt somit die Degussa-Variante der Asinger-Synthese den einzigen limitierenden Schritt dar. Da in diesem Schritt einfache, kostengünstige und kommerziell verfügbare Edukte verwendet wurden, ist im Rahmen der Kaskade am ehesten in diesem Schritt ein moderater Umsatz akzeptabel. Der erwartete Gesamtumsatz dieses Prozesses, der aus den Umsätzen der einzelnen Reaktion kalkuliert werden kann, wird nur durch den Umsatz von 33% der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion (siehe Kapitel 5.3.2.2) limitiert, sodass der berechnete Gesamtumsatz ebenfalls 33% beträgt. Entsprechend korreliert der beobachtete Gesamtumsatz von 26% sehr gut mit dem erwarteten Umsatz. Der Prozess stellt somit einen *Proof of Concept* einer sequentiellen Eintopf-Synthese zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** ohne Notwendigkeit zur Kompartimentierung der Einzelreaktionen dar. Außerdem konnte im zweiten Prozess der Gesamtumsatz von 13% der kompartimentierten Eintopf-Synthese, bei dem mit der Variante der Asinger-Reaktion und der Diffusion zwei limitierende Schritte vorlagen,^[260] auf 26% erhöht werden und somit der Gesamtumsatz verdoppelt werden. Die Darstellung des 3-Thiazolidins (S)-**4f** in einer Eintopf-Synthese konnte also über die sequentielle Durchführung des Prozesses optimiert werden.

Die Ergebnisse zur Eintopf-Synthese von 3-Thiazolidinen **4** über die sequentielle Durchführung einer Variante der Asinger-Reaktion und einer biokatalytischen IRED-Reduktion stellt nach bestem Wissen der Autorin die erste Eintopf-Synthese zur

Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** ohne Kompartimentierung der Einzelreaktion dar und wurde als Manuskript im *Journal of Biotechnology* zur Veröffentlichung eingereicht: N. Zumbrägel, H. Gröger, *J. Biotechnol.* zur Veröffentlichung eingereicht.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieses Teilprojektes zur Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse in Eintopf-Synthesen konnten zwei Kaskaden zur Darstellung von 3-Thiazolidinen **4** am Beispiel der Synthese von (*S*)-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan ((*S*)-**4f**) erfolgreich realisiert werden. Beide Prozesse stellen zum jetzigen Zeitpunkt jeweils einen *Proof of Concept* dar und bedürfen weiterer Optimierung zur Etablierung eines robusten Prozesses, der industriell interessant ist. Für ein *Upscaling* ist insbesondere die sequentielle Prozessführung ohne Kompartimentierung von Interesse. Eine große Limitierung der Anwendbarkeit des Prozesses ist bisher der geringe Umsatz der Asinger-Reaktion. Der Umsatz der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion ist stark von dem Reaktionsmaßstab und von den Substituenten der α -chlorierten Verbindung sowie der Oxokomponente abhängig, sodass die gewählte Verbindung kein optimales Beispiel ist. Insbesondere mit α -chlorierten Aldehyden sind höhere Umsätze leicht realisierbar, welche allerdings zu nicht chiralen Produkten geführt hätte. Um die Robustheit der biokatalytischen Technologie aufzuzeigen, welche die erste hoch enantioselektive Reduktion der 3-Thiazoline **3** ermöglicht, bevorzugte die Autorin den Prozess anhand der Synthese eines chiralen 3-Thiazolidins **4** zu realisieren.

6. BIODIVERSITÄTSGESTÜTZTE REDUKTION VON IMINEN MIT ZUSÄTZLICHEN STICKSTOFFATOMEN

6.1 Stand der Wissenschaft

6.1.1 Bedeutung des Hydrazin-Strukturmotivs

Hydrazine und Hydrazin-Derivate wie Pyrazolidine sind bedeutende Struktur motive, die aufgrund einer Vielzahl von Anwendungen in der medizinischen Chemie von herausragender Bedeutung sind. Einige ausgewählte Beispiele hierfür sind in Abbildung 6.1 dargestellt.^[261] Das Pyrazolidinon LY288513 ist zum Beispiel ein präklinischer Kandidat zur Inhibition des Cholecystokinin (CCK) Rezeptors,^[262,263] der unter anderem Auswirkungen auf das Schmerzempfinden, das Sättigungsgefühl und das Angstgefühl hat.^[264] Pyrazolidin-Aminosäurederivate zeigen zudem einen inhibitorischen Effekt auf die Dipeptylpeptidase IV^[265,266] und haben somit potentielle Anwendung in der Behandlung des Typ 2 Diabetes mellitus.^[267] Außerdem eignen Pyrazolidine sich als Antiepileptika^[268] oder als antibiotische bzw. antimykotische Agenzien.^[269] Die Manzacidine A, B und C sind natürlich vorkommende Alkaloide, die 1991 erstmals isoliert wurden^[270] und pharmazeutische Aktivitäten aufweisen^[271]. Die chemische Synthese von Manzacidin C, die von Tran *et al.* etabliert wurde, verläuft über das in Abbildung 6.1 dargestellte Pyrazolidin.^[272] Azaprolin-Analoga, die einen Pyrazolidinrest enthalten, zeigen eine höhere Resistenz gegenüber proteolytischer Spaltung und finden daher Anwendung als Enzyminhibitoren bzw. Rezeptorantagonisten.^[273–276]

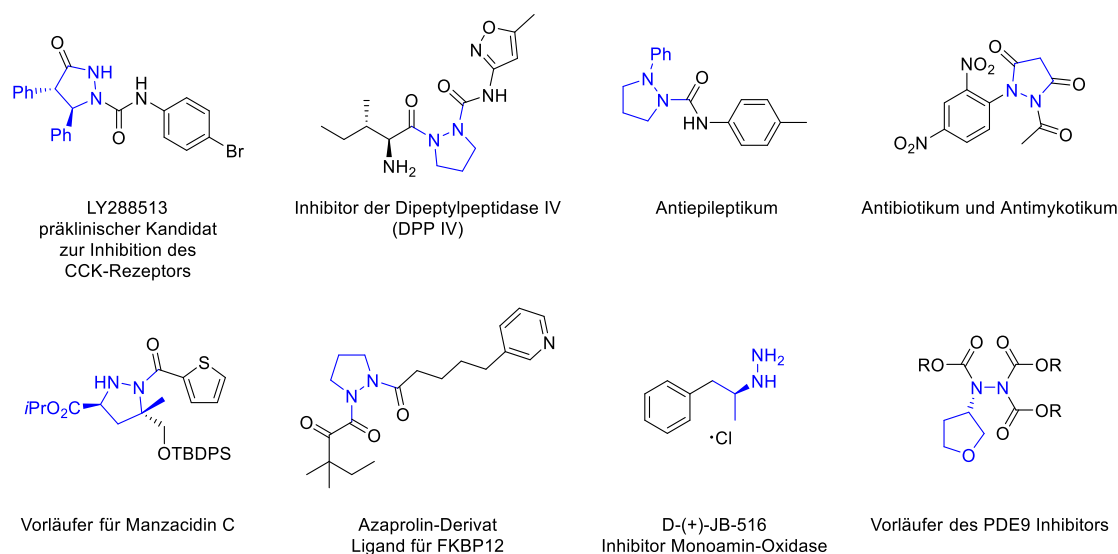
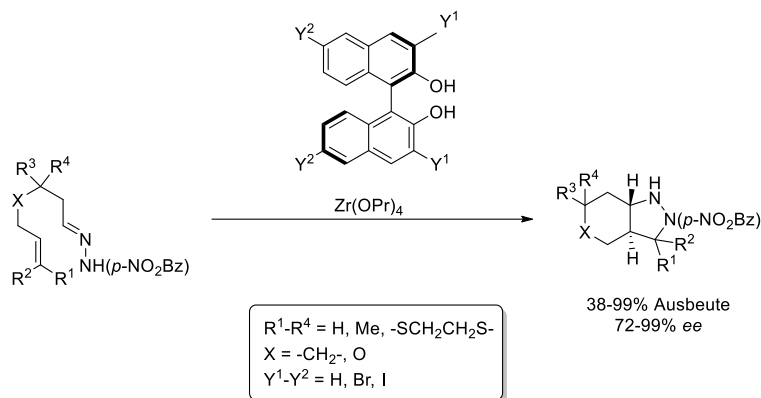


Abbildung 6.1. Ausgewählte Amine mit pharmazeutischer Aktivität, die ein Hydrazin als Strukturmotiv enthalten^[261,277,278]

Hydrazine als azyklische Analoga der Pyrazolidine stellen ebenfalls bedeutende Struktur motive dar. D-(+)-JB-516 eignet sich beispielsweise als Inhibitor der Monoaminoxidase im Mäusegehirn^[278] und ein weiteres azyklisches Hydrazin stellt einen Vorläufer eines PDE9 Inhibitors dar (Abbildung 6.1).^[277] Aufgrund der herausragenden Bedeutung des Hydrazin-Struktur motifs stellt die Synthese von Pyrazolidinen bzw. Hydrazinen ein aktuelles Forschungsgebiet dar.

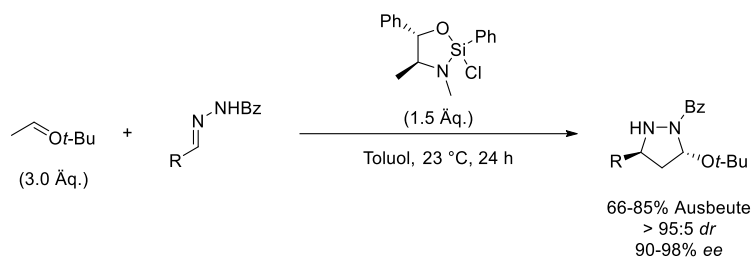
6.1.2 Chemische Methoden zur Darstellung von Pyrazolidinen

Klassische Methoden zur Darstellung von Pyrazolidinen umfassen insbesondere eine Vielzahl von Cycloadditionsreaktionen.^[261] Die Synthese dieser Verbindungen durch [3+2]-Cyloadditionsreaktionen mit Hydrazonen und Olefinen wurde vor allem unter stark sauren^[279–283] oder thermischen^[284–289] Reaktionsbedingungen beschrieben. Kobayashi *et al.* berichteten 2002 die erste intramolekulare, enantioselektive [3+2]-Cyloadditionsreaktion. Unter Verwendung eines Zirkonium/BINOL-Komplexes gelang es den Autoren eine Vielzahl von Pyrazolidinen mit *trans*-Selektivität und in einigen Fällen hoher Enantioselektivität darzustellen (Schema 6.1).^[290]



Schema 6.1. Intramolekulare, enantioselektive [3+2]-Cyloadditionsreaktion zur Darstellung von Pyrazolidinadukten^[290]

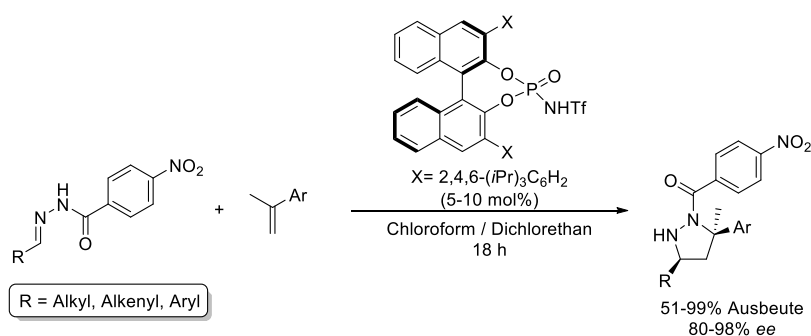
Shirakawa *et al.* entwickelten eine hoch enantioselektive [3+2]-Cyloadditionsreaktion unter Einsatz einer chiralen Silicium-basierten Lewis-Säure, die in großen Ansätzen aus dem (*S,S*) bzw. (*R,R*) Pseudoephedrin und Phenyltrichlorsilan dargestellt werden kann. Mit dieser Methode wurden eine Vielzahl aliphatischer, aromatischer und heteroaromatischer Benzoylhydrazone mit *tert*-Butylvinylethern zur Darstellung von Pyrazolidinen in guten Ausbeuten und exzellenten Diastereo- bzw. Enantioselektivitäten verwendet (Schema 6.2).^[291]



Schema 6.2. Synthese von Pyrazolidinen unter Einsatz einer Silizium-basierten Lewis-Säure in einer [3+2]-Cycloadditionsreaktion^[291]

Außerdem konnten Shirakawa *et al.* Pyrazolidine mit drei Stereozentren über die Verwendung von β -substituierten Enolethern darstellen.^[291]

Organokatalytisch können Pyrazolidine zudem unter Einsatz von Brønsted-Säuren dargestellt werden.^[292] 2012 entwickelte die Arbeitsgruppe um Rueping eine asymmetrische Brønsted-Säure-katalysierte [3+2]-Cycloaddition von *N*-Acylhydrazonen und Alkenen zur Darstellung von Pyrazolidinen. Als Katalysator verwendeten die Autoren BINOL-basierte *N*-Triflylphosphoramidate, da diese eine erhöhte Azidität als die entsprechenden Phosphorsäuren aufweisen. Mit dieser Methode gelang es der Arbeitsgruppe Alkyl-, Aryl- und Alkenyl-substituierte Hydrazone mit einer Vielzahl von Alkenen, die von Alkyl-, Aryl- und Heteroaryl-substituierten Styrolen abgeleitet sind, in moderaten bis hohen Ausbeuten sowie guter Diastereo- und Enantioselektivität umzusetzen (Schema 6.3).^[293]

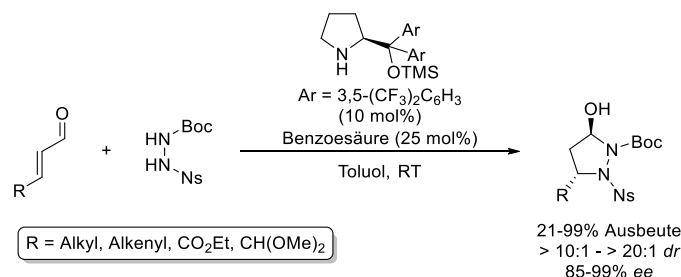


Schema 6.3. Asymmetrische Brønsted-Säure-katalysierte [3+2]-Cycloaddition zur Darstellung von Pyrazolidinen^[293]

Eine weitere bedeutende Methode zur Darstellung einer Vielzahl komplexer, fünfgliedriger Heterozyklen ist die 1,3-dipolare Cycloaddition.^[294,295] Mit Azomethin-Iminen können durch 1,3-dipolare Cycloadditionen hochfunktionalisierte Heterozyklen erhalten werden, welche Pyrazolidine enthalten und von der Arbeitsgruppe um Oppolzer in den 70er-Jahren erstmals beschrieben wurden.^[296,297] Da diese Methode zur Bildung von Pyrazolidonen führt,^[298-300] wird diese hier nicht weiter ausgeführt.

Darüber hinaus eignen sich Tandemreaktionen zur Synthese von Pyrazolidinen. Beispielsweise entwickelte die Arbeitsgruppe um Vicario eine Reaktionssequenz aus einer *aza*-Michael/Hemiaminal-Bildung, um ausgehend von *N,N*-disubstituierten Hydrazinen und

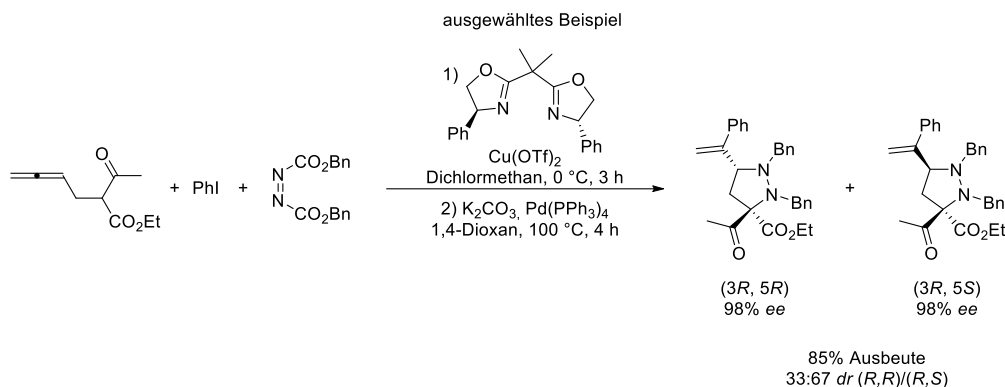
α,β -ungesättigten Aldehyden Pyrazolidin-3-ole darzustellen. Für eine erfolgreiche Umsetzung werden hierbei elektronenziehende Substituenten am Hydrazin benötigt, wohingegen eine Vielzahl von substituierten Aldehyden eingesetzt werden kann (Schema 6.4).^[301]



Schema 6.4. Darstellung von Pyrazolidon-3-olen in einer Tandemreaktion^[301]

Den Arbeitsgruppen um Wang und Córdoba gelang es diese Methode auch auf Aryl-substituierte α,β -ungesättigte Aldehyde zu übertragen.^[302,303]

Als weiteres Beispiel zur Darstellung von Pyrazolidinen ist die Kupfer- und Palladium-katalysierte asymmetrische Drei-Komponenten-Reaktion, die von Ma *et al.* entwickelt wurde, zu nennen. In diesem Eintopf-Prozess findet eine Aminierung des 2-(2',3'-Dienyl)- β -ketoesters mit Azodicarbonyldiethylester statt, die mit hohen Ausbeuten, allerdings mit eingeschränkter Diastereoselektivität verläuft (Schema 6.5).^[304]

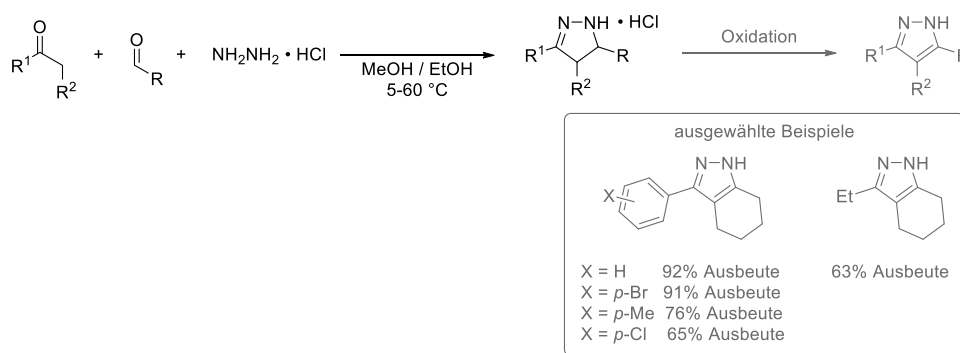


Schema 6.5. Kupfer- und Palladium-katalysierte asymmetrische Drei-Komponenten-Reaktion zur Darstellung von Pyrazolidinen^[304]

In weiterführenden Arbeiten gelang es der Arbeitsgruppe um Ma die Diastereoselektivität der Reaktion über eine zweifache asymmetrische Induktionsmethode^[305] zu verbessern.^[306] Allerdings stellte sich heraus, dass die Enantiomerenreinheit des Produktes von der chiralen Information des eingesetzten Eduktes abhängig war. Aufgrund dessen entwickelte die Arbeitsgruppe eine enantioselektive Palladium-katalysierte Reaktion ausgehend von racemischen Hydrazinen.^[307] Außerdem entwickelte die Arbeitsgruppe um Toste einen chiralen Biarylphosphingold(I)-Komplex für die enantioselektive Hydroaminierung von Allenen mit Hydrazinen.^[308]

Neben den bereits vorgestellten Routen zur Synthese von Pyrazolidinen, eignen sich außerdem Hetero-Diels-Alder Reaktionen,^[309] Anellierungsreaktionen zwischen Hydrazonen und Cyclopropanen^[310] und Carboaminierungsreaktionen^[311] zur Darstellung von Pyrazolidinen.

Eine sehr elegante Syntheseroute zur Darstellung von Pyrazolidinen ist die Reduktion der entsprechenden ungesättigten 2-Pyrazoline, welche über die Addition von Hydrazinen an α,β -ungesättigte Aldehyde bzw. Ketone, die Addition von Estern mit Allen-Struktur und Azodicarbonsäuredialkylester, sowie die Hydrohydrazinierung (Addition von Hydrazin an Alkine) dargestellt werden können.^[312-316] Kürzlich publizierten Lellek *et al.* eine Eintopf-Kondensationsreaktion zur Darstellung von 2-Pyrazolinen ausgehend von einem Keton, einem Aldehyd und Hydrazin-Monohydrochlorid, die von den Autoren noch mit einer Oxidation zum Pyrazol in einem Topf verknüpft wurde (Schema 6.6).^[317]



Schema 6.6. Eintopf Kondensationsreaktion zur Darstellung von 2-Pyrazolinen und anschließende Oxidation zu den entsprechenden Pyrazolen^[317]

Etablierte Methoden zur Reduktion von 2-Pyrazolinen zu den entsprechenden Pyrazolidinen umfassen dem Einsatz von Lithiumtriethylborhydrid, welche mit moderaten bis guten Ausbeuten verbunden ist.^[316,318] Außerdem ist die Verwendung von Natriumcyanoborhydrid zur Reduktion von 2-Pyrazolinen beschrieben,^[319] die insbesondere aufgrund der möglichen Entstehung von Blausäure im sauren Milieu bedenklich ist. Eine etablierte Reduktionsmethode der azyklischen Analoga, der Hydrazone, zur Darstellung von offenkettigen Hydrazinen weist über die Bildung der BH_2CN -Addukte unter Verwendung von Natriumcyanoborhydrid ebenfalls Nachteile auf.^[320] Außerdem stellen Borhydride aus ökonomischer Sicht nur bedingt ein attraktives Reduktionsmittel dar und die Etablierung einer hoch enantioselektiven Reduktionsmethode ausgehend von prochiralen 2-Pyrazolinen bzw. Hydrazonen stellt bis heute eine Herausforderung dar.

6.2 Motivation und Zielsetzung

Aufgrund der herausragenden Bedeutung des Hydrazin-Strukturmotivs stellt die Entwicklung neuartiger Routen zur Darstellung dieser Verbindungen ein interessantes Forschungsgebiet dar. Die Reduktion der ungesättigten Verbindungen, der 2-Pyrazoline und Hydrazone, stellt eine sehr elegante Methode zur Synthese von Pyrazolidinen und Hydrazinen dar. Allerdings weisen etablierte Reduktionsmethoden Nachteile auf, sodass insbesondere die Etablierung einer enantioselektiven und nachhaltigen Reduktionsmethode, welche die Nachteile der etablierten Methoden vermeidet, von großem Interesse ist (Abbildung 6.2).

Ausgehend von der erfolgreichen Nutzung von Iminreduktasen zur Reduktion zyklischer und azyklischer Imine^[118,121,124,125,129,150] (siehe auch Kapitel 3.1.4), der erfolgreichen Prozessentwicklung (siehe Kapitel 3)^[146] und der erfolgreichen Etablierung der Reduktion schwefel- sowie sauerstoffhaltiger zyklischer Imine (siehe Kapitel 4),^[218,225] sollten erste Experimente durchgeführt werden, um die Eignung von IREDs zur Reduktion von Substraten mit Hydrazin-Strukturmotiv zu evaluieren (Abbildung 6.2).

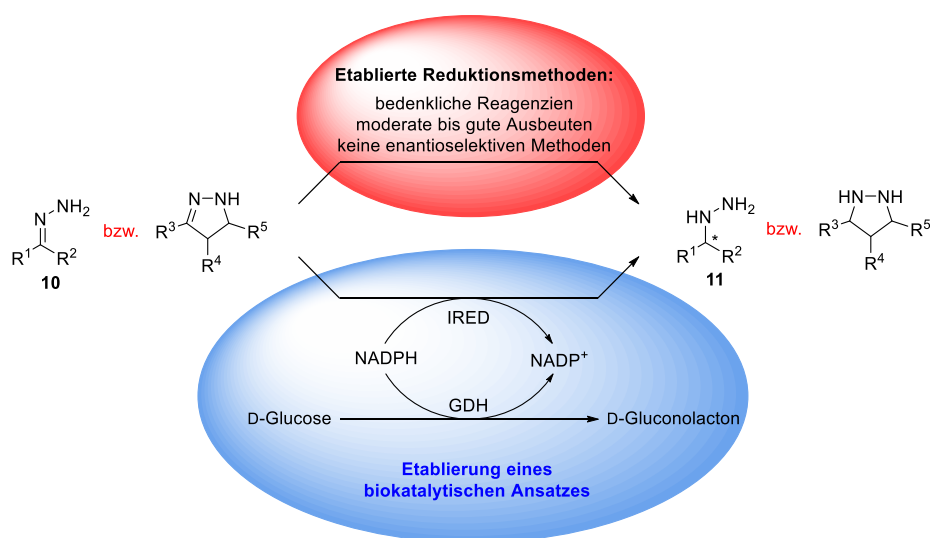


Abbildung 6.2. Limitierungen etablierter Reduktionsmethoden zur Darstellung von Pyrazolidinen und Hydrazinen und Zielsetzung des Kapitels

Da Hydrazone **10** sehr einfach über eine Kondensationsreaktion von Ketonen bzw. Aldehyden mit Hydrazin-Monohydrat zugänglich sind, sollen im Rahmen dieses Kapitels der vorliegenden Dissertation beispielhaft erste Experimente zur IRED-katalysierten Reduktion der azyklischen Hydrazone **10** durchgeführt werden.

Hierzu sollen zunächst beispielhaft Hydrazone **10** synthetisiert und die Stabilität der Hydrazone **10** im wässrigen Medium untersucht werden. Mittels Reduktion wurden außerdem Versuche zur Darstellung der entsprechenden racemischen Hydrazine **11** als Referenzverbindungen unternommen. Im nächsten Schritt sollen nach der Etablierung einer Analytik initiale Experimente zur Untersuchung der biokatalytischen Reduktion der

Hydrazone **10** erfolgen. Analog zu den Arbeiten zur Reduktion der S- und O-haltigen zyklischen Imine soll zunächst ein pH-Shift-Assay zur Identifizierung geeigneter Iminreduktasen sowie die Bestimmung der spektrophotometrischen Enzymaktivität durchgeführt werden. Daraufhin sollten initiale Biotransformationen durchgeführt werden, um die Eignung der IREDs zur Reduktion von Hydrazonen zu untersuchen (Abbildung 6.3).

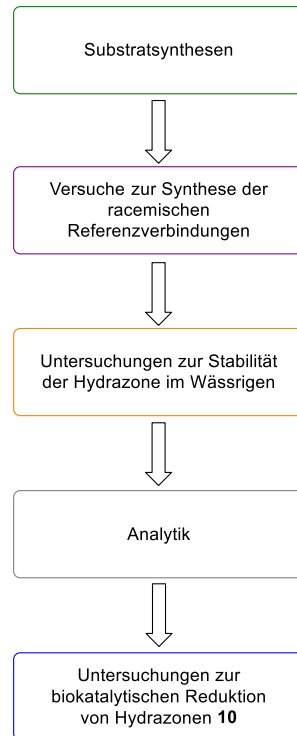
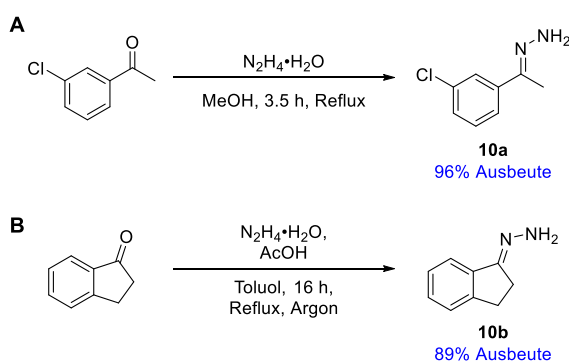


Abbildung 6.3. Übersicht des Projektes zur biokatalytischen Reduktion von Iminen mit zusätzlichen Stickstoffatomen

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 Synthese von Hydrazone **10**

Zur Untersuchung der biokatalytischen Reduktion von Hydrazone **10** unter Einsatz von Iminreduktasen wurden zunächst beispielhaft zwei Hydrazone über Kondensationsreaktionen synthetisiert. Die Synthese des Hydrazons **10a** erfolgte ausgehend von *meta*-Chloracetophenon nach einer Vorschrift von Poh *et al.*^[321] Das Hydrazon **10a** wurde in einer exzellenten isolierten Ausbeute von 96% erhalten (Schema 6.7A). Die Darstellung des 1-Indanonhydrazons **10b** erfolgte nach einer adaptierten Vorschrift von Wu *et al.*^[322] ebenfalls in einer Kondensationsreaktion unter Säurekatalyse mit Essigsäure ausgehend von 1-Indanon. Das Hydrazon **10b** wurde mit einer guten Ausbeute von 89% isoliert (Schema 6.7B).

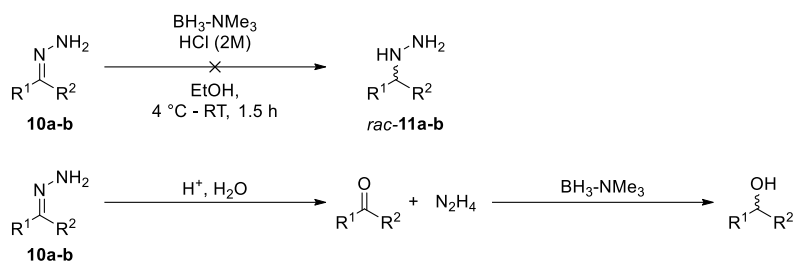


Schema 6.7. Synthese der Hydrazone **10a** und **10b**

6.3.2 Synthese der Referenzverbindungen

Im nächsten Schritt wurde die Darstellung der racemischen Hydrazine **11**, die als Referenzverbindungen für die Etablierung einer geeigneten Analytik benötigt wurden, untersucht. Die Verwendung von Natriumcyanoborhydrid zur Darstellung der Hydrazine **11** ausgehend von den Hydrazone **10** kam aufgrund der literaturbeschriebenen Bildung der BH_2CN -Addukte nicht in Frage.^[320] Daher wurde die Synthese der racemischen Hydrazine **11** anhand einer abgewandelten Vorschrift von Kawase *et al.* zur Reduktion von Oximen untersucht.^[323] Die Reduktionsversuche erfolgten hierbei säurekatalysiert unter Verwendung von Boran-Trimethylamin Komplex. Allerdings wurden anhand dieser Methode nicht die gewünschten Hydrazine **11**, sondern die entsprechenden Alkohole erhalten. Über Säurekatalyse erfolgte zunächst die Hydrolyse der Hydrazone zu den entsprechenden Ketonen, welche unter den Reaktionsbedingungen daraufhin zu den entsprechenden Alkoholen reduziert wurden (Schema 6.8). Die entsprechenden Hydrazine **11a-b** konnten über diese Reduktionsmethode somit nicht erfolgreich isoliert werden. Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich bereits die Hydrolyseempfindlichkeit der Hydrazone **10**, sodass im

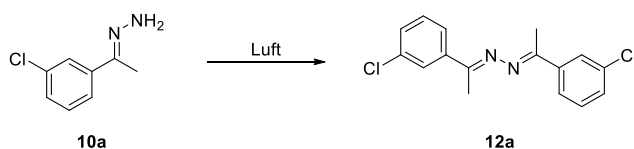
Hinblick auf die biokatalytische Reduktion zunächst die Stabilität dieser Verbindungen im wässrigen Medium untersucht wurde.



Schema 6.8. Versuch zur Synthese der racemischen Hydrazine **11a-b**

6.3.3 Untersuchung der Stabilität von Hydrazonen im wässrigen Medium

Bereits bei der Lagerung des Hydrazons **10a** bei Raumtemperatur unter Luftatmosphäre konnte nach einigen Tagen die Bildung von Kristallen in der öligen Reinsubstanz beobachtet werden. Per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Massenspektrometrie konnte eine Bildung des Azins **12a** nachgewiesen werden, die formal einer Dimerisierung des Hydrazone **10a** zu Dihydrazonen entspricht (Schema 6.9). Eine Lagerung des Hydrazons **10a** unter Argonatmosphäre und idealerweise verringerter Temperatur (4 °C) war daher zwingend erforderlich.



Schema 6.9. Dimerisierung des Hydrazons **10a** zum Azin **12a** durch Lagerung bei Raumtemperatur unter Luftatmosphäre

Eine solche Dimerisierung konnte für das 1-Indanonhydrazon **10b**, welches im Gegensatz zu der Verbindung **10a** als Feststoff isoliert wurde, bei Lagerung unter Luftatmosphäre nicht nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der biokatalytischen Reduktion von Hydrazonen **10** sind Kenntnisse der hydrolytischen Stabilität der Edukte **10** von großer Bedeutung. Eine hydrolytische Instabilität von Hydrazonen konnte bereits 2008 von Kalia *et al.* nachgewiesen werden. Demnach sind Hydrazone zwar im wässrigen Medium zwar stabiler als azyklische Imine, allerdings instabiler gegenüber Oximen, welche hydrolytisch stabil sind (Abbildung 6.4).^[324]

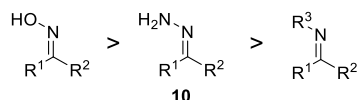
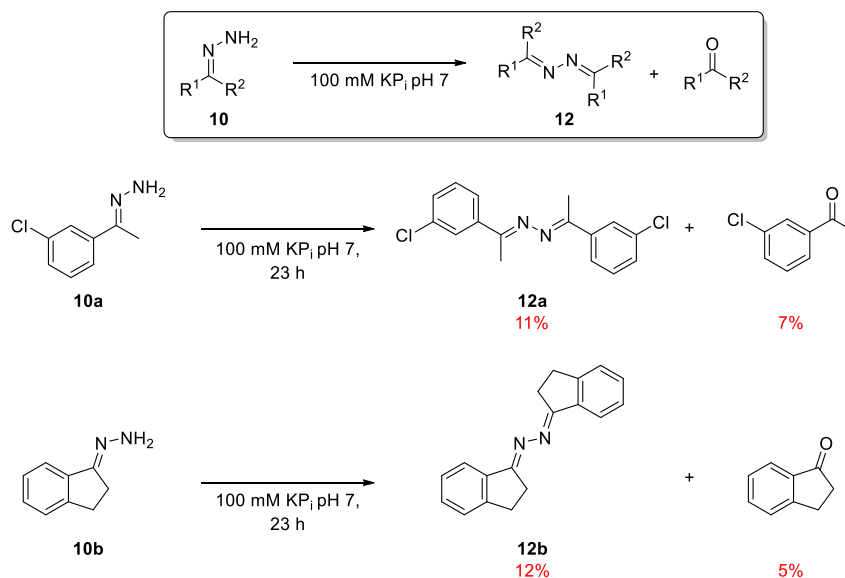


Abbildung 6.4. Einordnung der hydrolytischen Stabilität von Hydrazone **10** gegenüber azyklischen Iminen und Oximen^[324]

Um einen Eindruck über die hydrolytische Stabilität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hydrazone **10a-b** zu erhalten, wurde die zeitliche Stabilität der Hydrazone **10a** und **10b** ¹H-NMR-spektroskopisch in D₂O und in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7 bei einer Temperatur von 20 °C untersucht. Analog zur Lagerung des Hydrazons **10a** unter Luftatmosphäre wurde eine Dimerisierung beider Hydrazone **10a-b** in deuteriertem Wasser und in 100 mM KP_i pH 7 nachgewiesen. Nach einer Inkubationszeit von 5 h waren in D₂O sowie Kaliumphosphat-Puffer 4% des Hydrazons **10a** zum Azin **12a** dimerisiert. Die Dimerisierung des Hydrazons **10b** verläuft im Vergleich dazu langsamer und es wurde sowohl in D₂O als auch Kaliumphosphat-Puffer nach einer Inkubation von 5 h lediglich 1% des Azins **12b** nachgewiesen. Zusätzlich zur Dimerisierung der Hydrazone **10** wurde eine Hydrolyse zu den entsprechenden Ketonen beobachtet, die in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer schneller verlief als in deuteriertem Wasser. So wurde nach einer Inkubationszeit von 23 h in 100 mM KP_i pH 7 eine Hydrolyse des Hydrazons **10a** zum entsprechenden Keton mit 7% und eine Dimerisierung zum Azin **12a** mit 11% beobachtet. Analog dazu wurde neben der Dimerisierung auch eine Hydrolyse des Hydrazons **10b** zum entsprechenden Keton nachgewiesen (Schema 6.10).



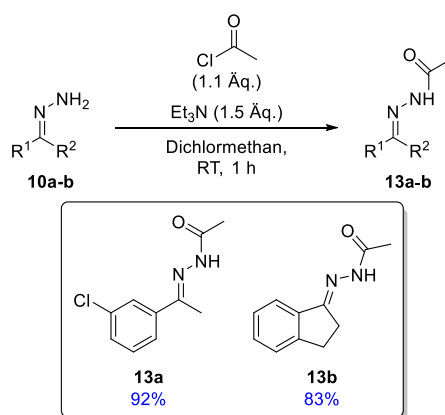
Schema 6.10. Stabilität der Hydrazone **10a-b** im Wässrigen

Sofern die Dimerisierung der Hydrazone **10** im Rahmen der biokatalytischen Umsetzungen nicht unterdrückt werden kann, muss neben der Hydrolyse der Hydrazone **10** auch die Dimerisierung im Rahmen der biokatalytischen Reduktionen berücksichtigt werden.

Außerdem sollte untersucht werden, ob möglicherweise auch die Azine **12** geeignete Substrate für die IRED-katalysierte Reduktion sind.

6.3.4 Analytik

Die vorliegenden Hydrazone **10** wurden für eine Vermessung per SFC-HPLC zunächst mit Acetylchlorid in Gegenwart von Triethylamin nach einer abgewandelten Vorschrift von Rye *et al.* acyliert.^[325] Die Amide der Hydrazone **13** wurden in guten Ausbeuten erhalten (Schema 6.11).



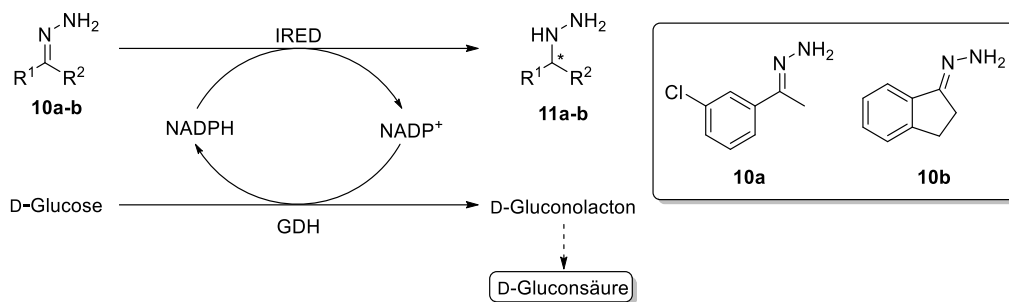
Schema 6.11. Acylierung der Hydrazone **10** für die Etablierung einer SFC-HPLC Analytik

Eine Auftrennung der Hydrazonamide **13**, der Azine **12** und der ebenfalls derivatisierten Alkohole konnte per SFC-HPLC erreicht werden, um einen ersten Eindruck über die Eignung von IREDs zur Darstellung von Hydrazinen **11** zu erhalten.

6.3.5 Biokatalytische Reduktion von Hydrazonen

6.3.5.1 Kolorimetrischer pH-Shift-Assay

Trotz der Instabilität der Hydrazone **10** wurde analog zu den Arbeiten mit den *S*- und *O*-haltigen zyklischen Iminen im Rahmen der biokatalytischen Untersuchungen zunächst ein kolorimetrischer pH-Shift-Assay durchgeführt. Dieser indirekte Assays wurde verwendet um einen ersten Eindruck zu erhalten, ob Iminreduktasen geeignete Biokatalysatoren zur Reduktion von Hydrazonen **10** bzw. Azinen **12**, die während der Inkubation des Assays entstehen (siehe Kapitel 6.3.3), sind (Schema 6.12). Mögliche falsch-positive Farbumschläge aufgrund einer Reduktion der Ketone als Hydrolyseprodukte durch andere exprimierte Proteine des *E. coli*-Stammes mussten ebenfalls berücksichtigt werden.



Schema 6.12. Biokatalytische Reduktion von Hydrazonen **10** unter Einsatz von Iminreduktasen und *in situ*-Regeneration des Cofaktors mit Glucose-Dehydrogenase

Leichte Farbumschläge von grün nach gelb konnten für die Substrate **10a-b** in Kombination mit einigen IREDs identifiziert werden. Analog zum Screening der 3-Thiazoline musste ein Volumen von 40 μL des IRED-ZRE eingesetzt werden, womit allerdings nur leichte Farbumschläge nachgewiesen werden konnten. Die schwächeren Farbumschläge im Vergleich zu den Farbumschlägen, die mit den 3-Thiazolinen **3** beobachtet wurden, könnten einerseits mit einer geringen Aktivität der IREDs gegenüber den Hydrazonen **10** erklärt werden. Zum anderen nahm die Hydrazonkonzentration aufgrund der Azinbildung sowie der Hydrolyse im Verlauf des pH-Shift-Assays ab, sodass mit der Zeit immer weniger Hydrazonmoleküle zur Verfügung standen und somit verhältnismäßig weniger Gluconsäure entstehen konnte, falls die IREDs lediglich eine Aktivität zur Reduktion der „Mono“-Hydrazone **10** aufweisen. Außerdem erhöhte das bei der Hydrolyse des Hydrazons gebildete Hydrazin den pH-Wert der Reaktionslösung und beeinflusste somit über die Färbung des Bromthymolblau die Ergebnisse des kolorimetrischen pH-Shift-Assay. Für alle Hydrazone **10a-b** konnten im Rahmen der Negativkontrollen keine signifikanten Farbumschläge ermittelt werden, sodass die Aktivität anderer Proteine, die von dem *E. coli*-Stamm exprimiert werden, vermutlich gering ist (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay der Hydrazone **10**

Substrat	Potentiell positive IREDs	Negativ	pET22b_leer
10a	IREd01, IREd06, IREd27, IREd31	negativ	negativ
10b	IREd01, IREd06, IREd12, IREd27	negativ	negativ

Potentiell positive IREDs zeigten einen deutlichen Farbumschlag von grün nach gelb innerhalb von 24 h. Negativ: ohne Zugabe von IRED-ZRE, pET22b_leer: Verwendung des ZRE ohne Expression der IRED. Für eine bessere Lesbarkeit wurden die IREDs durchnummeriert (Kapitel 10.3).

Aufgrund der Instabilität der Hydrazone **10** konnten anhand dieses Assays im Vergleich zum Screening der S- und O-haltigen zyklischen Imine keine vielversprechenden Hinweise auf die Eignung von IREDs zur Reduktion der Hydrazone **10a-b** gewonnen werden.

6.3.5.2 Spektrophotometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Aufbauend auf den bestimmten schwach positiven Farbumschlägen, die für die Hydrazone **10a-b** in Kombination mit einigen IREDs beobachtet wurden, wurde im nächsten Schritt die Aktivität der Iminreduktasen zur Reduktion dieser Verbindungen bei einer Substratkonzentration von 1 mM spektrophotometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Abnahme des Cofaktors NADPH bei 340 nm für 60 s verfolgt. Über die Proteinkonzentration des Rohextrakts wurde die Aktivität in die spezifische Aktivität (U mg^{-1} Ganzzell-Protein (GZP)) umgerechnet. Geringe Aktivitäten konnten für alle untersuchten IREDs in Kombination mit den Hydrazonen **10a-b** ermittelt werden, wobei die IRED27 in Kombination mit den Substraten **10a-b** vergleichsweise die höchsten Aktivitäten aufwies (Abbildung 6.5).

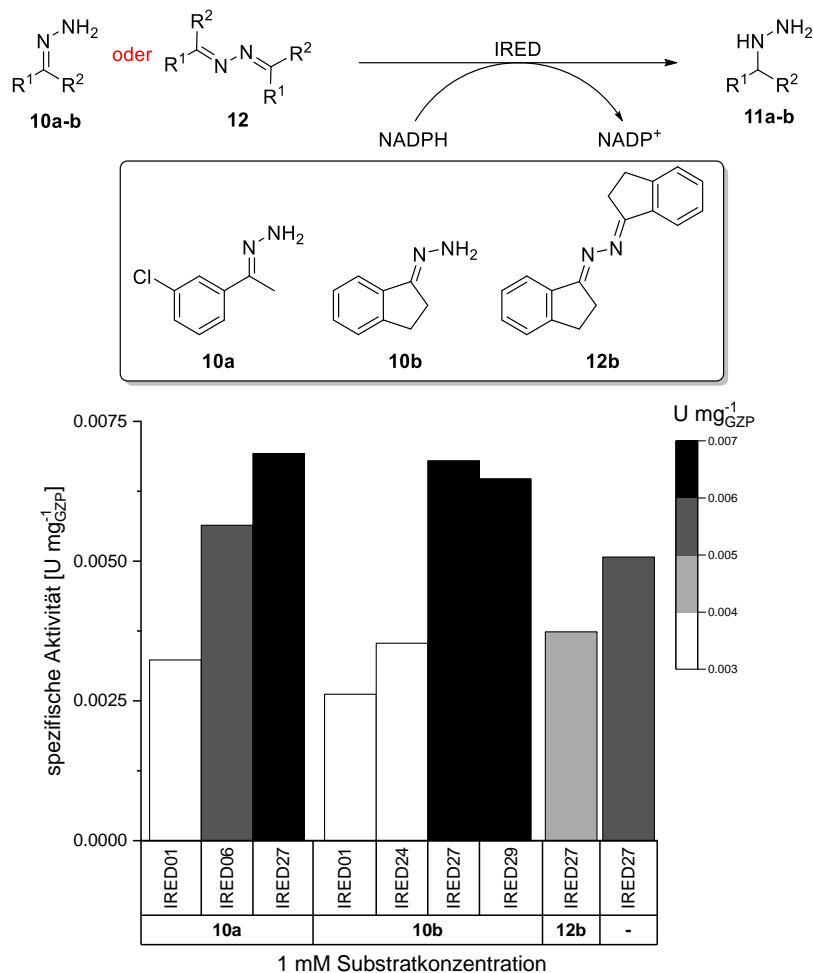


Abbildung 6.5. Spezifische Aktivität der IREDs zur Reduktion der Hydrazone **10a-b**, zur Reduktion des Azins **12b** und Negativkontrolle ohne Substrat

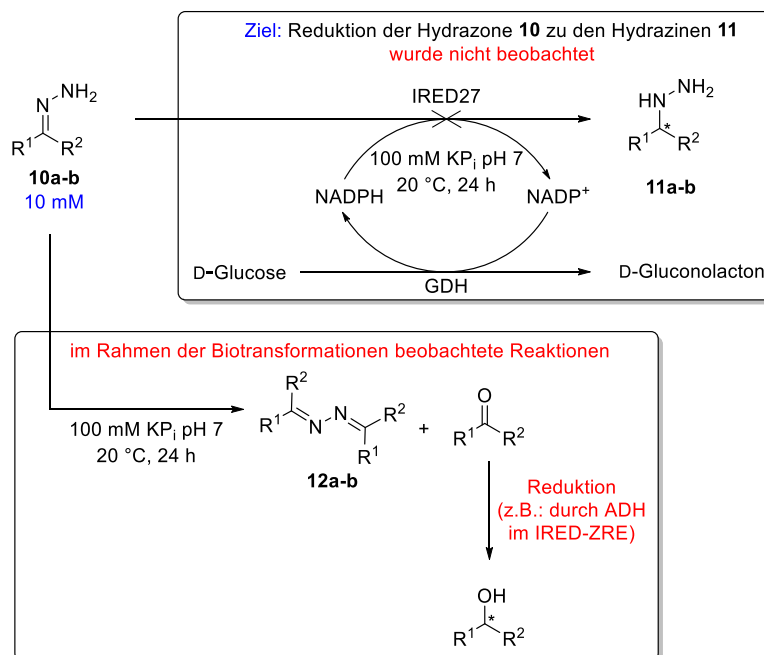
Da auch die Azine **12**, die im Wässrigen gebildet werden, potentielle Substrate der IREDs darstellten, wurde beispielhaft die Aktivität der IRED27 zur Reduktion des Azins **12b** bestimmt. Es konnte eine Aktivität bestimmt werden, die jedoch geringer ist als die Aktivität der IRED27 zur Umsetzung des Hydrazons **10b**. Als Negativkontrolle wurde zudem die Aktivität der IRED27 in Abwesenheit von Substrat bestimmt. Die so bestimmte

Aktivität kann auf die Anwesenheit von NADPH-Oxidasen im Zellrohextrakt zurückgeführt werden und liegt über der Aktivität der IRED27 in Gegenwart des Azins **12b** (Abbildung 6.5). Anhand dieses Ergebnisses konnte ausgeschlossen werden, dass das Azin **12b** durch die IRED27 umgesetzt wird und gilt vermutlich analog für das Azin **12a**. Die IRED27 weist somit geringe Aktivitäten für alle untersuchten Hydrazone **10** auf, die leicht über der bestimmten Negativaktivität in Abwesenheit von Substrat liegen (Abbildung 6.5). Da im Rahmen dieser spektrophotometrischen Bestimmung jeweils die initiale Aktivität der IRED in den ersten 60 s nach der Vermischung der Substrate **10a** und **10b** mit der wässrigen Lösung determiniert wurde, kann zudem davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Dimerisierung der Hydrazone **10** zu den Azinen **12** und der Hydrolyse zu den Ketonen relativ gering ist. Entsprechend sollte eine Nebenaktivität anderer Enzyme, die von dem *E. coli*-Stamm exprimiert wurden wie von ADHs zur Reduktion der Ketone in dieser Zeit vernachlässigbar sein. Die ermittelten geringen Aktivitäten, die nicht deutlich über der Aktivität der Negativkontrolle liegen, geben bereits einen Hinweis darauf, dass die verwendeten Iminreduktasen möglicherweise keine geeigneten Biokatalysatoren zur Reduktion von Hydrazonen **10** darstellen.

6.3.5.3 Biotransformationen von Hydrazonen **10**

Trotz der Instabilität der Hydrazone **10** im wässrigen Medium und des Mangels an Referenzverbindungen der Produkte **11** wurden im nächsten Schritt Biotransformationen durchgeführt, um die Eignung von IREDs zur Darstellung von Hydrazinen **11** zu untersuchen. Es wurden Biotransformationen im 1.0 mL Maßstab bei Substratkonzentrationen der Hydrazone **10a-b** von 10 mM unter Verwendung der GDH zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors durchgeführt. Mit dem Ziel die Rate der Dimerisierung und Hydrolyse der Substrate **10** gering zu halten, wurden die Reaktionen entgegen dem Optimum IRED-katalysierter Reaktionen bei einer verringerten Temperatur von 20 °C für 24 h durchgeführt. Da die IRED27 im Rahmen der spektrophotometrischen Untersuchungen die höchste Aktivität zur Reduktion der Hydrazone **10** aufwies, wurden alle Biotransformationen bei einer Gesamt-Proteinkonzentration von 4 mg mL⁻¹ der IRED27 durchgeführt. Erwartungsgemäß wurden nach einer Reaktionszeit von 24 h jeweils die Azine **12a-b** per SFC-HPLC nachgewiesen (Schema 6.13). Außerdem konnten in den Biotransformationen jeweils die nicht umgesetzten Hydrazone **10** bzw. Hydrazonamide **13** (aufgrund der Acylierung im Anschluss der Biotransformation) per SFC-HPLC detektiert werden. Somit erfolgte keine vollständige Dimerisierung oder Hydrolyse der Hydrazone **10** während der Biotransformationen und es standen Hydrazone **10a-b** für die IRED-katalysierte Reduktion zu den entsprechenden Hydrazinen **11** über einen Zeitraum von mehr als 24 h unter den Reaktionsbedingungen der Biotransformationen zur Verfügung. Im Rahmen der Biotransformation des Hydrazons **10a** wurden neben den

Signalen des Hydrazons **10a** und des Azins **12a**, zudem der acylierte Alkohol beobachtet. Der Alkohol wurde vermutlich durch Reduktion von anderen exprimierten Proteinen des *E. coli*-Stammes wie ADHs aus dem Keton, das im Rahmen der Biotransformation als Hydrolyseprodukt entsteht, gebildet (Schema 6.13) und über die Derivatisierung im Rahmen der Vorbereitung der HPLC-Messungen in den acylierten Alkohol überführt. Für die Umsetzung des Hydrazons **10b** wurde neben den Signalen des Hydrazons **10b** und des Azins **12b** ebenfalls der acylierte Alkohol beobachtet. Neben den Signalen der Hydrazone **10**, der Azine **12** und der Alkohole konnten für beide Biotransformationen keine weiteren Signale in den HPLC-Chromatogrammen beobachtet werden (Schema 6.13). Über eine Vermessung der Rohprodukte der Biotransformation per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, konnten ebenfalls keine Signale identifiziert werden, die einen Hinweis auf die Bildung der Hydrazine **11** geben. Im Rahmen der Bemühungen der Autorin konnte somit keine erfolgreiche biokatalytische Reduktion von Hydrazonen **10** etabliert werden. Trotz der beobachteten geringen Aktivitäten der IREDs über den indirekten spektrophotometrischen Aktivitätsassay konnte keine Bildung der Hydrazine **11** in Biotransformationen nachgewiesen werden (Schema 6.13). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Iminreduktasen stellen daher keine geeigneten Biokatalysatoren zur Reduktion von Hydrazonen **10** dar.



Schema 6.13. Nicht erfolgreiche biokatalytische Reduktion von Hydrazonen **10a-b**

6.4 Ausblick

Im Rahmen dieses Kapitels wurden erste Studien zur Eignung von Iminreduktasen zur Reduktion von Hydrazonen **10** durchgeführt. Allerdings konnte keine geeignete Iminreduktase zur Darstellung der Hydrazine **11** identifiziert werden. Mit dem Ziel eine IRED-katalysierte Reduktion von Hydrazonen in zukünftigen Arbeiten zu etablieren, könnte beispielsweise *directed evolution* genutzt werden, um IREDs zu entwickeln, die Hydrazone **10** als Substrate akzeptieren. Eine weitere Hürde für die Entwicklung dieser biokatalytischen Methode stellt die Instabilität der Hydrazone **10** im wässrigen Medium dar, die nicht zu vernachlässigen ist. Aufgrund dessen könnte ein Wechsel des Modellsubstrates interessant sein. Sofern 2-Pyrazoline eine erhöhte Stabilität in wässrigen Medien gegenüber Hydrazonen aufweisen, könnte auch die Reduktion dieser Hydrazon-Analoga aufgrund der medizinischen Bedeutung von Pyrazolinen von großem Interesse sein.

7. VANADIUM-KATALYSIERTE DEHYDRIERUNG VON *N*-HETEROZYKLEN IN WASSER

7.1 Stand der Wissenschaft

7.1.1 Bedeutung von Chinolinen

Von allen sechsgliedrigen, aromatischen Stickstoff-Heterozyklen, die in Pharmazeutika als Struktur motive auftreten, gehören Chinoline zu den Top-Fünf.^[1] So kommt 2-Methylchinolin in einer Reihe von pharmazeutisch aktiver Verbindungen, beispielsweise zur Behandlung von Schizophrenie (PF-2545920),^[326] Malaria (Mefloquin),^[327] Asthma (Montelukast),^[328] Schmerzen (JTC-801),^[329] und HIV-Infektionen (Styrylchinoline)^[330] vor (Abbildung 7.1).

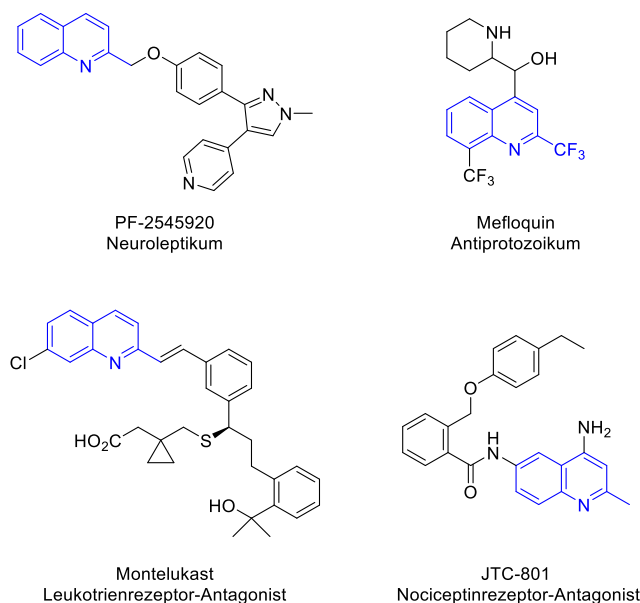
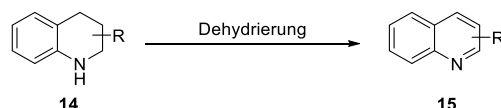


Abbildung 7.1. Ausgewählte Pharmazeutika, die Chinalin als Strukturmotiv enthalten^[326–329]

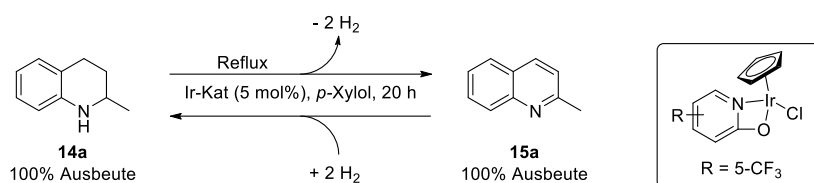
Die Dehydrierung von Tetrahydrochinolinen **14** ermöglicht eine atomökonomische und elegante Darstellung von Chinolinen **15** (Schema 7.1), die im Folgenden näher erläutert wird.



Schema 7.1. Dehydrierung zur atomökonomischen Darstellung von Chinolinen **15**

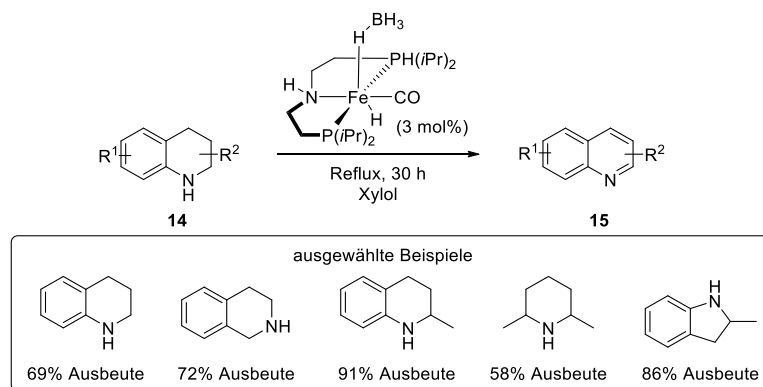
7.1.2 Methoden zur Dehydrierung von *N*-Heterozyklen

Die Dehydrierung von Tetrahydrochinolinen **14** wurde in den letzten Jahren bereits intensiv untersucht. Thermodynamisch stellt die Dehydrierung von *N*-Heterozyklen einen *Uphill*-Prozess dar, sodass häufig harsche Reaktionsbedingungen erforderlich sind, obwohl das Stickstoffatom die Endothermie im Vergleich zu Cycloalkanen verringert.^[331] Pionierarbeit in der Dehydrierung/Hydrierung von Stickstoff-Heterozyklen leisteten Yamaguchi *et al.* unter Verwendung eines Iridium-Komplexes, welcher Rückflussbedingungen in *p*-Xylol für die Dehydrierungsreaktion benötigt (Schema 7.2).^[332]



Schema 7.2. Reversible Dehydrierung/Hydrierung mit einem Iridium-Komplex^[332]

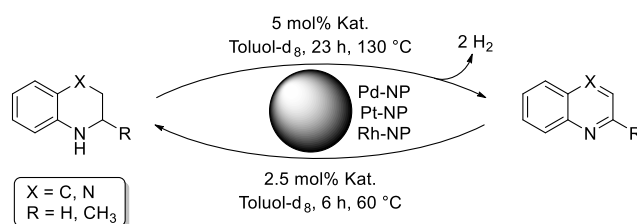
In den letzten Jahren wurden zudem eine Reihe weiterer Dehydrierungen von Stickstoff-Heterozyklen mit Iridiumkatalysatoren beschrieben.^[333–335] Chakraborty *et al.* entwickelten die erste Eisen-katalysierte Dehydrierung von Tetrahydrochinolinen **14** (Schema 7.3)^[336] und der Arbeitsgruppe um Beller gelang 2015 die Anwendung neuartiger Eisen-Graphen-Materialien zur Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen.^[337]



Schema 7.3. Eisen-katalysierte Dehydrierung von *N*-Heterozyklen^[336]

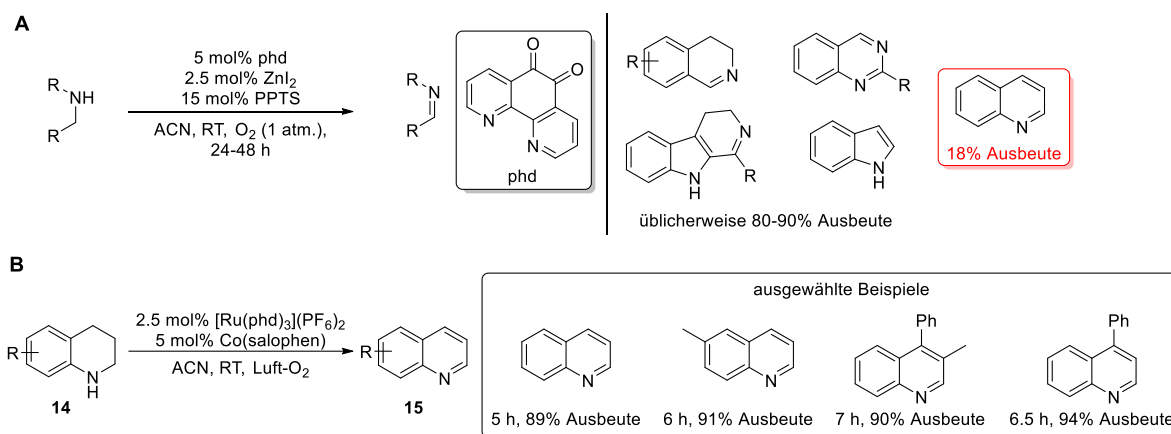
Außerdem wurden Dehydrierungsreaktion unter Verwendung von Metallkomplexen basierend auf Cobalt,^[338–341] Nickel,^[342,343] Ruthenium^[344,345] und Kupfer^[346] entwickelt. Die Arbeitsgruppe um Stahl etablierte zudem eine Dehydrierung von Cyclohexanon bzw. 2-Cyclohexen-1-on zu Phenolen unter Verwendung von Palladium-Katalyse.^[347,348] Die entsprechende Palladium-katalysierte Methode zur Dehydrierung von *N*-Heterozyklen wurde zuerst von Tanaka *et al.* mit Palladium auf Aktivkohle etabliert.^[349] Kürzlich wurde auch der erfolgreiche Einsatz von Palladium-Nanopartikeln zur Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen beschrieben.^[350,351] Neben der Verwendung von Palladium-Nanopartikeln konnten Deraedt *et al.* zudem Platin- und Rhodium-Nanopartikel

erfolgreich zur reversiblen Dehydrierung und Hydrierung einsetzen, wobei die Dehydrierung harschere Reaktionsbedingungen (höhere Reaktionstemperatur, Katalysatorbeladung, Reaktionszeit) erfordert (Schema 7.4).^[351]



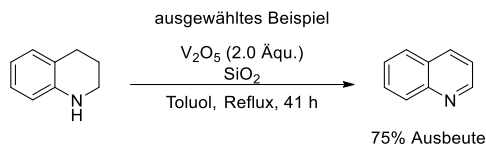
Schema 7.4. Reversible Dehydrierung/Hydrierung von *N*-Heterozyklen und Pd-, Pt- bzw. Rh-Nanopartikel Katalyse^[351]

Der Einsatz von *ortho*-Chinon-basierten Katalysatoren, welche von physiologischen Chinonen abgeleitet wurden, in Kombination mit Zink und Ruthenium ermöglichte der Arbeitsgruppe um Stahl die Etablierung weiterer Methoden zur Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen.^[345,352] Die Verknüpfung des *ortho*-Chinon-basierten Katalysators mit Zink erforderte jedoch relativ lange Reaktionszeiten (24-48 h) und wies nur ein eingeschränktes Substratspektrum auf (Schema 7.5A).^[352] Über die Verwendung eines oktahedralen [Ru(phd)₃]²⁺ Katalysators, der eine höhere Aktivität aufwies, gelang es der Arbeitsgruppe schließlich die Dehydrierung bei Raumtemperatur mit Luftsauerstoff durchzuführen (Schema 7.5B).^[345]



Schema 7.5. Dehydrierung von *N*-Heterozyklen mit *ortho*-Chinon-basierten Katalysatoren in Kombination mit **A** Zink^[352] und **B** Ruthenium^[345]

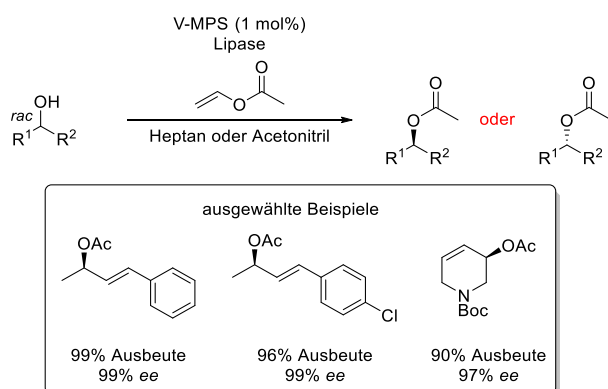
Allerdings ist bisher nur eine Vanadium-katalysierte Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen beschrieben, die auf der Verwendung von Vanadumpentoxid beruht. Nachteile dieser Methode sind die Notwendigkeit einer hohen Katalysatorbeladung von bis zu 2.0 Äquivalenten V_2O_5 und hohe Reaktionstemperaturen (Schema 7.6).^[353]



Schema 7.6. Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin mit Vanadumpentoxid^[353]

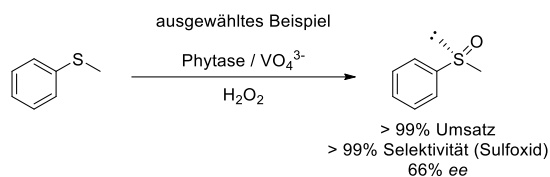
7.1.3 Vanadium-Katalyse

Aufgrund der guten Verfügbarkeit von Vanadium, welches in der Natur in demselben Maß vorkommt wie Zink und den damit verbundenen geringen Kosten sowie der relativ geringen Toxizität gegenüber anderen Schwermetallen, stellt Vanadium eine attraktive Komponente in Metallkatalysatoren dar.^[20,21] Die physiologische Akkumulation von Vanadium in aquatischen tierischen Organismen durch Vanadium-bindende Proteine^[22] zeigt zudem die Kompatibilität von Proteinen und dem Metall Vanadium auf. So nutzte die Arbeitsgruppe um Akai einen Vanadium-Katalysator in einem chemoenzymatischen Eintopf-Prozess zur dynamisch-kinetischen Racematspaltung sekundärer Alkohole durch Kombination einer Vanadium-katalysierten Racemisierung und einer enantioselektiven enzymatischen Acylierung, die nicht racemisierbare Allylester liefert. Der etablierte Vanadium-Katalysator und das Enzym zeigen eine hohe Kompatibilität und ermöglichen die dynamisch-kinetische Racematspaltung mit hoher Aktivität und Enantioselektivität (Schema 7.7).^[23–26]



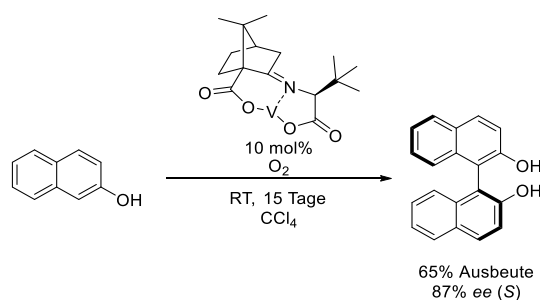
Schema 7.7. Chemoenzymatische dynamisch-kinetische Racematspaltung sekundärer Alkohole^[25]

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung eines artifiziellen Vanadium-Metalloenzym der Arbeitsgruppe um Sheldon zur asymmetrischen Sulfoxidation (Schema 7.8).^[354–358]



Schema 7.8. Asymmetrische Sulfoxidation mit einer artifiziellen Vanadium-Phytase^[354–358]

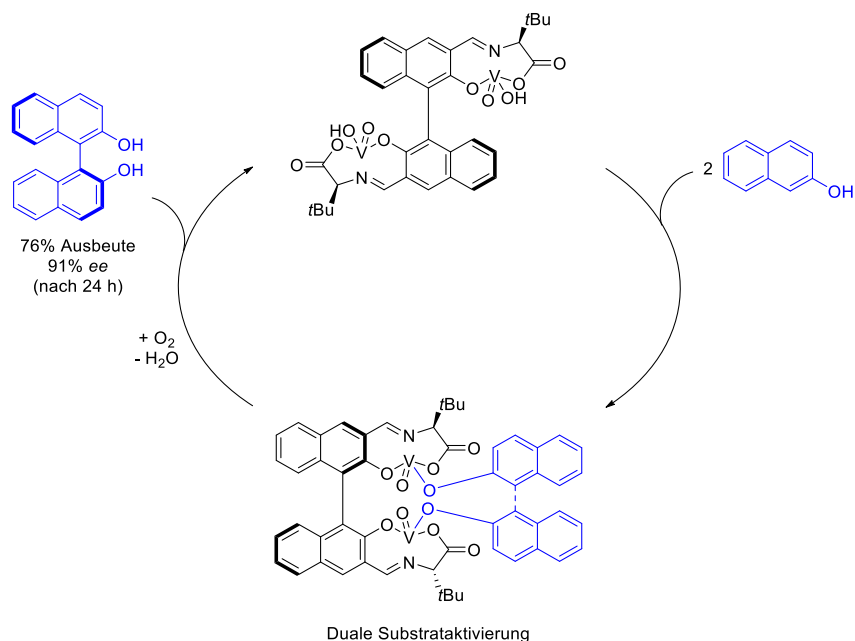
In den letzten Jahrzehnten wurde zudem eine Vielzahl von Arbeiten auf dem Gebiet der asymmetrischen Katalyse unter Verwendung chiraler Vanadium-Katalysatoren veröffentlicht. Insbesondere die Anwendung der Vanadium-katalysierten Redoxchemie und Lewis-Säure basierter Chemie stellen hierbei große Themengebiete dar.^[359] Eine Vielzahl von Vanadium-Katalysatoren wurde beschrieben, welche typischerweise ein mononukleares Vanadium als Metallzentrum und einen chiralen mehrzähligen Liganden tragen. Diese effizienten Katalysatoren konnten erfolgreich für eine Vielzahl von Reaktionen beispielsweise Epoxidierungen,^[360,361] Sulfoxidationen,^[362,363] Disulfidoxidationen,^[364] Oxidationen von α -Hydroxyestern,^[365] Hetero-Diels-Alder-Reaktionen,^[366] Cyanierungen von Aldehyden,^[367] Strecker-Reaktionen^[368] und Cyanierungen von Nitroalkenen^[369] eingesetzt werden. Die oxidative Kupplung von 2-Naphthol zur Synthese von 1,1'-Bi-2,2'-naphthol (BINOL) als bedeutender Ligand in der asymmetrischen Katalyse wurde in einem *Proof of Concept* erstmalig von den Arbeitsgruppen um Chen^[370] und Uang^[371] beschrieben. Aufgrund der moderaten Enantioselektivitäten in den initialen Publikationen wurden verbesserte mononukleare Vanadium-Katalysatoren, die auf veränderten Liganden beruhen, etabliert. In einer weiteren Arbeit der Arbeitsgruppe von Chen konnte bei einer langen Reaktionszeit von 15 Tagen eine hohe Enantioselektivität von 87% ee erreicht werden (Schema 7.9).^[372]



Schema 7.9. Oxidative Kupplung von 2-Naphthol mit einem optimierten mononuklearen Vanadium-Katalysator^[372]

Unter Verwendung eines dinuklearen Vanadium-Katalysators mit einer V-O-V Verknüpfung konnten die Arbeitsgruppen von Luo und Gong erstmalig exzellente Enantioselektivitäten, allerdings mit langen Reaktionszeiten von bis zu 5 Tagen, erreichen.^[373–375]

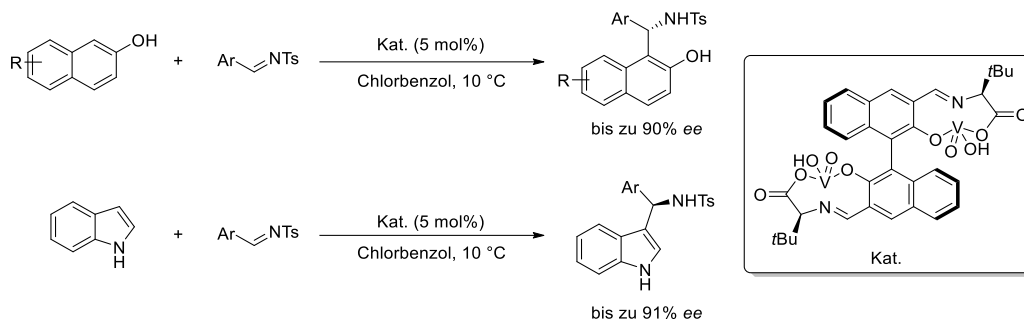
Die Entwicklung von Katalysatoren, die eine Kupplung von 2-Naphthol mit hoher Enantioselektivität und hoher Aktivität katalysieren, stellte demnach eine Herausforderung dar. Inspiriert durch bifunktionelle Katalysatoren, die sowohl Substrat als auch Reagenz in einem Schritt aktivieren,^[376] entwickelte die Arbeitsgruppe um Sasai Vanadium-Katalysatoren, die eine Fähigkeit zur Bindung von zwei Molekülen 2-Naphthol aufweisen, eine ausreichende Flexibilität bieten um beide 2-Naphthole zur Reaktion zu bringen und eine starre chirale Umgebung aufweisen um eine hohe asymmetrische Induktion bei der oxidativen Bildung der C-C-Bindung zu ermöglichen. Dinukleare Vanadium-Katalysatoren, wie in Schema 7.10 dargestellt, erfüllen diese Kriterien.^[28–35] Es werden beide 2-Naphthol Moleküle an jeweils einem Oxovanadium gebunden und sowohl die C₂-symmetrischen BINOL-Gerüste als auch die chiralen Aminosäure-Untereinheiten sind an der Bildung des Produkts beteiligt. Die Unabhängigkeit beider Vanadium-Einheiten ermöglicht die Ausbildung einer für die Kupplungsreaktion günstigen Anordnung über die Rotation um die C-C-Bindung der Binaphthol-Untereinheiten. Über dieses Konzept gelang es hohe Enantioselektivitäten (91% ee) sowie hohe Aktivitäten zur Kupplung von 2-Naphthol bei einer kurzen Reaktionszeit von 24 h zu erreichen (Schema 7.10).^[30,31]



Schema 7.10. Asymmetrische Kupplung von 2-Naphthol in Gegenwart eines chiralen dinuklearen Vanadium-Katalysators^[30,31]

Über die Optimierung des Katalysators konnte die Enantioselektivität im Rahmen der Arbeiten der Arbeitsgruppe um Sasai von 91% auf 97% ee erhöht werden.^[29–31] Außerdem ermöglicht der Wechsel des Lösungsmittels von Dichlormethan zu Tetrachlormethan einen Wechsel in der Enantioselektivität des gebildeten BINOLs.^[31] Die oxidative Kupplung von 2-Naphthol unter Verwendung der dinuklearen Vanadium-Komplexe kann außerdem in Wasser als umweltfreundliches Solvens erfolgreich durchgeführt werden.^[36] Außerdem konnte diese Methode auf die enantioselektive Kupplung polyzyklischer Phenole^[34] und

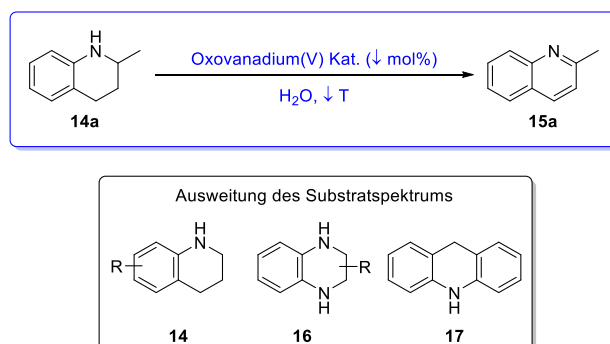
3-Hydroxycarbazole^[377] angewandt werden. Neben der oxidativen Kupplung wurden dinukleare Vanadium-Komplexe zudem erfolgreich für Lewis-Säure katalysierte Reaktionen wie die asymmetrische Friedel-Crafts Umsetzung von Iminen mit 2-Naphtholen oder Indolen verwendet (Schema 7.11).^[33]



Schema 7.11. Vanadium-katalysierte Friedel-Crafts Reaktion von Iminen mit 2-Naphtholen oder Indolen^[33]

7.2 Motivation und Zielsetzung

Vanadium stellt als ubiquitär verfügbares Metall mit vergleichsweise geringer Toxizität eine attraktive Komponente für einen Metallkatalysator dar.^[20,21,27] Mono- und dinukleare Vanadiumkomplexe konnten zudem bereits erfolgreich für oxidative Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen eingesetzt werden.^[27] Die Dehydrierung von *N*-Heterozyklen stellt aufgrund der Bedeutung von Chinolinen eine fundamentale Reaktion dar, die häufig harsche Reaktionsbedingungen erfordern (siehe Kapitel 7.1.2). Aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften von Vanadium und der Möglichkeit Vanadium-Katalyse unter milden Reaktionsbedingungen durchzuführen, sollte im Rahmen dieses Projektes eine Vanadium-katalysierte Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen unter milden Bedingungen etabliert werden. Die Etablierung und Optimierung dieser Reaktion sollte aufgrund der Bedeutung von 2-Methylchinolin^[326–330] zunächst anhand von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) erfolgen. Dabei sollte die Reaktionstemperatur möglichst gering gehalten werden und es sollte möglichst Wasser als umweltfreundliches Solvens verwendet werden (Schema 7.12).



Schema 7.12. Zielsetzung der Vanadium-katalysierten Dehydrierung von *N*-Heterozyklen

Hierfür sollten zunächst drei kommerziell erhältliche Vanadium-Katalysatoren und sieben mono- bzw. dinukleare Vanadium-Komplexe in einem Katalysator-Screening bei zwei unterschiedlichen Temperaturen untersucht werden. Mit dem besten Katalysator sollten daraufhin die Reaktionsbedingungen optimiert werden. Im Anschluss an die Optimierung und die Durchführung der Dehydrierungsreaktion im 1 mmol Maßstab sollten erste Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Vanadium-katalysierten Dehydrierung von *N*-Heterozyklen durchgeführt werden. Anhand dieser sollte daraufhin ein Reaktionsmechanismus der Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) postuliert werden. Darüber hinaus sollte die Methode auch auf die Dehydrierung anderer Stickstoff-Heterozyklen, wie anderweitig substituierte 1,2,3,4-Tetrahydrochinoline **14**, Tetrahydrochinoxaline **16** und 9,10-Dihydroacridin (**17**) übertragen werden (Schema 7.12). Zudem wurde getestet, ob sich 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (**18**) und 2-Methylpiperidin (**19**) als Substrate für diese Dehydrierungsreaktion eignen (Abbildung 7.2).

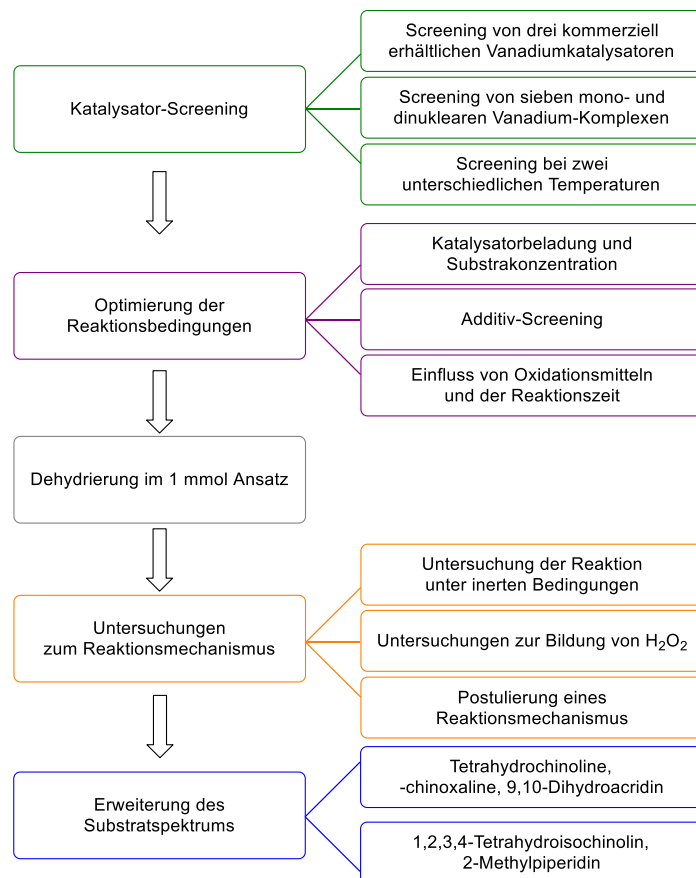


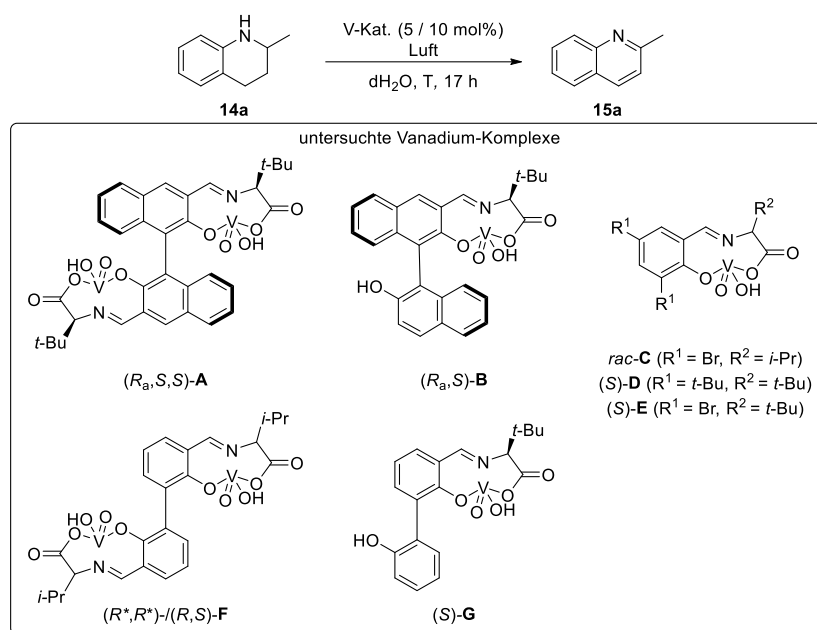
Abbildung 7.2. Übersicht des Projektes zur Vanadium-katalysierten Dehydrierung von *N*-Heterozyklen in Wasser

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Sasai durchgeführt und ein Großteil der Experimente wurden von der Autorin im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Sasai am *Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR)* der Universität Osaka durchgeführt.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

7.3.1 Katalysator-Screening

Mit dem Ziel der Etablierung einer Vanadium-katalysierten Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen unter milden Reaktionsbedingungen wurde zunächst ein Katalysator-Screening durchgeführt. In den initialen Experimenten wurden drei kommerziell erhältliche Vanadium-Katalysatoren ($\text{VO}(\text{SO}_4)$, NaVO_3 , $\text{VO}(\text{OEt})_3$) und sieben Oxovanadium(V)-Katalysatoren, die mono- und dinukleare Vanadium-Komplexe umfassen (Schema 7.13), gegen 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) als Modellsubstrat getestet. Das Screening wurde unter Luftatmosphäre für 17 h bei 70 °C und 50 °C in destilliertem Wasser (dH_2O) mit 5 mol% der dinuklearen Vanadium-Komplexe und 10 mol% im Falle der mononuklearen Vanadium-Komplexe durchgeführt (Schema 7.13).



Schema 7.13. Screening von mono- und dinuklearen Vanadium-Katalysatoren zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**)

Von den drei getesteten kommerziell erhältlichen Vanadium-Katalysatoren konnte nur mit $\text{VO}(\text{OEt})_3$ ein sehr geringer Umsatz von 3% nach einer Reaktionszeit von 17 h bei 70 °C nachgewiesen werden, wohingegen mit den anderen beiden kommerziellen Vanadium-Katalysatoren keine Umsätze detektiert wurden (Abbildung 7.3). In Gegenwart der untersuchten Vanadium-Komplexe **A-G** konnten erfolgreiche Umsetzungen des Amins **14a** zu 2-Methylchinolin (**15a**) ohne Bildung von Nebenprodukten mit Umsätzen von 20-50% unter nicht optimierten Reaktionsbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 7.3). Da die Dehydrierung ohne Bildung von Nebenprodukten verläuft, erfolgte die Umsatzbestimmung über den Vergleich der Integrale eines Signals des Eduktes und des Produktes per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Über eine Simulation der Aufarbeitung mit

Mischungen definierter Verhältnisse des Amins **14a** und Chinolins **15a** wurde zudem ein Verlust einer der Verbindungen durch die Aufarbeitung ausgeschlossen. Bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C lieferte der mononukleare Vanadium-Komplex (*S*)-**D** mit 50% den höchsten Umsatz (Abbildung 7.3).

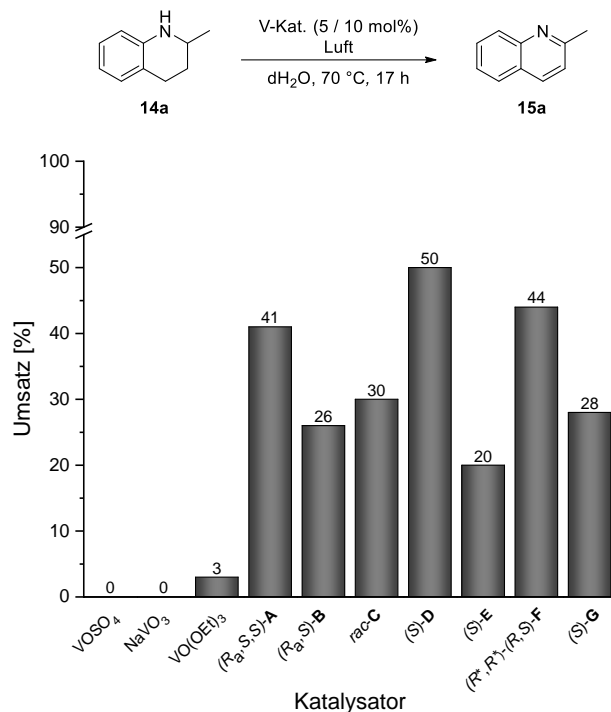


Abbildung 7.3. Katalysator-Screening zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) bei 70 °C

Im nächsten Schritt wurde das Screening bei einer verringerten Reaktionstemperatur von 50 °C wiederholt, um den besten Vanadium-Komplex für die Dehydrierung bei einer möglichst geringen Reaktionstemperatur zu identifizieren (Abbildung 7.4). Alle getesteten Vanadium-Komplexe katalysieren die Dehydrierung des Amins **14a** auch bei 50 °C mit Umsätzen von 13-39% nach einer Reaktionszeit von 17 h (Abbildung 7.4). Im Vergleich zu den Umsätzen bei 70 °C fallen die Umsätze bei einer verringerten Temperatur und gleichbleibender Reaktionszeit entsprechend geringer aus. Die besten Umsätze von 39% bzw. 36% konnten bei 50 °C mit den Vanadium-Komplexen (*R_a*,*S,S*)-**A** und (*S*)-**D** erreicht werden (Abbildung 7.4). Eine Unterscheidung der Enantiomere des 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) in der Dehydrierungsreaktion wurde in allen Fällen nicht beobachtet, sodass theoretisch ein quantitativer Umsatz des Amins **14a** zum gewünschten Produkt **15a** unter milden Reaktionsbedingungen erreicht werden kann.

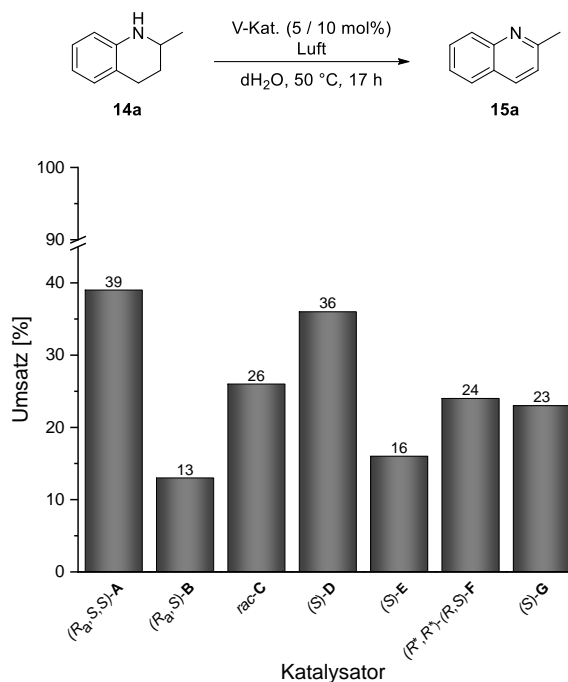


Abbildung 7.4. Katalysator-Screening zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) bei 50 °C

Im Rahmen des Katalysator-Screenings wurden die beiden Vanadium-Komplexe (*R_a,S,S*)-**A** und (*S*)-**D** als geeignetste Katalysatoren für die Dehydrierung identifiziert. Für die Optimierung wurde der Komplex (*S*)-**D** ausgewählt, der bereits nach 17 h und 50 °C mit 36% den zweithöchsten Umsatz zur Dehydrierung von Tetrahydrochinaldin (**14a**) zeigte. Ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Katalysators für die Optimierung ist der einfache Zugang über eine einstufige Synthese aus kommerziell erhältlichen Edukten (siehe Kapitel 10.8.2.1).

7.3.2 Einfluss des Reaktionsgefäßes auf die Dehydrierung des Amins **14a**

Im Anschluss an das Katalysator-Screening, bei dem alle Reaktionen in verschraubbaren Reagenzgläsern durchgeführt wurden, wurden Dehydrierungsreaktionen in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt. So wurde die Reaktion in Schlenk-Rohren (7 mL Fassungsvermögen) und in Glasgefäßen (1.5 mL Fassungsvermögen) ausgeführt (Abbildung 7.5). Die Dehydrierungsreaktion in dem Glasgefäß erreichte unabhängig von der Reaktionszeit unter Luftatmosphäre lediglich Umsätze von 19%, wohingegen keine Limitierung im Umsatz bei der Durchführung im Schlenk-Rohr zu beobachten war. Der einzige Unterschied der beiden Reaktionsgefäße besteht in dem Luftvolumen oberhalb der Reaktionslösung und unterscheidet sich damit in dem Volumen an Sauerstoff, das für die Reaktion zur Verfügung

steht. Zur Vergleichbarkeit der Reaktionen im Rahmen der Optimierung der Dehydrierung wurden daher alle Reaktionen in Schlenk-Rohren durchgeführt.



Abbildung 7.5. Reaktionsgefäße, die zur Dehydrierung von **14a** getestet wurden, links: Schlenk-Rohr mit 7 mL Fassungsvermögen, rechts: Glasgefäß mit 1.5 mL Fassungsvermögen

7.3.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Reaktionen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden unter Luftatmosphäre mit dem Vanadium-Komplex (S)-**D** durchgeführt. Da sich im Katalysator-Screening bereits gezeigt hatte, dass der Umsatz bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C mit dem Komplex (S)-**D** nach 17 h nur moderat ist und die Reaktionszeit bei möglichst geringer Temperatur ebenfalls kurz gehalten werden sollte, wurden die Optimierungsreaktionen bei einer Temperatur von 60 °C durchgeführt.

7.3.3.1 Optimierung der Katalysator- und Substratbeladung

Im ersten Schritt der Optimierung wurde der Einfluss der Katalysatorbeladung untersucht. Hierzu wurde 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) in Gegenwart verschiedener Katalysatorbeladungen des Vanadium-Komplexes (S)-**D** von 2.5-20 mol% für 24 h bei 60 °C umgesetzt (Abbildung 7.6). Erwartungsgemäß stieg der Umsatz des Amins **14a** mit Erhöhung der Katalysatorbeladung, sodass der höchste Umsatz von 60% mit 20 mol% (S)-**D** erreicht wurde. Als Kompromiss zwischen hohem Umsatz und einer ökonomischen Verwendung des Katalysators wurde eine Katalysatorbeladung von 10 mol%, die einen Umsatz von 44% nach 24 h Reaktionszeit lieferte, für die weitere Optimierung ausgewählt (Abbildung 7.6).

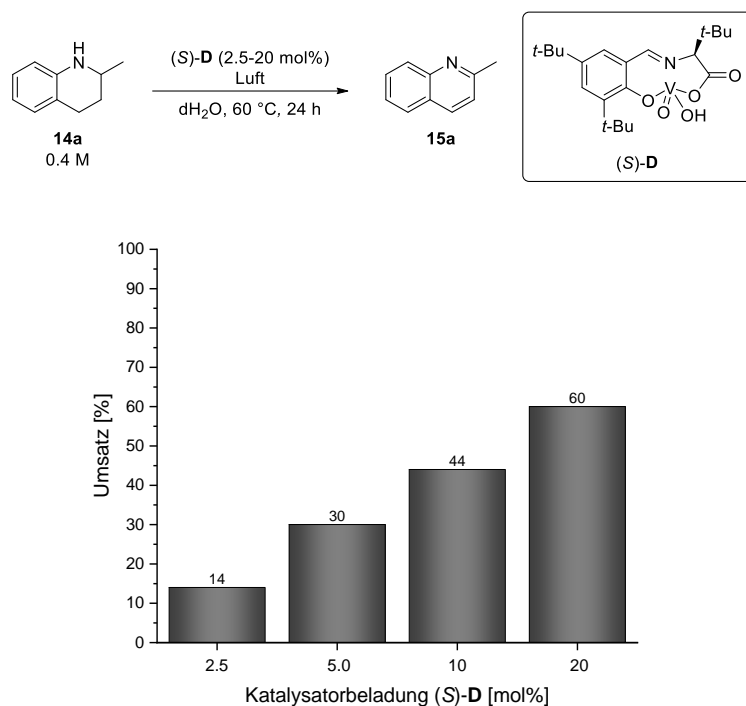


Abbildung 7.6. Optimierung der Katalysatorbeladung zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**)

Daraufhin wurde die optimale Substratkonzentration zur Dehydrierung des Amins **14a** evaluiert. Hierbei wurde die Konzentration des Substrates **14a** von 0.1-1.0 M bei einer Katalysatorbeladung des Komplexes (S)-**D** von 10 mol% und einer Reaktionszeit von 24 h variiert (Abbildung 7.7).

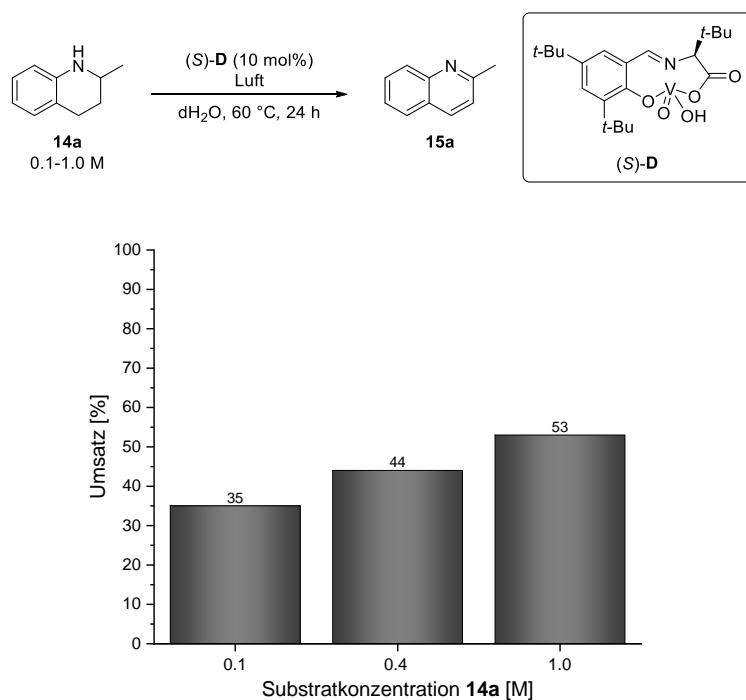


Abbildung 7.7. Optimierung der Substratkonzentration zur Dehydrierung von **14a**

Interessanterweise konnte bei einem konstanten Verhältnis von Substrat zu Katalysator eine Erhöhung des Umsatzes mit steigender Substratkonzentration beobachtet werden. Als

optimale Substratkonzentration wurde eine mittlere Konzentration von 0.4 M gewählt, die einen Umsatz von 44% nach einer Reaktionszeit von 24 h bei 60 °C lieferte (Abbildung 7.7).

7.3.3.2 Untersuchung des Einflusses von Tensiden und Cosolventien

Mit der optimalen Katalysatorbeladung und der optimalen Substratkonzentration wurde aufgrund der geringen Löslichkeit des Oxovanadium-Komplexes (*S*)-**D** und des Substrates **14a** in Wasser der Effekt von Tensiden in katalytischen Mengen auf die Dehydrierung bei der optimalen Substratkonzentration und Katalysatorbeladung evaluiert. Es wurden das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS), das neutrale Triton X-100 und das kationische Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) getestet (Abbildung 7.8). Die Zugabe von 5 mol% der Tenside hatte jedoch keinen signifikant positiven Einfluss auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**). Die Anwesenheit des kationischen Tensids TBAB wirkte sich sogar eher negativ auf die Umsetzung des Amins **14a** aus, da ein Abfall des Umsatzes von 44% ohne Tensid auf 37% in Anwesenheit von 5 mol% TBAB beobachtet wurde (Abbildung 7.8).

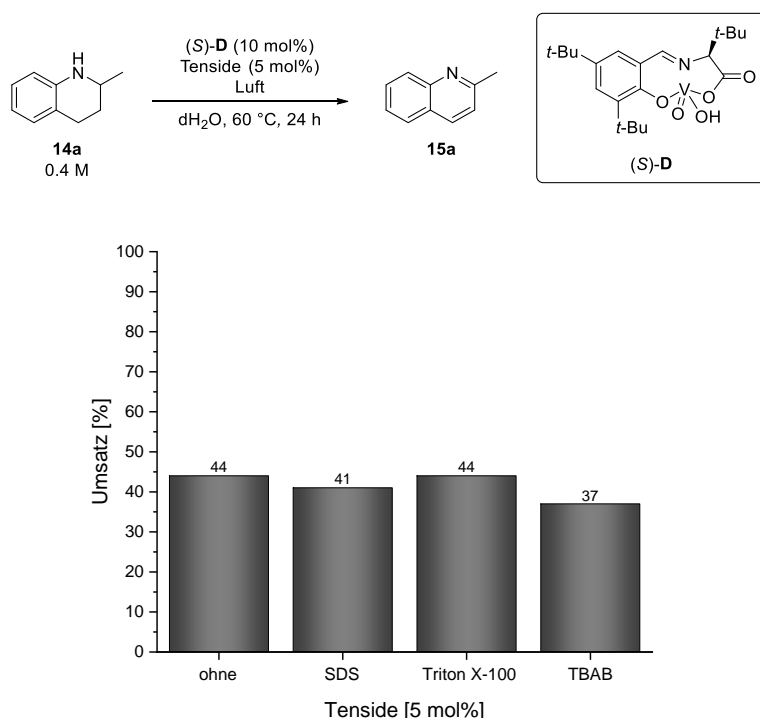


Abbildung 7.8. Untersuchung des Einflusses von Tensiden auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**)

Darüber hinaus wurde der Einfluss wassermischbarer Cosolventien auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) bei 60 °C und einer Reaktionszeit von 24 h untersucht. Hierfür wurden Methanol und DMSO jeweils in Konzentrationen von 10% v/v und 20% v/v untersucht (Abbildung 7.9). Auch die Addition von Cosolventien bewirkte keine Erhöhung des Umsatzes des Amins **14a**, wirkte sich im Gegenteil sogar eher negativ

auf den Umsatz aus. Während in Gegenwart von DMSO nur ein leichter Abfall des Umsatzes von 44% ohne Cosolvent auf 39 bzw. 40% beobachtet wurde, sank der Umsatz in Gegenwart von 10 bzw. 20% v/v Methanol signifikant auf 30% (Abbildung 7.9).

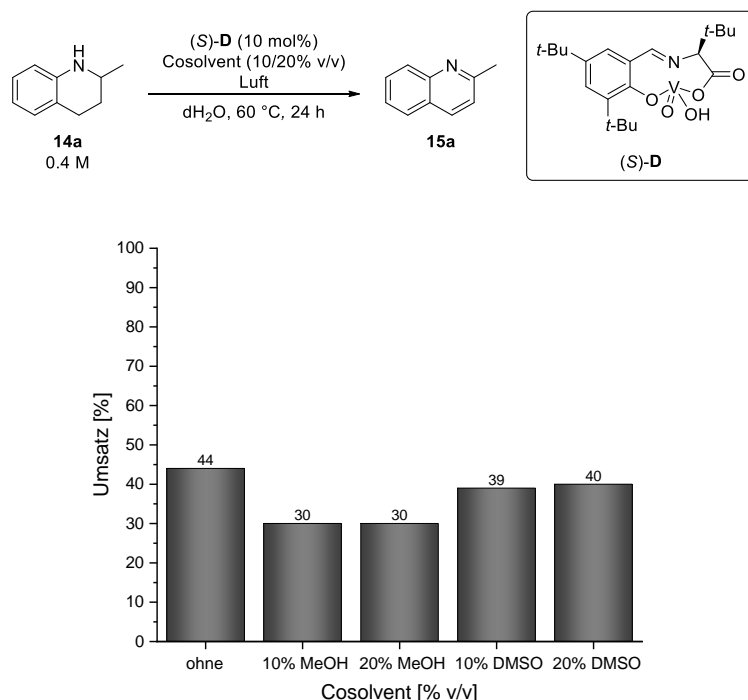


Abbildung 7.9. Untersuchung des Einflusses von Cosolventien auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**)

7.3.3.3 Einfluss der Reaktionszeit unter Luftatmosphäre

Da die Umsätze zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) im Rahmen der bisher vorgestellten Optimierungsreaktionen lediglich moderat waren und gute bis quantitative Umsätze zur Etablierung einer effizienten Dehydrierungsreaktion wünschenswert sind, wurde im nächsten Schritt die Reaktionszeit verlängert um den Einfluss der Reaktionszeit auf die Dehydrierung zu untersuchen und einen Eindruck über die Stabilität des Katalysators zu erhalten. Der Umsatz des Amins **14a** zum Produkt **15a** stieg mit Erhöhung der Reaktionszeit von 24 h auf 48 h an und erreichte nach einer Reaktionszeit von 72 h einen guten Umsatz von 90% (Abbildung 7.10). Dieses Experiment lässt zudem auf eine hohe Stabilität des Oxovanadium-Komplexes (S)-D schließen, da bei einer Reaktionszeit von 72 h in den letzten 24 h noch eine Umsatzsteigerung von 27% im Vergleich zum Umsatz bei 48 h zu beobachten war (Abbildung 7.10).

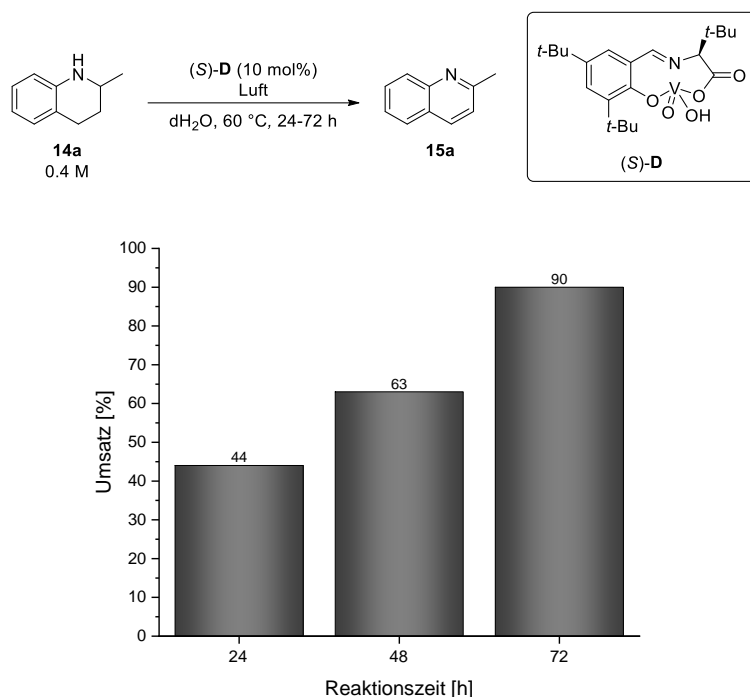


Abbildung 7.10. Untersuchung des Einflusses der Reaktionszeit auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) unter Luftatmosphäre

7.3.3.4 Untersuchung des Einflusses von Oxidationsmitteln

Die positiven Ergebnisse zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) mit dem Oxovanadium-Komplex (S)-D motivierten die Autorin den Effekt von Oxidationsmitteln auf die Dehydrierung des Amins **14a** zu untersuchen. Zunächst wurde der Einfluss von Peroxiden anhand von Wasserstoffperoxid und *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) untersucht. Die Reaktionen hierzu wurden aufgrund der Instabilität der Peroxide bei erhöhten Temperaturen für 24 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Ohne Zusatz von einem Oxidationsmittel war der Umsatz des Amins **14a** unter Umgebungsluftatmosphäre bei Raumtemperatur mit 10% entsprechend gering. Durch Addition von 1.5 Äquivalenten Wasserstoffperoxid wurde ein signifikanter Anstieg im Umsatz der Dehydrierungsreaktion auf 51% nach 24 h nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte durch Zugabe von 1.5 Äquivalenten TBHP keine signifikante Umsatzsteigerung gegenüber dem Vergleichsversuch beobachtet werden (Abbildung 7.11).

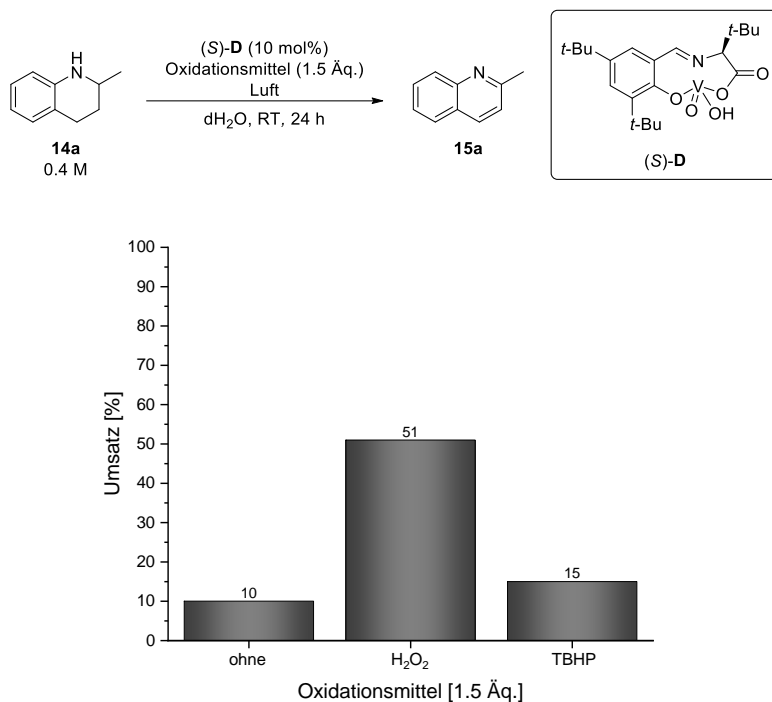


Abbildung 7.11. Untersuchung des Einflusses von Oxidationsmitteln auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) bei Raumtemperatur

Außerdem wurde der Einfluss von Sauerstoff als mildes und umweltfreundliches Oxidationsmittel auf die Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinaldin (**14a**) bei der im Rahmen der Optimierung standardmäßig verwendeten Reaktionstemperatur von 60 °C evaluiert. Unter Sauerstoffatmosphäre konnte ein signifikant gesteigerter Umsatz von 76% gegenüber der Reaktion unter Luftatmosphäre nachgewiesen werden. Aufgrund der positiven Eigenschaften von Sauerstoff als mildes und einfach handhabbares Oxidationsmittel wurde getestet, ob Sauerstoff ein geeignetes Oxidationsmittel zur effektiven Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) unter Einsatz des Oxovanadium-Komplexes (**S**)-**D** mit hohen Umsätzen darstellt. Über die Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 h konnte ein sehr guter Umsatz des Amins **14a** zum gewünschten Produkt 2-Methylchinolin (**15a**) von 91% ermittelt werden (Abbildung 7.12). Aufgrund dessen wurde Sauerstoff als Oxidationsmittel für eine effektive Dehydrierung ausgewählt.

Die optimierten Reaktionsbedingungen zur Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) unter Einsatz des Oxovanadium-Komplexes (**S**)-**D**, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, sind im Folgenden kurz zusammengefasst: 0.4 M Substratkonzentration, 10 mol% Vanadium-Komplex (**S**)-**D**, 60 °C Reaktionstemperatur, Sauerstoffatmosphäre und 48 h Reaktionszeit.

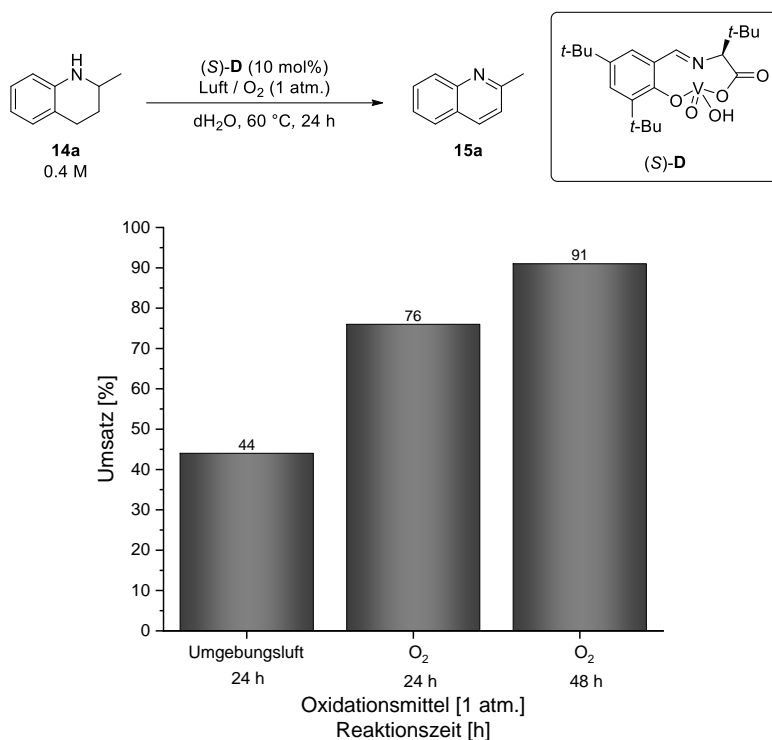
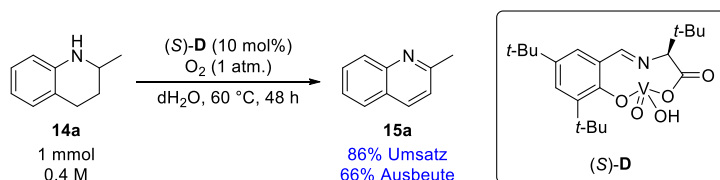


Abbildung 7.12. Untersuchung des Einflusses von Sauerstoff auf die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**15a**) bei Raumtemperatur

7.3.4 Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) im 1 mmol Maßstab

Mit den optimierten Reaktionsbedingungen wurde die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) im 10-fach vergrößerten Labormaßstab (2.5 mL) mit einer Substratbeladung von 1 mmol durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 48 h wurde das Edukt **14a** mit einem Umsatz von 86% zum entsprechenden Produkt dehydriert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde 2-Methylchinolin (**15a**) mit einer Ausbeute von 66% und einer Reinheit von 99% (per ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt) erfolgreich isoliert (Schema 7.14). Das positive Ergebnis der Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinaldin (**14a**) im vergrößerten Labormaßstab zeigt die Anwendbarkeit und Robustheit des etablierten Dehydrierungsprozesses auf.

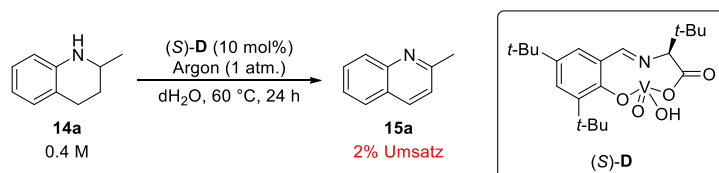


Schema 7.14. Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) im vergrößerten Labormaßstab (2.5 mL)

7.3.5 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Vanadium-katalysierten Dehydrierung

Die herausragenden Ergebnisse zur Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinaldin (**14a**) motivierten die Autorin in Kooperation mit Sako, Takizawa und Sasai der Universität Osaka einen plausiblen Mechanismus für die Dehydrierungsreaktion unter Einsatz des Oxovanadium-Komplexes (*S*)-**D** zu postulieren. Hierzu wurden zunächst einige Experimente durchgeführt um einen Eindruck zu erhalten, welches das Kupplungsprodukt der Dehydrierungsreaktion ist. Grundsätzlich sind zwei bzw. drei Coprodukte denkbar. Zum einen könnte Wasserstoff als Kupplungsprodukt entstehen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Sauerstoff im Rahmen der Dehydrierungsreaktion als Cosubstrat und somit als Akzeptor von Wasserstoff benötigt wird und Wasser bzw. Wasserstoffperoxid als Kopplungsprodukt entsteht. Das Ziel war also zunächst Wasserstoff bzw. Wasser oder Wasserstoffperoxid als Kupplungsprodukt der Dehydrierungsreaktion zu identifizieren.

Hierzu wurde die Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinaldin (**14a**) mit dem Vanadium-Komplex (*S*)-**D** im ersten Schritt unter inerten Reaktionsbedingungen bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C und einer Reaktionszeit von 24 h wiederholt. In diesem Versuch konnte nur ein sehr geringer Umsatz von 2% zum Produkt 2-Methylchinolin (**15a**) nachgewiesen werden (Schema 7.15).



Schema 7.15. Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**15a**) unter inerten Bedingungen

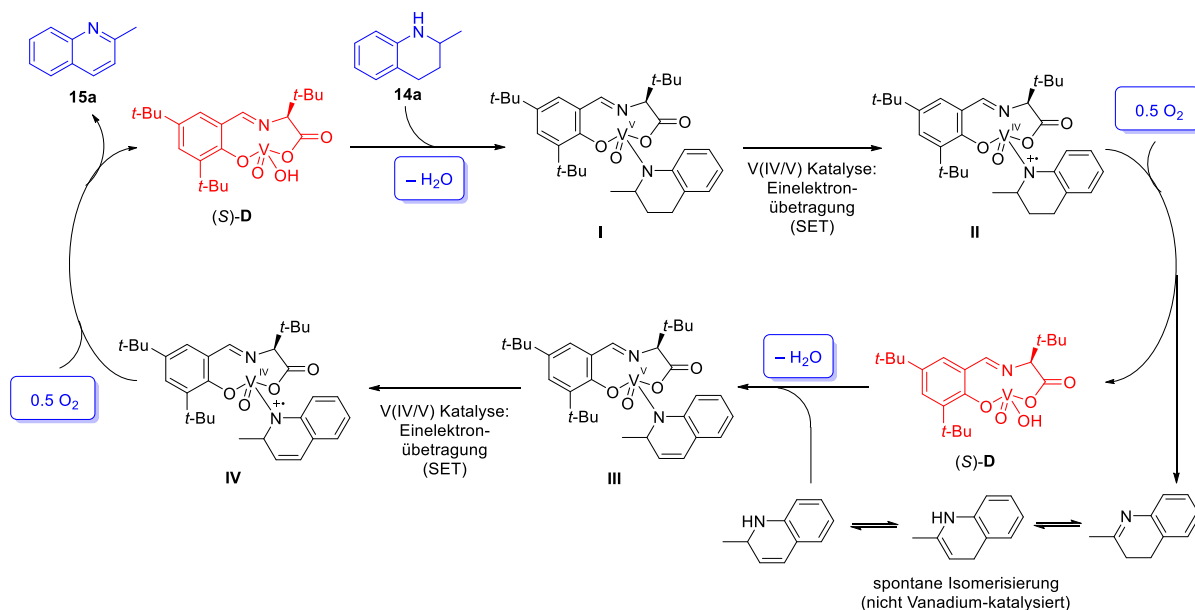
Der sehr geringe Umsatz der Dehydrierung von **14a** unter inerten Bedingungen ist im Einklang mit den Beobachtungen der Autorin, dass der Reaktionsverlauf der Dehydrierung unter Luftatmosphäre vom Reaktionsgefäß und damit vom Luftvolumen bzw. der Menge an Sauerstoff über der Reaktionsmischung abhängt (siehe Kapitel 7.3.2). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Sauerstoff als Cosubstrat in der Dehydrierungsreaktion benötigt wird, um als Akzeptor von Wasserstoff zu dienen. Demnach kann Wasserstoff als Kupplungsprodukt ausgeschlossen werden.

Um einen Eindruck zu erhalten, ob Wasser oder Wasserstoffperoxid als Kupplungsprodukt der Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinaldin (**14a**) entsteht, wurde während der Dehydrierungsreaktion mit Hilfe von Peroxid-Teststäbchen auf Wasserstoffperoxid in der Reaktionslösung getestet. Sowohl nach einer Reaktionszeit und 4 h als auch nach 24 h konnte kein Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. In einem Kontrollexperiment wurde zudem die Stabilität von Wasserstoffperoxid bei 60 °C unter Sauerstoffatmosphäre

überprüft. Hierbei konnte sowohl nach 4 h als auch nach 24 h Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden. Dieses Experiment unterstützt die Vermutung, dass Wasser als Kupplungsprodukt entsteht, was jedoch nicht vollständig bewiesen werden kann. Es wäre auch möglich, das Wasserstoffperoxid als Kupplungsprodukt entsteht, welches in geringen Konzentrationen unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil ist und daher direkt weiter zu Wasser reduziert wird bzw. sich zu Wasser und Sauerstoff zersetzt. Alternativ könnte über die Reduktion von Sauerstoff auch eine Peroxovanadium-Verbindung (als H_2O_2 -Derivat) gebildet werden, die unter Regeneration des Oxovanadium-Katalysators Wasser freisetzt.

Diese Beobachtungen und Schlüsse wurden bei der Postulierung eines plausiblen Mechanismus zur Dehydrierung von 1,2,3,4-Tetrahydrochinaldin (**14a**) unter Einsatz des Vanadium-Komplexes (*S*)-**D** berücksichtigt. Im ersten Schritt des postulierten Mechanismus erfolgt die Koordination desamins **14a** durch den Vanadium-Komplex zur Bildung des Intermediats **I** unter Abspaltung von Wasser. Im nächsten Schritt erfolgt eine Eielektronübertragung (*single electron transfer* (SET)) des elektronenreichen Stickstoffs auf den Vanadium-Komplex unter Bildung von **II**. Eine anschließende homolytische Spaltung der C-H Bindung führt zur Bildung eines Imins, welches aus dem Oxovanadium-Komplex freigesetzt wird. Das Imin isomerisiert spontan über 1,4-Dihydrochinaldin zu 1,2-Dihydrochinaldin und es findet eine Oxidation des Oxovanadium-Komplexes mit Sauerstoff statt, die zur Regeneration des Vanadium-Komplexes (*S*)-**D** führt. Die spontane Isomerisierung ist in Übereinstimmung mit quantenmechanischen Berechnungen von Sun *et al.*^[350] Der regenerierte Vanadium-Komplex kann unter Wasserabspaltung und Bildung des Komplexes **III** daraufhin 1,2-Dihydrochinaldin koordinieren. Über einen weiteren SET entsteht Komplex **IV**, der im letzten Schritt unter Verbrauch von Sauerstoff zum (regenerierten) Vanadium-Komplex (*S*)-**D** und 2-Methylchinolin (**15a**) umgesetzt wird (Schema 7.16).

Die Hypothese der Eielektronübertragung des Vanadium-Amin-Komplexes stimmt mit der These von Zhu *et al.*^[378] für die artverwandte Vanadium-katalysierte oxidative Strecker-Reaktion überein.



Schema 7.16. Vorschlag eines Reaktionsmechanismus zur Dehydrierung von **14a**

7.3.6 Erweiterung des Substratspektrums

Im letzten Schritt wurde das Substratspektrum der von der Autorin etablierten Dehydrierungsmethode untersucht. Hierzu wurden weitere Tetrahydrochinoline **14**, Tetrahydrochinoxaline **16**, 9,10-Dihydroacridin (**17**), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (**18**) und 2-Methylpiperidin (**19**) als Substrate in der Dehydrierung unter Verwendung des Vanadium-Komplexes (S)-**D** getestet (Abbildung 7.13). 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14b**) und die Tetrahydrochinoline **14c** und **14d**, die verschiedene elektronenschiebende Substituenten an der Position 6 tragen, wurden unter den optimierten Reaktionsbedingungen mit dem Vanadium-Komplex (S)-**D** effizient dehydriert und zeigten exzellente Umsätze von 99-100% (Abbildung 7.13). Das elektronenarme Tetrahydrochinolin **14e** wurde unter Verwendung des Katalysators (S)-**D** ebenfalls quantitativ zum entsprechenden Produkt umgesetzt. Der Umsatz für das Tetrahydrochinolin **14f**, mit einem elektronenziehenden und sterisch anspruchsvollen Substituenten an der C6-Position, war hingegen mit 89% nach 48 h Reaktionszeit etwas geringer (Abbildung 7.13).

Außerdem wurden zwei Tetrahydrochinoxaline **16a-b** mit unterschiedlichen Substituenten an der Position 2 als Substrate in der Dehydrierung untersucht. Die entsprechenden Chinoxaline mit einer Methylgruppe bzw. Phenylgruppe an der Position 2 wurden unter den optimalen Reaktionsbedingungen in quantitativen Umsätzen erhalten (Abbildung 7.13). 9,10-Dihydroacridin (**17**) konnte mit dem Vanadium-Komplex (S)-**D** ebenfalls mit einem hohen Umsatz von 82% effizient dehydriert werden, welches den Wert der etablierten

Dehydrierungsmethode unter Verwendung des Vanadium-Katalysators (*S*)-**D** erneut herausstellt (Abbildung 7.13).

Darüber hinaus wurden 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (**18**) und 2-Methylpiperidin (**19**) als Substrate untersucht. Allerdings konnte für diese beiden Edukte keine Bildung der entsprechenden Produkte beobachtet werden (Abbildung 7.13).

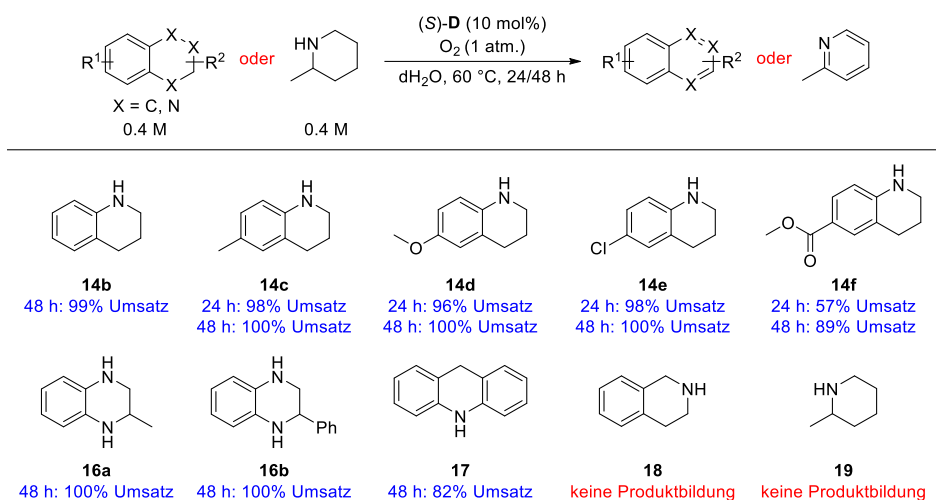


Abbildung 7.13. Untersuchung des Substratspektrums der Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen unter Verwendung des Vanadium-Komplexes (*S*)-**D**

Aus diesen Ergebnissen zur Erweiterung des Substratspektrums der Dehydrierung mit dem Vanadium-Komplex (*S*)-**D** schloss die Autorin, dass ein Aryl-substituiertes Amin eine strukturelle Voraussetzung für die etablierte Dehydrierungsreaktion darstellt.

In diesem Teilprojekt konnte eine effiziente Vanadium-katalysierte Dehydrierung für eine Reihe von Stickstoff-Heterozyklen erfolgreich etabliert werden. Die entwickelte Methode beruht auf der Verwendung von Vanadium als günstigem und uneingeschränkt verfügbarem Metall, die unter milden Bedingungen in Wasser als sicherem und günstigem Reaktionsmedium abläuft. Diese Katalysmethode wurde zudem erfolgreich auf die Dehydrierung von Tetrahydrochinolinen, Tetrahydrochinoxalinen und 9,10-Dihydroacridin angewandt und es konnte ein Reaktionsmechanismus postuliert werden.

Dieses Projekt wurde größtenteils im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in der Arbeitsgruppe von Sasai am *Institute of Scientific and Industrial Research* (ISIR) der Universität Osaka durchgeführt und die Ergebnisse dieses Kooperationsprojektes wurden gemeinsam mit den Kollegen der Arbeitsgruppe um Sasai in *Organic Letters* publiziert: N. Zumbrägel, M. Sako, S. Takizawa, H. Sasai, H. Gröger, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4723-4727.^[379]

7.4 Ausblick

Die im Rahmen dieses Projektes etablierte Methode zur Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen unter Verwendung des Vanadium-Komplexes (S)-**D** konnte erfolgreich auf die Dehydrierung von Tetrahydrochinolinen **14**, Tetrahydrochinoxalinen **16** und 9,10-Dihydroacridin (**17**) angewandt werden. Allerdings ist diese Methode auf Aryl-substituierte Amine beschränkt. Eine Optimierung des Vanadium-Katalysators mit dem Ziel der Etablierung einer Dehydrierung nicht Aryl-substituierter Amine wäre in Zukunft interessant, könnte allerdings aufgrund der vermuteten Instabilität der mono- und dinuklearen Vanadium-Komplexe in Gegenwart stark basischer Amine wie nicht Aryl-substituierter Amine eine große Herausforderung darstellen. Außerdem wäre eine Kombination aus Racematspaltung der zyklischen Amine und der Dehydrierung von großem Interesse. Dies könnte durch eine Optimierung des Vanadium-Komplexes erreicht werden, sodass lediglich ein Enantiomer des Amins dehydriert wird bzw. bevorzugt umgesetzt wird. So könnten in einer Reaktion zwei bedeutende Produkte, ein enantiomerenreines zyklisches Amin und einen aromatischer Stickstoff-Heterozyklus erhalten werden, wenn auch nur jeweils mit einer maximalen Ausbeute von 50%.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Synthese von Stickstoff-Heterozyklen unter Einsatz einer Vielzahl nachhaltiger Synthese- und Katalysemethoden in fünf Projekten adressiert. Hierzu wurden insbesondere die Biokatalyse, Vanadium-Katalyse und Heterozyklenchemie angewandt.

Im ersten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Optimierung und Prozessentwicklung von IRED-katalysierten Reaktionen, welche als Grundlage für alle weiteren biokatalytischen Umsetzungen im Rahmen dieser Arbeit diente. Anhand der Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) wurden zunächst die Reaktionsparameter optimiert und die Kinetik der Modellreaktion im Detail untersucht. Mit dem Ziel einen effizienten Prozess zu entwickeln, wurden daraufhin drei verschiedene Ganzzell-Katalysatoren konstruiert und evaluiert. Das Zwei-Plasmid-System wurde als bestes Konstrukt ausgewählt, welches über die Wahl der Vektoren ein „Feintuning“ in der Expression der Iminreduktase und der Glucose-Dehydrogenase, die zur *in situ*-Regeneration des Cofaktors NADPH verwendet wurde, erlaubt (Abbildung 8.1A). In präparativen Biotransformationen wurde die biokatalytische Reduktion des zyklischen Imins **1** erfolgreich bis zu einer Substratkonzentration von 100 mM bei einer geringen Biokatalysatorbeladung von 0.1 g lyophilisierten Zellen pro mmol Substrat mit einem exzellenten Umsatz von 96% und einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von > 99% ee zugunsten des (*R*)-Enantiomers von **2** etabliert (Abbildung 8.1B).

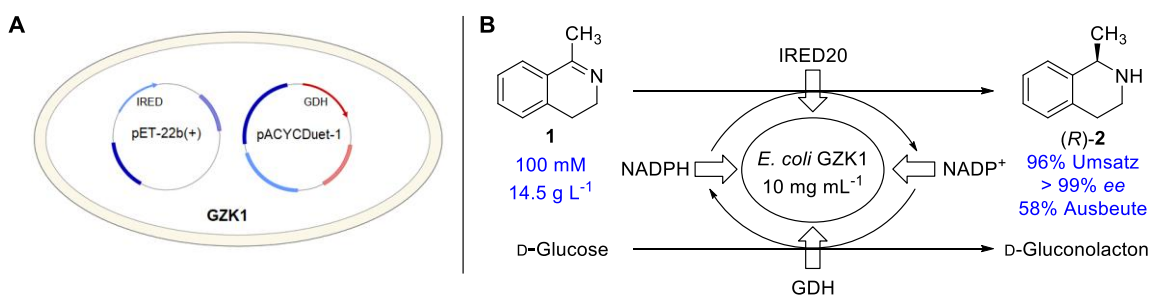
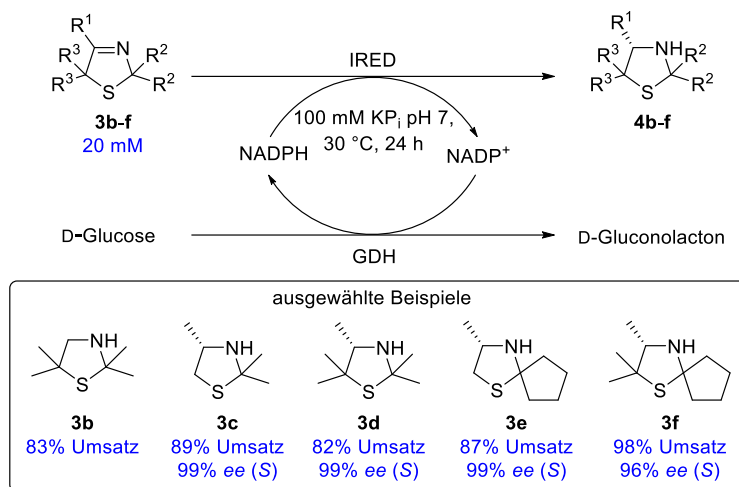


Abbildung 8.1. Prozessentwicklung der IRED-katalysierten Reduktion von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) **A** Verwendeter Ganzzell-Katalysator **B** Reduktion des Imins **1** bei einer Substratkonzentration von 100 mM

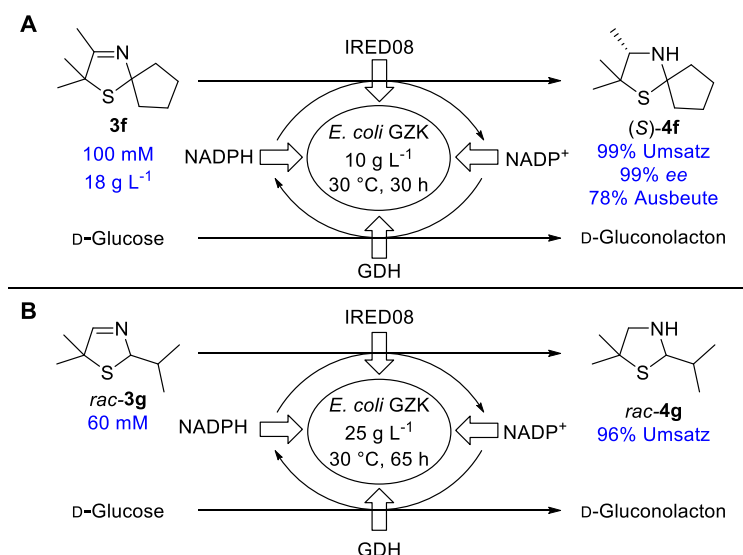
Der Fokus im zweiten Teil der Arbeit lag auf der biokatalytischen Darstellung von schwefel- und sauerstoffhaltigen zyklischen Aminen als bedeutende Struktur motive. Nach größtenteils erfolglosen Versuchen konnte im Rahmen dieser Arbeit die erste hoch enantioselektive Methode zur Reduktion von 3-Thiazolinen **3** über eine biokatalytische Reduktion unter Einsatz von Iminreduktasen etabliert werden. Alle untersuchten 3-Thiazoline **3a-h** wurden mit einer exzellenten Produktselektivität ohne Bildung von Nebenprodukten und guten Umsätzen zu den entsprechenden Aminen umgesetzt. Alle

prochiralen 3-Thiazoline **3c-f** konnten zudem mit exzellenten Enantioselektivitäten (> 96% ee) zu den entsprechenden (*S*)-3-Thiazolidinen **4c-f** umgesetzt werden (Schema 8.1).



Schema 8.1. Biokatalytische Reduktion zur (enantioselektiven) Darstellung von 3-Thiazolidinen

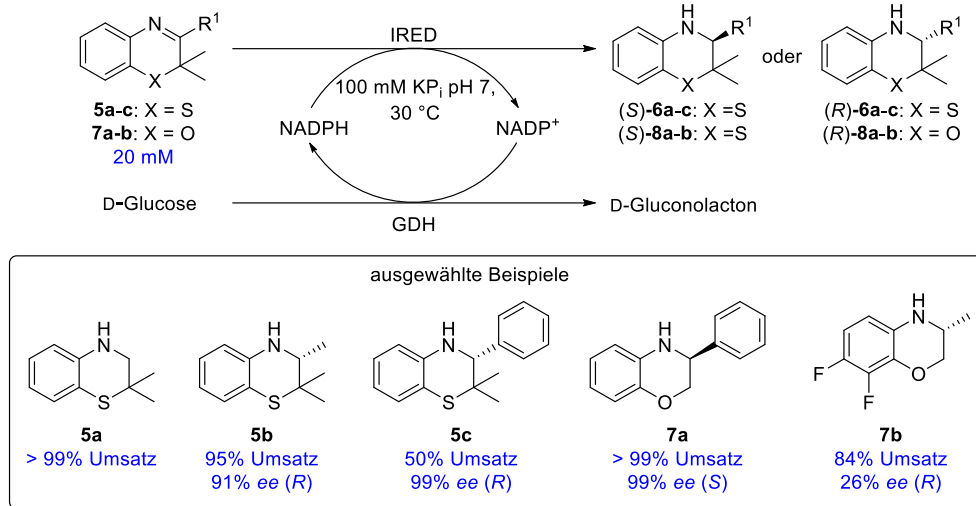
In einer Prozessentwicklung wurde zudem die Effizienz dieser biokatalytischen Technologie anhand der Reduktion des *spiro*-3-Thiazolins **3f** bei einer Substratbeladung von 18 g L⁻¹ demonstriert (99% Umsatz, 99% ee) (Schema 8.2A) und eine effiziente Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline mit einem Umsatz von 96% wurde im semipräparativen Maßstab realisiert (Schema 8.2B).



Schema 8.2. Biotransformationen von 3-Thiazolinen im **A** präparativen Maßstab (40 mL)
B semipräparativen Maßstab (10 mL)

Außerdem wurde die Methode erfolgreich auf die Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** als weitere Vertreter der schwefelhaltigen zyklischen Imine angewandt (Schema 8.3) und in DFT-Berechnungen konnten die beobachteten unterschiedlichen Aktivitäten zur Reduktion der 3-Thiazoline **3** und 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** nachvollzogen werden. Die Plattformtechnologie zur Reduktion schwefelhaltiger zyklischer Imine unter Einsatz von

Iminreduktasen konnte im Rahmen weiterer Arbeiten zudem auf 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** als sauerstoffhaltige zyklische Imine übertragen werden (Schema 8.3). Die im Rahmen dieses Projekts etablierte biokatalytische Methode stellt daher eine vielseitig anwendbare Technologie zur Reduktion von *S*- und *O*-haltigen zyklischen Iminen dar.



Schema 8.3. IRED-katalysierte Reduktion von 2*H*-1,4-Benzothiazinen und 2*H*-1,4-Benzoxazinen

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die biokatalytische Reduktionstechnologie zur enantioselektiven Darstellung von 3-Thiazolidinen in einer Eintopf-Synthese mit der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion verknüpft. Insgesamt wurde für zwei Prozesse, die eine Darstellung des 3-Thiazolidins (*S*)-**4f** ausgehend von einfachen und kostengünstigen Startmaterialien in einem Topf ermöglichen, jeweils ein *Proof of Concept* entwickelt (Abbildung 8.2A).

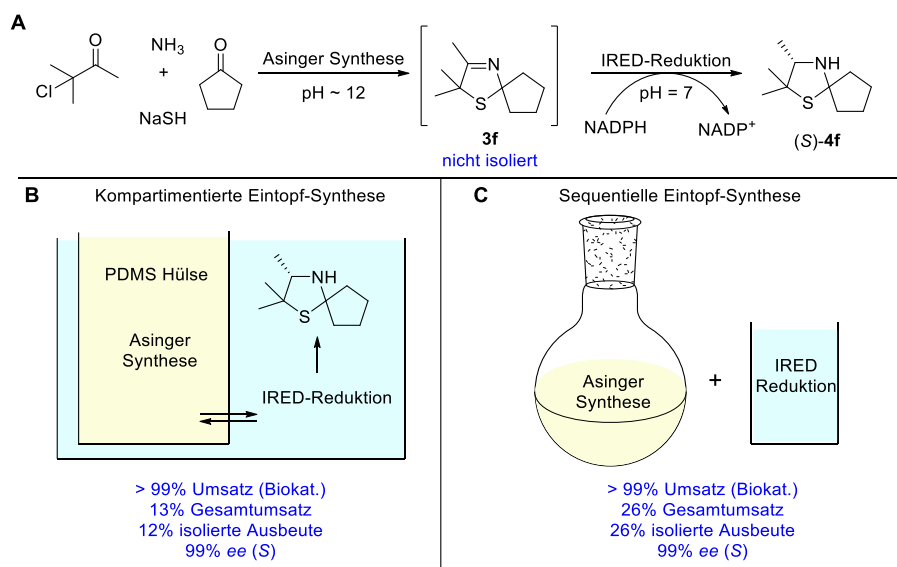


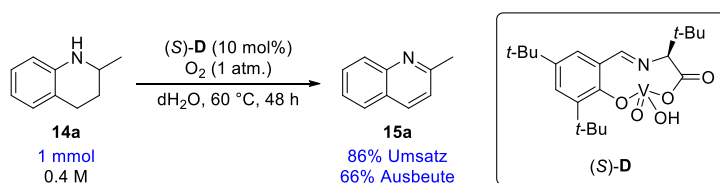
Abbildung 8.2. **A** Verknüpfung der Asinger-Synthese mit der IRED-katalysierten Reduktion in einer Eintopf-Synthese **B** Kompartmentierte Eintopf-Synthese **C** Sequentielle Eintopf-Synthese

Zum einen wurde eine kompartmentierte Eintopf-Synthese unter Anwendung von PDMS-Hülsen etabliert, mit der das 3-Thiazolidin (*S*)-**4f** mit einer isolierten

Gesamtausbeute von 12% erhalten wurde (Abbildung 8.2B). Zum anderen wurde eine sequentielle Eintopf-Synthese entwickelt über die (*S*)-**4f** mit einer verbesserten isolierten Gesamtausbeute von 26% erhalten wurde (Abbildung 8.2C). Die biokatalytische Reduktion des 3-Thiazolins **3f** zeigte in beiden Prozessen jeweils quantitativen Umsatz, was die Robustheit der in dieser Arbeit etablierten Reduktionstechnologie erneut unterstreicht.

Im vierten Teil dieser Arbeit wurden Studien zur biokatalytischen Darstellung von Hydrazinen bzw. Pyrazolidinen als weiteres wichtiges Strukturmotiv am Beispiel der enantioselektiven Reduktion von Hydrazonen unter Einsatz von IREDs durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine Iminreduktase zur Reduktion der Hydrazone **10** zu den entsprechenden Hydrazinen **11** identifiziert werden, sodass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Iminreduktasen nicht geeignet erscheinen zur enantioselektiven Darstellung von Hydrazinen **11**.

Der Fokus im fünften Teil dieser Arbeit lag auf der Entwicklung einer Vanadium-katalysierten Dehydrierung von Stickstoff-Heterozyklen unter milden Reaktionsbedingungen. Mit dem mononuklearen Vanadium-Komplex (*S*)-**D** konnte im Anschluss an ein Katalysator-Screening und die Optimierung der Reaktionsbedingungen eine effiziente Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) etabliert werden, die einen Umsatz von 86% zum gewünschten Produkt ohne Bildung von Nebenprodukten bei einer Substratbeladung von 1 mmol im 2.5 mL Maßstab zeigte. Zudem wurde das Produkt **15a** mit einer Ausbeute von 66% isoliert (Schema 8.4). Außerdem wurde ein Mechanismus für die Vanadium-katalysierte Dehydrierung von **14a** postuliert und die Methode wurde erfolgreich auf die Dehydrierung weiterer Tetrahydrochinoline **14**, Tetrahydrochinoxaline **16** und 9,10-Dihydroacridin (**17**) angewandt.



Schema 8.4. Vanadium-katalysierte Dehydrierung von **15a** im 2.5 mL Maßstab

9. ABSTRACT

This thesis focuses on the synthesis of nitrogen heterocycles in five projects by using a range of sustainable synthetic and catalytic methods, applying in particular biocatalysis, heterocyclic chemistry and vanadium catalysis.

The first part of the thesis deals with the optimization and process development of IRED-catalyzed reactions, which represents a basis for all biocatalytic reactions using imine reductases in this work. The optimization of the reaction conditions was performed for the reduction of 1-methyl-3,4-dihydroisoquinoline (**1**) and the enzyme kinetics of this model reaction was examined in detail afterwards. Toward the design of an efficient process, three different whole-cell catalysts were constructed and examined. The whole-cell catalyst containing the gene for the imine reductase and the gene for the glucose dehydrogenase, which is used for *in situ*-regeneration of the cofactor NADPH, on different plasmids was chosen as best catalyst, allowing a fine-tuning in the expression of both enzymes (Figure 9.1A). The biocatalytic reduction of the cyclic imine **1** was successfully performed up to a substrate concentration of 100 mM at a low biocatalyst loading of 0.1 g lyophilized cells per mmol substrate, showing excellent conversion of 96% and excellent enantioselectivity (> 99% ee) towards the (*R*)-enantiomer of **2** (Figure 9.1B).

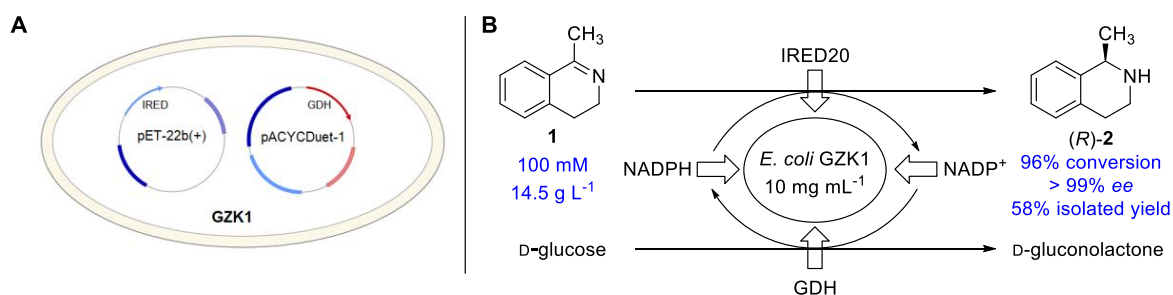
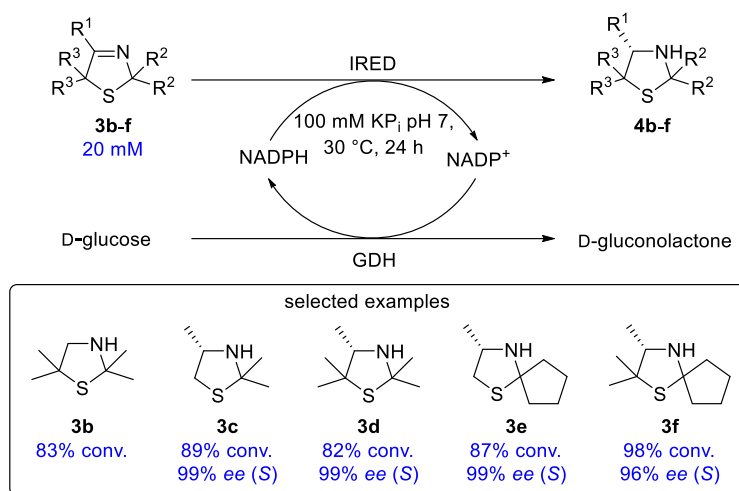


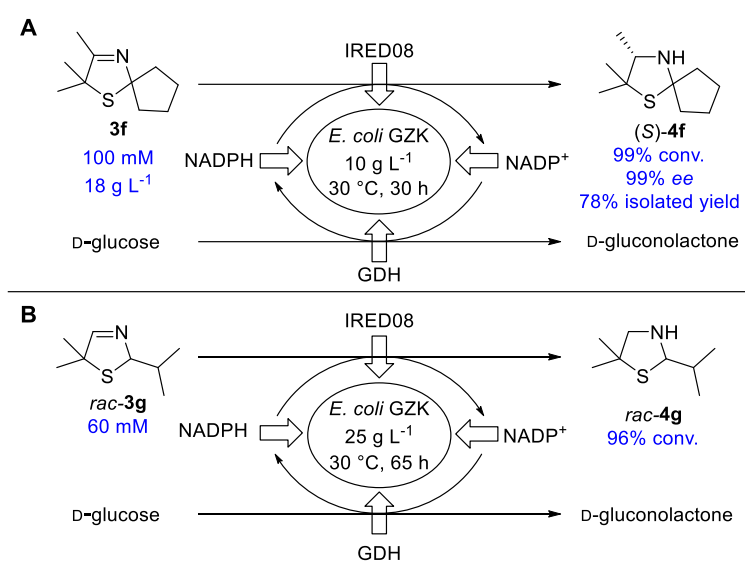
Figure 9.1. Process development of the IRED-catalyzed reduction of 1-methyl-3,4-dihydroisoquinoline (**1**) **A** best whole-cell catalyst **B** reduction of imine **1** at a substrate concentration of 100 mM

The second part of this thesis focuses on the biocatalytic synthesis of sulfur- and oxygen-containing cyclic amines, representing distinguished structural motifs in life science molecules. After mostly unsuccessful attempts, the first highly enantioselective method for the reduction of 3-thiazolines **3** was established in this thesis, which is using imine reductases as a biocatalyst. All examined 3-thiazolines **3a-h** were converted to the corresponding amines with perfect product selectivity and good conversions, avoiding any side reactions. Moreover, the prochiral 3-thiazolines **3c-f** were converted to the corresponding (*S*)-3-thiazolidines **4c-f** with excellent enantioselectivities (> 96% ee) (Scheme 9.1).



Scheme 9.1. Biocatalytic reduction for the (enantioselective) synthesis of 3-thiazolidines

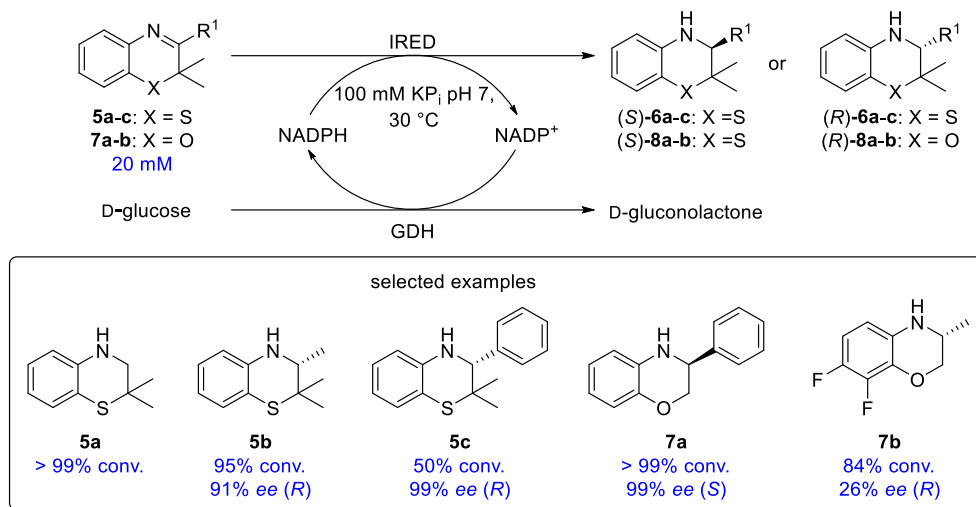
The efficiency of the established biocatalytic technology was demonstrated in a process development for the reduction of the *spiro*-cyclic compound **3f** at a substrate loading of 18 g L⁻¹ showing excellent conversion and enantioselectivity (99% conversion and 99% ee) (Scheme 9.2A). Moreover, an efficient reduction of 2-monosubstituted 3-thiazolines was realized on semi-preparative scale, showing 96% conversion towards the corresponding amine (Scheme 9.2B).



Scheme 9.2. Biotransformation of 3-thiazolines **A** on preparative scale (40 mL)
B on semi-preparative scale (10 mL)

Moreover, the biocatalytic method was successfully applied for the reduction of other sulfur-containing cyclic imines such as 2*H*-1,4-benzothiazines **5** (Scheme 9.3) and the different activities for the reduction of 3-thiazolines **3** and 2*H*-1,4-benzothiazines **5** could be understood by means of DFT calculations. The developed platform technology for the biocatalytic reduction of sulfur-containing cyclic imines was also successfully applied towards reduction of oxygen-containing cyclic imines, exemplified by

2*H*-1,4-benzoxazines **7** (Scheme 9.3). The established biocatalytic method therefore represents a versatile technology for the reduction of *S*- and *O*-containing cyclic imines.



Scheme 9.3. IRED-catalyzed reduction of 2*H*-1,4-benzothiazines and 2*H*-1,4-benzoxazines

The third part of this work focuses on merging Asinger-type multicomponent reaction and biocatalytic imine reductions towards synthesis of 3-thiazolidines **4** in one-pot. Proof of concepts for two different processes were developed for the synthesis of the 3-thiazolidine (*S*)-**4f** starting from easy and low-cost starting materials in one-pot (Figure 9.2A). On one hand, a compartmentalization approach using PDMS thimbles was established, yielding (*S*)-**4f** with 12% overall isolated yield (Figure 9.2B). On the other hand, a sequential approach was used, yielding (*S*)-**4f** with an improved overall isolated yield of 26% (Figure 9.2C). Quantitative conversion was observed for the biocatalytic step in both processes, which underlines the efficiency of the established biocatalytic method.

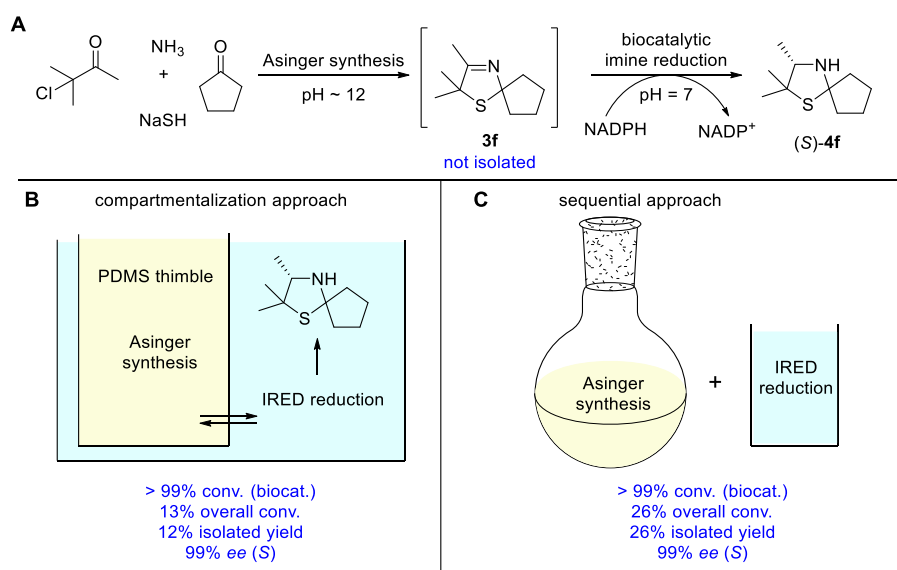
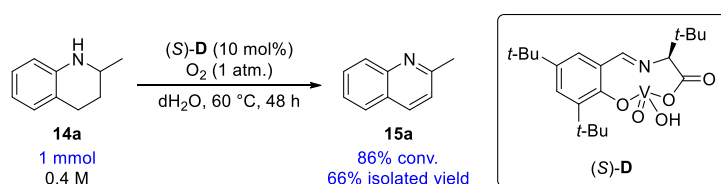


Figure 9.2. **A** Merging Asinger synthesis and IRED-catalyzed reduction in one-pot processes **B** Compartmentalization approach **C** Sequential approach

In the fourth part of this work the biocatalytic synthesis of hydrazines/pyrazolidines as important structural motifs was examined exemplified by the reduction of hydrazones using IREDs. Unfortunately, it was not possible to identify an imine reductase, which is performing the enantioselective reduction of hydrazones **10** to the corresponding hydrazines **11**. Accordingly, the IREDs tested in this work do not represent valuable catalysts for the enantioselective synthesis of hydrazines **11**.

The fifth part of this thesis focuses on the development of a vanadium-catalyzed dehydrogenation of nitrogen heterocycles under mild reaction conditions. An efficient dehydrogenation of 2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (**14a**) using the mononuclear vanadium complex (*S*)-**D** was realized after a catalyst screening and optimization of the reaction conditions, showing 86% conversion towards the desired product **15a** without any side reactions at a substrate loading of 1 mmol on 2.5 mL scale. Moreover, the product **15a** was obtained with 66% isolated yield (Scheme 9.4). Furthermore, a plausible reaction mechanism for the vanadium-catalyzed dehydrogenation of **14a** was proposed and the technology was successfully applied towards dehydrogenation of other tetrahydroquinolines **14**, tetrahydroquinoxalines **16** and 9,10-dihydroacridine (**17**).



Scheme 9.4. Vanadium-catalyzed dehydrogenation of **15a** on 1 mmol scale

10. EXPERIMENTELLER TEIL

10.1 Allgemeine chemische Methoden

Allgemeines

Alle Reaktionen mit hydrolyse- oder sauerstoffempfindlichen Reagenzien bzw. Produkten wurden in ausgeheizten Glasapparaturen unter Argonatmosphäre und Anwendung der Schlenk-Technik durchgeführt. Die zum Transfer der Lösungsmittel und Reagenzien verwendeten Spritzen und Kanülen wurden zuvor mehrmals mit Argon gespült. Analytische Biotransformationen wurden in Eppendorfgefäßen in den Thermomixern comfort von Eppendorf und MT100 von Universal-Labortechnik durchgeführt. Präparative Biotransformationen, die eine Konstanzhaltung des pH-Wertes erforderten, wurden mit dem pH-Stat Gerät TitroLine® alpha plus von SI Analytics durchgeführt.

Chemikalien

Kommerziell erhältliche Reagenzien und Chemikalien wurden von Acros Organics, Alfa Aesar, ABCR, Carl Roth, Deutero, Fluorochem, Gerbu, Merck, Oxchem, Sigma-Aldrich, VWR, Fisher Scientific, TCI in höchster Reinheit erworben und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Ethylacetat und Cyclohexan wurden in technischer Reinheit erworben und vor der Benutzung destilliert. Wasser wird als deionisiertes Wasser (dH₂O) bzw. Milli-Q® Wasser verwendet. Milli-Q® Wasser wurde aus deionisiertem Wasser mittels einer Milli-Q® Reinstwasseranlage von Merck erhalten.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel von Macherey-Nagel (Korngröße 40-63 µm) bei leichtem Überdruck oder unter Verwendung des Biotage® „Isolera One“ Säulenchromatographiesystems durchgeführt. Die verwendeten Laufmittel sind jeweils in Volumenverhältnissen (v/v) angegeben.

Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde mit DC Aluminiumfolien ALUGRAM® SILG/UV (0.2 mm Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit UV-Licht bei 254 nm oder mit Kaliumpermanganat als Tauchreagenz und anschließender Wärmebehandlung.

Kernmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern Bruker Advance II 500, Bruker Advance III 500HD und JEOL JMN ECS400 FT NMR bei einer Frequenz von 500 bzw. 400 MHz (^1H) oder 125 bzw. 100 MHz (^{13}C) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in *parts per million* [ppm] angegeben. Zur Kalibrierung wurde der Restprotonengehalt von Deuteriochloroform (^1H : $\delta = 7.26$ ppm, ^{13}C : $\delta = 77.16$ ppm) bzw. Deuteromethanol (^1H : $\delta = 3.31$ ppm, ^{13}C : $\delta = 49.00$ ppm) als interner Standard benutzt.^[380] Die Kopplungen (J) sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Multiplizität der Signale ist in Klammern angegeben und wird wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplett, t = Triplett, td = Triplett von Dublett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multipllett. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software MestReNova 8.1 (Mestrelab Research) ausgewertet.

Massenspektrometrie

Nano-ESI (Elektrospray-Ionisation) Massenspektren wurden mit dem Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer von Bruker Daltonik GmbH, ausgestattet mit einer Standard Nano-ESI Quelle, aufgenommen. Die Proben wurden über ein statisches Nano-ESI mittels gezogenen Glas-Emitter zerstäubt. Stickstoff wurde als Zerstäubungs- und Trocknungsgas verwendet und mittels eines Stickstoff Generator NGM 11 von Bruker erzeugt. Helium wurde als Kühlgas für die Ionenfalle verwendet. Die Spektren wurden mit der Software Bruker Daltonik esquireNT 5.2 esquireControl per Akkumulation und Mittelwertbildung der einzelnen Spektren aufgenommen und mit der Software DataAnalysis™ 3.4 prozessiert. Außerdem wurden Nano-ESI Massenspektren mit dem Q-IMS-TOF Massenspektrometer Synapt G2Si von Waters im Auflösungsmodus aufgenommen. Stickstoff wurde als Zerstäubungs- und Trocknungsgas verwendet und mittels eines Stickstoff Generator NGM 11 von Bruker erzeugt. Die Proben wurden über ein statisches Nano-ESI mittels gezogenen Glas-Emitter zerstäubt. Die Massenachse wurde extern mit GluFib Fragmentationen als Kalibrationsstandard kalibriert. Datenakkumulation und Prozessierung erfolgte mit der Software MassLynx 4.1 von Waters.

HRMS-ESI Massenspektren wurden mit dem Agilent 6220 Flugzeit-Massenspektrometer von Agilent Technologies im erweiterten Dynamikbereich, ausgestattet mit einer Dual-ESI Quelle, bei einer Emitter-Spannung von 2.5 kV durchgeführt. Stickstoff wurde als Zerstäubungs- und Trocknungsgas verwendet und über einen Stickstoff Generator NGM 11 von Bruker erzeugt. Die Proben wurden über ein 1200 HPLC System von Agilent Technologies, ausgestattet mit einer C18 Chromatographiesäule (Hypersil Gold, Länge: 50 mm, Durchmesser: 2.1 mm, Partikelgröße: 1.9 μm) mit Hilfe eines kurzen Gradienten (in 4 min von 0% B zu 98% B, zurück zu 0% B in 0.2 min, Gesamtlaufzeit: 7.5 min) bei einer Flussrate von 250 $\mu\text{L min}^{-1}$ und einer Säulenofentemperatur von 40 $^\circ\text{C}$ aufgetragen.

Das HPLC Solvens A besteht aus 94.9% Wasser, 5% Acetonitril und 0.1% Ameisensäure, Solvens B aus 5% Wasser, 94.9% Acetonitril und 0.1% Ameisensäure. Die Massenachse wurde extern mit einem ESI-L Tuning Mix von Agilent Technologies als Standard kalibriert. Die Spektren wurden mit der Software MassHunter Workstation Acquisition B.04.00 von Agilent Technologies aufgenommen und mit der Software MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 von Agilent Technologies prozessiert.

EI Massenspektren wurden mit dem Autospec X doppelt fokussierenden Magnet-Sektorfeld Massenspektrometer mit EBE Geometrie von Vacuum Generators, ausgestattet mit einer Standard EI-Quelle, aufgenommen. Die Proben werden über die Tiegelverdampfung eingebracht. Die Ionen werden mit 8 kV im EI Modus beschleunigt. Die Massenachse wurde extern mit Perfluorkerosin (PFK) als Kalibrationsstandard kalibriert. Die Spektren wurden mit der Software OPUS (V3.6, Micromass 1998) über die Akkumulation und Mittelwertbildung der einzelnen Spektren aufgenommen und prozessiert.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC-Messungen wurden mit dem LC2000 SFC-HPLC-System von Jasco (Pumpen PU-2080Plus, automatischer Rückdruckregler BP-2080Plus, Säulenthermostat CO-2060Plus, Multiwellenlängen-Detektor MD-2010Plus und Autosampler AS-2059Plus) durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit Chiralpak® Säulen von Daicel. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Galaxy Chromatography Data System.

Gaschromatographie (GC)

Es wurde das Gaschromatographie-System GC-2010 Plus mit AOC-20i/s Auto Injektor/Auto Sampler von Shimadzu mit Stickstoff als Trägergas verwendet. Zur Analyse wurde die Säule ZB-5MSi von Phenomenex (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; N₂; Linear Velocity: 46.9 cm s⁻¹; Split Modus 1:10; Total Flow: 28.8 mL min⁻¹; Purge Flow: 3.0 mL min⁻¹; Column Flow: 2.34 mL min⁻¹; Druck: 140.4 kPa) verwendet.

Drehwert-Bestimmung

Die Bestimmung von Drehwerten erfolgte mit dem Polarimeter Model 341 von PerkinElmer Instruments.

Schmelzpunkt-Bestimmung

Unkorrigierte Schmelzpunkte wurden mit dem Melting Point B-840 von Büchi bestimmt.

10.2 Allgemeine biochemische Methoden und verwendete Lösungen

Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Bakterienstämme *E. coli* BL21(DE3) (Expressionsstamm) und *E. coli* DH5a (Lagerstamm) verwendet.

Gene, Plasmide und Enzyme

Die Plasmide mit den Genen der Iminreduktasen wurden von Dr. Hans Iding und Dr. Dennis Wetzl (F. Hoffmann-La Roche AG) zur Verfügung gestellt. Die ganzen Zellen aus Hochzelldichtefermentation der Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* wurden von Dr. Daniel Bakonyi zur Verfügung gestellt. Die Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase wurden von Thermo Scientific bezogen.

Tabelle 10.1. Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz
pET-22b(+)	Carbenicillin
pACYCDuet-1	Chloramphenicol
pETDuet-1	Carbenicillin

Antibiotika und IPTG

Tabelle 10.2. Übersicht der verwendeten Antibiotika

	Stammkonzentration	Endkonzentration
Carbenicillin	100 mg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹
Chloramphenicol	34 mg mL ⁻¹	34 µg mL ⁻¹
IPTG	1 M	0.5 mM

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs wurden mit dem Labcycler Compact Gradient von Sensoquest durchgeführt. Die Phusion-Polymerase und dNTPs wurden von Thermo Scientific bezogen.

Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde mit 1%igen Agarosegelen in TBE-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 10.3) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10.000x, der in 1-facher Endkonzentration eingesetzt wird, und des Markers Roti-GelStain von Carl Roth mit dem PowerPac Basic Power Supply von BioRad durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit Gel iX20 Imager von Intas.

Tabelle 10.3. Zusammensetzung des TBE-Puffers für Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
TBE-Puffer (5x)	445 mM Tris-Base
	445 mM Borsäure
	10 mM EDTA
	1L dH ₂ O

Photometrische Bestimmung der DNA- und Protein-Konzentration

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen und Konzentrationen von aufgereinigten Proteinen wurde mit Hilfe des NanoDrop One Microvolume UV/Vis Spektrophotometer von Thermo Scientific durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen von Zellrohextrakten wurden mit dem Bradford-Assay mit BSA als Proteinstandard und Vermessung der Proben mit dem Spektrophotometer Multiskan GO von Thermo Scientific bei 595 nm bestimmt.

Medien

Tabelle 10.4. Übersicht und Zusammensetzung der Medien

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar-Nährmedium	25 g LB-Medium
	15 g Agar
	1 L dH ₂ O
	pH 7
LB-Nährmedium	autoklaviert
	25 g LB-Medium
	1 L dH ₂ O
	pH 7
TB-Nährmedium	autoklaviert
	50.8 g TB-Medium
	4 mL Glycerin
	1 L dH ₂ O
AI-Nährmedium	autoklaviert
	267 mL TB-Medium
	30 mL Lactose (20 g L ⁻¹)
	3 mL D-Glucose (50 g L ⁻¹)

Zentrifugation

Zentrifugation von 15 und 50 mL Falcon-Tubes erfolgte mit der Multifuge 3S-R von Heraeus. Eppendorffgefäße (0.5, 1.5 und 2.0 mL) wurden mit der CT 15RE von Himac zentrifugiert.

Puffer zur Proteinaufreinigung per Ni-NTA

Tabelle 10.5. Zusammensetzung der Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Aufschluss-Puffer	50 mM KPi pH 7
	20 mM Imidazol
	300 mM NaCl
Wasch-Puffer	50 mM KPi pH 7
	40 mM Imidazol
	300 mM NaCl
Elutions-Puffer	50 mM KPi pH 7
	300 mM Imidazol
	300 mM NaCl

Marker

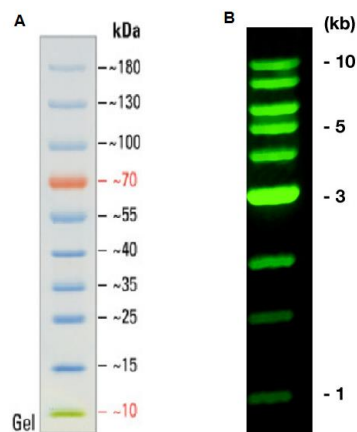


Abbildung 10.1. **A** SDS-Größenstandard (Page Ruler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific) **B** Agarosegel-Größenstandard (Roti-GelStain von Carl Roth)

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Gelelektrophorese wurde im Kammersystem Mini-Protean Tetra Cell von BioRad und dem Elektrophorese Power Supply-EPS301 von GE Healthcare durchgeführt.

Tabelle 10.6. Zusammensetzung der Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung	Zusammensetzung
15% iges Trenngel	5.0 mL Acrylamid (Rotiphorese)
	2.5 mL Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)
	2.4 mL dH ₂ O
	100 µL SDS 10%ig
	10 µL TEMED
	100 µL APS 10%ig
5% iges Sammelgel	0.83 mL Acrylamid (Rotiphorese)
	1.3 mL Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8)
	2.8 mL dH ₂ O
	50 µL SDS 10%ig
	10 µL TEMED
	50 µL APS 10%ig
Laufpuffer (1x)	3 g L ⁻¹ Tris
	14.4 g L ⁻¹ Glycin
	1 g L ⁻¹ SDS
	1.2 g SDS
Lämmli-Puffer	6 mg Bromphenolblau
	4.7 mL Glycerol
	1.2 mL 0.5 M Tris pH 6.8
	2.1 mL dH ₂ O
Färbelösung	10% Essigsäure
	30% Ethanol
	60% dH ₂ O
	1 g L ⁻¹ Coomassie Brilliant Blue G250
Entfärbelösung	10% Essigsäure
	30% Ethanol
	60% dH ₂ O

UV/Vis-Spektrophotometer zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgte mit dem Jasco V-630 Spektrophotometer und Auswertung der Daten über den Spectra Manager von Jasco oder dem Tecan Reader Spark 10M und Auswertung der Daten per Excel.

10.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (AAV1): Transformation von Plasmiden

30 ng Plasmid werden auf 50 μ L bzw. 100 μ L gefrorene, chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme des Plasmids wird für 90 s bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Zu den Zellen wird jeweils 1 mL LB-Medium, welches auf 37 °C vorgewärmt ist, gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden für 2 min bei 7000 x g abzentrifugiert, das Pellet in 100 μ L LB-Medium resuspendiert, auf einer LB-Agarplatte (mit dem entsprechenden Antibiotikum, siehe Kapitel 10.2) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

10.2.2 AAV2: Expression von Iminreduktasen

Die Expression der Iminreduktasen findet in *E. coli* BL21(DE3) statt. Zunächst werden Vorkulturen mit 10 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Kapitel 10.2) in einem 100 mL Erlenmeyerkolben inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Je nach Expression wird die Hauptkultur in TB- oder AI-Medium angesetzt.

10.2.2.1 Expression in TB-Medium

Die Hauptkultur (300 mL TB-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben) wird 1%ig inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wird durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) (Endkonzentration 0.5 mM) bei einer OD_{600} zwischen 0.4 und 0.6 induziert und die Kultur für ca. 20 h bei 25 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 30 min bei 4000 x g und 4 °C geerntet. Die Zellpellets werden ohne Flüssigkeit bei -20 °C in Falcon Tubes gelagert.

10.2.2.2 Expression in Autoinduktions-Medium

Die Hauptkultur (300 mL AI-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben) wird 1%ig inokuliert und für 2 h bei 37 °C und 180 rpm und anschließend für ca. 60-70 h bei 15 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation für 30 min bei 4000 x g und 4 °C geerntet. Die Zellpellets werden ohne Flüssigkeit bei -20 °C in Falcon Tubes gelagert.

10.2.3 AAV3: Gefriertrocknen von Zellen

Mit den gefrorenen, geernteten Zellen wird in Milli-Q® Wasser eine 50%ige Zellsuspension hergestellt. Diese werden zunächst für ca. eine Stunde bei -80 °C eingefroren und dann für mindestens 20 h in dem Triad Benchtop Freeze Dry System von Labconco gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird anschließend bei -20 °C in Falcon-Tubes aufbewahrt.

10.2.4 AAV4: Zellaufschluss und Gewinnung des Zellrohextrakts

Mit den gefrorenen Zellen wird in 50 mM KPi pH 7 eine 25%ige Zellsuspension hergestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgt durch Ultraschall auf Eis mit der Ultraschall-Sonode Sonopuls hd 2070 von Bandelin für 2 min (5 Zyklen, 20% Energie), anschließend wird die Zellsuspension für 2 min auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wird jeweils dreimal wiederholt. Zur Gewinnung der *inclusion bodies* wird bei 21000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird erneut bei 21000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, das Zellrohextrakt als Überstand und die *inclusion bodies* als Pellets erhalten.

10.2.5 AAV5: Bradford-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts von Zellrohextrakten wird der Bradford-Assay^[381] unter Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) als Proteinstandard verwendet. Hierzu werden jeweils 5 µL der BSA-Standards mit definierter Konzentration in Dreifachbestimmung in Mikrotiterplatten vorgelegt. Außerdem werden jeweils 5 µL des Zellrohextrakts in 1:20 und 1:40 Verdünnung in Dreifachbestimmung vorgelegt und alle Proben mit 250 µL Bradford-Reagenz versetzt und für 15 min bei 25 °C inkubiert. Die Absorption wird bei 595 nm bestimmt und die Proteingehalte der Zellrohextrakte über die lineare Abhängigkeit der BSA-Kalibrationsgerade bestimmt.

10.2.6 AAV6: SDS-PAGE

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgt in Anlehnung an Shapiro *et al.*^[382] Die im Rahmen des Zellaufschlusses erhaltenen *inclusion bodies* (IB) werden über Nacht in 6 M Harnstoff resuspendiert und im Rahmen der Probenvorbereitung der SDS-Proben wie die Zellrohextrakte behandelt. Mit Lämmli-Puffer (20%ig) und Milli-Q® Wasser wird eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 µg µL⁻¹ mit insgesamt 10 µg Protein erstellt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Auf die SDS-PAGE werden 5 µL des Markers und

jeweils 10 μL der Protein- bzw. *inclusion body*-Lösungen aufgetragen und die Proben zunächst bei einer Spannung von 100 V im Sammelgel laufen gelassen. Die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts wird im Trenngel bei einer Spannung von 130 V erreicht. Die SDS-PAGE wird in Färbelösung über Nacht gefärbt, mit Entfärbelösung der Hintergrund entfärbt und die SDS-PAGE fotografisch dokumentiert.

10.2.7 AAV7: Spektrophotometrische Bestimmung der IRED-Aktivität in Mikrotiterplatten

Zur Bestimmung der Aktivität der IREDs wird die Abnahme der Konzentration von NADPH spektrophotometrisch bei 30 °C und 340 nm für 60 s am Tecan Reader Spark 10M in Fünffachbestimmungen gemessen und anschließend die Steigung $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ über das Anlegen von Tangenten bestimmt.

Die Aktivität der IREDs gegenüber unterschiedlichen Substraten wird bei 30 °C in einem Ansatz von 250 μL mit 100 mM KPi pH 7, 4% Methanol oder DMSO als Cosolvent und 0.36 mM NADPH bestimmt. Die Messung wird direkt nach Zugabe von NADPH gestartet und es werden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Die Substratkonzentration und die Menge an verwendeter IRED müssen substratabhängig angepasst werden, sodass über den Messzeitraum von 60 s eine Gerade erhalten wird.

Die Schichtdicke der Mikrotiterplatte, die zur Berechnung der Enzymaktivität benötigt wird, kann nach Formel (I) mit den Variablen der Absorption von Wasser bei 998 nm bzw. 900 nm (A_{998} bzw. A_{900}) in der Mikrotiterplatte und in einer 1 cm Küvette bestimmt werden:

$$d = \frac{A_{998} - A_{900} \text{ (Mikrotiterplatte)}}{A_{998} - A_{900} \text{ (1 cm Küvette)}} \quad (\text{I})$$

Bei einem Gesamtvolumen von 250 μL in der Mikrotiterplatte ergibt sich hiermit eine Schichtdicke von 8 mm.

Die Enzymaktivität kann schließlich nach Formel (II) bestimmt werden.

$$\text{Aktivität [U mL}^{-1}] = \frac{-\frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot V_T}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \quad (\text{II})$$

mit V_T = Gesamtvolumen Küvette, V_E = Enzymvolumen, d = Schichtdicke der Küvette (hier 8 mm), ε = Extinktionskoeffizient NADPH ($0.63 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$)

Die Enzymaktivität kann mit der Proteinkonzentration nach Formel (III) in die spezifische Aktivität umgerechnet werden, wobei der Fehler der Aktivität vernachlässigt wird, da für die Proteinkonzentration ebenfalls kein Fehler berücksichtigt wird.

$$\text{spezifische Aktivität [U mg}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Aktivität [U mL}^{-1}\text{]}}{\text{Proteinkonzentration [mg mL}^{-1}\text{]}} \quad \text{(III)}$$

10.2.8 AAV8: Spektrophotometrische Bestimmung der GDH-Aktivität

Der Aufschluss der hochzelllichtfermentierten *E. coli*-Zellpellets, in denen die thermostabile GDH aus *Bacillus subtilis* überexprimiert wurde, erfolgt nach AAV3 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8. Die Hitze-fällung der anderen Proteine im Zellrohextrakt erfolgt in Falcon-Röhrchen im Wasserbad bei 60 °C für 10 min. Durch anschließende Zentrifugation für 20 min bei 10000 x g wird die GDH als Überstand erhalten.

Die Bestimmung der Aktivität der GDH für NADP⁺ als Cofaktor erfolgt über die Umsetzung von D-Glucose. Die mit dieser Umsetzung verbundene Bildung von NADPH kann am Photometer bei 340 nm verfolgt werden. In einer Quarzküvette (1 cm) werden 100 mM D-Glucose und GDH (10 µL in entsprechender Verdünnung) in 100 mM KPi pH 8 vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 2.5 mM NADP⁺ gestartet. Die Anfangssteigung wird durch Anlegen einer Tangente bestimmt und die Aktivität nach Formel (II) aus der Steigung mit den Variablen V_T (Gesamtvolumen der Küvette), V_E (Enzymvolumen), d (Schichtdicke der Küvette, hier 10 mm), ϵ (Extinktionskoeffizient NADPH 0.63 µmol⁻¹ mm⁻¹) bestimmt. Die Aktivität der in dieser Arbeit Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* beträgt 180 ± 8 U mL⁻¹.

10.3 Übersicht der verwendeten Iminreduktasen

Die Iminreduktasen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind literaturbekannte Enzyme: IRED01-IRED20^[124], IRED21-IRED29^[129], IRED30-IRED31^[121]

Tabelle 10.7. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten IREDS

Bezeichnung der IREDS in dieser Arbeit	Ursprungsorganismus
IRED01	<i>Streptomyces sp. Mg1</i> ^[124]
IRED02	<i>Streptomyces fulvissimus</i> ^[124]
IRED03	<i>Bacillales</i> ^[124]
IRED04	<i>Kribbella flavida DSM 17836</i> ^[124]
IRED05	<i>Cupriavidus sp. HPC(L)</i> ^[124]
IRED06	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> ^[124]
IRED07	<i>Frankia sp. QA3</i> ^[124]
IRED08	<i>Mycobacterium smegmatis</i> ^[124]
IRED09	<i>Verrucosispora maris</i> ^[124]
IRED10	<i>Streptomyces sp. CNB091</i> ^[124]
IRED11	<i>Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338</i> ^[124]
IRED12	<i>Nocardia cyriacigeorgica GUH-2</i> ^[124]
IRED13	<i>Actinomadura rifamycinii</i> ^[124]
IRED14	<i>Mycobacterium vaccae</i> ^[124]
IRED15	<i>Mycobacterium sp. JLS</i> ^[124]
IRED16	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> ^[124]
IRED17	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> ^[124]
IRED18	<i>Paenibacillus ehimensis</i> ^[124]
IRED19	<i>Streptomyces sp. CNH287</i> ^[124]
IRED20	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> ^[124]
IRED21	<i>Bacillus cereus</i> ^[129]
IRED22	<i>Paenibacillus sp. HGF5</i> ^[129]
IRED23	<i>Chitinophaga sp. JGI 0001002-D04</i> ^[129]
IRED24	<i>Glycomyces tenuis</i> ^[129]
IRED25	<i>Nocardia brasiliensis</i> ^[129]
IRED26	<i>Nitratireductor pacificus</i> ^[129]
IRED27	<i>Mesorhizobium sp. L48C026A00</i> ^[129]
IRED28	<i>Aeromonas veronii AER39</i> ^[129]
IRED29	<i>Aeromonas veronii AER397</i> ^[129]
IRED30	<i>Streptomyces aurantiacus</i> ^[121]
IRED31	<i>Streptomyces sp. Gf 3546</i> ^[121]

10.3.1 Überprüfung der Überexpression der Iminreduktasen per SDS-PAGE

Die Expression der Iminreduktasen wird per SDS-PAGE entsprechend der AAV6 überprüft. Die SDS-PAGEs sind in Abbildung 10.2 dargestellt.

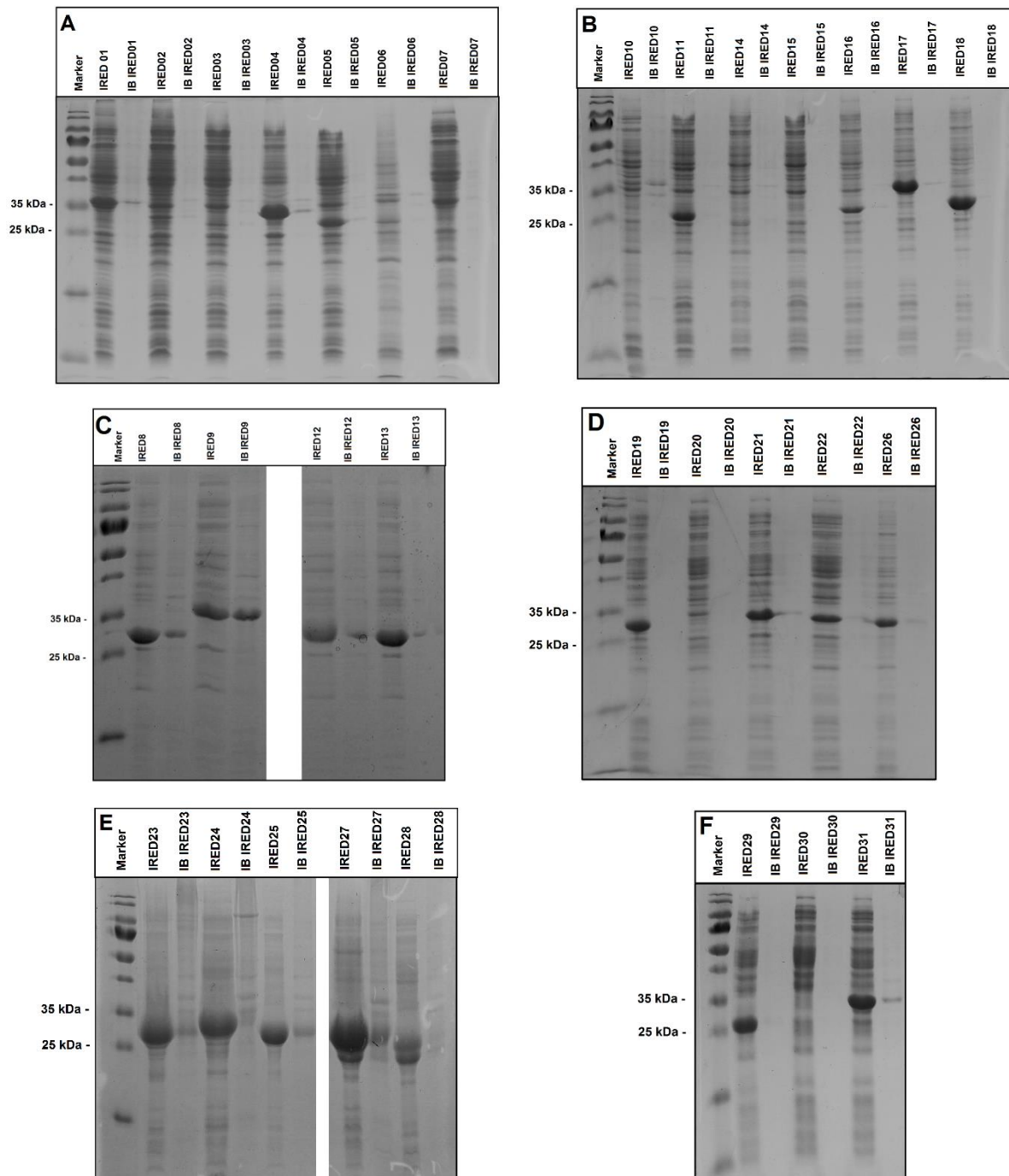


Abbildung 10.2. A-F SDS-PAGEs zur Überprüfung der Expression der Iminreduktasen IRED01-IRED31

10.4 Optimierung und Prozessentwicklung Iminreduktase-katalysierter Reaktionen

10.4.1 Analytik

Zur Bestimmung des Umsatzes von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) zum entsprechenden zyklischen Amin **2** und zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**2**) wird eine Analytik per SFC-HPLC etabliert. Zur analytischen Auftrennung des zyklischen Imins **1** sowie der beiden Enantiomere desamins **2** werden Lösungen der käuflich erworbenen Verbindungen in Dichlormethan vermessen. Eine eindeutige Trennung des 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolins (**1**) ($t_R=13.2$ min), sowie der beiden Enantiomere des 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolins (**2**) ($t_R(R)=15.8$ min, $t_R(S)=18.3$ min) kann an dem LC2000 SFC-HPLC System von Jasco mit der Chiralpak® IC von Diacel (überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) erreicht werden. Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse erfolgt über die Integrale der Enantiomere. Die Bestimmung der Umsätze erfolgt über den Vergleich der Integrale des Imins **1** und desamins **2**. Zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Absorption des Imins **1** und desamins **2** bei 213 nm werden jeweils Lösungen mit definierten Verhältnissen von Edukt und Produkt per chiraler SFC-HPLC untersucht. Über den Vergleich des definiert eingewogenen und per HPLC ermittelten Verhältnisses wird daraufhin jeweils ein Korrekturfaktor für das Amin **2** zur Umsatzbestimmung ermittelt. Die eingewogenen und per HPLC bestimmten Verhältnisse und die jeweiligen bestimmten Korrekturfaktoren sind in Tabelle 10.8 dargestellt.

Tabelle 10.8: Eingewogene bzw. per HPLC bestimmte Verhältnisse Amin **2**/Imin **1** sowie berechneter Korrekturfaktor und Mittelwert der Korrekturfaktoren für das Amin **2**.

Eintrag	Amin 2/Imin 1 eingewogen	Amin 2/Imin 1 HPLC	Korrekturfaktor
1	0.96	0.44	2.18
2	0.72	0.33	2.16
3	4.79	1.79	2.67
	Mittelwert		2.34 ± 0.29

Über die Simulation der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches (Versetzen des Gemisches mit Dichlormethan, Durchmischung und anschließende Zentrifugation bei 6000 x g für 10 min) mit exakt eingewogenen Verhältnissen der Verbindungen in einer Dreifachbestimmung wird überprüft, ob das Imin **1** und das Amin **2** zu gleichem Maß

extrahiert werden. Da dies zutrifft, muss für die Aufarbeitung der Reaktionsmischung kein Korrekturfaktor bestimmt werden.

10.4.2 Aufreinigung der IRED20 per Ni-NTA

Die IRED20 verfügt über einen N-terminalen His₆-Tag, sodass eine Aufreinigung per Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA) Affinitätschromatographie möglich ist. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 10.5 angegeben. Die Säule wird mit Nickel-NTA (5 mL) gepackt, mit Milli-Q® Wasser (25 mL) und anschließend mit Aufschlusspuffer (25 mL) gespült. Rohextrakt (bis zu 20 mL) wird aufgetragen, die Suspension mit einer Pipette aufgewirbelt und ca. 5 min inkubiert. Anschließend wird mit Aufschlusspuffer (25 mL) und dann mit Waschpuffer (50 mL) gespült. Das Protein wird mit Elutionspuffer (10 mL) eluiert und mit einer Vivaspin-Ultrafiltrationseinheit nach Herstellerangaben auf ein Volumen von 2.5 mL eingengt. Die Nickel-NTA-Tropfsäule wird zur Lagerung zunächst mit Elutionspuffer (25 mL), anschließend mit 0.5 M NaOH (25 mL) gespült. Die Tropfsäule wird anschließend mit 20%igem Ethanol (15 mL, unvergällt) gespült und anschließend in 20%igem Ethanol bei 4 °C gelagert. Die Umsalzung erfolgt mit Pd-10 Entsalzungssäulen von GE Healthcare nach Herstellerangaben.

Die Konzentration des aufgereinigten Proteins ($\epsilon = 29450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wird per NanoDrop bestimmt und der Erfolg der Aufreinigung per SDS-PAGE überprüft (Abbildung 10.3).

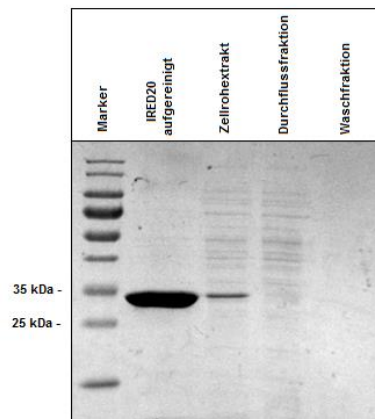


Abbildung 10.3. SDS-PAGE der Aufreinigung der IRED20 per Ni-NTA

10.4.3 Einleitende Biotransformationen

Die Biotransformationen werden im 0.5 mL Ansatz in Eppendorf-Gefäßen in 100 mM KPi pH 7 mit 1% Methanol als Cosolvent, 20mM D-Glucose, 10mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 0.1 mg mL⁻¹ IRED20 (aufgereinigt), 4 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer bei 30 °C und 850 rpm durchgeführt. Nach 15.5 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird per SFC-HPLC (IC, überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.9 dargestellt.

Tabelle 10.9. Ergebnis der einleitenden Biotransformation und Negativkontrollen zur IRED-katalysierten Reduktion des Imins **1**

Eintrag	Umsatz [%]	ee [%]
IRED20 (0.1 mg mL ⁻¹), GDH (2U)	97	> 99
Negativkontrolle 1: ohne IRED20	0	-
Negativkontrolle 2: ohne GDH	0	-
Negativkontrolle 3: ohne IRED20, ohne GDH	0	-

10.4.4 Reaktionsparameterscreening zur Optimierung der Reaktionsbedingungen

10.4.4.1 Variation der Reaktionsparameter in Biotransformationen

Die zeitabhängigen Biotransformationen unter Variation der Reaktionsparameter werden in jeweils fünf bzw. sechs identischen Ansätzen im 0.5 mL Ansatz in Eppendorf-Gefäßen unter Variation der Puffersubstanzen (jeweils 100 mM Pufferkonzentration) mit 1% Methanol als Cosolvent, 20 mM D-Glucose, 10 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 0.1 mg mL⁻¹ IRED20 (aufgereinigt), 4 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer bei 30 °C und 850 rpm durchgeführt. Nach jeweils ca. 1 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird per SFC-HPLC (IC, überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.10 dargestellt.

Tabelle 10.10. Biotransformationen von **1** unter Variation der Puffersysteme bei konstanter Pufferkonzentration (100 mM)

Puffersystem [100 mM]	Zeit [min]	Umsatz [%]	Puffersystem [100 mM]	Zeit [min]	Umsatz [%]
KP_i pH 7	60	45	HEPES pH 7.5	60	33
	120	74		121	50
	174	81		174	68
	238	90		239	65
	299	98		296	74
	379	98		376	84
Citrat pH 6	60	20	NaP_i pH 7	60	40
	120	42		119	68
	174	50		173	81
	238	49		239	91
	297	65		304	98
	377	63		374	99
MES pH 6.5	62	4	PIPES pH 7	63	11
	111	13		112	18
	180	14		181	35
	244	12		245	53
	293	10		294	88
Bicin pH 8	57	13	BisTris pH 6.5	61	3
	106	25		110	6
	175	73		179	7
	239	86		243	10
	288	93		292	9
MOPS pH 7	56	8	TEA pH 7	60	10
	105	11		109	18
	174	18		178	26
	238	19		242	32
	287	26		291	39
TRIS pH 7.5	60	34			
	120	68			
	180	76			
	240	75			
	300	85			

Außerdem werden Biotransformationen unter Variation der Natriumchlorid-Konzentration im 0.5 mL Ansatz in Eppendorf-Gefäßen in 100 mM KPi pH 7 mit 1% Methanol als Cosolvent, 20 mM D-Glucose , 10 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 0.1 mg mL⁻¹ IRED20 (aufgereinigt), 4 U GDH, 0-200 mM NaCl und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer bei 30 °C und 850 rpm durchgeführt. Nach 4 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32 %, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird per SFC-HPLC (IC, überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.11 dargestellt.

Tabelle 10.11. Biotransformationen von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) unter Variation der NaCl-Konzentration

Eintrag	NaCl-Konzentration [mM]	Umsatz [%]
1	0	90
2	25	79
3	75	80
4	100	81
5	150	78
6	200	81

10.4.4.2 Thermofluor-Assay

Der Thermofluor-Assay wird im CFX96 Real-Time PCR Cycler von BioRad in 96-Well qPCR-Mikroplatten von BioRad durchgeführt. Für das Screening werden jeweils 3 µg der aufgereinigten IRED20 eingesetzt. Das Endvolumen pro Well beträgt 25 µL mit einer Protein-Endkonzentration von 0.12 µg µL⁻¹. Als Protein-bindender Farbstoff wird SYPRO Orange 5000x verwendet, der im Assay mit einer 5-fachen Endkonzentration eingesetzt wird. Die Platten werden von 20 °C auf 90 °C mit einer Geschwindigkeit von 1 °C min⁻¹ erwärmt. Dabei wird die Fluoreszenz bei 485/20 nm (E_x) und 530/30 nm (E_m) gemessen. Die Auswertung erfolgt mit der CFX Manager Software, der Precision Melt Analysis Software und Origin. Die Schmelztemperatur wurde aus den Schmelzkurven in Doppelbestimmung ermittelt. Die gemittelten Schmelztemperaturen T_m sind in Tabelle 10.12 dargestellt.

Tabelle 10.12. Thermofluor-Assay - Gemittelte Schmelztemperaturen der IRED20 unter Variation der Reaktionsparameter

Reaktionsparameter	T_m [°C]	Reaktionsparameter	T_m [°C]
Wasser	31	100 mM Bicin pH 8	33.5
100 mM KP_i pH 7	40	100 mM TRIS pH 7.5	32
100 mM Citrat pH 6	39.5	100 mM KP_i pH 6	40
100 mM NaP_i pH 7	36	100 mM KP_i pH 7.5	38.5
100 mM MES pH 6.5	36	100 mM KP_i pH 8	38
100 mM PIPES pH 7	35.5	10 mM KP_i pH 7	33
100 mM MOPS pH 7	35	50 mM KP_i pH 7	37.5
100 mM HEPES pH 7	35	100 mM KP_i pH 7	40
100 mM TEA pH 7	34.5	250 mM KP_i pH 7	42
100 mM BisTris pH 6.6	34	500 mM KP_i pH 7	45.5

10.4.5 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wird die Aktivität der IRED20 gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) entsprechend der AAV7 (Kapitel 10.2.7) bei 30 °C in einem Ansatz von 250 μ L mit 100 mM KP_i pH 7, 4% Methanol als Cosolvent, 0.01-2 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 0.4 mg mL⁻¹ IRED20 (aufgereinigt) und 0.36 mM NADPH bestimmt. Die Messung wird direkt nach Zugabe von NADPH gestartet und es werden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Die ermittelten Aktivitäten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen sind in Tabelle 10.13 dargestellt.

Tabelle 10.13. Reaktionsgeschwindigkeit der IRED20 bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen des zyklischen Imins **1**

Substratkonzentration [mM]	v [U mL ⁻¹]
0.01	0.149 ± 0.029
0.02	0.267 ± 0.058
0.03	0.396 ± 0.068
0.05	0.648 ± 0.071
0.06	0.773 ± 0.069
0.08	0.985 ± 0.099
0.1	1.079 ± 0.084
0.2	1.664 ± 0.139
0.5	1.969 ± 0.15
1	1.740 ± 0.179
2	1.544 ± 0.201

10.4.6 Untersuchungen von Substratinhibierung bzw. -deaktivierung

Eine mögliche Substratinhibierung der IRED20 wird durch Bestimmung der Aktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen an 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) entsprechend der AAV7 (Kapitel 10.2.7) bei 30 °C in einem Ansatz von 250 µL mit 100 mM KPi pH 7, 4% Methanol als Cosolvent, 0.5-2 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 0.1 mg mL⁻¹ IRED20 (aufgereinigt) und 0.36 mM NADPH bestimmt. Die Messung wird direkt nach Zugabe von NADPH gestartet und es werden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Die Deaktivierung des Enzyms durch das Substrat **1** wird über eine Bestimmung der Aktivität der IRED20 gegenüber 0.5-2 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) nach zweistündiger Inkubation des Enzyms mit dem zyklischen Imin **1** bei 30 °C analog untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.14 dargestellt.

Tabelle 10.14. Untersuchung der Substratinhibierung bzw. -deaktivierung der IRED20 durch **1**

t [h]	Substratkonzentration [mM]	v [U mL ⁻¹]
0	0.5	2.325 ± 0.230
	1	2.219 ± 0.256
	2	1.592 ± 0.109
2	0.5	2.698 ± 0.166
	1	2.169 ± 0.065
	2	1.781 ± 0.154

10.4.7 Untersuchungen von Produktinhibierung bzw. -deaktivierung

Eine mögliche Produktinhibierung der IRED20 wird durch Bestimmung der Aktivität bei einer Konzentration des Imins **1** von 0.5 mM und unterschiedlichen Konzentrationen des Amins **2** entsprechend der AAV7 (Kapitel 10.2.7) bei 30 °C in einem Ansatz von 250 µL mit 100 mM KPi pH 7, 4% Methanol als Cosolvent, 0.5 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 0-2 mM 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**2**), 0.1 mg mL⁻¹ IRED20 (aufgereinigt) und 0.36 mM NADPH bestimmt. Die Messung wird direkt nach Zugabe von NADPH gestartet und es werden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Die Deaktivierung des Enzyms durch das Produkt **2** wird über eine Bestimmung der Aktivität der IRED20 gegenüber 0.5 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**) nach zweistündiger Inkubation des Enzyms mit dem zyklischen Amin **2** bei 30 °C analog untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.15 dargestellt.

Tabelle 10.15. Untersuchung der Substratinhibierung bzw. -deaktivierung der IRED20 durch *rac-2*

t [h]	Produktkonzentration [mM]	v [U mL⁻¹]
0	0	2.942 ± 0.233
	0.5	2.692 ± 0.236
	1	2.657 ± 0.212
	2	2.883 ± 0.217
2	0	2.803 ± 0.116
	0.5	2.666 ± 0.077
	1	2.757 ± 0.119
	2	2.927 ± 0.112

10.4.8 Konstruktion der Ganzzell-Katalysatoren

Der Zwei-Plasmid-System (GZK1) wird nach AAV1 über die Transformation der Plasmide pET22b_IRED20 & pACYCDuet_GDH in *E. coli* BL21(DE3) erzeugt. Die Konstrukte GZK2 (pETDuet_GDH_IRED20) und GZK3 (pETDuet_IRED20_GDH) werden über Klonierung entsprechend den folgenden Vorschriften dargestellt.

10.4.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Sequenzen und Schmelzpunkte der verwendeten Primer für die Amplifikation der IRED20 und der GDH sind in Tabelle 10.16 dargestellt:

Tabelle 10.16. Sequenzen und Schmelzpunkte der verwendeten Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T_m [°C]
IRED20_fw_1	GCATTCCATGGGAATGAATCGCCAGTTTAC	66.8
IRED20_rv_1	AATTATAGCGGCCGCTTAGCTTGCCGTCAG	69.5
IRED20_fw_2	GCAGCCCATATGAATCGCCAGTTTAC	64.8
IRED20_rv_2	AATTATACTCGAGTTAGCTTGCCGTCAGCAGGTC	69.5
GDH_fw	ACCAACCACATATGTATCCGGATTTAAA	58.0
GDH_rv	ATAATAACTCGAGTTAACCGCGGCCTG	61.7

Die Amplifikation der DNA-Fragmente wird entsprechend dem in Tabelle 10.17 dargestellten Ansätzen mit dem in Tabelle 10.18 abgebildeten PCR-Programm durchgeführt.

Tabelle 10.17. Zusammensetzung der PCR-Ansätze

	Komponente
40 – 400 ng	Template DNA
5 U	Phusion-Polymerase
1x	Polymerase Puffer (5x) HF
0.2 mM	dNTPs
20 pmol	<i>forward</i> Primer
20 pmol	<i>reverse</i> Primer
5%	DMSO
Σ 50 µL	Milli-Q® Wasser

Tabelle 10.18: PCR-Programm für die Phusion-Polymerase (die Annealing-Temperatur hängt von den Schmelzpunkten der Primer ab)

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
Initialdenaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	1	30
Annealing	$T_m + 5$	0.75	30
Elongation	72	0.75	30
Finale Elongation	72	5	1
Kühlung	12	∞	1

Der Erfolg der PCR wird per Agarosegelelektrophorese überprüft.

10.4.8.2 Restriktionsverdau

Die hydrolytische Spaltung von DNA wird mit Endonukleasen des Typs II von Thermo Scientific nach Herstellerangaben in FastDigest-Puffer durchgeführt. Dabei werden 5–10 U eines Restriktionsenzym pro Ansatz verwendet und für ca. 3 h bei 37 °C inkubiert. Um nach der Restriktion die Pufferkomponenten sowie die Endonukleasen aus der Probe zu entfernen, wurden diese über das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit von GE Healthcare aufgereinigt. Verdaute Plasmide werden zunächst über ein Agarosegel und anschließend über das GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit von GE Healthcare nach Herstellerangaben aufgereinigt.

10.4.8.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Insert und Plasmid (40 ng) wird jeweils in einem 1:1 (Vektor:Insert) und einem 1:3 Ansatz durchgeführt. Hierbei wird jeweils der Quotient der DNA-Menge pro

Größe (ng kb⁻¹) berücksichtigt. Die Ligation wird in einem Gesamtvolumen von 20 µL durchgeführt, mit 1x Ligations-Puffer und 1 µL T4-DNA-Ligase. Der Ligationsansatz wird für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt in chemisch-kompetente *E. coli* DH5a entsprechend der AAV1 transformiert.

10.4.8.4 Plasmidpräparation

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den kultivierten Zellen wird mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit von Analytikjena nach Herstellerangaben durchgeführt.

10.4.8.5 Probeverdau

Um den Erfolg der Ligation zu überprüfen, wird ein Probeverdau durchgeführt. Hierzu werden Klone von der Agarplatte aufgenommen und Übernachtkulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Kapitel 10.2) angesetzt, die bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert werden. Die Plasmide werden entsprechend der Plasmidpräparation (Kapitel 10.4.8.4) aus den kultivierten Zellen isoliert und jeweils 2 µL Plasmid im jeweiligen Probeverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben eingesetzt. Diese Restriktionsansätze werden für 2–3 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wird mit einem Agarosegel überprüft. Positive Klone werden anschließend noch per Sequenzierung überprüft.

Tabelle 10.19: Liste der erfolgreich klonierten Plasmide

Bezeichnung	Plasmid	Resistenz	MCS1	MCS2
-	pETDuet-1	Carbenicillin	IRED20	-
-	pETDuet-1	Carbenicillin	-	IRED20
GZK2	pETDuet-1	Carbenicillin	GDH	IRED20
GZK3	pETDuet-1	Carbenicillin	IRED20	GDH

Per Probeverdau und Sequenzierung konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die entsprechenden Gene sich in den entsprechenden Multiple Cloning Sites (MCS) befinden.

10.4.9 Evaluierung der Ganzzell-Konstrukte

Die drei Ganzzell-Konstrukte wurden nach AAV4 aufgeschlossen und die Aktivität der exprimierten IRED zur Reduktion des zyklischen Imins **1** über die AAV7 und die Aktivität der exprimierten GDH zur Oxidation von D-Glucose über die AAV8 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.20 dargestellt.

Tabelle 10.20. Aktivitätstest zur Evaluierung der Ganzzell-Konstrukte

GZK	GDH Aktivität [U mL⁻¹]	IRED Aktivität [U mL⁻¹]
GZK1	152.4	4.9
GZK2	188.3	4.3
GZK3	429.8	4.3

Die zeitabhängigen Biotransformationen mit den verschiedenen Ganzzell-Katalysatoren werden in jeweils fünf identischen Ansätzen im 0.5 mL Ansatz in Eppendorf-Gefäßen in 100 mM KPi pH 7 mit 1% Methanol als Cosolvent, 20 mM D-Glucose, 10 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 1.0 mg mL⁻¹ GZK1 bzw. GZK2 bzw. GZK3 und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer bei 30 °C und 850 rpm durchgeführt. Nach jeweils ca. 1 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchgemischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird per SFC-HPLC (IC, überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.21 dargestellt.

Tabelle 10.21. Analytische Biotransformation des zyklischen Imins **1** mit den Ganzzell-Katalysatoren GZK1-3

Zeit [min]	GZK1	GZK2	GZK3
	Umsatz [%]	Umsatz [%]	Umsatz [%]
0	0	0	0
60	12	5	5
120	23	11	6
180	35	17	13
240	43	23	20
300	53	28	21

10.4.10 Cosolventien-Screening

Die zeitabhängigen Biotransformationen des Cosolventien-Screenings werden in jeweils fünf identischen Ansätzen im 0.5 mL Ansatz in Eppendorf-Gefäßen in 100 mM KPi pH 7 mit 2 bzw. 10% Methanol, 10% Ethanol, 10% 2-Propanol oder 10% DMSO als Cosolvent, 40 mM D-Glucose, 20 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 2.0 mg mL⁻¹ GZK1 und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer bei 30 °C und 850 rpm durchgeführt. Nach jeweils ca. 1 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchgemischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird per

SFC-HPLC (IC, überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.22 dargestellt.

Tabelle 10.22. Cosolventien-Screening der Biotransformation des zyklischen Imins **1**

Zeit [min]	2% MeOH Umsatz [%]	10% MeOH Umsatz [%]	10% 2-Propanol Umsatz [%]	10% Ethanol Umsatz [%]	10% DMSO Umsatz [%]
0	0	0	0	0	0
57	21	14	12	11	30
126	57	28	34	24	60
180	57	34	32	38	72
240	78	55	43	42	83
320	73	57	55	50	94

10.4.11 Prozessentwicklung

Die Biotransformationen im präparativen Maßstab (40 mL) werden mit 20, 50 und 100 mM 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (**1**), 2, 5 bzw. 10 mg mL⁻¹ lyophilisiertem Ganzzell-Katalysator GZK1 (zugegeben aus einer 4, 10 bzw. 20 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 50 mM KPi pH 7), 120 mM (bei einer Substratkonzentration von 20 und 50 mM **1**) bzw. 240 mM (bei einer Substratkonzentration von 100 mM **1**) D-Glucose, 0.1 mM NADP⁺ und 1% (bei einer Substratkonzentration von 50 mM **1**) bzw. 2% (bei einer Substratkonzentration von 20 und 100 mM **1**) Methanol als Cosolvent bei 30 °C an einer TitroLine®-Apparatur durchgeführt. Der pH wird durch Titration mit Natronlauge über das TitroLine®-System konstant bei pH 7 gehalten. Nach 24 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 2 mL) und Dichlormethan (30 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Umsatz und der Enantiomerenüberschuss werden per SFC-HPLC (IC, überkritisches CO₂:Ethanol (DEA) = 80:20 (0.02), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 12 MPa, 213 nm) bestimmt. Zur Isolation von (*R*)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin (**2**) wird die organische Phase mit Salzsäure (2M, 3 x 10 mL) gewaschen. Der pH-Wert der erhaltenen wässrigen Phase wird auf pH 13 eingestellt und mit Dichlormethan (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Rohprodukt unter vermindertem Druck eingengt. (*R*)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin ((*R*)-**2**) wird als braunes Öl erhalten.

chirale SFC-HPLC: 98% Umsatz, > 99% ee (*R*) (bei einer Substratkonzentration von 20 mM), 95% Umsatz, > 99% ee (*R*) (bei einer Substratkonzentration von 50 mM), 96% Umsatz, > 99% ee (*R*) (bei einer Substratkonzentration von 100 mM).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.18–7.11 (m, 3H, **H^{Ar}**), 7.10–7.07 (m, 1H, **H^{Ar}**), 4.11 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H, **CH**), 3.27 (ddd, *J* = 12.5, 5.4, 4.6 Hz, 1H, **NHCH₂**), 3.02 (ddd, *J* = 12.5, 8.9, 4.7 Hz, 1H, **NHCH₂**), 2.91–2.84 (m, 1H, **C^{Ar}CH₂**), 2.76–2.71 (m, 1H, **C^{Ar}CH₂**), 1.73 (s, 1H, **NH**), 1.46 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, **CH₃**).

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[124]

Bestimmung der absoluten Konfiguration: [α]²⁵_D = +73 (c: 1.1; CHCl₃). Die optische Rotation stimmt mit den Literaturdaten des (*R*)-Enantiomers überein.^[383]

Isolierte Ausbeute: 85.6 mg, 73% (bei einer Substratkonzentration von 20 mM), 169.8 mg, 58% (bei einer Substratkonzentration von 50 mM), 339.6 mg, 58% (bei einer Substratkonzentration von 100 mM).

10.5 Biokatalytische Reduktion S- und O-haltiger zyklischer Imine

10.5.1 Synthese von Substraten

10.5.1.1 AAV9: α-Chlorierung von Aldehyden und Ketonen

Die Darstellung der α-chlorierten Aldehyde und Ketone erfolgt über eine von Stevens *et al.* adaptierte Methode.^[207] Sulfurylchlorid (0.50 mol, 1.00 Äq.) wird unter Eisbadkühlung bei 900 mbar zu dem Aldehyd bzw. Keton (0.50 mol, 1.00 Äq.) getropft, sodass die Innentemperatur 40 °C nicht übersteigt. Nach Zugabe wird das Reaktionsgemisch für 2 h bei 45 °C und 900 mbar gerührt. Durch fraktionierte Destillation wird das Rohprodukt anschließend aufgereinigt.

10.5.1.1.1 2-Chlor-2-methylpropanal



Die Darstellung erfolgt nach AAV9 aus Isobutanal (92.0 mL, 1.00 mol, 1.00 Äq.) und Sulfurylchlorid (81.0 mL, 1.00 mol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wird durch eine fraktionierte Destillation bei Normaldruck (150 °C Ölbadtemperatur, Siedepunkt 90 °C) aufgereinigt.

2-Chlor-2-methylpropanal (67.6 g, 0.63 mol, 63%) wird als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.37 (s, 1H, HC=O), 1.58 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.9 (HC=O), 69.4 (C(CH₃)₂Cl), 25.9 (C(CH₃)₂).

MS (EI) m/z berechnet für C₄H₇ClO [M]⁺: 106.02, gefunden: 106.0.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[384]

10.5.1.1.2 3-Chlor-3-methyl-2-butanon



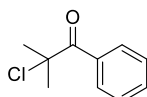
Die Darstellung erfolgt nach AAV9 aus 3-Methylbutanon (53.2 mL, 0.50 mmol, 1.00 Äq.) und Sulfurylchlorid (40.5 mL, 0.50 mmol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wird durch eine fraktionierte Destillation bei Normaldruck (160 °C Ölbadtemperatur, Siedepunkt 115 °C) aufgereinigt. 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (46.3 g, 0.38 mol, 77%) wird als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.29 (s, 3H, CH₃C=O), 1.59 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 204.7 (C=O), 70.4 (C(CH₃)₂Cl), 28.5 (C(CH₃)₂), 24.1 (O=CCH₃).

MS (EI) m/z berechnet für C₅H₉ClO [M]⁺: 120.03, gefunden: 120.0

10.5.1.1.3 2-Chlor-2-methylpropiophenon



Die Darstellung erfolgt nach AAV9 aus Isobutyrophenon (45.0 mL, 0.30 mol, 1.00 Äq.) und Sulfurylchlorid (24.3 mL, 0.30 mol, 1.00 Äq.). Das Rohprodukt wird durch eine fraktionierte Vakuumdestillation (30 mbar, Siedepunkt 125 °C) aufgereinigt. 2-Chlor-2-methylpropiophenon (48.8 g, 0.27 mol, 89%) wird als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.15–8.13 (m, 2H, H^{Ar}), 7.54–7.51 (m, 1H, H^{Ar}), 7.45–7.42 (m, 2H, H^{Ar}), 1.88 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 197.2 (C=O), 134.5 (C^{Ar}), 132.6 (C^{Ar}), 130.1 (2C, C^{Ar}), 128.2 (2C, C^{Ar}), 68.4 (C(CH₃)₂Cl), 30.6 (C(CH₃)₂Cl).

MS (EI) m/z berechnet für C₁₀H₁₁ClO [M]⁺: 182.05, gefunden: 182.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[385]

10.5.1.2 AAV10: Synthese von 3-Thiazolinen **3**

Die Darstellung der 3-Thiazoline **3** erfolgt nach der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion.^[173,175] Oxokomponente (260 mmol, 1.00 Äq. bzw. 3.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 34.0 mL) und Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (260 mmol, 1.00 Äq.) werden vorgelegt und auf 0°C gekühlt. Zur gelblichen Lösung wird die α -chlorierte Komponente (260 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in Dichlormethan (100 mL), tropfenweise zugegeben, wobei eine Färbung der Lösung auftritt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über fraktionierte Vakuumdestillation oder säulenchromatographisch aufgereinigt.

10.5.1.2.1 2,2-Dimethyl-3-thiazolin (**3a**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV10 aus Aceton (45.0 mL, 610 mmol, 3.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 41.0 mL), deionisiertem Wasser (56.0 mL), Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (13.5 g, 240 mmol, 1.20 Äq.) und wässriger α -Chloracetaldehydlösung (27.5 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.). 2,2-Dimethyl-3-thiazolin (**3a**) (9.89 g, 86.7 mmol, 43%) wird durch fraktionierte Vakuumdestillation (100 mbar, Siedepunkt 78...80 °C) als leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.30 (t, J = 1.4 Hz, 1H, CH), 4.04 (d, J = 1.4 Hz, 2H, CH₂), 1.66 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 156.7 (CH), 89.4 (C(CH₃)₂), 45.0 (CH₂), 32.7 (C(CH₃)₂).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₅H₁₀NS [M+H]⁺: 116.0529, gefunden: 116.0531.

IR [cm⁻¹]: 2967, 2920, 1711, 1644, 1432, 1362, 1310, 1218, 931, 889, 802, 779, 681, 573, 545, 529.

10.5.1.2.2 2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolin (**3b**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV10 aus Aceton (14.7 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 44 mL), Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (11.2 g, 200 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Chlor-2-methylpropanal (21.3 g, 200 mmol, 1.00 Äq.).

2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolin (**3b**) (6.32 g, 44 mmol, 22%) wird durch fraktionierte Vakuumdestillation (13 mbar, Siedepunkt 40...50 °C) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.89 (s, 1H, **CH**), 1.67 (s, 6H, NC(**CH**₃)₂), 1.55 (s, 6H, CHC(**CH**₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 165.7 (**CH**), 89.5 (**NCS**), 65.8 (**HCCS**), 33.9 (NC(**CH**₃)₂), 30.1 (CHC(**CH**₃)₂).

MS (EI) m/z berechnet für C₇H₁₃NS [M]⁺: 143.08, gefunden: 143.10.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[386]

10.5.1.2.3 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV10 aus Aceton (18.0 mL, 234 mmol, 1.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 30 mL), Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (16.4 g, 292 mmol, 1.00 Äq.) und α-Chloraceton (21.6 g, 234 mmol, 1.00 Äq.). 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (9.72 g, 75.1 mmol, 32%) wird durch fraktionierte Vakuumdestillation (20 mbar, Siedepunkt 45...52 °C) als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.94 (s, 2H, **CH**₂), 2.07 (s, 3H, C**CH**₃), 1.61 (s, 6H, C(**CH**₃)₂).

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ [ppm] = 165.8 (C**CH**₃), 88.6 (C(**CH**₃)₂), 46.7 (**CH**₂), 32.8 (C(**CH**₃)₂), 19.5 (C**CH**₃).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₆H₁₂NS [M+H]⁺: 130.0685, gefunden: 130.0683.

IR [cm⁻¹]: 2969, 2921, 1711, 1661, 1424, 1361, 1273, 1204, 1178, 1118, 849, 580, 544.

10.5.1.2.4 2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolin (**3d**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV10 aus Aceton (22.1 mL, 300 mmol, 1.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 45.0 mL), Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (16.82 g, 300 mmol, 1.00 Äq.) und 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (36.17 g, 300 mmol, 1.00 Äq.). 2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolin (**3d**) (29.3 g, 186 mmol, 62%) wird durch fraktionierte Vakuumdestillation (10 mbar, Siedepunkt 50 °C) als farblose Flüssigkeit erhalten.

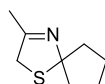
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.98 (s, 3H, C**CH**₃), 1.59 (s, 6H, NC(**CH**₃)₂S), 1.53 (s, 6H, CC(**CH**₃)₂S).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.3 (CCH₃), 82.8 (NC(CH₃)₂S), 66.8 (CC(CH₃)₂S), 33.8 (NC(CH₃)₂S), 30.7 (CC(CH₃)₂S), 15.0 (CCH₃).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₈H₁₆NS [M+H]⁺: 158.0998, gefunden: 158.0995.

IR [cm⁻¹]: 2966, 2924, 2857, 1656, 1456, 1438, 1363, 1258, 1204, 1169, 1145, 1098, 854, 640, 591, 574, 483.

10.5.1.2.5 3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3e**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV10 aus Cyclopentanon (17.7 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 30.0 mL), Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (11.21 g, 200 mmol, 1.00 Äq.) und 3-Chloraceton (16.1 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.). 3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3e**) (1.52 g, 9.66 mmol, 5%) wird durch fraktionierte Vakuumdestillation und anschließende Säulenchromatographie (6-50% Ethylacetat in Cyclohexan) als bräunliche Flüssigkeit erhalten.

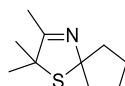
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.91 (s, 2H, CH₂), 2.17–2.12 (m, 2H, (CH₂)₄), 2.10 (s, 3H, CCH₃), 1.97–1.92 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.89–1.82 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.80–1.72 (m, 2H, (CH₂)₄).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 165.9 (CCH₃), 98.0 (C(CH₂)₄), 46.3 (CH₂), 43.6 (2C, (CH₂)₄), 24.6 (2C, (CH₂)₄), 19.8 (CCH₃).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₈H₁₄NS [M+H]⁺: 156.0842, gefunden 156.0844.

IR [cm⁻¹]: 2956, 2869, 1742, 1664, 1435, 1372, 1268, 1196, 1152, 956, 896, 869, 775, 526, 471, 432.

10.5.1.2.6 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV10 aus Cyclopentanon (17.7 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.), Ammoniaklösung (13.3 M, 30.0 mL), Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (11.21 g, 200 mmol, 1.00 Äq.) und 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (24.1 g, 200 mmol, 1.00 Äq.). 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**) (20.5 g, 112 mmol, 56%) wird durch fraktionierte Vakuumdestillation (0.74 mbar, Siedepunkt 80...88 °C) als gelbe Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.15–2.09 (m, 2H, (CH₂)₄), 2.00 (s, 3H, CCH₃), 1.96–1.89 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.87–1.81 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.77–1.71 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.54 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.4 (CCH₃), 91.6 (C(CH₂)₄), 65.5 (C(CH₃)₂), 44.0 (2C, (CH₂)₄), 30.2 (C(CH₃)₂), 24.6 (2C, (CH₂)₄), 15.0 (CCH₃).

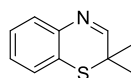
MS (ESI) m/z berechnet für C₁₀H₁₈NS [M+H]⁺: 184.1, gefunden 184.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[179]

10.5.1.3 AAV11: Synthese von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5**

Die Darstellung der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** erfolgt nach Gröger.^[208] Unter Eisbadkühlung wird Natrium (200 mmol, 1.00 Äq.) in Ethanol (400 mL) gegeben. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird 2-Aminothiophenol (200 mmol, 1.00 Äq.) in Ethanol (40 mL) gelöst, zu der Lösung getropft und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. α-Chloriertes Aldehyd bzw. Keton (200 mmol, 1.00 Äq.) wird zugetropft und anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Natriumchlorid wird abfiltriert und das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und das ausgefallene Natriumchlorid erneut abfiltriert. Das Filtrat wird erneut unter vermindertem Druck eingeeengt und das Rohprodukt anschließend destillativ, säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation aufgereinigt.

10.5.1.3.1 2,2-Dimethyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5a**)



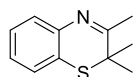
Die Darstellung erfolgt nach AAV11 aus 2-Aminothiophenol (21.4 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Chlor-2-methylpropanal (21.31 g, 200 mmol, 1.00 Äq.). 2,2,3-Trimethyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5a**) (6.42 g, 36.2 mmol, 18%) wird nach fraktionierter Vakuumdestillation (10 mbar, Siedepunkt 160 °C) und Umkristallisation aus Petrolether als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, CH), 7.43 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.26–7.19 (m, 2H, H^{Ar}), 7.14 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H^{Ar}), 1.40 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 161.0 (C=N), 141.0 (C^{Ar}), 127.8 (C^{Ar}), 127.7 (C^{Ar}), 127.5 (C^{Ar}), 126.4 (C^{Ar}), 123.4 (C^{Ar}), 37.2 (C(CH₃)₂), 25.4 (C(CH₃)₂).

MS (ESI) m/z berechnet für C₁₀H₁₁NS [M+H]⁺: 178.06, gefunden: 177.97.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[387]

10.5.1.3.2 2,2,3-Trimethyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5b**)

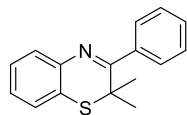
Die Darstellung erfolgt nach AAV11 aus 2-Aminothiophenol (21.4 mL, 200 mmol, 1.00 Äq.) und 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (24.1 g, 200 mmol, 1.00 Äq.). 2,2,3-Trimethyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5b**) (27.4 g, 143 mmol, 71%) wird nach fraktionierter Vakuumdestillation (40 mbar, Siedepunkt 170 °C) als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.35 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.22 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.17 (td, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.07 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 2.30 (s, 3H, CCH₃), 1.37 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.5 (**C=N**), 141.7 (**C^{Ar}**), 127.1 (**C^{Ar}**), 126.9 (**C^{Ar}**), 126.4 (**C^{Ar}**), 126.2 (**C^{Ar}**), 123.7 (**C^{Ar}**), 39.6 (**C(CH₃)₂**), 24.8 (**C(CH₃)₂**), 23.0 (CCH₃).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₁H₁₄NS [M+H]⁺: 192.0842, gefunden: 192.0845.

IR [cm⁻¹]: 2956, 1616, 1587, 1476, 1455, 1440, 1420, 1386, 1364, 1305, 1245, 1173, 1118, 1071, 1030, 853, 750, 725, 690, 649, 453, 436.

10.5.1.3.3 2,2-Dimethyl-3-phenyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5c**)

Die Darstellung erfolgt nach AAV11 aus 2-Aminothiophenol (10.7 mL, 100 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Chlor-2-methylpropiophenon (18.3 g, 100 mmol, 1.00 Äq.). 2,2-Dimethyl-3-phenyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5c**) (18.7 g, 73.7 mmol, 74%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (1-14% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.55 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.53–7.50 (m, 2H, **H^{Ar}**), 7.46–7.44 (m, 3H, **H^{Ar}**), 7.36 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.29–7.27 (m, 1H, **H^{Ar}**), 7.19 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 1.50 (s, 6H, C(CH₃)₂).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.8 (**C=N**), 142.1 (**C^{Ar}**), 138.8 (**C^{Ar}**), 129.1 (**C^{Ar}**), 128.3 (2C, **C^{Ar}**), 127.9 (2C, **C^{Ar}**), 127.8 (**C^{Ar}**), 127.2 (**C^{Ar}**), 127.0 (**C^{Ar}**), 126.5 (**C^{Ar}**), 124.0 (**C^{Ar}**), 39.6 (**C(CH₃)₂**), 26.3 (**C(CH₃)₂**).

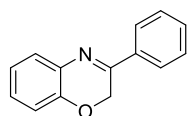
HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₆H₁₆NS [M]⁺: 254.0998, gefunden: 254.1001.

IR [cm⁻¹]: 1455, 1440, 1368, 1365, 1305, 1293, 1170, 1119, 1075, 998, 978, 968, 763, 740, 703, 689, 669, 631, 561, 453.

T_m: 90 °C

10.5.1.4 Synthese von 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7**

10.5.1.4.1 3-Phenyl-2*H*-benzoxazin (**7a**)



Die Darstellung erfolgt nach Shridhar *et al.*^[209] 2-Aminophenol (2.00 g, 18.3 mmol, 1.00 Äq.) wird mit Kaliumcarbonat (3.80 g, 27.5 mmol, 1.50 Äq.) in Aceton (500 mL) vorgelegt. Die Suspension wird für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Kaliumcarbonat (3.80 g, 27.5 mmol, 1.50 Äq.) und α -Bromacetophenon (3.64 g, 18.3 mmol, 1.00 Äq.) werden hinzugegeben und die Mischung für 6 h zum Reflux erhitzt. Nach Abkühlen der Suspension auf Raumtemperatur wird der Feststoff abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel des Filtrats wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit kaltem deionisiertem Wasser (200 mL) und Diethylether (300 mL) versetzt, die Phasen getrennt und die organische Phase wird mit Salzsäure (1.5 M) und destilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 3-Phenyl-2*H*-benzoxazin (**7a**) (1.49 g, 7.13 mmol, 39%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (1-10% Ethylacetat in Cyclohexan) als rötlicher Feststoff erhalten.

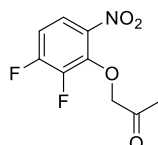
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.96–7.90 (m, 2H, **H^{Ar}**), 7.50–7.46 (m, 3H, **H^{Ar}**), 7.44 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.15 (td, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.03 (td, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.92 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, **H^{Ar}**), 5.08 (s, 2H, **CH₂**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 158.9 (**C=N**), 146.5 (**C^{Ar}**), 135.6 (**C^{Ar}**), 133.9 (**C^{Ar}**), 131.3 (**C^{Ar}**), 128.9 (2C, **C^{Ar}**), 128.8 (**C^{Ar}**), 128.0 (**C^{Ar}**), 126.6 (2C, **C^{Ar}**), 122.5 (**C^{Ar}**), 115.7 (**C^{Ar}**), 63.1 (**CH₂**).

MS (ESI) m/z berechnet für C₁₄H₁₂NO [M+H]⁺: 210.0, gefunden: 210.08.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[199,209]

10.5.1.4.2 1-(2,3-Difluor-6-nitrophenoxy)propan-2-on



Die Darstellung erfolgt nach Lopez-Iglesias *et al.*^[210] Nitrophenol (2.12 g, 12.1 mmol, 1.00 Äq.) wird in Toluol (4 mL) vorgelegt. Chloracetone (1.94 mL, 24.2 mmol, 2.00 Äq.), Kaliumbromid (173 mg, 1.45 mmol, 2 mol%), Natriumhydrogencarbonat (1.12 g, 13.3 mmol, 2.20 Äq.) und Tributylmethylammoniumchlorid (75% w/w in dH₂O, 0.26 mmol, 2.2 mol%) werden hinzugegeben und das Gemisch für 6 h bei 65 °C gerührt.

Es wird Chloraceton (0.49 mL, 6.04 mmol, 0.5 Äq.) hinzugegeben und für weitere 18 h bei 65 °C gerührt. Es wird deionisiertes Wasser (4 mL) hinzugegeben und der pH-Wert der Lösung mit 1 M Natronlauge auf 6.5-7 eingestellt. Die Phasen werden getrennt, die organische Phase mit Natriumchloridlösung (5%, 8 mL) versetzt und für 10 min bei 55-60 °C gerührt. Die Phasen werden getrennt, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 1-(2,3-Difluoro-6-nitrophenoxy)propan-2-on (2.53 g, 10.9 mmol, 91%) wird als gelber Feststoff erhalten.

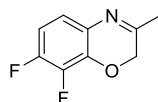
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.73 (ddd, *J* = 9.4 Hz, *J*_{FH} = 5.2, 2.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.07–7.03 (m, 1H, **H^{Ar}**), 4.80 (d, *J*_{FH} = 1.3 Hz, 2H, **CH₂**), 2.31 (s, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 203.0 (**C=O**), 154.1 (dd, *J*_{FC} = 259.6, 11.5 Hz, **C^{Ar}**), 144.7 (dd, *J*_{FC} = 252.9, 14.5 Hz, **C^{Ar}**), 142.6 (dd, *J*_{FC} = 10.9, 2.9 Hz, **C^{Ar}**), 140.0 (**C^{Ar}**), 120.8 (dd, *J*_{FC} = 9.0, 4.0 Hz, **C^{Ar}**), 111.8 (d, *J*_{FC} = 19.2 Hz, **C^{Ar}**), 78.2 (d, *J*_{FC} = 5.3 Hz, **CH₂**), 26.5 (**CH₃**).

MS (ESI) *m/z* berechnet für C₉H₇F₂NO₄Na [M+Na]⁺: 254.1, gefunden: 254.0.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[210]

10.5.1.4.3 7,8-Difluoro-3-methyl-2*H*-benzoxazin (**7b**)



Die Darstellung erfolgt nach Battistoni *et al.*^[211] 1-(2,3-Difluor-6-nitrophenoxy)propan-2-on (539.8 mg, 2.3 mmol, 1.00 Äq.) wird in THF/dH₂O (1:1, 20 mL) vorgelegt, mit Natriumhypophosphit-Monohydrat (1.36 g, 12.8 mmol, 5.5 Äq.) und Palladium auf Aktivkohle (10 % w/w, 30.9 mg, 0.3 mmol, 12.5 mol%) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird filtriert und mit THF/dH₂O (1:1) gewaschen. Das Filtrat wird mit dH₂O verdünnt, mit Diethylether extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 7,8-Difluor-3-methyl-2*H*-benzoxazin (**7b**) (194 mg, 1.3 mmol, 57%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.67 (ddd, *J* = 9.4 Hz, *J*_{FH} = 5.2, 2.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.99 (ddd, *J* = 9.3 Hz, *J*_{FH} = 8.7, 7.2 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 4.80 (d, *J*_{FH} = 1.3 Hz, 2H, **CH₂**), 2.32 (s, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 202.9 (**C=N**), 154.0 (dd, *J*_{FC} = 259.6, 11.5 Hz, **C^{Ar}**), 144.7 (dd, *J*_{FC} = 252.9, 14.5 Hz, **C^{Ar}**), 142.5 (dd, *J*_{FC} = 10.9, 2.9 Hz, **C^{Ar}**), 139.9 (**C^{Ar}**), 120.7

(dd, $J_{FC} = 9.0, 4.0$ Hz, \mathbf{C}^{Ar}), 111.7 (d, $J_{FC} = 19.2$ Hz, \mathbf{C}^{Ar}), 78.1 (d, $J_{FC} = 5.3$ Hz, \mathbf{CH}_2), 26.4 (\mathbf{CH}_3).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[388]

10.5.2 Versuche zur chemischen Reduktion von 3-Thiazolinen

10.5.2.1 Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid

Fein gemörsertes Lithiumaluminiumhydrid (58.8 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) wird in Diethylether (4 mL) vorgelegt und auf 4 °C abgekühlt. 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (200 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) wird in Diethylether (2 mL) gelöst und bei 4 °C zu der Lithiumaluminiumhydrid-Suspension getropft. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird Eiswasser und Diethylether hinzugegeben und die organische Phase abdekantiert. Die Salze werden dreimal mit Diethylether gewaschen, die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht. Es erfolgt keine Reduktion zum gewünschten 3-Thiazolidin. Stattdessen werden eine Ringöffnung des *N,S*-Acetals des 3-Thiazolidins und weitere Spaltprodukte beobachtet.

10.5.2.2 Reduktion mit DIBAL

Der Reduktionsversuch wird analog zu einer Vorschrift von Chung *et al.* durchgeführt.^[212] 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (250 mg, 1.93 mmol, 1.00 Äq.) wird in Toluol (3.4 mL) gelöst und auf -78 °C abgekühlt. DIBAL (1 M in Toluol, 4.4 mL, 2.30 Äq.) wird langsam zugetropft und 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Methanol (0.67 mL) wird hinzugegeben und daraufhin zu Zitronensäure (10% w/w, 9.2 mL) bei einer Temperatur von 0 °C gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 2 h gerührt, der pH-Wert der Mischung mit Kaliumcarbonat auf pH 9 eingestellt und anschließend zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht. Es erfolgt keine Umsetzung von **3c**.

10.5.2.3 Reduktion mit Natriumborhydrid

2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (200 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) wird in Methanol (3 mL) gelöst und auf 4 °C abgekühlt. Fein gemörsertes Natriumborhydrid (58.6 mg, 1.55 mmol, 1.00 Äq.) wird langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur

erwärmt und anschließend 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wird mit dH₂O versetzt und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. 0.7% des gewünschten Produkts werden im Rohprodukt identifiziert, wohingegen der Großteil aus nicht umgesetztem Edukt besteht.

10.5.2.4 Reduktion mit NaB(Boc-Pro)₃H

Der Reduktionsversuch erfolgt nach einer abgewandelten Vorschrift von Reiners *et al.*^[179] Boc-DL-Pro-OH (11.0 g, 51.1 mmol, 6.60 Äq.) wird in Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst, mit gemörsertem Natriumborhydrid (0.65 g, 17.0 mmol, 2.20 Äq.) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf 4 °C abgekühlt und 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (1.00 g, 7.74 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in Tetrahydrofuran, (10 mL) zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 24 h bei 4 °C gerührt. Es wird Salzsäure (2 M, 20 mL) zugesetzt und für 30 min bei 60 °C gerührt. Die Mischung wird mit Kaliumcarbonat auf einen pH-Wert von 9 eingestellt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Es erfolgt keine Umsetzung von **3c**.

10.5.2.5 Reduktionen mit Hantzsch-Ester

Die Reduktionsversuche erfolgen nach abgewandelten Vorschriften von Rueping *et al.*^[213] und Zhang *et al.*^[214] 2,2-Dimethyl-3-thiazolin (**3a**) (80.0 mg, 0.70 mmol, 1.00 Äq.) wird in Dichlormethan (5 bzw. 7 mL) gelöst. Hantzsch-Ester (247 mg, 0.98 mmol, 1.40 Äq. bzw. 194 mg, 0,77 mmol, 1.10 Äq.) und Diphenylphosphat (8.7 mg, 0.04 mmol, 5 mol% bzw. 17.4 mg, 0.07 mmol, 10 mol% bzw. 34.8 mg, 0.14 mmol, 20 mol%) oder Schreiners Thioharnstoff Katalysator (17.4 mg, 0.03 mmol, 5 mol% bzw. 34.8 mg, 0.07 mmol, 10 mol%) werden hinzugegeben und für 66 h bzw. 86 h unter Argonatmosphäre bei 40 °C oder Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird unter vermindertem Druck eingengt und das Rohprodukt ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.23 dargestellt.

Tabelle 10.23. Ergebnisse der Hantzsch-Ester Reduktionen von 2,2-Dimethyl-3-thiazolin (**3a**)

Hantzsch-Ester [Äq.]	DPP [mol%]	Thioharnstoff-Kat. [mol%]	T [°C]	t [h]	Umsatz des Eduktes [%]
1.4	5	-	40	66	0
1.4	10	-	40	86	0
1.4	20	-	40	86	0
1.1	-	5	RT	86	0
1.1	-	10	RT	86	0

10.5.2.6 Reduktion mit Palladium auf Aktivkohle

2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (500 mg, 3.87 mmol, 1.00 Äq.) wird in Methanol (5 mL) gelöst und mit Palladium auf Aktivkohle (10% w/w, 41.0 mg, 0.39 mmol, 10 mol%) versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 18 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Das Palladium auf Aktivkohle wird durch Filtration abgetrennt, mit kaltem Methanol gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Es erfolgt keine Umsetzung von **3c**.

10.5.2.7 Reduktion mit Zinkstaub

Der Reduktionsversuch wird analog zu einer Vorschrift von Giovenzana *et al.* durchgeführt.^[215] 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (250 mg, 1.93 mmol, 1.00 Äq.) wird in wässriger Kaliumhydroxidlösung (5% w/w, 9 mL) gelöst. Zinkstaub (1.89 g, 29.0 mmol, 15.0 Äq.) wird hinzugegeben und unter Argonatmosphäre für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Zinkstaub wird über Celite 535 abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zweimal mit deionisiertem Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wird ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Es erfolgt keine Umsetzung von **3c**.

10.5.3 Synthese von Referenzverbindungen

10.5.3.1 AAV12: Synthese von 3-Thiazolidinen **4**

Die Reduktion der 3-Thiazoline **3** mit Catecholboran erfolgt nach Gröger^[208] bzw. nach einer abgewandelten Vorschrift von Reiners *et al.*^[179] 3-Thiazolin (14.4 mmol, 1.00 Äq.) wird in Toluol (40 mL) vorgelegt. Catecholboran (52.1 mmol, 3.00 Äq.) wird in Toluol (10 mL) gelöst und bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 20 min zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 48 h bei Raumtemperatur gerührt, vorsichtig mit dH₂O versetzt und anschließend dreimal mit Natronlauge (2 M) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

10.5.3.1.1 2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolidin (**4b**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV12 aus 2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolin (**3b**) (1.16 g, 8.09 mmol, 1.00 Äq.) und Catecholboran (2.60 mL, 24.3 mmol, 3.00 Äq.). 2,2,5,5-Tetramethyl-3-thiazolidin (**4b**) (186 mg, 1.28 mmol, 16%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (12%-100% Ethylacetat in Cyclohexan) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.02 (s, 2H, CH₂), 1.59 (s, 6H, NC(CH₃)₂S), 1.43 (s, 6H, CC(CH₃)₂S).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 81.6 (NC(CH₃)₂S), 64.6 (CH₂), 59.8 (CC(CH₃)₂S), 32.6 (NC(CH₃)₂S), 30.4 (CC(CH₃)₂S).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₇H₁₆NS [M+H]⁺: 146.0998, gefunden: 146.1000.

10.5.3.1.2 *rac*-2,2,4-Trimethyl-3-thiazolidin (*rac*-**4c**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV12 aus 2,2,4-Trimethyl-3-thiazolin (**3c**) (1.00 g, 7.74 mmol, 1.00 Äq.) und Catecholboran (2.48 mL, 23.2 mmol, 3.00 Äq.). *rac*-2,2,4-Trimethyl-3-thiazolidin (*rac*-**4c**) (29.9 mg, 0.23 mmol, 3%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (12%-100% Ethylacetat in Cyclohexan) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.57–3.50 (m, 1H, CH), 3.22 (dd, *J* = 10.3, 5.6 Hz, 1H, CH₂), 2.59 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, CH₂), 1.67 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.55 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.36 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 75.8 (C(CH₃)₂), 59.7 (CCH₃), 44.7 (CH₂), 33.3 (C(CH₃)₂), 31.7 (C(CH₃)₂), 19.4 (CCH₃).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₆H₁₄NS [M+H]⁺: 132.0842, gefunden: 132.0844.

10.5.3.1.3 *rac*-2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolidin (*rac*-**4d**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV12 aus 2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolin (**3d**) (2.73 g, 17.4 mmol, 1.00 Äq.) und Catecholboran (5.55 mL, 52.1 mmol, 3.00 Äq.). *rac*-2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolidin (*rac*-**4d**) (860 mg, 5.40 mmol, 31%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (12%-100% Ethylacetat in Cyclohexan) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.27 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CHCH₃), 1.60 (s, 3H, NC(CH₃)₂S), 1.55 (s, 3H, NC(CH₃)₂S), 1.41 (s, 3H, CC(CH₃)₂S), 1.19 (s, 3H, CC(CH₃)₂S), 1.11 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CHCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 72.0 (NC(CH₃)₂S), 66.6 (CH), 61.4 (CC(CH₃)₂S), 33.8 (NC(CH₃)₂S), 32.9 (NC(CH₃)₂S), 27.7 (CC(CH₃)₂S), 26.1 (CC(CH₃)₂S), 13.6 (CCH₃).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₈H₁₈NS [M+H]⁺: 160.1155, gefunden: 160.1150.

IR [cm⁻¹]: 2964, 2922, 2851, 2357, 1736, 1454, 1378, 1365, 1201, 1158, 1119, 1043, 853, 797, 750, 632, 551.

10.5.3.1.4 *rac*-3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (*rac*-**4e**)



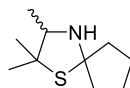
Die Darstellung erfolgt nach AAV12 aus 3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3e**) (735 g, 4.73 mmol, 1.00 Äq.) und Catecholboran (1.50 mL, 14.2 mmol, 3.00 Äq.). *rac*-3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (*rac*-**4e**) (58.9 mg, 0.38 mmol, 8%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (6%-50% Ethylacetat in Cyclohexan) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.39–3.33 (m, 1H, CHCH₃), 3.17 (dd, *J* = 10.1, 5.8 Hz, 1H, CH₂), 2.55 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, CH₂), 2.19–2.11 (m, 1H, (CH₂)₄), 1.96–1.86 (m, 3H, (CH₂)₄), 1.82–1.67 (m, 4H, (CH₂)₄), 1.35 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CCH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 85.3 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 59.9 (CCH_3), 44.2 (CH_2), 43.6 ($(\text{CH}_2)_4$), 41.1 ($(\text{CH}_2)_4$), 24.7 ($(\text{CH}_2)_4$), 24.2 ($(\text{CH}_2)_4$), 19.4 (CCH_3).

HRMS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 158.0998, gefunden: 158.0997.

10.5.3.1.5 *rac*-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (*rac*-**4f**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV12 aus 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**) (2.16 g, 11.81 mmol, 1.00 Äq.) und Catecholboran (3.78 mL, 35.4 mmol, 3.00 Äq.). *rac*-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (*rac*-**4f**) (933 mg, 5.03 mmol, 42%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (6%-50% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.11 (q, J = 6.6 Hz, 1H, CHCH_3), 2.13–1.63 (m, 8H, $(\text{CH}_2)_4$), 1.41 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.10 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 81.5 ($\text{C}(\text{CH}_2)_4$), 67.1 (CCH_3), 59.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 44.5 ($(\text{CH}_2)_4$), 42.4 ($(\text{CH}_2)_4$), 27.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 24.4 ($(\text{CH}_2)_4$), 23.9 ($(\text{CH}_2)_4$), 13.7 (CCH_3).

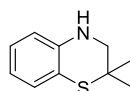
MS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 186.12, gefunden: 186.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[179]

10.5.3.2 AAV13: Synthese von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen **6**

Die organokatalytische Reduktion der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** erfolgt analog zu Rueping *et al.*^[213] 2*H*-1,4-Benzothiazin **5** (0.78 mmol, 1.00 Äq.) wird in Dichlormethan (5 mL) vorgelegt, Hantzsch-Ester (1.18 mmol, 1.40 Äq.) und Diphenylphosphat (0.04 mmol, 5 mol%) werden zugegeben und die Reaktionsmischung für 24 h unter Argonatmosphäre bei 40 °C gerührt. Das Rohprodukt wird unter vermindertem Druck eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt.

10.5.3.2.1 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin (**6a**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV13 aus 2,2-Dimethyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5a**) (107 mg, 0.60 mmol, 1.00 Äq.) mit Hantzsch-Ester (213 mg, 0.84 mmol, 1.40 Äq.) und Diphenylphosphat (6.94 mg, 0.03 mmol, 5 mol%). Durch säulenchromatographische

Aufreinigung (9% Ethylacetat in Cyclohexan) wird 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin (**6a**) (90.1 mg, 0.29 mmol, 49%) als farbloser Feststoff erhalten.

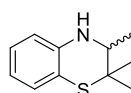
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.97 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.92 (ddd, *J* = 7.9, 7.2, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.65 (ddd, *J* = 7.6, 7.5, 1.3 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.53 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 3.25 (s, 2H, **CH₂**), 1.43 (s, 6H, **C(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 140.2 (**C^{Ar}**), 127.7 (**C^{Ar}**), 125.3 (**C^{Ar}**), 118.2 (**C^{Ar}**), 116.6 (**C^{Ar}**), 114.9 (**C^{Ar}**), 54.6 (**CH₂**), 39.7 (**C(CH₃)₂**), 28.0 (**C(CH₃)₂**).

MS (EI) *m/z* berechnet für C₁₀H₁₃NS [M]⁺: 179.08, gefunden: 179.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[389]

10.5.3.2.2 *rac*-2,2,3-Trimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin (*rac*-**6b**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV13 aus 2,2,3-Trimethyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5b**) (150 mg, 0.78 mmol, 1.00 Äq.), Hantzsch-Ester (298 mg, 1.18 mmol, 1.40 Äq.) und Diphenylphosphat (9.75 mg, 0.04 mmol, 5 mol%). Durch säulenchromatographische Aufreinigung (2%-14% Ethylacetat in Cyclohexan) wird 2,2,3-Trimethyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin (*rac*-**6b**) (51.4 mg, 0.27 mmol, 34%) als braunes Öl erhalten.

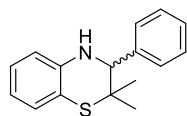
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.95 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.89 (ddd, *J* = 8.3, 7.3, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.61 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.48 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 3.85 (s, 1H, **NH**), 3.50 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, **CHCH₃**), 1.34 (s, 3H, **C(CH₃)₂**), 1.30 (s, 3H, **C(CH₃)₂**), 1.18 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, **CCH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 140.6 (**C^{Ar}**), 127.5 (**C^{Ar}**), 125.3 (**C^{Ar}**), 117.9 (**C^{Ar}**), 116.6 (**C^{Ar}**), 114.6 (**C^{Ar}**), 56.2 (**CHCH₃**), 42.6 (**C(CH₃)₂**), 27.4 (**C(CH₃)₂**), 23.7 (**C(CH₃)₂**), 18.0 (**CCH₃**).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₁H₁₆NS [M+H]⁺: 194.0998, gefunden: 194.1001.

IR [cm⁻¹]: 2961, 1590, 1480, 1307, 1123, 738.

10.5.3.2.3 2,2-Dimethyl-3-phenyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin (*rac*-**6c**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV13 aus 2,2-Dimethyl-3-phenyl-2*H*-1,4-benzothiazin (**5c**) (450 mg, 1.78 mmol, 1.00 Äq.), Hantzsch-Ester (210 mg, 0.83 mmol, 1.40 Äq.) und Diphenylphosphat (7.40 mg, 0.03 mmol, 5 mol%). Durch säulenchromatographische

Aufreinigung (100% Cyclohexan) wird 2,2-Dimethyl-3-phenyl-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin (*rac*-**6c**) (295 mg, 1.16 mmol, 65%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39–7.34 (m, 5H, **H^{Ar}**), 7.02 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.96–6.92 (m, 1H, **H^{Ar}**), 6.67 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.54 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 4.59 (s, 1H, **CH**), 4.23 (s, 1H, **NH**), 1.32 (s, 3H, C(**CH₃**)₂), 1.26 (s, 3H, C(**CH₃**)₂).

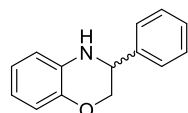
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 141.1(**C^{Ar}**), 140.5 (**C^{Ar}**), 128.7 (2C, **C^{Ar}**), 128.4 (**C^{Ar}**), 128.3 (2C, **C^{Ar}**), 127.5 (**C^{Ar}**), 125.6 (**C^{Ar}**), 118.3 (**C^{Ar}**), 116.4 (**C^{Ar}**), 114.7 (**C^{Ar}**), 65.8 (**CH**), 42.8 (C(**CH₃**)₂), 27.8 (C(**CH₃**)₂), 24.5 (C(**CH₃**)₂).

MS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₆H₁₈NS [M+H]⁺: 256.1, gefunden: 256.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[179]

10.5.3.3 Synthese von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazinen **8**

10.5.3.3.1 *rac*-3-Phenyl-3,4-dihydro-2*H*-benzoxazin (*rac*-**8a**)



Die Darstellung erfolgt analog zur Reduktion der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** nach Rueping *et al.*^[199] 3-Phenyl-2*H*-benzoxazin (**7a**) (300 mg, 1.43 mmol, 1.00 Äq.) wird in Dichlormethan (5 mL) vorgelegt, Hantzsch-Ester (507 mg, 2.00 mmol, 1.40 Äq.) und Diphenylphosphat (18.0 mg, 0.07 mmol, 5 mol%) zugeben und für 24 h unter Argonatmosphäre bei 40 °C gerührt. Das Gemisch wird unter vermindertem Druck eingeeengt. 3-Phenyl-3,4-dihydro-2*H*-benzoxazin (*rac*-**8a**) (266 mg, 1.26 mmol, 88%) wird nach säulenchromatographischer Aufgereinigung (1-10% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelbliches Öl erhalten.

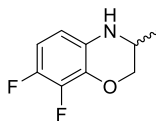
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.43–7.33 (m, 5H, **H^{Ar}**), 6.87–6.80 (m, 2H, **H^{Ar}**), 6.70 (ddd, *J* = 17.5, 7.7, 1.6 Hz, 2H, **H^{Ar}**), 4.52 (dd, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H, **CH₂**), 4.29 (dd, *J* = 10.6, 3.0 Hz, 1H, **CH₂**), 4.01 (dd, *J* = 10.7, 8.6 Hz, 1H, **CH**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 142.9 (**C^{Ar}**), 138.5 (**C^{Ar}**), 133.3 (**C^{Ar}**), 128.2 (2C, **C^{Ar}**), 127.7 (**C^{Ar}**), 126.6 (2C, **C^{Ar}**), 120.9 (**C^{Ar}**), 118.3 (**C^{Ar}**), 116.0 (**C^{Ar}**), 114.8 (**C^{Ar}**), 70.4 (**CH₂**), 53.6 (**CH**).

MS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₄H₁₄NO [M+H]⁺: 212.1, gefunden: 212.0.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[199]

10.5.3.3.2 *rac*-7,8-Difluor-3-methyl-3,4-dihydro-2*H*-benzoxazin (*rac*-**8b**)



Die Darstellung erfolgt nach Lopez-Iglesias *et al.*^[210] 1-(2,3-Difluor-6-nitrophenoxy)propan-2-on (1.85 g, 8.00 mmol, 1.00 Äq.) wird in Methanol (200 mL) vorgelegt und mit Palladium auf Aktivkohle (800 mg, 7.52 mmol 10% w/w) versetzt. Das Gemisch wird unter Wasserstoffatmosphäre (20 bar) im Hochdruckautoklaven für 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird filtriert, der Feststoff mit Diethylether gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 7,8-Difluor-3-methyl-3,4-dihydro-2*H*-benzoxazin (*rac*-**8b**) (1.36 g, 7.35 mmol, 92%) wird durch säulenchromatographische Aufreinigung (100% Ethylacetat) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.55 (ddd, *J* = 10.0 Hz, *J*_{FH} = 9.0, 7.8 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 6.25 (ddd, *J* = 9.0 Hz, *J*_{FH} = 4.7, 2.3 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 4.28 (dd, *J* = 10.5, 2.8 Hz, 1H, **CH₂**), 3.78 (dd, *J* = 10.4, 8.2 Hz, 1H, **CH₂**), 3.61 (s, 1H, **NH**), 3.53–3.47 (m, 1H, **CH**), 1.19 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.6 (dd, *J*_{FC} = 236.9, 10.8 Hz, **C^{Ar}**), 140.8 (dd, *J*_{FC} = 244.2, 15.7 Hz, **C^{Ar}**), 133.4 (dd, *J*_{FC} = 10.6, 2.8 Hz, **C^{Ar}**), 131.1 (t, *J*_{FC} = 2.5 Hz, **C^{Ar}**), 108.6 (dd, *J*_{FC} = 7.4, 3.8 Hz, **C^{Ar}**), 107.9 (d, *J*_{FC} = 18.3 Hz, **C^{Ar}**), 71.1 (**CH₂**), 45.0 (**CH**), 17.6 (**CH₃**).

MS (ESI) *m/z* berechnet für C₉H₁₀F₂NO [M+H]⁺: 186.06, gefunden: 186.0.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[210]

10.5.4 Analytik

10.5.4.1 Umsatzbestimmung von 3-Thiazolinen **3b-f**

Die Bestimmung des Umsatzes für die Biotransformationen der 3-Thiazoline **3a-f** zu den entsprechenden 3-Thiazolidinen **4b-f** wird über die Analyse der organischen Phase nach Extraktion des Reaktionsgemisches durchgeführt. Die Analyse erfolgt mit dem Gaschromatographie System GC-2010 Plus von Shimadzu ausgestattet mit der Säule ZB-5MSi (Phenomenex, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm; N₂; linear velocity 46.9 cm s⁻¹ split mode 1:10; total flow 28.8 mL min⁻¹; purge flow 3.0 mL min⁻¹; column flow 2.34 mL min⁻¹; Druck 140.4 kPa, welche an einen AOC-20i/s Auto Injector/Auto Sampler gekoppelt ist. Die verwendeten Temperaturprogramme und Retentionszeiten sind in Tabelle 10.24 dargestellt.

Tabelle 10.24. Achirale GC-Analytik zur Umsatzbestimmung der 3-Thiazoline **3b-f**

3-Thiazolin/3-Thiazolidin	Temperaturprogramm	Retentionszeiten [min]
3b / 4b	40-200 °C, 10 °C min ⁻¹	3b: 3.7 4b: 4.4
3c / 4c	40-200 °C, 15 °C min ⁻¹	3c: 3.5 4c: 3.6
3d / 4d	40-200 °C, 10 °C min ⁻¹	3d: 4.8 4d: 5.2
3e/ 4e	40-200 °C, 10 °C min ⁻¹	3e: 8.0 4e: 8.1
3f / 4f	40-200 °C, 10 °C min ⁻¹	3f: 8.5 4f: 9.0

Die Bestimmung der Umsätze erfolgt über den Vergleich der Integrale der Edukte und Produkte. Zur Berücksichtigung einer unterschiedlichen Ionisation der 3-Thiazoline **3** und 3-Thiazolidine **4** werden jeweils Lösungen mit definierten Verhältnissen von Edukt und Produkt per achiraler GC untersucht. Über das definiert eingewogene und per GC ermittelte Verhältnis wird daraufhin jeweils ein Korrekturfaktor für die 3-Thiazolidine **4** zur Umsatzbestimmung ermittelt. Die eingewogenen und per GC bestimmten Verhältnisse und die jeweiligen bestimmten Korrekturfaktoren sind in Tabelle 10.25-Tabelle 10.29 dargestellt.

Tabelle 10.25. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Ionisation von **3b** und **4b**

Eintrag	4b/3b eingewogen	4b/3b GC	Korrekturfaktor
1	0.91	1.02	0.89
2	0.4	0.32	1.25
3	1.62	1.47	1.1
Mittelwert			1.08 ± 0.18

Tabelle 10.26. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Ionisation von **3c** und **4c**

Eintrag	4c/3c eingewogen	4c/3c GC	Korrekturfaktor
1	1.17	0.89	1.3
2	0.45	0.26	1.71
3	1.75	1.39	1.26
Mittelwert			1.42 ± 0.25

Tabelle 10.27. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Ionisation von **3d** und **4d**

Eintrag	4d/3d eingewogen	4d/3d GC	Korrekturfaktor
1	2.87	2.57	1.11
2	0.39	0.37	1.06
3	1.18	1.099	1.07
Mittelwert			1.08 ± 0.03

Tabelle 10.28. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Ionisation von **3e** und **4e**

Eintrag	4e/3e eingewogen	4e/3e GC	Korrekturfaktor
1	0.31	0.25	1.21
2	0.77	0.65	1.18
Mittelwert			1.19 ± 0.02

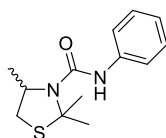
Tabelle 10.29. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Ionisation von **3f** und **4f**

Eintrag	4f/3f eingewogen	4f/3f GC	Korrekturfaktor
1	0.86	0.66	1.3
2	0.53	0.43	1.23
3	2.07	1.34	1.53
Mittelwert			1.35 ± 0.15

Über die Simulation der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches (Versetzen der Reaktionsmischung mit Dichlormethan, Durchmischung und anschließende Zentrifugation bei 6000 x g für 10 min) mit bestimmten Verhältnissen 3-Thiazolin **3**, 3-Thiazolidin **4** in einer Dreifachbestimmung wird zudem überprüft, ob die 3-Thiazoline **3** und die 3-Thiazolidine **4** im gleichen Maß extrahiert werden. Da dies für alle Verbindungen zutrifft, muss für die Aufarbeitung der Reaktionsmischung kein Korrekturfaktor bestimmt werden.

10.5.4.2 AAV14: Derivatisierung von 3-Thiazolidinen **4** mit Phenylisocyanat

Die Derivatisierung wird nach Reiners *et al.*^[179] durchgeführt. 3-Thiazolidin **4** (0.36 mmol, 1.00 Äq.) wird in Diethylether (0.5 mL) gelöst. Phenylisocyanat (41.0 µL, 0.38 mmol, 1.05 Äq.) und Cyclohexan (0.25 mL) werden hinzugegeben und die Reaktionsmischung unter Rühren über Nacht eingedampft. Der farblose Feststoff wird anschließend im Hochvakuum getrocknet.

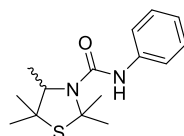
10.5.4.2.1 *rac*-2,2,4-Trimethyl-*N*-phenylthiazolidin-3-carboxamid (*rac*-**9c**)

Die Darstellung erfolgt nach AAV14 aus *rac*-2,2,4-Trimethyl-3-thiazolidin (**4c**) (32.5 mg, 0.25 mmol, 1.00 Äq.) und Phenylisocyanat (28.0 μ L, 0.25 mmol, 1.00 Äq.). *rac*-2,2,4-Trimethyl-*N*-phenylthiazolidin-3-carboxamid (*rac*-**9c**) (49.4 mg, 0.19 mmol, 79%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.30–7.26 (m, 2H, H^{Ar}), 7.05–7.02 (m, 1H, H^{Ar}), 6.23 (s, 1H, NH), 4.38 (quint, J = 6.2 Hz, 1H, CHCH_3), 3.33 (dd, J = 11.7, 5.9 Hz, 1H, CH_2), 2.61 (d, J = 11.7 Hz, 1H, CH_2), 1.90 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.87 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.50 (d, J = 6.3 Hz, 3H, CHCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 152.1 ($\text{C}=\text{O}$), 138.9 (C^{Ar}), 129.0 (2C, C^{Ar}), 123.4 (C^{Ar}), 120.4 (2C, C^{Ar}), 72.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 58.7 (CHCH_3), 34.9 (CH_2), 30.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 29.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 20.8 (CCH_3).

HRMS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{OS}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 251.1213, gefunden: 251.1209.

10.5.4.2.2 *rac*-2,2,4,5,5-Pentamethyl-*N*-phenylthiazolidin-3-carboxamid (*rac*-**9d**)

Die Darstellung erfolgt nach AAV14 aus *rac*-2,2,4,5,5-Pentamethyl-3-thiazolidin (**4d**) (57.0 mg, 0.36 mmol, 1.00 Äq.) und Phenylisocyanat (41.0 μ L, 0.38 mmol, 1.05 Äq.). *rac*-2,2,4,5,5-Pentamethyl-*N*-phenylthiazolidin-3-carboxamid (*rac*-**9d**) (91.8 mg, 0.33 mmol, 92%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.38–7.35 (m, 2H, H^{Ar}), 7.32–7.28 (m, 2H, H^{Ar}), 7.06–7.03 (m, 1H, H^{Ar}), 6.23 (s, 1H, NH), 3.90 (q, J = 6.5 Hz, 1H, CHCH_3), 2.02 (s, 3H, $\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 1.86 (s, 3H, $\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 1.66 (s, 3H, $\text{CC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 1.46 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CCH_3), 1.32 (s, 3H, $\text{CC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$).

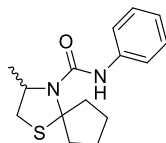
$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 152.8 ($\text{C}=\text{O}$), 138.9 (C^{Ar}), 129.1 (2C, C^{Ar}), 123.4 (C^{Ar}), 120.4 (2C, C^{Ar}), 71.9 ($\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 68.7 (CHCH_3), 51.3 ($\text{CC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 33.3 ($\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 33.1 ($\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 31.7 ($\text{CC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 24.2 ($\text{CC}(\text{CH}_3)_2\text{S}$), 17.8 (CCH_3).

HRMS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{OS}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 279.1525, gefunden: 279.1531.

IR [cm^{-1}]: 2364, 1631, 1529, 1441, 745.

T_m : 165 $^\circ\text{C}$

10.5.4.2.3 *rac*-3-Methyl-*N*-phenyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan-4-carboxamid (*rac*-**9e**)



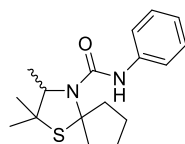
Die Darstellung erfolgt nach AAV14 aus *rac*-3-Methyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (**4e**) (2.51 mg, 0.02 mmol, 1.00 Äq.) und Phenylisocyanat (1.90 μ L, 0.02 mmol, 1.00 Äq.). *rac*-3-Methyl-*N*-phenyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan-4-carboxamid (*rac*-**9e**) (8.46 mg, 0.02 mmol, 100%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.37–7.27 (m, 4H, **H^{Ar}**), 7.07–7.02 (m, 1H, **H^{Ar}**), 6.18 (s, 1H, **NH**), 4.37 (quint, $J = 6.3$ Hz, 1H, **CHCH₃**), 3.27 (dd, $J = 11.7, 6.0$ Hz, 1H, **CH₂**), 2.88–2.82 (m, 1H, **CH₂**), 2.74–2.64 (m, 2H, (**CH₂**)₄), 1.99–1.81 (m, 4H, (**CH₂**)₄), 1.72–1.61 (m, 2H, (**CH₂**)₄), 1.53 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, **CHCH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 151.8 (**C=O**), 138.9 (**C^{Ar}**), 129.1 (2C, **C^{Ar}**), 123.4 (**C^{Ar}**), 120.5 (2C, **C^{Ar}**), 81.5 (**C(CH₂)₄**), 57.9 (**CHCH₃**), 40.1 ((**CH₂**)₄), 38.4 ((**CH₂**)₄), 35.6 (**CH₂**), 25.4 ((**CH₂**)₄), 25.1 ((**CH₂**)₄), 20.7 (**CHCH₃**).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₁₅H₂₁N₂OS [M+H]⁺: 277.1369, gefunden: 277.1374.

10.5.4.2.4 *rac*-2,2,3-Trimethyl-*N*-phenyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan-4-carboxamid (*rac*-**9f**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV14 aus *rac*-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (**4f**) (54.1 mg, 0.29 mmol, 1.00 Äq.) und Phenylisocyanat (33.5 μ L, 0.31 mmol, 1.05 Äq.). *rac*-2,2,3-Trimethyl-*N*-phenyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan-4-carboxamid (*rac*-**9f**) (82.3 mg, 0.27 mmol, 93%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.38–7.33 (m, 2H, **H^{Ar}**), 7.32–7.27 (m, 2H, **H^{Ar}**), 7.06–7.03 (m, 1H, **H^{Ar}**), 3.88 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, **CHCH₃**), 3.03–2.96 (m, 1H, (**CH₂**)₄), 2.86–2.79 (m, 1H, (**CH₂**)₄), 2.18–2.09 (m, 2H, (**CH₂**)₄), 1.97–1.83 (m, 4H, (**CH₂**)₄), 1.63 (s, 3H, **C(CH₃)₂**), 1.44 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, **CHCH₃**), 1.32 (s, 3H, **C(CH₃)₂**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 152.4 (**C=O**), 138.9 (**C^{Ar}**), 129.1 (2C, **C^{Ar}**), 123.4 (**C^{Ar}**), 120.4 (2C, **C^{Ar}**), 80.8 (**C(CH₂)₄**), 68.0 (**CHCH₃**), 51.9 (**C(CH₃)₂**), 41.7 ((**CH₂**)₄), 41.1 ((**CH₂**)₄), 32.1 (**C(CH₃)₂**), 25.1 ((**CH₂**)₄), 25.0 ((**CH₂**)₄), 23.7 (**C(CH₃)₂**), 17.5 (**CHCH₃**).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₁₇H₂₅N₂OS [M+H]⁺: 305.1682, gefunden: 305.1687.

IR [cm⁻¹]: 2357, 2012, 1632, 1594, 1548, 1501, 1440, 1346, 754.

T_m: 169 °C

10.5.4.3 Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von 3-Thiazolidinen

Zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse der 3-Thiazolidine, werden diese zunächst entsprechend der AAV14 derivatisiert. Die erhaltenen Feststoffe werden in Dichlormethan gelöst und über das LC2000 SFC-HPLC von Jasco mit der chiralen HPLC Säule Chiralpak[®] IC von Daicel (überkritisches CO₂:EtOH (DEA) = 90:10 (0.01), 1 mL min⁻¹, 20 °C, 10 MPa, 210 nm) analysiert. Die Enantiomerenüberschüsse werden über die Integrale der Enantiomere bestimmt. Die Retentionszeiten mit Zuordnung zur absoluten Konfiguration der 3-Thiazolidine **4**, die für **4f** nach der Reaktion im präparativen Maßstab von Merten bestimmt wurde (siehe Kapitel 4.3.5.5) und in Analogie per SFC-HPLC auf die anderen Thiazolidine **4c-e** übertragen wurde, sind in Tabelle 10.30 dargestellt.

Tabelle 10.30. Chirale SFC-HPLC Analytik zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse der derivatisierten 3-Thiazolidine **9c-f**

derivatisierte 3-Thiazolidine 9c-f	Retentionszeiten [min]
9c	(<i>S</i>)- 9c : 13.4 (<i>R</i>)- 9c : 14.9
9d	(<i>S</i>)- 9d : 10.5 (<i>R</i>)- 9d : 11.8
9e	(<i>S</i>)- 9e : 19.0 (<i>R</i>)- 9e : 33.8
9f	(<i>S</i>)- 9f : 13.5 (<i>R</i>)- 9f : 17.6

10.5.4.4 Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazinen **6a-c**

Zur Analyse der Biotransformationen der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** wird ein kombinierter Ansatz zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses verwendet. Es erfolgt eine direkte Analyse der organischen Phase des Rohprodukts nach Extraktion des Reaktionsgemisches. Die Analyse wird an einem LC2000 SFC-HPLC system von Jasco mit den chiralen HPLC Säulen Chiralpak[®] IC oder OB-H von Daicel bei 20 °C mit Mischungen von überkritischem CO₂ und Ethanol (mit 0.1% DEA) als mobile Phase bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ und einem Rückdruck von 12 MPa bei einer Detektionswellenlänge von 210 nm durchgeführt. Details der jeweiligen HPLC-Methoden und die Retentionszeiten der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** sowie der Enantiomere der 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazine **6**

mit Zuordnung zur absoluten Konfiguration in Analogie zu den 3-Thiazolidinen ist in Tabelle 10.31 dargestellt.

Tabelle 10.31. Chirale SFC-HPLC Analytik zur Analyse der Biotransformationen von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5**

Substrat/ Produkt	HPLC Säule	Mobile Phase (überkritisches CO ₂ : Ethanol (0.1% DEA))	Retentionszeiten [min]
5a/6a	Chiralpak® IC	95:5 (0.005)	5a: 10.9 6a: 9.3
5b/6b	Chiralpak® OB-H	95:5 (0.005)	5b: 9.6 (<i>S</i>)- 6b: 15.1 (<i>R</i>)- 6b: 16.5
5c/6c	Chiralpak® OB-H	90:10 (0.01)	5c: 16.5 (<i>S</i>)- 6c: 19.1 (<i>R</i>)- 6c: 21.1

Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse erfolgt über die Integrale der Enantiomere. Die Bestimmung der Umsätze erfolgt über den Vergleich der Integrale der Edukte und Produkte. Zur Berücksichtigung einer unterschiedlichen Absorption der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazine **6a-c** bei 210 nm werden jeweils Lösungen mit definierten Verhältnissen von Edukt und Produkt per chiraler SFC-HPLC untersucht. Über das definiert eingewogene und per HPLC ermittelte Verhältnis wird daraufhin jeweils ein Korrekturfaktor für die 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazine **6a-c** zur Umsatzbestimmung ermittelt. Die eingewogenen Verhältnisse gegenüber den per HPLC bestimmten Verhältnisse und die bestimmten Korrekturfaktoren sind in Tabelle 10.32- Tabelle 10.34 dargestellt.

Tabelle 10.32. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Absorption von **5a** und **6a**

Eintrag	6a/5a eingewogen	6a/5a HPLC	Korrekturfaktor
1	0.66	0.53	1.25
2	0.29	0.25	1.19
3	0.13	0.12	1.05
Mittelwert			1.16 ± 0.11

Tabelle 10.33. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Absorption von **5b** und **6b**

Eintrag	6b/5b eingewogen	6b/5b HPLC	Korrekturfaktor
1	0.32	0.34	0.92
2	0.36	0.37	0.97
3	1.09	1.03	1.06
Mittelwert			0.983 ± 0.07

Tabelle 10.34. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Absorption von **5c** und **6c**

Eintrag	6c/5c eingewogen	6c/5c HPLC	Korrekturfaktor
1	0.59	0.47	1.26
2	0.44	0.38	1.14
3	5.80	4.92	1.18
Mittelwert			1.19 ± 0.06

Über die Simulation der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches (Versetzen der Reaktionsmischung mit Dichlormethan, Durchmischung der Probe und anschließende Zentrifugation bei 6000 x g für 10 min) mit bestimmten Verhältnissen 2*H*-1,4-Benzothiazin **5** und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzothiazin **6** in einer Dreifachbestimmung wird zudem überprüft, ob die Imine **5a-c** und die entsprechenden Amine **6a-c** im gleichen Maß extrahiert werden. Da dies für alle Verbindungen zutrifft, muss für die Aufarbeitung der Reaktionsmischung kein Korrekturfaktor bestimmt werden.

10.5.4.5 Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses von 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazinen **8a-b**

Zur Analyse der Biotransformationen der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7a-b** wird ebenfalls ein kombinierter Ansatz zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses verwendet. Es erfolgt eine direkte Analyse der organischen Phase des Rohprodukts nach Extraktion des Reaktionsgemisches. Die Analyse wird an einem LC2000 SFC-HPLC System von Jasco mit der chiralen HPLC Säule Chiralpak® OJ-H von Daicel durchgeführt. Details der jeweiligen HPLC-Methoden und die Retentionszeiten der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** sowie der Enantiomere der 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine **8** mit Zuordnung zur absoluten Konfiguration sind in Tabelle 10.35 dargestellt. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration des 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazins **8a** erfolgt über die Bestimmung des Drehwertes im Anschluss an die präparative Biotransformation von **7a** und Vergleich mit Literaturdaten.^[199] Die Zuordnung der absoluten Konfiguration des 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazins **8b** erfolgt über die HPLC-Messung in Analogie zu Literaturdaten.^[210]

Tabelle 10.35. Chirale SFC-HPLC Analytik zur Analyse der Biotransformationen von 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7**

Substrat / Produkt	HPLC Methode	Retentionszeiten [min]
7a/8a	überkritisches CO ₂ :Ethanol (DEA) 85:15 (0.015), 1 mL min ⁻¹ , 20 °C, 10 MPa, 210 nm	7a : 37.9 (<i>S</i>)- 8a : 28.7 (<i>R</i>)- 8a : 30.6
7b/8b	<i>n</i> -Hexan:2-Propanol 95:5, 0.8 mL min ⁻¹ , 30 °C, 12 MPa, 210 nm	7b : 50.8 (<i>S</i>)- 8b : 24.5 (<i>R</i>)- 8b : 26.3

Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse erfolgt über das Verhältnis der Integrale der Enantiomere. Die Bestimmung der Umsätze erfolgt über den Vergleich der Integrale der Edukte und Produkte. Zur Berücksichtigung einer unterschiedlichen Absorption der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine **8** bei 210 nm werden jeweils Lösungen mit definierten Verhältnissen von Edukt und Produkt per chiraler SFC-HPLC untersucht. Über das definiert eingewogene und per HPLC ermittelte Verhältnis wird daraufhin jeweils ein Korrekturfaktor für die 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine **8** zur Umsatzbestimmung ermittelt. Die eingewogenen und per HPLC bestimmten Verhältnisse und die jeweiligen bestimmten Korrekturfaktoren sind in Tabelle 10.36 und Tabelle 10.37 dargestellt.

Tabelle 10.36. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Absorption von **7a** und **8a**

Eintrag	8a/7a eingewogen	8a/7a HPLC	Korrekturfaktor
1	0.52	1.53	0.34
2	1.32	3.67	0.36
3	2.19	6.05	0.36
Mittelwert			0.35 ± 0.01

Tabelle 10.37. Bestimmung des Korrekturfaktors zur unterschiedlichen Absorption von **7b** und **8b**

Eintrag	8b/7b eingewogen	8b/7b HPLC	Korrekturfaktor
1	0.62	1.53	0.41
2	1.25	3.24	0.39
3	1.64	4.32	0.38
Mittelwert			0.39 ± 0.02

Über die Simulation der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches (Versetzen der Reaktionsmischung mit Dichlormethan, Durchmischung der Probe und anschließende Zentrifugation bei 6000 x g für 10 min) mit bestimmten Verhältnissen 2*H*-1,4-Benzoxazin **7** und 3,4-Dihydro-2*H*-1,4-benzoxazin **8** in einer Dreifachbestimmung wird zudem jeweils überprüft, ob die Imine **7a-b** und die Amine **8a-b** im gleichen Maß extrahiert werden. Da dies für alle Verbindungen zutrifft, muss für die Aufarbeitung der Reaktionsmischung kein Korrekturfaktor bestimmt werden.

10.5.5 AAV15: Expression der IREDs in Deep-Well-Platten

Die Expression der 31 vorhandenen Iminreduktasen für den kolorimetrischen pH-Shift-Assay wird in Deep-Well-Platten (2 mL) durchgeführt. Hierzu werden in jedes Well 1.5 mL Autoinduktionsmedium (AI-Medium) mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Carbenicillin vorgelegt. Die Wells werden direkt von einer LB-Agarplatte in Vierfachbestimmung inokuliert und dann für 3 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1350 rpm im Heidolph Titramax 1000 inkubiert. Die Expression findet über Nacht (etwa 20 h) durch Inkubation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1350 rpm im Heidolph Titramax 1000 statt. Am nächsten Morgen werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min geerntet. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Lyse der Zellen werden $250 \mu\text{L}$ Lysepuffer ($50 \text{ mM KPi pH } 7$, 2 mg mL^{-1} Lysozym, 0.04 mg mL^{-1} DNaseI) auf die gefrorenen Zellen gegeben und für 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1350 rpm im Heidolph Titramax 1000 inkubiert. Die Zellsuspensionen werden für 30 min bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und daraufhin erneut für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1350 rpm im Heidolph Titramax 1000 inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4000 rpm und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min wird der Zellrohextrakt als Überstand erhalten und direkt im kolorimetrischen pH-Shift-Assay eingesetzt.

10.5.6 AAV16: Kolorimetrischer pH-Shift-Assay

Der kolorimetrische pH-Shift-Assay wird nach Pick *et al.* durchgeführt.^[216] Der Assay zur Screening der IREDs auf die Umsetzung von 3-Thiazolinen **3**, 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** wird in 96-Well Mikrotiterplatten jeweils in Doppelbestimmung für jede IRED in $10 \text{ mM KPi pH } 7.4$ ($+0.01\% \text{ w/w BTB}$), mit 20 mM D-Glucose , 10 mM Substrat (aus einer 100 mM Stammlösung in Methanol oder DMSO), $10 \mu\text{L GDH}$, IRED-Zellrohextrakt aus der Expression nach AAV15 ($10 \mu\text{L}$ für das Screening von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** bzw. $40 \mu\text{L}$ für das Screening von 3-Thiazolinen **3**) und 0.1 mM NADPH durchgeführt. Für jedes Substrat werden jeweils zwei Negativkontrollen in Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Negativkontrolle (in den Ergebnissen als Negativ bezeichnet) ohne IRED-Zellrohextrakt, die zweite Negativkontrolle (als pET22b_leer bezeichnet) enthält den Zellrohextrakt des *E. coli* BL21(DE3) ohne Insert im pET-22b(+) Vektor. Die Ergebnisse des pH-Shift-Assay der 3-Thiazoline **3**, 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** sind in Tabelle 10.38 zusammengefasst.

Tabelle 10.38. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay der 3-Thiazoline **3**, 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7**

Substrat	Potentiell positive IREDs	Negativ	pET22b_leer
3a	IRED05, IRED27	negativ	negativ
3b	IRED05, IRED06, IRED08, IRED13, IRED19, IRED24, IRED27, IRED28, IRED29	negativ	negativ
3c	IRED08, IRED24, IRED27,	negativ	negativ
3d	IRED08, IRED24, IRED27	negativ	negativ
3e	IRED08, IRED24	negativ	negativ
3f	IRED08	negativ	negativ
5a	IRED02, IRED05, IRED06, IRED08, IRED13, IRED14, IRED21, IRED22, IRED24, IRED25, IRED28, IRED30, IRED31	negativ	negativ
5b	IRED01, IRED04, IRED05, IRED08, IRED09, IRED12, IRED13, IRED14, IRED18, IRED21, IRED22, IRED27, IRED28, IRED30	negativ	negativ
5c	IRED05, IRED08, IRED28, IRED29	negativ	negativ
7a	IRED05, IRED12, IRED27, IRED29	negativ	negativ
7b	IRED05, IRED12, IRED27, IRED29	negativ	negativ

10.5.7 Spektrophotometrischer Aktivitätsassay

Die spektrophotometrische Bestimmung der Aktivität der IREDs gegenüber 3-Thiazolinen **3**, 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazinen **7** wird entsprechend der AAV7 durchgeführt. Aufgrund der geringen Löslichkeit der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** werden die Aktivitäten der Iminreduktasen gegenüber diesen Substraten bei einer Substratkonzentration von 0.5 mM bestimmt, wohingegen die Aktivität der IREDs zur Reduktion der 3-Thiazoline **3** bei einer Konzentration von 1 mM bestimmt wird. Als Cosolvent der 3-Thiazoline **3** wird Methanol verwendet, wohingegen als Cosolvent für die 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** DMSO eingesetzt wird.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt in 100mM KP_i pH 7 mit 4% Methanol oder DMSO als Cosolvent, 0.5 mM bzw. 1 mM Substrat, 10-60 µL IRED-Zellrohextrakt und 0.36 mM NADPH. Die Messung wird durch Zugabe von NADPH gestartet und es werden jeweils

Fünffachbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgt nach der AAV7. Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Aktivitätsassays zur Bestimmung der Aktivitäten der Iminreduktasen zur Reduktion der 3-Thiazoline **3**, 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7** sind in Tabelle 10.39 zusammengefasst.

Tabelle 10.39. Aktivitäten der IREDs zur Reduktion der 3-Thiazoline **3**, 2*H*-1,4-Benzothiazine **5** und 2*H*-1,4-Benzoxazine **7**

Substrat	IRED	Aktivität [U mL⁻¹]	Spezifische Aktivität [U mg_{GZP}⁻¹]
3a	IRED05	0.115 ± 0.008	0.007
3a	IRED27	0.141 ± 0.004	0.005
3b	IRED05	0.136 ± 0.007	0.008
3b	IRED24	0.129 ± 0.014	0.006
3c	IRED08	0.131 ± 0.008	0.006
3c	IRED24	0.095 ± 0.007	0.004
3c	IRED27	0.164 ± 0.008	0.006
3d	IRED08	0.130 ± 0.004	0.006
3d	IRED24	0.086 ± 0.006	0.004
3d	IRED27	0.128 ± 0.005	0.005
3e	IRED08	0.165 ± 0.004	0.008
3e	IRED24	0.114 ± 0.009	0.005
3f	IRED08	0.307 ± 0.021	0.015
5a	IRED08	2.647 ± 0.348	0.176
5a	IRED24	1.941 ± 0.323	0.088
5b	IRED04	2.281 ± 0.077	0.114
5b	IRED05	2.557 ± 0.128	0.128
5c	IRED05	0.572 ± 0.042	0.029
5c	IRED08	0.090 ± 0.059	0.006
5c	IRED28	0.695 ± 0.103	0.046
5c	IRED29	0.756 ± 0.052	0.039
7a	IRED05	0.160 ± 0.044	0.006
7a	IRED12	1.498 ± 0.163	0.085
7a	IRED27	0.109 ± 0.019	0.007
7a	IRED29	0.466 ± 0.012	0.024
7b	IRED05	0.185 ± 0.026	0.013
7b	IRED12	0.327 ± 0.024	0.019
7b	IRED27	0.247 ± 0.006	0.016
7b	IRED29	0.220 ± 0.013	0.011

10.5.8 Biotransformationen von 3-Thiazolinen **3b-f**

Die Biotransformationen der 3-Thiazoline **3b-f** werden im 10 mL Ansatz bei 30 °C und 500 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 2% Methanol als Cosolvent, 40mM D-Glucose, 20mM 3-Thiazolin **3a-f**, 1.2 mg mL⁻¹ IRED-ZRE (für die Substrate **3d** und **3f** in Kombination mit der IRED08) oder 5.0 mg mL⁻¹ IRED-ZRE (für die anderen Kombinationen), 24 U GDH (bei Verwendung von 1.2 mg mL⁻¹ IRED-ZRE) bzw. 100 U GDH (für die anderen Kombinationen) und 0.1 mM NADP⁺ durchgeführt. Nach 24 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 200 µL) und Dichlormethan (10 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes per achiraler GC (siehe Kapitel 10.5.4.1) untersucht. Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses werden die Probe nach AAV14 mit Phenylisocyanat derivatisiert und anschließend per chiraler SFC-HPLC (siehe Kapitel 10.5.4.3) analysiert. Die Negativkontrollen (ohne IRED-ZRE) werden im 10 mL Ansatz bei 30 °C und 500 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 2% Methanol als Cosolvent, 40mM D-Glucose, 20mM 3-Thiazolin **3a-f**, 100 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ durchgeführt. Nach 24 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 200 µL) und Dichlormethan (10 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes per achiraler GC (siehe Kapitel 10.5.4.1) untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in Tabelle 10.40 dargestellt.

Tabelle 10.40. Biotransformationen der 3-Thiazoline **3b-f**

Substrat	IRED	Umsatz [%]	ee [%]
3b	IRED05 ^a	29	-
	IRED24 ^a	83	-
	ohne IRED	0	-
3c	IRED08 ^a	89	99 (S)
	ohne IRED	0	-
3d	IRED08 ^b	82	99 (S)
	IRED24 ^a	12	99 (S)
	ohne IRED	0	-
3e	IRED08 ^a	91	97 (S)
	IRED24 ^a	87	99 (S)
	ohne IRED	0	-
3f	IRED08 ^b	98	96 (S)
	ohne IRED	0	-

die verwendete Ganzzell-Proteinkonzentrationen sind in Fußnote a und b angegeben; ^a5 mg mL⁻¹; ^b1.2 mg mL⁻¹

10.5.9 Präparative Biotransformation von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**)

Der Ganzzell-Katalysator für die Prozessentwicklung wird durch Transformation des pACYCDuet-Vektors, der die thermostabile GDH als Insert trägt (pACYCDuet_GDH), und des pET22b-Vektors, der die IRED08 als Insert trägt (pET22b_IRED08), nach der AAV1 als Zwei-Plasmid-System in *E. coli* BL21(DE3) konstruiert. Die Expression erfolgt nach der AAV2 in TB-Medium. Die Zellen werden nach der AAV3 lyophilisiert.

Die Biotransformation im präparativen Maßstab (40 mL) wird mit 100 mM 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]non-3-en (**3f**), 10 mg mL⁻¹ des lyophilisierten Ganzzell-Katalysators (bereitgestellt aus einer 20 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 50 mM KPi pH 7), 240 mM D-Glucose, 0.1 mM NADP⁺ und 2% Methanol als Cosolvent in Milli-Q[®] Wasser bei 30 °C an einer TitroLine[®]-Apparatur durchgeführt. Der pH-Wert wird durch Titration mit Natronlauge über das TitroLine[®]-System konstant bei pH 7 gehalten. Nach 30 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 2 mL) und Dichlormethan (30 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Umsatz wird per achiraler GC (siehe Kapitel 10.5.4.1) bestimmt (99% Umsatz), das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, ein Teil des Rohprodukts nach AAV14 mit Phenylisocyanat derivatisiert und anschließend per chiraler SFC-HPLC (siehe Kapitel 10.5.4.3) analysiert (99% ee). Zur Isolierung von 2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (**4f**) wird das Rohprodukt mit Dichlormethan versetzt, mit dH₂O (2x 30 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. (S)-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan ((S)-**4f**) (578.5 mg, 3,12 mmol, 78%) wird als gelbliches Öl mit einer isolierten Ausbeute von 78%, einer Reinheit von 97% (durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt) und einem Enantiomerenüberschuss von 99% ee erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.10 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CHCH₃), 2.16–1.64 (m, 8H, (CH₂)₄), 1.41 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.19 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CHCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 81.5 (C(CH₂)₄), 67.1 (CHCH₃), 59.9 (C(CH₃)₂), 44.8 ((CH₂)₄), 42.4 ((CH₂)₄), 27.8 (C(CH₃)₂), 26.1 (C(CH₃)₂), 24.4 ((CH₂)₄), 23.9 ((CH₂)₄), 13.7 (CHCH₃).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₀H₂₀NS [M+H]⁺: 186.1311, gefunden: 186.1309.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[179]

10.5.10 Biotransformationen 2-monosubstituierter 3-Thiazoline

Die Biotransformationen der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline *rac-3g-h* werden im 10 mL Ansatz bei 30 °C und 1000 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 2% Methanol als Cosolvent, 40 mM D-Glucose, 20mM 3-Thiazolin *rac-3g-h*, 7.5 mg mL⁻¹ des lyophilisierten Ganzzell-Katalysators, in dem die IRED08 und die GDH in einem Zwei-Plasmid-Konstrukt überexprimiert ist (aus einer 14 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 200 mM KPi pH 7) und 0.1 mM NADP⁺ durchgeführt. Nach 24 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 200 µL) und Dichlormethan (10 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes per achiraler GC nach Wagner^[223] untersucht. Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses werden die Proben nach AAV14 mit Phenylisocyanat derivatisiert und anschließend per chiraler SFC-HPLC entsprechend der Vorschrift von Wagner analysiert.^[223] Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.41 dargestellt.

Tabelle 10.41. Biotransformationen der 2-monosubstituierten 3-Thiazoline *rac-3g-h*

Substrat	Umsatz [%]	ee des Produkts [%]
<i>rac-3g</i>	77	0
<i>rac-3g</i>	21	0

10.5.10.1 Biotransformation von *rac-3h* und chemische Reduktion zur Bestimmung des stereochemischen Reaktionsverlaufs der biokatalytischen Reduktion 2-monosubstituierter 3-Thiazoline

Die Biotransformation zur Bestimmung des stereochemischen Reaktionsverlaufs wird im 10 mL Ansatz bei einer Substratkonzentration von 60 mM *rac-2-(tert-butyl)-5,5-Dimethyl-3-thiazolin (rac-3h)* mit 2% Methanol als Cosolvent, 120 mM D-Glucose, 5.7 mg mL⁻¹ IRED-ZRE (IRED08), 280 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ in 100 mM KPi pH 7 für 23.5 h bei 30 C und 1000 rpm durchgeführt. Nach 24 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 200 µL) und Dichlormethan (10 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Bestimmung des Umsatzes per achiraler GC nach Wagner^[223] untersucht. Der Umsatz der biokatalytischen Reduktion beträgt 6%. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und verbliebenes Edukt durch Säulenchromatographie (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) aufgereinigt. Das erhaltene Edukt wird mit Catecholboran nach AAV12 chemisch reduziert, wobei die Reaktionszeit auf 24 h verkürzt wird. Das entsprechende 3-Thiazolidin **4h** wird

über präparative DC (20% Ethylacetat in Cyclohexan) aufgereinigt und nach AAV14 mit Phenylisocyanat derivatisiert. Der erhaltene farblose Feststoff wird in Dichlormethan gelöst und per chiraler SFC-HPLC nach Wagner^[223] analysiert. Das 3-Thiazolidin **4h** wurde mit einem Enantiomerenüberschuss von 0% isoliert.

10.5.10.2 Semipräparative Biotransformation von *rac*-2-Isopropyl-5,5-dimethyl-3-thiazolin (*rac*-**3g**)

Die semipräparative Biotransformation des zyklischen Imins *rac*-**3g** wird im 10 mL Ansatz bei 30 °C und 1000 rpm mit 2% Methanol als Cosolvent, 140 mM D-Glucose, 60 mM *rac*-2-Isopropyl-5,5-dimethyl-3-thiazolin (*rac*-**3g**), 25 mg mL⁻¹ des lyophilisierten Ganzzell-Katalysators, in dem die IRED08 und die GDH in einem Zwei-Plasmid-Konstrukt überexprimiert ist (aus einer 50 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 200 mM KPi pH 7) und 0.1 mM NADP⁺ durchgeführt. Nach 65 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 1 mL) und Dichlormethan (20 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes per achiraler GC nach Wagner^[223] untersucht. Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses werden die Proben nach AAV14 mit Phenylisocyanat derivatisiert und anschließend per chiraler SFC-HPLC nach der Vorschrift von Wagner analysiert.^[223] Das Amin *rac*-**4g** wird mit einem Umsatz von 96% als Racemat (0% ee) nachgewiesen.

10.5.11 Biotransformationen von 2*H*-1,4-Benzothiazinen **5a-c**

Die Biotransformation der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c** werden im 0.5 mL Maßstab bei 30 °C und 850 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 4% Methanol (für die Substrate **5a** and **5b**) bzw. DMSO (für das Substrat **5c**) als Cosolvent, 40 mM D-Glucose, 20 mM 2*H*-1,4-Benzothiazin **5a-c**, 0.2 mg mL⁻¹ IRED-ZRE (für das Substrat **5b**) oder 0.6 mg mL⁻¹ IRED-ZRE (für die Substrate **5a** und **5c**), 6 U GDH (bei Verwendung von 0.2 mg mL⁻¹ IRED-ZRE) bzw. 12 U GDH (bei Verwendung von 0.6 mg mL⁻¹ IRED-ZRE) und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer durchgeführt. Nach 4, 6 oder 8 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses per chiraler SFC-HPLC analysiert (siehe Kapitel 10.5.4.4).

Die Negativkontrollen (ohne IRED-Zellrohextrakt) werden im 0.5 mL Ansatz bei 30 °C und 850 rpm in 100 mM KPi pH 7, mit 4% Methanol (für die Substrate **5a** and **5b**) bzw. DMSO (für das Substrat **5c**) als Cosolvent, 40 mM D-Glucose, 20 mM 2*H*-1,4-Benzothiazin **5a-c**,

12 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer durchgeführt. Nach 4, 6 oder 8 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes per chiraler SFC-HPLC (siehe Kapitel 10.5.4.4) untersucht. Die Ergebnisse der Biotransformationen sind in Tabelle 10.42 dargestellt.

Tabelle 10.42. Biotransformationen der 2*H*-1,4-Benzothiazine **5a-c**

Substrat	Zeit [h]	IRED ^a	Umsatz [%]	ee [%]
5a	8	IRED08 ^a	> 99	-
		IRED24 ^a	> 99	-
		ohne IRED	0	-
5b	4	IRED04 ^b	96	83 (S)
		IRED05 ^b	95	91 (R)
		ohne IRED	0	-
5c	6	IRED05 ^a	40	99 (R)
		IRED08 ^a	6	99 (S)
		IRED28 ^a	50	99 (R)
		IRED29 ^a	34	99 (R)
		ohne IRED	0	-

die verwendete Ganzzell-Proteinkonzentrationen sind in Fußnote a und b angegeben: ^a0.6 mg mL⁻¹; ^b0.2 mg mL⁻¹

10.5.12 Aufreinigung der IRED08 und Stabilitätstest für die Kristallisationsexperimente

10.5.12.1 Aufreinigung der IRED08

Die Expression der IRED08 erfolgt entsprechend der AAV2 in TB-Medium. Mit den gefrorenen, geernteten Zellen wird in Aufschluss-Puffer (50 mM KPi pH 7.0, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl) eine 25%ige Zellsuspension hergestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgt mit dem Homogenisator EmulsiFlex-C5 von Avestin bei einem Homogenisierdruck von 1000-1500 bar in drei Homogenisationszyklen. Das Rohextrakt wird durch Zentrifugation bei 20000 x g für 30 min als Überstand erhalten.

Die Nickel-Affinitätschromatographie wird analog zur Aufreinigung der IRED20 (siehe Kapitel 10.4.2) durchgeführt. Im Anschluss an Aufreinigung per Ni-NTA wird die Iminreduktase für die Kristallisationsexperimente per Anionenaustauschchromatographie mit der Säule HiLoad 26/10 Q-Sepharose High Performance von GE Healthcare mit einem Gradienten von 50 mM KPi pH 7.0 bis zu 50 mM KPi pH 7.0, 1 M NaCl über 10

Säulenvolumen mit Hilfe des ÄKTA™ Systems aufgereinigt. Die Aufreinigung per Anionenaustauscher entfällt für die Stabilitätstests der Iminreduktase. Das Protein wird daraufhin über Größenausschlusschromatographie mit der Säule Superdex 200 Increase 10/300 GL von GE Healthcare mit 10 mM HEPES pH 7.0 mit Hilfe des ÄKTA Systems™ aufgereinigt. Das Protein wird mit einer Vivaspin-Ultrafiltrationseinheit nach Herstellerangaben eingeeengt. Die Konzentration des aufgereinigten Proteins ($\epsilon = 19480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wird mit Hilfe des NanoDrop bestimmt und der Erfolg der Aufreinigungen per SDS-PAGE entsprechend der AAV6 überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10.4 und Abbildung 10.5 dargestellt.

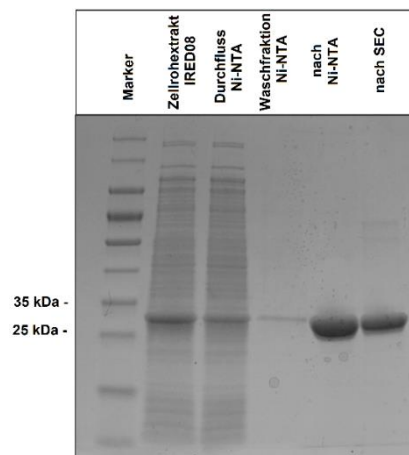


Abbildung 10.4. SDS-PAGE der Aufreinigung der IRED08 für die Stabilitätstests (Ni-NTA Chromatographie und Gelfiltration)

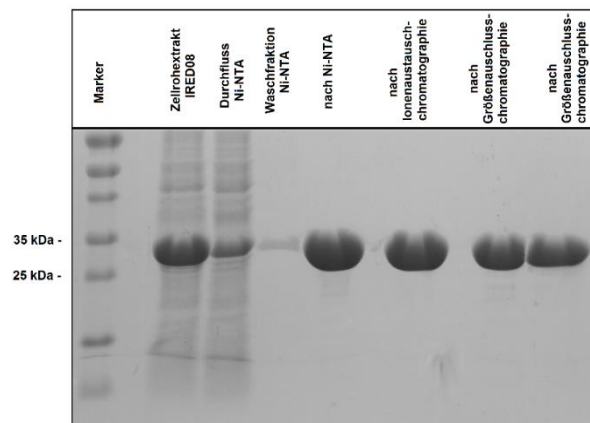


Abbildung 10.5. SDS-PAGE der Aufreinigung der IRED08 für die Kristallisationsexperimente (Ni-NTA Chromatographie, Größenausschlusschromatographie und Gelfiltration)

Per MS-Analyse wird zudem die mittlere Masse der aufgereinigten IRED08 bestimmt und nachgewiesen, dass die IRED08 homogen vorliegt.

MS (ESI) m/z berechnet für IRED08 $[M]^+$: 30996.81, gefunden: 30996.94.

10.5.12.2 Stabilitätstest der IRED08

Um einen Eindruck über die Stabilität des Proteins bei 4 °C und Raumtemperatur zu erhalten, wird ein Stabilitätstest durchgeführt. Hierzu wird jeweils eine Probe der aufgereinigten IRED08 bei 4 °C bzw. Raumtemperatur inkubiert und nach jeweils drei Tagen Proben für eine SDS-PAGE entnommen und entsprechend der AAV6 bei 95 °C denaturiert. Die letzte Probe wird nach 14 Tagen entnommen und die SDS-PAGE anschließend entsprechend der AAV6 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 dargestellt.

10.5.12.3 Stabilitätstest der IRED08 in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren

Um die Stabilität des Enzyms bei Raumtemperatur zu erhöhen, wurde der Stabilitätstest bei Raumtemperatur unter Zusatz verschiedener Proteaseinhibitoren wiederholt. Hierzu wurden Proben der aufgereinigten IRED mit einer Proteinkonzentration von 1 mg mL⁻¹ unter Zusatz verschiedener Proteaseinhibitoren sowie ausgewählter Mischungen (siehe Tabelle 10.43) bei Raumtemperatur inkubiert und nach 1, 3, 4, 7 und 9 Tagen jeweils Proben für eine SDS-PAGE entnommen und entsprechend bei 95 °C denaturiert. Die SDS-PAGE wird nach der AAV6 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.17-Abbildung 4.20 dargestellt.

Tabelle 10.43. Proteaseinhibitoren, die im Stabilitätstest eingesetzt wurden.

Proteaseinhibitor	inhibierte Protease(n)	Endkonzentration
cOmplete™ + EDTA	Cystein-, Serinprotease + Metalloprotease	1x + 1 mM
Iodacetamid	Cysteinprotease	1 mM
Leupeptin	Cystein-, Serin-, Threoninprotease	1 mM
Aprotinin	Serinprotease	0.3 µM
Iodacetamid + EDTA	Cysteinprotease + Metalloprotease	1 mM + 1 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid	Serinprotease	0.1 mM

10.5.13 Biotransformationen von 2*H*-1,4-Benzoxazinen

Die Biotransformation der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7a-b** werden im 0.5 mL Maßstab bei 30 °C und 850 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 4% Methanol (für das Substrat **7a**) bzw. DMSO (für das Substrat **7b**) als Cosolvent, 40 mM D-Glucose, 20 mM 2*H*-1,4-Benzoxazin **7a-b**, 0.6 mg mL⁻¹ (für Substrat **7a**) oder 1.2 mg mL⁻¹ (für Substrat **7b**) IRED-ZRE, 12 U GDH (bei Verwendung von 0.6 mg mL⁻¹ IRED-ZRE) bzw. 24 U GDH (bei Verwendung von 1.2 mg mL⁻¹ IRED-ZRE) und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer durchgeführt. Nach 15 h bzw. 19.5 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes und des Enantiomerenüberschusses per chiraler SFC-HPLC analysiert (siehe Kapitel 10.5.4.5).

Die Negativkontrollen (ohne IRED-Zellrohextrakt) werden im 0.5 mL Ansatz bei 30 °C und 850 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 4% Methanol (für das Substrat **7a**) bzw. DMSO (für das Substrat **7b**) als Cosolvent, 40 mM D-Glucose, 20 mM 2*H*-1,4-Benzoxazin **7a-b**, 24 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer durchgeführt. Nach 15 oder 19.5 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 10 µL) und Dichlormethan (300 µL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird zur Bestimmung des Umsatzes per chiraler SFC-HPLC (siehe Kapitel 10.5.4.5) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.44 dargestellt.

Tabelle 10.44. Biotransformationen der 2*H*-1,4-Benzoxazine **7**

Substrat	Zeit [h]	IRED ^a	Umsatz [%]	ee [%]
7a	15	IRED05 ^a	19	52 (<i>R</i>)
		IRED12 ^a	> 99	99 (<i>S</i>)
		IRED29 ^a	29	81 (<i>S</i>)
		ohne IRED	0	-
7b	19.5	IRED05 ^b	21	72 (<i>R</i>)
		IRED12 ^b	84	26 (<i>R</i>)
		IRED27 ^b	26	60 (<i>R</i>)
		IRED29 ^b	20	71 (<i>R</i>)
		ohne IRED	0	-

die verwendete Ganzzell-Proteinkonzentrationen sind in Fußnote a und b angegeben; ^a0.6 mg mL⁻¹; ^b1.2 mg mL⁻¹

10.5.14 Präparative Biotransformation von 3-Phenyl-2H-benzoxazin (**7a**)

Der Ganzzell-Katalysator für die Prozessentwicklung wird durch Transformation des pACYCDuet-Vektors, der die thermostabile GDH als Insert trägt (pACYCDuet_GDH), und des pET22b-Vektors, der die IRED12 als Insert trägt (pET22b_IRED12), nach AAV1 als Zwei-Plasmid-System in *E. coli* BL21(DE3) konstruiert. Die Expression erfolgt nach AAV2 in TB-Medium. Die Zellen werden daraufhin nach AAV3 lyophilisiert.

Die Biotransformation im präparativen Maßstab (40 mL) wird mit 50 mM 3-Phenyl-2H-benzoxazin (**7a**), 10% DMSO als Cosolvent (zunächst wird **7a** in DMSO gelöst, daraufhin werden alle anderen Komponenten zugegeben), 5 mg mL⁻¹ des lyophilisierten Ganzzell-Katalysators (bereitgestellt aus einer 10 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 50 mM KPi pH 7), 120 mM D-Glucose und 0.1 mM NADP⁺ in Milli-Q[®] Wasser bei 30 °C an einer TitroLine[®]-Apparatur durchgeführt. Der pH wird durch Titration mit Natronlauge über das TitroLine[®]-System konstant bei pH 7 gehalten. Nach 26 h wird dem Reaktionsgemisch Natronlauge (32%, 2 mL) und Dichlormethan (30 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Umsatz (>99%) und der Enantiomerenüberschuss werden per chiraler SFC-HPLC bestimmt (siehe Kapitel 10.5.4.5) und das Solvens wird unter vermindertem Druck entfernt. (S)-3-Phenyl-3,4-dihydro-2H-benzoxazin ((S)-**8a**) (300.8 mg, 1.42 mmol, 71%) wird nach Säulenchromatographie (2-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelbliches Öl mit einer Reinheit von 98% (durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.42–7.31 (m, 5H, **H**^{Ar}), 6.87–6.80 (m, 2H, **H**^{Ar}), 6.73–6.67 (m, 2H, **H**^{Ar}), 4.52 (dd, *J* = 8.6, 3.0 Hz, 1H, **CH**₂), 4.29 (dd, *J* = 10.6, 3.0 Hz, 1H, **CH**₂), 4.01 (dd, *J* = 10.6, 8.6 Hz, 1H, **CH**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 143.7 (**C**^{Ar}), 139.3 (**C**^{Ar}), 134.0 (**C**^{Ar}), 129.0 (2C, **C**^{Ar}), 128.5 (**C**^{Ar}), 127.3 (2C, **C**^{Ar}), 121.6 (**C**^{Ar}), 119.1 (**C**^{Ar}), 116.7 (**C**^{Ar}), 115.5 (**C**^{Ar}), 71.1 (**CH**₂), 54.4 (**CH**).

[α]²⁰_D = + 148 (c 1.0, CHCl₃), Literatur: [α]²⁰_D = - 118.1 (c: 1.0, CHCl₃) (98% ee für das (R)-Enantiomer).^[199]

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[199]

10.6 Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse in Eintopf-Synthesen

10.6.1 Analytik

Neben der in Kapitel 10.4.1 etablierten Analytik zur Bestimmung des Umsatzes des 3-Thiazolins **3f** über das Verhältnis der Integrale von Edukt **3f** und Produkt **4f** wird in diesem Kapitel eine Kalibrationsgerade des 3-Thiazolins **3f** und des 3-Thiazolidins **4f** erstellt, die eine Bestimmung der Konzentration und somit der Stoffmenge der Verbindungen über die vermessenen GC-Integrale ermöglicht. Hierfür werden jeweils sechs Lösungen des 3-Thiazolins **3f** und des 3-Thiazolidins **4f** mit definierter Konzentration in Dichlormethan gaschromatographisch vermessen (siehe Kapitel 10.5.4.1). Über die Auftragung der Integrale gegenüber der eingesetzten Konzentration in mol L⁻¹ und einem linearen Fit der erhaltenen Punkte (Abbildung 10.6 und Abbildung 10.7), erhält man die Geradengleichungen zur Bestimmung der Konzentration des Imins **3f** (Formel (IV)) und des Amins **4f** (Formel (V)) aus dem per GC ermittelten Integral.

$$c_{3f} = \frac{I(c) + 169300.48247}{2.43054 \cdot 10^8} \quad (\text{IV})$$

$$c_{4f} = \frac{I(c) - 44446.30129}{2.16018 \cdot 10^8} \quad (\text{V})$$

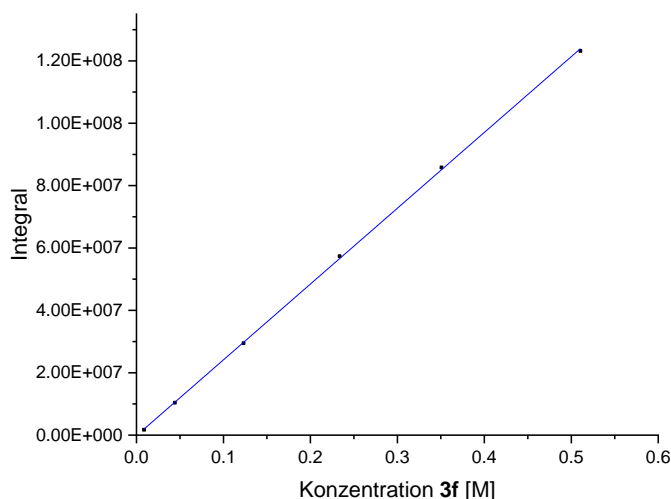


Abbildung 10.6. Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Konzentration des 3-Thiazolins **3f** per GC

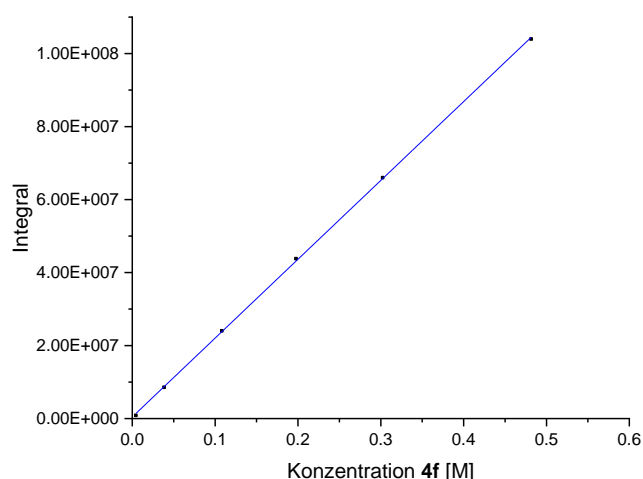


Abbildung 10.7. Kalibrationsgerade zur Bestimmung der Konzentration des 3-Thiazolidins **4f**

10.6.2 Verknüpfung von Heterozyklenchemie und Biokatalyse durch Kompartimentierung der Reaktionsschritte

Der im Rahmen dieses Kapitels verwendete mechanische Rührer wurde eigens für dieses Projekt von der Mechanischen Werkstatt der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld nach den Anforderungen der Autorin konstruiert.

10.6.2.1 Herstellung von PDMS-Hülsen

Die PDMS-Hülsen werden analog zu Uthoff *et al.* hergestellt.^[257] Die Oberfläche eines Glasgefäßes (1,5 mL) wird zunächst passiviert: Hierzu werden einige Tropfen Trichlor-(1*H*, 1*H*, 2*H*, 2*H*-perfluorooctyl)silan auf das Glasgefäß gegeben und über Nacht bei 45 mbar im Exsikkator inkubiert. Sylgard® 184 wird gemischt, entgast und für 5 min auf 65 °C vorgeheizt. Das Glasgefäß wird in die Elastomerlösung getaucht und abtropfen gelassen, bis sich keine neuen Tropfen mehr bilden. Das Glasgefäß wird kopfüber für 1 h bei 65 °C inkubiert. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Beim dritten Vorgang wird das Glasgefäß zum Aushärten des PDMS aufrecht für 1 h bei 120 °C inkubiert. Um die Hülse vom Glasgefäß zu lösen, wird das Gefäß in *n*-Hexan getaucht und die gequollene PDMS-Hülse vom Gefäß gestülpt. Die Hülse wird mit Dichlormethan und Wasser gewaschen und anschließend verwendet.

10.6.2.2 Synthese des 3-Thiazolins **3f** in unterschiedlichen Reaktortypen

Fein gemörstertes Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (333 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) wird mit Cyclopentanon (378 μL , 4.49 mmol, 1.00 Äq.) und Ammoniaklösung (25%, 675 μL) innerhalb der PDMS-Hülse oder im Glasgefäß vorgelegt. 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (542 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) wird hinzugeben und die Reaktionsmischung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt (Magnetrührkern oder mechanischer Rührer). Die Reaktionsmischung wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das verbliebene gelbliche Öl wird in Dichlormethan (5 mL) gelöst und per achiraler GC analysiert. Der Umsatz der Variante der Asinger-Reaktion wird per Kalibrationsgerade über die GC bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.45 dargestellt.

Tabelle 10.45. Synthese des 3-Thiazolins **3f** in unterschiedlichen Reaktortypen

Eintrag	Umsatz [%]
Kontrolle (Glasgefäß)	41
Hülse (Magnetrührkern)	3
Hülse (mechanischer Rührer)	25

10.6.2.3 Studien zur Diffusions-Effizienz

Zur Untersuchung der Diffusion des 3-Thiazolins **3f** durch die PDMS-Membran wird **3f** (345 mg, 1.87 mmol) in wässriger Ammoniaklösung (5.6 M, 675 μL) innerhalb der Hülse vorgelegt. DMSO (10 mL) bzw. DMSO (2 mL) in Milli-Q® Wasser (8 mL) wird in das äußere Kompartiment gegeben und beide Lösungen werden bei Raumtemperatur gerührt (innerhalb der PDMS-Hülse mit Hilfe eines mechanischen Rührers, außerhalb mit Hilfe eines Magnetrührkerns). Nach 3.5 h, 5 h, 6 h (100% v/v DMSO) bzw. 22 h (20% v/v DMSO) wird jeweils eine Probe (100 μL) aus dem äußeren Kompartiment entnommen, mit Dichlormethan (100 μL) vermischt und die Konzentration per achiraler GC bestimmt. Außerdem wird die Lösung im inneren Kompartiment nach 6 h (100% v/v DMSO) bzw. 22 h (20% v/v DMSO) dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Solvens unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe, ölige Rückstand wird in Dichlormethan (5 mL) gelöst. Per Kalibrationsgerade wird die Konzentration des 3-Thiazolins **3f** im äußeren Kompartiment bestimmt und ins Verhältnis zur maximal möglichen Konzentration gesetzt. Die Ergebnisse zur Diffusions-Effizienz des Imins **3f** mit 20% v/v bzw. 100% v/v DMSO sind in Tabelle 10.46 dargestellt.

Tabelle 10.46. Diffusions-Effizienz des 3-Thiazolins **3f** durch die PDMS-Membran

DMSO [% v/v]	Zeit [h]	Anteil an diffundiertem 3-Thiazolin 3f [%]
20	22	24
100	3.5	43
100	5	53
100	6	60

10.6.2.4 Studien zur biokatalytischen Reduktion des 3-Thiazolins **3f**

Die Biotransformationen (10 mL) werden ausgehend von einer 20 mM Konzentration des 3-Thiazolins **3f** mit 1 mg mL⁻¹ des lyophilisierten Ganzzell-Katalysators (zugegeben aus einer 2 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 200 mM KPi Puffer pH 7), 40 mM D-Glucose, 0.1 mM NADP⁺ und 10% v/v Methanol oder 20% oder 30% v/v DMSO als Cosolvent in Milli-Q[®] Wasser durchgeführt. Die Biotransformationen in Gegenwart von 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (5 oder 20 mM) bzw. Cyclopentanon (5 oder 20 mM) werden bei einer Cosolventkonzentration von 20% v/v DMSO durchgeführt. Die Reaktionen werden für 18 h bei 30 °C gerührt und durch Zugabe von Natronlauge (32%, 1 mL) sowie Dichlormethan (10 mL) gestoppt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und der Umsatz per achiraler GC bestimmt (siehe Kapitel 10.5.4.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.47 dargestellt.

Tabelle 10.47. Biokatalytische Reduktion von **3f** zur Realisierung der kompartimentierten Eintopf-Synthese

Cosolvent [% v/v]	Additiv [mM]	Umsatz [%]
Methanol [10]	ohne Additiv	25
DMSO [20]	ohne Additiv	83
DMSO [30]	ohne Additiv	3
DMSO [20]	Cyclopentanon [5]	88
DMSO [20]	Cyclopentanon [20]	70
DMSO [20]	3-Chlor-3-methyl-2-butanon [5]	69
DMSO [20]	3-Chlor-3-methyl-2-butanon [20]	60

10.6.2.5 Kompartimentierte Eintopf-Synthese

Fein gemörseretes Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (333 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) wird mit Cyclopentanon (378 μ L, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) und Ammoniaklösung (25%, 675 μ L) innerhalb der PDMS-Hülse vorgelegt. 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (542 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) wird hinzugeben und die Reaktionsmischung für 18 h bei Raumtemperatur mit Hilfe eines mechanischen Rührers gerührt. DMSO (10 mL) wird in das äußere Kompartiment gegeben und beide Reaktionslösungen für 6 h bei Raumtemperatur gerührt (innerhalb des Thimbles mit Hilfe eines mechanischen Rührers, außerhalb mit Hilfe eines Magnetrührkerns). In das äußere Kompartiment werden Milli-Q® Wasser (7.8 mL), 200 mM D-Glucose (6.7 mL einer 1.5 M Stammlösung), 0.1 mM NADP⁺ (0.5 mL einer 10 mM Stammlösung) und 8 mg mL⁻¹ lyophilisierter Ganzzell Katalysator (aus einer 16 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 200 mM KPi Puffer pH 7) in das äußere Kompartiment gegeben und die Reaktionsmischung bei 30 °C für 24 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natronlauge (32%, 2 mL) und Dichlormethan (50 mL) in das äußere Kompartiment gestoppt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und die Phasentrennung durch Zentrifugation (10 min bei 4000 x g) initiiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und der Umsatz (13% Gesamtumsatz, > 99% Umsatz im biokatalytischen Schritt) per achiraler GC Analyse der organischen Phase bestimmt (siehe Kapitel 10.5.4.1). Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt, ein Teil des Rohproduktes wird nach AAV14 mit Phenylisocyanat derivatisiert und per chiraler SFC-HPLC analysiert (99% ee) (siehe Kapitel 10.5.4.3). (S)-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (**4f**) (100 mg, 0.54 mmol, 12%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelbliches Öl mit einer Reinheit von 97% (bestimmt durch ¹H-NMR-Spektroskopie) isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.10 (q, J = 6.6 Hz, 1H, CHCH₃), 2.13–2.05 (m, 1H, (CH₂)₄), 1.95–1.78 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.77–1.63 (m, 5H, (CH₂)₄), 1.41 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.19 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.09 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CHCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 81.5 (C(CH₂)₄), 67.1 (CHCH₃), 59.9 (C(CH₃)₂), 44.8 ((CH₂)₄), 42.4 ((CH₂)₄), 27.8 (C(CH₃)₂), 26.1 (C(CH₃)₂), 24.4 ((CH₂)₄), 23.9 ((CH₂)₄), 13.7 (CHCH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[179,218]

10.6.3 Sequentielle Eintopf-Synthese zur Darstellung eines 3-Thiazolidins

10.6.3.1 Studien der Degussa-Variante der Asinger-Reaktion im 4.5 mmol Maßstab

Fein gemörstertes Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (333 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) wird mit Cyclopentanon (378 μL , 4.49 mmol, 1.00 Äq.) und Ammoniaklösung (25%, 675 μL) in einem 100 mL Kolben vorgelegt. 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (542 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.), verdünnt in DMSO (Endkonzentration von 10% v/v DMSO im Kolben), wird hinzugeben, während die Temperatur der Reaktionslösung zwischen 0-10 °C gehalten wird. Die Reaktionsmischung wird für 18 h bei Raumtemperatur gerührt, dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das verbliebene gelbliche Öl wird in Dichlormethan (5 mL) gelöst und per achiraler GC analysiert. Der Umsatz der Variante der Asinger-Reaktion wird per Kalibrationsgerade über die GC bestimmt und beträgt 33%.

10.6.3.2 Biokatalytische Reduktion in Gegenwart der Edukte der Asinger-Reaktion

Die Biotransformationen (10 mL) werden ausgehend von einer 20 mM Konzentration des 3-Thiazolins **3f** mit 1 mg mL⁻¹ des lyophilisierten Ganzzell Katalysators (ausgehend von einer 2 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 200 mM KPi Puffer pH 7), 40 mM D-Glucose, 0.1 mM NADP⁺ und 10% v/v DMSO als Cosolvent in Milli-Q® Wasser durchgeführt. Die Biotransformationen in Gegenwart von 3-Chlor-3-methyl-2-butanon (20 mM), Cyclopentanon (20 mM) bzw. Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (20 mM) werden ebenfalls bei einer Cosolventkonzentration von 10% v/v DMSO durchgeführt. Die Reaktionen werden für 18 h bei 30 °C gerührt und durch Zugabe von Natronlauge (32%, 1 mL) sowie Dichlormethan (10 mL) gestoppt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und der Umsatz per achiraler GC bestimmt (siehe Kapitel 10.5.4.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.48 dargestellt.

Tabelle 10.48. Biokatalytische Reduktion von **3f** zur sequentiellen Eintopf-Synthese

Additiv [20 mM]	Umsatz [%]
ohne Additiv	100
Cyclopentanon	100
3-Chlor-3-methyl-2-butanon	100
Natriumhydrogensulfid-Monohydrat	88

10.6.3.3 Sequentielle Eintopf-Synthese

Fein gemörstertes Natriumhydrogensulfid-Monohydrat (333 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) wird mit Cyclopentanon (378 μ L, 4.49 mmol, 1.00 Äq.) und Ammoniaklösung (25%, 675 μ L) im Kolben vorgelegt. 3-Chlor-3-methylbutan-2-on (542 mg, 4.49 mmol, 1.00 Äq.), verdünnt in DMSO um eine Endkonzentration von 10% v/v DMSO im Kolben zu erreichen, wird hinzugeben, während die Temperatur der Reaktionslösung zwischen 0-10 °C gehalten wird. Die Reaktionsmischung wird für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. DMSO (5 mL), Milli-Q® Wasser (12.8 mL), 200 mM D-Glucose (6.7 mL einer 1.5 M Stammlösung), 0.1 mM NADP⁺ (0.5 mL einer 10 mM Stammlösung), 8 mg mL⁻¹ lyophilisiertem Ganzzell-Katalysator (aus einer 16 mg mL⁻¹ Zellsuspension in 200 mM KPi Puffer pH 7) und DMSO (4.84 mL, insgesamt 10% v/v) werden hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei 30 °C für 24 h gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Natronlauge (32%, 2 mL) und Dichlormethan (50 mL) gestoppt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und die Phasentrennung durch Zentrifugation (10 min bei 4000 x g) initiiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und der Umsatz (26% Gesamtumsatz, > 99% Umsatz im biokatalytischen Schritt) per achiraler GC Analyse der organischen Phase bestimmt. Das organische Solvens wird unter vermindertem Druck entfernt und ein Teil des Produktes zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses per chiraler SFC-HPLC (siehe Kapitel 10.5.4.3) mit Phenylisocyanat entsprechend der AAV14 derivatisiert (99% ee). (*S*)-2,2,3-Trimethyl-1-thia-4-azaspiro[4.4]nonan (**4f**) (213 mg, 1.15 mmol, 26%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelbliches Öl mit einer Reinheit von 97% (bestimmt durch ¹H-NMR-Spektroskopie) isoliert.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.10 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, CHCH₃), 2.13–2.05 (m, 1H, (CH₂)₄), 1.95–1.78 (m, 2H, (CH₂)₄), 1.77–1.63 (m, 5H, (CH₂)₄), 1.41 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.19 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CHCH₃).

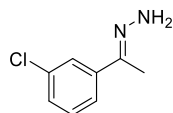
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 81.5 (C(CH₂)₄), 67.1 (CHCH₃), 59.9 (C(CH₃)₂), 44.8 ((CH₂)₄), 42.4 ((CH₂)₄), 27.8 (C(CH₃)₂), 26.1 (C(CH₃)₂), 24.4 ((CH₂)₄), 23.9 ((CH₂)₄), 13.7 (CHCH₃).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[179,218]

10.7 Biokatalytische Reduktion von Iminen mit zusätzlichen Stickstoffatomen

10.7.1 Synthese von Hydrazonen **10**

10.7.1.1 (1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (**10a**)



Die Darstellung des Hydrazons **10a** erfolgt nach Poh *et al.*^[321] *meta*-Chloracetophenon (2.6 mL, 20.0 mmol, 1.00 Äq.) und Hydrazin-Monohydrat (2.91 mL, 60.0 mmol, 3.00 Äq.) werden in Methanol (20 mL) vorgelegt und für 3.5 Stunden zum Reflux erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur abgekühlt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und Wasser (25 mL) sowie Dichlormethan (25 mL) hinzugegeben. Die Mischung wird mit Dichlormethan (3x 25 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. (1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (**10a**) (3.22 g, 19.1 mmol, 96%) wird als gelbliches Öl erhalten.

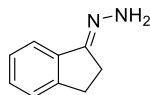
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.65–7.64 (m, 1H, **H^{Ar}**), 7.53–7.49 (m, 1H, **H^{Ar}**), 7.29–7.25 (m, 2H, **H^{Ar}**), 5.41 (s, 2H, **NH₂**), 2.11 (s, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 145.7 (**C=N**), 141.3 (**C^{Ar}**), 134.5 (**C^{Ar}**), 129.6 (**C^{Ar}**), 128.1 (**C^{Ar}**), 125.8 (**C^{Ar}**), 123.7 (**C^{Ar}**), 11.6 (**CH₃**).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₈H₁₀ClN₂ [M+H]⁺: 169.0527, gefunden: 169.0529.

IR [cm⁻¹]: 3373, 3300, 3215, 3066, 1634, 1586, 1557, 1407, 778, 683, 634, 521, 440.

10.7.1.2 (2,3-Dihydro-1*H*-inden-1-yliden)hydrazin (**10b**)



Die Darstellung erfolgt nach einer abgewandelten Vorschrift von Wu *et al.*^[322] 1-Indanon (1.39 g, 10.5 mmol, 1.00 Äq.), Hydrazin-Monohydrat (727 µL, 15.0 mmol, 1.50 Äq.) und Essigsäure (28.6 µL, 0.5 mmol, 5 mol%) werden in Toluol (30 mL) vorgelegt und für 16 Stunden bei 120 °C unter Argonatmosphäre und Rückfluss gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 0 °C abgekühlt, der ausgefallene Feststoff filtriert, mit eiskaltem Toluol gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. (2,3-Dihydro-1*H*-inden-1-yliden)hydrazin (**10b**) (1.38 g, 9.4 mmol, 89%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.64 (dd, J = 7.2, 1.5 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.30–7.23 (m, 3H, H^{Ar}), 5.15 (s, 2H, NH_2), 3.13–3.10 (m, 2H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 2.71–2.65 (m, 2H, $\text{N}=\text{CCH}_2$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 157.2 (C^{q}), 147.0 (C^{q}), 138.8 (C^{q}), 129.4 (C^{Ar}), 127.1 (C^{Ar}), 125.5 (C^{Ar}), 120.9 (C^{Ar}), 28.5 ($\text{C}^{\text{Ar}}\text{CH}_2$), 25.1 ($\text{N}=\text{CCH}_2$).

HRMS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 147.0917, gefunden: 147.0915.

IR [cm^{-1}]: 3338, 3186, 2360, 2344, 1625, 1464, 1093, 758, 434.

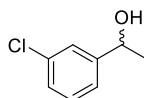
T_m : 87 °C

10.7.2 Versuch zur Synthese der Referenzverbindungen **11**

10.7.2.1 AAV17: Chemische Reduktion mit Boran-Trimethylamin Komplex

Die Reduktion mit Boran-Trimethylamin Komplex erfolgt nach abgewandelten Vorschrift von Kawase *et al.*^[323] Hydrazon **10** (5.93 mmol, 1.00 Äq.) wird in Ethanol (12 mL) vorgelegt und mit Boran-Trimethylamin Komplex (17.8 mmol, 3.00 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird entgast. Unter Eisbadkühlung wird HCl (2 M, 37 mL) zugegeben und für 5 min unter Eisbadkühlung gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur erwärmt und 1.5 h gerührt. Unter Eisbadkühlung wird der pH-Wert mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 9 eingestellt. Die Mischung wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt. Anstatt der gewünschten Hydrazine **11** werden die entsprechenden Alkohole erhalten.

10.7.2.1.1 *rac*-1-(3-Chlorphenyl)ethanol

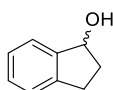


Die Darstellung erfolgt nach AAV17 aus (1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (**10a**) (1.00 g, 5.86 mmol, 1.00 Äq.) und Boran-Trimethylamin Komplex (1.30 g, 17.8 mmol, 3.00 Äq.). *rac*-1-(3-Chlorphenyl)ethanol (588 mg, 3.44 mmol, 58%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.28–7.26 (m, 2H, H^{Ar}), 7.20–7.12 (m, 2H, H^{Ar}), 4.77 (q, J = 6.5 Hz, 1H, CH), 1.38 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 147.9 (C^{Ar}), 134.4 (C^{Ar}), 129.8 (C^{Ar}), 127.5 (C^{Ar}), 125.6 (C^{Ar}), 123.5 (C^{Ar}), 69.8 (CH), 25.3 (CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[390]

10.7.2.1.2 *rac*-1-Indanol

Die Darstellung erfolgt nach AAV17 aus (2,3-Dihydro-1*H*-inden-1-yliden)hydrazin (**10b**) (1.00 g, 6.84 mmol, 1.00 Äq.) und Boran-Trimethylamin Komplex (1.49 g, 20.5 mmol, 3.00 Äq.). *rac*-1-Indanol (109 mg, 0.74 mmol, 11%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als farbloses Öl erhalten.

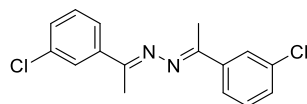
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.42 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.29–7.23 (m, 3H, **H^{Ar}**), 5.25 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, **CHNH**), 3.07 (ddd, *J* = 16.1, 8.5, 4.8 Hz, 1H, **C^{Ar}CH₂**), 2.83 (dt, *J* = 15.6, 7.5 Hz, 1H, **C^{Ar}CH₂**), 2.53–2.46 (m, 1H, **CHCH₂**), 1.94–1.92 (m, 1H, **CHCH₂**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 145.1 (**C^{Ar}**), 143.5 (**C^{Ar}**), 128.5 (**C^{Ar}**), 126.9 (**C^{Ar}**), 125.1 (**C^{Ar}**), 124.3 (**C^{Ar}**), 76.6 (**CH**), 36.1 (**CHCH₂**), 29.9 (**C^{Ar}CH₂**).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[391]

10.7.3 Charakterisierung der gebildeten Azine **12**

Die Bildung des Azins **12a** wird bereits bei Lagerung des entsprechenden Hydrazons **10a** bei Raumtemperatur und Luftatmosphäre beobachtet. Die Bildung von 1,2-Bis(2,3-dihydroinden-1-yliden)hydrazin (**12b**) wird im Gegensatz dazu erst in wässriger Umgebung beobachtet.

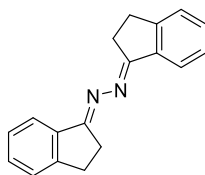
10.7.3.1 (1*E*,2*E*)-1,2-Bis(1-(3-chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (**12a**)

Es wird die Bildung von gelben Kristallen bei Lagerung unter Luftatmosphäre beobachtet, die als (1*E*,2*E*)-1,2-Bis(1-(3-chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (**12a**) charakterisiert werden.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.91 (t, *J* = 1.8 Hz, 2H, **H^{Ar}**), 7.77 (dt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 2H, **H^{Ar}**), 7.41–7.34 (m, 4H, **H^{Ar}**), 2.30 (s, 6H, **CH₃**).

MS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₆H₁₅Cl₂N₂ [M+H]⁺: 305.05, gefunden: 305.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[392]

10.7.3.2 (1*E*,2*E*)-1,2-Bis(2,3-dihydroinden-1-yliden)hydrazin (**12b**)

(1*E*,2*E*)-1,2-Bis(2,3-dihydroinden-1-yliden)hydrazin (**12b**) wird nach Inkubation von **10b** in 100 mM KPi pH 7 bei 30 °C und Extraktion mit Dichlormethan als gelblicher Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.92 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H^{Ar}), 7.43–7.28 (m, 6H, H^{Ar}), 3.13–3.02 (m, 8H, $\text{C}^{\text{Ar}}\text{CH}_2$, $\text{N}=\text{CCH}_2$).

MS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 261.1, gefunden: 261.1.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[393]

10.7.4 Untersuchung der hydrolytischen Stabilität der Hydrazone

Zur Untersuchung der hydrolytischen Stabilität von Hydrazonen **10** werden jeweils 5 mg des Hydrazons **10a-b** in Eppendorff-Gefäße eingewogen, mit D_2O (500 μL) bzw. 100 mM KPi pH 7 (500 μL) überschichtet und für 2, 5 und 23 h bei 20 °C und 850 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Proben werden mit CDCl_3 (800 μL) versetzt, mit Hilfe eines Vortexers durchmischt, für 1 min bei 4000 x g zentrifugiert und die organische Phase anschließend $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.49 und Tabelle 10.50 dargestellt.

Tabelle 10.49. Hydrolytische Stabilität von Hydrazonen **10** in D_2O

Zeit [h]	Azin 12a [%]	<i>meta</i> -Chloracetophenon [%]	Azin 12b [%]	1-Indanon [%]
2	2	0	0	0
5	4	1	1	0
23	5	4	2	3

Tabelle 10.50. Hydrolytische Stabilität von Hydrazonen **10** in 100 mM KPi pH 7

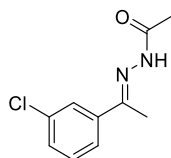
Zeit [h]	Azin 12a [%]	<i>meta</i> -Chloracetophenon [%]	Azin 12b [%]	1-Indanon [%]
2	0	0	0	0
5	3	3	1	0
23	11	7	12	5

10.7.5 Analytik

10.7.5.1 AAV18: Acylierung von Hydrazone **10**

Die Acylierung erfolgt nach einer abgewandelten Vorschrift von Rye *et al.*^[325] Hydrazone **10** (0.55 mmol, 1.00 Äq.) wird in Dichlormethan (2 mL) gelöst. Triethylamin (0.83 mmol, 1.50 Äq.) und Acetylchlorid (0.61 mmol, 1.10 Äq.) werden hinzugegeben und die Reaktionsmischung wird für 1 h bei 30 °C gerührt. Die Mischung wird mit Salzsäure (2 M, 2 mL), Natronlauge (2 M, 2 mL) und dH₂O (2 mL) gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, unter vermindertem Druck eingeeengt und direkt ¹H-NMR-spektroskopisch bzw. per SFC-HPLC analysiert.

10.7.5.1.1 (*E*)-*N*-(1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)acetohydrazid (**13a**)



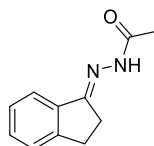
Die Darstellung erfolgt nach AAV18 aus (1-(3-Chlorphenyl)ethyliden)hydrazin (**10a**) (63.1 mg, 0.37 mmol, 1.00 Äq.). **13a** (71.9 mg, 0.34 mmol, 92%) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.45 (s, 1H, NH), 7.75 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.62 (dt, *J* = 7.1, 1.7 Hz, 1H, H^{Ar}), 7.36–7.31 (m, 2H, H^{Ar}), 2.40 (s, 1H, O=CCH₃), 2.25 (s, 1H, N=CCH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 174.4 (C=O), 145.9 (C=N), 140.0 (C^{Ar}), 134.7 (C^{Ar}), 129.8 (C^{Ar}), 129.3 (C^{Ar}), 126.3 (C^{Ar}), 124.3 (C^{Ar}), 20.9 (O=CCH₃), 13.1 (N=CCH₃).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₀H₁₂N₂OCl [M+H]⁺: 211.0632, gefunden: 211.0627.

10.7.5.1.2 (*E*)-*N*-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-1-yliden)acetohydrazid (**13b**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV18 aus (2,3-Dihydro-1*H*-inden-1-yliden)hydrazin (**10b**) (34.4 mg, 0.24 mmol, 1.00 Äq.). **13b** (37.6 mg, 0.20 mmol, 83%) wird als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.01 (s, 1H, **NH**), 7.75 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.38–7.27 (m, 3H, **H^{Ar}**), 3.17–3.14 (m, 2H, **C^{Ar}CH₂**), 2.79–2.77 (m, 2H, **N=CCH₂**), 2.40 (s, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.9 (**C=O**), 157.2 (**C^q**), 148.2 (**C^q**), 137.9 (**C^q**), 130.6 (**C^{Ar}**), 127.2 (**C^{Ar}**), 125.6 (**C^{Ar}**), 121.6 (**C^{Ar}**), 28.7 (**C^{Ar}CH₂**), 26.3 (**N=CCH₂**), 20.5 (**CH₃**).

HRMS (ESI) m/z berechnet für C₁₁H₁₃N₂O [M+H]⁺: 189.1022, gefunden: 189.1024.

10.7.5.2 Bestimmung des Umsatzes von Hydrazonen **10** zu Azinen **12**

Die Analyse der Biotransformationen der Hydrazone **10a-b** erfolgt nach Derivatisierung der organischen Phase des Rohprodukts entsprechend der AAV18 im Anschluss an die Extraktion des Reaktionsgemisches. Die Analysen werden an einem LC2000 SFC-HPLC System von Jasco mit der chiralen HPLC Säule Chiralpak® AD-H von Daicel bei 20 °C mit Mischungen überkritischem CO₂, Ethanol (0.1% DEA) als mobile Phase bei einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ und einem Rückdruck von 10 MPa bei einer Detektionswellenlänge von 210 nm durchgeführt. Details der jeweiligen HPLC-Methoden und die Retentionszeiten der Hydrazonamide **13a-b**, der Azine **12a-b** und der entsprechenden mit Acetylchlorid acylierten Alkohole sind in Tabelle 10.51 angegeben.

Tabelle 10.51. SFC-HPLC Analytik zur Analyse der Biotransformationen der Hydrazone **10a-b**

Azin/Hydrazonamid	Mobile Phase (überkritisches CO ₂ :Ethanol (0.1% DEA))	Retentionszeiten [min] ^a
12a/13a	95:5 (0.005)	13a : 24.5
		12a : 34.8 acylierter Alkohol: 15.8, 17.7
12b/13b	90:10 (0.01)	13b : 17.2
		12b : 42.8 acylierter Alkohol: 11.7, 13.2

10.7.6 Kolorimetrischer pH-Shift-Assay

Der kolorimetrische pH-Shift-Assay wird im Anschluss an die Expression aller 31 rekombinant vorliegenden IREDs (AAV15, siehe Kapitel 10.5.5) nach der AAV16 (siehe Kapitel 10.5.6) durchgeführt. Der Assay zur Umsetzung von Hydrazonen **10** durch die IREDs wird in 96 Well Mikrotiterplatten jeweils in Doppelbestimmung für jede IRED in 10 mM KP_i pH 7.4 (+0.01% w/w BTB) mit 20 mM D-Glucose, 10 mM Substrat (100 mM Stammlösung in Methanol), 10 μ L GDH, 40 μ L IRED-Zellrohextrakt aus der Expression nach AAV15 und 0.1 mM NADPH durchgeführt. Es werden jeweils 2 verschiedene Negativkontrollen in Doppelbestimmung durchgeführt. Eine Negativkontrolle (in den

Ergebnissen als Negativ bezeichnet) ohne IRED-Zellrohextrakt, die zweite Negativkontrolle (als pET22b_leer bezeichnet) enthält den Zellrohextrakt des *E. coli* BL21 (DE3) ohne Insert im pET-22b(+) Vektor. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.52 dargestellt.

Tabelle 10.52. Kolorimetrischer pH-Shift-Assay der Hydrazone **10**

Substrat	Potentiell positive IREDs	Negativ	pET22b_leer
10b	IRED01, IRED06, IRED27, IRED31	negativ	negativ
10c	IRED01, IRED06, IRED12, IRED27	negativ	negativ

10.7.7 Spektrophotometrischer Aktivitätsassay

Die spektrophotometrische Bestimmung der Aktivität der IREDs gegenüber Hydrazonen **10** bzw. dem Dihydraton **12b** wird entsprechend der AAV7 (siehe Kapitel 10.2.7) bei einer Substratkonzentration von 1 mM mit 4% Methanol als Cosolvent durchgeführt.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgt in 100mM KPi pH 7 mit 4% Methanol als Cosolvent, 1 mM Substrat, 60 μ L IRED-Zellrohextrakt und 0.36 mM NADPH. Die Messung wird durch Zugabe von NADPH gestartet und es werden jeweils Fünffachbestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.53 dargestellt.

Tabelle 10.53. Aktivitätsassay der Hydrazone **10**

Substrat	IRED	Aktivität [U mL ⁻¹]	Spezifische Aktivität [U mg _{GZP} ⁻¹]
10a	IRED01	0.076 \pm 0.008	0.003
10a	IRED06	0.136 \pm 0.013	0.005
10a	IRED27	0.092 \pm 0.009	0.006
10a	IRED01	0.073 \pm 0.005	0.003
10b	IRED24	0,095 \pm 0,011	0.004
10b	IRED27	0.106 \pm 0.013	0.007
10b	IRED29	0,156 \pm 0,006	0.006
12b	IRED27	0.086 \pm 0.022	0.004
ohne Substrat	IRED27	0.117 \pm 0.006	0.005

10.7.8 Biotransformationen von Hydrazonen **10**

Die Biotransformation der Hydrazone **10a-b** werden im 1 mL Maßstab bei 20 °C und 850 rpm in 100 mM KPi pH 7 mit 1% Methanol als Cosolvent, 20 mM D-Glucose, 10 mM Hydraxon **10a-b**, 4 mg mL⁻¹ IRED-ZRE, 200 U GDH und 0.1 mM NADP⁺ im Thermomixer durchgeführt. Nach 24 h wird dem Reaktionsgemisch jeweils Natronlauge (32%, 20 µL) und Dichlormethan (1 mL) zugesetzt. Die Phasen werden mit Hilfe eines Vortexers durchmischt und zur Phasentrennung für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die organische Phase wird entsprechend der AAV18 acyliert und per chiraler SFC-HPLC analysiert (siehe Kapitel 10.7.5.2). In den HPLC-Chromatogrammen konnten jeweils nur Signale für die Hydrazone **10**, die Azine **12** und die mit Acetylchlorid derivatisierten Alkohole nachgewiesen werden. Weitere Signale, die Hinweise auf eine Bildung der entsprechenden Hydrazine **11** geben könnten, wurden jedoch nicht beobachtet.

10.8 Vanadium-katalysierte Dehydrierung von N-Heterozyklen in Wasser

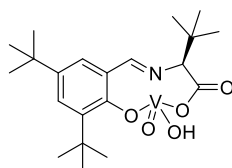
10.8.1 Analytik

Zur Etablierung einer Umsatzanalytik per ¹H-NMR-Spektroskopie werden drei unterschiedliche Verhältnisse von 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) und 2-Methylchinolin (**15a**) eingewogen und die Aufarbeitung des Gemisches simuliert. Hierfür wird die Mischung mit destilliertem Wasser (dH₂O) (0.25 mL) versetzt, die Lösung über eine mit Silicagel und Magnesiumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht. Da per ¹H-NMR-Spektroskopie die eingewogenen Verhältnisse wiedergefunden wurden, muss für die Aufarbeitung zur relativen Bestimmung des Umsatzes kein Korrekturfaktor bestimmt werden. Die Oxidation unter Einsatz der Vanadium-Katalysatoren verläuft ohne Bildung von Zwischen- oder Nebenprodukten, sodass der Umsatz über den Vergleich der Intergrale charakteristischer Signale von Edukt **14a** und Produkt **15a** erfolgen kann.

10.8.2 Synthese der Vanadium-Komplexe

Die Vanadium-Komplexe (*R_a,S,S*)-**A**, (*R_a,S*)-**B**, *rac*-**C**, (*S*)-**E**, (*R^{*},R^{*}*)-/(*R,S*)-**F** und (*S*)-**G** wurden während des Forschungsaufenthaltes am *Institute of Scientific and Industrial Research* (ISIR) der Universität Osaka freundlicherweise von Sako und Aoki zur Verfügung gestellt.

10.8.2.1 Vanadium-Komplex (S)-D



3,5-Di-*tert*-butylsalicylaldehyd (234.3 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.), *L-tert*-Leucin (144.3 mg, 1.10 mmol, 1.1 Äq.), Vanadylsulfat-Monohydrat (181.0 mg, 2.20 mmol, 2.2 Äq.) und Molsieb 3 Å (1 g) werden unter Sauerstoff-Atmosphäre (1 atm.) mit Methanol (25 mL) versetzt und das Gemisch für 20 h unter Reflux gerührt (die Vollständigkeit des Reaktionsverlaufs wird per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie überprüft). Die Reaktionsmischung wird über Celite filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Dichlormethan gelöst und mindestens dreimal mit dH_2O gewaschen. Die wässrige Phase wird erneut mit Dichlormethan extrahiert, die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. (S)-D (269.7 mg, 0.63 mmol, 63%) wird als schwarzer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 8.60 (s, 1H, HC=N), 7.69 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H^{Ar}), 7.48 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H^{Ar}), 4.14 (s, 1H, $\text{CHC}(\text{CH}_3)_3$), 1.47 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.35 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.21 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 180.1 (C=O), 169.0 (C=N), 168.9 (C^{Ar}), 143.5 (C^{Ar}), 138.6 (C^{Ar}), 132.3 (C^{Ar}), 129.4 (C^{Ar}), 121.9 (C^{Ar}), 84.7 ($\text{CHC}(\text{CH}_3)_3$), 38.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 35.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

HRMS (ESI) m/z berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{NO}_5\text{V}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 430.1793, gefunden: 430.1788.

IR [cm^{-1}]: 3025, 2968, 2946, 1739, 1365, 1229, 1217.

10.8.3 Katalysator-Screening

2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) (14.7 mg, 0.10 mmol, 1.00 Äq.) wird in dH_2O (0.25 mL) vorgelegt und mit Oxovanadium(V)-Katalysator (5 mol% für dinukleare Vanadium-Komplexe und 10 mol% bei mononuklearen) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei 50 °C bzw. 70 °C für 17 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel und Natriumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht. Der Enantiomerenüberschuss des verbleibenden Startmaterials **14a** wird nach Aufreinigung per präparativer DC (*n*-Hexan:Ethylacetat 8:1) über NP-HPLC (Chiralpak[®] OD-H,

n-Hexan:2-Propanol 98:2, 0.5 mL min⁻¹, *t*_{R1}= 14.4 min, *t*_{R2}= 15.5 min) bestimmt, wobei das Edukt stets racemisch vorliegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.54 dargestellt.

Tabelle 10.54. Katalysator-Screening zur Dehydrierung von **14a**

Vanadium-Katalysator	Reaktionstemperatur [°C]	Umsatz [%]
VOSO ₄	70	0
NaVO ₃	70	0
VO(OEt) ₃	70	3
(<i>R</i> _a , <i>S</i> , <i>S</i>)- A	70	41
(<i>R</i> _a , <i>S</i>)- B	70	26
<i>rac</i> - C	70	30
(<i>S</i>)- D	70	50
(<i>S</i>)- E	70	20
(<i>R</i> [*] , <i>R</i> [*])-(<i>R</i> , <i>S</i>)- F	70	44
(<i>S</i>)- G	70	28
(<i>R</i> _a , <i>S</i> , <i>S</i>)- A	50	39
(<i>R</i> _a , <i>S</i>)- B	50	13
<i>rac</i> - C	50	26
(<i>S</i>)- D	50	36
(<i>S</i>)- E	50	16
(<i>R</i> [*] , <i>R</i> [*])-(<i>R</i> , <i>S</i>)- F	50	24
(<i>S</i>)- G	50	23

10.8.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Dehydrierung von **14a**

2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) (14.7 mg, 0.10 mmol, 1.00 Äq.) wird in dH₂O (0.1 mL, 0.25 mL oder 1 mL) vorgelegt, mit Oxovanadium(V)-Katalysator (*S*)-**D** (1.08 mg, 0.0025 mmol, 2.5 mol%, 2.15 mg, 0.005 mmol, 5 mol%, 4.29 mg, 0.01 mmol, 10 mol% oder 8.58 mg, 0.02 mmol, 20 mol%) und gegebenenfalls SDS (1.44 mg, 0.005 mmol, 5 mol%), Triton X-100 (2.9 µL, 0.005 mmol, 5 mol%), TBAB (1.60 mg, 0.005 mmol, 5 mol%), Methanol oder DMSO (10 bzw. 20% v/v), Wasserstoffperoxid (15.3 µL, 0.15 mmol, 1.50 Äq.) oder *tert*-Butylhydroperoxid (15.0 µL, 0.15 mmol, 1.50 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur bzw. 60 °C für 24-72 h unter Luft- bzw. Sauerstoffatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel und Natriumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht. Die

Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgt durch Variation verschiedener Parameter, die mit den Ergebnissen in Tabelle 10.55 zusammengefasst sind.

Tabelle 10.55. Optimierung der Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) (sofern nicht anders angegeben, wurden die Reaktionen unter Luftatmosphäre durchgeführt)

T [°C]	t [h]	(S)-D [mol%]	14a [M]	Tensid [5 mol%]	Cosolvent [% v/v]	Oxidant [Äq./atm.]	Umsatz [%]
60	24	2.5	0.4	-	-	-	14
60	24	5.0	0.4	-	-	-	30
60	24	10	0.4	-	-	-	44
60	24	20	0.4	-	-	-	60
60	24	10	0.1	-	-	-	35
60	24	10	1.0	-	-	-	53
60	24	10	0.4	SDS	-	-	41
60	24	10	0.4	Triton X-100	-	-	44
60	24	10	0.4	TBAB	-	-	37
60	24	10	0.4	-	MeOH [10]	-	30
60	24	10	0.4	-	MeOH [20]	-	30
60	24	10	0.4	-	DMSO [10]	-	39
60	24	10	0.4	-	DMSO [20]	-	40
60	48	10	0.4	-	-	-	63
60	72	10	0.4	-	-	-	90
RT	24	10	0.4	-	-	-	10
RT	24	10	0.4	-	-	H ₂ O ₂ [1.5 Äq.]	51
RT	24	10	0.4	-	-	TBHP [1.5 Äq.]	15
60	24	10	0.4	-	-	O ₂ [1 atm.]	76
60	48	10	0.4	-	-	O ₂ [1 atm.]	91

10.8.5 AAV19: Dehydrierung mit dem Vanadium-Komplex (S)-D

Edukt (0.10 mmol, 1.00 Äq.) wird in dH₂O (0.25 mL) vorgelegt und mit Oxovanadium(V)-Katalysator (S)-D (0.01 mmol, 10 mol%) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei 60 °C für 48 h unter Sauerstoffatmosphäre (1 atm.) gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel und Magnesiumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht.

10.8.6 Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) im 1 mmol Maßstab

2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin (**14a**) (147 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) wird in dH₂O (2.5 mL) vorgelegt und mit dem Oxovanadium(V)-Katalysator (S)-**D** (442.9 mg, 0.10 mmol, 10 mol %) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei 60 °C für 48 h unter Sauerstoffatmosphäre (1 atm.) gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel und Magnesiumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht. 2-Methylchinolin (**15a**) (94.9 mg, 0.66 mmol, 66%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5-40% Ethylacetat in Cyclohexan) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.04–8.01 (m, 2H, **H^{Ar}**), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.67 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.47 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, **H^{Ar}**), 2.74 (s, 3H, **CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 159.1 (**C^{Ar}-CH₃**), 148.0 (**C^{Ar}**), 136.3 (**C^{Ar}**), 129.5 (**C^{Ar}**), 128.7 (**C^{Ar}**), 127.6 (**C^{Ar}**), 126.6 (**C^{Ar}**), 125.8 (**C^{Ar}**), 122.1 (**C^{Ar}**), 25.5 (**CH₃**).

HRMS (ESI) *m/z* berechnet für C₁₀H₁₀N [M+H]⁺: 144.0808, gefunden: 144.0809.

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten der *Spectral Database for Organic Compounds* (SDBS) überein.

10.8.7 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

10.8.7.1 Dehydrierung von **14a** unter inerten Bedingungen

2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) (14.7 mg, 0.10 mmol, 1.00 Äq.) wird in dH₂O (0.25 mL) vorgelegt und mit Oxovanadium(V)-Katalysator (S)-**D** (4.29 mg, 0.01 mmol, 10 mol%) versetzt. Die Reaktionslösung wird bei 60 °C für 24 h unter Argonatmosphäre (1 atm.) gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel und Magnesiumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht. **14a** wird mit einem Umsatz von 2% zum Produkt **15a** umgesetzt.

10.8.7.2 Untersuchung zur Bildung von Wasserstoffperoxid als Kupplungsprodukt

Zum Nachweis von Wasserstoffperoxid wird die Dehydrierung von 2-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (**14a**) entsprechend der AAV19 wiederholt und nach 4 h und 24 h Reaktionszeit mit Peroxid-Teststäbchen (Quantofix Peroxide 25 von Macherey-Nagel) die Anwesenheit von Peroxiden überprüft. Es konnte zu keinem Zeitpunkt Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden.

In einem Kontrollexperiment wird die Stabilität von Wasserstoffperoxid unter den Reaktionsbedingungen überprüft. Hierzu wird äquimolar zum Substrat **14a** Wasserstoffperoxid (30%, 10.2 µL, 0.10 mmol, 1.00 Äq.) in den Dehydrierungsansatz, der nach AAV19 durchgeführt wird, gegeben und 4 h und 24 h Reaktionszeit mit Peroxid-Teststäbchen (Quantofix Peroxide 25 von Macherey-Nagel) die Anwesenheit von Peroxiden überprüft. Es konnte sowohl nach 4 h als auch nach 24 h Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden.

10.8.8 Erweiterung des Substratspektrums der Dehydrierung mit Vanadium-Komplex (S)-D

Die Dehydrierung von Tetrahydrochinolinen **14b-f** (0.10 mmol, 1.00 Äq.), Tetrahydrochinoxalinen **16a-b** (0.10 mmol, 1.00 Äq.), 9,10-Dihydroacridin (**17**) (0.10 mmol, 1.00 Äq.), 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (**18**) (0.10 mmol, 1.00 Äq.) und 2-Methylpiperidin (**19**) (0.10 mmol, 1.00 Äq.) erfolgt nach der AAV19 für 24 bzw. 48 h. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel und Magnesiumsulfat gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen Ethylacetat gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch untersucht. Da keine Neben- bzw. Zwischenprodukte beobachtet wurden, erfolgte die Bestimmung der Umsätze über den Vergleich der Integrale charakteristischer Signale von Edukt und Produkt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10.56 dargestellt.

Tabelle 10.56. Untersuchung des Substratspektrums der Vanadium-katalysierten Dehydrierung

Substrat	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
14b	48	99
14c	24	98
	48	100
14d	24	96
	48	100
14e	24	98
	48	100
14f	24	57
	48	89
16a	48	100
16b	48	100
17	48	82
17	keine Produktbildung	
19	keine Produktbildung	

11. ANHANG – STUDIEN ZUR OXIDATIVEN KUPPLUNG MONOZYKLISCHER PHENOLE

11.1 Einleitung

Chirale 2,2'-Dihydroxy-1,1'-biphenyl-Derivate stellen wichtige Struktur motive in der asymmetrischen Synthese, beispielsweise als chirale Liganden für Übergangsmetalle (Abbildung 11.1), Organokatalysatoren und biologisch aktive Verbindungen dar.^[394–397]

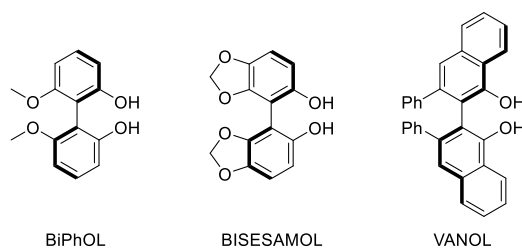
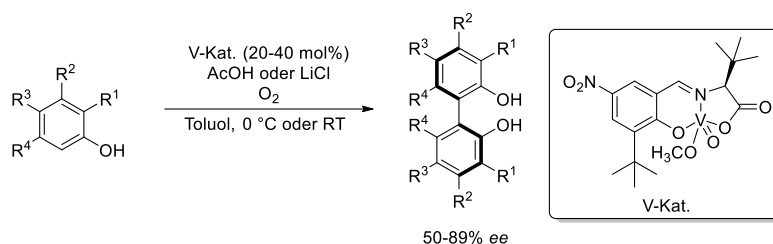


Abbildung 11.1. Anwendungen von chiralen 2,2'-Dihydroxy-1,1'-biphenyl-Derivaten^[394–397]

Die Syntheserouten zur Darstellung von axial-chiralen Phenolen jedoch noch immer verhältnismäßig limitiert, insbesondere im Vergleich zu der Vielzahl an asymmetrischen Syntheserouten von atropisomeren Biarylen wie BINOL (siehe auch Kapitel 7.1.3).^[394–399] Die oxidative Kupplung von Phenolen stellt eine elegante sowie nachhaltige Syntheseroute zur Darstellung von Biphenolen dar, da keine Aktivierung vor der Kupplungsreaktion erforderlich ist.^[400–402] Eine Vielzahl von Protokollen zur oxidativen Kupplung von Phenolderivaten unter Einsatz von Metallkatalyse,^[403–413] Enzymkatalyse,^[414] Peroxidinitiatoren,^[415] hypervalenten Iodanen^[416,417] und elektrochemischen Methoden^[418–420] wurde daher in den letzten Jahren veröffentlicht.

Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Kozłowski die erste enantioselektive oxidative Kupplung von Phenolen mit Enantiomerenüberschüssen zwischen 50–89% ee unter Einsatz von 20–40 mol% eines chiralen Vanadium-Katalysators erfolgreich etablieren (Schema 11.1).^[421]



Schema 11.1. Asymmetrische oxidative Kupplung von Phenolen unter Einsatz chiraler Vanadium-Komplexe^[421]

Die Autorin konnte im Rahmen des Forschungsaufenthaltes am *Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR)* der Universität Osaka in der Arbeitsgruppe von Sasai einen

Beitrag zur enantioselektiven oxidativen Kupplung monozyklischer Phenole unter Einsatz mono- und dinuklearer Vanadium-Katalysatoren leisten. Eine Übersicht der von der Autorin untersuchten Substrate zur Kupplung monozyklischer Phenole ist in Abbildung 11.2 dargestellt. Die Ergebnisse hierzu sind im Folgenden zusammengefasst.

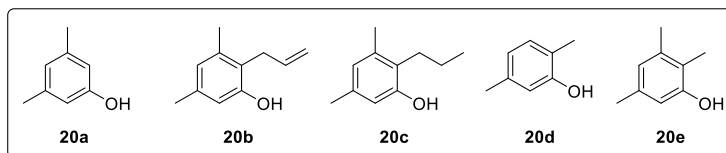
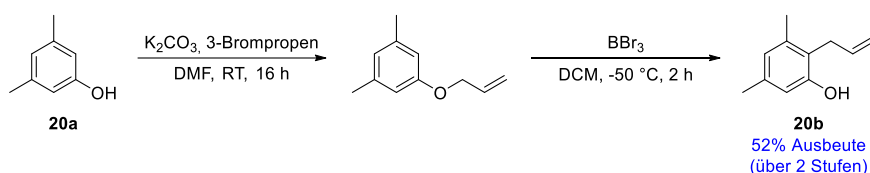


Abbildung 11.2. Übersicht der im Rahmen der Kupplung monozyklischer Phenole untersuchten Substrate

11.2 Ergebnisse und Diskussion

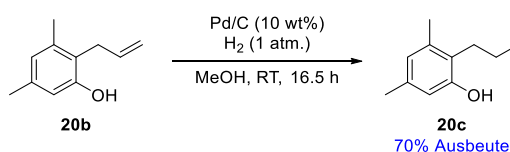
11.2.1 Substratsynthesen

Zur Untersuchung der oxidativen Kupplung monozyklischer Phenole wurden zunächst zwei verschiedene Substrate synthetisiert. Die Darstellung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) erfolgte nach einer Vorschrift von Kang *et al.* ausgehend von 3,5-Dimethylphenol (**20a**).^[421] Im ersten Schritt erfolgte die Ausbildung eines Allylarylethers, der im zweiten Schritt unter Verwendung von Bortribromid in einer Claisen-Umlagerung zum gewünschten Produkt **20b** umgesetzt wurde. 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) konnte mit einer isolierten Ausbeute von 52% über zwei Stufen erhalten werden (Schema 11.2).



Schema 11.2. Synthese von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**)

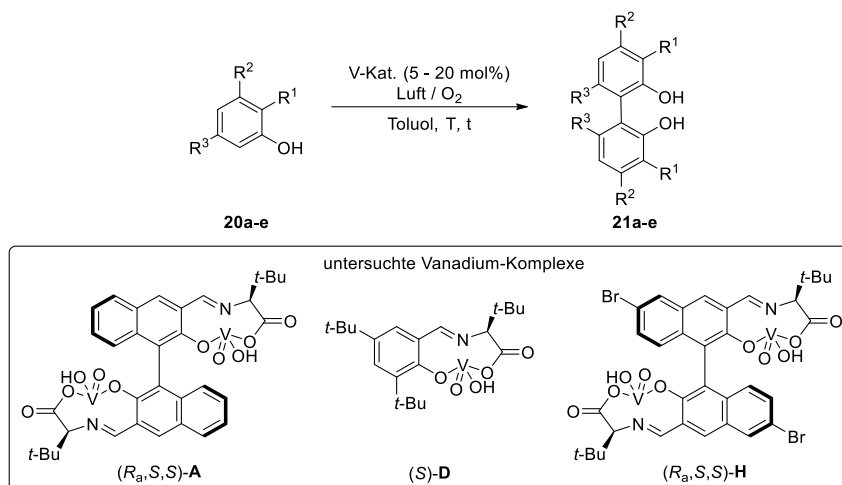
Ausgehend von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) konnte in einer Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**) ebenfalls nach einer Vorschrift von Kang *et al.*^[421] mit einer Ausbeute von 70% isoliert werden (Schema 11.3).



Schema 11.3. Synthese von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**)

11.2.2 Oxidative Kupplung monozyklischer Phenole

Die oxidative Kupplung monozyklischer Phenole wurde mit drei verschiedenen mono- und dinklearen Vanadium-Komplexen unter Variation der Reaktionsbedingungen in analytischen Maßstäben untersucht (Schema 11.4).



Schema 11.4. Oxidative Kupplung monozyklischer Phenole unter Verwendung von mono- bzw. dinklearen Vanadium-Komplexen

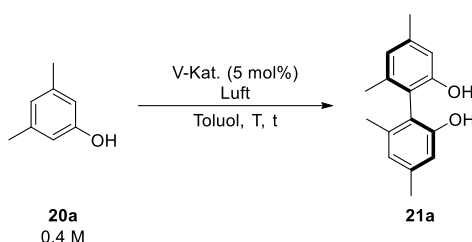
Als besten Vanadium-Komplex zur oxidativen Kupplung des Modellsubstrates [1,1'-Biphenyl]-3,5-diol identifizierten Sako und Aoki im Rahmen ihrer Arbeiten auf diesem Gebiet den dinuklearen Komplex (*R_a,S,S*)-**H** bei einer Katalysatorbeladung von 5 mol%. Außerdem wurde Toluol als bestes Solvent, Luftatmosphäre, 70 °C als Reaktionstemperatur und eine Reaktionszeit von 48 h als beste Reaktionsbedingungen von Sako und Aoki etabliert.^[422] Aufbauend auf diesen Ergebnissen nutzte die Autorin daher zunächst diese Bedingungen und variierte diese. Da die Autorin im Gegensatz zu dem Modellsubstrat der Arbeitsgruppe Sasai monohydroxyphenolische Derivate untersuchte, wurde analog zu der Arbeit von Kang *et al.*^[421] zusätzlich ein mononuklearer Vanadium-Komplex (*S*)-**D** für die oxidative Phenolkupplung untersucht. Außerdem wurde der dinukleare Vanadium-Komplex (*R_a,S,S*)-**A** untersucht, der den besten Katalysator im Rahmen der oxidativen Kupplung von 2-Naphthol darstellte.^[30,31]

Da bei der oxidativen Phenolkupplung auch Nebenprodukte beobachtet wurden, erfolgte die Analyse der Umsetzungen per ¹H-NMR-Spektroskopie unter Verwendung von 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard. Mit Hilfe dieses internen Standards wurden sowohl der Umsatz der Edukte **20a-e** und die Produktbildung **21a-e**, die im Folgenden als NMR-Ausbeute bezeichnet wird, prozentual angegeben.

11.2.2.1 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (**20a**)

Die oxidative Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (**20a**) wurde mit den drei Vanadium-Komplexen (R_a,S,S)-**A**, (S)-**D** und (R_a,S,S)-**H** durchgeführt, wobei jeweils 5 mol% der dinuklearen Komplexe und 10 mol% des mononuklearen Vanadium-Komplexes eingesetzt wurde. Mit dem Vanadium-Komplex (R_a,S,S)-**A** konnte ein Umsatz von 63% zum entsprechenden Produkt **21a** mit einer NMR-Ausbeute von 24% und einem Enantiomerenüberschuss zugunsten des (S)-Enantiomers von 26% ee nachgewiesen werden (Tabelle 11.1, Eintrag 1). Eine Erhöhung der produktbezogenen NMR-Ausbeute konnte über die Verwendung des bromierten Katalysators (R_a,S,S)-**H** und eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 h nachgewiesen werden, jedoch mit Einbußen in der Enantioselektivität (Tabelle 11.1, Eintrag 2). Über eine verringerte Reaktionstemperatur von 50 °C wurde die Enantioselektivität der oxidativen Kupplung von **20a** auf 31% ee erhöht (Tabelle 11.1, Eintrag 3). Der mononukleare Vanadium-Komplex (S)-**D** katalysierte die oxidative Kupplung von **20a** bei einer Substratkonzentration von 0.2 M ebenfalls und zeigt bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C und einer Reaktionszeit von 48 h mit 59% die höchste produktbezogene NMR-Ausbeute, allerdings mit einer geringen Enantioselektivität von 20% ee für das (S)-Enantiomer (Tabelle 11.1, Eintrag 4).

Tabelle 11.1. Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (**20a**)



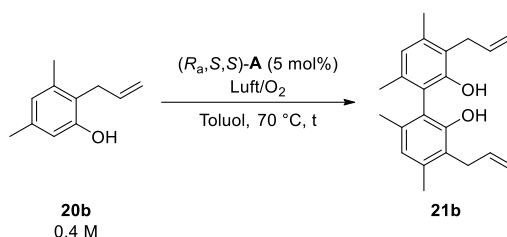
Eintrag	V Kat.	T [°C]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR-Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	(R_a,S,S)- A	70	44	63	24	26 (S)
2	(R_a,S,S)- H	70	48	76	30	20 (S)
3	(R_a,S,S)- H	50	48	34	22	31 (S)
4^c	(S)- D	70	48	37	59	20 (S)

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® IA, *n*-Hexan:2-Propanol (4:1), 1 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, *t*_{R1}: 9.3 min, *t*_{R2}: 21.9 min. Die absolute Konfiguration wurde in Analogie zu der per Kristallographie bestimmten Konfiguration von (S)-[1,1':2',1'':2'',1'''-Quaterphenyl]-3',4'',5',6'''-tetraol per HPLC bestimmt; ^cSubstratkonzentration: 0.2 M, V-Kat.: 10 mol%

11.2.2.2 Oxidative Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**)

Die oxidative Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) wurde lediglich mit dem Vanadium-Komplex (R_a,S,S)-**A** bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C unter Umgebungsluft- bzw. Sauerstoffatmosphäre untersucht. Unter Luftatmosphäre wurde nach einer Reaktionszeit von 44 h zwar mit 59% ein relativ hoher Umsatz des Phenols **20b** nachgewiesen, die produktbezogene NMR-Ausbeute war mit 6% jedoch sehr gering, welches auf die Bildung von Nebenprodukten hindeutete. Die Enantioselektivität der Kupplung war mit 38% ee moderat (Tabelle 11.2, Eintrag 1). Mit dem Ziel die NMR-Ausbeute des gewünschten Produktes **21b** zu erhöhen, wurde die Reaktion im nächsten Schritt unter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt. Da bereits nach einer Reaktionszeit von 18 h Nebenprodukte per Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnten, wurde die Kupplungsreaktion abgebrochen. Es konnte ein Umsatz von 23% und eine produktbezogene NMR-Ausbeute von 10% nachgewiesen werden. Die Enantioselektivität der Kupplungsreaktion unter Sauerstoffatmosphäre war mit 21% ee geringer gegenüber der Reaktion unter Luftatmosphäre (Tabelle 11.2, Eintrag 2).

Tabelle 11.2. Oxidative Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**)



Eintrag	Luft/O ₂ [1 atm.]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR-Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	Luft	44	59	6	38
2	O ₂	18	23	10	21

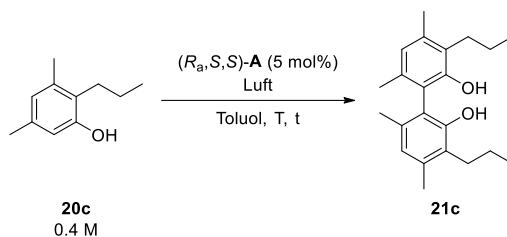
^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® AD-3, *n*-Hexan:2-Propanol (98:2), 0.3 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, t_{R1}: 10.7 min, t_{R2}: 12.0 min.

11.2.2.3 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**)

Die Kupplungsreaktionen von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**) wurden ebenfalls nur mit dem Vanadium-Komplex (R_a,S,S)-**A** unter Luftatmosphäre und Variation der Reaktionstemperatur durchgeführt. Analog zu der Kupplung von **20b** wurden nur geringe produktbezogene NMR-Ausbeuten bestimmt, die gegenüber dem Umsatz deutlich geringer waren, welches auf Nebenreaktionen schließen lässt. Auch eine Verringerung der Reaktionstemperatur von 70 °C auf 55 °C führte zu keiner Verbesserung der

NMR-Ausbeute im Vergleich zum Umsatz. Die Enantioselektivität der Kupplungsreaktion ist mit 27% ee bzw. 29% ee ebenfalls gering (Tabelle 11.3).

Tabelle 11.3. Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**)

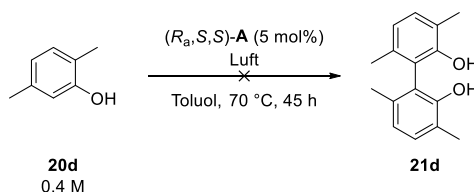


Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR-Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	70	44	53	12	27
2	55	48	23	4	29

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® IG-3, *n*-Hexan:2-Propanol (98:2), 0,3 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, t_{R1}: 12.2 min, t_{R2}:13.3 min.

11.2.2.4 Oxidative Kupplung von 2,5-Dimethylphenol (**20d**)

Im Rahmen der oxidativen Kupplung von 2,5-Dimethylphenol (**20d**) unter Einsatz des dinuklearen Komplexes (*R_a,S,S*)-**A** bei Luftatmosphäre, 70 °C und einer Reaktionszeit von 45 h wurde ein komplexes Produktgemisch erhalten, welches in Bezug auf die Bildung des gewünschten Produktes **21d** nicht auswertbar war. Das Produkt **21d** konnte entsprechend nicht nachgewiesen werden (Schema 11.5), sodass 2,5-Dimethylphenol (**20d**) kein geeignetes Substrat zur oxidativen Kupplung unter den getesteten Reaktionsbedingungen darstellte.



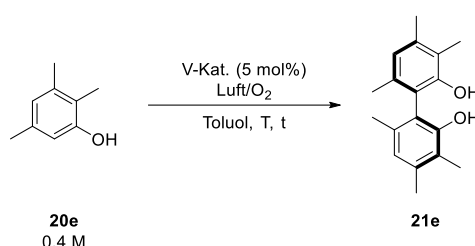
Schema 11.5. Oxidative Kupplung von 2,5-Dimethylphenol (**20d**)

11.2.2.5 Oxidative Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**)

Als letztes monohydroxyphenolisches Substrat wurde 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**) untersucht. Die Kupplung von **20e** wurde mit den drei Vanadium-Komplexen (*R_a,S,S*)-**A**, (*S*)-**D** und (*R_a,S,S*)-**H** unter Variation der Katalysatorbeladung, der Reaktionstemperatur, der Reaktionsatmosphäre und der Verwendung von Essigsäure als Additiv durchgeführt (Tabelle 11.4). Mit dem Vanadium-Komplex (*R_a,S,S*)-**A** wurde bei einer

Reaktionstemperatur von 70 °C unter Luftatmosphäre eine hohe produktbezogene NMR-Ausbeute von 66% und ein korrelierender Umsatz von 76% nachgewiesen. Allerdings verläuft die oxidative Kupplung von **20e** unter Verwendung des Komplexes (R_a,S,S)-**A** nicht enantioselektiv (Tabelle 11.4, Eintrag 1). Unter Verwendung des bromierten dinkulearen Vanadium-Komplexes (R_a,S,S)-**H** konnte die Enantioselektivität der oxidativen Kupplung von **20e** mit 8% ee leicht verbessert werden, die produktbezogene Ausbeute war mit 23% jedoch gering (Tabelle 11.4, Eintrag 2). Über eine Verringerung der Reaktionstemperatur auf 50 °C konnte die Enantioselektivität der Kupplungsreaktion auf 20% ee erhöht werden und eine übereinstimmende produktbezogene NMR-Ausbeute und ein Umsatz von jeweils 20% nachgewiesen werden (Tabelle 11.4, Eintrag 3).

Tabelle 11.4. Oxidative Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**)



Eintrag	V Kat.	Additiv [Äq./1 atm.]	T [°C]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR- Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	(R_a,S,S)- A	Luft	70	45	76	66	0
2	(R_a,S,S)- H	Luft	70	43	72	23	8 (<i>S</i>)
3	(R_a,S,S)- H	Luft	50	48	20	20	20 (<i>S</i>)
4^c	(R_a,S,S)- H	O ₂	RT	48	42	17	49 (<i>S</i>)
5^c	(R_a,S,S)- H	O ₂ , AcOH (6.3)	RT	48	48	11	52 (<i>S</i>)
6^d	(<i>S</i>)- D	O ₂ , AcOH (6.3)	RT	48	35	21	74 (<i>S</i>)

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® AD-3, *n*-Hexan:2-Propanol (98:2), 0.3 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, t_{R1} : 11.4 min, t_{R2} : 12.9 min. Die absolute Konfiguration wurde in Analogie zu der per Kristallographie bestimmten Konfiguration von (*S*)-[1,1':2',1'':2'',1''':1''''-Quaterphenyl]-3',4'',5',6''-tetraol per HPLC bestimmt; ^cV-Kat. 10 mol%; ^dSubstratkonzentration: 0.5 M, V-Kat. 20 mol%

Über eine Erhöhung der Katalysatorbeladung des Komplexes (R_a,S,S)-**H** auf 10 mol% und die Durchführung der Reaktion unter Sauerstoffatmosphäre bei Raumtemperatur wurde die Enantioselektivität der Kupplung von **20e** auf 49% ee erhöht (Tabelle 11.4, Eintrag 4). Da Kang *et al.* im Rahmen ihrer Experimente zur oxidativen Kupplung von Phenolen eine Erhöhung der Selektivität und Reaktivität durch Zugabe von Essigsäure beobachteten,^[421] wurde die Kupplung von **20e** unter Einsatz des Komplexes (R_a,S,S)-**H** ebenfalls in Gegenwart von Essigsäure als Additiv untersucht. Im Vergleich zu der Reaktion mit 10 mol% (R_a,S,S)-**H** bei Raumtemperatur unter Sauerstoffatmosphäre (Tabelle 11.4,

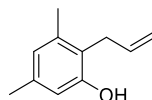
Eintrag 4) wurde keine signifikante Steigerung der Enantioselektivität und Reaktivität nachgewiesen (Tabelle 11.4, Eintrag 5). Unter analogen Bedingungen zur oxidativen Kupplung von Kang *et al.*^[421] (20 mol% mononuklearer Vanadium-Komplex, Raumtemperatur, Sauerstoffatmosphäre und Zusatz von Essigsäure als Additiv) konnte die Enantioselektivität deutlich auf 74% *ee* gesteigert werden. Im Zuge dieses Experiments konnte eine moderate produktbezogene NMR-Ausbeute von 21% bei einem Umsatz von 35% bestimmt werden (Tabelle 11.4, Eintrag 6). Zur oxidativen Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**), welches ebenfalls als Substrat von Kang *et al.* untersucht wurde,^[421] eigneten sich demnach analoge Reaktionsbedingungen wie von Kang *et al.* beschrieben. Unter den von Sako optimierten Bedingungen zur Kupplung dihydroxyphenolischer Derivate konnte jedoch keine effektive Kupplung von **20e** erreicht werden.

Die Ergebnisse, die in diesem Kapitel beschrieben sind, wurden von der Autorin im Rahmen des Forschungsaufenthaltes am *Institute of Scientific and Industrial Research (ISIR)* der Universität Osaka in der Arbeitsgruppe von Sasai erarbeitet. Die Ergebnisse dieses gemeinsamen Projekts wurden im *Journal of Organic Chemistry* zur Publikation angenommen und als *just accepted* Manuskript bereits online veröffentlicht: M. Sako, T. Aoki, N. Zumbärgel, L. Schober, H. Gröger, S. Takizawa, H. Sasai, *J. Org. Chem.*, DOI: 10.1021/acs.joc.8b02494 (als *just accepted* Manuskript online veröffentlicht).^[422]

11.3 Experimenteller Teil

11.3.1 Substratsynthesen

11.3.1.1 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**)



3,5-Dimethylphenol (**20a**) (488 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äq.) wird in *N,N*-Dimethylformamid (8 mL) vorgelegt. Kaliumcarbonat (608 mg, 4.40 mmol, 1.10 Äq.) und Allylbromid (0.40 mL, 4.40 mmol, 1.10 Äq.) werden hinzugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur für 16 h gerührt. Das Gemisch wird mit Diethylether verdünnt, mit Wasser gequench und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird mit Diethylether extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Öl wird ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

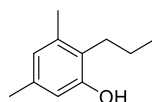
Der Arylallylether wird in Dichlormethan (20 mL) gelöst und auf -50 °C abgekühlt. Bortribromid (8.00 mL, 1 M Lösung in Dichlormethan, 8.00 mmol, 2.00 Äq.) wird langsam zu der Reaktionslösung getropft und für 2 h bei -50 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Wasser gequench, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) (339 mg, 2.09 mmol, 52% über 2 Stufen) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5% Ethylacetat in *n*-Hexan) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.61 (s 1H, **H^{Ar}**), 6.51 (s 1H, **H^{Ar}**), 6.01–5.91 (m, 1H, CH₂**CH=CH**₂), 5.05–5.04 (m, 1H, CH₂CH=**CH**₂), 5.01–5.00 (m, 1H, CH₂CH=**CH**₂), 4.85 (s, 1H, **OH**), 3.40 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, **CH**₂CH=CH₂), 3.39 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, **CH**₂CH=CH₂), 2.25 (s, 3H, C3-**CH**₃), 2.24 (s, 3H, C5-**CH**₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 154.0 (**C^{Ar}**), 138.0 (**C^{Ar}**), 137.1 (**C^{Ar}**), 135.9 (CH₂-**CH=CH**₂), 123.8 (**C^{Ar}**), 120.8 (**C^{Ar}**), 115.4 (CH₂CH=**CH**₂), 114.2 (**C^{Ar}**), 30.5 (CH₂CH=CH₂), 21.1 (**CH**₃), 19.7 (**CH**₃).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[421]

11.3.1.2 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**)



2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) (170 mg, 1.05 mmol, 1.00 Äq.) wird in trockenem Methanol (2 mL) vorgelegt. Palladium auf Aktivkohle (17 mg, 10% w/w) wird hinzugegeben und das Gemisch unter Wasserstoffatmosphäre (1 atm.) für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird filtriert, mit kaltem Methanol gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**) (121 mg, 0.74 mmol, 70%) wird nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5% Ethylacetat in *n*-Hexan) als farbloser Feststoff erhalten.

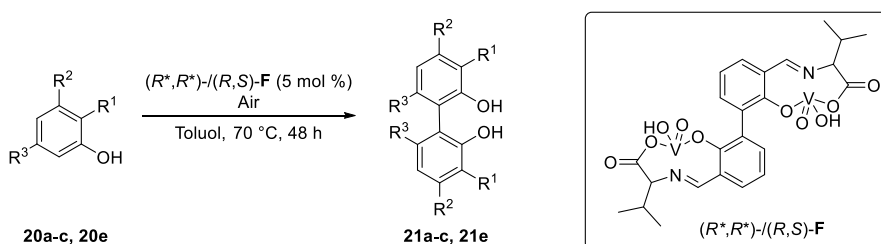
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.58 (s, 1H, **H^{Ar}**), 6.45 (s, 1H, **H^{Ar}**), 4.57 (s, 1H, **OH**), 2.57–2.53 (m, 2H, **CH₂CH₂CH₃**), 2.26 (s, 3H, **C3-CH₃**), 2.23 (s, 3H, **C5-CH₃**), 1.56–1.50 (m, 2H, **CH₂CH₂CH₃**), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, **CH₂CH₂CH₃**).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 153.6 (**C^{Ar}**), 137.7 (**C^{Ar}**), 136.2 (**C^{Ar}**), 124.2 (**C^{Ar}**), 123.7 (**C^{Ar}**), 113.7 (**C^{Ar}**), 28.3 (**CH₂CH₂CH₃**), 22.7 (**CH₂CH₂CH₃**), 21.0 (**CH₃**), 19.6 (**CH₃**), 14.6 (**CH₂CH₂CH₃**).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[421]

11.3.2 Oxidative Kupplung monozyklischer Phenole

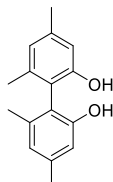
11.3.2.1 AAV20: Oxidative Kupplung zur Synthese racemischer Referenzen



Die oxidative Kupplung zur Synthese der racemischen Referenzen für die Etablierung der HPLC Analytik erfolgt mit dem Vanadium-Komplex (*R*^{*},*R*^{*})-/(*R*,*S*)-**F**. Phenol (**20a-c**, **20e**) (0.20 mmol, 1.00 Äq.) wird mit (*R*^{*},*R*^{*})-/(*R*,*S*)-**F** (5 mol%) in Toluol (0.5 mL) vorgelegt und bei 70 °C für 48 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen einer Mischung *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1) gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard untersucht. Die Produkte **21a-c** und **21e**

werden durch präparative DC aufgereinigt und für die Etablierung der HPLC Analytik zur Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen genutzt.

11.3.2.1.1 *rac*-4,4',6,6'-Tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21a**)

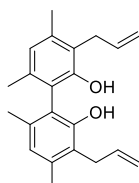


Die Darstellung erfolgt nach AAV20 ausgehend von 3,5-Dimethylphenol (**20a**) (24.4 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.). *rac*-4,4',6,6'-Tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21a**) wird als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.75 (s, 2H, **H^{Ar}**), 6.72 (s, 2H, **H^{Ar}**), 2.33 (s, 6H, C6**CH₃**, C6'**CH₃**), 1.97 (s, 6H, C4**CH₃**, C4'**CH₃**).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[423]

11.3.2.1.2 *rac*-3,3'-Diallyl-4,4',6,6'-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21b**)

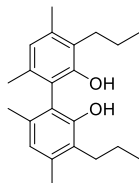


Die Darstellung erfolgt nach AAV20 ausgehend von 2-Allyl-3,5-Dimethylphenol (**20b**) (32.5 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.). *rac*-3,3'-Diallyl-4,4',6,6'-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21b**) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.81 (s, 2H, **H^{Ar}**), 6.05–5.96 (m, 2H, 2x CH₂**CH=CH₂**), 5.12–5.03 (m, 4H, 2x CH₂**CH=CH₂**), 3.51–3.48 (m, 4H, 2x **CH₂CH=CH₂**), 2.36 (s, 6H, C6**CH₃**, C6'**CH₃**), 2.10 (s, 6H, C4**CH₃**, C4'**CH₃**).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[421]

11.3.2.1.3 *rac*-4,4',6,6'-Tetramethyl-3,3'-dipropyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21c**)

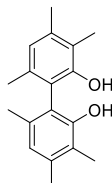


Die Darstellung erfolgt nach AAV20 ausgehend von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**) (32.9 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.). *rac*-4,4',6,6'-Tetramethyl-3,3'-dipropyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21c**) wird als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.76 (s, 2H, **H^{Ar}**), 2.69–2.65 (m, 4H, 2x **CH₂CH₂CH₃**), 2.35 (s, 6H, **C6CH₃**, **C6'CH₃**), 1.96 (s, 6H, **C4CH₃**, **C4'CH₃**), 1.74–1.67 (m, 4H, 2x **CH₂CH₂CH₃**), 1.06–1.01 (m, 6H, 2x **CH₂CH₂CH₃**).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[421]

11.3.2.1.4 *rac*-3,3',4,4',6,6'-Hexamethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21e**)



Die Darstellung erfolgt nach AAV20 ausgehend von 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**) (27.2 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.). *rac*-3,3',4,4',6,6'-Hexamethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (*rac*-**21e**) wird als gelblicher Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.74 (s, 2H, **H^{Ar}**), 4.75 (s, 2H, 2x **OH**), 2.29 (s, 6H, **C6CH₃**, **C6'CH₃**), 2.17 (s, 6H, **C4CH₃**, **C4'CH₃**), 1.92 (s, 6H, **C3CH₃**, **C3'CH₃**).

Die analytischen Daten stimmen mit Literaturdaten überein.^[421]

11.3.2.2 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (**20a**)

3,5-Dimethylphenol (**20a**) (24.4 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq. bzw. 12.2 mg, 0.10 mmol, 1.00 Äq.) wird mit (*R_a,S,S*)-**A** (7.32 mg, 0.01 mmol, 5 mol%) bzw. (*R_a,S,S*)-**H** (8.9 mg, 0.01 mmol, 5 mol%) oder (*S*)-**D** (4.29 mg, 0.01 mmol, 10 mol%) in Toluol (0.5 mL) vorgelegt und bei 70 °C bzw. 50 °C für 44–48 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen einer Mischung *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1) gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe

NMR-spektroskopisch mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard untersucht. Der Enantiomerenüberschuss wird nach Aufreinigung über eine präparative DC (*n*-Hexan:Ethylacetat 4:1) per HPLC (Chiralpak® IA, *n*-Hexan: 2-Propanol 4:1, 1 mL min⁻¹, *t*_{R1}=9.3 min, *t*_{R2}=21.9 min) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11.5 dargestellt.

Tabelle 11.5. Kupplung von 3,5-Dimethylphenol (**20a**)

Eintrag	V Kat.	T [°C]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR-Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	(<i>R</i> _a , <i>S</i> , <i>S</i>)- A	70	44	63	24	26 (<i>S</i>)
2	(<i>R</i> _a , <i>S</i> , <i>S</i>)- H	70	48	76	30	20 (<i>S</i>)
3	(<i>R</i> _a , <i>S</i> , <i>S</i>)- H	50	48	34	22	31 (<i>S</i>)
4^c	(<i>S</i>)- D	70	48	37	59	20 (<i>S</i>)

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® IA, *n*-Hexan:2-Propanol (4:1), 1 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, *t*_{R1}: 9.3 min, *t*_{R2}:21.9 min. Die absolute Konfiguration wurde in Analogie zu der per Kristallographie bestimmten Konfiguration von (*S*)-[1,1':2',1'':2'',1''':4''-Quaterphenyl]-3',4'',5',6''-tetraol per HPLC bestimmt; ^cSubstratkonzentration:0.2 M, V-Kat.: 10 mol%

11.3.2.3 Oxidative Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**)

2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**) (32.4 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.) wird mit (*R*_a,*S*,*S*)-**A** (7.32 mg, 0.01 mmol, 5 mol%) in Toluol (0.5 mL) vorgelegt und bei 70 °C für 18-44 h unter Luft- bzw. Sauerstoffatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen einer Mischung *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1) gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard untersucht. Der Enantiomerenüberschuss wird nach Aufreinigung über eine präparative DC (*n*-Hexan:Ethylacetat 4:1) per HPLC (Chiralpak® AD-3, *n*-Hexan:2-Propanol 98:2, 0.3 mL min⁻¹, *t*_{R1}=10.7 min, *t*_R =12.0 min) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11.6 dargestellt.

Tabelle 11.6. Kupplung von 2-Allyl-3,5-dimethylphenol (**20b**)

Eintrag	Luft/O ₂ [1 atm.]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR-Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	Luft	44	59	6	38
2	O ₂	18	23	10	21

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® AD-3, *n*-Hexan:2-Propanol (98:2), 0.3 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, *t*_{R1}: 10.7 min, *t*_{R2}:12.0 min.

11.3.2.4 Oxidative Kupplung von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**)

3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**) (32.9 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.) wird mit (*R_a,S,S*)-**A** (7.32 mg, 0.01 mmol, 5 mol%) in Toluol (0.5 mL) vorgelegt und bei 50 bzw. 70 °C für 44-48 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen einer Mischung *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1) gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard untersucht. Der Enantiomerenüberschuss wird nach Aufreinigung über eine präparative DC (*n*-Hexan:Ethylacetat 4:1) per HPLC (Chiralpak® IG-3, *n*-Hexan:2-Propanol 98:2, 0.3 mL min⁻¹, *t_{R1}*=12.2 min, *t_{R2}*=13.3 min) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11.7 dargestellt.

Tabelle 11.7. Kupplung von 3,5-Dimethyl-2-propylphenol (**20c**)

Eintrag	T [°C]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR-Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	70	44	53	12	27
2	55	48	23	4	29

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® IG-3, *n*-Hexan:2-Propanol (98:2), 0.3 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, *t_{R1}*: 12.2 min, *t_{R2}*:13.3 min.

11.3.2.5 Oxidative Kupplung von 2,5-Dimethylphenol (**20d**)

2,5-Dimethylphenol (**20d**) (24.4 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.) wird mit (*R_a,S,S*)-**A** (7.32 mg, 0.01 mmol, 5 mol%) in Toluol (0.5 mL) vorgelegt und unter Luftatmosphäre für 45 h bei 70 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen einer Mischung *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1) gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard untersucht. Es wird ein komplexes Produktgemisch erhalten, das bezüglich der Bildung von **21d** nicht auswertbar ist.

11.3.2.6 Oxidative Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**)

2,3,5-Trimethylphenol (**20e**) (27.2 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.) wird mit (*R_a,S,S*)-**A** (7.32 mg, 0.01 mmol, 5 mol%) bzw. (*R_a,S,S*)-**H** (8.9 mg, 0.01 mmol, 5 mol%; 17.8 mg, 0.02 mmol, 10 mol%) oder (*S*)-**D** (8.58 mg, 0.02 mmol, 10 mol%; 17.16 mg, 0.04 mmol, 20 mol%) in Toluol (0.4 mL bzw. 0.5 mL) vorgelegt und bei Raumtemperatur, 50 °C oder 70 °C für 43-48 h bei Luft- bzw. Sauerstoffatmosphäre sowie gegebenenfalls in Gegenwart von Essigsäure (72 µL, 1.25 mmol, 6.3 Äq.) gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung über eine mit Silicagel gefüllte Pasteurpipette filtriert und mit dem 10-fachen Reaktionsvolumen einer Mischung *n*-Hexan:Ethylacetat (1:1) gespült. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und die Probe NMR-spektroskopisch mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard untersucht. Der Enantiomerenüberschuss wird nach Aufreinigung über eine präparative DC (*n*-Hexan:Ethylacetat 4:1) per HPLC (Chiralpak® AD-3, *n*-Hexan: 2-Propanol 98:2, 0.3 mL min⁻¹, *t_{R1}*=11.4 min, *t_{R2}*=12.9 min) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11.8 dargestellt.

Tabelle 11.8. Kupplung von 2,3,5-Trimethylphenol (**20e**)

Eintrag	V Kat.	Additiv [Äq./1 atm.]	T [°C]	t [h]	Umsatz [%] ^a	NMR- Ausbeute [%] ^a	ee [%] ^b
1	(<i>R_a,S,S</i>)- A	Luft	70	45	76	66	0
2	(<i>R_a,S,S</i>)- H	Luft	70	43	72	23	8 (<i>S</i>)
3	(<i>R_a,S,S</i>)- H	Luft	50	48	20	20	20 (<i>S</i>)
4^c	(<i>R_a,S,S</i>)- H	O ₂	RT	48	42	17	49 (<i>S</i>)
5^c	(<i>R_a,S,S</i>)- H	O ₂ , AcOH (6.3)	RT	48	48	11	52 (<i>S</i>)
6^d	(<i>S</i>)- D	O ₂ , AcOH (6.3)	RT	48	35	21	74 (<i>S</i>)

^abestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie mit 1,3,5-Trimethoxybenzol als internen Standard; ^bper HPLC bestimmt: Chiralpak® AD-3, *n*-Hexan:2-Propanol (98:2), 0.3 mL min⁻¹, 25 °C, 280 nm, *t_{R1}*: 11.4 min, *t_{R2}*:12.9 min. Die absolute Konfiguration wurde in Analogie zu der per Kristallographie bestimmten Konfiguration von (*S*)-[1,1':2',1'':2'',1''':3'',4'',5'',6''-tetraol per HPLC bestimmt; ^cV-Kat. 10 mol%; ^dSubstratkonzentration:0.5 M, V-Kat. 20 mol%

12. ANHANG – GEN-, PROTEINSEQUENZEN UND PLASMIDKARTEN

12.1 Iminreduktasen

Im Folgenden sind die codonoptimierten DNA und Proteinsequenzen der verwendeten Iminreduktasen, die über einen N- oder C-terminalen His₆-Tag verfügen und in den Vektor pET-22b(+) kloniert sind, angegeben.

IREDO1: IRED aus *Streptomyces sp. Mg1* (N-terminaler His₆-Tag) 975 bp^[124]

```
ATGCACCATCACCATCATCACAATGCCCCGCAAACCCGACGACGAGCCAAAACCTCCGCCGTTAC
CGTTATCGGTCTGGGTCCGATGGGCCAAGCAATGACCCGTGCCCTGCTGGATAGTGGTCATCCG
GTCACCGTGTGGAACCGTACGGCAGGTCGTGCAGCCGGCGTGGTTGCAGACGGTGCTACCCTG
GCACCGACGCCGGCAGGTGCTGTGGAAGCAAGCGATCTGGTTATTCTGTCTCTGACCGACTATC
GTGCGATGTACGAAGTGTGTTGGGCGGTGCTACCGGTTCTCTGGCAGGTCGTACGCTGGTTAATCT
GAGCTCTGATACCCCGACCGTACGCGTGAAGCAGCTCGTTGGGCAGCAGGTCACGGCGCAGC
TTTTCTGACCGGCGGTGTTATGGTCCCGGCACCGATGGTCGGTACCGAAGCAGCCCATGTGTATT
ACAGTGGCGGTGGCGAAGCAGCTCGTTCCACCTGGCAACCCTGGCACCGCTGGGTACGCCGC
GCTATCTGGGTGAAGATCCGGGCCTGGCGCAGCTGATGTACCAGGCTCAACTGGCGGTGTTCTCT
GACCACGCTGTCAGCCCTGATGCATGCAACCGCAATGCTGGGTACGGCAGGTCGAAAGCCGGT
GAAGCACTGCCGGAAGTGTGAGTCCGCAGATGCTATTGGCGCCATCCTGCGTGCAGGTGAAG
AACATCCGGGTGCAGCACTGGATGCAGGTGAACACCCGGGTGACCTGTCGACCGTTACGATGAT
GGGTGCGACCGCCGATCACATCGTCGAAACCTCAACGTCGCTGGGTCTGGACCTGGCACTGCCG
CTGGCTGTTCTGTCGCATTATCGTCGCGCCATTGAAGATGGTCACGGTGGCGACAACCTGGACCC
GCATTATCGATGGCATCCGTGGCCCGCGTCGTGCAGACCCGGCGTCCGCAGACCGTGTTATCGC
AGCCCCGGCAGGCTAA
```

324 Aminosäuren

```
MHHHHHHNAPQNPTTSQNSAVTVIGLGPMGQAMTRALLDSGHPVTVWNRTAGRAAGVVADGATL
APTPAGAVEASDLVILSLTDYRAMYEVLLGGATGSLAGRTLNLSSDTPDRTREARWAAGHGAFLT
GGVMVPAPMVGTEAAHVYYSGGGEAARSHLATLAPLGTPLYLGEDPGLAQLMYQAQLAVFLTTLAL
MHATAMLGTAGLKAGEALPELLSSADAIGAILRAGEEHPGAALDAGEHPGDLSTVTMMGATADHIVE
TSTSLGLDLALPLAVRAHYRRAIEDGHGGDNWTRIIDGIRGPRRADPASADRVAAPAG
```

IREDO2: IRED aus *Streptomyces fulvissimus DSM 40593* (N-terminaler His₆-Tag) 954 bp^[124]

```
ATGCACCATCACCATCATCACAGTAGTGCTCGTCAACAACAACAGTCCGTCACCGTCATTGGTCT
GGGTCCGATGGGTGCGGCAATGGTCCGCGCTCTGCTGGATCGCCAGTATGCAGTTACCGTCTGG
AACCGTACGCCGTCACGTGCAGGTGATCTGGTGGCACGTGGTGCTGTTCTGGCACCGAGTCCGG
CTGAAGCAGTGGCAGCCAATGAAGCGGTGGTTATTTCCCTGACCGATTATGCAGCTGTCTACGAC
GTGCTGGAAGCAGCAGCACCGGCTCTGCAGGATCGTGCAGTCTGAACTGACCGAGCGCAACGC
CGGAAGAAGCCCGTGCAGGTGCTCGTTGGGCTGCAGGTCGTGGTGCAGTCCAACCTGACCGGCG
GTGTGAATTCACCGCCGTCGGGCATTGGTAAACCGGATAGCTCTACGTTTTATTCTGGCCCCGCT
GAAGTGTTTCGACCGTCATCGTCCGCTGCTGGAAGCACTGACCGGTGCTGCAGATCATCGTGGTG
AAGACCCGGGTACGCAGCACTGCTGTATCAGATCGGCGTTGGCATGTTTTGGACCAGCATGCT
GTCTTACTGGCAAGCGATTGCACTGGCACGTGCTAACGGTCTGACGGCTGCGGATATCCTGCCG
CACGCTGATGACACCGCGAATTCAGTACGCAATTTTTCGCGTTCTACACCGATCGTATCGACGC
CGTTGAACATACGGGCGATGTGACCGCCTGGCCATGGGTATGGCATCGGTTGAACACGTCCTG
CGACCAACGCGGATGCCGGTGTGACACGGCACTGCCGGCAGCAGTCGTGGACCTGTTTCGTG
GCGGCATGGAAGCCGGTCATGCAACCGACAGTTTTCTCCGCGCTGGTTGAAGTATGGGCAAACC
GACCGATCCGGGCACCGATGGCCGTGTTGGTCAAGCGGGTCCGTTCTGCGTTAA
```

317 Aminosäuren

MHHHHHHSSARQQQSVTVIGLGPMPGRAMVAALLDRQYAVTVWNRTPSRAGDLVARGAVLAPSP
 AEVAANEAVVISLTDYAAVYDVLEAAAPALQDRALLNLTSATPEEARAGARWAAGRGAVALTGGVN
 SPPSGIGKPDSSSTFYSGPREVDFDRHRPLLEALTGRADHRGEDPGHAALLYQIGVGMFWTSMLSYWQ
 AIALARANGLTAADILPHADDTANSLTQFFAFYTDRIDAVEHTGDVDRLAMGMASVEHVLRTNADAG
 VDTALPAAVVDLFRRGMEAGHATDSFSALVEVMGKPTDPTDGRVQAGPFLR

IREDO3: IRED aus *Bacillales* (N-terminaler His₆-Tag) 945 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACAAATCTGACCACATCGAAAACATCAACAAATCGGCAAGCCACGG
 CACGGAAAAAGTCGGCAGTCGTCTGTCCGTTACGGTTATCGGCCTGGGCCCCGATGGGTAAAGCT
 ATTGTGGGCGCGTTTCTGGATAAAGGTTATGAAGTCACCGTGTGGAACCGTACGCTGTCGAAAG
 CCGATGACCTGATGGCAAAGGCGCTATGAAAGCGTCAACCGTCTCGGAAGCAATTACGTCAAAT
 GATCTGATCGTGCTGTGCTGACCGACTATCGCGCCATGTACGCAATTTTCGAACCGATCTCCGA
 ACAGCTGACCGGTAAAGTTATCGTCAACCTGAGCTCTGATACGCCGAAAAAGTTCGTGAAGCCT
 CCGAATGGCTGGCCGAACGCAACGCAAGTCAACTGACCGGCGGTGTCCTGGCATCACCGCCGG
 GCATTGGTAATAAAGAAAGTGTTACCCTGTATTCCGGCCCCGCTAAAACGTTTGATGACCATCAG
 AATATCCTGGAAGTCCTGACCAGTACGTCTACAAAGGCGAAGATCCGGGTCTGGCTATGCTGTA
 TTACCAGCTGCAAATTGACGTGTTCTGGACCGCGATGCTGAGCAACCTGCACGCAGTGGCTGTTG
 CGCGTGCCAATGGTATTACCGCTGAACAGCTGCTGGCGTATGTTAGCGATATCCTGTCTACGATG
 CCGAAACTGCTGGAATTTTACGCCCGCGCATTGATGCAGGCACCCATAGCGGTGACGTGGAAA
 AACTGGCTATGGGCTGGCGAGCGTTGAACACGTGGTTCAAACGTCTAACGAAGCCGGTATCGA
 TGCAAGTCTGCCGCGCAGCAGTCTGGACGTGTTCAAACGCGCGTGTCTCGTGGTCATGCGGGT
 GATTCTTTTACCTCGCTGATTGATATGTTCCAGAAACTAA

314 Aminosäuren

MHHHHHHKSDHIENINKSASHGTEKVGSRSLSVTVIGLGPMPGKAIVGAFLDKGYEVTVWNRTLSKAD
 DLMAGKAMKASTVSEAITSNLIVLSLTDYRAMYAIPEISEQLTGKVIIVNLSSDTPKREASEWLA
 ERNAVQLTGGVLASPPGIGNKESVTLYSGPRKTFDDHQNILEVLTSTSYKGEDPGLAMLYQLQIDVF
 WTAMLSNLHAVAVARANGITAEQLLAYVSDILSTMPKLEFYAPRIDAGTHSGDVEKGLAMGLASVEH
 VVQTSNEAGIDASLPAVLDVFKRGVARGHAGDSFTSLIDMFQKH

IREDO4: IRED aus *Kribella flavida* DSM 17836 (N-terminaler His₆-Tag) 909 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACCCGCCGACGGATCGTACGCCGGTCACGCTGATTGGCCTGGGTC
 CGATGGGTCAAGCTATGACGCGCGCCCTGCTGGCTGCGGGTCATCCGGTTACCGTCTGGAACCG
 TACGCCGGCAGTGCAGCCGGCGTGGTTGAGATGGTGCAGTTCTGGCAGCTAGCCCGGTGGA
 AGCTGTTGAAGCGGGCGATCTGGTTATTCTGTCTCTGACCGACTATCAGGCCATGTACGATGTCC
 TGGAACCGGCAACCGGCAGCCTGGCAGGTGCTACGGTCTGAACTCTGAGCTCTGACACCCCGGA
 TCGTACGCGTGCAGCAGCAGATTGGGCTACCGAACATGGCGCGACCTTTCTGACGGGCGGTGTC
 ATGATTCCGGCTCCGATGGTGGGCACCGAAGAAGCGTATGTGTACTTCCGGTCCGGCGGAAG
 TCTTCGAAAAACACCGTACCACGCTGACCGTATCGGTGCACCGCGTTATCTGGGTGAAGATACG
 GGTCTGGCCCAACTGATGTACCAGGCACAACCTGGACGTGTTTCTGACCACGCTGAGTTCCTGAT
 GCATGCAACCGCACTGCTGGGTACGGCCGGTGTGTGAGCTGCAGAATCGATGCCGGAACCTGATT
 GGCATGCTGCGTACCGTTCCGGCTATGCTGGAAGCGGGCGGTGAAAACCCGGGTGCCGATATTG
 ACGCAGATAAACATCCGGGCGACCTGAGTACCATCACGATGATGGGTGCTACCGCGGATCACAT
 TGTCGGCGCTTCAGAAACGGCGGGTATCGACCTGGCACTGCCGCGTGCAGTGCAGGCACACTAC
 CGTCGCGCAATCGAAAACGGCCACGGTGGTGACAACTGGACCCGCATTATTGACGGTATTCGCT
 CCCC GCGTTAA

302 Aminosäuren

MHHHHHHHPPTDRTPVTLIGLGPMPQAMTRALLAAGHPVTVWNRTPARAAGVVADGAVLAASPVEA
 VEAGDLVILSLTDYQAMYDVLEPATGSLAGRTVNLSSDTPDRTRAAADWATEHGATFLTGGVMIPA
 PMVGTEEAYVYSGPAEVFEKHRITTLTVIGAPRYLGEDTGLAQLMYQAQLDVFLTLLSSLMHATALLG
 TAGVSAAESMPELIGMLRTPAMLEAGGENPGADIDADKHPGDLSTITMMGATADHIVGASETAGI
 DLALPRAVQAHYRRAIENGHGGDNWTRIIDGIRSPR

IRED05: IRED aus *Cupriavidus* sp. HPC(L) (N-terminaler His₆-Tag) 909 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACAAAACCGTCGCAGTCATCGGCCTGGGTCAAATGGGCACCACGCT
GGCTCGTCTGTTTCATCGAAGCGGGTATGCAAGTCCGTGTCTGGAACCGTACCCGCTCAAAGCT
GAACCGCTGGCATCCCGTGGTGAATTGTCGCAGCAACGGCAGCTGCAGCAATGGCAGATGCTG
AAGCGGTGGTTATTTGCGTTCATGACTATCGCGCACCACGATATCCTGTCAGACGTTGCAGTC
AAATCGGCTCTGAAAGGTAAACTGCTGCTGCAGCTGACCACGGGCAGCCCGCAAGATGCACGTG
ACATGGCAGAACTGGCAGCTCGTATCGGTGCAGGTTATCTGGATGGTGCAGTGCAGGTGGCTCC
GGAACAGATGGGCCAACCGGATACCACGGTGTGGTTAGCGGCTCTGGTGAAGACCATGCCCTG
GCACGTGAACTGCTGGCAGTGTGGGCGGTAACGTCGTGTACCTGGGTGAAGATGTTGCAGCAG
CAGTACCATGGACCTGGCAACGCTGAGCTATGTGTACGGCGCCTCTATGGGCTTTTTCCAGGGT
GCAGCACTGGCTCAAGCAGAAGGTCTGGATGTCGGCGTGTATGGCGGTATTGTTGAAGCAATGA
GTCCGTCCTTTGGCGCGTTCCTGCGTCACGAGGGTAACGTTATCGATAATGGCGACTACGCGGT
CTCACAGTCGCCGCTGAGCATTCTATCGATGCCACCGGTCGCATTGAACAGGCAATGCGTCAA
AAGGCCTGCGCAGTGAAGTCCCGTCCCTGATCGCACGTCTGCTGCGTGTATGCAGAAGAAGCAGG
CTACGGTAATGAAGAATTTGCTGCTGTGGCGAAAATCCTGCGTGGTGTGCGGAACCGGCCCG
GTGCGTTAA

302 Aminosäuren

MHHHHHHTVAVIGLGMGTTLARLFIEAGMQVRVWNRTRSKAEPLASRGAIVAATAAAAMADAE
AVVICVHDYRATHDILSDVAVKSALKGKLLLQLTTGSPQDARDMAELARIGAGYLDGALQVAPEQM
GQPDTTVLVSGSGEDHALARELLAVLGGNVVYLGEDVAAAATMDLATLSYVYGASMGFFQGAALAQ
AEGLDVGVYGGIVEAMSPSFGAFLRHGNNIDNGDYAVSQSPSISIDATGRIEQAMRQKGLRSELP
SLIARLLRDAEEAGYGNEEFAAVAKILRGAEPAPVR

IRED06: IRED aus *Saccharomonospora xinjiangensis* XJ-54 (N-terminaler His₆-Tag)
918 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACACCACGACGGCTACGGGTACGACGGGTTCCCTGGCGGCTGATC
CGGTACGGTCTGGGTCTGGGCGACATGGGCTCGGCAATCGCTCGTGTCTTTGTTGAACGTGG
CCATCGCACCCAGGTCTGGAACCGTACCGCTCAAATGCCGTCGCTGGTTGAAGCTGGTGCA
TCGGCAGCAGCAACGCCGGATGAAGCTGTGGAAGCGAGTTCGCTTCGTGGTTGTCTGTCTGCTGG
ATAGCGCTGCGGTGGACGAAGTTCTGGGCTCTGTTACCAGCTCTCTGGCCGGTAAAGTCTGGT
GAACCTGACGAGTGGCTCCCCGTCACAGGCACGTAGCAATGAACGCTGGGCCCGTGAACCGGG
TGCAGAATATCTGGATGGCAAATTATGGGTGATCCGCCGGACGTGGGCACCAGCAATGTTTCG
CTGAGCTTTTCTGGTAGTCGTTCCGCCTTCGATGCACATGAACCGATCCTGCGCGAACTGGGCGG
TGTGGCTTATCACGGTGAAGACGCAGGTCTGGCAGCAGTCAATTTCTGGCTCAAGTGGCGATG
GGCTACGAACTGCTGATTGGTTTCTGCATACCCTGAGCGTGGTTCACGCCGAAGGCGTTGAAG
TCGAAGCCTTTGCAGAACGTGTTGCAGTTCGTCGCTGCGTATCCGCCGCTGCTGACGATGATG
GGCAAAGCCATTGGCAGTGGTGAATACGGCCCGGATCTGGGTTCCCTGCGTGTTCAGGCCGCAC
TGATGGATGACCTGATCTCACACCGCGAATCGCTGGGTGTGGAAGCGGTGCGTATGCGCGAAGT
GAAAGAAGTATGGACCAACGCATTGCGGACGGTCACGGCGGCCAAGGCTTCTCATCGCTGTTT
GAACTGCTGACGAAACGCTAA

305 Aminosäuren

MHHHHHHTTTATGTTGSLAADPVTVLGLGDMGSAIARAFVERGHRRTTVWNRTASKRPLVEAGAS
AAATPDEAVEASRFVVVCLLDSAAVDEVLGSVTSSLGKVLVNLTSGPSQARSNERWARERGAEYL
DGKIMGDPDPVGTSNVLSFSGSRSAFDAHEPILRELGGVAYHGEDAGLAAVEFLAQVAMGYELLIG
FLHTLSVVHAEGVEVEFAERVAGSVAAYPLLMMGKAIGSGEYGPLDGLSLRVQAALMDDLISHRE
SLGVEAVRMREVKELMDQRIADGHGGQGFSSLFELLTKR

IRED07: IRED aus *Frankia* sp. QA3 (N-terminaler His₆-Tag) 999 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACACCGACCCGGCACCGGTAATGACCGCCCGCGTGACGTTGACG
GCCCCACACGTTGTTGACGACCGCCCGCCGAATGGCTCCCGCGGTTCGTGCACGTCAGCCGG
ATCGTGGTGAACCGGCACCGCTGGCTGTGCTGGGTCTGGGTGCAATGGGTACCGCACTGGCTC

GTACGTGGCTGGCAGCAGGTCATCCGACCACGGTTTGGAAACCGTACCCGTGCACGTGCAGAACC
 GCTGGTCGCGGAAGGTGCAACCCTGGCAGACACGGCAGCTGAAGCAGTTGCAGCAACCCCGCT
 GATTGTGGTTTGCCTGCTGGATGACGCAAGCGTGGGCGCAGCTCTGGCAGATGCTGAACTGGCC
 GGTCGCGACCTGGTTAATCTGACCACGGGCTCCCCGGCACAAGCCCCTGCACGTGCGGCCTGG
 GCGCACGAACGCGGTGCCCGTTATCTGGATGGCGGTATCATGGCAGTCCCGCCGATGGTGGGC
 AGCTCTCCGACCCGCGGTTATGTCTTTTACAGTGGCTCCCGTGCCTGTTTCGATGACCGTGGTGC
 TACGCTGGCAGTTCCGCTGGACCCGCGTTACGTCCGTGCCGACCCGGGTCTGGCAGCTCTGCAT
 GATGTTGCCCTGCTGAGTGCAATGACCGGCATGTTTGGGGTATTTACACGCTTTTCGACTGAT
 CCGTGCAGCCGGTGTCCCGGCTCGTCCGTTTGCACCGCTGCTGGTTGAATGGCTGCGTGCCATG
 GCAACCTCAGTTTCGCGCAGGCGCAACATCTGGATAGCGGCGACTATACCACGGGTGTGATGT
 CTAACCTGGCGATGCAGTTGCTGGTAATGCGACCCTGCTGCGTACGGCAGCTGAACTGGGCGT
 GGATGCCGAACTGCTGACCCCGTACATGGCGGCCATGCAACGTGCCTGGCTGATGGTCACGCC
 GACGAAGGTGTCACGGGTGTTATCGACCAACTGCTGTCATAA

332 Aminosäuren

MHHHHHHTDPAPRNDPRDVGPHHVDDRPPNGSRGRARQPDRGEPAPLAVLGLGAMGTALAR
 TWLAAGHPPTTVWNRTRARAEPVAEGATLADTAAEVAATPLIVVCLDDASVGAALADAELAGRDL
 VNLTGSPAQARARAAWAHERGARYLDGGIMAVPPMVGSSPTRGYVFYSGSRALFDDRGRTLAVPL
 DPRYVGADPGLAALHDVALLSAMTGMFAGISHAFALIRAAGVPARPFAPLLVEWLRAMATSASATAE
 HLDSGDYTTGVMSNLAMQVAGNATLLRTAAELGVDAELLTPYMAAMQRRLADGHADEGVTGVIDQL
 LS

IRED08: IRED aus *Mycobacterium smegmatis* ATCC 70084 (N-terminaler His₆-Tag)
 897 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACACGACGACGCCGACGGTTACGGTCCTGGGTCTGGGTCCGATGG
 GTCAAGCCCTGTCTCGCGCCCTGCTGGATGCGGGTCACACGGTTACCGTGTGGAACCGTACGGA
 AAGCAAAGCACAGGCTCTGCGTGATCGTGGTGCCTGAGTCTCCGACCCCGGCAGCAGCAATT
 GCTGCATCCGATCTGGCGCTGGTTAATGTGGTTGATCATGACGCGGTTCGATGCCATTCTGACCGC
 AGCAGGTGACGACCCGGCAGGTTCGACGGTTATCGGTCTGAGCTCTGATACCCCGGACCGTGCA
 CGTCGCACGGCTAAACTGGTCGGTAACGTGGGCGGTTCGTTATCTGGATGGCGCCATTATGACCC
 CGATTGACACCATCGGCACGCGCGGTGCATCAATCCTGTTTGGGGCCCGCAGGCCCTGTTTGA
 TGAACATCGTGGTGTCTGACACCCTGGGCCAACTGACGTGGGTGGGTGAAGATCACGGTCGT
 GCTGCAGCCTTTGATATGGCGCTGCTGGACCTGTTTTGGACCAGCGTGGGCGGCTTTGGTCACG
 CACTGATGGTTGCACGTGCTAATGGCATTGAACCGTCAAGACTGATGCCGCATGCGCACGGCATT
 GTGGGTATCCTGTCGCCGATCTTTACGGAAGTGGCCAACGTGTTGAAGATGACCGCCATAGCG
 ATGCGAGCGCCTCTGTTAGTTCCGTGCGGTCATCGGTTTCGTCACCTGATCGCAGCTTCTCGCGAA
 GCAGGCGTCGATGCTGGTCTGCTGGAAGCATTCCGCGGTTACGTGACGCGACCGTGGCGGCC
 GGCCATGGTGACGACGAAATCTCCCGTATTGCCAGCGAAATGACGACCCTGACCCGTGGTTAA

298 Aminosäuren

MHHHHHHTTTPTVTVLGLGPMGQALSRRLLDAGHTVTVWNRTESKAQALRDRGALSAPTPAAAIAA
 SDLALVNVVDHDAVDAILTAAGDAPAGRTVIGLSSDTPDRARRTAKLVGNVGGRYLDGAIMTPIDTI
 GTRGASILFAGPQALFDEHRGVLDTLGQLTWVGEDHGRAAAFDMALLDLFWTSVGGFGHALMVAR
 ANGIPESELMPHAHGIVGILSPIFTEVAQRVEDDRHSDASASVSSVASSVRHLIAASREAGVDAGLLE
 AFRGYVDATVAAGHGDEISRIASEMTTLTRG

IRED09: IRED aus *Verrucospora maris* AB-18-032 (DSM 45365) (N-terminaler His₆-Tag)
 909 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACGCGCGGATTTCGCGTGCTCCGGTACCGTTATCGGCCTGGGCG
 CAATGGGTTTCGGCTCTGGCTCGTGCTTTTCTGGCAGCGGGTACCCGACCACGGTTTGGAAACCG
 TTCACCGGATAAAGCTGATGACCTGGTTGGTCAGGGTGCAGTCCGTGCAGCAACCGTGGCAGAT
 GCAATGTCGGCAGGCAATCTGATTGTCATCTGCGTGCTGGACTATCGTGCCATGCGCGAAATTAT
 CGATAGCACCGGTCACTTCTCCGGCGGACCGTGTGATTGTTAACCTGACCAGTGGTACGCCGGGT
 GATGCTCGTGCAACCGCAGCTTGGGCACAGGAACAAGGCATGGAATACATTGACGGTGCCATCA

TGGCAACCCCGAGTATGATTGGCTCCGAAGAAACGCTGATCTTTTATGGCGGTCCGCAAGAAGT
 GTACGATGCCCATGCAGACACCCTGCGTAGCATTGCTGGCGCGGGCACGTATCTGGGCGAAGAA
 CCGGGTCTGCCGTCTCTGTACGATGTCGCACTGCTGGGTCTGATGTGGACCACGTGGGCAGGTT
 TCATGCACTCAGCGGCCCTGCTGGCCTCGAAAAAGTGCCGGCAGCTGCGTTTCTGCCGTATGC
 CCAGGCATGGTTCGAATACGTTATCTCTCCGGAAGTCCCGAACCTGGCTACCCAAGTTGATACGG
 GCGCGTATCCGGATAATGACAGTACCCTGGGTATGCAGACGGTGGCCATTGAACATCTGGTTGA
 AGCATCCCGTACCCAAGGTGTCGATCCGACGCTGCCGGAATTTCTGCACGCTCGCGCGGAACAG
 GCGATCCGTCGCGGTGATGCGGGTATGGCTTTGGTGCGGTGTGTTGAAGTGTGCGTGCTCCGG
 CTGCCAGTAA

302 Aminosäuren

MHHHHHHAADSRAPVTVIGLGAMGSALARAFLAAGHPTTVWNRSPDKADDLVGQGAVRAATVAD
 AMSAGNLIVICVLDIRAMREIIDSTGHSPADRIVNLTSGTPGDARATAAWAQEQGMEYIDGAIMAT
 PSMIGSEETLIFYGGPQEVYDAHADTLRSIAGAGTYLGEPEGLPSLYDVALLGLMWTTWAGFMHSA
 LLASEKVPAAAFPLPYAQAWFEYVISPEVPNLATQVDTGAYPDNDSTLGMQTVAIHLEASRTQGV
 DPTLPEFLHARAEQAIRRGHAGDGFVAVFEVLRAPAAQ

IRED10: IRED aus *Streptomyces sp. CNB091* (N-terminaler His₆-Tag) 1.014 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACGCCCCGCACAATCAACACCAACACCAAACGCAACACCAAACCC
 GGTCACGGTTATCGGCCTGGGCGCAATGGGCTCGGCACTGGCTGCGGCCTTTATTGCAGCTGGC
 CATCCGACCACGGTGTGGAACCGTACCGCATCACGTGCAGCACCGCTGGTTGCCCGTGGTGCAG
 CTCACCCGAAACGGTGTGTAAGCAGTGCAGCATCGCCGCTGGTTATCACCTGCCTGACCAC
 GTATGAAGATACGGTGAAGCACTGGAACCGGCACTGCAGCACTGAAAGGTCGTGACCTGGTT
 ACCCTGAACAGTGGCTCCCCGGCAGGTGCACGTGCGCGAGCTGAATGGGCTCGTGGTGCATGGT
 CACGTTACCTGGGCGGTGCAATAAAAATGTGCCGCCGGCTGTTGGCGCGGAAGATAACCCTGCT
 GTATTACAGTGGTGTGACCCGTTTTTACGGACCACGAACCGGTGCTGCGTGTCTGGGCGGT
 GATACCGTGTATCTGGGTGCCGATCCGGACCTGGCAGCACTGTACGAAATGGCAGTCGGCGGTA
 CCCTGCTGCCGGCCCTGGTGGGCTTTTTCCAGGGTGCAGCTGCACTGCGTGCACGCGGTCTGGA
 AGCCGCAAGCATGGTGCCTTCTCTGAACAGTGGTGCAAATGATTGCCTCTGTCCTGCCGGTGC
 TGGCACGCGAAATCGATTAGGCGACTATTCGGAACCGCTGAGCTCTGTGAATGTTTTTGTGCC
 GGTGCTGCGCATGATGCAGAACTGGGCAAAGAAGCTGGTCTGGACGTGCAATGGCATAAACCGT
 TCCACGAACTGCTGGAACCGCGCCGTGAAAGCAGGCTACGGTACCCAAAGTATTGCCGCACTGAC
 GGAAATCCTGATGGAACCGCGTGCAGTGCAGTGCACCCCGCCGACGTCCCCGAGTGGCACCAG
 CCCGCGTGTGCGTATCACCGGCCCGCCGCGTTCAGGCACCCCGTCTGTAA

331 Aminosäuren

MHHHHHHAPHNQHQHQTPVTVIGLGAMGSALAAAFIAAGHPTTVWNRASRAAPLVARGAA
 HPETVAEVAASPLVITCLTTYEDTVEALEPAAAALKGRDLVTLNSGSPAGARRAEWARGHGARYL
 GGAIKNVPPAVGAEDTLTYSGDATVFTDHEPVLRLVGGDTVYLGADPDLAALYEMAVGGTLLPALV
 GFFQGAALRARGLEAASMVRFSEQWLQMIASVLPVLAREIDSGDYSEPLSSVNVFVAGAAHDAEL
 GKEAGLDVEWHKPFHELLERAVKAGYGTQSI AALTEILMEPRRDALTPPTSPSGTSPRRASSPARPRS
 GTPS

IRED11: IRED aus *Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338* (N-terminaler His₆-Tag) 921 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACACAACGGTTTTGCTGCCCGGTTACGGTGTGGCCTGGGTCC
 GATGGGTTACGCACTGGCTGAAGCATTCTGCGGCGGGTCAACCGACCACGGTGTGGAACCGT
 AGTGCTCATAAAGCCGATCCGCTGGTTGCGGAAGGTGCAGTGCAGTGCAGCAACCGCAGCTGAAG
 CACTGGCGGCCTCAGATCTGGCAGTGGTTTTGCGTTGCTGACTATGCAGCTATGCATGCAGCACT
 GGACCACTGCGGTACCGCACTGAGCGGTAAAGTTCTGGTCAACCTGTGTTCCGGTACGCCGCGAG
 GAAGCTCGTGAAGCACTGACCTGGGCAACGGCACATGGTGCAGGTTATCTGGATGGCGCCATTA
 TGGTGGCGGTTGAAGTATCGGTACCCCGAGCTCTGTCGTGTTTTACAGCGGCGCACGTGAACC
 GTTCGATGCACACCGTAATACGCTGGACGCACTGGGCGGTGTCCCGGTTACCTGGGCGGTGAT
 GCCGGTCTGGCAGTGTGATAACACCGCACTGCTGGGTCTGATGTGGGCAACGGTGAATGGTT

TTCTGCACGCAGCTGCGCTGGTTGAAAGCGGCGGTGTGGGCGTTGCTGATTTTGCGGAAACCGC
CGTTGACTGGTTCCTGCCGTCTGTCACGGGTGAAATTCTGCGTGCGGAAGCCGCACGTATCGAT
CGCGAAGAATTCCCGGGTGACGGCGGTACCCTGGCAATGTGTCTGACGGCCATTGAACACATCG
TTCGTACCAGCCGCGATGCCGGTATTAGTGACGAAGTGCCGTCCCAACTGAAAGCACTGGGTGA
TCGTGCTGTTGCTGCAGTTATGGTGATGAAAACACTACATGAGCCTGATTAAGTGCTGCGTGTT
CGTCCGCTGCTACCCACCGTTAA

306 Aminosäuren

MHHHHHHHNGFAAPVTVVGLGPMGYALAEFLAAGHPTTVWNRSAHKADPLVAEGAVRAATAAEA
LAASDLAVVCVADYAAMHAALDHCGTALSGKVLVNLCSGTPQEAREALTWATAHGAGYLDGAIMVP
VEVIGTPSSVVFYSGAREPFDAHRNTLDALGGVPRYLGGDAGLAVLHNTALLGLMWATVNGFLHAAA
LVESGGVGVADFAETAVDWFLPSVTGEILRAEAARIDREEFPGDGGTLAMCLTAIEHIVRTSRDAGIS
DEVPSQLKALGDRAVAAGYGDENYMSLIKVLRVPSAATHR

IRED12: IRED aus *Nocardia cyriacigeorgica* GUH-2 (N-terminaler His₆-Tag) 888 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACACGAACAACGCAACGCCGGTCTCAATCCTGGGCCTGGGTCTGAT
GGGTCAAGCTCTGGCAGCGCCTTCTGAAAGCCGGTCAATCCGACCACGGTCTGGAACCGTACC
CCGGGCAAAGCGGATCAGCTGATGGCGGAAGGTGCCCAAGTTGCACCGACCGCGGCCGAAGCT
ATTGATGCGAGCTCTGACGGTGTCTGCGTTAGTGACTATCCGGCGATGTACGAACTGCTGGA
TGCTTCCGACCTGGCAGGTACCACGCTGCTGAATCTGACCAGTGGTATTCCGCACAGGCTCGT
CAAGCAGCTCGTTGGGCAGAACAGCGTGGTGACATTATCTGGACGGTGCCATTATGGCAATCC
CGCAAGCAATCGGCACCGATGACGCGGTGATTCTGATCAGCGGTGCACAGGCAGATGCAGACGC
TCATCGTCCGACGCTGGAAGCACTGGGTACCCTGACGTATCTGGGCGCAGATCACGGTCTGGCT
AGCCTGTACGACGTTGCTGGTCTGGCGATGATGTGGTCTGTCCTGAACGCATGGCTGCAGGGTA
CCGCACTGCTGCGTACGGCCGGTGTGGATGCAGCAACCTTTCACCGTTCGCACAGCAAATGGC
AGCTGGCGTTGCAGGTTGGCTGCCGGGCCACGCACAGGAAATTGATGCCGGTAGCTTTGCAACC
GAAGTCGCTTCTCTGGATACCCATGTGCGCACGATGGACCACCTGATTGAAGAATGTGAAGCGG
CCGGCATCAATGCGGAACTGCCGCTCTGATTAATCAATGGCCGATCGCTCGCTGGCAGCAGG
TCATGGTGCGGCGTCATACAGCGTTCTGATTGAAGAATTTGCGAAACCGGCTTAA

295 Aminosäuren

MHHHHHHTNNATPVSILGLGLMGQALARAFKAGHPTTVWNRTPGKADQLMAEGAQVAPTAEEAI
DASLTVICVSDYPAMYELLDASDLAGTLLNLTSGDSAQARQAARWAEQRGAHYLDGAIMAIPQAI
GTDDAVILISGAQADADAHRPTLEALGTLTYLGADHGLASLYDVAGLMMWSVLNAWLQGTALLRT
AGVDAATFAPFAQQMAAGVAGWLPGHAQEIDAGSFATEVASLDTHVRTMDHLIEECEAAGINAELP
RLIKSMADRSLAAGHGAASYSVLIEEFAKPA

IRED13: IRED aus *Actinomadura rifamycini* (N-terminaler His₆-Tag) 897 bp^[124]

ATGCACCATCACCATCATCACATGAAAGCGCCGGTTACGGTTGTGGGCCTGGGTCCGATGGGCA
AAGCAATGGCTGAAACGTTCTGAAAAACGGTCACCCGACGACGGTGTGGAACCGTACCGCATC
AAAAGCAGCACCGCTGGTTGAACAGGGTGCAACGCTGGCAGCTACCCCGGATGACGCACTGGCA
GCATCAGGCCTGGTGGTTATTTGCAAACCGATTATAAAGCAATGTACGATTCACTGGACGGTGC
TGAAATGAAAGGCCGCGTCTGGTGAATCTGAGCTCTGGTTCCCGGACGAACTGCGTCGCGCA
GCTGAATGGGCAGCCGGTAAAGGTGCCGAACTGCTGACGGGCGGTGTTATGGTGCCGCCGCCG
GGTATTGGTCAGCCGGGTGCATATATCATGTACAGCGGCCCGGAAGCTCTGCTGGATCGTCATC
GCGAAACCCTGCGTGTCTGGGTGATACCACGTATGTGGGTGCCGACGTTGGCCTGTCTAACCT
GTATTACCAGGCACAACACTGTACCTGTTTTGGAGTACCCTGACGGCGTACCTGCACTCCATTGCCA
TGCTGCAGAGTGCAGGCGTTTTCCGCTGAACAATTTTCGTCCTCGCGACCGAAACGGTCACCAG
CCTGGGCGTGGATGGTCCGATGGGCTTCTGCGCATCCTGGCCGAAGAAGCAGACGCTGGTCAT
AGCCCGGGCGGTGAAAATTCTATGCTGATGATGGCGGTTGGCGCCGATCACATGGTCAAGCAG
CTGAAGCGGCCGGTATCGATACGATGGGTCCGCGTGCCTGACCTGTTTTGGCGCACCGT
GAATGCCGGTCATGGTGCCGATGGTCTGGGTTCTGTGATTGAAGTCGTTCCGAAAGGTGCCTAA

298 Aminosäuren

MHHHHHMKAPVTVVGLGPMGKAMAETFLKNGHPTTVWNRRTASKAAPLVEQGATLAATPDDALAA
 SGLVVISQTDYKAMYDSLGAEMKGRVLVNLSSGSPDELRRAAEWAAGKGAELLTGGVMVPPPGIG
 QPGAYIMYSGPEALLDRHRETLRVLGDTTYVGADVGLSNLYYQAQLYLFWSTLTAYLHSIAMLQSAG
 VSAEQFRPFATETVTSLGVDGPMGFLRILAEEDAGHSPGGENSMLMMAVGADHMVEAAEAAGIDT
 MGPRALRDLFWRTVNAGHGADGLGSVIEVVRKGA

IRED14: IRED aus *Mycobacterium vaccae* (N-terminaler His₆-Tag) 876 bp^[124]

ATGCATCACCATCACCATCACACCACGGTCGCGGTGATTGGCCTGGGTCCGATGGGTTCGTGCAC
 TGGCCGACACTGCTGTCAGCAGGCTATCGTGTTACCGTCTGGAACCGCACGGAAAGTAAAGC
 TGCGCAGCTGCTGTCCTGTGGTGCACATTGGGCTCCGACCCCGGGTAAAGCGGTTGCAGCAGGT
 GATCTGACGCTGATTAATGTGGTTGATCATGACGCGGTGGATGCCGTCGTTTCATGCTGCCGCGG
 ATGCCGTTGCGGGCCGTCTGCTGGTTGGCCTGAGCTCTGATACCCCGACCGTGCACGTAGCAC
 CGCTGAACTGTTGTCGACGCTGGCGGTGCTATCTGGATGGCGCGATCATGACCCCGACGGAC
 GTGGTTGGTACCGCAGAAGCTTCTGTTCTGTATGCCGGCCCGTATGACCTGTTTGGCGGTCATCG
 TGAAGTGTTCGAAACCCTGGGTCAAGCCACCTGGCTGGGTGAAGACCCGGGTCGTGCCGACGCA
 TACGATATGGCACTGCTGGACGTGTTTTGGACCGCTGCGGGCGGTTTCTGCACGCACTGGGTA
 CCGCCCGTGCACACGGTATTTACCGGTTGAACTGCTGCCGCACGCGGTCGGTATTGCCGCAAT
 CCTGCCGCGGTGTTTTCGGAAGTTGCAGAACGTGTGGAAGCTGGCCGCCATGATGACGCAAC
 GCTACCGTTAGTTCGCTGCCGCATCACTGAGCCACCTGGTGGCCACCAGCGAAGCCTCTCGTG
 TTGATGCGGGTGCCTGAAAGCAATGAAACGCTACGCGGATGACCTGGTGGCAGCTGGCCATGG
 TGATGCGGAAATCTCCCGCCTGGTGGAAAGCCATGGGCGTTTAA

291 Aminosäuren

MHHHHHHTTVAVIGLPMGRALAAALLSAGYRVTVWNRRTESKAAQLLSCGAHWAPTPGKAVAAGD
 LTLINVVDHDAVDVAVHAAADAVAGRLLVGLSSDTPDRARSTAEVVAAGGRYLDGAIMPTDVG
 TAEASVLYAGPYDLFGGHRELFFETLGQATWLGEDPGRAAAYDMALLDVFWTAAGGFLHALGTARAH
 GISPVELLPHAVGIAAILPPVFSEVAERVEAGRHHDDANATVSSAAASLSHLVATSEASRVDAAGALKAM
 KRYADDLVAAGHGDAEISRLVEAMGV

IRED15: IRED aus *Mycobacterium sp. JLS* (N-terminaler His₆-Tag) 870 bp^[124]

ATGCATCACCATCACCATCACATCTCCGTGCTGGGTGAGGGTCCGATGGGTCAAGCTCTGACCAA
 TGCCCTGCTGCATGCGGGTTGCCGTACCACCGTTTGAATCGTACCGCCGCACGTGCCGATGGT
 GTCCGTGCACGCGGTGCTCGTTGGGCCGATAGCCCGGCCGATGCAATTGCAGCTGCGGATGTTA
 CCCTGGTCAACGTGGTTGACCAGGCAGTGCTGGATGACGTCGTGACCGCGGCAGGTCATGCAGT
 TGCTGGTCGTGTTATTGTTGGTCTGGCAAGCGATACCCCGACACCGCACGCGATACCGCTATG
 CTGTTGAAAACTGGGCGGTGCTTATCTGGATGGTGCATTATGACGCCGACCGACACGATCG
 GCTCAGCGCATGCCTCGATTCTGTTTAGCGGTCCGCGCGATCTGTACGACACCCACCGTGAAGT
 GTTCGATGTTCTGGCCACCACCGTGGCTGGGTGATGACCCGGGTCGTGCTGCCGCTTTGAT
 ATGGCCCTGCTGGACCTGTTCTGGACAGTGTCTCCGGCGTGTGTCATGCAGTGAACGTTGCAC
 GTGCTAATGGTATCTCTCCGATGGAAGTGTGCGCATGCCAGGGTATTGTCCGATCCTGCCG
 CCGATCGTGGATGAACTGCTGGAACGTATTGATGCCGACCGCCATGATGACTCCCGTGCCCAAG
 TTGCATCTGTCGACGCTAGTGTGCGCCACCTGATTGCCGCATCACGCGCAGTCGGCGTGGATGC
 CGGTGCACTGGAAGCTTTTCGCGGCTATGTGGATAACCGCGGTTGCAGCTGGCTACGGTGGCGAT
 GAAATTTACGATACGGTCAAACGATGAGCTCTTAA

289 Aminosäuren

MHHHHHHISVLGQGPMPQALTNALLHAGCRRTTVWNRRTAARADGVRARGARWADSPADAIAAADV
 TLVNVVDQAVLDDVVTAAGHAVAGRVIVGLASDTPDTARDTAMLVEKLGGRYLDGAIMPTDTIGS
 AHASILFSGPRDLYDTHREVFVLDLTTTWLGDDPGRAAFDMALLDLFWTSVSGVLHAVNVARANG
 ISPMELLPHAQGIVGILPPIVDELLERIDADRHHDSRAQVASVAASVRHLIAASRAVGVDAAGALEAFR
 GYVDTAVAAGYGADEISRIGQTMSS

IRED16: IRED aus *Cellulosimicrobium cellulans* (N-terminaler His₆-Tag) 957 bp^[124]

ATGCATCACCATCACCATCACAGTGATCAGCCGGCCCGTCCGAGCGAACGTGCAGTTACCGTCCT
GGGTCTGGGTGCAATGGGTTCGTCAGTGGCCGAGCAGCTGTGGCGGCCGGTTCATCCGACCAC
GGTTTGAACCGTACCCCGGGTCGTGCCGGTGCCCTGGTGGGCGCAGGTGCTCGTGAAGCCAC
GTCAGTTCGCGATGCAGTACCCGCTAGCCCGCTGGTTGTGGCAGTGTCTGGACCATGCTTCT
GTTACCAAACGCTGGACCCGGTTGCCGAAGCACTGGCAGGTTCGACCCCTGGTGAATCTGGTTA
CCACGACCCCGGAAGAAAGCCGTGAACTGGCAGCTTGGGCGGGCTCTCATGGTGTACCTATCT
GGACGGCGGTATTATGGCAGTGGCCGGTATGATCGGCGGTCCGGGTGCGGAAGTTCTGTACAG
CGTTCTCGCGCCGCATTTGATGATGCCCGTCCGGTCTGGATACCTGGGCGGGTAGCGCCTGG
TTTGGTGAAGACCCGGGTCTGGCCCCGCTGTATGATCTGGGCTGCTGGCAGGCATGTACGCGA
TGTTTGCCGGCTTTTTCCATGGTGTGCCATGGTGGGTACCGCTGGTGTGAGTGCCAGCGATTTT
GCACGTCGCGCAGTCCGTGGATTGCCGCCATGACCCGAGAAGTGGCTGGCTATGCGGATGTGA
TCGACCGTCCGATTACGGCGGTCCGGGTGAGCAAAGTCTGGAATTTTCAGACCTGTCCGATAT
GGTTCGTGCTAGCGCCGAAGCGGGTCTGGCCACCGATGTTGTGGCAGCTGTGCAGGCCCTGGT
CGTCGCCAAGTCGACGCAGGCCACGGTGTGATGGCTTCGCACGTGCTGTTGAAAGCATTCCGC
AACCGTCTGGTACGGCCGACCGTACCCCGGATCTGACGGCGACCCGGCGGGTGCAGCGCTAA

318 Aminosäuren

MHHHHHSDQPAPSERAVTVLGLGAMGRALAAAABAAGHPTTVWNRTTPGRAGALVGAGAREATS
VRDAVTASPLVVAVLLDHASVHQLDPAEALAGRTLVLNLTTPPEESRELAAWAGSHGVTYLDGGI
MAVPGMIGGPGAELYSGSRAAFDDARPVLDTWGGSWFGEDPGLAPLYDLGLLAGMYAMFAGFF
HGVAMVGTAGVSASFARRAAPWIAAMTAELAGYADVIDRRDYGGPGQQSLEFSDLSDMVRASAE
AGLATDVVAAVQALVRRQVDAGHGADGFARAVESIREPSGTADRTPLDTATAGGAR

IRED17: IRED aus *Streptomyces tsukubensis* (N-terminaler His₆-Tag) 952 bp^[124]

ATGCATCACCATCACCATCACTCAGCGACCACGAACACCACGTCGGCAGATGGCGTGGCTGGTC
CGGGCGGTCCGGGCGGTTCGTCGCCCGGTACCGTGTGGGTCTGGGTGAGATGGGTGCCGCAA
TTGCCGGTGCAGTGTGGCAGTGGTTCATCCGTTACCGTCTGGAACCGCACGCCGGGTAAAGC
CGCGCCGCTGGTTGAACAAGGCGCAGTTCTGGCTGGTAGCGTCGCAGAAGCTGTGGCAGCTAGT
CCGCTGGTGTGTCGGTGGTTCTGGATTATCCGGCGCTGTACGGCATTCTGGACCCGGAACCGG
ACGCGCTGAAAGGTGTCGCGCTGGTCAATCTGACCACCGGTACCCCGGAACAGGCCGGTGAAG
CCGCGGAATGGGCAGCTCGTCATGGTGTGATTATCTGGATGGTGAATTATGACCACGCCGCC
GGGCGTCCGGTACCCGTGAAGTATGTTTCTGTACAGTGGCGATCGTGCCGTGTTTGTATGCACAT
CATGCCGCACTGGATGTTCTGGGTGAACCGCTGCATCTGGGCACCGAACCCGGGTCTGGCAGCTC
TGTATGACGTGAATCTGCTGGGTCTGATGTGGGCCACCATGGCAGGTTGGCTGCATGGTACCGC
AGTTGTGGGTGCTGAAGGTACCCGTGCAGTTGATTTTACGGAAGTCGCGATTCCGTGGCTGGGT
ACCGTTAACAATTTTCATCCGTCGCTATGCGGCCAGGTTGATGAAGGCGTCTACCCGGGTGATGA
CGCCACGGTGGACGTTTTCAGATCGCAGTTGTCGAACATCAACTGCACGCAGCTGAAGCGCGTGGC
GTGATAACCGCCTGCCGGAAGTCTGAAAACCGTATGCTGGAAGCGAATGCCAAAGGCCATG
GTCAAGACAGCTTTGGCTCTGTGGTTGAAGTTCTGCGTAAAGGTGCCCGTCCGCTAA

316 Aminosäuren

MHHHHHSATTNTTSADGVAGPGGPPVTVLGLGQMGAAGIAGALLAAGHPVTVWNRTTPGKAA
PLVEQAVLAGSVAEAVAASPLVLSVLDYPALYGILDPEPDALKGRALVNLTGTPEQAGEAAEWAA
RHGVDYLDGAIMTTPPGVGTREVMFLYSGDRAVFDHHAALDVLGEPLHLGTEPLAALYDVNLLGL
MWATMAGWLHGTAVVGAEGTRAVDFTEVAIRWLGTVNNFIRRYAAQVDEGVYPGDDATVDVQIAV
VEHQLHAAEARGVDNRLPELLKTLMLEANAKGHGQDSFGSVVEVLRKGARR

IRED18: IRED aus *Paenibacillus ehimensis* (N-terminaler His₆-Tag) 945 bp^[124]

ATGCATCACCATCACCATCACAAACATAGCTCTCCGTCAGAAAAAGAAACCCACGAACAGGCCGG
TGCCCGGGTTCGTAACCCGGTACCGGTGATTGGCCTGGGTATGATGGGCTCCGCCCTGGCAGAT
GCTTTTCTGAACGCGGGTTCATCGTACCACGGTGTGGAATCGCAGCGCCGATAAAGCGGATGCC
TGGTGGCGAAGGGTGCAGTTCGTGCAGCTTCTGCCGAGAAGCAGTTTTCAGCTTCGCCGCTGAT
TGTGTTTTGCGTTCTGGATTATGAAGCCGTTTCATGAAATTCTGGGTCCGGCAGGCCGGTCTGCTGG

CTGGTCGTACCCTGGTGAACCTGACGAATGGCAAACCGGAACAGGCGCGTAAAGCAGCTAAATG
 GGCGAACGAACAAGGTGCCAATTATCTGGATGGCGGTATTATGGCAGTCCCGCAGATGATCGCA
 GGCCCGGAAGCTTTTCTGCTGTATAGCGGTTCTCCGGAAGCCTTCGAAACCTATCGTCGCGAACT
 GGATGTTCTGGGTGCCGGTAAATACCTGGGCGAAGATGCAGGTCTGGCGGCCCTGTATGACCTG
 GCACTGCTGACCACGGCTTACGGCCTGATTGGCGGCTTTTTCCATGCAGTGGCTCTGGTTGGTAC
 CGAAAAAGTGAAGCAGCTGCGTTTACGGTTCTGGTCATTCCGTGGCTGCAGGCGATGATCGCC
 AGTCTGCCGTCCAGGCGCAAGCCATTGATGCGAACAATCACACCACGGACGTTAGTTCCTGAA
 CATTATAAAGTCGGCTTCGTGAACCTGATCGAAGCCTCACAGGAACAAGGTGTCAGCACCGAAC
 TGGTGGCGCCGATCCAGGCACTGGTTAATCGTGCAGTCGCTGATGGTTATGGTGCCGATGGTCT
 GACCCGCTGGTGGAACTGCTGAAAAACCGCAACTGCTGTAA

314 Aminosäuren

MHHHHHKKHSSPSEKETHEQAGAAGRTPVTVIGLGMMSALADAFLNAGHRRTTVWNRSDKADA
 LVAKGAVRAASAAEAVSASPLIVVCVLDYEAVHEILGPAGGRLAGRTLVLNLNGKPEQARKAAKWAN
 EQGANYLDGGIMAVPQMIAGPEAFLLYSGSPEAFETYRRELDVLGAGKYLGEDAGLAALYDLALLTTA
 YGLIGGFFHAVALVGTEKVEAAFTVLVIPWLQAMIASLPSQAQIDANNHTTVDVSSLNINKVGFVNL
 IEASQEQGVSTELVAPIQALVNRAVADGYGADGLTRLVELLKKPQLL

IRED19: IRED aus *Streptomyces sp. CNH287* (N-terminaler His₆-Tag) 945 bp^[124]

ATGCATCACCATCACCATCACAGCACCACGCGTTCTGCGGCCGCAACCGGTCCGGCAACCGCTC
 CGAGCCCGGCCGTCGGCGTGCTGGGCCTGGGTCTGATGGGTGAGGCACTGGCTGCCGCCCTGG
 TTGGCGCAGGTCATCCGACCACGGTCTGGAACCGCTCTCCGGATAAAGCAGCTGACCTGGTTGC
 ACAAGGTGCGACCCTGGCCGCATCAGCCCATGATGCAGTGACCACGTCGGAAGTGGTTATTGTT
 TCGTGCAGGAATATGATGCAGTGCAGTGCCTGCTGGTTGAACCGCTGGCCGAAGCACTGCGTGGTC
 GTGTGCTGGTTAATCTGACCTCTGGTAGCTCTGCACAGGCTCGCGAATTTGCAGCTTGGGCGGC
 CGAACATGGCGTTGATTACCTGGACGGTGCAGTGCATGGCAATTCGCCGGTATTGGTACCCCG
 CACGCATTGTTCTGTATGCGGGCGGTCTCCGGTCTACGAAGCAGCTGAACCGGTTCTGCGTG
 TCCTGGCCCCGGCAGGTACCACGCATCTGGGCACGGATCACGGTCTGAGTTCCTGTATGATGT
 GGCCCTGCTGGGTCTGATGTGGGTGCCCTGAACAGCTTTCTGCACGGTCCGCACTGCTGGGT
 ACCGTCGGTGTGCCGGCAGCTGATTTTGCACCGTTCGTAACCAAGTGGCTGAATAGTGTACGG
 GCTTCGTGTCCGCGTATGCGGCCAAATTGATGCCGGTGAATACCCGGCGCATGACGCCAAAT
 CGAAACCCACCTGGCGACGATGCATCACCTGCGTCATGAAAGTGAAGCCGGCGGTGTTGATACC
 GCACTGCCGCTGTTTGTGAGGCACTGGCTGACCAGGCGATTGCCCAAGGCCACGGCGGTTTCAT
 CGTACGCAGCTGTGATCGAACAATTCCGCGCGGGTACCGCGGCCAGCTAA

314 Aminosäuren

MHHHHHSTTRSAAATGPATAPSPAVGVGLGLMGQALAAALVAGHPPTTVWNRSPDKAADLVAQ
 GATLAASAHDVTTSEVVIVCVTEYDAVRALVEPLAEALRGRVLVNLTSGSSAQAREFAAWAAEHGV
 DYLDGALMAIPPVIGTPHAFVLYAGGRPVEAAEPVLRVLAAGTTHLGTDLGLSSLYDVALLGLMWG
 ALNSFLHGAALLGTVGVPAADFAPFANQWLNSVTGFVSAYAAQIDAGEYPAHDAKIETHLATMHHLR
 HESEAGGVDALPLFVQALADQAIAQGHGSSYAAVIEQFRAGTAAS

IRED20: IRED aus *Streptomyces viridochromogenes* (N-terminaler His₆-Tag) 942 bp^[124]

ATGCATCACCACCACCACCACAATCGCCAGTTTACCAGCACCCGCCTGAACGCAATGACGGATAA
 TGCCTCAAGCCCGACCCCGGTTACCCTGCTGGGCACCGGTGCGATGGGCAGCGCACTGGCTCGT
 GCCTGGCTGGCCGCAAGTTCATCCGGTTACCGTTTGAATCGTACGCCGGCACGTGCAGAAGCTC
 TGGCCGGTGAAGGTGCAGCTGTTGCCGCAAGCGCCGATGCAGCTGTTGCCGCAATCGCCTGGT
 GGTTGCCTGCCTGCTGGATGACGATTCTGGGTGAAGCACTGGCAACCGCTGACCTGGGCGGT
 CGTGATCTGGTGAACCTGACCACCGGTACGCCGGTTCAGGGTTCGTCGCCGTCAGCTTGGGCG
 GAAGCCCGCGGTGCCCGTTTTGTTGATGGCGGTATTATGGCAGTCCCGCCGATGATCGGCAGTC
 CGGATTCGGTGCCTTTGTGTTCTATAGCGGCTCTGCGGCCCTGTTTGAAGAACACCGTGTATGT
 CTGGCCGTTCCGGCAGGTACCGCTTATGTCGGCGCAGATGCTGGTTTTCGAGCTCTGCATGACG
 TTGCGCTGCTGTCCGCCATGTACGGCATGTTTGGCGGTATTGCGCACGCCTTCGCACTGATTCGT
 CGCGAAGACATCGCACCGACCGATTTTGCGCCGCTGCTGGTGTCTTGGCTGACCGCTATGGCCC

CGGCCGCACTGGAATCAGCCGGTAAACTGGAATCGGGTACTATAACCCGCGATGTCGTGTCAA
 TCTGGCAATGCAGGTTGCTGGCATCCCACCTTCTGCGTACGGCCGACGAACAAGGTGTCCGC
 CCGGATCTGGTGCCTCCGTACCTGGACCTGATGCGTCCCGTCTGGAATGTGGTCCGCACGCTG
 ACGAAGATACGACGGGTGTTATTGACCTGCTGACGGCAAGCTAA

313 Aminosäuren

MHHHHHHNRQFTSTRLNAMTDNASSPTVTLTGAMGSALARAWLAAGHPVTVWNRTPARAEAL
 AGEAAVAASADAAVAANRLVVAACLLDDDSLGEALATADLGGDLVNLTTGTPGQGRARAAWAEA
 RGARFVDGGIMAVPPMIGSPDSGAFVYSGSAALFEEHRDVLAVPAGTAYVGADAGFAALHVDVALLS
 AMYGMFGGIAHAFALIRREDIAPTDFAPLLVSWLTAMAPAALESAGKLESVDYTRDVVSNLAMQVAG
 IPTFLRTADEQVVRPDLVRPYLDMRRRLECGPHADEDTTGVIDLLTAS

IRED21: IRED aus *Bacillus cereus* (N-terminaler His₆-Tag) 972 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACAAAGAAAACGATCAGTCTGAAAAAGAACAGAACATCAGTCAAGT
 TTCCGATACGGACGTCTCGATGATGGAAAACCCGAATCGTAGCCCGGTGACCGTTATTGGTCTGG
 GTCCGATGGGTGAGGCACTGGCAGGCACGTTTCTGATGAACGGCCATCCGACCACGCTGTGGAA
 TCGCACCCGCGAAAAAGCCGATTATCTGGTTAGCCAAGGTGCCATTCTGAGCAACTCTGTGATCG
 CGGCCGTTAGTGCATCCCCGCTGGTCATTATCTGCGTGTGGATTACAATATTGTTCTGTAAGTC
 CTGGCTCCGGCCGGTGTGACCCTGAAAGGTCGCACGCTGGTTAACCTGACCCCGCATAGCCCGA
 AACGTGCACGCGAAATGGCTACCTGGGCAGCTCAGCATGGCGTGCATTATCTGGACGGTGCAT
 TATGACCCCGACGCCGACCATTGGTACGCCGGCCGAGCGTTCTGACTCTGGTCCGGAAAGT
 ATTTTCAAAGCACACCAACCGACCCTGGCTTCCCTGGGCGGTACCACGTCATATCTGGGTGCAGA
 CCCGGGTCTGTCAGCTGCGTACGATGTGGCGCTGCTGGACCTGTTTTGGACGTCAATGTCGGGC
 TATGCCCATGCACTGGCTCTGGCGACCGCCGAAAATATCCCGCCAAAGAATTCGCAGTGTACG
 CTCAGGGCATTATCGGTATTCTGCCGGATATCATGGCGTATCTGGCCAACGAAGTTGATTCTGGC
 CACTACCCGGGTGACAAAAGTAATATTATCAGCGCATCTGCTGGCATGGAACATATTATCCACGC
 CGCACAGCATCACGGTCTGGACGTCTCAGTGTGCTGGCTGCGATGGCGGTGACCCAGCAAGCC
 ATTAACGAAGGCTATGGTACGGATGGTTTTTCCCGCCTGACCGAACTGCTGAAAAACCGAGTGC
 GTAA

323 Aminosäuren

MHHHHHHKNDQSEKEQNISQVSDTDVSMENPNRSPVTVIGLGPMPGQALAGTFLMNGHPTTLW
 NRTAEKADYLVSQGAILSNSVIAAVSASPLVVICVLDYNIVREVLAPAGDALKGRTLVNLADSPKRAR
 EMATWAAQHGVLDYLDGAIMTPTPTIGTPAASVLYSGPESIFKAHQPTLASLGGTTSYLGADPGRAAA
 YDVALLDLFWTSMGYAHALALATAENIPAKEFAVYAQGIIGILPDIMAYLANEVDSGHYPGDKSNIIS
 ASAGMEHIIHAAQHHLVDVSVLSAAMAVTQQAINEGYGTGDFSRLELLKKPSA

IRED22: IRED aus *Paenibacillus sp. HGF5* (N-terminaler His₆-Tag) 957 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACAAACCGAGTAAACAGCTGCAAGATCAGATGCTGGAAACCGAAAC
 GCGTCAAACCCCGCAAACGGCAGCCAGACCGCTGTGACGGTTCTGGGTCTGGGTCCGATGGG
 TCAGGCACTGGCAGGTGCTTTTATTCGTAGCGGCCATTCTACCACGGTGTGGAATCGCACCCAGC
 GCGAAAGCCGATTCTCTGGTGAACAGGGTGCGGTTCTGGCCCCGAGCGTTAAAGACGCGAGTCC
 TGGCTTCTCAGCTGATTATCATTTCGTCCTGAACTATGATGCGGTCAATGCCGTGCTGAGCTCT
 GAAACCAGCGCGCTGAAAGGTAAAACCCTGATTAACCTGACGGCGGATGTTCCGGAACGTGCC
 GCGAAATGGCAGAATGGGCTTCCATAATGGCATCGATTACATTGACGGTGCATTATGACCCCCG
 ATCCCGACGATTGGCGAACCGAGTGCCGTTATCCTGTATTCCGGTCCGGAAGATGTCTACCGTAG
 TCGCCAATCCATTCTGGCATCACTGGGCGGTACCGCGTCTTTCTGGGTGAAGACCCGGTCTG
 GCCGCGCGTATGATGTCGCCCTGCTGGACGTGTTCTGGACGGCAATGTCTGGCTATGTGCATG
 CACTGGCTATTGCCCGTGCAGAAAACATCGCTGCGGAAGATATTGCGCCGTATGCCATAATATC
 ATTCGTATCATGCCGACATTATGACCTATATGGCACACGATGCTGACCCGCGCGTGTACCCGGG
 TGATAGTTCAAACCTGATTTCAAATGTTACGTCGATGGAACATATCATTACGCGCGAGAACATCA
 CGGCATCGATTATCGGTTCTGATCGCTGCGAAAGCAATTGCTCAGAAAGCGATCCATGCCGGCC
 ACGGTGAAGACGGTTTTAGTCGCTGATTGAATAACAACCTGACCAGCCCCGTAA

318 Aminosäuren

MHHHHHHKPSKQLQDQMLETETRQTPANGSQTAVTVLGLGPMGQALAGAFIRSGHSTTVWNRRTSA
 KADSLVKQGAVLAPSVKDAVLASQLIICVLNYDAVNAVLSSETSALKGKTLINLTADVPERAREMAE
 WAFHNGIDYIDGAIMTPIPTIGEPSAVILYSGPEDVYRSRQSILASLGGTASFLGEDPGRAAAYDVALL
 DVFWTAMSGYVHALAIARAENIAAEDIAPYAHNIIRIMPDIMTYMAHDADRGVYPGDSSNLISNVTS
 MEHIIHAAEHHGIDSSVLIAAKAIAQKAIHAGHGEDGFSRLIEYNLTSP

IRED23: IRED aus *Chitinophaga sp. JGI 0001002-D04* (N-terminaler His₆-Tag) 909 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACACGGCAACCACGAAACATCCGGCTATTAGCGTCATTGGTCTGGG
 TTCTATGGGTGCCGACTGGCTCGTGCCCTGGTTAGCAAAGGCTTTCAGGTTACCGTCTGGAACC
 GCAATATGGAAAAGCCCAACCGCTGATTGCGGCTGATGCCATTGCCGCGGCAGATGCAAAAGC
 TGCCATTGAAGCAAGTCCGGTCATCGTGGTTTGCCTGTCCGAATATAAAGTTACCCGTAATAATC
 TGGAAGCAGATGGTGTGGCCCCGGCACTGAAAGGCCGTACGCTGGTCCAGCTGTCTACCGGTAC
 GCCGAAAGATGCGCGCGAACTGGACACCTGGGCGAAACAGCAAGGTGCCTGCTGTCTGAACGG
 CGATATTATGGCGTGGCCGAAACAGATGGGTACCGACGCCGCAACGATCAGCGTCTCTGGCGAT
 GCCGACGTGTATCGTCAGCAAGAAGATGTTCTGCGCGCTCTGGCGGGCAATGTCGTGTATCTGG
 GTGCAGAACCGGGTGTCTCAGGCGGTCTGTTTCATGCCGTTCTGGCATATCTGGCTGGCTCGTG
 GATCGGTTTCTGTACGGCGCGCTGGTTGCGGAAAAGAAGGTCTGCGTCCGGAAGACCTGGGC
 ATTCTGCTGGAACAGATTAGTCCGATCCTGTCCGCCAACTGAAACACATGGGTGAAGTGATCCA
 ACACGGCCGCTTCTCAGATCCGGAATCGACCGTGAAAACCGGGTGAAGACCTGCTGCTGCTG
 GTTCAGCAAGCAAAGAAGCTGGCATTAACTCAGAAGTCCGGAATTTGCTGCGAAACTGTTCAA
 ACAGGCGATGGATGCCGGCTACGGTCAAGAAGAACACGCCGACGATCAAAGTTCTGCGCCAG
 ACCGCGTAA

302 Aminosäuren

MHHHHHHTATTKHPAISVIGLGSMAALARALVSKGFQVTVWNRNMEKAQPLIAADAIAAADAKAA
 IEASPVIVVCVSEYKVRKILEADGVAPALKGRTLVLQSTGTPKDAELDTWAKQQGACCLNGDIMA
 WPKQMGTDAAISVSGDADVRRQEDVLRALAGNVVYLGAEPGASGGLFHAVLAYLAGSWIGFCH
 GALVAEKEGLRPEDLGILLEQISPILSAELKHMGEVIQHGRFSDPESTVKTTGEDLLLLLVQQA
 KEAGINSELPEFAAKLQKAMDAGYGQEEHAAVIVKVLQTA

IRED24: IRED aus *Glycomyces tenuis* (N-terminaler His₆-Tag) 897 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACAGTGCGAAAAAATCCGTGACCGTTCTGGGTCTGGGCCCGATGG
 GTCGTGCTACCGTCAAAATTCTGCTGGAAGCGGGCCTGGATGTCACCGTGTGGAACCGCACGCC
 GGGTAAAGCAGAAGCTCTGGCGAACTGGGTGCCGCACCGGCAGCTACCGTGGCAGACGCAAT
 TGCGGCCAGTGATACGGTTCTGCTGTCCCTGATCCATTATGACGCTATGTACGGTGTCTGGAAC
 AGGGCCCGGCAGATCTGACCGGTAACGATTGTGAACCTGAGCTCTGACTCACCGGCTAATAC
 CGCGAAAGGTGCAGCTTGGGTTCTGGATCGTGGCGGTGCTTTCTGACCGGCGCCTATATGACG
 CAGTCCGATGACATCCGTATCCGGCCTCACACCTGTACGTGTCGGGTCCGGCAGAACTGCATG
 ATGAACTGCGTCCGCTGCTGGAACCTGCTGTGTGCCAATGTTTATCTGGGTCCGGATTACGGCCTG
 GCCAGCTGTATTACCAAGCCGGCCTGGCAATGTTTACGCGTATCTGATCAGCCTGCAGCAAGC
 TCTGGCGATGATTGAACGTGGCGGTGGCGATATCGACACCTTCTGGAACCTGTCTAAAGATGAC
 GCAGATAGCCAGCGCGACTTTTCTGTGTACTTTGCCAGGCCGCAAACAAGGTGGCTGGGGTG
 ATCTGGCCTCACTGAAAATGATGCATGCCGGCGCACAAACACGTTATTGATACCTCGGAAGACGCC
 GGTACGGATGCAGAACTGACCAAAACGGTCCAGGACTATTACCAACGTGCGCTGGATGCCACCG
 AACGTACCGGTGCCATTGTTCCGGTCTATCAGATTATCCGTGGTGATAACGGCAATGAATAA

298 Aminosäuren

MHHHHHHSAKKSVTVLGLGPMGRATVKILLEAGLDVTVWNRTPGKAEALAEALGAAPAATVADAIAA
 SDTVLLSLIHYDAMYGVLEQGPADLTGKTIVNLSSDPANTAKGAAWVLD RGRFLT GAYMTQSD
 IRHPASHLYVSGPAELHDELRLLELLCANVYLPDYGLAQLYYQAGLAMFHAYLISLQALAMIERG
 GGDIDTFLELSKDDADSQRDFSVYFAQAQKQGGWGLASLKM MHAGA QHVIDTSEDAGTDAELTK
 TVQDYYQRALDATERTGAIVPVYQIIRGDNGNE

IRED25: IRED aus *Nocardia brasiliensis* ATCC 700358 (N-terminaler His₆-Tag) 900 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACAGCGAACAGCATAACCCCGCGTAGTGTTCCTGGTTGGCCTGGG
 TCCGATGGGCCAAAGTATGGTCCGTGCACTGCTGGACGCTGGTGTGCGAAGTGACCGTTTGAAC
 CGCAGCACGGATAAAGTCGATGCCATGGTGGAACTGGGTGCCGTTCTGTCGGAAACCGTTGCCG
 CCGCACTGGCTGCGAATGATGTCACCGTGCTGAGCCTGACGCATTATGCCGCAATGTACTCTGTG
 CTGGAACAGGCTGCGGACCAACTGGCCGGTAAAGTTATTGTCAACCTGAGCTCTGATAGTCCGG
 AAAAAGCGCGTAAGGGTGCAGGAATGGGTCCGTTCCCATGGTGCAGAAATTTCTGAGCGGCGGTGT
 GATGTCTGCAGGCGACAATATTGCACATCCGGCTAGTTATATCTTTTACTCCGGTCCGCGTGAAG
 TTTTCGATGCACACGCTGAACTGCTGCGCCCGCTGTCACCGCAGGAATATCTGGGCACCGATGA
 CGGTCTGTGCGAGGTGTATTACCAAGCGCTGCTGACCATTTTTTCATCCGTGGCTGCTGGCCTTCG
 ATCAGGCGACGGCCATGATCGAACGTTGAGGCAACTCGATTGCGCAATTTATCCCGTTCCGCGTT
 CGCAGCGCCGAGCTTATCCGTAATTTATGGAAGAATTCTCTGTGGCGAACAGAAATGGCGGTTG
 GGCGACCCTGGCCTCTCTGAAAATGATGGATGCAGGCGCTCAACATATTATCGACGCAAGTGAA
 GAAGTGGGTGTTGATGCGACCTTCTCCACACGGCGCAGGCCTATTGGCGTAAAGCGGTGGCGG
 CCTCAGAAGAAAAGGCGAAGCAGTTTCGACCTACGCTCTGATGCGCGGTGCAGATGCTTAA

299 Aminosäuren

MHHHHHSEQHTPRSVSVVGLGPMGQSMVRALLDAGVEVTVWNRSTDKVDAMVELGAVRAETVA
 AALAANDVTVLSLTHYAAMYSVLEQAADQLAGKIVIVNLSSDSPEKARKGAEWVRSHGAFLSGGVM
 SAGDNIAHPASYIFYSYGPREFDAHAELLRPLSPQEYLGTDGSLQVYYQALLTIFHPWLLAFDQATA
 MIERSGNSIAQFIPFAVRSAAAYPYFMEEFVANQNGGWATLASLKMMDAGAQHIIDASEEVGVDA
 TFSHTAQAYWRKAVAASEEKGEAVSTYALMRGADA

IRED26: IRED aus *Nitratireductor pacificus* *pht-3B* (N-terminaler His₆-Tag) 936 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACACCACGACCATTTGCGTGATTGGTGCGGGTCGTATGGGCAGCTC
 TCTGGCTCGTACCCTGCTGAATGCGGGTTCGTCCGACCTGGGTTTGAATCGTACCGCCGCACGT
 TGTGCGCCGCTGGTTCGCTCTGGGTGCCAAAACCGCAAATGCTCTGGCCGATGCGGTGCAGGCCA
 GCGAACTGATTCTGATCAATGTTATTGATCATGACGCCTCTGCAGCTCTGCTGCGCCAGGAAGCG
 GTTAGCTCCGCCCTGAGCGGCCGTACGGTCATCCAATGACCGGTTCTGCCCGTCTGGCAC
 GCGAAGAAGCGCTGTGGGTTGAAGCTCAGGGTGCCCGTTATCTGGATGGTGCCATTATGGCAAC
 CCCGGACTTTATTGGTTCGTCCGGAAGCCGCACTGCTGTACAGTGGTTCCCTGGCAAGCTTCGAA
 GCTCATCGCGATATTCTGCTGACCCTGGGCGGTGTTTCCGACATGTTGGTGATGTTCCGGGTCA
 GGCAAGCGCTCTGGATACCGCACTGCTGACCCAGATGTGGGGCGGTCTGTTTGGCGCACTGCAG
 GGATGGCGGTGCGCCGATGCGAAGGCCTGAGCCTGGATGTGTTTCCGCGACCAACTGTCTGCGT
 TCAAACCGGTGGTTGATGCAGCTCTGTATGATACGATCGACCGTACCGCCGCACGTCGCTTTGCT
 GGTGATGCCGAAACGCTGGCGTCACTGGGTGCCCATCACTCGGCATTACCCACCTGCTGGAAG
 CATGCGAAGATCAGGGCCTGGACCAAGGTCTGCCGCGCGAAATGGCGCGTCTGTTTCGCGAAG
 GCCTGAGTCGTAACGGTCCGGAAGCCGATTTTGCATCCCTGGCTCCGCTGCTGCGCGGCGGTCC
 GTCAAGCGAAGCAGGTGAAGTGCCTCCGACGCGTAA

311 Aminosäuren

MHHHHHHTTICVIGAGRMGSSLARTLLNAGRPTWVWNRTAARCAPLVALGAKTANALADAVQAS
 ELILINVIDHDASAALLRQEAVSSALSGRTVIQLTSGSARLAREEALWVEAQGARYLDGAIMATPDFI
 GRPEAALLYSGSLASFEAHRDILLTLGGRSAHVGDVPGQASALDALLTQMWGGLFGALQGMVAAD
 AEGLSLDVFRDQLSAFKPVVDAALYDTIDRTAARRFAGDAETLASLGAHHSAFTHLLEACEDQGLDQ
 GLPREMARLRFREGLSRNGPEADFAASLAPLLRGGPSSEAGEVVRPDA

IRED27: IRED aus *Mesorhizobium* sp. *L48C026A00* (N-terminaler His₆-Tag) 933 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACGCAAGCAACGTGTGCGTTCTGGGTGCTGGCCGATGGGCAGCT
 CTATTGCCCGTACCCTGCTGGATCGCGGTTATCCGACCTGGGTCTGGAATCGTACCGCCGCAAAA
 TGTGAACCGCTGGCAGCTCTGGGTGCGAAAGTCGCCAGTTCGTCGAGGAAGGCATTCAAGCGG
 CCGAAGTGGTTATTATCAACGTTCTGGATTACGCAGCTTACAGACGCCCTGCTGAAACGTGATGGT
 ATCGCATCGGCTCTGGCGGGCAAAGCGGTCTGCAACTGACCTCAGGCTCGCCGCGTCTGGCAC
 GTGAAGAAGCTCGCTGGGTGGAAGCACATGGTGTGGCTATCTGGATGGTGCGATTATGGCCAC

CCCGGACTTTATCGGCAAACCGGAAACGGCCATGCTGTATAGCGGTTCTCGTGATGTTTACGAAA
AACACAAACCGCTGCTGTTTGCCCTGGGCGGTGGCACCAATTATGTTGGTGAACCTGCCGGGTCA
GGCATCCGCACTGGATACCGCACTGCTGACCCAGATGTGGGGTGGCCTGTTTGGTGAACCTGCAA
GGCATGGCTGTGGCGGAAGCCGAAGGCCTGGATCTGGAAACGTTTCGTAACCATCTGAGTGCCT
TCAAACCGGTTGTGACGCCTCCCTGTTTGTCTGGTTGACCGCACCAATGCGCGTGCCTTCGCC
GGTGTGACGCAACGCTGGCTAGCCTGGGCGCACATTATTCTGCTTTCCAGCACCTGCTGGAAG
CGTGCGAAGAACGTGGTCTGGATGCGGCCATGCCGCGTGCAATGGACATGATCTTTCCGCAAGC
GCTGAGTCTGGGCTCCATGGAAGATGATCTGGCCAGCCTGGCACTGCTGTTCCGTAATGGTTCA
CCGCGTCAGAGCCGTGAACCGGCAAATGCTTAA

310 Aminosäuren

MHHHHHHASNVCLGAGRMGSSIARTLLDRGYPTVWVNRRTAAKCEPLAALGAKVASSVQEGIQAA
EVVIIINVLDYAASDALLKRDGIASALAGKAVVQLTSGSPRLAREEARWVEAHGAGYLDGAIMATPDFI
GKPETAMLYSGSRDVEYKHKPLLFALGGGTNYVGEPLGQASALDALLTQMWWGLFGALQGMVAE
AEGLDLETFRNHLSAFKPVVDASLFDLVDRTNARRFAGDDATLASLGAHYSAFQHLLLEACEERGLDA
AMPRAMDMIFRQALSLSMEDDLASLALLFRNGSPRQSREPANA

IRED28: IRED aus *Aeromonas veronii* AER39 (N-terminaler His₆-Tag) 897 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACCGTCATCTGAGCGTGATTGGCCTGGGTGCCATGGGCTCTGCACT
GGCTACCACGCTGCTGAAAGCGGGTCATCCGGTGACCGTTTGAATCGCAGCGCCGCAAAGCG
GCTCCGCTGCAGGCACTGGGTGCTACCCTGGCCCCGAGTGTGGGTGCCGCAATTGCAGCTTCCG
ATATCACGCTGGTCTGCGTGGACAATTATGCAGTTTCACTGCTGCTGGATGAAGCCAGCGAT
GCCGTTGCAGGTAACCTGCTGGTGCAGCTGAGTACCGGCTCCCCGCAAGGTGCACGTGCTCTGG
AAAGCTGGTCTCATGCCCGTGCGGCACGCTACCTGGATGGTGAATTCTGTGCTTTCCGGCTCAG
ATCGGCACCTCAGACGCATCGATTATCTGTAGCGGTGCTTCTGCGGCCTTCAGCGAAGCCGAAC
CGGTCTGTCTCTGCTGGCCCCGACCCTGGATCATGTTGCCGAAGCGGTTGGTGCAGCTGCCGC
ACAGGACTGTGCGGTTGCAGCTTATTTTGGCGCGGTCTGCTGGGTGCACTGCACGGTGTCTCTG
ATTTGCGAAGCGGAAGGTCTGCCGGTTGCGAAAGTCTGTGCCAGTTTGTGAACTGTCCCCGAT
CCTGGGCGGTGATGTGGCCCATCTGGGCAAACCTGGCAAGTGGTATTTCGACCACCCGTAC
GCCTCTTGAAAACCTGGAGCGCCGCAATTAGCCGCTGGCTGGTGCATGCCACCGATGCAGGTA
TCGACAGCCGTTTTCCGCGCTTCGAGCTGACCTGTTTGAAGAAGCGTTGCGCAGGGCTTCGG
TCAGCAAGAAGTTTTCCGCGCTGATCAAAGTCTGCGTGCCCCGCAACGGTGCGGCCCAATAA

298 Aminosäuren

MHHHHHRHLSVIGLGAMGSALATLLKAGHPVTWVNRSAKAAPLQALGATLAPSVGAAIAASDI
TLVCDVNYAVSQLLLDEASDAVAGKLLVQLSTGSPQGARALESWHARGARYLDGAILCFPAQIGTS
DASIICSGASAAFSEAEVLSLLAPTLDHVAEAVGAAAAQDCAVAAYFAGLLGALHGALICEAELP
VAKVCAQFSELSPIGGDVAHLGKTLASGDFDHPYASLKTWSAAISRLAGHATDAGIDSRFPRFAAD
LFEEGVAQGFQQEVSALIKVLRARNGAAQ

IRED29: IRED aus *Aeromonas veronii* AER397 (N-terminaler His₆-Tag) 897 bp^[129]

ATGCATCACCATCACCATCACCGTCATCTGTCAGTGATTGGCCTGGGTGCAATGGGCTCGGCACT
GGCTACCACGCTGCTGAAAGCGGGTCATCCGGTGACCGTTTGAATCGCAGCGCCGCAAAGCG
GCTCCGCTGCAGGCACTGGGTGCTACCCTGGCCCCGAGCGTGGGTGCGGCCATTGCAGCTTCTG
ATATCAACCTGGTCTGCGTGGACAATTATGCCGTTAGTCAGCAACTGCTGGATGAAGCGAGCGAT
GCCGTGGCAGGTAACCTGCTGGTTCAGCTGAGTACCGGCTCCCCGCAAGGTGCACGTGCTCTGG
AAAGCTGGTCTCATGCGCGTGCGGCACGTTACCTGGATGGTGAATTCTGTGCTTTCCGGATCAG
ATCGGCACCTCAGACGCGTCGATTATCTGTAGCGGTGCCTCTGCGGCCTTCTCCGATGCAGAACC
GGTCTGCGTCTGCTGGCCCCGACCCTGGACCATGTTGCCGAAGCGGTTGGTGCAGCTGCCGCA
CAGGATTGTGAGTTGCAGCTTATTTTGTGCGGTCTGCTGGGTGCACTGCACGGTGTCTGAT
TTGCGAAGCGGAAGGTCTGCCGATCGCGAAAAGTTTGTGCCAATTTAGTGAACCTGTCCCCGATTC
TGGGCGGTGATGTCGCTCATCTGGGCAAACCTGGCGAGCGGTGATTCGACCACCCGTACGC
CTCTCTGAAAACCTGGTGCAGCGGCCATTAGCCGCTGGCTGGTGCATGCCACCGATGCAGGTATC

GACAGTCGTTTTCCGCGCTTCGCAGCTGACCTGTTTGAAGAAGGCGTTGCGCAGGGCCTGGGTC
AGCAAGAAGTCTCTGCCCTGATCAAAGTGCTGCGTGCACGCAATGGTGCGGCCCTGTAA

298 Aminosäuren

MHHHHHRHLSVIGLGAMGSALATTLKAGHPVTVWNRSAAKAAPLQALGATLAPSVGAAIAASDI
NLVCVDNYAVSQQLLDEASDAVAGKLLVQLSTGSPQGARALESWHARGARYLDGAILCFPDQIGT
SDASIICSGASAAFSDAEPVLRLLAPTLDHVAEAVGAAAAQDCAVAAFYAGGLLGALHGALICEAEG
PIAKVCAQFSELSPILGDDVAHLGKTLASGDFDHPYASLKTWSAAISRLAGHATDAGIDSRFPRFAA
DLFEEGVAQGLGQQEVSALIKVLRARNGAAL

IRED30: IRED aus *Streptomyces aurantiacus* (C-terminaler His₆-Tag) 936 bp^[121]

ATGTCACAGTCCGTCACTGTCATCGGTCTCGGCCCATGGGGCAGGCGATGGCCGCCGCGTATC
TGGACCGCGGCTACGAGGTCACGCTCTGGAACCGCACCGCGTCCCGGGCGGACGCCCTGGTGG
CGCGCGGCGCCAAGCTGGCCGCCACCCCGAACAGGCGCTGTCGGCCAATGAGTTGGTGATAC
TGAGCCTGATCGACTACGACGCGATGTACGGCGTGCTCGAGGGCGCGGAGGAGGCGGTGCGCG
GCCGGGTGCTGGTGAACCTCAGCTCGGACACCCCGGAGAAGGCCCGCGCGGGCCGCGCGCCGG
GTGGCGGAGCTGGGCGGCACGCACCTACCGGCGGCGTCTCTCGCCGCCCGGGGATCGGC
AGCCCGGACATGTCGACGTTCTACAGCGGCCCGCGCGCCGCGTACGACCAGCACCGCGCGGCC
CTCGAAGTGATACCGGCAAGACGGACTACCGGGCGGAGACCGGGCCTGGCCGCCCTCATG
TACCAGCTCAACATGGTCGTCTTCTGGCCGGCGATGCTCTCGTACTGGCAGGCGGTGGCCCTGG
CCGACGCGCACGGGCTCACGGCGGCGGACATCGCCCCGTACGCTCTCCGAGAACTTCGCGGGGA
TGGGGCAGTTCATCGACTTCTACGCGGCCCGCATCGACGCCGGCAACCACGCCGGCGACGTCGA
CCGCCTCTCGATGGGCGTCGCCAGCATGGAACACGTCGTCCACACGAACGCGGACTCGGGCGT
GGACACGGCGTTCGCGGTGCGGTCTCGACGCGTTCACCGGGCGCGGACGCCGGTTTCGG
CGCGGACAGCTTCTCCAGCGTGATCAAAGTGAAGAAGCAGCCCGAGGATCCGAATTCGAGC
TCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

311 Aminosäuren

MSQSVTVIGLGMGQAMAAAYLDRGYEVTLWNRTASRADALVARGAKLAATPEQALSANELVILSLI
DYDAMYGVLEGAEAEVAGRVLVNLSSDTPEKARAAARRVAELGGTHLTGGVLSPPPGIGSPDMSTFY
SGPRAAYDQHRAALEVITGKTDYRGEDPGLAALMYQLNMVFWPAMLSYWQAVLADAHGLTAADI
APYVSENFAGMGQFIDFYAARIDAGNHAGDVDRLSMGVASMEHVHTNADSGVDTAFPRAVLDAF
HRGADAGFGADSFSSVIKLMKKQPEDPNSSSVDKLAAALEHHHHHH

IRED31: IRED aus *Streptomyces sp. GF3546* (C-terminaler His₆-Tag) 939 bp^[121]

ATGTCCAAACAGTCTGTTACCGTGATTGGGCTTGGTCCAATGGGCCAAGCGATGGTTAACACGTT
CCTGGATAACGGCCACGAAGTGACTGTCTGGAATCGCACCGCTTCAAAGGCAGAAGCACTGGTT
GCTCGTGGTGCAGTCTGGCCCCCTACCGTAGAAGATGCCCTGAGTGCCAACGAAGTATTGTGC
TGCTCTGACCGATTATGACGCTGTCTATGCGATTTTGAACCCGTTACTGGCAGCTTATCGGGC
AAAGTGATTGCCAATCTCAGCAGTGACACACCGGATAAAGCACGCGAAGCCGCGAAATGGGCGG
CCAAACACGGTGCCAAACATCTGACGGGTGGTGTACAGGTGCCTCCACCGCTGATTGGGAAACC
GGAATCATCGACCTATTACTCCGGCCCGAAAGACGCTCTTTGATGCGCATGAGGACACCCTCAAAG
TCCTGACTAATGCCGACTACCGTGGTGAGGATGCGGGTCTGGCGGCAATGTACTATCAGGCGCA
GATGACCATCTTTTGGACAACCATGTTGTCGTAACCAAACTGGCTTTAGGCCAAGCGAATG
GCGTGAGCGCGAAGGAGTTACTCCCGTATGCAACGATGATGACGTCATGATGCCCCACTTTCTG
GAACTTTATGCGCAGCATGTCGACTCTGCCGATTATCCGGGAGATGTGGATCGCCTTGCAATGGG
AGCGGCAAGTGTTGATCACGTAAGTGCATACCCATCAGGATGCGGGCGTAAGCACGGTGTTACCA
GCGGCTGTTGCAGAGATCTTCAAAGCCGGGATGGAGAAGGGCTTTGCCGAAAACAGCTTCAGCT
CACTGATCGAAGTGTTGAAGAAACCGGCTGTGGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCT
TGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

312 Aminosäuren

MSKQSVTVIGLGMGQAMVNTFLDNGHEVTWNRTASKAEALVARGAVLAPTVEDALSANELIVLS
LTDYDAVYAIPEVTVGSLSGKVIANLSSDTPDKAREAAKWAAKHGAKHLTGGVQVPPPLIGKPESSTY

YSGPKDVFDHEDTLKVLTNADYRGEDAGLAAMYYQAQMTIFWTTMLSYYQTLALGQANGVSAKEL
 LPYATMMTSMMPHFLELYAQHVDSADYPGDVDRLAMGAASVDHVLHTHQDAGVSTVLPAAVAEIFK
 AGMEKGFAENSFSSLIEVLKKPAVGDPNSSSVDKLAALAEHHHHHH

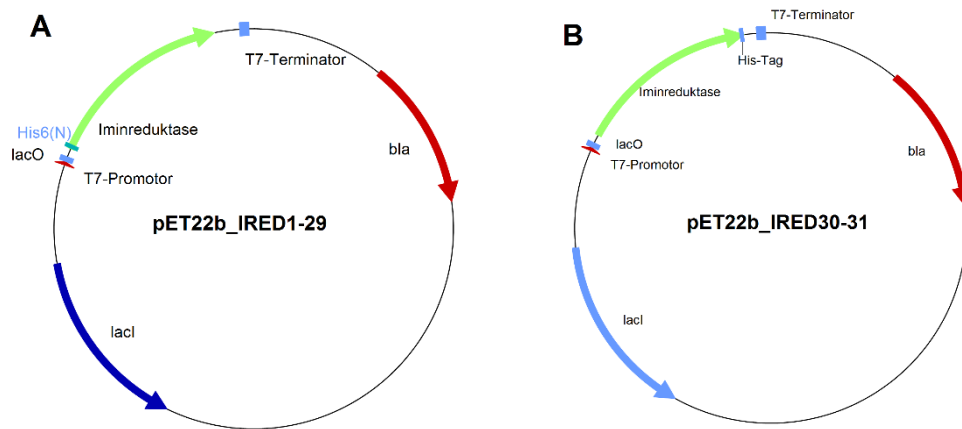


Abbildung 12.1. Plasmidkarten mit Genen der IREDs **A** IRED1-IRED29 mit N-terminalem His₆-Tag^[124,129] **B** IRED30 und IRED31 mit C-terminalem His₆-Tag^[121]

12.2 Glucose-Dehydrogenase

Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus subtilis* 168 (ATCC 23857) mit Hitzemutationen E170K und Q252L (786 bp)^[158] auf pACYCDuet-1

ATGTATCCGGATTTAAAAGGAAAAGTCGTCGCTATTACAGGAGCTGCTTCAGGGCTCGGAAAGGC
 GATGGCCATTCGCTTCGGCAAGGAGCAGGCAAAAGTGGTTATCAACTATTATAGTAATAACAAG
 ATCCGAACGAGGTAAAAGAAGAGGTCATCAAGGCGGGCGGTGAAGCTGTTGTCGTCCAAGGAGA
 TGTCACGAAAGAGGAAGATGTAATAAATATCGTGCAAACGGCAATTAAGGAGTTCGGCACACTCG
 ATATTATGATTAATAATGCCGGTCTTGAAAATCCTGTGCCATCTCACGAAATGCCGCTCAAGGATT
 GGGATAAAGTCATCGGCACGAACCTTAACGGGTGCCTTTTTAGGAAGCCGTGAAGCGATTAATAT
 TTCGTAGAAAACGATATCAAGGGAAATGTCATTAACATGTCCAGTGTGCACGAAGTGATTCCTTG
 GCCGTTATTTGTCCACTATGCGGCAAGTAAAGGCGGGATAAAGCTGATGACAAAGACATTAGCGT
 TGGAATACGCGCCGAAGGGCATTTCGCGTCAATAATATTGGGCCAGGTGCGATCAACACGCCAAT
 CAATGCTGAAAAATTTCGCTGACCCTAACAGAAAGCTGATGTAGAAAGCATGATTCCAATGGGAT
 ATATCGGCGAACC GGAGGAGATCGCCG CAGTAGCAGCCTGGCTTGCTTCGAAGGAAGCCAGCTA
 CGTCACAGGCATCACGTTATTCGCGGACGGCGGTATGACTACTATCCTTCATTCCAGGCAGGCC
 GCGGTTAA

261 Aminosäuren; 28,074 kDa

MYPDLKGVVAITGAASGLGKAMAIRFGKEQAKVVINYYSNKQDPNEVKEEVKAGGEAVVVQGDV
 TKEEDVKNIVQTAIKEFGTLDIMINNAGLENPVPSHEMPLKDWKVIKTNLTGAFSGSREAIKYFVEN
 DIKGNVINMSSVHEVIPWPLFVHYAASKGGIKLMTKTLALEYAPKIRVNNIGPGAINTPINAIEKFADP
 KQKADVESMIPMGYIGEPPEIAAVAAWLASKEASYVTGITLFADGGMTLYPSFQAGRG

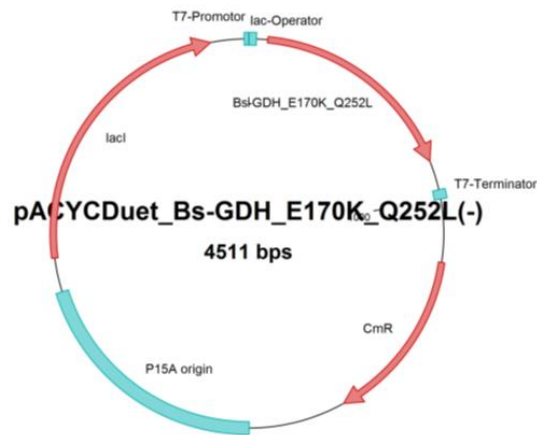


Abbildung 12.2. Plasmidkarte mit Gen der hitzestabilen GDH

12.3 Ganzzell-Katalysatoren

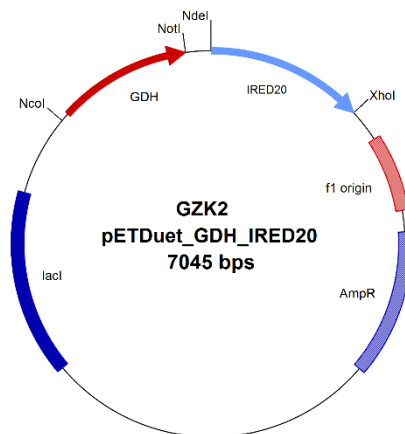


Abbildung 12.3. Plasmidkarte des GZK2 (pETDuet_GDH_IRED20)

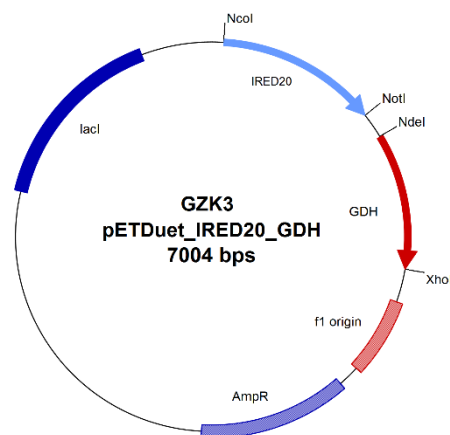


Abbildung 12.4. Plasmidkarte des GZK3 (pETDuet_IRED20_GDH)

13. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
a	<i>annus</i> (Jahr)
Å	Angström (10^{-10} m)
ACN	Acetonitril
ADH	Alkoholdehydrogenase
AmDH	Amin-Dehydrogenase
API	<i>active pharmaceutical ingredients</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Äq.	Äquivalente
Bicin	2-(Bis(2-hydroxyethyl)amino)essigsäure
BINOL	1,1'-Bi-2,2'-naphthol
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	bovines Serumalbumin
BTB	Bromthymolblau
ca.	circa
CAR	Carbonsäurereduktase
CAST	<i>combinatorial active-site saturation test</i>
CCK	Cholecystokinin
conv.	<i>conversion</i>
d	Dublett
d	<i>day</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DKR	Dynamisch kinetische Racematspaltung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPP	Diphenylphosphat
<i>dr</i>	<i>diastereomeric ratio</i> (Diastereomerenverhältnis)
dt	Dublett von Triplett
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethylacetat
ee	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss)
<i>E</i> -Faktor	<i>Environmental Factor</i> (definiert als Kilogramm Abfall pro Kilogramm Produkt)
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>

FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Behörde für Lebens- und Arzneimittel)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucose-Dehydrogenase
GZP	Ganzzell-Protein
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEH	Hantzsch-Ester
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
IB	<i>inclusion bodies</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IRED	Iminreduktase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
KPG	Kerngezogenes Präzisions-Glasgerät
KP _i	Kaliumphosphat-Puffer
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m	Multipllett
MAO	Monoaminoxidasen
MCR	Multikomponentenreaktion
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
n.b.	nicht bestimmt
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinsäureamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NaH	Natriumhydrid
NaOH	Natriumhydroxid
NaP _i	Natriumphosphat-Puffer
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NP	Normalphase
Ns	Nosyl
OD	optische Dichte

PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFK	Perfluorkerosin
PhNCO	Phenylisocyanat
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMP	<i>para</i> -Methoxyphenyl
ppm	<i>parts per million</i>
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
q	Quartett
quint	Quintett
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s	Singulett
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SET	<i>single electron transfer</i> (Einelektronübertragung)
SMD	<i>solvation model based on density</i>
t	Triplett
TA	Transaminase
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TBMAC	Tributylmethylammoniumchlorid
TB-Medium	<i>terrific broth</i> Medium
td	Triplett von Dublett
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
T_m	Schmelzpunkt
TMP	3,4,5-Trimethoxyphenyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV/Vis	Ultraviolett/Visuell
VCD	<i>vibrational circular dichroism</i>
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit (Enzymkinetik)
ZRE	Zellrohextrakt
δ	chemische Verschiebung

14. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] E. Vitaku, D. T. Smith, J. T. Njardarson, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274.
- [2] J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655–1685.
- [3] R. A. Sheldon, *Chem. Ind.* **1992**, 903–906.
- [4] R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437–1451.
- [5] R. A. Sheldon, I. Arends, U. Hanefeld, *Green Chemistry and Catalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [6] R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2017**, *19*, 18–43.
- [7] P. T. Anastas, *Chem. Eng. News* **2011**, *89*, 62–65.
- [8] P. T. Anastas, M. M. Kirchhoff, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 686–694.
- [9] K. Sanderson, *Nature* **2011**, *469*, 18–20.
- [10] H. Gröger, Y. Asano in *Enzyme catalysis in organic synthesis* (Eds.: K. Drauz, H. Gröger, O. May), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 3–42.
- [11] United States Environmental Protection Agency, Presidential Green Chemistry Challenge: 2010 Greener Reaction Conditions Award, <https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2010-greener-reaction-conditions-award>, zuletzt geprüft am 12.05.2018.
- [12] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305–309.
- [13] A. A. Desai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1974–1976.
- [14] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [15] F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125–131.
- [16] K. Waaghals, The Nobel Prize in Chemistry 2018, <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/press-chemistry2018.pdf>, zuletzt geprüft am 04.10.2018.
- [17] E. Gibney, R. van Noorden, H. Ledford, D. Castelveccchi, M. Warren, *Nature* **2018**, *562*, 176.
- [18] R. C. Cioc, E. Ruijter, R. V. A. Orru, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2958–2975.
- [19] S. Brauch, S. S. van Berkel, B. Westermann, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4948–4962.
- [20] D. Rehder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 148–167.
- [21] G. Bauer, V. Güther, H. Hess, A. Otto, O. Roidl, H. Roller, S. Sattelberger (Eds.) *Vanadium and Vanadium Compounds*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2000**.
- [22] E. M. Oltz, R. C. Bruening, M. J. Smith, K. Kustin, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6162–6172.
- [23] S. Akai, K. Tanimoto, Y. Kanao, M. Egi, T. Yamamoto, Y. Kita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2592–2595.
- [24] S. Akai, R. Hanada, N. Fujiwara, Y. Kita, M. Egi, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4900–4903.
- [25] M. Egi, K. Sugiyama, M. Saneto, R. Hanada, K. Kato, S. Akai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3654–3658.
- [26] S. Akai, *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 746–754.
- [27] S. Takizawa, H. Gröger, H. Sasai, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 8992–8997.

- [28] H. Somei, Y. Asano, T. Yoshida, S. Takizawa, H. Yamataka, H. Sasai, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1841–1844.
- [29] S. Takizawa, T. Katayama, C. Kameyama, K. Onitsuka, T. Suzuki, T. Yanagida, T. Kawai, H. Sasai, *Chem. Commun.* **2008**, 1810–1812.
- [30] S. Takizawa, T. Katayama, H. Somei, Y. Asano, T. Yoshida, C. Kameyama, D. Rajesh, K. Onitsuka, T. Suzuki, M. Mikami, H. Yamataka, D. Jayaprakash, H. Sasai, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3361–3371.
- [31] S. Takizawa, T. Katayama, H. Sasai, *Chem. Commun.* **2008**, 4113–4122.
- [32] S. Takizawa, D. Rajesh, T. Katayama, H. Sasai, *Synlett* **2009**, 1667–1669.
- [33] S. Takizawa, F. Arteaga Arteaga, Y. Yoshida, J. Kodera, Y. Nagata, H. Sasai, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 11787–11790.
- [34] S. Takizawa, J. Kodera, Y. Yoshida, M. Sako, S. Breukers, D. Enders, H. Sasai, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1786–1793.
- [35] S. Takizawa, *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1179–1188.
- [36] M. Sako, S. Takizawa, Y. Yoshida, H. Sasai, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 613–616.
- [37] J. H. Kim, A. R. Scialli, *Tox. Sci.* **2011**, *122*, 1–6.
- [38] D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284–300.
- [39] T. C. Nugent, M. El-Shazly, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 753–819.
- [40] A. Enz *Hydrogentartrat eines Phenylcarbamats*. DE 3844992B4, **1988**.
- [41] H.-U. Blaser, H.-P. Buser, H.-P. Jalett, B. Pugin, F. Spindler, *Synlett* **1999**, 867–868.
- [42] H.-U. Blaser, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 17.
- [43] H.-U. Blaser, C. Malan, B. Pugin, F. Spindler, H. Steiner, M. Studer, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 103–151.
- [44] H.-U. Blaser, B. Pugin, F. Spindler, M. Thommen, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1240–1250.
- [45] Z.-H. Guan, K. Huang, S. Yu, X. Zhang, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 481–483.
- [46] M.-L. Louillat, F. W. Patureau, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 901–910.
- [47] C. Liang, F. Robert-Peillard, C. Fruit, P. Müller, R. H. Dodd, P. Dauban, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4641–4644.
- [48] T. E. Müller, M. Beller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 675–704.
- [49] J. Hannedouche, E. Schulz, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4972–4985.
- [50] S. Raoufmoghaddam, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7179–7193.
- [51] Z. Wang, Jiang Zhenju, *Asian J. Chem.* **2010**, *22*, 4141–4149.
- [52] C. Zheng, S.-L. You, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2498–2518.
- [53] S. G. Ouellet, A. M. Walji, MacMillan, David W. C., *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1327–1339.
- [54] M. Rueping, E. Sugiono, F. Schoepke, *Synlett* **2010**, *2010*, 852–865.
- [55] M. Rueping, T. Theissmann, A. Antonchick, *Synlett* **2006**, 1071–1074.
- [56] S. Singh, U. K. Batra, *Indian J. Chem.* **1989**, *28B*, 1–2.
- [57] M. Rueping, E. Sugiono, C. Azap, T. Theissmann, M. Bolte, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3781–3783.
- [58] S. Hoffmann, A. M. Seayad, B. List, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *117*, 7590–7593.
- [59] T. B. Nguyen, H. Bousserouel, Q. Wang, F. Guéritte, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4705–4707.
- [60] T. B. Nguyen, H. Bousserouel, Q. Wang, F. Guéritte, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 257–262.
- [61] G. Li, Y. Liang, J. C. Antilla, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5830–5831.

- [62] Q. Kang, Z.-A. Zhao, S.-L. You, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1657–1660.
- [63] G. Li, J. C. Antilla, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1075–1078.
- [64] R. I. Storer, D. E. Carrera, Y. Ni, MacMillan, David W. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 84–86.
- [65] S. Hoffmann, M. Nicoletti, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13074–13075.
- [66] V. N. Wakchaure, J. Zhou, S. Hoffmann, B. List, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4612–4614.
- [67] V. Wakchaure, M. Nicoletti, L. Ratjen, B. List, *Synlett* **2010**, *2010*, 2708–2710.
- [68] A. Kumar, S. Sharma, R. A. Maurya, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2227–2232.
- [69] D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284–300.
- [70] F. Balkenhohl, K. Ditrach, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381–384.
- [71] N. Itoh, C. Yachi, T. Kudome, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 281–290.
- [72] H. Schütte, W. Hummel, H. Tsai, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *22*, 306–317.
- [73] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1797–1804.
- [74] M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969–3972.
- [75] M. J. Abrahamson, J. W. Wong, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1780–1786.
- [76] M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6965–6982.
- [77] S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001.
- [78] M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51.
- [79] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095.
- [80] Y. Asano, Y. Kato, C. Levy, P. Baker, D. Rice, *Biocatal. Biotransformation* **2004**, *22*, 133–140.
- [81] M. J. MacDonald, G. B. D'Cunha, *Biochem. Cell. Biol.* **2007**, *85*, 273–282.
- [82] S. L. Lovelock, N. J. Turner, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5555–5557.
- [83] S. L. Lovelock, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4652–4656.
- [84] F. Parmeggiani, S. L. Lovelock, N. J. Weise, S. T. Ahmed, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4608–4611.
- [85] S. T. Ahmed, F. Parmeggiani, N. J. Weise, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 5410–5413.
- [86] M. M. Heberling, B. Wu, S. Bartsch, D. B. Janssen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 250–260.
- [87] B. Schilling, K. Lerch, *Molec. Gen. Genet.* **1995**, *247*, 430–438.
- [88] B. Schilling, K. Lerch, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1995**, *1243*, 529–537.
- [89] S. O. Sablin, V. Yankovskaya, S. Bernard, C. N. Cronin, T. P. Singer, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 270–279.
- [90] M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *114*, 3309–3312.
- [91] R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. C. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807–4810.
- [92] R. Carr, M. Alexeeva, M. J. Dawson, V. Gotor-Fernández, C. E. Humphrey, N. J. Turner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 637–639.

- [93] C. J. Dunsmore, R. Carr, T. Fleming, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2224–2225.
- [94] I. Rowles, K. J. Malone, L. L. Etchells, S. C. Willies, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1259–1261.
- [95] D. Ghislieri, A. P. Green, M. Pontini, S. C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863–10869.
- [96] V. Köhler, K. R. Bailey, A. Znabet, J. Raftery, M. Helliwell, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2182–2184.
- [97] N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115–121.
- [98] K. E. Atkin, R. Reiss, V. Koehler, K. R. Bailey, S. Hart, J. P. Turkenburg, N. J. Turner, A. M. Brzozowski, G. Grogan, *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1218–1231.
- [99] K. Yasukawa, S. Nakano, Y. Asano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4428–4431.
- [100] R. S. Heath, M. Pontini, B. Bechi, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 996–1002.
- [101] E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447–2450.
- [102] E. O'Reilly, C. Iglesias, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 992–995.
- [103] T. Li, J. Liang, A. Ambrogelly, T. Brennan, G. Gloor, G. Huisman, J. Lalonde, A. Lekhal, B. Mijts, S. Muley, L. Newman, M. Tobin, G. Wong, A. Zaks, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6467–6472.
- [104] K. M. Meneely, A. L. Lamb, *Biochemistry* **2012**, *51*, 9002–9013.
- [105] Y. Fichman, S. Y. Gerdes, H. Kovács, L. Szabados, A. Zilberstein, L. N. Csonka, *Biol. Rev.* **2015**, *90*, 1065–1099.
- [106] M. Goto, H. Muramatsu, H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki, R. Omi, I. Miyahara, K. Hirotsu, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 40875–40884.
- [107] J. R. Schnell, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Annu. Rev. Biophys. Struct.* **2004**, *33*, 119–140.
- [108] H. Li, P. Williams, J. Micklefield, J. M. Gardiner, G. Stephens, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 753–758.
- [109] S. S. Chimni, R. J. Singh, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 247–250.
- [110] T. Vaijayanthi, A. Chadha, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 93–96.
- [111] M. Espinoza-Moraga, T. Petta, M. Vasquez-Vasquez, V. F. Laurie, L. A.B. Moraes, L. S. Santos, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1988–1992.
- [112] Y. Mirabal-Gallardo, M. d. P. C. Soriano, L. S. Santos, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 440–443.
- [113] V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 93–99.
- [114] M. Dürrenberger, T. Heinisch, Y. M. Wilson, T. Rossel, E. Nogueira, L. Knörr, A. Mutschler, K. Kersten, M. J. Zimbron, J. Pierron, T. Schirmer, T. R. Ward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3026–3029.
- [115] Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, E. S. Nogueira, T. R. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8928–8932.
- [116] V. M. Robles, M. Dürrenberger, T. Heinisch, A. Lledós, T. Schirmer, T. R. Ward, J.-D. Maréchal, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15676–15683.

- [117] K. Mitsukura, M. Suzuki, K. Tada, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4533–4535.
- [118] K. Mitsukura, M. Suzuki, S. Shinoda, T. Kuramoto, T. Yoshida, T. Nagasawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1778–1782.
- [119] K. Mitsukura, T. Kuramoto, T. Yoshida, N. Kimoto, H. Yamamoto, T. Nagasawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8079–8086.
- [120] M. Rodríguez-Mata, A. Frank, E. Wells, F. Leipold, N. J. Turner, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1372–1379.
- [121] T. Huber, L. Schneider, A. Präg, S. Gerhardt, O. Einsle, M. Müller, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 2248–2252.
- [122] H. Man, E. Wells, S. Hussain, F. Leipold, S. Hart, J. P. Turkenburg, N. J. Turner, G. Grogan, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1052–1059.
- [123] G. A. Aleku, H. Man, S. P. France, F. Leipold, S. Hussain, L. Toca-Gonzalez, R. Marchington, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2016**, 3880–3889.
- [124] D. Wetzl, M. Berrera, N. Sandon, D. Fishlock, M. Ebeling, M. Müller, S. Hanlon, B. Wirz, H. Iding, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1749–1756.
- [125] F. Leipold, S. Hussain, D. Ghislieri, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3505–3508.
- [126] P. N. Scheller, S. Fademrecht, S. Hofelzer, J. Pleiss, F. Leipold, N. J. Turner, B. M. Nestl, B. Hauer, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2201–2204.
- [127] M. Gand, H. Müller, R. Wardenga, M. Höhne, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *110*, 126–132.
- [128] S. Hussain, F. Leipold, H. Man, E. Wells, S. P. France, K. R. Mulholland, G. Grogan, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 579–583.
- [129] D. Wetzl, M. Gand, A. Ross, H. Müller, P. Matzel, S. P. Hanlon, M. Müller, B. Wirz, M. Höhne, H. Iding, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 2023–2026.
- [130] H. Li, Z.-J. Luan, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1692–1696.
- [131] P. N. Scheller, M. Lenz, S. C. Hammer, B. Hauer, B. M. Nestl, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3239–3242.
- [132] S. Fademrecht, P. N. Scheller, B. M. Nestl, B. Hauer, J. Pleiss, *Proteins* **2016**, *84*, 600–610.
- [133] R. S. Heath, M. Pontini, S. Hussain, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 117–120.
- [134] Z. Maugeri, D. Rother, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 2745–2750.
- [135] S. P. France, G. A. Aleku, M. Sharma, J. Mangas-Sanchez, R. M. Howard, J. Steflik, R. Kumar, R. W. Adams, I. Slabu, R. Crook, G. Grogan, T. W. Wallace, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15589–15593.
- [136] S. P. France, S. Hussain, A. M. Hill, L. J. Hepworth, R. M. Howard, K. R. Mulholland, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3753–3759.
- [137] D. Gamemara, Domínguez de María, Pablo, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2989–2992.
- [138] L. J. Hepworth, S. P. France, S. Hussain, P. Both, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 2920–2925.
- [139] M. Lenz, P. N. Scheller, S. M. Richter, B. Hauer, B. M. Nestl, *Protein. Expr. Purif.* **2016**.
- [140] H. Li, P. Tian, J.-H. Xu, G.-W. Zheng, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 3151–3154.
- [141] H. Li, G.-X. Zhang, L.-M. Li, Y.-S. Ou, M.-Y. Wang, C.-X. Li, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 724–727.
- [142] P. Matzel, L. Krautschick, M. Höhne, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2022–2027.

- [143] G.-D. Roiban, M. Kern, Z. Liu, J. Hyslop, P. L. Tey, M. S. Levine, L. S. Jordan, K. K. Brown, T. Hadi, L. A. F. Ihnken, M. J. B. Brown, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 4475–4479.
- [144] P. N. Scheller, B. M. Nestl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 10509–10520.
- [145] M. Sharma, J. Mangas-Sanchez, N. J. Turner, G. Grogan, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2011–2025.
- [146] N. Zumbrägel, D. Wetzl, H. Iding, H. Gröger, *Heterocycles* **2017**, *95*, 1261–1271.
- [147] J. Zhu, H. Tan, L. Yang, Z. Dai, L. Zhu, H. Ma, Z. Deng, Z. Tian, X. Qu, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 7003–7007.
- [148] S. P. France, R. M. Howard, J. Steflík, N. J. Weise, J. Mangas-Sanchez, S. L. Montgomery, R. Crook, R. Kumar, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 510–514.
- [149] G. A. Aleku, J. Mangas-Sanchez, J. Citoler, S. P. France, S. L. Montgomery, R. S. Heath, M. P. Thompson, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 515–519.
- [150] G. A. Aleku, S. P. France, H. Man, J. Mangas-Sanchez, S. L. Montgomery, M. Sharma, F. Leipold, S. Hussain, G. Grogan, N. J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 961–969.
- [151] S. L. Montgomery, J. Mangas-Sanchez, M. P. Thompson, G. A. Aleku, B. Dominguez, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10491–10494.
- [152] I. Slabu, J. L. Galman, N. J. Weise, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1038–1042.
- [153] M. Biermann, D. Bakonyi, W. Hummel, H. Gröger, *Green Chem.* **2017**, *19*, 405–410.
- [154] B. Lin, Y. Tao, *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 106.
- [155] C. C. C. R. de Carvalho, *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 250–263.
- [156] A. Schmid, Dordick, J. S., B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [157] H. Gröger, W. Hummel, S. Wedde in *Green biocatalysis* (Ed.: R. N. Patel), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2016**, pp. 557–585.
- [158] E. Vázquez-Figueroa, J. Chaparro-Riggers, A. S. Bommarius, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2295–2301.
- [159] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane, F. R. Salemme, *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 429–440.
- [160] S. Boivin, S. Kozak, R. Meijers, *Protein Expr. Purif.* **2013**, *91*, 192–206.
- [161] N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 55–64.
- [162] E. A. Ilardi, E. Vitaku, J. T. Njardarson, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2832–2842.
- [163] R. P. Elander, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 385–392.
- [164] S. Nakatani, K. Hidaka, E. I. Ami, K. Nakahara, A. Sato, J.-T. Nguyen, Y. Hamada, Y. Hori, N. Ohnishi, A. Nagai, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2992–3004.
- [165] W. M. Weigert, H. Offermanns, P. Scherberich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 330–336.
- [166] A. Bertamino, M. Soprano, S. Musella, M. R. Rusciano, M. Sala, E. Vernieri, V. Di Sarno, A. Limatola, A. Carotenuto, S. Cosconati, P. Grieco, E. Novellino, M. Illario, P. Campiglia, I. Gomez-Monterrey, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5407–5421.
- [167] A. Kaluszyner, P. Czerniak, E. D. Bergmann, *Radiat. Res.* **1961**, *14*, 23–28.
- [168] J. C. Roberts, K. E. Koch, S. R. Detrick, R. L. Warters, G. Lubec, *Radiat. Res.* **1995**, *143*, 203–213.

- [169] M. Kitano, M. Yagisawa, Y. Morimoto *Method for production of 1,3-thiazolidin-2-ones*. EP387028A2, **1990**.
- [170] S. Rochat, J.-Y. d. S. Laumer, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1147, 85–94.
- [171] F. Asinger, *Angew. Chem.* **1956**, 68, 413.
- [172] F. Asinger, M. Thiel, *Angew. Chem.* **1958**, 70, 667–683.
- [173] K. Drauz, H. G. Koban, J. Martens, W. Schwarze, *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1985, 448–452.
- [174] F. Asinger, H. Offermanns, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, 6, 907–919.
- [175] J. Martens, H. Offermanns, P. Scherberich, *Angew. Chem.* **1981**, 93, 680–683.
- [176] A. Kleemann, J. Martens, H. Bethge, P. Scherberich *Verfahren zur Herstellung von Thiazolinen-(3)*. EP0044010B1, **1981**.
- [177] M. Thiel, F. Asinger, K. Häussler, T. Körner, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1959**, 622, 107–116.
- [178] T.-T.-H. Vu, P. S. Kumbhar, F. Figueras, *Adv. Synth. Catal* **2003**, 345, 493–496.
- [179] I. Reiners, H. Gröger, J. Martens, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 541–546.
- [180] D. Armenise, G. Trapani, F. Stasi, F. Morlacchi, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1998**, 331, 54–58.
- [181] K. S. Brown, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2451–2463.
- [182] S. D. McAllister, G. Rizvi, S. Anavi-Goffer, D. P. Hurst, J. Barnett-Norris, D. L. Lynch, P. H. Reggio, M. E. Abood, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5139–5152.
- [183] J. Y. Shim, E. R. Collantes, W. J. Welsh, B. Subramaniam, A. C. Howlett, M. A. Eissenstat, S. J. Ward, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4521–4532.
- [184] A. Wang, C. P. Prouty, P. D. Pelton, M. Yong, K. T. Demarest, W. V. Murray, G.-H. Kuo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1432–1435.
- [185] A. Belattar, J. E. Saxton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 679.
- [186] D. Buhuniya, S. K. Das, G. R. Madhavan, J. Iqbal, R. Chakraborti *Benzoxazine and benzothiazine derivatives and pharmaceutical compositions containing them*. US7365064B2, **2008**.
- [187] B. Achari, S. Mandal, P. Dutta, C. Chowdhury, *Synlett* **2004**, 2004, 2449–2467.
- [188] S. Atarashi, S. Yokohama, K.-I. Yamazaki, K.-I. Sakano, M. Imamura, I. Hayakawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 1896–1902.
- [189] J. P. Brennan, J.E. Saxton, *Tetrahedron* **1987**, 43, 191–205.
- [190] J.-H. Xie, S.-F. Zhu, Q.-L. Zhou, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 1713–1760.
- [191] K. Satoh, M. Inenaga, K. Kanai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2657–2662.
- [192] K. Gao, C.-B. Yu, D.-S. Wang, Y.-G. Zhou, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 483–488.
- [193] N. Arai, Y. Saruwatari, K. Isobe, T. Ohkuma, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 2769–2774.
- [194] S. Fleischer, S. Zhou, S. Werkmeister, K. Junge, M. Beller, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 4997–5003.
- [195] J. L. Nunez-Rico, A. Vidal-Ferran, *Org. Lett.* **2013**, 15, 2066–2069.
- [196] Z.-P. Chen, M.-W. Chen, R.-N. Guo, Y.-G. Zhou, *Org. Lett.* **2014**, 16, 1406–1409.
- [197] J. Qin, F. Chen, Y.-M. He, Q.-H. Fan, *Org. Chem. Front.* **2014**, 1, 952–955.
- [198] S. Wei, X. Feng, H. Du, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 8026–8029.
- [199] M. Rueping, A. P. Antonchick, T. Theissmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6751–6755.
- [200] C. Bleschke, J. Schmidt, D. S. Kundu, S. Blechert, A. Thomas, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 3101–3106.

- [201] D. S. Kundu, J. Schmidt, C. Bleschke, A. Thomas, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5456–5459.
- [202] Z. Zhang, Y. R. Ji, L. Wojtas, W.-Y. Gao, S. Ma, M. J. Zaworotko, J. C. Antilla, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7693–7695.
- [203] M. Rueping, E. Sugiono, A. Steck, T. Theissmann, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 281–287.
- [204] M. Rueping, T. Theissmann, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 473.
- [205] Q.-A. Chen, K. Gao, Y. Duan, Z.-S. Ye, L. Shi, Y. Yang, Y.-G. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2442–2448.
- [206] G. Grogan, N. J. Turner, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 1900–1907.
- [207] C. L. Stevens, B. T. Gillis, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3448–3451.
- [208] H. Gröger, Nukleophile Additionsreaktionen an die C=N-Doppelbindung schwefelhaltiger, cyclischer Imine unter Berücksichtigung stereoselektiver Aspekte, Dissertation, Oldenburg, **1997**.
- [209] D. R. Shridhar, C. V. Reddy Sastry, O. P. Bansal, P. Pulla Rao, *Synthesis* **1981**, 912–913.
- [210] M. Lopez-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernandez, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3815–3824.
- [211] P. Battistoni, P. Bruni, G. Fava, *Synthesis* **1979**, *1979*, 220–221.
- [212] Y. J. Chung, E. J. Ryu, G. Keum, K. Byeang Hyeon, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 209–225.
- [213] M. Rueping, C. Azap, E. Sugiono, T. Theissmann, *Synlett* **2005**, 2367–2369.
- [214] Z. Zhang, P. Schreiner, *Synlett* **2007**, 1455–1457.
- [215] G. B. Giovenzana, D. Imperio, A. Penoni, G. Palmisano, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1095–1099.
- [216] A. Pick, B. Beer, R. Hemmi, R. Momma, J. Schmid, K. Miyamoto, V. Sieber, *BMC Biotechnology* **2016**, *16*, 80–89.
- [217] S. Roth, A. Präg, C. Wechsler, M. Marolt, S. Ferlaino, S. Lüdeke, N. Sandon, D. Wetzl, H. Iding, B. Wirz, M. Müller, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1703–1706.
- [218] N. Zumbrägel, C. Merten, S. M. Huber, H. Gröger, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1949.
- [219] C. M. Marson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5514–5533.
- [220] Y. Zheng, C. M. Tice, S. B. Singh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3673–3682.
- [221] Spartan 14. Wavefunction Inc., Irvine, CA, USA, **2014**.
- [222] Gaussian 09. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, **2013**.

- [223] K. Wagner, Synthese von 3-Thiazolidinen unter Einsatz von Iminreduktasen. *Bachelorarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2017**.
- [224] N. Weißing, Biokatalytische Reduktion von Thiazolinen und Benzoxazinen durch Iminreduktasen. *Masterarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2018**.
- [225] N. Zumbrägel, K. Wagner, N. Weißing, H. Gröger, *J. Heterocycl. Chem.*, zur Publikation akzeptiert.
- [226] T. Meyer, C. Geerds, H. Niemann **2018**, *unpublizierte Ergebnisse*.
- [227] P. Machui, Enantioselektive Synthese von O-haltigen heterozyklischen Aminen durch Reduktion mit Iminreduktasen. *Masterarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2018**.
- [228] J. Nonnhoff, Enantioselektive Synthese heterocyclischer Amine unter Einsatz von Biokatalysatoren. *Masterarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, **2018**.
- [229] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22.
- [230] S. Schmidt, K. Castiglione, R. Kourist, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1755–1768.
- [231] M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, J. A. Roels, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 930–931.
- [232] J. V. Allen, J. M.J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859–1862.
- [233] P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M.J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623–7626.
- [234] M.-J. Kim, Y. Ahn, J. Park, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 578–587.
- [235] A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211–1212.
- [236] M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668–669.
- [237] C. Simons, U. Hanefeld, Arends, Isabel W. C. E., T. Maschmeyer, R. A. Sheldon, *Top. Catal.* **2006**, *40*, 35–44.
- [238] E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551–9554.
- [239] K. Baer, M. Krausser, E. Burda, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9355–9358.
- [240] G. Rulli, N. Duangdee, K. Baer, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7944–7947.
- [241] G. Rulli, N. Duangdee, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 812–817.
- [242] R. C. Simon, E. Busto, J. H. Schrittwieser, J. H. Sattler, J. Pietruszka, K. Faber, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15669–15672.
- [243] S. Suljić, J. Pietruszka, D. Worgull, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1822–1830.
- [244] M. Heidlindemann, G. Rulli, A. Berkessel, W. Hummel, H. Gröger, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1099–1103.
- [245] C. A. Denard, H. Huang, M. J. Bartlett, L. Lu, Y. Tan, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 465–469.
- [246] Y. Wang, H. Zhao, *Catalysts* **2016**, *6*, 194.
- [247] H. Huang, C. A. Denard, R. Alamillo, A. J. Crisci, Y. Miao, J. A. Dumesic, S. L. Scott, H. Zhao, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2165–2168.
- [248] Y.-C. Lee, S. Dutta, K. C.-W. Wu, *ChemSusChem* **2014**, *7*, 3241–3246.
- [249] A. K. Ganai, P. Shinde, B. B. Dhar, S. Sen Gupta, B. L. V. Prasad, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 2186.

- [250] D. Uhrich, J. von Langermann, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2111.
- [251] A. Buthe, A. Kapitan, W. Hartmeier, M. B. Ansorge-Schumacher, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *35*, 93–99.
- [252] V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 93–99.
- [253] A. L. Miller, N. B. Bowden, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4834–4840.
- [254] M. T. Mwangi, M. B. Runge, K. M. Hoak, M. D. Schulz, N. B. Bowden, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6780–6788.
- [255] M. B. Runge, M. T. Mwangi, A. L. Miller, M. Perring, N. B. Bowden, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 935–939.
- [256] H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488–4492.
- [257] F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 555–558.
- [258] J. Latham, J.-M. Henry, H. H. Sharif, B. R. K. Menon, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11873.
- [259] F. Uthoff, H. Gröger, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9517–9521.
- [260] N. Zumbrägel, H. Gröger, *Bioengineering* **2018**, *5*, 60.
- [261] L. O. Davis, *Org. Prep. Proced. Int.* **2013**, *45*, 437–464.
- [262] V. V. Khau, M. J. Martinelli, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4323–4326.
- [263] K. Rasmussen, D. R. Helton, J. E. Berger, E. Scearce, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1994**, *713*, 374–376.
- [264] F. Noble, S. A. Wank, J. N. Crawley, J. Bradwejn, K. B. Seroogy, M. Hamon, B. P. Roques, *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 745–781.
- [265] J. H. Ahn, J. A. Kim, H.-M. Kim, H.-M. Kwon, S.-C. Huh, S. D. Rhee, K. R. Kim, S.-D. Yang, S.-D. Park, J. M. Lee, S. S. Kim, H. G. Cheon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1337–1340.
- [266] H. G. Cheon, S.-S. Kim, K.-R. Kim, S.-D. Rhee, S.-D. Yang, J. H. Ahn, S.-D. Park, J. M. Lee, W. H. Jung, H. S. Lee, H. Y. Kim, *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 22–29.
- [267] B. Ahren, E. Simonsson, H. Larsson, M. Landin-Olsson, H. Torgeirsson, P.-A. Jansson, M. Sandqvist, P. Bavenholm, S. Efendic, J. W. Eriksson, S. Dickinson, D. Holmes, *Diabetes Care* **2002**, *25*, 869–875.
- [268] M. J. Kornet, R. Joyce Garrett, *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 377–378.
- [269] B. Parashar, A. Jain, S. Bharadwaj, V. K. Sharma, *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1692–1699.
- [270] J. Kobayashi, F. Kanda, M. Ishibashi, H. Shigemori, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4574–4576.
- [271] J. D. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 113.
- [272] K. Tran, P. J. Lombardi, J. L. Leighton, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3165–3167.
- [273] J. C. Powers, R. Boone, D. L. Carroll, B. F. Gupton, C. M. Kam, N. Nishino, M. Sakamoto, P. M. Tuhy, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4288–4294.
- [274] R. Baggio, Y. Q. Shi, Y. Q. Wu, Abeles, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3351–3353.
- [275] M. Hart, C. Beeson, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3700–3709.
- [276] D. E. Wilkinson, B. E. Thomas, D. C. Limburg, A. Holmes, H. Sauer, D. T. Ross, R. Soni, Y. Chen, H. Guo, P. Howorth, H. Valentine, D. Spicer, M. Fuller, J. P. Steiner, G. S. Hamilton, Y.-Q. Wu, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4815–4825.

- [277] A. S. Khile, R. Nayak, G. Dixit *Process for production of (S)-(Tetrahydrofuran-3-yl)hydrazine*. WO2016021192A1, **2016**.
- [278] J. Bernstein, K. A. Losee, C. I. Smith, B. Rubin, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4433.
- [279] T. Shimizu, Y. Hayashi, S. Ishikawa, K. Teramura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 2456–2459.
- [280] T. Shimizu, Y. Hayashi, M. Miki, K. Teramura, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2277–2285.
- [281] B. Fouchet, M. Joucla, J. Huelin, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1333–1336.
- [282] G. Le Fevre, S. Sinbandhit, J. Hamelin, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 1821–1824.
- [283] K.-D. Hesse, *Liebigs Ann. Chem.* **1971**, *743*, 50–56.
- [284] B. B. Snider, R. S. E. Conn, S. Sealton, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 218–221.
- [285] Y. A. Ibrahim, S. E. Abdou, S. Selim, *Heterocycles* **1982**, *19*, 819.
- [286] M. A. Badawy, S. A. El-Bahaie, A. M. Kadry, Y. A. Ibrahim, *Heterocycles* **1988**, *27*, 7.
- [287] J. K. Gallos, A. E. Koumbis, N. E. Apostolakis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2457–2460.
- [288] R. Grigg, J. Kemp, N. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 2827–2830.
- [289] R. Grigg, M. Dowling, M. W. Jordan, V. Sridharan, S. Thianpatanagul, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5873–5886.
- [290] S. Kobayashi, H. Shimizu, Y. Yamashita, H. Ishitani, J. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13678–13679.
- [291] S. Shirakawa, P. J. Lombardi, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9974–9975.
- [292] L. O. Davis, W. F.M. Daniel, S. L. Tobey, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 522–525.
- [293] M. Rueping, M. S. Maji, H. B. Küçük, I. Atodiresei, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12864–12868.
- [294] H. Pellissier, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3235–3285.
- [295] M. Kissane, A. R. Maguire, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 845–883.
- [296] W. Oppolzer, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3091–3094.
- [297] W. Oppolzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1977**, *16*, 10–23.
- [298] V. V. Khau, M. J. Martinelli, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4323–4326.
- [299] L.-J. Wang, Y. Tang in *Comprehensive organic synthesis II* (Eds.: G. A. Molander, P. Knochel), Elsevier, Amsterdam, **2014**, pp. 1342–1383.
- [300] L.-J. Wang, Y. Tang in *Comprehensive organic synthesis II* (Eds.: G. A. Molander, P. Knochel), Elsevier, Amsterdam, **2014**, pp. 1342–1383.
- [301] M. Fernández, E. Reyes, J. L. Vicario, D. Badía, L. Carrillo, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 371–376.
- [302] L. Deiana, G.-L. Zhao, H. Leijonmarck, J. Sun, C. W. Lehmann, A. Córdova, *Chem. Open* **2012**, *1*, 134–139.
- [303] Z.-C. Geng, J. Chen, N. Li, X.-F. Huang, Y. Zhang, Y.-W. Zhang, X.-W. Wang, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1710–1720.
- [304] S. Ma, N. Jiao, Z. Zheng, Z. Ma, Z. Lu, L. Ye, Y. Deng, G. Chen, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2193–2196.
- [305] S. Masamune, W. Choy, J. S. Petersen, L. R. Sita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 1–30.
- [306] Q. Yang, X. Jiang, S. Ma, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9310–9316.
- [307] W. Shu, Q. Yang, G. Jia, S. Ma, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11159–11166.

- [308] R. L. Lalonde, Z. J. Wang, M. Mba, A. D. Lackner, F. D. Toste, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 598–601.
- [309] J.M. Ellis, S.B. King, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5833–5835.
- [310] T. P. Lebold, M. A. Kerr, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4354–4357.
- [311] N. C. Giampietro, J. P. Wolfe, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12907–12911.
- [312] A. Chauveau, T. Martens, M. Bonin, L. Micouin, H.-P. Husson, *Synthesis* **2002**, 1885–1890.
- [313] N. R. Campbell, B. Sun, R. P. Singh, L. Deng, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3123–3128.
- [314] K. Alex, A. Tillack, N. Schwarz, M. Beller, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2377–2379.
- [315] V. Nair, A. T. Biju, K. Mohanan, E. Suresh, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2213–2216.
- [316] J. M. de Los Santos, Y. López, D. Aparicio, F. Palacios, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 550–557.
- [317] V. Lellek, C.-y. Chen, W. Yang, J. Liu, X. Ji, R. Faessler, *Synlett* **2018**, *29*, 1071–1075.
- [318] F. Jakob, E. Herdtweck, T. Bach, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7537–7546.
- [319] M. R. Mish, F. M. Guerra, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8379–8380.
- [320] R. Calabretta, C. Gallina, C. Giordano, *Synthesis* **1991**, 536–539.
- [321] J.-S. Poh, D. N. Tran, C. Battilocchio, J. M. Hawkins, S. V. Ley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7920–7923.
- [322] X. Wu, M. Wang, G. Zhang, Y. Zhao, J. Wang, H. Ge, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5882–5890.
- [323] M. Kawase, Y. Kikugawa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 643–645.
- [324] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.
- [325] C. E. Rye, D. Barker, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6636–6648.
- [326] P. R. Verhoest, D. S. Chapin, M. Corman, K. Fonseca, J. F. Harms, X. Hou, E. S. Marr, F. S. Menniti, F. Nelson, R. O'Connor, J. Pandit, C. Proulx-Lafrance, A. W. Schmidt, C. J. Schmidt, J. A. Suiciak, S. Liras, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5188–5196.
- [327] A. Croft, P. Garner, *BMJ* **1997**, *315*, 1412–1416.
- [328] M. L. Belley, S. Leger, M. Labelle, P. Roy, Y. B. Xian, D. Guay *Unsaturated hydroxyalkylquinoline acids as leukotriene antagonists*. US5565473A, **1996**.
- [329] I. Sestili, A. Borioni, C. Mustazza, A. Rodomonte, L. Turchetto, M. Sbraccia, D. Riitano, M. R. Del Giudice, *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 1047–1057.
- [330] J.-F. Mouscadet, D. Desmaële, *Molecules* **2010**, *15*, 3048–3078.
- [331] E. Clot, O. Eisenstein, R. H. Crabtree, *Chem. Commun.* **2007**, 2231–2233.
- [332] R. Yamaguchi, C. Ikeda, Y. Takahashi, K.-i. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8410–8412.
- [333] D.-W. Wang, X.-B. Wang, D.-S. Wang, S.-M. Lu, Y.-G. Zhou, Y.-X. Li, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2780–2787.
- [334] J. Wu, D. Talwar, S. Johnston, M. Yan, J. Xiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6983–6987.
- [335] D. Talwar, A. Gonzalez-de-Castro, H. Y. Li, J. Xiao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5223–5227.
- [336] S. Chakraborty, W. W. Brennessel, W. D. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8564–8567.
- [337] X. Cui, Y. Li, S. Bachmann, M. Scalone, A.-E. Surkus, K. Junge, C. Topf, M. Beller, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 10652–10658.
- [338] K.-H. He, F.-F. Tan, C.-Z. Zhou, G.-J. Zhou, X.-L. Yang, Y. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3080–3084.

- [339] A. V. Iosub, S. S. Stahl, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4404–4407.
- [340] S. Lee, M. Di Vece, B. Lee, S. Seifert, R. E. Winans, S. Vajda, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1632–1637.
- [341] R. Xu, S. Chakraborty, H. Yuan, W. D. Jones, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 6350–6354.
- [342] L. M. Ombaka, P. Ndungu, V. O. Nyamori, *Catal. Today* **2013**, *217*, 65–75.
- [343] K.-i. Shimizu, K. Kon, K. Shimura, S. S.M.A. Hakim, *J. Catal.* **2013**, *300*, 242–250.
- [344] S. Muthaiah, S. H. Hong, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3045–3053.
- [345] A. E. Wendlandt, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11910–11913.
- [346] D. Jung, M. H. Kim, J. Kim, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 6300–6303.
- [347] Y. Izawa, C. Zheng, S. S. Stahl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3672–3675.
- [348] D. Pun, T. Diao, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8213–8221.
- [349] T. Tanaka, K.-i. Okunaga, M. Hayashi, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4633–4635.
- [350] X.-T. Sun, J. Zhu, Y.-T. Xia, L. Wu, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 2463–2466.
- [351] C. Deraedt, R. Ye, W. T. Ralston, F. D. Toste, G. A. Somorjai, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18084–18092.
- [352] A. E. Wendlandt, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 506–512.
- [353] M. Karki, H. Araujo, J. Magolan, *Synlett* **2013**, *24*, 1675–1678.
- [354] van de Velde, Fred, L. Könemann, *Chem. Commun.* **1998**, 1891–1892.
- [355] van de Velde, F, L. Könemann, F. van Rantwijk, Sheldon, R. A., *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 87–96.
- [356] van de Velde, Fred, I. W.C.E. Arends, R. A. Sheldon, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 81–89.
- [357] I. Correia, S. Aksu, P. Adão, J. C. Pessoa, R. A. Sheldon, I. W.C.E. Arends, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 318–329.
- [358] van de Velde, Fred, I. W.C.E. Arends, R. A. Sheldon, *Top. Catal.* **2000**, *13*, 259–265.
- [359] C. Bolm, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *237*, 245–256.
- [360] R. C. Michaelson, R. E. Palermo, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1990–1992.
- [361] N. Murase, Y. Hoshino, M. Oishi, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 338–339.
- [362] C. Bolm, F. Bienewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *34*, 2640–2642.
- [363] A. H. Vetter, A. Berkessel, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1741–1744.
- [364] G. Liu, D. A. Cogan, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9913–9914.
- [365] A. T. Radosevich, C. Musich, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1090–1091.
- [366] A. Togni, *Organometallics* **1990**, *9*, 3106–3113.
- [367] Y. N. Belokon', M. North, T. Parsons, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1617–1619.
- [368] J. Blacker, L. A. Clutterbuck, M. R. Crampton, C. Grosjean, M. North, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1449–1456.
- [369] M. North, J. M. Watson, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 2405–2409.
- [370] S.-W. Hon, C.-H. Li, J.-H. Kuo, N. B. Barhate, Y.-H. Liu, Y. Wang, C.-T. Chen, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 869–872.
- [371] C.-Y. Chu, D.-R. Hwang, S.-K. Wang, B.-J. Uang, *Chem. Commun.* **2001**, 980–981.
- [372] N. B. Barhate, C.-T. Chen, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2529–2532.
- [373] Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Chem. Commun.* **2002**, 914–915.
- [374] Z. Luo, Q. Liu, L. Gong, X. Cui, A. Mi, Y. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4532–4535.

- [375] Q.-X. Guo, Z.-J. Wu, Z.-B. Luo, Q.-Z. Liu, J.-L. Ye, S.-W. Luo, L.-F. Cun, L.-Z. Gong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13927–13938.
- [376] M. Shibasaki, H. Sasai, T. Arai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1236–1256.
- [377] M. Sako, A. Sugizaki, S. Takizawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 2751–2753.
- [378] C. Zhu, J.-B. Xia, C. Chen, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*.
- [379] N. Zumbrägel, M. Sako, S. Takizawa, H. Sasai, H. Gröger, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 4723–4727.
- [380] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [381] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [382] A. L. Shapiro, E. Viñuela, J. V. Maizel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *28*, 815–820.
- [383] R. Pedrosa, C. Andrés, J. M. Iglesias, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 243–250.
- [384] M. J. Rodig, A. W. Snow, P. Scholl, S. Rea, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 5354–5361.
- [385] A. Jobin-Des Lauriers, C. Y. Legault, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 108–111.
- [386] F. Brockmeyer, D. van Gerven, W. Saak, J. Martens, *Synthesis* **2014**, *46*, 1603–1612.
- [387] T. Stalling, K. Johannes, S. Polina, J. Martens, *J. Heterocyclic Chem.* **2013**, *50*, 654–659.
- [388] K. Satoh, M. Inenaga, K. Kanai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2657–2662.
- [389] H. Shimizu, N. Ueda, T. Kataoka, M. Hori, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 2571–2590.
- [390] H. C. Maytum, B. Tavassoli, Williams, Jonathan M. J., *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4387–4389.
- [391] A. Aupoix, C. Bournaud, G. Vo-Thanh, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2772–2776.
- [392] N. Boonnak, S. Chantrapromma, P. Ruanwas, C. Sontimuang, H.-K. Fun, *Crystallogr. Rep.* **2017**, *62*, 1104–1108.
- [393] M.-N. Zhao, H. Liang, Z.-H. Ren, Z.-H. Guan, *Synthesis* **2012**, *44*, 1501–1506.
- [394] P. Renzi, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4506–4516.
- [395] J. Wencel-Delord, A. Panossian, F. R. Leroux, F. Colobert, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3418–3430.
- [396] G. Bringmann, T. Gulder, T. A. M. Gulder, M. Breuning, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 563–639.
- [397] M. C. Kozłowski, B. J. Morgan, E. C. Linton, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3193–3207.
- [398] Y.-B. Wang, B. Tan, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 534–547.
- [399] G. Bringmann, A. J. Price Mortimer, P. A. Keller, M. J. Gresser, J. Garner, M. Breuning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5384–5427.
- [400] Y. Yang, J. Lan, J. You, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8787–8863.
- [401] M. C. Kozłowski, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 638–643.
- [402] S. Quideau, D. Deffieux, L. Pouységu in *Comprehensive organic synthesis II* (Eds.: G. A. Molander, P. Knochel), Elsevier, Amsterdam, **2014**, pp. 656–740.
- [403] X. Wu, T. Iwata, A. Scharf, T. Qin, K. D. Reichl, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5969–5975.
- [404] V. Vershinin, A. Dyadyuk, D. Pappo, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 3660–3668.
- [405] H. Shalit, A. Libman, D. Pappo, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13404–13413.
- [406] Z. Maeno, T. Mitsudome, T. Mizugaki, K. Jitsukawa, *Catal. Sci. Technol.* **2017**, *7*, 3205–3209.
- [407] A. Eisenhofer, J. Hioe, R. M. Gschwind, B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 2194–2204.
- [408] A. Stöhr, M. Tabatabai, P. Favresse, K. Roland, H. Ritter, *Polym. Int.* **2016**, *65*, 544–550.

- [409] A. Libman, H. Shalit, Y. Vainer, S. Narute, S. Kozuch, D. Pappo, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11453–11460.
- [410] E. Gaster, Y. Vainer, A. Regev, S. Narute, K. Sudheendran, A. Werbeloff, H. Shalit, D. Pappo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4198–4202.
- [411] Y. E. Lee, T. Cao, C. Torruellas, M. C. Kozlowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6782–6785.
- [412] K. V. N. Esguerra, Y. Fall, L. Petitjean, J.-P. Lumb, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7662–7668.
- [413] B.-S. Liao, Y.-H. Liu, S.-M. Peng, S.-T. Liu, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 1158–1164.
- [414] R. Mei, D. Xu, H. Hu, D. Song, H. Zhang, D. Ma, X. Xie, X. She, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2230–2233.
- [415] S. Grant-Overton, J. A. Buss, E. H. Smith, E. G. Gutierrez, E. J. Moorhead, V. S. Lin, A. G. Wenzel, *Synth. Commun.* **2014**, *45*, 331–337.
- [416] K. Morimoto, K. Sakamoto, T. Ohshika, T. Dohi, Y. Kita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3652–3656.
- [417] K. Morimoto, K. Sakamoto, Y. Ohnishi, T. Miyamoto, M. Ito, T. Dohi, Y. Kita, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8726–8731.
- [418] S. Lips, A. Wiebe, B. Elsler, D. Schollmeyer, K. M. Dyballa, R. Franke, S. R. Waldvogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10872–10876.
- [419] B. Elsler, A. Wiebe, D. Schollmeyer, K. M. Dyballa, R. Franke, S. R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 12321–12325.
- [420] B. Elsler, D. Schollmeyer, K. M. Dyballa, R. Franke, S. R. Waldvogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5210–5213.
- [421] H. Kang, Y. E. Lee, P. V. G. Reddy, S. Dey, S. E. Allen, K. A. Niederer, P. Sung, K. Hewitt, C. Torruellas, M. R. Herling, M. C. Kozlowski, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5505–5508.
- [422] M. Sako, T. Aoki, N. Zumbärgel, L. Schober, H. Gröger, S. Takizawa, H. Sasai, *J. Org. Chem.*, DOI:10.1021/acs.joc.8b02494.
- [423] R. S. Coleman, J. M. Guernon, J. T. Roland, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 277–280.