

**Enzymatische Synthese von chiralen, mehrfach  
substituierten Heterozyklen durch Verwendung  
einer neuartigen Gruppe von Zyklasen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Lisa Wagner**

geboren in Neuburg an der Donau

Bayreuth, 2021

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2016 bis Oktober 2021 in Bayreuth an der Professur Organische Chemie (Lebensmittelchemie) unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Frank Hahn angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 20.10.2021

Zulassung durch die Promotionskommission: 03.11.2021

Wissenschaftliches Kolloquium: 12.05.2022

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Benedikt Westermann

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Frank Hahn (Gutachter)

Prof. Dr. Andreas Möglich (Gutachter)

Prof. Dr. Birgitta Wöhrl (Vorsitz)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt



~ ~ ~ ~ ~

Am Ende wird alles gut.  
Und wenn es noch nicht gut ist,  
ist es noch nicht das Ende.

~ ~ ~ ~ ~

OSCAR WILDE



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Polyketide.....	1
1.1.1. Allgemeine Struktur motive .....	1
1.1.2. Polyketidsynthasen.....	2
1.1.2.1. Typ I.....	6
1.1.2.2. Typ II.....	7
1.1.2.3. Typ III.....	7
1.2. Heterozyklen .....	8
1.2.1. Vorkommen von Heterozyklen in der Natur und Wirkstoffen.....	8
1.2.2. Chemische Synthesemöglichkeiten.....	8
1.2.3. Biochemische Mechanismen.....	11
1.3. IMOMA-Zyklasen.....	13
1.3.1. Bifunktionelle Dehydratase/Zyklase: AmbDH3 .....	14
1.3.2. <i>Trans</i> -AT-Pyransynthasen: PedPS7 und SorPS8 .....	17
1.3.2.1. PedPS7.....	18
1.3.2.2. SorPS8.....	21
1.3.3. Epoxid-Hydrolasen: IndCyc11, ZinJ und SalBIII .....	23
1.3.3.1. IndCyc11 .....	24
1.3.3.2. ZinJ.....	27
1.3.3.3. SalBIII .....	29
1.3.4. Furanbildende Zyklasen: NonS und PamS.....	34
1.3.4.1. NonS.....	34
1.3.4.2. PamS.....	36
1.4. Immobilisierung von Enzymen .....	38
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>40</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>42</b>
3.1. Klonierung und Expression.....	42
3.1.1. AmbDH3 .....	43
3.1.1.1. Gewinnung von AmbDH3 aus <i>E. coli</i> BL21 pET28a(+) <i>_ambDH3</i> .....	43
3.1.1.2. Klonierung von <i>ambDH3</i> in pCold-I.....	44
3.1.1.3. Optimierung der AmbDH3-Produktion.....	46
3.1.1.4. Bestimmung der löslichen AmbDH3-Menge .....	51

3.1.1.5.	Gewinnung von AmbDH3-Mutanten zur Durchführung von <i>in vitro</i> -Studien der Zyklase-Aktivität .....	51
3.1.2.	AmbDH2 und AmbDH4.....	53
3.1.2.1.	AmbDH2 .....	53
3.1.2.2.	AmbDH4 .....	56
3.1.3.	PedPS7 und SorPS8.....	67
3.1.3.1.	PedPS7.....	67
3.1.3.2.	SorPS8 .....	68
3.1.4.	IndCyc11, ZinJ und SalBIII .....	69
3.1.4.1.	IndCyc11 .....	69
3.1.4.1.2.	Gewinnung unter denaturierenden Bedingungen.....	70
3.1.4.2.	ZinJ.....	73
3.1.4.3.	SalBIII .....	74
3.1.5.	NonS und PamS.....	75
3.2.	MS-MS-Analysen.....	95
3.3.	Biochemische Charakterisierung von AmbDH3 .....	97
3.3.1.	Analyse per Fluoreszenzemissionsspektrometrie .....	97
3.3.2.	Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	98
3.3.3.	Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration.....	99
3.3.4.	Stabilitätstests .....	100
3.3.5.	Lagerbarkeit.....	101
3.3.6.	Gefriertrocknung .....	102
3.3.7.	<i>In vivo</i> -Reaktion .....	103
3.3.8.	Untersuchung der Substratspezifität.....	104
3.3.9.	Untersuchung der dualen Aktivität als Dehydratase und Zyklase.....	107
3.4.	Enzymaktivitätstests mit löslichem Protein .....	112
3.4.1.	AmbDH2 und AmbDH4.....	112
3.4.1.1.	AmbDH2 .....	113
3.4.1.2.	AmbDH4 .....	114
3.4.2.	PedPS7 und SorPS8.....	119
3.4.2.1.	PedPS7.....	120
3.4.2.2.	SorPS8 .....	137
3.4.3.	IndCyc11, ZinJ und SalBIII .....	138
3.4.3.1.	IndCyc11 .....	138
3.4.3.2.	ZinJ.....	141
3.4.3.3.	SalBIII .....	142

3.4.4.	NonS und PamS.....	143
3.4.5.	Zusammenfassung.....	147
3.5.	Enzymaktivitätstests mit immobilisiertem Protein .....	151
3.5.1.	Immobilisierung <i>via</i> His <sub>6</sub> -tag .....	151
3.5.1.1.	Ni-NTA .....	151
3.5.1.2.	Ni-TED.....	153
3.5.2.	Immobilisierung als <i>cross-linked enzyme aggregates</i> (CLEAs) .....	156
3.5.2.1.	AmbDH3-CLEA.....	157
3.5.2.2.	PedPS7-CLEA.....	178
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>183</b>
<b>5.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>187</b>
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>190</b>
6.1.	Material .....	190
6.2.	Methoden.....	190
6.2.1.	Biochemische und molekularbiologische Arbeiten.....	190
6.2.1.1.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	190
6.2.1.2.	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	191
6.2.1.3.	Stammhaltung.....	191
6.2.1.4.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> One Shot™ TOP10 .....	191
6.2.1.5.	Reinigung von DNA mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits.....	193
6.2.1.6.	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	193
6.2.1.7.	Agarosegelelektrophorese .....	193
6.2.1.8.	Polymerasekettenreaktion.....	194
6.2.1.9.	Enzymatische Hydrolyse von DNA .....	198
6.2.1.10.	Two-Step-SLIC.....	199
6.2.1.11.	Ligation von linearisierter DNA .....	200
6.2.1.12.	Gateway™-Klonierung .....	200
6.2.1.13.	DNA-Sequenzierung .....	201
6.2.2.	Proteinchemische Arbeiten.....	201
6.2.2.1.	Vorkulturen.....	201
6.2.2.2.	Expressionskulturen .....	202
6.2.2.3.	Zellernte.....	202
6.2.2.4.	Zellaufschluss mit Lysozymbehandlung .....	203
6.2.2.5.	Zellaufschluss mit Ultraschallbehandlung.....	203
6.2.2.6.	Diskontinuierliche SDS-PAGE .....	203
6.2.2.7.	Methoden zur Proteinreinigung und Analyse .....	204

6.2.2.8.	Enzymaktivitätstests mit löslichem Protein.....	208
6.2.2.9.	<i>In vivo</i> -Reaktionen.....	209
6.2.2.10.	Methoden zur Immobilisierung.....	209
6.2.2.11.	UPLC-MS-Analyse.....	213
6.2.2.12.	Normierung und Kalibrierung.....	214
6.2.3.	Synthetische Arbeiten.....	215
6.2.3.1.	Analyse mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie).....	215
6.2.3.2.	Säulenchromatographie.....	215
6.2.3.3.	Basische Esterhydrolyse des Substrats <b>169</b> .....	216
<b>7.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>217</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>227</b>
8.1.	Biochemikalien und Chemikalien.....	227
8.2.	Materialien und Geräte.....	228
8.2.1.	Materialien.....	228
8.2.2.	Geräte.....	229
8.3.	Primer, Plasmide, Bakterienstämme, synthetische Gene und Substrate.....	230
8.3.1.	Primer.....	230
8.3.2.	Plasmide.....	231
8.3.3.	Bakterienstämme.....	235
8.3.4.	Synthetische Gene.....	236
8.3.4.1.	<i>ambDH3</i> .....	236
8.3.4.2.	<i>ambDH2</i> .....	236
8.3.4.3.	<i>ambDH4</i> .....	237
8.3.4.4.	<i>indCyc11</i> .....	237
8.3.4.5.	<i>nonS</i> .....	237
8.3.4.6.	<i>pamS</i> .....	237
8.3.4.7.	<i>pedPS7</i> .....	238
8.3.4.8.	<i>sorPS8</i> .....	238
8.3.4.9.	<i>zinJ</i> .....	238
8.3.4.10.	Berechnete Parameter der produzierten Proteine.....	239
8.3.5.	Substrate und zyklisierte Produkte.....	240
8.4.	MS-MS-Analysen.....	242
8.4.1.	Gelbilder der SDS-PAGE.....	242
8.4.2.	Ergebnisse der MS-MS-Analysen.....	244
8.5.	Tabellen.....	253
8.6.	UPLC-MS-Chromatogramme.....	254

## Inhaltsverzeichnis

---

8.6.1.	Enzymaktivitätstests mit AmbDH3 .....	254
8.6.2.	Enzymaktivitätstests mit AmbDH4 .....	262
8.6.3.	Enzymaktivitätstests mit PedPS7 und SorPS8 .....	266
8.6.3.1.	Enzymaktivitätstests mit PedPS7 .....	266
8.6.3.2.	Enzymaktivitätstests mit SorPS8.....	273
8.6.4.	Enzymaktivitätstests mit IndCyc11, ZinJ und SalBIII .....	273
8.6.4.1.	Enzymaktivitätstests mit IndCyc11 .....	273
8.6.4.2.	Enzymaktivitätstests mit ZinJ.....	277
8.6.4.3.	Enzymaktivitätstests mit SalBIII.....	281
8.6.5.	Enzymaktivitätstests mit NonS und PamS .....	284
8.6.6.	Immobilisierung .....	289
8.6.6.1.	Enzymaktivitätstests mit Ni-TED-AmbDH3.....	289
8.6.6.2.	Enzymaktivitätstests mit AmbDH3-CLEA .....	295
8.6.6.3.	PedPS7-CLEA.....	342
8.7.	NMR-Spektren .....	346
8.7.1.	Enzymaktivitätstests mit PedPS7 .....	346
8.7.2.	Enzymaktivitätstests mit AmbDH3-CLEA .....	355
8.7.2.1.	Wiederverwendung.....	355
8.7.2.2.	Reaktion bei kontinuierlichem Fluß .....	362
	<b>Danksagung.....</b>	<b>364</b>
	<b>(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen .....</b>	<b>366</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	(NPRS-)Adenylierungsdomäne
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
AC	<i>Affinity Chromatography</i> , Affinitätschromatographie
ACP	<i>Acyl carrier protein</i> ; Acyl-Träger-Protein
AI(M)	Autoinduktion(smedium)
<i>amb</i> /Amb	Gene/Proteine der Ambruticin-Biosynthese
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Acyltransferase
bp	<i>Base pair</i> ; Basenpaar
C	<i>Condensation domain</i> ; Kondensationsdomäne
CA	Celluloseacetat
Carb <sup>R</sup>	Carbenicillin-Resistenz
CL	Crosslinking, Crosslinker
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i> , quervernetzte Enzymaggregate
CoA	Coenzym A
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CP	<i>Carrier-Protein</i> ; Träger-Protein
CspA	<i>Cold-shock protein A</i>
Cyc	Cyclase; Zyklase
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DH	Dehydratase
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

dYT	<i>Double yeast/tryptone</i> , zweifache Menge Hefeextrakt/Trypton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Enoylisomerase
<i>ent-</i>	<i>enantio-</i> , Enantiomer einer Verbindung
ER	Enoylreduktase
ESI	<i>Electrospray ionization</i> ; Elektrosprayionisation
FAS	<i>Fatty acid synthase</i> ; Fettsäure-Synthase
FD	<i>Fast digest</i> ; hoch aktiv
fwd	<i>Forward</i> ; vorwärts
× g	Mehrfaches der Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
HDA	Hetero-DIELS-ALDER-Reaktion
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
IAA	2-Iodacetamid
IBs	<i>Inclusion bodies</i>
IMOMA	Intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition
<i>ind/Ind</i>	Gene/Proteine der Indanomycin-Biosynthese
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
KR	Ketoreduktase
LEW	<i>Loading equilibration wash</i> ; Lade-Äquilibrierung-Wasch
MBP	<i>Maltose-binding protein</i> ; Maltosebindeprotein
mf	monofunktional
MPW	Milliporewasser, membranfiltriertes Wasser
MS	<i>Mass spectrometry</i> , Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> ; Molekulgewichtsausschlussgrenze
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis

n.d.	nicht durchgeführt
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i> ; Kern-Overhauser-Effekt
<i>non/Non</i>	Gene/Proteine der Nonactin-Biosynthese
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
NusA	<i>N-utilization substance protein A</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
P	NRPS-Peptidsynthetase
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>pam/Pam</i>	Gene/Proteine der Pamamycin-Biosynthese
PDB-ID	<i>Protein data bank identification code</i> , Proteindatenbankidentifizierungscode
PCP	<i>Peptide carrier protein</i> ; Peptid-Träger-Protein
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
<i>ped/Ped</i>	Gene/Proteine der Pederin-Biosynthese
PHYRE <sup>2</sup>	<i>Protein Homology/analogy Recognition Engine 2.0</i> ; Proteinhomologie/Analogie-Erkennungsprogramm 2.0
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Pyransynthase
PTFE	Polytetrafluorethylen
PKS	Polyketidsynthase
rev	<i>Reverse</i> ; rückwärts
RP	<i>Reversed phase</i> ; Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
S	Synthase
<i>sal/Sal</i>	Gene/Proteine der Salinomycin-Biosynthese



SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SLIC	<i>Sequence and ligation-independent cloning</i> ; sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung
SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin
SOC	<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression
<i>sor</i> /Sor	Gene/Proteine der Sorangicin-Biosynthese
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TED	Tris(carboxymethyl)-ethylendiamin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TOF	<i>Time of flight</i> ; Flugzeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
u	<i>Unified atomic mass unit</i> ; atomare Masseneinheit
U	<i>Units</i> ; Enzymeinheit
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
UpM	Umdrehungen pro Minute
VE	Voll entsalzt
<i>zin</i> /Zin	Gene/Proteine der Zincophorin-Biosynthese
Zyk	Zyklase

### 1. Einleitung

Heutzutage werden 64% aller Arzneimittel aus Naturstoffen gewonnen mit steigender Tendenz. Zusätzlich wächst das Bestreben, neue Naturstoffe als Arzneimittel trotz der zum Teil sehr anspruchsvollen und aufwendigen Synthesen zu etablieren. Um Naturstoffe effektiver und leichter zu synthetisieren, erfolgt ein stetiger Ausbau der kombinatorischen Chemie. Die Vorteile der Biosynthese unter der Verwendung von Aspekten der kombinatorischen Chemie im Vergleich zur rein chemischen Synthese bestehen darin, dass die Bedingungen während der Reaktion weniger toxisch sind und niedrigere Temperaturen zur Synthese eingesetzt werden können. Ebenso sind weniger Reaktionsschritte notwendig und eine größere Stereoselektivität kann bei der enzymkatalysierten Synthese erreicht werden.<sup>[1,2]</sup>

#### 1.1. Polyketide

##### 1.1.1. Allgemeine Struktur motive

Polyketide stellen eine Klasse von Naturstoffen mit breiter pharmakologischer Bedeutung dar, die viele interessante Kandidaten für die Wirkstoffforschung umfasst. Sie werden von Bakterien, Pilzen und Pflanzen produziert und können als verbreitetes Strukturmerkmal Sauerstoffheterozyklen aufweisen.<sup>[3,4]</sup>

Polyketide können in Form von Polyphenolen, Endiinen oder Makroliden auftreten und weisen eine größere Strukturvielfalt als Fettsäuren auf, wobei sie aus den Grundbausteinen Acetat und Propionat aufgebaut sind. Die Totalsynthese gestaltet sich als äußerst schwierig, weshalb für Polyketide meist biosynthetische Ansätze zur Bildung verfolgt werden. In der Medizin werden bereits Polyketide als Antibiotika, Immunsuppressiva, Antiparasitika sowie als cholesterinsenkende und tumorhemmende Wirkstoffe eingesetzt. Polyketid-basierte Wirkstoffe nahmen 2005 mit einem Anteil von 20% an den meist verkauften Medikamenten eine überproportional hohe Stellung ein.<sup>[5,6]</sup> Bekannte Beispiele hierfür sind Erythromycin A (**1**), Tetracyclin (**2**) und Mupirocin bzw. Pseudomoninsäure A (**3**), die als Antibiotika eingesetzt werden (Abbildung 1-1).<sup>[7,8]</sup>

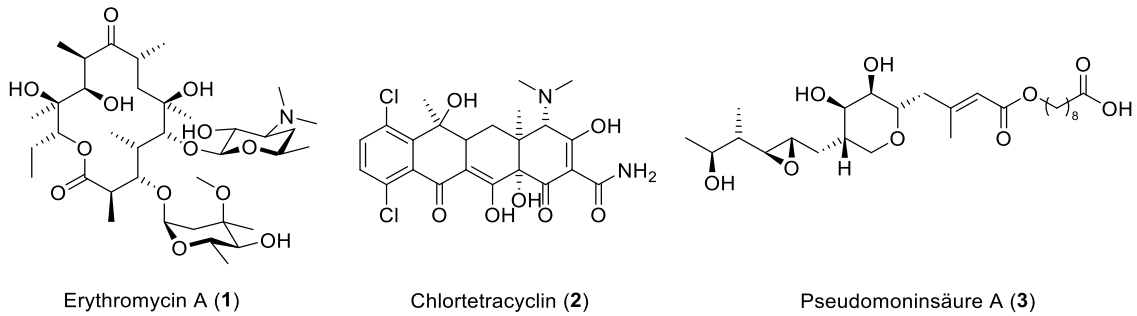


Abbildung 1-1. Strukturen verschiedener Polyketid-Wirkstoffe.

### 1.1.2. Polyketidsynthesen

Die hochkomplexen und bioaktiven Polyketide werden von großen, multifunktionalen Enzymkomplexen, Polyketidsynthesen (PKS), aus simplen Bausteinen wie Essigsäure oder Propionsäure biosynthetisiert. PKS sind große, multifunktionale Enzymkomplexe, die starke Ähnlichkeit zu den Synthesen der Fettsäurebiosynthese (FAS) besitzen. Die PKS sind aus verschiedenen aktiven Einheiten aufgebaut, welche als Module bezeichnet werden. Jedes Modul führt unabhängig zu einer Verlängerung der Kohlenstoffkette und Reduktion in das entsprechende Produkt. Die Module sind wiederum aus unterschiedlichen Domänen aufgebaut.<sup>[9,10]</sup> Bei den Domänen wird allgemein zwischen katalytischen Domänen, welche die Reaktionen durchführen, und *Carrier*-Domänen (*Acyl-Carrier-Proteine*; ACP), die die Zwischenprodukte binden, unterschieden. Die minimal notwendige Domänenstruktur besteht neben einer ACP-Domäne aus einer Ketosynthase (KS)-Domäne, welche durch CLAISEN-Kondensation zu einer Verlängerung der Kette führt.<sup>[9,11]</sup>

Das Lademodul jeder PKS bestimmt die Starteinheit, die in den nachfolgenden Modulen durch verschiedene C<sub>2</sub>-Einheiten verlängert wird. Die Auswahl der Starteinheit bzw. des Verlängerungsbausteins geschieht durch die Acyltransferase (AT)-Domäne. Die Elongationsbausteine eines PKS-Systems können in der  $\alpha$ -Position variieren; hier können beispielsweise Substituenten wie H (Malonyl-Coenzym A (-CoA) **4**), Me (Methylmalonyl-CoA **5**), Et (Ethylmalonyl-CoA **6**) oder OMe (Methoxymalonyl-CoA **7**) auftreten (Abbildung 1-2).

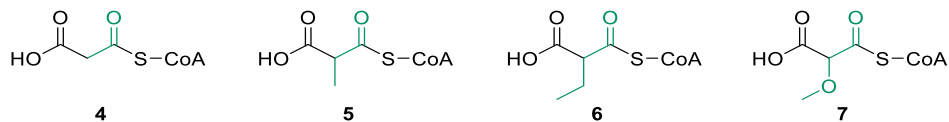
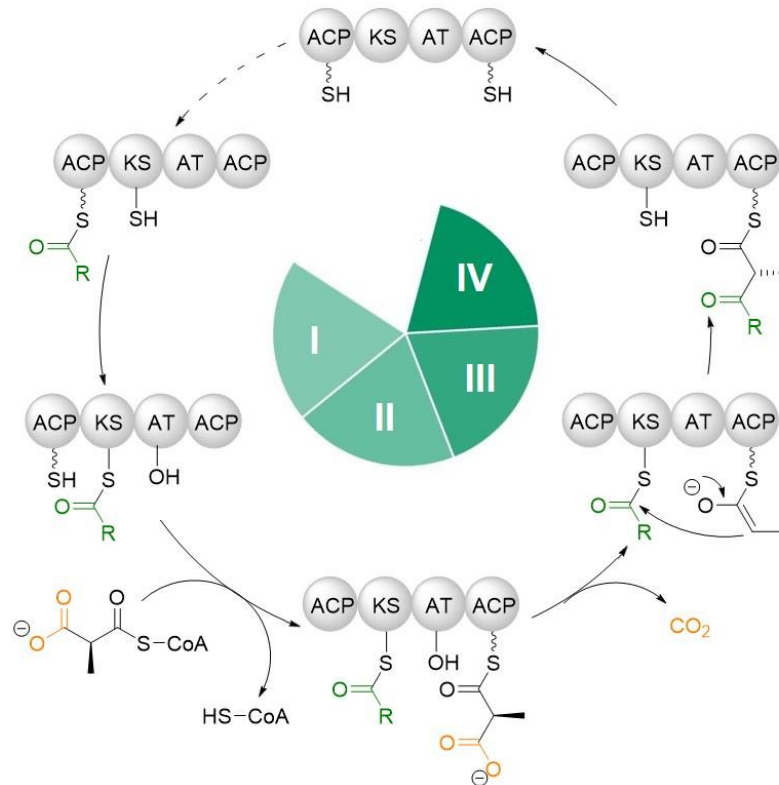


Abbildung 1-2. Strukturen verschiedener Start- und Elongationsbausteine der Polyketid-Biosynthese. Malonyl-CoA **4**, Methylmalonyl-CoA **5**, Ethylmalonyl-CoA **6** und Methoxymalonyl-CoA **7**. Die **grün** hervorgehobenen Strukturen verbleiben im Naturstoff.<sup>[3,12,13]</sup>

Zudem existieren noch weitere Bausteine wie Propionyl-CoA, *iso*-Butyryl-CoA, Benzyl-CoA, 2-Cyclopentylcarbonsäure-CoA, die beispielsweise in den Biosynthesen von Tylostin, Lipomycin, Soraphen 193 und Borrelidin als Startbaustein verwendet werden.<sup>[14-17]</sup> Die Auswahl des Bausteins ist abhängig von der Sequenz der AT-Domäne.<sup>[3,18]</sup> Unabhängig von der Struktur des Bausteins wird dieser von der AT über ein Serin gebunden und die Verlängerungseinheit anschließend auf den Phosphopantethein-Rest des ACP übertragen.<sup>[12,13]</sup> Die Auswahl der Starteinheit bzw. des Verlängerungsbausteins geschieht in *cis*-AT-Systemen durch die modulintegrierte Acyltransferase (AT)-Domäne, die in der Anordnung der Enzyme integriert ist. Bei *cis*-AT PKS besteht eine enge Korrelation zwischen der Domänenstruktur und der daraus resultierenden Struktur des Kettenverlängerungsintermediats. Dieses Prinzip der Kollinearität ermöglicht die Vorhersage von Polyketidkernstrukturen aus den Sequenzen der jeweiligen PKS und umgekehrt.<sup>[19]</sup>

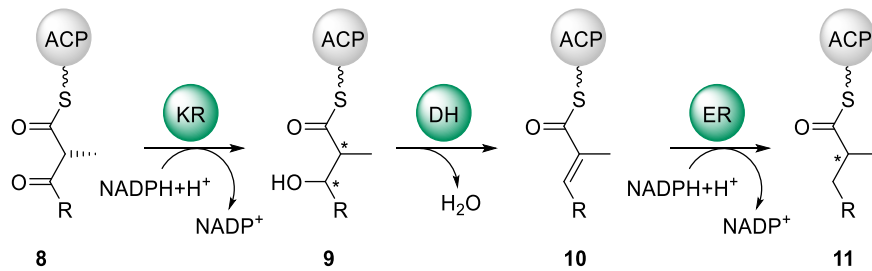
Bei *trans*-AT weicht die Architektur von denen der kanonischen *cis*-Systeme ab, da keine diskreten AT-Domänen in den Modulen vorhanden sind. Deshalb läuft die Beladung der ACP durch eine oder mehrere diskrete, *trans*-agierende ATs ab, die iterativ mehrere Module bedienen. Bei den *trans*-AT PKS wird die wachsende Polyketidkette von jedem Modul typischerweise um einen Baustein verlängert. Der minimale Domänensatz beinhaltet eine KS zur Kettenverlängerung und ein ACP. Ein wichtiges Merkmal dieser PKS ist die große Vielfalt an Modulvarianten durch ungewöhnliche Domänen und Domänenkombinationen. Zudem existieren Abweichungen wie Tandemdomänen, zusätzliche oder fehlende Aktivitäten, neuartige Domänen oder ungewöhnliche Domänenreihenfolgen.<sup>[19,20]</sup>

Der grundlegende Ablauf der Biosynthese von Polyketiden beginnt mit einem Acylrest, der durch Transacylierung vom ACP des vorherigen Moduls auf die Ketosynthase (KS)-Domäne übertragen wird (**Schritt I**, Abbildung 1-3). Das ACP des eigenen Moduls wird durch die AT mit dem entsprechenden Elongationsbaustein (hier: Methylmalonat) beladen (**Schritt II**). Die an diesem Prozess beteiligte AT ist neben der KS und dem ACP eine der drei Domänen, die jedes Modul enthält. Durch die KS-katalysierte CLAISEN-Kondensation kommt es zur Decarboxylierung des gebundenen Malonats und Aufbau einer neuen C-C-Bindung (**Schritt III**). Anschließend übernimmt die KS des folgenden Moduls die wachsende Polyketidkette (**Schritt IV**). Durch Wiederholung der CLAISEN-Kondensation zwischen dem  $\beta$ -Keto-thioester und weiteren Malonsäurethioestern wird das Polyketid schrittweise verlängert.



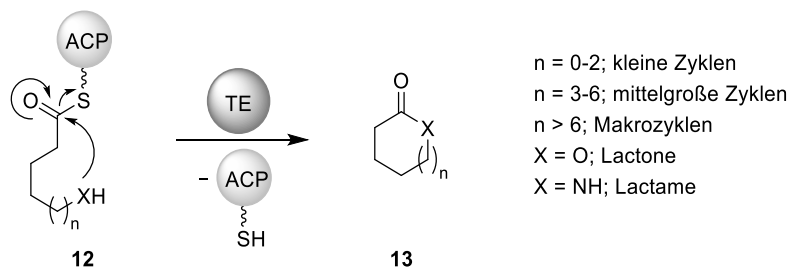
**Abbildung 1-3. Elongationsprozess während der Biosynthese von Polyketiden.** (I) Die KS übernimmt die Polyketidkette der ACP des vorherigen Moduls. (II) Die AT belädt das modulinterne ACP mit dem gewählten Elongationsbaustein (hier: Methylmalonyl-CoA). (III) Die KS-katalysierte decarboxylative CLAISEN-Kondensation findet statt, d.h. das gebundene Malonat wird decarboxyliert und eine neue C-C-Bindung aufgebaut. (IV) Anschließend übernimmt die KS des folgenden Moduls die Polyketidkette. Cystein:  $-\text{SH}$ ; Serin:  $-\text{OH}$ ; Phosphopantethein:  $\sim\text{SH}$ .<sup>[21]</sup> In Anlehnung an M. SCHRÖDER.<sup>[22]</sup>

Die Synthesen tragen signifikant zur hohen Komplexität von Polyketiden bei, indem sie das Gerüst schrittweise verlängern und den gebildeten  $\beta$ -Ketothioester optional durch Keto-reduktase- (KR), Dehydratase- (DH) und Enoylreduktase (ER)-Domänen reduktiv prozessieren (Abbildung 1-4). Die Ketofunktion in **8** kann zuerst durch eine KR stereoselektiv zum Alkohol **9** reduziert werden. Je nach Aktivität der KR kann zwischen verschiedenen Typen unterschieden werden. Der entstandene Alkohol **9** kann durch eine DH zum Olefin **10** dehydratisiert und abschließend durch eine ER zum Alkan **11** hydriert werden. Die Kombination dieser Domänen wird als reduktive Schleife bezeichnet. Alternativ können die entstehenden Moleküle **8-10** als Bausteine für die nächste Kettenverlängerung *via* CLAISEN-Kondensation eingesetzt werden, sodass reduzierte Polyketide resultieren.



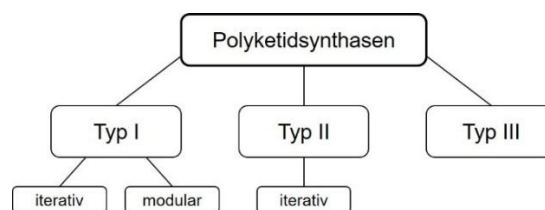
**Abbildung 1-4. Grundprinzip der reductiven Schleife einer PKS.** Die anfängliche stereoselektive Reduktion des ACP-gebundenen  $\beta$ -Ketothioesters **8** zum  $\beta$ -Alkohol **9** geschieht durch die Ketoreduktase (KR)-Domäne. Anschließend erfolgt die  $\beta$ -Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}$  durch die Dehydratase (DH)-Domäne. Das entstandene Olefin **10** wird von der Enoylreduktase (ER)-Domäne zum gesättigten Alkan **11** stereoselektiv reduziert.

Die Thioesterase (TE)-Domäne ist für die Freisetzung der vollständig prozessierten Polyketidkette von der ACP-Domäne und die damit verbundene Zyklisierung verantwortlich (Abbildung 1-5).<sup>[7,23]</sup> Die Reaktion läuft über die Transacylierung des Thioesters eines ACP-gebundenen Polyketids auf ein Nukleophil. In den meisten Fällen steht das Nukleophil für Sauerstoff oder Stickstoff, was zur Bildung von Lactonen oder Lactamen führt. Meistens katalysieren die TE-Domänen die Bildung von Makrozyklen, seltener von kleinen und mittleren Zyklen.<sup>[24]</sup> Weitere Modifikationen durch nichtkanonische PKS-Domänen und *Tailoring*-Enzyme können durch Hydroxylasen, Methylasen, Glycosyltransferasen oder Zyklasten eingeführt werden.<sup>[25]</sup>



**Abbildung 1-5. TE-katalysierte Freisetzung und Zyklisierung der Polyketidkette **12** vom ACP.** In den meisten Fällen steht das Nukleophil  $\text{X}$  für Sauerstoff oder Stickstoff, was zur Bildung von Lactonen oder Lactamen führt.<sup>[24]</sup>

Die PKS können anhand ihrer Struktur und Wirkungsweise in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Abbildung 1-6), wobei allesamt ihre Produkte durch sequenzielle, decarboxylierende CLAISEN-Kondensation aufbauen. Innerhalb des Polyketidwegs werden somit über PKS des Typs I, II und III, mit ACP oder CoA thioveresterte Acylgruppen untereinander verknüpft.<sup>[4]</sup>

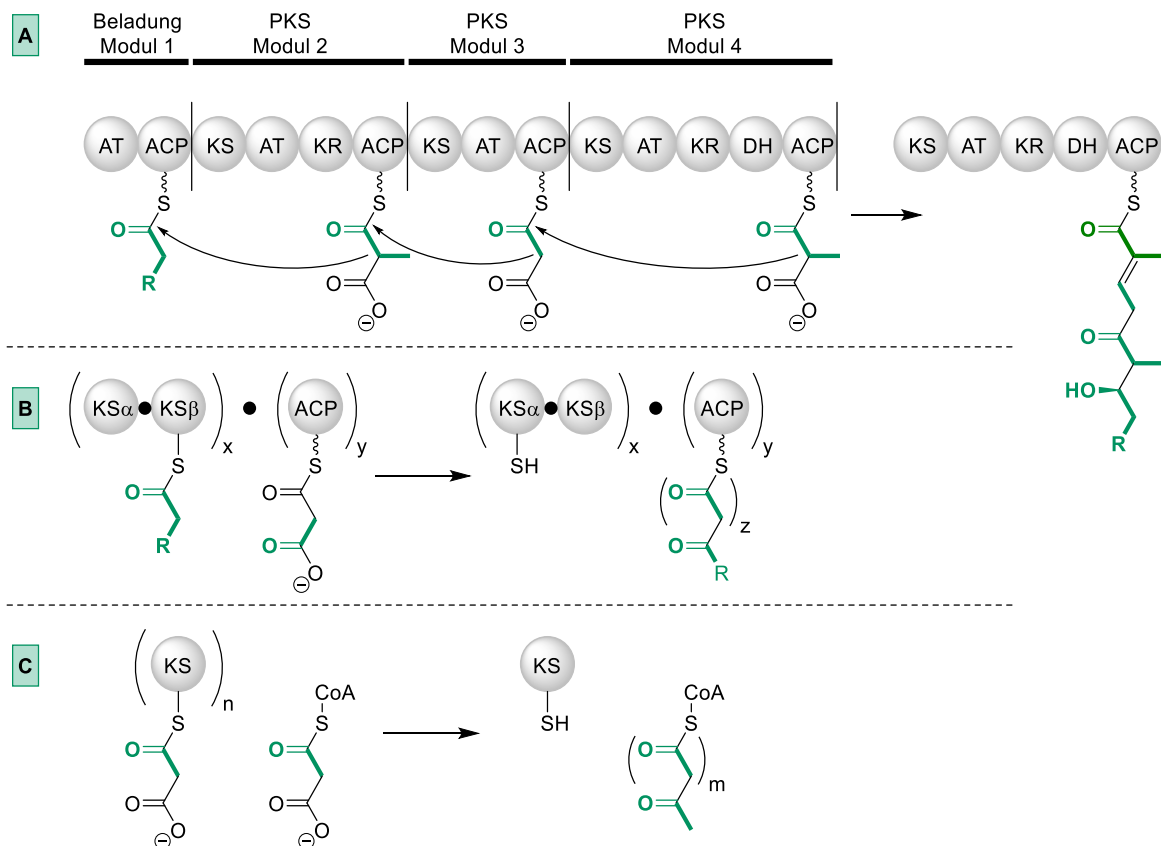


**Abbildung 1-6. Übersicht über die verschiedenen Typen von PKS.**

1.1.2.1. Typ I

PKS des Typs I sind multimodular und besitzen linear angeordnete, kovalent verknüpfte enzymatische Domänen, ähnlich den FAS in Tieren und Pilzen.<sup>[26]</sup> Durch die Eigenschaften der Katalyse kann zwischen modularen und iterativen Typ I PKS unterschieden werden abhängig davon, ob das Polyketidrückgrat in aneinandergereihten Modulen oder wiederholend in einem Modul verlängert wird.<sup>[27]</sup> Die KS-Domäne von iterativen PKS katalysiert mehr als einen Verlängerungszyklus, wohingegen bei modularen PKS nur eine Verlängerung pro Enzym durchgeführt wird.<sup>[7]</sup> Bakterielle Typ I PKS wurden zuerst 1990 in der Literatur erwähnt und können den modularen Typ I PKS zugeordnet werden.<sup>[26,28,29]</sup> Monomodulare, iterativ agierende Typ I PKS können in Pilzen gefunden werden.<sup>[30]</sup>

Die sequenzielle Verlängerung und Funktionalisierung der Polyketidkette erfolgt durch das bereits beschriebene Zusammenspiel von ACP, AT- und KS-Domänen sowie von KR-, DH-, ER- und TE-Domänen (Abbildung 1-7). Die Produkte der Typ I PKS sind meist reduziert und hoch funktionalisiert (Abbildung 1-8).<sup>[31]</sup>



**Abbildung 1-7. Übersicht über die drei verschiedenen Typen von PKS.** A) Typ I PKS (am Beispiel der Erythromycin A-PKS) zeichnen sich durch mehrere nicht-iterative Module aus, die komplexe Polyketide biosynthetisieren. B) Typ II PKS (am Beispiel der Tetracenomyacin-PKS) bestehen aus mehreren iterativen Einheiten, wodurch die resultierenden Polyketide ebenfalls aus Wiederholungseinheiten aufgebaut sind. C) Typ III PKS (am Beispiel der 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalensynthase-PKS) kommen hauptsächlich in Pflanzen vor und arbeiten unabhängig von ACPs.<sup>[28]</sup>

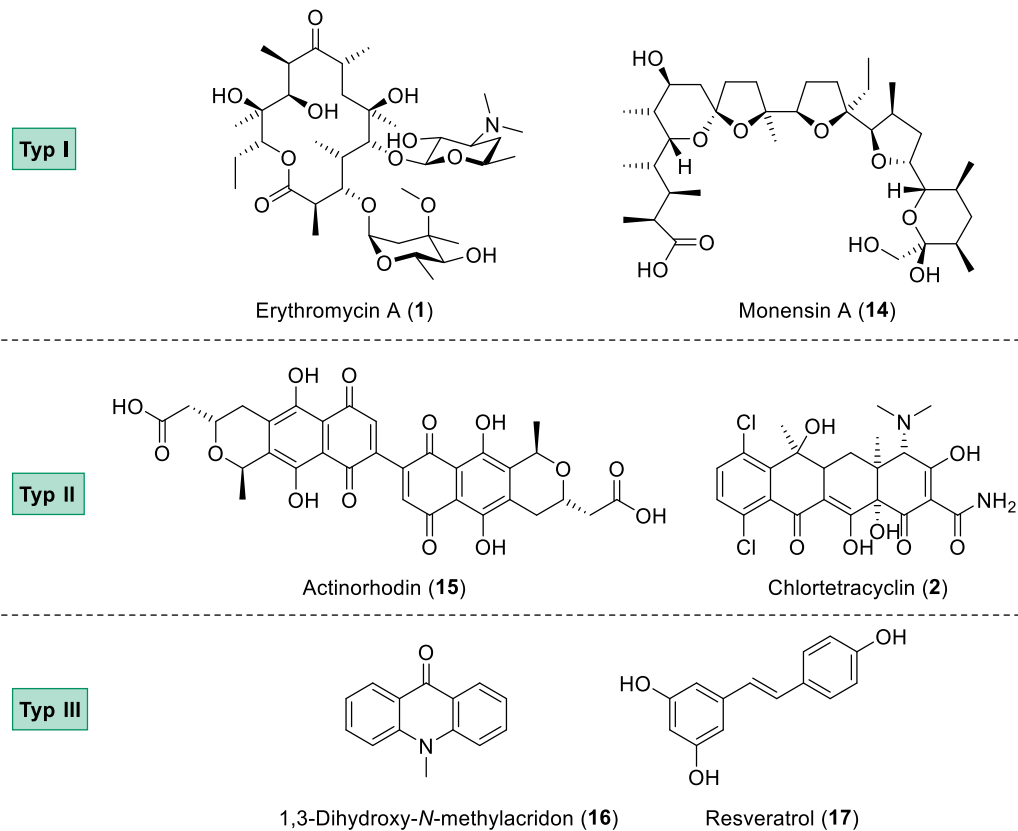


Abbildung 1-8. Strukturen von ausgewählten Polyketiden des Typs I<sup>[3,32,33]</sup>, II<sup>[34,35]</sup> und III<sup>[36,37]</sup>.

#### 1.1.2.2. Typ II

Typ II PKS können in Bakterien gefunden werden und sind iterativ agierende Multienzymkomplexe, ähnlich den Typ II FAS aus Bakterien und Pflanzen.<sup>[38]</sup> Seit 1984 sind iterative Typ II PKS bekannt, modulare Typ II PKS wurden bis jetzt nicht publiziert.<sup>[29,39]</sup> PKS werden dem Typ II zugeordnet wenn ein dissozierbarer Komplex aus monofunktionellen (mf) Enzymen vorliegt.<sup>[7]</sup> Die minimale PKS setzt sich aus den Enzymen  $KS_{\alpha}$ ,  $KS_{\beta}$  (als *chain length factor* bezeichnet) sowie einem ACP zusammen, die die iterative Verlängerung einer Acyl-CoA-Starteinheit mit Malonyl-CoA katalysieren.<sup>[40]</sup> Mithilfe zusätzlicher KR-Domänen, Zyklastasen oder Aromatasen wird das gebildete Produkt gefaltet und zyklisiert. Die gebildeten Polyketide sind meist polyzyklisch und aromatisch mit ähnlich starker Funktionalisierung wie die des Typs I (Abbildung 1-8).<sup>[31,40,41]</sup>

#### 1.1.2.3. Typ III

Typ III PKS sind homodimere Enzyme, die ebenfalls iterativ agieren und den Chalkon-Synthasen ähnlich sind.<sup>[28,42]</sup> Typ III PKS können in Pflanzen, Braunalgen, Bakterien und Pilzen gefunden werden.<sup>[38,43]</sup> Der größte Unterschied zu den anderen Typen besteht darin, dass Typ III PKS nicht von *Carrier*-Domänen abhängig sind.<sup>[28]</sup> Sie katalysieren in nur einem



aktiven Zentrum die iterative Verlängerung diverser Acyl-CoA-Starteinheiten mit Malonyl-CoA sowie eine anschließende Zyklisierung. Die resultierenden Produkte sind häufig mono- oder bizyklische, aromatische Verbindungen mit weniger Funktionalisierungen als die des Typs II (Abbildung 1-8).<sup>[31,40,41]</sup>

## 1.2. Heterozyklen

### 1.2.1. Vorkommen von Heterozyklen in der Natur und Wirkstoffen

Heterozyklen sind wichtige Strukturelemente, die in Naturstoffen aller Klassen und auch in vielen biologisch aktiven, synthetischen Verbindungen enthalten sind. Diese tragen oft wesentlich zu den strukturellen und physikalischen Eigenschaften sowie zur biologischen Aktivität bei. Sauerstoffheterozyklen, wie substituierte Pyrane und Furane, stellen aufgrund ihrer natürlichen Abundanz und der vielfältigen biologischen Funktionen eine wichtige Klasse der heterozyklischen Verbindungen dar. Ihr Rückgrat weist mehrere potentiell chirale und funktionalisierbare Kohlenstoffatome auf. Daher ist ihre Herstellung meist aufwändig und erfordert hochspezifische Synthesemethoden. Sie kommen hauptsächlich in Kohlenhydraten, Polyketiden, Peptiden und Terpenoiden vor. Im Fall der Sauerstoffheterozyklen ist es erstrebenswert, neue Methoden für eine zuverlässigere und effizientere Synthese als mit aktueller Methodik zu entwickeln. Die biosynthetischen Mechanismen zur Bildung von Heterozyklen sind vielfältig und reichen von einfachen Additions- oder Kondensationsreaktionen bis hin zu oxidativen Ringschlüssen. Aufgrund der Vielfalt an mechanistisch unterschiedlichen Zyklisierungsmodi, steigt das Interesse für die verantwortlichen Enzyme. Das Verständnis der Enzymologie ist somit essentiell für den Einsatz der Enzyme als chemoenzymatische Werkzeuge in der Naturstoffsynthese und der medizinischen Chemie.<sup>[24,44]</sup>

### 1.2.2. Chemische Synthesemöglichkeiten

Aufgrund des Wirkungsspektrums komplexer Polyketide stellen Naturstoffe mit Heterozyklen bis heute synthetische Ziele von verschiedensten Forschungsgruppen dar.<sup>[45]</sup> Eine Schlüsselreaktionen bei der Synthese dieser Moleküle ist die Bildung der Sauerstoffheterozyklen. Durch die Vielzahl an mittlerweile bekannten Naturstoffsynthesen wurden bereits diverse Zugänge zu diesen Motiven entwickelt.

Eine einfache Methode stellt die unselektive Zyklisierung *via* **oxa-MICHAEL-Addition** in der Totalsynthese von Jerangolid (**71**) von LINDNER *et al.*<sup>[46]</sup> dar (Abbildung 1-9). Bei der Struktur **18** handelt es sich um ein MICHAEL-System mit einem potentiellen Reaktionspartner im 1,7-Abstand. Der Ringschluss erfolgt durch Angriff des nach Deprotonierung vorliegenden Alkoholat-Anions an der Doppelbindung. Alle Substituenten am neu entstandenen Pyranring

von **19** sind aufgrund möglicher 1,3-Abstoßungen äquatorial ausgerichtet. Bei dieser Synthese kann keine Kontrolle der C2-Konfiguration erfolgen, was für die Jerangolid-synthese jedoch keinen Nachteil darstellt.

Die Synthese des Pyrans **21** konnten CRIMMINS *et al.*<sup>[47]</sup> durch eine intramolekulare, stereoselektive **oxa-MICHAEL-Addition** am  $\alpha,\beta$ -ungesättigten System **20** und nachfolgende Reduktion verwirklichen (Abbildung 1-9).

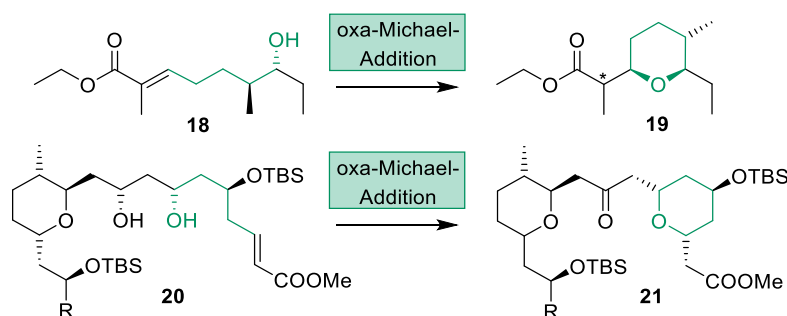


Abbildung 1-9. Zyklisierung zu den Sauerstoffheterozyklen **19** bzw. **21** via oxa-MICHAEL-Addition aus der Totalsynthese von Jerangolid E (**71E**) nach LINDNER *et al.*<sup>[46]</sup> bzw. des (+)-Leucascandrolid A-Makrolactons nach CRIMMINS *et al.*<sup>[47]</sup>.

LEE *et al.*<sup>[48]</sup> und LIU *et al.*<sup>[49]</sup> planten in ihren jeweiligen Totalsynthesen von Ambruticin S (**63S**) verschiedene Methoden zum Aufbau des Hydropyrans im Ostfragment (Abbildung 1-10). LEE *et al.*<sup>[48]</sup> baute das Intermediat **23** über **Ringschlussmetathese** am chiralen Dien **22** unter Zuhilfenahme eines Katalysators und nachfolgender Oxidation auf.

LIU *et al.*<sup>[49]</sup> nutzten die **Hetero-DIELS-ALDER (HDA)-Reaktion**, eine [4+2]-Cycloaddition, um die Pyranspezies **26** aus dem Aldehyd **24** und dem Dien **25** zu synthetisieren. Während metallkatalysierte Metathesereaktionen lediglich zum olefinischen Ringschluss führen, kann die Stereoselektivität bei der HDA-Reaktion durch einen chiralen Chromkatalysator erreicht werden und somit gezielt Stereozentren aufgebaut werden. Der selektive Zugang zum westlichen Tetrahydropyran (THP) in Ambruticin S gelang ebenfalls über eine chromkatalysierte Variante der HDA-Reaktion.<sup>[49]</sup>

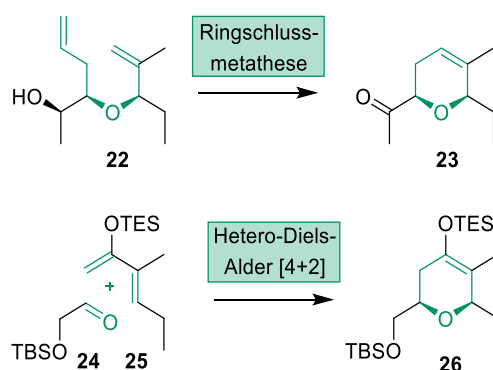


Abbildung 1-10. Zyklisierung zu den Sauerstoffheterozyklen **23** und **26** via Ringschlussmetathese bzw. asymmetrischer Hetero-DIELS-ALDER-Reaktion aus der Totalsynthese von Ambruticin (**63**) nach LEE *et al.*<sup>[50]</sup> bzw. LIU *et al.*<sup>[49]</sup>.

Weiterhin besteht die Möglichkeit zum Aufbau eines Sauerstoffheterozyklus durch die von KURODA *et al.*<sup>[51]</sup> durchgeführte **Epoxidöffnung** während der Totalsynthese von Phomactin A (Abbildung 1-11). Aufgrund räumlicher Abschirmung kann der nukleophile Angriff am dreigliedrigen Ring in **28** erst nach einer Kaskade aus Oxidation und anschließender Reduktion der Hydroxygruppe stattfinden, sodass der THP-Ring in **29** stereoselektiv geschlossen wird.

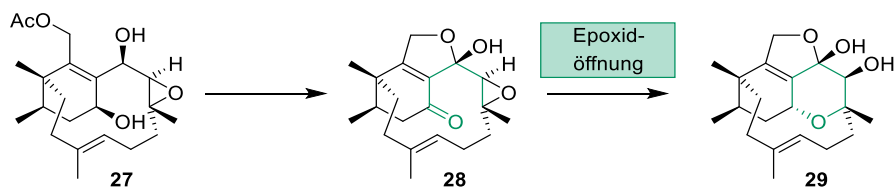


Abbildung 1-11. Zyklisierung zum Sauerstoffheterozyklus **29** via Epoxidöffnung aus der Totalsynthese von Phomactin A nach KURODA *et al.*<sup>[51]</sup>.

KOPECKY *et al.*<sup>[52]</sup> nutzten dagegen eine selektive Sequenz aus **MUKAIYAMA-Aldoladdition** und **PRINS-Zyklisierung** (Abbildung 1-12). Diese Art der Kondensation von Aldehyden und Alkenen unter dem Einfluss einer Säure gewann im Laufe der Zeit immer mehr an Bedeutung, insbesondere die intramolekulare Variante zur Erzeugung von Sauerstoffheterozyklen.<sup>[53]</sup> Die LEWIS-Säurekatalysierte Aldoladdition des Enolethers **31** an den Aldehyd **30** liefert das intermediär gebildete oxa-Carbeniumion. Dieses wird durch den nukleophilen C7-Kohlenstoff abgefangen, woraus **32** resultiert.

NASINI *et al.*<sup>[54]</sup> führte die Reaktion mit dem Lactol **34** durch und erhielt so den chlorierten THP-Ring **35** (Abbildung 1-12). Die LEWIS-Säure ermöglicht durch Aktivierung des Aldehyds den Angriff der Doppelbindung von **33**. Der anschließende Ringschluss erfolgt durch einen nukleophilen Angriff des Alkohols.

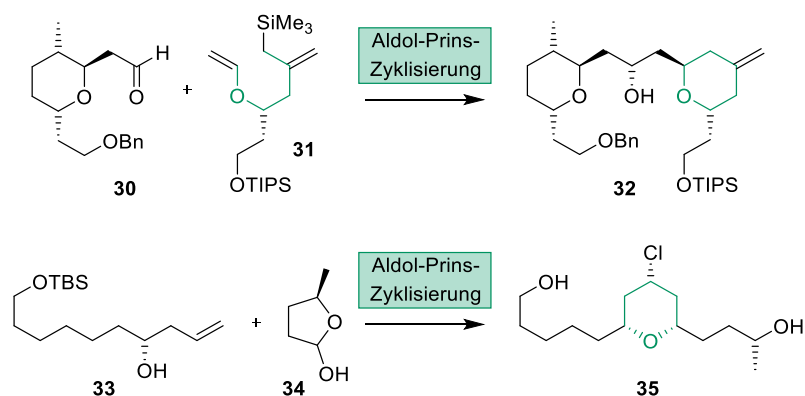


Abbildung 1-12. Zyklisierung zu den Sauerstoffheterozyklen **32** bzw. **35** via Aldol-PRINS-Zyklisierung aus der Totalsynthese des (+)-Leucascandrolid A Makrolactons nach KOPECKY *et al.*<sup>[52]</sup> bzw. der Totalsynthese des (+)-Spirolaxin-Methylethers nach NANNEI *et al.*<sup>[54]</sup>.

Zudem existieren weitere Methoden zur Synthese von Sauerstoffheterozyklen wie beispielsweise über *Ti*-vermittelte Olefinmetathesen.<sup>[55,56]</sup> NICOLAOU *et al.*<sup>[57]</sup> entwickelten

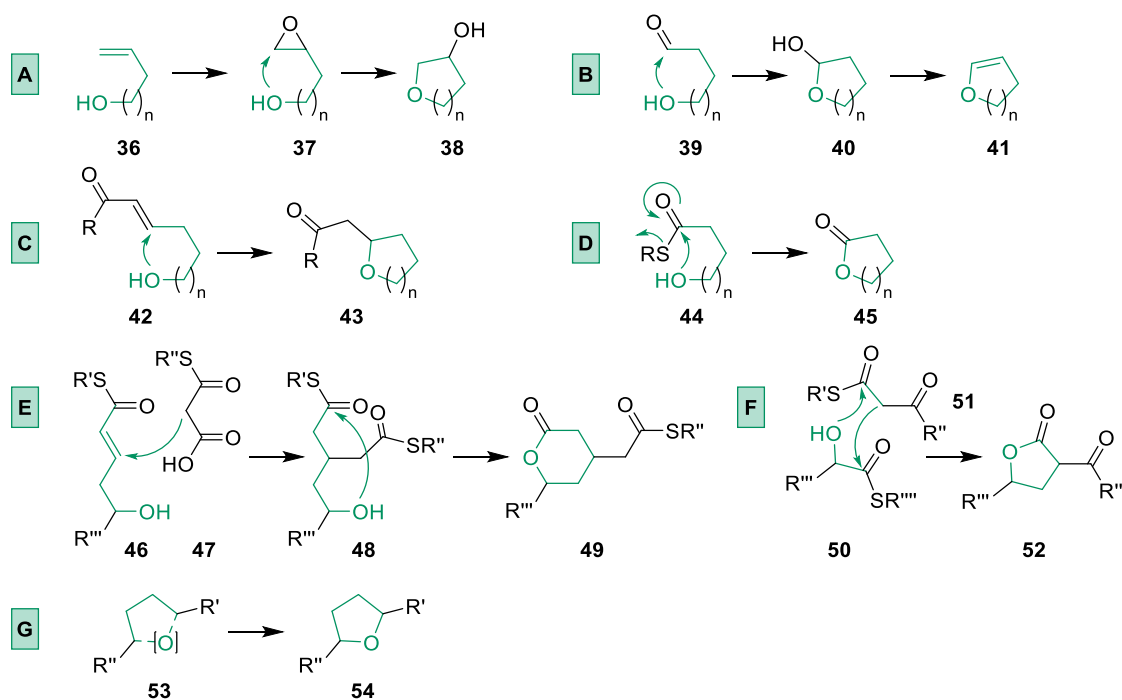
daneben noch eine weitere Methode, die den Zugang zu größeren Ringsystemen über eine S-Elektrophil-Zwischenstufe ermöglicht.

### 1.2.3. Biochemische Mechanismen

Die vielfältige Bioaktivität von komplexen Polyketid-Naturstoffen lässt sich häufig auf die heterozyklischen Motive zurückführen. Die Erforschung des biosynthetischen Aufbaus dieser Naturstoffe wird deshalb verstärkt von Forschungsgruppen verfolgt.<sup>[24,58,59]</sup> Aufgrund der Vielfalt an mechanistisch unterschiedlichen Zyklisierungsmodi, steigt das Interesse für die verantwortlichen Enzyme. Das Verständnis der Enzymologie ist essentiell für den Einsatz der Enzyme als chemoenzymatische Werkzeuge in der Naturstoffsynthese und der medizinischen Chemie. Die synthetische Chemie macht sich verschiedenste Reaktionstypen zum Aufbau von Sauerstoffheterozyklen zu Nutze (siehe Abschnitt 1.2.2),<sup>[45]</sup> wohingegen die biosynthetische Bildung von Hydropyranen und -furanen über nukleophile Additions- bzw. Substitutionsreaktion einer Hydroxygruppe an verschiedene Akzeptoren abläuft.<sup>[24]</sup>

Sauerstoffheterozyklen können nach sieben grundlegenden Wegen biosynthetisiert werden (Abbildung 1-14). Diese umfassen die nukleophile Addition einer Hydroxygruppe an Elektrophile wie Epoxide **37**, Carbonylgruppen **39** oder MICHAEL-Akzeptoren **42**, möglicherweise gefolgt von einer weiteren Prozessierung (Abbildung 1-14A-C). Kohlenstoff-Kohlenstoff und Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen können effektiv durch MICHAEL- und Hetero-MICHAEL-Additionen gebildet werden.<sup>[60]</sup> Die oxa-MICHAEL-Addition erfolgt an einem  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Thioesterzwischenprodukt, was zur Bildung von Sauerstoffheterozyklen und der Entstehung von bis zu zwei neuen Stereozentren führt. Das Vorkommen der oxa-MICHAEL-Addition in mehreren Polyketid-Biosynthesewegen wurde für ein Jahrzehnt auf Grundlage von Gencluster-Analysen lediglich postuliert, jedoch ist erst in jüngster Zeit eine *in vitro*-Charakterisierung verantwortlicher katalytischer Einheiten gelungen.<sup>[9]</sup>

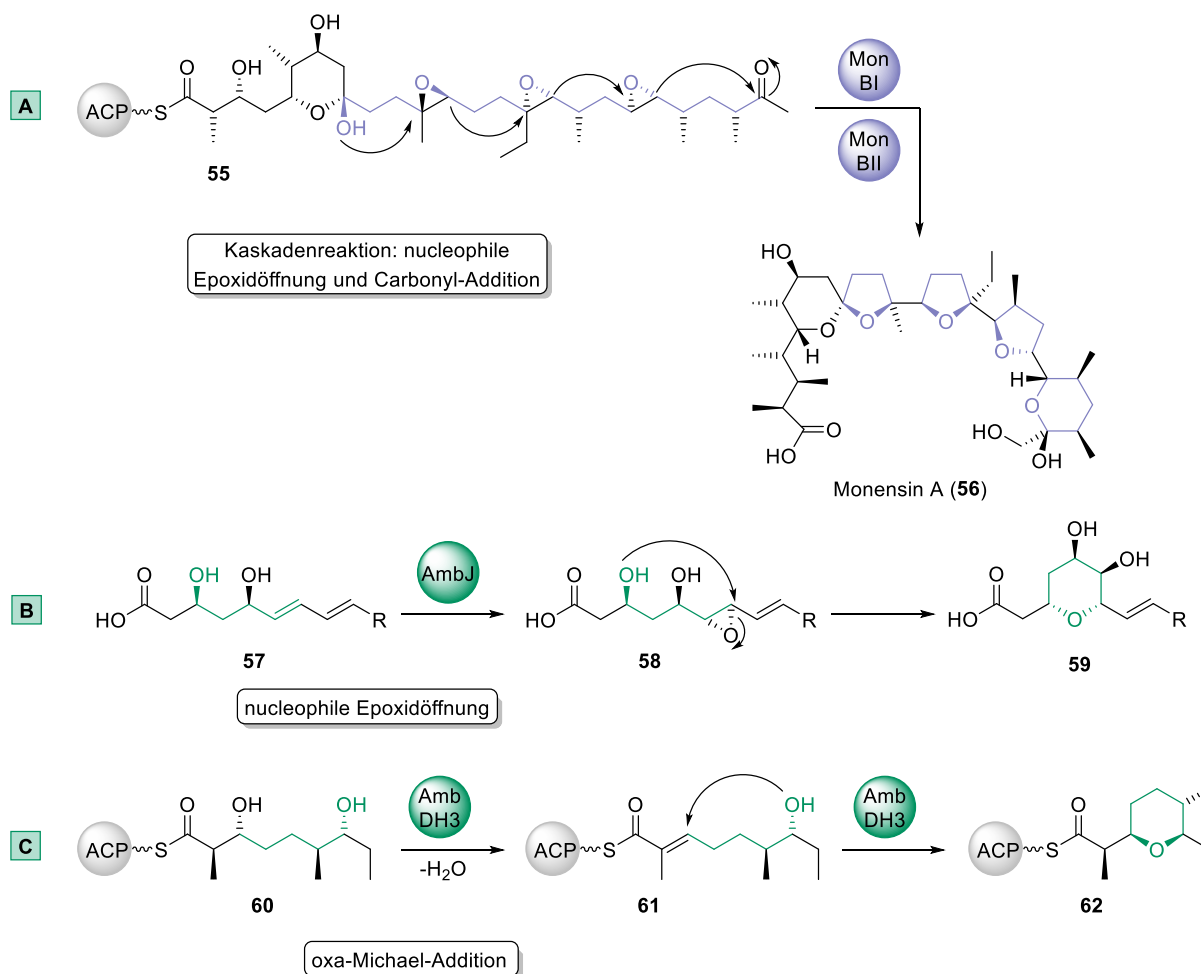
Weiterhin besteht die Möglichkeit der Transacylierung eines Thioesters zu einer Hydroxygruppe, wodurch Lactone **45** gebildet werden (Abbildung 1-14D). Eine Kaskade aus MICHAEL-Addition und Lactonisierung führt zu Pyranonen mit einem Substituenten in 4-Position (wie in **49**; Abbildung 1-14E). Bei der Acylierung-DIECKMANN-Kondensation zwischen 2-Hydroxythioestern **51** und  $\beta$ -Ketothioestern **50** entstehen 3-Acylfuran-2-onen **52** (Abbildung 1-14F). Eine weitere Möglichkeit der biosynthetischen Bildung von Furanringen (wie in **54**) besteht in der oxidativen Zyklisierung nach CH-Aktivierung von Alkylkohlenstoffen (Abbildung 1-14G).<sup>[24]</sup>



**Abbildung 1-13. Mechanismen der biosynthetischen Bildung von Sauerstoffheterozyklen.** A-C) Nucleophile Addition einer Hydroxygruppe an Elektrophile wie Epoxide **37**, Carbonylgruppen **39** oder MICHAEL-Akzeptoren **42**; D) Transacylierung eines Thioesters zu einer Hydroxygruppe; E) MICHAEL-Additions-Lactonisierungskaskade; F) Acylierung-DIECKMANN-Kondensation; G) Oxidative Zyklisierung nach CH-Aktivierung von Alkylkohlenstoffen; in Anlehnung an HEMMERLING *et al.*<sup>[24]</sup>.

Im Folgenden sind drei konkrete Beispiele der Bildung von Sauerstoffheterozyklen dargestellt (Abbildung 1-14). Der am häufigsten vorkommende Reaktionstyp ist die **nucleophile Epoxidöffnung**, wie in der Biosynthese von Monensin A (**56**, Abbildung 1-14B). Die Reaktion verläuft durch das Zusammenspiel von MonBI und MonBII und die damit katalysierte Kaskaden-Zyklisierung des Triepoxids **55** zum Polyether **56**.<sup>[61]</sup> Durch den nucleophilen Angriff der Hydroxygruppe erfolgt der Aufbau der drei THF- und des östlichen THP-Rings in **56** über stereoselektive  $S_N2$ -Epoxidöffnungen und Carbonyl-Addition. Der THP-Ring im westlichen Fragment von Ambruticin (**63**) wird über ähnliche Weise biosynthetisiert. Aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten Epoxidasen wird angenommen, dass das *Tailoring*-Enzym AmbJ die stereoselektive Epoxidierung von **57** zum Intermediat **58** katalysiert. Das Hydropyran **59** wird durch nachfolgende **stereoselektive Epoxidöffnung** entweder spontan oder durch AmbJ-Katalyse gebildet.<sup>[62]</sup>

Anders verhält es sich bei der Bildung des Pyranrings **62** im östlichen Fragment von Ambruticin (**63**), der durch AmbDH3-katalysierte **oxa-MICHAEL-Addition** gebildet wird (Abbildung 1-14C). Nach Dehydratisierung von **60** erfolgt die diastereoselektive Zyklisierung des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Systems **61** zum THP **62** *via* oxa-MICHAEL-Addition durch die bifunktionale Dehydratase AmbDH3. Daneben existieren noch zahlreiche weitere Beispiele für Zyklasten, deren Mechanismus auf intramolekularen oxa-MICHAEL-Additionen basiert.

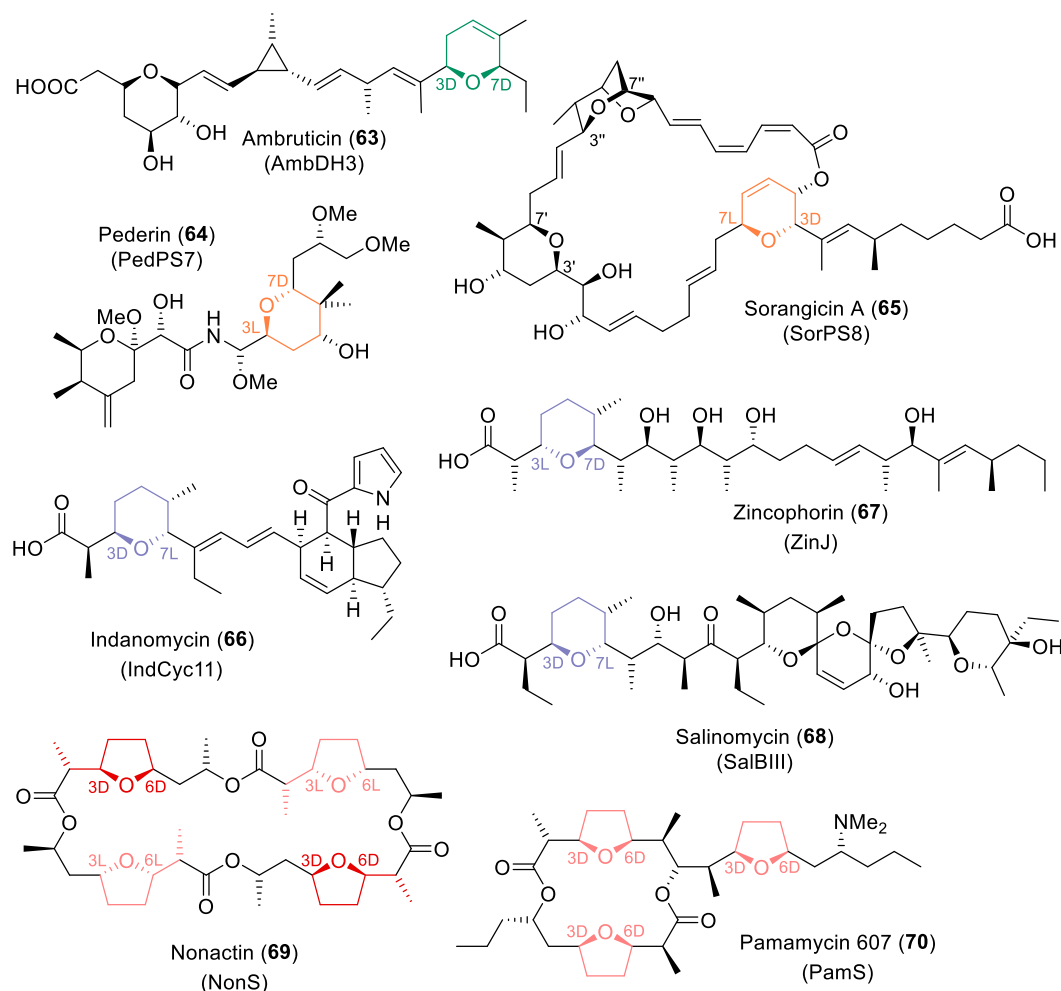


**Abbildung 1-14. Mechanismen der biosynthetischen Bildung von Sauerstoffheterozyklen.** A) Kaskadische Epoxidöffnung und Carbonyl-Addition während der Monensin A-Biosynthese (56).<sup>[63]</sup> B) Bildung des Pyrans 59 via nukleophiler Epoxidöffnung im Westfragment von Ambruticin.<sup>[62]</sup> C) AmbDH3-katalysierte Dehydratisierung und oxa-MICHAEL-Addition zum THP 62.<sup>[64]</sup>

### 1.3. IMOMA-Zyklasten

Die Verwendung von enzymatischen Biokatalysatoren ist eine Möglichkeit, der Ressourcenproblematik synthetischer Prozesse zu begegnen. Die Reaktionen finden üblicherweise in wässrigen Puffern bei neutralem pH-Wert und Normaldruck sowie im Temperaturbereich bis 37 °C statt. Der Einsatz dieser Enzyme für synthetische Zwecke könnte in vielfacher Hinsicht Ressourcen einsparen. Zu diesem Zweck können verschiedene Zyklasten aus Biosynthesewegen produziert und hinsichtlich synthetisch relevanter Eigenschaften wie Substrattoleranz, Stereoselektivität und präparativer Anwendbarkeit untersucht werden. Bei den möglichen Zyklastenkandidaten handelt es sich um Enzyme aus verschiedenen Biosynthesewegen. Diese können unter dem Begriff der IMOMA-Zyklasten zusammengefasst werden, da sie die Bildung von Sauerstoffheterozyklen durch **intra**molekulare **oxa-MICHAEL-Addition** katalysieren. Diese Zyklasten sollen eine Biokatalyse-Werkzeugkiste (*Biocatalytic Toolbox*) bilden, mit deren Hilfe

es möglich ist, Sauerstoffheterozyklen unterschiedlicher Größe und Konfiguration enzymatisch zu bilden (Abbildung 1-15). Die Auswahl der Enzyme soll sich vor allem dadurch auszeichnen, dass sowohl verschiedene Ringgrößen, als auch unterschiedlichste Konfigurationen innerhalb des Heterozyklus gebildet werden können.<sup>[64]</sup>

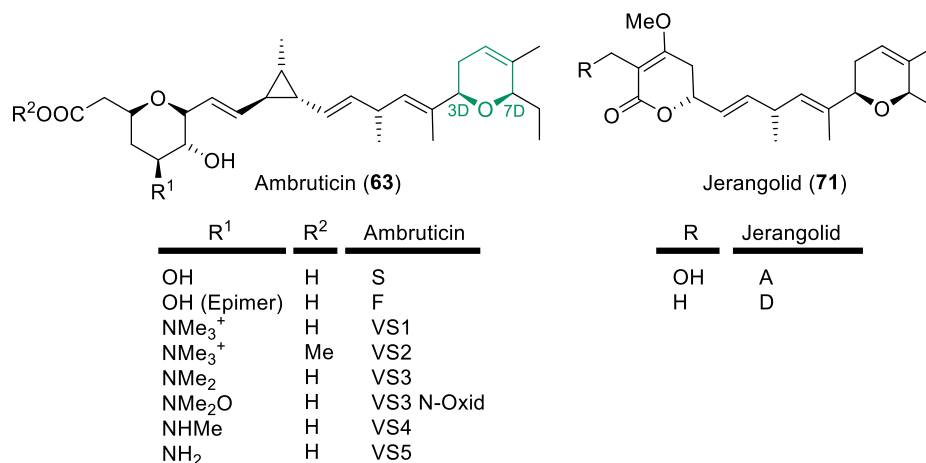


**Abbildung 1-15. Strukturen verschiedener biosynthetisch gebildeter Naturstoffe.** Die Heterozyklen, die durch die in Klammern dargestellte Zyklastase gebildet werden, sind entsprechend farbig hervorgehoben.

### 1.3.1. Bifunktionelle Dehydratase/Zyklastase: AmbDH3

Ein Beispiel für eine solche Zyklastase stellt die in unserer Arbeitsgruppe charakterisierte bifunktionelle Dehydratase/Zyklastase **AmbDH3** aus der Ambruticin-Biosynthese dar. Ambruticine (63, Abbildung 1-16) sind antimykotische Polyketide, die von dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* So ce10 produziert werden. Aufgrund der antimykotischen Wirkung bei gleichzeitig sehr geringer Toxizität gegenüber Säugerzellen sind Ambruticine besonders interessant für die Wirkstoffforschung.<sup>[64,65]</sup> Sie weisen einen seltenen Methylcyclopropanring und einen THP-Ring auf. Ein Dihydropyranring, der mit einer 1,4-Dienyl-Seitenkette verknüpft ist (C13-C17), bildet das Ostfragment.<sup>[9,65-67]</sup> Verschiedene Typen des

Ambruticins werden durch den Rest am Dihydropyranring unterschieden (Abbildung 1-16).<sup>[67]</sup> Ambruticin VS3 und S wurde eine antifugale Wirkung nachgewiesen, indem sie das Pilzwachstum über den Signalweg der hochosmolaren Glycerin (HOG)-Proteinkinase hemmen, wodurch die Osmoregulation beeinträchtigt wird. Durch die Bindung an *hik1*-exprimierende Zellen wird Hog1 phosphoryliert, wodurch schädliche zelluläre Antworten eingeschaltet werden, wie die Anreicherung von Glycerol und folglich die Einleitung der Apoptose. Der genaue Weg der Aktivierung des Zelltods und der Weitergabe dieser Information ist noch nicht vollständig aufgeklärt.<sup>[65]</sup> MARCOS-TORRES *et al.*<sup>[68]</sup> konnten kürzlich nachweisen, dass die Produktion von Ambruticin VS3 *S. cellulosum* einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Myxobakterien verschafft und damit weitere Hinweise auf die vielfältige Wirkungsweise der Ambruticine liefern, was sie zu interessanten Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Antimykotika macht.

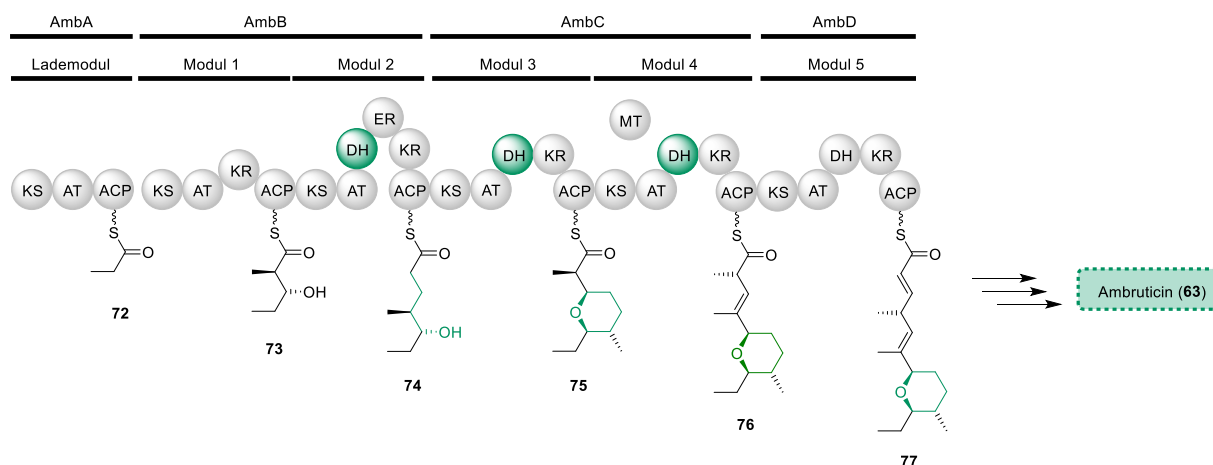


**Abbildung 1-16. Strukturen der Ambruticine (63)<sup>[67]</sup> und Jerangolide (71)<sup>[66]</sup>.** Der durch AmbDH3 gebildete *cis*-Pyranring in Ambruticin ist grün hervorgehoben.

Das östliche THP-Fragment ist ein Strukturmerkmal, welches sowohl bei Ambruticinen als auch bei Jerangoliden (71) auftritt, weshalb davon ausgegangen wird, dass besonders dieses Fragment eine wichtige Rolle für die biologische Aktivität spielt.<sup>[66,69]</sup>

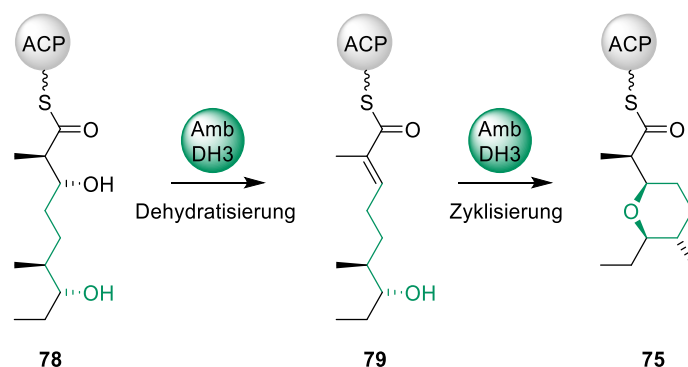
Der biosynthetische Aufbau von Ambruticin erfolgt über eine modulare Typ I PKS und wurde von JULIEN *et al.*<sup>[62]</sup> basierend auf Genclusteranalysen postuliert (Abbildung 1-17). Ausgehend von Propionyl-CoA beginnt der hypothetische Aufbau des Ostfragments. Das Rückgrat wird innerhalb von fünf Modulen mit zwei Methylmalonyl-CoA-Einheiten und drei Malonyl-CoA verlängert.





**Abbildung 1-17. Biosynthetischer Aufbau des Ostfragments von Ambruticin (63) nach BERKHAN *et al.*<sup>[60,64]</sup> und JULIEN *et al.*<sup>[62]</sup>.** AmbDH2, AmbDH3 und AmbDH4 sowie der durch AmbDH3 gebildete Pyranring sind grün hervorgehoben.

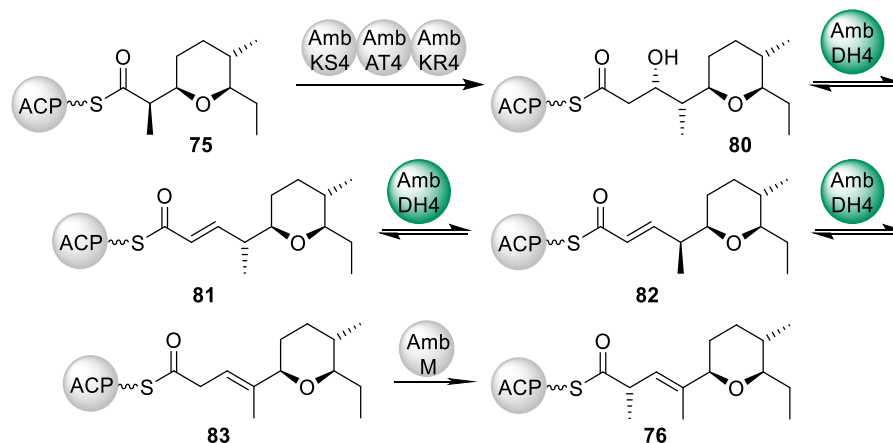
Der DH-Domäne AmbDH3 konnte durch BERKHAN *et al.*<sup>[64]</sup> eine Bifunktionalität nachgewiesen werden. Die Pyranbildung erfolgt durch AmbDH3-katalysierte Dehydratisierung des 3-Hydroxythioester-Intermediates **78** und anschließendem Ringschluss *via* oxa-MICHAEL-Addition zum THP-Ring **75** (Abbildung 1-18b).<sup>[60,62]</sup> AmbDH3 katalysiert dabei zuerst die Dehydratisierung des 2D,3D-konfigurierten Vorläufermoleküls **78** zum (*E*)-konfigurierten Produkt **79**. Die oxa-MICHAEL-Addition an dem entstandenen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Thioester führt zu einem Sauerstoffheterozyklus und somit zur Bildung von bis zu zwei neuen Stereozentren. Dabei entsteht ausschließlich die *D*-Konfiguration des C2-Atoms im zyklisierten Produkt **75**, was die hohe Stereoselektivität der katalysierten Reaktion unterstreicht. AmbDH3 ist die bisher einzige bekannte pyranbildende Domäne unter den *cis*-AT PKS, welche typischerweise Doppelbindungen in einer  $\alpha,\beta$ -*trans*-Konfiguration einführen.<sup>[24,70]</sup>



**Abbildung 1-18. AmbDH3-katalysierte Dehydratisierungs- und Zyklisierungsreaktion.**<sup>[24]</sup> AmbDH3 sowie der durch AmbDH3 gebildete Pyranring sind grün hervorgehoben.

Während Modul 4 ist zusätzlich die Einführung der Methylgruppe und die Doppelbindungsverschiebung interessant. Die Sequenz der AT in Modul 4 zeigt typische Motive von Domänen, die Verlängerungen mit Malonyl-CoA katalysieren, was gegen einen Einbau der  $\alpha$ -Methylgruppe spricht. Enzymatische *in vitro*-Experimente beweisen, dass eine aus AmbM stammende

Methyltransferase (MT) gemeinsam mit der trifunktionalen Domäne AmbDH4 diese Modifikation katalysiert (Abbildung 1-19). Demnach besitzt AmbDH4 eine dreifache Aktivität als Dehydratase, Epimerase und Enoylisomerase (EI). Diese Reaktion wird durch die anschließend agierende Methyltransferase begünstigt, da AmbM aufgrund der strikten Substratspezifität das Produkt der Reaktion durch Methylierung aus dem Gleichgewicht zieht.<sup>[60]</sup>



**Abbildung 1-19.** Postulierter Verlauf der Biosynthese ausgehend vom Produkt aus Modul 3 der Ambruticin-Biosynthese.<sup>[60]</sup> AmbDH4 ist grün hervorgehoben.

Nach Durchlaufen der Module zum Aufbau des Cyclopropanrings und des Westfragments entstehen Ambruticine (**63**) mit unterschiedlichen Resten am C5-Atom (Abbildung 1-17). Hierbei agieren nach Freisetzung des Polyketids vom ACP verschiedene *Tailoring*-Enzyme wie beispielsweise AmbP und AmbO was zur Bildung des Dihydropyranrings führt.<sup>[62]</sup>

### 1.3.2. *Trans*-AT-Pyransynthesen: PedPS7 und SorPS8

Neben AmbDH3 zählen zu den möglichen Zyklasekandidaten noch einige weitere IMOMA-Zyklasen. Für *trans*-AT PKS, die zyklische Ether einführen, ist das Vorhandensein einer einzigartigen Domäne mit relevanter Proteinsequenzhomologie zu DH-Domänen ein charakteristisches Merkmal. Dabei handelt es sich um Pyransynthese (PS)-Domänen, die an der Biosynthese wichtiger Verbindungen wie Bryostatin, Pederin (**64**) und Sorangicinen (**65**) teilnehmen und in eine eigene phylogenetische Klasse fallen.<sup>[71,72]</sup> **PedPS7** und **SorPS8** gehören zu den Pyransynthesen (PS) aus *trans*-AT PKS und katalysieren in den Naturstoffen Pederin (**64**) bzw. Sorangicin A (**65A**) die Bildung eines *trans*-konfigurierten Pyranrings. In PS-Domänen ist das DH-charakteristische Motiv His-Ser-Asp der aktiven Tasche zu His-Ser-His/Asn mutiert.<sup>[64]</sup> Dieser Austausch verhindert die Dehydratisierungsreaktion und erleichtert die Aktivierung der Hydroxygruppe für den nukleophilen Angriff auf das MICHAEL-System durch Protonenabstraktion.<sup>[71,73]</sup> Innerhalb eines Moduls befinden sich PS-Domänen in der Regel neben DH-Domänen, die für den Aufbau des notwendigen,  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Vorläufers verantwortlich sind. PS-Domänen wirken anschließend auf deren transient gebildetes

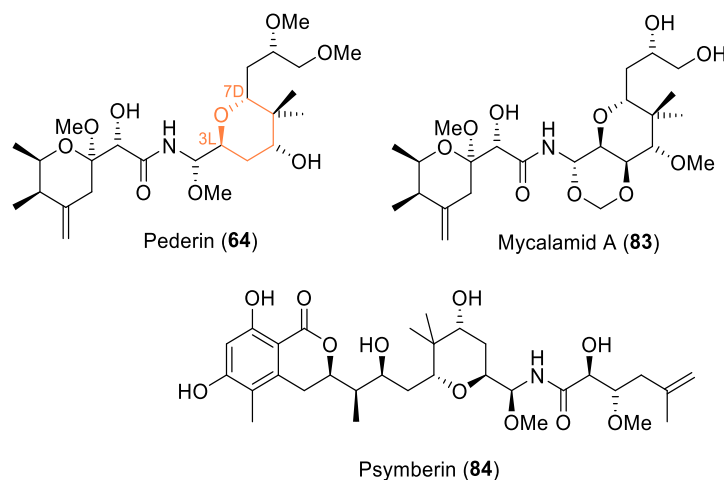
Dehydratationsprodukt.<sup>[24]</sup> Die beiden Pyransynthesen PedPS7 und SorPS8 weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 28% auf.

<b>PedPS7</b>	-----STLVSTE-----GVSFRFKGEEFFLRD <b>HS</b> GMPLPAAVYLEMVRAFAEGKHERKITGLS	51
<b>SorPS8</b>	<u>HPLV</u> HREVADAEGRRFAFAAVFDGAEPFLMD <b>HE</b> QLFPAVAYLEMARAAAEEAA-DLSIAGIR	59
	:.:* .: * . * * * * . :.:* . * * * * * . :.:* . * * * * .	
<b>PedPS7</b>	HVVWPKVLLVSGEGREVRTCLTNVDRSAFLISACEQSSEGPQEVTYCQGNLLLPEVMEE-	110
<b>SorPS8</b>	NALWISPLVIRDACELRVVLSDAESGRAYEVSS---SRG---VHARGLLVFDEPPAQP	112
	:.:* . *.: . . . *.: *.: . . . :. : . *.* .:.* *.: * .:	
<b>PedPS7</b>	-PGAALAIETAIYRCPSVLEAKQCDRLQLQSTHGPALMSVQQLRYSREALALLQLPDELQ	169
<b>SorPS8</b>	ARPPALDIEAVRTRCAIEVDARTRNEAMGPASYDKLWIASLVHSDHEALASLQAPSA--	170
	* * *.: * * .:.*: .: . . : . : . * .:.*: * * * * * .	
<b>PedPS7</b>	MGWDDYGWHPSSL <b>NG</b> GAILASVVWCLARAPRSRAGLPMFSLDRLRVFQPFERQMAYVRR	229
<b>SorPS8</b>	PGDEAFLLDPN <b>LN</b> SVLVPAIFLSLIQ--DGEREWRFPTYLEALWIYSDPRRG--AYVHA	226
	* : : . * . * * .:.*: .: . . * : . . :.:*.: * :.: . * * *:	
<b>PedPS7</b>	-HGSARSLGENLEKVDIDLDSQGRCLASLEGFTLVFAPDANRLV-----	273
<b>SorPS8</b>	RRAAEDGQAARFGRYDVLVDASGNCLMAFRGLTAVPAVAVAPEKPAAPVV	277
	:.: . . . : *.:*.:*.:*.* *.:*.:* * * *	

**Abbildung 1-20. Sequenzalignment der beiden Pyransynthesen PedPS7 und SorPS8.** „\*“ steht für identische Aminosäuren, „.“ für ähnliche Aminosäuren und „:“ für unterschiedliche Aminosäuren. Die beiden katalytisch aktiven Aminosäuren His33 und Asn186 sind orange hervorgehoben. Das konservierte katalytische His33 kommt normalerweise in einem Hx<sub>4</sub>P-Motiv in PSs, einem Hx<sub>8</sub>L-Motiv in EIs und einem Hx<sub>8</sub>P-Motiv in DHs vor. Asn186 entspricht dem katalytischen Aspartat in DHs, während in PSs hier normalerweise ein Asn oder His und in EIs ein Asn vorliegt. Ein HPLL-Motiv (unterstrichen hervorgehoben) kommt oft am N-Terminus von PSs und DHs vor.<sup>[72]</sup>

### 1.3.2.1. PedPS7

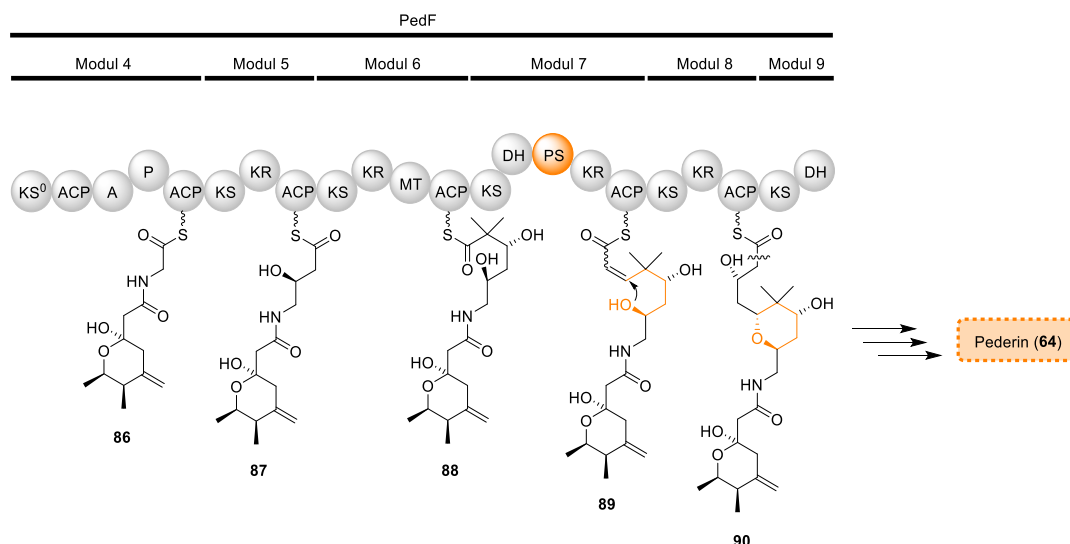
Die Pederin-Familie beinhaltet zytotoxische Verbindungen, die aus Insekten, Flechten und Meeresschwämmen isoliert wurden, wobei es sich bei den eigentlichen Produzenten um verschiedene, nicht kultivierbare Bakteriensymbionten handelt. Pederin (**64**), Mycalamid A (**84**) und Psymberin (**85**) sind drei Vertreter dieser Pederin-Familie (Abbildung 1-21).<sup>[74,75]</sup>



**Abbildung 1-21. Strukturen der zytotoxischen Polyketide Pederin (64), Mycalamid A (84) und Psymberin (85) aus der Pederin-Familie.**<sup>[71]</sup> Der durch PedPS7 gebildete *trans*-Pyranring in Pederin ist orange hervorgehoben.

Die drei gezeigten Naturstoffe sind strukturell eng verwandte Polyketid-Naturstoffe mit stark funktionalisierten Strukturen. Zusätzlich zu den sich ähnelnden Strukturmotiven weisen die Moleküle zytotoxische Eigenschaften auf.<sup>[76]</sup> Das PKS-NRPS-Hybridprodukt Pederin (**64**) ist ein starkes Zytotoxin mit antitumorale Wirkung und wird von Rehkäfern der Gattung *Paederus sp.* zur chemischen Abwehr eingesetzt. Die Verbindung wurde erstmals in kristalliner Form aus der Hämolymphe der Rehkäfer gewonnen und erwies sich als potenter, vesikanter Wirkstoff.<sup>[11,77,78]</sup> Als eigentlicher Produzent wurden endosymbiotische Bakterien der Gattung *Pseudomonas sp.* innerhalb des weiblichen Käfers festgestellt, was durch molekulare Analyse des biosynthetischen Genclusters von Pederin bestätigt wurde.<sup>[79]</sup> Psymberin (**85**) konnte aus Meeresschwämmen der Gattung *Ircinia ramosa* isoliert werden. Dennoch zeigten neuere Untersuchungen, dass die eigentlichen Produzenten dieser Naturstoffe symbiotische Bakterien sind.<sup>[80-84]</sup> Mycalamid A (**84**) konnte aus dem Marineschwamm *Mycale sp.* aus Neuseeland erhalten werden.<sup>[85]</sup>

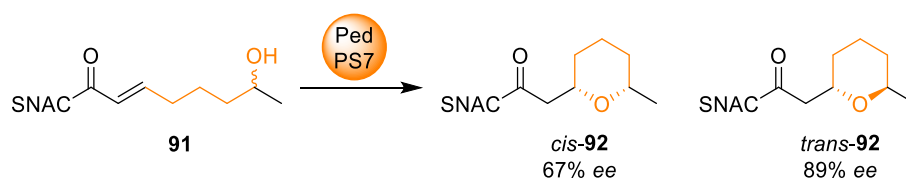
Aufgrund der Produktion durch symbiotische Bakterien ähneln sich die Biosynthesen der Polyketide stark.<sup>[59,86]</sup> PIEL *et al.*<sup>[71]</sup> postulierte die grundlegenden Schritte zur Bildung von Pederin (**64**).<sup>[59,87]</sup> Die Analyse der biosynthetischen Gencluster zeigte, dass Pederin über eine modulare Typ I *trans*-AT PKS gebildet wird. Viele Polyketide, die von *trans*-AT PKS erzeugt werden, enthalten zyklische Ether, die vermutlich während der Kettenverlängerung eingeführt werden. Innerhalb der ersten drei Module in PedI wird der Startbaustein Acetyl-CoA mit vier Malonyl-CoA-Einheiten verlängert, durch eine C-MT methyliert und anschließend durch Acetalbildung zyklisiert. Durch das nicht-ribosomale Peptidsynthetase-Modul (NRPS) wird in das Polyketidrückgrat Glycin eingebaut, sodass der ACP-Thioester **86** entsteht (Abbildung 1-22).



**Abbildung 1-22. Biosynthetischer Aufbau des Pyranrings im Westfragment von Pederin (64) nach PIEL *et al.*<sup>[71]</sup>.** PedPS7 sowie der durch PedPS7 gebildete Pyranring sind **orange** hervorgehoben. NRPS-Peptidsynthetase (P); NRPS-Adenylierungsdomäne (A); nicht-verlängernde Ketoreduktase (KS<sup>0</sup>).

Durch vier weitere Malonyl-CoA-Verlängerungen, vier Reduktionen und der Zyklisierung durch die PS in Modul 7 wird die Pyranspezies **90** aufgebaut. PedPS7 katalysiert dabei den Ringschluss zum THP **90** *via* oxa-MICHAEL-Addition einer ζ-Hydroxygruppe (an C7 von **89**) an die β-Position des *trans*-α,β-ungesättigten Ketoesters **89**. Durch einen C1-C2-Schnitt sorgt Modul 9 für den Stopp der Elongation unter Freisetzung eines terminalen Alkans, welches weiter in PedG oxidiert wird. Die Zyklisierung zum THP während der Biosynthese des verwandten Polyketids Psymberin (**85**) geschieht in der PKS-Untereinheit PsyD über die Domäne PsyPS6 auf nahezu analoge Weise.<sup>[86]</sup>

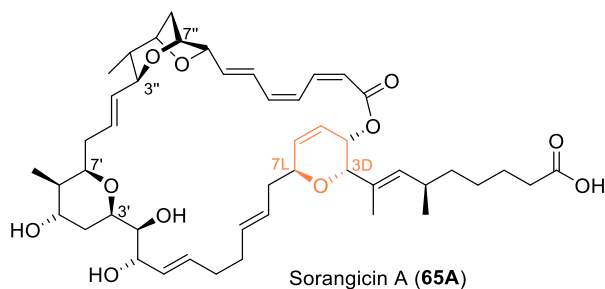
PÖPLAU *et al.*<sup>[11]</sup> berichtete über die erste *in vitro*-Charakterisierung der PS-Domäne PedPS7 aus der Biosynthese von Pederin (**71**).<sup>[77]</sup> Bei PedPS7 handelt es sich um eine mf-PS, welche die IMOMA an der β-Position stereoselektiv auf der *re*- oder *si*-Seite katalysiert. Durch *in vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, dass PedPS7 eine leichte Präferenz für das natürliche L-Hydroxy-Substrat gegenüber dem nicht-natürlichen D-Hydroxy-Substrat besitzt (Abbildung 1-23).<sup>[11,72,77,88]</sup>



**Abbildung 1-23. *In vitro*-Experiment mit dem vereinfachten Substrat 91 zur Untersuchung der Zyklaseaktivität von PedPS7 durch PÖPLAU *et al.*<sup>[11]</sup>.** PedPS7 sowie der durch PedPS7 gebildete Pyranring sind **orange** hervorgehoben.

### 1.3.2.2. SorPS8

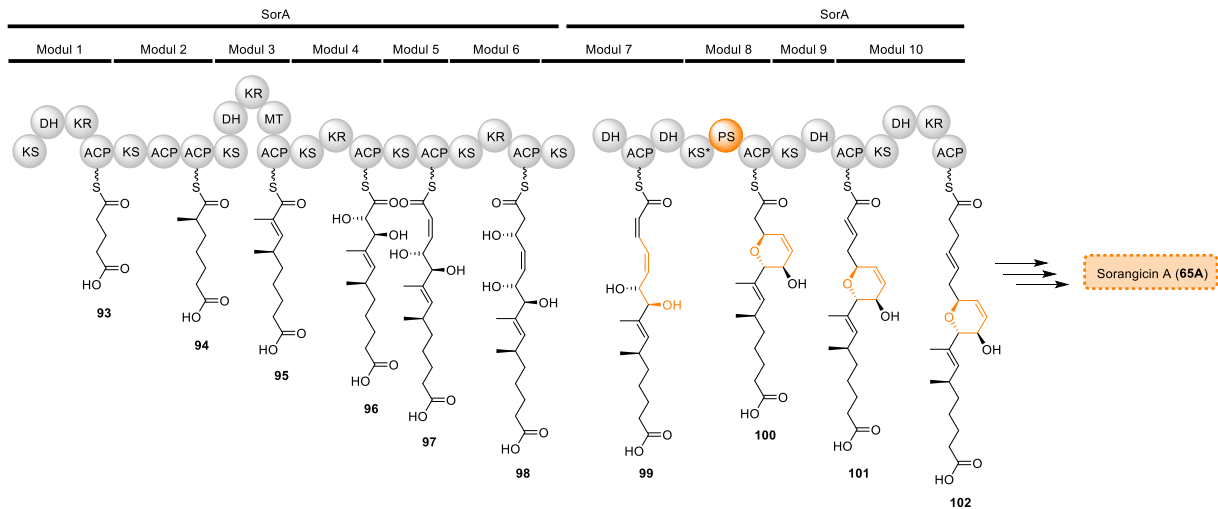
Sorangicine (**65**) sind eine Gruppe von polyketidischen Antibiotika, die von verschiedenen Stämmen des Myxobakteriums *S. cellulorum* produziert werden.<sup>[89–91]</sup> Ihre Funktion beruht auf der Inhibition der eubakteriellen RNA-Polymerase.<sup>[91–93]</sup> Bis zum heutigen Zeitpunkt gelten Sorangicine als die wirksamsten myxobakteriellen Antibiotika und wirken sowohl gegen GRAM-positive als auch gegen GRAM-negative Spezies.<sup>[91]</sup> Da die entsprechenden Glycoside nur eine geringe Aktivität besitzen, wird davon ausgegangen, dass diese Modifikation *S. cellulorum* vor seinen eigenen Antibiotika schützt.<sup>[94]</sup> Strukturelle Analoga der Sorangicine könnten somit in Zukunft bei der Bekämpfung von Rifampicin-resistenten Tuberkulose-Stämmen nützlich sein. Sorangicine besitzen als Kernstruktur einen 31-gliedrigen Lactonring, der einen tetrasubstituierten THP-Ring, einen trisubstituierten Dihydropyranring und ein bicyklisches Ethermotiv enthält (Abbildung 1-24).



**Abbildung 1-24. Struktur des Antibiotikums Sorangicin A (65A).**<sup>[95]</sup> Der durch SorPS8 gebildete Pyranring ist orange hervorgehoben.

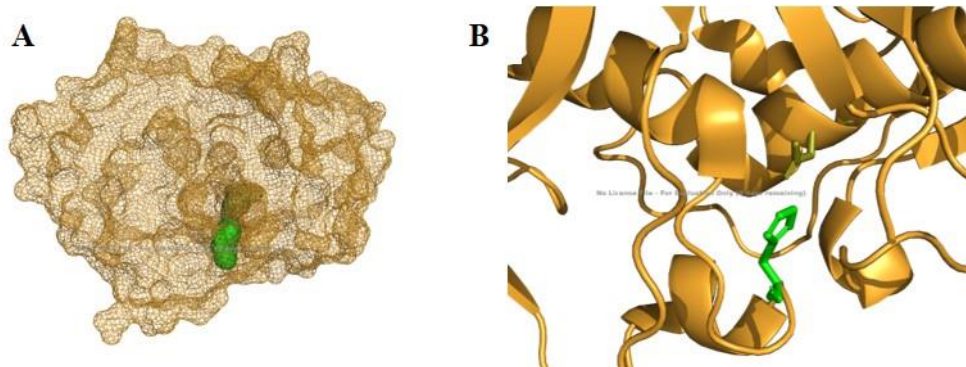
Im Stamm *S. cellulorum* So ce12 gelang es IRSCHIK *et al.*<sup>[94]</sup> den Sorangicin-Gencluster zu entschlüsseln. Dieser enthält sieben große Gene (*sorA-sorI*), die insgesamt 23 Module einer *trans*-AT PKS enthalten.<sup>[7]</sup> Die PKS beinhaltet viele Eigenschaften, die für ein solches System charakteristisch sind (doppelte Domänen, nicht standardmäßige Domänenreihenfolge und Module, die auf zwei Untereinheiten aufgeteilt sind), ebenso wie drei mutmaßliche PS-Domänen. Zudem konnten mutmaßlich kondensationsinaktive KS-Domänen (KS<sup>0</sup> in den Modulen 7, 8 und 22) identifiziert werden, die stattdessen die Polyketidkette auf das nachgeschaltete Modul übertragen. Allen drei KS<sup>0</sup>-Domänen fehlt ein His-Rest innerhalb des HGTGT-Motivs, der essentiell für die decarboxylative Kondensation ist.<sup>[96]</sup> Die DH-Domänen selbst sind ebenfalls bemerkenswert, da sie nur eine geringe Ähnlichkeit zu anderen DH-Domänen aufweisen und signifikant kürzer sind. Von der Pyransynthese in Modul 8, SorPS8, wird vermutet, dass sie aktiv ist und während der Kettenverlängerung die Zyklisierung (C9-C13) katalysiert. Insgesamt deuten die Analysen von IRSCHIK auf die Existenz von zwei multimodularen Funktionseinheiten während der Sorangicin-Biosynthese: die Module 21 und

22 installieren gemeinsam eine  $\beta$ -olefinische Funktionalität, während die Module 6, 7 und 8 zusammenarbeiten, um einen Pyranring zu erzeugen.<sup>[59,95]</sup>



**Abbildung 1-25. Beginn des biosynthetischen Aufbaus von Sorangicin A (65A) nach IRSCHIK *et al.*<sup>[95]</sup>.** SorPS8 sowie der durch SorPS8 gebildete Pyranring sind **orange** hervorgehoben.

WAGNER *et al.*<sup>[72]</sup> gelang es die Kristallstruktur von SorPS8 zu erhalten und damit zu zeigen, dass diese PS-Domäne vergleichbar zu anderen DH-Domänen ebenfalls die Doppel-Hotdog-Faltung einnimmt und sich der gleichen katalytischen Diade bedient (Abbildung 1-26). Dabei liegt SorPS8 als Monomer vor, wohingegen alle bisher vorliegenden Strukturen von DHs von *cis*-AT PKS als Dimer vorliegen.<sup>[97–102]</sup>



**Abbildung 1-26. Kristallstruktur von SorPS8 (PDB-ID: 6B2V).**<sup>[72]</sup> **A)** Gesamtfaltung von SorPS8. Die beiden katalytisch aktiven Reste His33 und Asn186 sind **grün** und **olivgrün** hervorgehoben. **B)** Ausschnitt der aktiven Tasche mit den beiden katalytisch aktiven Resten.

His33 befindet sich in der gleichen Anordnung und Orientierung wie das katalytisch aktive Histidin in DHs (Abbildung 1-27). Asn186 entspricht dem streng konservierten DH-Aspartat, von dem angenommen wird, dass es eine Wasserstoffbrücke mit der  $\beta$ -Hydroxygruppe von DH-Substraten bildet. Das Thioestercarbonyl des Substrates befindet sich neben dem Rückgrat-NH und einem Wassermolekül, was die konjugierte Addition der Hydroxygruppe an  $C\beta$  erleichtert. Das katalytische His33 ist in der Lage, den Protonentransfer zu  $C\alpha$  zu vermitteln. Eine



potentielle Wechselwirkung von Asn186 mit dem Substrat durch eine Wasserstoffbrücke ist nicht klar, eine Interaktion mit Wasser ist allerdings möglich. Das tatsächliche SorPS8-Substrat kann auch eine D-ε-Hydroxylgruppe besitzen.<sup>[97]</sup>

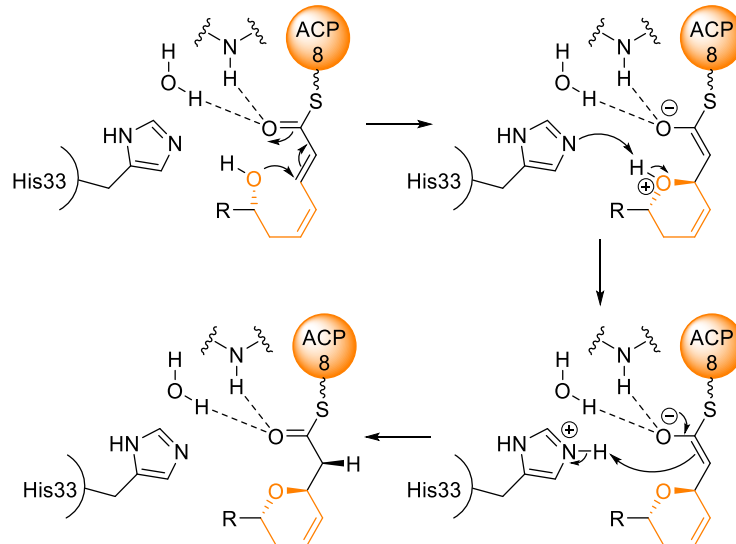


Abbildung 1-27. Vorgeschlagener Mechanismus der SorPS8-katalysierten Ringbildung nach WAGNER *et al.*<sup>[72]</sup>. Der durch SorPS8 gebildete Pyranring ist orange hervorgehoben.

### 1.3.3. Epoxid-Hydrolasen: IndCyc11, ZinJ und SalBIII

IndCyc11, SalBIII und ZinJ sind *Tailoring*-Enzyme aus Biosynthesewegen reduzierter Polyketide, die untereinander eine Sequenzähnlichkeit von 41-42% aufweisen (Abbildung 1-28). Zwei katalytisch aktive Aspartate konnten unter anderem identifiziert werden, die in IndCyc11, ZinJ und SalBIII konserviert vorliegen.<sup>[103–105]</sup>

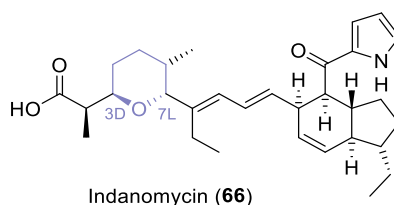
ZinJ	-IDETQRKATVLE <b>Y</b> FERVNAKDLDGVVKLFATDAVVA <b>D</b> PVGAPPVAGEEALRA <b>Y</b> FQRVLH	59
SalBIII	MQDEQKRKEIVAE <b>Y</b> FRKVNEDVDVAIVEMFTENATIE <b>D</b> PVGKDVREGRAAQRE <b>Y</b> FNSNVT	60
IndCyc11	-----VEE <b>Y</b> FRRLNAGDLLDKVLEMLAPDVRME <b>D</b> PVGGPPKLGREAVGE <b>Y</b> IAQVIE	50
	* ***. :. * * : * : : : : . : * * * * * . * * * : :	
ZinJ	EFDTHDVPVPSGAQDGQSVALPLKATINNP <b>D</b> PTGGVRLDVNLVSVFTIGEDGLISEMR	119
SalBIII	AE-VTIEPGHLSAGQDGKSVAVAAEAEMTNI <b>D</b> PN-RTRVKINAVDVFTLTPEGKIDSMR	118
IndCyc11	AN-AEITVGPPIVAAQDGLRVALPLVGRLAQLGRS <b>D</b> -GPRMEINCVDVIQVNGEGLIQEVL	108
	. * ..** * * : * . : : * : : * * . * : : * * * . . .	
ZinJ	AY <b>W</b> GLTDIAPAGA	132
SalBIII	VE <b>W</b> GMTDIGV---	128
IndCyc11	VE <b>W</b> GMTDIAR---	118
	..**:* * * .	

Abbildung 1-28. Sequenzalignment der Epoxid-Hydrolasen IndCyc11, ZinJ und SalBIII. „\*“ steht für identische Aminosäuren, „:“ für ähnliche Aminosäuren und „.“ für unterschiedliche Aminosäuren. Ausgewählte Aminosäuren der aktiven Tasche sind eingerahmt. Die beiden katalytisch aktiven Aspartatreste sind zusätzlich lila hervorgehoben.



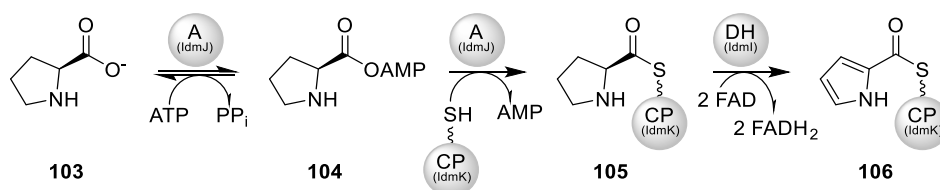
### 1.3.3.1. IndCyc11

Der ionophore Naturstoff Indanomycin (**66**, Abbildung 1-29), welcher in verschiedenen *Streptomyces*-Arten auftritt, enthält neben einem THP-Ring auch ein selten vorkommendes Indan-Motiv und besitzt antibakterielle, antiprotozoische und insektizide Eigenschaften.<sup>[103]</sup> Andere Polyketid-Naturstoffe mit Indan-Gerüst wirkten bereits gegen Malaria oder werden als Medikamente in der Tiermedizin benutzt, weshalb weitere unerforschte Bioaktivitäten von Indanomycin denkbar wären.<sup>[106]</sup>



**Abbildung 1-29. Struktur des ionophoren Naturstoffs Indanomycin (66).** Der durch IndCyc11 gebildete Pyranring ist **lila** hervorgehoben.

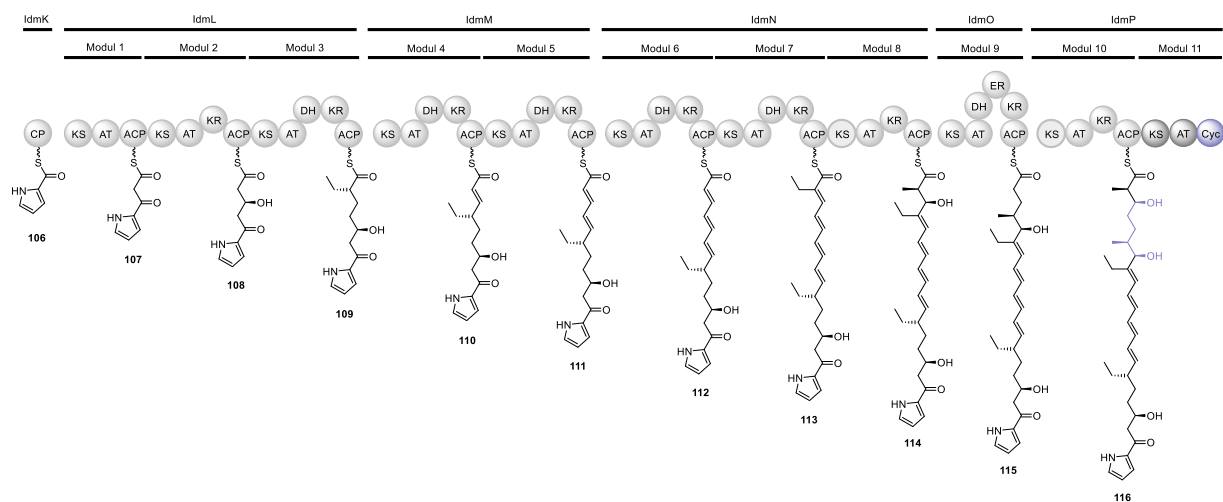
Der biosynthetische Aufbau von Indanomycin (**66**) verläuft über einen modularen Typ I-PKS-NRPS-Metabolismus und wurde von Li *et al.*<sup>[103]</sup> auf der Grundlage von Genclusteruntersuchungen postuliert (Abbildung 1-29). Zunächst muss die Biosynthese des Startbausteins Pyrrol-2-carboxylat **103** ausgehend von L-Prolin erfolgen (Abbildung 1-30). Hierfür sind drei Enzyme notwendig: eine Prolyl-Adenylattransferase, ein *Carrier*-Protein und eine Flavin-abhängige L-Prolyl-S-CP-Dehydrogenase. Durch Sequenzvergleiche mit verschiedenen freistehenden Prolyl-Adenylattransferasen und nachfolgende Deletionsstudien von *idmJ* konnte bestätigt werden, dass IdmJ an der Bildung des Pyrrolylrestes beteiligt ist. An beiden Seiten von *idmJ* grenzen die beiden Gene *idmI* und *idmK* an, die vermutlich für Proteine codieren, welche ebenfalls an der Pyrrolerzeugung beteiligt sind. Sequenzvergleiche legen nahe, dass es sich bei IdmI um eine Dehydrogenase handelt und IdmK als *Carrier*-Protein agiert.<sup>[33,107]</sup>



**Abbildung 1-30. Vorgeschlagene Biosynthese des Pyrrols als Startbaustein für die nachfolgende Indanomycin (66)-Biosynthese nach Li *et al.*<sup>[103]</sup>.**

Fünf große *open reading frames* (ORFs), die für die großen Untereinheiten der modularen Typ I PKS codieren, wurden unmittelbar *downstream* von *idmIJK* gefunden. Das gemischt reduzierte Rückgrat wird somit über zehn Module (fünf PKS-Untereinheiten) aus dem Startbaustein Pyrrolyl-CoA aufgebaut. Dieser wird nach Biosynthese von einem Modul zum anderen weiter-

gereicht und schrittweise durch Einbau von Malonyl-, Methylmalonyl- und Ethylmalonyl-CoA verlängert. Nach Durchlaufen von Modul 10 ist bereits das komplette Kohlenstoffgerüst von **66** aufgebaut, wodurch die Frage für die Notwendigkeit des Zyklase-beinhaltenen ungewöhnlichen, elften Moduls verbleibt (Abbildung 1-31).

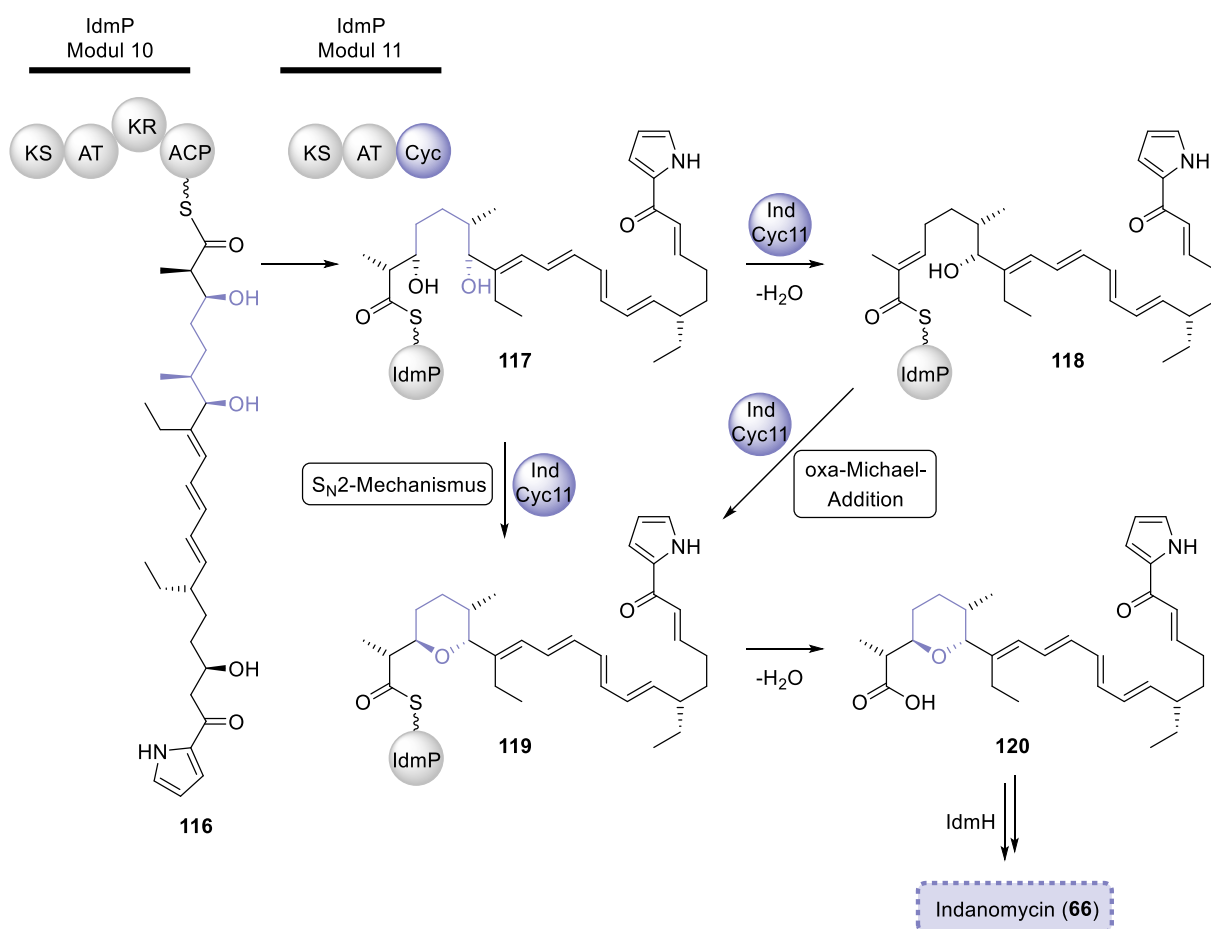


**Abbildung 1-31. Biosynthetischer Aufbau von Indanomycin (66) nach Li *et al.*<sup>[103]</sup>.** IndCyc11 sowie der durch IndCyc11 im späteren Verlauf der Biosynthese gebildete Pyranring sind **lila** hervorgehoben.

KS11 scheint katalytisch kompetent zu sein, während AT11 verkürzt ist und wichtige aktive Aminosäuren fehlen, was auf dessen Inaktivität schließen lässt.<sup>[33]</sup> Des Weiteren fehlt Modul 11 ein obligatorisches ACP, ebenso wie eine TE-Domäne, die normalerweise fusioniert am terminalen Modul der Kettenverlängerung vorliegt, um das Vollängen-Polyketid zu entlassen.<sup>[4]</sup> Stattdessen liegt hier eine hoch ungewöhnliche Zyklase-Domäne am C-Terminus des finalen Moduls IdmP vor. Diese finale Domäne, IndCyc11, besitzt Sequenzähnlichkeiten zu Mitgliedern der Familie der  $\Delta^5$ -3-Ketosteroidisomerasen, ebenso wie zu Ringöffnenden Epoxid-Zyklasen, wie sie in der Biosynthese der Polyether-Ionophore Nigericin und Monensin (**56**) vorkommen.<sup>[61,108,109]</sup> Diese Enzyme katalysieren eine Kaskade von gekoppelten Epoxidöffnungen und Zyklisierungen für die Ausbildung der charakteristischen Polyethergerüste.<sup>[110]</sup> Deshalb wird vermutet, dass IndCyc11 die Bildung des THP-Ringes und die Freilassung des PKS-gebundenen Produktes aufgrund des Fehlens jeglicher Thioesterasekandidaten im *idm*-Gencluster katalysiert.

Alle elf KS der Ind-PKS benötigen die hoch konservierte katalytische Triade Cys-His-His für deren Aktivität.<sup>[33]</sup> Möglicherweise benötigt IndCyc11 ebenfalls eine Aktivierung, wie zum Beispiel durch Wasserstoffbrücken in der aktiven Tasche an das Substrat; die Amino-Gruppe des Pyrrols könnte hierbei ein wichtiger Donator sein. Der Aufbau des THP-Rings kann über zwei verschiedene Mechanismen entstehen (Abbildung 1-32). Zum einen kann der Ringschluss *via* oxa-MICHAEL-Addition zu **119** entstehen, wobei eine Eliminierung zum  $\alpha,\beta$ -Thioester **118**

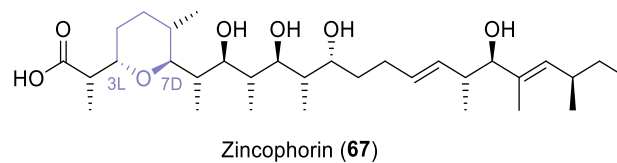
vorausgehen müsste. In Modul 10 und 11 liegt eine solche Dehydratase, die eine H<sub>2</sub>O-Abspaltung katalysiert, nicht vor, weshalb die Vermutung besteht, dass IndCyc11 in diesem Prozess eine doppelte Funktion besitzt. Die Stereochemie an C3 spricht allerdings gegen einen 1,4-Additionsmechanismus, welche aus dem Vorläufermolekül **118** nicht resultieren könnte. Zudem fehlen im *idm*-Gencluster bekannte, genetische Merkmale anderer MICHAEL-Additions-Zyklasten.<sup>[111]</sup> Zum anderen wäre eine direkte Zyklisierung über einen S<sub>N</sub>2-Mechanismus von **117** zu **119** denkbar, was die Stereochemie an C3 erklären würde. Die großen Sequenz-ähnlichkeiten von IndCyc11 zu anderen Epoxidhydrolasen/Zyklasten legen nahe, dass **117** während der THP-Bildung noch an den Enzymkomplex gebunden ist.<sup>[61,109]</sup> Aufgrund der Homologie besteht die Vermutung, dass die Domäne an der Bildung des 3*D*,7*L*-*trans*-konfigurierten THP-Rings von Indanomycin (**66**) sowie der Freisetzung der vollständig assemblierten Polyketidkette beteiligt ist. Mechanismus und genauer Zeitpunkt der Abspaltung von der PKS ist aufgrund der fehlenden TE in Modul 11 bisher nicht geklärt.



**Abbildung 1-32. Mechanismen der IndCyc11-katalysiertes THP-Bildung während der Indanomycin (**66**)-Biosynthese nach LI *et al.*<sup>[103]</sup>. IndCyc11 sowie der durch IndCyc11 gebildete Pyranring sind lila hervorgehoben.**

### 1.3.3.2. ZinJ

Das Polyketid Zincophorin oder Griseochelin (**67**, Abbildung 1-33) wurde erstmalig in *Streptomyces griseus* entdeckt. Dabei handelt es sich dabei um ein ionophores Antibiotikum mit einer effektiven Wirkung gegen GRAM-positive Bakterien, einschließlich humanpathogener Bakterien wie *Clostridium perfringens* oder *Streptococcus pneumoniae*. Die antibakterielle Wirkung geht mit Zytotoxizität einher, wobei für diese Wirkeigenschaften die Säurefunktion entscheidend zu sein scheint, da der Methylester von **67** keine dieser Wirkungen zeigt.<sup>[105]</sup>



**Abbildung 1-33. Struktur des ionophoren Antibiotikums Zincophorin (67).**<sup>[105]</sup> Der durch ZinJ gebildete Pyranring ist **lila** hervorgehoben.

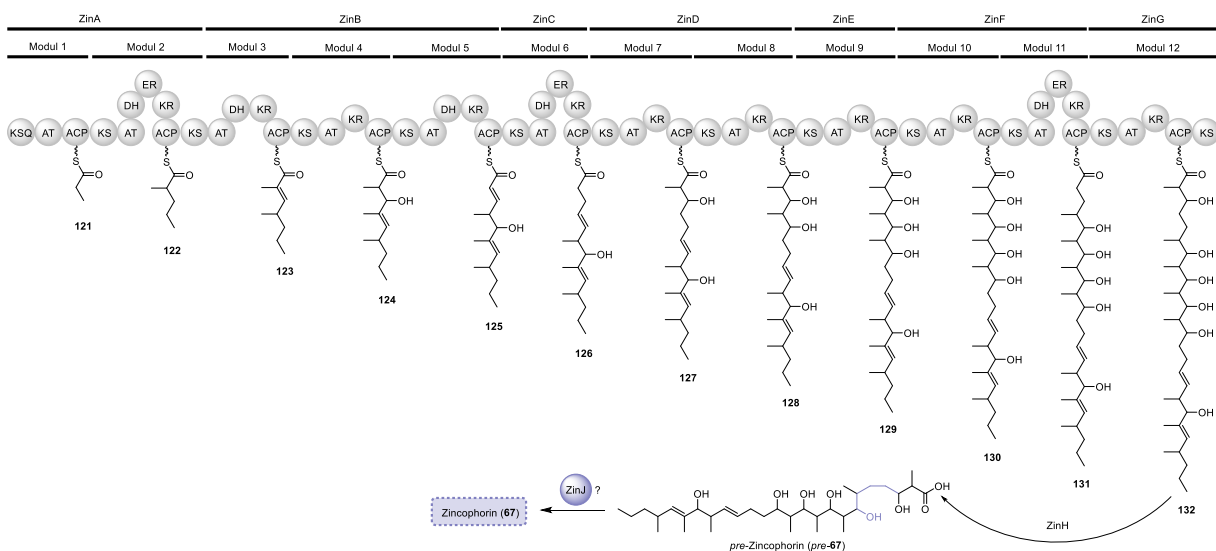
Ionophore Antibiotika sind dafür bekannt, dass sie bestimmte Metallionen durch Membranen in Organismen transportieren. Dieser Transport eines bestimmten Metallkations geschieht durch die Bildung eines Metallchelats. Zincophorin ist ein ionophores Antibiotikum mit einer sehr hohen Affinität für bivalente Ionen wie  $Zn^{II}$ - und  $Mg^{II}$ -Ionen.<sup>[112]</sup> Dabei ist es weniger sauerstoffhaltig als die meisten anderen ionophoren Antibiotika und enthält nur einen einzigen Sauerstoffheterozyklus.<sup>[113]</sup>

Die Struktur von Zincophorin kann formal in 12 biosynthetische Bausteine zerlegt werden, darunter eine Propionat-Starteinheit sowie drei  $C_2$ - und acht  $C_3$ -Verlängerungseinheiten. Letztere leiten sich von Malonyl- bzw. Methylmalonyl-CoA ab.<sup>[105]</sup> Das 25-Kohlenstoff-Grundgerüst enthält interessante Strukturelemente, wie die verzweigte Propionsäureeinheit an C-2, das trisubstituierte THP (C3–7), alternierende Methyl- und Hydroxygruppen (C8–13 und C18–19), eine disubstituierte (C16–17) und eine trisubstituierte (C20–21) Doppelbindung, beide in *E*-Konfiguration sowie ein entferntes isoliertes Stereozentrum (C22).

WALTHER *et al.*<sup>[105]</sup> publizierten neben Aktivitätsbeziehungen auch die Biosynthese von Zincophorin, welche über Genclusterexperimente am natürlichen Produzenten *Streptomyces griseus* HKI 0741 erforscht wurde (Abbildung 1-34). Das Zincophorin-Gencluster auf dem Chromosom des Stammes *S. griseus* HKI 0741 besteht aus 13 verschiedenen ORFs, darunter sieben PKS-Gene (*zinA–zinG*), ein Transportgen (*zinT*) und zwei regulatorische Gene (*zinR1* und *zinR2*). Die Substratspezifität der AT-Domänen sowie Art und Anzahl der reduktiven Domänen stimmten bereits perfekt mit der Struktur von Zincophorin überein.<sup>[114,115]</sup> Die einzige Ausnahme stellt eine im vermeintlichen Lade-Modul lokalisierte KS-Domäne dar, der ein essentielles Cystein im aktiven Zentrum fehlt, wohingegen ein Glutamin vorliegt, was

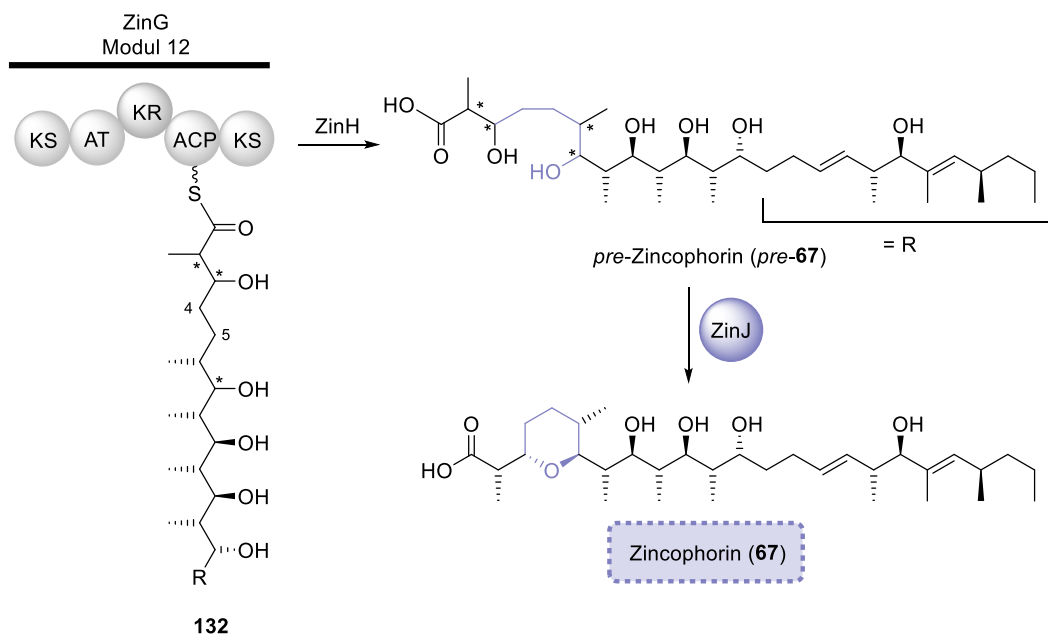
funktionelle Veränderungen zur Folge hat. Während prototypische KS-Domänen Kettenverlängerungsreaktionen katalysieren, besitzt eine Glutamin-enhaltende KSQ-Domäne eine Decarboxylaseaktivität gegenüber ACP-gebundenen Substraten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Acyl-ACP-Decarboxylierung einen alternativen Mechanismus der Initiierung der Polyketid-Biosynthese darstellt.<sup>[116]</sup> Die Zincophorin-PKS stellt somit ein Bilderbuchbeispiel für kollineare Polyketid-Biosynthese dar.

Die Molekülkette wird dabei am PKS-Enzymkomplex des modularen Typs I ausgehend von Propionyl-CoA über zwölf Module durch Kettenverlängerungen mit Malonyl-CoA (3×) und Methylmalonyl-CoA (8×) aufgebaut (Abbildung 1-34).



**Abbildung 1-34. Biosynthetischer Aufbau von Zincophorin (67) nach WALTHER *et al.*<sup>[105]</sup>. ZinJ sowie der später durch ZinJ gebildete Pyranring sind lila hervorgehoben.**

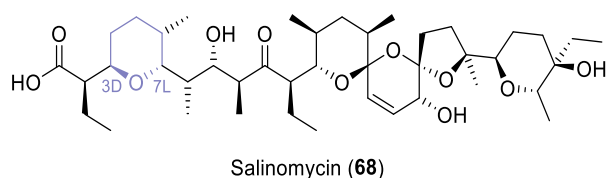
Da dem terminierenden PKS-Modul ZnG eine TE-Domäne fehlt, wird vermutet, dass die Hydrolase ZinH die hydrolytische Entladung der fertig synthetisierten Acylkette vermittelt und somit die Hydrolyse von *pre-67* katalysiert. Homologie-Alignments von *zinJ* deuten auf eine mögliche Verwandtschaft zu anderen Epoxid-Hydrolasen hin, die an Ringbildungen von Polyethern beteiligt sind.<sup>[109,117]</sup> Nach welchem Mechanismus und ob der Ringschluss tatsächlich in ZinJ abläuft, ist nicht eindeutig geklärt und muss weiter erforscht werden.<sup>[105]</sup> Dennoch vermutet man, dass ZinJ eine Rolle in der Ausbildung des 3L,7D-*trans*-konfigurierten THP-Rings von Zincophorin spielt (Abbildung 1-35).<sup>[105]</sup>



**Abbildung 1-35. ZinJ-katalysierte THP-Bildung während der Zincophorin (67)-Biosynthese.**<sup>[105]</sup> ZinJ sowie der durch ZinJ gebildete Pyranring sind **lila** hervorgehoben.

### 1.3.3.3. SalBIII

Salinomycin (**68**) ist ein antibiotisch wirkendes Polyether-Ionophor aus *Streptomyces albus* DSM 31498 mit einer komplexen trizyklischen bispiroacetalen Kernstruktur (Abbildung 1-36). Salinomycin ist in der Lage,  $K^+$ -Ionen zu binden und transportiert diese durch Zellmembranen, was zum Zelltod führt. Der therapeutische Nutzen wird durch dessen Zytotoxizität limitiert, wobei es oft in der Tierhaltung als Kokzidiostat eingesetzt wird. Seit kurzem ist Salinomycin von besonderem Interesse, da es eine gerichtete Aktivität gegen Krebsstammzellen und Krebszellen besitzt. Die Untersuchung des Biosynthesewegs zu Salinomycin bietet somit einen äußerst attraktiven Weg zu neuartigen und potentiell nützlichen Analoga dieses komplexen Moleküls.<sup>[118–126]</sup>

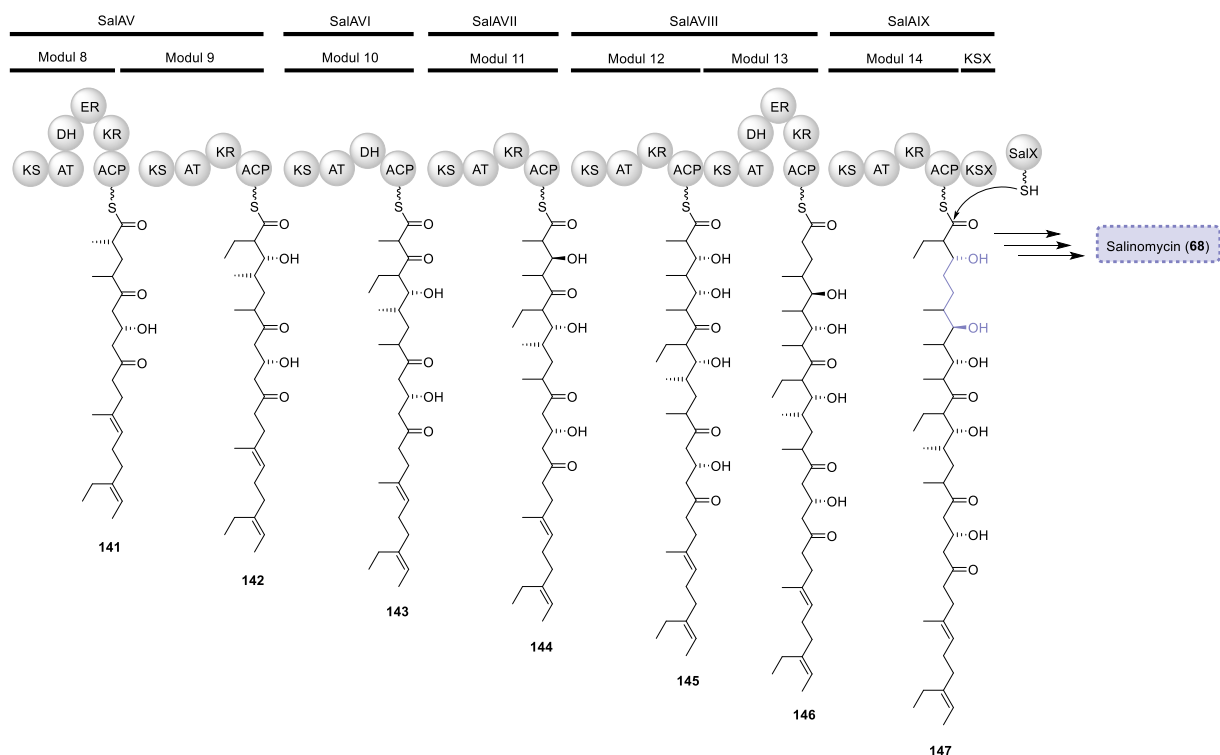


**Abbildung 1-36. Struktur von Salinomycin (68).**<sup>[104]</sup> Der durch SalBIII gebildete Pyranring ist **lila** hervorgehoben.

Salinomycin wird durch eine *cis*-AT PKS bestehend aus neun PKS-Multienzymen gebildet (Abbildung 1-37). Außerdem existieren vier weitere, *upstream*-liegende PKS-Gene, die unter anderem für Proteine mit regulatorischer Funktion codieren. *Downstream* gelegen von den PKS-Genen umfasst der Cluster etliche weitere Gene, darunter drei Epoxid-

hydrolasen/Zyklasten (*salBI*, *salBII* und *salBIII*), eine Epoxidase (*salC*) und ein bifunktionales Protein, das eine NRPS-Kondensationsdomäne und ein Peptid *Carrier*-Protein (PCP; *salX*) umfasst.<sup>[118]</sup> Alle neun PKS-Gene sind in der Reihenfolge angeordnet, wie die Proteine, für die sie codieren, agieren. Die Biosynthese startet mit einem Lademodul, das eine Malonylthioester-Decarboxylase (KSQ-Domäne)<sup>[116]</sup>, Malonyl-CoA-spezifische AT und ACP beinhaltet. Das Polyketid durchläuft anschließend 14 Verlängerungsmodule (Abbildung 1-37). Fusioniert an den C-Terminus des finalen Moduls liegt eine ungewöhnliche, zusätzliche KS-ähnliche Domäne vor, die einen wichtigen Hinweis auf den Mechanismus der Kettenbeendigung liefert. In den verwandten Biosynthesen von Monensin (**14**), Nigericin und Nanchangamycin gibt es Hinweise, dass eine diskrete KS (KSX) an das terminale ACP des finalen Moduls andockt und die Vollängen-Polyketidkette auf ein diskretes ACP (ACPX) überträgt, an dem die oxidative Zyklisierung stattfindet.<sup>[109,127]</sup> Es scheint, als ob die KSX-Domäne, deren aktive Reste allesamt intakt sind, an den C-Terminus der ACP-Domäne fusioniert ist. Davon ausgehend sollte der Cluster ebenfalls eine ACPX- und eine MonCII-ähnliche ACP-Thioesterase beinhalten.<sup>[128]</sup> Ein möglicher Kandidat für ein solches *Carrier*-Protein ist SalX, welches im *sal*-Cluster als PCP-Domäne annotiert ist und an eine für NRPS-typische, N-terminale Kondensationsdomäne (C) fusioniert ist. Die Sequenzuntersuchung der C-Domäne zeigt, dass ein wichtiger Rest des aktiven Zentrums, His138, durch Arg ersetzt ist, wodurch eigentlich keine Kondensationsaktivität möglich ist.<sup>[129]</sup> Dennoch kann im *sal*-Cluster kein entsprechendes Gegenstück zu *monCII* gefunden werden, weshalb der exakte Mechanismus der Freisetzung der Salinomycin-Kette noch nicht geklärt ist.

Nach der letzten Runde PKS-Kettenverlängerung katalysiert die KSX-Domäne am Ende von Modul 14 die Übertragung der Acylkette auf das diskrete SalX-Protein. Anschließend erfolgt die Modifizierung des SalX-gebundenen Intermediats zum finalen Salinomycin (**68**) durch verschiedene *Tailoring*-Enzyme, wie SalC, SalBI, SalBII, SalBIII, SalD und SalE.<sup>[118]</sup>

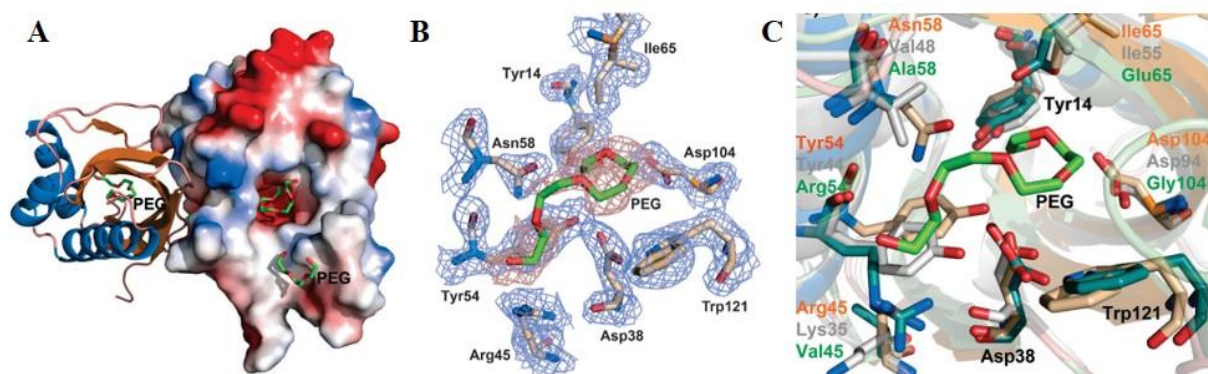


**Abbildung 1-37. Weiterführender biosynthetischer Aufbau von Salinomycin (68) nach LUHAVAYA et al.**<sup>[104,118]</sup>. Der durch SalBIII im späteren Verlauf der Biosynthese gebildete Pyranring ist lila hervorgehoben.

Die *sal*-PKS weist mehrere ungewöhnliche Merkmale auf, wie beispielsweise das Einfügen der *cis*-Doppelbindung an C18-C19 durch die neuartige Dehydratase<sup>[104,130]</sup> (und vermutliche Spirozyklase<sup>[130]</sup>) SalE und das Fehlen einer konventionellen TE.<sup>[118,131]</sup> Bemerkenswerterweise enthält das letzte Verlängerungsmodul weder eine DH-Domäne noch eine Pederin-ähnliche PS-Domäne, sodass der Ursprung des Pyranrings am westlichen Ende des Moleküls unklar war. Die Ergebnisse mit *Knockout*-Mutanten von  $\Delta salE$  und  $\Delta salC$  legten nahe, dass die Pyranbildung ein frühes *post*-PKS-Ereignis ist.<sup>[104,118,130]</sup> Das Gen *salBIII* kodiert für ein drittes Mitglied der MonB-Familie von Epoxidhydrolasen/-zyklasen.<sup>[118]</sup> Das *Tailoring*-Enzym SalBIII aus der Salinomycin-Biosynthese zeigt eine erhebliche Sequenzhomologie zu IndCyc11 und ZinJ (Abbildung 1-28).<sup>[104,105]</sup> Sequenzalignments und Untersuchungen der Kristallstruktur von SalBIII zeigten zwar strukturelle Ähnlichkeiten zu den Epoxid-Hydrolasen/-Zyklasen der Monensin-Biosynthese, jedoch auch einige signifikante Unterschiede wie das Fehlen eines katalytisch aktiven Glutamats (Abbildung 1-38).<sup>[104,118]</sup> Zudem konnten zwei katalytisch aktive Aspartate identifiziert werden, die in IndCyc11 und ZinJ ebenfalls konserviert vorliegen (Asp28 und Asp94) und in SalBIII verantwortlich für die Aktivität sind.<sup>[105]</sup> Die Überlagerung der modellierten Strukturen des aktiven Zentrums von IndCyc11, Lsd19/LasB<sup>[132]</sup> und SalBIII zeigen, dass die beiden Aspartat-Reste die exakt äquivalenten Positionen einnehmen. Arg45, Tyr54 und Ile65 besitzen ebenfalls enge Gegenstücke in IndCyc11, was damit übereinstimmt, dass einer oder mehrere dieser Reste eine



katalytische Rolle spielen. Daher ist es wahrscheinlich, dass diese Enzyme einen ähnlichen katalytischen Mechanismus für die Pyranbildung anwenden.

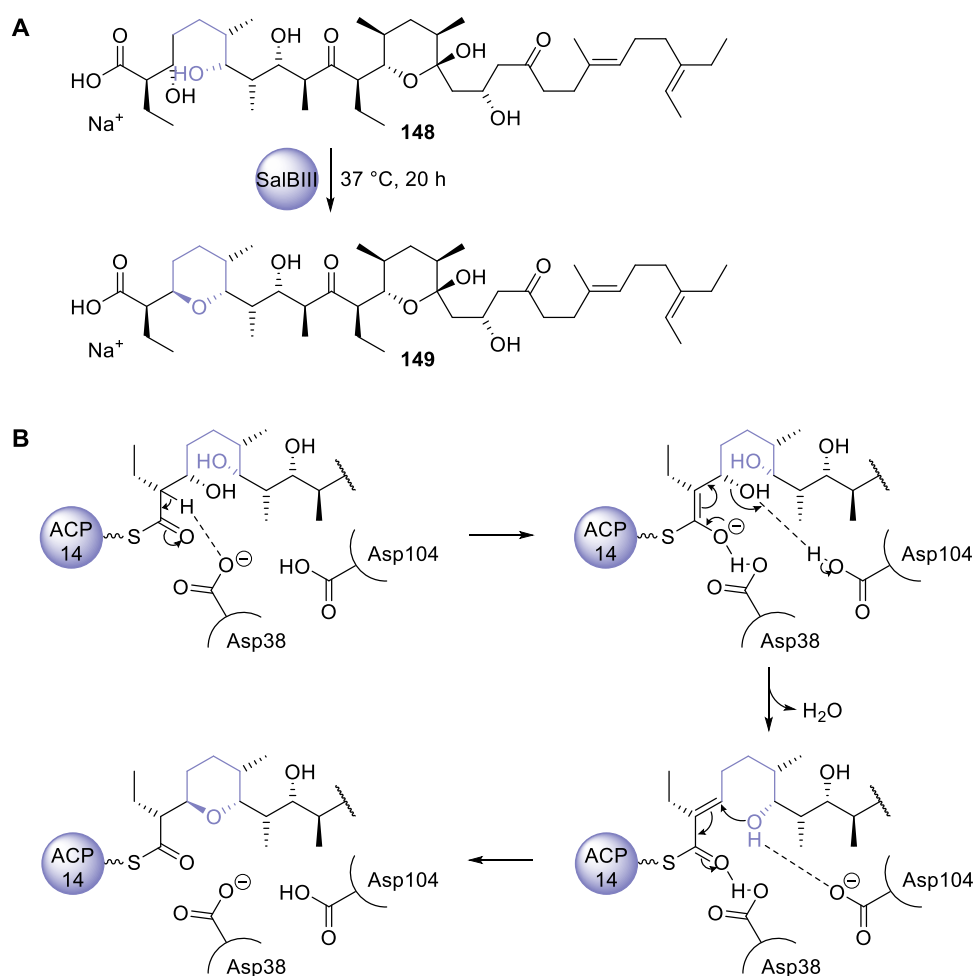


**Abbildung 1-38. Kristallstruktur von SalBIII (PDB-ID: 5XCO).** A) Gesamtfaltung von SalBIII. Bei dem rechten Monomer ist die elektrostatische Oberfläche dargestellt (blau: negativ geladen, rot: positiv geladen). B) Vorgeschlagene aktive Reste in SalBIII. C) Überlagerung der aktiven Reste von SalBIII (orange), IndCyc11 (modelliert, grau) and Lsd19 (PDB-ID: 3RGA, grün); übernommen von LUHAVAYA *et al.*<sup>[104]</sup>.

SalBIII liegt in Lösung als Dimer vor, wobei jede Untereinheit eine kegelförmige  $\alpha$ + $\beta$ -Fassfaltung annimmt. Diese Faltung wurde zuerst in der Struktur der Scytalon-Dehydratase entdeckt, wo mehrere  $\alpha$ -Helices an der konkaven Seite von gekrümmten  $\beta$ -Faltblättern anliegen, wodurch ein weitgehend hydrophober Hohlraum des aktiven Zentrums entsteht, der an einer Seite geschlossen ist (Abbildung 1-38).<sup>[133]</sup> In verschiedenen anderen Enzymen, die nach der allgemeinen Säure-Base-Katalyse agieren, konnte ebenfalls diese Art der Faltung entdeckt werden.<sup>[110,132,132,134–136]</sup> Die 3D-Strukturen, die denen von SalBIII am ähnlichsten sind, sind die der Epoxidhydrolasen vom MonB-Typ, wobei in SalBIII einer der beiden katalytischen Reste fehlt und die Aminosäureabfolge ebenfalls variiert.<sup>[61,137,138]</sup>

Durch Deletionsstudien und *in vitro*-Aktivitätstests konnten LUHAVAYA *et al.*<sup>[104]</sup> die Beteiligung von SalBIII an der Ausbildung des 3D,7L-*trans*-konfigurierten THP-Rings in Salinomycin (**68**) bestätigen. Ein möglicher Mechanismus ist eine Kaskade aus Dehydratisierung und intramolekularer oxa-MICHAEL-Addition am entstehenden  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Thioester, bei dem die katalytische Diade die benötigten Säure/Base-Funktionen liefert (Abbildung 1-39). Bei dem vorliegenden Mechanismus handelt es sich um eine E1cb-ähnliche Eliminierung, wobei auf die allgemeine basenkatalysierte Spaltung der CH-Bindung an C2 unter Bildung eines stabilisierten Enolats eine  $\beta$ -Eliminierung von C3 folgt.<sup>[139]</sup> Asp38 und Asp104 bilden dabei die katalytische Diade, die die benötigten Säure/Base-Funktionen liefert. Asp38 fungiert als allgemeine Base für die Protonenabstraktion und die Bildung und Stabilisierung des Enolats kann auch durch allgemeine Säurekatalyse begünstigt werden, was die Polarisierung des Thioestercarbonyls beinhaltet. Asp104 unterstützt die  $\beta$ -Eliminierung an C3 und die anschließende oxa-konjugierte Addition der C7-Hydroxygruppe

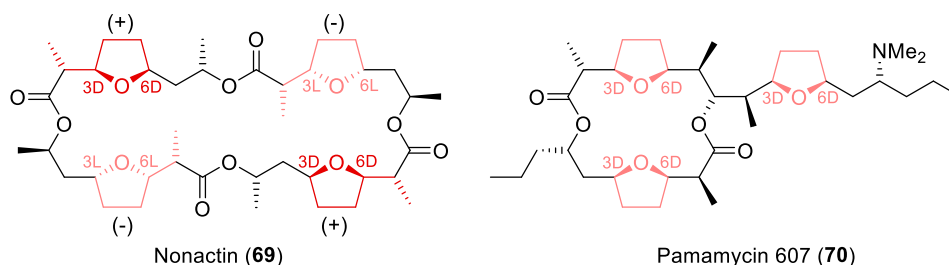
des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Thioesters, was zu einer *syn*-Addition der Doppelbindung führt. Asp38 könnte die Ringbildung durch Wasserstoffbrücken zum Thioestercarbonyl unterstützen oder das Proton an C2 des Pyrans liefern.<sup>[104]</sup> Aufgrund der bereits beschriebenen Homologie zwischen den drei Epoxid-Hydrolasen/Zyklasten IndCyc11, ZinJ und SalBIII ist es wahrscheinlich, dass bei diesen Pyran-bildenden Zyklasten der gleiche biosynthetische Mechanismus vorliegt.



**Abbildung 1-39. Mechanismus der SalBIII-katalysierten Reaktion.** **A)** *In vitro*-Analyse der SalBIII-katalysierten Dehydratisierung und Zyklisierung durch LUHAVAYA *et al.*<sup>[104]</sup>. **B)** Vorgeschlagener Mechanismus der SalBIII-katalysierten Dehydratisierung und anschließender intramolekularer oxa-MICHEAL-Addition. Asp38 und Asp104 bilden die katalytische Diade. ACP14: terminale ACP-Domäne der Sal-PKS. Der durch SalBIII gebildete Pyranring ist **lila** hervorgehoben.<sup>[104]</sup>

### 1.3.4. Furanbildende Zyklasten: NonS und PamS

Die zwei als Enoyl-CoA-Hydratase annotierten Enzyme **NonS** und **PamS** sind an der Tetrahydrofuran (THF)-Bildung in der Biosynthese der beiden Macrolide Nonactin (**69**) und Pamamycin 607 (**70**) beteiligt (Abbildung 1-40).<sup>[111,140,141]</sup>



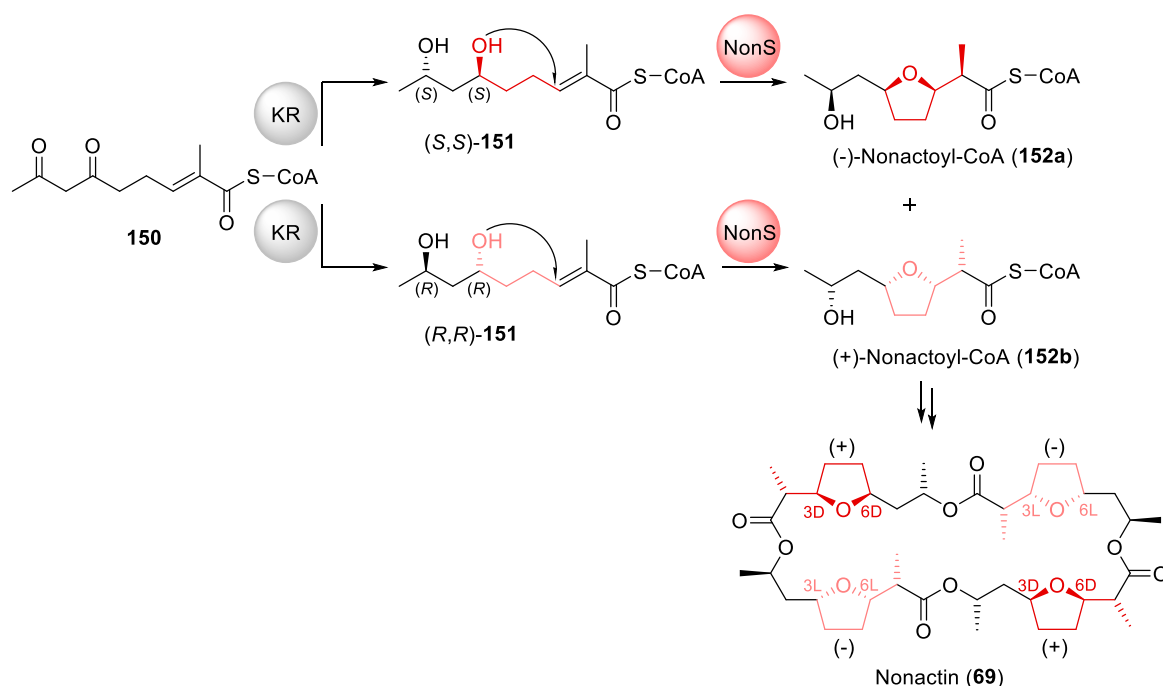
**Abbildung 1-40. Struktur von Nonactin (69) und Pamamycin 607 (70).**<sup>[111,141]</sup> Die durch NonS bzw. PamS gebildeten Furanringe sind **rot** bzw. **rosa** hervorgehoben.

#### 1.3.4.1. NonS

Makrotetrolide gehören zur Familie der makrozyklischen Polyether und werden von einer Reihe von Streptomyceten, darunter *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* ETH A7796 und *Streptomyces fulvissimus* produziert. Sie weisen ein breites Spektrum an biologischen Aktivitäten auf (antibakteriell, antitumorös, antifungal, immunsuppressiv).<sup>[24,142]</sup> Das ionophore Makrotetrolid-Antibiotikum ist als der kleinste Vertreter der zyklischen Polyether ein wirksamer Inhibitor des verantwortlichen P170-Glykoproteins.<sup>[143]</sup> Nonactin (**69**) ist ein achirales Molekül bestehend aus vier Nonactinsäureeinheiten, die stereospezifisch durch Kopf-Schwanz-Verknüpfungen zu einem C<sub>2</sub>-symmetrischen (-)-(+)-(-)-(+)-Makrozyklus im Endprodukt zusammengesetzt werden. Bei den beiden Grundbausteinen handelt es sich um zwei enantiomere Hydroxysäuren mit THF-Ringen.<sup>[142]</sup>

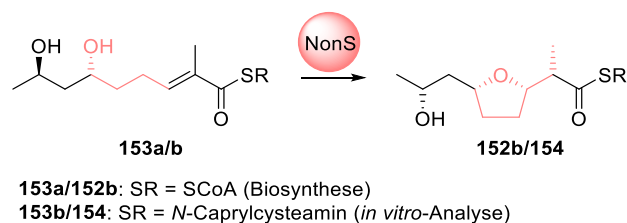
Die Nonactin-Biosynthese ist aufgrund der Zugehörigkeit von Nonactin zu einer Antibiotika-Klasse und der C<sub>2</sub>-symmetrischen Struktur grundlegend erforscht und weist mehrere ungewöhnliche Merkmale auf. Sequenzanalysen ergaben 22 ORFs, die in die Makrotetrolid-Biosynthese involviert sind. Fünf alleinstehende KS- (*nonJKPQU*) und vier KR-Enzyme (*nonEMNO*) konnten identifiziert werden, jedoch kein ACP.<sup>[144]</sup> Alle fünf KS-Domänen sind homolog zu KS des Typs II PKS oder Typ II FAS, die allerdings beide ACP-abhängig sind. Bei der Non-PKS handelt es sich demnach um eine nicht-iterativ wirkende Typ II-PKS, welche über kein ACP verfügt, das an der Bildung von Nonactoyl-CoA **152a/152b** beteiligt ist, mit zusätzlichen Genen einer modularen Typ I PKS.<sup>[111,142]</sup> Ausgehend von Acetyl-, Malonyl- und Succinyl-CoA erfolgt die Kondensation zu einem 3-oxo-Thioester und Umsetzung zu dem achiralen Vorläufer **150** (Abbildung 1-41). Anschließend folgt die stereoselektive Reduktion zu den *trans*-Diastereomeren (6*S*,8*S*)-**151** und (6*R*,8*R*)-**151** von (*E*)-6,8-Dihydroxy-2-

methylnon-2-enoyl-CoA. Diese werden durch NonS unter Aufbau von zwei neuen Stereozentren zu (+)- und (-)-Nonactoyl-CoA (**152a/152b**) *via* oxa-MICHAEL-Addition zyklisiert (Abbildung 1-41).<sup>[111,145]</sup> Der finale Aufbau von Nonactin (**69**) verläuft über Kopf-Schwanz-Verknüpfung von jeweils zwei Molekülen der Enantiomere **152a/152b** im (+)-(-)-(+)-(-)-Muster, woraus sich der C2-symmetrische Makrozyklus ergibt.<sup>[146]</sup>



**Abbildung 1-41. Ausschnitt aus der Nonactin (**69**)-Biosynthese nach WOO *et al.*<sup>[24,142]</sup>. Die durch NonS gebildeten Furanringe sind rot bzw. rosa hervorgehoben.**

WOO *et al.*<sup>[111]</sup> konnten zeigen, dass das Zelllysate eines *nonS*-überexprimierenden *Streptomyces lividans*-Stammes den realistischen *N*-Caprylcysteamin-Thioester **153** zu **154** zyklisiert (Abbildung 1-42). SMITH *et al.*<sup>[147]</sup> bestätigten diese Erkenntnisse mittels *in vivo*-Experimenten. NonS wurde somit als Enoyl-CoA-Hydratase annotiert und zeigt einen hohen Grad an Homologie zu anderen, meist noch uncharakterisierten Enzymen in verschiedenen anderen Clustern von *Streptomyces*-Stämmen.



**Abbildung 1-42. NonS-katalysierte Zyklisierungsreaktion von **153** zu **152b** bzw. **154**.**<sup>[24,111,140,147]</sup> Das Produkt des Gens *nonS* katalysiert die Zyklisierung von (6*R*,8*R*,*E*)-6,8-Dihydroxy-2-methylnon-2-enoylsäurethioester (**153a/b**) zu (+)-Nonactinsäurethioester (**154** und **152b**). Der durch NonS gebildete Furanring ist rosa hervorgehoben.

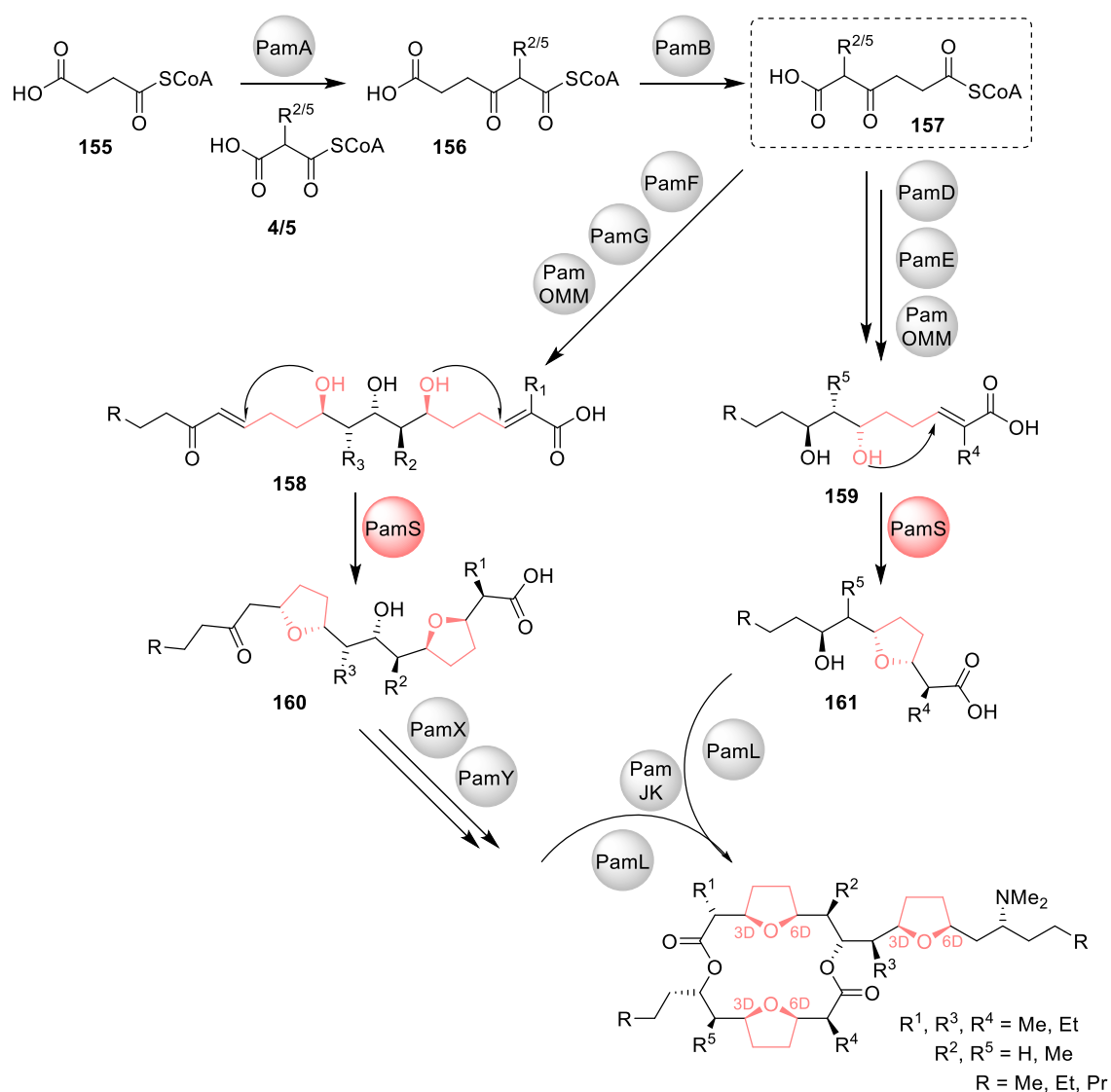
#### 1.3.4.2. PamS

Pamamycine gehören zur Gruppe der polyketidischen Macrodiolid-Naturstoffe mit antibiotischen Eigenschaften und werden von verschiedenen *Streptomyces*-Arten produziert. Neben antibiotischen besitzen sie ebenfalls autoregulatorische, anionophore und antimykotische Aktivitäten.<sup>[15]</sup> Aus *S. alboniger* konnte zunächst die Struktur von Pamamycin 607 (**70**) isoliert werden.<sup>[148]</sup> Erneute Untersuchungen zeigten eine größere Diversität von Pamamycinen durch verschiedene Substituenten (Abbildung 1-40), wobei sich alle Derivate aus einer großen (**160**) und einer kleinen Hydroxysäure (**161**) zusammensetzen (Abbildung 1-43).<sup>[149–151]</sup> Die Anordnung der THF-Bausteine ähnelt der Struktur von Nonactin (**69**), was zusätzliches Interesse an der biosynthetischen Erforschung weckt.

REBETS *et al.*<sup>[141]</sup> gelang die Aufklärung der Sequenz des Genclusters der makrodioliden Antibiotika-Gruppe der Pamamycine und ausgiebige Untersuchung einiger Gene. Diese Analysen lieferten PamS, ein NonS-Homolog mit 28% Sequenzhomologie, von dem vermutet wird, dass es die Bildung der drei THF-Ringe *via* oxa-MICHAEL-Addition katalysiert. Mit Blick auf die Heterozyklen in Pamamycin 607 (**70**) wird deutlich, dass die Ringe aus unterschiedlichen Vorläufern biosynthetisiert werden. Falls PamS alle Zyklisierungsreaktionen katalysiert, würde dies auf eine ungewöhnlich breite Substrattoleranz hindeuten, was dieses Enzym für die biokatalytische Forschung umso interessanter machen würde.<sup>[24,111,141]</sup>

Das Gencluster der Pam-PKS enthält ein Gen, das für ein ACP codiert und PKS-Gene, die für insgesamt sieben verschiedene KS codieren. Diese ungewöhnlichen KS-Enzyme wurden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu den KS aus nicht-iterativen Typ II PKS zugeordnet. Die erhaltenen genetischen und biochemischen Daten lieferten wichtige Hinweise, wodurch es REBETS *et al.*<sup>[141]</sup> gelang, die Biosynthese von Pamamycin zu postulieren. Die Deletion von einzelnen Genen der Pamamycin-Biosynthese und Analyse der erhaltenen Metabolite lieferten Rückschlüsse auf die Funktion der weiteren Gene. PamB, D und O scheinen somit an den anfänglichen Schritten der Biosynthese und PamK, J und L an den finalen Schritten der Biosynthese beteiligt zu sein. Durch *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente konnte bestätigt werden, dass die Biosynthese mit einer PamA-katalysierten Kondensation von Succinyl-CoA **155** und Malonyl-CoA **4** oder Methylmalonyl-CoA **5** beginnt. Dadurch entsteht 3-Oxo adipyl-CoA **156** als wichtiges Schlüsselintermediat und Schnittpunkt zwischen dem Primärmetabolismus und der Pamamycin-Biosynthese.<sup>[152]</sup> Das erhaltene Intermediat **156** wird anschließend durch die AT PamB gedreht.<sup>[140]</sup> 4-Oxo adipyl-CoA und 5-Methyl-4-oxo adipyl-CoA **157** dienen als Verlängerungseinheiten für die PamB-katalysierte CLAISEN-Kondensation mit einer kurzkettigen Acylstarteinheit gefolgt von der Addition von Malonyl-CoA durch

PamE.<sup>[153]</sup> Die Biosynthese teilt sich anschließend in zwei Wege, wobei unterschiedliche Enzyme nacheinander aktiv sind. Den beiden Molekülen **158** und **159** gemeinsam ist die Zyklisierung zum fünfgliedrigen Sauerstoffheterozyklus durch PamS. Die beiden erhaltenen Produkte **160** und **161** werden anschließend durch die Acyl-CoA-Ligase PamL aktiviert. Der Ringschluss zum Makrodiolid erfolgt letztlich durch eine ungewöhnliche C-O-Kondensation, die durch die KS PamJ und PamK katalysiert wird.<sup>[141,154]</sup>



**Abbildung 1-43. Ausschnitt aus der Pamamycin (70)-Biosynthese nach REBETS *et al.*<sup>[141]</sup>.** Das Schlüsselintermediat 4-Oxo adipyl-CoA bzw. 5-Methyl-4-oxoadipyl-CoA **157** ist im gestrichelten Rahmen dargestellt. Die durch PamS gebildeten Furanringe sind **rosa** hervorgehoben.

## 1.4. Immobilisierung von Enzymen

Wie bisher deutlich zu sehen, besitzen Enzyme viele Vorteile gegenüber klassischen Katalysatoren, wie eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität sowie milde Reaktionsbedingungen. Dies macht Enzyme zu vielseitig einsetzbaren Biokatalysatoren und idealen Kandidaten für den Einsatz im industriellen Maßstab. Ein Einsatz in der Industrie ist bisher noch durch eine mangelnde Langzeitstabilität und Schwierigkeiten beim Recycling eingeschränkt. Diese Limitierungen können jedoch größtenteils durch eine Immobilisierung von Enzymen umgangen werden.<sup>[155]</sup>

Eine Immobilisierung kann dazu genutzt werden, ein Enzym in einer wiederverwendbaren, oft auch stabileren Form zu erhalten. Neben einer gesteigerten Stabilität und mehrfachem oder kontinuierlichem Einsatz ist es möglich, das Enzym nach erfolgter Reaktion einfach vom Reaktionsgemisch abzutrennen. Dadurch können beispielsweise Kontaminationen im Produkt durch Proteine vermieden werden. Zudem besteht die Möglichkeit zur Beeinflussung der katalytischen Eigenschaften der immobilisierten Enzyme. Jede Immobilisierung stellt somit einen Kompromiss zwischen der Erhaltung der katalytischen Aktivität und den eben genannten Vorteilen dar.<sup>[155]</sup>

Bei der Immobilisierung kann grundsätzlich zwischen vier Methoden unterschieden werden: nichtkovalente und kovalente Verknüpfung, Einschluss in einem polymeren Gel, Membran oder Kapsel und Vernetzung in einem polyfunktionalen Reagens. Eine Möglichkeit der Enzymimmobilisierung ist die Bindung von Proteinen mittels Affinitäts-*tags* (z.B. FLAG-, Strep-, GST- oder His<sub>6</sub>-*tag*) an ein Trägermaterial. Weiterhin kann das Protein kovalent über einen Crosslinker mit sich selbst oder anderen Proteinen quervernetzt werden. Hierfür können oberflächenexponierte Arginin- oder Lysinreste mit freier Aminogruppe durch Glutaraldehyd verknüpft werden (Abbildung 1-44). Daraus ergeben sich Proteinaggregate, sogenannte *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs), die entweder eine Sorte von Protein enthalten oder eine Mischung aus mehreren Proteinen (combiCLEAs). Diese Art der Präparation bietet den Vorteil einer einfachen Handhabung, da die zu immobilisierenden Proteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat aufgrund des Aussalzeffektes aus dem Zelllysat gefällt werden, aber ihre native Faltung beibehalten. Der Zusatz von Crosslinking-Reagenzien führt zu einer kovalenten Verknüpfung zwischen freien Aminogruppen des Proteins.<sup>[156]</sup> Außerdem kann ein Enzym an die Oberfläche eines geeigneten Festkörpers gebunden werden. Dabei kann eine Immobilisierung an magnetischen, mit Epoxygruppen funktionalisierten *beads* erfolgen, da die Epoxygruppen im Gegensatz zu einer Funktionalisierung mit Carboxylgruppen keinen Einfluss auf den pH ausüben.<sup>[157]</sup>

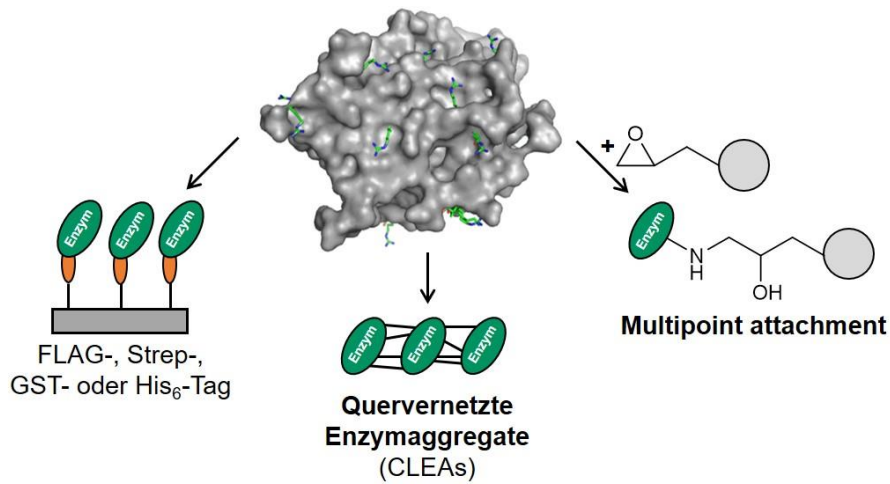


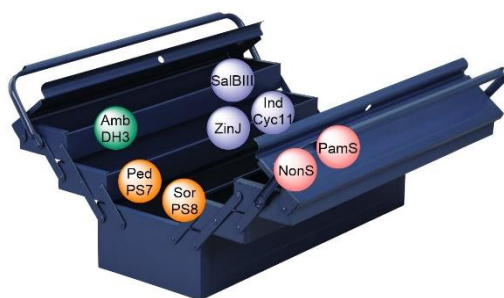
Abbildung 1-44. Auswahl von verschiedenen Methoden der Immobilisierung von Enzymen.<sup>[158,159]</sup>

In allen Fällen ist die mehrfache Verwendung einer Enzymcharge möglich. Eine Immobilisierung bewirkt zwar oft eine geringfügige Aktivitätsminderung, die jedoch durch die einhergehende Stabilisierung des Enzyms meist bei weitem aufgewogen wird. Zudem besteht durch eine Immobilisierung oft die Möglichkeit der Verwendung des Biokatalysators in nicht-wässrigen Lösungsmitteln wie organischen Lösungsmitteln.<sup>[155,156,158]</sup>



## 2. Zielsetzung

Viele Sauerstoffheterozyklen in Polyketiden und einigen anderen Naturstoffen werden durch eine spezifische Gruppe von Zyklasten gebildet. Diese katalysieren die biosynthetische Bildung der THP- oder THF-Ringe *via* intramolekularer oxa-MICHAEL-Addition. Die sogenannten IMOMA-Zyklasten besitzen ein großes Potential für eine Anwendung als Biokatalysatoren in der Synthese von Feinchemikalien, Naturstoffen sowie von diesen abgeleiteten Wirkstoffen. Diese neue Gruppe an Enzymen ist bisher nur ansatzweise untersucht worden. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll die Grundlage für deren Etablierung in der chemoenzymatischen Synthese geschaffen werden mit dem Fernziel eine „biokatalytischen Werkzeugkiste“ zu entwickeln, mit der sich gezielt Heterozyklen mit bestimmten Eigenschaften herstellen lassen (Abbildung 2-1).



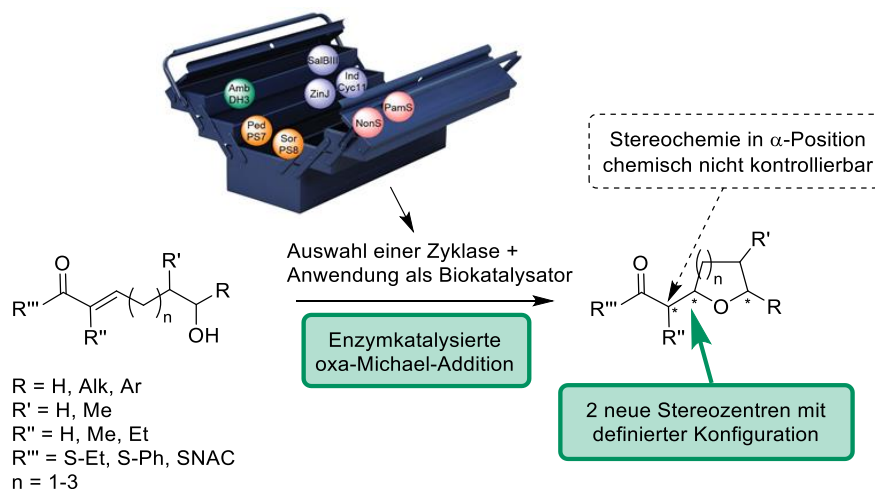
**Abbildung 2-1. Biokatalytische Werkzeugkiste mit den darin enthaltenen Zyklasten zur Synthese von Sauerstoffheterozyklen unterschiedlicher Größe und Konfiguration.**

Die angestrebten Studien sollten die Substratselektivität ausgewählter Zyklaste-Domänen aus verschiedenen Biosynthesewegen näher beleuchten. Dieses Repertoire soll Enzyme enthalten, die die Bildung von Heterozyklen unterschiedlicher Konfigurationen und Ringgrößen katalysieren, um später passende Biokatalysator-Kandidaten für unterschiedliche synthetische Herausforderungen zur Verfügung zu haben.

Die Genexpression und nachfolgende Isolierung und Reinigung von allen rekombinant hergestellten Zyklaste-Domänen sollten hierfür etabliert und möglichst weiter optimiert werden. Im Anschluss sollten die zur Verfügung stehenden Zyklasten charakterisiert und effiziente Einsatzbedingungen entwickelt werden. Die tiefere biochemische Charakterisierung des in unserer Forschungsgruppe bereits etablierten enzymatischen Domäne AmbDH3 sollte zudem weiter vorangetrieben werden und anschließend als Blaupause für die weiteren Heterozyklen-bildenden Zyklasten dienen. Im Zuge eines Kooperationsprojektes sollten auch strukturelle Untersuchungen sowie gezielte Mutagenesestudien durchgeführt werden.

Enzymreaktionen mit zur Verfügung gestellten Substraten sollten mit allen erhaltenen Zyklaste-Domänen durchgeführt werden, um deren Substrattoleranz und Stereoselektivität zu

untersuchen (Abbildung 2-2). Dabei ist ein breites Spektrum unterschiedlicher Substitutionsmuster in den verwendeten Substraten besonders wünschenswert.



**Abbildung 2-2. Enzymkatalysierte oxa-MICHAEL-Addition mithilfe der Biokatalyse-Werkzeugkiste zum Aufbau von Sauerstoffheterozyklen.**

Die Immobilisierung von Enzymen kann deren Stabilität teils deutlich verbessern sowie Wiederverwendbarkeit ermöglichen und zu einer Modulation anderer Eigenschaften führen. Einige der hier bearbeiteten Zyklasen sollten dementsprechend exemplarisch immobilisiert und Anwendbarkeit getestet und näher charakterisiert werden. Dabei sollte auf unterschiedliche literaturbeschriebene Methoden zurückgegriffen werden. Um die Nutzbarkeit der immobilisierten Enzyme für die präparative Synthese von Heterozyklen bewerten zu können, sollten synthetisch relevante Faktoren wie die Substratspezifität oder die Skalierbarkeit der Reaktion untersucht werden.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Klonierung und Expression

Zunächst sollten die Proteine in *Escherichia coli* BL21(DE3) ausgehend von pET28a(+) oder pET29b(+) produziert und anschließend gereinigt werden. Das exprimierte Gen steht in allen pET-Vektoren unter Kontrolle des Lactose-Operators (*lacO*). Dieser kontrolliert in Prokaryoten die Genexpression von drei strukturellen, Lactose-abbauenden Enzymen: einer  $\beta$ -Galactosidase, die Lactose in Galactose und Glucose spaltet, einer  $\beta$ -Galactosid-Permease, die die Aufnahme von Lactose über die Zellmembran gewährleistet und einer  $\beta$ -Galactosid-Transacetylase, die eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf  $\beta$ -Galactoside überträgt. Da Glucose für Bakterien eine effizientere Energiequelle als Lactose darstellt, aktiviert der *lac*-Operator den entsprechenden Promoter nur in Abwesenheit von Glucose und Anwesenheit von Lactose oder Allolactose. Dieser Mechanismus kann genutzt werden, um die Transkription von Genen unter Kontrolle von *lacO* gezielt zu regulieren. Bei Vorhandensein von Lactose wird das Lac-Repressorprotein von *lacO* freigesetzt, wodurch dieses den *lac*-Promotor aktiviert und es zur Transkription kommt. Da der *lac*-Promotor für heterologe Genexpressionen jedoch zu schwach ist und für eine effiziente heterologe Genexpression größere Mengen an mRNA produziert werden müssen, wurde dieser durch den viralen T7-Promotor ausgetauscht. Dieser bewirkt nach Zugabe von Lactose eine sehr starke Überproduktion des entsprechenden Proteins. Die zur Transkription benötigte T7-Polymerase ist in *E. coli* BL21(DE3) im Genom codiert. Als Induktor wurde anstelle von Lactose das Strukturanalogon Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) verwendet. Anders als Lactose kann IPTG von Bakterien nicht metabolisiert werden, wodurch dieses während der gesamten Inkubationszeit in gleichbleibenden Mengen vorliegt und somit eine konstante Proteinmenge hergestellt wird.<sup>[160,161]</sup>

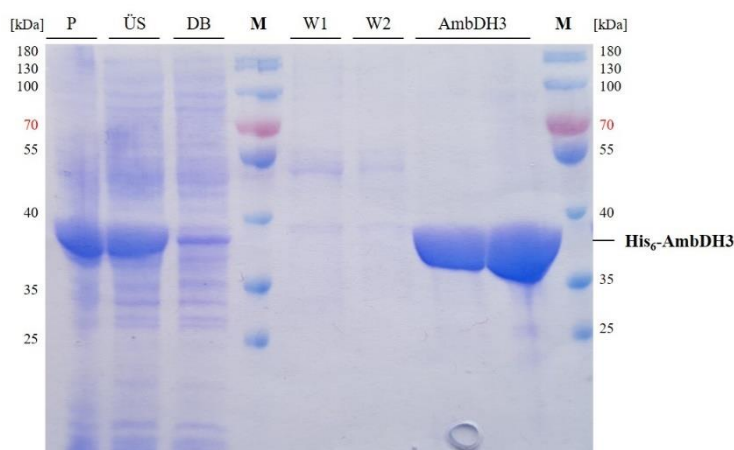
Für die standardmäßige Genexpression wurde *E. coli* BL21(DE3) mit eingebrachtem pET28a(+)-Expressionsvektor verwendet. Dabei lagen alle Gene sequenzoptimiert für die Genexpression in *E. coli* vor. Das T7-RNA-Polymerase-IPTG-Induktionssystem wurde verwendet und bietet die Möglichkeit hoher Expressionslevel und einer leichten Handhabbarkeit. Die Genexpression wurde standardmäßig mit 0.1 mM IPTG induziert und fand für 22 h bei 15 °C statt. Solche milden Expressionsbedingungen sorgen für eine langsamere Produktion des Zielproteins und können dessen Aggregation zu unlöslichen *inclusion bodies* (IBs) verhindern.<sup>[27]</sup> Nach Ernte der Zellen wurde eine Lyse mittels Ultraschallbehandlung durchgeführt und unlösliche Bestandteile wie Zelltrümmer abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Reinigung des Lysats *via* Ni-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-

AC) unter nativen Bedingungen. Die Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial wird dabei durch Komplexbildung der immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen durch den Hexahistidin-*tag* (His<sub>6</sub>-*tag*) bewerkstelligt. Der Waschpuffer kann geringe Mengen an Imidazol enthalten, sodass unspezifisch bindende, kontaminierende Proteine von der Säule in einem Waschschrift einfach entfernt werden können. Für schwach bindende Proteine bietet sich ein Waschpuffer ohne Imidazol an, da das Zielprotein ansonsten noch vor dem Elutionsschritt von der Säule gewaschen wird. Die nachfolgende Elution der am Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte kompetitiv mit einem linearen Gradienten von Imidazol. Der anschließende Pufferwechsel der proteinenthaltenden Elutionsfraktionen erfolgte mittels einer Entsalzungssäule zum standardmäßig verwendeten 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer. Dabei wird Imidazol entfernt, um mögliche Effekte desselben auf die Proteinaktivität und -stabilität auszuschließen. Um die Proteine für die *in vitro*-Aktivitätstests in hohen Konzentrationen zu erhalten, erfolgte eine Anreicherung mit einem Proteinkonzentrator.

### 3.1.1. AmbDH3

#### 3.1.1.1. Gewinnung von AmbDH3 aus *E. coli* BL21 pET28a(+) *ambDH3*

Die Kultivierung von *E. coli* BL21 mit pET28a(+)-*ambDH3* fand in dYT-Medium statt. Die Genexpression wurde mit 0.1 mM IPTG induziert und für 22 h bei 15 °C inkubiert. Der Verlauf der Reinigung von AmbDH3 wurde anhand einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH3 (34 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3*.** Die Reinigung erfolgte *via* Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschschrift (W) und vereinte, konzentrierte Enzymlösung nach Pufferwechsel (AmbDH3 in HEPES-Puffer (A) bzw. HEPES-Glycerin-Puffer (B)).

Die Intensität der entsprechenden Banden bei etwa 35–40 kDa, deutet darauf hin, dass das Zielprotein in allen Fällen in ausreichender Menge produziert wurde (Abbildung 3-1). Es

zeigen sich nur minimale Verluste im Durchbruch sowie in den Waschfraktionen. In den Elutionsfraktionen sind nur sehr schwache Banden mit einem anderen Molekulargewicht zu erkennen, was auf geringe Verunreinigungen durch andere Proteine hindeutet. Das Zielprotein konnte somit erfolgreich mithilfe der Ni-NTA-AC gereinigt und in anschließenden Aktivitätstests eingesetzt werden (Abschnitt 3.3).

### 3.1.1.2. Klonierung von *ambDH3* in pCold-I

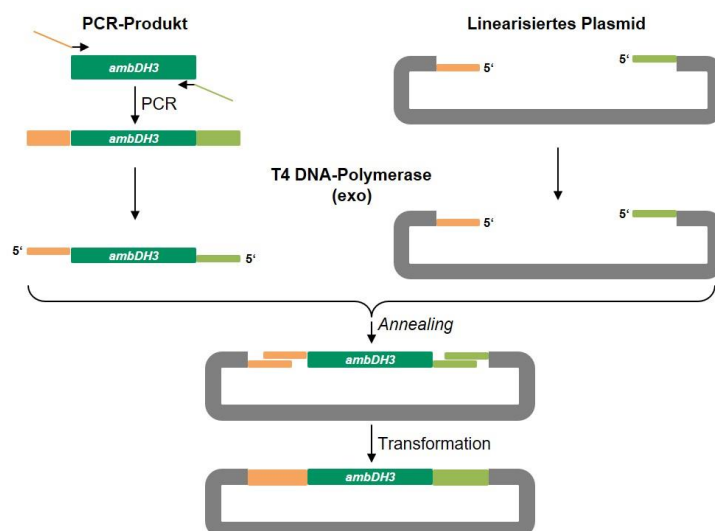
Für weitere *in vitro*-Untersuchungen sollte die Gensequenz von *ambDH3* in pCold-I kloniert werden. Besonders interessant ist die Möglichkeit der Induktion durch einen Kälteschock. Hierbei handelt es sich um eine besonders sanfte Induktionsvariante durch niedrige Temperaturen (15 °C), welche zu einer Erhöhung der Löslichkeit des produzierten Proteins führen kann. Dabei wird die Produktion von Wirtsproteinen möglichst niedrig gehalten und Proteaseaktivität minimiert, wodurch hohe Ausbeuten an Zielprotein erreicht werden können (bis zu 60% der intrazellulären Proteine).<sup>[162]</sup>

#### 3.1.1.2.1. Klonierung mittels T4-DNA-Ligase

Für die klassische Klonierung sollte eine Restriktion von *ambDH3* und dem Zielvektor pCold-I mit den Enzymen *EcoRI* und *NdeI* erfolgen. Nach Restriktionshydrolyse der beiden Komponenten pET28a(+)-*ambDH3* und pCold-I erfolgte die Ligation der beiden Komponenten durch eine T4-DNA-Ligase. Diese Methode führte jedoch nicht zum Erhalt von pCold-I-*ambDH3*.

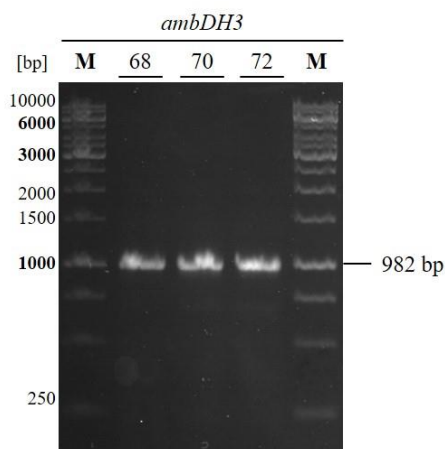
#### 3.1.1.2.2. Klonierung mittels *Two-step-SLIC*

Da die Methode der Restriktion und anschließenden Ligation mit einer Ligase nicht erfolgreich verlief, wurden Versuche unternommen die Klonierung von *ambDH3* in pCold-I mittels einer *Two-step sequence and ligation-independent cloning (SLIC)* zu ermöglichen. Bei Verwendung dieser Methode wurden zunächst homologe Überhänge des verwendeten Gens zum Zielvektor mittels Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction, PCR*) erzeugt. Der Zielvektor wurde mittels Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und lag so in linearer Form vor. Insert und Zielvektor wurden in einem ersten Schritt separat mit T4 DNA-Polymerase inkubiert. Da keine freien Nukleotide vorhanden waren, übte die T4 DNA-Polymerase lediglich ihre 3'→5'-Exonuklease-Aktivität aus und erzeugte somit einsträngige Überhänge. Durch Zugabe von Desoxycytidintriphosphat (dCTP) wurde die Exonuklease-Aktivität gestoppt. Aufgrund der zuvor erzeugten homologen Enden konnten in einem zweiten Schritt die beiden Teile mit zusätzlicher Hilfe einer DNA-Ligase ligiert werden.



**Abbildung 3-2. Arbeitsschema für die Klonierung von *ambDH3* in *pCold-I* mittels SLIC.** Dabei erfolgte zuerst die Erzeugung von homologen Enden mittels PCR und Linearisierung des Zielvektor *pCold-I* durch Restriktionshydrolyse. Beide Komponenten wurden anschließend separat mit der T4 DNA-Polymerase inkubiert. Die Ligation erfolgte durch Inkubation aller Komponenten unter Zuhilfenahme der DNA-Ligase. Die Transformation der Ligationsreaktion führte zum Endprodukt *pCold-I\_ambDH3*.<sup>[163]</sup>

Für diese Methode wurde eine PCR von *pET28a(+)\_ambDH3* mit den entsprechenden Primern P5+6 (Tabelle 8-4) durchgeführt, um das Gen *ambDH3* mit Überhängen zu amplifizieren (Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-3. Agarosegel (1%) der PCR zur Amplifizierung von *ambDH3* mit 20 bp langen Überhängen an beiden Enden.** Aufgetragen wurden Marker (M) und die PCR-Produkte bei den *Annealing*-Temperaturen 68–72 °C ausgehend von *pET28a(+)\_ambDH3* und den Primern P5+6 (Tabelle 8-4). Zu erwartende Fragmentgröße: 982 bp.

Anschließend wurde der Leervektor *pCold-I* mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NdeI* inkubiert. Infolgedessen wurden gereinigtes Insert und hydrolysiertes Leervektor über eine *Two-Step-SLIC* miteinander ligiert und das Produkt in Zellen des *E. coli* One Shot TOP10 Stammes transformiert. Aus den erhaltenen positiven Klonen wurde zunächst die Plasmid-DNA isoliert. Für eine Testrestriktion wurde das Plasmid mit den beiden verwendeten Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NdeI* hydrolysiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese

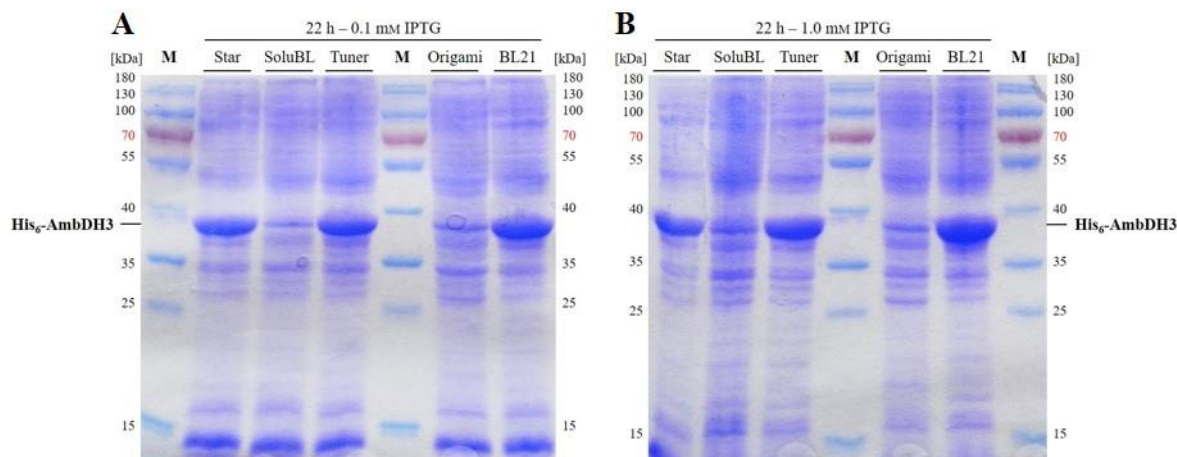
analysiert. Eine parallele Überprüfung mehrerer Kolonien gleichzeitig wurde mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Die Sequenzierung von Proben mit erwarteter Produktgröße ergab eine Übereinstimmung der Sequenzen und zeigte somit den Erfolg der Etablierung des Vektors pCold-I\_ambDH3. Dieser Vektor steht für zukünftige Expressionstests zur Verfügung.

### 3.1.1.3.Optimierung der AmbDH3-Produktion

#### 3.1.1.3.1. Variation des Expressionsstammes

Exemplarisch wurde die Anwendbarkeit der in unserer Forschungsgruppe bereits biochemisch charakterisierten Zyklase AmbDH3 gezielt weiter verbessert. In bisherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Expression von pET28a(+)\_ambDH3 in *E. coli* BL21 bei 15 °C für 22 h mit 0.1 mM IPTG das lösliche Enzym in sehr guter Menge und Reinheit liefert (Abschnitt 3.1.1.1). Hier konnten ca. 70 mg gereinigtes AmbDH3 pro Liter Expressionskultur erhalten werden.<sup>[164]</sup>

Ausgehend davon sollte getestet werden inwiefern es möglich ist durch Änderung des *E. coli*-Expressionsstammes größere Mengen an löslichem AmbDH3 zu erhalten. Hierfür wurde das Plasmid in die *E. coli*-Stämme Tuner™(DE3), One Shot™ BL21 Star™(DE3), Origami™ B(DE3) und SoluBL21™ transformiert (Details und Quellen zu den Genotypen der Stämme finden sich in Abschnitt 8.3.3). Bei allen Stämmen handelt es sich um Derivate von BL21(DE3). Diese enthalten somit eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, das wiederum unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht. Die Expression eines Zielgens kann somit durch Zugabe von IPTG eingeleitet werden.<sup>[165]</sup> Aufgrund einer gleichmäßigeren Aufnahme von IPTG in die Zellen kann bei *E. coli* Tuner eine verbesserte Anpassung des Genexpressionslevels erreicht werden. In *E. coli* Star liegt die mRNA besonders stabil vor, wodurch eine größere Menge an löslichem Protein erhalten werden kann. *E. coli* Origami zeichnet sich, ebenso wie Tuner, durch ein gleichmäßiges und anpassbares Expressionslevel sowie durch eine verbesserte Bildung von Disulfidbrücken im produzierten Protein aus. Eine verbesserte Löslichkeit des Proteins kann durch die Produktion in *E. coli* SoluBL aufgrund von zufallsgenerierten Mutationen erreicht werden.



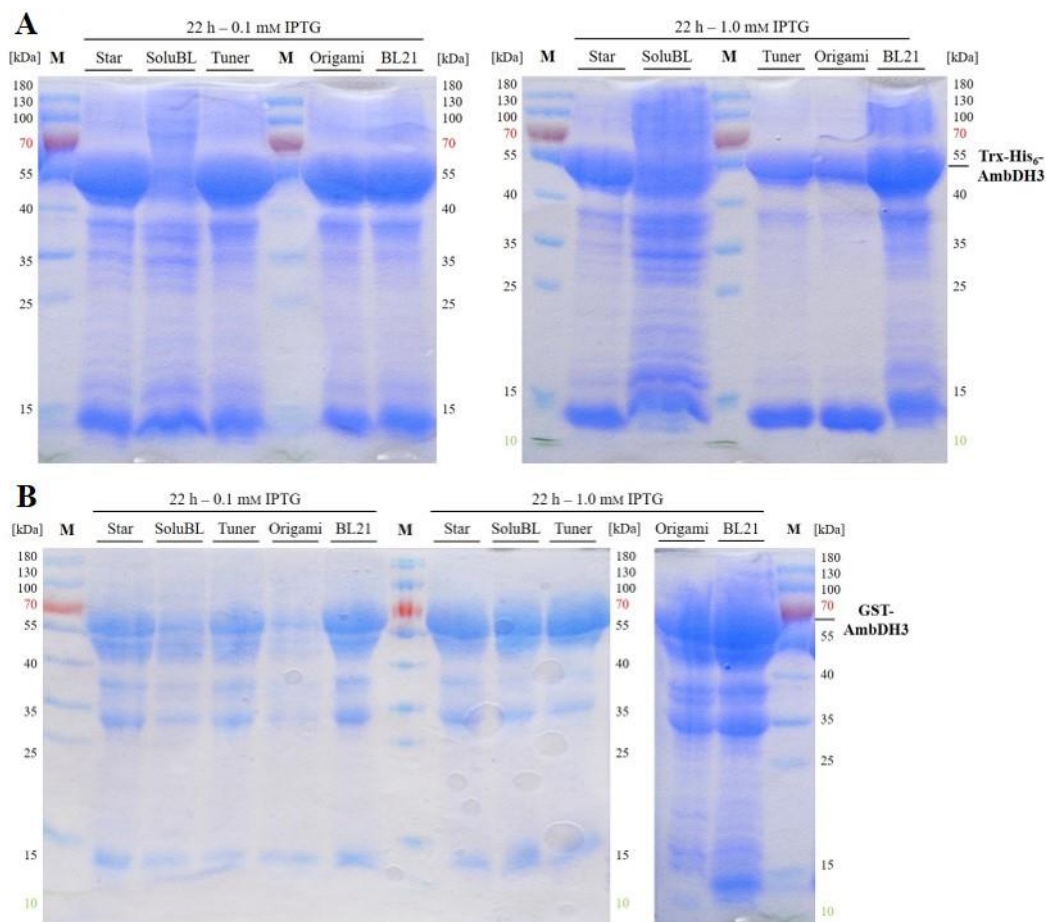
**Abbildung 3-4.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-AmbDH3 (34 kDa) in *E. coli* Star, SoluBL, Tuner, Origami und BL21 pET28a(+)\_ambDH3. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM (A) bzw. 1.0 mM IPTG (B) bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Lysozymbehandlung. Aufgetragen wurden Marker (M) und jeweils die Überstände aus den Kultivierungen nach Zellaufschluss. Die Volumina der aufgetragenen Proben innerhalb eines Gels stehen in Relation zum Volumen der jeweiligen Fraktion.

Die Produktion von AmbDH3 war vor allem in den Stämmen BL21, Star und Tuner erfolgreich (Abbildung 3-4). Bei diesen drei Stämmen war eine deutlich höhere Menge an Protein erkennbar. Der Stamm *E. coli* BL21 ist ein bekannter Stamm zur Produktion von Proteinen, der häufig verwendet wird, um ein hohes Level an löslichem Protein zu erhalten. Dieser Stamm zeigte auch hier das größte Potential.

### 3.1.1.3.2. Variation des Expressionsvektors

Neben den Expressionsstämmen wurden die Expressionsvektoren zu pET32a(+) und pGEX-6P-1 variiert. Diese zeichnen sich durch einen N-terminalen Thioredoxin- (Trx) und His<sub>6</sub>-tag bzw. Glutathion-S-Transferase (GST)-tag aus. Sowohl Trx- als auch GST-tag zählen zu den solubilisierenden Protein-tags, die dem Protein dabei helfen können die richtige Faltung einzunehmen. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 3-5 dargestellt.





**Abbildung 3-5.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Produktion von Trx-His<sub>6</sub>-AmbDH3 (52 kDa) (A) bzw. GST-AmbDH3 (61 kDa) (B) in *E. coli* Star, SoluBL, Tuner, Origami und BL21 pET32a(+)<sub>ambDH3</sub> (A) bzw. pGEX-6P-1<sub>ambDH3</sub> (B). Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 bzw. 1.0 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Aufgetragen wurden Marker (M) und jeweils die Überstände aus den Kultivierungen nach Zellaufschluss. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Lysozymbehandlung. Die Volumina der aufgetragenen Proben innerhalb eines Gels stehen in Relation zum Volumen der jeweiligen Fraktion.

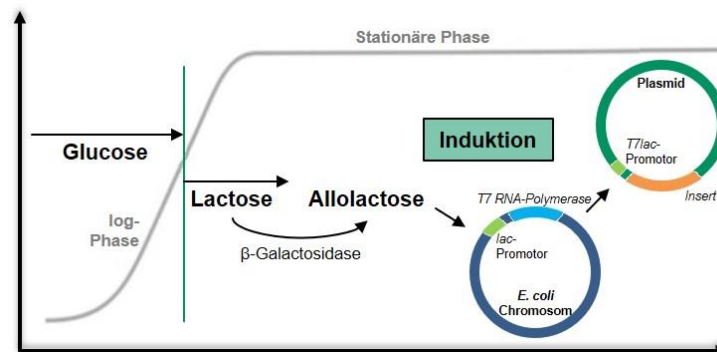
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Expressionsstamm *E. coli* BL21 bei Verwendung von sämtlichen Vektoren die höchste Ausbeute an löslichem AmbDH3 liefert.

Die beiden Plasmide führen zwar ebenfalls zur löslichen Proteinproduktion, da diese jedoch nicht signifikant höher zu sein scheint als die in *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>ambDH3</sub> wurde diese Kombination aus Stamm und Plasmid beibehalten. Der Expressionsvektor pCold-I<sub>ambDH3</sub> wurde zwar erfolgreich erstellt (Abschnitt 3.1.1.2.2), da die Genexpression von pET28a(+)<sub>ambDH3</sub> in *E. coli* BL21 jedoch erfolgreich verlief, wurde diese Plasmid-Stamm-Kombination nicht weiter untersucht.

### 3.1.1.3.3. Verwendung von Autoinduktionsmedium

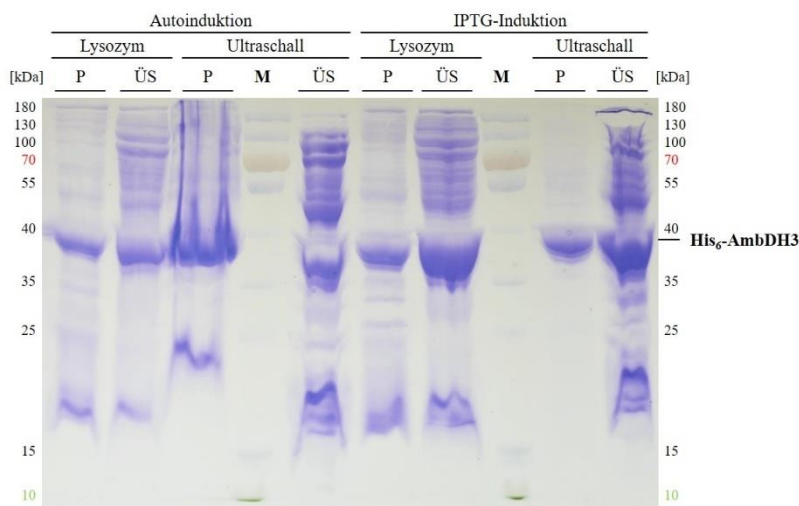
Eine Produktion von AmbDH3 in anderen Expressionsstämmen wie *E. coli* Tuner, Star, SoluBL oder Origami oder ausgehend von anderen Expressionsvektoren lieferte zwar Enzym, eine Steigerung der Proteinausbeute konnte dadurch jedoch nicht erreicht werden. Deshalb

sollte getestet werden, ob sich die Menge an löslichem AmbDH3 durch Verwendung von Autoinduktionsmedium (AIM) erhöhen lässt. Der Wirkmechanismus der Autoinduktionsmedien basiert auf den beiden Kohlenstoffquellen Lactose und einer begrenzten Menge an Glucose im Medium, die unterschiedlich metabolisiert werden (Abbildung 3-6). Dabei können höhere Zelldichten und Expressionsraten durch automatische *lacO*-vermittelte Genexpressionsinduktion erreicht werden. Während der Zellproliferation bis zur mittleren bis späten *log*-Phase wird zunächst die Glucose verstoffwechselt, wobei die Lactose-Aufnahme inhibiert ist. Sobald die im Medium enthaltene Glucose durch die Zellen verbraucht ist, wird Lactose aufgenommen, durch die  $\beta$ -Galactosidase zu Allolactose umgewandelt und dadurch die Genexpression gestartet. Allolactose bewirkt die Freisetzung des Lac-Repressors von seiner spezifischen Bindungsstelle an der DNA, sodass *lacO*-gesteuerte Gensequenzen exprimiert werden können. Der Wechsel der Energiequellen stellt einen sanfteren Übergang zur Überexpression dar und soll eine Produktion von überwiegend löslichem Protein bewirken. In *E. coli* des Genotyps DE3 werden dadurch die *T7lac*-Promotoren deblockiert und die *lacUV5*-gesteuerte Expression der T7-RNA-Polymerase induziert. Dies führt zur Produktion der T7-RNA-Polymerase und damit letztlich der Zielproteine. Diese Art der Induktion besitzt zum einen den Vorteil, dass kein IPTG zugesetzt werden muss und eine sanftere Induktion stattfindet und zum anderen muss keine strikte Überwachung der Kulturdichte erfolgen.<sup>[166]</sup>



**Abbildung 3-6. Schematischer Ablauf der Autoinduktion.** Dabei verwenden die Bakterien anfangs Glucose als Kohlenstoffquelle. Sobald diese aufgebraucht ist, wird die Lactose durch die  $\beta$ -Galactosidase zu Allolactose umgewandelt und die Genexpression dadurch induziert. In Anlehnung an STUDIER<sup>[166]</sup>.

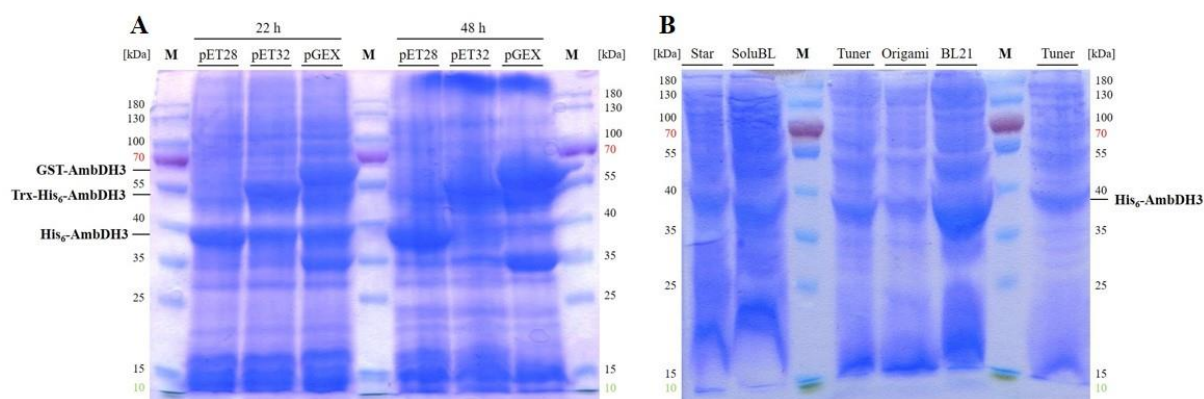
Im Folgenden wurde der Proteinanteil in Pellet und Überstand nach Aufschluss von Zellen aus IPTG-induzierter (in dYT-Medium) und autoinduzierter Genexpression (in AIM) mittels SDS-PAGE untersucht (Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-AmbDH3 (34 kDa) in *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH3.** Die Induktion der Genexpression erfolgte durch IPTG-Induktion (0.1 mM) oder Autoinduktion bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Der Zellaufschluss erfolgte mit Lysozym oder Ultraschallbehandlung. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss. Die Volumina der aufgetragenen Proben innerhalb eines Gels stehen in Relation zum Volumen der jeweiligen Fraktion.

Es ist erkennbar, dass jeweils in den Überständen nach Zellaufschluss lösliches AmbDH3 vorhanden war. Zudem weisen die Überstände aus der IPTG-induzierten Genexpression einen höheren Anteil an löslichem Enzym auf. Im Falle von AmbDH3 konnte durch Verwendung von AIM das Protein löslich und aktiv erhalten werden. Eine Erhöhung der löslichen Proteinmenge konnte jedoch nicht erreicht werden.

In Folge dieser Ergebnisse wurden Expressionstests mit Autoinduktion und den bereits verwendeten Expressionsvektoren sowie *E. coli*-Stämmen durchgeführt. Alle Bedingungen sollen eine Vergleichbarkeit der beiden verwendeten Induktionsmethoden ermöglichen.

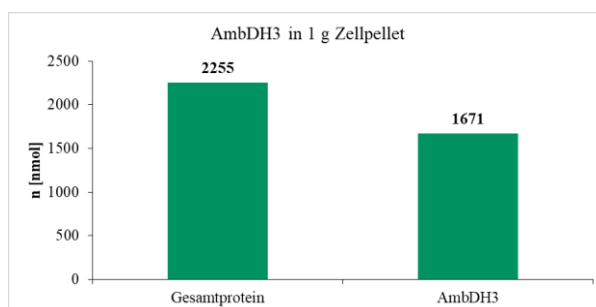


**Abbildung 3-8. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-AmbDH3 (34 kDa), Trx-His<sub>6</sub>-AmbDH3 (52 kDa) bzw. GST-AmbDH3 (61 kDa) in AIM in verschiedenen *E. coli*-Stämmen und mithilfe verschiedener Expressionsvektoren.** Die Kultivierung erfolgte in *E. coli* BL21 mit pET28a(+)\_ambDH3, pET32a(+)\_ambDH3 oder pGEX-6P-1\_ambDH3 (A) bzw. in den *E. coli*-Stämmen Star, SoluBL, Tuner, Origami oder BL21 mit pET28a(+)\_ambDH3 (B). Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Autoinduktion bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 bzw. 48 h bei 15 °C. Der Zellaufschluss erfolgte mit Lysozymbehandlung. Aufgetragen wurden Marker (M) und jeweils die Überstände aus den Kultivierungen nach Zellaufschluss.

Abbildung 3-8 verdeutlicht, dass AmbDH3 durch die Verwendung von AIM löslich produziert wurde, wobei die Genexpression ausgehend von pET28a(+)*ambDH3* die größte lösliche Enzymmenge lieferte. Zusätzlich weist *E. coli* BL21 das höchste Expressionslevel auf. Des Weiteren war eine ähnlich hohe Expression bei beiden Methoden der Induktion zu vermerken. Es besteht allerdings die Vermutung, dass die Methode der IPTG-Induktion reineres und demnach mehr lösliches Enzym liefern könnte, da in der Methode der AIM zunehmend andere Proteinbanden im SDS-Polyacrylamid-Gel zu erkennen sind.

#### 3.1.1.4. Bestimmung der löslichen AmbDH3-Menge

Für die Bestimmung der löslichen AmbDH3-Menge ausgehend von 1 g Zellpellet wurde Zellpellet von *E. coli* BL21 pET28a(+)*ambDH3* mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die anschließende Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC, wobei sämtliche Protein-enthaltenden Fraktionen verwendet wurden, um die maximal mögliche AmbDH3-Menge zu erhalten. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsmessung der Enzymlösung. Die erhaltenen Daten sind im Anhang in Abschnitt 8.5 dargestellt.



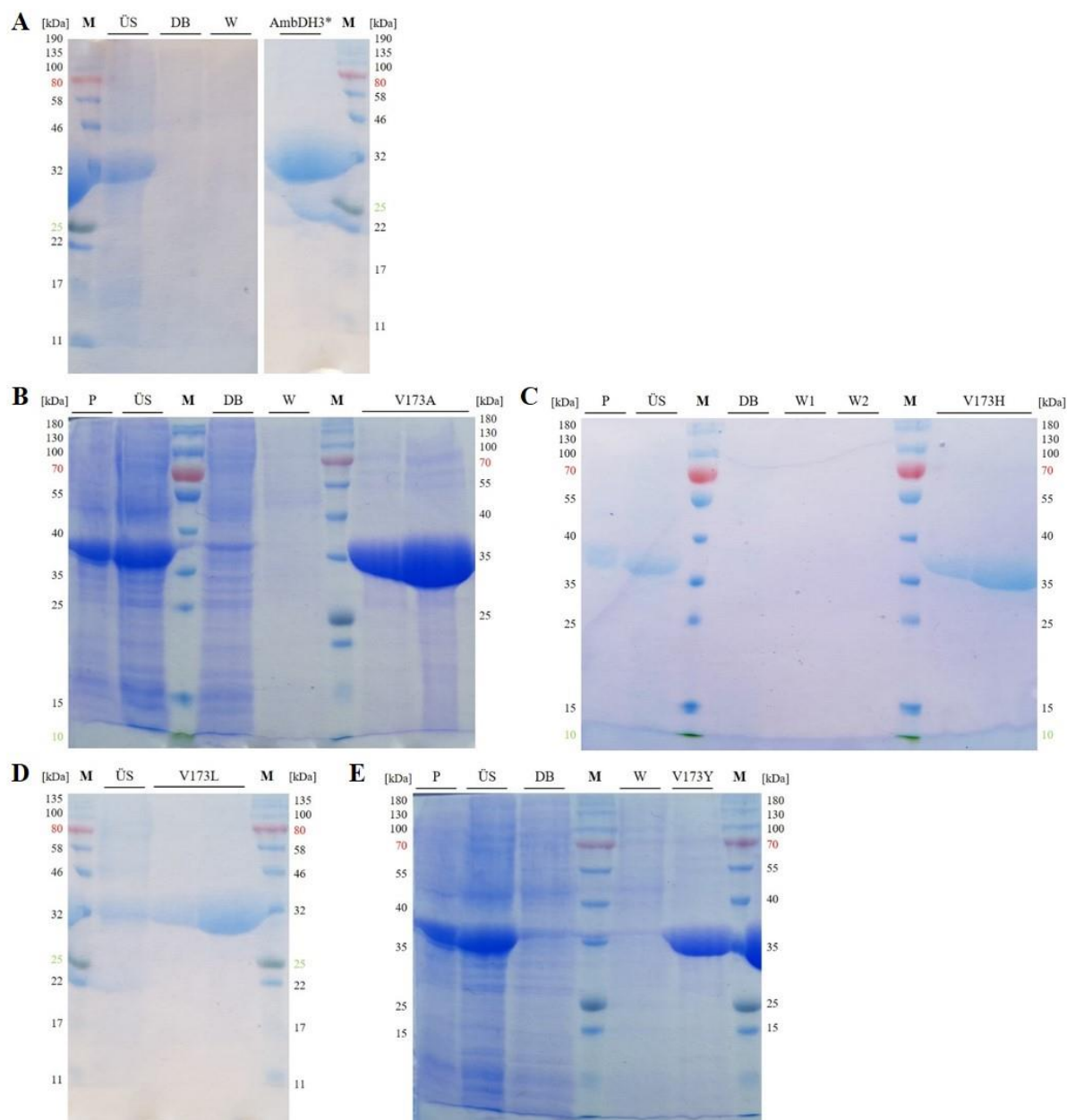
**Abbildung 3-9. Übersichtsdiagramm zum AmbDH3-Anteil in der Gesamtproteinmenge.** Die Mengen beziehen sich auf 1 g Zellpellet. Alle Werte wurden durch BRADFORD-Test bestimmt und sind in Abschnitt 8.5 dargestellt.

Die absolute AmbDH3-Menge in 1 g Zellen beträgt 1.67  $\mu\text{mol}$ . Dies entspricht einem Anteil von 74% der gesamten isolierbaren Proteinmenge einer induzierten *ambDH3*-Expressionskultur (Abbildung 3-9). Die Bestimmung der Proteinmenge nach Reinigung liefert eine Stoffmenge für AmbDH3 von 6.68 nmol. Eine homogene Standardreaktion von AmbDH3-Lysat mit 332 nmol (0.1 mg) Substrat enthält demnach 6.68 nmol (230  $\mu\text{g}$ ) lösliches AmbDH3.

#### 3.1.1.5. Gewinnung von AmbDH3-Mutanten zur Durchführung von *in vitro*-Studien der Zyklase-Aktivität

Untersuchungen der Struktur von AmbDH3 sollten die ungewöhnliche Zyklase-Aktivität der bifunktionalen Domäne näher beleuchten. Die durchgeführten Analysen sind im späteren Verlauf in Abschnitt 3.3.9 dargestellt.

Die Tatsache, dass V173 die voluminöseren Reste, die in anderen mf-DH-Domänen vorkommen, ersetzt, bildet die Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen der Zyklaseaktivität von AmbDH3. Hierfür wurden die Mutanten V173A, V173H, V173L und V173Y erstellt. Alle Plasmide lagen bereits vor und konnten für eine Produktion und Reinigung der Zielproteine aus *E. coli* BL21 analog zu Abschnitt 3.1.1.1 genutzt werden. Die entsprechenden Gelbilder der Reinigungen sind in Abbildung 3-10 dargestellt.



**Abbildung 3-10.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH3\* (A), His<sub>6</sub>-AmbDH3 V173A (B), V173H (C), V173L (D) und V173Y (E) (je 34 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>ambDH3\_V173A/H/L/Y</sub>. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung. Die Reinigung erfolgte *via* Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss, Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W) der Affinitätschromatographie und die Enzymlösung nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (AmbDH3\* bzw. V173A/H/L/Y in HEPES-Puffer).



Es zeigt sich, dass alle Mutanten erfolgreich und in hoher Reinheit isoliert werden konnten. Zudem lagen alle Proteine stabil in HEPES-Puffer vor und zeigten keinerlei Aggregation nach Proteinreinigung. Die nachfolgenden Enzymreaktionen mit den erzeugten Proteinmutanten sind in Abschnitt 3.3.9 dargestellt.

### 3.1.2. AmbDH2 und AmbDH4

Im Folgenden sind die Arbeiten zu Klonierung und Expression von *ambDH2*, *ambMod4* und *ambDH4* beschrieben. Die Hintergründe und Zusammenhänge dazu sind in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

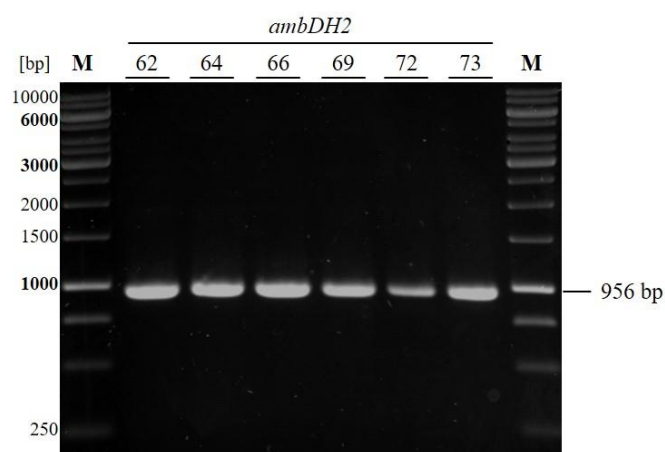
#### 3.1.2.1. AmbDH2

##### 3.1.2.1.1. Klonierung von *ambDH2* in pET28a(+)

##### 3.1.2.1.1.1. Klonierung mittels T4-DNA-Ligase

Im ersten Schritt sollte das Gen *ambDH2* in pET28a(+) kloniert werden, um eine Proteinproduktion zu ermöglichen. Hier wurde der klassische Ansatz der Ligation mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase gewählt. Als erstes wurde das Plasmid pUC57\_ambDH2 sowie der Zielvektor pET28a(+) mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NdeI* hydrolysiert. Eine anschließende Ligation der geschnittenen Fragmente, Transformation in *E. coli* TOP10, Plasmidisolation und Sequenzierung lieferte jedoch nicht das gewünschte Plasmid.

Um eine größere Menge an einzufügendem Gen zu erhalten, wurde dieses zudem durch PCR ausgehend von pUC57\_ambDH2 vervielfältigt.



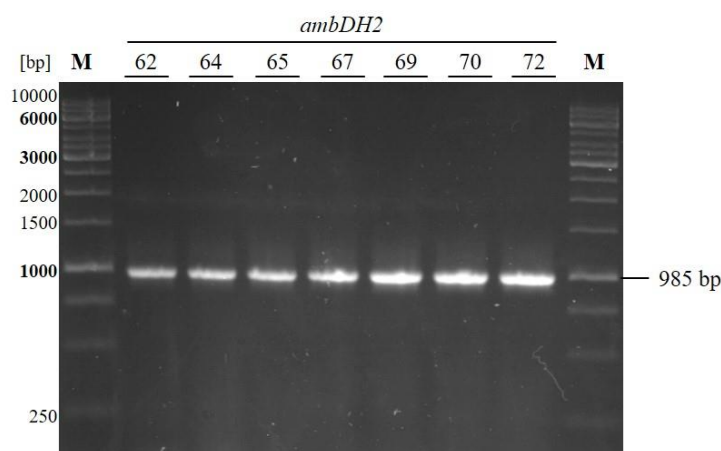
**Abbildung 3-11. Agarosegel (1%) der PCR zur Amplifizierung von *ambDH2*.** Aufgetragen wurden Marker (M) und die PCR-Produkte bei den *Annealing*-Temperaturen 62–73 °C ausgehend von pUC57\_ambDH2 und den Primern P7+8 (Tabelle 8-4). Zu erwartende Fragmentgröße: 956 bp.

Bei allen getesteten *Annealing*-Temperaturen konnte das Gen *ambDH2* mit den Primern P7+8 erfolgreich amplifiziert werden (Abbildung 3-11). Der nachfolgende Einsatz der PCR-

Fragmente in Ligationsreaktionen mit dem linearisierten Zielvektor pET28a(+) führte jedoch nicht zum gewünschten Endprodukt pET28a(+)*\_ambDH2*.

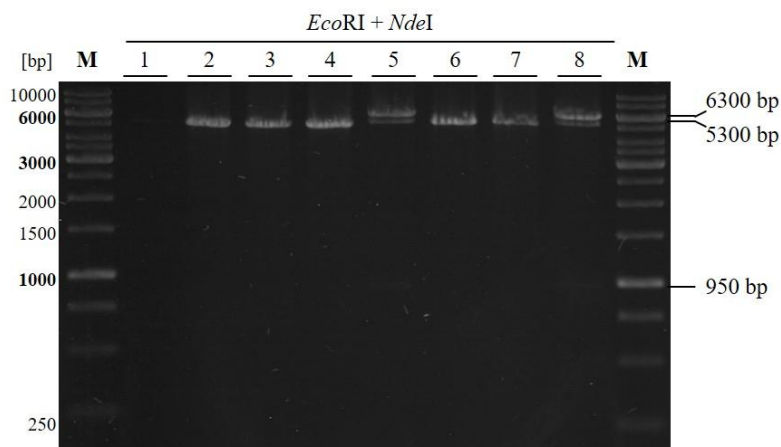
### 3.1.2.1.1.2. Klonierung mittels *Two-step-SLIC*

Da die Klonierung mit der klassischen Methode nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde analog zu Abschnitt 3.1.1.2.2 die Methode des SLIC durchgeführt. Hierfür wurde anfangs *ambDH2* ausgehend von pUC57\_*ambDH2* und den Primern P9+10 (Tabelle 8-4) mit 20 bp langen Überhängen an beiden Enden per PCR amplifiziert (Abbildung 3-12). Die Überhänge sind homolog zum mit *EcoRI* und *NdeI* linearisierten pET28a(+)-Vektor.



**Abbildung 3-12. Agarosegel (1%) der PCR zur Amplifizierung von *ambDH2* mit 20 bp langen Überhängen an beiden Enden.** Aufgetragen wurden Marker (M) und die PCR-Produkte bei den *Annealing*-Temperaturen 62–72 °C ausgehend von pUC57\_*ambDH2* und den Primern P9+10 (Tabelle 8-4). Zu erwartende Fragmentgröße: 990 bp.

Die gereinigten PCR-Produkte und der geschnittene Leervektor wurden in separaten Reaktionen mit T4 DNA-Polymerase inkubiert und anschließend mittels DNA-Ligase verknüpft. Durch Transformation der Reaktionen in *E. coli* TOP10 und Plasmidisolation konnten verschiedene potentielle Expressionsplasmide erhalten werden. Testrestriktion mit *EcoRI* und *NdeI* zeigten in zwei Fällen das zu pET28a(+)*\_ambDH2* passende Bandenmuster (Abbildung 3-13).

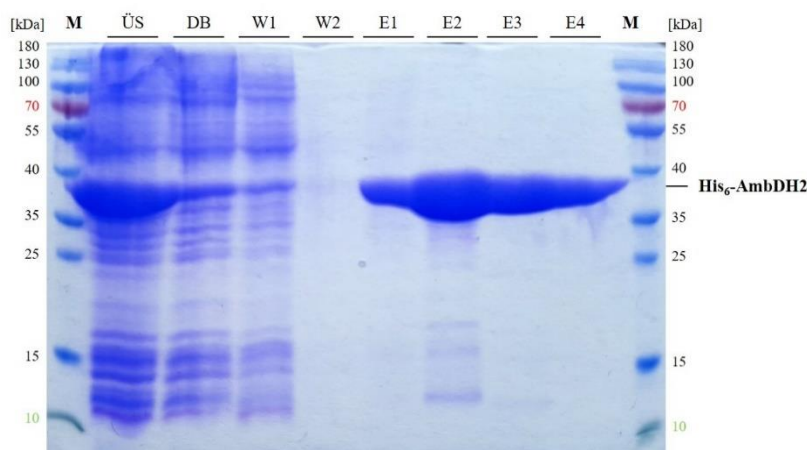


**Abbildung 3-13. Agarosegel (1%) der Testrestriktion von pET28a(+)\_ambDH2 (6300 bp) mit *EcoRI* und *NdeI*.** Aufgetragen wurden Marker (M) und verschiedene getestete Plasmide (1–8). Zu erwartende Fragmentgrößen: 950 und 5300 bp.

Einzig die Bande bei 900 bp ist nur zu erahnen, was sich jedoch auf die niedrige Intensität der Färbung zurückführen lässt. Die Sequenzanalyse bestätigte die korrekte Sequenz von pET28a(+)\_ambDH2.

#### 3.1.2.1.2. Gewinnung von AmbDH2 aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH2

Das erhaltene Plasmid pET28a(+)\_ambDH2 wurde in *E. coli* BL21 transformiert und in dYT-Medium kultiviert. Die Genexpression und nachfolgende Reinigung von AmbDH2 wurde analog zu der von AmbDH3 durchgeführt (Abschnitt 3.1.1.1). In Abbildung 3-14 ist das Ergebnis der SDS-PAGE dargestellt.



**Abbildung 3-14. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH2 (34 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH2.** Die Reinigung erfolgte *via* Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W1–2) und Elutionsfraktionen (E1–4) der Affinitätschromatographie.

Im Überstand zeigt sich eine deutliche Bande zwischen 35 und 40 kDa, die AmbDH2 entspricht. Nach Affinitätschromatographie weisen die Elutionsfraktionen lediglich eine Proteinbande mit der gleichen Masse auf. Eine MS-MS-Analyse bestätigte zudem die Identität



von AmbDH2 (Abschnitt 3.2). Die gereinigte Enzymlösung konnte anschließend in Aktivitätstests eingesetzt werden (Abschnitt 3.4.1.1).

### 3.1.2.2. AmbDH4

#### 3.1.2.2.1. Punktmutagenese von pET28a(+)*\_ambDH4*

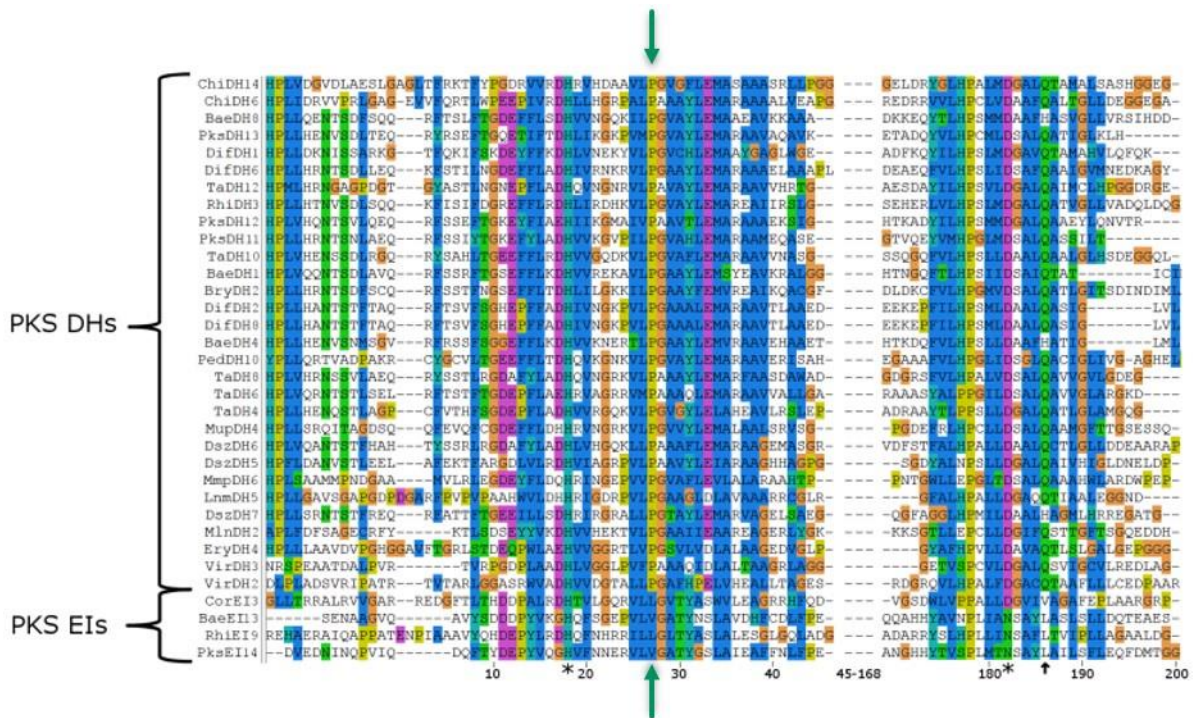
Das Sequenzalignment zwischen AmbDH2, AmbDH3 und AmbDH4 zeigt, dass in AmbDH2 und AmbDH3 die Aminosäure V173 konserviert vorliegt, wohingegen bei AmbDH4 und fast allen kanonischen mf-DHs an dieser Stelle ein Tyr zu finden ist (Abbildung 3-15). Im Folgenden soll untersucht werden, welche Auswirkungen das vorliegende Y173 für die Stabilität und Aktivität von AmbDH4 besitzt. Es besteht die Hoffnung durch die gewonnenen Erkenntnisse potentielle neue Zyklysekandidaten erhalten zu können.

Ziel ist es, durch PCR Mutationen in *ambDH4* einzuführen. Zum einen soll untersucht werden, inwiefern ein Austausch von Tyr173 gegen Ala oder Val einen Effekt auf die Zyklyseaktivität besitzt (Abbildung 3-15). Zum anderen soll Pro27 durch Punktmutation zu Leu und Val mutiert und dessen Auswirkungen untersucht werden. Für die Katalyse der Enoyl-isomerisierung wird ein in DH und EIs konserviertes Histidin sowie eine noch unbekannt Aminosäure, welche als Base fungieren kann, benötigt.

AmbDH4	---WVL	DHVVAGTVIL	<b>E</b>	GTAFV	DLAWAAA--...--	AQGYG	<b>Y</b>	GPAFQA
AmbDH3	---WVL	DHVVLGTVIL	<b>E</b>	GTAFV	ELALAAA--...--	ALDAW	<b>V</b>	GPAFRG
AmbDH2	---WVL	DHVVLGTALL	<b>E</b>	GTGFV	ELAWAAA--...--	IVDAW	<b>V</b>	GPAFRG
			<b>27</b>				<b>173</b>	

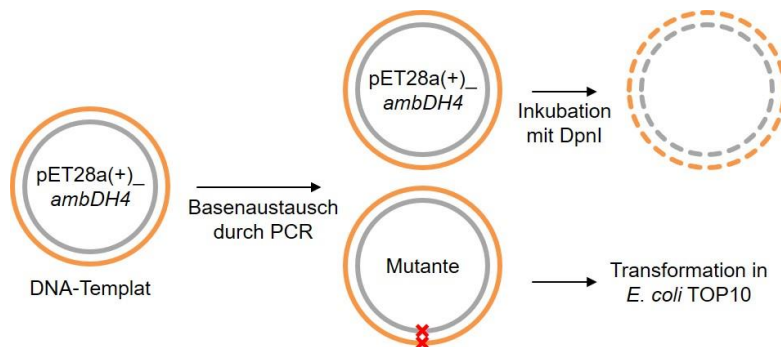
**Abbildung 3-15. Ausschnitt aus dem Sequenzalignment von AmbDH3 und AmbDH4.** Die Aminosäuren, die mutiert werden sollen, sind grün hervorgehoben.

Ein Sequenzalignment von PKS DHs mit PKS EIs zeigt eine hohe Konservierung eines Pro in der Sequenz der DHs (Abbildung 3-16). Die EIs besitzen anstelle des Pro häufig ein sterisch weniger anspruchsvolles Val oder Leu. Das Pro beschränkt die Flexibilität des His in der aktiven Tasche. Wird das Pro gegen eine kleine unpolare Aminosäure ausgetauscht, so wird der katalytisch aktive Imidazolring um 1.7 Å verschoben und erhält zusätzliche Flexibilität, sodass das His als Protonenshuttle bei der Isomerisierung der Doppelbindung fungieren kann.<sup>[60,100]</sup>



**Abbildung 3-16. Sequenzalignment verschiedener DHs und EIs aus PKSs.** „\*“ bezeichnet die katalytische Diade in den DH-Domänen und die Pfeile zeigen die Reste, die anscheinend die Funktion der katalytischen DH-Diade in EI-Domänen verändern. Pro27 ist durch einen grünen Pfeil besonders hervorgehoben. In leicht abgeänderter Form von *GAY et al.*<sup>[100]</sup>

Die Auswirkungen auf die Zyklaseaktivität von *AmbDH4* durch kleinere Aminosäuren an Position 173 sollte analysiert werden, weshalb *ambDH4\_Y173A* und *ambDH4\_Y173V* durch zielgerichtete Mutation hergestellt werden sollten. Zur Untersuchung der Enoylisomeraseaktivität sollten zudem *ambDH4\_P27V* und *ambDH4\_P27L* erzeugt werden.<sup>[100]</sup> Die Mutationen sollten durch PCR in das parentale Plasmid *pET28a(+)\_ambDH4* eingeführt werden (Abbildung 3-17).



**Abbildung 3-17. Arbeitsschema zur Erzeugung von Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR-Amplifizierung am Beispiel von *ambDH4*.** Dabei wird in das Templat *pET28a(+)\_ambDH4* durch PCR mit modifizierten Primern die entsprechende Mutation eingeführt. Das verwendete Templat wird anschließend durch Inkubation mit *DpnI* abgebaut. Nach Transformation in *E. coli* TOP10 werden die erhaltenen Kolonien auf die eingefügte Mutation durch Plasmidisolierung und Sequenzierung überprüft.

Für jede Mutation ist jeweils ein spezifischer *fwd*- und *rev*-Primer nötig, die bis auf eine oder zwei Basen komplementär zum parentalen Plasmid sind. Die nicht-komplementären Bereiche können für den Austausch einer bzw. zweier Basen im parentalen Plasmid sorgen und führen somit die gewünschte Punktmutation in den amplifizierten Plasmiden ein. Das verwendete Templat soll durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut werden, da dieses nur methylierte DNA abbaut. Durch anschließende Sequenzierung sollte die erfolgreiche Mutation bestätigt werden. Zur erfolgreichen Erzeugung der Punktmutanten von *ambDH4* wurden verschiedene Primer sowie Reaktionsbedingungen getestet (Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-1. Getestete Bedingungen zur Erzeugung von Mutationen in *ambDH4*.**

#	Konstrukt	Primer	Veränderung der Primer	PCR-Bedingungen	Templat
1	Y173A	11+12	-	GC- und HF-Puffer	<i>ambDH4</i>
	Y173V	13+14 / 15+16			
	P27L	23+24			
	P27V	27+28			
2	Y173V	17+18 <sup>[H]</sup>	GC-reiche Enden der Primer T <sub>m</sub> etwa 80 °C	-	<i>ambDH4</i>
	P27L	23+24			
	P27V	27+28			
3	Y173V	17+18 <sup>[H]</sup>	-	Mehr <i>Phusion</i> - Polymerase 18 Zyklen à 3 min Elongationszeit Zugabe von 0, 5, 10v% DMSO	<i>ambDH4</i>
4	Y173V P27L P27V	17+18 <sup>[H]</sup> 25+26 <sup>[H]</sup> 29+30 <sup>[H]</sup>	-	Zugabe von T4- DNA-Ligase vor Transformation	<i>ambDH4</i>
5	A173V	15+16 17+18	-	-	<i>ambDH4</i>
6	A173V	19+20 21+22	- Regionen vor und nach Mutation: 10-14 nt mit mindestens sechs Guaninen/Cytosinen und wenn möglich mit Guanin/Cytosin am Ende - QuikChange II	Zugabe von 0 oder 5v% DMSO	<i>ambDH4</i> und <i>ambDH4</i> _Y173A

<sup>[H]</sup> deutet auf eine HPLC-Reinheit der entsprechenden Primer. Alle anderen Primer lagen entsalzt vor. Bei den eingesetzten Templaten handelt es sich jeweils um das in der Tabelle angegebene Gen in pET28a(+). Bei jeder durchgeführten PCR wurden unterschiedliche *Annealing*-Temperaturen getestet.

Mithilfe der Reaktionsbedingungen aus Eintrag 1 (Tabelle 3-1, S. 58) konnte nur die Mutation zu *ambDH4\_Y173A* in pET28a(+) erhalten werden. Für alle anderen Klone konnte jeweils nur das parentale Plasmid nachgewiesen werden. Um die Effizienz der Mutagenese zu erhöhen, wurden Veränderungen der Reaktionsbedingungen getestet. Eine Verwendung des GC-Puffers für die PCR ist vor allem bei längeren Substraten empfohlen, führte jedoch in diesem Fall zu keinen *E. coli*-Kolonien, weshalb in weiteren Versuchen der HF-Puffer verwendet wurde. Die Menge des eingesetzten Templats wurde mit 100 ng möglichst niedrig gehalten, um die Anzahl der Klone mit parentalem Plasmid zu minimieren.

Bei einer Optimierung der Primer wurden die Enden zu GC-reichen Regionen modifiziert (Tabelle 3-1, S. 58, Eintrag 2.). Guanin und Cytosin erhöhen die Bindungsstärke der Primer an das Templat durch die Ausbildung von jeweils drei H-Brücken. Adenin und Thymin bilden hingegen nur zwei H-Brücken aus, wodurch die Bindungsstärke der Primer geringer ist.<sup>[167]</sup> Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Primer keine Sekundärstruktur ausbilden und die Schmelztemperatur bei ca. 80 °C liegt. Letzterer Parameter wurde gewählt, da Primer für die erfolgreiche Herstellung von pET28a(+)-*ambDH4\_Y173A* diese Schmelztemperatur aufwiesen. Zudem wurden die Primer in besserer Reinheit (HPLC-rein) verwendet, um auszuschließen, dass Verunreinigungen die Mutagenese stören. Es konnte keine Tendenz bezüglich der *Annealing*-Temperatur festgestellt werden und auch nach Sequenzierung konnte keine Punktmutation nachgewiesen werden.

Zur Erzeugung der Y173V-Mutante wurden erneut die optimierten Primer P17+18 verwendet, jedoch wurden die Zusammensetzung der Reaktion und Reaktionsbedingungen verändert (Tabelle 3-1, S. 58, Eintrag 3). Die enthaltene Menge an *Phusion*-Polymerase wurde erhöht und gleichzeitig die Anzahl der PCR-Zyklen auf 18 minimiert, da diese als ideale Anzahl an Zyklen zur Optimierung der Mutationseffizienz von FISHER *et al.*<sup>[168]</sup> ermittelt wurde. Eine Erhöhung der DMSO-Konzentration kann die Denaturierung der Primer unterstützen.<sup>[169]</sup> Es konnte keine Tendenz bezüglich des DMSO-Anteils festgestellt werden.

Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurden die PCR-Produkte vor der Transformation mit T4-DNA-Ligase inkubiert (Tabelle 3-1, S. 58, Eintrag 4). Die Ligase kann dabei helfen, die entstandenen PCR-Produkte zu zyklisieren, um die Effizienz der Aufnahme in *E. coli* zu erhöhen.<sup>[170]</sup> Ligasen verknüpfen DNA-Enden durch Bildung einer Phosphodiesterbindung.<sup>[167]</sup> Nach der PCR wurde eine kombinierte Inkubation der PCR-Produkte mit T4-DNA-Ligase und T7-Polynukleotidkinase durchgeführt. Dabei wird durch die Kinase ein 5'-Phosphat an die Enden der linearen PCR-Produkte anhängt.<sup>[171]</sup> Statt in vorherigen Versuchen maximal zehn *E. coli*-Kolonien wurden durch die Veränderungen nun >200 *E. coli*-

Kolonien erhalten. Wie auch bei vorangegangenen Sequenzierungen wurde nur das parentale Plasmid nachgewiesen.

Da die gewünschten Mutationen nicht erzeugt werden konnten, wurde die Templat-DNA für folgende Reaktionen verändert. Zur Erzeugung der Punktmutante Y173V muss ein Austausch von zwei Basen erfolgen. Durch Erzeugung eines Zwischenprodukts, bei welchem nur eine der Basen ausgetauscht werden muss, soll die gewünschte Mutante dargestellt werden (Tabelle 3-1, S. 58, Eintrag 5). Dies wurde für *ambDH4\_Y173V* durchgeführt, da als Zwischenprodukt die bereits hergestellte Mutante pET28a(+)*\_ambDH4\_Y173A* vorlag. Für die PCR wurden sowohl P15+16, als auch P17+18 bei verschiedenen DMSO-Konzentrationen verwendet. Bei letzteren handelt es sich um die modifizierten Primer, die am Ende der Sequenz ein Guanin bzw. Cytosin aufweisen und als „HPLC-rein“ vorlagen. Bei P15+16 handelt es sich um die Primer, die keiner weiteren Optimierung unterlaufen sind. Trotz Modifikation des Templats konnte nach Sequenzierung nur das parentale Plasmid pET28a(+)*\_ambDH4\_Y173A* nachgewiesen werden.

Bei einer erneuten Optimierung der Primer wurden zwei verschiedene Methoden verfolgt (Tabelle 3-1, S. 58, Eintrag 6). Zum einen sollten die Regionen vor und nach der eingeführten Mutation nicht länger als 14, aber mindestens zehn Nukleotide lang sein. Diese Regionen sollten jeweils mindestens sechs Guanine bzw. Cytosine enthalten und mit einem Guanin bzw. Cytosin enden (P19+20). Zum anderen wurde das QuikChange II Primerdesign der Firma AGILENT verwendet (P21+22).<sup>[172]</sup> Beide Primer-Paare wurden separat in mehreren Reaktionen zur Erzeugung von pET28a(+)*\_ambDH4\_Y173V* eingesetzt. Als Templat-DNA wurde sowohl pET28a(+)*\_ambDH4* als auch pET28a(+)*\_ambDH4\_Y173A* mit DMSO-Konzentrationen von 0 und 5v% verwendet. Bei einer Mutante aus der Reaktion mit pET28a(+)*\_ambDH4\_Y173A* als Templat unter Verwendung von P21+22 und 5v% DMSO konnte nach Sequenzierung eine Mutation zu Val festgestellt werden.

Es bestätigte sich somit, dass die Veränderung von nur einer Base eine positive Wirkung auf die Effizienz der zielgerichteten Mutation hat. Bezüglich der optimalen Struktur der Primer bzw. des idealen DMSO-Anteils in der Reaktion kann durch die erhaltenen Daten keine Aussage getroffen werden. Um Mutationen an Position 27 zu erhalten wäre es daher sinnvoll, ebenfalls über eine zweistufige Synthese die gewünschten Mutanten herzustellen. Dies wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiterverfolgt.

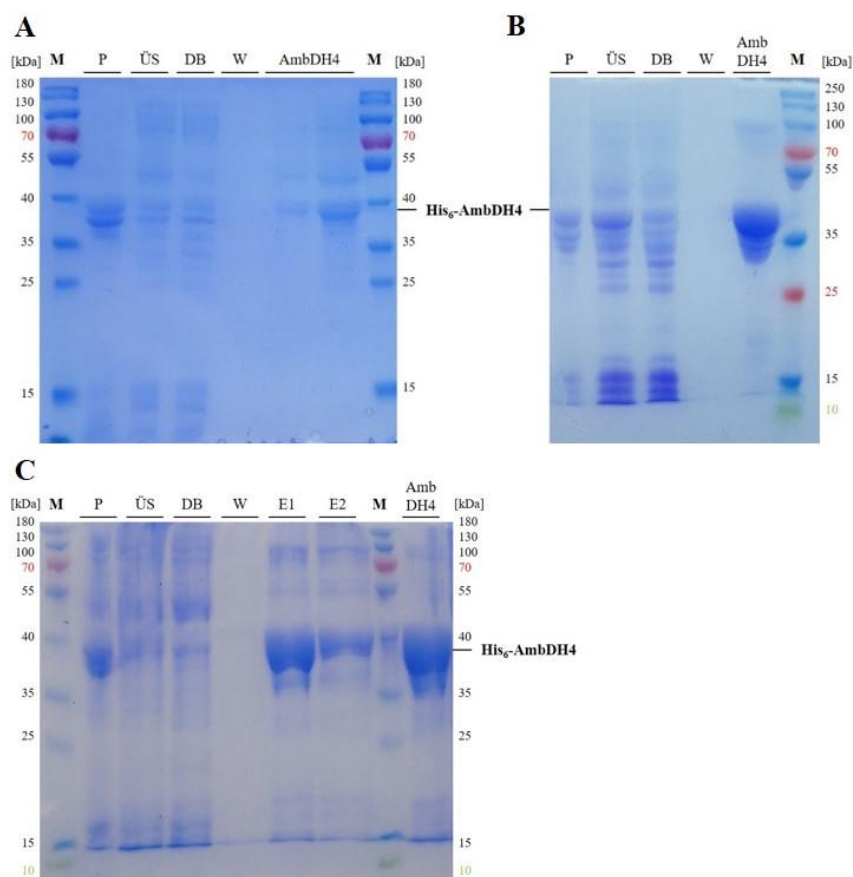
### 3.1.2.2.2. Gewinnung von AmbDH4 und dessen Mutanten

AmbDH4 sowie die beiden Mutanten Y173A und Y173V sollten heterolog in *E. coli* produziert und anschließend isoliert werden. Die gereinigten Proteine sollten hinsichtlich ihrer Aktivität unter Verwendung verschiedener Substrate untersucht werden.

Nach Kultivierung von *E. coli* BL21 oder Tuner und Induktion der Genexpression mit IPTG wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Proteine wurden mittels Ni-NTA-AC von Verunreinigungen getrennt. Nach Pufferwechsel lagen die gereinigten Proteine in HEPES- oder HEPES-Glycerin-Puffer vor, um deren Stabilität zu erhöhen.

#### 3.1.2.2.2.1. AmbDH4 aus *E. coli* BL21 und Tuner pET28a(+)\_ambDH4

Zu diesem Zweck wurde pET28a(+)\_ambDH4 (bereitgestellt von G. BERKHAN<sup>[164]</sup>) in *E. coli* BL21 und Tuner transformiert und ambDH4 exprimiert. Durch nachfolgenden Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung und Reinigung per Ni-NTA-AC konnte AmbDH4 löslich erhalten werden. Der Verlauf der Expression von ambDH4 und Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH4 unter Verwendung eines Waschpuffers ohne und mit Imidazol ist in Abbildung 3-18 dargestellt.



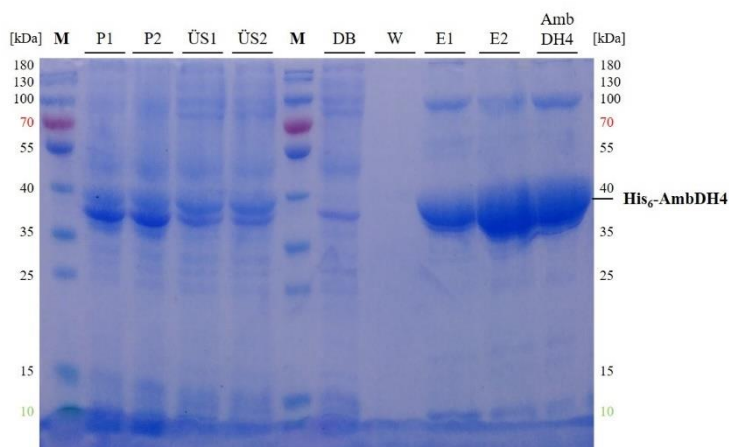
**Abbildung 3-18. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH4 (38 kDa) aus *E. coli* BL21 (A+B) bzw. Tuner (C) pET28a(+)\_ambDH4.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne (A) und mit (B+C) Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P), Überstand (ÜS), Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktionen (E1–2) der Affinitätschromatographie und AmbDH4 nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (AmbDH4 in HEPES-Puffer).

Es zeigt sich, dass ein Teil des Enzyms AmbDH4 nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung unlöslich im Pellet verblieb. Die SDS-Polyacrylamid-Gele zeigen im Pellet, ebenso wie im Überstand zwei intensive Proteinbanden mit einem Molekulargewicht zwischen 35 und 40 kDa. Weiterhin zeigten sich Proteinbanden von deutlich höheren und geringeren Molekulargewichten. Im Durchbruch zeigte sich jeweils dasselbe Bandenmuster wie im löslichen Überstand, während in den Waschfraktionen ohne und mit Imidazol keine Proteine erkennbar waren. Die Elutionsfraktionen zeigten ausreichend lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von knapp unter 40 kDa. Eine Analyse dieser Gelbande per MS-MS bestätigt das Vorhandensein von AmbDH4 (Abschnitt 3.2). Die Reinigung mit einem Waschpuffer ohne Imidazol lieferte deutlich mehr Verunreinigungen, wohingegen durch Verwendung des Waschpuffers mit Imidazol die zuvor vorhandenen Verunreinigungen reduziert werden konnten. AmbDH4 konnte letztlich in guter Reinheit mit einer maximalen Konzentration von 5.0 mg/mL löslich erhalten werden und in Aktivitätstests eingesetzt werden (Abschnitt 3.4.1.2).

Die Ergebnisse der Reinigung von AmbDH4 aus *E. coli* BL21 und Tuner waren ähnlich. Der Vorteil von *E. coli* Tuner liegt in der verbesserten und gleichmäßigeren IPTG-Aufnahme und dadurch einer homogeneren Genexpression.<sup>[173]</sup> Die Banden der Verunreinigungen der verschiedenen Fraktionen während der Reinigung unterscheiden sich nicht zur Reinigung aus *E. coli* BL21. Eine Steigerung der Proteinkonzentration durch Produktion in *E. coli* Tuner konnte nicht erreicht werden.

Bei Proteinkonzentrationen über 5.0 mg/mL kam es trotz permanenter Lagerung auf Eis stets zu einer irreversiblen Proteinaggregation. Deshalb wurde versucht AmbDH4 in einem glycerinhaltigen Puffer zu erhalten, der möglicherweise stabilisierende Effekte auf das Protein haben könnte. GOOD *et al.*<sup>[174]</sup> bezeichneten einen derartigen glycerinhaltigen Puffer als geeignet für biologische Untersuchungen, da er den pH der Lösung stabilisiert sowie enzymatisch und chemisch stabil ist. Zudem hat der Puffer keinen Effekt auf die ablaufenden Reaktionen.





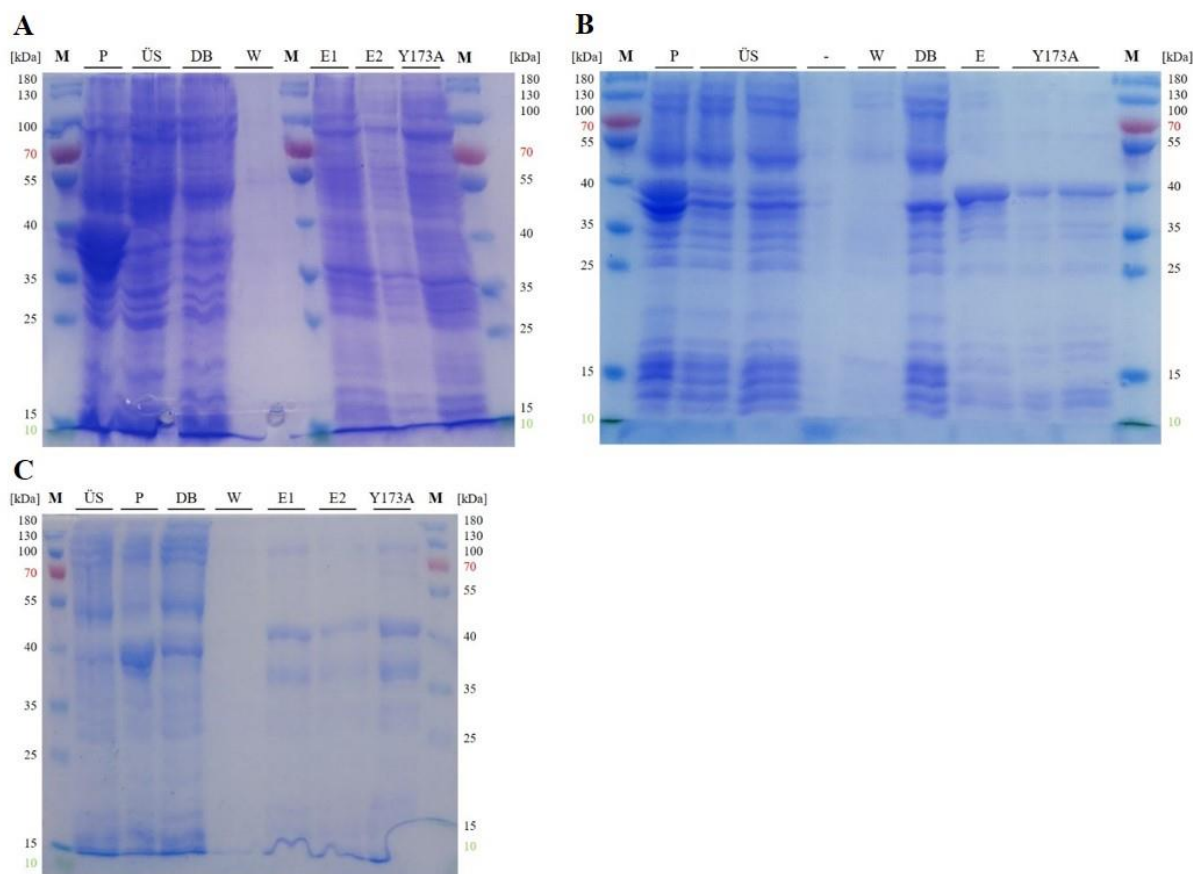
**Abbildung 3-19. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH4 (38 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH4.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktionen (E1–2) der Affinitätschromatographie und AmbDH4 nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (AmbDH4 in HEPES-Glycerin-Puffer).

Nach Zellaufschluss, Reinigung per Ni-NTA-AC und Pufferwechsel konnte AmbDH4 in reiner Form erhalten werden (Abbildung 3-19). Der Durchbruch weist mehrere Proteine auf, die nicht oder nur schwach an die Säule gebunden haben, während die Waschfraktion keine Proteine aufweist. In den Elutionsfraktionen ist eindeutig zu erkennen, dass vor allem AmbDH4 und nur wenige Verunreinigungen enthalten sind. Um die Proteinkonzentration für die Aktivitätstests zu steigern, wurden die Elutionsfraktionen zu einem HEPES-Glycerin-Puffer umgepuffert und in einem Konzentrator angereichert. Nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren zeigt sich eine deutlich erhöhte Intensität der Proteinbande bei 40 kDa. Dabei konnte die Proteinkonzentration auf nahezu 18 mg/mL erfolgreich gesteigert werden.

#### 3.1.2.2.2.2. AmbDH4 Y173A aus *E. coli* BL21 und Tuner pET28a(+)\_ambDH4\_Y173A

Die Reinigung der Mutante AmbDH4 Y173A aus *E. coli* BL21 und Tuner wurde ebenfalls anhand SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-20).





**Abbildung 3-20.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH4 Y173A (38 kDa) aus *E. coli* BL21 (A+B) bzw. Tuner (C) pET28a(+)\_ambDH4\_Y173A. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne (A) und mit (B+C) Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie und AmbDH4 Y173A nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (Y173A in HEPES-Puffer).

Im Vergleich zum Pellet befindet sich weniger Protein mit einer Masse von etwa 35 kDa im Überstand. Bei Reinigung mit einem Waschpuffer ohne Imidazol ist auffällig, dass die Verunreinigungen mit anderen Proteinen nur mit geringem Erfolg entfernt werden konnten. Im Eluat können weitere Banden bei 35 und 90 kDa detektiert werden, die deutlich intensiver sind als die Bande von AmbDH4 Y173A.

Um die Reinheit des Proteins zu erhöhen wurde daher ein Waschpuffer mit Imidazol verwendet, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen (Abbildung 3-20B+C). Die Waschfraktion ist nicht frei von Proteinen, jedoch werden vermutlich nur unspezifisch bindende Protein eluiert. Die Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen werden durch die Änderung der Waschbedingungen deutlich minimiert und auch die Intensität der Bande bei 40 kDa steigt im Vergleich zu den verbleibenden Verunreinigungen.

Die Reinigung von AmbDH4 Y173A aus *E. coli* Tuner (Abbildung 3-20C) zeigte einen ähnlichen Verlauf, wie die Reinigung aus *E. coli* BL21 (Abbildung 3-20B). Eine Steigerung der Intensität der Bande bei 40 kDa in den Elutionsfraktionen konnte nicht erreicht werden. Die

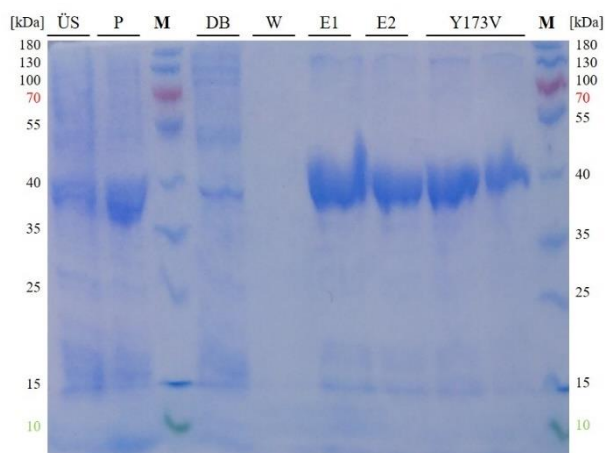
Verbesserung der IPTG-Aufnahme für die nachfolgende Proteinproduktion brachte somit nicht die gewünschte Erhöhung der Konzentration des Zielproteins mit sich.

Verglichen mit der Reinigung des Wildtyps (Abbildung 3-18 in Abschnitt 3.1.2.2.2.1) ist im Falle der Reinigung der Mutante die Intensität der Bande bei 40 kDa deutlich geringer. Vermutlich liegt der Grund für die geringere Menge an löslicher Mutante in der Punktmutation, da diese Änderung in der Primärstruktur eine Auswirkung auf die Faltung und damit Tertiärstruktur des Proteins ausübt.

Die Stabilität von Proteinen wird durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, oder kovalente Bindungen bestimmt, wobei die Ausbildung dieser von der Aminosäuresequenz abhängig ist. Bei der Faltung der Proteine wird aus thermodynamischer Sicht vereinfacht von einem Zweizustandsmodell gesprochen, wobei zwischen nativem und denaturiertem Zustand unterschieden wird.<sup>[175]</sup> Die Anwendbarkeit dieses Modells wurde von LUMRY *et al.*<sup>[176]</sup> beschrieben. Das *guided protein folding* beschreibt den Faltungsmechanismus, wodurch die Proteine spontan ihre native Struktur einnehmen.<sup>[177,178]</sup> Der native Zustand weist thermodynamisch die geringste freie Energie auf. Der Ablauf der Faltung unterscheidet sich normalerweise zwischen dem Wildtyp und der entsprechenden Mutante aufgrund der sehr ähnlichen Primärstruktur kaum. Die freie Energie des nativen Zustands kann sich allerdings durch die Punktmutation stark unterscheiden.<sup>[179]</sup> Eine Erhöhung der freien Energie geht mit einer Verringerung der Stabilität einher. Da die Konzentrationen von AmbDH4 Y173A nach der Reinigung deutlich geringer waren als die des Wildtyps, wäre eine Erhöhung der freien Energie und dadurch eine Stabilitätsminderung der Mutante durch die Punktmutation denkbar.

3.1.2.2.2.3. AmbDH4 Y173V aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH4\_Y173V

Die Reinigung von AmbDH4 Y173V aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH4\_Y173V wurde durch SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3-21).



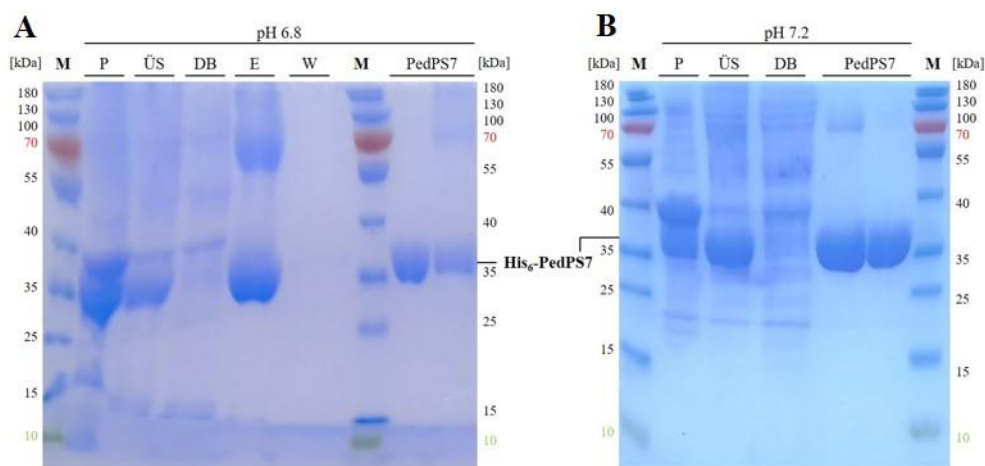
**Abbildung 3-21. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-AmbDH4 Y173V (38 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH4\_Y173A.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktion (E1–2) und AmbDH4 Y173V nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (Y173V in HEPES-Puffer).

Das SDS-Polyacrylamid-Gel der Reinigung von Y173V zeigt keine großen Unterschiede zu der Reinigung von Y173A aus *E. coli* BL21 oder Tuner (Abschnitt 3.1.2.2.2). Die Elutionsfraktionen der Reinigung von AmbDH4 Y173V aus *E. coli* BL21 weisen jeweils eine intensive Proteinbande für das Zielprotein auf. Verglichen mit der Reinigung von AmbDH4 Y173A scheint die Intensität der Zielproteinbande in Relation zu möglichen Verunreinigungen in diesem Fall am größten zu sein. Folglich konnte hier eine höhere Menge an löslichem AmbDH4 Y173V erhalten werden. Durch den Austausch des Tyr gegen Val besteht die Möglichkeit, dass die Stabilität weniger stark beeinflusst wurde als bei der entsprechenden Ala-Mutante.

### 3.1.3. PedPS7 und SorPS8

#### 3.1.3.1. PedPS7

Die Produktion und Reinigung von PedPS7 wurde analog zu AmbDH3 (Abschnitt 3.1.1.1) durchgeführt. Die Analyse des Verlaufs der Genexpression und anschließenden Proteinreinigung *via* SDS-PAGE ist in Abbildung 3-22 dargestellt.

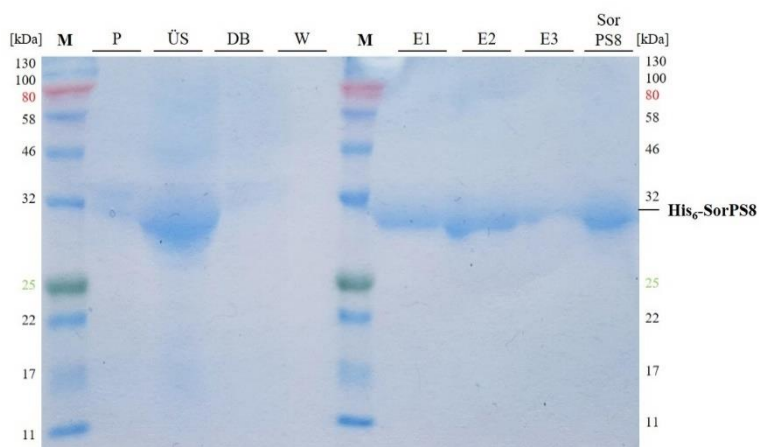


**Abbildung 3-22.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-PedPS7 (33 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)*\_pedPS7*. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M) Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie und PedPS7 nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (**PedPS7** in HEPES-Puffer pH 6.8 (A) bzw. 7.2 (B)).

Die Produktion von PedPS7 in *E. coli* BL21 fand sowohl unlöslich als auch löslich statt. Bei den Elutionsfraktionen sind im Bereich über und unter 40 kDa nur wenige und nach dem Konzentrieren kaum noch Verunreinigungen vorhanden. Das Fusionsprotein präzipitierte nach Pufferwechsel bei einem pH von 6.8 teilweise. Zunächst wurde für eine bessere Stabilität des Zielproteins Glycerin zum Puffer gegeben, wodurch jedoch keine Verbesserung der Protein- ausbeute erreicht werden konnte. Der pH-Wert des HEPES-Puffers scheint zu nah an dem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von His<sub>6</sub>-PedPS7 (pI = 6.2) zu liegen. Der pI entspricht dem pH-Wert, bei dem die Nettoladung eines Proteins gleich Null und dessen Löslichkeit somit am geringsten ist. Deshalb wurde ein HEPES-Puffer mit einem pH von 7.2 getestet. In einem Vergleichsexperiment konnte eine ca. vier Mal höhere Ausbeute gegenüber dem HEPES-Puffer mit pH 6.8 erzielt werden. Unter diesen Reinigungsbedingungen konnte PedPS7 in ausreichenden Mengen und guter Reinheit löslich erhalten werden. Das gereinigte Protein konnte anschließend in Aktivitätstests eingesetzt werden.

### 3.1.3.2. SorPS8

Die Genexpression und anschließende Proteinreinigung wurde analog zu AmbDH3 bzw. PedPS7 (Abschnitt 3.1.1.1 bzw. 3.1.3.1) durchgeführt und zeigte einen ähnlich guten Erfolg (Abbildung 3-23).



**Abbildung 3-23. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-SorPS8 (32 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>sorPS8</sub>.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschlösungspuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktionen (E1–3) der Affinitätschromatographie und SorPS8 nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (SorPS8 in HEPES-Puffer).

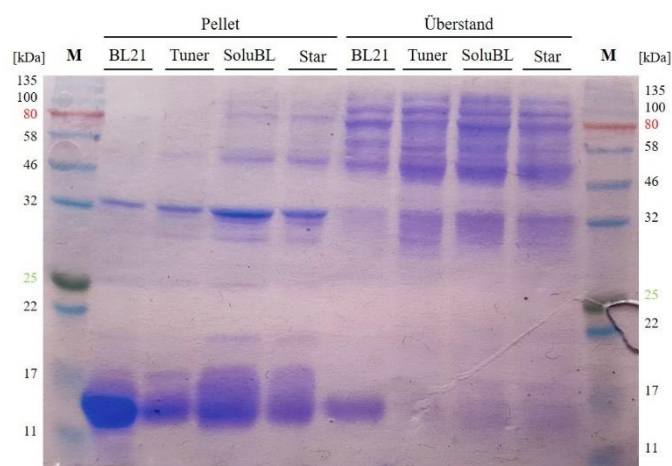
Die Proteinbande bei etwa 35 kDa zeigt mit Abstand die stärkste Intensität im SDS-Polyacrylamid-Gel. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um das gewünschte Protein SorPS8 handelt, das folglich in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden konnte. Eine nachfolgende MS-MS-Analyse dieser Gelbande bestätigte diese Aussage (Abschnitt 3.2). Somit konnte die Enzymlösung in nachfolgenden Aktivitätstests eingesetzt werden (Abschnitt 3.4.2.2).

### 3.1.4. IndCyc11, ZinJ und SalBIII

#### 3.1.4.1. IndCyc11

##### 3.1.4.1.1. Gewinnung von IndCyc11 aus *E. coli* BL21, Tuner, Star und SoluBL pET28a(+)\_indCyc11

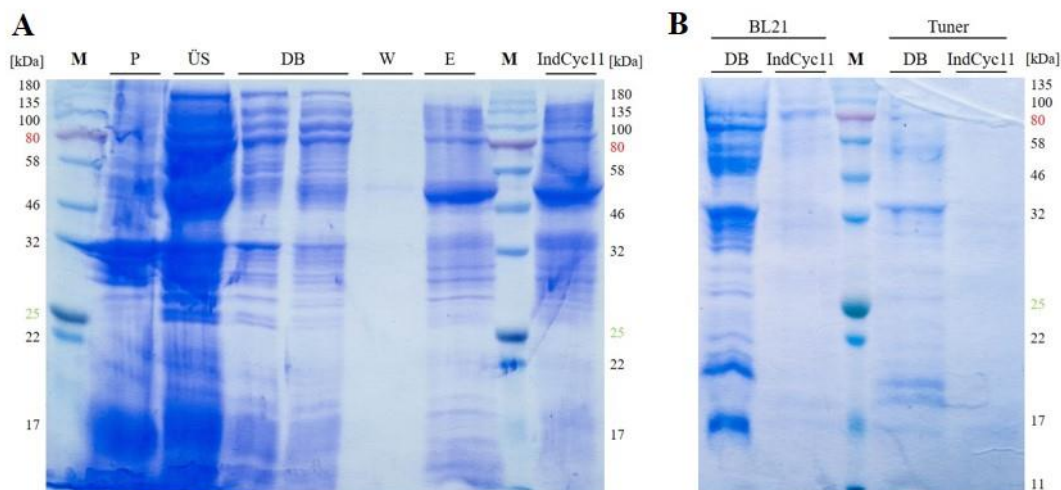
Zunächst wurde versucht das Enzym IndCyc11 analog zu vorherigen Versuchen mit AmbDH3 und PedPS7 (Abschnitt 3.1.1.1 und 3.1.3.1) löslich aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_indCyc11 zu gewinnen.



**Abbildung 3-24.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-IndCyc11 (15 kDa) in den *E. coli*-Stämmen BL21, Tuner, SoluBL und Star mit pET28a(+)\_indCyc11. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung.

Der Großteil von IndCyc11 lag in allen getesteten *E. coli*-Stämmen unlöslich im Pellet vor. Die Genexpression in *E. coli* BL21 mit pET28a(+)\_indCyc11 zeigte die vielversprechendsten Ergebnisse. Aufgrund hoher erreichbarer Zelldichten mit *E. coli* BL21 und Tuner wurden Testexpressionen von *indCyc11* in den beiden Stämmen durchgeführt. Dabei wurde das erhaltene Zellpellet mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und *via* Ni-NTA-AC gereinigt (Abbildung 3-25).



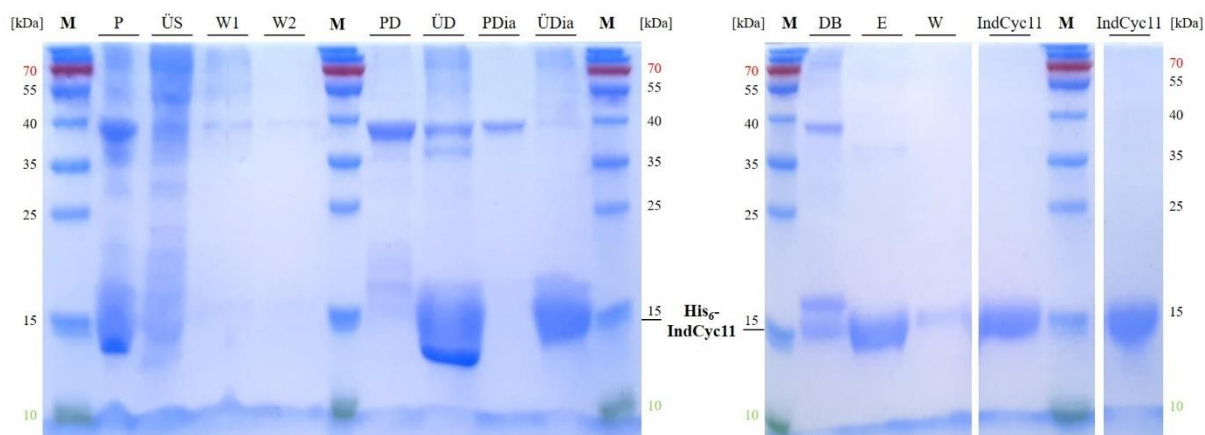


**Abbildung 3-25. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-IndCyc11 (15 kDa) aus *E. coli* BL21 bzw. Tuner pET28a(+)\_indCyc11.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (**M**), Überstand (**ÜS**) und Pellet (**P**) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (**DB**), Waschfraktion (**W**), Elutionsfraktion (**E**) der Affinitätschromatographie und IndCyc11 nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (**IndCyc11** in HEPES-Puffer).

Im Durchbruch zeigte sich vor allem bei der Isolierung aus *E. coli* BL21 (Abbildung 3-25B) eine Bande für IndCyc11 bei etwa 17 kDa. Ein Teil des Proteins hat vermutlich nicht an die Säule gebunden und befand sich deshalb bereits im Durchbruch. In den Elutionsfraktionen war keine Bande im Bereich von 15 kDa sichtbar. Der Großteil des Proteins wurde vermutlich nicht löslich produziert.

#### 3.1.4.1.2. Gewinnung unter denaturierenden Bedingungen

Da vorherige Versuche nicht zur löslichen Produktion von IndCyc11 führten, wurde die Methode der Proteingewinnung unter denaturierenden Bedingungen getestet (Abbildung 3-26). Nach Zellaufschluss, Zentrifugation und Abtrennung der löslichen Bestandteile, wird das unlösliche Protein in harnstoffhaltigem Denaturierungspuffer entfaltet und somit in Lösung gebracht. Der chaotrope Harnstoff führt zur Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophober Wechselwirkungen innerhalb des Proteins und bei Protein-Protein-Interaktionen. Der Harnstoff wird anschließend durch Dialyse über Nacht langsam wieder entfernt, sodass sich das Protein durch die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen rückfalten kann und in Lösung bleibt. Anschließend wird die Proteinlösung per Affinitätschromatographie gereinigt.



**Abbildung 3-26. SDS-Polyacrylamid-Gele (15%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-IndCyc11 (15 kDa) unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli* BL21 pET28a(+) *indCyc11*.** Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung, Überstände nach Waschen der Zellfragmente (W1–2), Pellet (PD) und Überstand (ÜD) nach Denaturierung, Pellet (PDia) und Überstand (ÜDia) nach Dialyse sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W), Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie und IndCyc11 nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (IndCyc11 in HEPES-Puffer).

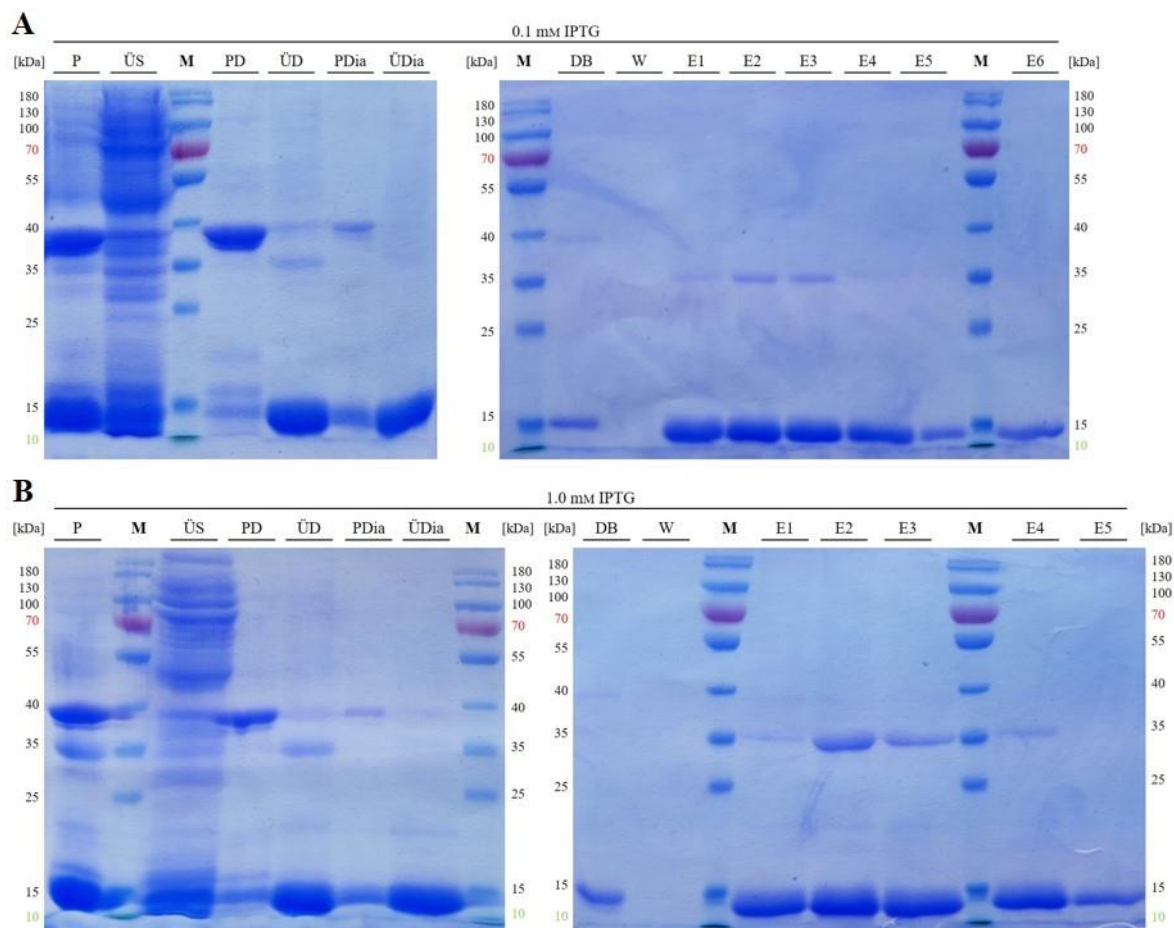
Es zeigte sich, dass hauptsächlich eine unlösliche Proteinproduktion des Fusionsproteins IndCyc11 (15 kDa) stattfand. Die Zellen wurden mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die lösliche Fraktion abgetrennt. Nach Waschen der unlöslichen Fraktion wurden die darin enthaltenen Proteine mit Harnstoff denaturiert und dadurch solubilisiert. Bereits nach der Denaturierung war im Überstand eine deutliche Bande im Bereich von 15 kDa zu erkennen. Durch Abtrennen des Denaturierungsmittels mittels Dialyse erfolgte die Rückfaltung der Proteine. Nach diesem Schritt befand sich das Zielprotein in der löslichen Fraktion und es fand keine Präzipitation nach der Dialyse statt. Verunreinigungen waren nur noch sehr schwach zu sehen, welche durch die anschließende Reinigung *via* Ni-NTA-AC erfolgreich entfernt werden konnten, sodass in der Elutionsfraktion nur noch die Bande bei 15 kDa sichtbar war. Nach Vereinigung der Elutionsfraktionen erfolgte ein Pufferwechsel und Anreicherung in einem Proteinkonzentrator. IndCyc11 konnte aufgrund der Reinigungsbedingungen und einer nachfolgenden Präzipitation in vergleichsweise geringen Mengen, jedoch sehr guter Reinheit erhalten werden. Für höhere Ausbeuten an IndCyc11 könnten neben Glycerin weitere Additive (z.B. NaCl) im Reaktionspuffer getestet werden. Eine MS-MS-Analyse der entsprechenden Bande bestätigte die Identität des Proteins (Abschnitt 3.2). Die gereinigte Enzymlösung wurde zudem in Aktivitätstests eingesetzt (Abschnitt 3.4.3.1).

#### 3.1.4.1.2.1. Vergleich des Einflusses der IPTG-Konzentration

Da die Reinigung von IndCyc11 ausgehend von der unlöslichen Fraktion erfolgt, bieten sich harschere Expressionsbedingungen, wie z.B. eine verstärkte Induktion der Genexpression durch erhöhte IPTG-Konzentrationen, an, die eine unlösliche Proteinproduktion begünstigen.



Die Induktion der Genexpression erfolgte deshalb sowohl mit 0.1 als auch 1.0 mM IPTG. IndCyc11 wurde in *E. coli* BL21 nach Zugabe von verschiedenen IPTG-Konzentrationen produziert, aus den unlöslichen IBs gereinigt und *via* SDS-PAGE überprüft (Abbildung 3-27).



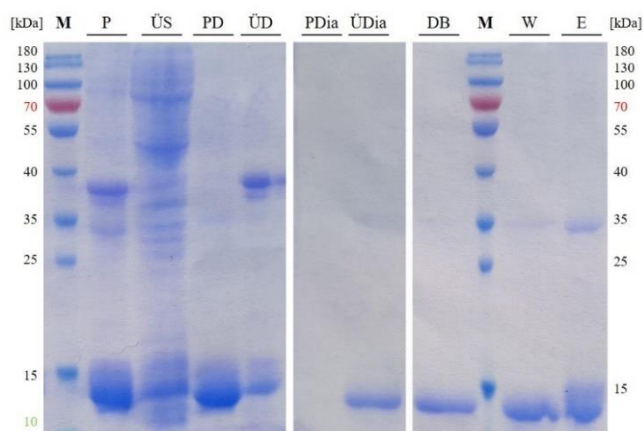
**Abbildung 3-27. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-IndCyc11 (15 kDa) unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli* BL21 pET28a(+)*\_indCyc11*.** Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM (A) bzw. 1.0 mM IPTG (B) bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung, Pellet (PD) und Überstand (ÜD) nach Denaturierung, Pellet (PDia) und Überstand (ÜDia) nach Dialyse sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W) und Elutionsfraktion (E1–6) der Affinitätschromatographie.

Vergleicht man die Intensität der Proteinbanden bei 15 kDa über den Verlauf der Denaturierung und anschließenden Rückfaltung sowie Affinitätschromatographie, so zeigt sich nahezu kein Unterschied zwischen einer Induktion mit 0.1 und 1.0 mM IPTG. Der Einfluss der IPTG-Konzentration auf die erhaltene Menge von IndCyc11 scheint somit vernachlässigbar.

#### 3.1.4.1.2.2. Vergleich der *E. coli*-Stämme BL21 und Star bei der Produktion von IndCyc11

Da sich bei der Isolierung von IndCyc11 aus *E. coli* BL21 kein Unterschied bei den beiden getesteten IPTG-Konzentrationen in der erhaltenen Proteinmenge zeigte, wurde die

Genexpression in *E. coli* Star nur mit 0.1 mM IPTG induziert. IndCyc11 wurde aus IBs mittels Ni-NTA-AC gereinigt (Abbildung 3-28).

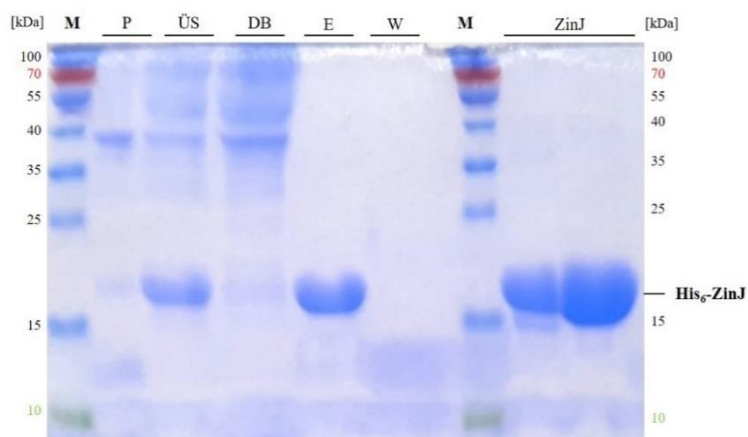


**Abbildung 3-28. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Produktion und Reinigung von His<sub>6</sub>-IndCyc11 (15 kDa) unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli* Star pET28a(+)\_indCyc11.** Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung, Pellet (PD) und Überstand (ÜD) nach Denaturierung, Pellet (PDia) und Überstand (ÜDia) nach Dialyse sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W) und Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie.

Es zeigt sich, dass nach Renaturierung immer noch sehr große Mengen des Zielproteins im Pellet sind. Die Elutionsfraktion nach Affinitätschromatographie weist nur sehr leichte Verunreinigungen mit anderen Proteinen auf. Verglichen mit der Reinigung von IndCyc11 aus *E. coli* BL21 (Abschnitt 3.1.4.1.2) zeigen sich keine bemerkenswerten Unterschiede.

### 3.1.4.2. ZinJ

Die Reinigung des Zielproteins ZinJ erfolgte *via* Ni-NTA-AC unter nativen Bedingungen aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_zinJ (Abbildung 3-29).

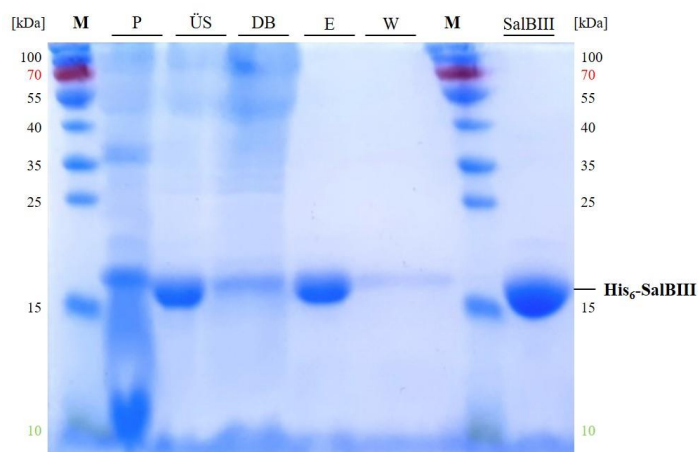


**Abbildung 3-29. SDS-Polyacrylamid-Gel (15%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-ZinJ (16 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_zinJ.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie und ZinJ nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (ZinJ in HEPES-Puffer).

Außer bei der Waschfraktion ist bei jeder Probe eine Bande zu erkennen, die dem Molekulargewicht von ZinJ entspricht. Des Weiteren ist zu sehen, dass das Enzym löslich produziert wurde, da die entsprechende Bande sowohl im Überstand als auch in den Elutionsfraktionen im Vergleich zum Pellet eine höhere Intensität aufweist. Die Enzymlösung wies nur noch geringe Verunreinigungen durch andere Proteine auf. Die Identität des Proteins konnte zudem durch MS-MS-Analyse bestätigt werden (Abschnitt 3.2). Somit konnte die erhaltene Enzymlösung für Enzymreaktionen verwendet werden (Abschnitt 3.4.3.2).

### 3.1.4.3. SalBIII

Die Isolierung und Reinigung von SalBIII erfolgten *via* Ni-NTA-AC unter nativen Bedingungen aus *E. coli* BL21 pET29b(+)*\_salBIII* (Abbildung 3-30).



**Abbildung 3-30. SDS-Polyacrylamid-Gel (15%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-SalBIII (16 kDa) aus *E. coli* BL21 pET29b(+)*\_salBIII*.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers mit Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktion (W), Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie und SalBIII nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (SalBIII in HEPES-Puffer).

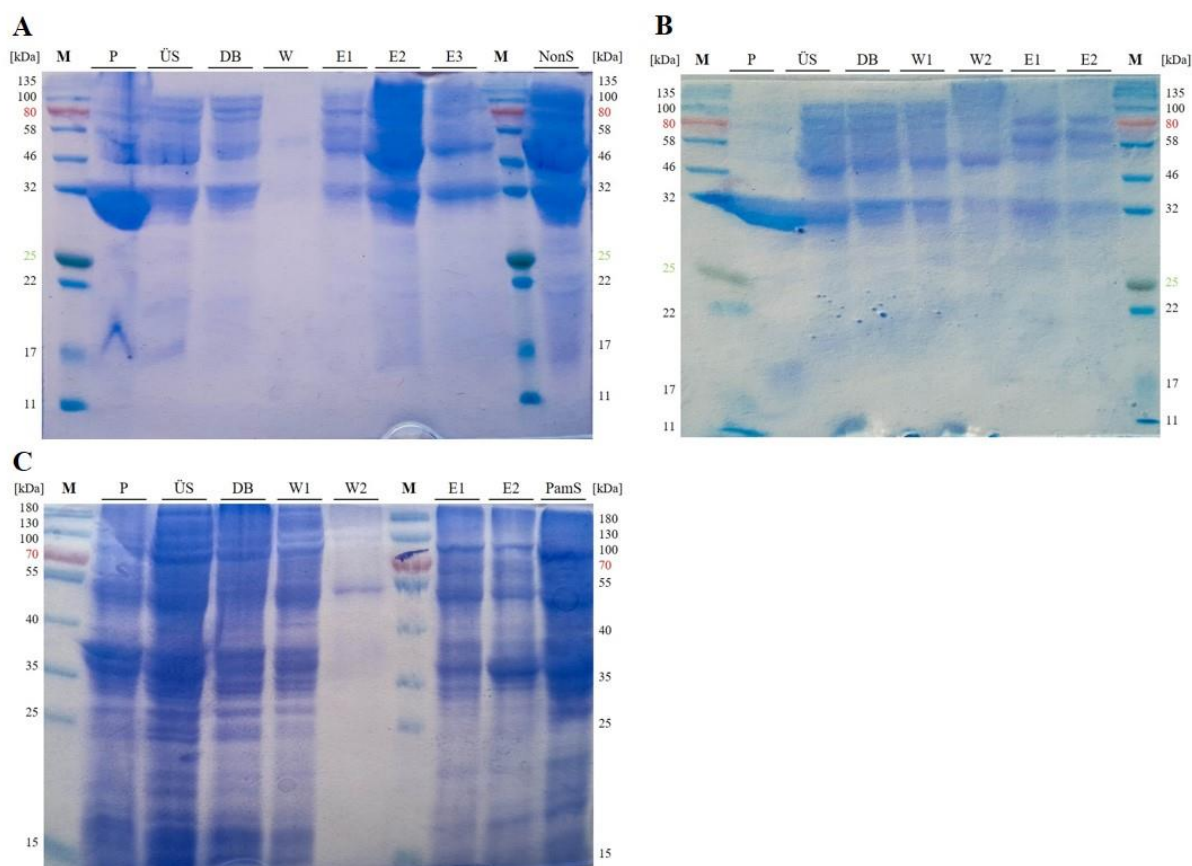
Das Enzym wurde in *E. coli* BL21 löslich produziert und bereits nach Ni-NTA-AC waren keine kontaminierenden Proteine auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel mehr zu erkennen. SalBIII konnte unter den verwendeten Expressions- und Reinigungsbedingungen in großen Mengen und sehr guter Reinheit löslich erhalten werden. Eine Analyse der Gelbande mittels MS-MS bestätigte die Identität des Enzyms (Abschnitt 3.2). Die Enzymlösung wurde für Aktivitätstests verwendet (Abschnitt 3.4.3.3).

### 3.1.5. NonS und PamS

Da die Versuche zu den beiden Furan-bildenden Zyklasten NonS und PamS in gleicher Weise durchgeführt wurden, werden die Ergebnisse im Folgenden für beide Enzyme zusammen betrachtet.

#### 3.1.5.1.1. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS/pamS</sub>

Die Reinigung von NonS bzw. PamS erfolgte zuerst durch Ni-NTA-AC aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS</sub> und die Analyse via SDS-PAGE (Abbildung 3-31).



**Abbildung 3-31. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) (A+B) bzw. His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) (C) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS</sub>.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne (A+C) und mit (B) Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W1–2), Elutionsfraktionen (E1–3) der Affinitätschromatographie und NonS bzw. PamS nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (NonS/PamS in HEPES-Puffer).

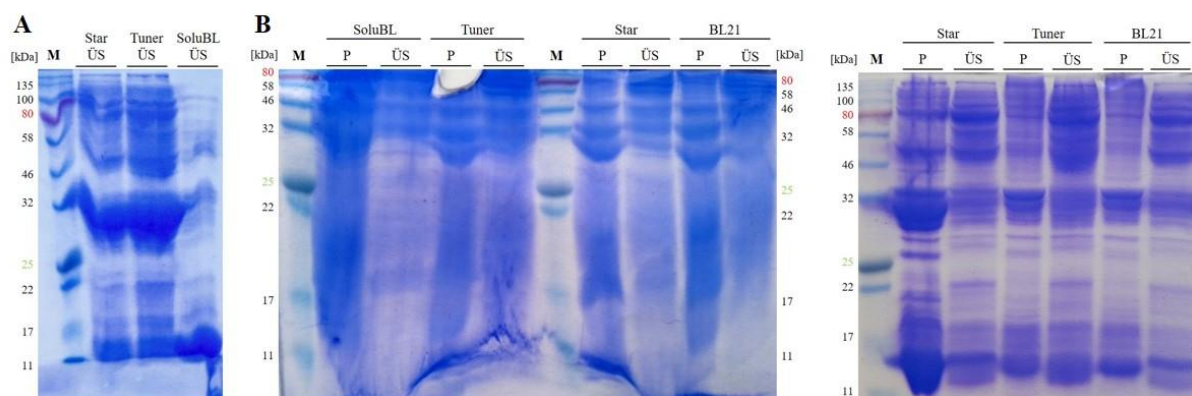
Nach Expression von *nonS* und *pamS* zeigte sich jeweils eine Bande bei knapp über 32 kDa, deren Intensität im Pellet deutlich intensiver war als im Überstand. Daraus lässt sich schließen, dass eine lösliche Produktion teilweise stattgefunden hat, wenn auch nur in sehr geringem Maße. Nach Reinigung mit einem Waschpuffer ohne Imidazol (Abbildung 3-31A+C) befanden sich die Proteine teilweise auch im Durchbruch und den Waschfraktionen. Das Ergebnis der Reinigungen zeigte deutliche Verunreinigungen.



Nach Reinigung mit einem Waschpuffer mit Imidazol (Abbildung 3-31B) zeigte sich in den Elutionsfraktionen das gleiche Bandenmuster, wobei die Intensität der Banden deutlich geringer ausfiel. Daraus lässt sich schließen, dass NonS und PamS trotz His<sub>6</sub>-tag nur sehr schwach an die Ni-NTA-Säule binden und im Falle von NonS dieses bereits durch eine geringe Imidazolkonzentration eluiert wird. In den Elutionsfraktionen sind deutliche Verunreinigungen und im Durchbruch und der Waschfraktion keine Bande für das Zielprotein erkennbar.

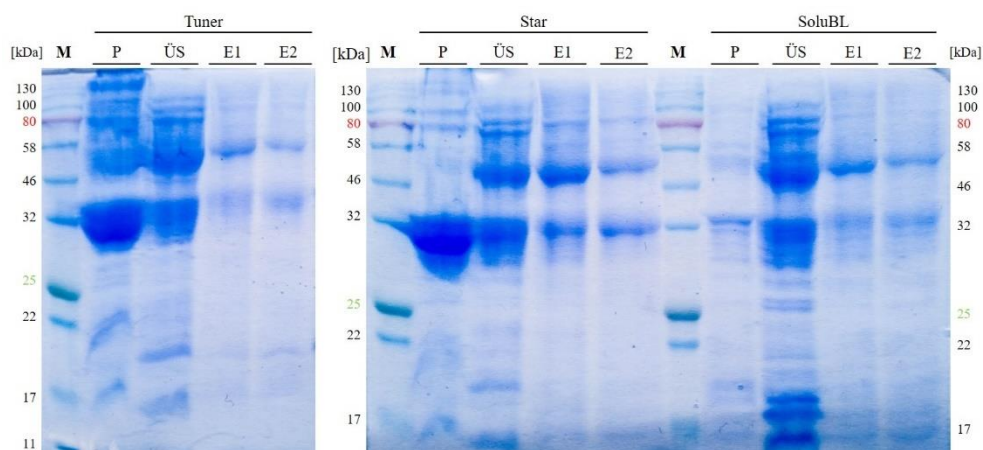
### 3.1.5.1.2. Gewinnung aus *E. coli* Star, Tuner und SoluBL pET28a(+)<sub>nonS/pamS</sub>

Für beide Enzyme sollten Optimierungen für eine verbesserte lösliche Produktion angestrebt werden. Hierfür wurden zunächst Testexpressionen in *E. coli* BL21, Star, Tuner und SoluBL mit pET28a(+)<sub>nonS</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS</sub> durchgeführt (Abbildung 3-32).



**Abbildung 3-32.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) (A) bzw. His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) (B) in den *E. coli*-Stämmen BL21, Star, Tuner und SoluBL pET28a(+)<sub>nonS</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS</sub>. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung.

Auf Höhe von etwa 30 kDa ist bei den Genexpressionen von *nonS* und *pamS* in allen *E. coli*-Stämmen eine Bande im Pellet erkennbar. Die Produktion der beiden Enzyme in den unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen lieferte vermutlich nur eine geringe Menge an Zielprotein. Das Enzym NonS sollte dennoch versucht werden *via* Ni-NTA-AC zu isolieren und zu reinigen (Abbildung 3-33).

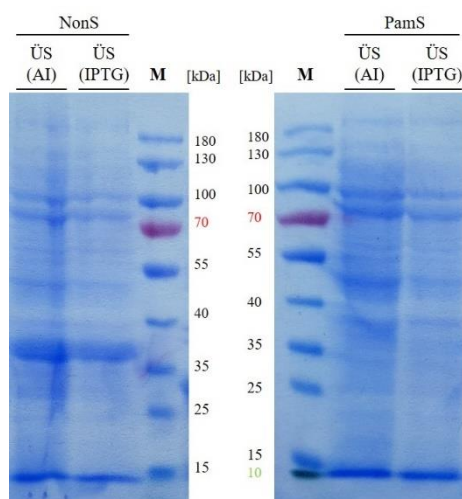


**Abbildung 3-33. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) aus *E. coli* Tuner, Star und SoluBL pET28a(+)<sub>nonS</sub>.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Elutionsfraktionen (E1–2) der Affinitätschromatographie.

Im Bereich zwischen 46 und 80 kDa waren in den Elutionsfraktionen einige Verunreinigungen zu erkennen, die sich auch durch Ni-NTA-AC nicht abtrennen ließen. Analog zur Proteinreinigung aus BL21 konnten nur geringe Mengen an Zielprotein isoliert werden. Zudem war die Bande im Pellet deutlich ausgeprägter als in den Elutionsfraktionen. Die Variation des Expressionsstammes führte somit zu keiner Verbesserung der Löslichkeit und Reinheit von NonS. Aus diesem Grund wurde die Methode für PamS nicht durchgeführt. Daraufhin wurden eine Expression mittels Autoinduktion, Coexpression von Chaperonen und Proteingewinnung unter denaturierenden Bedingungen in Betracht gezogen.

### 3.1.5.1.3. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS/pamS</sub> mittels Verwendung von Autoinduktionsmedium

Die Expression von *nonS* und *pamS* erfolgte unter anderem durch eine sanftere Induktion unter Verwendung von Autoinduktionsmedium (Abbildung 3-34).



**Abbildung 3-34.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) bzw. His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) in *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS</sub>. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Autoinduktion (AI) oder mit 0.1 mM IPTG (IPTG) bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Aufgetragen wurden Marker (M) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung.

Für NonS waren entsprechende Banden in den Überständen der beiden Proben zu erkennen, was darauf hindeutet, dass dieses im Vergleich zu PamS in größerer Menge löslich produziert wurde. PamS wurde sowohl durch Induktion mit IPTG als auch durch Verwendung des Autoinduktionsmediums nicht bzw. nur in sehr geringer Menge löslich produziert. Der Anteil an Verunreinigungen durch andere Proteine war durch IPTG-Induktion minimal geringer als durch Autoinduktion, weshalb die Genexpression in darauffolgenden Versuchen weiterhin mit IPTG induziert wurde.

#### 3.1.5.1.4. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS/pamS</sub> durch Coexpression von Chaperonen

Eine weitere Methode das Löslichkeitsproblem der beiden Zielproteine zu umgehen ist die Coexpression von Chaperonen, die dem neu synthetisierten Protein dabei helfen seine funktionelle native Struktur zu erreichen. Die *in vivo* Proteinfaltung ist ein energieabhängiger Prozess, der durch zwei Klassen von Faltungsmodulatoren vermittelt wird. Zum einen unterdrücken molekulare Chaperone wie DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES Aggregationsreaktionen und erleichtern die Faltung durch ATP-koordinierte Zyklen der Bindung und Freisetzung von Faltungsintermediaten. Zum anderen beschleunigen Faltungskatalysatoren geschwindigkeitsbestimmende Schritte entlang des Proteinfaltungsweges wie die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen und die Bildung und Neuordnung von Disulfidbrücken.<sup>[180]</sup>

Die Coexpression wurde in *E. coli* BL21 mit dem Plasmid pET28a(+)<sub>nonS</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS</sub> durchgeführt. Es wurden zudem Plasmide eingefügt, die für die Chaperone

GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, Tf und GrpE codieren. Diese Kombination der Chaperone gilt als besonders erfolgreich bei der Unterstützung des Faltungsmechanismus. In Tabelle 3-2 sind die Plasmide, in denen die Chaperone kloniert wurden, der Induktor, der die Expression des Chaperons induziert, der Promotor und in Tabelle 3-3 die jeweilige Größe der Chaperone aufgelistet. Alle Plasmide enthielten eine Sequenz, die für eine Chloramphenicol-Resistenz codierte, was neben der Kanamycin-Resistenz des pET28a(+)-Vektors als zusätzlicher Selektionsmarker diente.

**Tabelle 3-2. Verwendete Chaperone und Plasmide, in denen sie jeweils kloniert sind.** Des Weiteren sind der Promotor und der Induktor, der die Expression induziert dargestellt.

Plasmid	Chaperon	Promotor	Induktor
pGro7	GroES-GroEL	<i>araB</i>	L-Arabinose
pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	<i>araB</i>	L-Arabinose
pTf16	Tf	<i>araB</i>	L-Arabinose
pG-Tf2	GroES-GroEL-Tf	<i>Pzt-1</i>	Tetracycline
pG-KJE8	DnaK-DnaJ-GrpE GroES-GroEL	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetracyclin

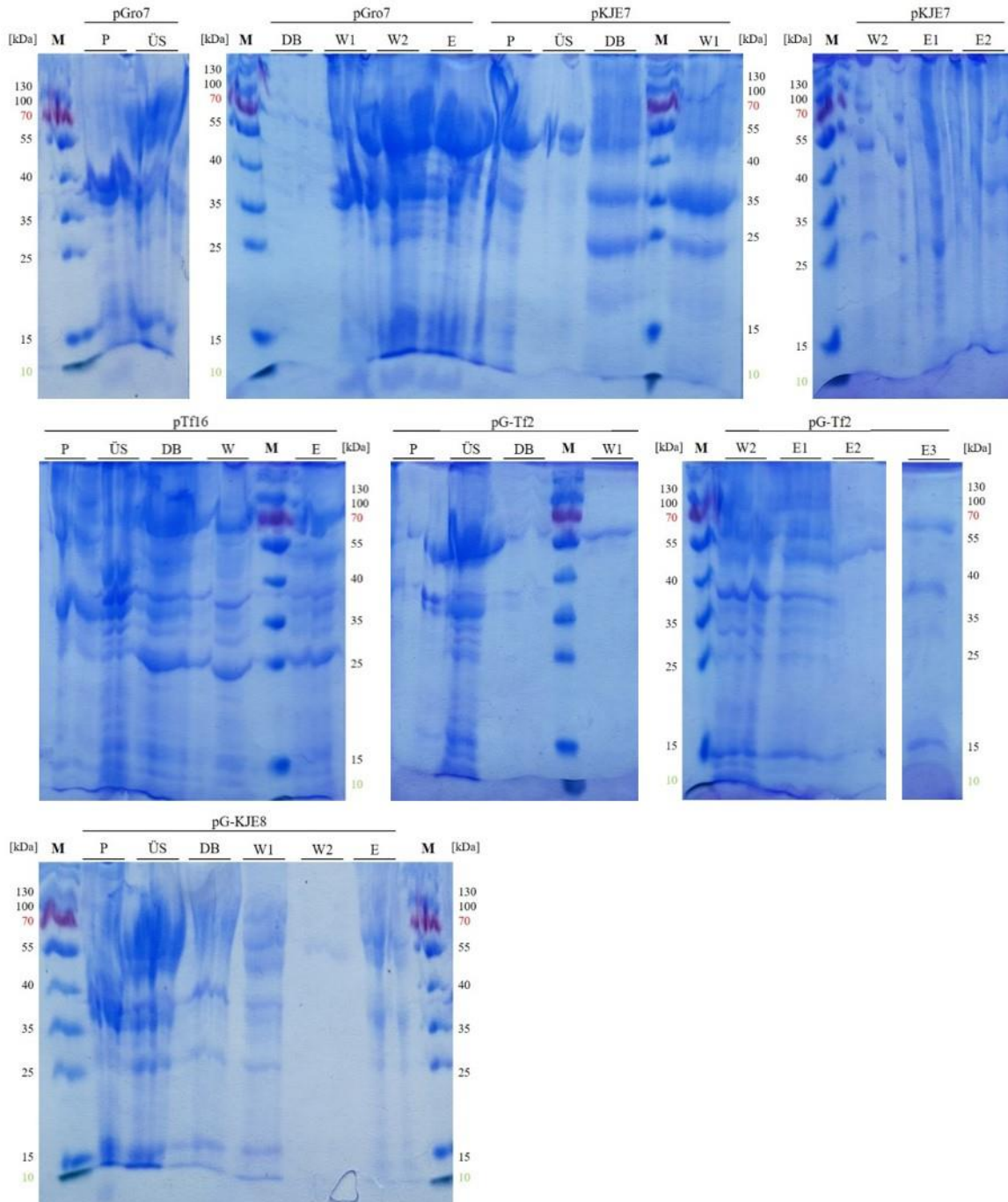
**Tabelle 3-3. Verwendete Chaperone und deren Masse.**

Chaperon	GroEL	GroES	DnaK	DnaJ	Tf	GrpE
Masse [kDa]	60	10	70	40	56	22

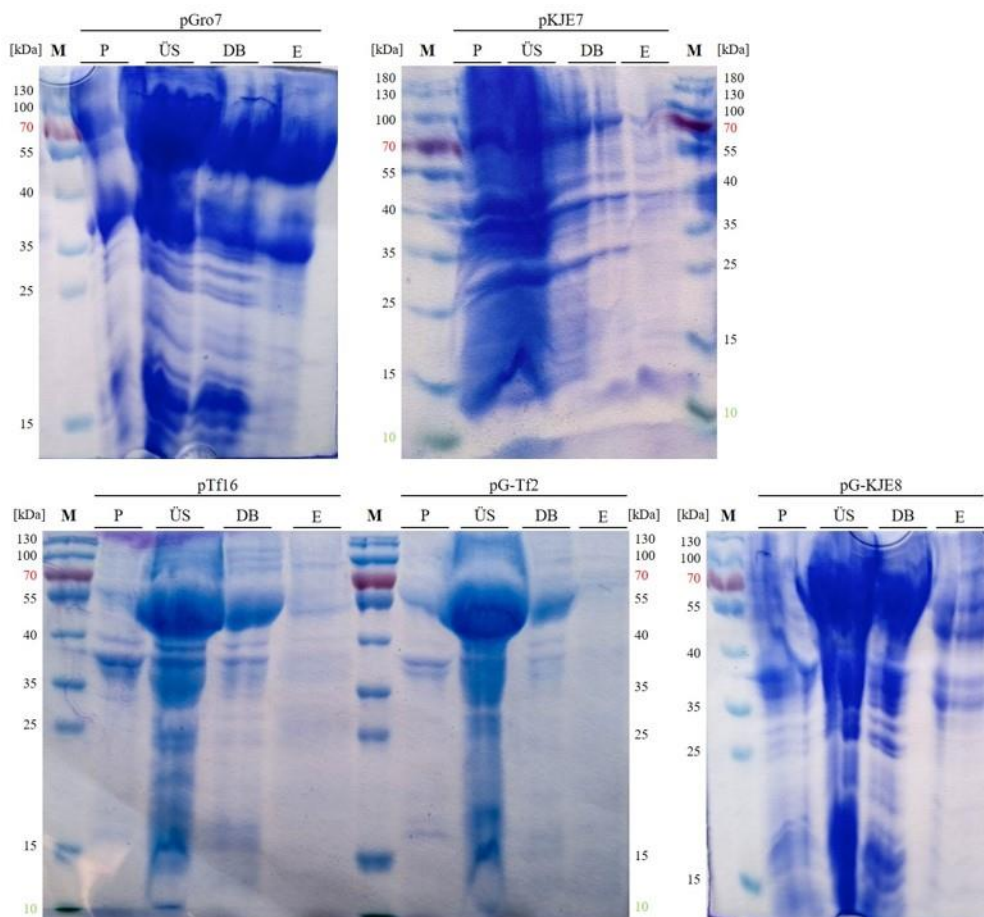
Die Induktion der Expression von *nonS* und *pamS* erfolgte durch Zugabe von IPTG, während die Expression der Chaperon-Plasmide je nach Promotor durch L-Arabinose oder Tetracyclin induziert wurde. Die Analyse der nachfolgenden Reinigung erfolgte *via* SDS-PAGE (Abbildung 3-35 und Abbildung 3-36).



## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 3-35.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) aus der Coexpression von pET28a(+)<sub>nonS</sub> mit pGro7, pKJE7, pTf16, pG-Tf2 und pG-KJE8 in *E. coli* BL21. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W) und Elutionsfraktionen (E) der Affinitätschromatographie.



**Abbildung 3-36. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) aus der Coexpression von pET28a(+)-*pamS* mit pGro7, pKJE7, pTf16, pG-Tf2 und pG-KJE8 in *E. coli* BL21.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB) und Elutionsfraktionen (E) der Affinitätschromatographie.

Die intensiven Banden im jeweiligen Überstand im Bereich zwischen 55 und 70 kDa deuten darauf, dass die Chaperone GroEL (60 kDa) und DnaK (70 kDa) in größerer Menge löslich produziert wurden. Dasselbe gilt für DnaJ (40 kDa), GrpE (22 kDa) und GroES (10 kDa), da den entsprechenden Molekulargewichten ebenfalls Banden im Überstand zugeordnet werden können.

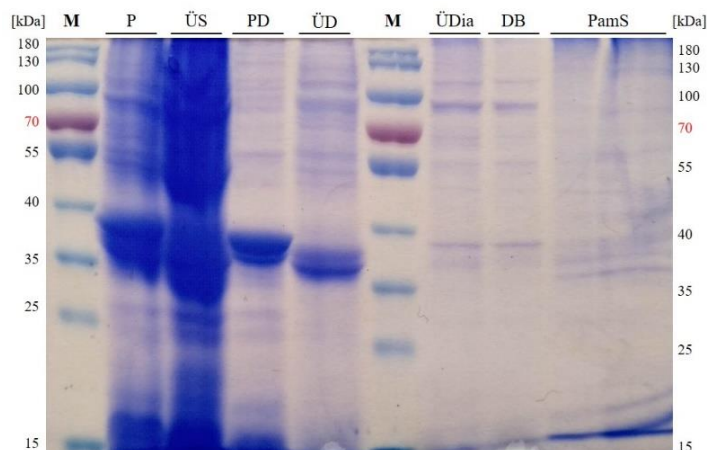
Im Durchbruch und den Waschfraktionen sind Banden zu sehen, die vermutlich den jeweiligen Chaperonen entsprechen. Weder im Durchbruch noch den Waschfraktionen sind Banden bei 35 kDa zu sehen, die den beiden Zielproteinen NonS und PamS entsprechen würden. Dies deutet darauf hin, dass eventuell im Überstand befindliches NonS und PamS erfolgreich an das Säulenmaterial gebunden hat. In den Elutionsfraktionen sind jedoch viele Verunreinigungen in dem Bereich zwischen 25 und 55 kDa zu erkennen, die den Chaperonen entsprechen. Schwache Interaktionen der Chaperone mit dem Säulenmaterial konnten vermutlich nicht unterbunden werden. Außerdem befindet sich der größere Zielproteinanteil im Pellet und konnte somit mithilfe der Chaperone nicht in löslicher Form gewonnen werden. Der NonS- und PamS-Anteil

in der löslichen Fraktion konnte auch durch Coexpression mithilfe der Chaperon-Plasmide pGro7, pKJE7, pTf16, pG-Tf2 und pG-KJE8 nicht erhöht werden.

### 3.1.5.1.5. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS/pamS</sub> unter denaturierenden Bedingungen

Eine Möglichkeit, um die Enzyme künftig in löslicher Form zu erhalten, ist die Proteingewinnung unter denaturierenden Bedingungen. In harnstoffhaltigem Denaturierungspuffer wird das Protein entfaltet und somit solubilisiert. Durch Dialyse wird der Harnstoff langsam entfernt, wodurch sich das Protein rückfaltet und somit in Lösung bleibt.

Zellen von *E. coli* BL21 mit pET28a(+)<sub>pamS</sub> wurden mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen analog zu IndCyc11 (Abschnitt 3.1.4.1.2) durchgeführt (Abbildung 3-37).

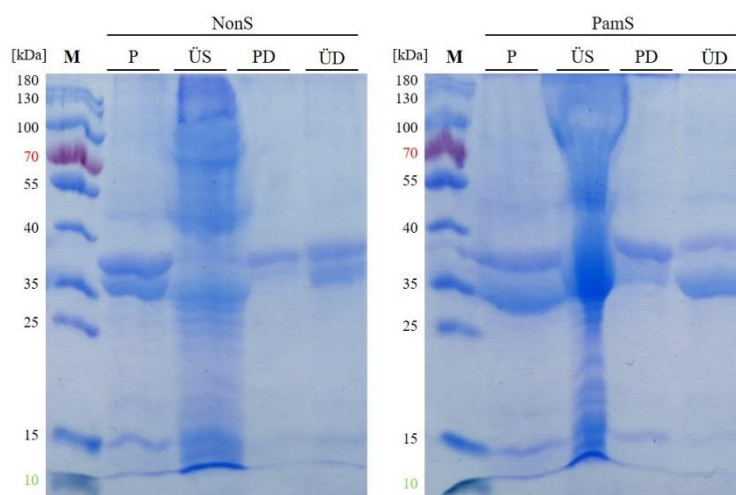


**Abbildung 3-37. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>pamS</sub>.** Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung, Pellet (PD) und Überstand (ÜD) nach Denaturierung, Überstand (ÜDia) nach Dialyse sowie Durchbruch (DB) der Affinitätschromatographie und PamS nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (PamS in HEPES-Puffer).

Im Pellet zeigte sich eine deutliche Bande bei etwa 35 kDa. Im Überstand war diese Bande weiterhin zu sehen, allerdings mit starken Verunreinigungen. Nach Denaturierung war im Pellet eine Bande bei 35 kDa zu erkennen und im Überstand etwas tiefer gelegen ebenfalls eine Bande. Insgesamt war die Probe nach Denaturierung deutlich sauberer, da von *E. coli* löslich produzierte Proteine erfolgreich abgetrennt werden konnten. Da in Pellet und Überstand nach Denaturierung eine Bande im relevanten Bereich zu erkennen war, konnte geschlossen werden, dass das Protein zumindest teilweise entfaltet wurde. Ein großer Anteil blieb allerdings im Pellet zurück und wurde somit verworfen. Nach Dialyse waren die Verunreinigungen nur noch

sehr schwach bis gar nicht mehr sichtbar, allerdings war dort viel weniger Protein vorhanden, da aggregierte Proteine durch Zentrifugation abgetrennt wurden.

Um die großen Verluste für die lösliche Gewinnung von PamS zu minimieren, wurde versucht eine höhere Proteinmenge im Zellpellet zu erhalten. Hierfür wurde die Genexpression mit einer IPTG-Konzentration von 1.0 mM induziert. Durch Denaturierung und schließende Dialyse sollten NonS und PamS in ihrer nativen Form gewonnen werden (Abbildung 3-38).



**Abbildung 3-38. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) und His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_*nonS* bzw. pET28a(+)\_*pamS* unter denaturierenden Bedingungen.** Die Genexpression erfolgte durch Zugabe von 1.0 mM IPTG. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Überstand (ÜD) und Pellet (PD) nach Denaturierung durch Harnstoff und Rückfaltung *via* Dialyse.

Sowohl für NonS als auch PamS zeigt sich, dass sich im Pellet nach Zellaufschluss neben einer Bande bei etwa 35 kDa, was der Größe der Zielproteine entspricht, eine Verunreinigung mit 40 kDa befand. Durch Denaturierung mit Harnstoff und anschließender Zentrifugation sollten unlösliche Verunreinigungen abgetrennt werden. Teilweise konnte dies in beiden Fällen erreicht werden, da im Pellet nach Denaturierung ebenfalls eine Bande bei 40 kDa zu erkennen ist und die Intensität der entsprechenden Bande im Überstand abgenommen hat. Es ist anzunehmen, dass das Protein mit 40 kDa ebenfalls durch die Dialyse rückgefaltet wurde und jedoch mithilfe dieser Methode nicht von den Zielproteinen NonS und PamS abgetrennt werden konnte. Da die Intensität der Proteinbanden in den Elutionsfraktionen vergleichsweise schwach war und zu viele Verunreinigungen vorhanden waren, wurden andere Methoden zur Gewinnung und Reinigung der beiden Zielproteine herangezogen.

### 3.1.5.1.6. Klonierung von *nonS* und *pamS* in pCold-I

#### 3.1.5.1.6.1. Klonierung mittels *Two-Step-SLIC*

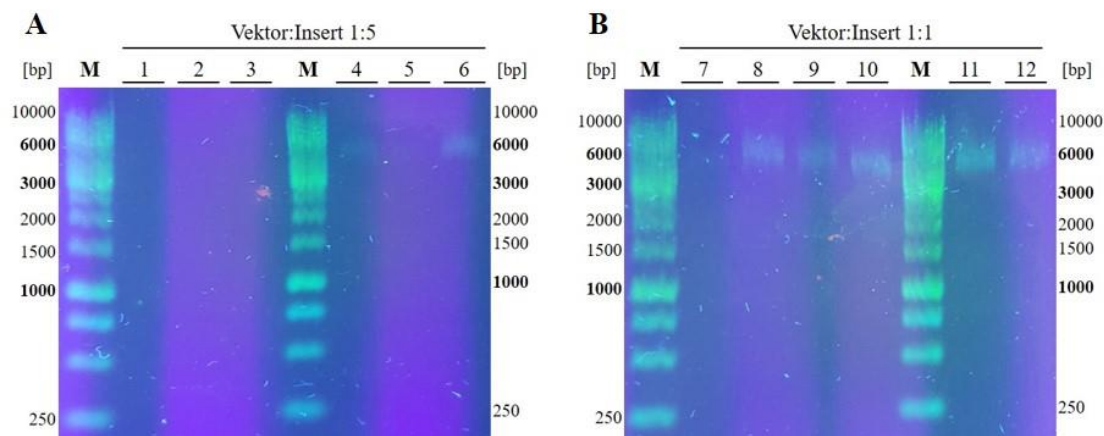
Da die lösliche Produktion von NonS und PamS bisher nicht erfolgreich war, sollten die entsprechenden Gensequenzen *nonS* und *pamS* in pCold-I kloniert werden. Der Vektor pCold-I besitzt den *cold-shock protein A (cspA)*-Promotor zur Produktion von hochreinem rekombinantem Protein in *E. coli*. Dadurch kann die Zielproteinsynthese selektiv bei einer niedrigen Temperatur induziert werden. In diesem Zustand wird die Produktion von zelleigenen Wirtsproteinen unterdrückt und die Proteaseaktivität verringert. Idealerweise sollte dies zu einer hohen Ausbeute und Reinheit des Zielproteins führen.<sup>[162]</sup>

Es wurde zunächst der Versuch unternommen, die Klonierung über eine *Two-Step-SLIC* (analog zu Abschnitt 3.1.1.2.2) durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden durch PCR mithilfe der Primer P31–34 (Tabelle 8-4) 20 bp lange Überhänge an den Gensequenzen *nonS* und *pamS* erzeugt, welche homolog zu denen des Zielvektors pCold-I sind. Der Vektor pCold-I wurde mithilfe der Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NdeI* hydrolysiert. Im ersten Schritt der SLIC wurden die erzeugten Inserts und der Vektor jeweils mit einer T4 DNA-Polymerase inkubiert. In Abwesenheit von dNTPs verfügt diese über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, wodurch homologe, einzelsträngige 5'-Überhänge generiert wurden. Im zweiten Schritt wurden die Inserts mit zusätzlicher Hilfe einer DNA-Ligase in den Vektor pCold-I ligiert.<sup>[163]</sup> Das Klonierungsprodukt wurde in *E. coli* TOP10 transformiert und positive Klone sollten mittels Kolonie-PCR identifiziert werden. Die Klonierung mithilfe dieser Methode führte jedoch nicht zu den gewünschten Zielvektoren.

#### 3.1.5.1.6.2. Klonierung mittels T4-DNA-Ligase

Da der Versuch *nonS* und *pamS* mithilfe der *Two-Step-SLIC* in pCold-I zu klonieren nicht zum Erfolg führte, wurde die Klonierung unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase durchgeführt. Zunächst wurden die erzeugten PCR-Fragmente für *nonS* und *pamS* mithilfe der Enzyme *EcoRI* und *NdeI* geschnitten. Im Ligationsschritt wurde der mit *EcoRI* und *NdeI* linearisierte Vektor jeweils mit den geschnittenen Inserts und einer T4-DNA-Ligase inkubiert. Es wurden hierfür die Verhältnisse 1:1 und 1:5 zwischen Vektor und jeweiligem Insert gewählt. Nach Transformation in *E. coli* TOP10 wurden die Plasmide isoliert und einer Testrestriktion mit *EcoRI* und *NdeI* unterzogen (Abbildung 3-39).



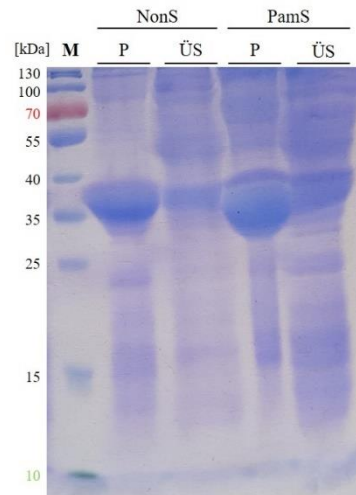


**Abbildung 3-39.** Agarosegele (1%) der Testrestriktion von pCold-I\_*nonS* bzw. pCold-I\_*pamS* mit *EcoRI* und *NdeI* nach Ligation von *nonS* und *pamS* mit einem Vektor:Insert-Verhältnis von 1:5 (A) bzw. 1:1 (B). Aufgetragen wurden Marker (M) und die jeweiligen Produkte der Testrestriktion von *nonS* (1–3, 7–9) und *pamS* (4–6, 10–12).

Bei den Proben 4, 6 und 8 ist jeweils eine schwache Bande zwischen etwa 5000 und 6000 bp zu erkennen. Bei diesen Proben war eine weitere Bande zwischen 750 und 1000 bp zu erwarten, was dem Insert *nonS* bzw. *pamS* mit einer Größe von 900 bp entspricht. Die Proben, bei denen das gewünschte Bandenmuster zu erkennen war, wurden zur eindeutigen Überprüfung sequenziert. Dabei konnte die Sequenz von pCold-I\_*nonS* bzw. pCold-I\_*pamS* eindeutig bestätigt werden.

#### 3.1.5.1.7. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS/pamS*

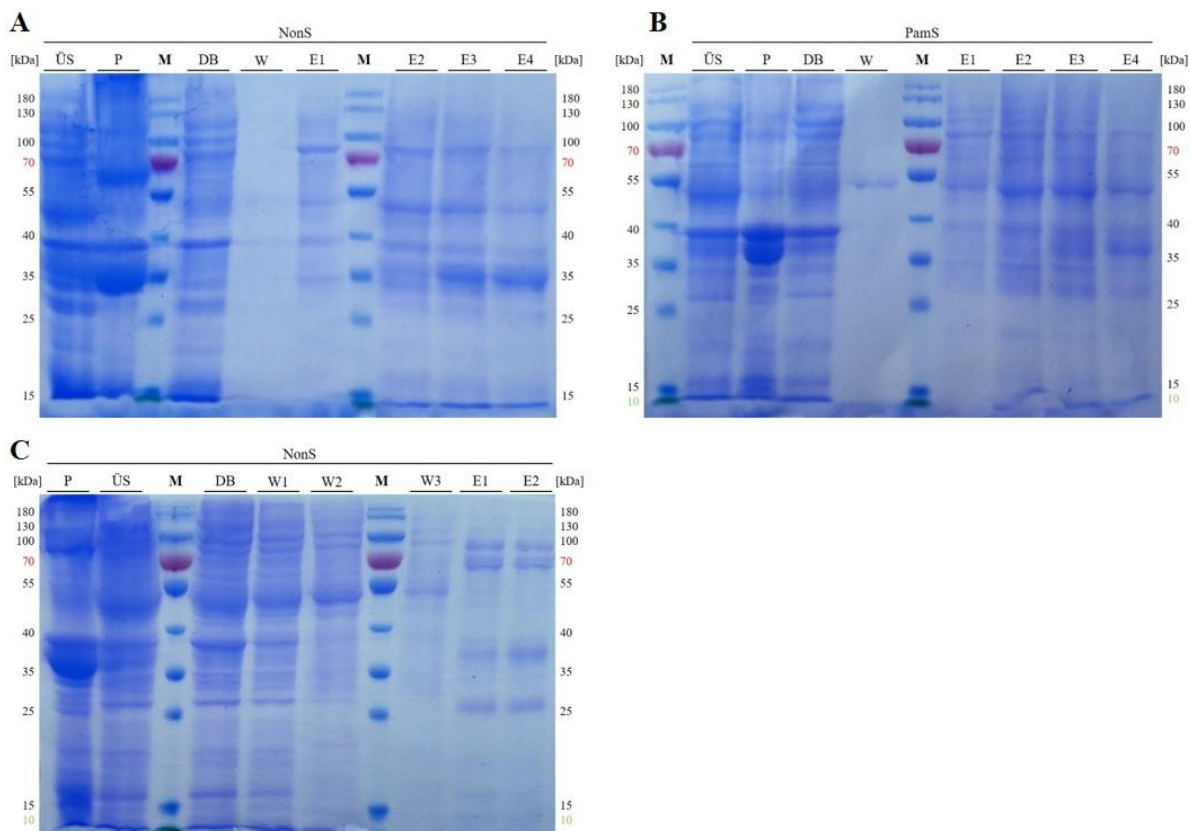
Die Vektoren pCold-I\_*nonS* und pCold-I\_*pamS* wurden für die Produktion von NonS und PamS in *E. coli* BL21 eingebracht und kultiviert. Zur verstärkten Expression wurde bei 15 °C zusätzlich IPTG zugegeben und das erhaltene Zellpellet mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Proben von Pellet und Überstand wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-40).



**Abbildung 3-40.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) bzw. His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) in *E. coli* BL21 pCold-I<sub>nonS</sub> bzw. pCold-I<sub>pamS</sub>. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Kälteschock auf 15 °C und zusätzliche Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung.

Es zeigte sich eine intensive Bande im Pellet auf einer Höhe von knapp über 35 kDa, die vermutlich NonS und PamS entspricht. Im Überstand ist die entsprechende Bande ebenfalls zu erkennen, wenn auch in sehr viel schwächerer Intensität.

Da die Ergebnisse für den Erhalt der löslichen Zielproteine vielversprechend waren, wurden die Zielproteine His<sub>6</sub>-NonS und His<sub>6</sub>-PamS *via* Ni-NTA-AC unter nativen Bedingungen gereinigt (Abbildung 3-41).



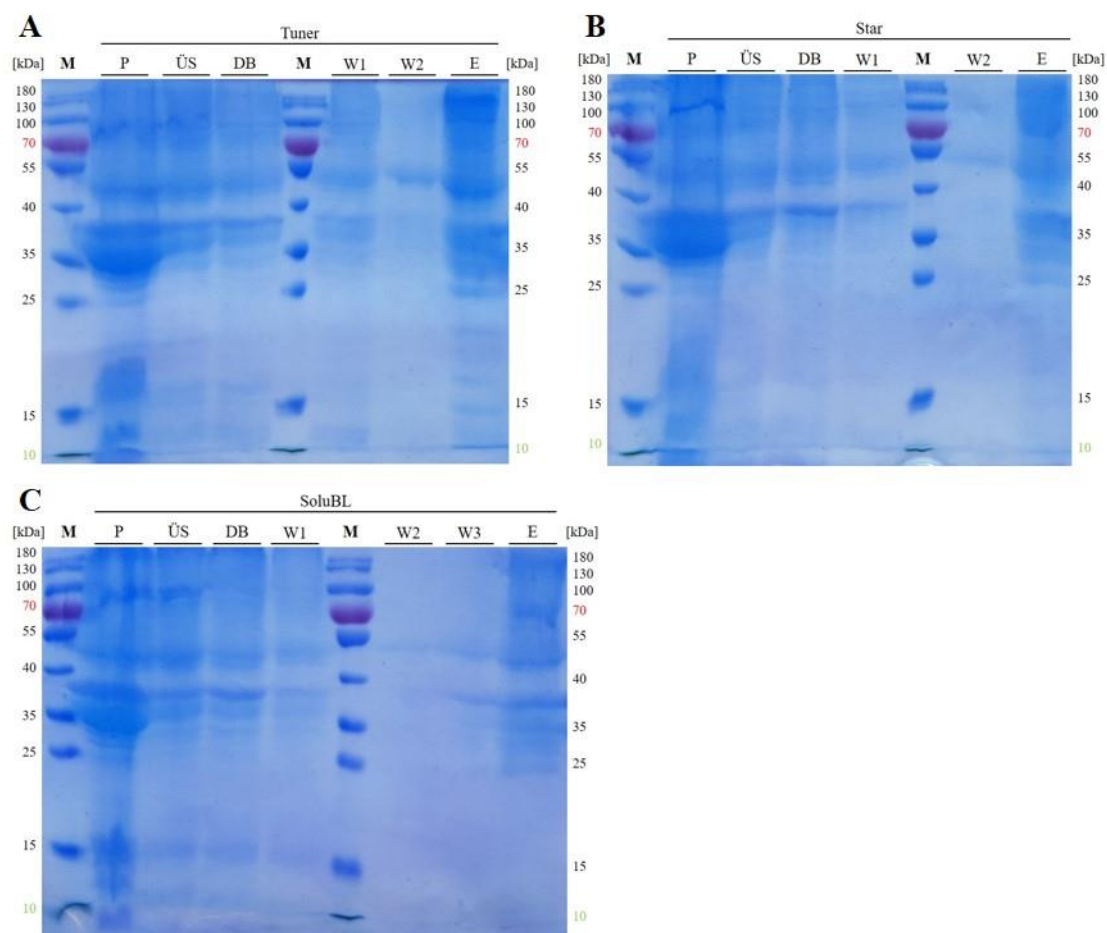
**Abbildung 3-41. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (A+C) (34 kDa) bzw. His<sub>6</sub>-PamS (B) (30 kDa) aus *E. coli* BL21 pCold-I<sub>nonS</sub> bzw. pCold-I<sub>pamS</sub>. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschlösungspuffers ohne (A+B) bzw. mit (C) Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W1–2) und Elutionsfraktionen (E1–4) der Affinitätschromatographie.**

Es ist zu erkennen, dass NonS und PamS nur in sehr geringer Menge löslich produziert wurden und mithilfe der Ni-NTA-AC isoliert werden konnten. Der größte Proteinanteil befand sich im Pellet, da eine intensive Bande im Bereich von 35–40 kDa zu erkennen ist. Da auch im Durchbruch jeweils eine Bande in dem Größenbereich zu erkennen ist, war die Wechselwirkung der Zielproteine mit dem Säulenmaterial vermutlich relativ schwach. Außerdem weisen die Elutionsfraktionen sehr viele Verunreinigungen durch andere Proteine auf. Die Verwendung eines Waschlösungspuffers mit Imidazol könnte mögliche Verunreinigungen in der Enzymlyse minimieren (Abbildung 3-41C). Im Fall von NonS waren dabei jedoch noch viele Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen zu erkennen. Außerdem wurde das Zielprotein vermutlich bereits durch den Imidazol-haltigen Waschlösungspuffer vom Säulenmaterial gewaschen, wodurch der NonS-Anteil in den Elutionsfraktionen geringer ist (verglichen mit Abbildung 3-41A).



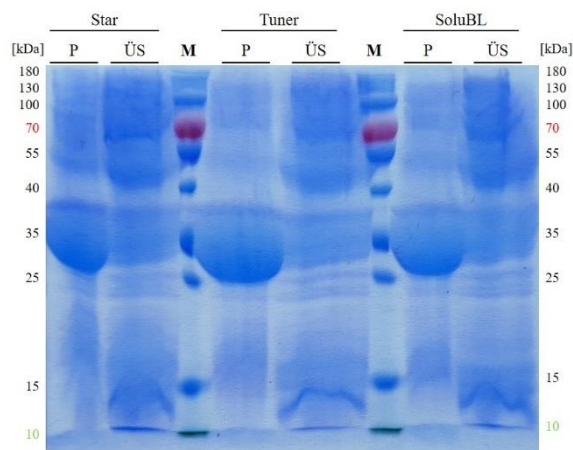
3.1.5.1.8. Gewinnung aus *E. coli* Star, Tuner und SoluBL pCold-I<sub>nonS</sub>/pamS

Die Vektoren pCold-I<sub>nonS</sub> und pCold-I<sub>pamS</sub> wurden ebenfalls in die *E. coli*-Stämme Star, Tuner und SoluBL21 eingebracht. Die Analysen der Reinigungen durch Ni-NTA-AC erfolgten via SDS-PAGE (Abbildung 3-42, Abbildung 3-43 und Abbildung 3-44).



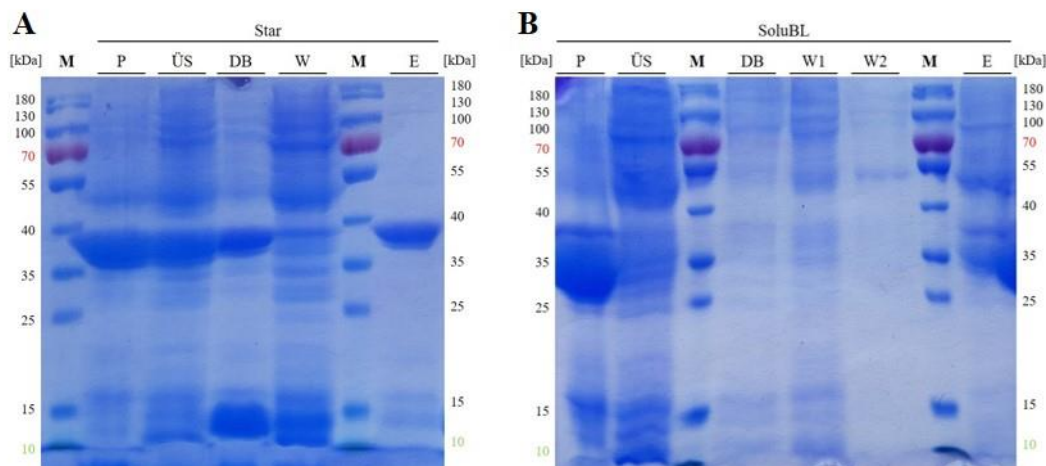
**Abbildung 3-42.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) aus *E. coli* Tuner (A), Star (B) und SoluBL21 (C) pCold-I<sub>nonS</sub>. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschlösungspuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W1–3) und Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie.

In allen Elutionsfraktionen sind noch viele Verunreinigungen durch andere Proteine zu erkennen. Außerdem befand sich der größere Zielproteinanteil vermutlich unlöslich im Zellpellet. Die Produktion und Reinigung von löslichem NonS mithilfe der verwendeten *E. coli*-Stämme war somit nicht erfolgreich.



**Abbildung 3-43.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Produktion von His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) in *E. coli* Star, Tuner und SoluBL21 pCold-I<sub>pamS</sub>. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Kälteschock bei 15 °C und zusätzliche Zugabe von 0.1 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 für 22 h bei 15 °C. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung.

Das Ergebnis für die Produktion von PamS zeigt, dass sich viele Proteine mit einer Größe von 25–40 kDa im Überstand befanden und damit löslich gewonnen werden konnten. Um zu überprüfen, wie hoch der Anteil des Zielproteins im Überstand ist, erfolgte eine Reinigung *via* Ni-NTA-AC (Abbildung 3-44).

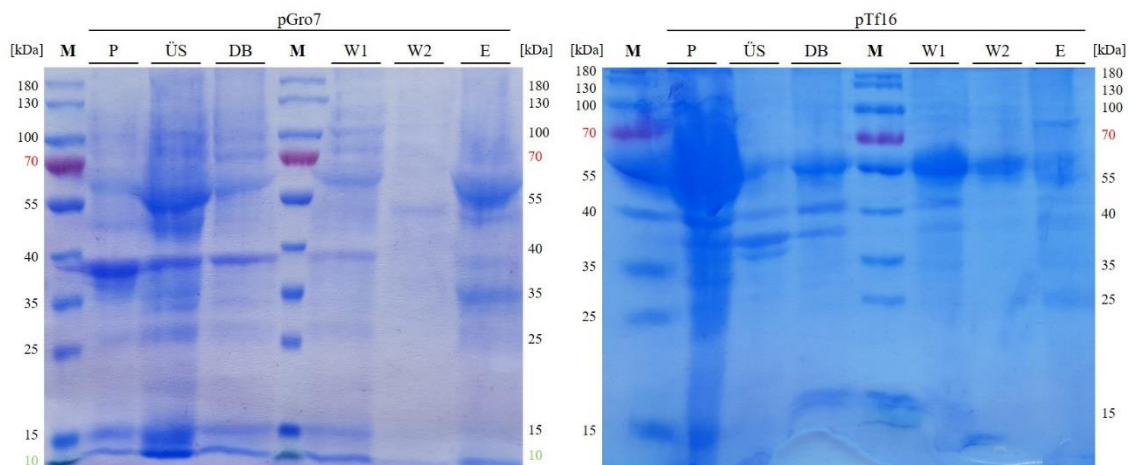


**Abbildung 3-44.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) aus *E. coli* Star (A) und SoluBL21 (B) pCold-I<sub>pamS</sub>. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W1–2) und Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie.

Bei der Elutionsfraktion der Reinigung von PamS aus *E. coli* Star ist eine intensive Bande knapp unter 40 kDa zu erkennen (Abbildung 3-44A). Dabei handelt es sich vermutlich nicht um PamS, da dieses ein Molekulargewicht von 30 kDa besitzt. Bei der Reinigung von PamS aus *E. coli* SoluBL21 befanden sich noch starke Verunreinigungen in der Elutionsfraktion und auch die Menge an Zielprotein war relativ gering (Abbildung 3-44B).

3.1.5.1.9. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pCold-I\_pamS durch Coexpression von Chaperonen

Die Chaperonplasmide pGro7 und pTf16 des *Chaperone Plasmid Sets* von TAKARA BIO wurden in *E. coli* BL21 mit pCold-I\_pamS eingebracht. Expression, Aufschluss, Reinigung und Analyse *via* SDS-PAGE erfolgten analog zu Abschnitt 3.1.5.1.4 (Abbildung 3-45).



**Abbildung 3-45.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) aus der Coexpression von pCold-I\_pamS mit pGro7 und pTf16 in *E. coli* BL21. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-NTA-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch (DB), Waschfraktionen (W1–2) und Elutionsfraktion (E) der Affinitätschromatographie.

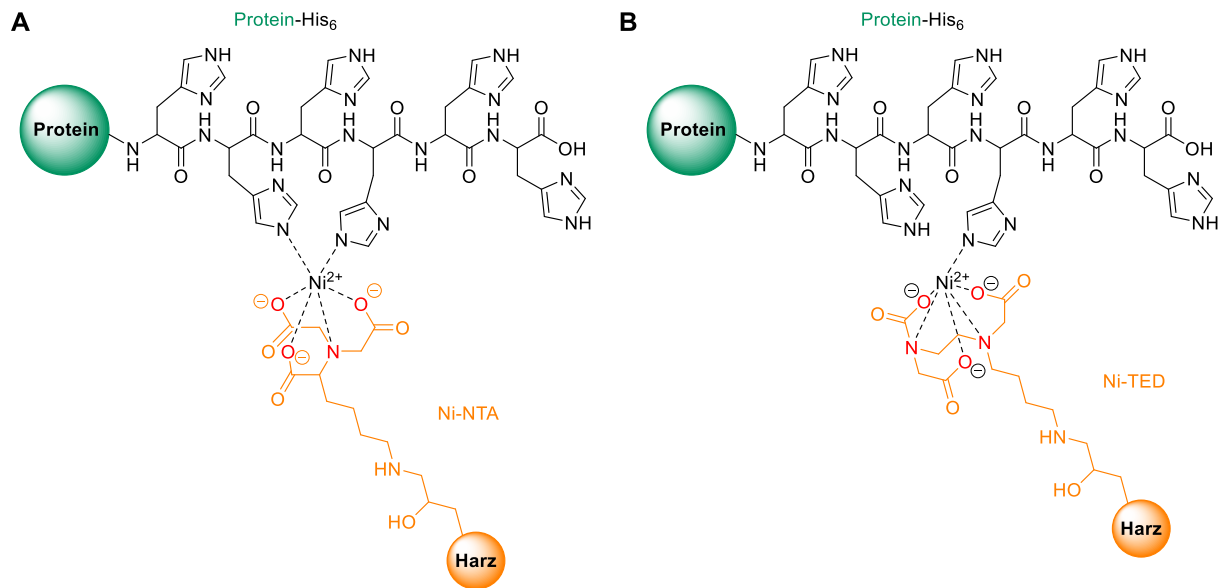
Anhand des Überstandes aus der Coexpression von pCold-I\_pamS und pGro7 ist zu erkennen, dass der Großteil der Proteine löslich gewonnen werden konnte. In der Elutionsfraktion ist eine Bande bei etwa 35 kDa zu erkennen, wobei es sich um das Zielprotein His<sub>6</sub>-PamS handeln könnte. Jedoch ist zusätzlich eine intensive Bande bei etwa 50–60 kDa zu sehen. Dabei handelt es sich vermutlich um das Chaperon GroEL (60 kDa). Es ist außerdem eine Bande bei etwa 10 kDa zu erkennen, was dem Chaperon GroES (10 kDa) entsprechen könnte. Da bei der Reinigung *via* Ni-NTA-AC ein Waschpuffer ohne Imidazol genutzt wurde, konnte die Wechselwirkung von GroEL und GroES mit dem Säulenmaterial wahrscheinlich nicht unterbunden werden.

PamS konnte im Falle der Coexpression mit pTf16 vermutlich nicht oder kaum löslich gewonnen werden, da bei der Elutionsfraktion nur sehr schwache Banden bei 30–40 kDa zu erkennen sind. Außerdem sind weder in Überstand und Pellet noch in den beiden Waschfraktionen entsprechende Banden zu sehen. Bei allen Proben sind Banden bei 55 kDa zu sehen, was dem Chaperon Tf (56 kDa) entspricht. PamS konnte somit nicht mithilfe des Chaperons Tf löslich zurückgewonnen werden. Aus diesem Grund wurde diese Methode nicht zur Gewinnung von NonS herangezogen.

### 3.1.5.1.10. Gewinnung aus *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS/pamS* mithilfe des Ni-TED-Harzes

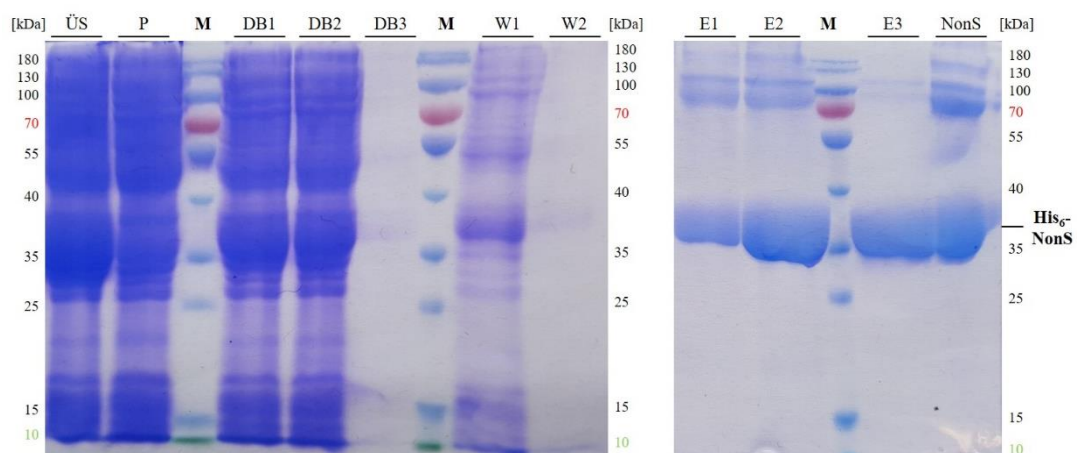
Bisherige Versuche die beiden Enzyme NonS und PamS durch Coexpression mit Chaperon-Plasmiden sowie Reinigung unter nativen und denaturierenden Bedingungen *via* Ni-NTA-AC löslich zu gewinnen, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Ein Problem bei der Reinigung unter Verwendung des Ni-NTA-Affinitätsmaterials waren die vielen Verunreinigungen in der Elutionsfraktion. Dies lag unter anderem daran, dass die Äquilibration der Affinitätsäule mit einem Waschpuffer ohne Imidazol geschah, wodurch es zu keiner Elution von unspezifisch gebundenen Proteinen kam. Jedoch konnte unter Verwendung eines Imidazol-haltigen Waschpuffers kein Protein erhalten werden. Möglicherweise ist der His<sub>6</sub>-tag nur schwer zugänglich und die Proteinbindung an die Säule in Gegenwart von Imidazol zu schwach. Ein weiteres Problem könnte sein, dass Ni-NTA durch die zwei vorhandenen Bindungsstellen für den His<sub>6</sub>-tag auch unspezifisch Proteine bindet, weshalb ein weiterer Reinigungsversuch aus *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS/pamS* mithilfe des Protino<sup>®</sup> Ni-TED-Harzes unter nativen Bedingungen geschah.

Bei Vorhandensein eines His<sub>6</sub>-tags im Fusionsprotein kann eine Reinigung *via* Ni-NTA- oder Ni-Tris(carboxymethyl)-ethylendiamin (TED)-AC erfolgen. Bei NTA handelt es sich um einen Chelat-Liganden, der in einer Agarosematrix vorliegt und Ni<sup>2+</sup>-Ionen über vier Koordinationsstellen bindet (Abbildung 3-46A). Es verbleiben zwei Koordinationsstellen, über die Ni<sup>2+</sup> an zwei der sechs Histidine im His<sub>6</sub>-tag binden kann. Eine Alternative bietet das Ni-TED-Affinitätsmaterial, welches nur eine einzelne Bindestelle für den His<sub>6</sub>-tag besitzt. Dies führt zu einer geringeren Bindekapazität, gleichzeitig aber auch zu einer erhöhten Bindespezifität des *getaggen* Proteins gegenüber unspezifisch bindenden Proteinen (Abbildung 3-46B). Zudem können unspezifische Interaktionen durch die geringere Anzahl der Seitenketten des Silica-Trägermaterials reduziert werden.<sup>[181]</sup>



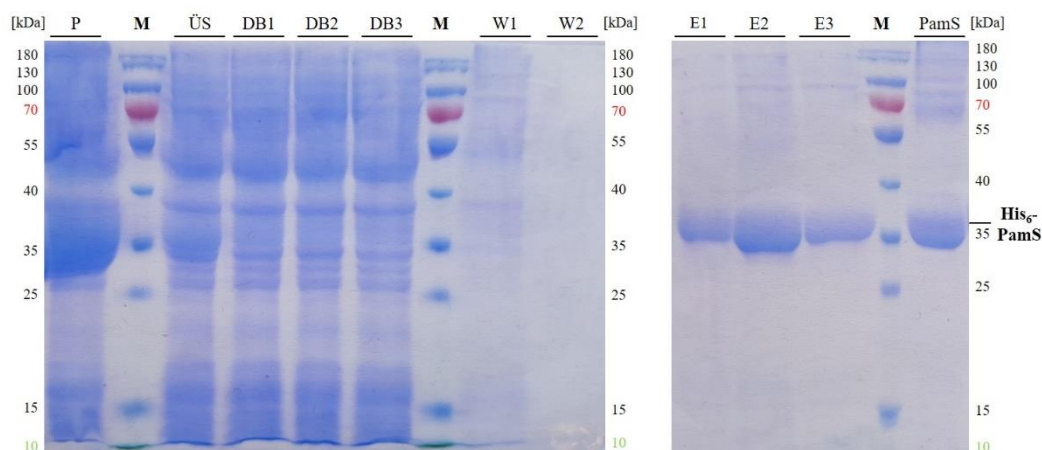
**Abbildung 3-46. Trägermaterialien für die Affinitätschromatographie.** Ni-NTA (**A**) weist durch zwei Bindestellen eine höhere Bindekapazität für das Protein auf, bindet jedoch unspezifischer. Ni-TED (**B**) besitzt nur eine Bindestelle an den His<sub>6</sub>-tag, was zu einer geringeren Bindekapazität aber zu einer höheren Proteinspezifität führt.<sup>[181]</sup>

Das Lysat von *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS* bzw. *pamS* wurde während des Reinigungsprozesses dreimal auf die Säule aufgetragen, um eine bessere Bindung des rekombinanten Proteins an das Säulenmaterial zu gewährleisten. Gebunden Proteine mit Polyhistidin-tag wurden durch Zugabe des Elutionspuffers mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM eluiert. Damit können auch stark bindende, multimere Proteine mit mehr als einem Polyhistidin-tag gewonnen werden. Die Proben des Reinigungsverlaufes wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3-47 und Abbildung 3-48).



**Abbildung 3-47. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) aus *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS*.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-TED-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (**M**), Überstand (**ÜS**) und Pellet (**P**) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch des dreimal aufgetragenen Lysates (**DB1–3**), Waschfraktionen (**W1–2**) und Elutionsfraktionen (**E1–3**) der Affinitätschromatographie und NonS nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (**NonS** in HEPES-Puffer).



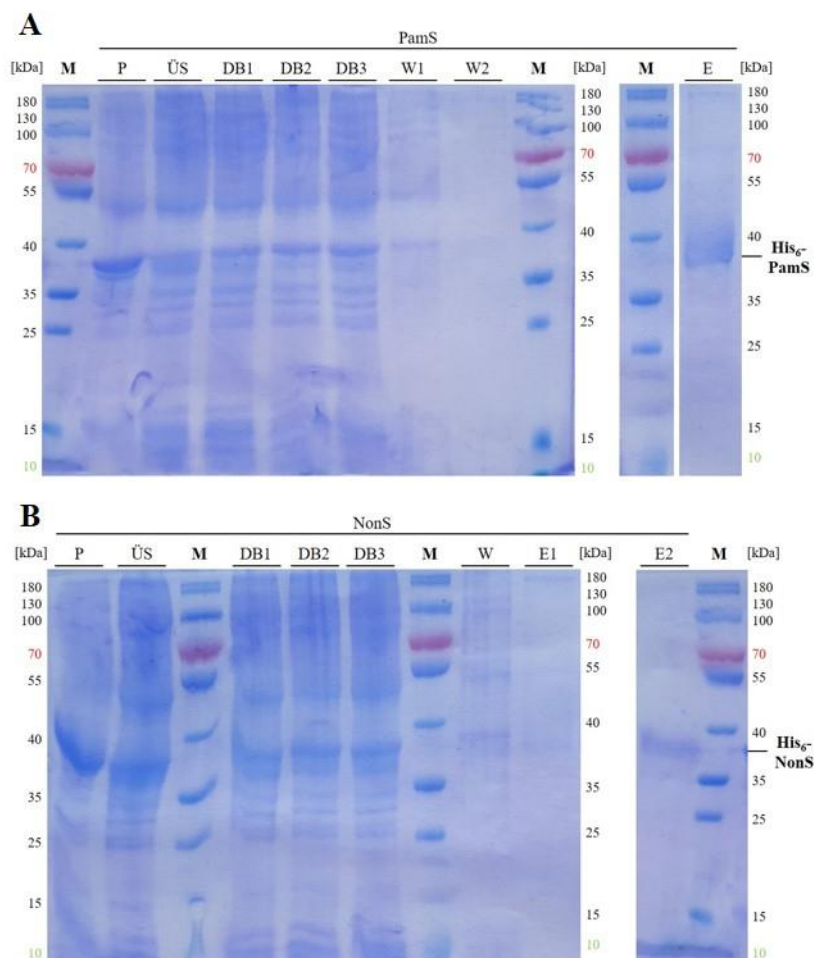


**Abbildung 3-48. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa) aus *E. coli* BL21 pCold-I\_pamS.** Die Reinigung erfolgte mittels Ni-TED-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand (ÜS) und Pellet (P) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch des dreimal aufgetragenen Lysates (DB1–3), Waschfraktionen (W1–2) und Elutionsfraktionen (E1–3) der Affinitätschromatographie und PamS nach Pufferwechsel und Aufkonzentrieren (PamS in HEPES-Puffer).

NonS und PamS konnten mithilfe des Ni-TED-Säulenmaterials erfolgreich isoliert und gereinigt werden. Bei den Elutionsfraktionen ist eine intensive Proteinbande auf der entsprechenden Höhe zu erkennen. Die Identität der beiden Proteine konnte zudem durch MS-MS-Analyse bestätigt werden (Abschnitt 3.2). Die erhaltenen Enzymlösungen für NonS und PamS wurden für die darauffolgenden Aktivitätstests genutzt (Abschnitt 3.4.4).

#### 3.1.5.1.11. Gewinnung der Fusionsproteine His<sub>6</sub>-NonS-His<sub>6</sub> und His<sub>6</sub>-PamS-His<sub>6</sub>

Um eine bessere Interaktion der Proteine NonS und PamS mit dem Ni-TED-Säulenmaterial zu erreichen, wurde ein zusätzlicher His<sub>6</sub>-tag am C-Terminus der jeweiligen Proteine angebracht. Zu diesem Zweck wurden die Gene *nonS* und *pamS* ausgehend von pET28a(+)\_*nonS/pamS* durch PCR amplifiziert. Es wurden hierfür entsprechende Primer verwendet, um das Stopcodon der beiden Gensequenzen zu entfernen (P31–34, Tabelle 8-4). Auf diese Weise sollte die Gensequenz mit einem weiteren His<sub>6</sub>-tag, welche der *nonS*- bzw. *pamS*-Sequenz auf pET28a(+) nachgeschaltet ist, exprimiert werden. Da im Anschluss das gewünschte Plasmid transformiert und amplifiziert werden sollte, wurden die PCR-Produkte mit *DpnI* inkubiert, wodurch das methylierte Ausgangsmaterial abgebaut wurde. Nach Transformation in *E. coli* TOP10 wurden entsprechende Plasmide gereinigt und durch Sequenzierung überprüft. Die beiden Plasmide mit der korrekten Sequenz wurden in *E. coli* BL21 eingebracht und die Genexpression induziert. Nach Zellaufschluss erfolgte die Reinigung *via* Ni-TED-AC unter nativen Bedingungen (Abbildung 3-49).



**Abbildung 3-49.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS-His<sub>6</sub> (34 kDa) (A) bzw. His<sub>6</sub>-PamS-His<sub>6</sub> (30 kDa) (B) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>nonS-his6</sub> bzw. pET28a(+)<sub>pamS-his6</sub>. Die Reinigung erfolgte mittels Ni-TED-AC unter Verwendung eines Waschpuffers ohne Imidazol. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Durchbruch des dreimal aufgetragenen Lysates (DB1-3), Waschfraktion (W) und Elutionsfraktionen (E) der Affinitätschromatographie.

His<sub>6</sub>-NonS-His<sub>6</sub> und His<sub>6</sub>-PamS-His<sub>6</sub> konnten beide löslich gewonnen werden, da auf beiden Gelen eine intensive Bande im Überstand bei 35 kDa zu sehen ist. Verglichen mit der Reinigung von His<sub>6</sub>-NonS und His<sub>6</sub>-PamS weisen die Banden in den Eluaten bei 35 kDa eine niedrigere Intensität auf, weshalb angenommen werden kann, dass die Wechselwirkung von His<sub>6</sub>-PamS-His<sub>6</sub> und His<sub>6</sub>-NonS-His<sub>6</sub> mit dem Säulenmaterial durch den weiteren His<sub>6</sub>-tag nicht verbessert werden konnte.

### 3.2. MS-MS-Analysen

Von allen verwendeten Proteinen wurde eine MS-MS-Analyse durchgeführt, um die Aminosäuresequenz dieser eindeutig zu bestätigen. Eine Analyse per Tandem-Massenspektrometrie (MS) verwendet zwei hintereinander geschaltete Massenspektrometer. Nach der ersten Ionisation kommt es hierbei zu einer Trennung der Ionen, wobei bestimmte Ionen im ersten Massenspektrometer ausgewählt werden. Anschließend werden diese in der Stoßkammer weiter aufgetrennt und durch das zweite Massenspektrometer analysiert. Für diese Analyse wurde jeweils die entsprechende Proteinbande im SDS-Polyacrylamid-Gel (siehe Abschnitt 8.4.1) ausgeschnitten und weiterverwendet. Die Hydrolyse der Proteine fand durch Inkubation mit Trypsin statt. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 3-4 zusammenfassend dargestellt. Die weiterführenden Ergebnisse sind im Anhang in Abschnitt 8.4 zu sehen.

**Tabelle 3-4. Ergebnisse der MS-MS-Analysen für alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine.**

<b>Protein</b>	<b>Sequenzabdeckung [%]</b>	<b>Anzahl an Spektren</b>
<b>His<sub>6</sub>-AmbDH2</b>	94	1317
<b>His<sub>6</sub>-AmbDH3</b>	80	536
<b>His<sub>6</sub>-AmbMod4</b>	67	666
<b>His<sub>6</sub>-AmbDH4</b>	56	371
<b>His<sub>6</sub>-IndCyc11</b>	95	235
<b>His<sub>6</sub>-NonS</b>	69	284
<b>His<sub>6</sub>-PamS</b>	89	296
<b>His<sub>6</sub>-PedPS7</b>	50	523
<b>SalBIII-His<sub>6</sub></b>	76	333
<b>His<sub>6</sub>-SorPS8</b>	79	369
<b>His<sub>6</sub>-ZinJ</b>	100	469

Die Sequenzabdeckung beschreibt den Prozentwert, wieviel von der zu erwartenden Aminosäuresequenz durch gefundene Peptidfragmente im Massenspektrum abgedeckt wird. Die Anzahl an Spektren gibt die Anzahl der gefundenen Massenspektren für die Peptidfragmente des jeweiligen Proteins an. Die SDS-Polyacrylamid-Gelbilder der analysierten Proteine sind in Abbildung 8-3 bis Abbildung 8-7 zu sehen. Die detaillierten Ergebnisse sind in Abbildung 8-8 und Abbildung 8-17 enthalten.



Lücken in der Abdeckung können durch fehlende Schnittstellen des Trypsins hervorgerufen werden, wodurch die zu analysierenden Fragmente zu groß sind, um nachgewiesen werden zu können. Das Fehlen dieser Bereiche in der Aminosäuresequenz ist daher wahrscheinlich durch die Verwendung des Enzyms Trypsin hervorgerufen worden, denn in den entsprechenden Abschnitten ist vermutlich keine Schnittstelle für Trypsin vorhanden. Zudem kann es sein, dass zu nah beieinanderliegende Schnittstellen zu kleine Peptidfragmente liefern, die per MS nicht detektiert werden.

Bei sämtlichen analysierten Proteinen liegt eine Sequenzabdeckung von mindestens 50 bis maximal 100% vor, sodass in allen Fällen sicher davon ausgegangen werden kann, dass die Proteine mit der zu erwartenden Aminosäuresequenz vorliegen. Das Vorhandensein des N- oder C-terminalen His<sub>6</sub>-tags kann für den Großteil der Proteine ebenfalls eindeutig bestätigt werden.

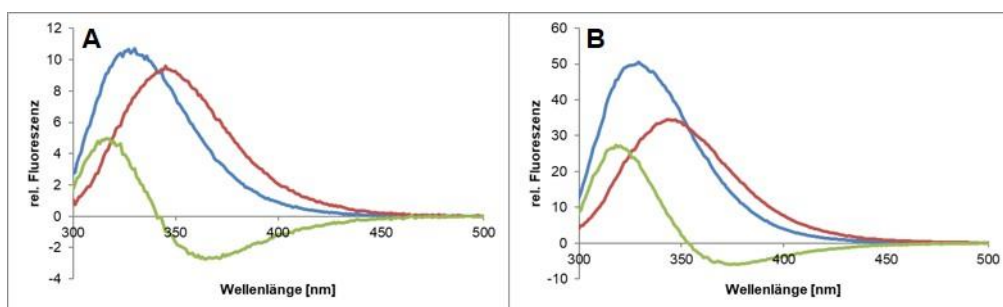
### 3.3. Biochemische Charakterisierung von AmbDH3

Die bisherigen Ergebnisse zu AmbDH3<sup>[164,182]</sup> bilden die Grundlage für die weitergehenden biochemischen Untersuchungen dieses Enzyms zur besseren Charakterisierung. Im folgenden Kapitel wurde das Enzym selbst untersucht sowie auch dessen Präparation und Reaktionsbedingungen mit verschiedenen Substraten optimiert.

#### 3.3.1. Analyse per Fluoreszenzemissionsspektrometrie

Die Fluoreszenz von Proteinen kann hauptsächlich auf aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin zurückgeführt werden. Änderungen im Fluoreszenzemissionsspektrum beruhen vor allem auf Veränderungen in der Konformation des Proteins und damit der Lösungsmittelzugänglichkeit der Chromophore. Die Messung von Fluoreszenzemissionsspektren gilt als eine sehr sensitive Methode und eignet sich daher zur Untersuchung von Proteinen.<sup>[183]</sup>

Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Fluoreszenzemission wurde in einem Bereich von 300 bis 500 nm detektiert. Die entstandenen Spektren wurden anschließend auf Abweichungen kontrolliert, miteinander verglichen und gemittelt. Die Messung erfolgte unter nativen sowie denaturierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde ein Differenzspektrum erstellt, indem die jeweiligen Spektren voneinander subtrahiert wurden. Die entstandenen Fluoreszenzemissionsspektren von AmbDH3 sind in Abbildung 3-50 gezeigt.



**Abbildung 3-50. Fluoreszenzemissionsspektren von AmbDH3.** 1  $\mu\text{M}$  (A) und 5  $\mu\text{M}$  (B) AmbDH3 unter nativen (in HEPES-Puffer; **blau**) und denaturierenden Bedingungen (in Harnstoffhaltigem HEPES-Puffer; **rot**) sowie das daraus erstellte Differenzspektrum (**grün**). Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Messung der Fluoreszenzemission von 300-500 nm.

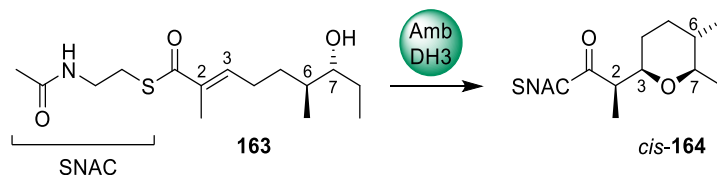
Die Fluoreszenzspektren zeigen eine eindeutige Verschiebung des Emissionsspektrums unter denaturierenden Bedingungen zu höheren Wellenlängen im Vergleich zu nativen Bedingungen. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität am Emissionsmaximum war ebenfalls zu erkennen. Diese Veränderungen der Spektren aufgrund unterschiedlicher Pufferbedingungen deuten auf eine Konformationsänderung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen hin. Außerdem

zeigt sich eine etwa fünffach bzw. vierfach höhere Fluoreszenzintensität unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen aufgrund der Konzentrationserhöhung.

### 3.3.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die *in vitro*-Enzymreaktionen der heterolog produzierten Zyklasen wurden standardmäßig für 16 h inkubiert und durch Zugabe von EtOAc gestoppt. Das Edukt/Produkt-Gemisch wurde extrahiert und *via* UPLC-MS analysiert. Die daraus bestimmten Umsätze beruhen auf der Annahme, dass alle Verbindungen im gleichen Maße per ESI ionisierbar sind. Einzig im Falle von Substrat **163** wurde eine Kalibriergerade für Edukt **163** und zyklisiertes Produkt *cis*-**164** erstellt und bei der Bestimmung des Zyklisierungsumsatzes miteinbezogen (Abschnitt 6.2.2.12; Abbildung 6-1).

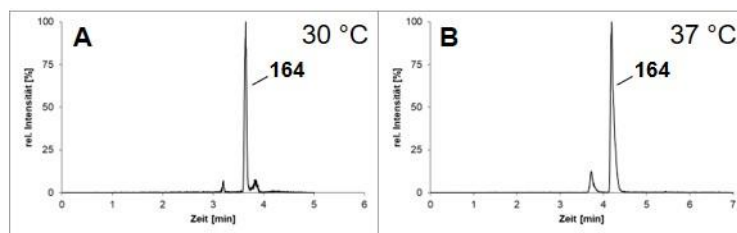
Substrat **163** ähnelt dem natürlichen Substrat von AmbDH3, wobei der *N*-Acetylcysteamin-Rest als Mimetikum des im natürlichen Kontext gebundenen ACPs dient.<sup>[184–188]</sup> Durch Umsetzung von **163** mit AmbDH3 oder einer der anderen Zyklasen können Rückschlüsse auf die Zyklaseaktivität dieser Enzyme getroffen werden. Das standardmäßig verwendete Substrat **163** besitzt eine Masse von 301 u und ist nach ESI<sup>+</sup> durchweg als Natrium-Addukt detektierbar, was zu einem Masse-Ladungsverhältnis von 324 u führt. Bei der Bildung des zyklisierten Produkts *cis*-**164** gibt es keine Veränderung der molaren Masse im Vergleich zum Edukt.



**Abbildung 3-51.** AmbDH3-katalysierte Zyklisierungsreaktion von Substrat **163** zum THP *cis*-**164**. SNAC (*N*-Acetylcysteamin) dient hierbei als Mimetikum des im natürlichen Kontext kovalent gebundenen ACP.

Durch einen Vergleich mit dem UPLC-MS-Chromatogramm der synthetisch hergestellten Referenzverbindung können die erhaltenen Signale dem Edukt **163** und Produkt *cis*-**164** zugeordnet werden. Aussagen über den Zyklisierungsumsatz können nach Vergleich der beiden Integrale getroffen werden.

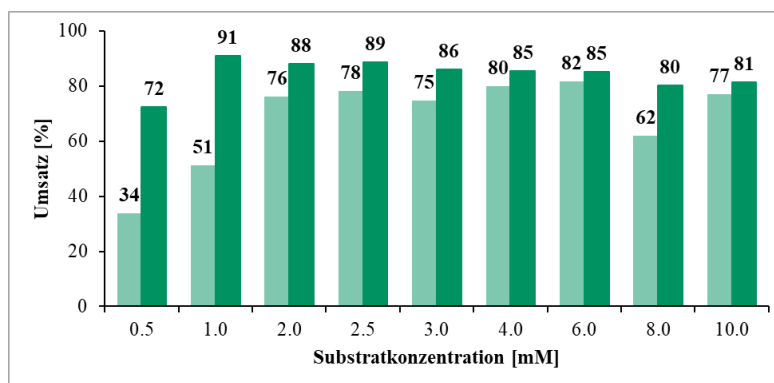
Die Reaktionstemperatur sollte zur Optimierung der Reaktionsbedingungen und dem Ziel der Ressourcenschonung von den bisher standardmäßig verwendeten 37 °C auf 30 °C gesenkt werden. Bei gleichbleibendem Umsatz war es möglich, die Temperatur der Enzymreaktion von 37 auf 30 °C zu senken (Abbildung 3-52).



**Abbildung 3-52. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3 mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C (A) bzw. 37 °C (B) und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

### 3.3.3. Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration

Die Enzymaktivitäten des Zelllysats und des gereinigten AmbDH3 wurden zudem in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der Verbindung **163** getestet. Die Enzymaktivitätstests erfolgten mit Substratkonzentrationen von 0.5 bis 8.0 bzw. 10.0 mM. Für die Reaktionen mit gereinigter Proteinlösung wurde eine niedrige Enzymkonzentration von 1 mg/mL gewählt, da mit zu hohen Enzymkonzentrationen aufgrund des vollständigen Umsatzes keine Konzentrationsabhängigkeit mehr bestimmt werden kann. Die prozentualen Umsätze der Reaktionen mit Zelllysate bzw. gereinigter Enzymlösung sind in Abbildung 3-53 aufgeführt.



**Abbildung 3-53. Umsätze der Enzymreaktionen von AmbDH3 mit Substrat 163.** Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 0.5–10.0 mM) und 20 µL Zelllysate (entspricht ungefähr 115 µg His<sub>6</sub>-AmbDH3) (hellgrün; linker Balken) bzw. 214 µg His<sub>6</sub>-AmbDH3 (grün; rechter Balken) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich im Anhang in Abbildung 8-18 und Abbildung 8-19. Die eingesetzte Menge an Lysate enthält ungefähr 115 µg AmbDH3 und entspricht damit in etwa der Hälfte der eingesetzten AmbDH3-Menge der gereinigten Proteinlösung. Die Berechnung wurde entsprechend Abschnitt 3.1.1.4 durchgeführt.

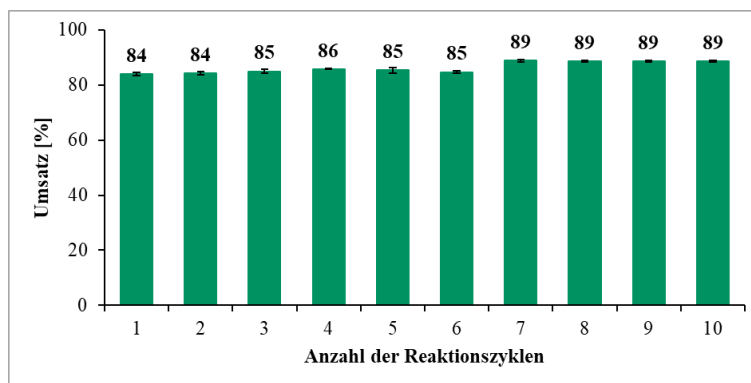
Aus der Gegenüberstellung der verschiedenen Messungen lässt sich zunächst erkennen, dass die Zyklisierungsaktivität bei Verwendung des Zelllysates mit steigender Substratkonzentration zunimmt (Abbildung 3-53; hellgrüner bzw. linker Balken). Im Bereich von 2.0 bis 8.0 mM bleibt der Umsatz auf gleichem Niveau, um dann ab einer Substratkonzentration von 8.0 bzw. 10.0 mM wieder zu sinken. Mögliche Ursachen sind eine Substratinhibition durch Anlagerung

von überschüssigen Substratmolekülen an nicht-katalytische, inhibierende Stellen des Enzyms oder eine schlechtere Löslichkeit des Substrates aufgrund des geringer werdenden Puffervolumens. Der Umsatz ist bei Verwendung des Lysats mit Substratkonzentrationen von 2 bis 6 mM auf relativ gleichem Niveau. Für künftige Enzymreaktionen mit Lysat kann somit eine Substratkonzentration ab 2.0 mM gewählt werden, um einen optimalen Zyklisierungsumsatz zu erhalten.<sup>[189]</sup>

Die Reaktionen mit gereinigtem Enzym zeigen im Allgemeinen einen höheren Umsatz als die Reaktionen mit Lysat (Abbildung 3-53; grüner bzw. rechter Balken). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass in den Enzymreaktionen mit gereinigtem Protein fast doppelt so viel AmbDH3 enthalten ist verglichen mit den Reaktionen mit Lysat. Bis zu einer Substratkonzentration von 1.0 mM kommt es zu einer deutlichen Umsatzsteigerung mit einem nahezu vollständigen Umsatz von 91%. Mit steigender Substratkonzentration sinkt dieser Wert leicht auf 80–89%. Auch in diesem Fall könnten die Substratinhibition oder schlechtere Substratlöslichkeit aufgrund des geringeren Puffervolumens der Grund für den sinkenden Umsatz sein.

### 3.3.4. Stabilitätstests

Zudem wurden verschiedene Untersuchungen zur Stabilität des AmbDH3-Lysates gegenüber Temperatur durchgeführt, indem das filtrierte, zentrifugierte Lysat mit Verbindung **163** inkubiert wurde. Eine mehrfache Wiederverwendung des Lysats ist nicht möglich, da sich nach durchgeführter Enzymreaktion beide Komponenten in der wässrigen Phase befinden und nur durch Extraktion mit EtOAc und somit Denaturierung der Proteine voneinander trennen lassen. Die verbleibenden Aliquots des Lysates wurden ohne Substrat bis zu neunmal für 16 h bei 30 °C parallel zu den Enzymreaktionen inkubiert. Bei jedem weiteren Zyklus wurde eines der Aliquots mit Substrat **163** versetzt. Nach Extraktion der Enzymreaktion und Analyse *via* UPLC-MS konnten Rückschlüsse auf den Umsatz zu zyklisiertem Produkt *cis*-**164** getroffen werden. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung 3-54 zu sehen.

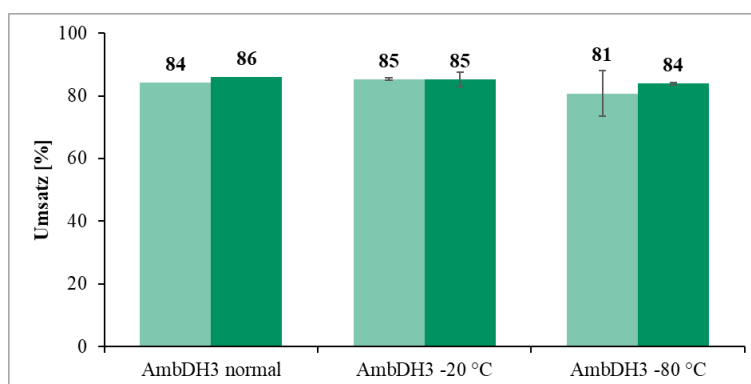


**Abbildung 3-54. Umsätze der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach bis zu neunmaliger Inkubation ohne Substrat.** Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat 163 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich im Anhang in Abbildung 8-20.

Es ergab sich für die Verwendung des AmbDH3-Lysates ein mittlerer Umsatz von 86%. Über zehn Versuche blieb dieser konstant hoch, was eine hohe Stabilität des im Lysat enthaltenen AmbDH3 beweist.

### 3.3.5. Lagerbarkeit

Eine Lagerbarkeit von AmbDH3 ohne relevanten Aktivitätsverlust bei Minusgraden würde dessen Anwendung enorm vereinfachen. Deshalb sollte getestet werden, inwiefern eine Lagerung von AmbDH3 bei –20 oder –80 °C die Aktivität beeinflusst. Nach der Reinigung von AmbDH3 wurde ein Teil direkt für Enzymreaktionen verwendet und der restliche Teil bei –20 bzw. –80 °C für 20 h eingefroren. Die entsprechenden Proteinlösungen vor dem Einfrieren wurden ebenfalls in Enzymreaktionen eingesetzt, um die Umsätze vor und nach dem Einfrieren zu vergleichen. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern sich ein Zusatz von Glycerin auf die Proteinestabilität und damit den nachfolgenden Zyklisierungsumsatz auswirkt. Die berechneten Umsätze sind in Abbildung 3-55 dargestellt.



**Abbildung 3-55. Umsätze der Enzymreaktionen von AmbDH3 vor bzw. nach Einfrieren des Enzyms mit Substrat 163.** Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat 163 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Das Enzym wurde entweder bei –20 oder –80 °C in HEPES-Puffer ohne (hellgrün; linker Balken) und mit 10v% Glycerin (grün; rechter Balken) gelagert. Die UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich im Anhang in Abbildung 8-30.

Die UPLC-MS-Analyse zeigte bei Verwendung des Proteins vor Einfrieren einen Umsatz zu Produkt *cis*-**164** von 84% (Abbildung 3-55). Nach Einfrieren bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C blieb dieser relativ gleich mit 86 bzw. 81% Umsatz. Nach Einfrieren von AmbDH3 in HEPES-Puffer verändert sich die Enzymaktivität nicht maßgeblich, da sich die Umsätze im Vergleich zur direkten Weiterverwendung von AmbDH3 nur geringfügig verbesserten oder verschlechterten. Dies deutet auf eine relativ hohe Stabilität von AmbDH3 selbst nach Einfrieren und ermöglicht damit eine noch effizientere präparative Anwendung dieses Enzyms.

Da bekannt ist, dass die Lagerung von Enzymen in glycerinhaltigen Puffern die Stabilität positiv beeinflussen kann, wurden die Enzymreaktionen zudem in HEPES-Puffer mit 10v% Glycerin durchgeführt. Die Proteinstabilität in wässrigen Lösungen kann im Allgemeinen durch Cosolventien wie Glycerin verbessert werden. Die bevorzugte Hydratation von Proteinen in Glycerin-Wasser-Gemischen ist auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen, die amphiphile Grenzflächenorientierungen des Glycerins an der Proteinoberfläche induzieren. Proteine nehmen dabei kompaktere Konformationen an. Glycerin fungiert als amphiphile Grenzfläche zwischen der hydrophoben Oberfläche und dem polaren Lösungsmittel, wodurch die Entfaltung des Proteins gehemmt und Aggregationen verhindert werden können.<sup>[190]</sup> Es zeigten sich nahezu identische Umsatzwerte verglichen mit der Verwendung von HEPES-Puffer ohne Glycerin (91 und 86 bzw. 84% nach Lagerung bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C). Der HEPES-Glycerin-Puffer scheint in diesem Fall somit keinerlei Einfluss auf die Proteinstabilität zu besitzen.

### **3.3.6. Gefriertrocknung**

Eine weitere Möglichkeit der einfachen und stabilen Lagerung von Enzymen über längere Zeiträume stellt die Lagerung in gefriergetrockneter Form dar. Deshalb wurden Versuche zur Verwendung des Proteins nach einer Gefriertrocknung unternommen. Das in HEPES-Puffer gelöste Lysat und das gereinigte Protein wurden schockgefroren und über Nacht lyophilisiert. Vor Verwendung wurden diese in dem entsprechenden Volumen an Wasser gelöst, um die ursprüngliche Pufferkonzentration wiederherzustellen. Tabelle 3-5 zeigt die Ergebnisse der nachfolgenden Enzymaktivitätstests. Die UPLC-MS-Chromatogramme sind in Abbildung 8-34 und Abbildung 8-38 dargestellt.

Tabelle 3-5. Werte für den jeweiligen Umsatz von gefriergetrocknetem Lysat bzw. gereinigtem Enzym.

Probe	Umsatz [%]	
	Vor Lyophilisation	Nach Lyophilisation
Lysat	quantitativ	quantitativ
AmbDH3	quantitativ	quantitativ

Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich im Anhang in Abbildung 8-31 und Abbildung 8-32.

Die durchgeführten Aktivitätstests vor Lyophilisation zeigten sowohl für Lysat als auch gereinigte Enzymlösung einen quantitativen Umsatz zum zyklisierten Produkt *cis*-**164**. Nach einer Gefriertrocknung konnte bei Verwendung des Lysats und AmbDH3 ebenfalls ein quantitativer Umsatz erhalten werden. Um eine Aussage über die Langzeitstabilität des gefriergetrockneten Lysats und Enzyms treffen zu können, wurde dieses nach 90 d Lagerung bei 4 °C mit Substrat **163** inkubiert, wobei ein Umsatz zu *cis*-**164** von 86 bzw. 89% festgestellt wurde (Abbildung 8-33). Dies beweist, dass sich AmbDH3 auch nach Gefriertrocknung und auch Lagerung ohne jeglichen Umsatzverlust verwenden lässt und erleichtert so enorm die Handhabbarkeit.

### 3.3.7. *In vivo*-Reaktion

Ein Vorteil von *in vivo*-Reaktionen gegenüber *in vitro*-Enzymreaktionen ist die einfachere Durchführung, da hierfür lediglich *ambDH3*-exprimierende Zellen zum Substrat gegeben und inkubiert werden. Deshalb sollte getestet werden, ob es möglich ist, die AmbDH3-katalysierte Zyklisierung von Substrat **163** *in vivo* durchzuführen. Falls das produzierte Enzym nicht in das Medium sekretiert wird und somit in den Zellen verbleibt, ist es notwendig, dass das Substrat membrangängig ist, um die Umsetzung innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Die Reaktion wurde mit Zellen von *E. coli* BL21 mit pET28a(+)-*ambDH3* und Substrat **163** durchgeführt (Abbildung 3-56).

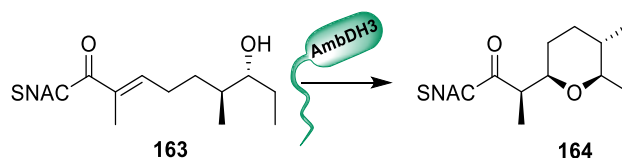
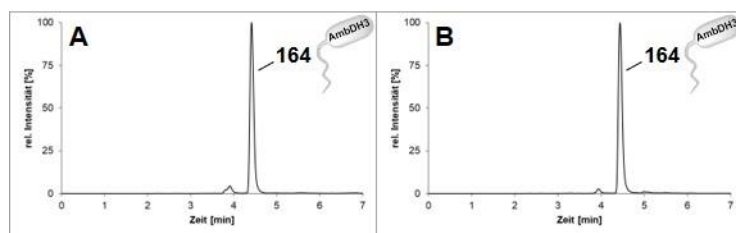


Abbildung 3-56. *In vivo*-Reaktion von *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3* mit Substrat **163**. Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer mit 0.1v% Kanamycin (Startkonzentration 2 mM) und 33 mg Zellen bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



Die Lösung wurde nach durchgeführter Reaktion zentrifugiert und somit Überstand und Pellet voneinander getrennt. Das Pellet wurde mit Lysozym aufgeschlossen, um eventuell in den Zellen eingeschlossene Moleküle *via* UPLC-MS analysieren zu können (Abbildung 3-57).

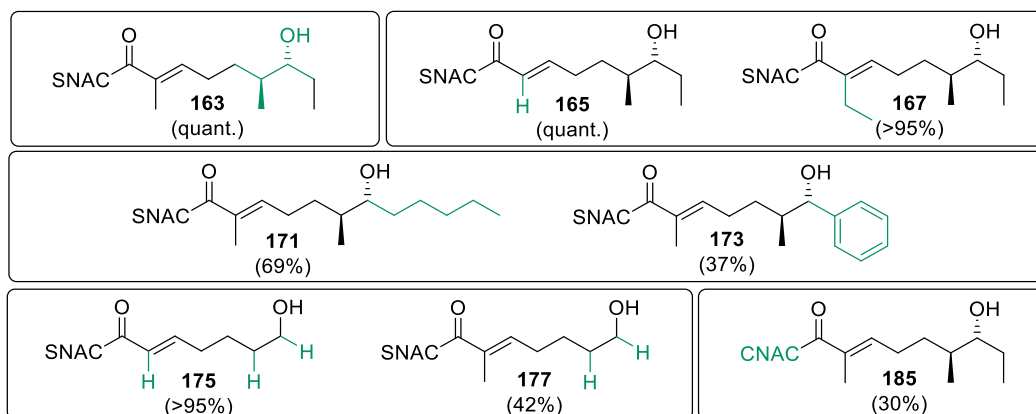


**Abbildung 3-57. UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Reaktion von *E. coli* BL21 pET28a(+)*\_ambDH3* mit Substrat **163**.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$  **A**) nach Extraktion des Überstandes nach der Reaktion und **B**) nach Extraktion des mit Lysozym aufgeschlossenen Zellpellets nach Reaktion. Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer mit 0.1v% Kanamycin (Startkonzentration 2 mM) und 33 mg Zellen bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Das Verhältnis der Menge von eingesetztem Zellpellet (33 mg) und damit der Menge des Enzyms zu Substrat ist für die *in vivo*-Reaktion etwa 8fach höher als bei Enzymreaktionen mit AmbDH3-Lysat (4 mg). Bei der *in vivo*-Reaktion zeigt sich ein nahezu vollständiger Umsatz zum zyklisierten Produkt *cis*-**164**. Die UPLC-MS-Chromatogramme für den extrahierten Überstand sowie für das aufgeschlossene und extrahierte Pellet stimmen überein. Das bedeutet, dass weder das Edukt **163** noch Produkt *cis*-**164** vermehrt in unterschiedlichen Anteilen in Überstand oder Pellet der Reaktionslösung zu finden sind. Substrat **163** und Produkt *cis*-**164** sind demnach hinreichend membrangängig, wodurch eine Ganzzellumsetzung mit diesem System möglich ist.

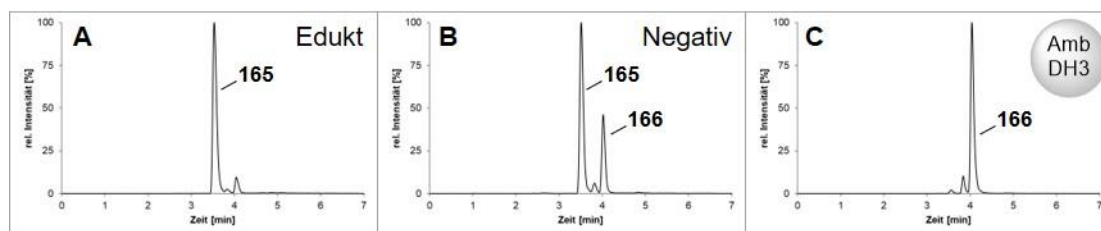
### 3.3.8. Untersuchung der Substratspezifität

Enzymreaktionen mit AmbDH3 und verschiedenen Substraten sollen dessen Substrattoleranz und Stereoselektivität näher beleuchten. Die Enzymreaktionen wurden in einem Maßstab von 0.1 mg bei einer Substratkonzentrationen von 2 mM durchgeführt. Das Ergebnis wurde *via* UPLC-MS untersucht. Die UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich im Anhang in Abbildung 8-34 bis Abbildung 8-39. Die Substrate unterscheiden sich nicht nur in der Art der Substituenten und der Konfiguration an C-6 und C-7, sondern auch in der Substitution an C-2, der Natur des Thioesters und der Rückgratlänge (Abbildung 3-58).<sup>[191]</sup>



**Abbildung 3-58. Strukturen der Substrate, die von AmbDH3 akzeptiert wurden.** Die Kästen unterteilen die Substrate in unterschiedliche Gruppen entsprechend ihrer Struktur. In Klammern angegeben ist der jeweilige Umsatz. Die Werte können zudem Tabelle 3-6 (S. 106) entnommen werden.<sup>[19]</sup>

Die in Abbildung 3-58 dargestellten Substrate konnten alle in AmbDH3-katalysierten Enzymaktivitätstests zum jeweiligen zyklisierten Produkt umgesetzt werden. Die Werte für die Zyklisierung der einzelnen Substrate können Tabelle 3-10 entnommen werden. Dabei wurde neben dem Edukt und der Enzymreaktion auch eine Negativkontrolle (Substrat in HEPES-Puffer) *via* UPLC-MS analysiert, um eine spontane Zyklisierung auszuschließen.



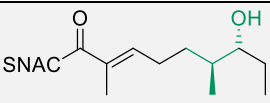
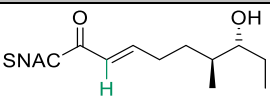
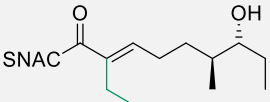
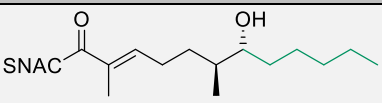
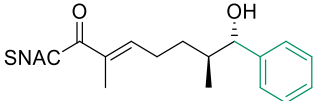
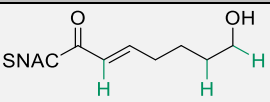
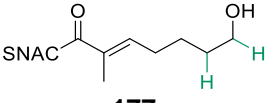
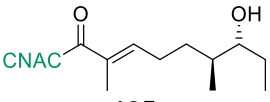
**Abbildung 3-59. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 165:** A) Substrat **165**; B) Negativkontrolle von Substrat **165**; C) Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat **165**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **165** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Abbildung 3-59B+C zeigt, dass im Fall der Umsetzung von **165** neben der AmbDH3-katalysierten Reaktion eine spontane Zyklisierung zu **166** von 23% auftritt. Nach Subtraktion der spontanen Zyklisierung vom Gesamtumsatz verbleiben 69% AmbDH3-katalysierte Zyklisierungsaktivität mit Substrat **165**. Es zeigt sich, dass das Produkt der spontanen Zyklisierung und das von AmbDH3 gebildete Produkt die gleiche Retentionszeit (4.1 min) und vermutlich die gleiche Konfiguration besitzen.

Die Reaktion von **167** zeigte einen Umsatz zu zwei unterschiedlichen Produkten (Abbildung 8-34). Hierbei könnte es sich um das 2L-konfigurierte Produkt **168** handeln. Dieses eluiert nach der Literatur kurze Zeit nach dem erwarteten 2D-konfigurierten Produkt **168**.<sup>[64]</sup> Die erfolgreiche Zyklisierung der Verbindungen **163**, **165** und **167** zeigt, dass verschiedene  $\alpha$ -Substituenten (wie Me, H oder Et) von AmbDH3 toleriert werden.

Mit einer aliphatischen C<sub>5</sub>-Seitenkette an C-7 konnte eine durch AmbDH3 katalysierte, stereospezifische Zyklisierung von **171** ebenfalls beobachtet werden. Die Umsetzung des Substrates **173** mit Phenylsubstituent an C-7 bestätigt zudem die hohe Toleranz gegenüber vorhandenen, größeren Substituenten an C-7. Die erfolgreiche Zyklisierung der C<sub>6</sub>-unverzweigten Substrate **175** und **177** verdeutlicht die breite Substrattoleranz der Zykklase AmbDH3. Ein anderer Ester wie CNAC in **185** wurde ebenfalls von AmbDH3 akzeptiert.

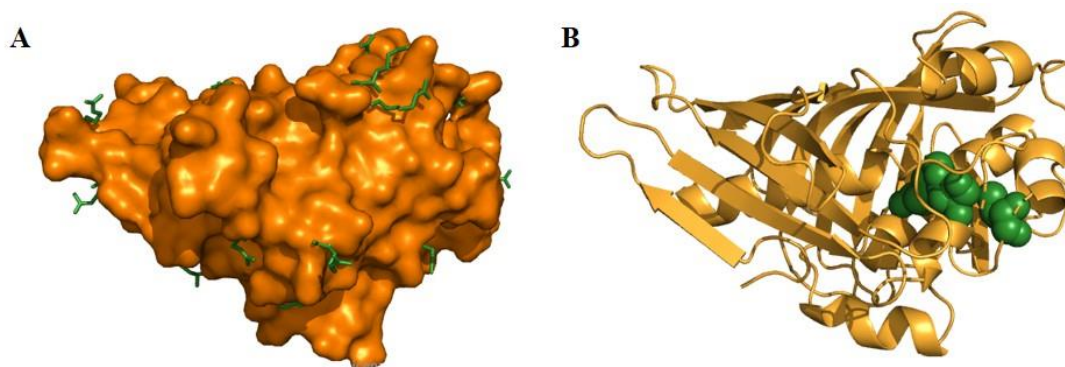
**Tabelle 3-6. Übersicht über die Substrate, die mit AmbDH3 bezüglich eines möglichen Umsatzes zum zyklischen Produkt getestet wurden.**

Eintrag	Substrat	Umsatz [%]
1	 <b>163</b>	quant.
2	 <b>165</b>	quant.* (23)
3	 <b>167</b>	>95
4	 <b>171</b>	69
5	 <b>173</b>	37
6	 <b>175</b>	>95
7	 <b>177</b>	42
8	 <b>185</b>	30

„\*“ deutet auf eine spontane Zyklisierung; der Wert der spontanen Zyklisierung ist in Klammern dahinter angegeben. Bei Substrat **163** wurde die entsprechende Kalibriergerade für die Umsatzwerte miteinbezogen. Bei racemisch eingesetzten Substraten wurde bei Angabe des Umsatzes nicht zwischen den beiden möglichen entstandenen Produkten unterschieden. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg Substrat in HEPES-Puffer (Startkonzentrationen 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.<sup>[191]</sup>

### 3.3.9. Untersuchung der dualen Aktivität als Dehydratase und Zyklastase

Die strukturelle Ursache der zusätzlichen Zyklastaseaktivität von AmbDH3 konnte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von BLANKENFELDT<sup>[44]</sup> aufgeklärt werden. Röntgenkristallstrukturanalysen lieferten die Kristallstruktur von AmbDH3 mit einer Auflösung von 1.19 Å (Abbildung 3-60).<sup>[44]</sup>

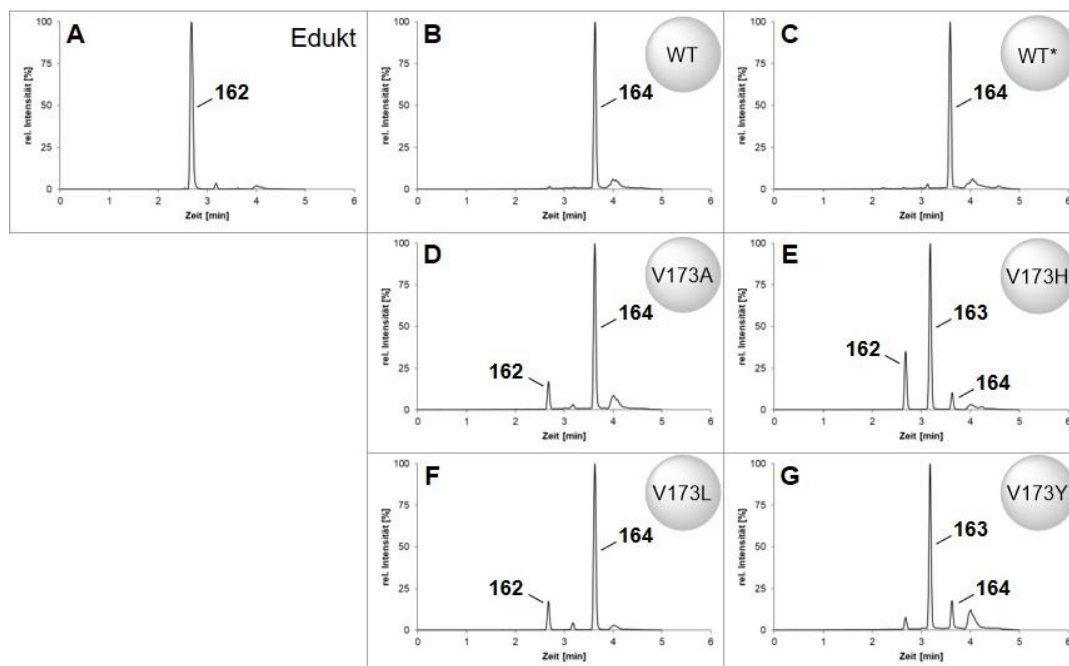


**Abbildung 3-60. Kristallstruktur von AmbDH3 (PDB-ID: 5O16):** **A)** Oberflächenstruktur mit exponierten Arginin- und Lysinresten, die für eine mögliche Quervernetzung genutzt werden können. **B)** Struktur in Cartoon-Darstellung mit grün hervorgehobener aktiver Tasche.<sup>[44]</sup>

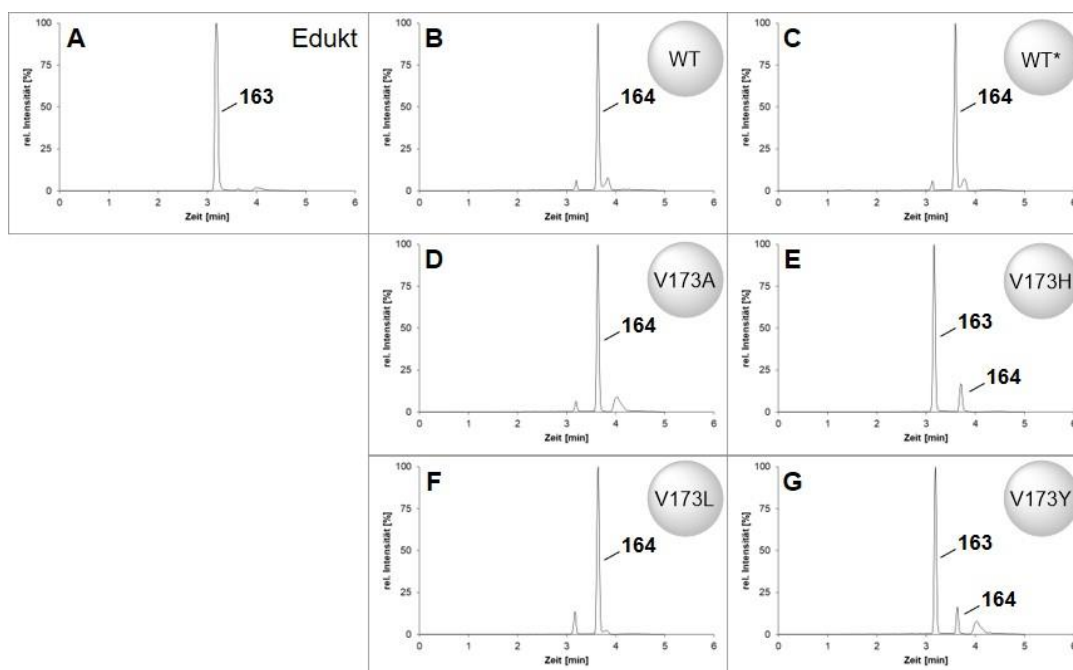
AmbDH3 weist die für mf-Domänen charakteristische Doppel-Hotdog-Faltung auf, bei der zwei  $\alpha$ -Helices von einem geschwungenen  $\beta$ -Faltblatt umschlossen werden. Anders als bisher isolierte DH-Domänen liegt AmbDH3 als Monomer vor. AmbDH3 besitzt einige Ähnlichkeiten zu anderen mf-DH-Domänen aus *cis*-AT-PKS-Systemen, scheint sich jedoch aufgrund der fehlenden Oligomerisierung deutlich von anderen strukturell untersuchten DH-Domänen wie denen in der Erythromycin-, Rifamycin-, Curacin- oder Mycocerosinsäure-Biosynthese abzugrenzen. Eine  $\alpha$ -Helix auf der Proteinoberfläche von AmbDH3 ist kürzer und um 90 °C gedreht, wodurch ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt fehlt. Dadurch stellen nur V173 und G174 eine Verbindung zur nächsten  $\alpha$ -Helix dar. Normalerweise liegt in mf-DH-Domänen an Position 173 ein größerer hydrophilerer Rest vor, wie Tyr oder manchmal His oder Leu. Durch das in AmbDH3 vorliegende V173 wird der Raum und die Flexibilität im aktiven Zentrum deutlich erhöht. Dieser Hohlraum mit überwiegend hydrophobem Charakter enthält als einzige polare Reste die beiden zur katalytischen Diade zugehörigen Aminosäuren H51 und D215.<sup>[44]</sup>

Basierend auf der Kristallstrukturanalyse der rekombinanten Domäne konnte mit einer Kombination aus gezielter Punktmutagenese und Enzymaktivitätstests gezeigt werden, dass die katalytische Diade aus H51 und D215 neben der Dehydratisierung auch die intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition katalysiert. Die Relevanz von V173 wurde in Mutationsstudien mit den erzeugten Mutanten V173A, V173H, V173L und V173Y untersucht. Hierbei wurde getestet,

ob deren Dehydratisierungs- und Zyklisierungsaktivität mit dem Vorläufer **162** (Abbildung 3-61) bzw. Intermediat **163** (Abbildung 3-62) erhalten blieben.

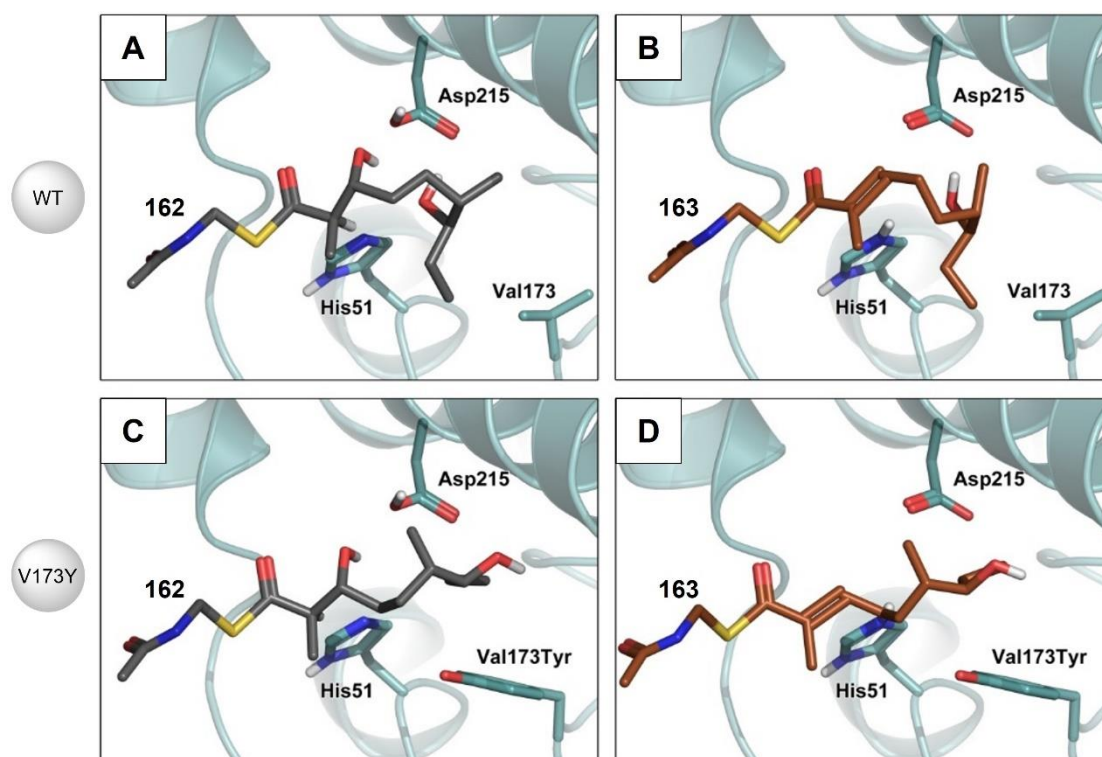


**Abbildung 3-61. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3 und den Mutanten V173A, V173H, V173L und V173Y mit Substrat 162:** A) Referenz von Substrat **162**; B-G) Enzymreaktionen mit AmbDH3 oder den erzeugten Mutanten. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324+342$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.5 mg (1567 nmol) Substrat **162** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 5 mM) und 5.0 mg/mL AmbDH3 (WT; B), AmbDH3 16-311 (WT\*; C), V173A (D), V173H (E), V173L (F) und V173Y (G) bei 37 °C und 300 UpM für 14 h durchgeführt.



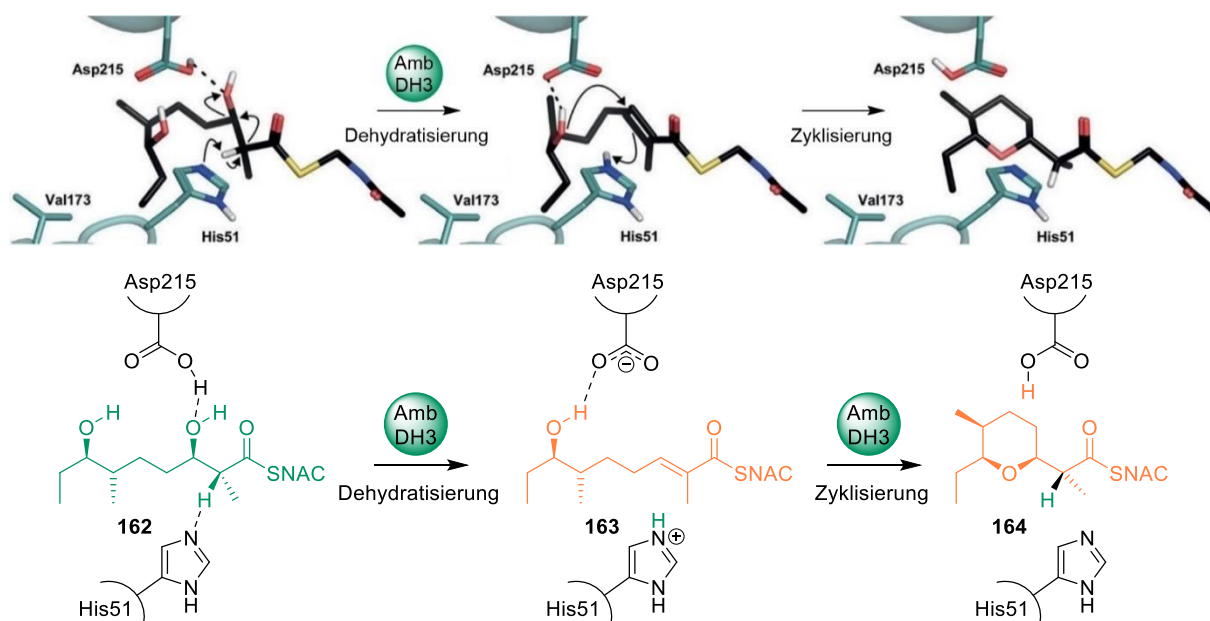
**Abbildung 3-62. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3 und den Mutanten V173A, V173H, V173L und V173Y mit Substrat 163:** A) Referenz von Substrat **163**; B-G) Enzymreaktionen mit AmbDH3 oder den erzeugten Mutanten. Gezeigt sind die gesuchten Massen mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.5 mg (1661 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 5 mM) und 5.0 mg/mL AmbDH3 (WT; B), AmbDH3 16-311 (WT\*; C), V173A (D), V173H (E), V173L (F) und V173Y (G) bei 37 °C und 300 UpM für 14 h durchgeführt.

Die beiden Mutanten V173A und V173L zeigten beinahe vollständigen Umsatz zum zyklisierten Produkt *cis*-**164** sowohl mit dem Vorläufer **162** (Abbildung 3-61D+F), als auch dem Intermediat **163** (Abbildung 3-62D+F). Dagegen ergaben die Reaktionen der Mutanten V173H und V173Y große Mengen des dehydratisierten aber nicht zyklisierten Intermediats **163** (Abbildung 3-61E+G). Eine Zyklisierung fand nur in sehr geringem Maße statt (Abbildung 3-62E+G). Die Mutationen an V173 besitzen offensichtlich einen starken Einfluss auf die katalytische Aktivität der beiden AmbDH3-katalysierten Einzelreaktionen. V173H und V173Y verschieben die Aktivität in Richtung Dehydratisierung, wohingegen Ala, Val und Leu anscheinend mehr Platz, Flexibilität oder Möglichkeiten für hydrophobe Wechselwirkungen liefern. Dadurch wird die Faltung des Rückgrats für die nachfolgende Zyklisierung ermöglicht. Dies konnte ebenfalls durch Modellierungen des Wildtyps und der Mutante V173Y mit den Substraten **162** und **163** bestätigt werden (Abbildung 3-63 und Abbildung 3-64).



**Abbildung 3-63. Modellierungen des Vorläufers **162** und des Intermediats **163** in das aktive Zentrum des AmbDH3 Wildtyps (A+B) und der V173Y Mutante (C+D) nach SUNG *et al.*<sup>[44]</sup>** Die gebogene Konformation beider Liganden im Wildtyp wird wahrscheinlich durch das Fehlen von Zusammenstößen, die in V173Y vorhanden sind sowie durch hydrophobe Wechselwirkungen von V173 mit dem Et-Rest des aliphatischen Rückgrats ermöglicht.





**Abbildung 3-64. Postulierter Mechanismus der dualen Aktivität von AmbDH3 mit Substrat 162 nach SUNG *et al.*<sup>[44]</sup>.** H51 und D215 bilden die katalytische Diade. Die Anwesenheit von V173 ermöglicht die notwendige Rückgratumlagerung während der Zyklisierung zum Pyran *cis*-164.

Sequenzvergleiche und Strukturüberlagerungen von AmbDH3 mit mf-DH- und PS-Domänen sollten andere Domänen identifizieren, die das charakteristische Valin an gleicher Stelle tragen und daher als mögliche Zyklasekandidaten in Frage kommen. Durch diese Arbeiten kam die im vorherigen Modul der Amb-PKS auftretende Dehydratasedomäne AmbDH2 als unerwartete Zyklasekandidaten hinzu (Abbildung 3-65). Zusätzlich zeigte sich durch Enzymreaktionen mit AmbMod4, dem kompletten Modul 4 der Ambruticin-PKS, eine unerwartete Zyklase-Aktivität. Aus diesem Grund kam AmbDH4, die Dehydratase aus Modul 4, als zusätzlicher Zyklase-Kandidat hinzu.

<b>AmbDH3</b>	MEAPRGRAGLESGLLAVKHPWLSAAVRLADRDGYVLSGRLSTVEHAWVLDHVVVLGTVIL	60
<b>AmbDH2</b>	MQAPRPRPSLEGVGLTAANHPWLGAAVRLADRDGYVLSGRLSTSDHPWVLDHVVVLGTALL	60
<b>AmbDH4</b>	MQAPRPRPSLEGVGLTAANHPWLGAAVRLADRDGYVLSGRLSTLDHPWVLDHVVAGTVIL	60
	*:*** * .** . ** *.:***.***** :* ***** **.:*	
<b>AmbDH3</b>	PDGAHDAPWTAHARGVGLGAAPAAATTAWAAGAWPPAGAEPVDVT---RWVEALDAWVGPA	177
<b>AmbDH2</b>	PDGAADAPWTAHARGVGLGAASDRDAAWAQQAWPPGAVPVDVT---QWLEIVDAWVGPA	177
<b>AmbDH4</b>	PDAASEAEWTQHATGVLSAQAAAGADVADLSVWPPGAEVVALDGGYAWLAAQGYGPA	180
	**.* :* ** * **.* : . . .*** ** * : * : . ***	
<b>AmbDH3</b>	PMPFAWSDVVALEARGAAALRRARVEVEDASDGDQLAASIELADAQQPVARAGTFRARWAT	297
<b>AmbDH2</b>	VVPFAWSDVVALEARGTAALRVRAEVEAGGDGDAITASIQLADGQGRPVARV GALQMRWTT	297
<b>AmbDH4</b>	LLAFAFSDVVI EARGAAEVRVRLNKQAGDDGEGLTAS IHLADAQQRPVARV GAFQARATT	300
	: **:**.***:* :*. * : : .*** : :***.***.***:***.***.: : * :*	

**Abbildung 3-65. Ausschnitt des Sequenzalignments von AmbDH3, AmbDH2 und AmbDH4.** „\*“ steht für identische Aminosäuren, „:“ für ähnliche Aminosäuren und „.“ für unterschiedliche Aminosäuren. In **grau** sind die beiden an der Dehydratisierung beteiligten Aminosäuren H51 und D215 hervorgehoben. Die **grün** markierte Aminosäure stellt die an der Zyklisierung beteiligte Aminosäure an Position 173 dar (Val bei AmbDH2 und AmbDH3, Tyr bei AmbDH4).

AmbDH2 besitzt an Position 173 ebenfalls das für die Rückgratumlagerung des Substrates und damit Zyklisierung notwendige V173. In AmbDH4 ist hingegen an dieser Stelle ein Tyrosin vorhanden und spricht vorerst gegen eine Zyklase-Aktivität dieses Enzyms. Die beiden Dehydratasen sind in der Biosynthese nicht in der Lage Heterozyklen zu bilden, was allerdings an dem zu kurzen bzw. bereits zyklisierten Substrat liegt. Die Untersuchungen bezüglich einer möglichen Zyklaseaktivität der beiden Enzyme sind in Abschnitt 3.4.1 dargestellt.



### 3.4. Enzymaktivitätstests mit löslichem Protein

Einige weitere IMOMA-Zyklasen wurden bereits in verschiedenen Biosynthesewegen basierend auf Genclusteranalysen vorhergesagt. Daraus ergeben sich neben den Dehydratasen AmbDH2, AmbDH3 und AmbDH4 noch zusätzliche Zyklase-Kandidaten, die im Folgenden näher untersucht werden sollen. Diese weiteren Zyklasen sollten ebenfalls bezüglich Substrattoleranz und Stereoselektivität analysiert werden. Die Durchführung der Enzymreaktionen wurden analog zu denen von AmbDH3 (siehe Abschnitt 6.2.2.8) durchgeführt. Eine Zusammenstellung aller getesteten Substrate aus den folgenden Abschnitten befindet sich im Anhang in Abbildung 8-1. Die jeweiligen resultierenden Produkte nach Enzymkatalyse befinden sich ebenfalls im Anhang in Abbildung 8-2.

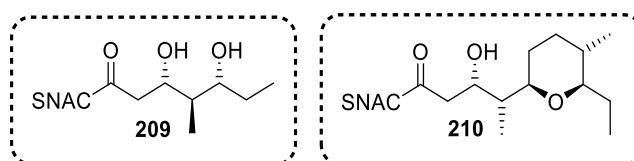
#### 3.4.1. AmbDH2 und AmbDH4

Die Domäne AmbDH2 aus dem Modul 2 der Ambruticin-PKS katalysiert im natürlichen Kontext keine Zyklisierungsreaktion. Dies lässt sich auf das zu kurze biosynthetische Substrat zurückführen. In Modul 4 der Ambruticin-PKS zeigt sich eine weitere Dehydratase, AmbDH4. Ein Sequenzvergleich der beiden Dehydratasen mit AmbDH3 (Abbildung 3-66) zeigt, dass diese einige Ähnlichkeiten besitzen (ca. 80% Sequenzidentität).

<b>AmbDH4</b>	MQAPRRPRSLEGVGLTAANHPWLGAAVRLADRDGYVLSGRLSTLDHPWVLDHVVAGTVIL	60
<b>AmbDH2</b>	MQAPRRPRSLEGVGLTAANHPWLGAAVRLADRDGYVLSGRLSTSDHPWVLDHVVLTALL	60
<b>AmbDH3</b>	MEAPRGRAGLESGGLLAVKHPWLSAAVRLADRDGYVLSGRLSTVEHAWVLDHVVLTGVIL	60
	*:*** * .** . ** *.:****.*****.***** :* ***** **.:*	
<b>AmbDH4</b>	PGTAFVDLAWAAAEEVVGAAVSEVFTTTPVLVPPRSVVELQVRIGEPDASGRRTFAAYS	120
<b>AmbDH2</b>	PGTGFVELAWAAAEEAVGLSGVSELAIEAPLALPARGAVALQVAIEAPDPAGRRGIAIYSR	120
<b>AmbDH3</b>	PGTAFVELALAAADAVGLPSVSELTIEAPLALPARGAVTLQVTVEALDATGRRGFVHRSR	120
	***.***:*** **:.** .***:..: :**.* *..* *** : * :*** :* :***	
<b>AmbDH4</b>	PDAASEAEWTQHATGVLSAQAAAGADVADLSVWPPGAEVVALDGGYAWLAAQGYGNGGPA	180
<b>AmbDH2</b>	PDGAADAPWTAHARGVGLGAAASDRDAAWAQGAWPPGAVPVDVT---QWLEIVDAWNGGPA	177
<b>AmbDH3</b>	PDGAHDAPWTAHARGVGLGAAAPAAATTAWAAGAWPPAGAEPVDVT---RWVEALDAWNGGPA	177
	**.* : * ** * * **.* : . . . ** * * * : * : . ***	
<b>AmbDH4</b>	FQALREVVRAGTTLYARVALPDAVADTAQSFGIHPALLDAVLHSLARSPPQEEASDDDKV	240
<b>AmbDH2</b>	FRGVVALWRVGRTIYADVALPDGVAGTAQDFGLHPALLDVALRAFLRAELSADPSPREGT	237
<b>AmbDH3</b>	FRGVTAARVGRSIYADLALPEGVSERAQDFGLHPALLDAALQALLRAELGAGSSPREGI	237
	*.:. : **.* :.*** :***.:* : **.*.*****.***.:* : *	
<b>AmbDH4</b>	LLAFAFSDVVEARGAAEVRVRLNKQAGDDGEGLTASIHLDADAQGRPVARVGFARATT	300
<b>AmbDH2</b>	VVPFAWSDVALEARGTAALRVRAEVEAGDGDITASIQADGQGRPVARVGFALQMRWTT	297
<b>AmbDH3</b>	PMPFAWSDVALEARGAAALRRVEVEDASDGDQLAASIELADAQGPVARAGTFRRARWAT	297
	: **.:***.:****:* :*. * : : ..**.: :****.***.*:****.*.:* : *	
<b>AmbDH4</b>	TERVRALA--GASERD	314
<b>AmbDH2</b>	AERVRAAAAAGAAERD	313
<b>AmbDH3</b>	AEHVRKAAA--GASERD	312
	*:*** * **.:***	

**Abbildung 3-66. Sequenzalignment von AmbDH2, AmbDH3 und AmbDH4.** „\*“ steht für identische Aminosäuren, „.“ für ähnliche Aminosäuren und „-“ für unterschiedliche Aminosäuren. Die eingerahmte Aminosäure stellt die an der Zyklisierung beteiligte Aminosäure an Position 173 dar (Val bei AmbDH2 und AmbDH3, Tyr bei AmbDH4). Die katalytisch aktiven Aminosäuren H51, V/Y173 und D215 sind grün hervorgehoben.

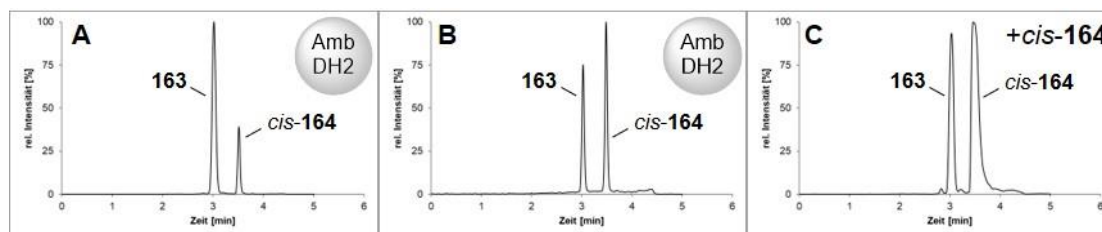
Die Sequenzvergleiche zeigen, dass AmbDH2 eine zu AmbDH3 analoge Tyr-Val-Mutation im aktiven Zentrum aufweist und daher auch ein möglicher Zyklasekandidat sein könnte. Eine Ringbildung ist innerhalb der Biosynthese aufgrund von fehlenden Molekülstrukturen im Modul 2 nicht möglich. Die beiden Dehydratasen AmbDH2 und AmbDH4 sind aufgrund eines zu kleinen bzw. bereits zyklischen Substrates in der Biosynthese nicht in der Lage eine solche Zyklisierungsreaktion zu katalysieren, weshalb sich dies nicht in der Naturstoff-Biosynthese widerspiegelt (Abbildung 3-67). Deshalb sollte die AmbDH2- und AmbDH4-katalysierte Zyklisierung mit anderen Modellsubstraten erfolgen (Abschnitt 3.4.1.1 und 3.4.1.2).



**Abbildung 3-67. Biosyntheseintermediate 209 und 210 von AmbDH2 und AmbDH4.** Diese Intermediate entsprechen den natürlichen Vorläufern aus den Biosynthesen. Im Falle von AmbDH2 kann in der Biosynthese keine Zyklisierung auftreten, da das entsprechende Substrat zu kurz ist und im Falle von AmbDH4 enthält das Substrat bereits den durch AmbDH3 gebildeten Heterozyklus.

### 3.4.1.1. AmbDH2

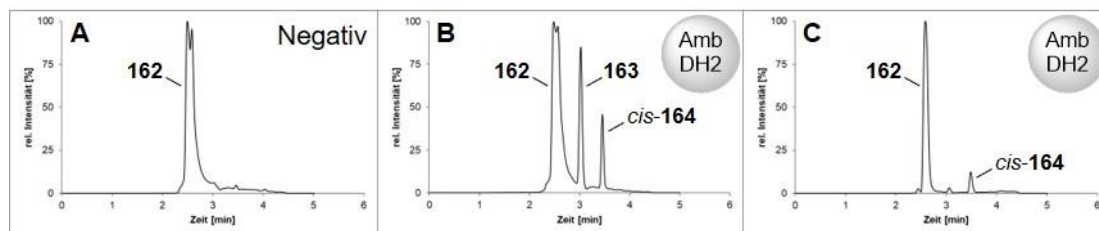
Nach Erstellung des Expressionsplasmids pET28a(+)<sub>ambDH2</sub> (Abschnitt 3.1.2.1.1) war es möglich das Enzym löslich herzustellen und zu reinigen (Abschnitt 3.1.2.1.2). Enzymreaktionen von AmbDH2 mit Substrat **163** zeigten einen anfänglichen Zyklisierungsumsatz von 15% (Abbildung 3-68A). Durch Erhöhung der Enzymkonzentration konnte dieser auf 47% angehoben werden (Abbildung 3-68B). Die Zugabe des AmbDH3-Produkts *cis*-**164** zeigte eine Comigration mit dem entstandenen Produkt von AmbDH2, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um die gleiche Verbindung *cis*-**164** handelt (Abbildung 3-68C).<sup>[44]</sup>



**Abbildung 3-68. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH2 mit Substrat 163:** A+B) Enzymreaktionen von AmbDH2 mit Substrat **163**; C) Nach Zugabe von AmbDH3-Produkt *cis*-**164**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2.1 mM) und 1.7 mg/mL (A) bzw. 3.4 mg/mL (B) His<sub>6</sub>-AmbDH2 bei 37 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Die durchgeführten Enzymreaktionen von AmbDH2 mit dem hydratisierten Substrat **162** zeigten, dass dieses in der Lage ist sowohl als Dehydratase und Zyklase zu agieren

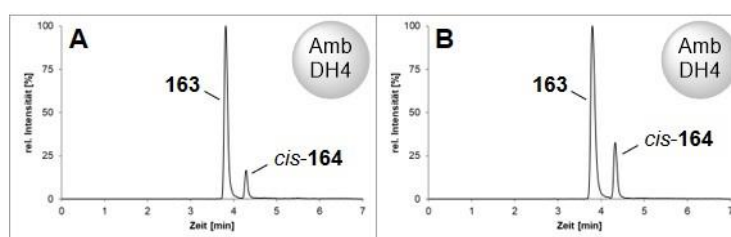
(Abbildung 3-69). Eine Umsatzbestimmung war aufgrund der zu hohen Signalintensität von Verbindung **163** nicht möglich. Dennoch sind die beiden Signale für die dehydratisierten und zyklisierten Produkte **163** und *cis*-**164** deutlich erkennbar (Abbildung 3-69B).



**Abbildung 3-69. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH2 mit Substrat 162:** A) Negativkontrolle von Substrat **162**; B+C) Enzymreaktionen von AmbDH2 mit Substrat **162**. Gezeigt sind die gesuchte Masse mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324+342$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (313 nmol) Substrat **162** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 1.6 mM) und 1.7 mg/mL (B) bzw. 3.4 mg/mL (C) AmbDH2 bei 37 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

### 3.4.1.2. AmbDH4

In vorhergehenden Arbeiten von BERKHAN *et al.*<sup>[60]</sup> konnte gezeigt werden, dass es sich bei AmbDH4 um eine trifunktionale Domäne handelt, die in der Biosynthese als Dehydratase, Epimerase und Enoylisomerase fungiert (siehe Abschnitt 1.3.1; Abbildung 1-19). Um zu überprüfen, ob dieses Enzym noch eine zusätzliche vierte Funktion als Zyklase besitzt wurde die rekombinante Domäne produziert und isoliert. Die Genexpression erfolgte ausgehend von *E. coli* BL21 und Tuner pET28a(+)<sub>ambDH4</sub> (Abschnitt 3.1.2.2.2.1). Anfängliche Enzymreaktionen von AmbDH4 mit Substrat **163** zeigten einen Umsatz zu zyklisiertem Produkt von 9% (Abbildung 3-70A).



**Abbildung 3-70. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (A) bzw. HEPES-Glycerin-Puffer (B) (Startkonzentration 2 mM) und 3.5 mg/mL (A) bzw. 17.4 mg/mL (B) AmbDH4 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Um den Umsatz der AmbDH4-katalysierten Zyklisierungsreaktion zu steigern wurde versucht das Enzym in einer höheren Konzentration als 3.5 mg/mL in die Reaktion einzusetzen. Die Versuche das Protein in HEPES-Puffer löslich zu erhalten verliefen jedoch nicht erfolgreich, da das Protein ab einer Konzentration von 5.0 mg/mL aggregierte. Ein Umpuffern und Konzentrieren in HEPES-Puffer mit 10v% Glycerin lieferte eine höhere Proteinkonzentration

von 17.4 mg/mL. Nach Enzymreaktionen zeigte sich ein gesteigerter Umsatz von 15% (Abbildung 3-70C). Die UPLC-MS-Analyse der *in vitro*-Reaktion mit AmbDH4-Zellysats (Abbildung 8-40) zeigte keine Zyklisierung von Substrat **163**, was sich möglicherweise auf die zu geringe AmbDH4-Konzentration im Zellysats zurückführen lässt. AmbDH4 besitzt somit eine Zyklaseaktivität zusätzlich zur Dehydratase-, Epimerase- und Enoylisomerase-Aktivität, die jedoch nur mit isoliertem Enzym nachgewiesen werden konnte.

Die Mutanten AmbDH4 Y173A und Y173V wurden ebenfalls auf eine mögliche Zyklisierung mit Substrat **163** untersucht, um die Auswirkungen der Mutationen an Position 173 zu testen. Nach der Reaktion mit dem gereinigten Enzym als auch dem Lysats konnte das Produkt *cis*-**164** jedoch in keinem der UPLC-MS-Chromatogramme nachgewiesen werden (Abbildung 8-41).

Die Struktur des aktiven Zentrums von AmbDH4 wurde bisher nicht aufgeklärt, wodurch die Positionierung der Aminosäure 173 dort noch nicht eindeutig geklärt ist. Um den Mechanismus der Zyklisierung und die Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum von AmbDH4 eindeutig aufzuklären, wäre eine Strukturaufklärung durch Kristallisation notwendig.

Eine Zyklisierungsaktivität von AmbDH4 wurde anfangs nicht erwartet, da an Position 173 in AmbDH4 ein Tyrosin konserviert vorliegt, wohingegen in der verwandten bifunktionellen Dehydratase/Zyklase AmbDH3 ein Valin vorliegt. In vorhergehenden Arbeiten (siehe Abschnitt 3.3.9) konnte gezeigt werden, dass bei der erzeugten Mutante AmbDH3 V173Y der freie Platz im aktiven Zentrum durch das Tyrosin so stark minimiert wird, sodass die Rückgratumlagerung des Substrates und damit Zyklisierung weniger effektiv stattfinden kann.<sup>[44]</sup> Der Position 173 wird eine wichtige Funktion bei der Zyklisierung zugeschrieben, jedoch scheint diese nicht die einzig relevante Position in AmbDH4 zu sein. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Veränderung einer Base der Primärstruktur der Proteine eine Veränderung der stabilisierenden Wechselwirkungen mit sich bringt. Durch Minimierung der ausgebildeten Wechselwirkungen, wie beispielsweise H-Brückenbindungen, VAN-DER-WAALS- oder ionischen Wechselwirkungen kann die Stabilität der mutierten Proteine enorm gesenkt werden. Dies kann eine Proteinaggregation bei geringeren Konzentrationen nach sich ziehen, wodurch die Proteinkonzentration zu gering ist, um eine nachweisbare Zyklisierung katalysieren zu können.

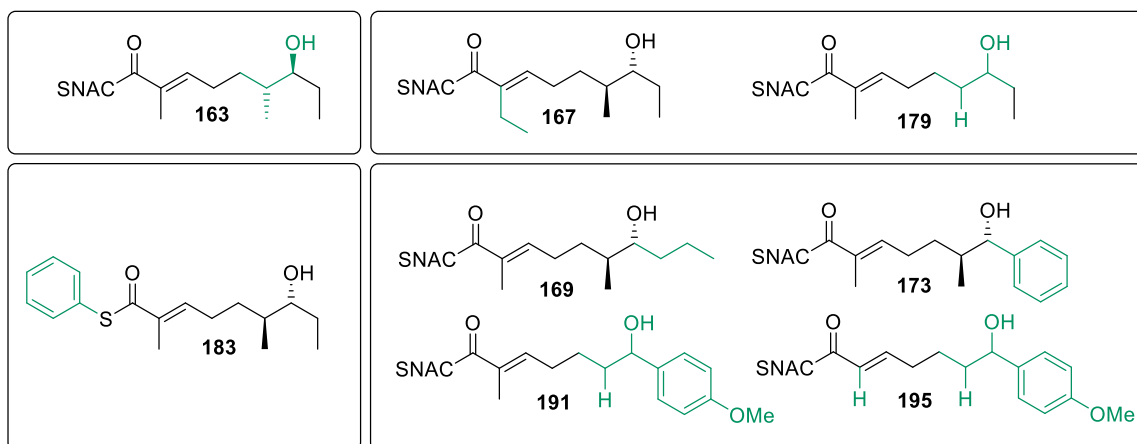
### 3.4.1.2.1. *In vivo*-Reaktion

Die *in vivo*-Reaktion mit *ambDH4*-exprimierenden Zellen wurde unter den gleichen Bedingungen wie für AmbDH3 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.7). Mit den gewählten Bedingungen konnten für die *in vivo*-Reaktionen von AmbDH4 kein Umsatz zu zyklisiertem

Produkt *cis*-**164** erreicht werden (Abbildung 8-42). Wie bereits für die *in vitro*-Reaktionen mit Zelllysat beschrieben, könnte die AmbDH4-Konzentration generell zu niedrig gewesen sein, sodass keine Umsetzung zu beobachten war. Da eine *in vivo*-Reaktion von *ambDH3*-exprimierenden Zellen mit Substrat **163** bereits erfolgreich durchgeführt werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.7), kann ausgeschlossen werden, dass das Substrat **163** nicht in die Zellen aufgenommen wurde.

#### 3.4.1.2.2. Untersuchung der Substrattoleranz

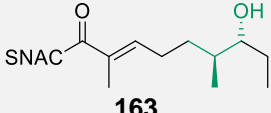
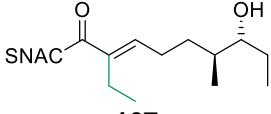
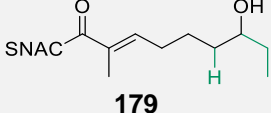
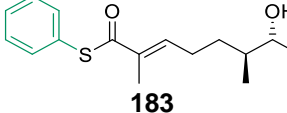
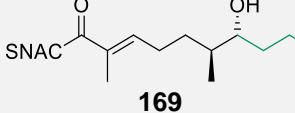
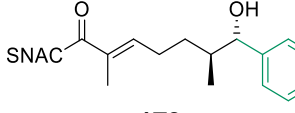
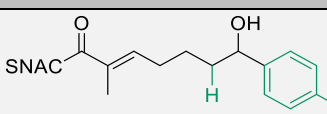
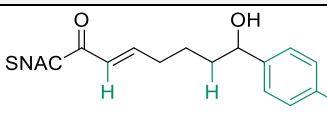
AmbDH4 und dessen Mutanten sollten mit verschiedenen Substraten auf deren Zyklisierungsaktivität getestet werden. Die leicht modifizierten Substrate können in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 3-71). Substrat **183** besitzt anstatt des SNAC-Restes, welcher die Bindung an das ACP imitiert, einen Thiophenyl-Rest, wohingegen bei Substrat **167** und **179** die Reste an C-2 bzw. C-6 modifiziert wurden. Die Substrate **169**, **173**, **191** und **195** weisen eine Modifikation an Position C-7 zu größeren Resten auf, wobei die Substrate **191** und **195** als racemisches Gemisch vorliegen.



**Abbildung 3-71. Strukturen der Substrate, die mit AmbDH4 auf eine mögliche Zyklisierung getestet wurden.** Die Kästen unterteilen die Substrate in unterschiedliche Gruppen entsprechend ihrer Struktur. Die Werte können Tabelle 3-7 (S. 117) entnommen werden.

Die UPLC-MS-Chromatogramme aller Enzymreaktionen von AmbDH4 sind in Abbildung 8-43 bis Abbildung 8-49 dargestellt. In Tabelle 3-7 sind die jeweiligen Umsatzwerte zusammengefasst. In einigen Fällen wurde die Enzymreaktion mit AmbDH4 und dessen Mutanten durchgeführt, welche sowohl aus *E. coli* BL21 als auch *E. coli* Tuner isoliert wurden. In den Enzymreaktionen unterscheiden sich die verwendeten Proteinkonzentrationen teilweise und liegen größtenteils in einem Bereich von 0,7–4,6 mg/mL.

Tabelle 3-7. Zusammenfassung der Umsätze durch enzymkatalysierte Reaktionen von verschiedenen Substraten mit AmbDH4 oder dessen Mutanten.

Eintrag	Substrat	Umsatz [%]		
		AmbDH4	Y173A	Y173V
1	 <b>163</b>	9; 15 [3.5; 17.4 mg/mL]	0 [0.7; 1.1; 1.9 mg/mL]	0 [1.0 mg/mL]
2	 <b>167</b>	7 [1.9; 3.5 mg/mL]	7 [0.9 mg/mL]	0 [2.0 mg/mL]
3	 <b>179</b>	0 [4.6 mg/mL]	0 [0.7; 1.4 mg/mL]	0 [1.0; 2.0 mg/mL]
4	 <b>183</b>	44 [1.9 mg/mL]	0 [1.4 mg/mL]	15 [1.0 mg/mL]
5	 <b>169</b>	0 [3.5; 4.6 mg/mL]	0 [0.7; 1.4 mg/mL]	0 [2.0 mg/mL]
6	 <b>173</b>	7; 24 [1.9; 3.5 mg/mL]	6; 26 [0.9; 0.7 mg/mL]	0 [1.0 mg/mL]
7	 <b>191</b>	0 [3.5 mg/mL]	0 [0.9 mg/mL]	0 [2.0 mg/mL]
8	 <b>195</b>	25; 31 [0.7; 1.4 mg/mL]	42 [0.9 mg/mL]	0 [2.0 mg/mL]

Grün hervorgehoben sind die Zellen, die einen Umsatzwert größer 5% enthalten. In Klammern ist die Proteinkonzentration angegeben mit der die Enzymreaktion durchgeführt wurde. Die Enzymreaktionen wurden in einem Maßstab von 0.1 mg bei einer Substratkonzentrationen von 2 mM durchgeführt. Bei den racemisch vorliegenden Substraten **179**, **191** und **195** wurde nicht zwischen möglicherweise entstandenen Stereoisomeren unterschieden. Bei den Umsatzwerten für Substrat **195** lagen im Edukt bereits geringe Mengen Produkt vor, weshalb die Umsatzwerte um den Wert von 14% korrigiert wurden.

Aus den Enzymreaktionen mit AmbDH4 kann aufgrund der variierenden Enzymkonzentration keine quantitative Aussage getroffen werden. Es kann jedoch festgehalten werden, ob eine Zyklisierung des jeweiligen Substrates durch AmbDH4 oder eine der beiden Mutanten stattfand. Die Inkubation von AmbDH4 mit Substrat **167** lieferte einen Umsatz von 7% (Abbildung 8-43). Die Modifikation des Substrats an C-2 zeigte für die Mutante Y173A einen

Umsatz von 7%, während für die Y-V-Mutation keine Zyklaseaktivität nach Inkubation der Mutante mit Substrat **167** nachweisbar war.

In den Enzymreaktionen von Substrat **179** mit AmbDH4 und dessen Mutanten konnten in keinem der Fälle eine Zyklisierung festgestellt werden (Abbildung 8-46). Die Methylgruppe an C-6 scheint essentiell zu sein damit die nötigen Wechselwirkungen ausgebildet werden und eine Zyklisierung stattfinden kann.

Der Phenyl-Rest in Substrat **183** führte zu einer deutlichen Steigerung der Zyklaseaktivität des Wildtyps auf 44% (Abbildung 8-47). Die Phenylgruppe scheint die Anlagerung des Substrats in das aktive Zentrum zu erlauben, sodass die Wechselwirkungen im aktiven Zentrum ausgebildet werden können. Für die Mutante Y173V konnte ebenfalls eine Zyklaseaktivität von 15% nachgewiesen werden.

Die Verwendung der Substrate **169** und **173** mit einer Propyl- bzw. Phenylgruppe an C-7 liefern direkte Rückschlüsse über den Einfluss größerer Substituenten auf die Zyklisierungsaktivität. Eine Propylgruppe an C-7 wie in **169** führte zu keinerlei Zyklaseaktivität von AmbDH4 oder den beiden Mutanten (Abbildung 8-44). Die Umsetzung von Substrat **173** mit dem isolierten Wildtyp-Protein aus *E. coli* BL21 ergab einen Umsatz von 24% (Abbildung 8-45). Auch für AmbDH4 Y173A konnte ein Umsatz von maximal 26% bestimmt werden. Ein zyklischer bzw. raumausfüllenderer Rest scheint für die Zyklaseaktivität von AmbDH4 vorteilhaft zu sein.

Die Substrate **191** und **195** weisen eine Modifikation an C-7 zu einer voluminöseren *para*-Methoxyphenylgruppe auf. Die Verbindungen unterscheiden sich untereinander zudem durch Änderungen an C-2 und besitzen keine Methylgruppe an C-6. Für die Umsetzung von Substrat **191** mit AmbDH4 und dessen Mutanten konnte keine Zyklaseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 8-48). Substrat **195** hingegen wurde von AmbDH4 mit maximal 31% und von Y173A mit 42% zyklisiert (Abbildung 8-49). Trotz fehlender Methylgruppe an C-6, wie auch schon bei Substrat **179**, kann eine gesteigerte Zyklaseaktivität der beiden Enzyme beobachtet werden. Der Einfluss der Methylgruppe auf die Aktivität der Proteine müsste durch Umsetzungen mit weiteren Substraten genauer beleuchtet werden.

Die Enzymreaktionen mit AmbDH4 und dessen Mutanten lieferten somit einige grundlegende Erkenntnisse. Generell stellte sich heraus, dass die beiden Mutationen einen destabilisierenden Effekt auf das Enzym besitzen. Eine Zyklisierung der Substrate konnte nur in sehr geringem Maß erreicht werden. V173 scheint also nicht die einzige Position zu sein, die für die Zyklisierung diagnostisch ist, sondern vielmehr ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Hier sind tiefgreifendere Analysen notwendig, um konkrete Aussagen über die Substrattoleranz von AmbDH4 und dessen Mutanten treffen zu können. Dennoch scheinen AmbDH4 und die

erzeugten Mutanten eine Tendenz zu Substraten mit größeren Substituenten an C-2 oder C-7 zu besitzen. Voluminösere Reste an dieser Position verbesserten die Zyklaseaktivität bei Verwendung der meisten Enzyme. Die Verlängerung der linearen Kette an C-7 führt zu keiner Erhöhung der Zyklaseaktivität. Es wird vermutet, dass sich die Substrate durch den zyklischen Rest effektiver im aktiven Zentrum anlagern können, da das natürliche Substrat von AmbDH4 bereits einen Heterozyklus enthält und für diesen durch natürliche Evolution Platz im aktiven Zentrum geschaffen wurde. Eine stabilere Anlagerung in das aktive Zentrum kann die Ausbildung der notwendigen Wechselwirkungen zwischen H51 und D215 des aktiven Zentrums und dem Substrat erhöhen.

Es besteht weiterhin die Vermutung, dass die Zyklisierungsaktivität nicht nur von einer Position abhängt.<sup>[44]</sup> Für AmbDH4 konnte keine Steigerung der Zyklaseaktivität durch die erzeugten Mutationen hervorgerufen werden. Ob die Struktur des aktiven Zentrums hierfür sorgt oder die Stabilität der Mutanten zu gering ist, bleibt noch ungeklärt. Aufgrund höherer Zyklisierungsumsätze bei höheren Enzymkonzentrationen besteht die Vermutung, dass hier auch die Proteinkonzentration eine starke Auswirkung auf den Umsatz besitzt.

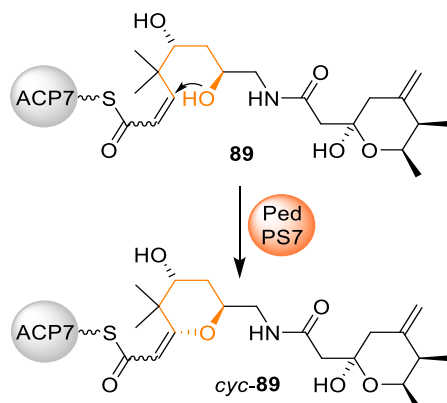
### 3.4.2. PedPS7 und SorPS8

Neben den Dehydratase aus der Ambruticin-Biosynthese sollten weitere Zyklastasen biochemisch charakterisiert und bezüglich ihrer synthetisch relevanten Eigenschaften, wie Stereoselektivität und Substrattoleranz untersucht werden. Bei diesen handelt es sich um putativ nach einem oxa-MICHAEL-Additionsmechanismus agierende Enzyme aus verschiedenen Biosynthesewegen, welche verschiedene Ringgrößen (Fünf- und Sechsringe) und Produktkonfigurationen abdecken. Die Zyklastasen werden im Folgenden in verschiedenen Gruppen entsprechend ihrer Homologie eingeteilt und auf deren Aktivitätstests eingegangen. Die beiden mf-PKS-Domänen **PedPS7** und **SorPS8** sind Pyransynthasen aus *trans*-AT PKS-Systemen. In den Biosynthesen der Naturstoffe Pederin (**64**) und Sorangicin (**65**) führen die beiden Enzyme zu einer Bildung eines *trans*-konfigurierten Pyranrings. Nach Genexpression in *E. coli* BL21, Zellaufschluss und Reinigung *via* Ni-NTA-AC konnten PedPS7 und SorPS8 in ausreichender Reinheit erhalten werden (siehe Abschnitt 3.1.3).



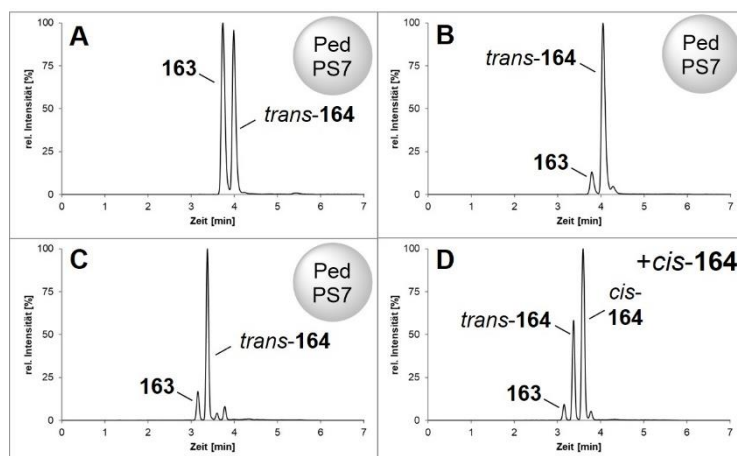
### 3.4.2.1. PedPS7

Die Pyransynthese **PedPS7** katalysiert in der Biosynthese von Pederin (**64**) die Bildung des 3*L*,7*D*-*trans*-Pyranrings (Abbildung 3-72).



**Abbildung 3-72.** PedPS7-katalysierte Zyklisierung des Pyranrings im Westfragment während der Pederin (**64**)-Biosynthese nach PIEL *et al.*<sup>[71]</sup>. PedPS7 sowie der durch PedPS7 gebildete Pyranring sind orange hervorgehoben.

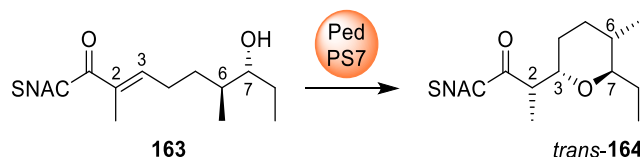
Für PedPS7 konnte in Enzymaktivitätstests eine Aktivität an Substrat **163** gezeigt werden. Es zeigte sich ein maximaler Zyklisierungsumsatz mit gereinigtem Enzym von 84% im analytischen Maßstab (0.1 mg) sowie 79% im semipräparativen Maßstab (5.0 mg) (Abbildung 3-73B+C). Die Umsetzung mit Lysat zeigte einen geringen Umsatz von 38% vermutlich aufgrund der geringeren Enzymmenge.



**Abbildung 3-73.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **163**: **A-C**) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **163**; **D**) nach Zugabe des AmbDH3-Produkts *cis*-**164**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (**A+B**) bzw. 5.0 mg (**C**) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (**A**) bzw. 4 mM (**B+C**)) und Lysat (**A**) oder 10.0 mg/mL (**B**) bzw. 5.0 mg/mL (**C**) His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

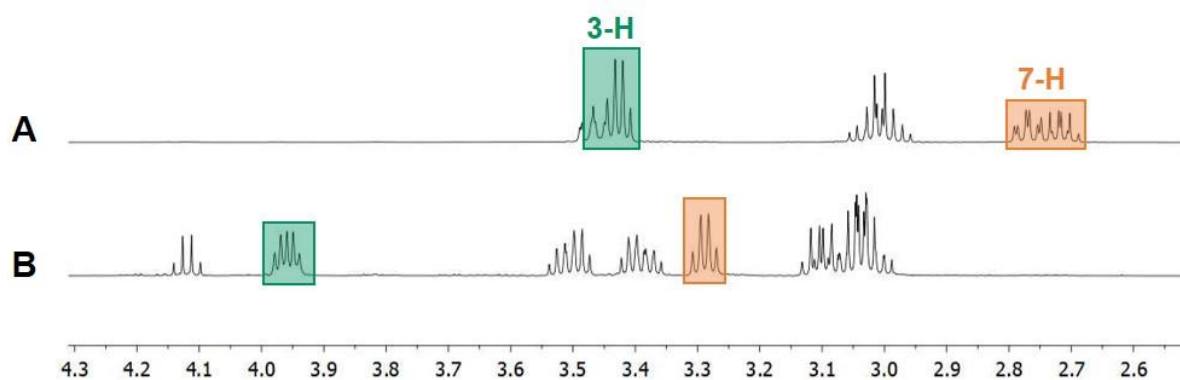
Die Retentionszeit bei der UPLC-MS-Analyse legt nahe, dass im Produkt eine andere Konfiguration der gebildeten Stereozentren vorliegt als im Fall der AmbDH3-katalysierten Umsetzung (Abbildung 3-73A). Um einen ersten Anhaltspunkt der Konfiguration des

entstandenen Produkts zu bekommen, wurde das strukturell ähnliche AmbDH3-Produkt *cis*-**164** zur UPLC-MS-Probe gegeben (Abbildung 3-73D). Das neue entstandene Signal deutet darauf hin, dass die beiden Produkte nicht dieselbe Konfiguration besitzen (Abbildung 3-74). Interessanterweise scheint sich die zu erwartende unterschiedliche Stereoselektivität der beiden Enzyme hier zu zeigen.



**Abbildung 3-74.** PedPS7-katalysierte Zyklisierung von Substrat **163**. Dabei bildet PedPS7 den *trans*-Pyranring *trans*-**164**.

Die Stereokonfiguration des entstandenen zyklischen Produkts sollte *via* NMR-Spektroskopie eindeutig bestätigt werden. Hierfür wurden verbliebenes Edukt und Produkt per Flash-chromatographie auf Silicagel mit EtOAc voneinander getrennt und das Produkt *via* NMR-Spektroskopie analysiert. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des PedPS7-Produkts konnten die Signale bei 3.96 ppm dem Proton an C-3 und bei 3.29 ppm dem Proton an C-7 zugeordnet werden (Abbildung 3-75).



**Abbildung 3-75.** Ausschnitte aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren der Produkte *cis*-**164** (A) bzw. *trans*-**164** (B) der Enzymreaktionen von AmbDH3 (A) bzw. PedPS7 (B) mit Substrat **163**. Die Aufnahmen erfolgten bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Die kompletten Spektren sind in Abbildung 8-220 und Abbildung 8-203 dargestellt. Die Signale für die Protonen an C-3 und C-7 sind durch einen grünen bzw. orangen Kasten hervorgehoben. Es zeigt sich die 2,6-*cis*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 3.45$  und  $\delta(7\text{-H}) = 2.77$  ppm bzw. 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 3.96$  und  $\delta(7\text{-H}) = 3.29$  ppm.

Die Konfiguration des entstehenden Produkts an C-6 und C-7 ist bereits durch die Konfiguration des verwendeten Substrates **163** festgelegt. Basierend darauf können Rückschlüsse auf die Konfiguration an C-2 und C-3 getroffen werden. Die chemischen Verschiebungen für 3-H und 7-H sind im Gegensatz zu den Werten für den *cis*-Pyranring stärker tieffeldverschoben (Tabelle 3-8).<sup>[191]</sup> Dabei zeigten sich für 3-H und 7-H in ähnlichen *trans*-THP-Ringen Signale im Bereich von 3.7–3.6 ppm (Zincophorin<sup>[113,192,193]</sup>), 4.2–3.9 ppm

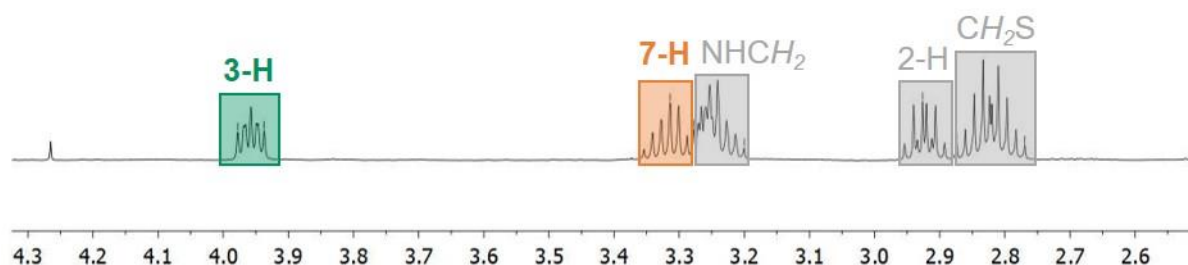
(Salinomycin<sup>[194]</sup>) und 4.0–3.8 ppm (Nigericin<sup>[195]</sup>), im Gegensatz zu 3.5–2.8 ppm (*cis*-Pyranring in *cis*-164).

**Tabelle 3-8.** Übersicht der chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum für 3-H und 7-H in *cis*- und *trans*-konfigurierten Pyranringen.

Eintrag	Produkt der Enzymreaktion	Chemische Verschiebung [ppm]	
		3-H	7-H
1	<i>cis</i> -Pyranring in <i>cis</i> -164 (gebildet von AmbDH3)	3.45	2.77
2	<i>trans</i> -Pyranring in <i>trans</i> -164 (gebildet von PedPS7)	3.96	3.29
3	<i>trans</i> -Pyranring in Zincophorin <sup>[113,192,193]</sup>	4.04	3.74
4	<i>trans</i> -Pyranring in Salinomycin <sup>[194]</sup>	4.09	3.98
5	<i>trans</i> -Pyranring in Nigericin <sup>[195]</sup>	3.87	3.63

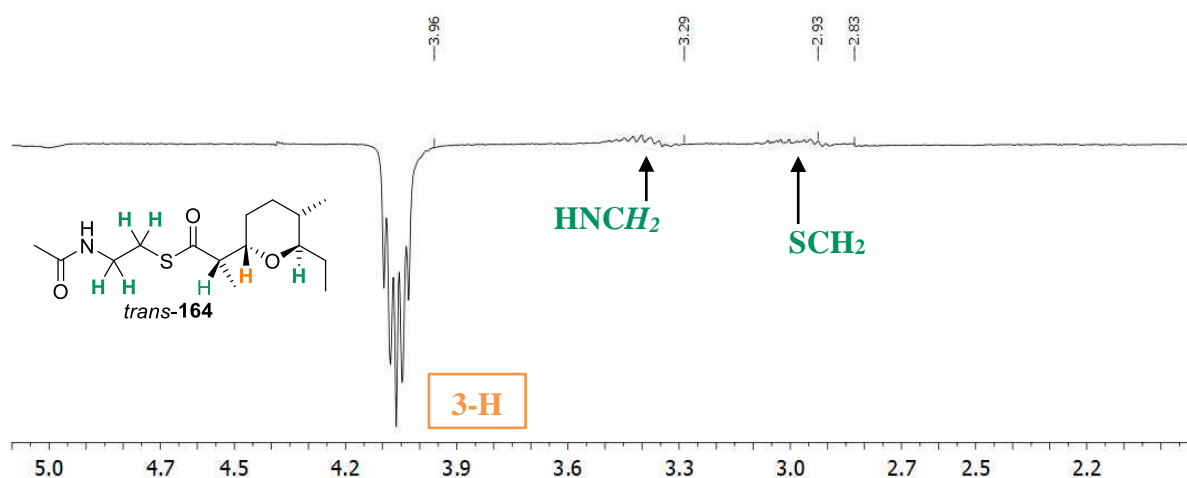
Die Werte für die chemischen Verschiebungen der Produkte von AmbDH3 und PedPS7 stammen aus Abbildung 3-75. Beide NMR-Spektren wurden bei 500 MHz in CDCl<sub>3</sub> aufgenommen. Die Werte für die Verschiebungen der Protonen in den *trans*-Pyranringen von Zincophorin, Salinomycin und Nigericin stammen aus der entsprechenden Literatur.

Eine Analyse *via* 1D-NOE-Spektroskopie dient der eindeutigen Aufklärung der Konfiguration im Pyranring. Beziehungen zwischen den Kernen bestehen über skalare Spin-Spin-Kopplungen, das heißt über Bindungen. Bei einem 1D-NOE-Experiment werden keine Wechselwirkungen von Bindungen sichtbar gemacht. Vielmehr kann auf das Signal eines spezifischen Protons eingestrahlt werden, sodass deren Wechselwirkung zwischen koppelnden Kerndipolen detektiert werden können, die direkt über den Raum übertragen werden. Der Magnetisierungstransfer über den Raum geschieht mittels des sogenannten Kern-Overhauser-Effekts (*Nuclear Overhauser Effect*). Für die nachfolgenden 1D-NOE-Experimente wurde C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> verwendet (Abbildung 3-76).



**Abbildung 3-76.** Ausschnitte aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat 163. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die kompletten Spektren sind in Abbildung 8-204 dargestellt. Die Signale für die Protonen an C-3 und C-7 sind durch einen grünen bzw. orangen Kasten hervorgehoben. Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 3.96$  und  $\delta(7\text{-H}) = 3.31$  ppm. Weitere wichtige Signale sind durch einen grauen Kasten hervorgehoben.

In diesem Fall wurde ein homonukleares  $H,H$ -NOE-Experiment durchgeführt, bei dem Beziehungen von Protonen über den Raum aufgedeckt werden können (Abbildung 3-77).

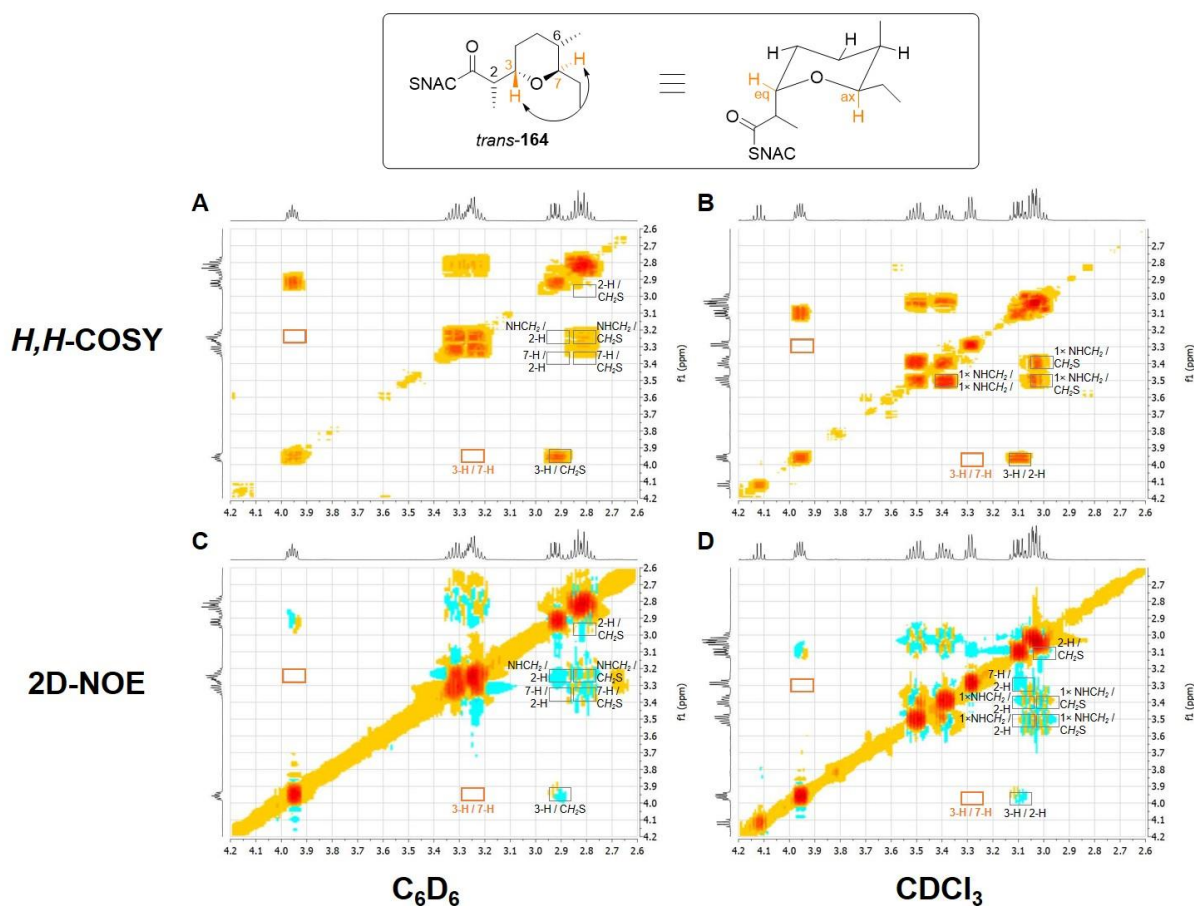


**Abbildung 3-77.** Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 *trans*-164 mit Substrat 163 mit Sättigung bei 3.96 ppm (3-H). Die Aufnahme erfolgte bei 300 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die wichtigen Protonen sind grün markiert. Das Proton, das angeregt wird ist jeweils orange hervorgehoben. Das komplette 1D-NOE-Spektrum ist in Abbildung 8-205 dargestellt. Die weiteren 1D-NOE-Spektren der durchgeführten Experimente befinden sich in Abbildung 8-206 bis Abbildung 8-209.

BERKHAN konnte zeigen, dass eine *cis*-Konfiguration im Pyranring (wie in *cis*-164) im entsprechenden 1D-Spektrum ein Signal bei 3.96 ppm ergibt.<sup>[164]</sup> Nach Einstrahlung auf das Proton an C-3 im PedPS7-gebildeten Produkt resultierte keine Wechselwirkung mit dem Proton an C-7. An dieser Position zeigt sich allerdings nur ein schwaches Signal für die Wechselwirkung von 3-H mit HNCH<sub>2</sub> und nicht mit 7-H (Abbildung 3-77). Das bedeutet, dass 3-H und 7-H zu weit voneinander entfernt liegen, um miteinander zu wechselwirken. Dies ist ein Indiz für das Vorhandensein eines *trans*-konfigurierten Pyranrings.

Zusätzliche 2D-NMR-Experimente, darunter  $H,H$ -COSY und NOESY, sollten zur weiteren Verifizierung durchgeführt und analysiert werden. Die  $H,H$ -COSY-Spektren von *trans*-164 sowie von *cis*-164 zeigten kein Kreuzsignal der beiden Protonen an C-3 und C-7, da diese über mehr als zwei Bindungen voneinander getrennt sind (Abbildung 3-78 sowie Abbildung 8-221A und Abbildung 8-222A). Bei räumlicher Nähe der Protonen an C-3 und C-7 tritt im 2D-NOE-Spektrum ein Kreuzsignal bei 3.30/3.96 ppm auf und deutet damit auf eine *cis*-Konfiguration des Pyranrings (wie im Produkt *cis*-164 von AmbDH3; Abbildung 8-221B und Abbildung 8-222B). Andererseits kann bei Fehlen des entsprechenden Signals davon ausgegangen werden, dass die beiden Protonen nicht in räumlicher Nähe zueinander liegen und somit ein *trans*-konfigurierter Pyranring vorliegt. Im Falle des PedPS7-Produkts zeigt sich in den COSY-Spektren bei 3.30/3.96 ppm kein Signal (Abbildung 3-78A+B). Auch in den entsprechenden 2D-NOE-Spektren fehlt dieses Signal (Abbildung 3-78C+D). Dies bestätigt,

dass PedPS7 die Zyklisierung von Substrat **163** zu *trans*-**164** katalysiert. Entsprechende Analysen mit *cis*-**164** stützen diese Aussage, da hier im COSY-Spektrum kein Signal, im 2D-NOE-Spektrum jedoch eine Wechselwirkung der Protonen an C-3 und C-7 erkennbar ist (Abbildung 8-221 und Abbildung 8-222).



**Abbildung 3-78. Ausschnitt aus den 2D-NOE-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163: A+B) *H,H*-COSY-Spektren; C+D) 2D-NOESY-Spektren. Die Aufnahmen erfolgten bei 500 MHz in  $C_6D_6$  (A+C) bzw.  $CDCl_3$  (B+D). Die kompletten Spektren sind in Abbildung 8-212 bis Abbildung 8-211 dargestellt. Die grauen Kästen beschreiben die vorhandenen Signale in den *H,H*-COSY- und 2D-NOE-Spektren. Der orangene Kasten deutet jeweils auf den Bereich, in dem bei Vorliegen eines *cis*-Pyranrings im 2D-NOE-Spektrum ein eindeutiges Signal vorhanden sein müsste. Die entsprechenden *H,H*-COSY und 2D-NOE-Spektren für *cis*-**164** sind in Abbildung 8-221 und Abbildung 8-222 dargestellt.**

Für die Konfiguration an C-2 können durch Bestimmung der vicinalen Kopplungskonstante  $^3J_{2H-3H}$  Rückschlüsse auf dessen Konfiguration getroffen werden. Dabei ergibt sich für das von PedPS7 gebildete Produkt *trans*-**164** eine Kopplungskonstante von 9.8 bzw. 10.0 Hz (in  $CDCl_3$  bzw.  $C_6D_6$ ; Abbildung 8-203 bzw. Abbildung 8-204). Literaturvergleiche mit ähnlichen *trans*-THP-Ringen besitzen Kopplungskonstanten von 10.0 Hz, was die gezeigte D-Konfiguration an C-2 bestätigt.<sup>[196]</sup> Eine 2L-Konfiguration würde vicinale Kopplungskonstanten von ungefähr 10.8–11.2 Hz ergeben.<sup>[194,197]</sup>

#### 3.4.2.1.1. Gefriertrocknung

Die Experimente zur Lyophilisation von PedPS7 wurden weitestgehend analog zu denen von AmbDH3 durchgeführt (Abschnitt 3.3.6). Dabei wurde Ammoniumcarbonat-Puffer zur Lyophilisierung und HEPES-Puffer für die anschließende Enzymreaktion mit Substrat **163** verwendet. Es zeigte sich bei Verwendung von nicht lyophilisiertem Lysat ein Umsatz von 65%, während sich nach Lyophilisation des gereinigten Proteins keinerlei Umsatz mehr feststellen ließ (Abbildung 8-50). Diese Methode scheint demnach für PedPS7 nicht geeignet zu sein.

#### 3.4.2.1.2. Lagerbarkeit

Die Experimente zum Einfluss der Lagerung von PedPS7 bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C auf dessen Zyklisierungsaktivität wurden analog zu denen von AmbDH3 durchgeführt (Abschnitt 3.3.5). Nach Lagerung über Nacht bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C wurden Enzymaktivitätstests mit Substrat **163** durchgeführt. Dabei konnte ein gleichbleibender Umsatz von 74 und 72 bzw. 75% nach Lagerung bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C festgestellt werden (Tabelle 3-9; Abbildung 8-51).

**Tabelle 3-9. Umsätze von PedPS7 mit Substrat 163 vor und nach Lagerung des Enzyms bei  $-20$  bzw.  $-80$  °C.**

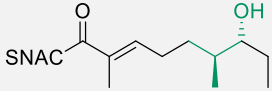
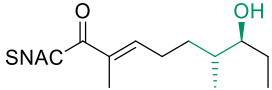
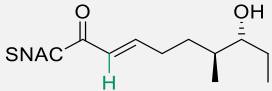
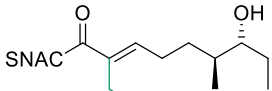
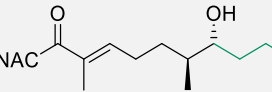
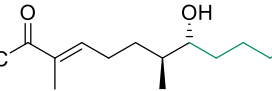
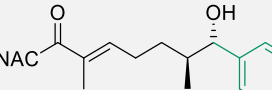
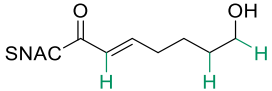
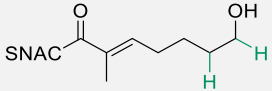
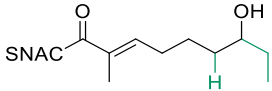
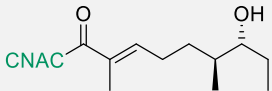
Lagerung	Temperatur [°C]	Umsatz [%]
-	-	74
✓	$-20$	$72 \pm 0.6$
✓	$-80$	$75 \pm 1.3$

Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 in HEPES-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich im Anhang in Abbildung 8-51.

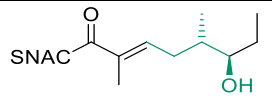
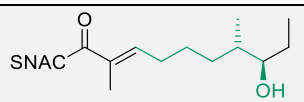
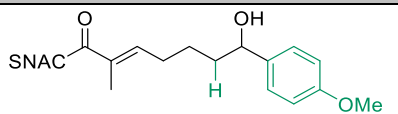
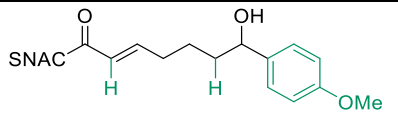
#### 3.4.2.1.3. Untersuchung der Substratspezifität

Zusätzlich sollten noch einige weitere Substrate in Enzymreaktionen mit PedPS7 getestet werden. In Tabelle 3-10 sind die Ergebnisse der Enzymaktivitätstests mit gereinigtem PedPS7 zusammengefasst. Die Stereokonfigurationen am THP-Ring der jeweiligen Produkte (C-3 und C-7) wurden vorerst aufgrund des Biosynthesewegs von Pederin angenommen und für einige Substrate in nachfolgenden Experimenten *via* NMR-Spektroskopie untersucht und bestätigt (Abschnitt 3.4.2.1.4).

Tabelle 3-10. Übersicht über die Substrate, die mit AmbDH3 und PedPS7 bezüglich eines möglichen Umsatzes zum zyklischen Produkt getestet wurden.

Eintrag	Substrat	Umsatz [%]	
		AmbDH3	PedPS7
1	 <b>163</b>	quant.	84
2	 <i>ent</i> - <b>163</b>	n.d.	32
3	 <b>165</b>	quant.* (23)	77* (23) <sup>[a]</sup>
4	 <b>167</b>	>95	51
5	 <b>169</b>	n.d.	84
6	 <b>171</b>	69	39
7	 <b>173</b>	37	62
8	 <b>175</b>	>95	61
9	 <b>177</b>	42	0
10	 <b>179</b>	n.d.	11 // 47
11	 <b>185</b>	30	n.d.



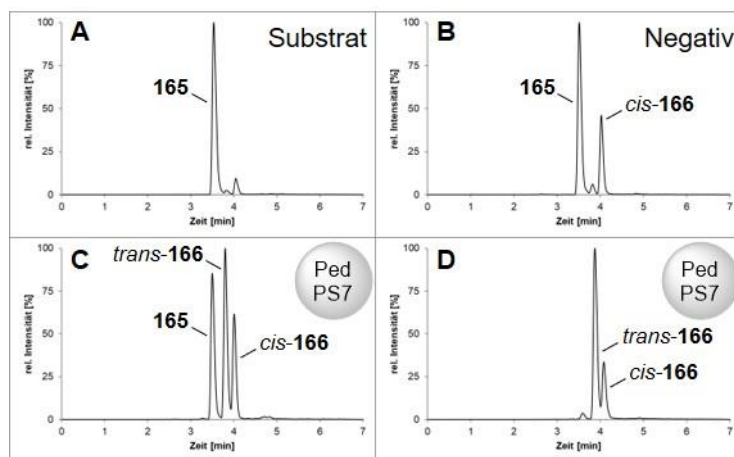
12	 <b>187</b>	n.d.	>95* (15)
13	 <b>189</b>	n.d.	0
14	 <b>191</b>	n.d.	6 // 11
15	 <b>195</b>	n.d.	46 // 35

„\*“ deutet auf eine spontane Zyklisierung; der Wert der spontanen Zyklisierung ist in Klammern dahinter angegeben. <sup>[a]</sup> spontane Zyklisierung mit 20–29% trat nur zum Produkt *cis*-**166** auf. Dieser Wert wurde vom Umsatz nicht subtrahiert, da es sich bei *cis*-**166** nicht um das von PedPS7 gebildete Stereoisomer handelt. Die Umsatzwerte von Substrat **163** wurden mit der entsprechenden Kalibriergerade korrigiert. Bei racemisch eingesetzten Substraten wurde bei Angabe des Umsatzes zwischen den beiden möglichen entstandenen Produkten unterschieden und diese getrennt angegeben. Die Enzymreaktionen wurden in einem Maßstab von 0.1 mg bei einer Substratkonzentrationen von 2 mM durchgeführt.

Eine Zyklisierungsaktivität durch PedPS7 konnte für viele der Substrate nachgewiesen werden. Eine breite Substrattoleranz scheint also keine rein AmbDH3-spezifische Eigenschaft zu sein. Hervorzuheben ist hier, dass nur durch Reaktion mit PedPS7 eine Zyklisierung der Substrate *ent*-**163** (32%) und **191** (17%) möglich war. Die Verwendung des gereinigten Proteins führte in allen Fällen aufgrund der höheren Enzymkonzentration in Vergleich zum Zelllysate zu einem höheren Umsatz. Dabei stehen jedoch die Enzymmengen der Reaktionen mit Lysat und gereinigtem Protein nicht in gleichem Verhältnis zueinander.

Die Negativkontrolle von Substrat **165** zeigte ein neues Signal, bei dem es sich um spontan zyklisiertes Produkt **166** handelt (Abbildung 3-79B). Vergleichbare Substrate ohne Substituenten an C-2 neigen dazu, in Lösung zu zyklisieren.<sup>[164]</sup> Bedingt ist dies durch die erhöhte Reaktivität des MICHEAL-Akzeptors aufgrund des fehlenden elektronenschiebenden Substituenten. Nach Enzymreaktion mit PedPS7 kam es zu einem deutlichen Anstieg der Intensität eines neuen Signals, das Produkt *trans*-**166** entsprechen könnte. Eine spontane Zyklisierung zu *trans*-**166** kann aufgrund der durchgeführten Negativkontrolle ausgeschlossen werden, weshalb diese bei den PedPS7-katalysierten Umsatzwerten nicht berücksichtigt wurde (Tabelle 3-10). Daraus ergibt sich ein Umsatz zu *trans*-**166** von 77%. Das von PedPS7 zyklisierte Produkt besitzt eine unterschiedliche Retentionszeit (3.9 min) zum AmbDH3-Produkt **166** (4.1 min). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass PedPS7 im Gegensatz zu AmbDH3 die Bildung eines *trans*-konfigurierten Heterozyklus katalysiert.





**Abbildung 3-79. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat 165:** **A)** Substrat **165**; **B)** Negativkontrolle von Substrat **165**; **C+D)** Enzymreaktionen von PedPS7-Lysat (**C**) oder PedPS7 (**D**) mit Substrat **165**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **165** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (**B**) und 4 mM (**C+D**)) und Lysat (**C**) oder 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 (**D**) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Bei den racemisch vorliegenden Substraten **191** und **195** wurde keine Bestimmung durchgeführt, welches der Enantiomere bevorzugt durch PedPS7 umgesetzt wird. Die Retentionszeiten der Produkte aus den Umsetzungen von PedPS7 mit den Substraten unterscheiden sich durchweg von denen der entsprechenden AmbDH3-Produkte. Genauere Aussagen über die Stereokonfiguration können an dieser Stelle noch nicht getroffen werden. Die Stereokonfiguration einiger zyklischer Produkte wurde in weiterführenden Experimenten *via* NMR-Spektroskopie bestätigt (Abschnitt 3.4.2.1.4).

#### 3.4.2.1.4. Konfigurationsbestimmung der Produkte

Die Enzymreaktionen mit den Substraten **169**, **179**, **181**, **183**, **191** und **197** wurden jeweils in mehrfacher Ausführung (5–10× 0.1 mg) durchgeführt und anschließend vereinigt, um die größtmögliche Menge an zyklisiertem Produkt zu erhalten. Die Umsatzanalyse erfolgte, wenn möglich *via* UPLC-MS-Analyse. Mehrmalige Umsetzungen des erhaltenen Edukt/Produkt-Gemisches sollten die Menge an zyklischem Produkt für eine nachfolgende Analyse *via* <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie erhöhen. Für die Substrate **181**, **183** und **197** wurden direkt Enzymreaktionen in größerem Maßstab (1 mg) durchgeführt, da eine Ionisierung dieser Substrate mittels ESI nicht möglich ist. Aufgrund variierender Bedingungen bei den Enzymreaktionen können die hier erhaltenen Umsatzwerte nicht direkt mit denen von anderen Reaktionen verglichen werden und dienen lediglich dem Erhalt an größtmöglicher Menge von zyklisiertem Produkt.

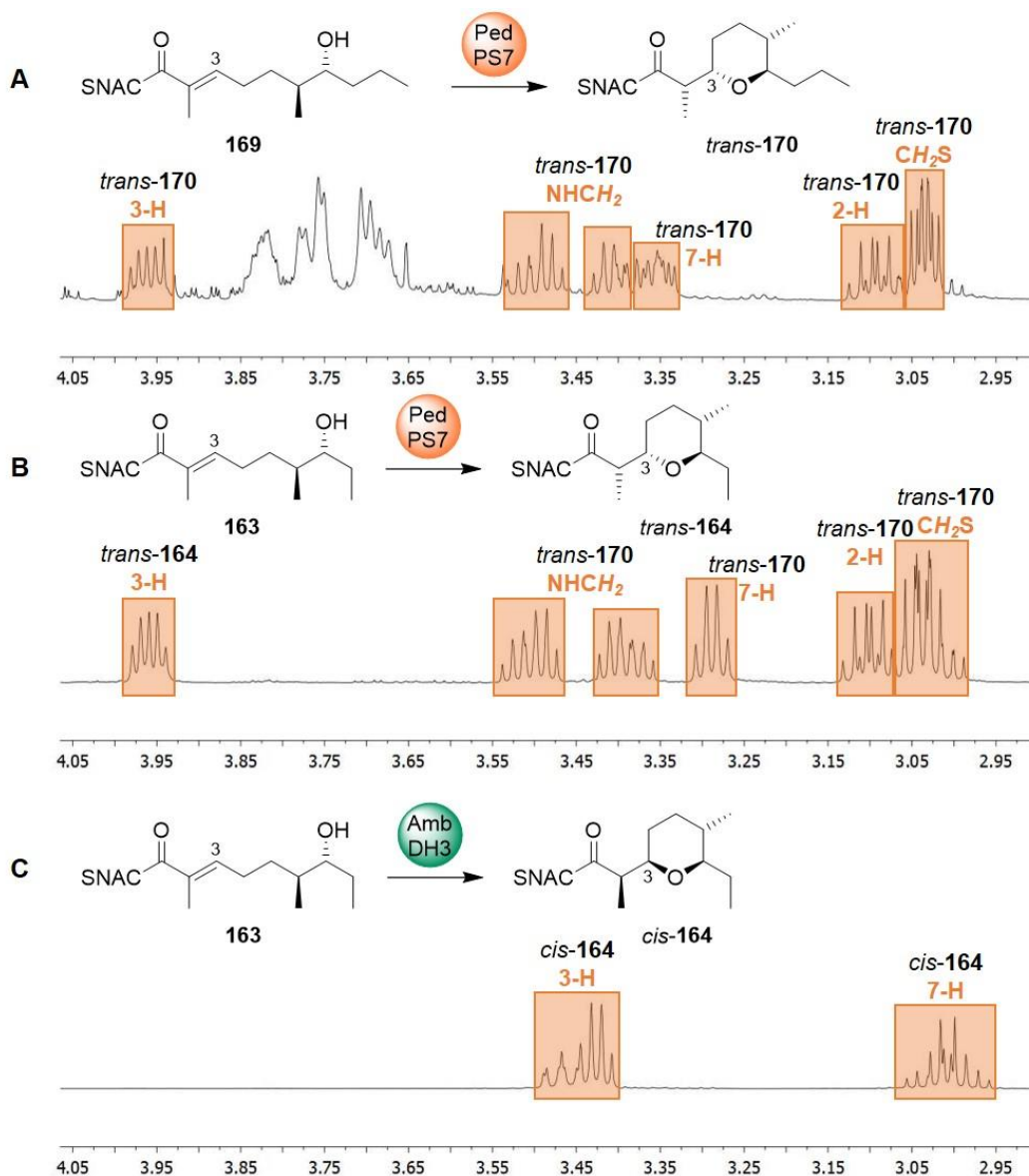
Der Aktivitätstest von PedPS7 mit Substrat **169** zeigte einen Umsatz von 61 bzw. 79% (Abbildung 8-64A+B und Tabelle 3-11, Eintrag 1). Die erneute Inkubation des Edukt/Produkt-Gemisches steigerte den Umsatz letztlich auf 93 bzw. 94% (Abbildung 8-64C+D und Tabelle 3-11, Eintrag 2).

**Tabelle 3-11. Bedingungen der Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat 169 sowie der daraus ermittelte Umsatz.**

Eintrag	Umsetzung	Enzymkonzentration [mg/mL]	Puffer	Umsatz [%]
1	1	1.6	HEPES pH 6.8	61
	2	7.0	HEPES pH 7.2	93
2	1	6.3	HEPES-Glycerin pH 7.2	79
	2	7.0	HEPES pH 7.2	94

Die UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Substrat **169** mit PedPS7 befinden sich im Anhang in Abbildung 8-64.

Die nachfolgende Analyse *via* NMR-Spektroskopie sollte Erkenntnisse über die Konfiguration an C-3 und C-2 liefern. Das erhaltene Spektrum wurde mit dem Spektrum von *trans*-**164**, dem Produkt der Zyklisierung von **163** mit PedPS7, verglichen (Abbildung 3-80A+B). Charakteristisch für die Bildung des *trans*-konfigurierten THP-Rings ist unter anderem das Signal bei 3.96 ppm (3-H). Die durch PedPS7 gebildete *trans*-Konfiguration führt zu einer stärkeren Entschirmung des äquatorial positionierten C-3-Protons durch das Sauerstoffatom im Pyranring. Dadurch kommt es zu einer Tieffeldverschiebung des Signals im Vergleich zum Signal des C-3-Protons von *cis*-**164** (3.45 ppm, 3-H). Im Spektrum des Produkts von PedPS7 ist das Signal bei 3.96 ppm (3-H) zu sehen und deutet auf die Bildung von *trans*-**170**. Das Signal bei 3.10 ppm kann dem Proton an C-2 zugeordnet werden. Daraus ergibt sich eine vicinale Kopplungskonstante  ${}^3J_{2H-3H} = 9.9$  bzw. 10.0 Hz und bestätigt damit die gezeigte Konfiguration an C-2 (Abbildung 8-214).<sup>[196]</sup>



**Abbildung 3-80. Ausschnitte aus den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren nach Umsetzung von PedPS7 mit Substrat 169 und des Produkts nach Umsetzung von AmbDH3 mit Substrat 163:** Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat **169** (A) bzw. **163** (B) und von AmbDH3 mit Substrat **163** (C). Die betrachteten Signale der PedPS7-gebildeten Produkte sind orange hinterlegt. Die kompletten NMR-Spektren sowie die Berechnungen der vicinalen Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>2H-3H</sub> sind im Anhang in Abbildung 8-214 bzw. Abbildung 8-203 dargestellt. Bei den Signalen im Bereich von 3.85–3.65 ppm handelt es sich vermutlich um systematische Verunreinigungen, da diese ebenfalls in anderen NMR-Spektren zu sehen sind.

Auf analoge Weise wurde für die Substrate **179**, **181**, **183**, **191** und **197** vorgegangen. Eine Ionisierung der Substrate **181**, **183** und **197** mittels Elektronensprayionisierung war nicht möglich, weshalb hier nur eine Analyse *via* <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie erfolgte.

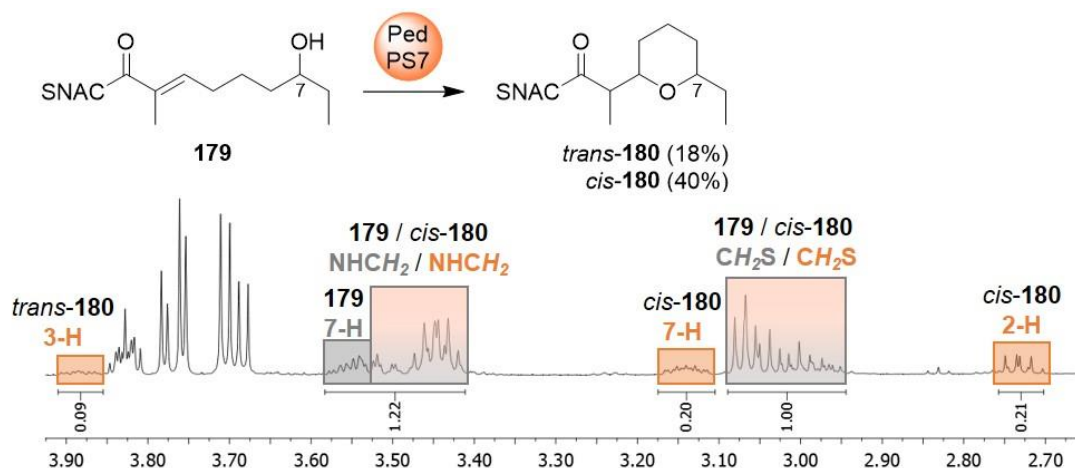
Die Aktivitätstests von PedPS7 mit Substrat **179** zeigten einen Umsatz zu zwei verschiedenen Stereoisomeren von 11 und 47% (Abbildung 8-65A und Tabelle 3-12). Der Umsatz konnte durch erneute Inkubation mit PedPS7 auf 19 und 52% angehoben werden (Abbildung 8-65B und Tabelle 3-12).

**Tabelle 3-12. Bedingungen der Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat 179 sowie der daraus ermittelte Umsatz.**

Umsetzung	Enzymkonzentration [mg/mL]	Puffer	Umsatz [%]
			<i>trans-</i> / <i>cis</i> - <b>180</b>
1	7.0	HEPES pH 7.2	11 / 47
2	4.8		19 / 52

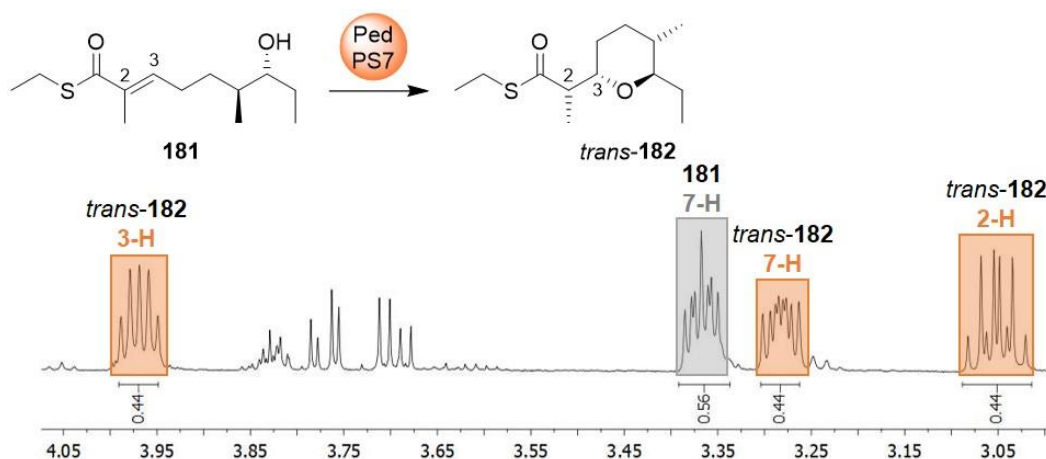
Die UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Substrat **179** mit PedPS7 befinden sich im Anhang in Abbildung 8-65.

NMR-spektroskopische Analysen sollten aufzeigen, ob bei der Umsetzung von Substrat **179** mit PedPS7 der *cis*- oder *trans*-Pyranring gebildet wird. Im erhaltenen Spektrum deutet das tieffeldverschobene Signal für 3-H (3.91–3.87 ppm, m, 1H) auf das Vorliegen eines *trans*-Pyranringes im gebildeten Produkt *trans*-**180**, wohingegen das hochfeldverschobene Signal für 7-H (3.17–3.11 ppm, m, 1H) dem *cis*-Pyranring in *cis*-**180** zugeordnet werden kann (Abbildung 3-81). Anhand der Signale für das Proton an C-3 von *trans*-**180** bzw. an C-7 von *cis*-**180** kann ein Umsatz von 18% zu *trans*-**180** bzw. 40% zu *cis*-**180** ermittelt werden. Die erhaltenen Signale für *cis*-**180** decken sich mit denen des entsprechenden Produkts nach Umsetzung mit AmbDH3 durch T. HOLLMANN.<sup>[191]</sup> Das sehr ähnliche Substrat **91** von PÖPLAU *et al.*<sup>[11]</sup> wurde durch PedPS7 ebenfalls vermehrt zu *cis*-**92** umgesetzt (Abbildung 1-23).



**Abbildung 3-81. Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Umsetzung von PedPS7 mit Substrat 179.** Die betrachteten Signale des PedPS7-gebildeten Produkts sind orange hinterlegt. Das komplette NMR-Spektrum ist im Anhang in Abbildung 8-215 dargestellt. Die Signale für die Protonen an C-7 von *trans*-180 (~3.70 ppm) und C-3 von *cis*-180 (~3.55 ppm) werden von Verunreinigungen oder anderen Signalen im vorliegenden Spektrum überlagert. Bei den Signalen im Bereich von 3.85–3.65 ppm handelt es sich vermutlich um systematische Verunreinigungen, da diese ebenfalls in anderen NMR-Spektren zu sehen sind.

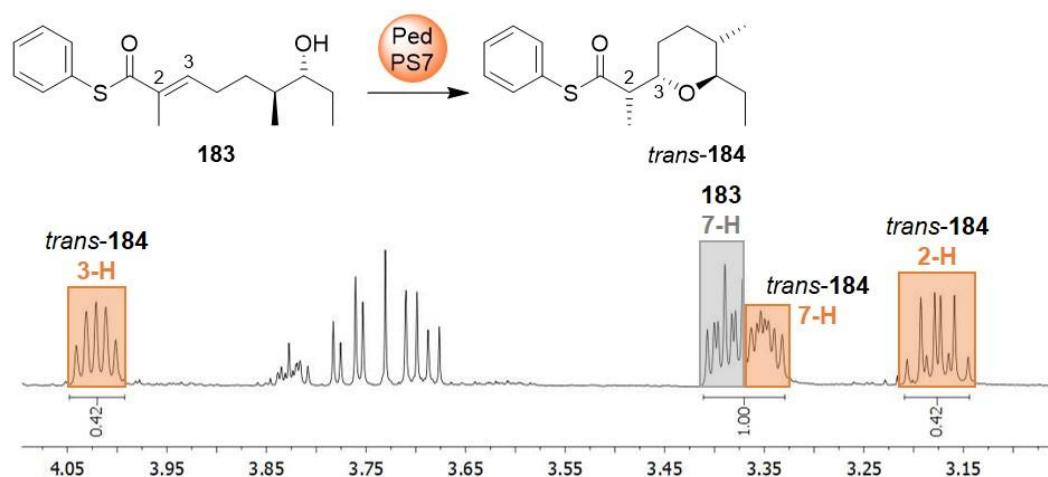
Nach der Umsetzung von Verbindung **181** mit PedPS7 kann im Spektrum das charakteristische, tieffeldverschobene Signal des C-3-Protons bei 3.99–3.95 ppm (dt, 1H, 3-H) detektiert werden. Dies deutet ebenfalls auf eine *trans*-Konfiguration im THP-Ring des gebildeten Produkts *trans*-182 (Abbildung 3-82). Anhand der Protonensignale von Edukt **181** bei 3.39–3.35 ppm (m, 1H, 7-H) und Produkt *trans*-182 bei 3.99–3.95 ppm (dt, 1H, 3-H) ergab sich ein Umsatz von 44%. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{2\text{H}-3\text{H}} = 9.8 \text{ Hz}$  bestätigt die gezeigte 2D-Konfiguration (Abbildung 8-216).<sup>[196]</sup>



**Abbildung 3-82. Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Umsetzung von PedPS7 mit Substrat 181.** Die betrachteten Signale des Edukts bzw. PedPS7-gebildeten Produkts sind jeweils grau bzw. orange hinterlegt. Das komplette NMR-Spektrum sowie die Berechnung der vicinalen Kopplungskonstante  $^3J_{2\text{H}-3\text{H}}$  sind im Anhang in Abbildung 8-216 dargestellt. Bei den Signalen im Bereich von 3.85–3.65 ppm handelt es sich vermutlich um systematische Verunreinigungen, da diese ebenfalls in anderen NMR-Spektren zu sehen sind.

Analog dazu ist auch im Spektrum von PedPS7 mit Substrat **183** das Signal von 3-H bei 4.04–4.00 ppm (dt,  $J = 9.9, 5.0 \text{ Hz}$ , 1H, 3-H) zu sehen, sodass auch hier von einer *trans*-

Konfiguration des THP in **184** ausgegangen werden kann (Abbildung 3-83). Anhand der Protonensignale von Edukt **183** bei 3.41–3.37 ppm (m, 1H, 3-H) und Produkt **184** bei 4.04–4.00 ppm (dt, 1 H, 7-H) ließ sich ein Umsatz von 42% bestimmen. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{2H-3H} = 9.9$  Hz bestätigt die gezeigte 2D-Konfiguration (Abbildung 8-217).<sup>[196]</sup>



**Abbildung 3-83.** Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Umsetzung von PedPS7 mit Substrat **183**. Die betrachteten Signale des Edukts bzw. PedPS7-gebildeten Produkts sind grau bzw. orange hinterlegt. Das komplette NMR-Spektrum sowie die Berechnung der vicinalen Kopplungskonstante  $^3J_{2H-3H}$  sind im Anhang in Abbildung 8-217 dargestellt. Bei den Signalen im Bereich von 3.85–3.65 ppm handelt es sich vermutlich um systematische Verunreinigungen, da diese ebenfalls in anderen NMR-Spektren zu sehen sind.

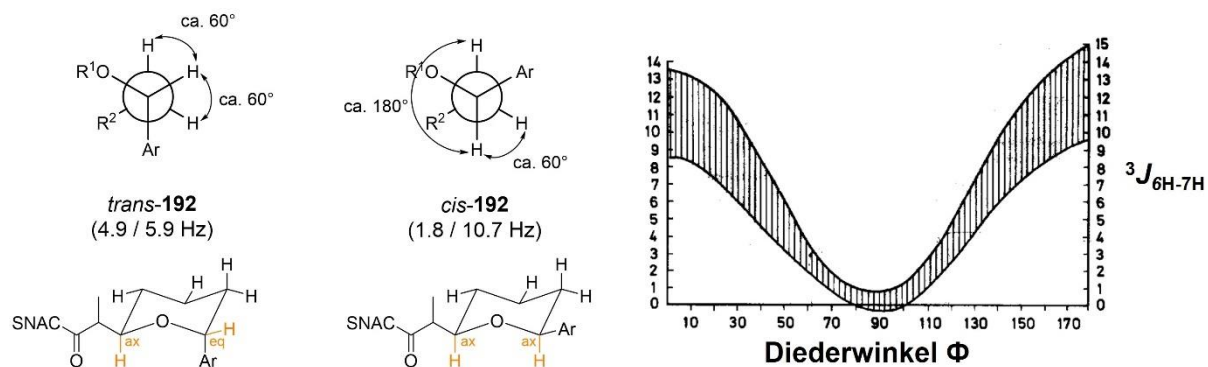
Die Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat **191** zeigten einen maximalen Umsatz zu zwei verschiedenen Stereoisomeren von 11 und 17% (Abbildung 8-66 und Tabelle 3-13). Durch aufeinanderfolgende Inkubation konnte der Umsatz schließlich auf 21 und 41% (Abbildung 8-66F und Tabelle 3-13) gesteigert werden.

**Tabelle 3-13.** Bedingungen der Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat **191** sowie der daraus ermittelte Umsatz.

Eintrag	Umsetzung	Enzymkonzentration [mg/mL]	Puffer	Umsatz [%]	
				<i>trans</i> -192	<i>cis</i> -192
1	1	1.6	HEPES pH 6.8	5	12
	2	7.0	HEPES pH 7.2	18	37
	3	4.8	HEPES pH 7.2	19	31
2	1	6.3	HEPES-Glycerin pH 7.2	11	17
	2	7.0	HEPES pH 7.2	19	35
	3	4.8	HEPES pH 7.2	21	41

Die UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Substrat **191** mit PedPS7 befinden sich im Anhang in Abbildung 8-66.

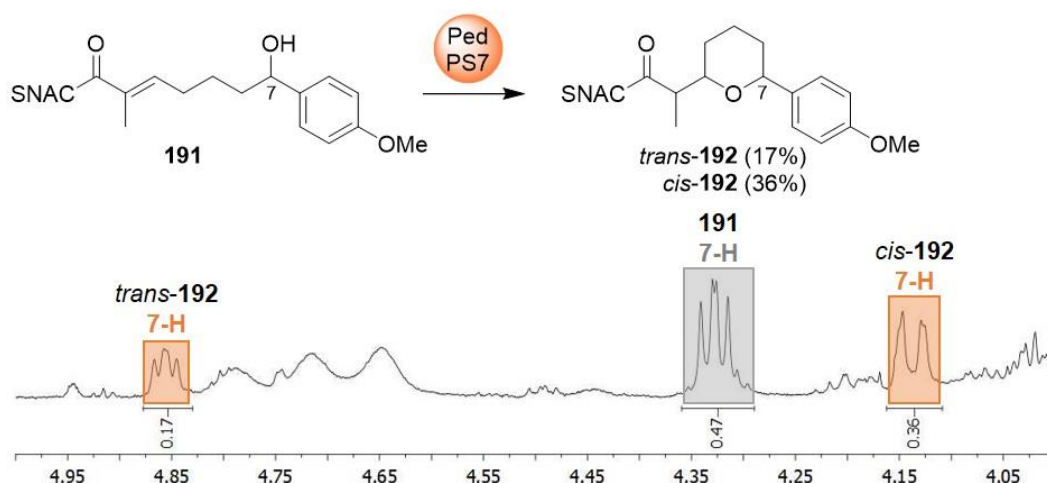
Im Spektrum kann das Signal des C-7-Protons von Edukt **191** bei 4.33-4.30 ppm (dd,  $J = 7.4$ , 5.7 Hz, 1H, 7-H) gefunden werden (Abbildung 3-85). Aufgrund der Winkelabhängigkeit der Kopplungskonstante kann eine Aussage über die Konfiguration an C-7 getroffen werden. Die KARPLUS-Beziehung beschreibt die Korrelation der  $^3J$ -Kopplungskonstante und dem Diederwinkel  $\Phi$  der vicinalen Kopplungspartner (Abbildung 3-84).<sup>[198]</sup>



**Abbildung 3-84. Bestimmung der Konfiguration an C-7 der Produkte **192** mithilfe der KARPLUS-Beziehung.**<sup>[199]</sup> Für die vicinalen Kopplungskonstanten  $^3J_{6H-7H}$  der beiden Produkte ergeben sich 4.9 und 5.9 Hz bzw. 1.8 und 10.7 Hz. Aufgrund der KARPLUS-Beziehung können die Werte den Produkten *trans*- und *cis*-**192** zugeordnet werden.

Bei Diederwinkeln nahe 90° sind die entsprechenden Kopplungskonstanten sehr niedrig, bei 0 und 180° sind diese jedoch vergleichsweise hoch. Vermutlich handelt es sich demnach bei dem Signal bei 4.86–4.84 ppm (dd,  $J = 5.9$ , 4.9 Hz, 1H, 7-H) um das tieffeldverschobene Signal des C-7-Protons von *trans*-**192**. Die Kopplungskonstanten von 4.9 und 5.9 Hz entsprechen den Erwartungen, da die Diederwinkel beide ca. 60° betragen (Abbildung 8-218). Bei dem Signal bei 4.14–4.12 ppm (dd, 1H, 7-H) handelt es sich wahrscheinlich um das hochfeldverschobene Signal des C-7-Protons von *cis*-**192**. Hier betragen die Kopplungskonstanten 1.8 und 10.7 Hz, resultierend aus den Diederwinkeln von 60 und 180°. Demnach kann ein Umsatz zu *trans*-**192** von 17% und zu *cis*-**192** von 36% ermittelt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus der UPLC-MS-Analyse (Abbildung 8-66). Dort zeigten sich ebenfalls zwei verschiedene Isomere, wobei das *trans*-konfigurierte Produkt *trans*-**192** jeweils eine geringere Retentionszeit besaß als der entsprechende *cis*-Pyranring.

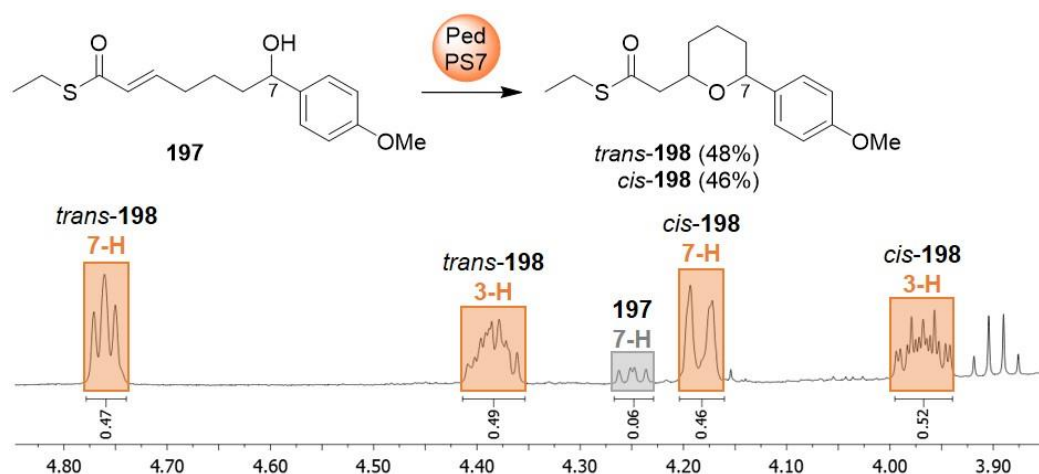




**Abbildung 3-85. Ausschnitte aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach Umsetzung des Substrats **191** durch PedPS7 im semipräparativen Maßstab: A) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **195**; B) Substrat **195**. Die betrachteten Signale der Edukte bzw. des PedPS7-gebildeten Produkts sind grau bzw. orange hinterlegt. Die kompletten NMR-Spektren sowie die Berechnung der vicinalen Kopplungskonstanten  $^3J_{6\text{H}-7\text{H}}$  sind im Anhang in Abbildung 8-218 dargestellt.**

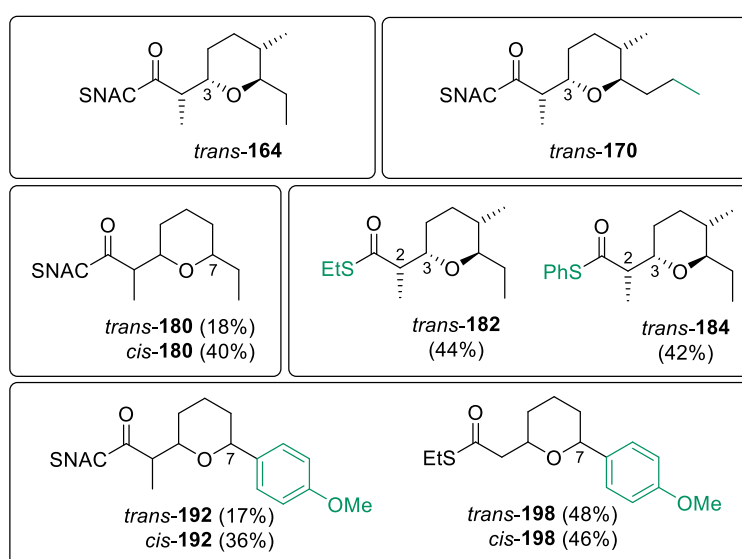
Der Umsatz der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **197** konnte anhand der jeweiligen C-7-Protonensignale bestimmt werden. Demnach zeigen sich Umsatzwerte von 48% zu *trans*-**198** und 46% zu *cis*-**198** (Abbildung 3-86). Wie auch bei Substrat **191** (siehe S. 135) können die gebildeten Diastereomere anhand des Signals des C-7-Protons voneinander unterschieden werden. Bei dem Signal bei 4.76–4.74 ppm (dd, 1H, 7-H) mit Kopplungskonstanten von 5.1 und 5.3 Hz handelt es sich wahrscheinlich um das Signal des C-7-Protons von *trans*-**198**. Das Signal bei 4.19–4.16 ppm (dd, 1H, 7-H) mit Kopplungskonstanten von 1.2 und 10.7 Hz entspricht vermutlich dem Signal des C-7-Protons von *cis*-**198**. Auch hier fehlt ein elektronenschiebender Substituent an C-2, eine mögliche spontane Zyklisierung konnte jedoch von T. HOLLMANN<sup>[182]</sup> ausgeschlossen werden. Die Konfiguration an C-3 wurde nicht näher untersucht. Um genauere Aussagen über die Konfiguration der gebildeten Isomere treffen zu können wäre eine Reinigung des Reaktionsgemisches *via* Chromatographie notwendig.





**Abbildung 3-86. Ausschnitt aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum nach Umsetzung von PedPS7 mit Substrat 197.** Die betrachteten Signale der Edukte bzw. PedPS7-gebildeten Produkte sind grau bzw. orange hinterlegt. Das komplette NMR-Spektrum sowie die Berechnung der vicinalen Kopplungskonstanten  $^3J_{6H-7H}$  sind im Anhang in Abbildung 8-219 dargestellt.

Für die Substrate, die isomerenrein in die Enzymreaktionen mit PedPS7 eingesetzt wurden, konnte durchgehend ein Zyklisierungsumsatz zum *trans*-konfigurierten Produkt (*trans*-**164**, *trans*-**170**, *trans*-**182** und *trans*-**184**) festgestellt werden (Abbildung 3-87). Die Konfiguration an C-2 der racemischen Verbindungen **180**, **192** und **198** konnte nicht näher bestimmt werden. Die Verbindung **179** wurde durch PedPS7 zum *trans*- und *cis*-konfigurierten Pyran *trans*- und *cis*-**180** umgesetzt und bestätigt damit die Ergebnisse von PÖPLAU *et al.*<sup>[11]</sup> Nach Umsetzung der Substrate **191** und **197** mit PedPS7 zeigten sich ebenso sowohl das jeweilige *cis*- als auch das *trans*-konfigurierte Produkt. Dabei ergibt sich für Substrat **191** eine Tendenz zur Bildung des *cis*-Pyranringes (52% Umsatz zu *cis*-**192** und 36% zu *trans*-**194**), während **197** von PedPS7 in gleichen Verhältnissen zu *cis*- und *trans*-**198** zyklisiert wurde.



**Abbildung 3-87. Strukturen der Substrate, die von PedPS7 akzeptiert wurden.** In Klammern angegeben ist der jeweilige Umsatz zum entsprechenden Stereoisomer. Die Umsatzbestimmung erfolgte für die Enzymreaktionen von PedPS7 mit den Substraten **163**, **169** und **179** via UPLC-MS-Analyse und mit **179**, **191** und **197** via NMR-Spektroskopie.

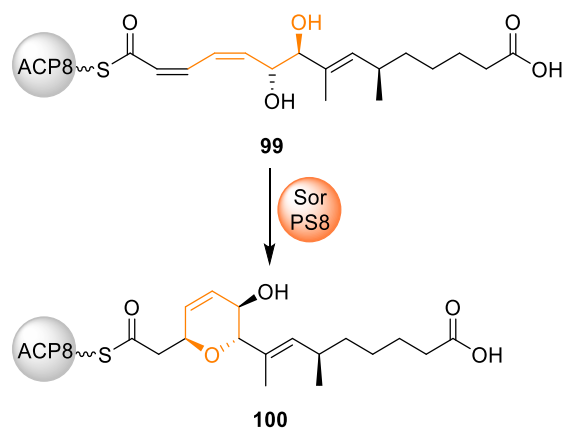
Grundsätzlich stellt sich PedPS7 als potentiell guter Biokatalysator für die Bildung eines *trans*-konfigurierten Pyranrings dar und zeigte sehr gute Substrattoleranz. Es war zudem möglich die Eigenschaften dieser neuen Enzymklasse zu bestimmen (Tabelle 3-14). Verglichen mit AmbDH3 wurden ähnlich viele Substrate von PedPS7 akzeptiert und zyklisiert. Auch eine Lagerung des Enzyms bei Minustemperaturen war ohne Aktivitätsverlust problemlos möglich.

**Tabelle 3-14. Gegenüberstellung der getesteten Eigenschaften von AmbDH3 und PedPS7.**

Eigenschaft	AmbDH3	PedPS7
Konfiguration des gebildeten Pyranrings	<i>cis</i>	vor allem <i>trans</i>
Substrattoleranz	sehr gut	sehr gut
Anzahl der akzeptierten und zyklisierten Substrate	8 (von 8)	15 (von 17)
Umsatzverlust mit Substrat <b>163</b> nach Lagerung des Enzyms bei $-20$ bzw. $-80$ °C (siehe Abschnitt 3.3.5 bzw. 3.4.2.1.2)	$-14$ bzw. $-12\%$	0%

#### 3.4.2.2. SorPS8

Das Enzym **SorPS8** katalysiert die Bildung des 3D,7L-*trans*-konfigurierten Pyranrings während der Sorangicin A (**65A**)-Biosynthese (Abbildung 3-88).



**Abbildung 3-88. SorPS8-katalysierte Zyklisierung des Pyranrings während der Sorangicin A (65A)-Biosynthese nach IRSCHIK *et al.*<sup>[95]</sup>. SorPS8 sowie der durch SorPS8 gebildete Pyranring sind orange hervorgehoben.**

Die Pyransynthese SorPS8 wurde in löslicher Form mit Substrat **163** auf eine mögliche Zyklisierung getestet. Substrat **163** wurde jedoch nicht durch SorPS8 umgesetzt. Die Unterschiede zwischen der korrekten Vorläuferstruktur **211** und dem vorliegenden Substrat-surrogat scheinen zu groß zu sein oder aber das Enzym nicht in der aktiven Form erhalten worden zu sein (Abbildung 3-89).

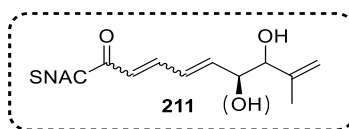


Abbildung 3-89. Hypothetischer Vorläufer **211** von SorPS8.

### 3.4.3. IndCyc11, ZinJ und SalBIII

Für *in vitro*-Aktivitätstest mit den heterolog produzierten Zyklasen IndCyc11, ZinJ und SalBIII sowie später auch NonS und PamS sollte die Verbindung **199** mit freier Carboxylgruppe verwendet werden. Substrat **199** soll dabei strukturell einem vom ACP bereits abgespaltenen biosynthetischen Substrat stärker ähneln und zudem als ein Stereoisomer vorliegen. Für IndCyc11, ZinJ und SalBIII besteht die Vermutung, dass diese als *Tailoring*-Enzyme Substrate ohne SNAC-Gruppe besser umsetzen. Deshalb wurde Verbindung **199** ausgehend vom SNAC-Thioester **169** durch basische Esterhydrolyse mit LiOH dargestellt (Abbildung 3-90).

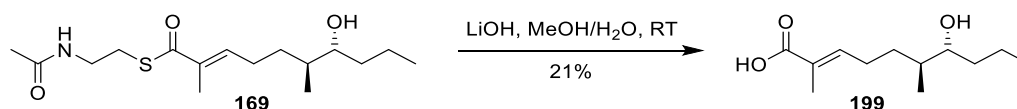


Abbildung 3-90. Basische Esterhydrolyse des SNAC-Thioesters **169** zur Carbonsäure **199** mittels LiOH in MeOH/H<sub>2</sub>O bei RT.

Das entstandene Produkt **199** wurde anschließend durch Extraktion und Säulenchromatographie gereinigt und *via* NMR-Spektroskopie identifiziert. Die Carbonsäure **199** konnte mit einer Ausbeute von 21% in hinreichender Menge für die Enzymtests erhalten werden.

#### 3.4.3.1. IndCyc11

Das Enzym **IndCyc11** katalysiert als *Tailoring*-Enzym während der Indanomycin (**66**)-Biosynthese die Pyranbildung zum 3D,7L-*trans*-konfigurierten Produkt **120** (Abbildung 3-91).

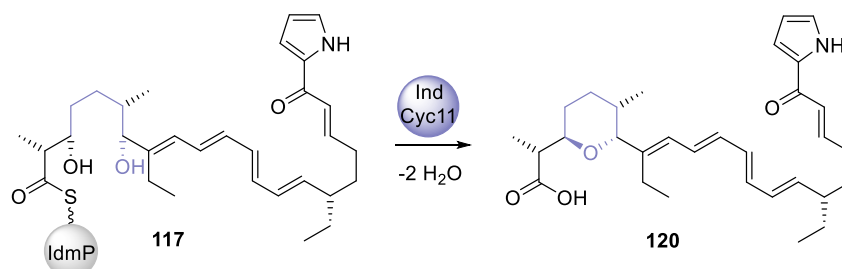
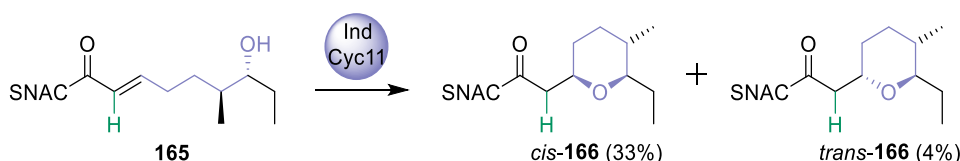


Abbildung 3-91. IndCyc11-katalysierte Zyklisierung des Pyranrings während der Indanomycin (**66**)-Biosynthese nach LI *et al.*<sup>[103]</sup>. IndCyc11 sowie der durch IndCyc11 gebildete Pyranring sind lila hervorgehoben.

IndCyc11 wurde in Enzymaktivitätstests mit den Substraten **163**, *ent*-**163**, *syn*-**163**, **165**, **167**, **169**, **171**, **173**, **177**, **187**, **199**, *rac*-**201** und *rac*-**203** auf eine Zyklisierung getestet

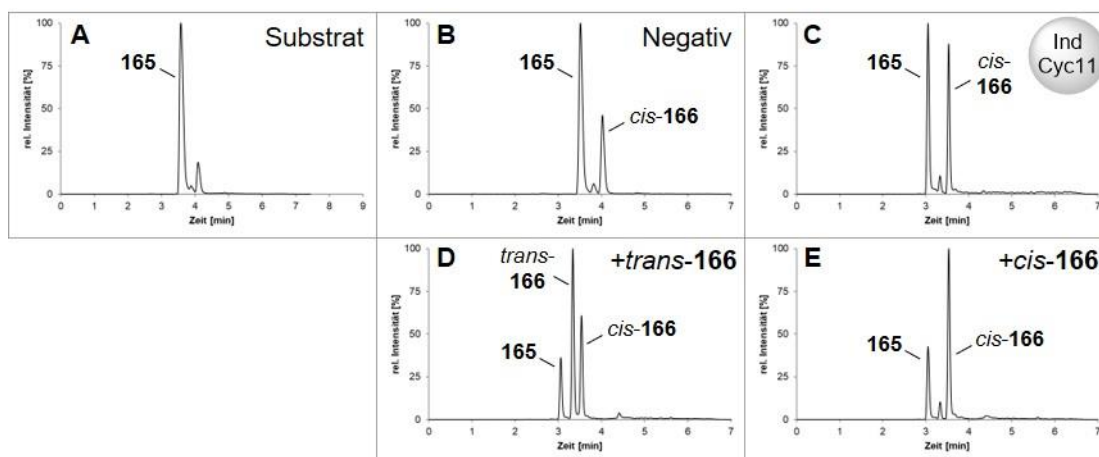
(Abbildung 8-68 bis Abbildung 8-78). Die Analyse der erhaltenen UPLC-MS-Chromatogramme zeigte für die Substrate *syn*-**163**, **165**, und **187** eine IndCyc11-katalysierte Umsetzung (Tabelle 3-15, S. 148). Diese Tatsache zeigt, dass das Enzym nach Entfaltung und anschließender Rückfaltung in aktiver Form vorlag.

Für Substrat **165** konnte eine IndCyc11-katalysierte Aktivität von 33% festgestellt werden, wobei hier noch der Wert der spontanen Zyklisierung berücksichtigt werden muss (Abbildung 3-92).



**Abbildung 3-92. IndCyc11-katalysierte Zyklisierung des SNAC-Thioesters **165** zu den Produkten *cis*- und *trans*-**166**.** Dabei katalysiert IndCyc11 die Zyklisierung zu *cis*-**166** mit 33%, abzüglich 23% spontane Zyklisierung zu *cis*-**166**. Die Werte können Tabelle 3-15 (S. 148) entnommen werden.

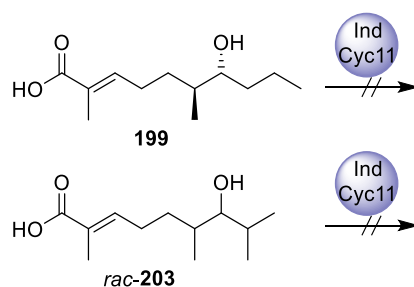
Die Negativkontrolle von Substrat **165** lässt erkennen, dass *cis*-**166** bereits zu 23% spontan zyklisierte (Abbildung 3-93B). Unter Berücksichtigung dessen ergibt sich ein Umsatz von 10% zu *cis*-**166** (Abbildung 3-93C). In vorherigen Arbeiten konnte die Zyklisierung von Substrat **165** zu *cis*-**166** durch AmbDH3<sup>[164]</sup> und zu *trans*-**166** durch PedPS7 (Abschnitt 3.4.2.1) *via* NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Die Zugabe geringer Mengen der Produkte dieser beiden Domänen verifizierte die Identität der IndCyc11-katalysierten Produkte (Abbildung 3-93D+E).



**Abbildung 3-93. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat **165**:** **A)** Substrat **165**; **B)** Negativkontrolle von Substrat **165**; **C)** Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat **165**; **D)** Bestimmung der gebildeten Produkte durch Zugabe von *trans*-**166** (dem Produkt der Zyklisierung von **165** durch PedPS7); **E)** Bestimmung der gebildeten Produkte durch Zugabe von *cis*-**166** (dem Produkt der Zyklisierung von **165** durch AmbDH3). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **165** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Eine Modifizierung der SNAC-gebundenen Substrate zu freien Carbonsäuren sollte zu einer erhöhten Zyklisierungsaktivität von IndCyc11 führen, da das Enzym im Biosyntheseweg am

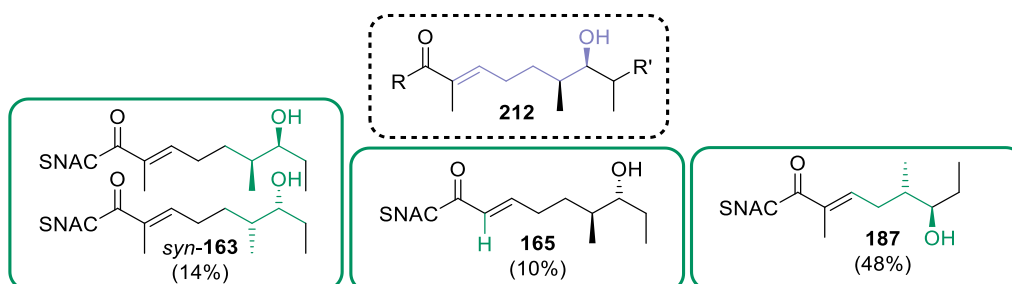
Ende des Moduls 11 platziert ist. Aufgrund des Fehlens einer expliziten TE-Domäne der Polyketidbiosynthese, besteht die Möglichkeit, dass IndCyc11 als solche agiert und somit die Hydrolyse des Substrates vom ACP katalysiert. Zudem zeigte das entsprechende Homolog SalBIII *in vitro* eine Aktivität mit dem komplexen Carbonsäurevorläufer **148** (siehe Abbildung 1-39, S. 33).<sup>[104]</sup> Dementsprechend könnte die Zyklisierungsreaktion von IndCyc11 mit einem ohne SNAC-gekoppelten Substrat (wie in **199** und *rac*-**203**) möglicherweise stattfinden (Abbildung 3-94).



**Abbildung 3-94. IndCyc11-katalysierte Zyklisierung der Substrate 199 und *rac*-203.** In beiden Fällen konnte keine Zyklisierung durch IndCyc11 erreicht werden.

Ein Vergleich zwischen Negativkontrollen und Enzymreaktionen mit **199** und *rac*-**203** zeigten keine Unterschiede in den UPLC-MS-Spuren (Abbildung 8-77, Abbildung 8-79 und Abbildung 8-80). Dies deutet darauf hin, dass keine IndCyc11-katalysierte Zyklisierungsreaktion stattfand. Bei racemischen Substraten kann es vorkommen, dass andere Stereoisomere beispielsweise die aktive Tasche besetzen und dadurch eine inhibierende Wirkung auf das Enzym besitzen. Eine Inhibition durch eines der Stereoisomere von *rac*-**203** könnte ebenfalls der Grund für die fehlender Zyklisierung sein. Inhibierende Effekte durch die Substrat- oder Proteinkonzentration sind unwahrscheinlich, da verschiedene Konzentrationen bei gleichem Resultat getestet wurden.

Letztlich konnten die drei SNAC-gebundenen Substrate *syn*-**163**, **165**, und **187** durch IndCyc11 umgesetzt werden (Abbildung 3-95 und Tabelle 3-15).

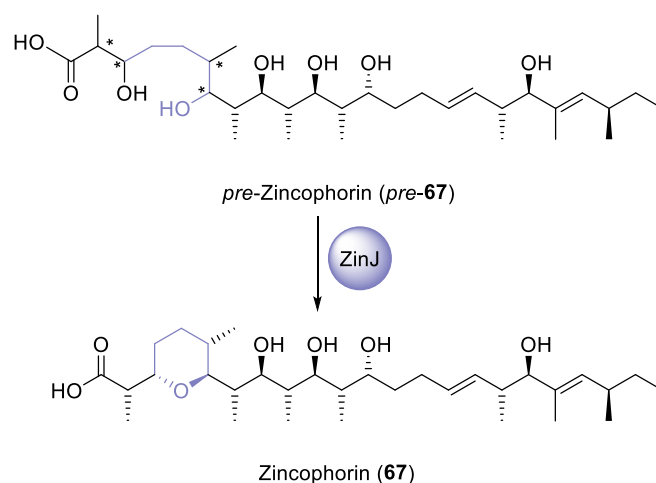


**Abbildung 3-95. Hypothetischer Vorläufer 212 von IndCyc11 und ZinJ (schwarzer Kasten) sowie von IndCyc11 akzeptierte Substrate *syn*-163, 165 und 187 (grüner Kasten).** R = SNAC oder OH; R' = H oder Me. In Klammern angegeben ist der jeweilige Umsatz. Die Werte können zudem Tabelle 3-15 (S. 148) entnommen werden. Der durch IndCyc11 gebildete Pyranring ist lila hervorgehoben.

Es zeigt sich, dass ein Isomer des akzeptierten Substrats *syn*-**163** die gleiche Konfiguration besitzt wie der natürlich angenommene IndCyc11- bzw. ZinJ-Vorläufer **212**. Aus den Ergebnissen der Enzymreaktionen ergibt sich, dass IndCyc11 vermutlich ein PKS-gebundenes Intermediat umsetzt, da alle akzeptierten Substrate als SNAC-Thioester vorlagen. Zudem zeigt IndCyc11 eine gewisse Substrattoleranz und akzeptiert dabei sowohl Substrate, die zu Pyran- als auch zu Furanringen führen. Um genauere Aussagen über die Substrattoleranz von IndCyc11 treffen zu können wären Experimente mit besseren und komplexeren Substratsurrogaten zukünftig erstrebenswert.

### 3.4.3.2. ZinJ

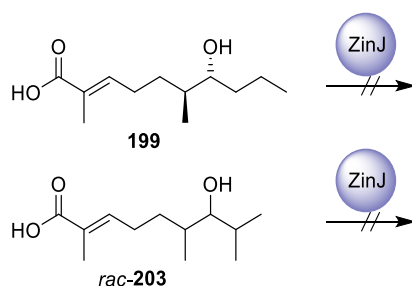
**ZinJ** ist ein *Tailoring*-Enzym und katalysiert während der Biosynthese von Zincophorin (**67**) die Bildung des 3L,7D-*trans*-Pyranrings (Abbildung 3-96).



**Abbildung 3-96. ZinJ-katalysierte Zyklisierung des Pyranrings während der Zincophorin (**67**)-Biosynthese.**<sup>[105]</sup> ZinJ sowie der durch ZinJ gebildete Pyranring sind **lila** hervorgehoben.

Analog zu IndCyc11 wurden mit ZinJ ebenfalls Enzymreaktionen mit den Substraten **163**, *ent*-**163**, *syn*-**163**, **165**, **169**, **171**, **173**, **187**, **199**, *rac*-**201** und *rac*-**203** durchgeführt. Hierbei konnte kein Umsatz zu zyklisiertem Produkt festgestellt werden (Tabelle 3-15, S. 148; Abbildung 8-81 bis Abbildung 8-92). Lediglich ein Stereoisomer von Substrat *syn*-**163** besaß die gleiche 6D,7L-Konfiguration wie der postulierte ZinJ-Vorläufer **212** (Abbildung 3-95), wurde jedoch von diesem nicht umgesetzt.

Die Substrate **199** und *rac*-**203** ähneln dem natürlich vorkommenden biosynthetischen Substrat von ZinJ mehr als die bereits getesteten Substrate (Abbildung 3-97). ZinJ scheint in der Zincophorin-Biosynthese als *Tailoring*-Enzym zu fungieren, folglich ist das entsprechende Substrat nicht über eine Thioesterbindung an die PKS gebunden.



**Abbildung 3-97. ZinJ-katalysierte Zyklisierung der Substrate 199 und rac-203.** In beiden Fällen konnte keine Zyklisierung durch ZinJ erreicht werden.

Bei keiner der Enzymreaktionen von ZinJ mit den Substraten **199** und *rac*-**203** konnte ein weiteres Signal detektiert werden (Abbildung 8-89, Abbildung 8-91 und Abbildung 8-92), folglich kam es zu keiner Umsetzung durch ZinJ. Diese Ergebnisse sind analog zu denen von IndCyc11, wobei auch hier keine genaue Aussage über den Einfluss der Konfiguration an C- und C-7 getroffen werden kann.

WALTHER *et al.* postulierten, dass es sich bei ZinJ im Biosyntheseweg um ein *Tailoring*-Enzym handelt, welches die Zyklisierung zum finalen Zincophorin (**67**) katalysiert.<sup>[105]</sup> Da den beiden Edukten **199** und *rac*-**203** im Vergleich zum natürlichen Substrat eine Hydroxygruppe an C-9 fehlt und diese außerdem um 16 Kohlenwasserstoffatome verkürzt ist, wurden die beiden Verbindungen vermutlich nicht von ZinJ akzeptiert. Des Weiteren handelt es sich bei Substrat *rac*-**203** um eine racemische Verbindung, sodass insgesamt vier verschiedene Stereoisomere vorliegen. Da ZinJ vermutlich nur eines dieser Isomere akzeptiert, könnten die verbliebenen Isomere inhibierend wirken. Es ist zudem möglich, dass der His<sub>6</sub>-tag die native Struktur des Proteins und somit die Aktivität beeinflusst. Dies könnte überprüft werden, indem das Protein mit anderen oder gänzlich ohne His<sub>6</sub>-tag produziert und eingesetzt wird.

#### 3.4.3.3. SalBIII

Bei **SalBIII** handelt es sich ebenso wie IndCyc11 und ZinJ um ein *Tailoring*-Enzym, das während der Biosynthese von Salinomycin (**68**) die Bildung des 3D,7L-*trans*-konfigurierten Pyranrings katalysiert (Abbildung 3-98).



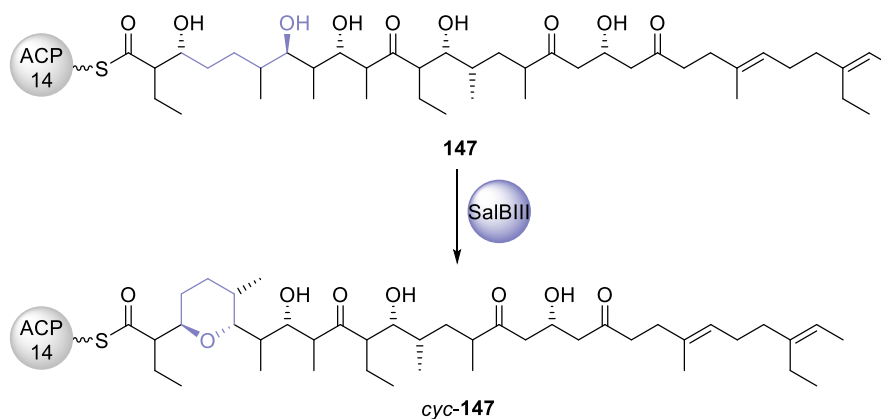


Abbildung 3-98. SalBIII-katalysierte Zyklisierung des Pyranrings während der Salinomycin (68)-Biosynthese nach LUHAVAYA *et al.*<sup>[104,118]</sup>. Der durch SalBIII gebildete Pyranring ist **lila** hervorgehoben.

SalBIII wurde ebenfalls in Enzymreaktionen mit den Substraten **163**, *syn*-**163**, **165**, **167**, **169**, **171**, **173**, **179**, **187**, *rac*-**191**, *rac*-**195** und **199** eingesetzt (Abbildung 8-93 bis Abbildung 8-104). Die Substrate wurden alle nicht von SalBIII umgesetzt, was vermutlich an der vorliegenden SNAC-Gruppe lag. Lediglich Substrat **199** lag als freie Carbonsäure vor, wobei dieses vermutlich aufgrund der zu starken Vereinfachung und Verkürzung des Substrates nicht akzeptiert wurde. Die Charakteristika des Biosynthesewegs zu Salinomycin legen nahe, dass der Zyklisierungsvorläufer in dieser nicht ACP-gebunden, sondern in freier Form vorliegen könnte. LUHAVAYA *et al.*<sup>[104]</sup> gelang es in einem *in vitro*-Experiment einen isolierten Biosynthese-Vorläufer in Form einer Carbonsäure mit SalBIII zu zyklisieren (Abschnitt 1.3.3.3, S. 33). Eine Inaktivität des Enzyms aufgrund der Darstellungsmethodik kann vermutlich ausgeschlossen werden, da die SalBIII-Produktion analog zu LUHAVAYA *et al.*<sup>[104]</sup> erfolgte und dort eine Zyklisierungsaktivität beobachtet werden konnte. Zudem lag – ebenso wie bei IndCyc11 und ZinJ – nur ein Stereoisomer von *syn*-**163** in der richtigen Konfiguration vor wie der hypothetische SalBIII-Vorläufer **213** (Abbildung 3-99).

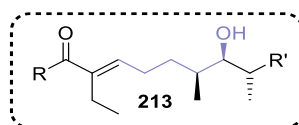


Abbildung 3-99. Hypothetischer Vorläufer **213** von SalBIII. R = SNAC oder OH; R' = H oder Me. Der durch SalBIII gebildete Pyranring ist **lila** hervorgehoben.

#### 3.4.4. NonS und PamS

Die beiden als Enoyl-CoA-Hydratasen annotierten Enzyme **NonS** und **PamS** katalysieren die biosynthetische Bildung von THF-Ringen in Makroliden (Abbildung 3-100 und Abbildung 3-101). Dabei bildet NonS die beiden Furanringe in zwei enantiomeren Hydroxysäuren, während PamS die Bildung der beiden zyklischen Produkte **158** und **159** katalysiert.

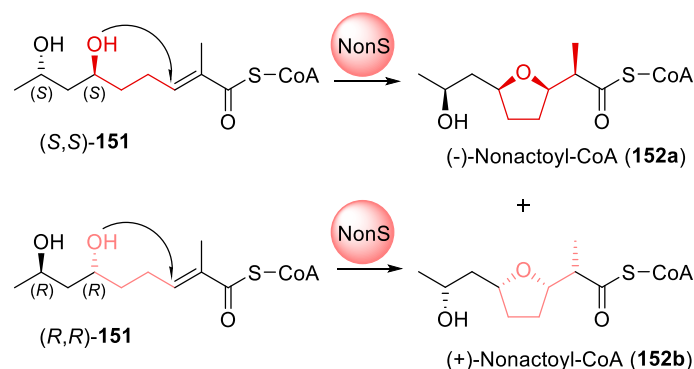


Abbildung 3-100. NonS-katalysierte Zyklisierungen der beiden Furanringe während der Nonactin (69)-Biosynthese nach WOO *et al.*<sup>[24,142]</sup>. Die durch NonS gebildeten Furanringe sind **rot** bzw. **rosa** hervorgehoben.

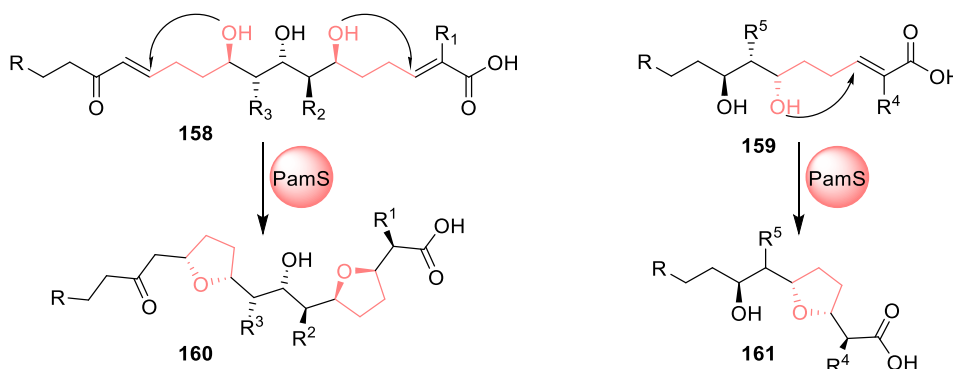


Abbildung 3-101. PamS-katalysierte Zyklisierungen der beiden Furanringe in der Pamamycin (70)-Biosynthese nach REBETS *et al.*<sup>[141]</sup>. Die durch PamS gebildeten Furanringe sind **rosa** hervorgehoben.

WOO *et al.*<sup>[111]</sup> und SMITH *et al.*<sup>[147]</sup> konnten bereits zeigen, dass NonS in der Lage ist einen realistischen *N*-Caprylcysteamin-Thioester zum Produkt **154** zu zyklisieren (Abbildung 3-102).

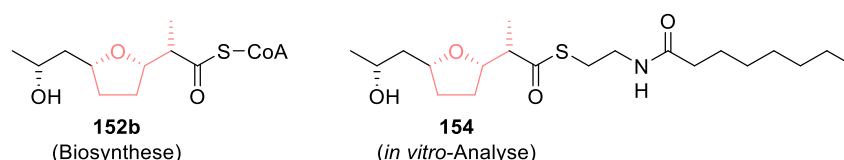
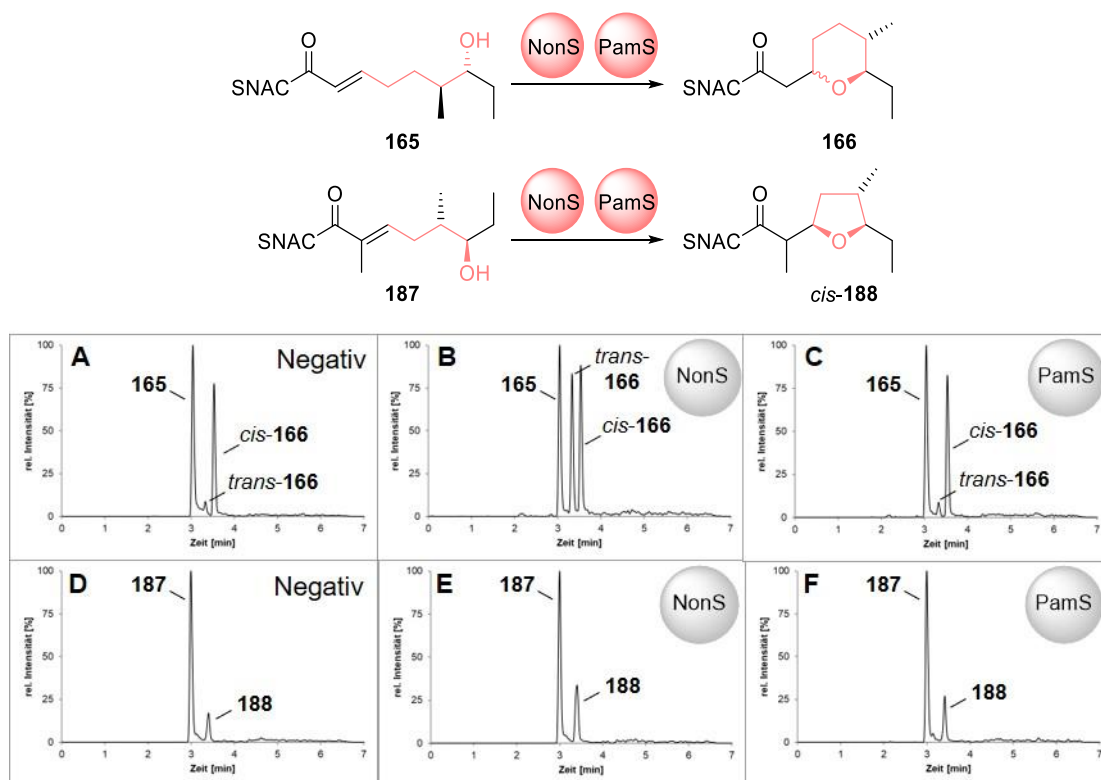


Abbildung 3-102. Produkte der NonS-katalysierten Zyklisierungsreaktion nach den Experimenten von WOO *et al.*<sup>[111]</sup> und SMITH *et al.*<sup>[147]</sup>. Der durch NonS gebildete Furanring ist **rosa** hervorgehoben.

Enzymreaktionen mit den gereinigten Enzymen NonS und PamS wurden mit den Substraten **163**, *syn*-**163**, **165**, **169**, **187**, **199**, *rac*-**205** und *rac*-**207** durchgeführt. Da der pI von NonS bei 6.4 und der von PamS bei 6.8 liegt, könnte es aufgrund der geringen Nettoladung bei pH 6.8 zur Proteinaggregation kommen. Der pH-Wert des verwendeten HEPES-Puffers wurde deshalb auf 7.8 angehoben. Für NonS zeigten sich gute Umsatzwerte für die beiden Substrate **165** und **187** (Abbildung 3-103). Spontane IMOMA-Reaktionen laufen bei höheren pH-Werten deutlich schneller ab. Die entsprechende Negativkontrolle ohne Enzym ist in Abbildung 3-103A gezeigt.



**Abbildung 3-103. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat 165 und 187:** A) Negativkontrolle von Substrat 165; B+C) Enzymreaktionen von NonS (B) und PamS (C) mit Substrat 165; D) Negativkontrolle von Substrat 187 mit Spuren von Produkt *cis*-188; E+F) Enzymreaktionen von NonS (E) und PamS (F) mit Substrat 187. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat 165 bzw. 0.1 mg (348 nmol) Substrat 187 in HEPES-Puffer (pH 7.8) (Startkonzentration 2 mM) und 1.3 mg/mL (B) bzw. 2.5 mg/mL (E) His<sub>6</sub>-NonS oder 23.0 mg/mL (C) bzw. 1.9 mg/mL (F) His<sub>6</sub>-PamS bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Für Substrat 165 ergab sich nur für NonS ein Umsatz von 25% (Abbildung 3-103B+C). Die Ergebnisse der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat 165 (Abschnitt 3.4.3.1; S. 139) legen nahe, dass NonS die Verbindung 165 – entgegen der Erwartung – zu *trans*-166 umsetzt. In der Negativkontrolle waren nur sehr geringe Mengen an *trans*-166 und es entstand lediglich das Isomer *cis*-166, weshalb dieser Wert für NonS nicht miteinbezogen wurde. NonS katalysiert in seinem Biosyntheseweg die Bildung von *cis*-konfigurierten THF-Ringen. Das um einen Kohlenstoff zu lange Substrat 165 könnte der Grund sein, weshalb sich das Substrat in der aktiven Tasche der Enzyme anders orientiert und folglich eine invertierte Stereokonfiguration gebildet wird.

Die Enzymreaktion mit Verbindung 187 zeigte für NonS einen Umsatz von 14% (Abbildung 3-103E), wobei für PamS ebenfalls keine Zyklisierung beobachtet wurde (Abbildung 3-103F). Eine Aussage über die gebildete Konfiguration kann nicht getroffen werden, wobei vermutet wird, dass ein *cis*-konfigurierter THF-Ring gebildet wird, da das eingesetzte Substrat dem biosynthetischen Vorläufer 214 recht ähnlich ist (Abbildung 3-105).

Enzymreaktionen von NonS und PamS mit den optimierten THF-Vorläufern *rac*-**205** und *rac*-**207** sollten zeigen, ob die Zyklisierungsaktivität der Enzyme gesteigert werden kann (Abbildung 3-104).<sup>[200]</sup> Die beiden Substrate zeichnen sich durch die fehlende Methylverzweigung an C-5 aus und ähneln damit dem natürlichen Vorläufer **214** von NonS und PamS noch mehr (Abbildung 3-105).

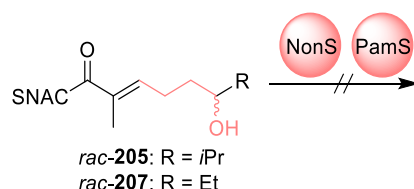


Abbildung 3-104. NonS- bzw. PamS-katalysierte Zyklisierung der beiden Substrate *rac*-**205** und *rac*-**207**.

Dabei lagen die Substrate **205** und **207** jeweils als Diastereomergemisch vor, weshalb in der UPLC-MS-Analyse mehrere Signale auftraten (Abbildung 8-111A+B bis Abbildung 8-110A+B). Die Chromatogramme zeigen neben den Edukten auch die Umsetzung mit Lysat und gereinigtem Enzym bei pH 6.8 (Abbildung 8-111 und Abbildung 8-109) bzw. 7.8 (Abbildung 8-112 und Abbildung 8-110). Bei Betrachtung der Chromatogramme wird deutlich, dass sowohl mit NonS als auch PamS unter keinen Bedingungen Umsatz zu einem zyklischen Produkt erzielt werden konnte, da sich die Verhältnisse der Signale in den Chromatogrammen nach Enzymreaktionen nicht von denen der Negativkontrolle unterscheiden. Bei einer Umsetzung von *rac*-**205** und *rac*-**207** zu den zyklischen Produkten **206** und **208** wären weitere Signale mit gleicher Masse und einer höheren Retentionszeit zu erwarten gewesen.

Dennoch scheint NonS grundsätzlich in der Lage zu sein Sechs- sowie Fünfringe zu bilden. Für PamS war die Aktivität mit den getesteten Substraten sehr gering, weshalb hier keine Aussage getroffen werden kann (Abbildung 3-105).

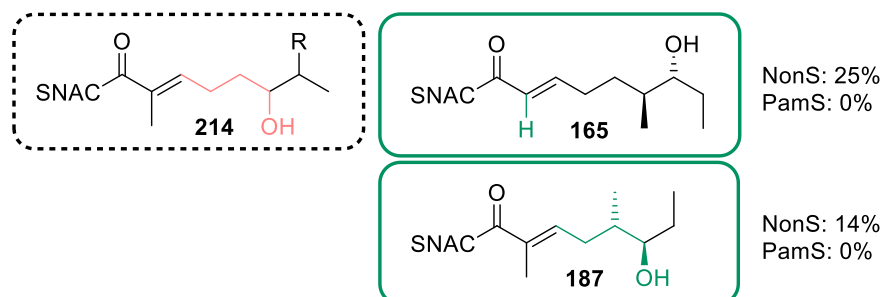


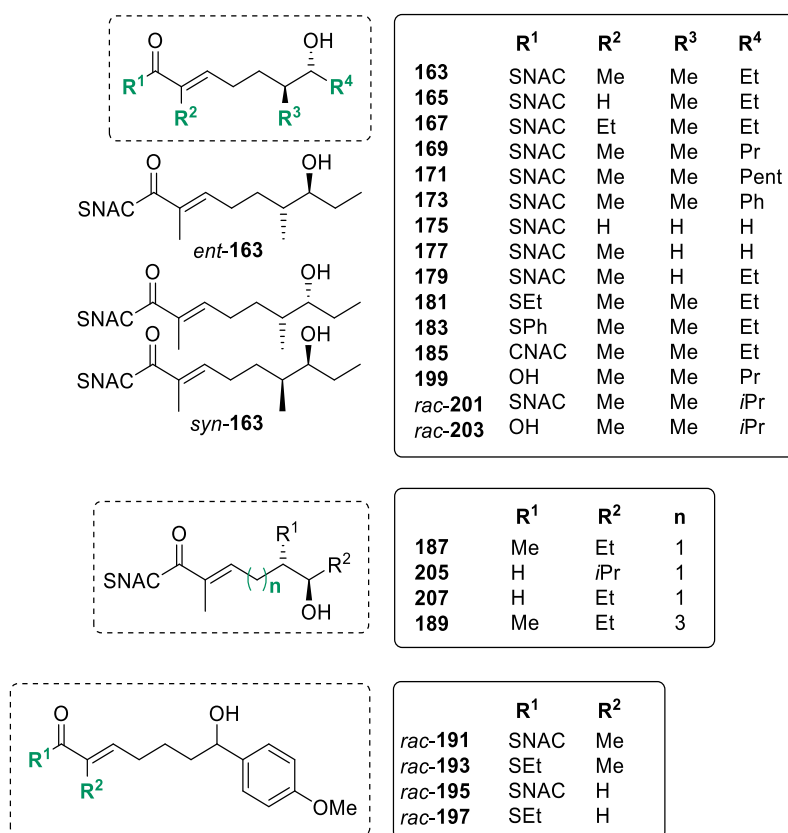
Abbildung 3-105. Hypothetischer Vorläufer **214** von NonS und PamS (schwarzer Kasten) und von NonS akzeptierte Substrate **165** und **187** (grüner Kasten). R = H oder Me. Die Umsatzwerte können zudem Tabelle 3-15 (S. 148) entnommen werden.

NonS und PamS katalysieren beide im jeweiligen Biosyntheseweg den THF-Ringschluss *via* oxa-MICHAEL-Addition. Für Enzymreaktionen mit NonS und PamS könnte eine verstärkte

Umsetzung durch Verwendung von Substraten gewährleistet werden, welche um eine zusätzliche Methylgruppe verlängert sind und zwei benachbarte Hydroxygruppen besitzen. Allen verwendeten Substraten fehlt, verglichen mit dem natürlichen Substrat, die zusätzliche, benachbarte Hydroxygruppe. Die Substrate **187**, *rac*-**205** und *rac*-**207** sind außerdem um eine Methylengruppe verkürzt, von denen zumindest Verbindung **187** in geringem Maße umgesetzt wurde (14% Umsatz durch NonS). Der Einbau einer zusätzlichen Alkoholfunktion – wie sie in den natürlichen Diolvorläufern vorliegt (siehe Abschnitt 1.3.4, S. 34) – könnte eine konformative Änderung der Substrate in den aktiven Enzymtaschen durch neu ausgebildete Enzym-Substrat-Wechselwirkungen begünstigen und daher notwendig sein.

### 3.4.5. Zusammenfassung

Die Strukturen der getesteten Substrate sind in Abbildung 3-106 dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro*-Enzymreaktionen ist in Tabelle 3-15 zu finden. Die Konfiguration einiger Produkte an C-2 und C-3 konnten mit den vorliegenden Daten nur zum Teil bestimmt werden. Für eine eindeutige Bestimmung der Stereochemie der Produkte könnten weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen oder eine Röntgenstrukturanalyse erfolgen.



**Abbildung 3-106.** Strukturen der Substrate, die mit den zur Verfügung stehenden Enzymen auf eine mögliche Zyklisierung getestet wurden. Die Umsatzwerte für die enzymkatalysierten Zyklisierungen können der nachfolgenden Tabelle 3-15 entnommen werden.

Tabelle 3-15. Zusammenfassung der Umsatzwerte für die enzymkatalysierten Zyklisierungen.

Enzym Substrat	Umsatz [%]							
	Amb DH3	PedPS7	SorPS8	Ind Cyc11	ZinJ	Sal BIII	NonS	PamS
<b>163</b>	quant.	84	0	0	0	0	0	0
<i>rac</i> -163	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ent</i> -163	-	32	-	0	0	-	-	-
<i>syn</i> -163	-	-	-	14	0	0	0	0
<b>165</b>	quant.*	77	-	10	0	0	25	0
<b>167</b>	>95	51	-	0	-	0	-	-
<b>169</b>	-	84	-	0	0	0	0	0
<b>171</b>	69	39	-	0	0	0	-	-
<b>173</b>	37	62	-	0	0	0		
<b>175</b>	>95	61	-	-	-	-	-	-
<i>rac</i> -177	42	0	-	0	-	-	-	-
<i>rac</i> -179	-	19 / 47	-	-	-	0	-	-
<b>181</b>	-	<u>44</u>	-	-	-	-	-	-
<b>183</b>	-	<u>42</u>	-	-	-	-	-	-
<b>185</b>	30	-	-	-	-	-	-	-
<b>187</b>	-	>95*	-	48	0	0	14	0
<b>189</b>	-	0	-	-	-	-	-	-
<i>rac</i> -191	-	6 / 11	-	-	-	0	-	-
<i>rac</i> -193	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rac</i> -195	-	46 / 35	-	-	-	0	-	-
<i>rac</i> -197	-	<u>48 / 46</u>	-	-	-	-	-	-
<b>199</b>	-	-	-	0	0	0	0	0
<i>rac</i> -201	-	-	-	0	0	-	-	-
<i>rac</i> -203				0	0			
<i>rac</i> -205	-	-	-	-	-	-	0	0
<i>rac</i> -207	-	-	-	-	-	-	0	0
Anzahl der akzeptierten Substrate / Gesamtzahl	8 / 8	15 / 17	0 / 1	3 / 13	0 / 11	0 / 12	2 / 8	0 / 8

Grün hinterlegte Felder zeigen an, dass ein Umsatz >5% beobachtet wurde, bei rot hinterlegten Feldern hingegen nicht. „\*“ deutet auf eine spontane Zyklisierung des Substrates. Der Wert der spontanen Zyklisierung wurde beim angegebenen Umsatzwert bereits abgezogen sofern das Zeichen „\*“ beim Umsatz nicht angegeben ist. Bei Angabe von zwei Werten innerhalb einer Zelle wurden verschiedene Stereoisomere gebildet. Die Enzymreaktionen wurden in einem Maßstab von 0.1 mg bei einer Substratkonzentration von 2 mM durchgeführt. Unterstrichene Werte wurden zur Konfigurationsbestimmung *via* NMR-Spektroskopie in einem Maßstab von 1 mg bei einer Substratkonzentration von 2 mM durchgeführt und können aufgrund der variierenden Bedingungen nur eingeschränkt mit den Ergebnissen aus den UPLC-MS-Analysen verglichen werden (siehe Abschnitt 3.4.2.1.4, S. 128).

Die Pyransynthase **PedPS7** zeigte sich neben AmbDH3 am vielversprechendsten hinsichtlich einer möglichen Verwendung als Biokatalysator. Lediglich bei zwei der getesteten Substrate

wurde mit PedPS7 kein Umsatz beobachtet. Wie auch schon bei den Enzymtests von PIEL *et al.*<sup>[22]</sup> zeigte PedPS7 eine hohe Stereoselektivität. Die hohe Substrattoleranz von PedPS7 wird bei näherer Betrachtung der Substrate deutlich: neben Substraten mit sterisch anspruchsvollen Substituenten (*rac*-**191**, *rac*-**195** und *rac*-**197**) war PedPS7 auch in der Lage, die Verbindung **187** zum Produkt **188** mit THF-Ring umzusetzen. Zudem konnte das Enzym die Substrate unabhängig von ihrer C-7-Konfiguration zyklisieren. PedPS7 zeigte damit eine zu AmbDH3 vergleichbar hohe Aktivität und bildete dabei *trans*-konfigurierte Heterozyklen. Mit den gezeigten Eigenschaften von PedPS7 scheint Potential für die mögliche Verwendung der Zyklase in der chemoenzymatischen Synthese vorhanden zu sein. Eine Zyklisierung mit der Pyransynthase **SorPS8** war hingegen nicht möglich, wobei nur ein Substrat getestet wurde und deshalb weitere Tests nötig sind.

**IndCyc11** zeigt nur bei den Substraten *syn*-**163**, **165** und **187** Zyklisierungsaktivität, sodass hier eine geringere Substrattoleranz vermutet werden kann. Für die Zyklenen **ZinJ** und **SalBIII** konnte keine Aktivität mit den getesteten Substraten beobachtet werden. Die beiden Enzyme scheinen eine geringe Substrattoleranz zu besitzen bzw. inaktiv zu sein. Auffällig ist, dass alle drei der homologen Zyklenen IndCyc11, ZinJ und SalBIII keine bzw. nur wenig Aktivität zeigen. In den *in vitro*-Aktivitätstests von LEADLEY *et al.*<sup>[104]</sup> mit SalBIII wurde ein hochrealistischer Vorläufer verwendet, der aus einer *Knockout*-Mutante isoliert wurde. Die geringe Anzahl der zyklisierten Substrate spricht für eine geringe Substrattoleranz, die charakteristisch für diese Klasse von Zyklenen sein könnte. Zudem könnten die getesteten Substrate strukturell zu stark von den natürlichen Substraten der Zyklenen abweichen. IndCyc11, ZinJ und SalBIII agieren in ihren jeweiligen Biosynthesewegen erst nach vollständiger Assemblierung der Polyketidkette, sodass die getesteten Substrate vermutlich zu klein waren, um von den Enzymen akzeptiert zu werden. Außerdem unterschied sich die Konfiguration an C-6 und C-7 der meisten getesteten Substrate. Einzig ein Stereoisomer von Substrat *syn*-**163** besaß die gleiche 6*D*,7*L*-Konfiguration wie die putativen biosynthetischen Vorläufer von IndCyc11, ZinJ und SalBIII. Bereits bei AmbDH3 zeigte sich ein ganz entscheidender Einfluss der Konfiguration der Stereozentren an C-6 und C-7.<sup>[182]</sup>

**NonS** konnte die beiden Substrate **165** und **187** zum entsprechenden Pyran bzw. Furan zyklisieren. Die Zyklase ist somit in der Lage, sowohl die Bildung von THP- als auch THF-Ringen zu katalysieren. Dabei bildet sie vermutlich *trans*-konfigurierte Pyrane und *cis*-konfigurierte Furane. Der Grund für die invertierte Stereokonfiguration in den gebildeten Produkten könnte die Rückgratlänge des eingesetzten Substrats sein. **PamS** hingegen war nicht



in Lage eines der getesteten Substrate zu zyklisieren. Weitere Untersuchungen der beiden Enzyme hinsichtlich ihrer Substrattoleranz mit Analoga von **187**, wie beispielsweise *rac*-**205** und *rac*-**207**, führten nicht zu zyklisiertem Produkt. Gezielte Studien mit weiteren Substratsurrogaten wären notwendig, um bestimmte Fragestellungen konkret beantworten zu können.

Letztendlich konnten erste Schritte in Richtung der Etablierung einer Biokatalyse-Toolbox erreicht werden. Die Enzyme AmbDH3, PedPS7, IndCyc11 und NonS konnten durch heterologe Expression in aktiver Form hergestellt werden. In *in vitro*-Umsetzungen war es möglich verschiedene Pyrane und Furane mit unterschiedlichen Konfigurationen biokatalytisch zu bilden. Für die drei letztgenannten Enzyme bedarf es nun ausführlicher Studien zur substratabhängigen Stereoselektivität und zur Verbesserung der präparativ-synthetischen Handhabbarkeit nach dem Muster der vorgestellten Untersuchungen zu AmbDH3. Im Fall der Enzyme SorPS8, SalBIII, ZinJ und PamS müssten die bisher durchgeführten Studien mit dem vornehmlichen Ziel fortgesetzt werden, eine *in vitro*-Aktivität bei Umsetzungen passenderer Substratsurrogate im analytischen Maßstab zu erreichen.

### 3.5. Enzymaktivitätstests mit immobilisiertem Protein

Eine Immobilisierung verbessert den synthetischen Wert von Enzymen vor allem durch deren Stabilisierung und die Möglichkeit zur mehrmaligen Wiederverwendung. Für die Immobilisierung von AmbDH3 und PedPS7 wurden prinzipiell zwei verschiedene, einfach anwendbare Methoden getestet und die immobilisierten Enzyme hinsichtlich Stabilität und Zyklisierungsaktivität untersucht. Es handelte sich dabei um eine Immobilisierung durch Bindung des Protein-*tags* an ein Affinitätsmaterial oder Quervernetzung der Proteine untereinander stattfinden.

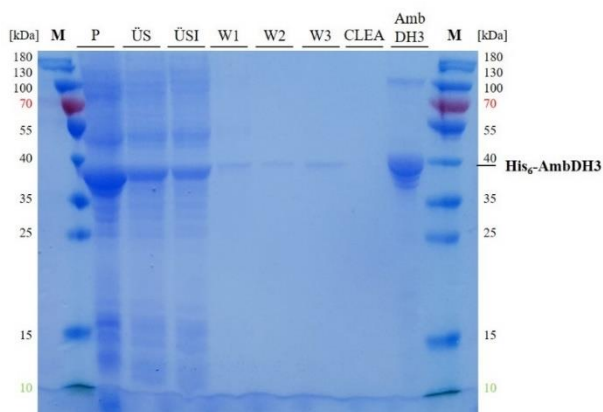
#### 3.5.1. Immobilisierung *via* His<sub>6</sub>-tag

Bei der Immobilisierung durch Bindung eines Protein-*tags* an ein Affinitätsmaterial werden die Schritte der Reinigung mittels Affinitätschromatographie und der Immobilisierung vereint. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine liegen als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine vor.

Daher wurde versucht AmbDH3 aus dem Zelllysat an zwei verschiedenen Materialien mit Affinität zu His<sub>6</sub>-*tags* zu fixieren. Die Bindung der AmbDH3 an Ni-NTA und Ni-TED wurde mittels SDS-PAGE untersucht und die Wiederverwendbarkeit der immobilisierten Proteine mittels *in vitro*-Reaktionen überprüft.

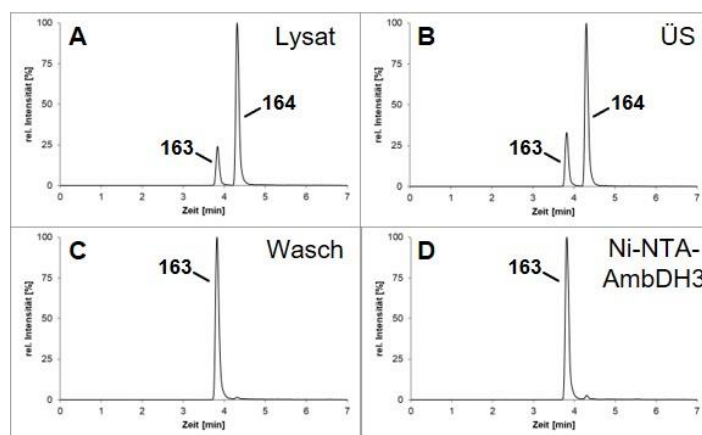
##### 3.5.1.1. Ni-NTA

In diesem Fall wurde das Säulenmaterial Ni-NTA zur Immobilisierung der Proteine genutzt. Hierzu wurde das zentrifugierte filtrierte AmbDH3-Lysat zur Ni-NTA-Agarose gegeben und zur Bindung an das Säulenmaterial inkubiert. Die nachfolgenden Waschschrte entfernten ungebundene Proteine. Das finale, gewaschene Ni-NTA-AmbDH3 wurde anschließend in Enzymaktivitätstests mit Substrat **163** eingesetzt. Zur Überprüfung der Immobilisierungseffizienz wurden ebenfalls Enzymreaktionen mit dem Überstand nach der Immobilisierung und der dritten (letzten) Waschfraktion nach der Immobilisierung durchgeführt.



**Abbildung 3-107. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Immobilisierung von His<sub>6</sub>-AmbDH3 (34 kDa) mithilfe des Zellysates von *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH3 an Ni-NTA-Agarose.** Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung, der Überstand nach Immobilisierung (ÜSI), die erste (W1), zweite (W2) und dritte Waschfraktion (W3) nach Inkubation der Ni-NTA-Agarose mit dem Zellysate, das finale Produkt AmbDH3-CLEA (CLEA) und zum Vergleich die gereinigte Enzymlösung (AmbDH3).

Die Analyse zeigte dabei im Pellet des Zellysates eine sehr intensive Bande bei 35-40 kDa, bei der es sich um unlösliches AmbDH3 handelt (Abbildung 3-107). Auch der Überstand des Zellysates und der Überstand der Ni-NTA-Agarose nach Inkubation mit dem Lysat wiesen deutlich Mengen an AmbDH3 auf. Die drei Waschfraktionen der Ni-NTA-Agarose enthielten geringe Enzymmengen, die offenbar nicht an das Säulenmaterial gebunden haben. Die Bindungskapazität der Ni-NTA-Agarose war möglicherweise überschritten oder die Affinität des His<sub>6</sub>-markierten Proteins zu gering, da vor allem im Überstand, aber auch in allen Waschfraktionen AmbDH3 vorhanden war. Es handelte sich um bereits verwendete, möglicherweise mangelhafte Ni-NTA-Agarose, weshalb diese womöglich eine geringere Bindungskapazität aufwies. Das immobilisierte Enzym Ni-NTA-AmbDH3 wurde anschließend in Enzymreaktionen mit Substrat **163** eingesetzt und mittels UPLC-MS analysiert (Abbildung 3-108).



**Abbildung 3-108. UPLC-MS-Chromatogramme der *in vitro*-Enzymreaktionen von AmbDH3 bzw. Ni-NTA-AmbDH3 mit Substrat **163**.** Die Reaktionen wurden durchgeführt mit A) Zellysate, B) dem Überstand nach der Immobilisierung, C) der dritten Waschfraktion nach Immobilisierung und D) immobilisiertem Ni-NTA-AmbDH3. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion des entsprechenden AmbDH3-Immobilisierungsschrittes bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

**Tabelle 3-16.** Umsatzwerte für die Enzymreaktionen mit verschiedenen Fraktionen der AmbDH3-Immobilisierung an Ni-NTA-Agarose.

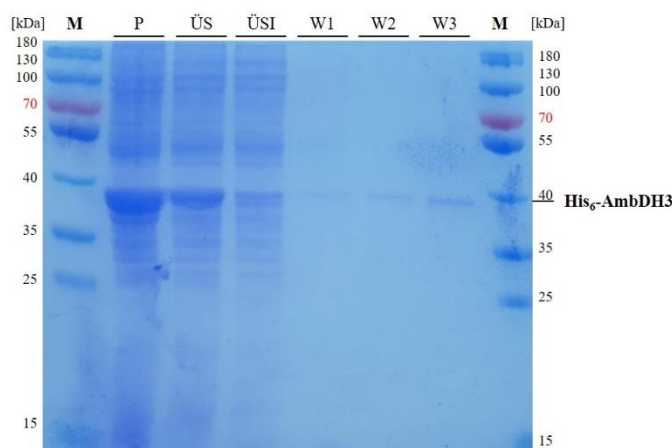
	Fraktion der Präparation von Ni-NTA-AmbDH3			
	Lysat	Überstand nach Immobilisierung	Waschschritt nach Immobilisierung	Ni-NTA-AmbDH3
Umsatz [%]	73	66	0	0

Die UPLC-MS-Analyse der *in vitro*-Reaktionen mit Ni-NTA-AmbDH3 (Abbildung 3-108) zeigte, dass sowohl das Zelllysate, als auch der Überstand nach Inkubation des Lysates mit der Ni-NTA-Agarose in der Lage waren Substrat **163** mit 73 bzw. 66% umzusetzen. Im Gegensatz dazu wurde mit der dritten Waschfraktion, die nur geringe Mengen AmbDH3 enthielt, und mit dem Endprodukt Ni-NTA-AmbDH3 kein Umsatz beobachtet. Die ausbleibende Umsetzung des immobilisierten Proteins im Vergleich zum Zelllysate zeigte, dass das immobilisierte Enzym entweder keine Aktivität mehr besaß oder die Ni-NTA-Agarose nur minimale Mengen AmbDH3 binden konnte (vergleiche Abbildung 3-108).

### 3.5.1.2. Ni-TED

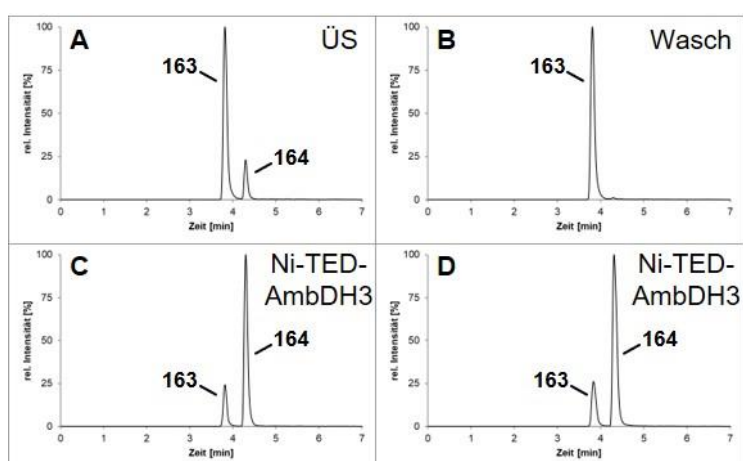
Bei der Bindung eines Enzyms an Ni-TED *Silica Beads* handelt es sich ebenso wie bei der Bindung an Ni-NTA-Agarose um eine gerichtete, reversible Immobilisierungsmethode. Vorteil ist, dass der bereits an allen Enzymen fusioniert vorliegende His<sub>6</sub>-tag für die Bindung an Ni-TED *Silica Beads* genutzt werden kann. Der Ligand TED kann mit Ni<sup>2+</sup> einen Chelatkomplex bilden, wobei Proteine mit Histidin-reichen Sequenzen an das Metall-Kation binden können. Analog zur Immobilisierung *via* Ni-NTA können Proteine durch Adsorption an Ni-TED immobilisiert werden.

Für die Bindung von AmbDH3 an Ni-TED wurden zunächst Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und das erhaltene Lysate mit Ni-TED *Silica Beads* inkubiert (Abbildung 3-109).



**Abbildung 3-109.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Immobilisierung von AmbDH3 (34 kDa) aus Zelllysats aus *E. coli* BL21 pET28a(+)*\_ambDH3* an Ni-TED *Silica Beads*. Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung, der Überstand nach Immobilisierung an Ni-TED *Silica Beads* (ÜSI), die erste (W1), zweite (W2) und dritte Waschfraktion (W3) nach Inkubation der Ni-TED *Silica Beads* mit Zelllysats. Die Volumina der aufgetragenen Proben innerhalb eines Gels stehen in Relation zum Volumen der jeweiligen Fraktion.

Die Analyse der Immobilisierung von AmbDH3 an Ni-TED *Silica Beads* zeigte im Pellet des Zelllysates eine intensive Bande von AmbDH3 zwischen 35 und 40 kDa. Auch der Zelllysats-Überstand enthielt deutliche Mengen des Enzyms. Nach Inkubation des Zelllysates mit den Ni-TED *Silica Beads* zeigte der entsprechende Überstand, anders als bei der Ni-NTA-Agarose (Abbildung 3-107) eine stark verringerte Bandenintensität bei 35–40 kDa. Die Fraktionen der drei Waschschrte wiesen geringe Mengen an AmbDH3 auf. Ein Großteil des im Überstand enthaltenen AmbDH3 hat somit an die Ni-TED *Silica Beads* gebunden. Die nachfolgende Analyse der Aktivität von Ni-TED-AmbDH3 erfolgte ebenfalls *via* UPLC-MS (Abbildung 3-110).



**Abbildung 3-110.** UPLC-MS-Chromatogramme der *in vitro*-Enzymreaktionen von AmbDH3 bzw. Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163. Die Reaktionen wurden durchgeführt mit A) dem Überstand nach Immobilisierung, B) der dritten Waschfraktion nach Immobilisierung, C) Ni-TED-AmbDH3 und D) einmalig wiederverwendetem Ni-TED-AmbDH3. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat 163 in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion des entsprechenden AmbDH3-Immobilisierungsschrittes bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

**Tabelle 3-17. Umsatzwerte für die Enzymreaktionen mit verschiedenen Fraktionen der Immobilisierung von AmbDH3 an Ni-TED *Silica Beads*.**

	Fraktion der Präparation von Ni-TED-AmbDH3			
	Überstand nach Immobilisierung	Waschschritt nach Immobilisierung	Ni-TED-AmbDH3	Recyceltes Ni-TED-AmbDH3
Umsatz [%]	26	0	73	71

Dass für den Überstand nach Immobilisierung lediglich ein Zyklisierungsumsatz von 12% beobachtet wurde (Abbildung 3-110A) deutet darauf hin, dass der Großteil von AmbDH3 an die Ni-TED *Silica Beads* gebunden hat und die Immobilisierung somit erfolgreich verlief. Nach dreimaligem Waschen zeigte sich im Enzymaktivitätstest kein Zyklisierungsumsatz (Abbildung 3-110B). Die vorherige Analyse *via* SDS-PAGE (Abbildung 3-107) zeigte Proteinbanden für AmbDH3 in den Waschfraktionen, weshalb das darin vorliegende Protein vermutlich inaktiv vorlag. Der erste Versuch der Immobilisierung von AmbDH3 an Ni-TED *Silica Beads* verlief mit einem Zyklisierungsumsatz von 73% erfolgreich (Abbildung 3-110C). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ni-TED-AmbDH3 nach Reaktionsende wiederverwendbar ist. Nach einmaliger Nutzung und darauffolgender Wiederverwendung von Ni-TED-AmbDH3 wurde immer noch ein Umsatz von 71% erzielt (Abbildung 3-110D). Das immobilisierte Enzym zeigte trotz 16-stündiger Inkubation bei 30 °C keinen in diesem Experiment erkennbaren Aktivitätsverlust.

Darauffolgend wurde getestet, ob das an Ni-TED immobilisierte AmbDH3 in zehn aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen wiederverwendet werden kann. Hierzu wurde Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat **163** inkubiert und nach 16 h Reaktionszeit durch Zentrifugation abgetrennt. Nach dreimaligem Waschen von Ni-TED-AmbDH3 wurde dieses in einem neuen Reaktionszyklus eingesetzt. Die Umsätze der einzelnen Reaktionen sind in folgender Tabelle 3-18 dargestellt.

**Tabelle 3-18. Umsatzwerte von Ni-TED-AmbDH3 nach Verwendung in 10 aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen**

	Anzahl der Reaktionszyklen									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Umsatz [%]	63	67	55	60	47	41	40	29	22	17
Abweichung [%]	7	8	5	6	10	9	9	14	16	15

Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die Experimente wurden in einer Zweifachbestimmung durchgeführt.

Nach erfolgter Reaktion konnten die *Silica Beads* durch Zentrifugation abgetrennt und wiederverwendet werden. Nach zehnmaliger Wiederverwendung von Ni-TED-AmbDH3 sank der Umsatz von anfänglichen 63 auf 17% (Abbildung 3-127). Bei jedem Waschschrift wurden unbeabsichtigt Ni-TED *Silica Beads* verworfen, was die Umsatzeinbußen von 46% erklärt. Optimierungen der Präparation und Aufarbeitung könnten dazu führen, dass höhere Umsätze erzielt werden können.

### 3.5.2. Immobilisierung als *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs)

Die Quervernetzung von Enzymen als CLEAs ist allgemein eine gut etablierte Methode, um Enzyme nach einfachem Protokoll zu immobilisieren. FRESE und SEWALD zeigten im Jahr 2015, dass sowohl die Stabilität als auch die synthetische Effizienz der Tryptophan-Halogenase RebH in Kombination mit weiteren Enzymen zur Cofaktorregeneration durch Quervernetzung deutlich erhöht wurden.<sup>[159]</sup> Um zu überprüfen, ob diese Immobilisierung ebenfalls bei den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen zur Verbesserung der Stabilität und Effizienz beitragen könnte, wurden Studien zur permanenten Immobilisierung mittels Bildung von *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) durchgeführt (Abbildung 3-111). Dabei lag der Fokus auf den beiden Enzymen AmbDH3 und PedPS7, da diese die vielversprechendsten Kandidaten darstellten.

Für die Präparation von CLEAs wird dem Lysat zunächst ein Fällungsmittel (wie z.B. Ammoniumsulfat) zugesetzt. Dadurch konkurrieren die Ionen mit den Proteinen um das Hydratwasser und entziehen es ihnen. Durch die Verringerung der Hydrathülle um die Proteine kommt es zu Wechselwirkungen der Proteine untereinander. Folglich fallen die im Lysat enthaltenen Proteine aufgrund dieses Aussalzeffektes aus, behalten dabei aber ihren nativen Zustand bei. Durch Variation der Ammoniumsulfatmenge kann die ungefähre Größe der präzipitierenden Proteine beeinflusst werden. Ammoniumsulfat ist dabei als Fällungsmittel optimal, da es die biologische Aktivität der Proteine nicht beeinflusst, gut wasserlöslich ist und keine signifikante Lösungswärme zeigt.<sup>[201]</sup> Im Anschluss erfolgt die Zugabe eines Crosslinkers, der oberflächenexponierte Arginin- und Lysinreste miteinander vernetzt. Die katalytischen Eigenschaften von CLEAs sind abhängig vom Präzipitationsmittel, da verschiedene Fällungsmittel unterschiedliche Konformationen der Enzymaggregate induzieren. Glutaraldehyd (GA) ist das am häufigsten verwendete Quervernetzungsmittel für die Herstellung von CLEAs, da es neben niedrigen Kosten und hoher Marktverfügbarkeit eine hohe Umwandlungseffizienz erreicht. CLEAs können, verglichen mit dem freien Enzym, stabiler sein, da diese eine höhere Toleranz gegenüber schweren Reaktionsbedingungen wie pH-Wert, organische Lösungsmittel, Temperatur aufweisen können. Sie sind außerdem resistenter

gegenüber Inhibitoren oder Denaturierungsmitteln.<sup>[202]</sup> Nach erfolgreicher Quervernetzung erfolgen mehrere Waschschrte, wobei im Anschluss das fertige quervernetzte Enzym vorliegt.



**Abbildung 3-111. Fotos von AmbDH3-CLEA:** A) Verschiedene GA-Konzentrationen (v.l.n.r. 0.5; 1; 2 und 5%), die zum Crosslinking getestet wurden; B) Finales AmbDH3-CLEA.

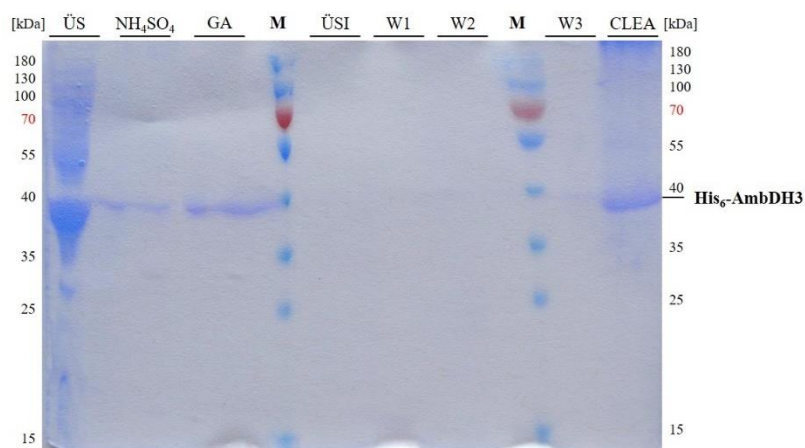
### 3.5.2.1. AmbDH3-CLEA

Es erfolgten einige Modifikationen der Bedingungen, um die Effizienz der Immobilisierung von AmbDH3 zu steigern. Der Verlauf der Immobilisierung wurde *via* SDS-PAGE verfolgt und im Anschluss wurden Enzymreaktionen durchgeführt, um zu ermitteln, ob das Enzym weiterhin die gleiche Aktivität wie im nativen Zustand besitzt.

#### 3.5.2.1.1. Vergleich von IPTG- und Autoinduktion

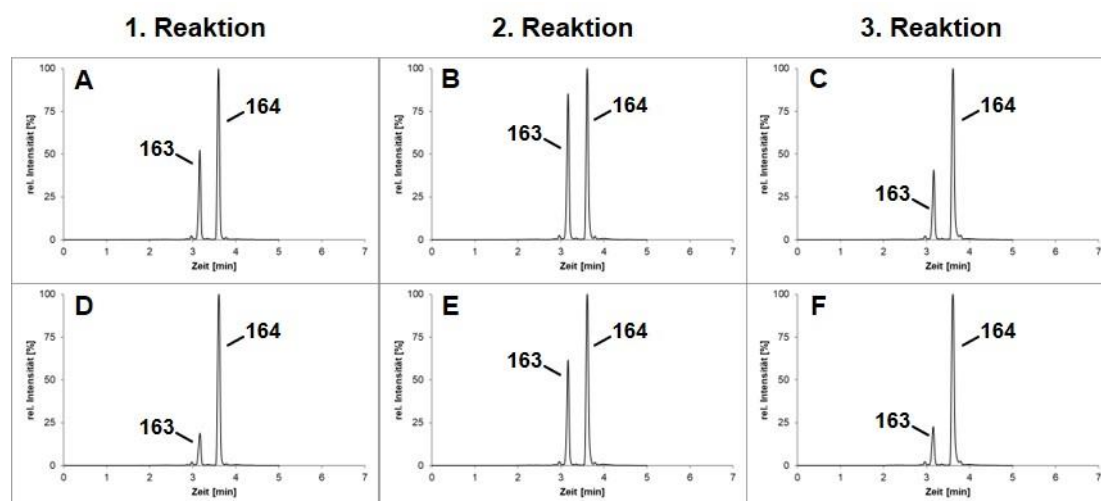
Die Immobilisierung wurde zunächst mit Zellen aus IPTG-induzierter sowie autoinduzierter Genexpression durchgeführt, um die Expressionsbedingungen für den höchstmöglichen Umsatz zu identifizieren. Hierfür erfolgte ein Aufschluss des Zellpellets von *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>ambDH3</sub> mittels Ultraschallbehandlung. Dem zentrifugierten, filtrierten Lysat wurde Ammoniumsulfat zugesetzt. Dadurch wurde ein Aussalz-Effekt hervorgerufen, wodurch alle im Lysat enthaltenen Proteine in nativer Form präzipitieren. Durch Zugabe von GA erfolgte eine Quervernetzung zwischen oberflächenexponierten Argininen und Lysin. Nach dreimaligem Waschen mit Puffer wurde das CLEA-Pellet zur Durchführung von Enzymreaktionen verwendet.





**Abbildung 3-112. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Bildung von AmbDH3-CLEA (34 kDa).** Die Immobilisierung erfolgte mit Zellysats aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>ambDH3</sub>. Aufgetragen wurden Marker (M), Überstand nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung (ÜS), nach Ammoniumsulfatzugabe (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>), nach GA-Zugabe (GA), nach Fällung der immobilisierten Proteine (ÜSI), nach den drei Waschschrissen (W1–3) und nach Resuspendieren des Endproduktes (CLEA).

Sowohl im Überstand nach Zellaufschluss als auch im Endprodukt sind deutliche Proteinbanden erkennbar, die AmbDH3 entsprechen (Abbildung 3-112). In den Waschfraktionen sind nur sehr schwache Banden erkennbar, was darauf deutet, dass der Großteil des Enzyms erfolgreich quervernetzt wurde. Für die nachfolgenden Enzymreaktionen wurde das immobilisierte Enzym in Natriumphosphat-Puffer resuspendiert und mit Substrat **163** inkubiert. Nach Beendigung der Enzymreaktion erfolgte die Abtrennung des CLEA-Pellets durch Zentrifugation. Das gewaschene CLEA-Pellet wurde daraufhin in einem weiteren Reaktionszyklus wiederverwendet (Abbildung 3-113 und Tabelle 3-19).



**Abbildung 3-113. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Die Enzymreaktionen wurden mit verschiedenen Proben der Immobilisierung durchgeführt: AmbDH3-CLEA aus Zellen mit autoinduzierter (A–C) bzw. IPTG-induzierter Genexpression (D–F) nach Einsatz in bis zu drei Reaktionszyklen. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Der Unterschied zwischen den Umsätzen von AmbDH3-CLEA aus auto- und IPTG-induzierter Genexpression ist von Anfang an erkennbar. Die Differenz der Umsätze zwischen den beiden unterschiedlichen Arten der Induktion beträgt über drei Reaktionen durchschnittlich 13%. Somit zeigt sich, dass die Immobilisierung von AmbDH3 aus IPTG-induzierter Genexpression erfolgreicher in Bezug auf die erhaltenen Umsätze verlief. Vermutlich lag dies an der niedrigeren AmbDH3-Menge aufgrund geringerer Zelldichten oder einer schwächeren *ambDH3*-Expression während der Kultivierung (vergleiche Abbildung 3-7).

**Tabelle 3-19. Umsätze der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach Verwendung in drei aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen.**

AmbDH3-CLEA aus...	Umsatz [%]		
	1. Reaktion	2. Reaktion	3. Reaktion
...autoinduzierter Genexpression	67	45	65
...IPTG-induzierter Genexpression	84	55	76

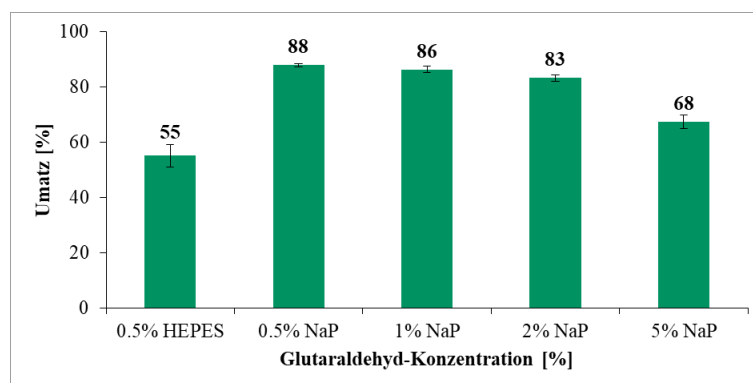
Auch nach zweimaliger Wiederverwendung von AmbDH3-CLEA zeigte sich, dass das Enzym nach Regeneration weiterhin aktiv verblieb und Produkt *cis-164* bildete. Durch die Quervernetzung konnte somit aktives, immobilisiertes Enzym erhalten werden. Der nächste Schritt war die Optimierung der CLEA-Präparation und Untersuchung der mehrfachen Wiederverwendbarkeit.<sup>[203,204]</sup>

#### 3.5.2.1.2. Optimierung der CLEA-Präparation und -Reaktion

Der Umsatz von AmbDH3-CLEA (86%) lag von Anfang an deutlich über dem der AmbDH3-Ni-TED *Silica Beads* (63%). Da die Quervernetzung als CLEA mit einem anfänglichen Umsatz von 84% deutlich besser funktionierte als die Methode der Bindung an Ni-TED *Silica Beads* mit einem mittleren Umsatz von 44%, wurde sich in folgenden Experimenten auf die Untersuchung der CLEAs konzentriert. Bei einer Übertragung der Methode auf andere Zyklasten ist es von Vorteil auf verschiedene etablierte Protokolle zurückgreifen zu können, falls eine der beiden Immobilisierungsmethoden zu instabilem oder inaktivem Enzym führt. Da die CLEA-Präparation vielversprechende Ergebnisse erzielte und generell präparativ einfach umzusetzen ist wurden keine weiteren Immobilisierungsmethoden getestet.

### 3.5.2.1.2.1. GA-Konzentration und Reaktionspuffer

Zunächst wurden die Bedingungen der CLEA-Präparation optimiert und zwei verschiedene Reaktionspuffer getestet. Hierfür wurde die Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** in HEPES- und Natriumphosphat-Puffer getestet. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener GA-Konzentrationen beim *Crosslinking* untersucht (Abbildung 3-114).

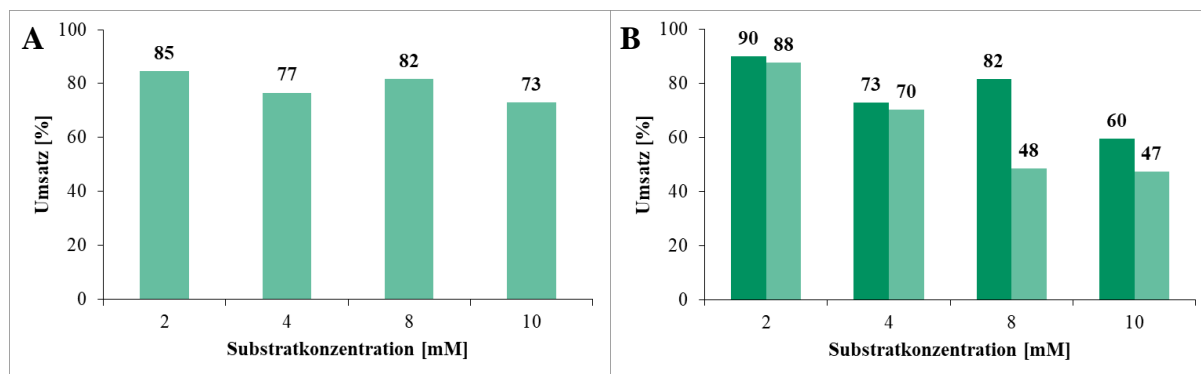


**Abbildung 3-114.** Balkendiagramm für die Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163**. AmbDH3 wurde mit GA-Konzentrationen von 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0% quervernetzt. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0,1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in HEPES-Puffer (**HEPES**) bzw. Natriumphosphat-Puffer (**NaP**) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Eine Verwendung von HEPES-Puffer (pH 6,8) ergab lediglich einen Umsatz von 55%, während der Umsatz durch Verwendung von Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) auf 88% stieg. Für die Folgeexperimente wurde die niedrigste GA-Konzentration von 0,5% übernommen, da diese zudem die besten Umsätze lieferte.

### 3.5.2.1.2.2. Substratkonzentration und Reaktionsvolumen

Enzymreaktionen bei hohen Substratkonzentrationen sind erstrebenswert, da hierfür weniger Lösungsmittel gebraucht wird und sich die Reaktionen leichter in einen größeren Maßstab hochskalieren lassen. Deshalb sollte getestet werden, die AmbDH3-CLEA-katalysierte Zyklisierungsreaktion bei Substratkonzentrationen von bis zu 10 mM durchzuführen. Einerseits wurde die Substratmenge konstant gelassen (0,1 mg) und das Reaktionsvolumen dementsprechend verringert (Abbildung 3-115A). Dadurch ergibt sich das Reaktionsvolumen als einzig geänderter Parameter zwischen den einzelnen Experimenten. Andererseits wurden verschiedene Substratmengen (0,1, 0,2, 0,4 und 0,5 mg) bei gleichbleibendem Reaktionsvolumen getestet (Abbildung 3-115B). Alle Reaktionen wurden mit der gleichen Menge von AmbDH3-Lysat und -CLEA durchgeführt, sodass sich nur Reaktionsvolumen (Abbildung 3-115A) bzw. Substratmenge (Abbildung 3-115B) unterschieden.



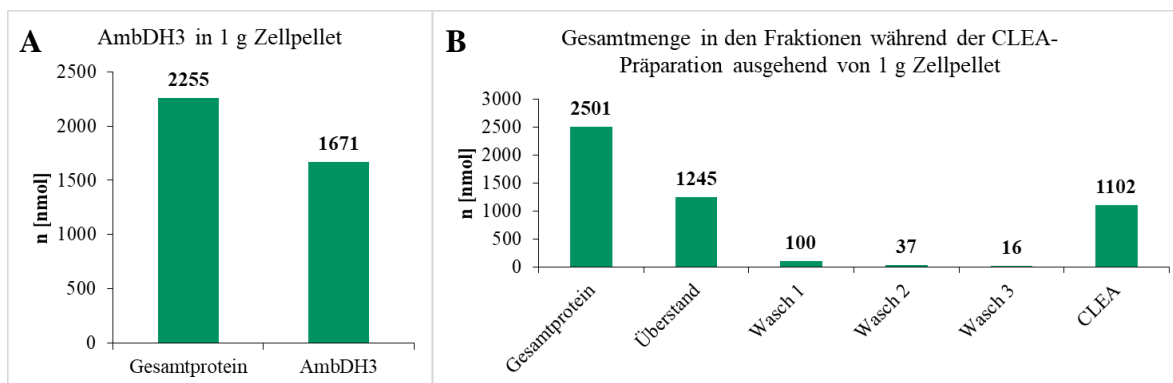
**Abbildung 3-115. Einfluss der Substratkonzentration auf die Zyklisierungsreaktion von AmbDH3-Lysat (grün) und AmbDH3-CLEA (hellgrün).** **A)** Umsatz von jeweils 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** mit AmbDH3-CLEA bei geringer werdendem Reaktionsvolumen. **B)** Umsatz von 0.1 (332 nmol), 0.2 (664 nmol), 0.4 (1329 nmol) und 0.5 mg (1661 nmol) Substrat **163** mit AmbDH3-Lysat und -CLEA bei gleichbleibendem Reaktionsvolumen.

Bei Inkubation von AmbDH3-CLEA mit gleichen Substratmengen bei kleiner werdenden Reaktionsvolumina zeigte sich, dass bei einer Substratkonzentration von 10 mM (und daraus resultierendem niedrigerem Reaktionsvolumen) ein etwas geringerer Umsatz von 73% im Vergleich zu 85% (2 mM Substratkonzentration; Abbildung 3-115A). Dennoch blieb der Umsatz über den getesteten Bereich der Substratkonzentrationen relativ konstant im Bereich von 73–85%.

Zur Vermeidung von Skalierungseffekten wurde die Substratmenge bei gleichbleibendem Reaktionsvolumen erhöht (Abbildung 3-115B). Mit steigender Substratkonzentration sank der Umsatz auf 48% bei 8 mM, blieb jedoch auch bei 10 mM Substratkonzentration konstant bei 47%. Entsprechende Kontrollen mit Lysat unter gleichen Bedingungen zeigten ebenfalls einen Aktivitätsabfall bei steigender Substratkonzentration mit leicht höheren Umsätzen bei 8 und 10 mM. Generell zeigen die Ergebnisse, dass die Zyklisierungsreaktion mit AmbDH3-CLEA bei höheren Substratkonzentrationen mit geringen Umsatzeinbußen durchgeführt werden kann.

### 3.5.2.1.3. Bestimmung der quervernetzten AmbDH3-Menge

Für spätere Kinetikmessungen und deren Auswertung ist es notwendig die genaue Enzymmenge in den AmbDH3-CLEAs zu berechnen. Hierzu wurde eine CLEA-Präparation durchgeführt und von jeder Fraktion durch BRADFORD-Test die enthaltene Proteinmenge bestimmt. Der bereits bestimmte Anteil von löslichem AmbDH3 aus 1 g Zellpellet wurde miteinbezogen (Abschnitt 3.1.1.4).



**Abbildung 3-116. Übersichtsdiagramme zum AmbDH3-Anteil in der Gesamtproteinmenge.** A) Gesamtprotein- und AmbDH3-Menge in 1 g Zellpellet. Die Bestimmung der löslichen AmbDH3-Menge ist in Abschnitt 3.1.1.4 beschrieben. B) Gesamtproteinmenge in den einzelnen Fraktionen der CLEA-Präparation. Alle Werte wurden durch BRADFORD-Test bestimmt und sind in Abschnitt 8.5 dargestellt.

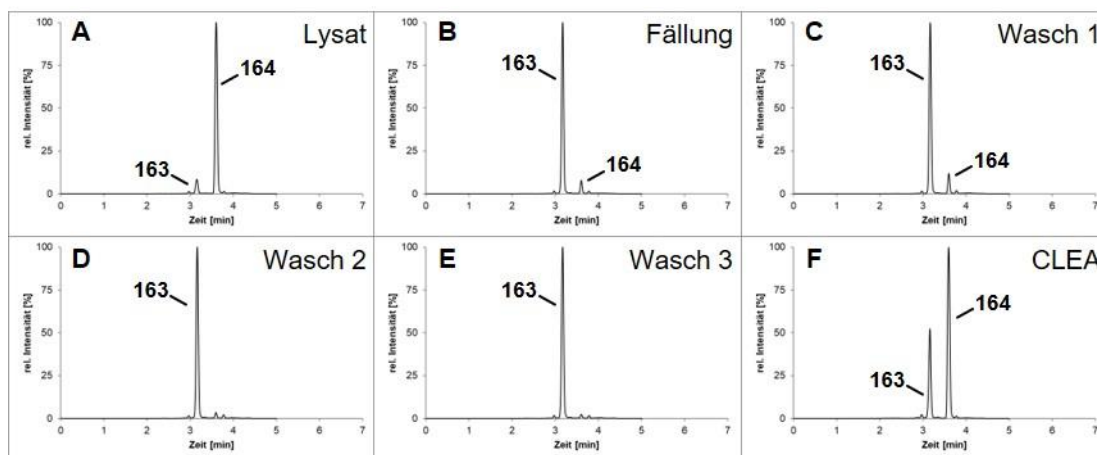
Die Werte des Überstandes nach Quervernetzung und der drei Waschfraktionen wurden von der Gesamtmenge im entsprechenden Lysat abgezogen (Abbildung 3-116B). Daraus resultierte eine Proteinmenge von 1.10  $\mu\text{mol}$  (44%) in AmbDH3-CLEA. Basierend auf dem oben ermittelten Anteil von AmbDH3 in der Gesamtproteinmenge und unter der Annahme, dass sich AmbDH3 während der Ammoniumsulfatfällung und anschließenden Quervernetzung eher in der Feststofffraktion anreichert, betrug die AmbDH3-Menge im CLEA 0.82–1.10  $\mu\text{mol}$ , was 44–60% der ursprünglichen Menge im Lysat entspricht. Eine heterogene Standardreaktion von AmbDH3-CLEA mit 332 nmol (0.1 mg) Substrat **163** enthält somit etwa 28–38 mg AmbDH3.

**Tabelle 3-20. Übersicht über die ermittelten Werte für Substrat 163 und AmbDH3 in einer homogenen und heterogenen Reaktion.**

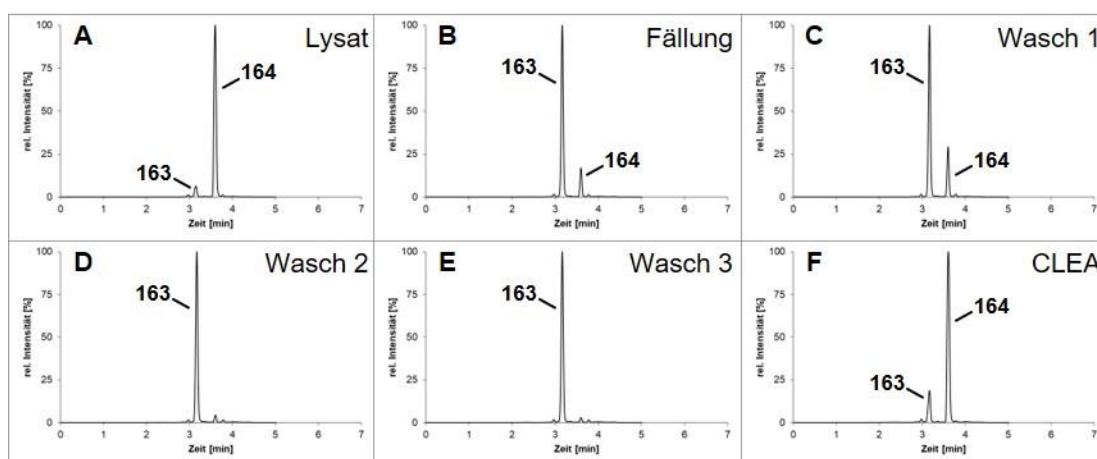
	Substrat 163		AmbDH3	
	n	m	n	m
<b>Homogene Reaktion (mit löslichem AmbDH3)</b>	332 nmol	0.1 mg	6.68 nmol	230 $\mu\text{g}$
<b>Heterogene Reaktion (mit AmbDH3-CLEA)</b>			0.82–1.10 $\mu\text{mol}$	28–38 mg

#### 3.5.2.1.4. Immobilisierungseffizienz

Zudem wurden mit verschiedenen Schritten der CLEA-Präparation Enzymreaktionen mit Substrat **163** durchgeführt, um eine Aussage über die Immobilisierungseffizienz treffen zu können. Dabei wurden Zellen aus Kulturen verwendet, deren Genexpression mit IPTG bzw. Autoinduktion induziert wurde. Die entsprechenden Chromatogramme befinden sich in Abbildung 3-117 und Abbildung 3-118.



**Abbildung 3-117. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen mit Fraktionen der CLEA-Präparation (aus autoinduzierter Genexpression) mit Substrat 163.** Die Enzymreaktionen wurden mit verschiedenen Proben der Immobilisierung durchgeführt: **A)** Lysat, **B)** nach Ammoniumsulfatfällung, **C)** Waschfraktion 1, **D)** Waschfraktion 2, **E)** Waschfraktion 3 und **F)** AmbDH3-CLEA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 3-118. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen mit Fraktionen der CLEA-Präparation (aus IPTG-induzierter Genexpression) mit Substrat 163.** Die Enzymreaktionen wurden mit verschiedenen Proben der Immobilisierung durchgeführt: **A)** Lysat, **B)** nach Ammoniumsulfatfällung, **C)** Waschfraktion 1, **D)** Waschfraktion 2, **E)** Waschfraktion 3 und **F)** AmbDH3-CLEA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

Tabelle 3-21. Umsätze von AmbDH3-CLEA aus verschiedenen Schritten der Immobilisierung.

Art der Induktion	Schritt der CLEA-Präparation	Umsatz [%]
Autoinduktion	Lysat	88
	Nach Ammoniumsulfat-Fällung	5
	Waschfraktion 1	7
	Waschfraktion 2	3
	Waschfraktion 3	2
	<b>AmbDH3-CLEA</b>	<b>58</b>
IPTG-Induktion	Lysat	90
	Nach Ammoniumsulfat-Fällung	10
	Waschfraktion 1	15
	Waschfraktion 2	3
	Waschfraktion 3	2
	<b>AmbDH3-CLEA</b>	<b>78</b>

Nach Fällung des Proteins und den Waschschritten zeigte sich noch eine geringe Aktivität von AmbDH3 für beide Arten der Induktion. Diese nahm mit zusätzlichen Waschschritten ab. Dies zeigt, dass der Großteil des im Lysat enthaltenen AmbDH3 im Endprodukt quervernetzt vorlag. Für AmbDH3-CLEA aus Zellen der autoinduzierten Genexpression ergab sich ein Umsatz von 58%, wohingegen für AmbDH3-CLEA aus Zellen der IPTG-induzierten Genexpression ein Umsatz von 78% erreicht wurde.

Für letztere wurde die enzymatische Aktivität bestimmt, um eine genaue Aussage über die Immobilisierungseffizienz treffen zu können. Hierfür wurde der Zeitverlauf der Reaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** über einen Zeitraum von 3 h verfolgt (Abbildung 3-119).

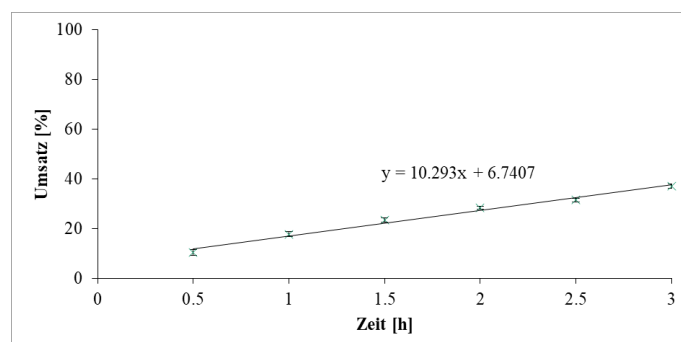


Abbildung 3-119. Zeitverlauf der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** über einen Zeitraum von 3 h. Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für bis zu 3 h durchgeführt. Die Trendlinie wurde durch den Nullpunkt gelegt und ergab folgende Geradengleichung:  $y = 10.293x + 6.7407$ .

Analog dazu erfolgte die Vorgehensweise für die verschiedenen Fraktionen der CLEA-Präparation, wodurch ebenfalls Geradengleichungen erhalten wurden. Mithilfe der Steigungen können die enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen der CLEA-Präparation berechnet werden (Abschnitt 6.2.2.10.2.2).

**Tabelle 3-22. Werte für die Steigungen der linearen Gleichungsgeraden der Umsetzung verschiedener Schritte der Immobilisierung von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.**

Steigung der Geradengleichung			
Lysat	Präzipitation für 3 h	Waschfraktion	CLEA
0.7183	0.0103	0.0357	0.5792
Berechnete Aktivitäten [U]			
$A_{\text{Lysat}}$	$A_{\text{CLEA}}$	$A_{\text{Präzipitat}}$	$A_{\text{Wasch}}$
$2.4 \times 10^{-3}$	$1.9 \times 10^{-3}$	$34 \times 10^{-6}$	$119 \times 10^{-6}$

Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und der entsprechenden Fraktion der CLEA-Präparation in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für bis zu 80 min durchgeführt. Die Trendlinie der Datenpunkte wurde durch den Nullpunkt gelegt.

**Tabelle 3-23. Übersicht der Werte für die Aktivitätswiederherstellung, Immobilisierungsausbeute und -effizienz.**

Aktivitätswiederherstellung [%]	Immobilisierungsausbeute [%]	Immobilisierungseffizienz [%]
81	94	86

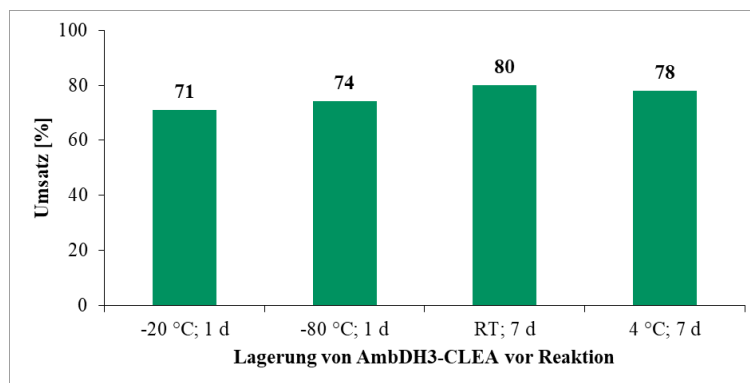
Die verwendeten Gleichungen für die Berechnungen der Parameter befinden sich in Abschnitt 6.2.2.10.2.2.

Dabei zeigten sich für die bestimmten Parameter für Aktivitätswiederherstellung, Immobilisierungsausbeute und -effizienz Werte im Bereich von 81–94%. Das bedeutet, dass der Großteil des im Lysat enthaltenen AmbDH3 im CLEA gebunden und damit quervernetzt wurde. Die Immobilisierung von AmbDH3 läuft demnach mit einer Effizienz von 86% ab. Zudem weist das quervernetzte Enzym 81% der ursprünglichen Aktivität auf.

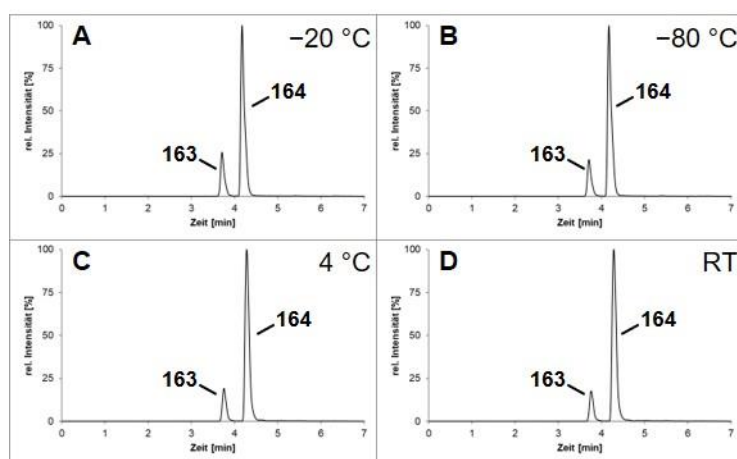
### 3.5.2.1.5. Lagerbarkeit

Für Stabilitätsexperimente mit AmbDH3-CLEA wurde dieses über Nacht bei –20 bzw. –80 °C eingefroren und gelagert (Abbildung 3-120). Vor dem Einfrieren ergab sich hier ein Umsatz von 86%. Dieser sank nach Lagerung für 1 d bei –20 bzw. –80 °C nur leicht auf einen Wert von 71 bzw. 74%. Auch eine längere Lagerung über 7 d bei RT bzw. 4 °C ergab Umsatzwerte von 80 bzw. 80%. AmbDH3-CLEA zeigt somit eine ähnliche Stabilität gegenüber den genannten Lagerbedingungen wie das lösliche Enzym (Abbildung 3-55).





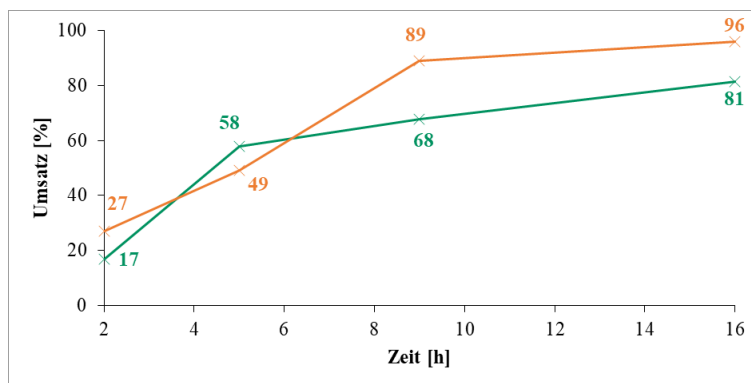
**Abbildung 3-120. Übersicht über die Zyklisierungsumsätze von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 vor und nach Lagerung des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen.** Die Lagerung erfolgte für 7 d bei RT bzw. 4 °C und für 1 d bei –20 bzw. –80 °C. Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 3-121. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach Lagerung des Enzyms.** Das immobilisierte Enzym wurde für 1 d bei **A)** –20 bzw. **B)** –80 °C oder für 7 d bei **C)** 4 °C bzw. **D)** RT gelagert. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die resultierenden Umsätze sind in Abbildung 3-120 dargestellt.

### 3.5.2.1.6. Zeitverlauf

Um eine Aussage über die Geschwindigkeit der AmbDH3-CLEA-katalysierten Zyklisierungsreaktion treffen zu können, wurde die Reaktion über 16 h hinweg zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von EtOAc gestoppt und *via* UPLC-MS analysiert. Diese Ergebnisse können anschließend mit denen des AmbDH3-Lysates verglichen werden (Abbildung 3-122).

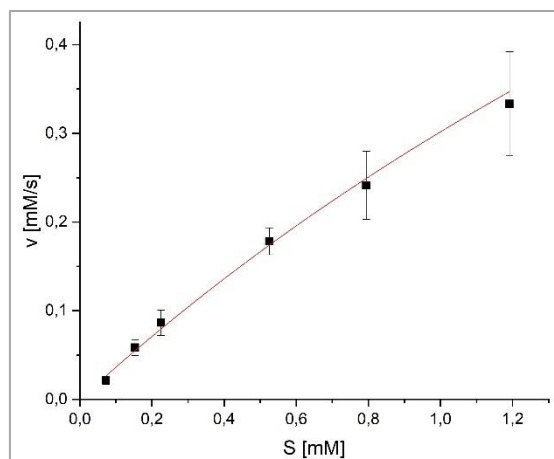


**Abbildung 3-122. Zeitaufgelöster Verlauf des Zyklisierungsumsatzes katalysiert durch AmbDH3-CLEA (grün) und AmbDH3-Lysat (orange).** Die Ergebnisse zum Umsatz des Lysates wurden von T. HOLLMANN ermittelt. Die Enzymreaktionen mit AmbDH3-CLEA (grün) wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die Enzymreaktionen mit AmbDH3-Lysat (orange) wurden mit 10.0 mg (33.2 µmol) Substrat **163** (Startkonzentration 8 mM) und AmbDH3-Lysat in HEPES-Puffer bei 37 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.<sup>[182]</sup>

Für AmbDH3-CLEA waren nach 9 h bereits mehr als zwei Drittel des Startmaterials umgesetzt und nach Ende der Reaktionszeit zeigte sich ein Umsatz von 81%. Beim Vergleich der Kurven von löslichem und immobilisiertem Enzym fällt auf, dass die des immobilisierten Enzyms leicht unter der des löslichen liegt. Eine niedrigere Aktivität von immobilisiertem verglichen mit löslichem Enzym kann häufig auftreten. Dabei konnte in Abschnitt 3.5.2.1.4 bestimmt werden, dass die Quervernetzung von AmbDH3 als CLEA mit einer Ausbeute von 94% und Effizienz von 86% abläuft. Die geringere Aktivität des quervernetzten Enzyms lässt sich unter anderem auf die Ausbeute- und Effizienzverluste während der Immobilisierung zurückführen. Zudem befinden sich in AmbDH3-CLEA nur etwa 44–60% der ursprünglichen AmbDH3-Menge im Lysat (siehe Abschnitt 3.5.2.1.3, S. 161). Weitere Gründe für die niedrigere Aktivität von AmbDH3-CLEA können eine Veränderung der Proteinkonformation, Blockierung des aktiven Zentrums oder Einschränkungen in der Diffusion sein.

#### 3.5.2.1.7. Kinetik

Zudem wurden kinetische Messungen der Reaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** durchgeführt. Dabei ergab sich der folgende Verlauf der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik mit zugehörigen Parametern (Abbildung 3-123 und Tabelle 3-24).



**Abbildung 3-123. MICHAELIS-MENTEN-Kinetik der Reaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Die daraus erhaltenen Kinetikparameter sind in folgender Tabelle 3-24 aufgelistet.

**Tabelle 3-24. MICHAELIS-MENTEN-Kinetikparameter und enzymatische Aktivität von AmbDH3-CLEA und löslichem AmbDH3 mit Substrat 163.**

Parameter	AmbDH3-CLEA	AmbDH3
$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$24.7 \pm 14.2$	$230 \pm 83$
$K_m$ [mM]	$4.4 \pm 2.8$	$8.2 \pm 3.1$
$k_{cat}/K_m$ [ $s^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ]	$5.67 \pm 4.87$	$28.2 \pm 14.8$
Enzymaktivität [ $\text{nmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ]	5.18	n.d.
Spezifische Enzymaktivität [ $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ]	7.65	n.d.

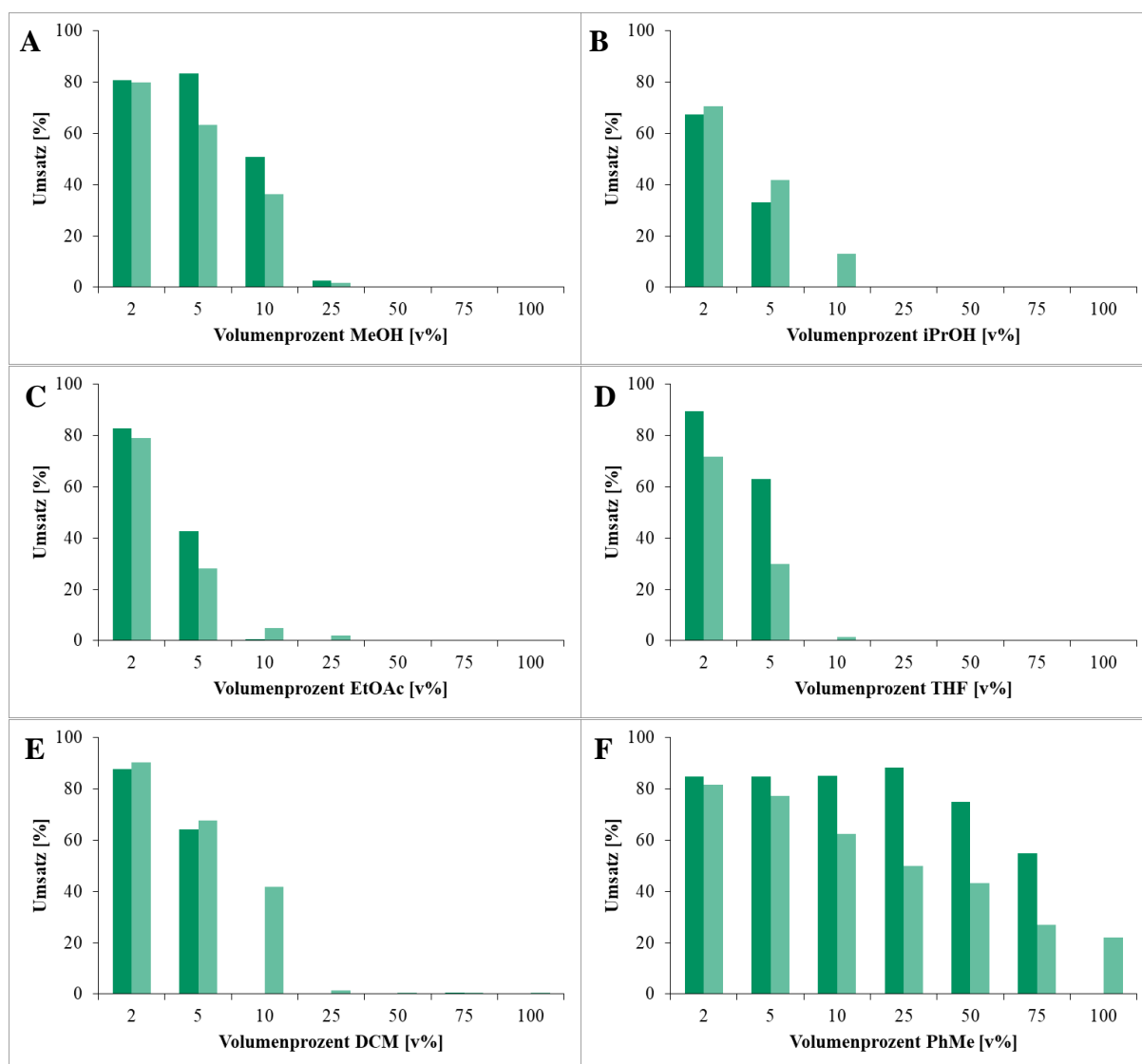
Die Enzymreaktionen für die Bestimmung der MICHAELIS-MENTEN-Kinetikparameter wurden mit  $65.4 \mu\text{M}$  AmbDH3-CLEA bzw.  $5.0 \mu\text{M}$  löslichem AmbDH3 durchgeführt. Die Reaktionen zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden mit  $3.27 \text{ nmol}$  ( $112 \mu\text{g}$ ) quervernetztem Protein pro Reaktion mit  $332 \text{ nmol}$  ( $0.1 \text{ mg}$ ,  $2 \text{ mM}$ ) Substrat **163** durchgeführt. Der Umsatz wurde in Intervallen von  $30 \text{ min}$  über einen Zeitraum von  $180 \text{ min}$  bestimmt.<sup>[205]</sup> Die Ergebnisse zum Umsatz von löslichem AmbDH3 wurden von T. HOLLMANN ermittelt.<sup>[182]</sup>

Bei Vergleich der Werte von löslichem und immobilisiertem Enzym zeigt sich für AmbDH3-CLEA ein 10fach niedrigerer Wert für  $k_{cat}$  und halb so hoher Wert für  $K_m$ . Dies entspricht den Erwartungen, da der Umsatz mit AmbDH3-CLEA von Anfang an unter dem des löslichen AmbDH3 lag. Exakte Aussagen über die Gründe können an dieser Stelle nicht getroffen werden. Es ist bekannt, dass die Zugänglichkeit des Substrates zur aktiven Tasche durch die Quervernetzung der Arginine und Lysine in CLEAs oft eingeschränkt ist und es deshalb zu einer langsameren Umsetzung kommen kann.

### 3.5.2.1.8. Lösungsmitteltoleranz

Um die Löslichkeit der getesteten Substrate zu erhöhen, wurden mehrere Zwei-Phasen-Systeme mit verschiedenen organischen Cosolventien getestet. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Systemen ist im Allgemeinen vorteilhaft wenn enzymkatalysierte Reaktionen mit schwer wasserlöslichen Substraten durchgeführt werden und Wasser als Reagenz direkt an der Reaktion beteiligt ist. Außerdem können die Produkte, wenn sie schlecht wasserlöslich sind, leicht von den Enzymen getrennt werden. Es erfolgt ein Transfer von Verbindungen aus der organischen Phase in die wässrige Phase. Die wässrige Phase enthält dabei das Enzym sowie eventuell wasserlösliche Cofaktoren oder Cosubstrate und die organische Phase den größten Teil von Edukten und Produkten. Der Transfer wird durch das Rühren der beiden Phasen erreicht und die Wahl des organischen Lösungsmittels ist stark abhängig von der Art des Enzyms. Im Allgemeinen haben Lösungsmittel mit niedrigerer Polarität einen geringeren Einfluss auf die Enzymstabilität. Bei der Wahl muss außerdem die Löslichkeit der Substrate und Produkte im organischen Lösungsmittel berücksichtigt werden. Zu bevorzugen sind hierbei solche Lösungsmittel, die leicht von Wasser getrennt und wiederverwendet werden können. Da die Katalyse in der wässrigen Phase stattfindet, hängt die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch von der Substratkonzentration in der wässrigen Phase ab.<sup>[206]</sup>

Die Immobilisierung des eingesetzten Enzyms kann dazu führen, dass dieses eine erhöhte Toleranz in Bezug auf Lösungsmittel aufweist. Deshalb sollte die Stabilität von AmbDH3-CLEA in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht werden. Hierfür wurden zum einen wassermischbare Lösungsmittel (Methanol, *iso*-Propanol und Tetrahydrofuran) und zum anderen nicht wassermischbare Lösungsmittel (Ethylacetat, Dichlormethan und Toluol) als Cosolvenz in der AmbDH3-katalysierten Zyklisierung getestet (Abbildung 3-124). Dazu wurde Substrat **163** in Cosolvenz vorgelöst und zu AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer gegeben. Dabei wurden verschiedene Volumenprozent an Cosolvenz getestet, wobei die Gesamtmenge aus Puffer und organischem Lösungsmittel konstant war. Nach 16 h wurde das immobilisierte Enzym durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand extrahiert und *via* UPLC-MS analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8-10 und Abbildung 3-124 dargestellt.



**Abbildung 3-124. Umsatzwerte der Zyklisierungsreaktionen von AmbDH3-Lysat (grün) und AmbDH3-CLEA (hellgrün) in Gegenwart verschiedener Cosolventien:** A) Methanol, B) *iso*-Propanol, C) Ethylacetat, D) Tetrahydrofuran, E) Dichlormethan und F) Toluol. Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat (grün) bzw. AmbDH3-CLEA (hellgrün) in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die Werte können Tabelle 8-10 im Anhang entnommen werden.

Die Umsetzungen durch AmbDH3-CLEA blieben bei den Lösungsmitteln Methanol, Ethylacetat, Tetrahydrofuran und Toluol leicht unter der des Lysates. Bei *iso*-Propanol und Dichlormethan war der Umsatz von AmbDH3-CLEA leicht höher als der des Lysates. Steigende Mengen an den zugefügten Cosolventien Methanol, *iso*-Propanol, Ethylacetat, Tetrahydrofuran und Dichlormethan senkten den Umsatz für Lysat und AmbDH3-CLEA deutlich. Dabei zeigte sich ab 5v% bzw. spätestens 10v% nur noch eine sehr geringe oder keinerlei Zyklisierungsaktivität. Die Lösungsmittel führten zu einer irreversiblen Deaktivierung des Enzyms, sodass keine Zyklisierung mehr stattfinden konnte. Die höchste Enzymstabilität und damit auch der höchste Umsatz konnten in einem Zweiphasen-System aus Puffer und Toluol erreicht werden. Bei 75v% Toluol konnten Umsätze von 55 bzw. 27% für Lysat bzw.

AmbDH3-CLEA erreicht werden. Selbst in 100v% Toluol zeigte AmbDH3-CLEA eine verbleibende Aktivität von 22%. Ein Vorteil von Toluol besteht darin, dass sich ein Zweiphasen-System aus Puffer und organischem Lösungsmittel bildet. Dabei kommt das Lösungsmittel weniger mit dem Enzym in Kontakt verglichen mit dem Einsatz von wassermischbaren Lösungsmitteln. Bei den beiden ebenfalls nicht-wassermischbaren Lösungsmitteln Ethylacetat und Dichlormethan handelt es sich um polarere Lösungsmittel, bei denen das verwendete Substrat **163** besser gelöst wird. Daher bleibt das Substrat **163** vermutlich eher in der Lösemittelphase und kann vom Enzym nicht umgesetzt werden.

Die Aktivitätstests mit AmbDH3-CLEA wurden zudem mit der Verbindung **171** durchgeführt. In Tabelle 3-25 sind die eingesetzten Substrate mit den jeweiligen Substratkonzentrationen und Cosolventien für die verschiedenen Reaktionen aufgeführt. Die Reaktionen von AmbDH3-CLEA mit dem Pentylsubstrat **171** enthielten 0, 25 oder 50v% der Cosolventien (Abbildung 8-180).

**Tabelle 3-25. Bedingungen der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 171.**

Eintrag	Cosolvenz	Anteil Cosolvenz [v%]	Umsatz [%]
1	-	0	0
2	iPrOH	25, 50	
3	Toluol	25, 50	
4	THF	25, 50	
5	DMSO	25, 50	

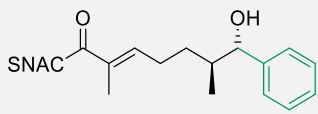
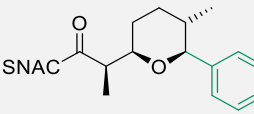
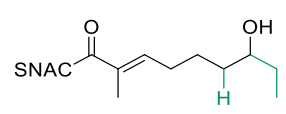
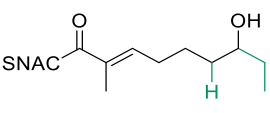
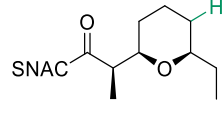
Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer mit entsprechendem Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die entsprechenden UPLC-MS-Chromatogramme befinden sich in Abbildung 8-180.

Verbindung **171** ist aufgrund des Pentylrestes an C-7 im Vergleich zu Substrat **163** unpolarer und dementsprechend schlechter wasserlöslich. Da in keiner der Reaktionen mit Substrat **171** (Einträge 1-5, Tabelle 3-25) ein weiteres Signal mit gleicher Masse detektiert wurde, erfolgte keine Zyklisierung zu Produkt **172**. Auch die Reaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat **171** zeigte keine Zyklisierung. Bei den Zwei-Phasen-Systemen wurde vermutlich nur eine geringe Menge des Substrats von der organischen Phase in die wässrige Phase transferiert, weshalb es zu keinem bzw. nur geringem Umsatz kam. Eine Inaktivität von AmbDH3-CLEA aufgrund des Lösungsmittels ist aufgrund vorheriger Experimente unwahrscheinlich. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass Substrat **171** von AmbDH3-CLEA nicht akzeptiert wird und deshalb keine Zyklisierung zustande kam.

## 3.5.2.1.9. Substrattoleranz

Die Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit einigen Substraten wurden zudem im größeren Maßstab wiederholt, um die schlechte Löslichkeit der Substrate zu umgehen. Deshalb wurden die Reaktionen im 10 mg-Maßstab unter Rühren durchgeführt (Tabelle 3-26).

**Tabelle 3-26. Übersicht über Experimente zur Untersuchung der Substrattoleranz von AmbDH3-CLEA.**

Eintrag	Substrat	Produkt	Umsatz / Ausbeute [%]
1	 <b>173</b>	 <b>174</b>	80 / 41
2	 <i>rac</i> - <b>179</b>	 <i>rac</i> - <b>179</b> (D):(L) = 32:68  <i>cis</i> - <b>180</b> (D):(L) = >95:5	35 / 20

Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 10.0 mg Substrat **173** oder *rac*-**179** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 4 mM, ~30 µmol) und AmbDH3-CLEA (0.19 u) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die Bestimmung der Ausbeute und Konfiguration der entstandenen Produkte wurde von T. ROß durchgeführt.<sup>[205]</sup>

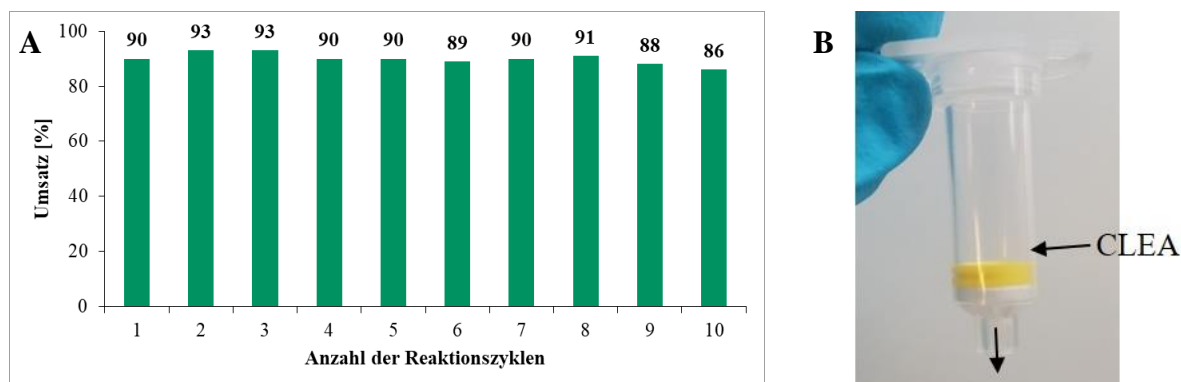
Substrat **173** wurde mit einem Umsatz von 80% zum entsprechenden Pyran **174** umgesetzt. Dabei konnte das Produkt mit einer Ausbeute von 41% isoliert werden und dessen Konfiguration *via* NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Das racemische Substrat *rac*-**179** wurde ebenfalls von AmbDH3-CLEA zyklisiert (35% Umsatz, 20% Ausbeute). T. ROß konnte durch nachfolgende Veresterung mit  $\alpha$ -(9-Anthryl)- $\alpha$ -methoxyessigsäure (9-AMA) ermitteln, dass vermehrt das *cis*-konfigurierte Produkt **180** gebildet wurde, während das Edukt 7L-**179** nicht von AmbDH3-CLEA akzeptiert wurde. Ebenso wie für lösliches AmbDH3 wurde bei den Umsetzungen von **173** und *rac*-**179** nur der *cis*-Pyranring durch AmbDH3-CLEA gebildet. Für Substrat *rac*-**179** zeigte sich auch hier eine deutliche Präferenz für das D-konfigurierte Substrat.

### 3.5.2.1.10. Wiederverwendung

#### 3.5.2.1.10.1. Analytischer Maßstab (0.1 mg; 332 nmol)

Da die ersten Ergebnisse der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA positive Ergebnisse in Bezug auf die Immobilisierung aufwiesen, wurde getestet inwiefern sich die CLEAs wiederverwenden lassen.

Die Reaktion wurde anfangs in einer DNA-Reinigungssäule mit Silica durchgeführt, in der AmbDH3-CLEA oberhalb der Fritte vorlag und das vorgelöste Substrat **163** zugegeben wurde. Nach Schütteln wurde die Reaktionslösung durch Zentrifugation abgetrennt und das in der Säule verbliebene CLEA-Pellet mehrmals gewaschen (Abbildung 3-125A). Diese Prozedur wurde bei jedem Reaktionszyklus wiederholt.



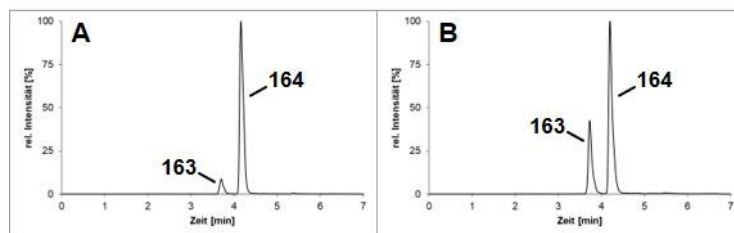
**Abbildung 3-125.** A) Balkendiagramm für die Umsätze von AmbDH3-CLEA nach Verwendung in zehn aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen. B) Foto der Silicasäule für die Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163**. 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) wurden für 30 min bei 30 °C und 300 UpM in Natriumphosphat-Puffer vorgelöst, anschließend zu AmbDH3-CLEA gegeben und bei 30 °C und 300 UpM für 16 h inkubiert. Die Pfeile deuten an wo sich AmbDH3-CLEA mit der Substratlösung befindet bzw. wie es durch Zentrifugation abgetrennt wird.

Bei Vorlösen des Substrates und Zugabe dieser Substratlösung zum immobilisierten Enzym über zehn Reaktionszyklen zeigte sich lediglich ein Schwanken der Umsätze um etwa 7% (Abbildung 3-125B). Die hohe Stabilität von AmbDH3 und die gleichbleibend hohen Umsätze in den zehn Reaktionen zeigen, dass das Enzym für die Verwendung in immobilisierter Form sehr gut geeignet ist. Jedoch muss dieses Ergebnis kritisch betrachtet werden, da Substrat **163** aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit möglicherweise nicht komplett gelöst vorlag und deshalb geringere Mengen als vermutet in jeden Reaktionszyklus eingesetzt wurden.

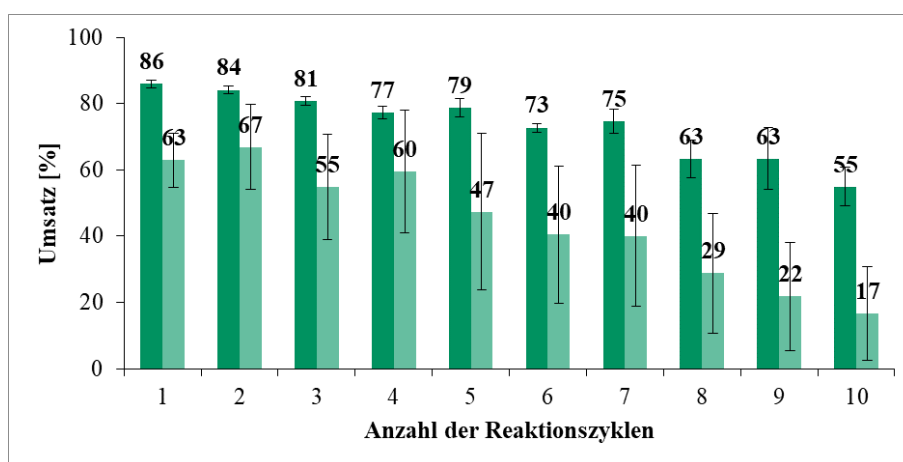
Aus diesem Grund wurde das Experiment ohne vorheriges Vorlösen des Substrates wiederholt. Dabei wurde AmbDH3-CLEA in Puffer suspendiert, zum Substrat gegeben und für 16 h inkubiert. Die Ergebnisse der Verwendung von AmbDH3-CLEA in zehn aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen sind in Abbildung 3-127 dargestellt. Abbildung 3-126 zeigt das Ergebnis der



UPLC-MS-Analysen nach der ersten und zehnten Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163**.



**Abbildung 3-126.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** nach dem ersten (A) und zehnten (B) Reaktionszyklus. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

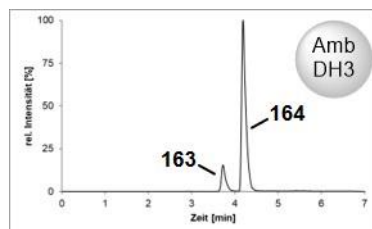


**Abbildung 3-127.** Vergleich der Umsatzwerte der Reaktionen von AmbDH3-CLEA (grün) und Ni-TED-AmbDH3 (hellgrün) nach Verwendung in zehn aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen. Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA (grün) bzw. Ni-TED-AmbDH3 (hellgrün) in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

Es zeigte sich ein Abfall des Zyklisierungsumsatzes von anfänglichen 86 auf 56%. Diese Tendenz lässt sich vermutlich nicht durch eine sinkende Aktivität von AmbDH3-CLEA begründen, sondern mehr durch die Handhabung. Da im analytischen Maßstab lediglich 0.1 mg Substrat eingesetzt wurden, sind die Mengen an verwendetem CLEA folglich sehr gering. Nach jedem Reaktionszyklus wurde die Lösung zentrifugiert und das Pellet gewaschen, wodurch ein Teil des CLEA-Pellets durch Abnahme des Überstands unbeabsichtigt verworfen wurde. Somit verringert sich die Menge an eingesetztem AmbDH3-CLEA mit zunehmender Anzahl an Reaktionszyklen unfreiwillig. Bei der Wahl eines größeren Ansatzes (siehe Abschnitt 3.5.2.1.10.3) ist die Regeneration und Zentrifugation des immobilisierten Enzyms aufgrund der größeren Volumina deutlich einfacher und sollte somit auch einen geringeren Abfall des Umsatzes nach sich ziehen. Aus diesem Grund wurde die Reaktion im größeren Maßstab wiederholt und die Wiederverwendbarkeit des AmbDH3-CLEA dabei untersucht.

3.5.2.1.10.2. Semipräparativer Maßstab (4.5 mg; 15.0  $\mu\text{mol}$ )

Zur Skalierung der Zyklisierungsreaktion wurden 4.5 mg (15.0  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** mit AmbDH3-CLEA umgesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-128 dargestellt.

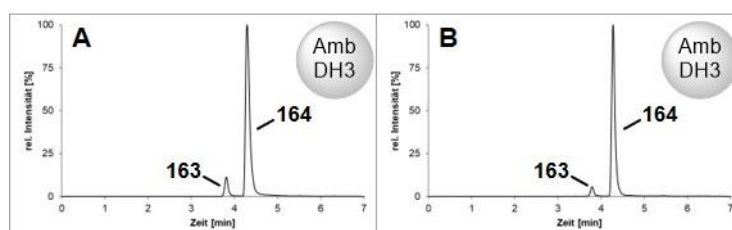


**Abbildung 3-128. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 4.5 mg (15.0  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

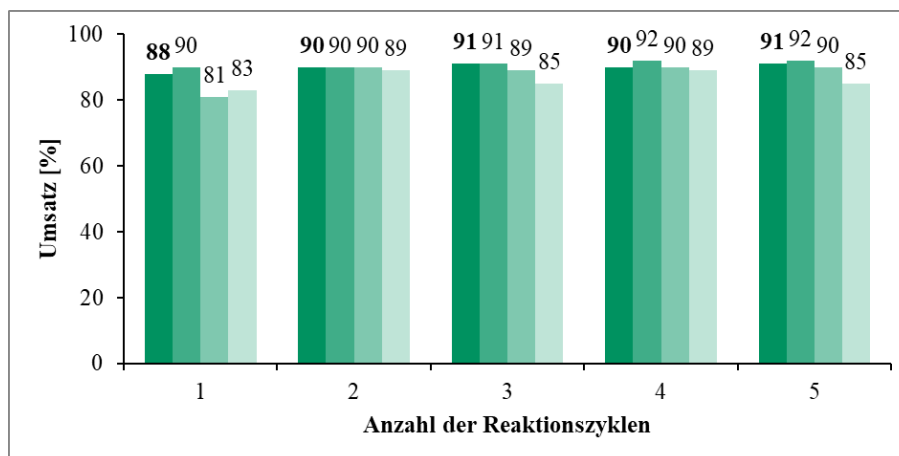
Die Enzymreaktion mit AmbDH3-CLEA ergab einen Umsatz von 81% *via* UPLC-MS-Analyse. Eine Wiederverwendung von AmbDH3-CLEA fand hier nicht statt. Diese sollte aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse in den präparativen Maßstab übertragen werden.

3.5.2.1.10.3. Präparativer Maßstab (10.0 mg; 33.2  $\mu\text{mol}$ )

Aufbauend auf den Versuchen im semipräparativen Maßstab wurde die Enzymreaktion mit AmbDH3-CLEA in den präparativen Maßstab von 10.0 mg hochskaliert. Zu diesem Zweck wurden 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** in einem Kolben vorgelegt und die entsprechende Menge an AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer zugegeben. Nach 16 h Reaktionszeit wurden die Reaktionslösung und AmbDH3-CLEA durch Zentrifugation voneinander getrennt, gewaschen und vier Mal wiederverwendet. Die Waschfraktionen wurden ebenso wie die Reaktionslösungen extrahiert, um die darin enthaltene Menge von Edukt und Produkt vergleichen zu können. Die entsprechenden UPLC-MS-Chromatogramme nach dem ersten und fünften Reaktionszyklus sind in Abbildung 3-129 dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-130 zusammengefasst.



**Abbildung 3-129. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem ersten (A) und fünften (B) Reaktionszyklus im präparativen Maßstab.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 3-130. Umsatzwerte für die Zyklisierung durch AmbDH3-CLEA im präparativen Maßstab mit fünfmaliger Wiederholung.** Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu$ mol) Substrat **163** (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 U $\mu$ M für 16 h durchgeführt. Die Balken mit abnehmender Farbintensität zeigen die Umsätze in den Waschfraktionen 1–3. Die Umsetzung von Lysat mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** lieferte bei 2 bzw. 4 mM einen Umsatz von 83 bzw. 90%. Für die Umsetzung der gleichen Menge von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** konnten für 2 und 4 mM 87% Umsatz erhalten werden. Der angegebene Umsatz wurde *via* UPLC-MS-Analyse bestimmt. Die Umsatzbestimmung der Reaktionslösungen *via* NMR-Spektroskopie ergab für alle fünf Reaktionen einen Umsatz von >95%.

Trotz der relativ langen Inkubationszeit von jeweils 16 h, den dabei ausgesetzten Scherkräften, denen AmbDH3-CLEA durch das Rühren und der nachfolgenden Zentrifugation ausgesetzt ist, zeigte sich über insgesamt fünf Reaktionszyklen ein durchschnittlicher Umsatz der AmbDH3-CLEAs von 90% (88–91%). Selbst nach fünfmaliger Wiederverwendung bleibt die Zyklisierungsaktivität des immobilisierten Enzyms mit 91% auf dem gleichen Niveau wie zu Beginn (88%). Die Waschschrte nach Abtrennung der Reaktionslösung enthalten ebenfalls noch verbleibende Mengen an Edukt **163** und Produkt *cis*-**164**. Hier ist deutlich erkennbar, dass die Mengen an Edukt und Produkt mit zunehmender Zahl der Waschschrte abnehmen. Die Konfiguration des entstandenen Produkts wurde durch NMR-Spektroskopie bestätigt. Die NMR-Analysen zeigten vollständigen Umsatz zum Produkt *cis*-**164** bzw. nur Spuren des verbliebenen Edukts **163** (Abbildung 8-220 bis Abbildung 8-226). Die isolierte Ausbeute nach Säulenchromatographie lag bei durchschnittlich 94%. Dies verdeutlicht die sehr gute Eignung des als CLEA immobilisierten Enzyms AmbDH3 für Reaktionen im präparativen Maßstab.

#### 3.5.2.1.11. Reaktion bei kontinuierlichem Fluss

Kontinuierliche Flussverfahren besitzen gegenüber *Batch*-Prozessen vielfältige Vorteile, wie eine bessere Automatisierbarkeit, höhere Sicherheit oder leichtere Skalierbarkeit. Die prinzipielle Eignung einer immobilisierten Enzympräparation für solche Zwecke gibt wertvolle Hinweise auf die Prozesstauglichkeit des entsprechenden Enzymtyps.

Es wurden 5.0 mg (16.6  $\mu$ mol) Substrat **163** in Reaktionspuffer über Nacht vorgelöst. AmbDH3-CLEA wurde zwischen zwei Fritten in eine Spritze gegeben und die Substratlösung mit einer konstanten Geschwindigkeit durch das immobilisierte Enzym gedrückt (Abbildung 3-131). Die verwendete Menge von AmbDH3-CLEA ist in Tabelle 3-27 aufgeführt.



Abbildung 3-131. Versuchsaufbau der Reaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** bei kontinuierlichem Fluss.

Tabelle 3-27. Bedingungen der Reaktionen von AmbDH3-CLEA bei kontinuierlichem Fluss mit jeweiligem Umsatz.

Eintrag	Substrat-konzentration [mM]	CLEA-Menge	Fließgeschwindigkeit [mL/h]	Anzahl der Reaktionszyklen	Umsatz [%]
1	0.50	1 $\times$	10	1	19
2	0.25	2 $\times$		1	23
3	0.25	4 $\times$		3	44

Die Enzymreaktionen erfolgten jeweils mit 5.0 mg (16.6  $\mu$ mol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer. Dabei wurde das Substrat **163** für 20 h bei 30 °C und 600 UpM vorgelöst. Die CLEA-Menge „1 $\times$ “ bezeichnet die standardmäßig eingesetzte Menge für die Umsetzung von 5.0 mg Substrat (siehe Abschnitt 6.2.2.10.2.2). Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte für Eintrag 1 *via* UPLC-MS-Analyse (Abbildung 8-196 und Abbildung 8-197) und für die Einträge 2 und 3 *via* NMR-Spektroskopie (Abbildung 8-227 und Abbildung 8-228).

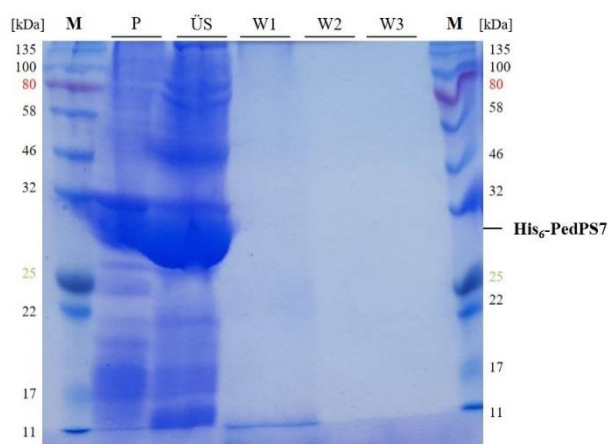
Für den ersten Versuch (Eintrag 1, Tabelle 3-27) zeigte sich ein durchschnittlicher Umsatz von 19%. Dieser Umsatz scheint noch weit niedriger verglichen mit dem der heterogenen Reaktion mit AmbDH3-CLEA. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Substrat bei Reaktionen unter kontinuierlichem Fluss verhältnismäßig kurz mit dem Enzym in Kontakt kommt und nur in dieser kurzen Zeitspanne eine Zyklisierung stattfinden kann.

Durch Erhöhung der Enzymmenge und Erniedrigung der Substratkonzentration und dem dementsprechend größeren Reaktionsvolumen konnte eine minimale Erhöhung des Zyklisierungsumsatzes auf 23% erreicht werden (Eintrag 2, Tabelle 3-27). Die optimierten Bedingungen führen vermutlich zu einer gesteigerten Kontaktzeit zwischen Substrat und immobilisiertem Enzym, wodurch der höhere Umsatz zustande kommt. Als weitere Modifikation wurde die Enzymmenge nochmals auf die vierfache Menge erhöht und die

Substratlösung nach Reaktion noch zwei weitere Male durch das CLEA-Pellet gedrückt (Eintrag 3, Tabelle 3-27). Hier konnte der Umsatz auf 44% gesteigert werden. Diese Steigerung des Zyklisierungsumsatzes zeigt zwar die prinzipielle Einsetzbarkeit von AmbDH3-CLEA in Enzymreaktionen bei kontinuierlichem Fluss. Der Umsatz bleibt allerdings deutlich unter dem der *Batch*-Methode. Eine mögliche Erklärung ist, dass in der kinetischen Untersuchung ein geringer  $k_{cat}$ -Wert und ein hoher  $K_m$ -Wert festgestellt wurde. Dies bewirkt, dass innerhalb eines bestimmten Zeitraums nur eine begrenzte Anzahl an Substratmolekülen umgesetzt wird. Dies könnte eine absolute Limitierung für den effektiven Einsatz von AmbDH3-CLEA unter diesen Bedingungen darstellen. Ausführliche Optimierungen des Verfahrens oder ein Protein-*Engineering* zur Anpassung der kinetischen Parameter sind diesbezüglich vonnöten. Problematisch könnte zudem sein, dass das CLEA-Pellet weitaus größeren mechanischen Belastungen ausgesetzt ist als bei *Batch*-Umsetzungen, sodass auch eine Optimierung der CLEA-Herstellung Umsatzgewinne erbringen könnte.

### 3.5.2.2. PedPS7-CLEA

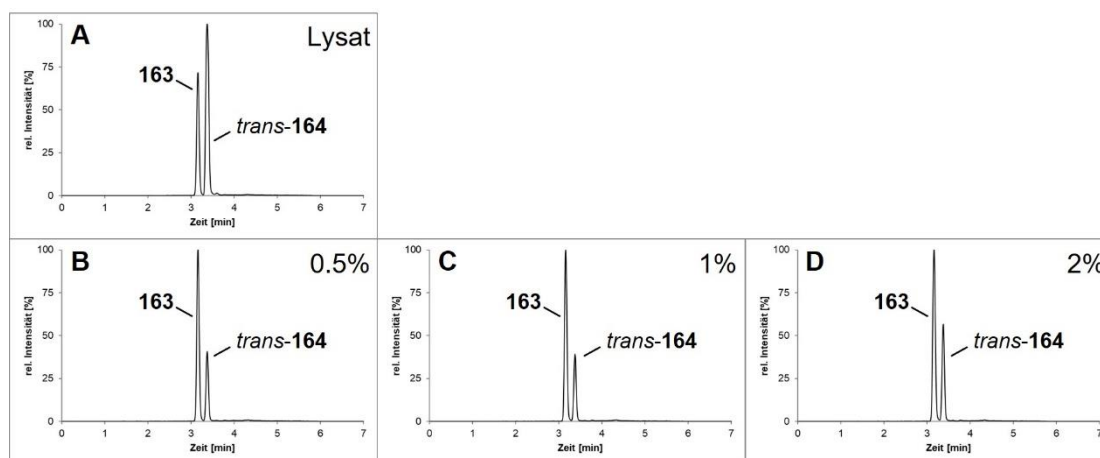
Die Versuche zur Immobilisierung wurden ebenfalls mit dem Enzym PedPS7 durchgeführt. Zunächst wurden Ansätze mit GA-Konzentrationen von 0.5, 1.0 und 2.0% durchgeführt. Es ist bekannt, dass eine zu hohe GA-Konzentration zu einer geringeren Enzymaktivität führen kann.<sup>[17]</sup> Dementsprechend gilt es, die optimale GA-Konzentration zu finden, bei der am meisten Protein quervernetzt wird und der Zugang zur aktiven Tasche nicht blockiert wird. Das Ergebnis der per SDS-PAGE analysierten PedPS7-CLEA-Bildung ist in Abbildung 3-132 dargestellt.



**Abbildung 3-132. SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) der Immobilisierung von PedPS7-CLEA (33 kDa) aus *E. coli* BL21 pET28a(+)<sub>pedPS7</sub>.** Aufgetragen wurden Marker (M), Pellet (P) und Überstand (ÜS) nach Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung sowie Waschfraktionen der Immobilisierung (W1–3).

Sowohl im Pellet als auch im Überstand ist eine deutliche Bande zu erkennen, die dem Molekulargewicht von PedPS7 entspricht, was auf eine erfolgreiche Proteinproduktion hindeutet. Der Überstand wurde anschließend für die Quervernetzung des Enzyms bei verschiedenen GA-Konzentrationen weiterverwendet. Die Waschfraktionen enthalten keinerlei Proteinbanden, was darauf deutet, dass das im Überstand befindliche PedPS7 komplett quervernetzt wurde.

Die optimalen Bedingungen für die Präparation von PedPS7-CLEA sollten identifiziert werden, weshalb anfangs die GA-Konzentrationen 0.5, 1.0 und 2.0% für das Crosslinking getestet wurden. Das Lysat und das resultierende, immobilisierte Enzym wurden anschließend in Enzymreaktionen mit Substrat **163** eingesetzt (Abbildung 3-133).



**Abbildung 3-133. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (A) bzw. PedPS7-CLEA (B-D) mit Substrat 163.** PedPS7 wurde bei verschiedenen GA-Konzentrationen quervernetzt: **B)** 0.5, **C)** 1.0 und **D)** 2.0%. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-Lysat (A) bzw. -CLEA (B-D) in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

**Tabelle 3-28. Übersicht der Zyklisierungsumsätze von PedPS7-CLEA bei verschiedenen GA-Konzentrationen.**

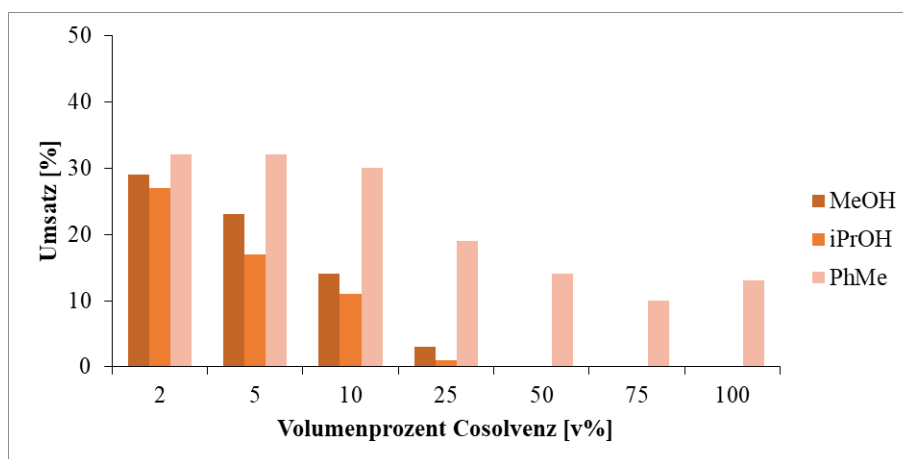
GA-Konzentration [%]	Umsatz [%]	
	Lysat	CLEA
0.5	54	22
1.0		21
2.0		26

Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-Lysat bzw. -CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

Bei allen Reaktionen fand eine Umsetzung von Substrat **163** zu Produkt *trans*-**164** statt (Tabelle 3-28). Bei Umsetzung von **163** mit Lysat wurde ein Umsatz von 54% erhalten, wohingegen bei der Immobilisierung nur 21–26% zyklisiert wurden. Dieser Unterschied beruht vermutlich auf Verlusten von nicht gefällttem bzw. quervernetztem Enzym. Eine höhere GA-Konzentration bewirkte in diesem Fall auch eine minimal höhere Umsetzung von **163**. Bei der höchsten getesteten GA-Konzentration von 2.0% wurde eine Umsetzung von 34% erzielt. Bei einer 0.5%igen GA-Konzentration wurden hingegen nur 22% erreicht. Da sich die Umsätze nur marginal unterscheiden, wurde in nachfolgenden Versuchen dennoch eine GA-Konzentration von 0.5% gewählt.

### 3.5.2.2.1. Lösungsmitteltoleranz

Die Lösungsmitteltoleranz von PedPS7-CLEA wurde gegenüber Toluol, Methanol und *iso*-Propanol getestet (analog zu Abschnitt 3.3.8). Die ausgewerteten Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 3-29 und Abbildung 3-134 zu sehen.



**Abbildung 3-134. Umsatzwerte der Zyklisierungsreaktionen von PedPS7-CLEA in Gegenwart der Cosolventien Methanol, *iso*-Propanol und Toluol (mit abnehmender Farbintensität).** Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die Umsatzwerte können Tabelle 8-10 entnommen werden.



Tabelle 3-29. Umsatz von PedPS7-CLEA bei verschiedenen Anteilen an Cosolvenz.

Cosolvenz	Volumenprozent Cosolvenz [v%]								
	0	0.5	2	5	10	25	50	75	100
MeOH	34	n.d.	29	23	14	3	0	0	0
iPrOH		n.d.	27	17	11	1	0	0	0
EtOAc		13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DMSO		18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PhMe		n.d.	32	32	30	19	14	10	13

Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Gezeigt ist jeweils der prozentuale Umsatz von PedPS7-CLEA mit Substrat **163**. Die Verwendung von Lysat ohne Cosolvenz ergab einen Umsatz von 70%.

Verglichen mit Reaktionen von AmbDH3-CLEA ohne Cosolvenz (89%) zeigt sich von Beginn an ein deutlich niedrigerer Umsatz von 34%. Dieser Trend ist ebenfalls bei Verwendung von Lysat erkennbar (89% für AmbDH3-Lysat und 78% für PedPS7-Lysat). Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass Substrat **163** nicht dem natürlichen Substrat von PedPS7 entspricht. Bei Verwendung von Cosolventien zeigt sich analog zu AmbDH3-CLEA, dass bei Enzymreaktionen von PedPS7-CLEA mit Toluol selbst bei 100v% ein verbleibender Umsatz von 14% besteht. Ein Zusatz von Methanol oder *iso*-Propanol senkt den Umsatz schon bei 5v% auf Werte von 23 bzw. 17%. Bei einem Zusatz von 0.5v% DMSO wurde mehr Substrat (18%) umgesetzt als mit 0.5v% EtOAc (13%).

### 3.5.2.2.2. Substrattoleranz

In nachfolgenden Experimenten wurde die Substrattoleranz von PedPS7-CLEA untersucht. Hierfür wurde die Umsetzung mit Substrat **169** getestet (Abbildung 3-135).

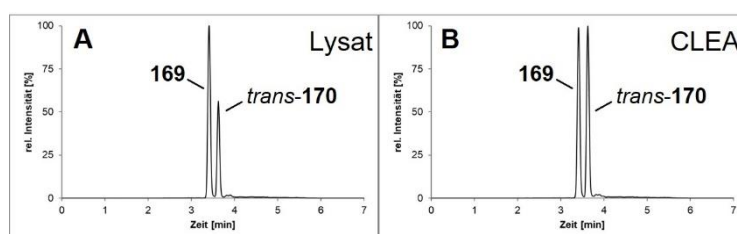


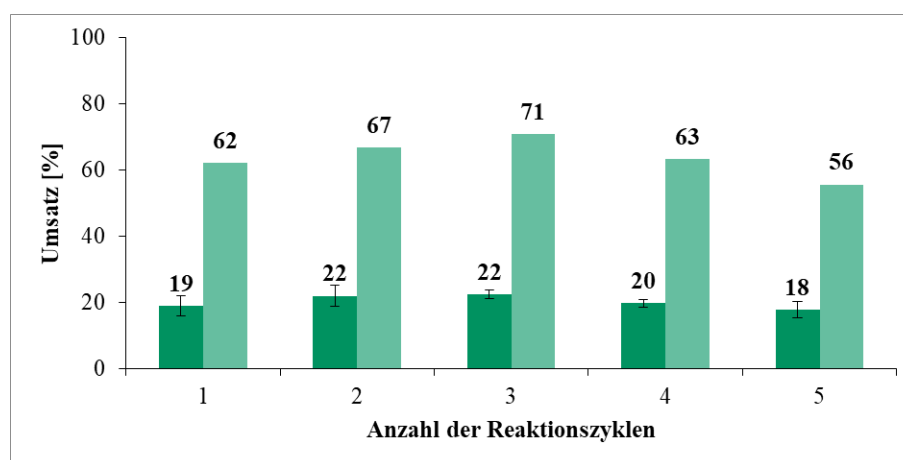
Abbildung 3-135. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von PedPS7-Lysat (A) bzw. PedPS7-CLEA (B) mit Substrat **169**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **169** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-Lysat (A) oder -CLEA (B) in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



Die Reaktion von PedPS7-Lysat mit Substrat **169** zeigte lediglich 35% Umsatz, während nach Inkubation von PedPS7-CLEA mit Substrat **169** ein Umsatz von 50% erhalten wurde. Dies bedeutet, dass Substrat **169** trotz der zusätzlichen Methylgruppe besser von PedPS7-CLEA als dem Lysat akzeptiert wurde.

### 3.5.2.2.3. Wiederverwendung

Zur Untersuchung der Wiederverwendbarkeit von PedPS7-CLEA sollte dieses in mehreren Reaktionszyklen eingesetzt werden. Hierzu wurde nach Enzymreaktion abzentrifugiert, der Überstand mit EtOAc extrahiert und *via* UPLC-MS analysiert. Danach wurde PedPS7-CLEA mit Natriumphosphat-Puffer gewaschen und erneut in Enzymaktivitätstests mit Substrat **163** eingesetzt. Hierbei wurde das Substrat in Reaktionspuffer vorgelöst und zum immobilisierten PedPS7-CLEA gegeben. Um eine Inkubation des Lysates mit Substrat zu simulieren, wurden verschiedene Aliquots des Lysates ebenfalls für 16 h bei 30 °C ohne Zugabe von Substrat inkubiert. Nach entsprechender Anzahl an Zyklen erfolgte anschließend die Inkubation mit Substrat und nachfolgend Bestimmung des Zyklisierungsumsatzes. Die Umsätze sind in Abbildung 3-136 dargestellt.



**Abbildung 3-136.** Balkendiagramm für die Umsätze von PedPS7-CLEA (grün) und PedPS7-Lysat (hellgrün) nach Verwendung in fünf aufeinanderfolgenden Reaktionszyklen. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-Lysat oder -CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

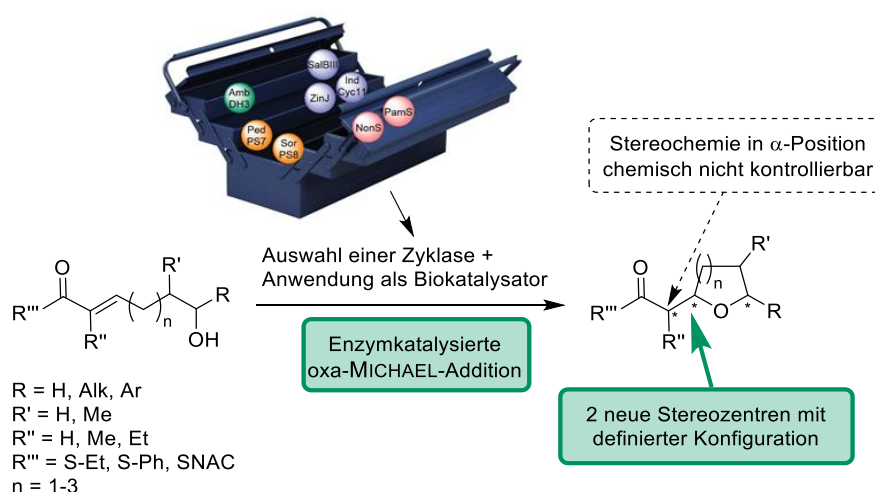
Der Unterschied zwischen den Umsatzwerten von PedPS7-CLEA (19%) und -Lysat (62%) ist von Anfang an deutlich erkennbar (Abbildung 3-136). Dennoch bleiben beide Werte über einen Zeitraum von fünf Tagen auf gleichem Niveau. PedPS7-CLEA weist zwar zu Beginn einen durchschnittlich 33% geringeren Umsatz auf, besitzt aber über fünf Reaktionszyklen hinweg keinerlei Aktivitätsverlust. Die Werte für die Umsätze in den Enzymreaktionen mit Lysat schwanken relativ stark, was sich vermutlich auf unzureichendes Mischen vor der jeweiligen Enzymreaktion zurückführen lässt.

## 4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Promotionsprojektes sollte eine kürzlich charakterisierte Gruppe von IMOMA-Zyklasen, die in unterschiedlichen Naturstoffbiosynthesen Sauerstoffheterozyklen über eine intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition bilden, eingehender untersucht und ihr Potential für eine synthetische Nutzung evaluiert werden. Dabei wurden neben des bereits teilweise durch die Forschungsgruppe HAHN biochemisch charakterisierten Enzyms AmbDH3 weitere Zyklasten untersucht (Abbildung 4-1).

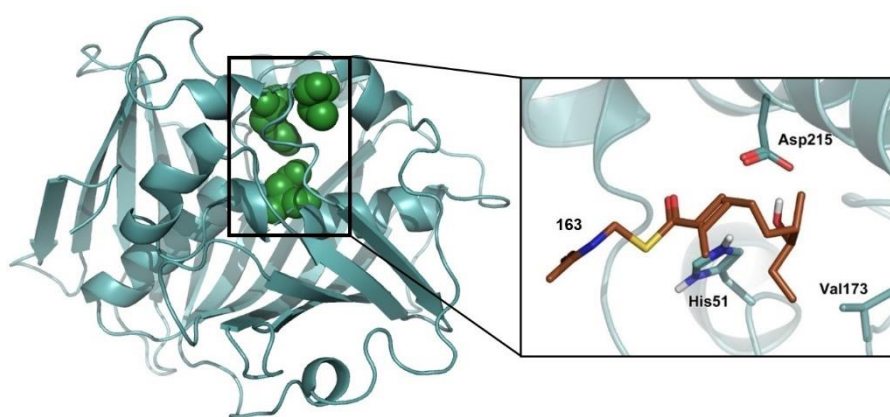
Durch Optimierung der AmbDH3-Produktion ausgehend von *E. coli* pET28a(+)<sub>ambDH3</sub> konnte die Menge an löslichem Enzym maximiert werden. Die enzymatische Zyklisierungsreaktion von Startverbindung **163** konnte mithilfe des Expressionslysates bei 30 °C durchgeführt werden. Das Lysat der *ambDH3*-Expression zeigte zudem eine unerwartet stabile Aktivität. Auch nach neunmaliger, substratfreier Langzeitinkubation bei 30 °C oder Lagerung bei -20 bzw. -80 °C zeigte dieses in nachfolgenden Enzymreaktionen einen gleichbleibend hohen Umsatz verglichen zur frischen Präparation. Sowohl das AmbDH3-Lysat als auch das gereinigte Enzym setzten nach Lyophilisierung oder Lagerung für drei Monate bei 4 °C das Substrat **163** mit fast identischem Umsatz wie eine frische Präparation um. Außerdem konnte die Zyklisierungsreaktion von AmbDH3 *in vivo* in *E. coli* BL21 mit vollständigem Umsatz durchgeführt werden.

Die Untersuchung der Substratspezifität von AmbDH3 zeigte eine breite Toleranz gegenüber strukturellen Veränderungen des natürlichen Vorläufersurrogates **163** sowie eine hohe, konservierte Stereoselektivität. Dabei wurden Substratsurrogate mit verschiedenen Substituenten und Konfigurationen an C-2, -6 und -7, ebenso wie unterschiedliche Thioester und Rückgrate akzeptiert.



**Abbildung 4-1. Enzymkatalysierte oxa-MICHAEL-Addition mithilfe der Biokatalyse-Werkzeugkiste zum Aufbau von Sauerstoffheterozyklen.**

Kristallstrukturanalyse und Mutagenesestudien von AmbDH3 kombiniert mit *in vitro*-Enzymreaktionen lieferten wichtige Erkenntnisse über den Zyklisierungsmechanismus (Abbildung 4-2). Dabei stellten sich die Reste H51 und D215 als essentiell für die Dehydratisierung sowie V173 anstelle des normalerweise auftretenden Y173 in Dehydratasen für die Zyklisierung heraus. Die Anwesenheit von V173 ermöglicht die notwendige Rückgratumlagerung während der Zyklisierung zum Pyran. Die Erkenntnisse ermöglichten es, die beiden Enzyme **AmbDH2** und **AmbDH4** basierend auf Sequenzvergleichen und Enzymaktivitätstests als „stille“ Zyklasten zu identifizieren und deren Zyklisierungsaktivität zu bestätigen.



**Abbildung 4-2. Kristallstruktur von AmbDH3 mit Substrat 163 (PDB-ID: 5O16).** Die Reste der aktiven Tasche H51 und D215 sowie dem für die Zyklisierung notwendigen V173 sind grün hervorgehoben.<sup>[44]</sup>

Zwei Methoden der reversiblen Immobilisierung wurden mit AmbDH3 getestet. Die Bindung von AmbDH3 mittels His<sub>6</sub>-tag an Ni-TED *Silica Beads* ergab bei zehnmaliger Wiederverwendung des resultierenden Harzes in Reaktionen mit Substrat **163** einen mittleren Umsatz von 35% ( $\pm 24\%$ ). Die Quervernetzung von AmbDH3 als *cross-linked enzyme aggregate* (CLEA) lief mit einer Effizienz von 86% ab und besaß danach noch 81% der ursprünglichen Aktivität. Die Kinetikparameter  $k_{cat}$  und  $K_m$  für die AmbDH3-CLEA-katalysierte Reaktion waren 10fach niedriger ( $24.7 \text{ s}^{-1}$ ) bzw. halb so hoch (4.4 mM) wie die Werte für das lösliche Enzym. Eine zehnmalige Wiederverwendung von AmbDH3-CLEA konnte mit einem mittleren Umsatz von 74% erfolgreich durchgeführt werden. AmbDH3-CLEA wies nach Lagerung bei Minusgraden hohe Umsätze und damit eine ähnlich hohe Stabilität gegenüber niedrigen Temperaturen wie das Lysat auf. Bei der Untersuchung des Einflusses von Cosolventien besaßen nicht wassermischbare Lösungsmittel wie Toluol oder Dichlormethan den geringsten Einfluss auf die Aktivität von AmbDH3-CLEA. Selbst in 100v% Toluol war ein Umsatz von 22% detektierbar. Im Rahmen von Versuchen zur Skalierung der Reaktion mit AmbDH3-CLEA war es möglich 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** umzusetzen und das immobilisierte

Enzym vier weitere Male mit identischer Performance wiederzuverwenden (quantitativer Umsatz, Ausbeute 94%).

Die analoge Untersuchung weiterer Zyklasen ergab nach Inkubation von **PedPS7** mit **163** das Stereoisomer zum AmbDH3-Produkt mit *trans*-konfiguriertem Pyranring. PedPS7 zyklisierte verschiedenste Substrate und zeigte damit eine ähnlich hohe Substratspezifität wie AmbDH3. Die Enzymaktivität nach Lagerung des löslichen PedPS7 bestand weiterhin. **SalBIII**, **SorPS8** und **ZinJ** konnten nach heterologer Genexpression in *E. coli* ebenfalls gereinigt und löslich erhalten werden. Das nach Expression unlöslich vorliegende **IndCyc11** wurde aus dem Zellpellet durch Harnstoff-induzierte Solubilisierung und anschließender Rückfaltung in nativer, löslicher Form erhalten. Die beiden Furan-bildenden Zyklasen **NonS** und **PamS** konnten *via* Ni-TED-Affinitätschromatographie in reiner Form isoliert werden. Für die Zyklasen IndCyc11 (*syn*-**163**, **165** und **187**), NonS und PamS (**165** und **187**) konnten Substrate gefunden werden, die von diesen zyklisiert wurden. Die umgesetzten Substrate lagen allesamt SNAC-gebunden vor und ähnelten strukturell dem jeweiligen hypothetischen Vorläufer aus der entsprechenden Biosynthese. Dabei waren die drei Enzyme in der Lage, sowohl Reaktionen zum Pyran als auch Furan zu katalysieren, was auf ein gewisses Maß an Substrattoleranz hindeutet. Für die Enzyme SorPS8, SalBIII und ZinJ konnten im Rahmen dieser Arbeit keine passenden Substrate gefunden werden.

Die durchgeführten Arbeiten erweiterten die Auswahl an charakterisierten IMOMA-Zyklasen und schafften am Beispiel der detaillierten Studie zu AmbDH3 eine Blaupause für entsprechende Untersuchungen verwandter Zyklasen in der Zukunft. Hiermit rückt eine Verwendung dieses neuen Enzymtyps in der chemoenzymatischen Synthese näher. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse legen nahe, dass die Verwendung dieser Zyklasen gegenüber der verfügbaren chemischen Synthesemethodologie für die IMOMA bedeutende Vorteile, wie eine hochkonservierte Stereoselektivität und die Möglichkeit zur kinetischen Racematspaltung, bietet.

### **Ausblick**

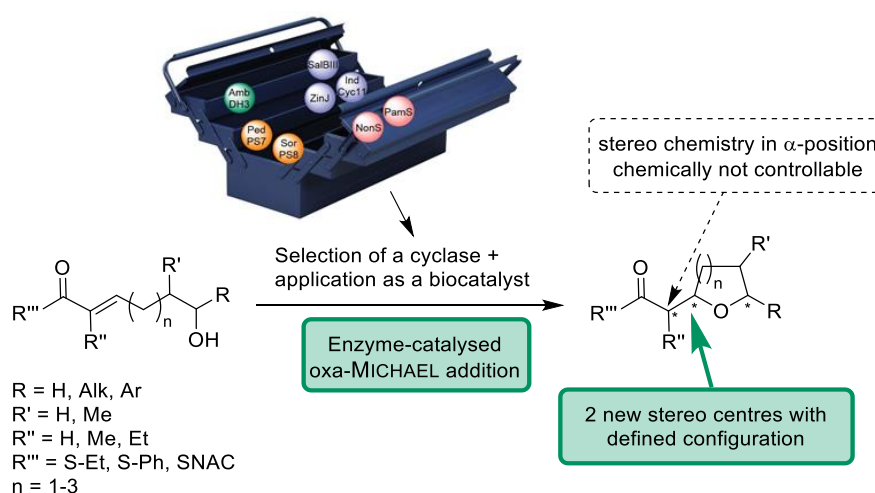
Die durchgeführten Arbeiten zeigen, dass die Enzymklasse der IMOMA-Zyklasen deutlich weiter verbreitet ist als bisher angenommen. Eine derartige Aktivität als Zyklase ist oftmals ausgehend von der Biosynthese nicht ersichtlich. Deshalb besteht die Hoffnung zukünftig viele als Dehydratasen annotierte, „stille“ Zyklasen bereits bei metagenomischer Analyse erkennen zu können. Die bisherigen Ergebnisse könnten die Grundlage für eine Optimierung von Enzymeigenschaften durch gerichtete Evolution bilden, um so möglicherweise monofunktionale Dehydratasen durch gezielte Punktmutation mit einer Zyklaseaktivität zu versehen. Das Spektrum an nutzbaren Biokatalysatoren würde sich dadurch enorm erweitern.

## 5. Summary

A recently characterized group of IMOMA cyclases, which form oxygen heterocycles in different natural product biosyntheses *via* an **intramolecular oxa-MICHAEL addition**, were examined in more detail and their potential for synthetic use was evaluated. In addition to the partly biochemically characterized cyclase AmbDH3 further cyclases were investigated (Figure 5-1).

By optimizing the AmbDH3 production in *E. coli* pET28a(+)-*ambDH3*, the amount of soluble enzyme could be maximized. The enzymatic cyclization reaction of compound **163** could be achieved with the expression lysate. The lysate of an *ambDH3* expression showed an unexpected stable activity. Even after nine substrate-free long-term incubations at 30 °C or storage at -20 and -80 °C it showed a consistently high conversion in subsequent enzyme reactions compared to the fresh preparation. After lyophilization or storage for three months at 4 °C, the AmbDH3 lysate and the purified enzyme converted the substrate **163** with almost the same conversion as before. Moreover, the cyclization reaction of AmbDH3 could be carried out *in vivo* in *E. coli* with complete conversion.

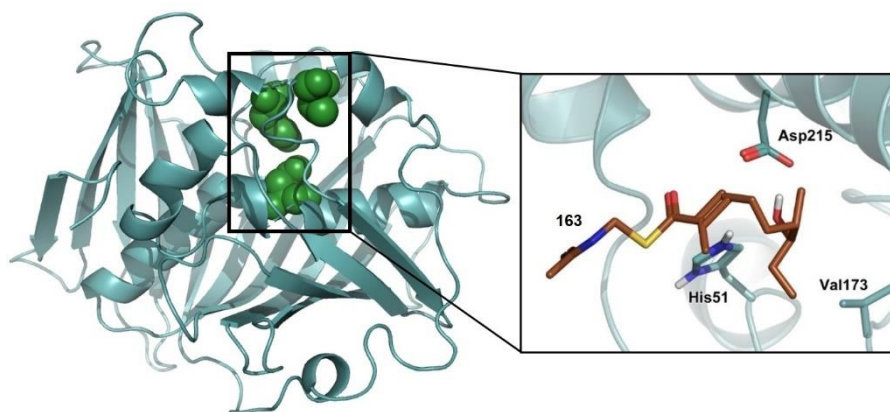
The investigation of the substrate specificity of AmbDH3 showed a broad tolerance towards structural changes in the natural precursor **163** as well as a high conserved stereoselectivity. Substrates with different substituents and configurations at C-2, -6 and -7, as well as different thioesters and backbones were accepted.



**Figure 5-1. Enzyme-catalyzed oxa-MICHAEL addition using the biocatalytic toolbox to build oxygen heterocycles.**

Crystal structure analysis and mutagenesis studies of AmbDH3 combined with *in vitro* enzymatic reactions provided important insights into the cyclization mechanism (Figure 5-2). The residues H51 and D215 turned out to be essential for dehydration and V173 instead of the normally occurring Y173 in dehydratases for cyclization. The presence of V173 enables the

necessary backbone rearrangement during cyclization to the pyran. These findings made it possible to identify AmbDH2 and AmbDH4 as "silent" cyclases based on sequence comparisons and enzyme activity tests and to assign their cyclization activity.



**Figure 5-2. Crystal structure of AmbDH3 with substrate 163 (PDB ID: 5O16).** The residues of the active site H51, D215 and the V173 required for cyclization are highlighted in **green**.<sup>[44]</sup>

Two methods of reversible immobilization were tested with AmbDH3.

The binding of AmbDH3 to Ni-TED silica beads using His<sub>6</sub>-tag resulted in an average conversion of 35% ( $\pm$  24%) when the resulting resin was reused ten times with substrate **163**. The cross-linking of AmbDH3 as cross-linked enzyme aggregates (CLEA) proceeded with an efficiency of 86% and then still had 81% of the original activity. The kinetic parameters  $k_{\text{cat}}$  and  $K_{\text{m}}$  for the AmbDH3-CLEA-catalyzed reaction were 10 times lower ( $24.7 \text{ s}^{-1}$ ) and half as high (4.4 mM) as the values for the soluble enzyme. A ten-time reuse of AmbDH3-CLEA could be carried out successfully with an average conversion of 74%. AmbDH3-CLEA showed high conversions after storage at minus degrees and thus a similarly high stability towards low temperatures as the lysate. When investigating the influence of cosolvents, water-immiscible cosolvents such as toluene or dichloromethane had the least influence on the activity of AmbDH3-CLEA. A conversion of 22% was detectable even in 100v% toluene. As part of experiments to scale the reaction with AmbDH3-CLEA, it was possible to convert 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) substrate **163** and to reuse the immobilized enzyme four more times with identical performance (quantitative conversion, 94% yield).

The analogous investigation of further cyclases showed after incubation of **PedPS7** with **163** the stereoisomer compared to the product of the AmbDH3 conversion with a *trans*-THP. PedPS7 cyclized a wide variety of substrates and thus showed a similarly high substrate specificity as AmbDH3. The enzyme activity persisted after storage of the soluble PedPS7. **SalBIII**, **SorPS8** and **ZinJ** could be purified and obtained soluble after heterologous gene expression in *E. coli*. The insoluble **IndCyc11** was gained in soluble form from the cell pellet

by urea-induced solubilization and subsequent refolding. The two furan-forming cyclases **NonS** and **PamS** were isolated in pure form *via* Ni-TED affinity chromatography. For the cyclases IndCyc11 (*syn*-**163**, **165** und **187**), NonS and PamS (**165** und **187**) substrates could be found which were cyclized by them. The converted substrates were all SNAC-bound and resembled the respective hypothetical precursor from the corresponding biosynthesis. The three enzymes were able to catalyze reactions leading to pyrans and furans, which indicates a certain degree of substrate tolerance. No suitable substrates could be found for the enzymes SorPS8, SalBIII and ZinJ.

The performed work expanded the selection of characterized IMOMA-cyclases and, using the detailed study of AmbDH3 as an example, creates a blueprint for future studies of related cyclases. This brings the use of this new type of enzyme in chemoenzymatic synthesis closer. The knowledge gained so far suggests that the use of these cyclases offers significant advantages over the available chemical synthesis methodology for IMOMA, such as a highly conserved stereoselectivity and the possibility of kinetic resolution.



## 6. Material und Methoden

### 6.1. Material

Die verwendeten Biochemikalien und Chemikalien sowie ihre Bezugsquelle, sind in Tabelle 8-1 im Anhang aufgeführt. Das verwendete Reinstwasser wurde nach Aufarbeitung durch das Laborwasserreinigungssystem B30 der Firma ADRONA gewonnen. Es wurde zur Herstellung der benötigten Medien, Puffer und Reaktionslösungen genutzt. Alle für die Bakterienkultivierung zum Einsatz gebrachten Puffer und Medien wurden vor Benutzung bei 121 °C für 20 min autoklaviert oder filtriert (0.45 µm, CA). Benötigte Enzyme wurden von THERMOFISHER SCIENTIFIC bezogen und nach Protokoll mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Methanol in HPLC-Reinheit wurde für die analytischen UPLC-MS-Messungen benutzt. Reinheit beziehungsweise Qualität sind ebenfalls in Tabelle 8-1 im Anhang aufgeführt.

### 6.2. Methoden

#### 6.2.1. Biochemische und molekularbiologische Arbeiten

##### 6.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

dYT-Medium:	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Kompetenzpuffer I:	50 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Kaliumacetat, pH 6.2
Kompetenzpuffer II:	50 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Kaliumacetat, 20% (v/v) Glycerin, pH 6.2

In einem 15 mL-Reaktionsgefäß wurden 5 mL dYT-Medium mit *E. coli*-Zellen aus einer Gefrierkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 mL entnommen und in einen 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Spirale mit 50 mL dYT-Medium überführt. Die Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Nach 3 h wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 3500 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 mL eiskaltem Kompetenzpuffer I resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 10 min bei 4 °C und 3500 ×g zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 5 mL eiskaltem Kompetenzpuffer II resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Trockeneis (−78 °C) zu jeweils 50 µL aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei −80 °C gelagert.

### 6.2.1.2. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

SOC-Medium	0.5% (w/v) Hefeextrakt, 2.0% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O, 1.0% (w/v) Glucose, pH 7.0
dYT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
dYT-Agar	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 16 g/L Agar
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34 mg/mL Chloramphenicol in <i>iso</i> -Propanol

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 50 µL chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 1 µL Plasmid hinzugegeben und für 10–30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte im Anschluss durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Die Proben wurden weitere 10 min auf Eis inkubiert, mit 500 µL SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 300 UpM inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 s bei 5000 ×g wurden 450 µL des Überstandes verworfen, der Rückstand resuspendiert und auf dYT-Agarplatten (25 mL dYT-Agar mit 0.1% (v/v) Antibiotikum) ausplattiert. Die nachfolgende Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### 6.2.1.3. Stammhaltung

Glycerin (50% (w/v))	0.5 g/mL Glycerin (99.9%) in H <sub>2</sub> O
----------------------	---

Zur Konservierung der Stämme wurden Gefrierkulturen angefertigt. Hierfür wurden 500 µL einer Bakterienkultur mit 500 µL Glycerin (50% (v/v) in H<sub>2</sub>O) unter der Sterilbank in Cryoröhrchen gegeben und bei –80 °C gelagert.

### 6.2.1.4. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* One Shot™ TOP10

Für eine Lagerung bei –20 °C und Transformationen wurde aus alkalischer Lyse isolierte DNA verwendet. Für eine Lagerung bei –20 °C, Klonierungsarbeiten, Transformationen und Sequenzierungen wurde mittels *QIAprep miniprep Kit* isolierte DNA verwendet, da die Sequenzierungen ansonsten keine oder Ergebnisse schlechter Qualität lieferten.

Nach Transformation in *E. coli* One Shot™ TOP10 mit einem Plasmid wurde eine Kolonie der entsprechenden Agarplatte in 6 mL dTY-Medium mit 6 µL des entsprechenden Antibiotikums in einem 15 mL-Reaktionsgefäß bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde bei 10000 ×g für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen.

### Alkalische Lyse

dYT-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Lösung I	50 mM Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8.0
Lösung II	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Lösung III	3 M Kaliumacetat, pH 5.5
RNase I-Stammlösung	10 mg/mL RNase I in H <sub>2</sub> O

Das Zellpellet wurde in 1 mL Lösung I und 10 µL RNase I resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurden 2 mL Lösung II zugegeben, die Suspension mehrmals invertiert und weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurden 1.5 mL Lösung III und 500 µL Chloroform zugegeben, mehrmals invertiert und bei 10000 ×g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde zu 3.5 mL *iso*-Propanol gegeben und bei 13000 ×g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde zweimal mit 1 mL 70% Ethanol gewaschen und jeweils bei 13000 ×g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und Reste von Ethanol wurden bei 45 °C und vermindertem Druck entfernt. Das Pellet wurde anschließend in 100 µL MPW gelöst und bei –20 °C gelagert.

### Isolation von DNA mithilfe des *QIAprep miniprep Kits*

Puffer P1	<i>QIAprep miniprep Kit</i> der Firma QIAGEN
Puffer P2	<i>QIAprep miniprep Kit</i> der Firma QIAGEN
Puffer N3	<i>QIAprep miniprep Kit</i> der Firma QIAGEN
RNase I Stammlösung	10 mg/mL RNase I in H <sub>2</sub> O

Wichtig ist die Durchführung der Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur, um ein Kristallisieren der Salze in den Pufferlösungen zu verhindern. Das Zellpellet wurde in 250 µL Puffer P1 und 2.5 µL RNase I resuspendiert und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach mehrmaligem Invertieren wurden 250 µL Puffer P2 hinzugegeben und erneut invertiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit 350 µL Puffer N3 versetzt und für 10 min bei 13000 ×g zentrifugiert. 300 µL des resultierenden Überstandes wurden auf die mitgelieferte Säule gegeben und für 1 min bei 13000 ×g zentrifugiert. Der Durchbruch wurde verworfen und 750 µL Puffer PE auf die Säule gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 ×g für 1 min, woraufhin der Durchbruch erneut verworfen wurde. Zum vollständigen Entfernen der Waschlösung erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Anschließend wurden 50 µL H<sub>2</sub>O auf die

Säule gegeben und für 1 min stehen gelassen. Die Elution geschah durch Zentrifugation bei 13000 ×g für 1 min. Die Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt und die gereinigte Probe bei –20 °C gelagert.

#### 6.2.1.5. Reinigung von DNA mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits

NTI-Puffer	<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit</i> der Firma MACHEREY-NAGEL
NT3-Puffer	<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit</i> der Firma MACHEREY-NAGEL

Für die Reinigung von DNA-Proben aus PCR-Ansätzen wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Hierfür wurde die zu reinigende Probe mit dem doppelten Volumen an NTI-Puffer versetzt, auf die mitgelieferte Säule gegeben und für 1 min bei 11000 ×g zentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschriffe durch Zugabe von je 700 µL NT3-Waschpuffer und Zentrifugation bei 11000 ×g für 1 min. Um die Säule zu trocknen wurde diese nach den Waschschriffen 1 min bei 11000 ×g zentrifugiert und 3 min bei 70 °C inkubiert. Für die Elution wurden 20 µL MPW auf die Säule gegeben und für 1 min stehen gelassen. Schließlich wurde bei 11000 ×g für 1 min zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde gegebenenfalls wiederholt. Die Ermittlung der Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm. Die Probe wurde anschließend bei –20 °C gelagert.

#### 6.2.1.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von linearisierter und zirkulärer DNA erfolgte durch photometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 260 nm an einem Plattenlesegerät. Die Reinheit von DNA wurde durch Bildung der Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  (1.8–2.0; Verunreinigungen durch Proteine) und  $A_{260}/A_{230}$  (>2; Verunreinigungen durch Phenole) bestimmt.

#### 6.2.1.7. Agarosegelelektrophorese

Agarosegel	1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer
TAE-Puffer	40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0
Probenpuffer (6×)	10 mM TRIS-HCl, 0.03% (w/v) Bromphenolblau, 0.03% (w/v) Xylencyanol FF, 60% (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA, pH 7.6
Fluoreszenz-Farbstoff	<i>Midori Green Advance</i> der Firma NIPPON GENETICS
DNA-Standard	<i>GeneRuler 1 kb</i> DNA-Leiter oder <i>GeneRuler 1 kb Plus</i> DNA-Leiter der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC

Zur Analyse von Plasmid-DNA sowie einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurden native 1%ige Agarosegele genutzt. Die Auftrennung von DNA erfolgte hierbei nach ihrer

Größe in einer Agarosematrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Agarose wurde durch Erhitzen in 1× TAE-Puffer gelöst, nach kurzer Abkühlphase mit 0.08 µL Fluoreszenz-Farbstoff pro 1 mL Gelvolumen versetzt und in den Gelträger der Gelelektrophoresekammer gegossen. Vor Beladung des Gels wurden die DNA-Proben mit 6× Probenpuffer auf eine 1× Startkonzentration verdünnt. Als Marker dienten 5 µL des DNA-Standards. Die Elektrophorese wurde bei 110 V für 1 h 30 min bzw. bis die Farbstoffbande das untere Ende des Gels erreicht hat in 1× TAE-Puffer durchgeführt. Durch Interkalation des UV-Farbstoffes in DNA konnten die DNA-Fragmente zur Analyse anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 6.2.1.8. Polymerasekettenreaktion

##### 6.2.1.8.1. Standard-PCR

Die Erzeugung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe von selektiven Primern unter Verwendung der thermostabilen *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase über eine Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Primer für die PCR wurden von SIGMA-ALDRICH (Tabelle 8-4) und die Polymerase von THERMOFISHER SCIENTIFIC bezogen. Die Zusammensetzung der Standard-PCR ist in Tabelle 6-1 beschrieben.

**Tabelle 6-1. Standard-PCR unter Verwendung der *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase.**

Komponente	Volumen [µL]	Startkonzentration
5× HF-Puffer mit 2.5 mM MgCl <sub>2</sub>	10	1×
10 mM dNTP-Mix	1	200 µM
10 µM 5'-Primer	2.5	0.5 µM
10 µM 3'-Primer	2.5	0.5 µM
Templat-DNA		100–250 ng
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase (2 U/µL)	0.5	0.5 U
H <sub>2</sub> O	<i>ad 50</i>	

Die PCR wurde in einem Thermocycler mit einem den Primern und Genen angepasstem Temperaturprogramm durchgeführt. Das Temperaturprotokoll ist in Tabelle 6-2 gezeigt.

**Tabelle 6-2. Standard-Temperaturprotokoll der PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten.**

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	Initiale Denaturierung	98	60–180
25–35	Denaturierung	98	30
	Primerhybridisierung	65–72	30
	Elongation	72	15–30 s/kbp
1	Finale Elongation	72	300–600
1	Lagerung	4	Bis zur Probenentnahme

Anschließend erfolgte eine Überprüfung der produzierten DNA-Amplifikate mittels Agarose-gelelektrophorese (Abschnitt 6.2.1.7), gefolgt von Reinigung (Abschnitt 6.2.1.5), Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 6.2.1.6) und Lagerung bei  $-20\text{ °C}$ .

#### 6.2.1.8.2. PCR zur Einfügung von ortsgerichteten Mutationen

Um eine Mutation in ein Plasmid einzufügen, wurden Primer erstellt, die die gewünschte Mutation enthalten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig (ein oder maximal zwei) Basen im Vergleich zum parentalen Plasmid ausgetauscht werden müssen. Des Weiteren soll die Mutation von mindestens 10 und maximal 14 Nukleotiden an jeder Seite flankiert werden und wenn möglich mindestens sechs Cytosin- oder Guanin-Nukleotide enthalten. Bei Mutation von mehreren Basen kann die Sequenz auf jeder Seite der Mutation auf 20 Nukleotide erhöht werden. Zudem ist es von Vorteil, wenn die Primer auf ein C oder G enden. Die Zusammensetzung der PCR zur ortsgerichteten Mutagenese und dessen Temperaturprotokoll sind in Tabelle 6-3 und Tabelle 6-4 dargestellt.

**Tabelle 6-3. PCR unter Verwendung der *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase zur zielgerichteten Mutagenese.**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Startkonzentration
5× HF-Puffer mit 2.5 mM $\text{MgCl}_2$	4	1×
10 mM dNTP-Mix	0.4	200 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ 5'-Primer	1	0.5 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ 3'-Primer	1	0.5 $\mu\text{M}$
Templat-DNA		50–100 ng
DMSO	0.6	0, 3, 5 oder 10%
<i>Phusion High-Fidelity</i> DNA-Polymerase (2 U/ $\mu\text{L}$ )	0.2–0.5	0.2–0.5 U
$\text{H}_2\text{O}$	<i>ad 20</i>	

**Tabelle 6-4. Temperaturprotokoll der PCR zur zielgerichteten Mutagenese.**

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer [s]
1	Initiale Denaturierung	98	120
18–25	Denaturierung	98	30
	Primerhybridisierung	50–60	30
	Elongation	72	15–30 s/kbp
1	Finale Elongation	72	600
1	Lagerung	4	Bis zur Probenentnahme

Die PCR-Produkte wurden mit dem Restriktionsenzym *DpnI* inkubiert, wodurch methylierte, parentale DNA abgebaut wird. Hierfür wurden die PCR-Produkte direkt mit 0.5  $\mu\text{L}$  *DpnI* bei 37  $^{\circ}\text{C}$  für 60 min und 300 UpM inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms geschah bei 80  $^{\circ}\text{C}$  für 5 min. 5  $\mu\text{L}$  wurden direkt für eine Transformation in *E. coli* OneShot™ TOP10 verwendet (Abschnitt 6.2.1.2).

Zur Verbesserung der Aufnahme des entstandenen mutierten Plasmids wurde eine kombinierte einstündige Inkubation mit *DpnI*, T4-DNA-Ligase und T4 Polynukleotid-Kinase bei 37  $^{\circ}\text{C}$  durchgeführt (Tabelle 6-5). Die Enzyme wurden bei 80  $^{\circ}\text{C}$  für 5 min inaktiviert und die zyklisierten Produkte für eine Transformation weiterverwendet.

**Tabelle 6-5. Zusammensetzung für den Abbau der parentalen DNA und der Zirkualisierung der PCR-Produkte mittels *DpnI*, Polynukleotid-Kinase und Ligase.**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Startkonzentration/-menge
10× Puffer A	1	0.8×
20 mM ATP	1	1.5 mM
PCR-Produkt	10	
FastDigest <i>DpnI</i>	0.5	
T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.1	0.5 U
T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5	5 U

### 6.2.1.8.3. Kolonie-PCR

Für den Nachweis positiver Klone nach einer Ligation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Im Gegensatz zur Standard-PCR dient hier keine gereinigte DNA, sondern eine Bakterienkolonie als DNA-Templat. Dadurch können viele Bakterienkolonien gleichzeitig auf die Aufnahme des entsprechenden Inserts überprüft werden.

Eine Kolonie wurde in 8.6  $\mu\text{L}$  Mastermix 1 (Tabelle 6-6) suspendiert, für 3 min inkubiert und nachfolgend für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden 1.4  $\mu\text{L}$  Mastermix 2 (Tabelle 6-6) zugegeben und das Temperaturprogramm der Kolonie-PCR (Tabelle 6-7) durchlaufen. Die Kolonie-PCR wurde mit den genspezifischen Primern (Tabelle 8-4) unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase (THERMOFISHER SCIENTIFIC) durchgeführt. Die Primerhybridisierungstemperatur wurde den Primern angepasst. Gleichzeitig wurde eine Negativkontrolle mit MPW durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 6.2.1.7) analysiert.

**Tabelle 6-6. Zusammensetzung der Kolonie-PCR unter Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase.**

	Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Startkonzentration
<b>Mastermix 1</b>	10× <i>Taq</i> Puffer mit KCl	1	1×
	25 mM MgCl <sub>2</sub>	0.8	2 mM
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 8.7	
<b>Mastermix 2</b>	10 mM dNTP-Mix	0.2	200 $\mu\text{M}$
	10 $\mu\text{M}$ 5'-Primer	0.5	0.5 $\mu\text{M}$
	10 $\mu\text{M}$ 3'-Primer	0.5	0.5 $\mu\text{M}$
	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.1	0.5 U



**Tabelle 6-7. Standard-Temperaturprotokoll der Kolonie-PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten.**

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	Denaturierung der Zellen	98	300
Zugabe von Mastermix 2			
1	Initiale Denaturierung	98	180
25–40	Denaturierung	98	30
	Primerhybridisierung	65–72	30
	Elongation	72	60 s/kbp
1	Finale Elongation	72	300
1	Lagerung	4	Bis zur Probenentnahme

#### 6.2.1.9. Enzymatische Hydrolyse von DNA

Die enzymatische Restriktion von DNA erfolgte unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen FastDigest *EcoRI*, *NcoI*, *NdeI* und *NotI* von THERMOFISHER SCIENTIFIC. Das Reaktionsvolumen betrug immer das zehnfache des Gesamtvolumens der in der Reaktion eingesetzten Enzyme. Falls präparative Ansätze von Nöten waren, wurden die Werte dementsprechend hochskaliert. Zudem wurde hier Alkalische Phosphatase zugesetzt, um eine Rezirkularisierung der DNA zu verhindern. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C für 1 h. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte abschließend bei 80 °C für 20 min. Das Protokoll für die enzymatische Hydrolyse von DNA ist in Tabelle 6-8 gezeigt.

**Tabelle 6-8. Standard-Protokoll für die enzymatische Hydrolyse von DNA.**

Komponente	Volumen [µL]	Startkonzentration
10× FastDigest-Puffer	2	1×
DNA	500 ng	25 ng/µL
FastDigest Enzym I	0.5	
FastDigest Enzym II	0.5	
Alkalische Phosphatase (1 U/µL) (nur bei präparativen Ansätzen)	1	0.1 U/µL
H <sub>2</sub> O	<i>ad 20</i>	

6.2.1.10. Two-Step-SLIC

Zuerst wurden 1 µg des Vektors pCold-I mit den Restriktionsendonukleasen FastDigest *EcoRI* und *NdeI* inkubiert (Abschnitt 6.2.1.9). Der linearisierte Vektor und die beiden per PCR amplifizierten Inserts wurden anschließend einzeln mit der T4 DNA-Polymerase für 30 min bei RT gemäß Tabelle 6-9 inkubiert. Durch Zugabe von je 1/10 des Gesamtvolumens an 10 mM CTP wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurden Vektor, das jeweilige Insert, Ligasepuffer, DNA-Ligase und H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 15 µL entsprechend Tabelle 6-10 vermischt. Das Verhältnis linearisierter Plasmid-DNA zu DNA-Insert betrug 1:1 bzw. 1:5 und wurde mit folgender Gleichung 1 berechnet (wobei x = 1 oder 5):

$$\text{ng(Insert)} = \frac{\text{ng(Vektor)} \times \text{kb(Insert)}}{\text{kb(Vektor)}} \times x \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die Zusammensetzung der einzelnen Ligationsansätze ist in Tabelle 6-10 aufgelistet. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 6-9. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den ersten Schritt der *Two-Step-SLIC*.**

Komponente	Volumen [µL]	Startkonzentration/-menge
5× T4 Puffer	4	1×
10× BSA	2	1×
Linearisierter pCold-I		1 µg
DNA-Insert		1 µg
T4 DNA-Polymerase (5 U/µL)	0.1	0.5 U
H <sub>2</sub> O	<i>ad 20</i>	

**Tabelle 6-10. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Ligationsschritt der *Two-Step-SLIC*.**

Verhältnis Vektor:Insert	Komponente				
	Linearisierter pCold-I	Insert	10× T4-DNA- Ligase Puffer	T4-DNA- Ligase	H <sub>2</sub> O
<b>1:1</b>	100 ng	siehe Gleichung 1	1.5 µL	0.1 µL	<i>ad 15 µL</i>
<b>1:5</b>					

Im Anschluss wurden 1–5 µL des Ansatzes in *E. coli* OneShot® TOP10 transformiert (Abschnitt 6.2.1.2).

6.2.1.11. Ligation von linearisierter DNA

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten erfolgte durch die T4 DNA-Polymerase von THERMOFISHER SCIENTIFIC. Die Ligation erfolgte bei RT für 1 h oder bei 4 °C über Nacht. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µL mit einer DNA-Menge von 100 ng linearisierter Plasmid-DNA. Das Verhältnis linearisierter Plasmid-DNA zu DNA-Insert betrug 1:1 bzw. 1:5 und wurde mit Gleichung 1 berechnet. Das Protokoll für die Ligation von linearisierter DNA ist in Tabelle 6-11 gezeigt.

**Tabelle 6-11. Zusammensetzung für die enzymatische Ligation von linearisierter DNA.**

Komponente	Volumen [µL]	Startkonzentration/-menge
10× T4-DNA-Ligase Puffer	2	1×
Linearisierte Plasmid-DNA		100 ng
DNA-Insert	siehe Gleichung 1	
T4-DNA-Ligase (5 U/µL)	0.5	2.5 U
H <sub>2</sub> O	ad 20	

Eine Inaktivierung erfolgte entweder bei 65 °C für 15 min oder bei 80 °C für 20 min. Anschließend wurden 5 µL des Ansatzes in *E. coli* One Shot™ TOP10 Zellen transformiert (Abschnitt 6.2.1.2).

6.2.1.12. Gateway™-Klonierung

TE-Puffer                      10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Der *Gateway™ LR Clonase™ II* Enzym-Mix (THERMOFISHER SCIENTIFIC) wurde für 5 min auf Eis aufgetaut, kurz gevortext und alle Komponenten entsprechend Tabelle 6-12 zusammen pipettiert. Die Reaktion wurde bei 25 °C über Nacht inkubiert und im Anschluss durch Zugabe von 1 µL Proteinase K-Lösung (THERMOFISHER SCIENTIFIC) gestoppt. Die Lösung wurde ohne weitere Reinigung für eine Transformation in *E. coli* TOP10 verwendet (Abschnitt 6.2.1.2).

**Tabelle 6-12. Zusammensetzung für die Reaktion der Gateway™-Klonierung.**

Komponente	Volumen [µL]	Endmenge
TE-Puffer	6	
Ausgangsvektor: pENTR-YA_ambMod4		150 ng
Zielvektor: pETGXA_ccdB		150 ng
LR Clonase™ II Enzym-Mix	2	

#### 6.2.1.13. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden mithilfe des Sequenzierkits Mix2Seq von EUROFINS GENOMICS bzw. der Barcode Labels Economy Run von MICROSYNTH durchgeführt. Als DNA-Probe diente in beiden Fällen Plasmid, welches mithilfe des *QIAprep miniprep Kits* isoliert wurde (Abschnitt 6.2.1.4). Für die Sequenzierung bei EUROFINS GENOMICS wurden in einem Sequenziergefäß 15 µL gereinigte Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50–100 ng/µL vorgelegt und mit 2 µL des Sequenzierprimers (10 µM) (Tabelle 8-4) versetzt. Für Sequenzierungen von MICROSYNTH wurden in einem 1.5 mL-Reaktionsgefäß 12 µL einer Plasmid-Lösung mit 40–100 ng/µL zusammen mit 3 µL des entsprechenden Sequenzierprimers (10 µM) vorgelegt. Die Sequenzierungen erfolgten jeweils in *forward* und *reverse* Richtung und deckten dabei das komplette Gen ab.

### 6.2.2. Proteinchemische Arbeiten

#### 6.2.2.1. Vorkulturen

dTY-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34 mg/mL Chloramphenicol in <i>iso</i> -Propanol

Für die Vorkulturen wurden 5–50 mL dYT-Medium verwendet. Als Selektionsmarker diente das entsprechende Antibiotikum in einer Konzentration von 0.1% (v/v). Bei Zellen mit zusätzlichem Chaperon-kodierendem Vektor wurden darüber hinaus 0.1% (v/v) Chloramphenicol zugegeben. Die Vorkulturen wurden mit einer Einzelkolonie oder Gefrierkultur angeimpft und in einem 15 mL-Reaktionsgefäß bzw. 100 mL-Kultivierkolben mit Spirale bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert.

### 6.2.2.2. Expressionskulturen

#### 6.2.2.2.1. IPTG-induzierte Expressionskulturen

dTY-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34 mg/mL Chloramphenicol in <i>iso</i> -Propanol
IPTG-Lösung	1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid in H <sub>2</sub> O

Für die Proteinproduktion wurden Hauptkulturen mit einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0.05 erstellt. Dazu wurden jeweils 50–200 mL Medium mit 0.1% (v/v) Antibiotikum in Kultivierkolben mit Spirale vorbereitet, mit dem entsprechenden Volumen der Vorkultur angeimpft und anschließend bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  zwischen 0.4 und 0.6 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 M IPTG (Endkonzentration 0.1 oder 1.0 mM IPTG) induziert. Die Expressionskulturen wurden für 22 h bei 15 °C und 180 UpM inkubiert.

#### 6.2.2.2.2. Autoinduzierte Expressionskulturen

dYT-Autoinduktionsmedium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM NH <sub>4</sub> Cl, 5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 0.5% (w/v) Glycerin, 0.2% (w/v) Lactose, 2.8 mM Glucose, 0.1 mM FeCl <sub>3</sub>
Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	34 mg/mL Chloramphenicol in <i>iso</i> -Propanol

Es wurden Hauptkulturen mit einer  $OD_{600}$  von 0.05 in 200 mL dYT-Autoinduktionsmedium mit entsprechendem Antibiotikum in Kultivierkolben mit Spirale angeimpft. Die Kolben wurden bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0.4–0.6 wurden die Kulturen bei 15 °C und 180 UpM für 22 h inkubiert.

#### 6.2.2.3. Zellernte

Nach 22 h wurden die Zellen der Expressionskulturen für 20 min bei 4234  $\times g$  und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in H<sub>2</sub>O resuspendiert, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt, erneut präzipitiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

### 6.2.2.4. Zellaufschluss mit Lysozymbehandlung

Lysepuffer	40 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10% (w/v) Glycerin, pH 8.5
Lysozym-Lösung	2 mg/mL Lysozym in Lysepuffer

Die entnommenen Proben aus der Expressionskultur wurden in 1 mL Lysepuffer pro 0.1 mg Zellpellet resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Lysozymlösung hinzugegeben und 1 h bei 37 °C und 300 UpM inkubiert. Die Proben wurden dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und aufgetaut. Nach Zentrifugation bei 10000 ×g und 4 °C für 30 min wurden aus Pellet und Überstand Proben für eine nachfolgende Analyse per SDS-PAGE angefertigt (Abschnitt 6.2.2.6).

### 6.2.2.5. Zellaufschluss mit Ultraschallbehandlung

HEPES-Puffer	25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8
Natriumphosphat-Puffer	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.4

Das Zellpellet wurde in 1 mL Puffer pro 0.1 g Pellet resuspendiert (Natriumphosphat-Puffer bei Immobilisierung als CLEAs, ansonsten standardmäßig HEPES-Puffer). Die Zellen wurden 10 min im 30 s Rhythmus und einer 45%igen Amplitude mit Ultraschall unter ständiger Eiskühlung aufgeschlossen. Das Volllysat wurde bei 10000 ×g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, filtriert (0.45 µm, CA) und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 6.2.2.6. Diskontinuierliche SDS-PAGE

Trenngel (12%)	40% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 390 mM TRIS-HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 0.04% (v/v) <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED), 0.1% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
Sammelgel (5%)	17% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 62.5 mM TRIS-HCl (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
Probenpuffer (4×)	20 mM Dithiothreitol (DTT), 200 mM TRIS-HCl, 20% (w/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 0.8% (w/v) Bromphenolblau
Fixierlösung	50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure (100%ig)
Färbelösung	5% (v/v) Ethanol, 7.5% (v/v) Essigsäure (100%ig)
Coomassielösung	7.75 mM Coomassie Blue R-250
Marker	<i>PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter (10-180 kDa)</i> oder <i>PageRuler™ Plus vorgefärbte Proteinleiter (10-250 kDa)</i> der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC

Die Lösung für das 12%ige Trenngel wurde zusammen pipettiert, invertiert und ca. 4 mL zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegeben. APS diente als Radikalstarter und TEMED als Polymerisationskatalysator. Um Luftblasen zu vermeiden, wurden im Anschluss 500  $\mu$ L *iso*-Propanol darauf gegeben. Nach Polymerisation des Gels wurde das *iso*-Propanol abgegossen und das 5%ige Sammelgel erstellt. Nach leichtem Invertieren wurden 1–1.5 mL dieser Lösung zwischen die Platten gegeben. Für die Gelproben wurden die entsprechenden Lösungen mit Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. TRIS-Glycin-Puffer diente für die SDS-PAGE als Laufpuffer. Von den Gelproben wurden 10–20  $\mu$ L und vom Marker 5  $\mu$ L aufgetragen. Die Kammer wurde an eine Stromquelle angeschlossen und die Proteine für 10 min bei 135 V und 1.5 h bei 175 V ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Trenngel wurde mit Fixierlösung bedeckt, für 30 s in der Mikrowelle erwärmt, auf dem Wippschüttler für 5 min geschwenkt und die Lösung anschließend verworfen. 200  $\mu$ L Coomassielösung wurden mit 50 mL Färbelösung vermischt und zum Gel gegeben. Nach erneuten 30 s in der Mikrowelle wurde das Gel für 30–60 min auf dem Wippschüttler geschwenkt. Zum Entfärben des Gels wurde dieses in VE-H<sub>2</sub>O über Nacht geschwenkt und zur Dokumentation fotografiert.

#### 6.2.2.7. Methoden zur Proteinreinigung und Analyse

##### 6.2.2.7.1. Proteingewinnung unter denaturierenden Bedingungen

Lysepuffer	50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0.5% (v/v) Triton-X 100, 1 mM DTT, 0.1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), pH 8.5
Waschpuffer	50 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) NaN <sub>3</sub> , 0.5% (v/v) Triton-X 100, pH 8.5
Denaturierungspuffer	50 mM TRIS-HCl, 8 M Urea, pH 7.5
Dialysepuffer	50 mM TRIS-HCl, pH 8.5

Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (1 mL pro 0.1 g Pellet) gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung analog zu Abschnitt 6.2.2.5. Anschließend wurde 10 min bei 11000  $\times$ g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das verbliebene Pellet wurde in Waschpuffer gelöst und bei 11000  $\times$ g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Im Anschluss daran wurden 1 mL pro 0.1 g des ursprünglichen Zellpellets Denaturierungspuffer hinzugegeben und 1 h bei RT und 10 UpM in einem Überkoprotator inkubiert. Das Protein wurde durch den harnstoffhaltigen Denaturierungspuffer entfaltet und somit solubilisiert. Die unlöslichen Reste wurden durch Zentrifugation bei 11000  $\times$ g und 4 °C für 30 min abgetrennt. Der Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa, CARL ROTH) wurde vor dem Befüllen gründlich mit H<sub>2</sub>O gespült. Die denaturierte

Proteinlösung wurde mit Dialysepuffer auf eine Harnstoffkonzentration von 5 M verdünnt. Die Dialyse der Proteinlösung erfolgte unter sanftem Rühren über Nacht bei 4 °C. Durch Senkung der Harnstoffkonzentration konnte sich das Protein langsam rückfalten. Die Proteinlösung wurde nach der Dialyse bei 11000 ×g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Proteine zu entfernen, und im Anschluss per Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 6.2.2.7.2).

#### 6.2.2.7.2. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Waschpuffer I 30 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 7.5

Waschpuffer II 30 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin, pH 7.5

Elutionspuffer 30 mM TRIS-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.5

Das filtrierte Lysat wurde luftblasenfrei in das FPLC ÄKTA Pure System der Firma GE HEALTHCARE injiziert. Die Reinigung der löslich exprimierten His<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgte per Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit einer HisTrap<sup>™</sup> FF Ni-NTA-Säule (5 mL Säulenvolumen; GE HEALTHCARE). Die Auftragung auf die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Im Anschluss folgte ein Waschschrift mit Waschpuffer I oder II bis zu einem Grenzwert der Absorption von 50 mAU. Zur Elution der Proteine wurde ein Gradient von 0 bis 100% Elutionspuffer in 5 CV bei einer Flussrate von 5 mL/min angelegt. Anschließend folgten 5 CV 100% Elutionspuffer. Die Fraktionierung erfolgte in 1 mL-Schritten. Gelproben für eine SDS-PAGE (Abschnitt 6.2.2.6) wurden entnommen und entsprechend vorbereitet (Abschnitt 6.2.2.6).

#### 6.2.2.7.3. Ni-TED-Affinitätschromatographie

LEW-Puffer *Protino<sup>®</sup> Ni-TED Packed Columns* der Firma MACHEREY-NAGEL

Elutionspuffer *Protino<sup>®</sup> Ni-TED Packed Columns* der Firma MACHEREY-NAGEL

Lösliche His<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden mittels Ni-TED-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Protino<sup>®</sup> Ni-TED-Säule von MACHEREY-NAGEL gereinigt. Zunächst wurde die Säule mit 2 mL LEW-Puffer pro 1 g Ni-TED-Harz äquilibriert. Daraufhin wurde das filtrierte Lysat auf die Säule gegeben und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Lysat lief im Anschluss durch die Säule und wurde noch zwei weitere Male aufgetragen. Die Säule wurde mit 8 mL LEW-Puffer pro 1 g Ni-TED-Harz gewaschen und die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von 6 mL pro 1 g Ni-TED-Harz Elutionspuffer. Der Elutionsschritt wurde zwei Mal



wiederholt. Von allen Reinigungsschritten wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 6.2.2.6) analysiert.

### 6.2.2.7.4. Pufferwechsel

HEPES-Puffer                      25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8

HEPES-Glycerin-Puffer        25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 6.8

Um die Proteine nach Reinigung per FPLC im gewünschten Puffer vorliegen zu haben, wurde eine PD-10 Säule der Firma GE HEALTHCARE verwendet. Diese wurde zuvor mit 25 mL des gewünschten Puffers äquilibriert. 2.5 mL der Proteinlösung wurden auf die Säule gegeben. Anschließend wurden 3.5 mL Puffer hinzugegeben und das Eluat in einem separaten 15 mL-Reaktionsgefäß gesammelt. Der Vorgang des Pufferwechsels entsprach den Herstellerangaben.

### 6.2.2.7.5. Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption

Um die Konzentration der Proteinlösung zu erhalten, wurde das Mikroplattenlesegerät Varioscan™ der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC verwendet. Dafür wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Mittelwert der Leerwerte wurde vom Mittelwert der Proben subtrahiert und mithilfe des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (Gleichung 2) die Proteinkonzentration berechnet. Die Variable  $c$  beschreibt dabei die Konzentration,  $d$  die Schichtdicke und  $\epsilon$  den Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient wurde mittels Prot-Param<sup>[207]</sup> berechnet.

$$A = \epsilon \times c \times d \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

### 6.2.2.7.6. Konzentrationsbestimmung mittels BRADFORD-Test

Der BRADFORD-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm von Coomassie Brilliant Blau G-250 kann durch die Bindung an Proteine gemessen werden und so auf die Konzentration des entsprechenden Proteins in Lösung geschlossen werden. Diese Methode wurde ausschließlich zur Konzentrationsbestimmung von PamS verwendet. PamS besitzt zu wenige aromatische Aminosäuren, um verlässlich die Konzentration anhand der Absorption bei 280 nm zu bestimmen. Zu 5  $\mu$ L Proteinprobe wurden 250  $\mu$ L BRADFORD-Reagenz (SIGMA-ALDRICH) gegeben. Anschließend wurde der Ansatz im Dunkeln für 10 min bei 25 °C inkubiert. 200  $\mu$ L der Probe wurden in eine 96-Well-Platte überführt und Absorption bei 595 nm an einem Mikroplattenlesegerät (Varioskan™ LUX der Firma THERMOFISHER

SCIENTIFIC) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über eine Kalibriergerade mit festgelegten Konzentrationen an Rinderserumalbumin (0 µg/mL–1.4 mg/mL) bestimmt. Alle Proben wurden in Dreifachbestimmung aufgenommen. Als Referenz diente der verwendete Puffer mit BRADFORD-Reagenz. Um zu hohe Proteinkonzentrationen zu vermeiden und in die Sättigung der Kalibriergerade zu gelangen wurde die unbekannte Proteinprobe auf eine Konzentration von etwa 1 mg/mL verdünnt.

### 6.2.2.7.7. Gewinnung von gefriergetrocknetem Protein

HEPES-Puffer                      25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8

Um die Proteine in einer gefriergetrockneten Form zu erhalten wurden Lysat (Abschnitt 6.2.2.5) und gereinigtes Protein (Abschnitt 6.2.2.7.2) in 1.5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und über Nacht an einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert. Am nächsten Tag wurde das gleiche Volumen an H<sub>2</sub>O hinzugegeben, für 30 min bei 4 °C stehen gelassen und vor Verwendung in Enzymaktivitätstests (Abschnitt 6.2.2.8) gründlich durch sanftes Auf- und Abpipettieren gelöst.

### 6.2.2.7.8. Proteinidentifizierung über MS-MS-Analyse

MS-Puffer I                      10 mM DTT, 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.5  
MS-Puffer II                      55 mM 2-Iodacetamid (IAA), 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.5  
MS-Puffer III                      100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.5, 100% Acetonitril (1:1 (vol)/(vol))  
MS-Puffer IV                      25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 8.5  
UPLC-Laufmittel A                70% (v/v) Acetonitril, 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA)  
UPLC-Laufmittel B                H<sub>2</sub>O, 0.1% (v/v) TFA

Die eindeutige Identifizierung von Proteinen erfolgte über MS-MS-Analyse. Hierfür wurden die entsprechenden zu identifizierenden Proteinbanden aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten, zerkleinert (1×1 mm) und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zunächst wurden 500 µL Acetonitril zugegeben und die bedeckten Gelstücke für 10 min inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und 50 µL MS-Puffer I zur Probe gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf RT, wurden erneut 500 µL Acetonitril zugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Gelstücke sedimentiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurden 50 µL MS-Puffer II zugegeben und die Probe für 20 min im Dunklen inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Entfärbung der Gelstücke fand schließlich durch Zugabe von 100 µL MS-Puffer III statt.

Eine vollständige Entfärbung wurde durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung einhergehend mit wiederholter sorgfältiger Durchmischung erreicht. Nach Sedimentation der Gelstücke und Abnahme des Überstandes wurden zur Dehydratisierung der Gelstücke 500 µL Acetonitril zugegeben und die Probe inkubiert. Nachdem die Gelstücke eine weiße Färbung angenommen haben, wurde das überschüssige Acetonitril abgenommen. Der Verdau des Proteins wurde anschließend durch Zugabe von 50 µL MS-Puffer IV sowie 1 µL Trypsin (100 ng/µL) gestartet. Der Ansatz wurde für 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 20 µL MS-Puffer IV zur Probe gegeben und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Probe für 10 min bei 10000 ×g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß für die nachfolgende MS-MS-Analyse überführt.

Die weiterführende Analyse der Proteinproben wurde von DR. MATTHEW FUSZARD oder DR. ANDREA DI FONZO (Lehrstuhl Biochemie, Universität Bayreuth) durchgeführt. Hierzu wurde ein Prominence UPLC (SHIMADZU) mit einem TripleTOF® 5600+ Massenspektrometer verwendet. Die Trennung der Peptide erfolgte über eine Hypersil™ ODS C18 Säule (5 µm Partikelgröße, 200 Å Porengröße, THERMOFISHER SCIENTIFIC) mit einem Gradienten von 0–40% Laufmittel A in 20 min, 40–95% Laufmittel A in 2 min, 95% Laufmittel A für 2 min und 0% Laufmittel A für 6 min bei einer Flussrate von 70 µL/min. Die Ionisation erfolgte über eine TURBO V™ Ionenquelle (SCIEX) mit 5500 V Ionisationsspannung, 35 V Gegenstromgas, 4 V Quellgas, einer Proben temperatur von 350 °C und einer Kollisionsenergie von 43 V. Es wurde ein vollständiges Massenspektrum von 400–1250 *m/z* aufgenommen. Dem Scan des Peptidvorläufers für 0.25 s folgten bis zu 20 MS-MS-Scans zwischen 100–2000 *m/z*. Die Selektion der Fragmente erfolgte dabei über einen Ladungszustand von +2 bis +5 mit über 150 Detektionen pro s und einer Massentoleranz von 50 mDa.

Die Prozessierung der Rohdaten wurde mit Byonic™ (PROTEIN METRICS 2.8.2) durchgeführt. Beim Trypsinverdau wurden zwei ausgelassene Arginin- bzw. Lysinschnittstellen toleriert. Die Massentoleranz des Vorläuferpeptids wurde mit 2 Da, die des Peptidfragments mit 0.6 Da festgelegt. Gängige Modifikationen wie Oxidationen, Methylierungen, Acetylierungen und Carbamidomethylierungen wurden dabei berücksichtigt.

### 6.2.2.8. Enzymaktivitätstests mit löslichem Protein

HEPES-Puffer	25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8
HEPES-Glycerin-Puffer	25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 6.8

Die Proteinlösung wurde standardmäßig mit 0.1 mg Substrat (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM inkubiert. Nach 16 h wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe von 500 µL

Ethylacetat (EtOAc) gestoppt und durch Vortexen extrahiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend folgte eine Analyse per UPLC-MS (Abschnitt 6.2.2.11).

#### 6.2.2.9. In vivo-Reaktionen

Für *in vivo* Reaktionen wurde frisches Zellpellet von *E. coli* BL21 mit entsprechendem Plasmid aus Abschnitt 6.2.2.3 verwendet. 33 mg Zellen (0.2 g Zellen pro mL Reaktionsvolumen) wurden in 166 µL HEPES-Puffer mit 0.1v% Kanamycin resuspendiert und zu 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in einem 2 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Die Reaktion wurde für 16 h bei 30 °C und 300 UpM inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min bei 10000 ×g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit 500 µL EtOAc extrahiert, die organische Phase unter vermindertem Druck eingengt und per UPLC-MS analysiert (Abschnitt 6.2.2.11). Gegebenenfalls wurde das Zellpellet mit Lysozym aufgeschlossen und zentrifugiert (Abschnitt 6.2.2.4). Der daraus erhaltene Überstand wurde analog mit EtOAc extrahiert und analysiert.

#### 6.2.2.10. Methoden zur Immobilisierung

##### 6.2.2.10.1. Immobilisierung an Ni-TED *Silica Beads*

###### 6.2.2.10.1.1. Präparation von immobilisiertem Ni-TED-Enzym

Natriumphosphat-Puffer      100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

Zur Immobilisierung an Ni-TED *Silica Beads* wurde filtriertes Lysat aus Abschnitt 6.2.2.5 verwendet. 4 mL Lysat wurden zu 2 mL des in Natriumphosphat-Puffer vorliegenden Ni-TED-Materials gegeben und für 1 h bei 4 °C in einem Überkopffrotator bei 10 UpM inkubiert. Im Anschluss wurde bei 10000 ×g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 7 mL Natriumphosphat-Puffer. Nach Abnahme des Überstands wurde das Ni-TED-Material auf 2 mL mit Natriumphosphat-Puffer aufgefüllt und 20 µL davon in 1.5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen.

###### 6.2.2.10.1.2. Enzymaktivitätstests mit immobilisiertem Ni-TED-Enzym

Natriumphosphat-Puffer      100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

Zur Durchführung der Enzymaktivitätstests mit an Ni-TED immobilisiertem Enzym wurde das im 1.5 mL-Reaktionsgefäß vorliegende Harz dreimal mit je 55.3 µL Natriumphosphat-Puffer zu 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) gegeben. Die Reaktion wurde

bei 30 °C und 300 UpM für 16 h inkubiert. Nach durchgeführter Enzymreaktion wurde die Lösung bei 10000 ×g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit 200 µL EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen, unter vermindertem Druck eingeeengt und anschließend per UPLC-MS analysiert (Abschnitt 6.2.2.11).

#### 6.2.2.10.1.3. Regeneration des immobilisierten Ni-TED-Enzyms

Natriumphosphat-Puffer      100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

Zur Regeneration wurden 200 µL Natriumphosphat-Puffer zugegeben, kurz gevortext, bei 10000 ×g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch zwei weitere Male wiederholt und das verbleibende Pellet bis zur Wiederverwendung in Enzymaktivitätstests auf Eis gelagert.

#### 6.2.2.10.2. Immobilisierung als *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs)

##### 6.2.2.10.2.1. Präparation von CLEAs

Glutaraldehydlösung      25% (w/v) Glutaraldehyd in H<sub>2</sub>O

Natriumphosphat-Puffer      100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

Die Quervernetzung als CLEAs diente der besseren Stabilisierung und Wiederverwendbarkeit der Enzyme. Dem in Natriumphosphat-Puffer vorliegenden, filtrierten Lysat wurden 472 g Ammoniumsulfat pro L zum Ausfällen der darin enthaltenen Proteine zugegeben. Die Lösung wurde 1 h bei 10 UpM und 4 °C im Überkopffrotator invertiert. 0.5, 1.0 oder 2.0% einer 25%igen Glutaraldehyd-Lösung wurden zugegeben und für 2 h bei 10 UpM und 4 °C im Überkopffrotator inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt, sodass passend zur umzusetzenden Substratmenge die entsprechende Menge an immobilisiertem Enzym bzw. ursprünglichem Zellpellet enthalten war (siehe Abschnitt 6.2.2.10.2.2). Im Anschluss daran wurden die Proben für 30 min bei 10000 ×g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet insgesamt drei Mal mit jeweils 100 µL Natriumphosphat-Puffer gewaschen und 15 min bei 10000 ×g und 4 °C zentrifugiert.

##### 6.2.2.10.2.2. Bestimmung der Immobilisierungseffizienz

Für die Bestimmung der Immobilisierungsausbeute, der Aktivitätswiederherstellung und der Immobilisierungseffizienz wurden die folgenden Gleichungen 3–5 verwendet.<sup>[208]</sup>  $A_{\text{Lysat}}$  entspricht der Aktivität des zentrifugierten, filtrierten Lysates,  $A_{\text{Präzipitation}}$  der Aktivität des

Überstandes nach Ammoniumsulfat-Fällung,  $A_{\text{Wasch}}$  der Aktivität des Überstandes nach dem ersten Waschschrift und  $A_{\text{CLEA}}$  der Aktivität des finalen AmbDH3-CLEA.

$$\text{Immobilisierungsausbeute [\%]} = 100 \times \frac{\text{Immobilisierte Aktivität}}{\text{Startaktivität}} = 100 \times \frac{A_{\text{Lysat}} - A_{\text{Präzipitation}} - A_{\text{Wasch}}}{A_{\text{Lysat}}} \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$\text{Immobilisierungseffizienz [\%]} = 100 \times \frac{\text{Beobachtet Aktivität}}{\text{Immobilisierte Aktivität}} = 100 \times \frac{A_{\text{CLEA}}}{A_{\text{Lysat}} - A_{\text{Präzipitation}} - A_{\text{Wasch}}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

$$\text{Aktivitätswiederherstellung [\%]} = 100 \times \frac{\text{Beobachtete Aktivität}}{\text{Startaktivität}} = 100 \times \frac{A_{\text{CLEA}}}{A_{\text{Lysat}}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Die Reaktionen der verschiedenen Fraktionen der CLEA-Präparation wurden in 2 mL-Reaktionsgefäßen als Triplikate in einem Endvolumen von 166  $\mu\text{L}$  mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) durchgeführt. 40  $\mu\text{L}$  Lysat oder 50  $\mu\text{L}$  der Fraktion von Präzipitation und Waschschrift (aufgrund der Volumenvergrößerung) wurden mit Substrat **163** für bis zu 2 h bei 30 °C und 300 UpM inkubiert. Für die Reaktion mit AmbDH3-CLEA wurde die entsprechende Menge des CLEAs in Natriumphosphat-Puffer resuspendiert und in das Gefäß mit dem Substrat gegeben. Die Reaktionen wurden alle 20 min durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  EtOAc gestoppt, extrahiert und das organische Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingengt. Der verbliebene Feststoff wurde in 1 mL MeOH gelöst und *via* UPLC-MS analysiert.

#### 6.2.2.10.2.3. Enzymaktivitätstests mit immobilisierten CLEAs

Natriumphosphat-Puffer 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4

Bei sämtlichen durchgeführten Enzymreaktionen wurde die Menge an verwendetem Zellpellet auf die jeweilige Menge des umzusetzenden Substrates angepasst. Hierbei wurden (analog zu G. BERKHAN) 2 g Zellpellet pro 50 mg Substrat eingesetzt.<sup>[164]</sup>

#### Analytischer Maßstab (332 nmol, 0.1 mg Substrat)

Zum immobilisierten Enzym (entspricht 4 mg des ursprünglichen Zellpellets) wurden 55.3  $\mu\text{L}$  Natriumphosphat-Puffer gegeben und dieses gründlich resuspendiert. Die Lösung wurde vollständig zu 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) in ein 2 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Der Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt, sodass ein Endvolumen von 166  $\mu\text{L}$  vorlag. Die Reaktion wurde für 16 h bei 30 °C und 300 UpM inkubiert. Um eine Aussage über die Effizienz der Quervernetzung treffen zu können, wurde

parallel dazu eine Enzymreaktion von 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) mit 40  $\mu$ L Lysat und 126  $\mu$ L Natriumphosphat-Puffer durchgeführt.

Bei Verwendung von Cosolventien wurde das immobilisierte Enzym in der entsprechenden Menge an Natriumphosphat-Puffer gelöst. Das Substrat wurde im entsprechenden Volumen an Cosolvenz für 30 min bei 30 °C und 300 UpM vorgelöst. Im Anschluss wurde das resuspendierte immobilisierte Enzym zum Substrat gegeben und gleichermaßen bei 30 °C und 300 UpM für 16 h inkubiert. Nach 16 h wurden die Reaktionsgefäße mit den Enzymreaktionen bei 10000  $\times$ g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, 500  $\mu$ L EtOAc zugegeben und durch kräftiges Vortexen extrahiert. Der Überstand wurde nochmals in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und unter vermindertem Druck eingengt. Anschließend folgte eine Analyse per UPLC-MS (Abschnitt 6.2.2.11).

### Semipräparativer Maßstab (15.0 $\mu$ mol, 4.5 mg Substrat)

Es wurden 3.7 mL Natriumphosphat-Puffer zum immobilisierten Enzym (entspricht 180.0 mg des ursprünglichen Zellpellets) gegeben. Das Pellet wurde resuspendiert und zu 4.5 mg Substrat **163** (Startkonzentration 4 mM) in einen 10 mL-Rundkolben gegeben. Die Reaktion wurde bei 30 °C und unter Rühren bei 300 UpM inkubiert. Nach 16 h wurde die Lösung in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt. Der Kolben wurde zweimal mit 7 mL EtOAc ausgespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach gründlichem Schütteln und Vortexen wurde zur besseren Phasentrennung für 15 min bei 10000  $\times$ g und 4 °C zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, unter vermindertem Druck eingengt und per UPLC-MS analysiert (Abschnitt 6.2.2.11).

### Präparativer Maßstab (33.2 $\mu$ mol, 10.0 mg Substrat)

Zum immobilisierten Enzym (entspricht 0.4 g des ursprünglichen Zellpellets) wurden zunächst 3 mL Natriumphosphat-Puffer gegeben und zu 10.0 mg Substrat **163** (Startkonzentration 4 mM) in einen 25 mL-Rundkolben gegeben. Verbliebenes Pellet wurde zweimal mit 2 mL und einmal mit 1.3 mL Natriumphosphat-Puffer in den selben Kolben überführt. Die Reaktion wurde bei 30 °C und unter Rühren bei 300 UpM inkubiert. Nach 16 h wurde die Lösung in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt, der Kolben zweimal mit 2 mL Natriumphosphat-Puffer ausgespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde bei 10000  $\times$ g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein 50 mL-Reaktionsgefäß gegeben und dreimal mit jeweils 10 mL EtOAc extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils für 5 min bei 10000  $\times$ g und 4 °C zentrifugiert. Die organische Phase wurde in ein neues 50 mL-

Reaktionsgefäß überführt, unter vermindertem Druck eingengt und *via* UPLC-MS analysiert (Abschnitt 6.2.2.11).

### Reaktion bei kontinuierlichem Fluss

5.0 mg Substrat **163** wurde in Natriumphosphat-Puffer für 20 h bei 30 °C und 600 UpM in einem 100 mL-Kolben vorgelöst. AmbDH3-CLEA wurde entsprechend Abschnitt 6.2.2.10.2.1 präpariert und unmittelbar vor Reaktionsbeginn in eine 20 mL-Spritze zwischen zwei Fritten gegeben. Die Substratlösung wurde vorsichtig aufgezogen und mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 mL/h durch das CLEA-Pellet gedrückt.

#### 6.2.2.10.2.4. Regeneration der immobilisierten CLEAs

Natriumphosphat-Puffer      100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

Um die quervernetzten Enzyme wiederzuverwenden, wurden diese nach Verwendung im Enzymaktivitätstest mit Natriumphosphat-Puffer gewaschen.

### Analytischer Maßstab (332 nmol, 0.1 mg Substrat)

Hierfür wurden 200 µL Natriumphosphat-Puffer zugegeben, gevortext und bei 10000 ×g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde bis zur Weiterverwendung in Enzymaktivitätstests auf Eis gelagert.

### Präparativer Maßstab (33.2 µmol, 10.0 mg Substrat)

Das verbliebene Pellet wurde mit jeweils 5 mL Natriumphosphat-Puffer versetzt, gevortext und bei 10000 ×g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in 15 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde bis zur Weiterverwendung für Enzymaktivitätstests auf Eis gelagert. Die drei Waschfraktionen wurden dreimal mit jeweils 5 mL EtOAc extrahiert, der Überstand in ein neues 15 mL-Reaktionsgefäß überführt, unter vermindertem Druck eingengt und ebenfalls *via* UPLC-MS analysiert (Abschnitt 6.2.2.11).

#### 6.2.2.11. UPLC-MS-Analyse

Das extrahierte Produkt aus den durchgeführten Enzymaktivitätstests wurde in 1 mL Methanol (HPLC-rein) gelöst, bei Bedarf verdünnt und in ein UPLC-MS-Gefäß filtriert (0.2 µm, PTFE). Massenspektren der Enzymreaktionen wurden an einem ACQUITY™ UPLC® System der Firma WATERS mit Single Quadrupole Massenspektrometer und BEH C18 Säulen (Partikelgröße 1.7 µm, Porengröße 130 Å, Säulendurchmesser 2.1 mm und Länge 50 mm)



aufgenommen. Die Injektion der in Methanol gelösten Proben fand im *Partial loop with needle overflow*-Modus über einen *Autosampler* statt. Ionisation wurde nach dem Elektrospray-Verfahren (*Electrospray Ionisation*, ESI) durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte anschließend mit einem Gradienten von 10:90 zu 90:10 Methanol:H<sub>2</sub>O in 5 min bei einer Flussrate von 0.5 mL/min.

#### 6.2.2.12. Normierung und Kalibrierung

Zur besseren Vergleichbarkeit der UPLC-MS-Chromatogramme wurden diese normiert. Dazu wurde der höchste Wert gleich 100% gesetzt und alle anderen Werte im Vergleich dazu normiert. Zur Berechnung des Umsatzes der Enzymreaktion wurden die Integrale für die erhaltenen Signale aus den UPLC-MS-Chromatogrammen berechnet und in Verhältnis zueinander gesetzt. Falls es sich bei den beiden erhaltenen Signalen um Edukt **163** und Produkt *cis*-**164** handelte, wurden zudem die Geradengleichung einer Kalibriergerade mit einberechnet. Diese wurde von T. HOLLMANN<sup>[182]</sup> erstellt und berücksichtigt das unterschiedliche Ionisierungsverhalten der beiden Komponenten. Hierbei wurden verschiedene Stoffmengen an Edukt **163** und Produkt *cis*-**164** per UPLC-MS analysiert. Die daraus erhaltenen Integrale wurden zu den injizierten Stoffmengen ins Verhältnis gesetzt und somit zwei Geradengleichungen für **163** und *cis*-**164** (Abbildung 6-1; Gleichung 6 und 7) erhalten. Mithilfe der beiden Geradengleichungen konnte die Kalibrierung der Umsatzwerte für Edukt **163** und Produkt *cis*-**164** durchgeführt werden:

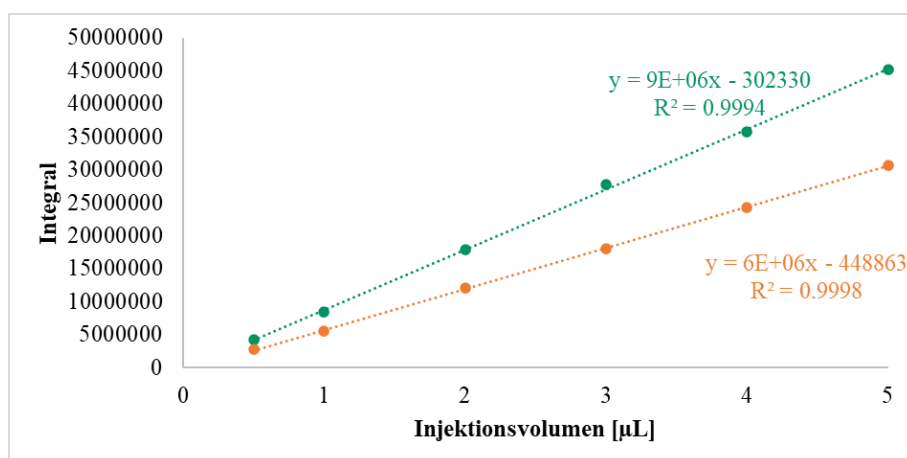


Abbildung 6-1. Kalibriergerade für die Ionisierung von Edukt **163** und Produkt *cis*-**164**.

Edukt **163**:  $y = 6196796 x - 448863$  ( $R^2 = 0.9998$ ) (Gleichung 6)

Produkt *cis*-**164**:  $y = 9105677 x - 302330$  ( $R^2 = 0.9994$ ) (Gleichung 7)

Bei allen anderen verwendeten Substraten und Produkten wurde keine Geradengleichung zur Kalibrierung miteinbezogen. Falls bei Umsatzwerten Abweichungen angegeben sind, wurden die Experimente in Dreifachbestimmung durchgeführt, ansonsten als Einfachbestimmung.

### 6.2.3. Synthetische Arbeiten

#### 6.2.3.1. Analyse mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Strukturanalysen *via* NMR-Spektroskopie erfolgten bei Raumtemperatur (298 K) in NMR-Probenröhrchen mit 5 mm Durchmesser und einer Länge von 178 mm. Für Aufnahme der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR- sowie 2D-Korrelationsspektren wurde ein *Avance III HD 500* von BRUKER verwendet. 1D-NOE-Differenz-Experimente wurden am *Avance 300* von BRUKER aufgenommen. Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte in deuterierten Lösemitteln und die Normierung erfolgte anhand des Restlösemittelsignals ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$ : 7.26 ppm;  $\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $^1\text{H}$ : 7.16 ppm).<sup>[209]</sup> Die chemische Verschiebung wird auf der  $\delta$ -Skala in *parts per million* (ppm) und Kopplungskonstanten ( $J$ ) in Hz angegeben. Die Signalformen werden durch folgende Abkürzungen sowie Kombinationen dieser beschrieben: Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Multiplett (m). Zum Vergleich dienten zudem NMR-Spektren von T. HOLLMANN.<sup>[182]</sup> Die genaue Zuordnung der Protonen sowie Kohlenstoffsignale erfolgte *via* 2D-Korrelationsspektren (*H,H*-COSY). Zur Beschreibung der  $^{13}\text{C}$ -Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: primär (p, Methyl), sekundär (s, Methylen), tertiär (t, Methin) und quartär (q). Alle eindeutigen Zuordnungen der Protonen- sowie Kohlenstoffsignale sind in Fragmentschreibweise angegeben.

#### 6.2.3.2. Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Reinigungen wurde Kieselgel 60 (Partikelgröße 63–200  $\mu\text{m}$ ) von MACHEREY-NAGEL als stationäre Phase verwendet. Das Kieselgel wurde zum Packen zunächst im verwendeten Laufmittelgemisch aufgeschlemmt, in die Säule gefüllt und unter Druck komprimiert. Die Zusammensetzung der Laufmittelgemische ist in v% angegeben.

Die Reinigung des Produkts von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** (Abschnitt 3.5.2.1.10.3, S. 175) erfolgte durch Säulenchromatographie ( $\text{Et}_2\text{O}$ :Hexan / 2:8, anschließend EtOAc). Das Produkt der Reaktion von PedPS7 mit Substrat **163** (Abschnitt 3.4.2.1, S. 120) wurde durch säulenchromatographische Reinigung (EtOAc) gereinigt.

6.2.3.3. Basische Esterhydrolyse des Substrats 169

Der SNAC-Thioester **169** (25.0 mg, 79.2  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äquiv.) wurde in MeOH/H<sub>2</sub>O 3:1 (792.4  $\mu\text{L}$ ) auf Eis gelöst, mit LiOH (9.2 mg, 388.3  $\mu\text{mol}$ , 4.9 Äquiv.) versetzt und über Nacht unter Erwärmen auf RT gerührt. MeOH wurde im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 1 M HCl auf pH 3-4 angesäuert, erneut drei Mal mit EtOAc extrahiert und die vereinten organischen Phasen *in vacuo* eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Kieselgel, H<sub>2</sub>O/Acetonitril 90:10, 75:25, 50:50, 25:75, 5:95, je 5 mL) konnten aus der 5:95-Fraktion 3.5 mg Produkt **199** (16.3  $\mu\text{mol}$ , Ausbeute 21%) isoliert werden.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 6.91-6.68 (m, 1H, CCHCH<sub>2</sub>), 3.48–3.45 (m, 1H, CHOH), 2.33–2.26 (m, 1H, 1 $\times$  CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.20–2.13 (m, 1H, 1 $\times$  CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 1.84 (d,  $J$  = 0.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CCH), 1.67–1.25 (m, 7H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.95–0.92 (m, 6H, CHCH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

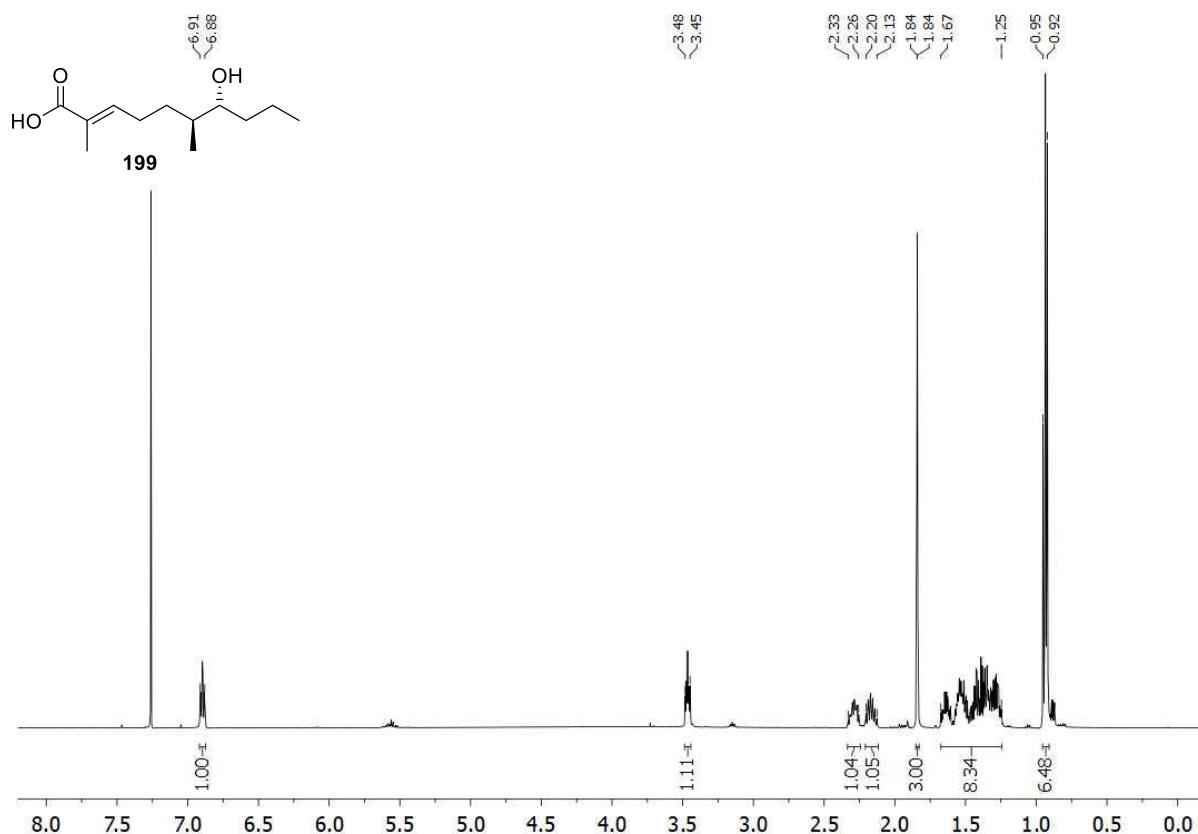


Abbildung 6-2. <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der Carbonsäure **199** nach Esterhydrolyse des SNAC-Thioesters **169**. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in CDCl<sub>3</sub>.

## 7. Literatur

- [1] E. L. Ang, H. Sun, Z. Liu, H. Zhao, *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, 823, DOI 10.2147/DDDT.S63023.
- [2] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629–661, DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- [3] J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, P. F. Leadlay, *Nature* **1990**, 348, 176–178, DOI 10.1038/348176a0.
- [4] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 380–416, DOI 10.1039/A909079G.
- [5] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 925–936, DOI 10.1038/nrmicro1287.
- [6] L. Katz, R. H. Baltz, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 43, 155–176, DOI 10.1007/s10295-015-1723-5.
- [7] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4688–4716, DOI 10.1002/anie.200806121.
- [8] B. D. Cookson, R. W. Lacey, W. C. Noble, D. S. Reeves, R. Wise, R. J. Redhead, *The Lancet* **1990**, 335, 1095–1096, DOI 10.1016/0140-6736(90)92667-7.
- [9] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3468–3496, DOI 10.1021/cr0503097.
- [10] K. J. Weissman, M. Timoney, M. Bycroft, P. Grice, U. Hanefeld, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Biochemistry* **1997**, 36, 13849–13855, DOI 10.1021/bi971566b.
- [11] P. Pöplau, S. Frank, B. I. Morinaka, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 13215–13218, DOI 10.1002/anie.201307406.
- [12] B. J. Dunn, C. Khosla, *J. R. Soc. Interface* **2013**, 10, 20130297, DOI 10.1098/rsif.2013.0297.
- [13] G. F. Liou, J. Lau, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2003**, 42, 200–207, DOI 10.1021/bi0268100.
- [14] E. Cundliffe, N. Bate, A. Butler, S. Fish, A. Gandecha, L. Merson-Davies, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2001**, 79, 229–234, DOI 10.1023/A:1012065300116.
- [15] C. Bihlmaier, E. Welle, C. Hofmann, K. Welzel, A. Vente, E. Breitling, M. Müller, S. Glaser, A. Bechthold, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 2113–2121, DOI 10.1128/AAC.00007-06.
- [16] J. Ligon, S. Hill, J. Beck, R. Zirkle, I. Molnár, J. Zawodny, S. Money, T. Schupp, *Gene* **2002**, 285, 257–267, DOI 10.1016/S0378-1119(02)00396-7.
- [17] C. Olano, B. Wilkinson, C. Sánchez, S. J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A. J. Weston, A. F. Braña, C. J. Martin, M. Oliynyk, et al., *Chem. Biol.* **2004**, 11, 87–97, DOI 10.1016/j.chembiol.2003.12.018.
- [18] S. F. Haydock, A. N. Appleyard, T. Mironenko, J. Lester, N. Scott, P. F. Y. 2005 Leadlay, *Microbiology* **n.d.**, 151, 3161–3169, DOI 10.1099/mic.0.28194-0.
- [19] Y. Cheng, J. Coughlin, S.-K. Lim, B. Shen, *Methods Enzymol.* **2009**, DOI 10.1016/S0076-6879(09)04608-4.
- [20] D. C. Gay, D. T. Wagner, J. L. Meinke, C. E. Zogzas, G. R. Gay, A. T. Keatinge-Clay, *J. Struct. Biol.* **2015**, 193, 196–205, DOI 10.1016/j.jsb.2015.12.011.

- [21] T. Robbins, J. Kapilivsky, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2016**, *55*, 4476–4484, DOI 10.1021/acs.biochem.6b00639.
- [22] M. Schröder, Dissertation, Universität Bayreuth, **2020**.
- [23] R. S. Gokhale, D. Hunziker, D. E. Cane, C. Khosla, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 117–125, DOI 10.1016/S1074-5521(99)80008-8.
- [24] F. Hemmerling, F. Hahn, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1512–1550, DOI 10.3762/bjoc.12.148.
- [25] C. Olano, C. Méndez, J. A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 571–616, DOI 10.1039/B911956F.
- [26] J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368–1372, DOI 10.1126/science.284.5418.1368.
- [27] A. T. Keatinge-Clay, *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 540–542, DOI 10.1016/j.chembiol.2016.05.005.
- [28] B. Shen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 285–295, DOI 10.1016/s1367-5931(03)00020-6.
- [29] H. Motamedi, C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 4445–4449, DOI 10.1073/pnas.84.13.4445.
- [30] N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, S. Horinouchi, *Nature* **1999**, *400*, 897–899, DOI 10.1038/23748.
- [31] S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1041–1072, DOI 10.1039/b603600g.
- [32] P. F. Leadlay, J. Staunton, M. Oliynyk, C. Bisang, J. Cortés, E. Frost, Z. A. Hughes-Thomas, M. A. Jones, S. G. Kendrew, J. B. Lester, et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 360–367, DOI 10.1038/sj.jim.7000204.
- [33] S. Donadio, M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson, L. Katz, *Science* **1991**, *252*, 675–679, DOI 10.1126/science.2024119.
- [34] M. Metsä-Ketelä, T. Oja, T. Taguchi, S. Okamoto, K. Ichinose, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 562–570, DOI 10.1016/j.cbpa.2013.06.032.
- [35] B. M. Duggar, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1948**, *51*, 177–181, DOI 10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x.
- [36] R. Lukačín, K. Springob, C. Urbanke, C. Ernwein, G. Schröder, J. Schröder, U. Matern, *FEBS Lett.* **1999**, *448*, 135–140, DOI 10.1016/S0014-5793(99)00355-5.
- [37] S. Samappito, J. E. Page, J. Schmidt, W. De-Eknamkul, T. M. Kutchan, *Phytochemistry* **2003**, *62*, 313–323, DOI 10.1016/S0031-9422(02)00545-9.
- [38] H. Jenke-Kodama, A. Sandmann, R. Müller, E. Dittmann, *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 2027–2039, DOI 10.1093/molbev/msi193.
- [39] F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Nature* **1984**, *309*, 462–464, DOI 10.1038/309462a0.
- [40] C. Hertweck, A. Luzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162–190, DOI 10.1039/B507395M.
- [41] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79–110, DOI 10.1039/B100917F.
- [42] B. S. Moore, J. N. Hopke, *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2001**, *2*, 35–38, DOI 10.1002/1439-7633(20010105)2:1<35::AID-CBIC35>3.0.CO;2-1.
- [43] J. M. Cock, L. Sterck, P. Rouzé, D. Scornet, A. E. Allen, G. Amoutzias, V. Anthouard, F. Artiguenave, J.-M. Aury, J. H. Badger, et al., *Nature* **2010**, *465*, 617–621, DOI 10.1038/nature09016.

- [44] K. H. Sung, G. Berkhan, T. Hollmann, L. Wagner, W. Blankenfeldt, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 343–347, DOI 10.1002/anie.201707774.
- [45] J. Cossy, A. Guérinot, in *Adv. Heterocycl. Chem.* (Eds.: E.F.V. Scriven, C.A. Ramsden), Academic Press, **2016**, pp. 107–142.
- [46] F. Lindner, S. Friedrich, F. Hahn, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 14091–14101, DOI 10.1021/acs.joc.8b02047.
- [47] M. T. Crimmins, P. Siliphaivanh, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4641–4644, DOI 10.1021/ol035797o.
- [48] T. A. Kirkland, J. Colucci, L. S. Geraci, M. A. Marx, M. Schneider, D. E. Kaelin, S. F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12432–12433, DOI 10.1021/ja011867f.
- [49] P. Liu, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10772–10773, DOI 10.1021/ja016893s.
- [50] E. Lee, S. J. Choi, H. Kim, H. O. Han, Y. K. Kim, S. J. Min, S. H. Son, S. M. Lim, W. S. Jang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 176–178, DOI 10.1002/1521-3773(20020104)41:1<176::AID-ANIE176>3.0.CO;2-#.
- [51] Y. Kuroda, K. J. Nicacio, I. A. da Silva-Jr, P. R. Leger, S. Chang, J. R. Gubiani, V. M. Deflon, N. Nagashima, A. Rode, K. Blackford, et al., *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 938–945, DOI 10.1038/s41557-018-0084-x.
- [52] D. J. Kopecky, S. D. Rychnovsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8420–8421, DOI 10.1021/ja011377n.
- [53] X. Han, G. Peh, P. E. Floreancig, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1193–1208, DOI 10.1002/ejoc.201201557.
- [54] R. Nannei, S. Dallavalle, L. Merlini, A. Bava, G. Nasini, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6277–6280, DOI 10.1021/jo060839i.
- [55] K. C. Nicolaou, M. H. D. Postema, C. F. Claiborne, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1565–1566, DOI 10.1021/ja9534866.
- [56] K. C. Nicolaou, M. H. D. Postema, E. W. Yue, A. Nadin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10335–10336, DOI 10.1021/ja962862z.
- [57] K. C. Nicolaou, M. E. Duggan, C. K. Hwang, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2468–2469, DOI 10.1021/ja00269a067.
- [58] L. E. Day, J. W. Chamberlin, E. Z. Gordee, S. Chen, M. Gorman, R. L. Hamill, T. Ness, R. E. Weeks, R. Stroshane, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *4*, 410–414.
- [59] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 996–1047, DOI 10.1039/B816430B.
- [60] G. Berkhan, C. Merten, C. Holec, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13589–13592, DOI 10.1002/anie.201607827.
- [61] A. R. Gallimore, C. B. W. Stark, A. Bhatt, B. M. Harvey, Y. Demydchuk, V. Bolanos-Garcia, D. J. Fowler, J. Staunton, P. F. Leadlay, J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 453–460, DOI 10.1016/j.chembiol.2006.01.013.
- [62] B. Julien, Z.-Q. Tian, R. Reid, C. D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1277–1286, DOI 10.1016/j.chembiol.2006.10.004.
- [63] W. Hüttel, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 361–368, DOI 10.3762/bjoc.10.34.
- [64] G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240–14244, DOI 10.1002/anie.201407979.

- [65] L. Vetcher, H. Menzella, T. Kudo, T. Motoyama, L. Katz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3734–3736, DOI 10.1128/AAC.00369-07.
- [66] S. Hanessian, T. Focken, R. Oza, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3172–3175, DOI 10.1021/ol101103q.
- [67] C. D. Reeves, B. Julien, R. C. Reid, *Biosynthetic Gene Cluster for Ambruticins and the Encoded Proteins*, **2005**, US7332576.
- [68] F. J. Marcos-Torres, C. Volz, R. Müller, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5563, DOI 10.1038/s41467-020-19384-7.
- [69] N. J. Barnes, A. H. Davidson, L. R. Hughes, G. Procter, V. Rajcoomar, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1751–1754, DOI 10.1016/S0040-4039(01)90430-7.
- [70] J. C. Kwan, E. W. Schmidt, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 309–311, DOI 10.1016/j.chembiol.2012.03.003.
- [71] J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14002–14007, DOI 10.1073/pnas.222481399.
- [72] D. T. Wagner, Z. Zhang, R. A. Meoded, A. J. Cepeda, J. Piel, A. T. Keatinge-Clay, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 975–983, DOI 10.1021/acscchembio.8b00049.
- [73] J. H. Frank, K. Kanamitsu, *J. Med. Entomol.* **1987**, *24*, 155–191, DOI 10.1093/jmedent/24.2.155.
- [74] J. Piel, I. Höfer, D. Hui, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1280–1286, DOI 10.1128/JB.186.5.1280-1286.2004.
- [75] C. Schleissner, L. M. Cañedo, P. Rodríguez, C. Crespo, P. Zúñiga, A. Peñalver, F. de la Calle, C. Cuevas, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2170–2173, DOI 10.1021/acs.jnatprod.7b00408.
- [76] G. R. Pettit, J.-P. Xu, J.-C. Chapuis, R. K. Pettit, L. P. Tackett, D. L. Doubek, J. N. A. Hooper, J. M. Schmidt, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1149–1152, DOI 10.1021/jm030207d.
- [77] J. C. Jewett, V. H. Rawal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6502–6504, DOI 10.1002/anie.200701677.
- [78] R. Narquizian, P. J. Kocienski, in *Role Nat. Prod. Drug Discov.* (Eds.: J. Mulzer, R. Bohlmann), Springer, Berlin, Heidelberg, **2000**, pp. 25–56.
- [79] C. Beemelmans, H. Guo, M. Rischer, M. Poulsen, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 314–327, DOI 10.3762/bjoc.12.34.
- [80] J. Mulzer, R. Bohlmann, *The Role of Natural Products in Drug Discovery*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2000**.
- [81] M. Pavan, G. Bo, *Physiol Comp Oecol* **1953**, 307–312.
- [82] J. Piel, D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzer, N. Fusetani, S. Matsunaga, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 16222–16227, DOI 10.1073/pnas.0405976101.
- [83] M. Bielitzka, J. Pietruszka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10960–10985, DOI 10.1002/anie.201301259.
- [84] R. H. Cichewicz, F. A. Valeriote, P. Crews, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1951–1954, DOI 10.1021/ol049503q.
- [85] N. B. Perry, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, L. K. Pannell, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4850–4851, DOI 10.1021/ja00222a067.
- [86] K. M. Fisch, C. Gurgui, N. Heycke, S. A. van der Sar, S. A. Anderson, V. L. Webb, S. Taudien, M. Platzer, B. K. Rubio, S. J. Robinson, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 494, DOI 10.1038/nchembio.176.

- [87] J. Piel, G. Wen, M. Platzer, D. Hui, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 93–98, DOI 10.1002/cbic.200300782.
- [88] A. Miyanaga, *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, 531–547, DOI 10.1039/C8NP00071A.
- [89] R. Jansen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 213–222, DOI 10.1002/jlac.198919890142.
- [90] R. Jansen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, V. Wray, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 309–313, DOI 10.1002/jlac.198919890155.
- [91] H. Irschik, R. Jansen, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1987**, *40*, 7–13, DOI 10.7164/antibiotics.40.7.
- [92] E. A. Campbell, O. Pavlova, N. Zenkin, F. Leon, H. Irschik, R. Jansen, K. Severinov, S. A. Darst, *EMBO J.* **2005**, *24*, 674–682, DOI 10.1038/sj.emboj.7600499.
- [93] A. O'Neill, B. Oliva, C. Storey, A. Hoyle, C. Fishwick, I. Chopra, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3163–3166, DOI 10.1128/aac.44.11.3163-3166.2000.
- [94] M. Kopp, C. Rupprath, H. Irschik, A. Bechthold, L. Elling, R. Müller, *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2007**, *8*, 813–819, DOI 10.1002/cbic.200700024.
- [95] H. Irschik, M. Kopp, K. J. Weissman, K. Buntin, J. Piel, R. Müller, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1840–1849, DOI 10.1002/cbic.201000313.
- [96] C. Davies, R. J. Heath, S. W. White, C. O. Rock, *Struct. Lond. Engl. 1993* **2000**, *8*, 185–195, DOI 10.1016/s0969-2126(00)00094-0.
- [97] A. Faille, S. Gavalda, N. Slama, C. Lherbet, L. Maveyraud, V. Guillet, F. Laval, A. Quémard, L. Mourey, J.-D. Pedelacq, *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 1554–1569, DOI 10.1016/j.jmb.2017.03.026.
- [98] D. L. Akey, J. R. Razelun, J. Tehranisa, D. H. Sherman, W. H. Gerwick, J. L. Smith, *Struct. Lond. Engl. 1993* **2010**, *18*, 94–105, DOI 10.1016/j.str.2009.10.018.
- [99] D. T. Wagner, J. Zeng, C. B. Bailey, D. C. Gay, F. Yuan, H. R. Manion, A. T. Keatinge-Clay, *Struct. Lond. Engl. 1993* **2017**, *25*, 1045-1055.e2, DOI 10.1016/j.str.2017.05.011.
- [100] D. C. Gay, P. J. Spear, A. T. Keatinge-Clay, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2374–2381, DOI 10.1021/cb500459b.
- [101] T. Bretschneider, J. B. Heim, D. Heine, R. Winkler, B. Busch, B. Kusebauch, T. Stehle, G. Zocher, C. Hertweck, *Nature* **2013**, *502*, 124–128, DOI 10.1038/nature12588.
- [102] A. Keatinge-Clay, *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 941–953, DOI 10.1016/j.jmb.2008.09.084.
- [103] C. Li, K. E. Roege, W. L. Kelly, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1064–1072, DOI 10.1002/cbic.200800822.
- [104] H. Luhavaya, M. V. B. Dias, S. R. Williams, H. Hong, L. G. de Oliveira, P. F. Leadlay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13622–13625, DOI 10.1002/anie.201507090.
- [105] E. Walther, S. Boldt, H. Kage, T. Lauterbach, K. Martin, M. Roth, C. Hertweck, A. Sauerbrei, M. Schmidtke, M. Nett, *GMS Infect. Dis.* **2016**, *4*, Doc08, DOI 10.3205/id000026.
- [106] C. Gumila, M. L. Ancelin, G. Jeminet, A. M. Delort, G. Miquel, H. J. Vial, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 602–608.
- [107] X. Zhang, R. J. Parry, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 946–957, DOI 10.1128/AAC.01214-06.
- [108] N.-C. Ha, M.-S. Kim, W. Lee, K. Y. Choi, B.-H. Oh, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41100–41106, DOI 10.1074/jbc.M007561200.



- [109] B. M. Harvey, T. Mironenko, Y. Sun, H. Hong, Z. Deng, P. F. Leadlay, K. J. Weissman, S. F. Haydock, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 703–714, DOI 10.1016/j.chembiol.2007.05.011.
- [110] A. Minami, T. Ose, K. Sato, A. Oikawa, K. Kuroki, K. Maenaka, H. Oguri, H. Oikawa, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 562–569, DOI 10.1021/cb4006485.
- [111] A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1662–1668, DOI 10.1128/AAC.43.7.1662.
- [112] K. Komatsu, K. Tanino, M. Miyashita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4341–4345, DOI 10.1002/anie.200460434.
- [113] M. Defosseux, N. Blanchard, C. Meyer, J. Cossy, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4626–4647, DOI 10.1021/jo0496042.
- [114] S. F. Haydock, J. F. Aparicio, I. Molnár, T. Schwecke, L. E. Khaw, A. König, A. F. Marsden, I. S. Galloway, J. Staunton, P. F. Leadlay, *FEBS Lett.* **1995**, *374*, 246–248, DOI 10.1016/0014-5793(95)01119-y.
- [115] C. D. Reeves, S. Murli, G. W. Ashley, M. Piagentini, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15464–15470, DOI 10.1021/bi015864r.
- [116] C. Bisang, P. F. Long, J. Cortés, J. Westcott, J. Crosby, A. L. Matharu, R. J. Cox, T. J. Simpson, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Nature* **1999**, *401*, 502–505, DOI 10.1038/46829.
- [117] Y. Shichijo, A. Migita, H. Oguri, M. Watanabe, T. Tokiwano, K. Watanabe, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12230–12231, DOI 10.1021/ja8040543.
- [118] M. E. Yurkovich, P. A. Tyrakis, H. Hong, Y. Sun, M. Samborsky, K. Kamiya, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 66–71, DOI 10.1002/cbic.201100590.
- [119] P. B. Gupta, T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg, E. S. Lander, *Cell* **2009**, *138*, 645–659, DOI 10.1016/j.cell.2009.06.034.
- [120] D. Fuchs, V. Daniel, M. Sadeghi, G. Opelz, C. Naujokat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *394*, 1098–1104, DOI 10.1016/j.bbrc.2010.03.138.
- [121] M. R. Bardsley, V. J. Horváth, D. T. Asuzu, A. Lorincz, D. Redelman, Y. Hayashi, L. N. Popko, D. L. Young, G. A. Lomber, R. A. Urrutia, et al., *Gastroenterology* **2010**, *139*, 942–952, DOI 10.1053/j.gastro.2010.05.083.
- [122] T.-T. Dong, H.-M. Zhou, L.-L. Wang, B. Feng, B. Lv, M.-H. Zheng, *Ann. Surg. Oncol.* **2011**, *18*, 1797–1804, DOI 10.1245/s10434-011-1561-2.
- [123] Q.-L. Tang, Z.-Q. Zhao, J.-C. Li, Y. Liang, J.-Q. Yin, C.-Y. Zou, X.-B. Xie, Y.-X. Zeng, J.-N. Shen, T. Kang, et al., *Cancer Lett.* **2011**, *311*, 113–121, DOI 10.1016/j.canlet.2011.07.016.
- [124] Y. Wang, *Med. Chem. Shariqah United Arab Emir.* **2011**, *7*, 106–111, DOI 10.2174/157340611794859307.
- [125] J.-H. Kim, M. Chae, W. K. Kim, Y.-J. Kim, H. S. Kang, H. S. Kim, S. Yoon, *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 773–784, DOI 10.1111/j.1476-5381.2010.01089.x.
- [126] D. Lu, M. Y. Choi, J. Yu, J. E. Castro, T. J. Kipps, D. A. Carson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 13253–13257, DOI 10.1073/pnas.1110431108.
- [127] R. W. Broadhurst, D. Nietlispach, M. P. Wheatcroft, P. F. Leadlay, K. J. Weissman, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 723–731, DOI 10.1016/s1074-5521(03)00156-x.
- [128] B. M. Harvey, H. Hong, M. A. Jones, Z. A. Hughes-Thomas, R. M. Goss, M. L. Heathcote, V. M. Bolanos-Garcia, W. Kroutil, J. Staunton, P. F. Leadlay, J. B. Spencer, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1435–1442, DOI 10.1002/cbic.200500474.
- [129] E. D. Roche, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1334–1344, DOI 10.1021/bi026867m.

- [130] C. Jiang, Z. Qi, Q. Kang, J. Liu, M. Jiang, L. Bai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9097–9100, DOI 10.1002/anie.201503561.
- [131] H. J. Kim, M. W. Ruzsarczyky, S. Choi, Y. Liu, H. Liu, *Nature* **2011**, *473*, 109–112, DOI 10.1038/nature09981.
- [132] K. Hotta, X. Chen, R. S. Paton, A. Minami, H. Li, K. Swaminathan, I. I. Mathews, K. Watanabe, H. Oikawa, K. N. Houk, et al., *Nature* **2012**, *483*, 355–358, DOI 10.1038/nature10865.
- [133] T. Lundqvist, J. Rice, C. N. Hodge, G. S. Basarab, J. Pierce, Y. Lindqvist, *Struct. Lond. Engl. 1993* **1994**, *2*, 937–944, DOI 10.1016/s0969-2126(94)00095-6.
- [134] S. W. Kim, S. S. Cha, H. S. Cho, J. S. Kim, N. C. Ha, M. J. Cho, S. Joo, K. K. Kim, K. Y. Choi, B. H. Oh, *Biochemistry* **1997**, *36*, 14030–14036, DOI 10.1021/bi971546+.
- [135] M. Arand, B. M. Hallberg, J. Zou, T. Bergfors, F. Oesch, M. J. van der Werf, J. A. M. de Bont, T. A. Jones, S. L. Mowbray, *EMBO J.* **2003**, *22*, 2583–2592, DOI 10.1093/emboj/cdg275.
- [136] A. Sultana, P. Kallio, A. Jansson, J.-S. Wang, J. Niemi, P. Mäntsälä, G. Schneider, *EMBO J.* **2004**, *23*, 1911–1921, DOI 10.1038/sj.emboj.7600201.
- [137] L. Smith, H. Hong, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2008**, *9*, 2967–2975, DOI 10.1002/cbic.200800585.
- [138] A. Minami, M. Shimaya, G. Suzuki, A. Migita, S. S. Shinde, K. Sato, K. Watanabe, T. Tamura, H. Oguri, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246–7249, DOI 10.1021/ja301386g.
- [139] J. A. Gerlt, P. G. Gassman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11552–11568, DOI 10.1021/ja00077a062.
- [140] J. Rong, M. E. Nelson, B. Kusche, N. D. Priestley, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 2009–2012, DOI 10.1021/np100421v.
- [141] Y. Rebets, E. Brötz, N. Manderscheid, B. Tokovenko, M. Myronovskyi, P. Metz, L. Petzke, A. Luzhetskyy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2280–2284, DOI 10.1002/anie.201408901.
- [142] B. Shen, H.-J. Kwon, *Chem. Rec.* **2002**, *2*, 389–396, DOI 10.1002/tcr.10042.
- [143] R. J. Walczak, A. J. Woo, W. R. Strohl, N. D. Priestley, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 171–175, DOI 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08953.x.
- [144] H.-J. Kwon, W. C. Smith, L. Xiang, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3385–3386, DOI 10.1021/ja0100827.
- [145] M. J. Earle, N. D. Priestley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2187–2192, DOI 10.1016/S0960-894X(97)00393-4.
- [146] B. Shen, H.-J. Kwon, *Chem. Rec.* **2002**, *2*, 389–396, DOI 10.1002/tcr.10042.
- [147] W. C. Smith, L. Xiang, B. Shen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1809–1817, DOI 10.1128/aac.44.7.1809-1817.2000.
- [148] S. Kondo, K. Yasui, M. Natsume, M. Katayama, S. Marumo, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1988**, *41*, 1196–1204, DOI 10.7164/antibiotics.41.1196.
- [149] M. Natsume, K. Yasui, S. Kondo, S. Marumo, **1991**, DOI 10.1016/0040-4039(91)80696-4.
- [150] M. Natsume, J. Tazawa, K. Yagi, H. Abe, S. Kondo, S. Marumo, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1995**, *48*, 1159–1164, DOI 10.7164/antibiotics.48.1159.

- [151] I. Kozone, N. Chikamoto, H. Abe, M. Natsume, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1999**, *52*, 329–331, DOI 10.7164/antibiotics.52.329.
- [152] E. Díaz, J. I. Jiménez, J. Nogales, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 431–442, DOI 10.1016/j.copbio.2012.10.010.
- [153] L. Song, F. Barona-Gomez, C. Corre, L. Xiang, D. W. Udvary, M. B. Austin, J. P. Noel, B. S. Moore, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14754–14755, DOI 10.1021/ja065247w.
- [154] H.-J. Kwon, W. C. Smith, A. J. Scharon, S. H. Hwang, M. J. Kurth, B. Shen, *Science* **2002**, *297*, 1327–1330, DOI 10.1126/science.1073175.
- [155] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3336–3337, DOI 10.1002/anie.200301664.
- [156] L. Cao, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361–1364, DOI 10.1021/ol005593x.
- [157] J. C. Y. Wu, C. H. Hutchings, M. J. Lindsay, C. J. Werner, B. C. Bundy, *J. Biotechnol.* **2015**, *193*, 83–90, DOI 10.1016/j.jbiotec.2014.10.039.
- [158] C. Mateo, V. Grazú, B. C. C. Pessela, T. Montes, J. M. Palomo, R. Torres, F. López-Gallego, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1593–1601, DOI 10.1042/BST0351593.
- [159] M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 298–301, DOI 10.1002/anie.201408561.
- [160] R. M. Cranenburgh, K. S. Lewis, J. A. J. Hanak, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *7*, 197–203, DOI 10.1159/000079828.
- [161] M. Eichhorn, *German Dictionary of Biology*, Routledge Chapman & Hall, **1999**.
- [162] “pCold DNA cold-shock expression system,” zu finden unter <https://www.takarabio.com/products/protein-research/expression-vectors-and-systems/protein-folding-kits/pcold-dna-cold-shock>, 05.05.2021.
- [163] M. Z. Li, S. J. Elledge, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 251–256.
- [164] G. Berkhan, Dissertation, Universität Hannover, **2016**.
- [165] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113–130, DOI 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- [166] F. W. Studier, *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41*, 207–234, DOI 10.1016/j.pep.2005.01.016.
- [167] J. Graw, *Genetik*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, **2015**.
- [168] C. L. Fisher, G. K. Pei, *BioTechniques* **1997**, *12*, 570–574.
- [169] Thermo Scientific, **2018**.
- [170] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580, DOI 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- [171] “T4 Polynucleotide Kinase” zu finden unter <https://www.neb.com/products/m0201-t4-polynucleotide-kinase#Product%20Information>, 05.05.2021.
- [172] “QuickChange Primer Design,” zu finden unter <https://www.chem.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>, 05.05.2021.
- [173] “Tuner™(DE3) Chemically Competent Cells,” zu finden unter [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/TunerDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD\\_BIO-70623](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/TunerDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-70623), 20.10.2021.
- [174] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, R. M. M. Singh, *Biochemistry* **1966**, *5*, 467–477, DOI 10.1021/bi00866a011.

- [175] C. M. Dobson, A. Šali, M. Karplus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 868–893, DOI 10.1002/(SICI)1521-3773(19980420)37:7<868::AID-ANIE868>3.0.CO;2-H.
- [176] R. Lumry, R. Biltonen, J. F. Brandts, *Biopolymers* **1966**, *4*, 917–944, DOI 10.1002/bip.1966.360040808.
- [177] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F. H. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1961**, *47*, 1309–1314.
- [178] C. Levinthal, J. T. P. DeBrunner, E. Munck, University Of Illinois Press, **1969**, pp. 22–24.
- [179] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr., L. Stryer, *Biochemie*, Springer Spektrum, Berlin, **2018**.
- [180] J. G. Thomas, A. Ayling, F. Baneyx, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *66*, 197–238, DOI 10.1007/BF02785589.
- [181] “Protino Ni-TED Resin for His-tag protein purification,” zu finden unter <https://www.mn-net.com/de/protino-ni-ted-resin-for-his-tag-protein-purification-745200.120>, 20.10.2021.
- [182] T. Hollmann, Dissertation, Universität Bayreuth, **2021**.
- [183] F. X. Schmid, in *Protein Struct. Pract. Approach*, Oxford University Press, Oxford, New York, **1997**, 261–297.
- [184] S. K. Piasecki, C. A. Taylor, J. F. Detelich, J. Liu, J. Zheng, A. Komsoukianants, D. R. Siegel, A. T. Keatinge-Clay, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1331–1340, DOI 10.1016/j.chembiol.2011.07.021.
- [185] M. Häckh, M. Müller, S. Lüdeke, *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 8922–8928, DOI 10.1002/chem.201300554.
- [186] S. Bali, H. M. O’Hare, K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 478–484, DOI 10.1002/cbic.200500430.
- [187] S. Bali, K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1935–1942, DOI 10.1002/cbic.200600285.
- [188] J. Zheng, C. A. Taylor, S. K. Piasecki, A. T. Keatinge-Clay, *Structure* **2010**, *18*, 913–922, DOI 10.1016/j.str.2010.04.015.
- [189] M. Yoshino, K. Murakami, *SpringerPlus* **2015**, *4*, 292, DOI 10.1186/s40064-015-1082-8.
- [190] V. Vagenende, M. G. S. Yap, B. L. Trout, *Biochemistry* **2009**, *48*, 11084–11096, DOI 10.1021/bi900649t.
- [191] T. Hollmann, G. Berkhan, L. Wagner, K. H. Sung, S. Kolb, H. Geise, F. Hahn, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 4973–4982, DOI 10.1021/acscatal.9b05071.
- [192] L.-A. Chen, M. A. Ashley, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 4568–4573, DOI 10.1021/jacs.7b01590.
- [193] Z. A. Kasun, X. Gao, R. M. Lipinski, M. J. Krische, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 8900–8903, DOI 10.1021/jacs.5b05296.
- [194] P. J. Kocieński, R. C. D. Brown, A. Pommier, M. Procter, B. Schmidt, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1998**, 9–40, DOI 10.1039/A705385A.
- [195] C. P. Holmes, P. A. Bartlett, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 98–108, DOI 10.1021/jo00262a025.
- [196] Z. Song, R. P. Hsung, T. Lu, A. G. Lohse, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9722–9731, DOI 10.1021/jo7017922.

- [197] T. J. Harrison, S. Ho, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7308–7311, DOI 10.1021/ja201467z.
- [198] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15, DOI 10.1063/1.1729860.
- [199] M. Breuning, Skript zur Vorlesung OC III: Instrumentelle Analytik, **2014**.
- [200] S. Kolb, Masterarbeit, Universität Bayreuth, **2018**.
- [201] P. Wingfield, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2001**, *Appendix 3*, Appendix 3F, DOI 10.1002/0471140864.psa03fs13.
- [202] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, J. C. Mateos-Díaz, E. Favela-Torres, *Biocatalysis* **2016**, *1*, 166–177, DOI 10.1515/boca-2015-0012.
- [203] F. Khan, M. He, J. Taussig, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3072–3079.
- [204] S. Q. Hutsell, R. J. Kimple, D. P. Siderovski, F. S. Willard, A. J. Kimple, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2010**, *627*, 75–90, DOI 10.1007/978-1-60761-670-2\_4.
- [205] L. Wagner, T. Roß, T. Hollmann, F. Hahn, *RSC Adv.* **2021**, *11*, 20248–20251, DOI 10.1039/D1RA03692K.
- [206] E. Antonini, G. Carrea, P. Cremonesi, *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 291–296, DOI 10.1016/0141-0229(81)90002-8.
- [207] “ExPASy - ProtParam tool,” zu finden unter <https://web.expasy.org/protparam/>, 05.05.2021.
- [208] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235, DOI 10.1039/C3CS60075K.
- [209] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179, DOI 10.1021/om100106e.
- [210] “One Shot™ TOP10 Chemically Competent Cells,” zu finden unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010>, 20.10.2021.
- [211] “BL21(DE3) Chemically Competent Cells,” zu finden unter [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/BL21DE3-Competent-Cells-Novagen,EMD\\_BIO-69450](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/BL21DE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-69450), 20.10.2021.
- [212] “BL21 Star™(DE3) Chemically Competent Cells,” zu finden unter <https://www.fishersci.de/shop/products/invitrogen-one-shot-bl21-star-de3-chemically-competent-i-e-coli-i/10328512>, 20.10.2021.
- [213] “Origami™ B(DE3) Chemically Competent Cells,” zu finden unter [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Origami-BDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD\\_BIO-70837?Referrer](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Origami-BDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-70837?Referrer), 20.10.2021.
- [214] “SoluBL21™ Chemically Competent Cells,” zu finden unter <https://www.amsbio.com/solubl21-chemically-competent-e-coli-c700200>, 20.10.2021.

## 8. Anhang

### 8.1. Biochemikalien und Chemikalien

Tabelle 8-1. Auflistung aller verwendeten Biochemikalien und Chemikalien zuzüglich ihrer Qualität/Reinheit und Bezugsquelle.

(Bio-)Chemikalien (Qualität/Reinheit)	Bezugsquelle
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 19:1 (30%)	ABCR CHEMICALS
Agarose (p.a.)	CARL ROTH
Ammoniumhydrogencarbonat ( $\geq 98\%$ , p.a.)	CARL ROTH
Ammoniumperoxodisulfat ( $\geq 98\%$ , p.a.)	CARL ROTH
Ammoniumsulfat ( $\geq 99.5\%$ , p.a.)	CARL ROTH
Ampicillin-Natriumsalz ( $\geq 97\%$ )	CARL ROTH
Carbenicillin-Dinatriumsalz ( $\geq 88\%$ , für die Biochemie)	CARL ROTH
Chloroform (99 – 99.4%, p.a.)	HONEYWELL
Coomassie Brilliant Blue R-250	FISHER BIOREAGENTS
D(+)-Glucose Monohydrat (99%)	GRÜSSING
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\geq 98\%$ , p.a.)	CARL ROTH
Essigsäure ( $\geq 99\%$ )	FLUKA
Ethanol absolut (Bio-rein)	FISHER SCIENTIFIC
Ethylacetat (ACS-rein)	VWR CHEMICALS
Ethylendiamintetraessigsäure (p.a.)	CARL ROTH
Fast Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ $\mu$ L)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Gateway <sup>TM</sup> LR Clonase <sup>TM</sup> II Enzym-Mix	THERMOFISHER SCIENTIFIC
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA-Leiter GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb Plus DNA-Leiter	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Glutaraldehydlösung (25%)	SIGMA-ALDRICH
Glycerin (99.5%)	VWR CHEMICALS
Glycin (99%)	CARL ROTH
Harnstoff (99.5%)	GRÜSSING
Hefeextrakt (für die Biochemie)	CARL ROTH
Imidazol ( $\geq 99\%$ )	ACROS ORGANICS
Iodacetamid ( $\geq 99\%$ )	SIGMA-ALDRICH
<i>Iso</i> -Propanol (Bio-rein)	FISHER SCIENTIFIC
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Kaliumacetat (99%)	GRÜSSING
Kaliumdihydrogenphosphat (99%)	GRÜSSING
Kanamycin-Monosulfat ( $\geq 750$ I.U./mg)	CARL ROTH
Lactose-Monohydrat (GR-rein)	GERBU
L-Arabinose ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Lysozym ( $\geq 35000$ FIP/mg, lyophilisiert)	CARL ROTH
Methanol absolut (HPLC-rein)	FISHER SCIENTIFIC
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin ( $\geq 99\%$ , p.a.)	CARL ROTH
Natriumchlorid (zur Analyse)	BERND KRAFT
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (99%)	CARL ROTH
Natriumdodecylsulfat ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Natriumhydroxid (ACS-rein)	VWR CHEMICALS
Natriumsulfat ( $\geq 99\%$ )	CARL ROTH
Nickel(II)sulfat Hexahydrat (zur Analyse)	CARL ROTH
PageRuler <sup>TM</sup> vorgefärbte Proteinleiter (10–180 kDa) PageRuler <sup>TM</sup> Plus vorgefärbte Proteinleiter (10–250 kDa)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Protino <sup>TM</sup> Ni-TED Harz	MACHEREY-NAGEL
Restriktionsenzyme <i>DpnI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NcoI</i> , <i>NdeI</i> , <i>NotI</i> (FastDigest)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
RNase I (91.8 U/mg)	APPLICHEM

Salzsäure (37%, p.a.)	BERND KRAFT
Schwefelsäure (95–97%, p.a.)	SIGMA-ALDRICH
T4-DNA-Ligase (5 U/μL) mit T4-DNA-Ligasepuffer	THERMOFISHER SCIENTIFIC
T4 DNA-Polymerase (5 U/μL)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/μL)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Taq DNA-Polymerase (5 U/μL)	THERMOFISHER SCIENTIFIC
TRIS (Puffer-Qualität)	CARL ROTH
TRIS-Acetat (≥99%)	CARL ROTH
Trypton (granuliert, für die Biochemie)	CARL ROTH
UV-Farbstoff Midori Green Advance	NIPPON GENETICS

## 8.2. Materialien und Geräte

### 8.2.1. Materialien

Tabelle 8-2. Auflistung aller verwendeten Materialien zuzüglich ihrer Bezugsquelle.

Materialien	Bezugsquelle
μDrop™ Platte für Plattenlesegerät	THERMOFISHER SCIENTIFIC
96-well Platte F für Plattenlesegerät	SARSTEDT
Amicon® Ultra 15 mL Zentrifugenfilter (MWCO: 10 und 30 kDa)	MERCK
CryoPure Röhren (2 mL)	SARSTEDT
Desinfektionslösung Spitacid	ECOLAB®
Duran® Glasflaschen (25, 50, 100, 250, 500 und 1000 mL)	SCHOTT
Duran® Kultivierkolben mit/ohne Spirale (50, 250 und 500 mL)	SCHOTT
Duran® Glaskolben (5, 10, 50, 100 mL), Bechergläser (50, 100 mL)	LENZ LABORGLAS
Einmalspritzen Injekt®-F Tuberkulin (1 mL)	BRAUN
Einmalspritzen Injekt® Luer Solo (2, 5, 10 und 20 mL)	BRAUN
Flächendesinfektionsreiniger Kohrsolin® FF	BODE CHEMIE
Gewindeflasche für die Massenspektrometrie (Nenndurchmesser N 9, Nutzvolumen 1.5 mL)	MACHEREY-NAGEL
Halbmikro Einmal-Küvetten (1.5 mL)	BRAUN
Membranfilter Cellulosenitrat Wha™an™ (0.45 μm)	GE HEALTHCARE
Messzylinder (50, 100, 250, 1000 mL)	ISOLAB LABORGERÄTE
Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Säule HisTrap FF 5 mL	GE HEALTHCARE
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	MACHEREY-NAGEL
Pasteurpipetten	BRAND
PCR-Reaktionsgefäß Multiply®-Pro (0.2 mL)	SARSTEDT
Petrischalen	SARSTEDT
Protino™ Ni-TED Harz	MACHEREY-NAGEL
Reaktionsgefäß (0.5, 1.5 und 2 mL)	SARSTEDT
Reaktionsgefäß Cellstar® Tubes (15 und 50 mL)	GREINER BIO-ONE
Sequenzier Economy Run Prepaid (Tubes)	MICROSYNTH
Sequenzier-Kit Mix2Seq	EUROFINS GENOMICS
Serologische Pipette (10 und 25 mL)	SARSTEDT
Spritzenfilter, CA, 0.45 μm, 25 mm, unsteril	VWR
Spritzenfilter, CA, 0.45 μm, 25 mm, steril	VWR
Spritzenfilter Chromafil® Xtra, CA, 0.45 μm, 25 mm, unsteril	MACHEREY-NAGEL
Spritzenfilter Chromafil® Xtra, PTFE, 0.20 μm, 15 mm, unsteril	MACHEREY-NAGEL
Spritzenfilter ROTILABO®, CA, 0.45 μm, 25 mm, unsteril	CARL ROTH
Spritzenfilter ROTILABO®, CA, 0.45 μm, 25 mm, steril	CARL ROTH
Spritzenfilter ROTILABO®, PTFE, 0.20 μm, 15 mm, unsteril	CARL ROTH
Spritzenkanülen Sterican® (0.6 × 80 mm, 0.6 × 30 mm, 0.8 × 50 mm, 0.8 × 120 mm, 0.4 × 20 mm, 0.9 × 0.4 mm)	BRAUN

## 8.2.2. Geräte

Tabelle 8-3. Auflistung aller verwendeten Gerätschaften zuzüglich ihrer Bezugsquelle.

Gerätschaften	Bezugsquelle
Absorption- und Fluoreszenz Mikroplattenlesegerät Varioskan™ LUX	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Analysenwaage AES-200-4C	KERN®
Chemie-Membranpumpe VP-100C	VACUUBRAND
Chromatographiesystem ÄKTA Pure mit UV-Detektor U9-L und Leitfähigkeitsdetektor C9	GE HEALTHCARE
Chromatographiesystem ACQUITY™ UPLC® mit einem Single Quadrupole Massenspektrometer und BEH C18 Säulen mit Partikelgröße 1.7 µm, Säulendurchmesser 2.1 µm und einer Länge von 50 mm	WATERS
Chromatographiesystem-Fraktionensammler F-9R für ÄKTA Pure	GE HEALTHCARE
Digitalwaage HAT-3000	A&D
Drehschieberpumpe RZ 6 mit Vakuummessgerät DCP-3000 + Sensor VSP-3000	VACUUBRAND
Elektrophoresespannungsquelle peqPOWER 300	PEQLAB
Gefrierschrank (-20 °C) GNP 2666-20	LIEBHERR
Geldokumentationsanlage Gel iX 20 Imager	INTAS
Geldokumentationsanlage LTF Labortechnik	LTF LABORTECHNIK
Horizontales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Gelsystem Midi S	PEQLAB
Horizontales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Gelsystem mini M	PEQLAB
Horizontales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Gelsystem mini S	PEQLAB
Inkubationsschüttler MaxQ 6000	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Kühlzelle Unichromat 900	UNIEQUIP
Laborabzug VARIOLAB Mobilien W 90	WALDNER
Labor-Kühl-Gefrierkombination (ex-geschützt) Lcexv 4010	LIEBHERR
Laborreinigungs- und Desinfektionsautomat PG 8583	MIELE
Labor-Wasserreinigungssystem B30	ADRONA
Magnetrührer Hei-Standard	HEIDOLPH
Magnetrührer Hei-Tec mit Temperaturfühler PT-1000	HEIDOLPH
Magnetrührer RCT basic	IKA
Mikrowelle R322STWE	SHARP
Mikrozentrifuge Micro Star 17 R	VWR
Mikrozentrifugenrotor 24 × 1.5/2.0 mL Rotor mit aerosoldichtem ClickSeal™ Deckel 75003424	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Minizentrifuge SPROUT®	SPROUT
PCR-/Thermo-Cycler peqSTAR	PEQLAB
pH-Meter Lab 855	SI ANALYTICS
Pipetten PIPE™AN® Classic	GILSON
Pipetten Research® Plus	EPPENDORF
Pipettierhilfe Pipetus®	HIRSCHMANN
Präzisionswaage EW-200-3NM	KERN
Rotationsverdampfer Hei-Vap Precision ML/G3	HEIDOLPH
Rotor Concentrator plus F45-48-11	EPPENDORF
Schüttler RS-VA 10	PHOENIX INSTRUMENT
Schüttler Vortex-Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES
Sicherheitswerkbank MSC Advantage 1.8	THERMOFISHER SCIENTIFIC
Standautoklav VX-65	SYSTEC
Sterilfiltrationsanlage Millipore® XX1504700	MERCK
Stickstoffgenerator NMG 11 für UPLC® ACQUITY™	CMC INSTRUMENTS
ThermoMixer@ C	EPPENDORF
ThermoMixer@ C SmartBlock™ 24×1.5 mL	EPPENDORF
Rotator Tube-Revolver für Probenröhrchen	CARL ROTH
Ultraschall-Homogenisator HD 3100 SONOPULS Mikrospitze KE 76	BANDELIN
Ultraschall-Homogenisator HD 3100 SONOPULS Mikrospitze MS 73	BANDELIN
Ultraschall-Homogenisator HD 3100 SONOPULS mit Lärmschutzbox LS 8	BANDELIN



Ultratiefkühlschrank (-80 °C) U410	EPPENDORF
Vakuumkonzentrator Concentrator plus	EPPENDORF
Vakuumpumpe Rotavap Valve Control	HEIDOLPH
Vakuumpumpe SOGEVAC SV40 BI	LEYBOLD
Vertikales Elektrophoresesystem PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin M	PEQLAB
Wärmeschrank U-Serie UN160	MEMMERT
Wippschüttler RK-1D	WITEG
Vakuumpumpe SOGEVAC SV40 BI	LEYBOLD
Zelldichte-Messgerät Ultrospec™ 10 Cell Classic	GE HEALTHCARE
Zentrifuge Centrifuge 5804 R	EPPENDORF
Zentrifugenrotor FA-45-6-30	EPPENDORF
Zentrifugenrotor S-4-72	EPPENDORF

### 8.3. Primer, Plasmide, Bakterienstämme, synthetische Gene und Substrate

#### 8.3.1. Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 8-4 aufgelistet.

**Tabelle 8-4. Übersicht über Sequenzen der verwendeten Primer.**

#	Name	Sequenz (5'→3') (Anzahl der Nukleobasen)
P1	T7 fwd	TAATACGACTCACTATAGGG (20)
P2	T7 rev	GCTAGTTATTGCTCAGCG (18)
P3	<i>ambDH3</i> fwd	GAAGCACCGCGTGGTC (16)
P4	<i>ambDH3</i> rev	TAATCACGTTCACTTGCACCC (21)
P5	<i>ambDH3_SLIC20</i> fwd	ATCATCATATCGAAGGTAGGCATATGGAAGCACCGCGTGGTCGT (44)
P6	<i>ambDH3_SLIC20</i> rev	GACTGCAGGTCGACAAGCTTGAATTCTTAATCACGTTCACTTGCAC (46)
P7	<i>ambDH2</i> fwd	TAAGCACATATGCAGGCACCGC (22)
P8	<i>ambDH2</i> rev	GCTTAGAATTCCTAATCGCGTTCGG (25)
P9	<i>ambDH2_SLIC20</i> fwd	CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCAGGCACCGCGCCCGGTCCG (45)
P10	<i>ambDH2_SLIC20</i> rev	TTGTCGACGGAGCTCGAATTCCTAATCGCGTTCGGCGGCACCGGC (45)
P11	<i>ambDH4_Y173A</i> fwd	CTGGCAGCACAGGGTTATGGTGCTGGTCTCGCT (34)
P12	<i>ambDH4_Y173A</i> rev	ACGCAGGACCAGCACCATAACCCTGTGCTGCCAG (34)
P13	<i>ambDH4_Y173V</i> fwd1	CTGGCAGCACAGGGTTATGGTGTTGGTCTCGCAC (34)
P14	<i>ambDH4_Y173V</i> rev1	ACGCAGGACCAACACCATAACCCTGTGCTGCCAG (34)
P15	<i>ambDH4_Y173V</i> fwd2	AGCACAGGGTTATGGTGTTGGTCTCGGTTTCA (33)
P16	<i>ambDH4_Y173V</i> rev2	TGAAACGCAGGACCAACACCATAACCCTGTGCT (33)
P17	<i>ambDH4_Y173V</i> fwd3	GGCAGCACAGGGTTATGGTGTTGGTCTCGGTTTTCAGG (37)

## Anhang

P18	<i>ambDH4_Y173V</i> rev3	CCTGAAACGCAGGACCAACACCATAACCCTGTGCTGCC (38)
P19	<i>ambDH4_A173V</i> fwd1	CGCAGGACCAACACCATAACCC
P20	<i>ambDH4_A173V</i> rev1	GGGTTATGGTGTGGTCCTGCG
P21	<i>ambDH4_A173V</i> fwd2	CTGAAACGCAGGACCAACACCATAACCCTGTGC
P22	<i>ambDH4_A173V</i> rev2	GCACAGGGTTATGGTGTGGTCCTGCGTTTCAG
P23	<i>ambDH4_P27L</i> fwd1	TCAACAAATGCTGTACCTAGCAGAATAACTGTACCGG (37)
P24	<i>ambDH4_P27L</i> rev1	CCGGTACAGTTATTCTGCTAGGTACAGCATTTGTTGA (37)
P25	<i>ambDH4_P27L</i> fwd2	CGCCAGATCAACAAATGCTGTACCTAGCAGAATAACTGTACC (42)
P26	<i>ambDH4_P27L</i> rev2	GGTACAGTTATTCTGCTAGGTACAGCATTTGTTGATCTGGCG (42)
P27	<i>ambDH4_P27V</i> fwd1	GATCAACAAATGCTGTACCTACCAGAATAACTGTACCGGCAA (42)
P28	<i>ambDH4_P27V</i> rev1	TTGCCGGTACAGTTATTCTGGTAGGTACAGCATTTGTTGATC (42)
P29	<i>ambDH4_P27V</i> fwd2	CCAGATCAACAAATGCTGTACCTACCAGAATAACTGTACCGGCAAC (46)
P30	<i>ambDH4_P27V</i> rev2	GTTGCCGGTACAGTTATTCTGGTAGGTACAGCATTTGTTGATCTGG (46)
P31	<i>nonS_SLIC</i> fwd	CATCATCATATCGAAGGTAGGCATATGAATCAAGAAGCGTTTCGT (45)
P32	<i>nonS_SLIC</i> rev	TGCAGGTCGACAAGCTTGAATTCTTACGCGCCGG (34)
P33	<i>pamS_SLIC</i> fwd	CATCATCATATCGAAGGTAGGCATATGAGCGAAGAGTTTGGTCAGG (46)
P34	<i>pamS_SLIC</i> rev	AGACTGCAGGTCGACAAGCTTGAATTCTTAAACGCGGACCGCC (42)
P35	pCold-I fwd	ACGCCATATCGCCGAAAGG
P36	pCold-I rev	GGCAGGGATCTTAGATTCTG

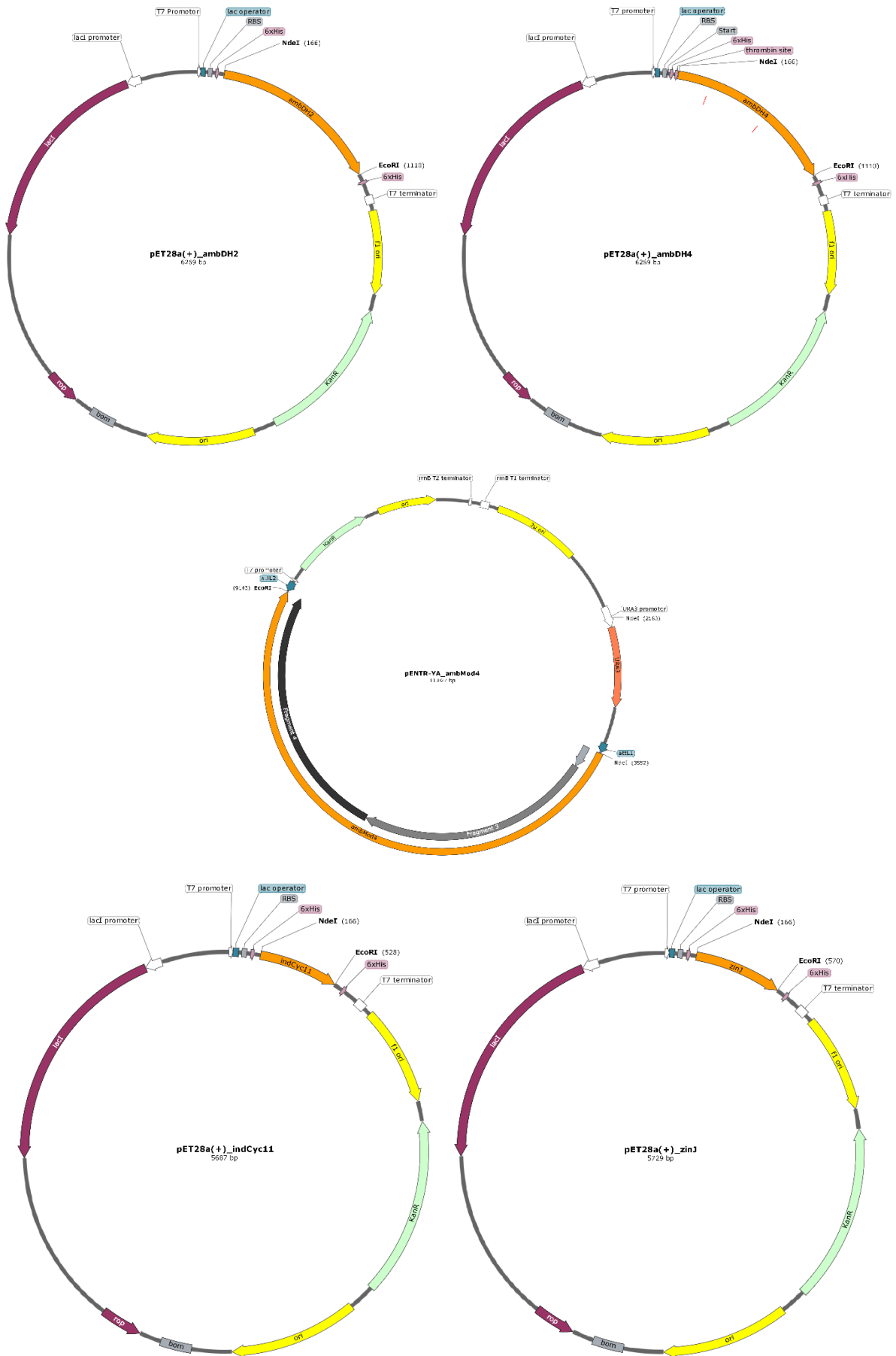
### 8.3.2. Plasmide

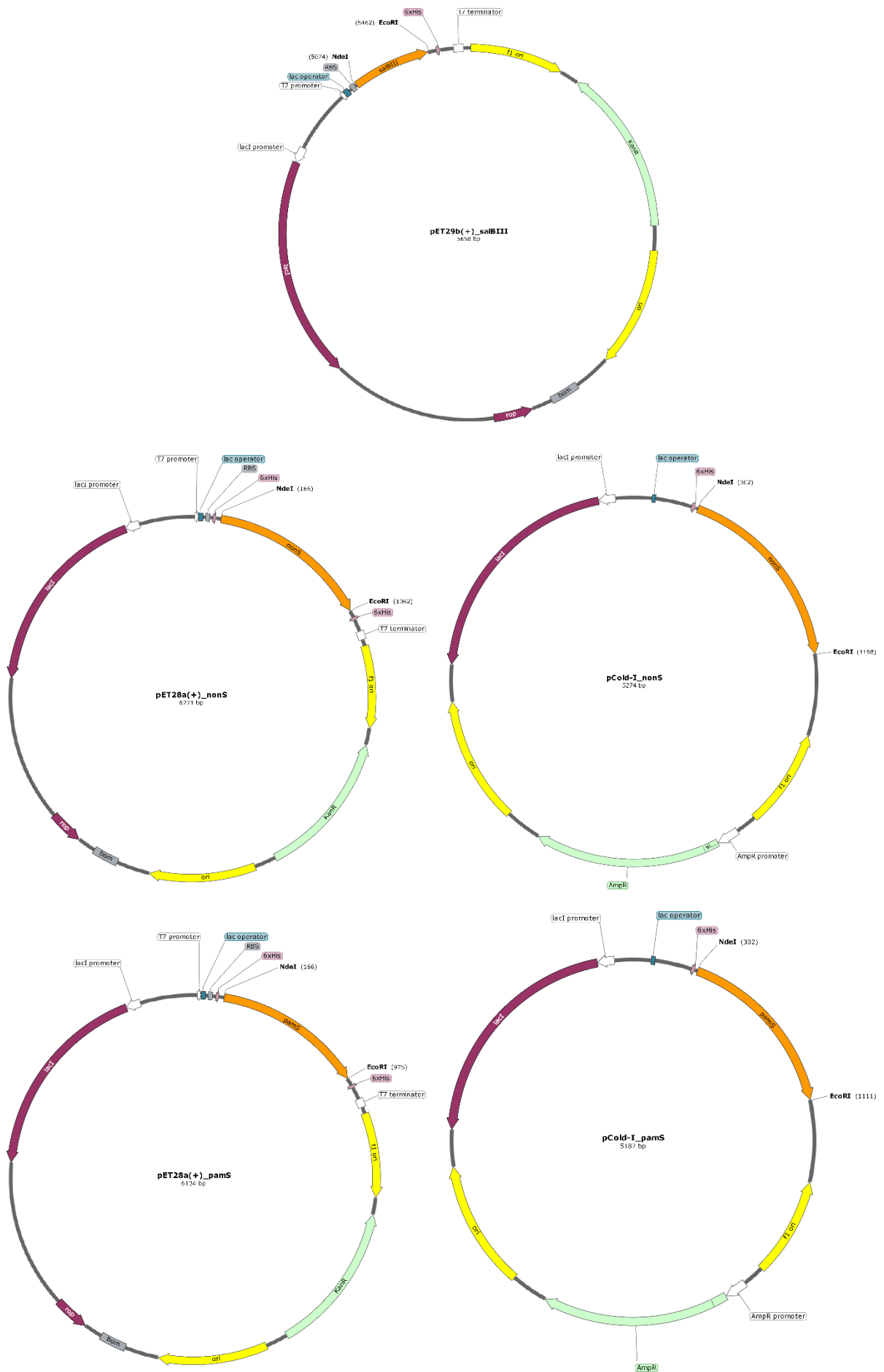
Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet (Tabelle 8-5). Die nach Klonierung entstandenen Plasmidkonstrukte sind im Folgenden schematisch als Plasmidkarten dargestellt. Die Abbildungen wurden mit SnapGene Viewer erstellt.

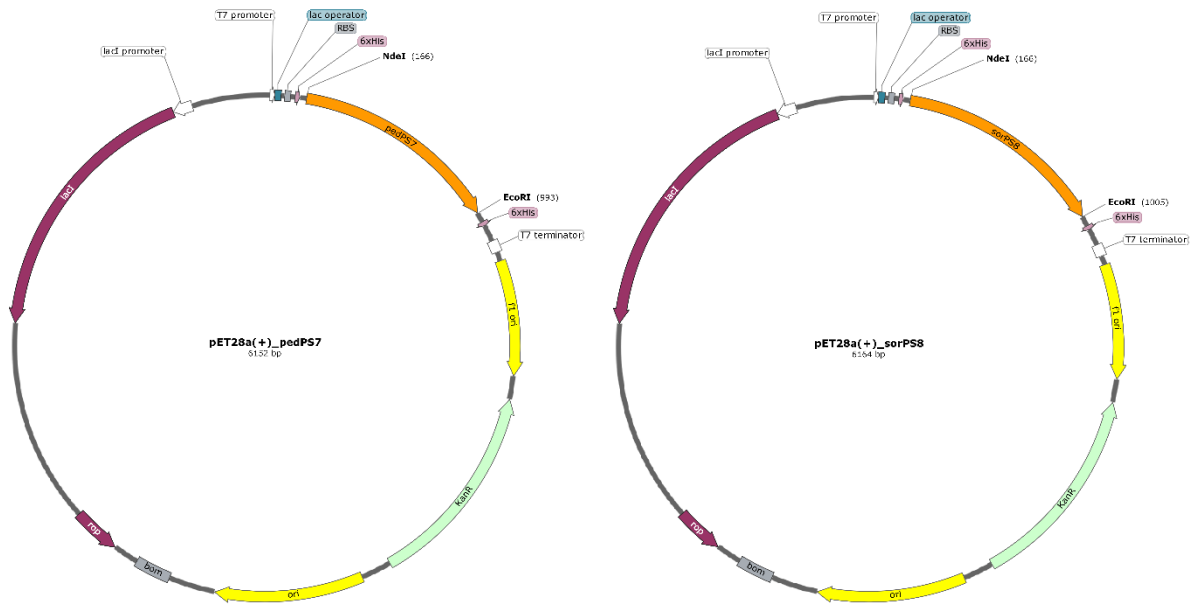
**Tabelle 8-5. Auflistung der verwendeten Plasmide mit dem nach Genexpression vorliegendem Protein-tag sowie eventuellen Besonderheiten der Plasmide.**

Plasmid	Protein-tag	Besonderheit
pET20b(+)	C-His <sub>6</sub> -tag	-
pET28a(+)	N-His <sub>6</sub> -tag	-
pET32a(+)	N-Trx-tag N-His <sub>6</sub> -tag N-S-tag C-His <sub>6</sub> -tag	-
pGEX-6P-1	N-GST-tag	-
pCold-I	N-His <sub>6</sub> -tag	Kälteschockexpressionsvektor
TaKaRa-Chaperonplasmide	-	Verwendung für lösliche Coexpression









### 8.3.3. Bakterienstämme

Für die Expressionen sowie Präparationen der Enzyme wurden vier verschiedene *E. coli*-Stämme verwendet. Die Proteinproduktion wurde standardmäßig im Stamm *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Für eine verbesserte Anpassung des Genexpressionslevels wurde *E. coli* Tuner™(DE3) und für eine stabilere mRNA One Shot™ BL21 Star™(DE3) verwendet. *E. coli* Origami™ B(DE3) zeichnet sich durch Mutationen in den Genen der Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und der Glutathion-Reduktase (*gor*) aus, wodurch die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma stark verbessert wird. Zudem ermöglicht der Stamm – ebenso wie Tuner™(DE3) – eine präzise Kontrolle der Expressionslevel durch die Anpassung der IPTG-Konzentration. *E. coli* SoluBL21™ besitzt spezifische Mutationen, die die Löslichkeit des Zielproteins erhöhen sollen. Die Herstellerangaben zu den Genotypen sind in Tabelle 8-6 aufgeführt. Die Gene werden mithilfe verschiedener Expressionsvektoren in die Zellen transformiert.

Tabelle 8-6. Genotypen der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	THERMOFISHER SCIENTIFIC <sup>[210]</sup>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	NOVAGEN <sup>[211]</sup>
<i>E. coli</i> Tuner™(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)	NOVAGEN <sup>[173]</sup>
<i>E. coli</i> One Shot® BL21 Star™(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	INVITROGEN <sup>[212]</sup>
<i>E. coli</i> Origami™ B(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522:: Tn10 trxB</i> (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	NOVAGEN <sup>[213]</sup>
<i>E. coli</i> SoluBL21™	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)* * Der Stamm enthält nicht charakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektionskriterien erhalten wurden.	AMSBIO <sup>[214]</sup>

### 8.3.4. Synthetische Gene

#### 8.3.4.1. *ambDH3*

CATATGGAAGCACCGCGTGGTTCGTGCAGGTCTGGAAAGCGGTGGTCTGCTGGCAGTTAAACATCCGTGGCTGAGC  
GCAGCAGTTTCGTCTGGCAGATCGTGATGGTTATGTTCTGAGCGGTTCGTCTGAGCACCGTTGAACATGCATGGGTT  
CTGGATCATGTTGTTCTGGGCACCGTTATTCTGCCTGGCACCGCATTTGTTGAACTGGCACTGGCAGCAGCAGAT  
GCAGTTGGTCTGCCGAGCGTTAGCGAACTGACCATTGAAGCTCCGCTGGCACTGCCTGCACGTGGTGCAGTTACC  
CTGCAGGTTACCGTTGAAGCACTGGATGCAACCGGTCGTTCGTGGTTTTGCAGTTCATAGCCGTCCGGATGGTGCC  
CATGATGCACCGTGGACCGCACATGCCCGTGGTGTCTGGGTGCAGCACCGGCAGCTGCAACCACCGCATGGGCA  
GCTGGTGCATGGCCTCCGGCTGGTGCAGAACCGGTTGATGTTACCCGTTGGGTGGAAGCCCTGGACGCATGGGTT  
GGTCCGGCATTTCGTGGTGTACC GCAGCATGGCGTGTGGTTCGTAGCATTTATGCAGATCTGGCCCTGCCGGAA  
GGTGTGAGCGAACGTGCACAGGATTTTGGTCTGCATCCGGCACTGCTGGATGCCGCACTGCAGGCCCTGCTGCGT  
GCCGAACCTGGGTGCCGGTAGCAGTCCGCGTGAAGGTATTCCGATGCCGTTTGCATGGTCAGATGTTGCACTGGAA  
GCGCGTGGTGCCGAGCACTGCGTGCCCGTGTGAAGTTGAAGATGCAAGTATGGTATCAGCTGGCAGCAAGC  
ATCGAACTGGCAGATGCACAGGGTCAGCCGGTTGCACGTGCCGTTACATTTTCGTGCACGTGGGCAACCGCAGAA  
CATGTGCGTAAAGCAGCAGCGGGTGCAAGTGAACGTGATTAAGAATTC

#### 8.3.4.2. *ambDH2*

CATATGCAGGCACCGCGCCCGCGTCCGAGTCTGGAAGGTGTTGGTCTGACCGCAGCAAATCATCCGTGGCTGGGT  
GCAGCCGTTTCGTCTGGCAGATCGTGACGGTTATGTGCTGAGCGGCCGTCTGAGCACCGAGCATCCGTGGGTT  
CTGGATCATGTGGTTCTGGGCACAGCCTTACTGCCGGGCACCGGTTTTGTTGAACTGGCCTGGGCAGCAGCCGAA  
GCAGTTGGCCTGAGTGGCGTTAGCGAACTGGCAATCGAGGCACCGTTAGCCCTGCCGGCACGTGGTGCAGTTGCC  
TTACAGGTGGCAATTGAAGCACCGGATCCGGCAGGTCGTTCGCGGTATTGCAATTTATAGCCGTCCGGATGGCGCA  
GCCGATGCACCTTGACCGCCCATGCACGTGGCGTTCTGGGTGCAGCCGCAAGCGATCGCGATGCAGCATGGGCA  
CAGGGCGCCTGGCCGCCGGGTGCAGTTCGGTGTGATGTTACCCAGTGGCTGGAGATTGTGGATGCCTGGGTT  
GGCCCGCCTTTCGTGGTGTGTGGCCCTGTGGCGTGTGGCCGACCATTTACGCAGATGTTGCCCTGCCGGAC  
GGTGTGGCCGGTACCGCACAAGACTTTGGTCTGCACCCTGCCCTGCTGGATGTGGCCCTGCGTGCCTTTCTGCGT  
GCCGAACCTGAGTGCAGATCCGAGCCCGCGCAAGGTACCGTGGTTCCGTTTGCCTGGAGTGACGTGGCACTGGAA

GCCCCGCGGTACAGCAGCCCTGCGTGTTCGTGCAGAGGTGGAAGCAGGTGGTGTATGGCGACGCCATTACCGCCAGC  
ATCCAGCTGGCAGATGGTCAGGGTTCGTCCGGTTGCACGTGTTGGCGCCCTGCAGATGCGTTGGACCACAGCAGAA  
CGTGTTCGTGCAGCAGCAGCCGCCGGTGCCGCCGAACGCGATTTAGGAATTC

8.3.4.3.ambDH4

CATATGCAGGCACCGCGTCCGCGTCCGTCACCTGGAAGGTGTTGGCCTGACAGCAGCAAATCATCCTTGGCTGGGT  
GCAGCCGTTTCGTCTGGCGGATCGTGACGGTTATGTTCTGAGCGGTGCCTGAGTACCCTGGATCATCCGTGGGTA  
CTGGATCATGTTGTTGCCGGTACAGTTATTCTGCCAGGTACAGCATTTGTTGATCTGGCGTGGGCTGCTGCGGAA  
GTTGTTGGTGCGGCAGCGGTTAGCGAAGTTACCTTTACCACCCCTCTGTTTCTGCCCTCCGCGTAGCGTTGTGGAA  
CTGCAGGTTTCGTATTGGTGAACCGGATGCGAGCGGTTCGTACCTTTGCAGCATATAGCCGTCCGGATGCGGCA  
AGCGAAGCCGAATGGACCCAGCATGCCACCGGTGTGCTGAGCGCACAAAGCTGCCGCAGGGGCAGATGTTGCGGAT  
CTGAGCGTTTGGCCTCCTCCGGGTGCCGAAGTGGTTGCGCTGGATGGTGGTTATGCGTGGCTGGCAGCACAGGGT  
TATGGTTATGGTCTGCGTTTTCAGGCGCTGCGTGAAGTTTGGCGTGCAGGTACAACGCTGTATGCGCGTGTGGC  
CTGCCTGATGCCGTTGCAGATACCGCACAGTCATTTGGTATTTCATCCTGCCCTGCTGGACCCGTGCTGCATAGT  
CTGCTGGCACGTTTACC CGCAAGAAGAAGCCAGCGACGACGATAAAGTTCTGCTGGCCTTTGCATTTAGTGATGTT  
GTTATTGAAGCGGTGGTGCAGCGGAAGTTTCGTGTTTCGTCTGAATAACAAGCCGGTGATGATGGTGAAGCCCTG  
ACCGCAAGCATTTCATCTGGCCGATGCACAGGGTTCGTCCGGTTGCCCGTGTGGTGCATTCCAGGCACGTGCAACC  
ACCACCGAACGTGTTTCGTGCTCTGGCTGGTGCCAGCGAACGTGATGAATTC

8.3.4.4.indCyc11

CATATGGTTGAAGAGTACTTTTCGTGCTCTGAATGCGGGTGACCTGGATAAGGTTCTGGAGATGCTGGCGCCGGAC  
GTTTCGTATGGAGGACCCGGTGGGTGGCCCGCCGAAGCTGGGTTCGTGAGGCGGTGGGCGAATACATCGCGCAGGTT  
ATTGAGGCGAACGCGGAAATCACCGTGGGTCCGATTGTTGCGGCGCAGGATGGTCTGCGTGTTCGCGTCCGCGT  
GTTGGTTCGTCTGGCGCAACTGGGTTCGTAGCGATGGTCCGCGTATGGAGATCAACTGCGTGGATGTTATTCAAGTT  
AACGGCGAAGGTCTGATTCAAGAGGTTCTGGTTTTCTGGGGTATGACCGACATTGCGCGCTTAAGAATTC

8.3.4.5.nonS

CATATGAATCAAGAAGCGTTTTCGTGCGGGCCAAGAACC CGCGGAGTGGGCGGGTGCGGCGACCGAGAGCTTT  
GCGGACTTTGCGGACCGTGTGACGGCAAAGAGGTGGTTCCGCTGCGTGCAGCCTGGCGGGTGGCGTGGCGACC  
CTGACCCTGGACCGTCCGCACCGTTCGTAACAGCCTGGATCTGACCCTGAGCCGTACCTGCTGCTGGGTCTGATG  
TGCGCGGGTGATGATCCGCGTGTTCGTACCGTGGTTATTACCGGTAACGGTGGCGCGTTCGCGCGGGTGACGAT  
GTTGGCAGCGTGCCTGTTGGCGTCTGGGTGACCGTGC GGATAACCCGTTTGACCCGATCACCAGCGATGCGCAC  
TACCTGCGTGTGTGCGAGGCGATTCTGCACCTGCCGAAACCGGTGGTTGTGGGTCTGACCGGTGCGGCGGCGGGT  
GCGGGTGCGGAAATTGCGTGC GCGGCGGACTTCCGCTCTGGCGGATAACCCGTGCGAGCATTGGTAGCTGCC TGGCG  
GGTGTGGTTCATGTGGTAACGTTGTTCTGATGAGCCGTCTGACCGGTCCGGCGCGTGC GACCGAGATTTATCTG  
ACCGGTCGTATGGTTAGCGGCGACGAAGCGGTGCGTCTGGGTCTGTTTCGATCGTCTGTGCGAGCCGGAAGACTTT  
GATCGTGAGCTGGCGGATCTGGCGGGCCGTTTCGCGGCGCTGCCGACCGGAGCGTGGTCTGTTTAAGGAGCTG  
CGTGAACGTAGCTGGGGTCAGCCGGCGGAATATGGTCTGCGTCTGCAAGACACCTATCACCTGAAAAACCCACGCG  
ACCGTGGCGGATGCGCGTGAGGGTATGGCGGCGTTTACC GAGAAGCGTCCGCCGCGTTTACC GCGCGTTAAGAA  
TTC

8.3.4.6.pamS

CATATGAGCGAAGAGTTTGGTTCAGGATCGTCCGGCGGAGGCGGGTAGCGGCAGCGGCACCGACGTTCTGGTTGAG  
CGTTCGTGGTCCGTTTCTGGTGATCCAGCTGAACCGTCCGCGTGTTCGTAACGCGCTGACCCGTGCGATGGCGGAG  
CGTCTGGCGGCGGCGTTTACC GAACTGGATGCGCGTGC GGAACCTGCGTCTGGGCGTGTGACCGGTACCCCGCCG  
GCGTTCTGCAGCGGTATGGATCTGGGTGCGTTTGC GCGTGGCGAGCGTGC GAGCCTGCCGGGTGCTGGT TTTGGT  
GGCCTGACCGAACAACCGCCGAGCAAACCGCTGATCGCGGCGGTGGAGGGTGC GCGCGGTTGGTGGCGGTTTCGAA  
ATGGTTCTGGCGTGC GACATGGTGGTTGC GCGCGGATGATGCGGTGTTTGGTCTGCCGGAACCTGCGTCTGGTCTG  
GTTGCGGCGGCGGGCGGTCTGCTGCGTCTGCCGCGTGC GATTGC GCGCGGCGGTGGCGATGGAGATGGCGCTGACC  
GGCGAACCGATTGATGCGCAGCGTGC GTTTGCGCTGGGTCTGGTTAACCGTGTGGTTGCGCCGGGTACCGCGCTG



ACCGCGCGTGCAGCTGGCGGAAAAGATTGCGGCGCATGCGGACCATGCGGTGCTGGCGAGCAAAGCGTGCTG  
GCGCGTGTTCGTGACGGCGAGCTGGCGGATGAATACCGTAGCCACCGTGAGCTGCTGAGCGGTATTCTGGATAGC  
CCGGGTGCGCGTGGGGTGCAGCTGAGTTCGTTCGTGAGCGTCCGGGCGGTCCGCGT**TAAGAATTC**

8.3.4.7.pedPS7

CATATGAGCACCCCTGGTTAGCACCGAAGGTGTTAGCCGTTTCAAGGGCGAAGAGTTTTCTGCGTGACCACAGC  
GGTATGCTGCCGGCGGGCGGTGTACCTGGAAATGGTTCGTGCGTTCGCGGAGGGCAAGCACGAACGTAAAAATCACC  
GGCCTGAGCCACGTGGTTTTGGCCGAAGGTGCTGCTGGTTAGCGGGCAGGGCCGTGAAGTGCGTACCTGCCTGACC  
AACGTTGACCGTAGCGCGTTTTCTGATTAGCGCGTGCGAGCAGAGCAGCGAAGGTCCGCAAGAGGTGACCTACTGC  
CAGGGCAACCTGCTGCTGCCGGAAGTGATGGAAGAACC GGTTGCGGCGCTGGCGATTGAAGCGATTGCGTATCGT  
TGCCCGAGCGTGCTGGAGGGCAACAATGCGATCGTCTGCTGCAAAGCACCCATGGTCCGGCGCTGATGAGCGTT  
CAGCAACTGCGTTACAGCGACCGTGAAGCGCTGGCGCTGCTGCAACTGCCGGATGAGCTGCAGATGGGTTGGGAC  
GATTATGGTTGGCACCCGAGCCTGCTGAACGGTGCATTCTGGCGAGCGTGGTTTTGGTGCCTGGCGCGTGCGCCG  
CGTAGCCGTGCGGGTCTGCCGATGCCGTTTACGCTGGACCGTCTGCGTGTGTTCCAACCGTTTGAACGTCAGATG  
CAAGCGTATGTTTCGTTCGTATGGTAGCGCGCTAGCCTGGGGCAGAACCCTGGAAAAGGTGGACATTGATCTGCTG  
GATAGCCAGGGTTCGTTGCCTGGCGAGCCTGGAAGGTTTTACCCCTGGTTTTTTCGCCCGGATGCGAATCGTCTGGTT  
**TAAGAATTC**

8.3.4.8.sorPS8

CATATGCACCCGCTGGTTCATCGTGAGGTTGCGGACGCGGAAGGTCGTTCGTGCGTTTTGCGGCGGTTTTGACGGT  
GCGGAGCCGTTTTCTGATGGATCATGAGCAGCTGTTTTCCGGCGGTTGCGTATCTGGAGATGGCGCGTGCGGCGCG  
GAAGCGGCGGATCTGAGCATCGCGGGTATTCGTAACGCGCTGTGGATCAGCCCGCTGGTTATTCGTGACCGTGCG  
TGCGAACTGCGTGTGGTTCTGAGCGATGCGGAGAGCGGCCGTGCGTACGAAGTGAGCAGCAGCCGTGGTGTTCAT  
GCGCGTGGCCTGCTGGTGTGTTGATGAGCCGCCGGCGCAACC GGCGCGTCCGCCGGCGCTGGATATCGAAGCGGTG  
CGTACCCGTTGCGCGATTGAGGTTGACGCGCGTACCCGTAACGAAGCGATGGGTATGCCGGCGAGCTATGACAAAG  
CTGTGGATCGCGAGCCTGGTTTACAGCGATCACGAGGCGCTGGCGAGCCTGCAGGCGCCGAGCGCGCCGGGTGAT  
GAAGCGTTCCTGCTGGATCCGAACCTGGGCAACAGCGTGTGGTTCCGGCGATCTTCTGAGCCTGATTCAGAC  
GGCGAGCGTGAATGGCGTTTTTCCGTACACCCTGGAGGCGCTGTGGATTTATAGCGATCCGCGTTCGTGGCGCGTAC  
GTGCATGCGCGTTCGTGCGGCGGAAGATGGTCAGGCGGCGCGTTTTCCGGCCGTTACGACGTGGATCTGGTTGATGCG  
AGCGGTAACCTGCCTGATGGCGTTTTCTGTTGCCTGACCGCGGTTCCGGGCGGCGGTTGCGGCGCCGGAGAAAACCGGCG  
GCGCCGTTGTG**TAAGAATTC**

8.3.4.9.zinJ

CATATGATCGACGAGACCCAGCGTAAGGCGACCGTTCGGAATACTTTGAGCGTGTGAATGCGAAGGACCTGGAC  
GGCGTGGTGAACCTGTTTCGCGACCGACGCGGTGGTTGCGGATCCGGTGGGTGCTCCGCCGTTGCGGGCGAGGAA  
GCGCTGCGTGCCTACTTCCAGCGTGTGCTGCACGAGTTTGACACCCACGATGTTCCGGGTGTTCCGAGCGGTGCG  
CAGGATGGTCAAAGCGTTGCGCTGCCGCTGAAGGCGACCATCAACAACCCGCAAGACCCGACCGGTGGCGTGCGT  
CTGGATGTTAACCTGGTGAGCGTTTTTACCATTGGTGAAGATGGCCTGATTAGCGAGATGCGTGCCTACTGGGGT  
CTGACCGACATTGCCCGGCGGGCGCG**TAAGAATTC**

8.3.4.10. Berechnete Parameter der produzierten Proteine

Sämtliche Parameter wurden mittels ProtParam berechnet und sind für alle verwendeten Proteine in Tabelle 8-7 und Tabelle 8-8 aufgelistet.

Tabelle 8-7. Parameter der ausgehend von pET28a(+) produzierten Proteine.

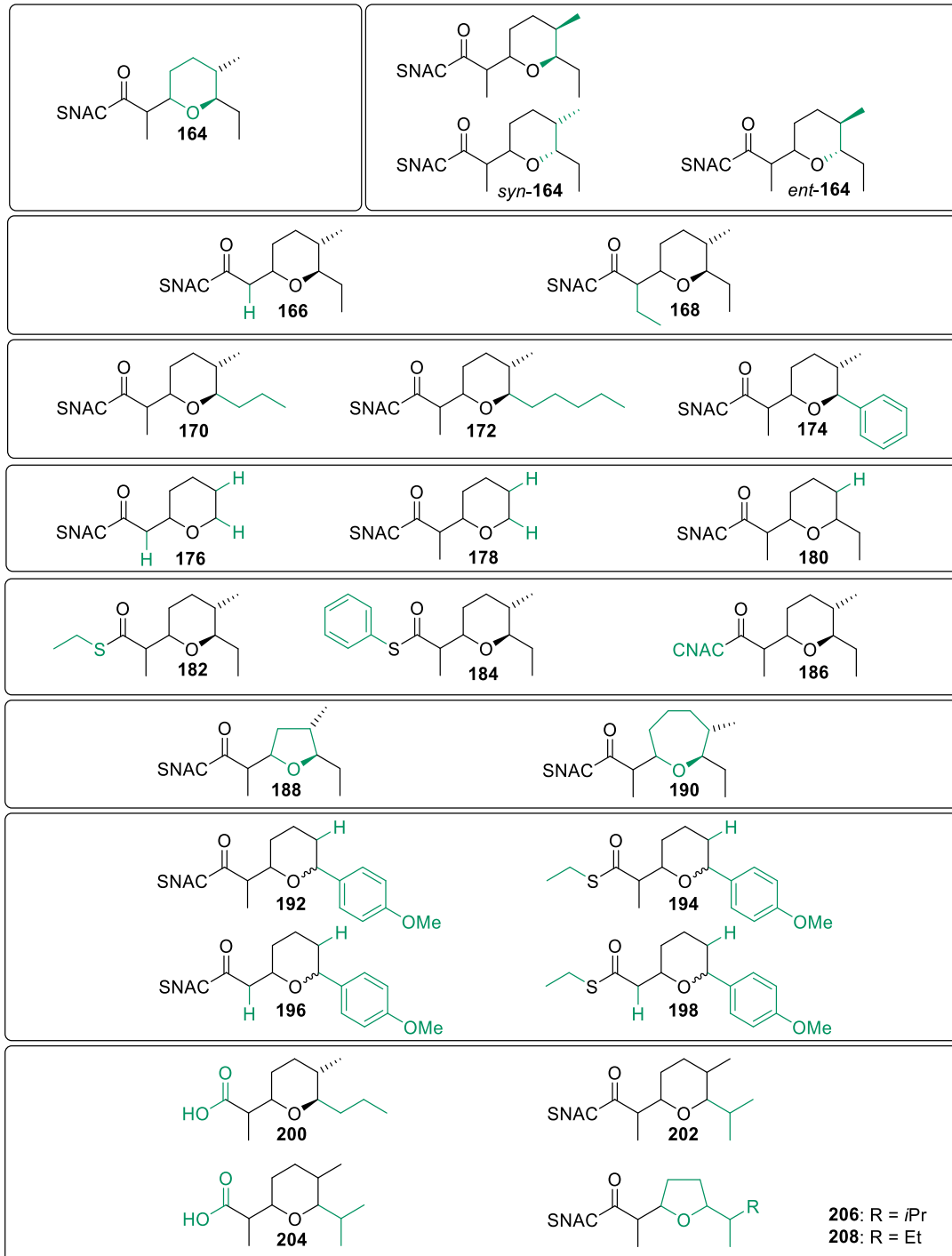
Protein	Anzahl an Aminosäuren	MW [Da]	pI	$\epsilon$ [g <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
<b>His<sub>6</sub>-AmbDH2</b>	333	34438.8	5.8	64970
<b>His<sub>6</sub>-AmbDH3</b>	332	34396.7	5.9	57980
<b>His<sub>6</sub>-AmbDH4</b>	358	37644.3	6.0	47565
<b>His<sub>6</sub>-IndCyc11</b>	139	15090.3	5.4	8480
<b>His<sub>6</sub>-NonS</b>	317	33889.3	6.4	22835
<b>His<sub>6</sub>-PamS</b>	288	29951.2	6.8	16150
<b>His<sub>6</sub>-PedPS7</b>	294	32640.3	6.2	31315
<b>His<sub>6</sub>-SalBIII</b>	148	16371.3	5.2	8480
<b>His<sub>6</sub>-SorPS8</b>	298	32326.6	5.7	32555
<b>His<sub>6</sub>-ZinJ</b>	153	16340.3	5.3	9970

Tabelle 8-8. Parameter der ausgehend von pCold-I produzierten Proteine.

Protein	Anzahl an Aminosäuren	MW [Da]	pI	$\epsilon$ [g <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
<b>His<sub>6</sub>-NonS</b>	313	33751.2	6.4	22835
<b>His<sub>6</sub>-PamS</b>	284	29813.2	6.8	16150



Nach enzymkatalysierter Zyklisierung der Substrate aus Abbildung 8-1 ergeben sich folgende Produkte (Abbildung 8-2). Dabei ist nur die Konfiguration an C-6 und C-7 aufgrund des eingesetzten Substrates festgelegt. Eine Aussage über die Konfiguration an C-2 und C-3 wird nicht getroffen.



**Abbildung 8-2. Strukturen der zyklisierten Produkte.** Die Konfiguration an C-6 und C-7 ist bereits durch die Konfiguration des eingesetzten Substrates festgelegt. Die Konfiguration an C-2 und C-3 wird durch das jeweilige Enzym festgelegt.

## 8.4. MS-MS-Analysen

### 8.4.1. Gelbilder der SDS-PAGE

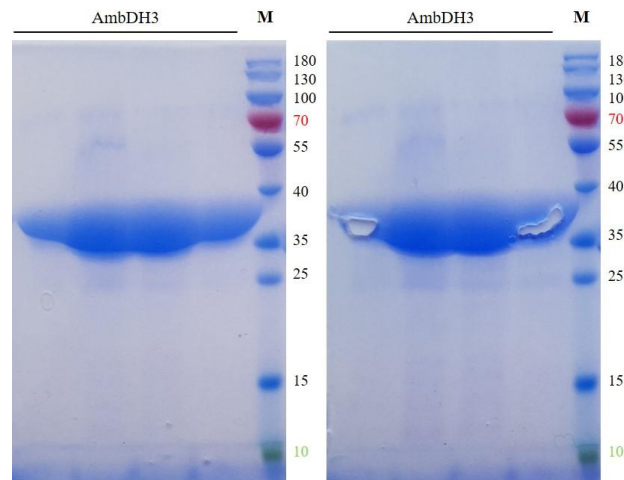


Abbildung 8-3. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) von His<sub>6</sub>-AmbDH3 (34 kDa).

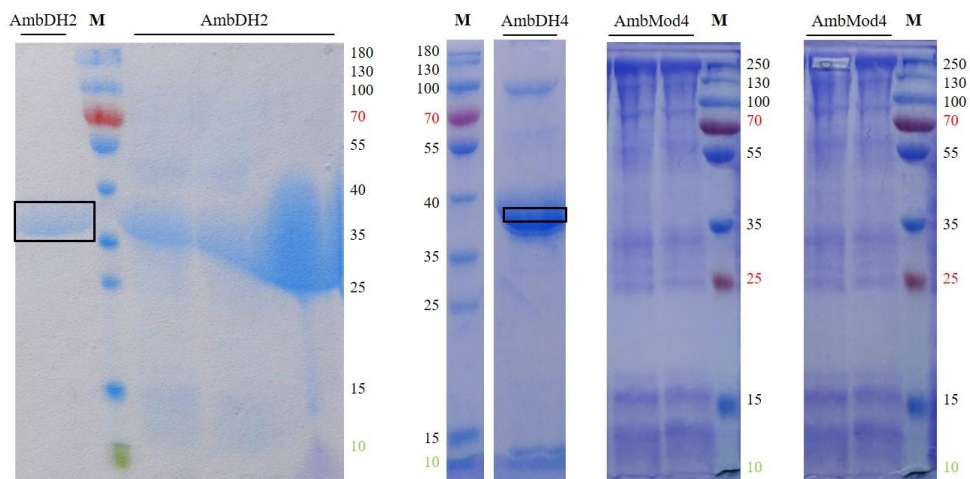
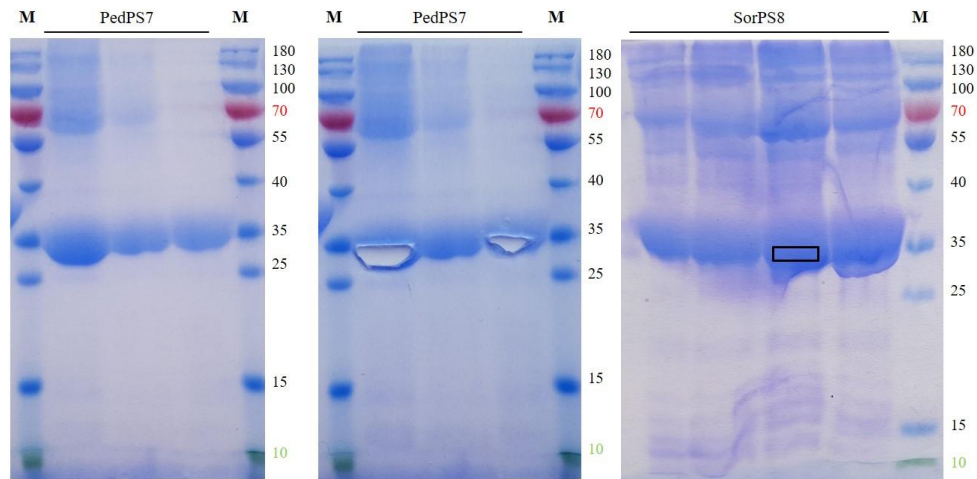
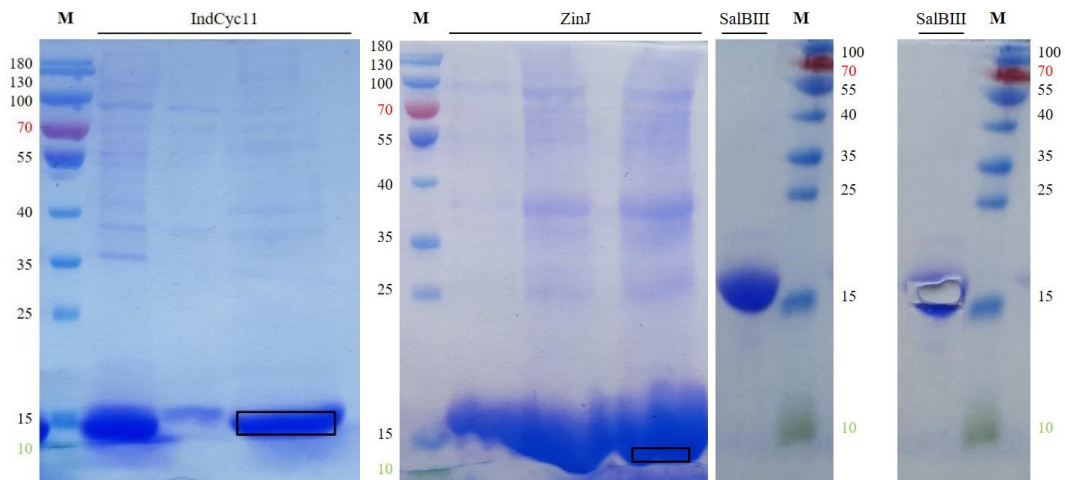


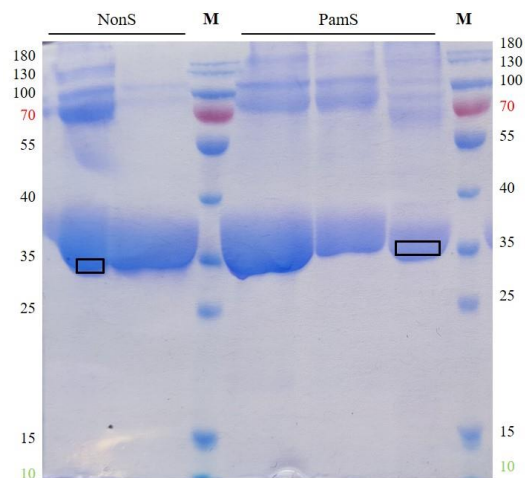
Abbildung 8-4. SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) von His<sub>6</sub>-AmbDH2 (34 kDa), His<sub>6</sub>-AmbDH4 (38 kDa) und His<sub>6</sub>-AmbMod4 (197 kDa). Der Rahmen markiert den Bereich, der für eine nachfolgende MS-MS-Analyse (Abschnitt 6.2.2.7.8) ausgeschnitten wurde.



**Abbildung 8-5.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) von His<sub>6</sub>-PedPS7 (33 kDa) und His<sub>6</sub>-SorPS8 (32 kDa). Die Rahmen markieren die Bereiche, die für eine nachfolgende MS-MS-Analyse (Abschnitt 6.2.2.7.8) ausgeschnitten wurden.



**Abbildung 8-6.** SDS-Polyacrylamid-Gele (12%) von His<sub>6</sub>-IndCyc11 (15 kDa), His<sub>6</sub>-ZinJ (16 kDa) und His<sub>6</sub>-SalBIII (16 kDa). Die Rahmen markieren die Bereiche, die für eine nachfolgende MS-MS-Analyse (Abschnitt 6.2.2.7.8) ausgeschnitten wurden.



**Abbildung 8-7.** SDS-Polyacrylamid-Gel (12%) von His<sub>6</sub>-NonS (34 kDa) und His<sub>6</sub>-PamS (30 kDa). Die Rahmen markieren die Bereiche, die für eine nachfolgende MS-MS-Analyse (Abschnitt 6.2.2.7.8) ausgeschnitten wurden.

### 8.4.2. Ergebnisse der MS-MS-Analysen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Sequenz des jeweiligen analysierten Proteins. Die grünen Balken stellen die in der MS-MS-Analyse detektierten Fragmente dar. Die roten Bereiche deuten auf Modifikationen der jeweiligen Aminosäure (z.B. Oxidationen, Methylierungen, Acetylierungen und Carbamidomethylierungen).



Abbildung 8-8. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-AmbDH3.



Abbildung 8-9. MS-MS-Analyse von His6-AmbDH2.



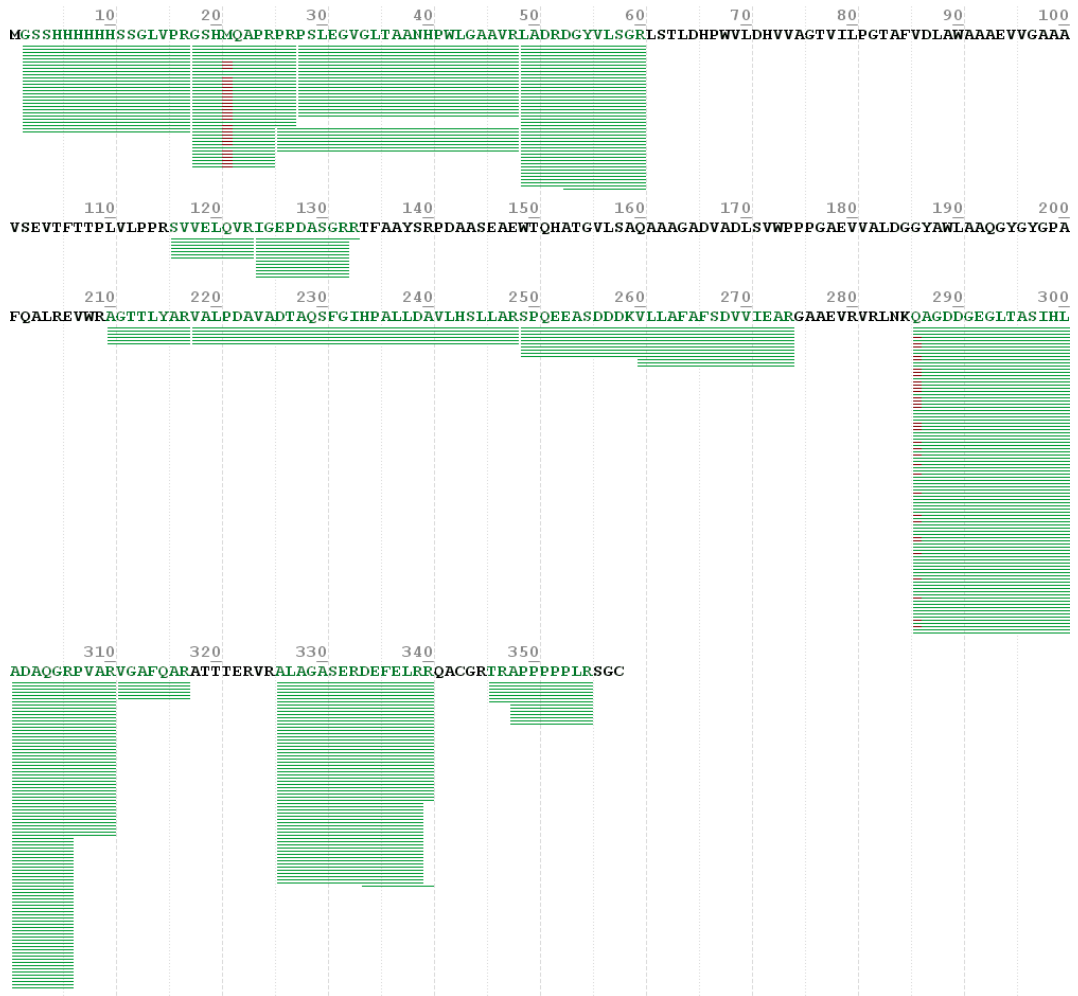


Abbildung 8-10. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-AmbDH4.

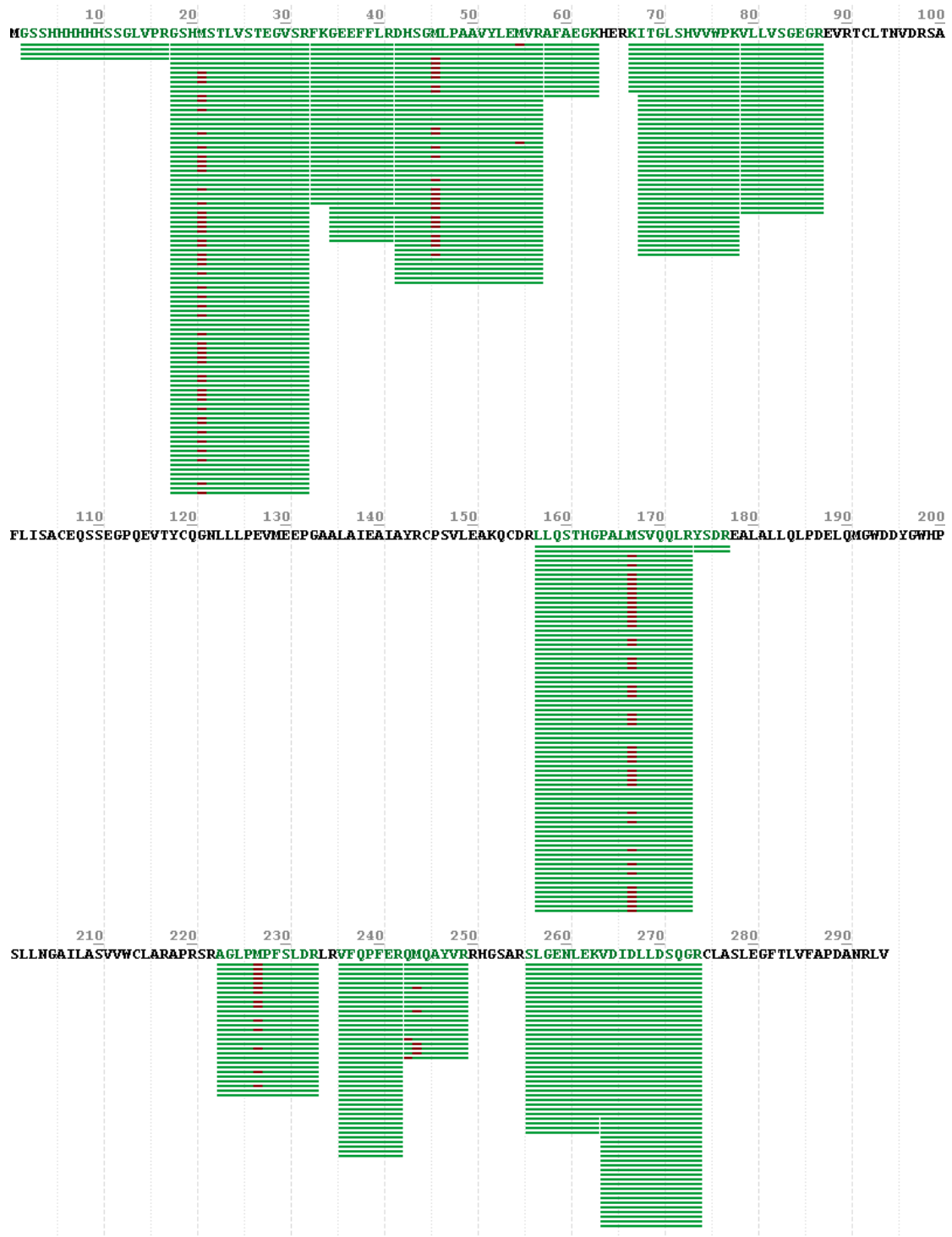


Abbildung 8-11. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-PedPS7.

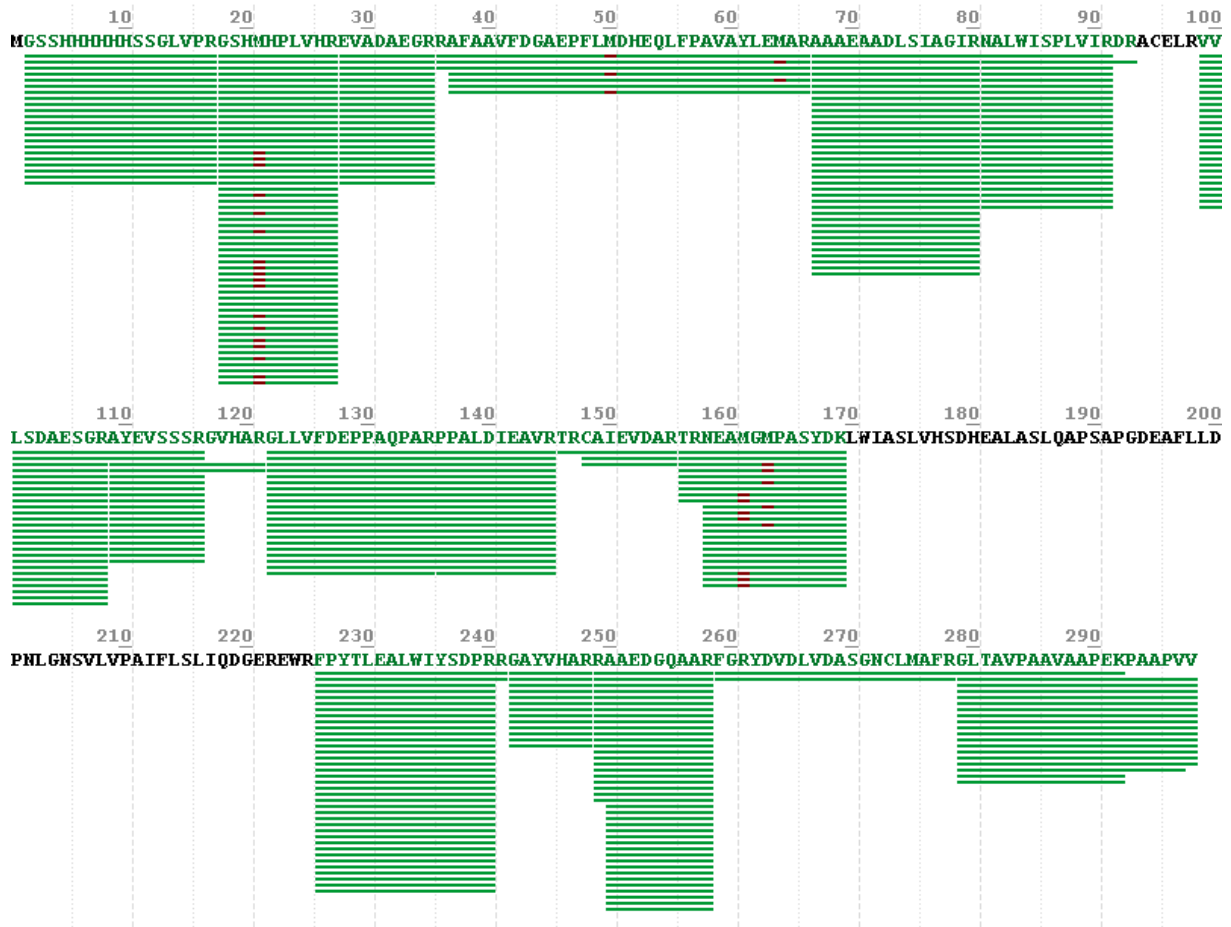


Abbildung 8-12. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-SorPS8.

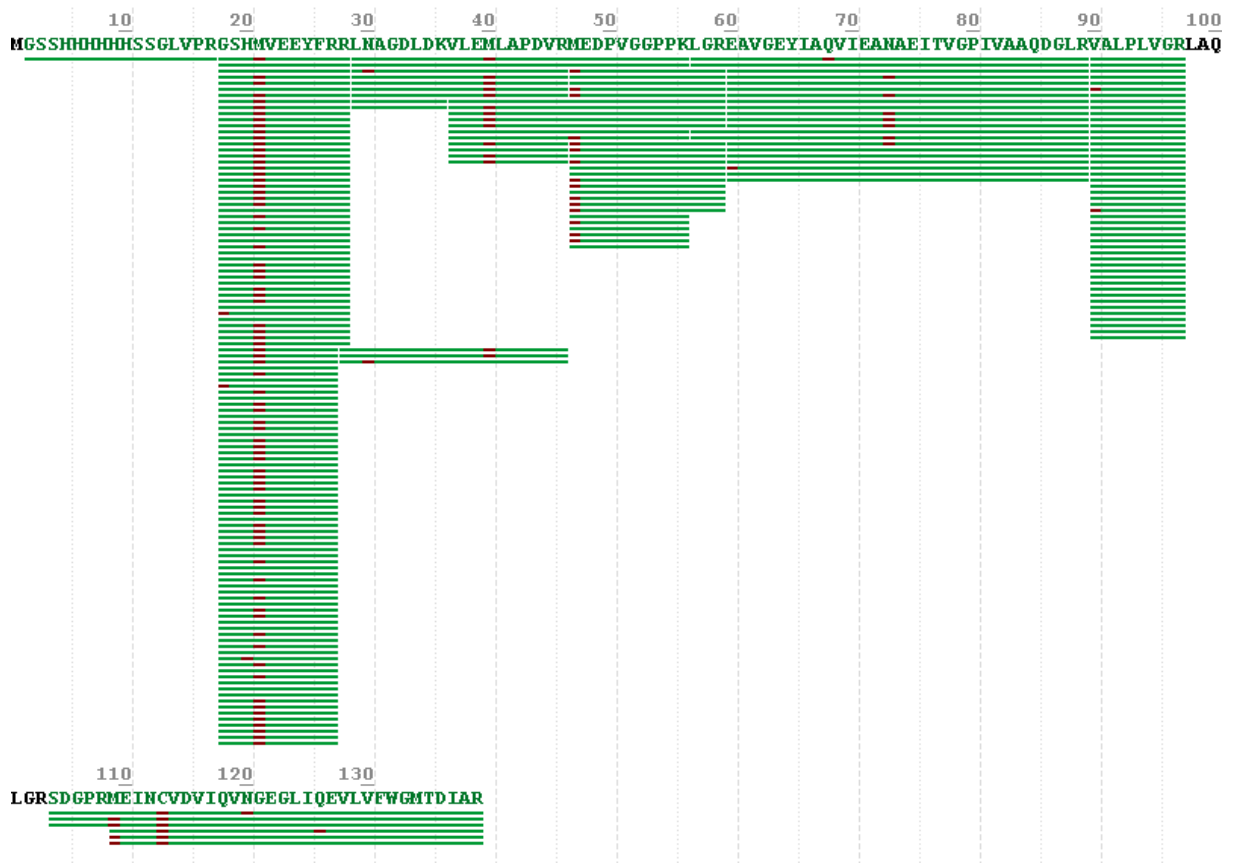


Abbildung 8-13. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-IndCyc11.

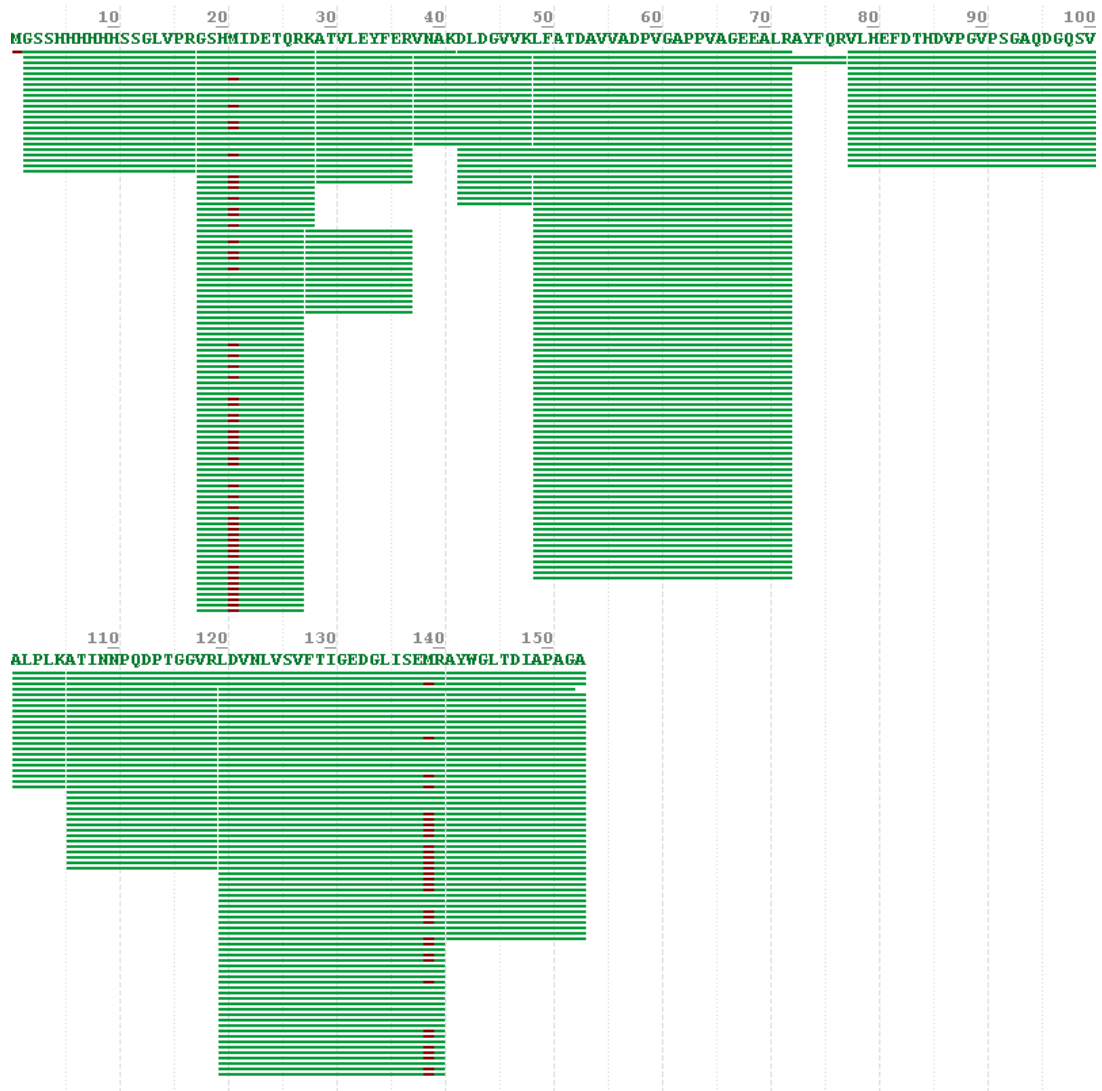


Abbildung 8-14. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-ZinJ.

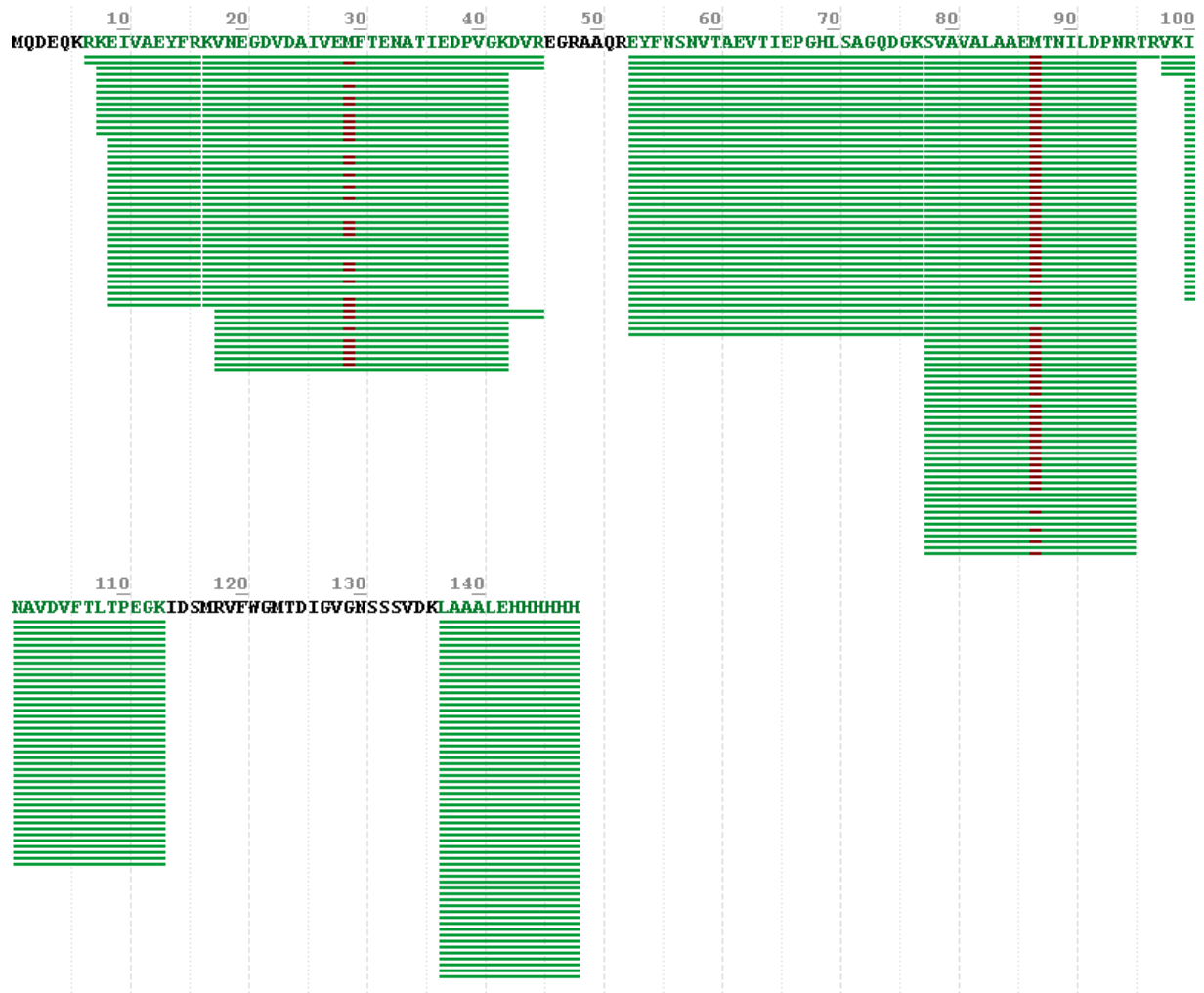


Abbildung 8-15. MS-MS-Analyse von SalBIII-His<sub>6</sub>.



Abbildung 8-16. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-NonS.

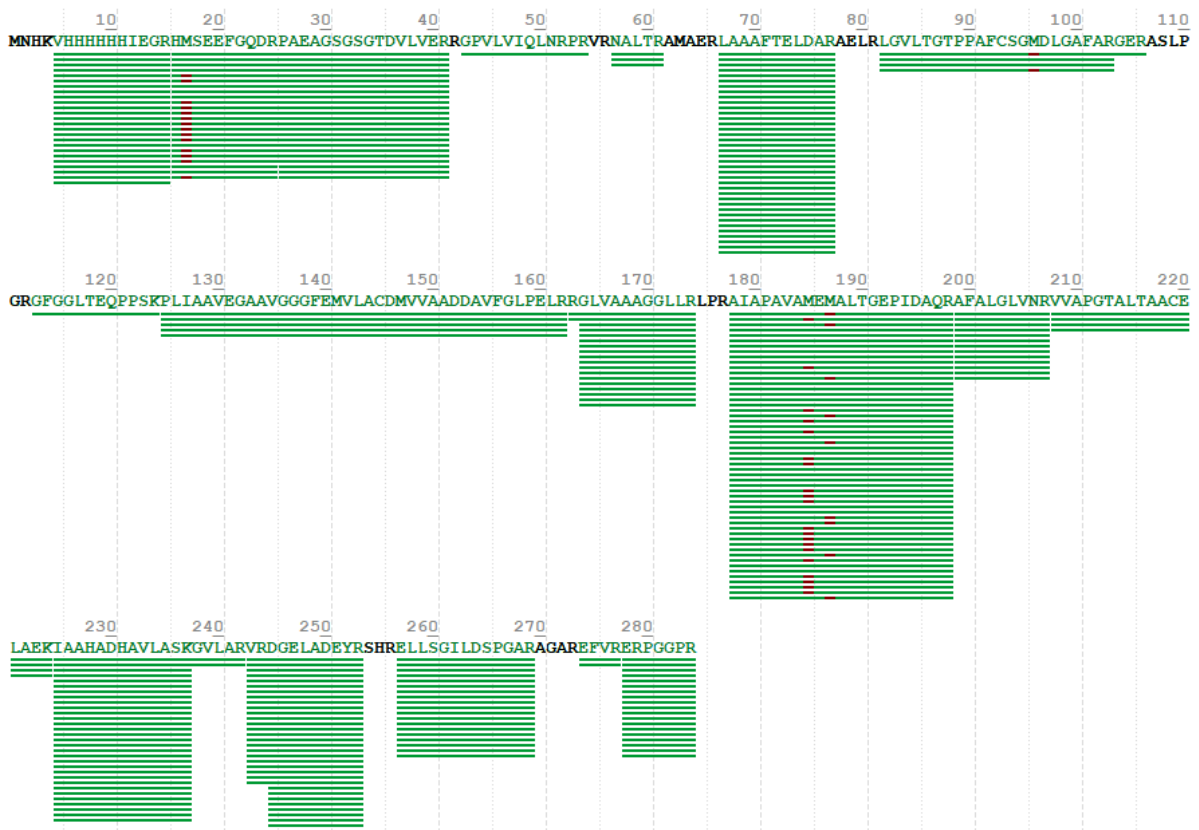


Abbildung 8-17. MS-MS-Analyse von His<sub>6</sub>-PamS.

## 8.5. Tabellen

Tabelle 8-9. Experimentell ermittelte und daraus errechnete Werte für den Anteil von löslichem AmbDH3 am Gesamtprotein und quervernetztem AmbDH3 in AmbDH3-CLEA.

	Probe	Absorption bei 595 nm	c [mg/mL]	Protein pro g Zellpellet [mg]	Bezogen auf Reaktion mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat 163		
					m [mg]	m [µg]	n [nmol]
Löslich	Lysat	1.810	7.56	77.57	0.310	310.28	9.02
	Eluat	1.341	5.60	57.47	0.230	229.87	6.68
CLEA	Lysat	2.048	8.56	86.04	0.344	344.17	10.01
	ÜS nach Crosslinking	0.807	3.37	42.83	0.171	171.32	4.98
	Wasch 1	0.066	0.28	3.46	0.014	13.83	0.40
	Wasch 2	0.025	0.10	1.29	0.005	5.16	0.15
	Wasch 3	0.011	0.05	0.56	0.002	2.26	0.07

Tabelle 8-10. Umsatzwerte von AmbDH3-Lysat und AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 bei verschiedenen Anteilen an Cosolvenz.

	Probe	Cosolvenz	Volumenprozent Cosolvenz [v%]							
			0	2	5	10	25	50	75	100
Umsatz [%]	Lysat	MeOH	87	81	83	51	3	0	0	-
	CLEA		89	80	63	36	2	0	0	0
	Lysat	iPrOH	87	67	33	0	0	0	0	-
	CLEA		89	70	42	13	0	0	0	0
	Lysat	EtOAc	87	83	43	0	0	0	0	-
	CLEA		89	79	28	5	2	0	0	0
	Lysat	THF	87	89	63	0	0	0	0	-
	CLEA		89	72	30	1	0	0	0	0
	Lysat	DCM	87	88	64	0	0	0	0	-
	CLEA		89	90	68	42	1	0	0	0
	Lysat	PhMe	87	85	85	85	88	75	55	-
	CLEA		89	82	77	63	50	43	27	22

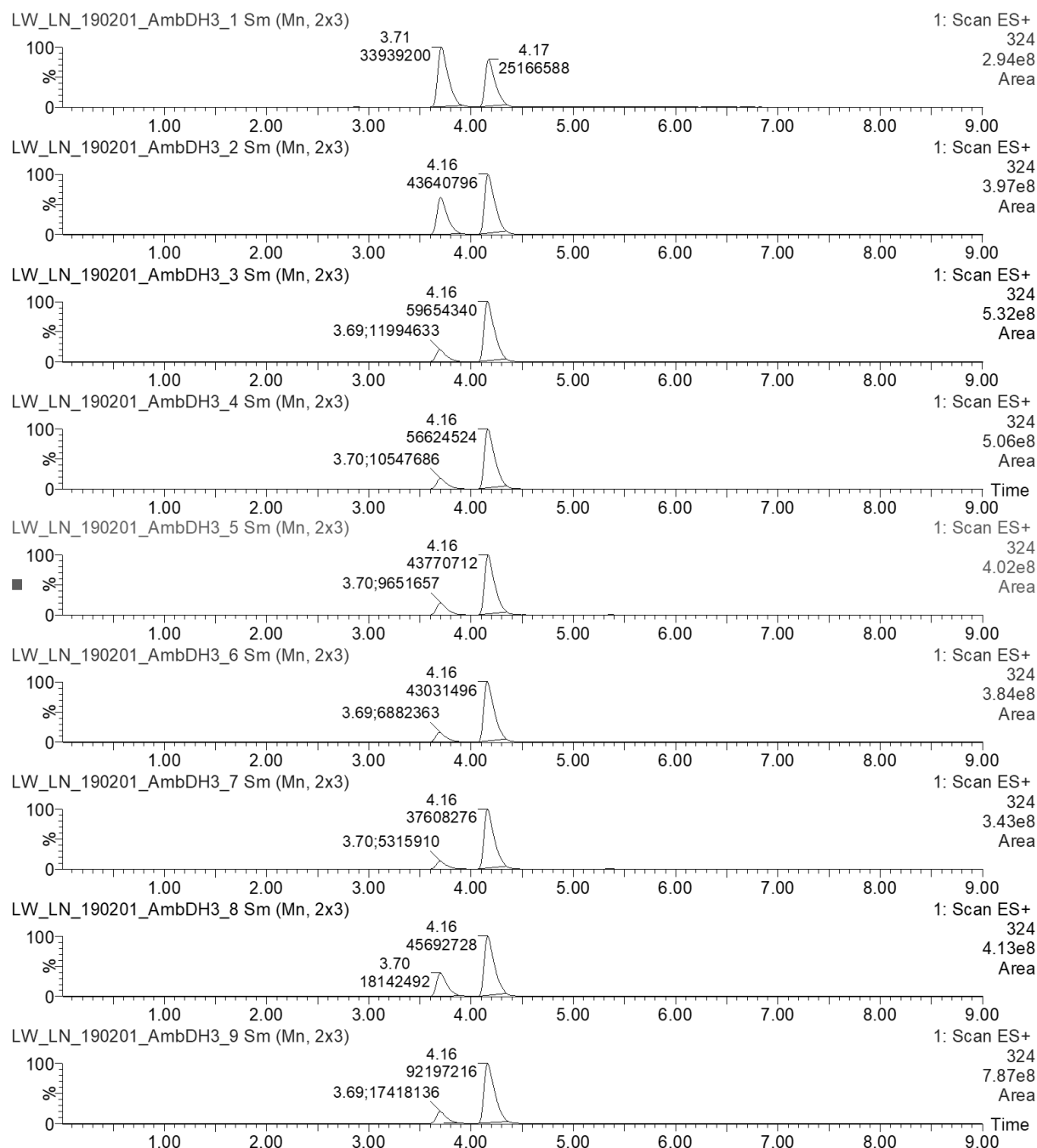
Gezeigt ist jeweils der prozentuale Umsatz von AmbDH3-Lysat und AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** zu zyklisiertem Produkt *cis-164*.



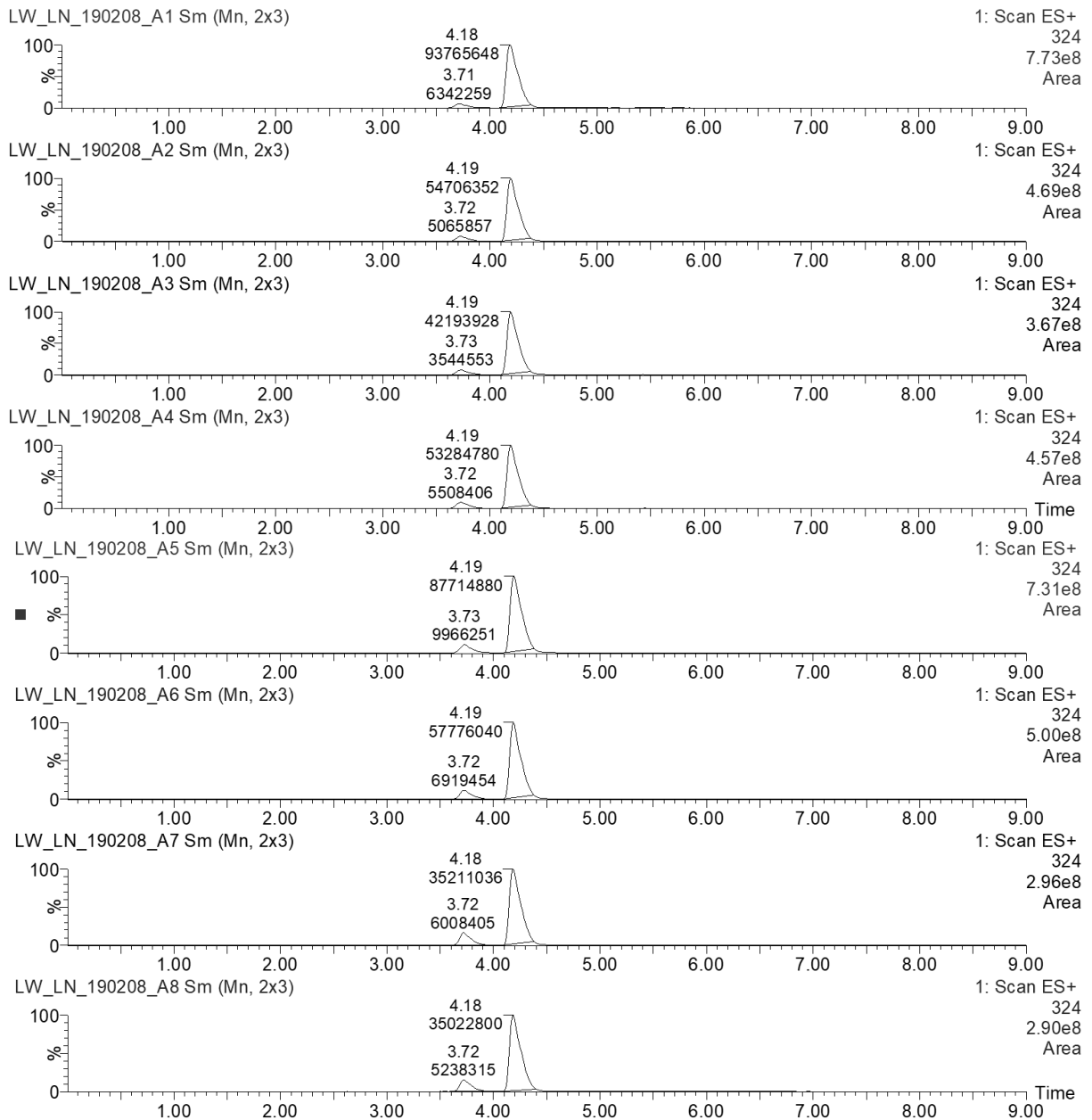
## 8.6. UPLC-MS-Chromatogramme

### 8.6.1. Enzymaktivitätstests mit AmbDH3

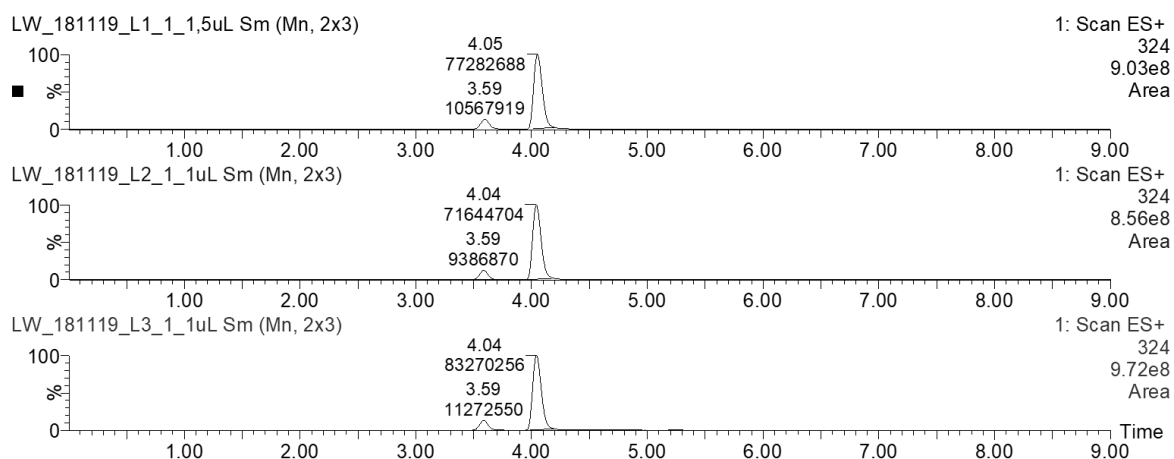
Die folgenden Abbildungen enthalten die Rohdaten zu den Experimenten aus Abschnitt 3.3.



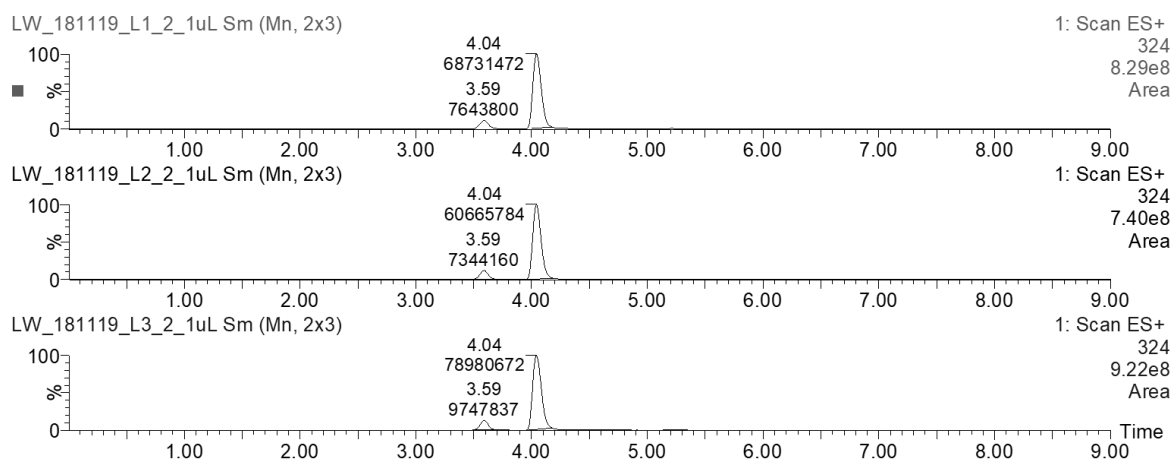
**Abbildung 8-18. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 bei verschiedenen Substratkonzentrationen.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration von oben nach unten) 0.5; 1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0 mM) und AmbDH3-Lysat bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Dabei wurden nur jeweils 20 µL AmbDH3-Lysat statt den standardmäßig verwendeten 40 µL eingesetzt (siehe Abschnitt 6.2.2.10.2).  $t_R$  (**163**) = 3.69–3.71 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.16 min.



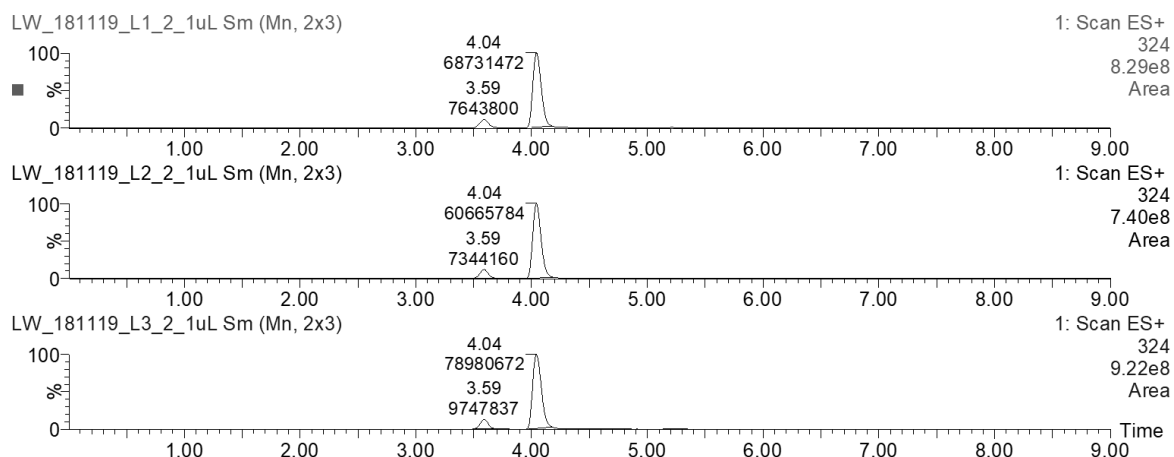
**Abbildung 8-19. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3 mit Substrat 163 bei verschiedenen Substratkonzentrationen.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration (von oben nach unten) 0.5; 1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0 mM) und 214  $\mu$ g His<sub>6</sub>-AmbDH3 (entspricht 20  $\mu$ L einer 10.7 mg/mL AmbDH3-Lösung) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.71–3.73 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.18–4.19 min.



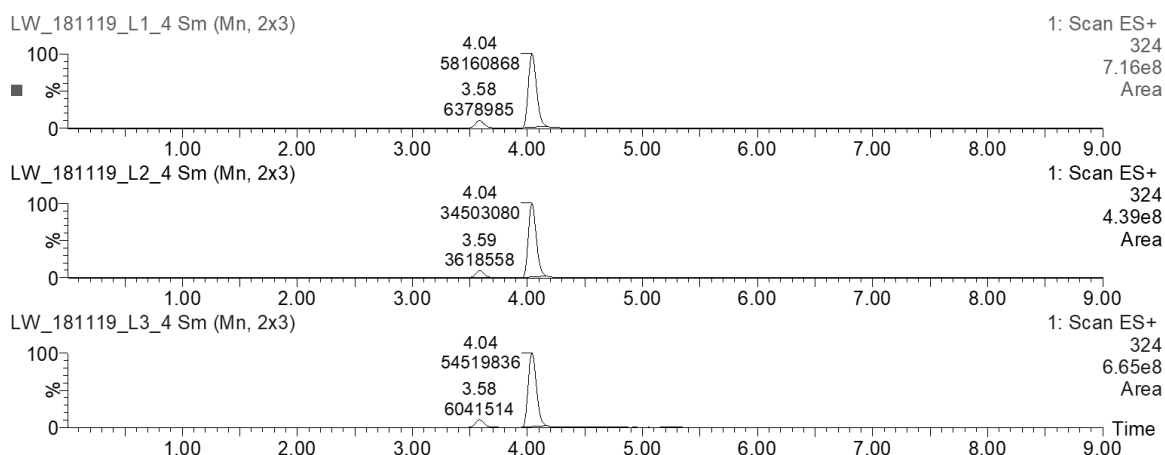
**Abbildung 8-20. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach einmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04–4.05 min.



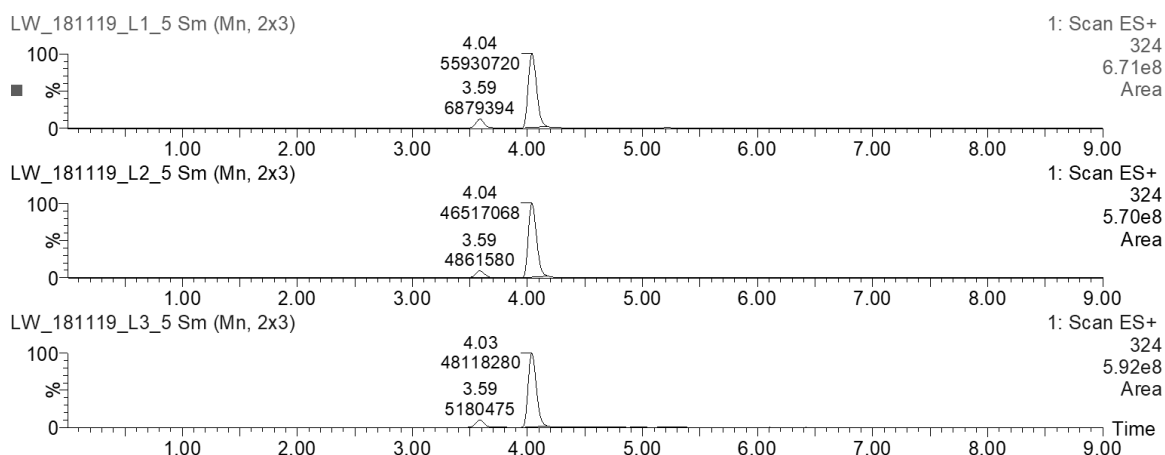
**Abbildung 8-21. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach zweimaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst einmal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04 min.



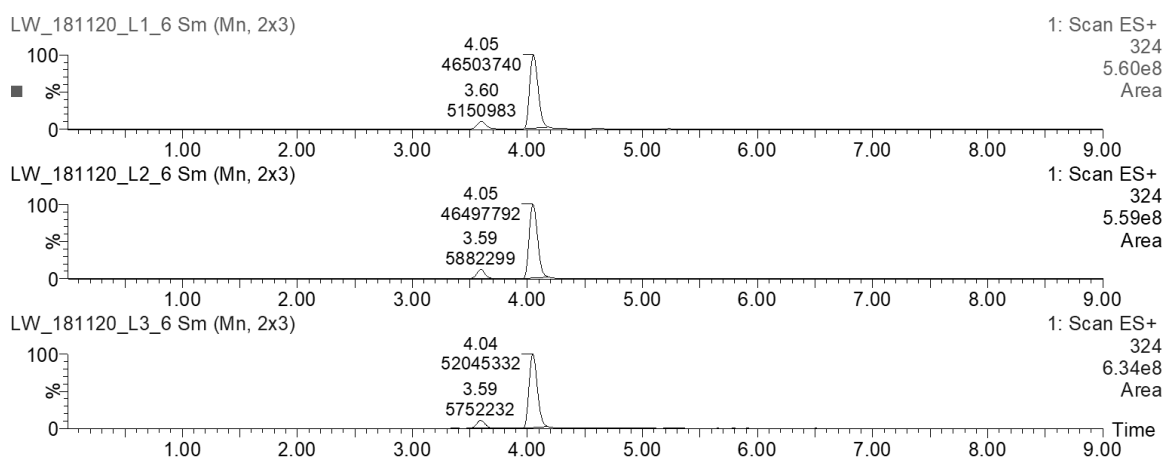
**Abbildung 8-22. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach dreimaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst zweimal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04 min.



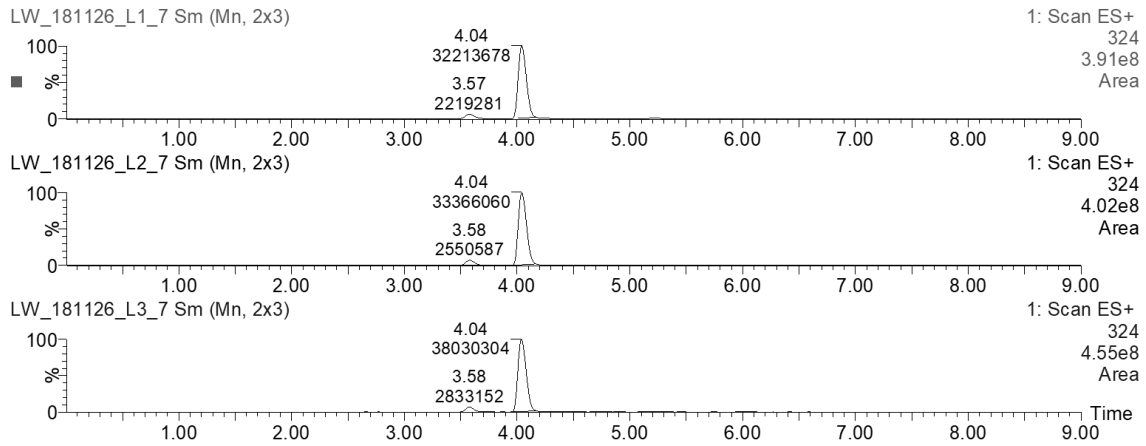
**Abbildung 8-23. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach viermaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst dreimal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.58–3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04 min.



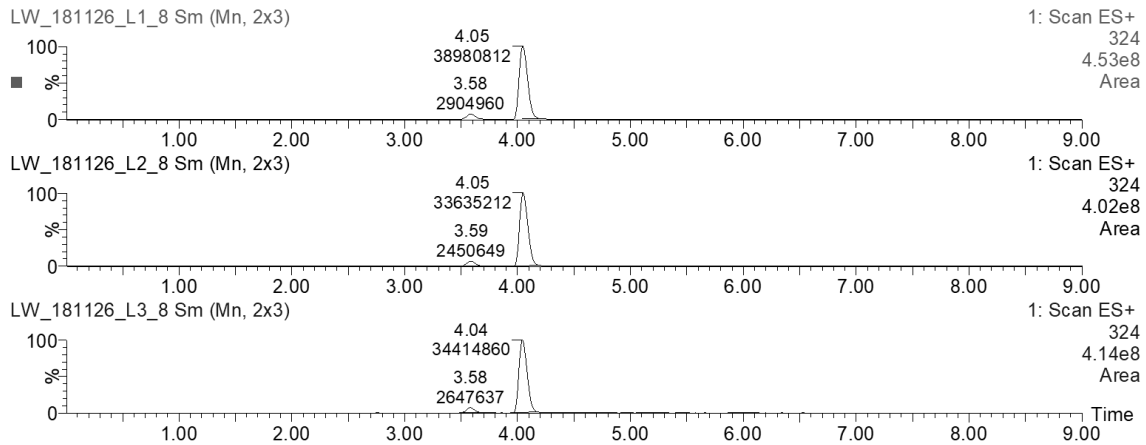
**Abbildung 8-24. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach fünfmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst viermal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.03–4.04 min.



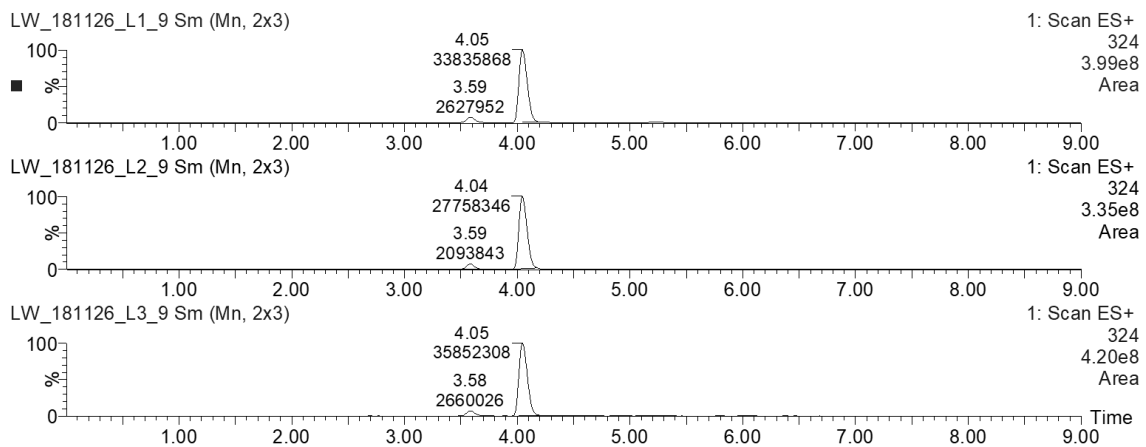
**Abbildung 8-25. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach sechsmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst fünfmal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.59–3.60 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04–4.05 min.



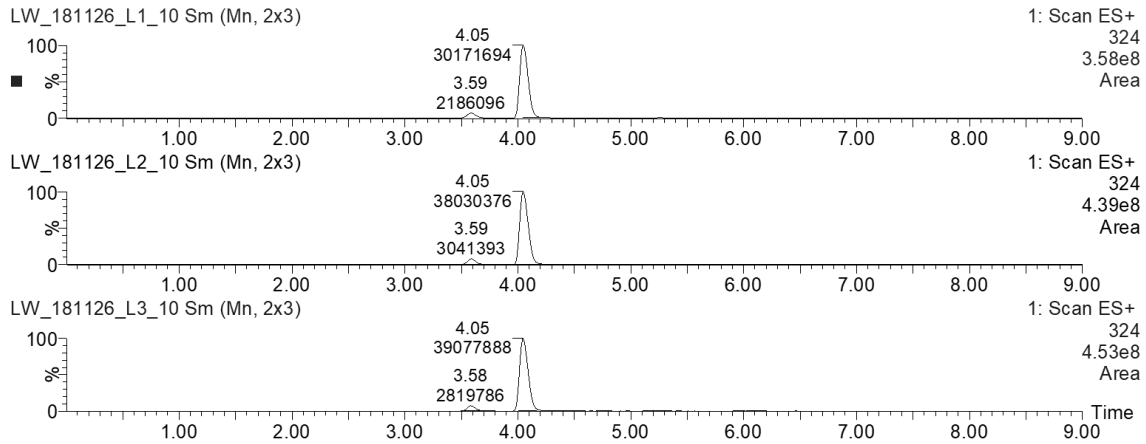
**Abbildung 8-26. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach siebenmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst sechsmal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.57–3.58 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04 min.



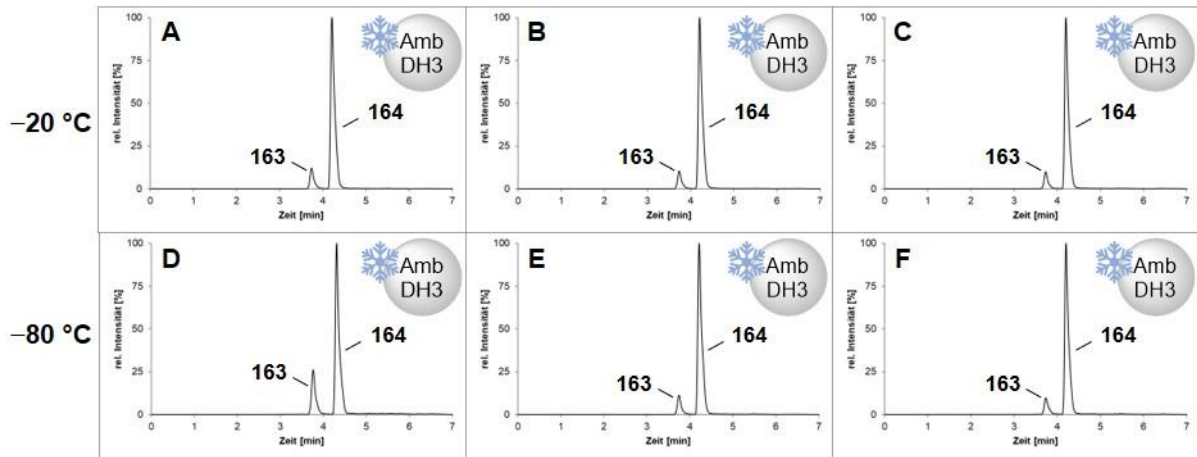
**Abbildung 8-27. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach achtmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst siebenmal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.58–3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04–4.05 min.



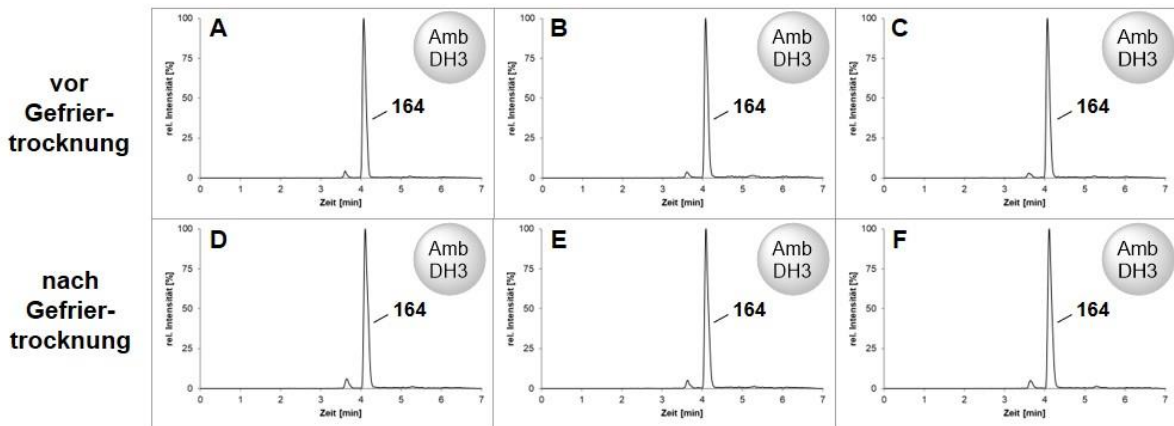
**Abbildung 8-28. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach neunmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst achtmal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.58–3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.04–4.05 min.



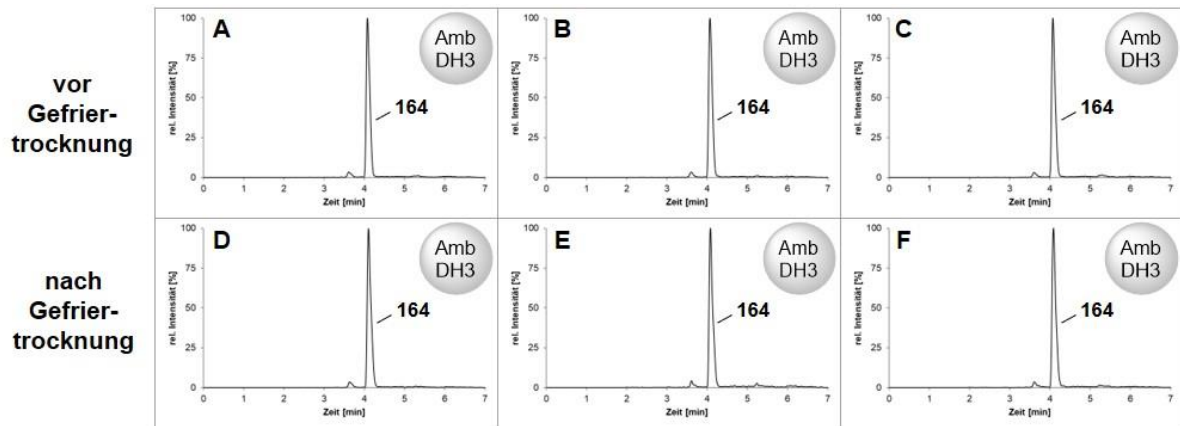
**Abbildung 8-29. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach zehnmaliger Inkubation.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Dabei wurde das Lysat zuerst neunmal ohne Substrat inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysate bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.58–3.59 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.05 min.



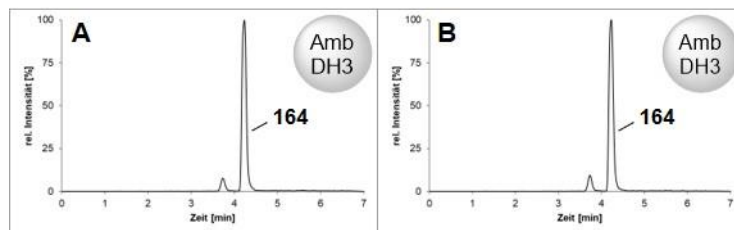
**Abbildung 8-30. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3 mit Substrat 163 vor und nach Einfrieren bei –20 bzw. –80 °C.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (A–C) bzw. HEPES-Glycerin-Puffer (D–F) (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



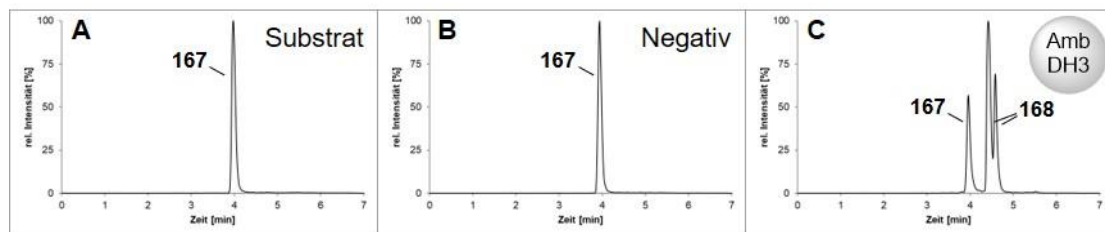
**Abbildung 8-31. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat vor und nach Gefrier-trocknung mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



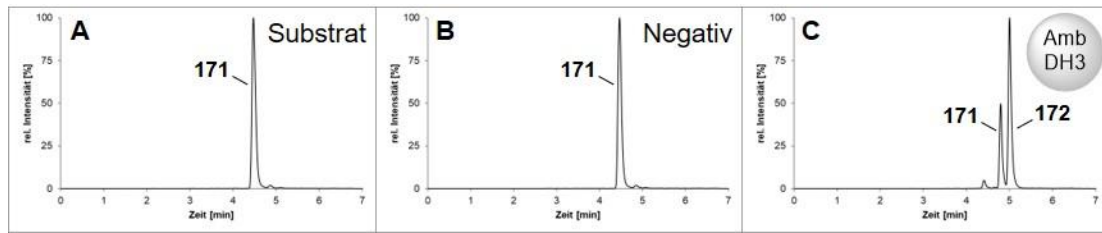
**Abbildung 8-32. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3 vor und nach Gefrier-trocknung mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



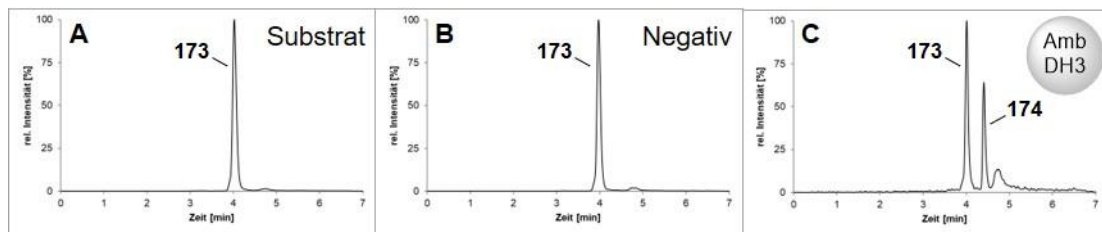
**Abbildung 8-33. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lyst (A) bzw. AmbDH3 (B) nach Lagerung in gefriergetrockneter Form für 90 d mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat (A) bzw. 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 (B) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



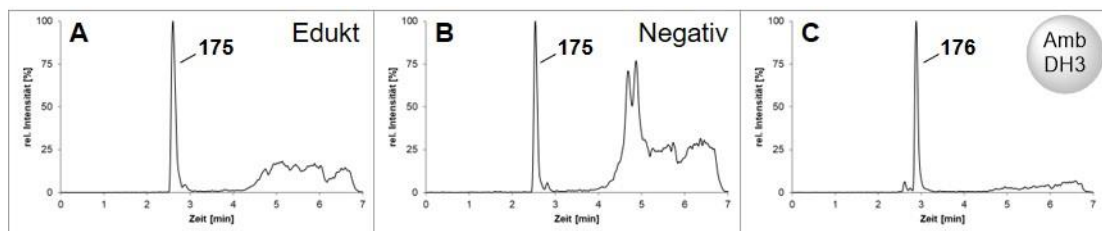
**Abbildung 8-34. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 167:** A) Substrat **167**; B) Negativkontrolle von Substrat **167**; C) Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat **167**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **167** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



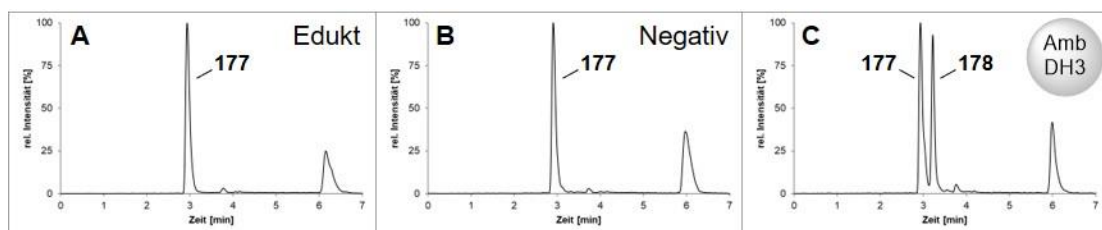
**Abbildung 8-35. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 171:** A) Substrat 171; B) Negativkontrolle von Substrat 171; C) Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 171. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat 171 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-36. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 173:** A) Substrat 173; B) Negativkontrolle von Substrat 173; C) Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 173. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 372$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (287 nmol) Substrat 173 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

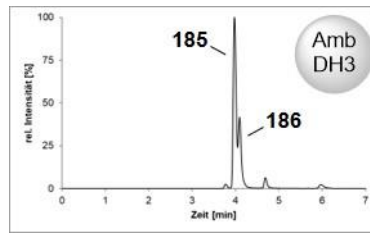


**Abbildung 8-37. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 175:** A) Substrat 175; B) Negativkontrolle von Substrat 175; C) Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 175. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 268$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (408 nmol) Substrat 175 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-38. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 177:** A) Substrat 177; B) Negativkontrolle von Substrat 177; C) Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 177. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 282$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (386 nmol) Substrat 177 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

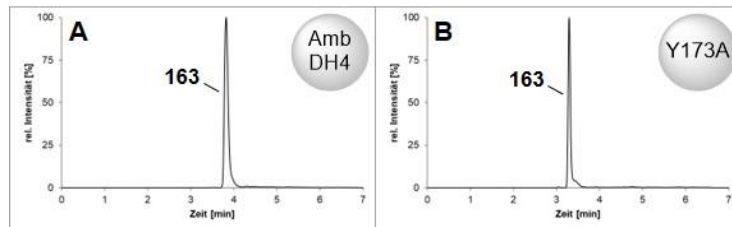




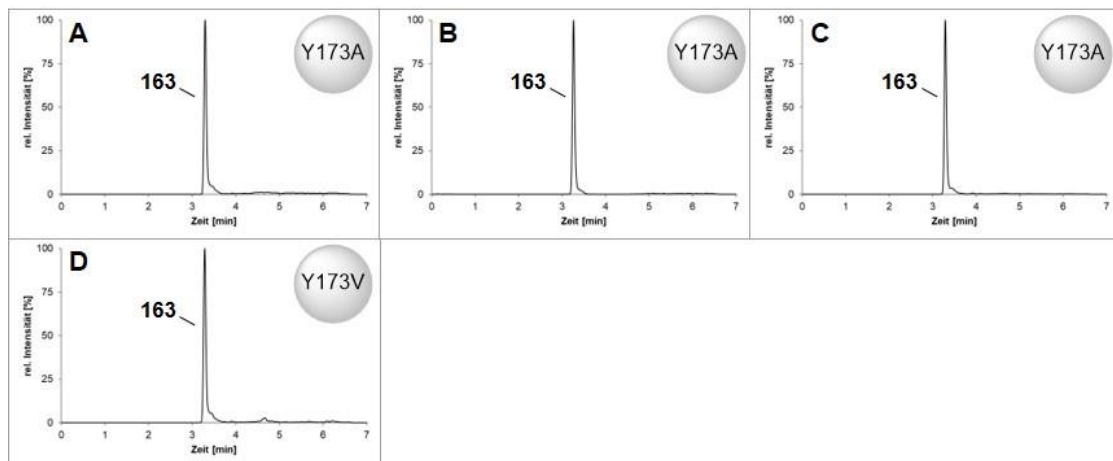
**Abbildung 8-39. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von AmbDH3 mit Substrat 185.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 306$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (253 nmol) Substrat **185** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-AmbDH3 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

### 8.6.2. Enzymaktivitätstests mit AmbDH4

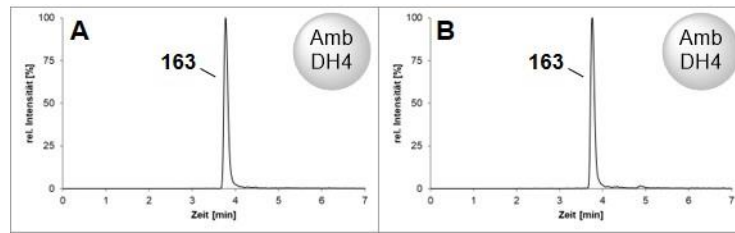
Die UPLC-MS-Chromatogramme der Substrate und Negativkontrollen sind in Abschnitt 3.3.8 oder 8.6.1 dargestellt und werden im folgenden Kapitel nicht noch einmal aufgeführt.



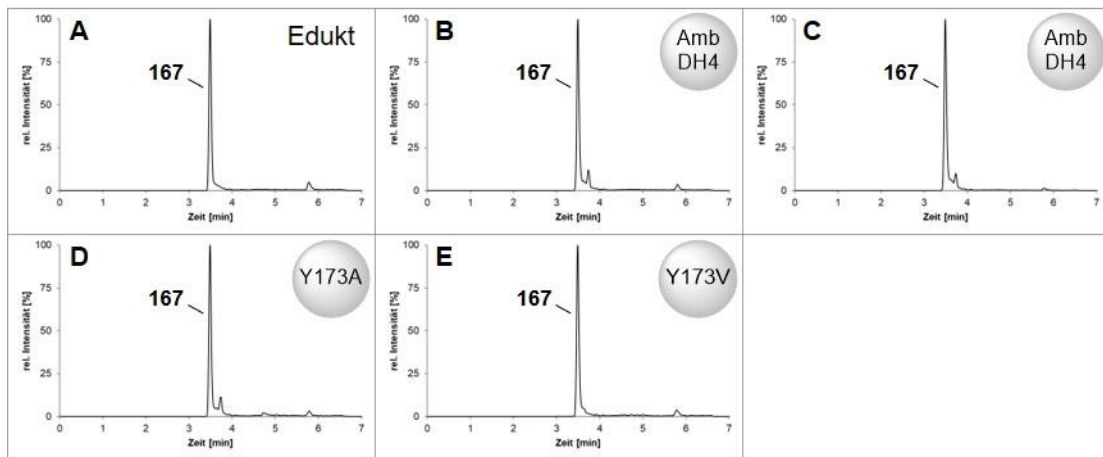
**Abbildung 8-40. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Lysat aus *E. coli* BL21 pET28a(+)\_ambDH4 (A) bzw. pET28a(+)\_ambDH4\_Y173V (B) mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



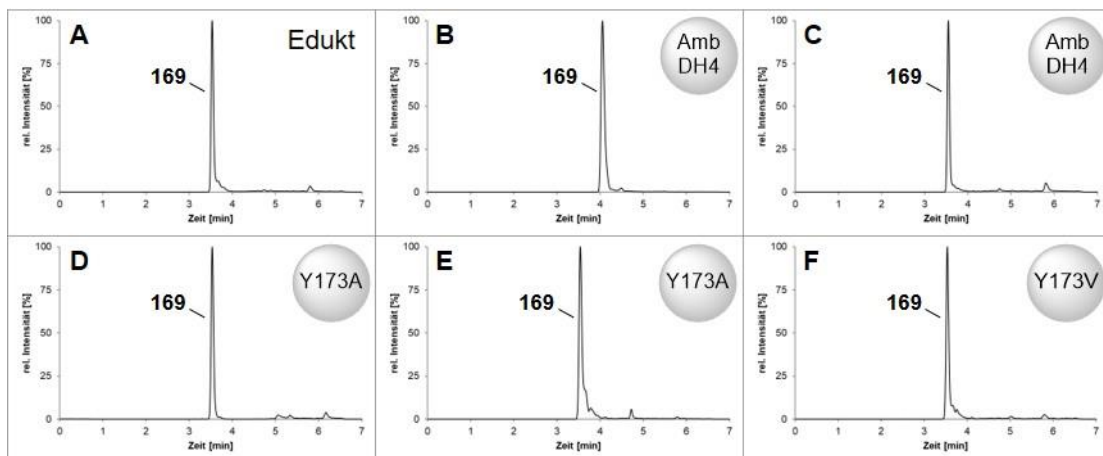
**Abbildung 8-41. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 163:** **A)** AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 0.7 mg/mL); **B)** AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.1 mg/mL); **C)** AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.9 mg/mL); **D)** AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



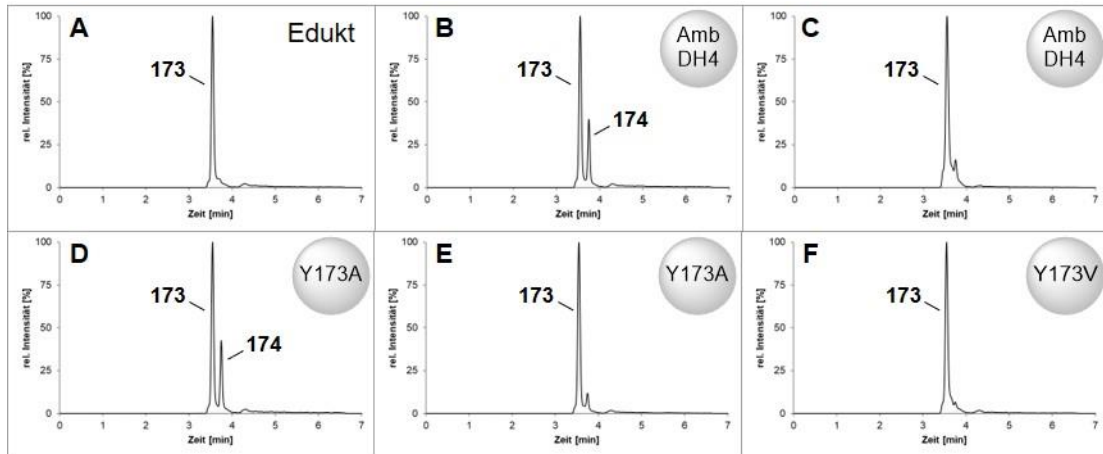
**Abbildung 8-42. UPLC-MS-Chromatogramme der *in vivo*-Reaktion von *E. coli* BL21 pET28a(+)*\_ambDH4* mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$  nach Extraktion des Überstandes (A) und nach Zellaufschluss des Zellpellets mit Lysozym (B). Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat 163 in HEPES-Puffer mit 0.1v% Kanamycin (Startkonzentration 2 mM) und 0.2 g Zellen/mL bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



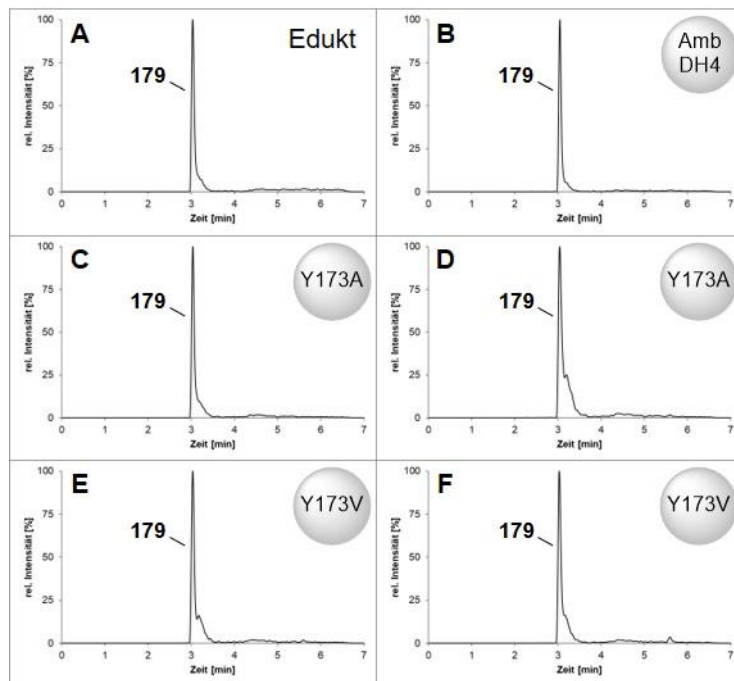
**Abbildung 8-43. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 167:** A) Substrat 167; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 3.5 mg/mL); C) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* Tuner; 1.9 mg/mL); D) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 0.9 mg/mL); E) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 2.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat 167 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



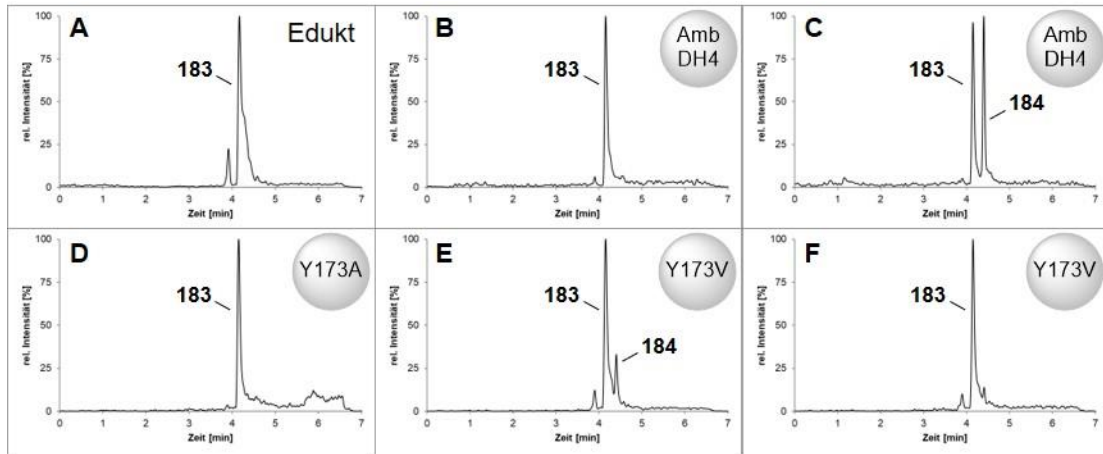
**Abbildung 8-44. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 169:** A) Substrat 169; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 3.5 mg/mL). C) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 4.6 mg/mL); D) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.4 mg/mL); E) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* Tuner; 0.7 mg/mL); F) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 2.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat 169 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Der Unterschied in der Retentionszeit zwischen B) und C-F) beruht einzig auf unterschiedlichen Messzeitpunkten.



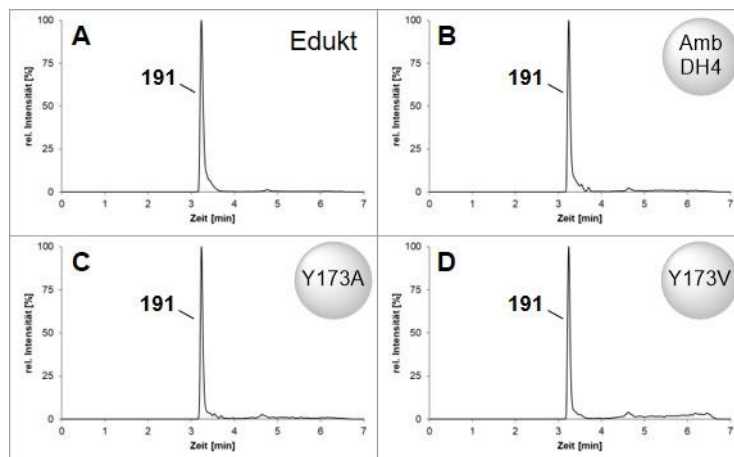
**Abbildung 8-45. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 173:** A) Substrat 173; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 3.5 mg/mL); C) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* Tuner; 1.9 mg/mL); D) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 0.9 mg/mL); E) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* Tuner; 0.7 mg/mL); F) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 372$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (287 nmol) Substrat 173 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



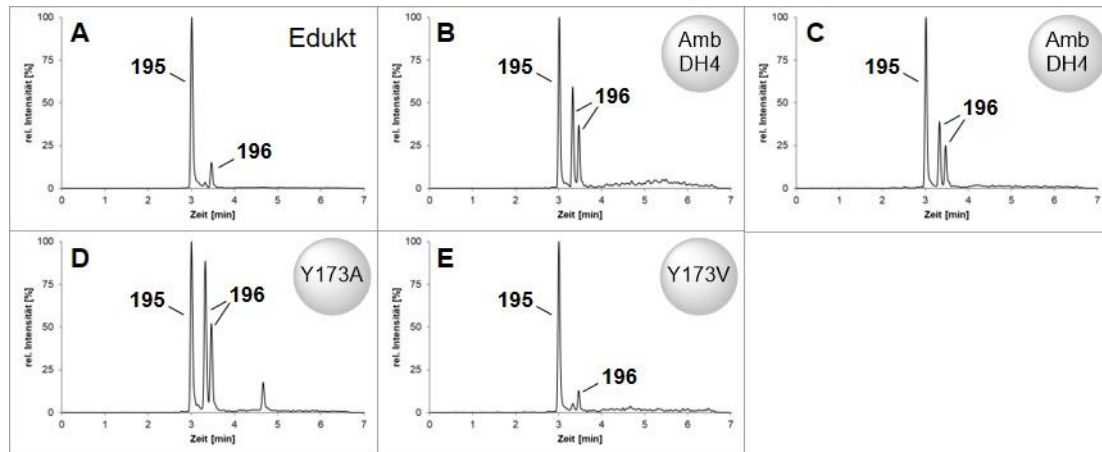
**Abbildung 8-46. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 179:** A) Substrat 179; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 4.6 mg/mL); C) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.4 mg/mL); D) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* Tuner; 0.7 mg/mL); E) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.0 mg/mL); F) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 2.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat 179 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-47. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 183:** A) Substrat 183; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 4.6 mg/mL); C) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* Tuner; 1.9 mg/mL); D) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.4 mg/mL); E) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.0 mg/mL); F) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 2.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 315$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (342 nmol) Substrat 183 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



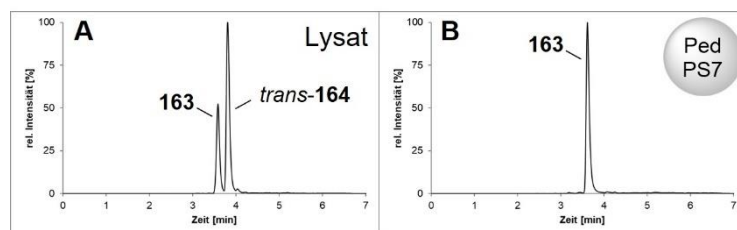
**Abbildung 8-48. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 bzw. dessen Mutanten mit Substrat 191:** A) Substrat 191; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 3.5 mg/mL); C) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 0.9 mg/mL); D) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 2.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 388$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (274 nmol) Substrat 191 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



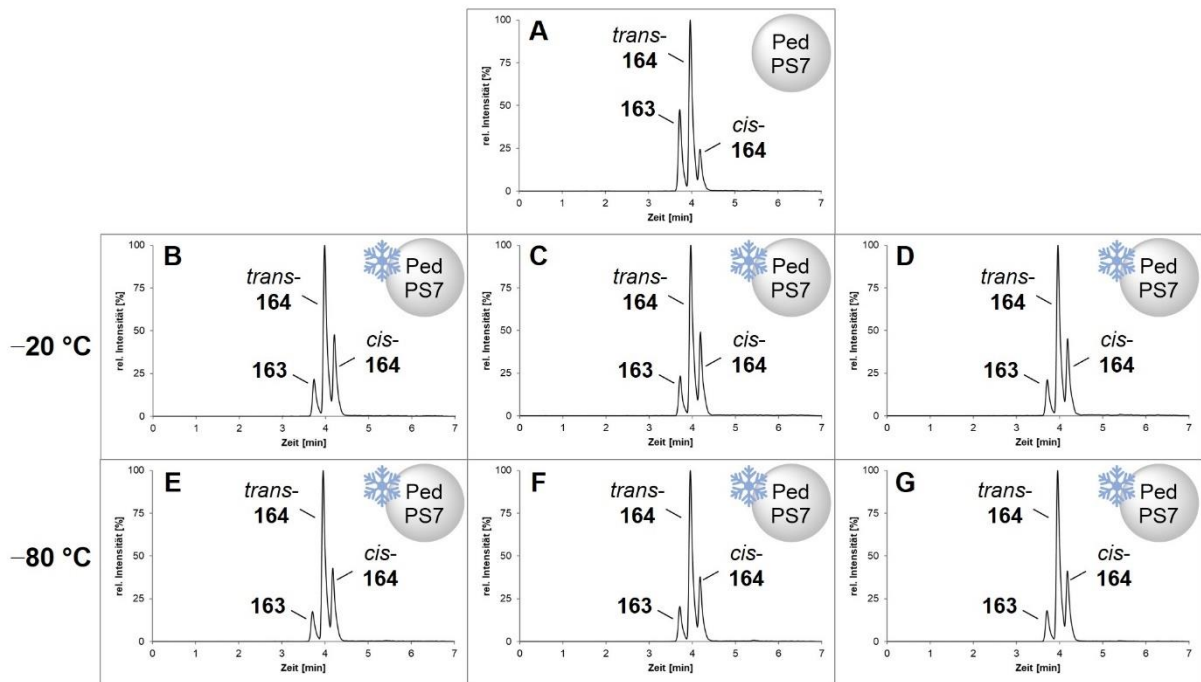
**Abbildung 8-49. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH4 und dessen Mutanten mit Substrat 195:** A) Substrat **195** mit Spuren von Produkt **196**; B) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* BL21; 1.4 mg/mL); C) AmbDH4 (isoliert aus *E. coli* Tuner; 0.7 mg/mL); D) AmbDH4 Y173A (isoliert aus *E. coli* BL21; 0.9 mg/mL); E) AmbDH4 Y173V (isoliert aus *E. coli* BL21; 2.0 mg/mL). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 374$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (285 nmol) Substrat **195** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

### 8.6.3. Enzymaktivitätstests mit PedPS7 und SorPS8

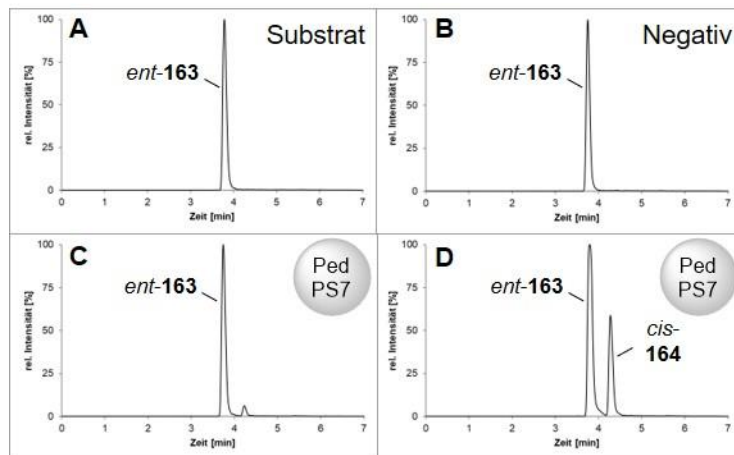
#### 8.6.3.1. Enzymaktivitätstests mit PedPS7



**Abbildung 8-50. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von PedPS7-Lysat (A) und lyophilisiertem PedPS7 (B) mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-Lysat (A) oder 5.8 mg/mL lyophilisiertem His<sub>6</sub>-PedPS7 (B) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

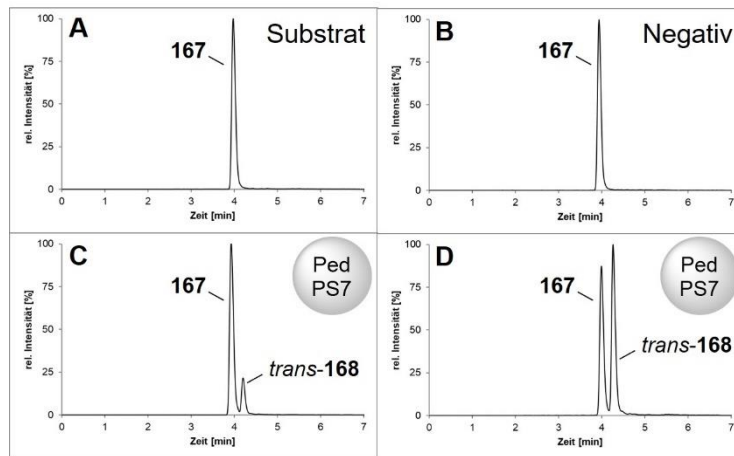


**Abbildung 8-51. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163:** **A)** vor Einfrieren des Enzyms; **B–D)** nach Lagerung des Enzyms über Nacht bei  $-20\text{ °C}$ ; **E–G)** nach Lagerung des Enzyms über Nacht bei  $-80\text{ °C}$ . Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit  $0.1\text{ mg}$  ( $332\text{ nmol}$ ) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration  $2\text{ mM}$ ) und  $5.0\text{ mg/mL}$  His<sub>6</sub>-PedPS7 bei  $30\text{ °C}$  und  $300\text{ UpM}$  für  $16\text{ h}$  durchgeführt.

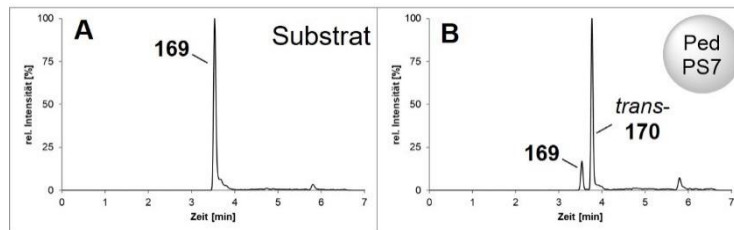


**Abbildung 8-52. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat ent-163:** **A)** Substrat *ent-163*; **B)** Negativkontrolle von Substrat *ent-163*; **C+D)** Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (**C**) bzw. gereinigtem Enzym (**D**) mit Substrat *ent-163*. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit  $0.1\text{ mg}$  ( $332\text{ nmol}$ ) Substrat *ent-163* in HEPES-Puffer (Startkonzentration  $2\text{ mM}$  (**B**) bzw.  $4\text{ mM}$  (**C+D**)) und Lysat (**C**) oder  $10.0\text{ mg/mL}$  His<sub>6</sub>-PedPS7 (**D**) bei  $30\text{ °C}$  und  $300\text{ UpM}$  für  $16\text{ h}$  durchgeführt.

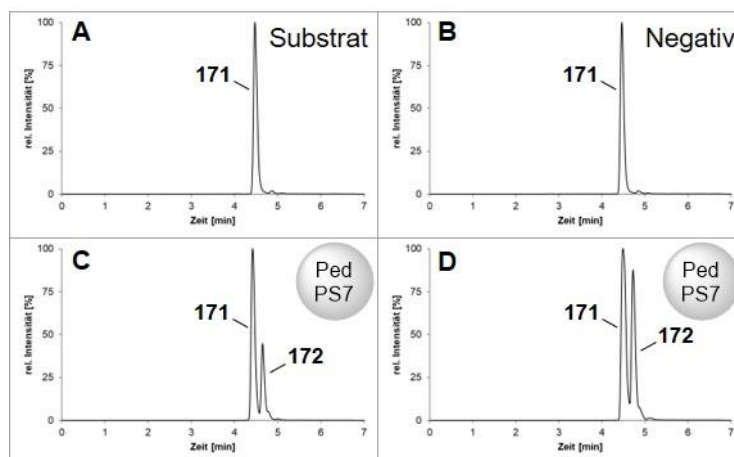




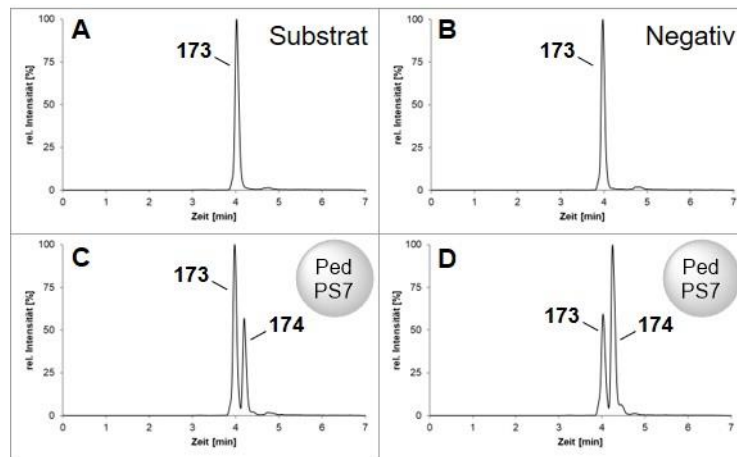
**Abbildung 8-53. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 167:** A) Substrat **167**; B) Negativkontrolle von Substrat **167**; C+D) Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (C) bzw. gereinigtem Enzym (D) mit Substrat **167**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **167** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (B) und 4 mM (C+D) und Lysat (C) oder 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 (D) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



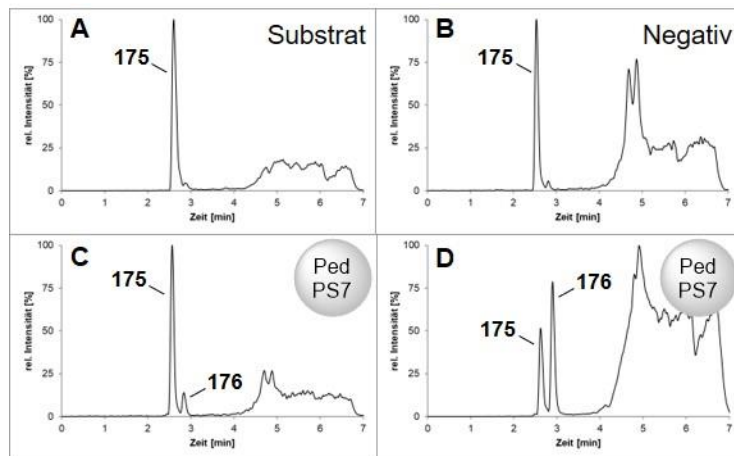
**Abbildung 8-54. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 169:** A) Substrat **169**; B) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **169**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **169** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.7 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-55. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 171:** A) Substrat **171**; B) Negativkontrolle von Substrat **171**; C+D) Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (C) bzw. gereinigtem Enzym (D) mit Substrat **171**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (B) und 4 mM (C+D) und Lysat (C) oder 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 (D) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

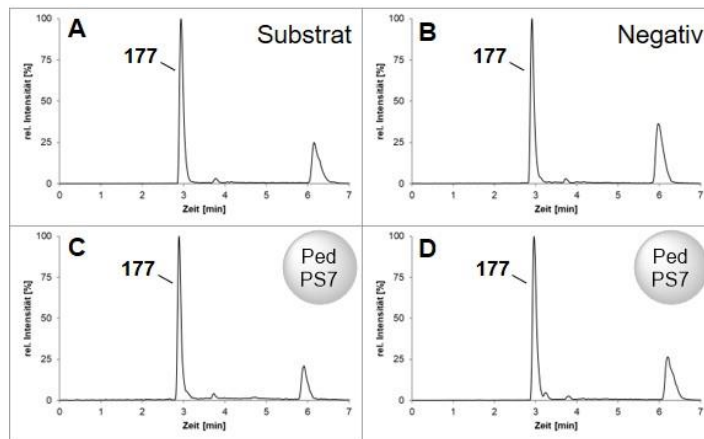


**Abbildung 8-56. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 173:** **A)** Substrat **173**; **B)** Negativkontrolle von Substrat **173**; **C+D)** Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (**C**) bzw. gereinigtem Enzym (**D**) mit Substrat **173**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 372$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (287 nmol) Substrat **173** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (**B**) und 4 mM (**C+D**) und Lysat (**C**) oder 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 (**D**) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

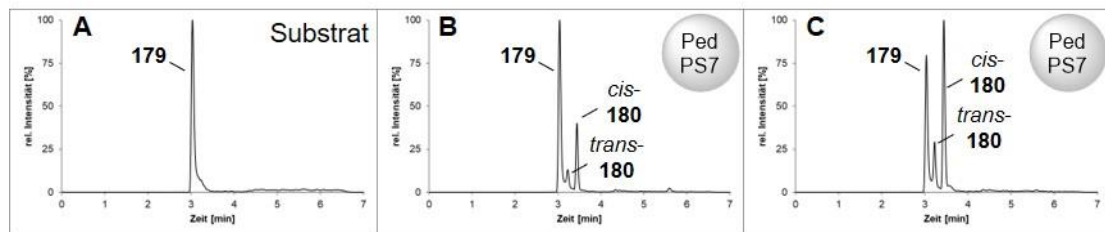


**Abbildung 8-57. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 175:** **A)** Substrat **175**; **B)** Negativkontrolle von Substrat **175**; **C+D)** Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (**C**) bzw. gereinigtem Enzym (**D**) mit Substrat **175**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 291$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (408 nmol) Substrat **175** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (**B**) und 4 mM (**C+D**) und Lysat (**C**) oder 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 (**D**) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

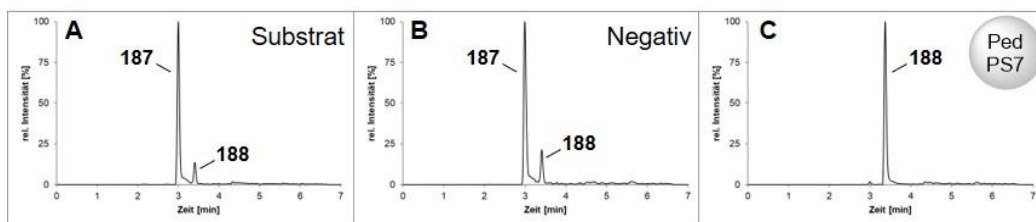




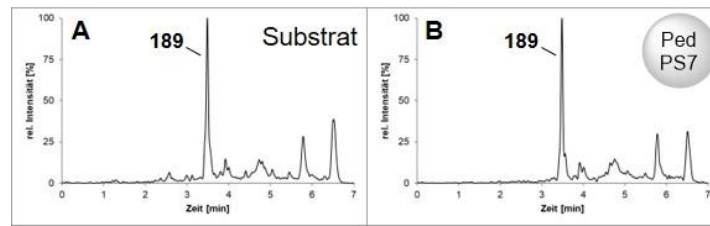
**Abbildung 8-58. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 177:** A) Substrat **177**; B) Negativkontrolle von Substrat **177**; C+D) Enzymreaktion von PedPS7-Lysat (C) bzw. gereinigtem Enzym (D) mit Substrat **177**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 282$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (386 nmol) Substrat **177** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (B) und 4 mM (C+D) und Lysat (C) oder 10.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 (D) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



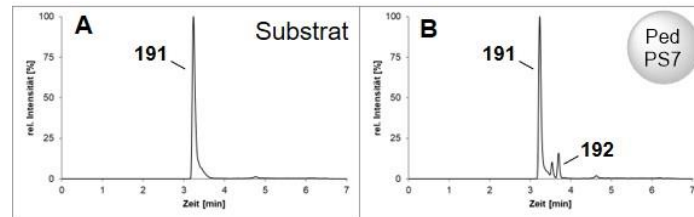
**Abbildung 8-59. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 179:** A) Substrat **179**; B+C) Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat **179**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **179** in HEPES-Puffer (pH 6.8 (B) bzw. 7.2 (C)) (Startkonzentration 2 mM) und 2.7 mg/mL (B) bzw. 7.0 mg/mL (C) His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



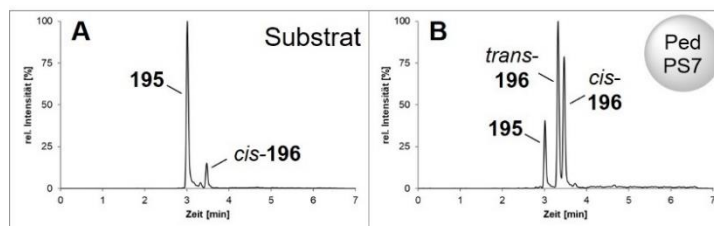
**Abbildung 8-60. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 187:** A) Substrat **187**; B) Negativkontrolle von Substrat **187**; C) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **187**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **187** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.7 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



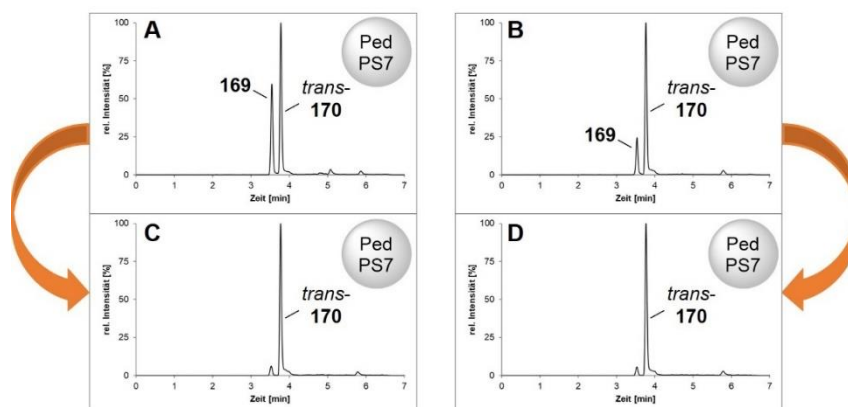
**Abbildung 8-61. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 189:** A) Substrat **189**; B) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **189**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **189** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.7 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



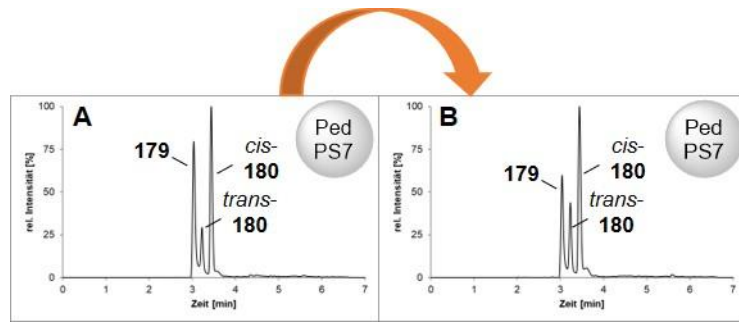
**Abbildung 8-62. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 191:** A) Substrat **191**; B) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **191**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 388$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (274 nmol) Substrat **191** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.7 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



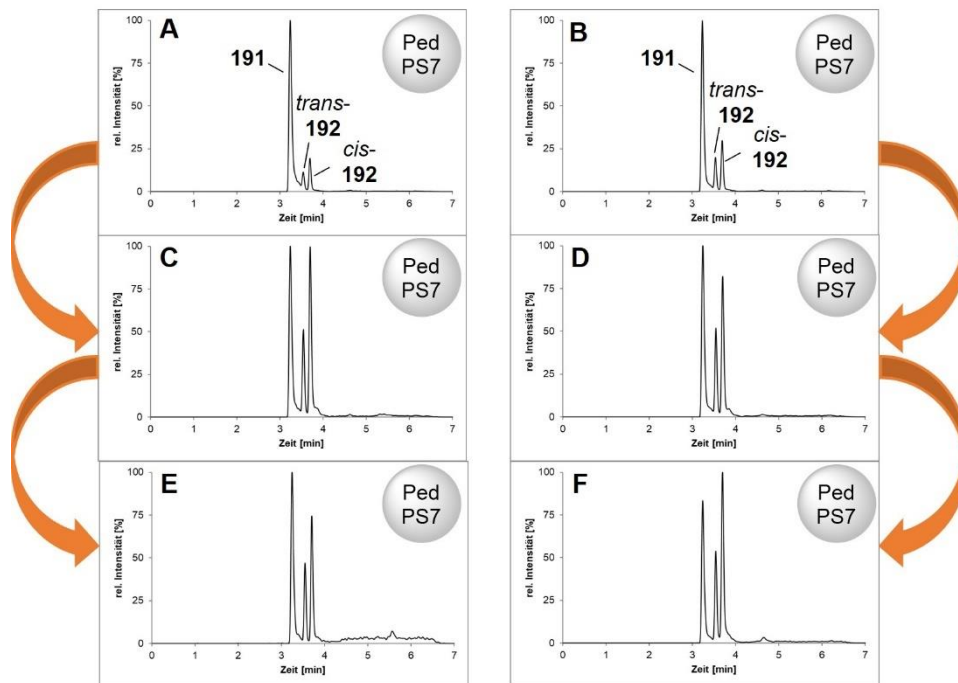
**Abbildung 8-63. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 195:** A) Substrat **195** mit Spuren von Produkt **196**; B) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **195**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 374$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (285 nmol) Substrat **195** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.7 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



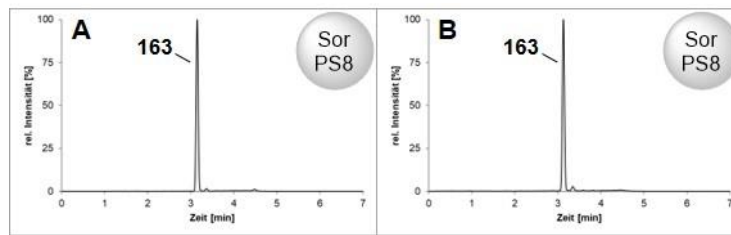
**Abbildung 8-64. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von PedPS7 mit Substrat 169:** Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **169** nach einmaligem (A+B) und zweimaligem (C+D) Umsatz. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit  $5 \times 0.1$  mg (317 nmol) Substrat **169** in HEPES-Puffer pH 6.8 (A), HEPES-Glycerin-Puffer pH 7.2 (B) bzw. HEPES-Puffer pH 7.2 (C+D) (Startkonzentration 2 mM) und 1.6–7.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die genauen Bedingungen können zudem Tabelle 3-11 (S. 129) entnommen werden.



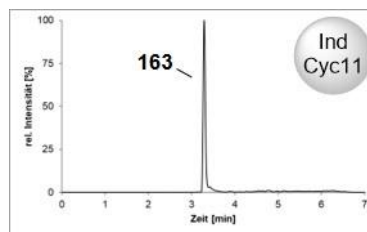
**Abbildung 8-65. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 179:** A+B) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **179** nach einmaligem (A) und zweimaligem Umsatz (B). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit  $10 \times 0.1$  mg (348 nmol) Substrat **179** in HEPES-Puffer pH 7.2 (Startkonzentration 2 mM) und 4.8–7.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die genauen Bedingungen können zudem Tabelle 3-12 (S. 131) entnommen werden.



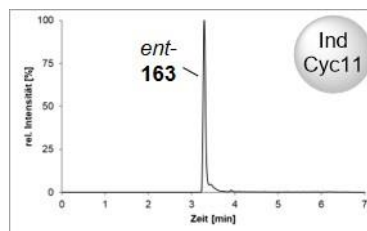
**Abbildung 8-66. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 191:** A–F) Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **191** nach einmaligem (A+B), zweimaligem (C+D) und dreimaligem Umsatz (E+F). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 388$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit  $5 \times 0.1$  mg (274 nmol) Substrat **191** in HEPES-Puffer pH 6.8 (A), HEPES-Glycerin-Puffer pH 7.2 (B) bzw. HEPES-Puffer pH 7.2 (C–F) (Startkonzentration 2 mM) und 1.6–7.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PedPS7 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt. Die genauen Bedingungen können zudem Tabelle 3-13 (S. 133) entnommen werden.

8.6.3.2. Enzymaktivitätstests mit SorPS8

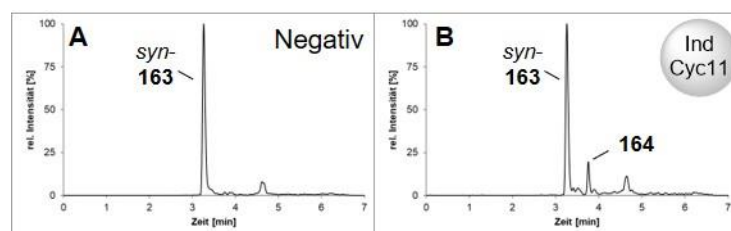
**Abbildung 8-67. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SorPS8 mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 3.3 mM (A) bzw. 0.7 mM (B) und 4.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SorPS8 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

8.6.4. Enzymaktivitätstests mit IndCyc11, ZinJ und SalBIII8.6.4.1. Enzymaktivitätstests mit IndCyc11

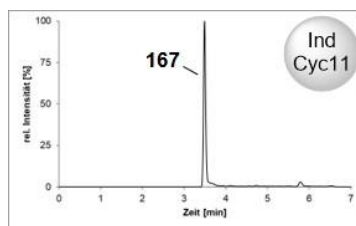
**Abbildung 8-68. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



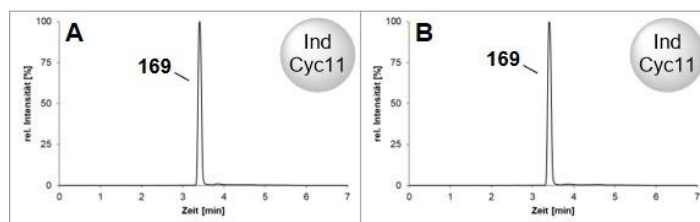
**Abbildung 8-69. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat ent-163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *ent*-**163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 (B) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



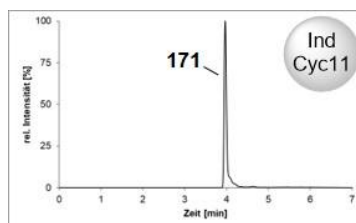
**Abbildung 8-70. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat syn-163:** A) Negativkontrolle von Substrat *syn*-**163**; B) Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat *syn*-**163**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *syn*-**163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.8 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



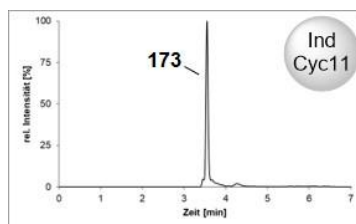
**Abbildung 8-71. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat 167.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **167** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



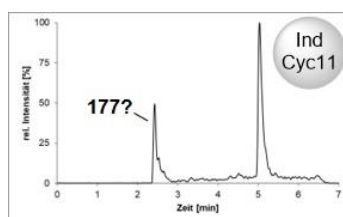
**Abbildung 8-72. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat 169.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **169** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 0.5 mM (A) bzw. 2 mM (B)) und 4.1 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



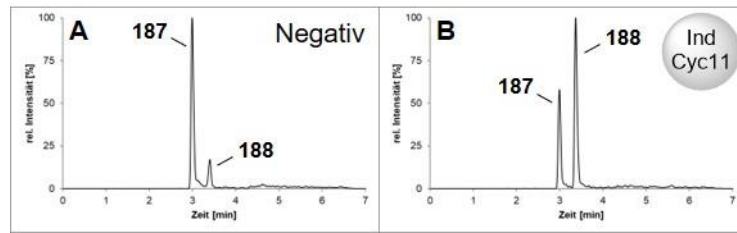
**Abbildung 8-73. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat 171.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



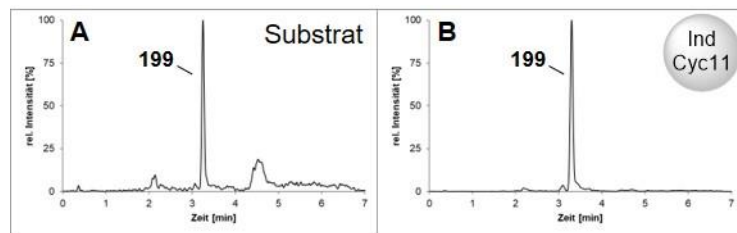
**Abbildung 8-74. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat 173.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 372$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (287 nmol) Substrat **173** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



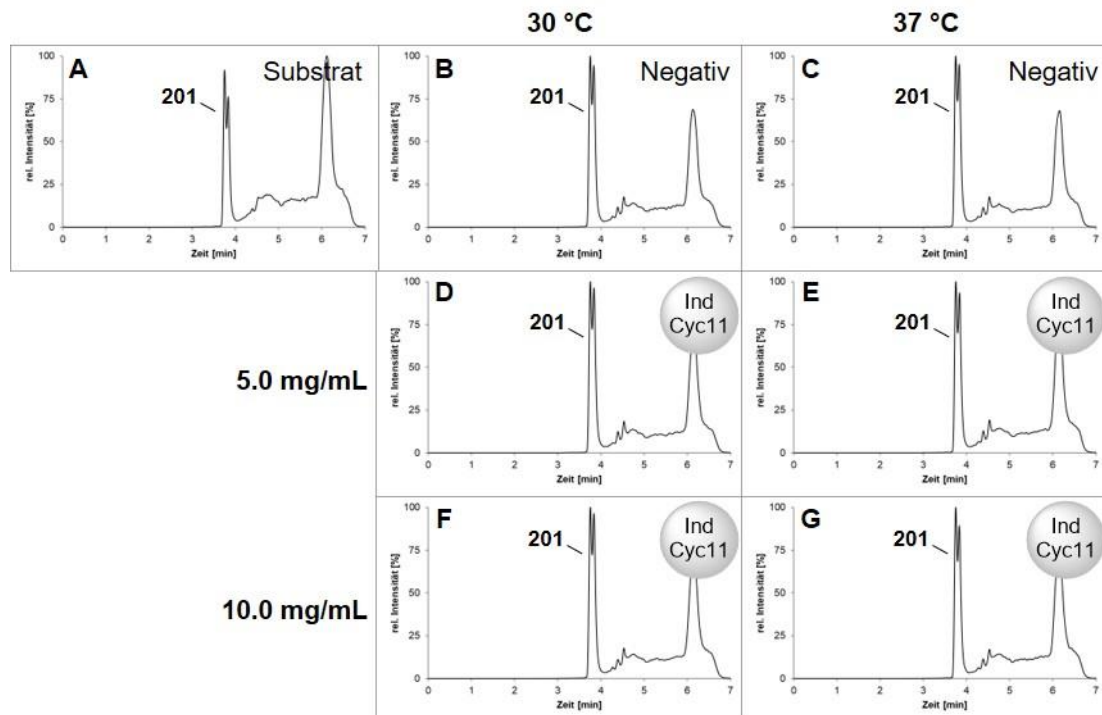
**Abbildung 8-75. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat 177.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 282$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (386 nmol) Substrat **177** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.0 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-76. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat 187:** A) Negativkontrolle von Substrat 187; B) Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat 187. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat 187 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.8 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

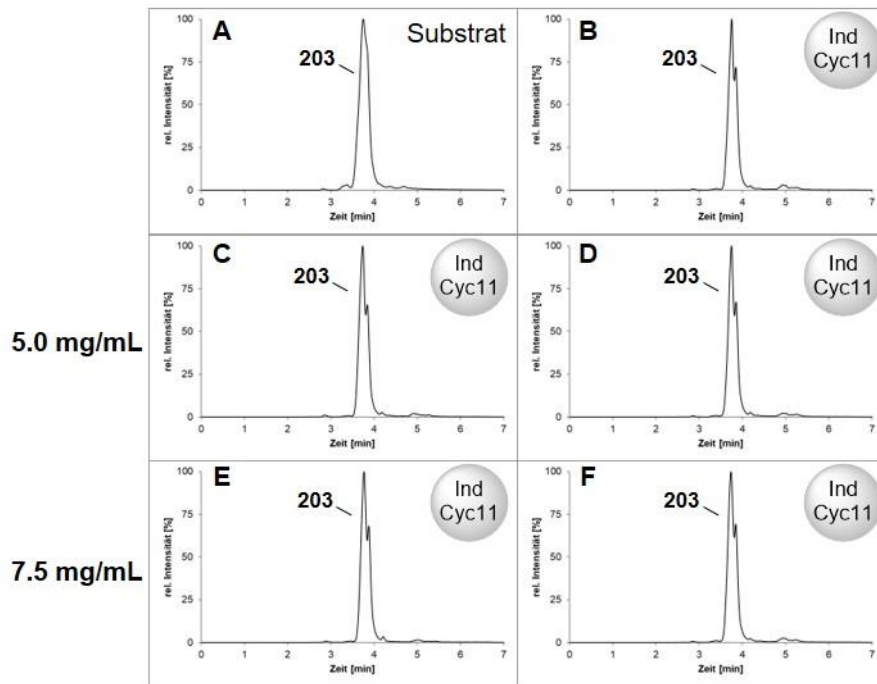


**Abbildung 8-77. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat 199:** A) Substrat 199; B) Enzymreaktion von IndCyc11 mit Substrat 199. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat 199 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 4.1 mg/mL His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

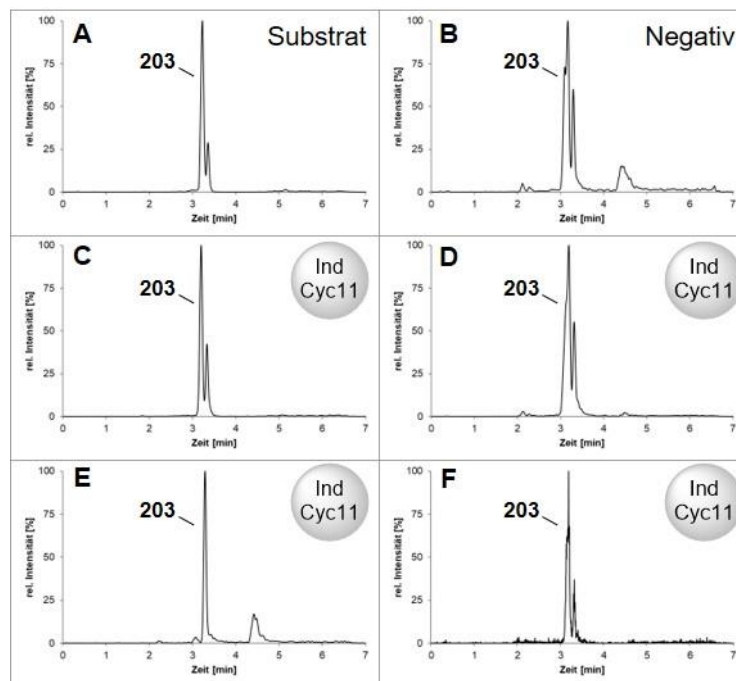


**Abbildung 8-78. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat *rac*-201:** A) Substrat *rac*-201; B+C) Negativkontrolle von Substrat *rac*-201; D–G) Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat *rac*-201. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat *rac*-201 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und 5.0 mg/mL (D+E) bzw. 10.0 mg/mL (F+G) His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C (B+D+F) bzw. 37 °C (C+E+G) und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

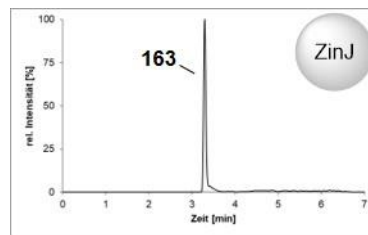




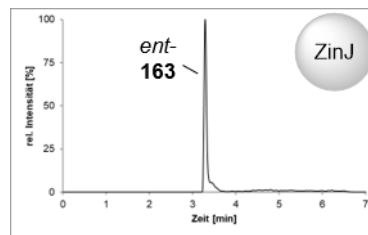
**Abbildung 8-79. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat *rac*-203:** A) Substrat *rac*-203; B–F) Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat *rac*-203. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat *rac*-203 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (C+E) bzw. 4 mM (D+F)) und Zellysate (B) oder 5.0 mg/mL (C+D) bzw. 7.5 mg/mL (E+F) His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



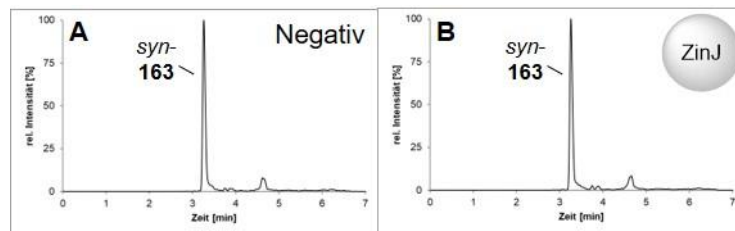
**Abbildung 8-80. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat *rac*-203:** A) Substrat *rac*-203; B) Negativkontrolle von Substrat *rac*-203; C–F) Enzymreaktionen von IndCyc11 mit Substrat *rac*-203. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat *rac*-203 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 2.5 mg/mL (C), 2.9 mg/mL (D), 4.1 mg/mL (E) bzw. 7.8 mg/mL (F) His<sub>6</sub>-IndCyc11 bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

8.6.4.2. Enzymaktivitätstests mit ZinJ

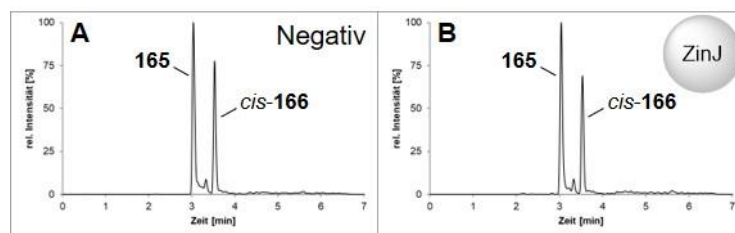
**Abbildung 8-81. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 15.0 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-82. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat ent-163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *ent-163* in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 15.0 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

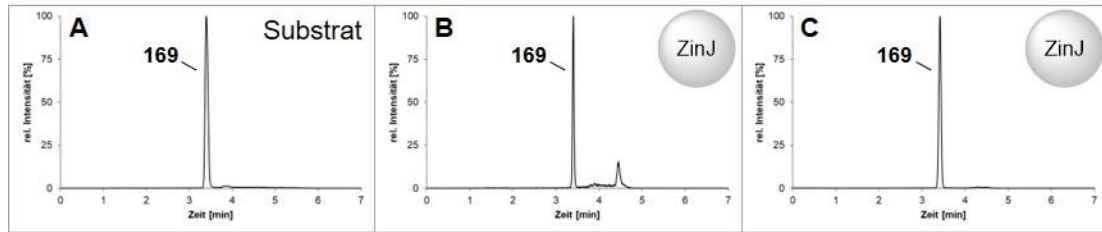


**Abbildung 8-83. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat syn-163:** **A)** Negativkontrolle von Substrat *syn-163*; **B)** Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat *syn-163*. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *syn-163* in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 8.4 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

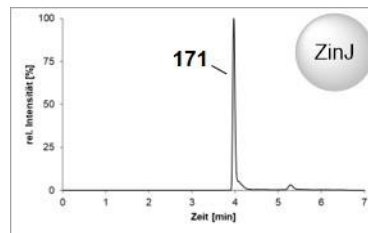


**Abbildung 8-84. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat 165:** **A)** Negativkontrolle von Substrat **165**; **B)** Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat **165**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **165** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 8.4 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

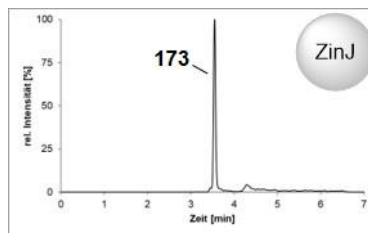




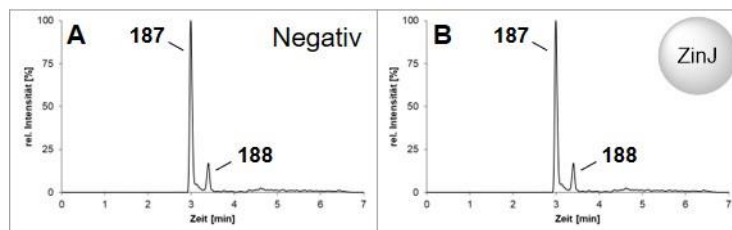
**Abbildung 8-85. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat 169:** A) Substrat **169**, B+C) Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat **169**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **169** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 0.6 mM (B) bzw. 3.2 mM (C)) und 3.7 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt



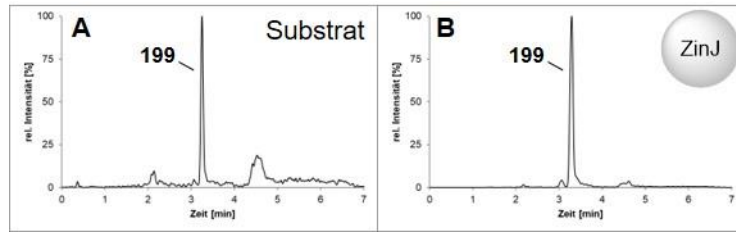
**Abbildung 8-86. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat 171.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 15.0 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



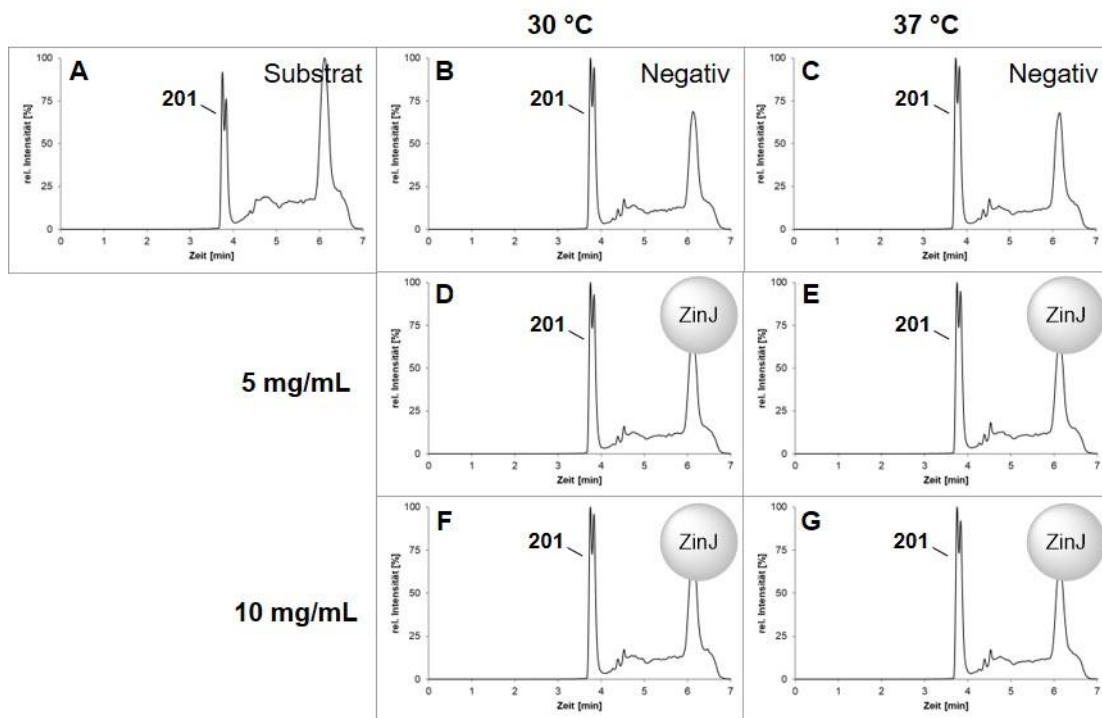
**Abbildung 8-87. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat 173.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 372$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (287 nmol) Substrat **173** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 15.0 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



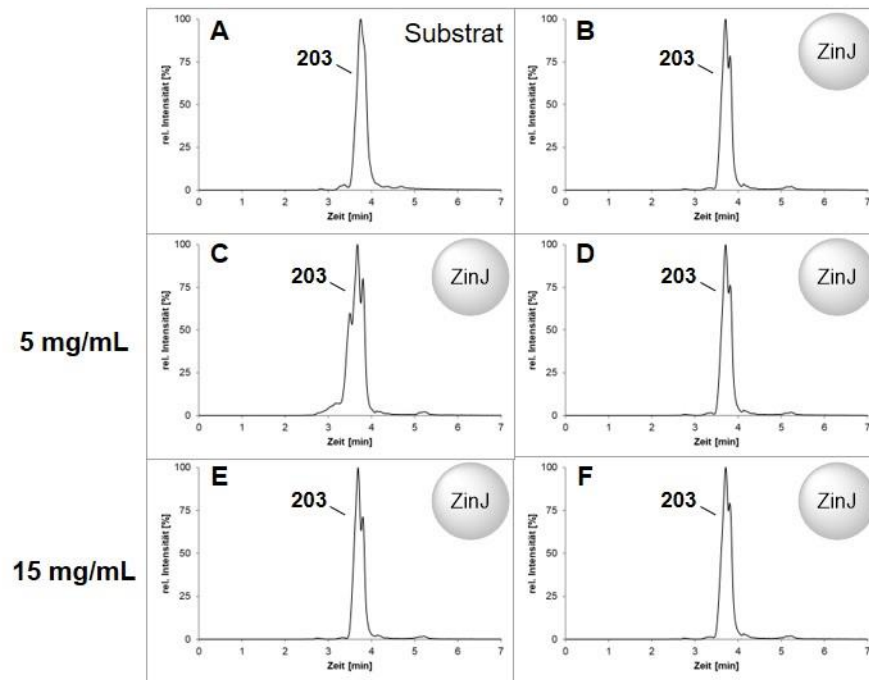
**Abbildung 8-88. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat 187:** A) Negativkontrolle von Substrat **187**; B) Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat **187**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **187** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 8.4 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



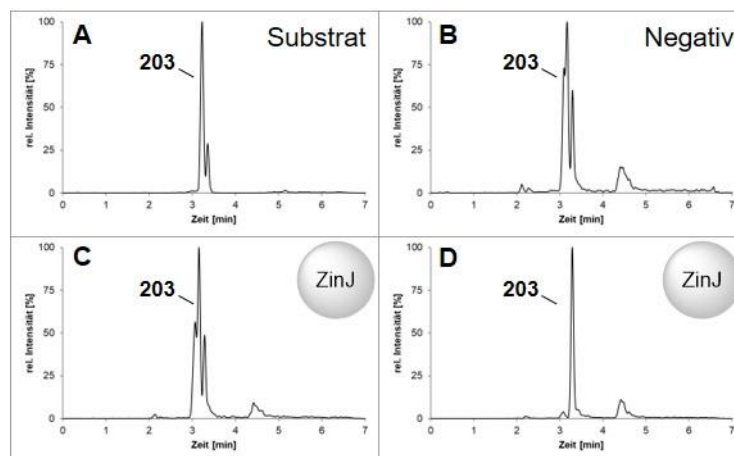
**Abbildung 8-89. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat 199:** A) Substrat **199**; B) Enzymreaktion von ZinJ mit Substrat **199**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat **199** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 17.1 mg/mL His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



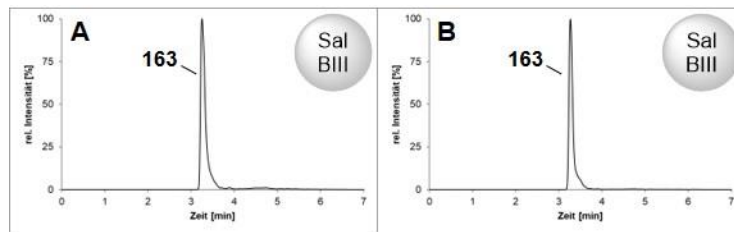
**Abbildung 8-90. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat *rac*-201.** A) Substrat *rac*-201; B+C) Negativkontrolle von Substrat *rac*-201; D–G) Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat *rac*-201. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat *rac*-201 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und 5.0 mg/mL (D+E) bzw. 10.0 mg/mL (F+G) His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C (B+D+F) bzw. 37 °C (C+E+G) und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



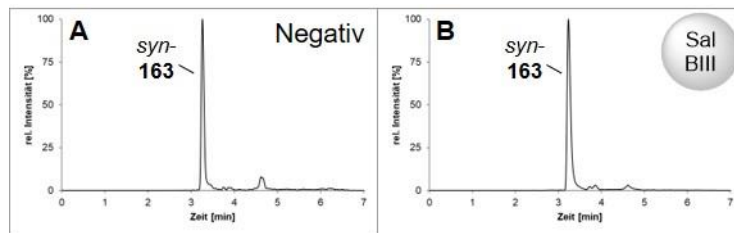
**Abbildung 8-91. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat *rac*-203:** A) Substrat *rac*-203; B–F) Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat *rac*-203. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat *rac*-203 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM (B+C+E) bzw. 4 mM (D+F)) und Zelllysate (B) bzw. 5.0 mg/mL (C+D) oder 15.0 mg/mL (E+F) His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



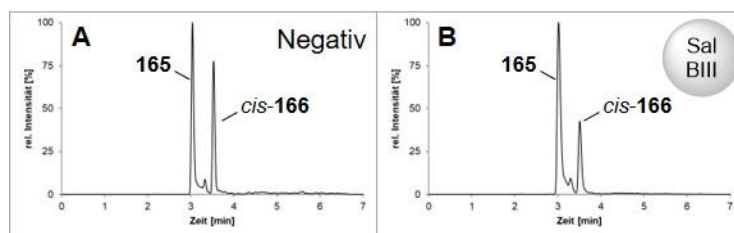
**Abbildung 8-92. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat *rac*-203:** A) Substrat *rac*-203; B) Negativkontrolle von Substrat *rac*-203; C+D) Enzymreaktionen von ZinJ mit Substrat *rac*-203. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat *rac*-203 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 15.0 mg/mL (C) bzw. 17.1 mg/mL (D) His<sub>6</sub>-ZinJ bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

8.6.4.3. Enzymaktivitätstests mit SalBIII

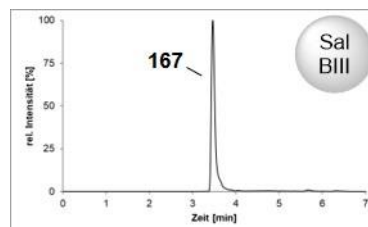
**Abbildung 8-93. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von SalBIII mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Zelllysat (**A**) bzw. 38.2 mg/mL (**B**) His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



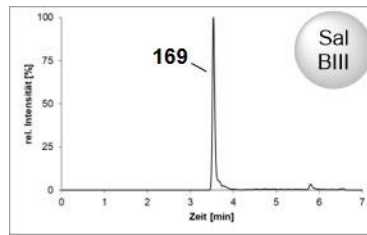
**Abbildung 8-94. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat *syn*-163:** **A**) Negativkontrolle von Substrat *syn*-163; **B**) Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat *syn*-163. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *syn*-163 in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



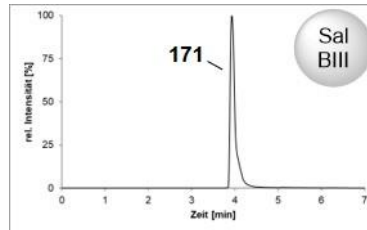
**Abbildung 8-95. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 165:** **A**) Negativkontrolle von Substrat **165**; **B**) Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat **165**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **165** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



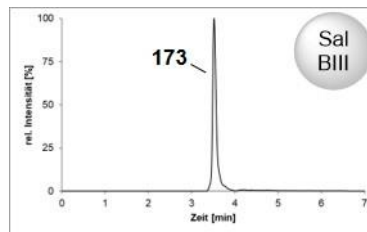
**Abbildung 8-96. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von SalBIII mit Substrat 167.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **167** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



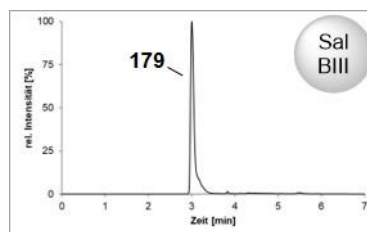
**Abbildung 8-97. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 169.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **169** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



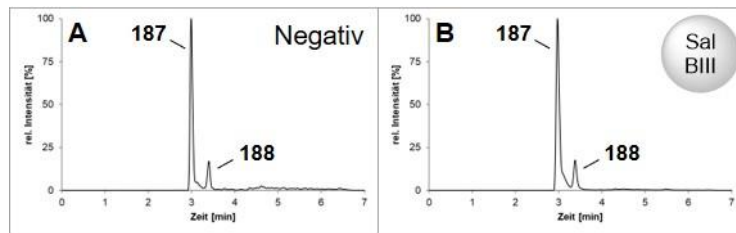
**Abbildung 8-98. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 171.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



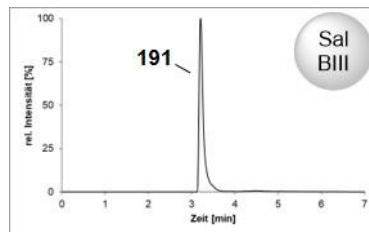
**Abbildung 8-99. UPLC-MS-Chromatogramm der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 173.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 372$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (287 nmol) Substrat **173** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



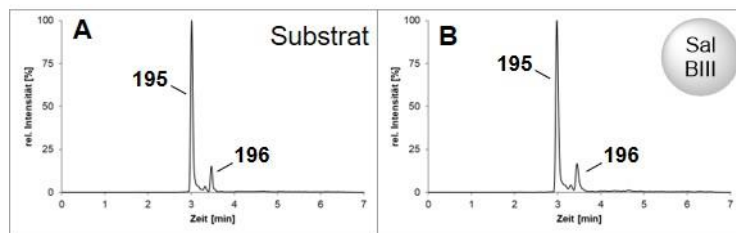
**Abbildung 8-100. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 179.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **179** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



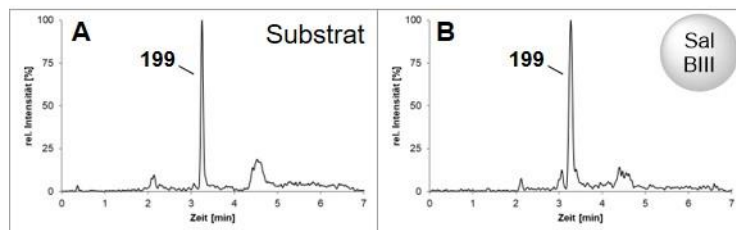
**Abbildung 8-101. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 187:** A) Negativkontrolle von Substrat **187**; B) Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat **187**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat **187** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-102. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 191.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 388$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (274 nmol) Substrat **191** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

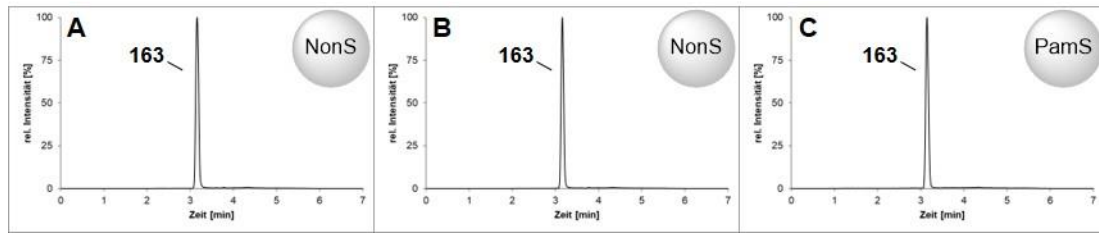


**Abbildung 8-103. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat 195:** A) Substrat **195** mit Spuren von Produkt **196**; B) Enzymreaktion von SalBIII mit Substrat **195**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 374$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (285 nmol) Substrat **195** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

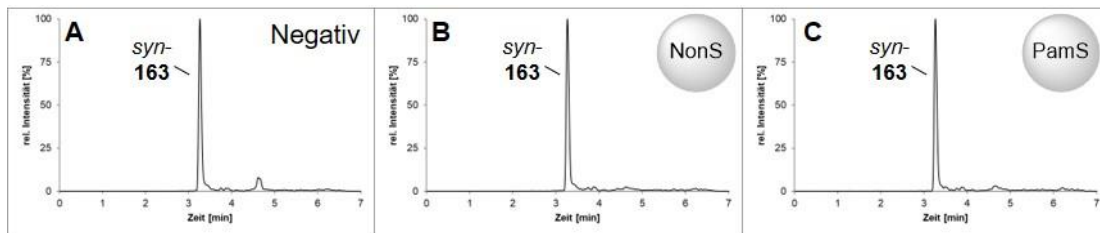


**Abbildung 8-104. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von SalBIII mit Substrat 199.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 213$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat **199** in HEPES-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und 38.2 mg/mL His<sub>6</sub>-SalBIII bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

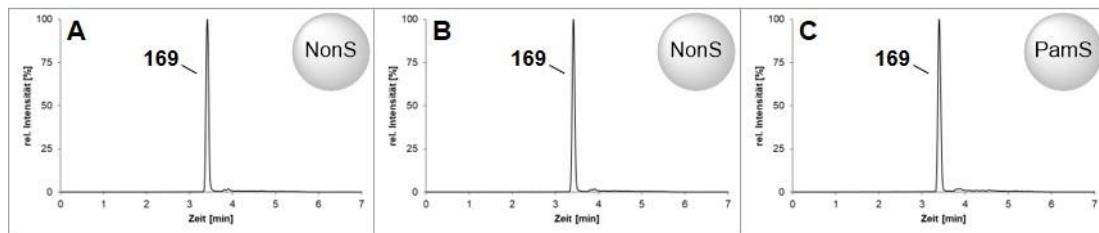
## 8.6.5. Enzymaktivitätstests mit NonS und PamS



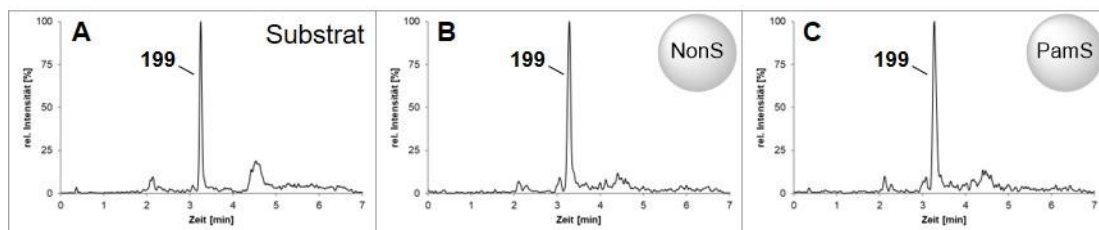
**Abbildung 8-105.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat **163**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in HEPES-Puffer pH 7.8 (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-NonS bzw. 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PamS bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-106.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat *syn-163*: A) Negativkontrolle von Substrat *syn-163*; B+C) Enzymreaktion von NonS und PamS mit Substrat *syn-163*. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *syn-163* in HEPES-Puffer pH 7.8 (Startkonzentration 2 mM) und 2.5 mg/mL His<sub>6</sub>-NonS bzw. 1.9 mg/mL His<sub>6</sub>-PamS bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

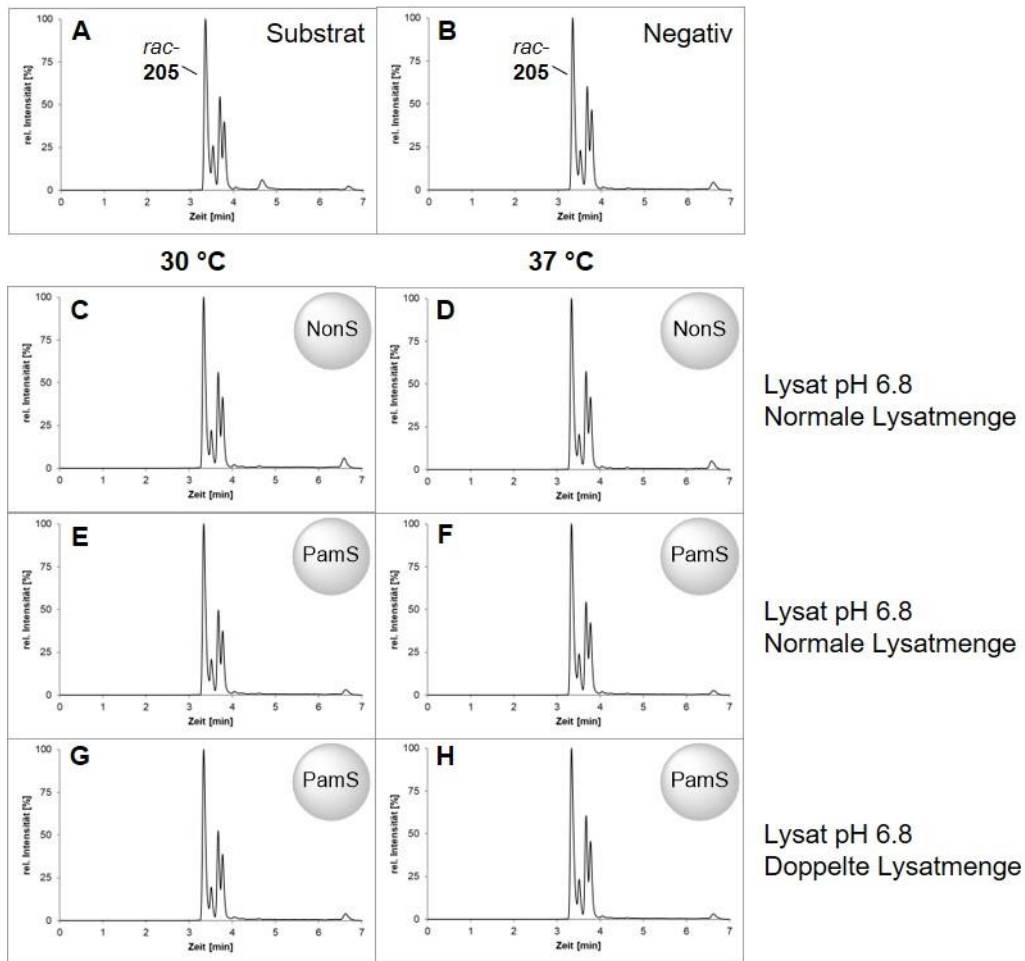


**Abbildung 8-107.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat **169**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 338$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (317 nmol) Substrat **169** in HEPES-Puffer pH 7.8 (Startkonzentration 2 mM) und 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-NonS bzw. 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PamS bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



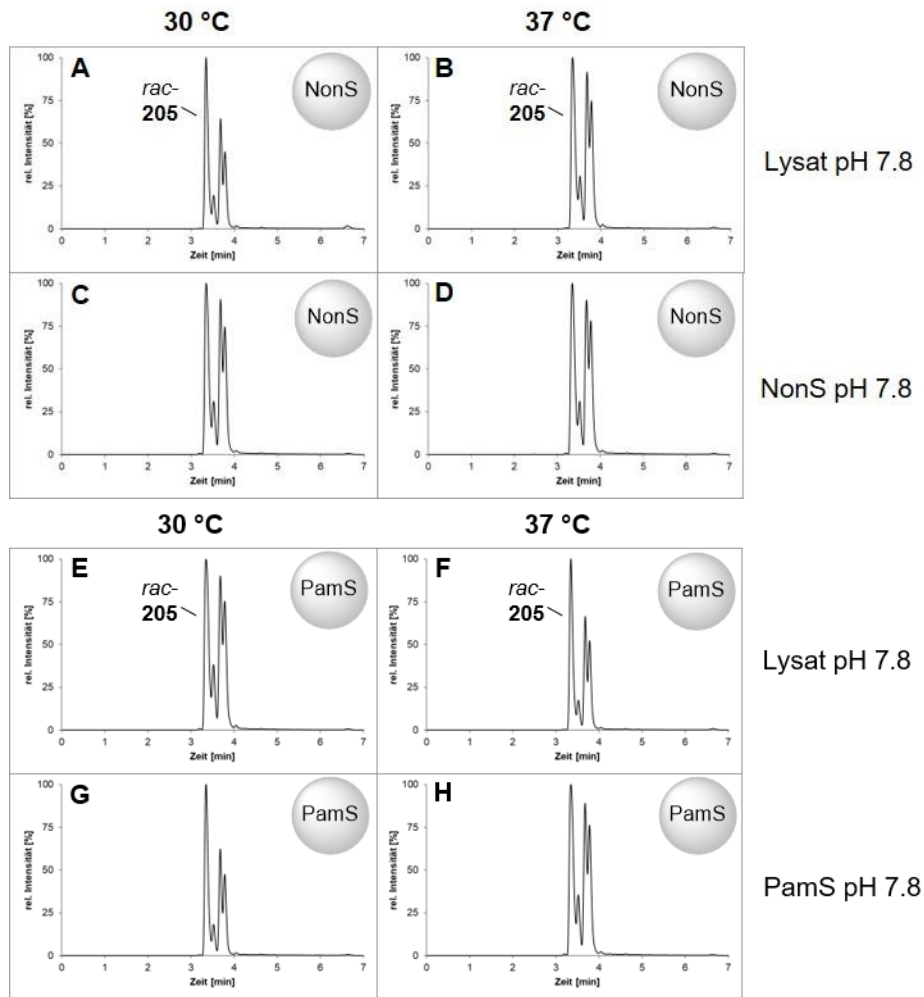
**Abbildung 8-108.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat **199**: A) Substrat **199**; B+C) Enzymreaktion von NonS und PamS mit Substrat **199**. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M-H]^- = 213$ . Die Enzymreaktion wurde mit 0.1 mg (467 nmol) Substrat **199** in HEPES-Puffer pH 7.8 (Startkonzentration 2 mM) und 2.5 mg/mL His<sub>6</sub>-NonS bzw. 1.9 mg/mL His<sub>6</sub>-PamS bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



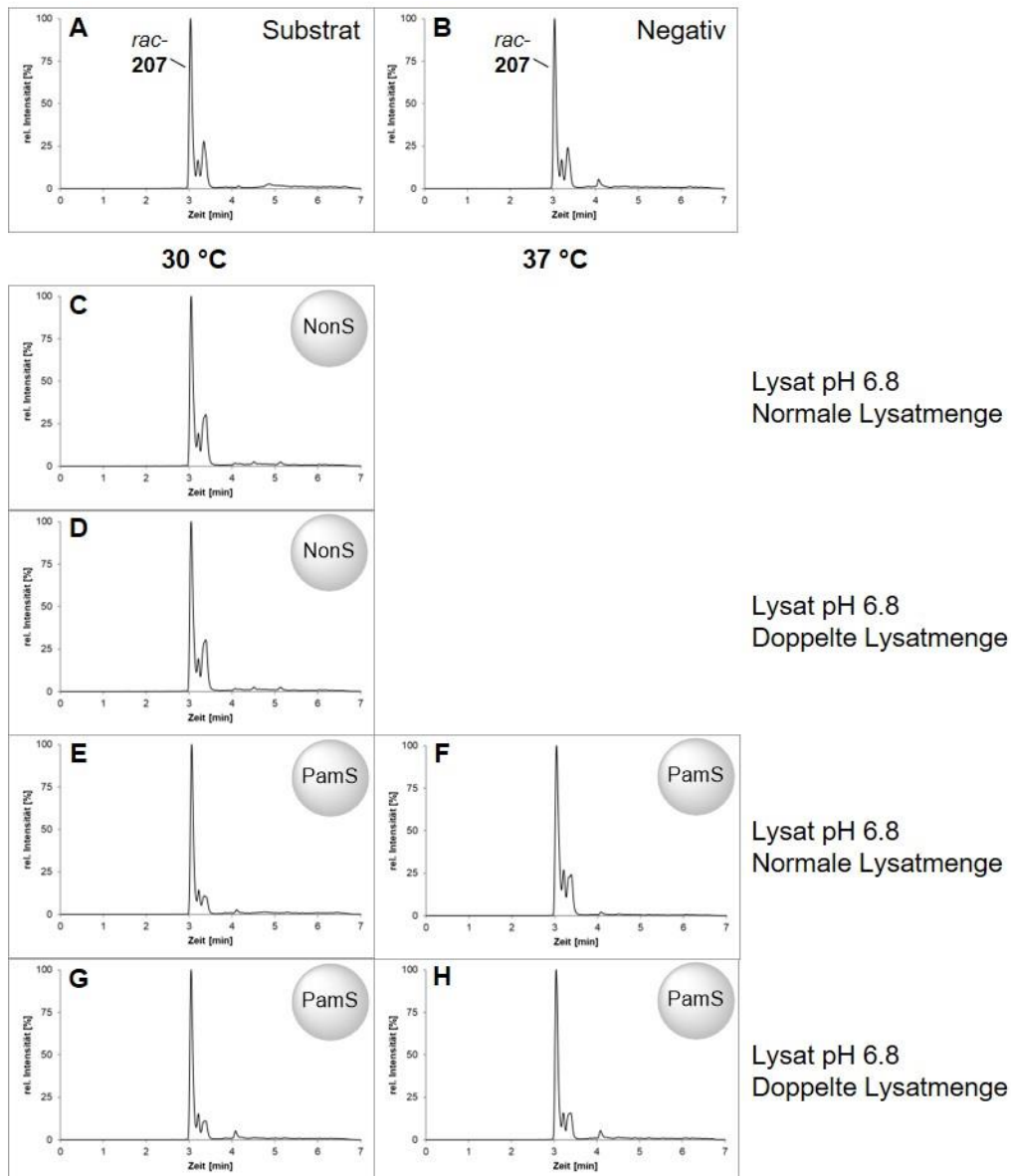


**Abbildung 8-109. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat *rac-205*:** **A)** Referenz von Substrat *rac-205*; **B)** Negativkontrolle von Substrat *rac-205*; **C–H)** Enzymreaktionen von Substrat *rac-205* mit NonS (**C–D**) bzw. PamS (**E–H**). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 296$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *rac-205* in HEPES-Puffer pH 6.8 (Startkonzentration 4 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS* (**C–D**) bzw. pCold-I\_*pamS* (**E–H**) bei 30 °C und 300 U $\mu$ M für 16 h durchgeführt.

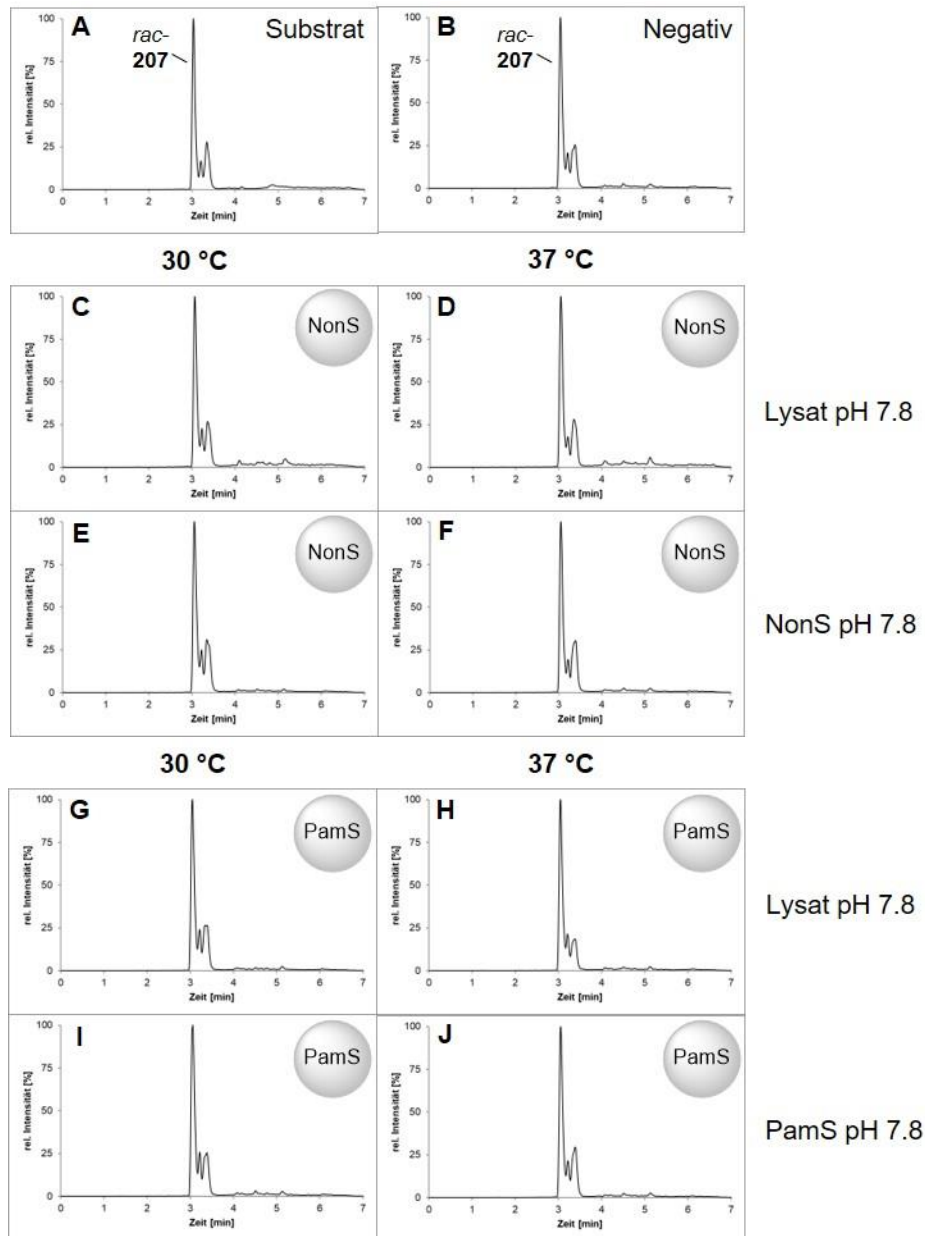




**Abbildung 8-110. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat *rac-205*:** A–D) Enzymreaktionen von Substrat *rac-205* mit NonS; E–H) Enzymreaktionen von Substrat *rac-205* mit PamS. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 296$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat *rac-205* in HEPES-Puffer pH 7.8 (Startkonzentration 4 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS* (A–B) bzw. pCold-I\_*pamS* (E–F) oder 8.0 mg/mL His<sub>6</sub>-NonS (C–D) bzw. 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PamS (G–H) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



**Abbildung 8-111. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat *rac-207*:** A) Referenz von Substrat *rac-207*; B) Negativkontrolle von Substrat *rac-207*; C–H) Enzymreaktionen von Substrat *rac-207* mit NonS (C–D) bzw. PamS (E–H). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat *rac-207* in HEPES-Puffer pH 6.8 (Startkonzentration 4 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS* (C–D) bzw. pCold-I\_*pamS* (E–H) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.



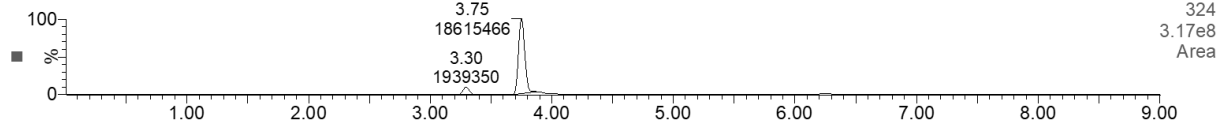
**Abbildung 8-112. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von NonS und PamS mit Substrat *rac-187*:** A) Referenz von Substrat *rac-187*; B) Negativkontrolle von Substrat *rac-187*; C–J) Enzymreaktionen von Substrat *rac-187* mit NonS (C–F) bzw. PamS (G–J). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 310$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (348 nmol) Substrat *rac-187* in HEPES-Puffer pH 7.8 (Startkonzentration 4 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pCold-I\_*nonS* (C–D) bzw. pCold-I\_*pamS* (G–H) oder 8.0 mg/mL His<sub>6</sub>-NonS (E–F) bzw. 5.0 mg/mL His<sub>6</sub>-PamS (I–J) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

## 8.6.6. Immobilisierung

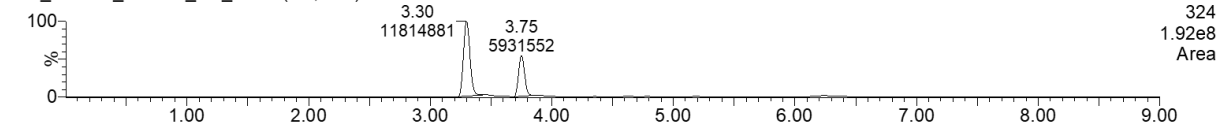
### 8.6.6.1. Enzymaktivitätstests mit Ni-TED-AmbDH3

#### LW\_200122\_Ni-TED\_Lys\_0

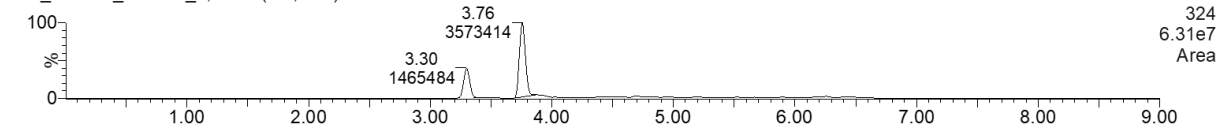
LW\_200122\_Ni-TED\_Lys\_0 Sm (Mn, 2x3)



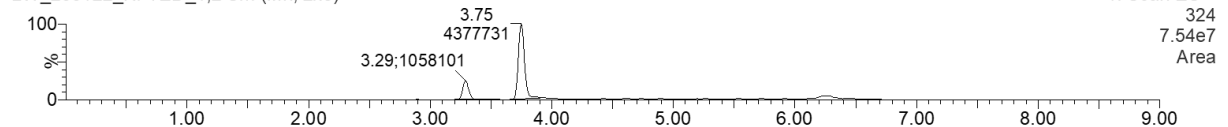
LW\_200122\_Ni-TED\_US\_0 Sm (Mn, 2x3)



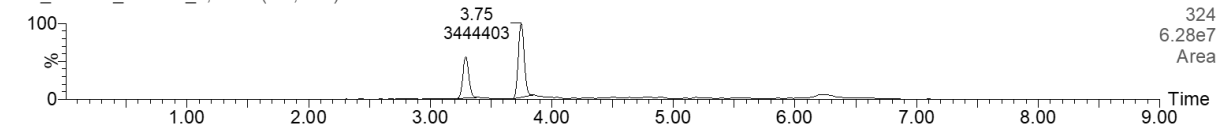
LW\_200128\_Ni-TED\_1,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200122\_Ni-TED\_1,2 Sm (Mn, 2x3)



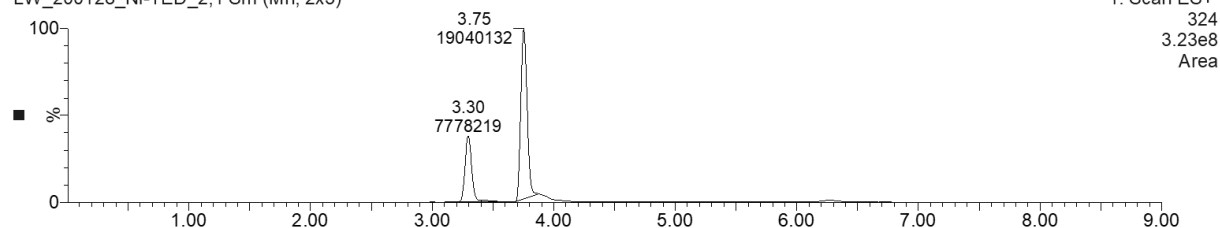
LW\_200122\_Ni-TED\_1,3 Sm (Mn, 2x3)



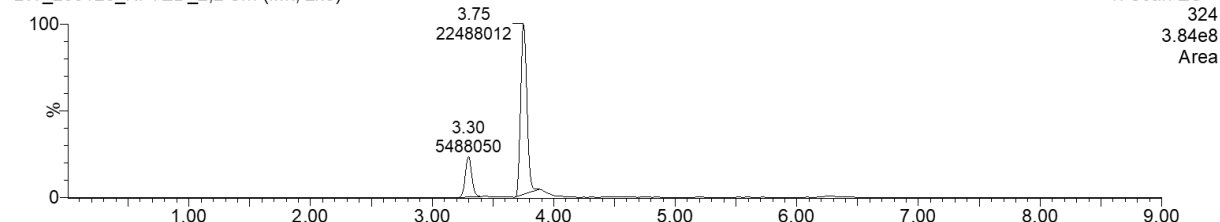
**Abbildung 8-113. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat und Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem ersten Reaktionszyklus:** Enzymreaktion mit **A)** AmbDH3-Lysat; **B)** dem Überstand nach Inkubation von AmbDH3-Lysat mit den Ni-TED *Silica Beads*; **C–E)** Ni-TED-AmbDH3. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.29–3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75–3.76 min.

## LW\_200128\_Ni-TED\_2,1

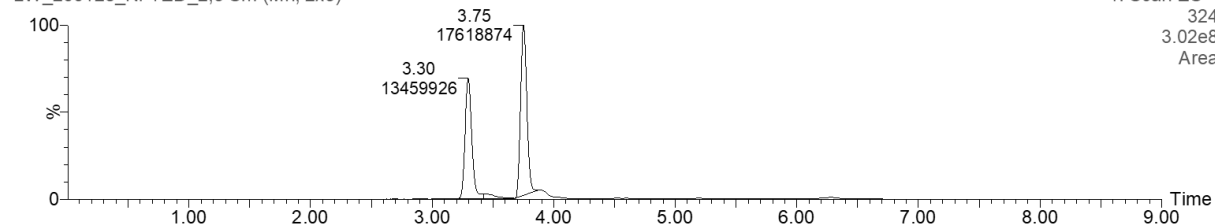
LW\_200128\_Ni-TED\_2,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200128\_Ni-TED\_2,2 Sm (Mn, 2x3)



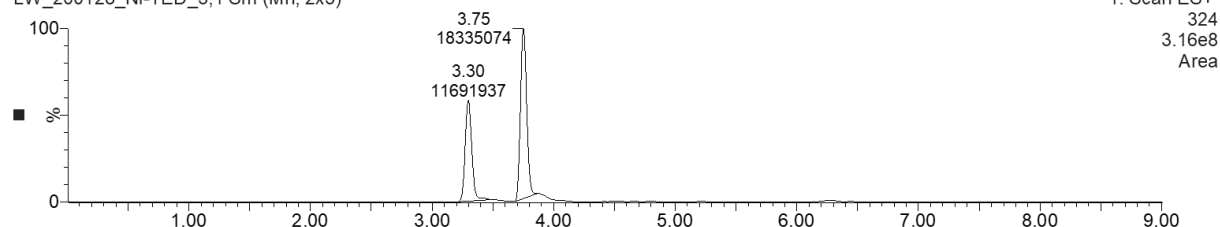
LW\_200128\_Ni-TED\_2,3 Sm (Mn, 2x3)



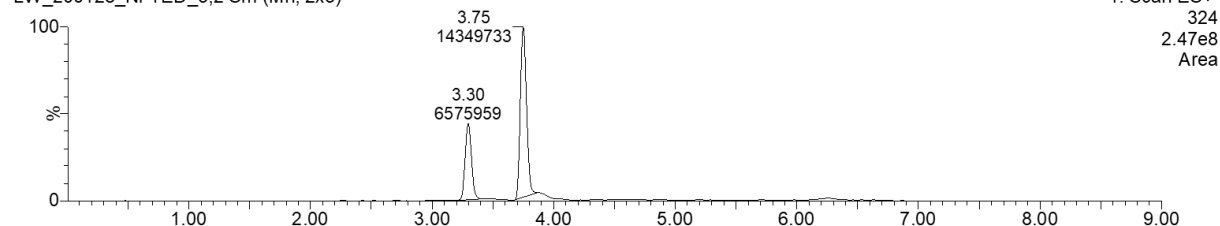
**Abbildung 8-114. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem zweiten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

## LW\_200128\_Ni-TED\_3,1

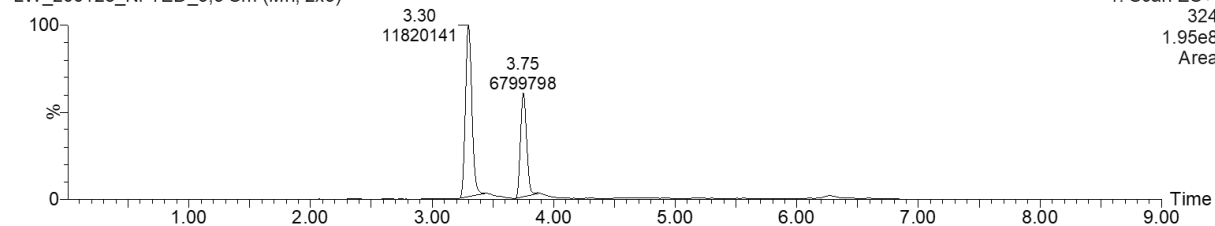
LW\_200128\_Ni-TED\_3,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200128\_Ni-TED\_3,2 Sm (Mn, 2x3)



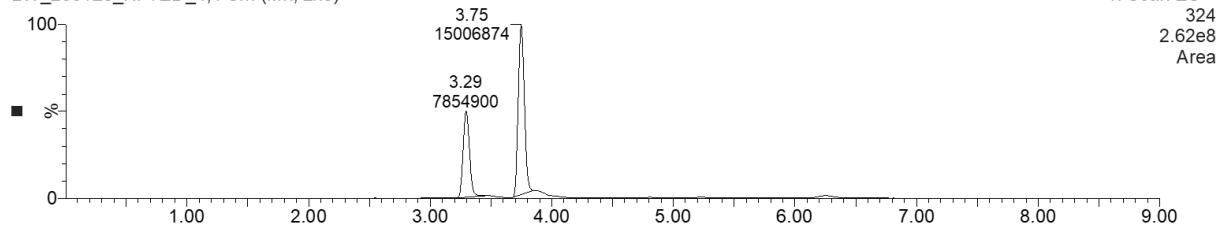
LW\_200128\_Ni-TED\_3,3 Sm (Mn, 2x3)



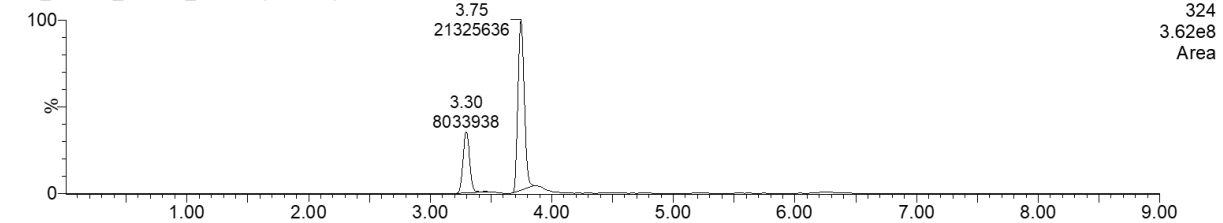
**Abbildung 8-115. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem dritten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

## LW\_200128\_Ni-TED\_4,1

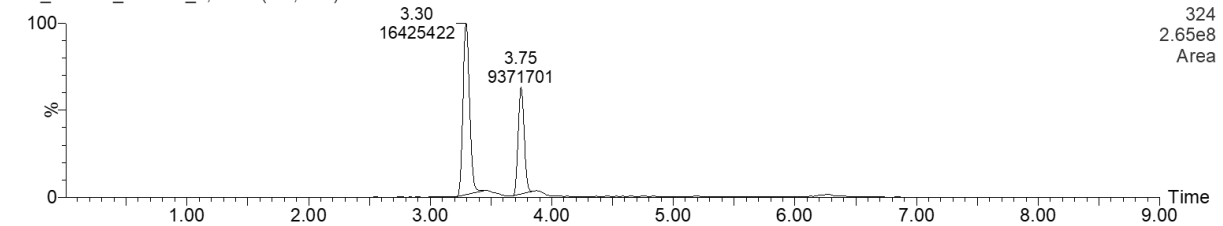
LW\_200128\_Ni-TED\_4,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200128\_Ni-TED\_4,2 Sm (Mn, 2x3)



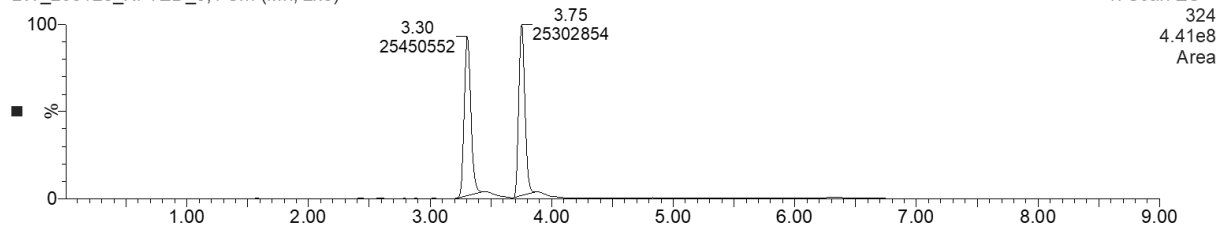
LW\_200128\_Ni-TED\_4,3 Sm (Mn, 2x3)



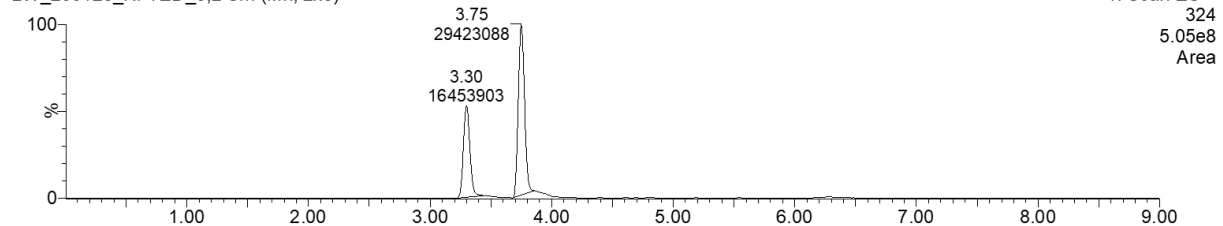
**Abbildung 8-116. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem vierten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.29–3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

## LW\_200128\_Ni-TED\_5,1

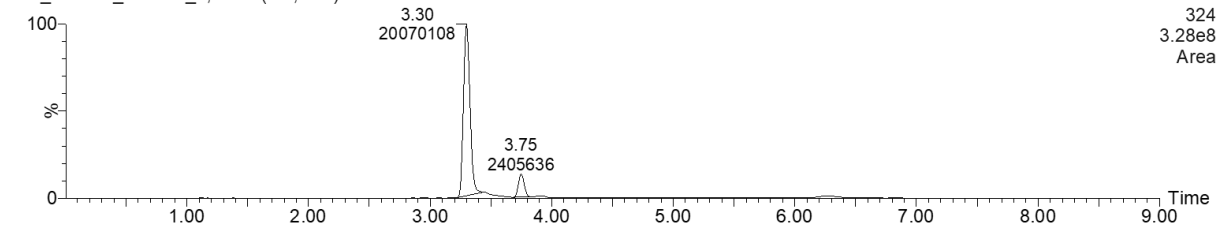
LW\_200128\_Ni-TED\_5,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200128\_Ni-TED\_5,2 Sm (Mn, 2x3)



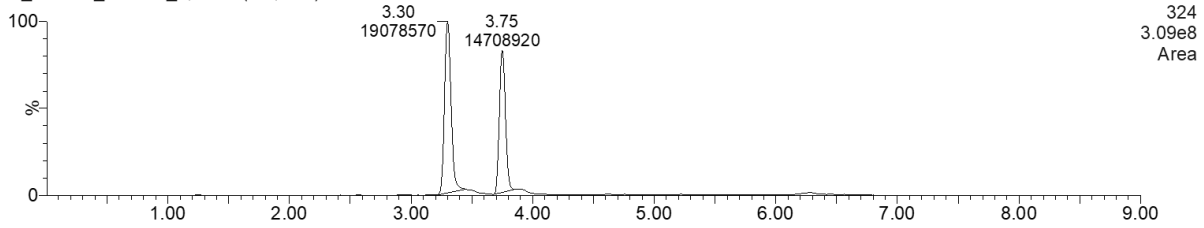
LW\_200128\_Ni-TED\_5,3 Sm (Mn, 2x3)



**Abbildung 8-117. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem fünften Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

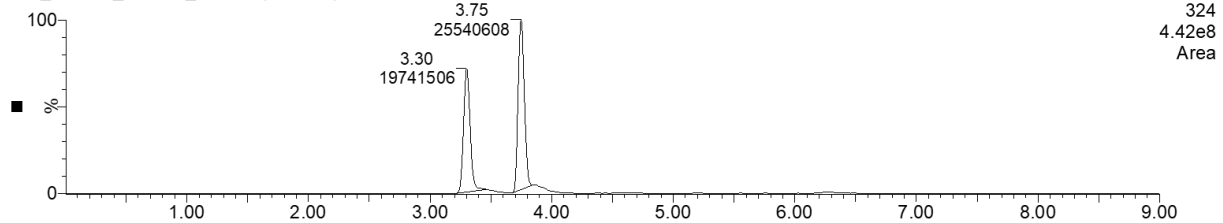
## LW\_200128\_Ni-TED\_6,2

LW\_200128\_Ni-TED\_6,1 Sm (Mn, 2x3)



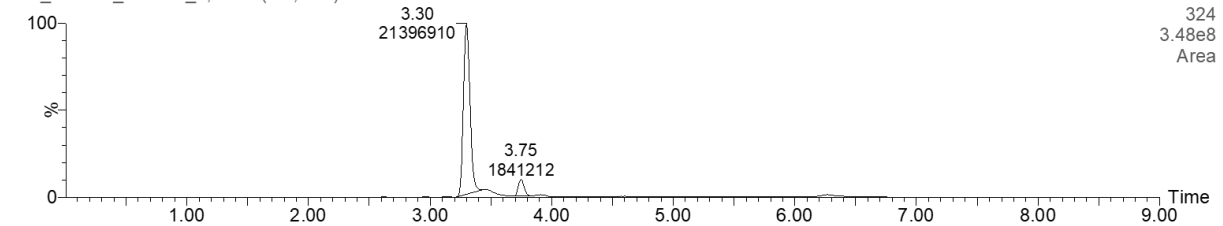
1: Scan ES+  
324  
3.09e8  
Area

LW\_200128\_Ni-TED\_6,2 Sm (Mn, 2x3)



1: Scan ES+  
324  
4.42e8  
Area

LW\_200128\_Ni-TED\_6,3 Sm (Mn, 2x3)

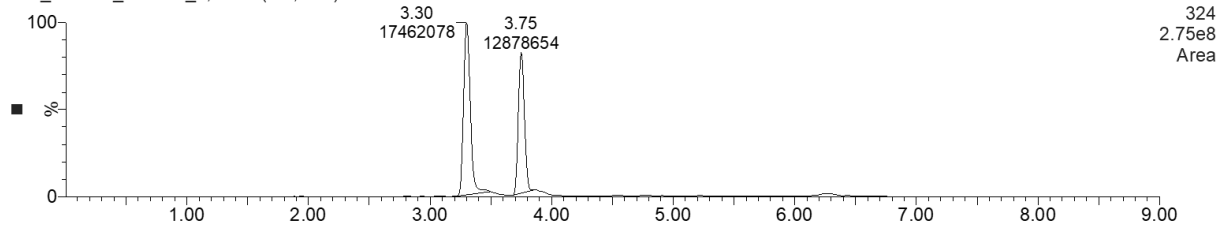


1: Scan ES+  
324  
3.48e8  
Area

**Abbildung 8-118. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem sechsten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

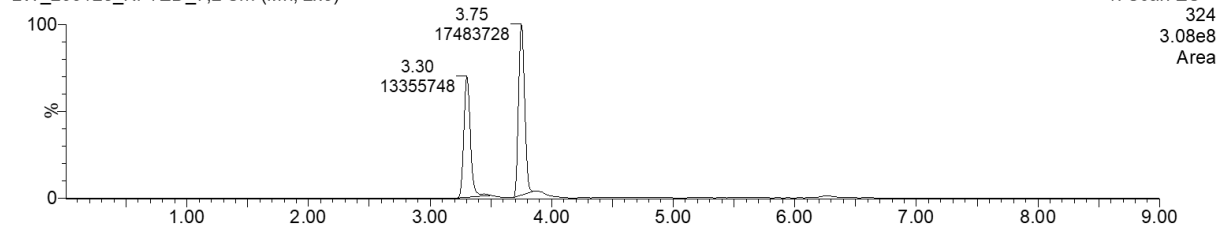
## LW\_200128\_Ni-TED\_7,1

LW\_200128\_Ni-TED\_7,1 Sm (Mn, 2x3)



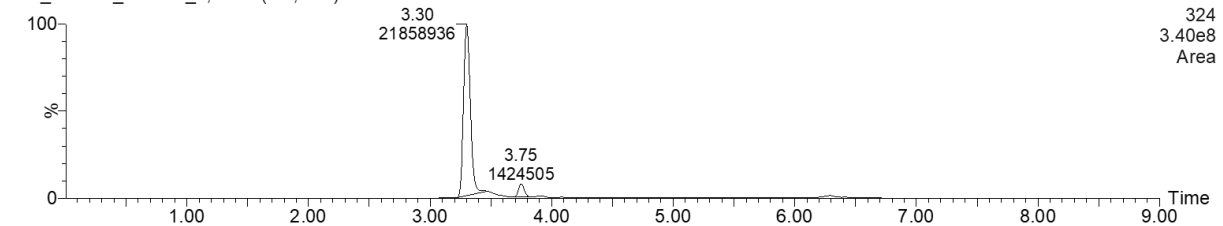
1: Scan ES+  
324  
2.75e8  
Area

LW\_200128\_Ni-TED\_7,2 Sm (Mn, 2x3)



1: Scan ES+  
324  
3.08e8  
Area

LW\_200128\_Ni-TED\_7,3 Sm (Mn, 2x3)

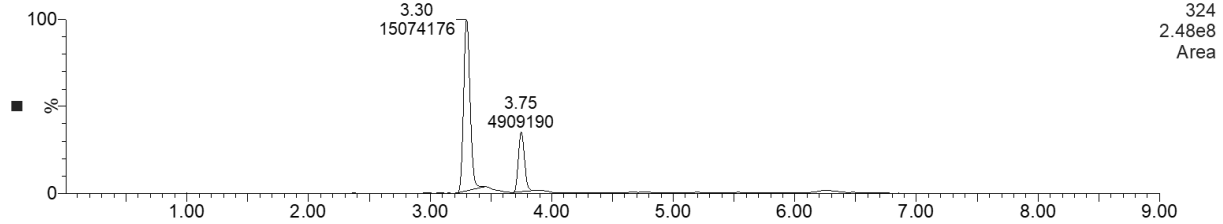


1: Scan ES+  
324  
3.40e8  
Area

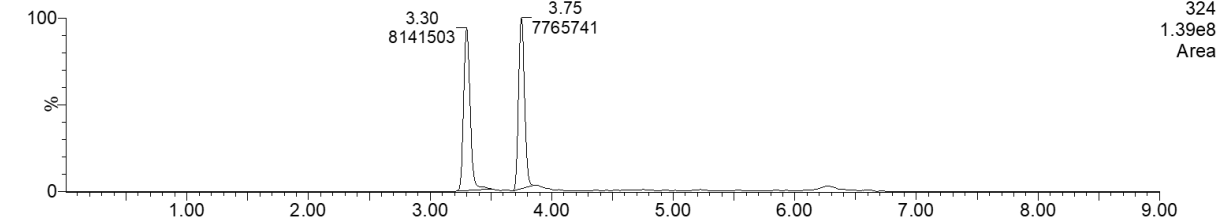
**Abbildung 8-119. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem siebten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

## LW\_200128\_Ni-TED\_8,1

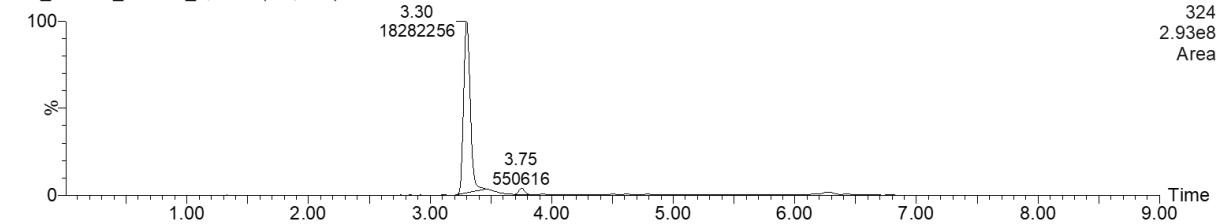
LW\_200128\_Ni-TED\_8,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200128\_Ni-TED\_8,2 Sm (Mn, 2x3)



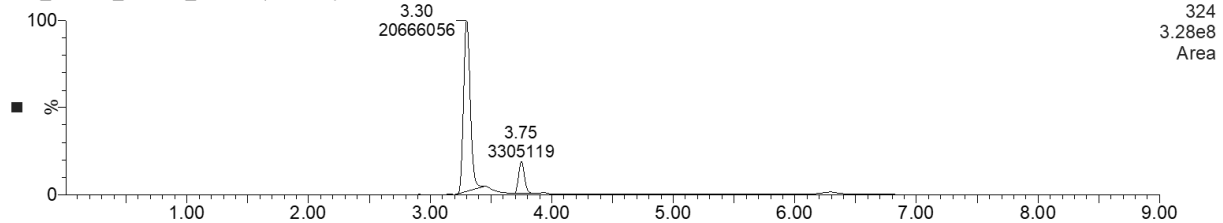
LW\_200128\_Ni-TED\_8,3 Sm (Mn, 2x3)



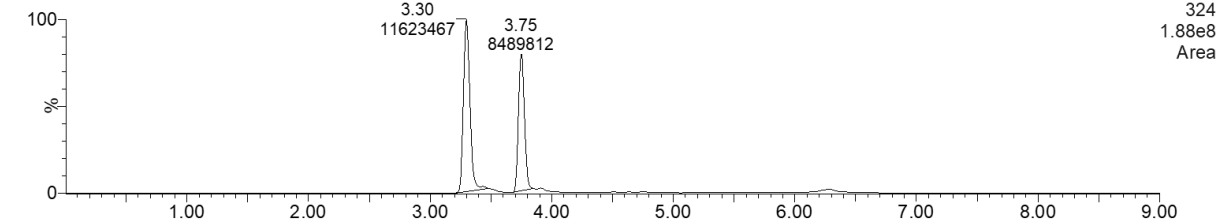
**Abbildung 8-120. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem achten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

## LW\_200128\_Ni-TED\_9,1

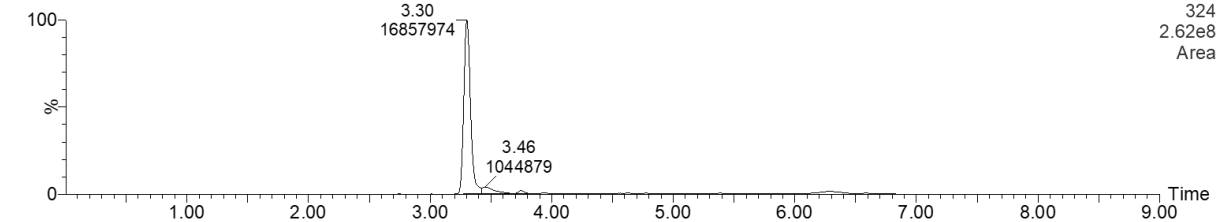
LW\_200128\_Ni-TED\_9,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_200128\_Ni-TED\_9,2 Sm (Mn, 2x3)

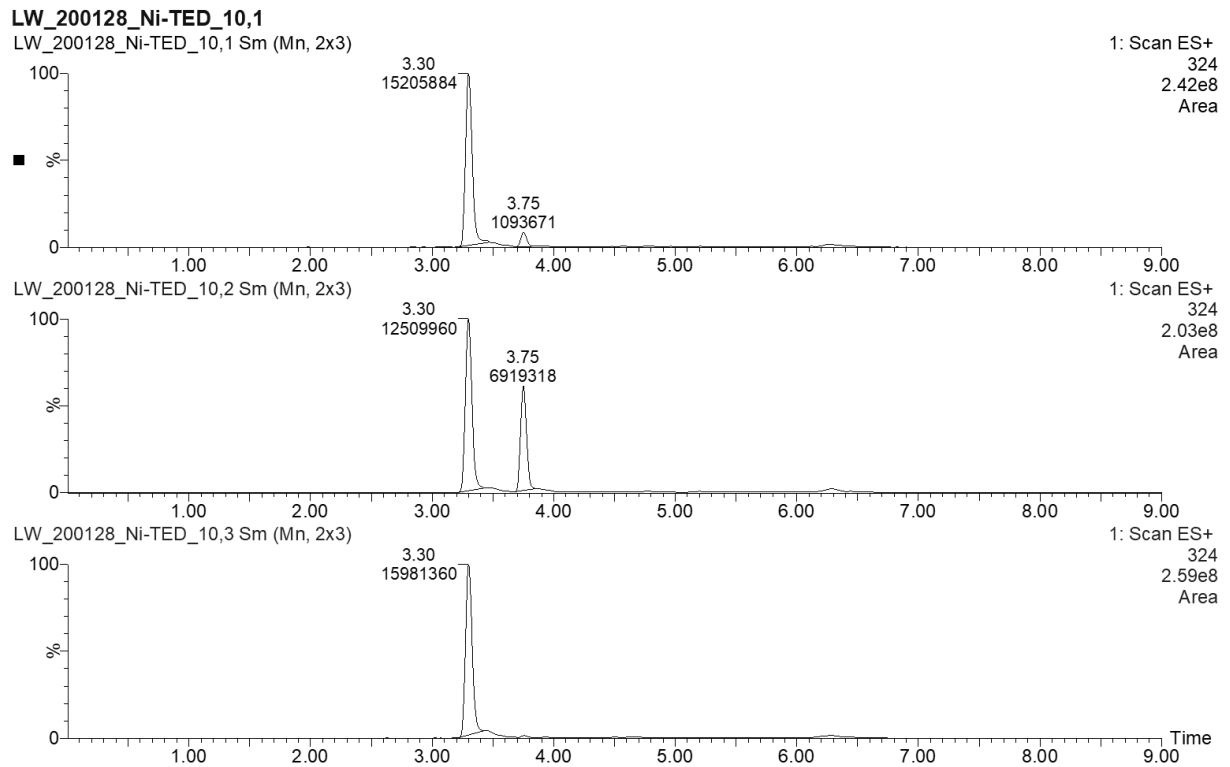


LW\_200128\_Ni-TED\_9,3 Sm (Mn, 2x3)



**Abbildung 8-121. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem neunten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.





**Abbildung 8-122. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von Ni-TED-AmbDH3 mit Substrat 163 nach dem zehnten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und Ni-TED-AmbDH3 in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

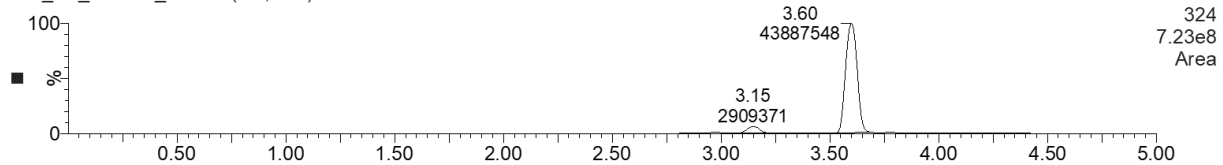
8.6.6.2. Enzymaktivitätstests mit AmbDH3-CLEA

## 8.6.6.2.1. Optimierung der CLEA-Präparation und Reaktion

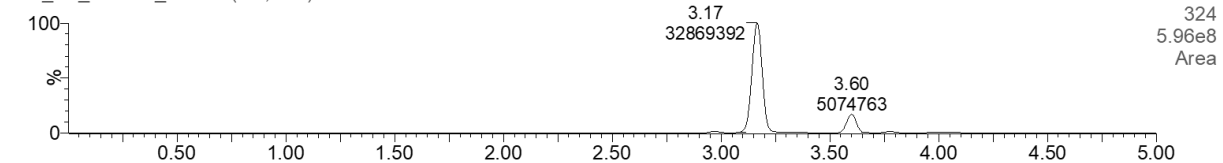
## 8.6.6.2.1.1. Reaktionspuffer und GA-Konzentration

**LW\_LH\_170818\_B1**

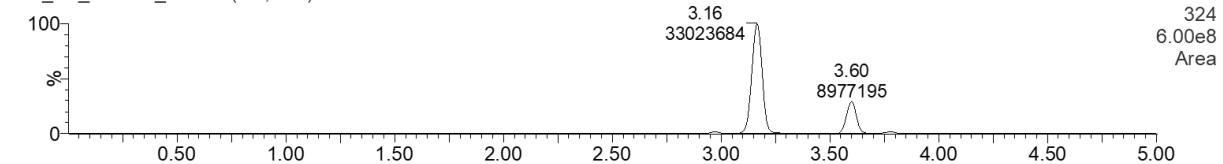
LW\_LH\_170818\_B1 Sm (Mn, 2x3)



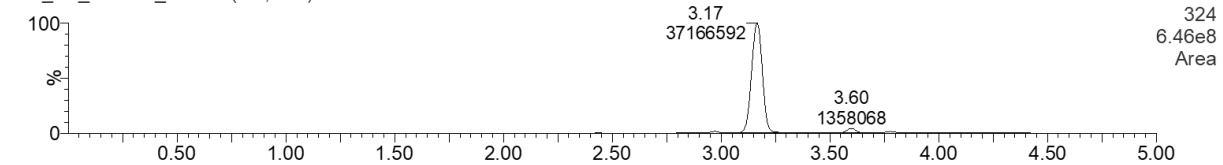
LW\_LH\_170818\_B2 Sm (Mn, 2x3)



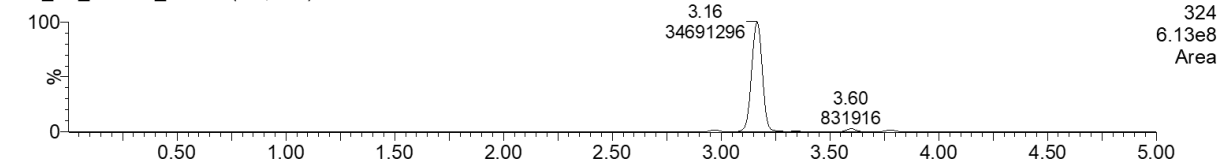
LW\_LH\_170818\_B3 Sm (Mn, 2x3)



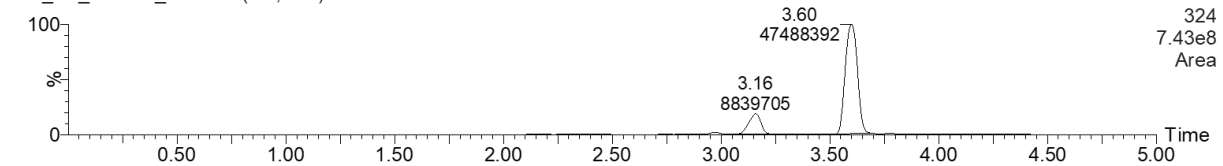
LW\_LH\_170818\_B4 Sm (Mn, 2x3)



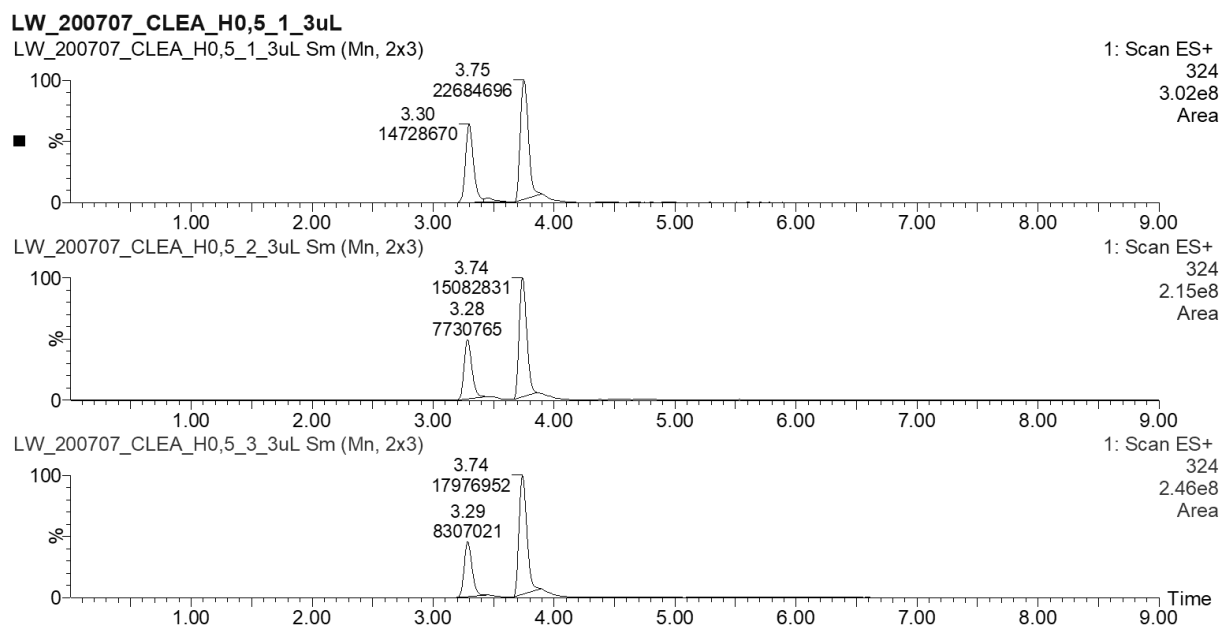
LW\_LH\_170818\_B5 Sm (Mn, 2x3)



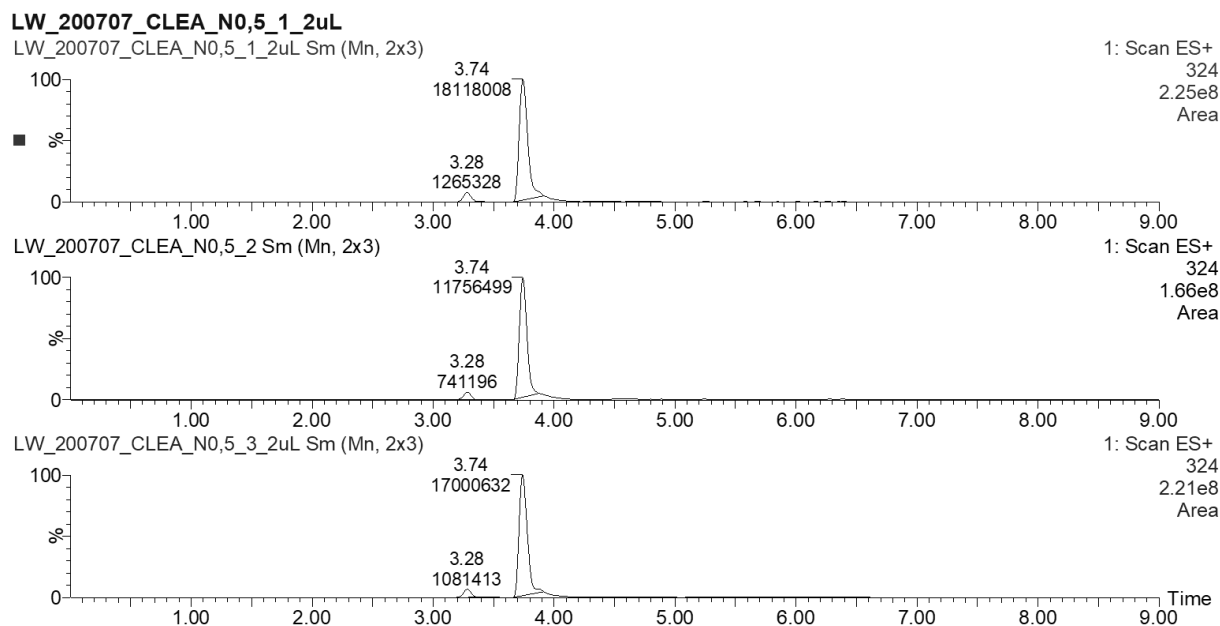
LW\_LH\_170818\_B6b Sm (Mn, 2x3)



**Abbildung 8-123. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Die Reaktionen wurden mit verschiedenen Fraktionen der CLEA-Präparation durchgeführt (von oben nach unten): Lysat; nach Ammoniumsulfatfällung; Waschfraktion 1; Waschfraktion 2; Waschfraktion 3; AmbDH3-CLEA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.15–3.17 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.60 min.



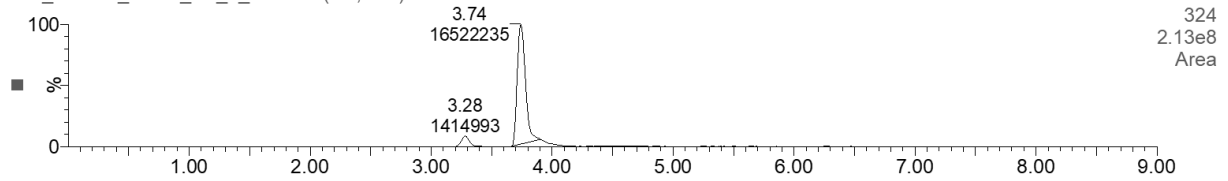
**Abbildung 8-124. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Das Crosslinking von AmbDH3 erfolgte mit 0.5% GA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in HEPES-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28–3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74–3.75 min.



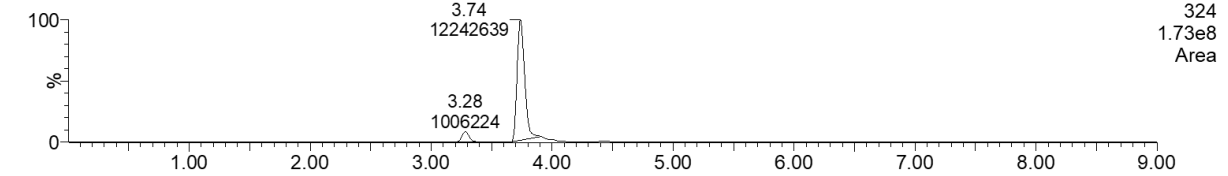
**Abbildung 8-125. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Das Crosslinking von AmbDH3 erfolgte mit 0.5% GA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74 min.

## LW\_200707\_CLEA\_N1\_1\_2uL

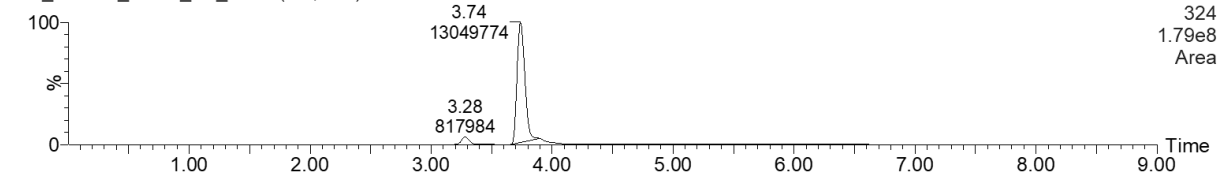
LW\_200707\_CLEA\_N1\_1\_2uL Sm (Mn, 2x3)



## LW\_200707\_CLEA\_N1\_2 Sm (Mn, 2x3)



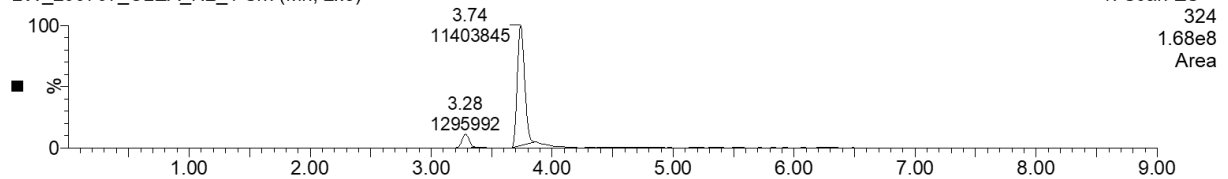
## LW\_200707\_CLEA\_N1\_3 Sm (Mn, 2x3)



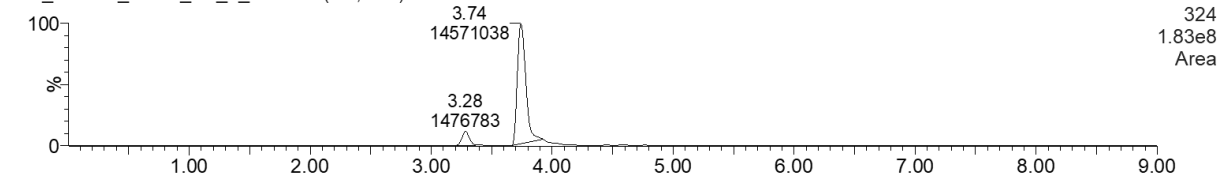
**Abbildung 8-126. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Das Crosslinking von AmbDH3 erfolgte mit 1.0% GA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74 min.

## LW\_200707\_CLEA\_N2\_1

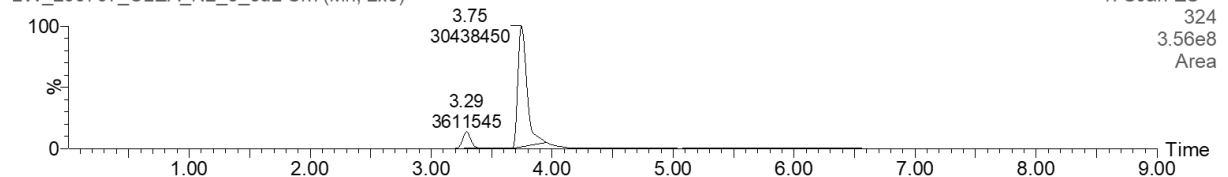
LW\_200707\_CLEA\_N2\_1 Sm (Mn, 2x3)



## LW\_200707\_CLEA\_N2\_2\_2uL Sm (Mn, 2x3)



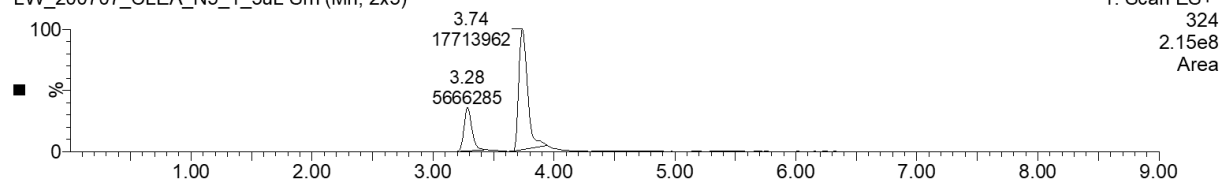
## LW\_200707\_CLEA\_N2\_3\_3uL Sm (Mn, 2x3)



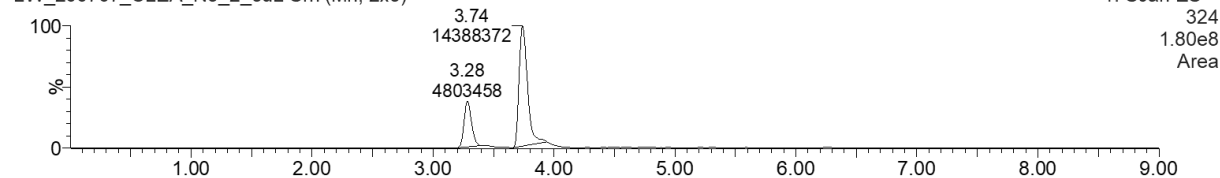
**Abbildung 8-127. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Das Crosslinking von AmbDH3 erfolgte mit 2.0% GA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28–3.29 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74–3.75 min.

## LW\_200707\_CLEA\_N5\_1\_3uL

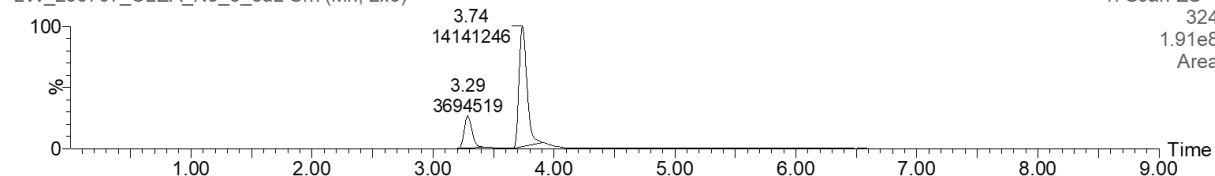
LW\_200707\_CLEA\_N5\_1\_3uL Sm (Mn, 2x3)



LW\_200707\_CLEA\_N5\_2\_3uL Sm (Mn, 2x3)



LW\_200707\_CLEA\_N5\_3\_3uL Sm (Mn, 2x3)

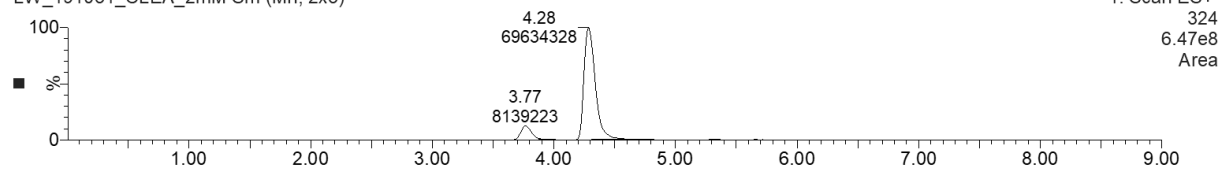


**Abbildung 8-128. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Das Crosslinking von AmbDH3 erfolgte mit 5% GA. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28–3.29 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74 min.

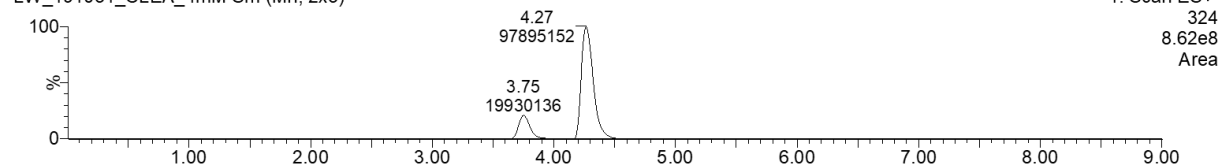
## 8.6.6.2.1.2. Substratkonzentration und Reaktionsvolumen

## LW\_191031\_CLEA\_2mM

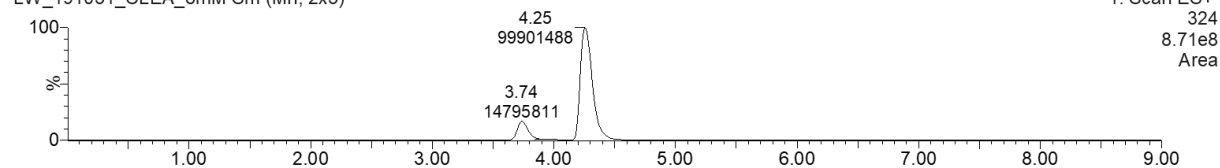
LW\_191031\_CLEA\_2mM Sm (Mn, 2x3)



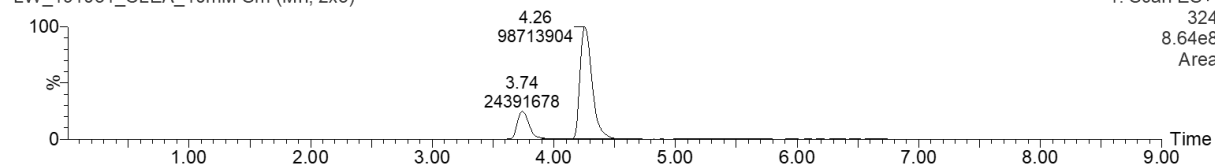
LW\_191031\_CLEA\_4mM Sm (Mn, 2x3)



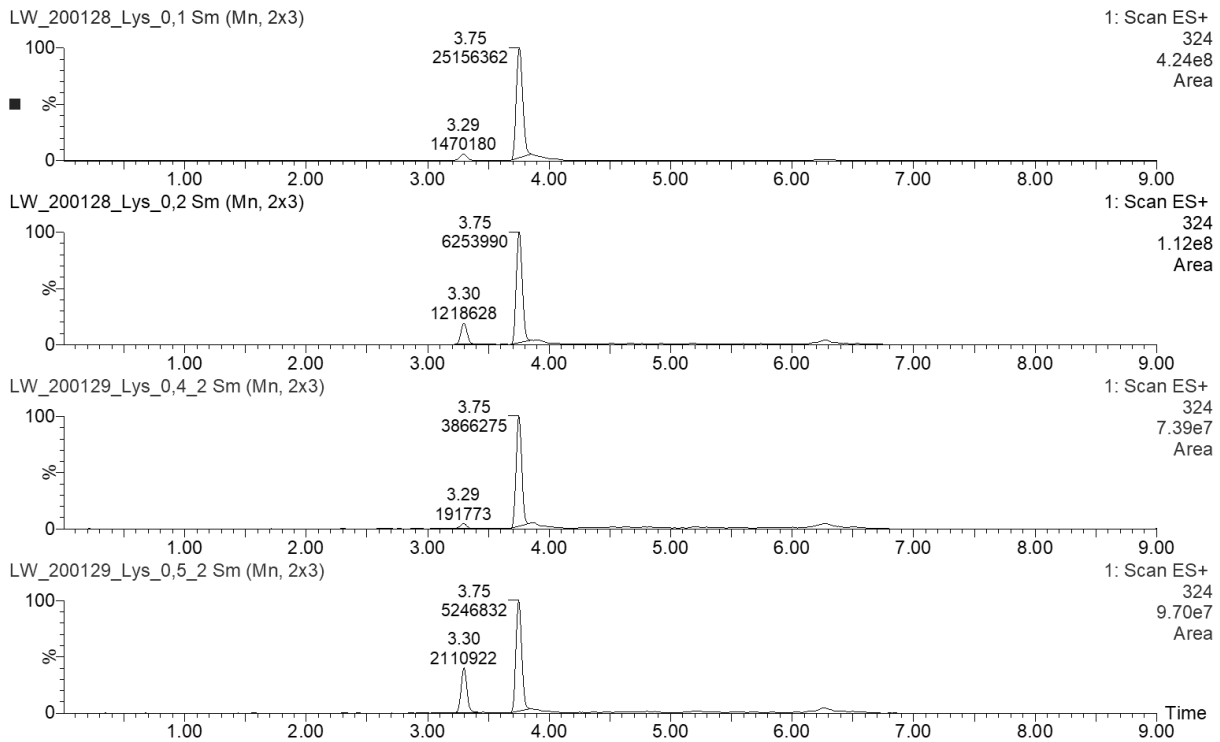
LW\_191031\_CLEA\_8mM Sm (Mn, 2x3)



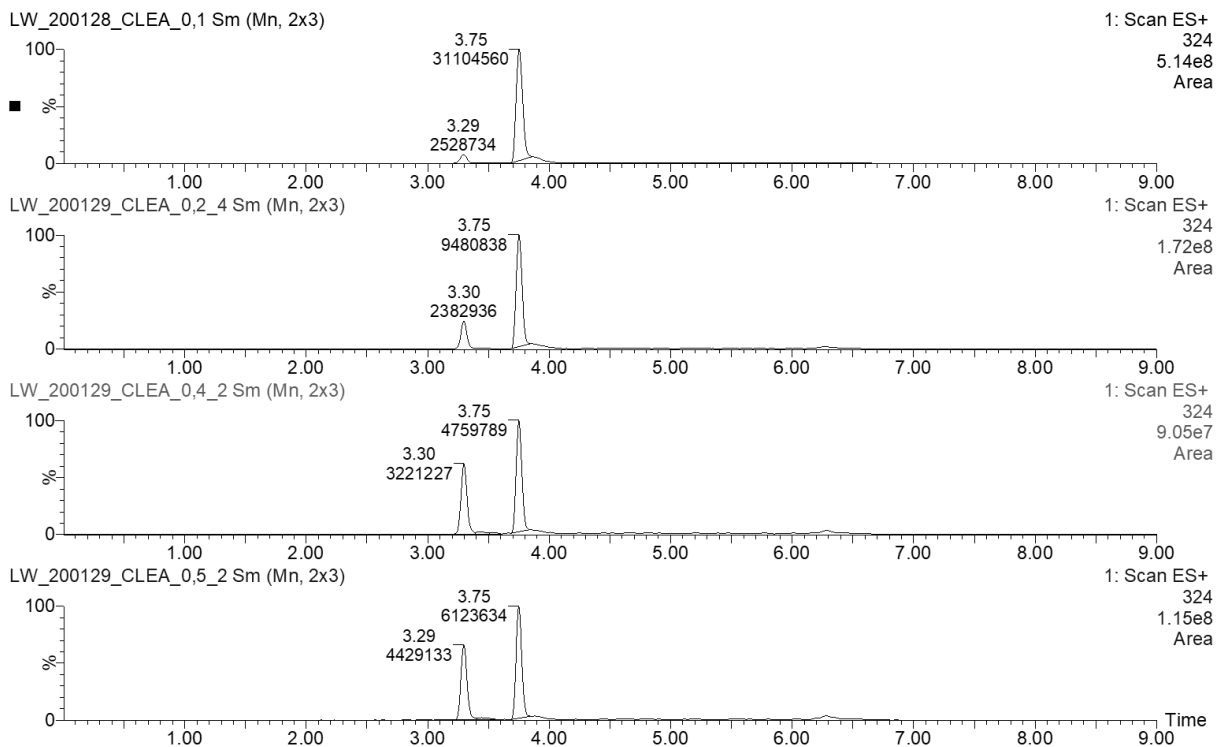
LW\_191031\_CLEA\_10mM Sm (Mn, 2x3)



**Abbildung 8-129. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 (A), 4 (B), 8 (C) bzw. 10 mM (D)) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.74–3.77 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.25–4.28 min.

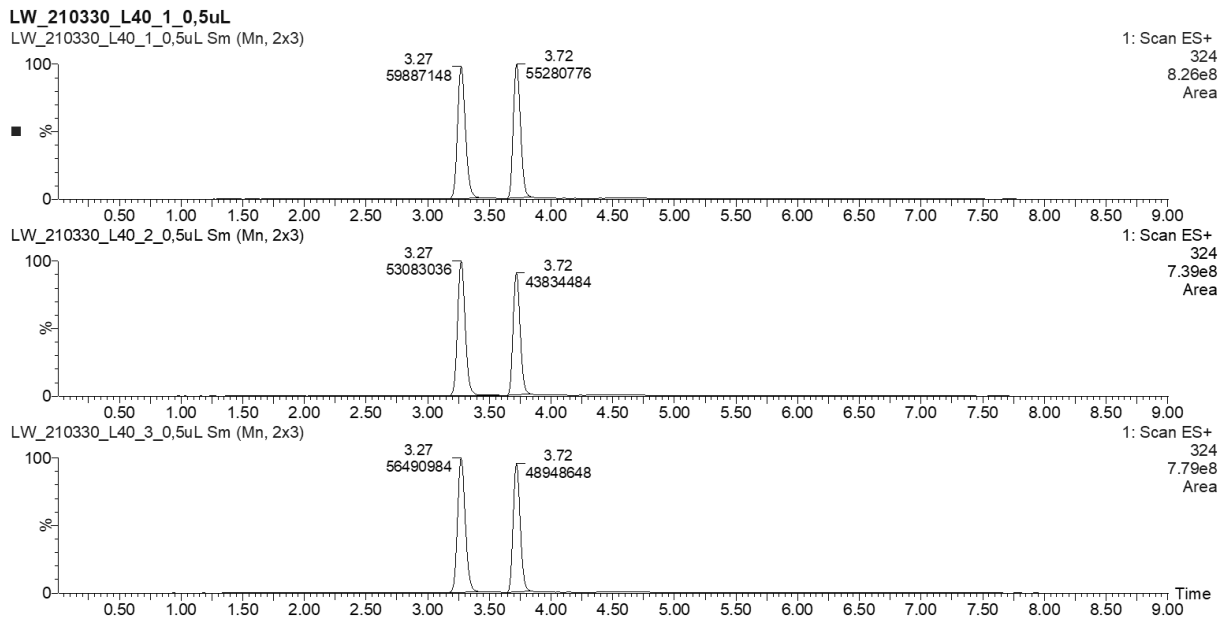


**Abbildung 8-130. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 (A; 332 nmol), 0.2 (B; 664 nmol), 0.4 (C; 1329 nmol) bzw. 0.5 mg (D; 1661 nmol) Substrat 163 (Startkonzentration 2 (A), 4 (B), 8 (C) bzw. 10 mM (D)) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (163) = 3.29–3.30 min,  $t_R$  (cis-164) = 3.75 min.

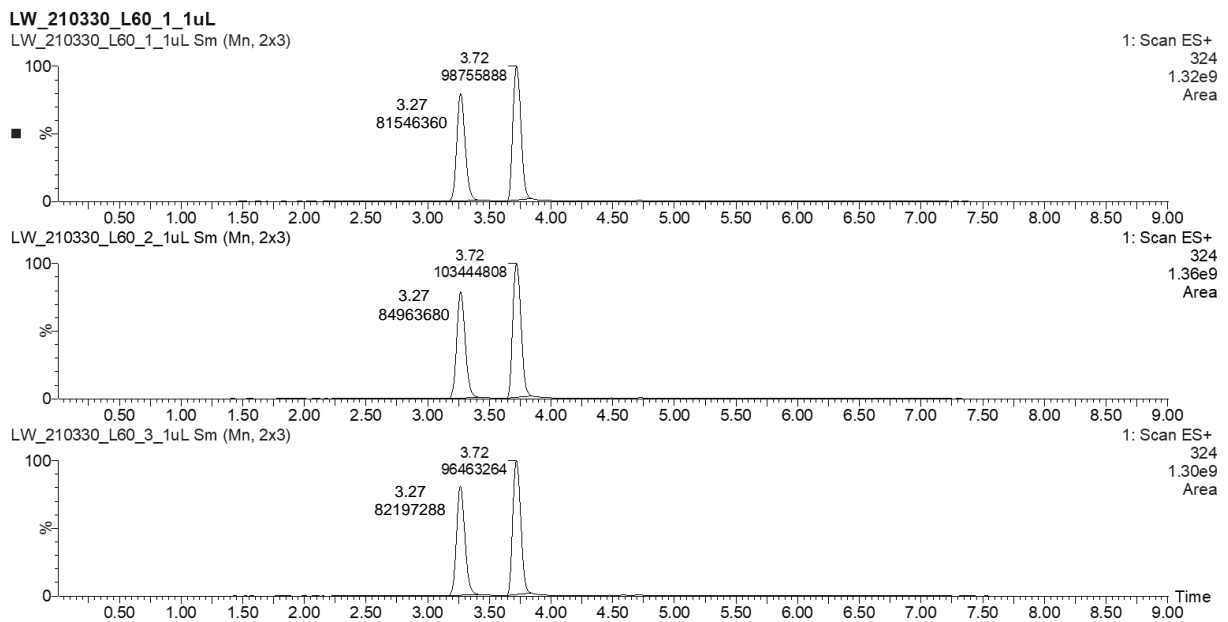


**Abbildung 8-131. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 (A; 332 nmol), 0.2 (B; 664 nmol), 0.4 (C; 1329 nmol) bzw. 0.5 mg (D; 1661 nmol) Substrat 163 (Startkonzentration 2 (A), 4 (B), 8 (C) bzw. 10 mM (D)) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (163) = 3.29–3.30 min,  $t_R$  (cis-164) = 3.75 min.



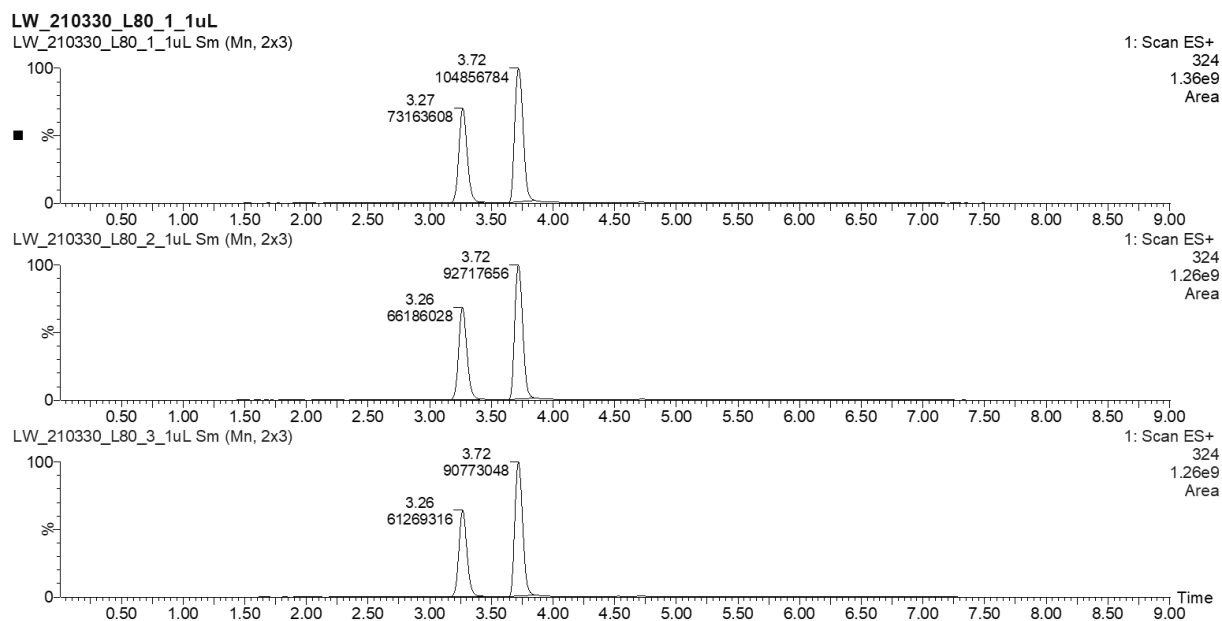


**Abbildung 8-134. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach 40 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3* bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

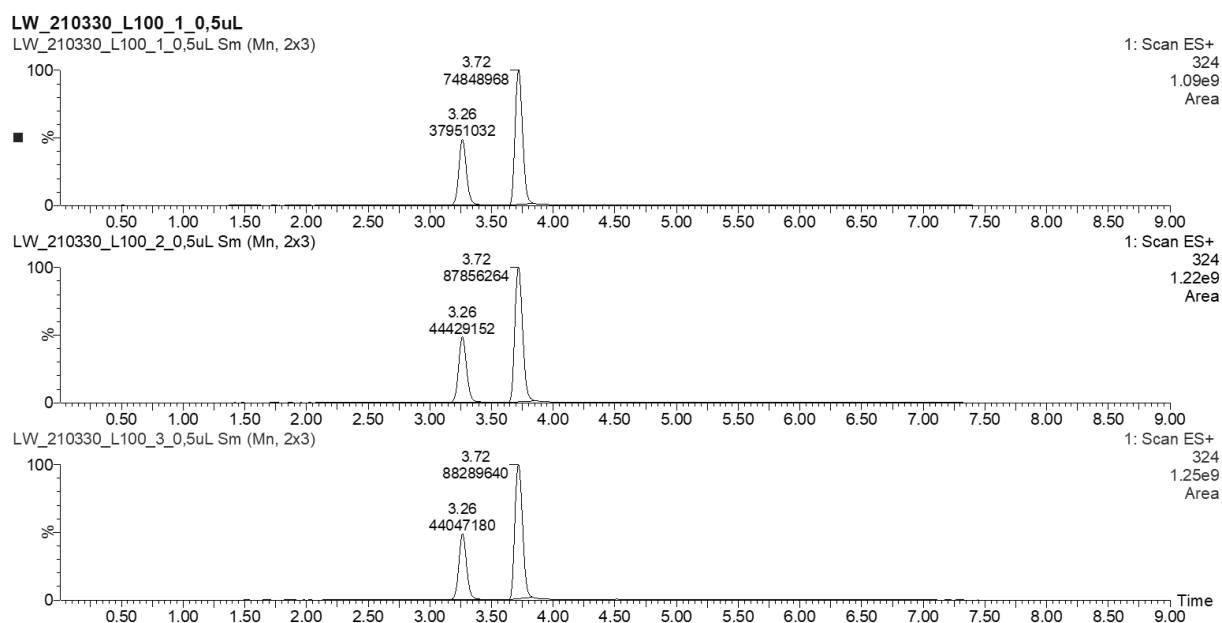


**Abbildung 8-135. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach 60 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3* bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

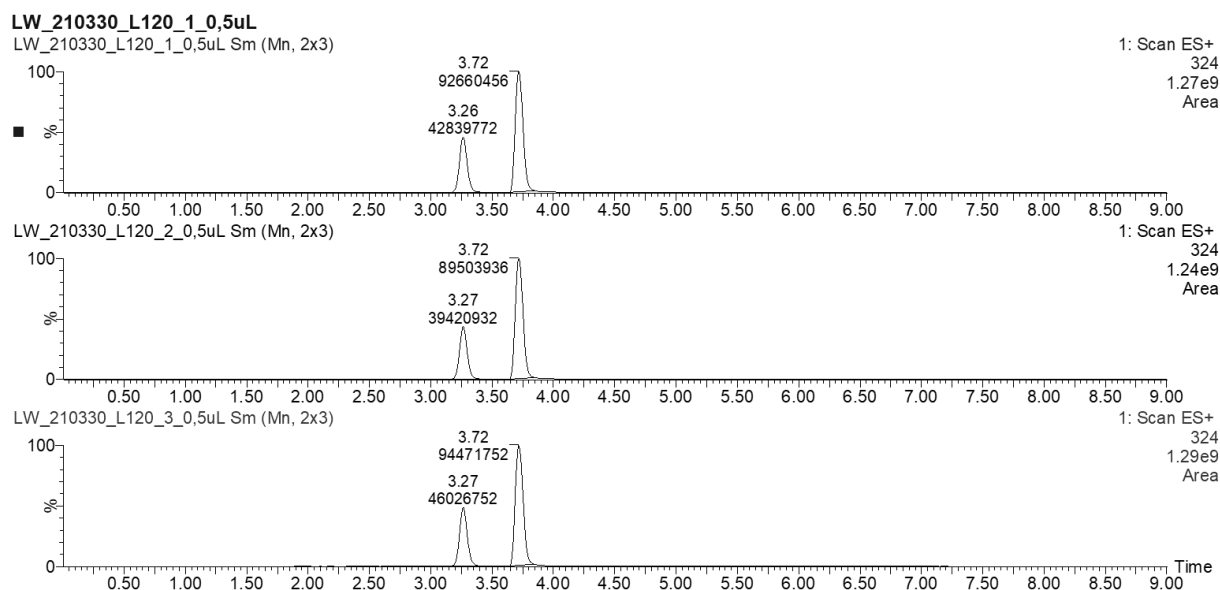




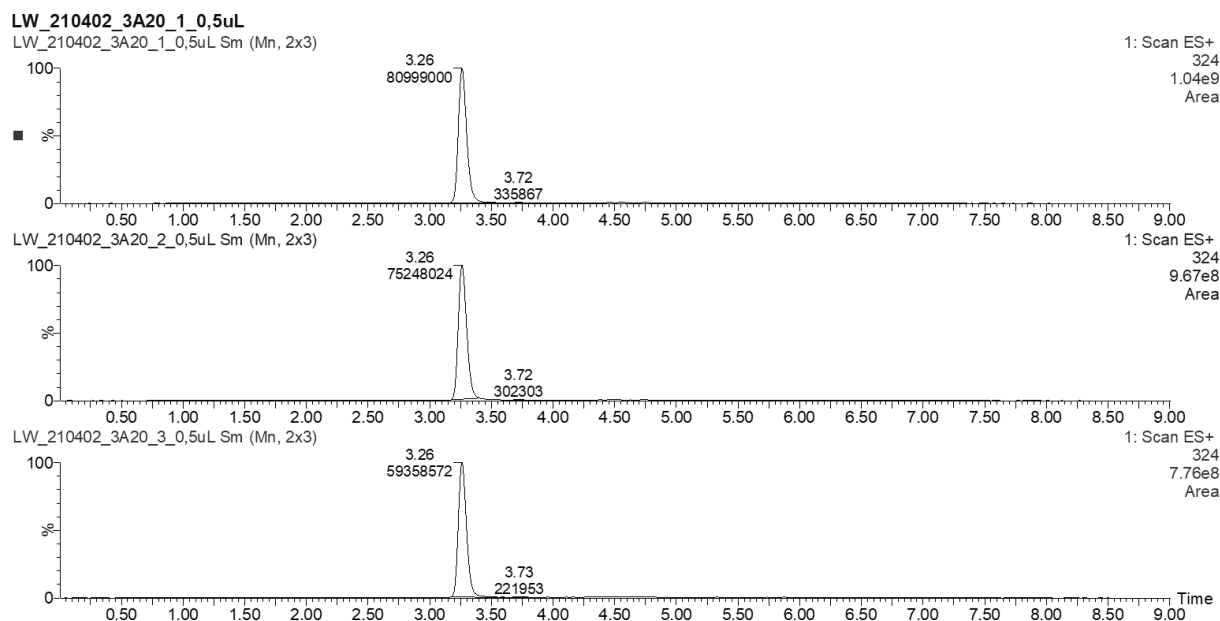
**Abbildung 8-136. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach 80 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3* bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



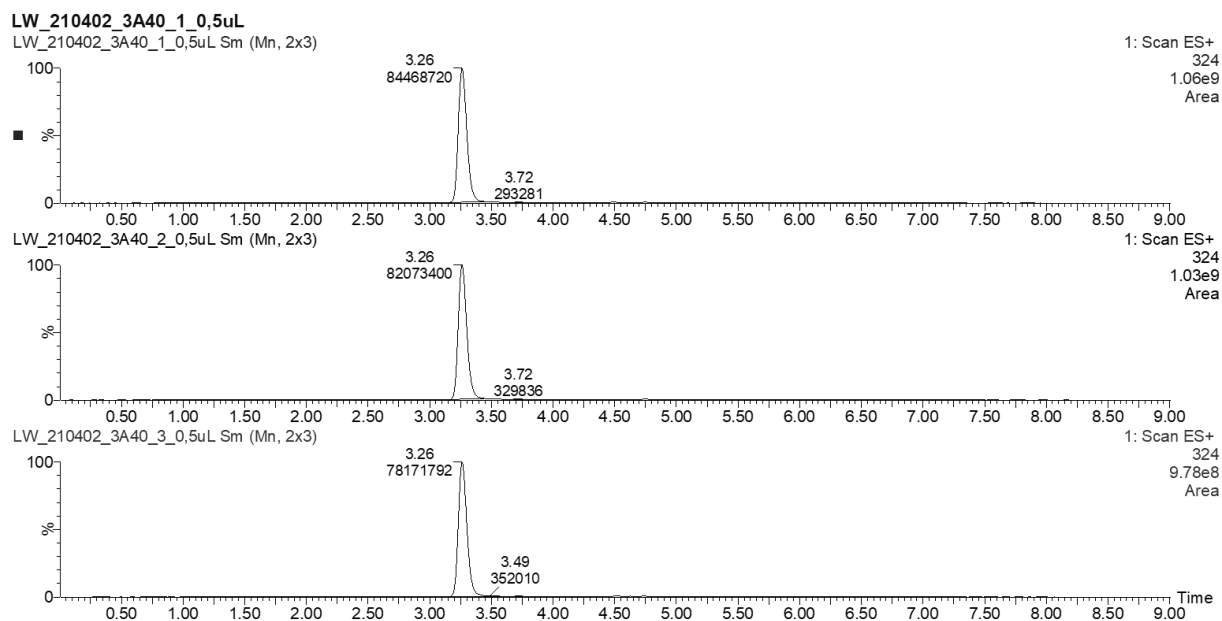
**Abbildung 8-137. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach 100 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3* bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



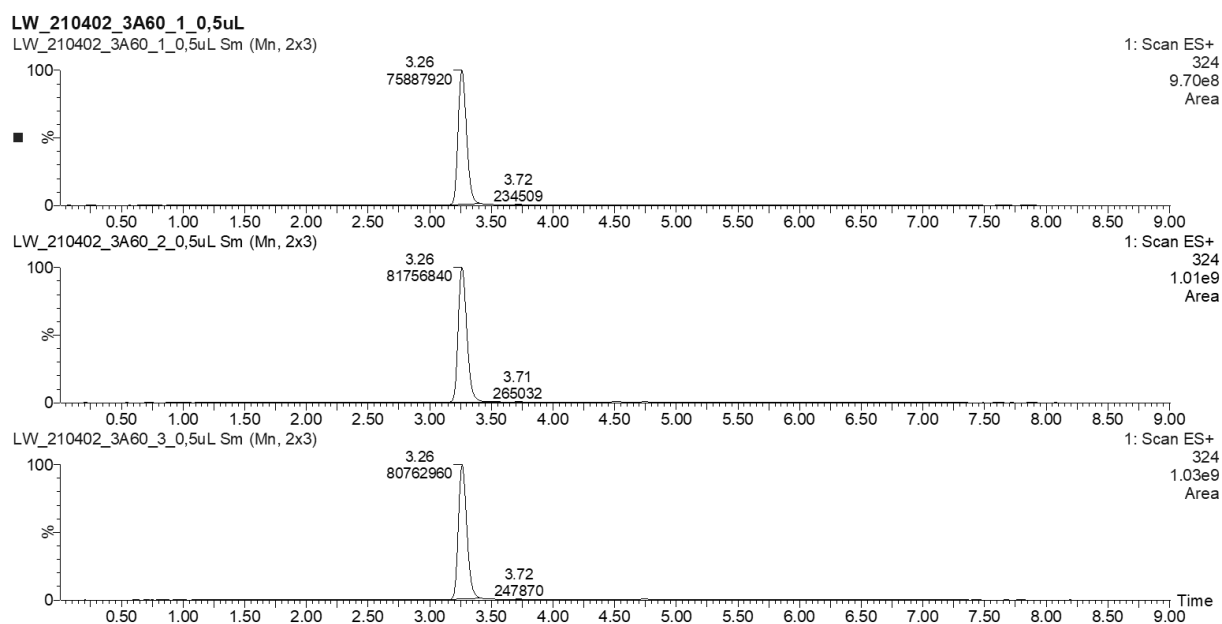
**Abbildung 8-138. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 nach 120 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und Lysat von *E. coli* BL21 pET28a(+)-*ambDH3* bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



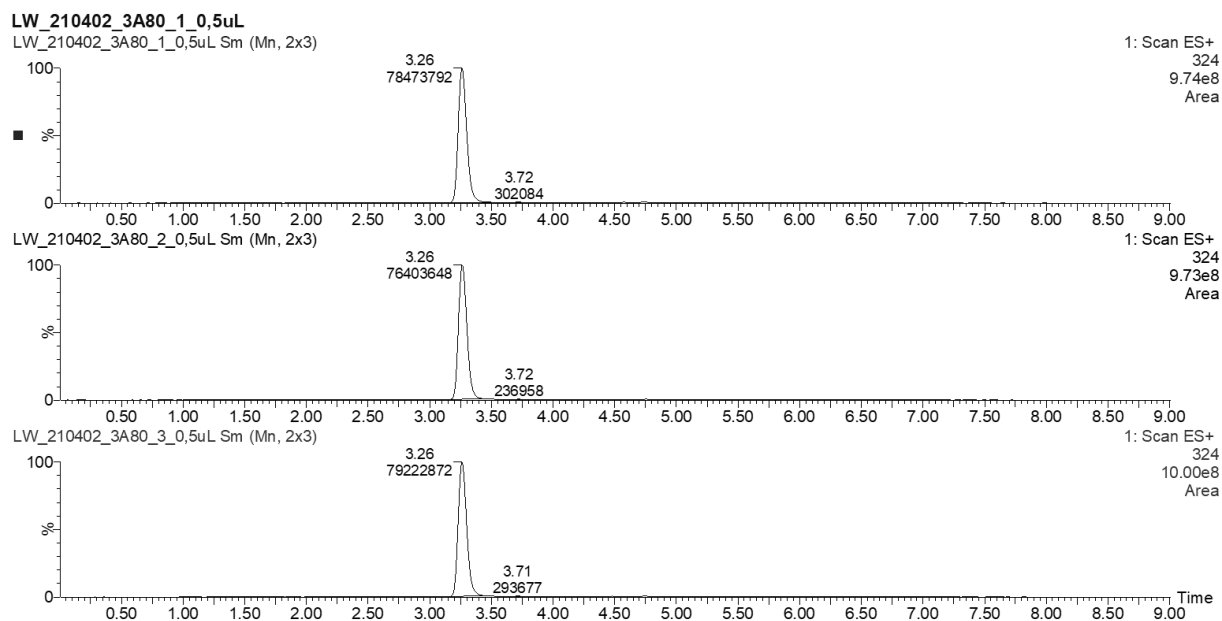
**Abbildung 8-139. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 20 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72–3.73 min.



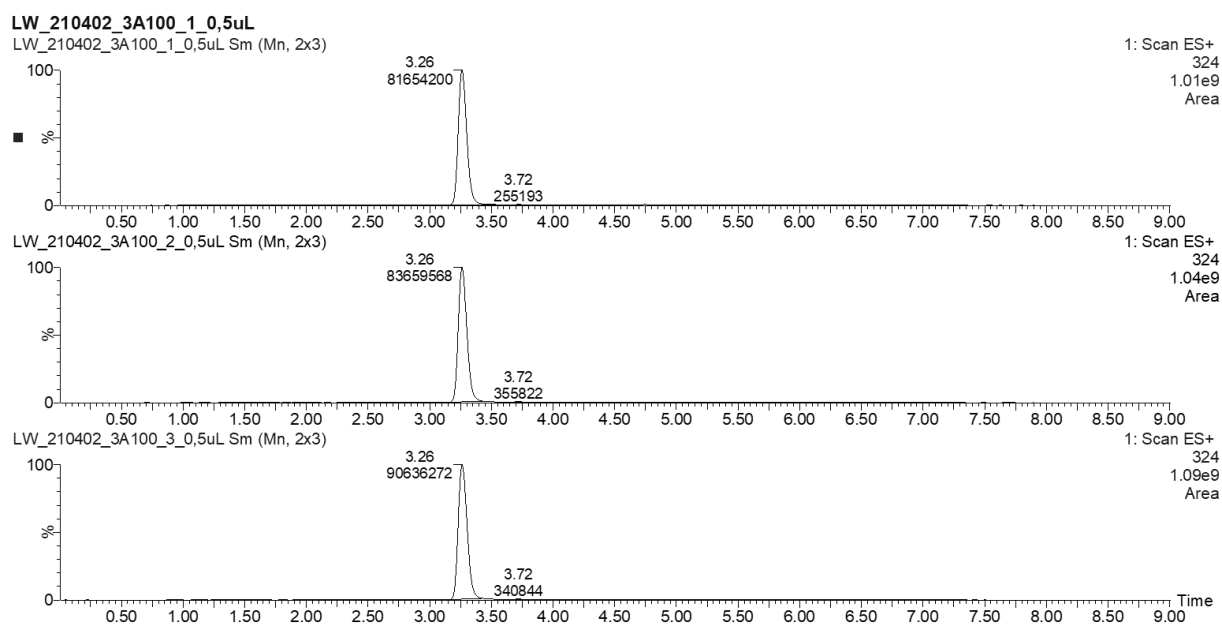
**Abbildung 8-140. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 40 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



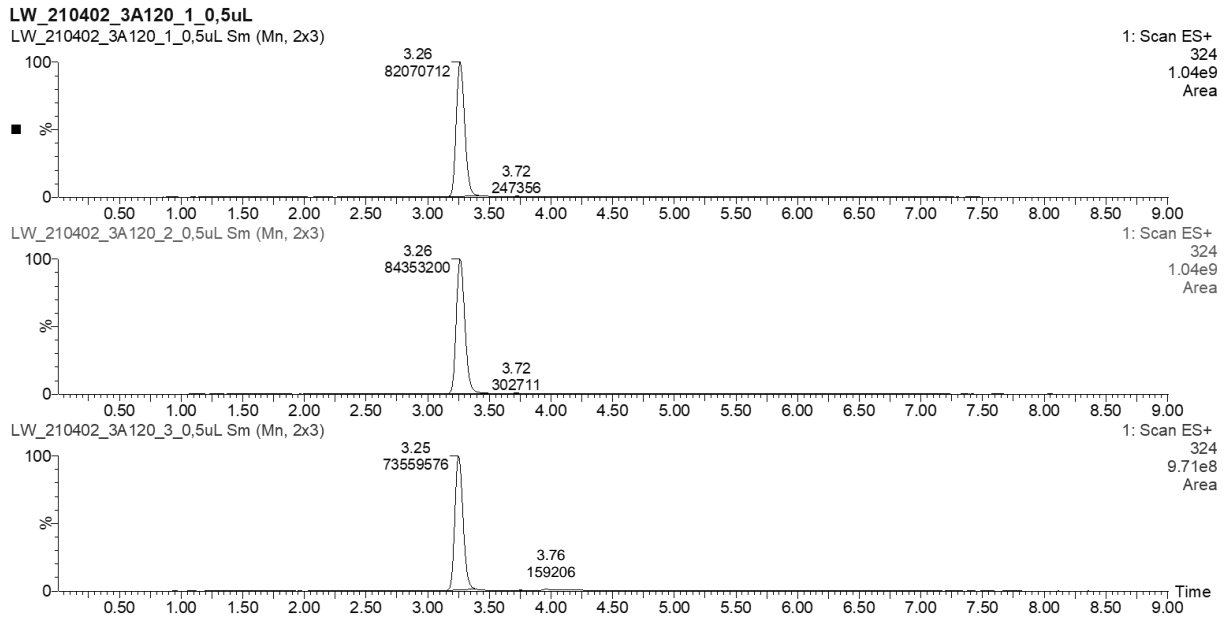
**Abbildung 8-141. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 60 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.71–3.72 min.



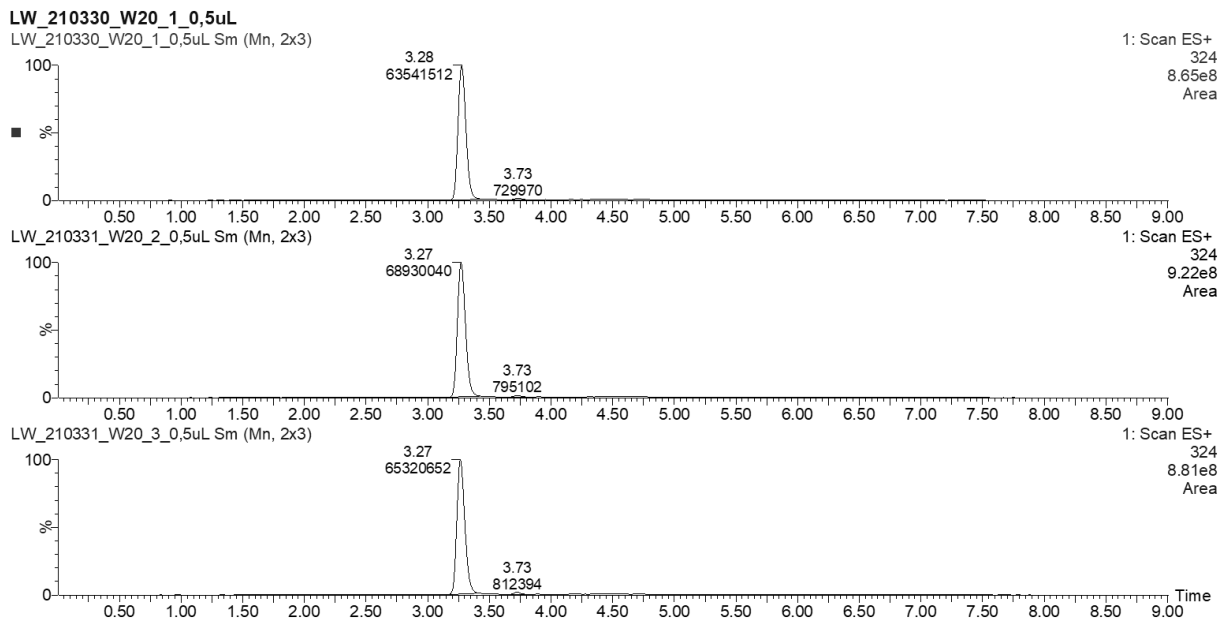
**Abbildung 8-142. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 80 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.71–3.72 min.



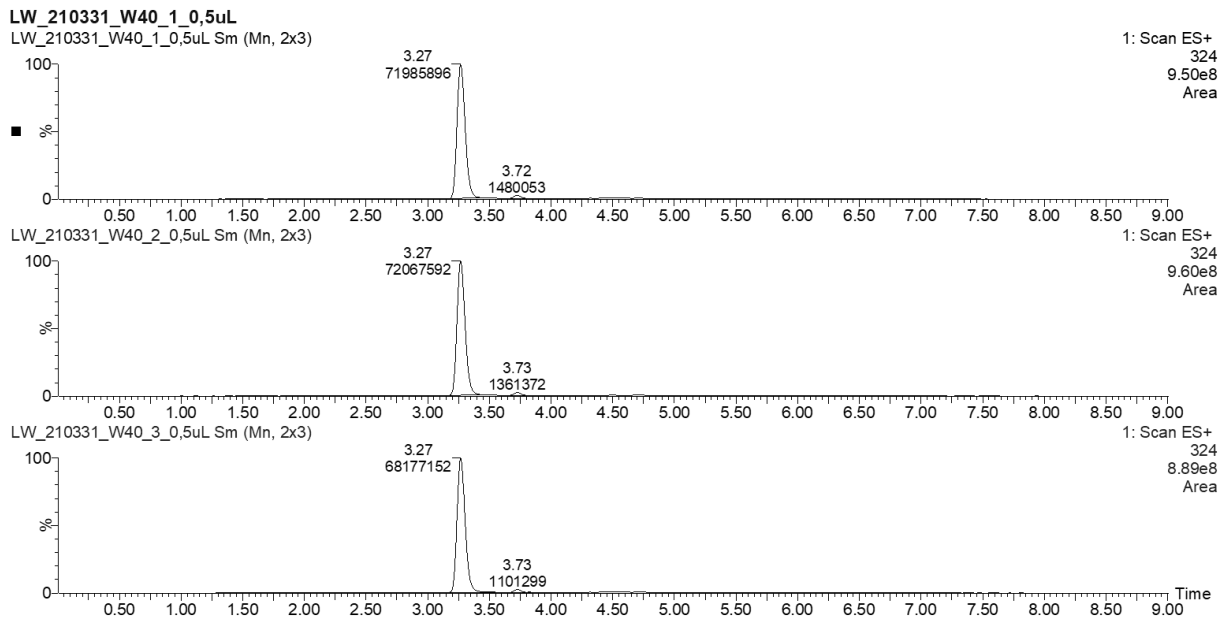
**Abbildung 8-143. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 100 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



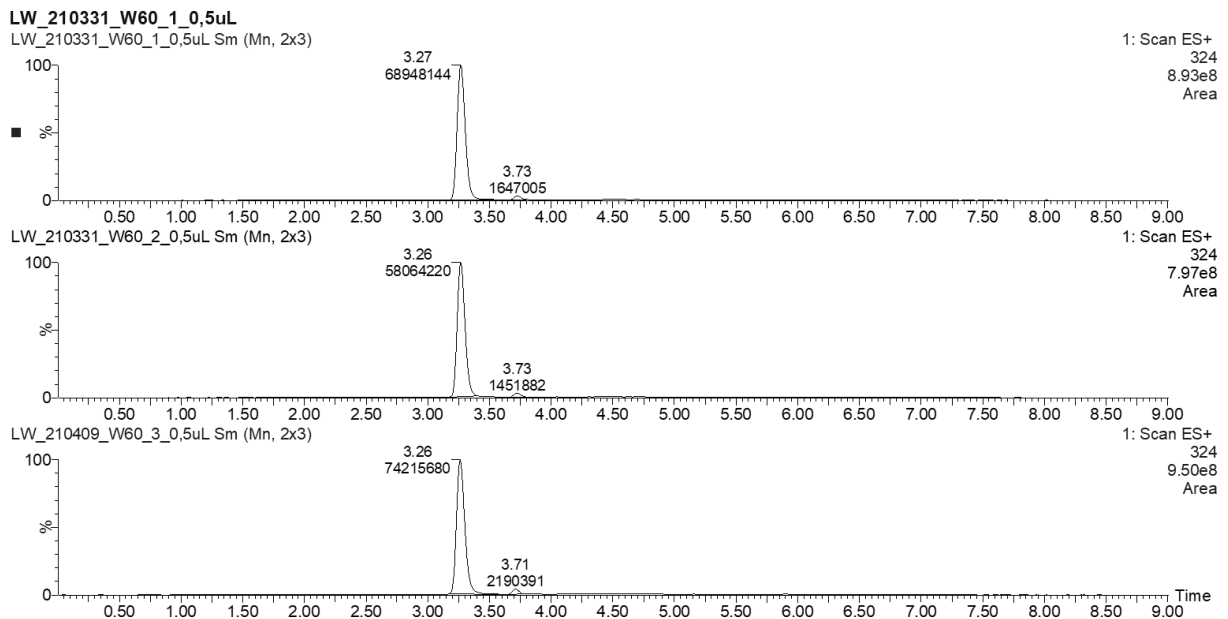
**Abbildung 8-144. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 120 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Fraktion nach Ammoniumsulfatfällung während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.25–3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



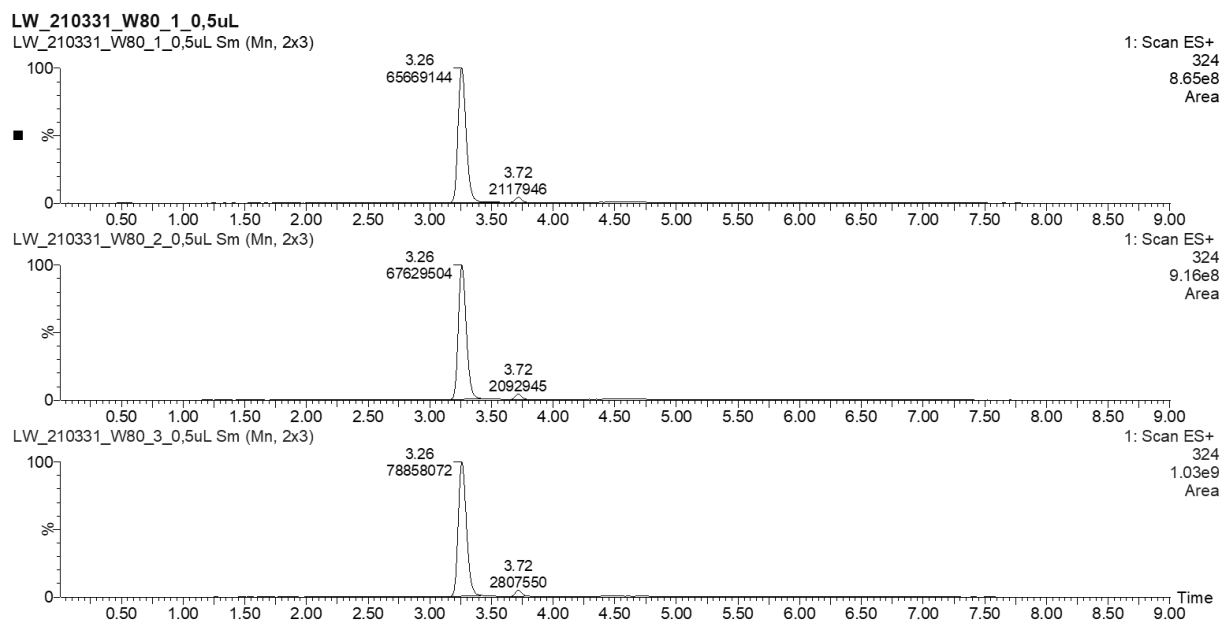
**Abbildung 8-145. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Waschfraktion während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 20 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Waschfraktion während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27–3.28 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.73 min.



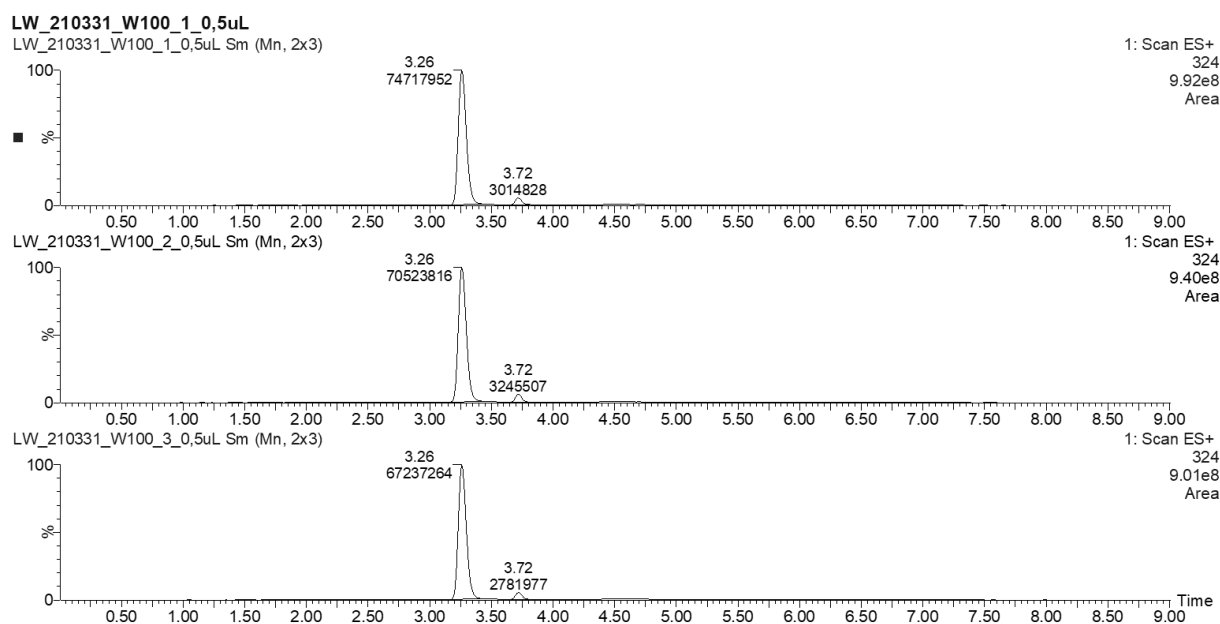
**Abbildung 8-146. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Waschfraktion während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 40 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Waschfraktion während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72–3.73 min.



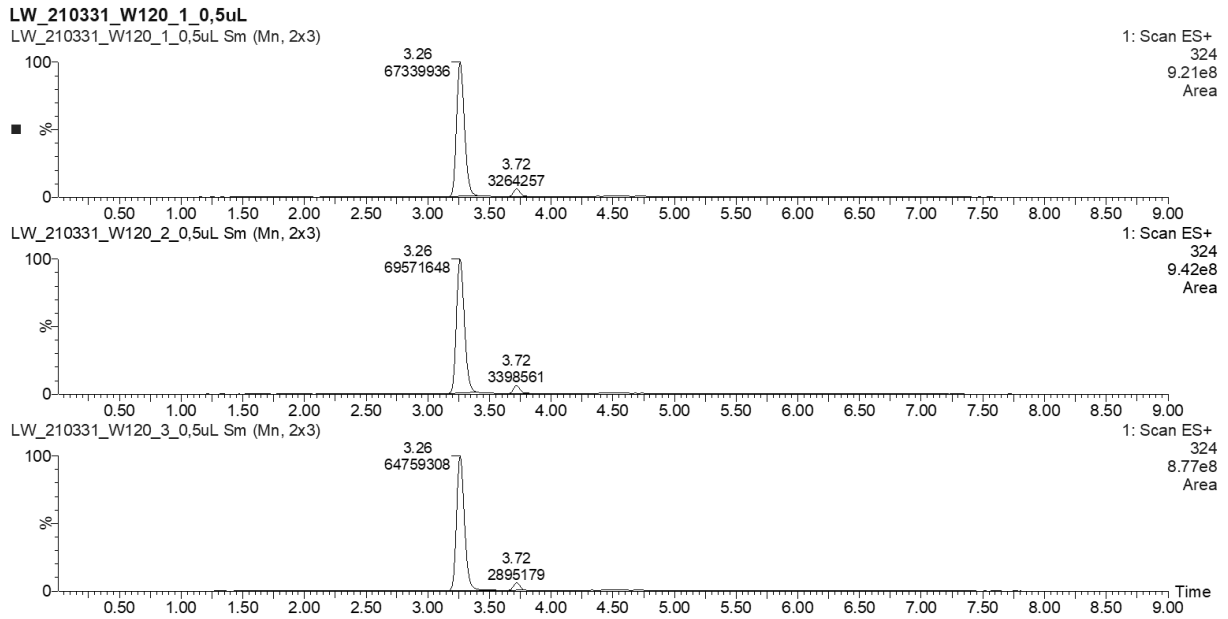
**Abbildung 8-147. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Waschfraktion während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 60 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Waschfraktion während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.71–3.73 min.



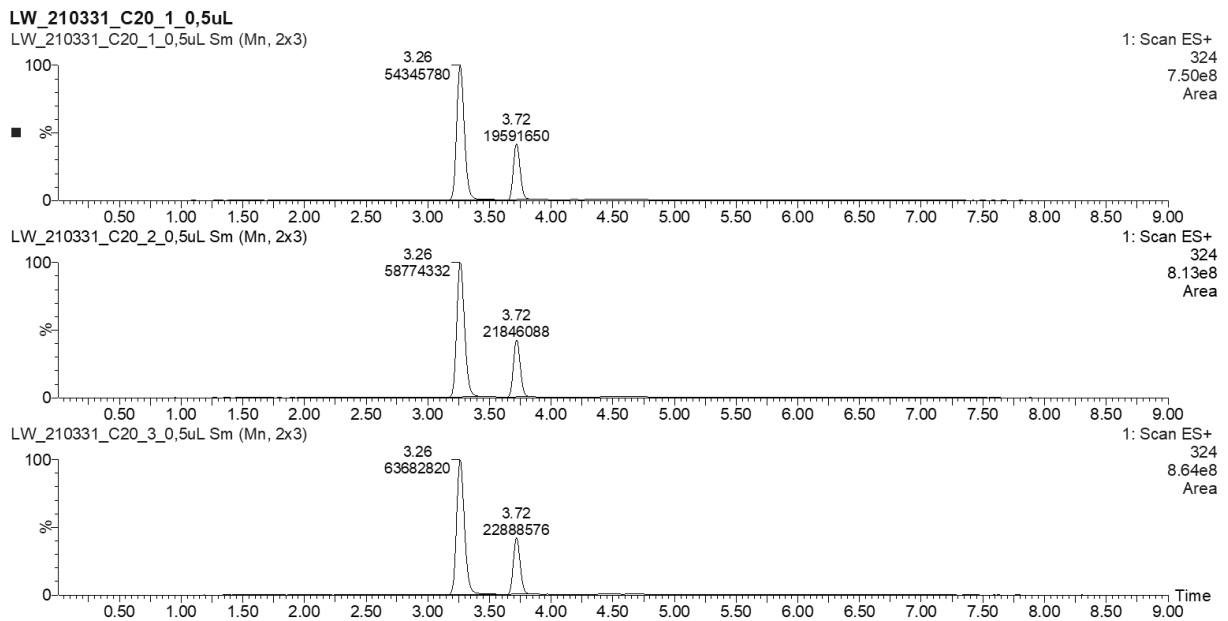
**Abbildung 8-148. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Waschfraktion während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 80 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Waschfraktion während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



**Abbildung 8-149. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Waschfraktion während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 100 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Waschfraktion während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

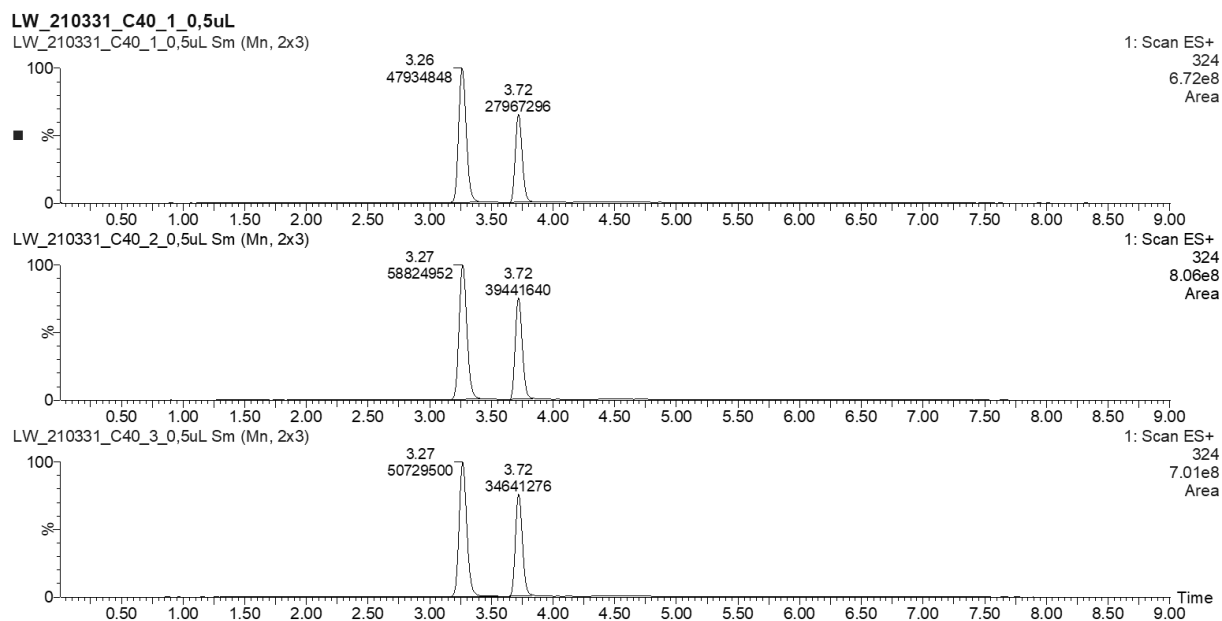


**Abbildung 8-150. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion der Waschfraktion während der Präparation von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 120 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und der Waschfraktion während der CLEA-Präparation bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

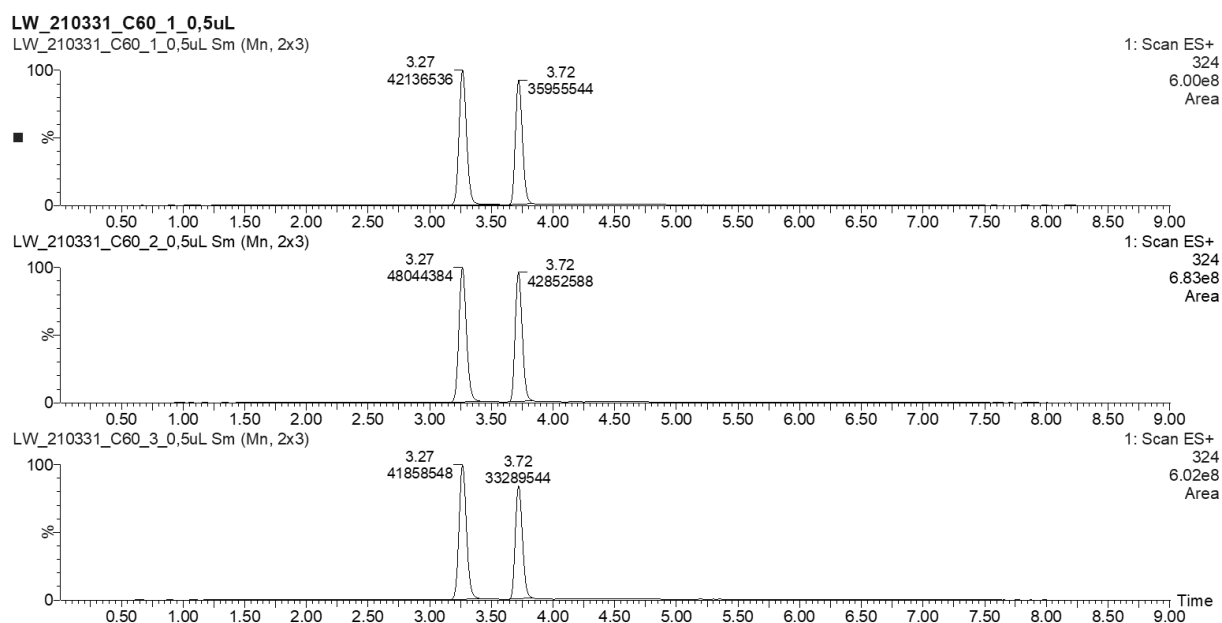


**Abbildung 8-151. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 20 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspür  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

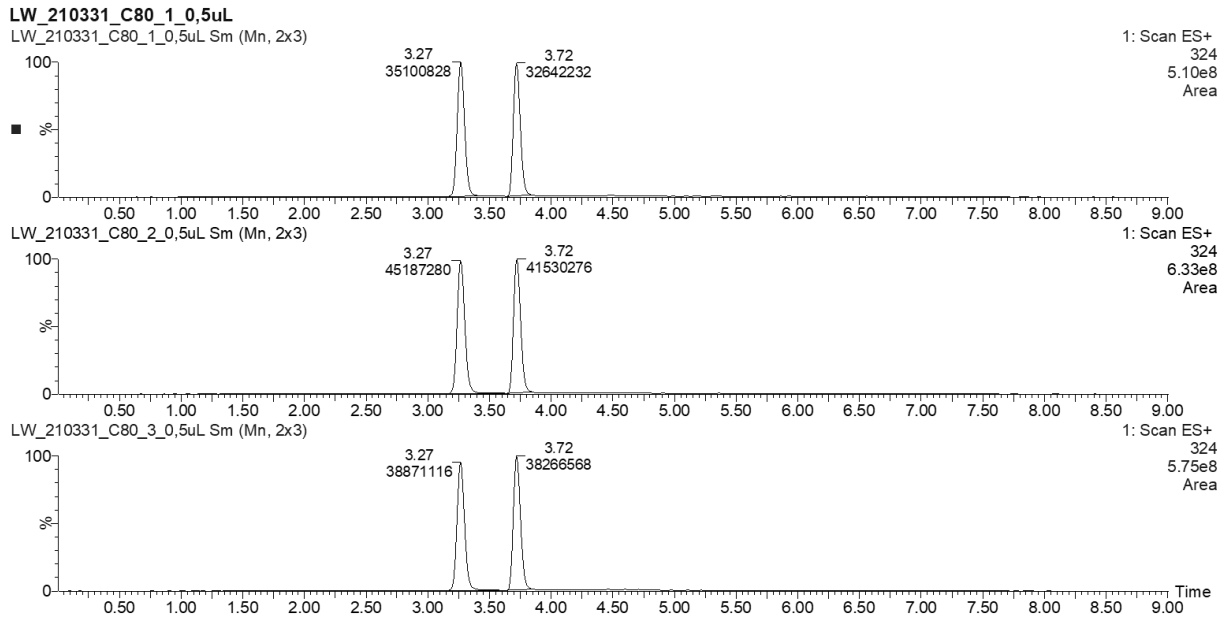




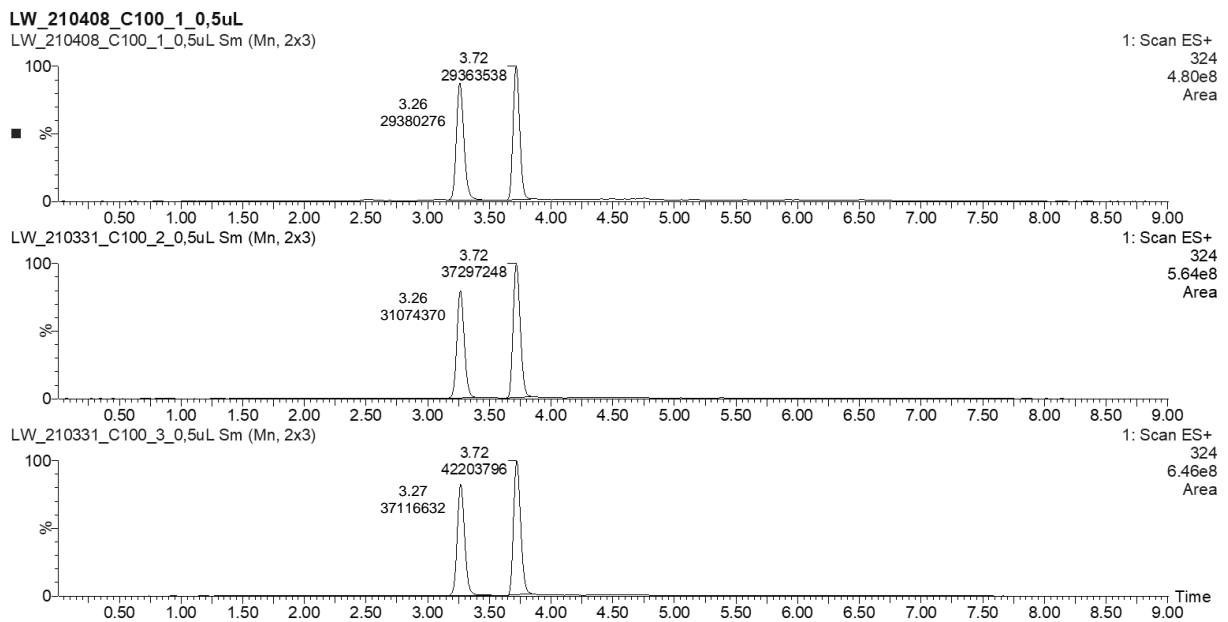
**Abbildung 8-152. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 40 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



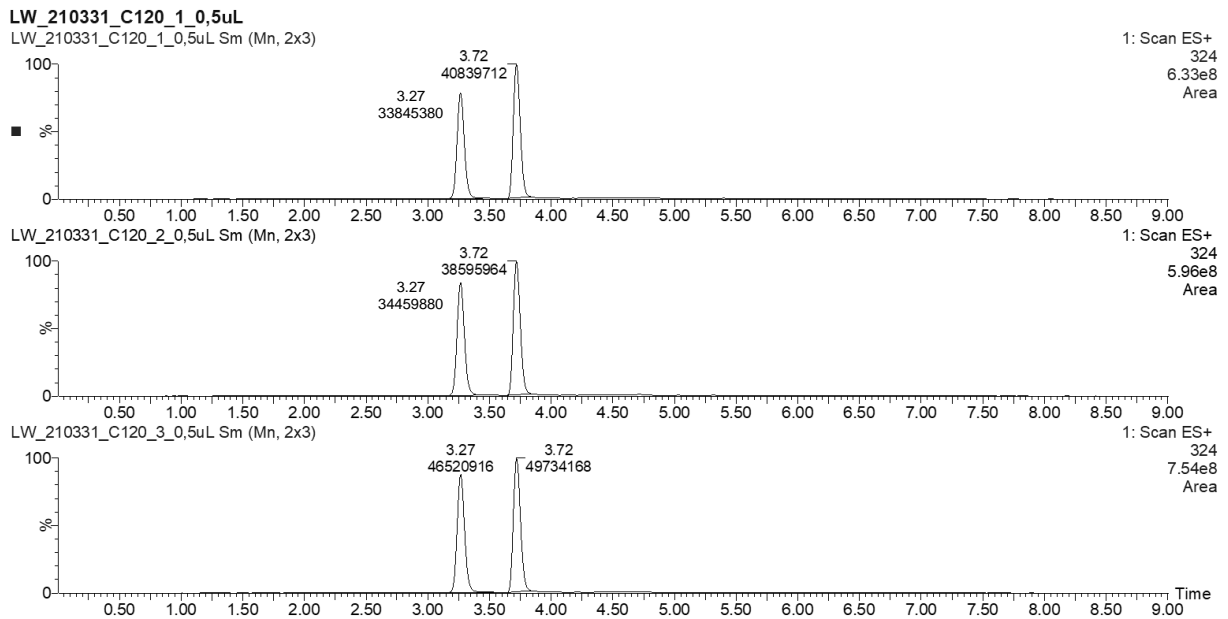
**Abbildung 8-153. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 60 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.



**Abbildung 8-154. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 80 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

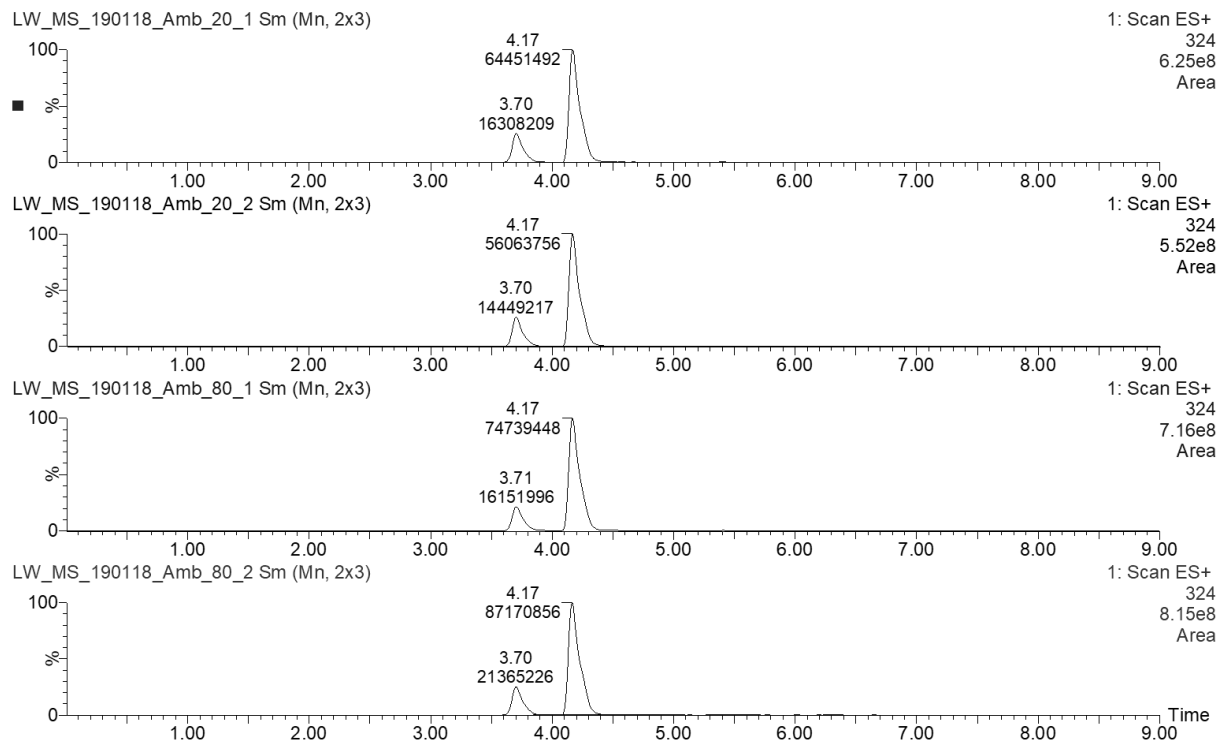


**Abbildung 8-155. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 100 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

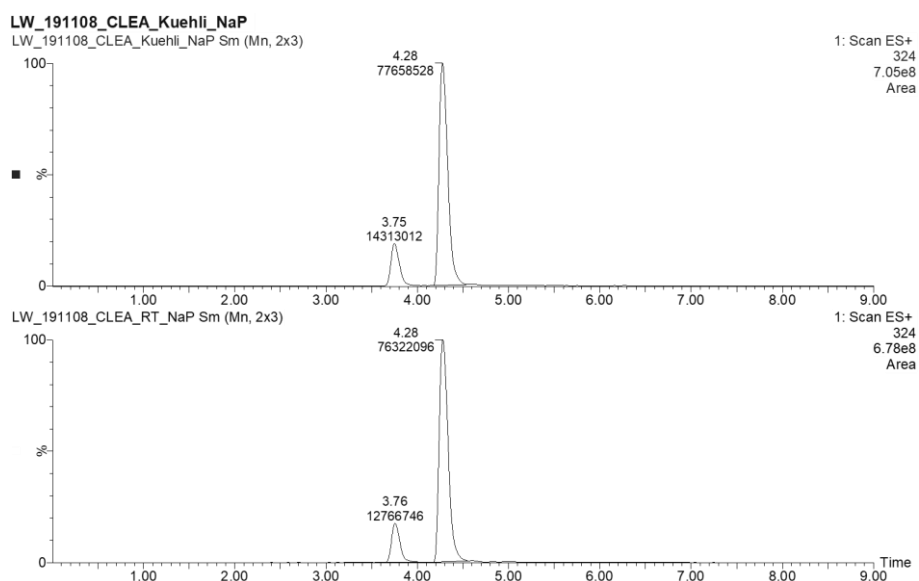


**Abbildung 8-156. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 120 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.72 min.

### 8.6.6.2.3. Lagerbarkeit

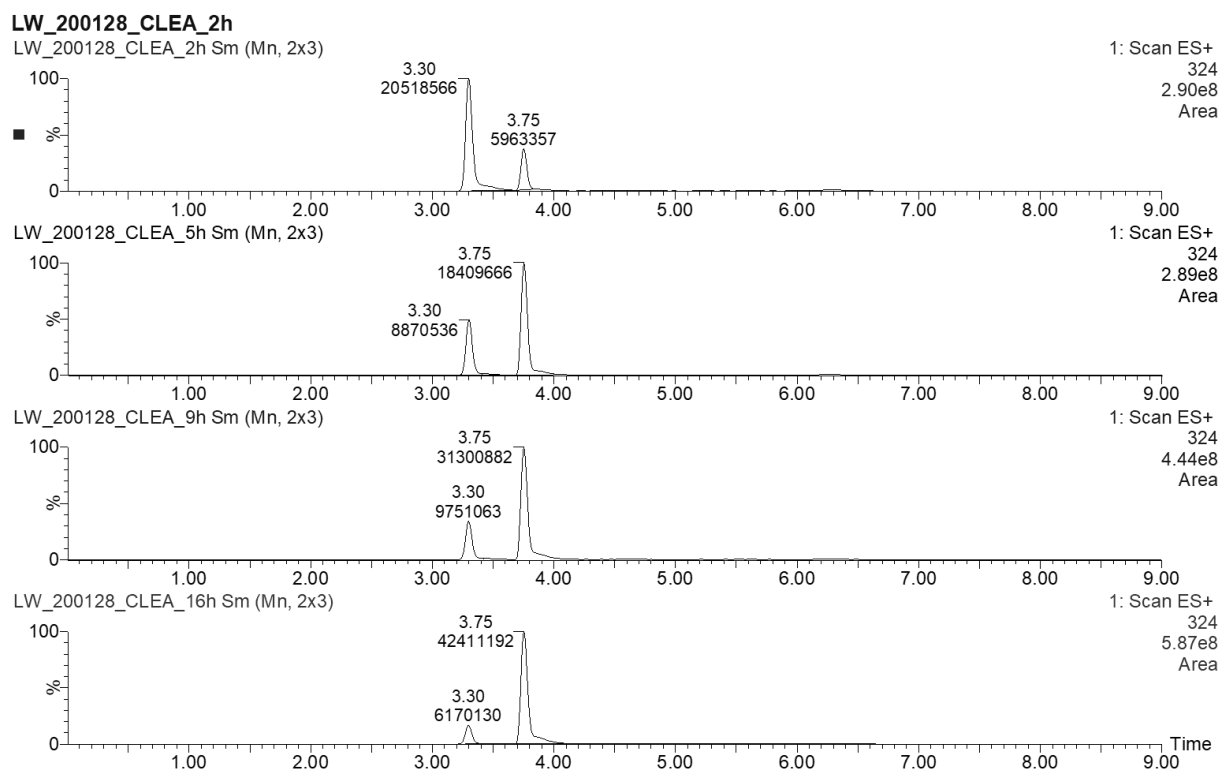


**Abbildung 8-157. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach Lagerung bei Minusgraden.** Die Lagerung des Enzyms erfolgte 1 d bei -20 °C (A+B) bzw. -80 °C (C+D). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.70–3.71 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.17 min.



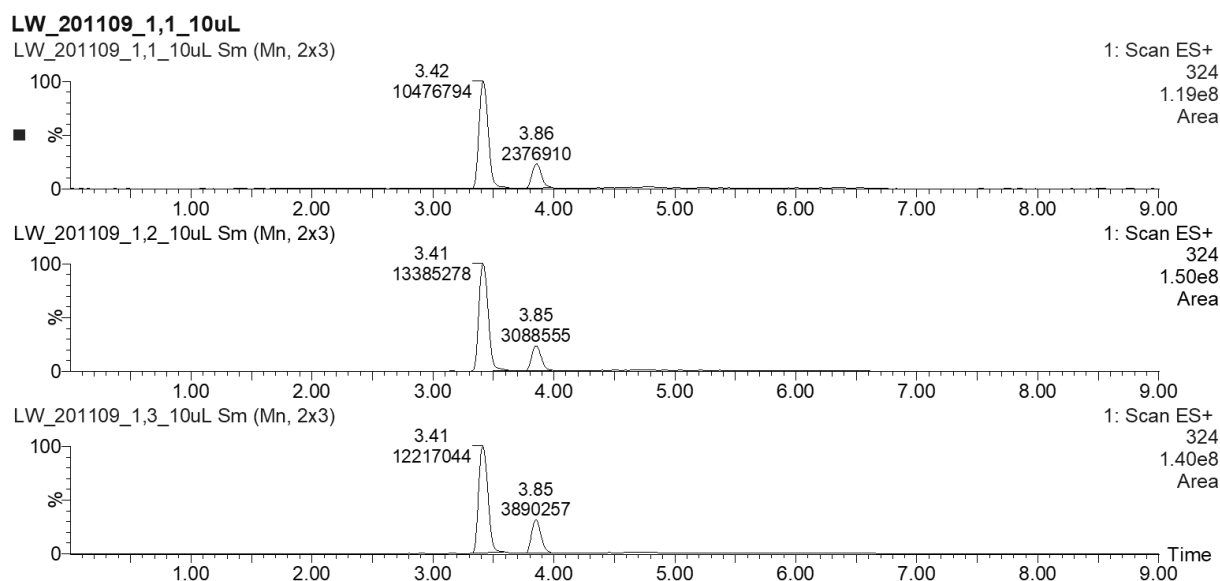
**Abbildung 8-158. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach Lagerung.** Die Lagerung des Enzyms erfolgte 7 d bei 4 °C (A) bzw. RT (B). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.75–3.76 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.28 min.

#### 8.6.6.2.4. Zeitverlauf

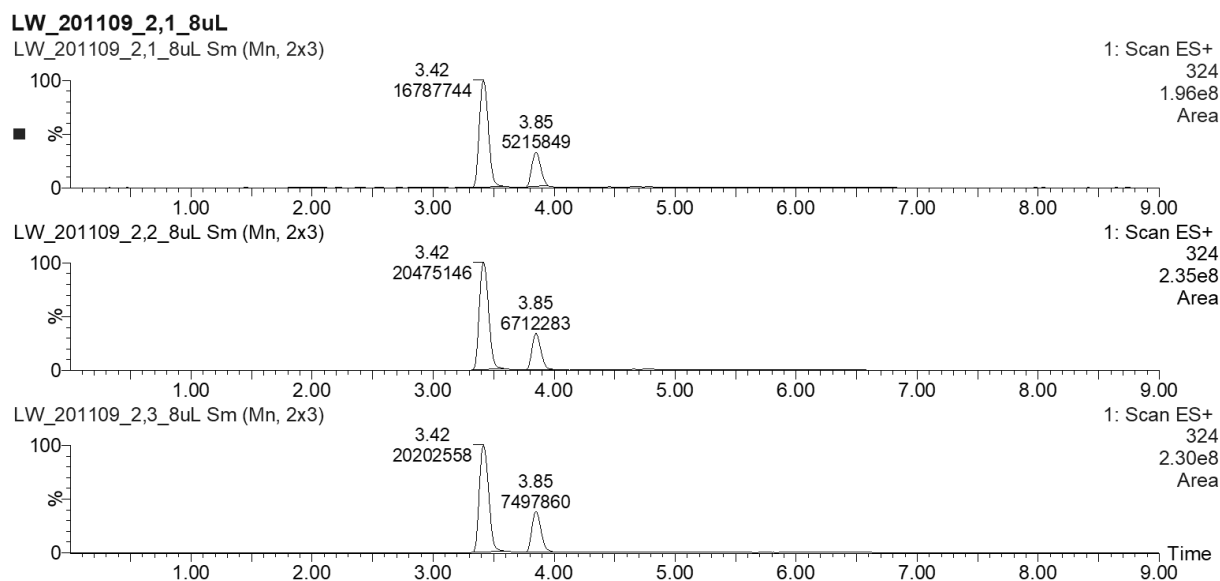


**Abbildung 8-159. UPLC-MS-Chromatogramme des Zeitverlaufs der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163.** Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von EtOAc nach 2, 5, 9 oder 16 h gestoppt. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für bis zu 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.30 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.75 min.

## 8.6.6.2.5. Kinetik



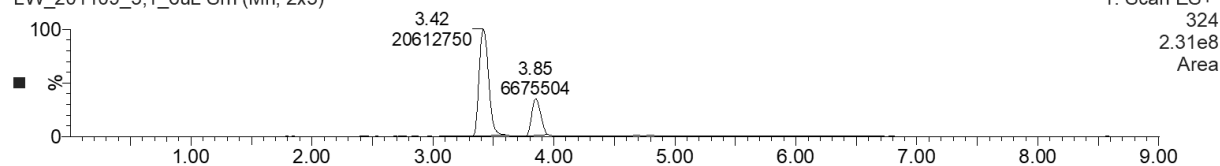
**Abbildung 8-160. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 0.07 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.41–3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.85–3.86 min.



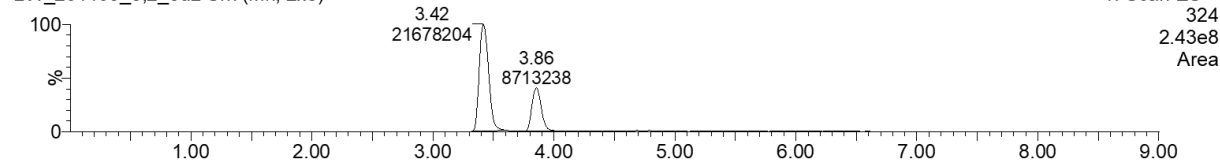
**Abbildung 8-161. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 0.15 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.85 min.

## LW\_201109\_3,1\_6uL

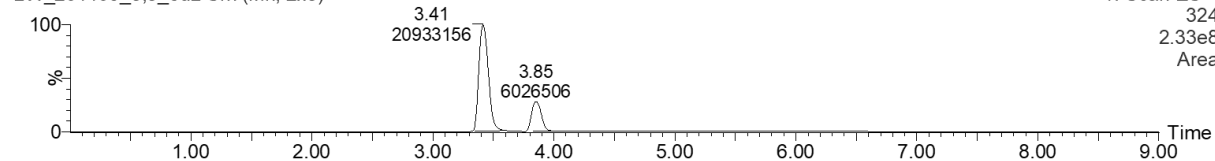
LW\_201109\_3,1\_6uL Sm (Mn, 2x3)



LW\_201109\_3,2\_6uL Sm (Mn, 2x3)



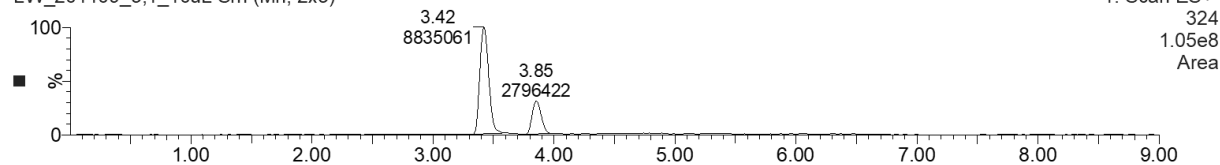
LW\_201109\_3,3\_6uL Sm (Mn, 2x3)



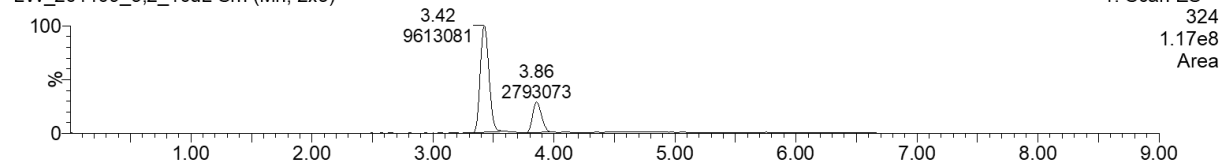
**Abbildung 8-162. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 0.23 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.41–3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.85–3.86 min.

## LW\_201109\_5,1\_10uL

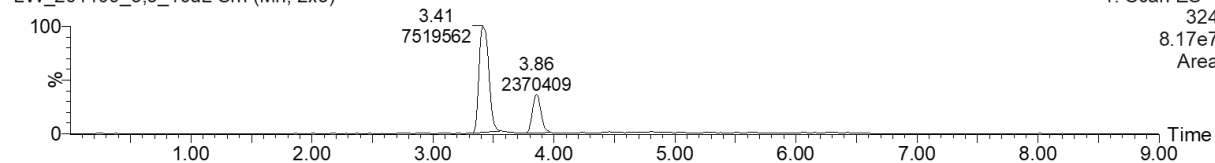
LW\_201109\_5,1\_10uL Sm (Mn, 2x3)



LW\_201109\_5,2\_10uL Sm (Mn, 2x3)



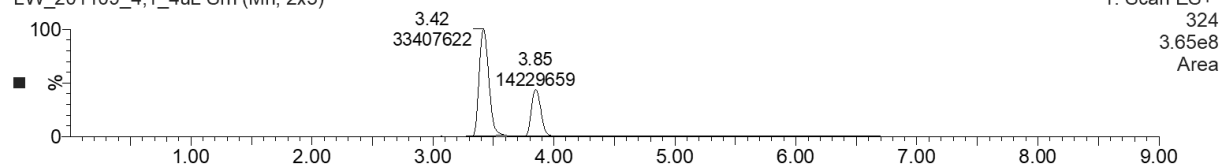
LW\_201109\_5,3\_10uL Sm (Mn, 2x3)



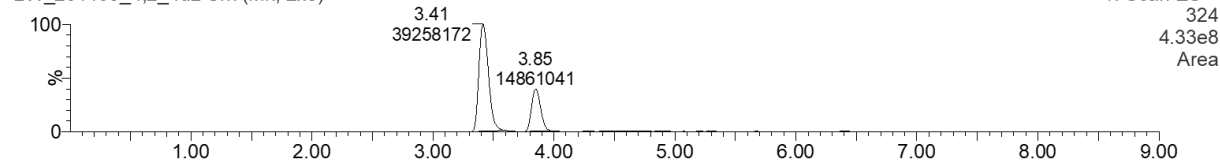
**Abbildung 8-163. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 0.52 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.41–3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.85–3.86 min.

## LW\_201109\_4,1\_4uL

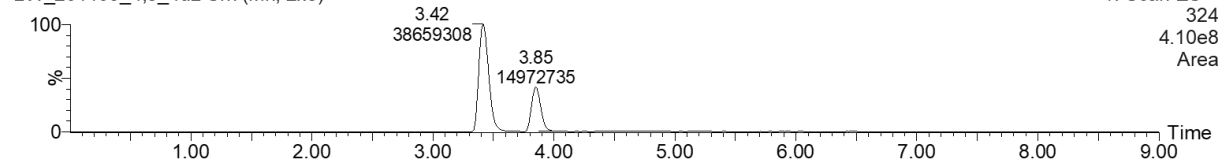
LW\_201109\_4,1\_4uL Sm (Mn, 2x3)



LW\_201109\_4,2\_4uL Sm (Mn, 2x3)



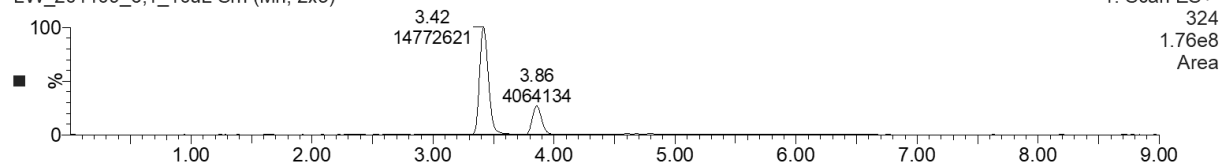
LW\_201109\_4,3\_4uL Sm (Mn, 2x3)



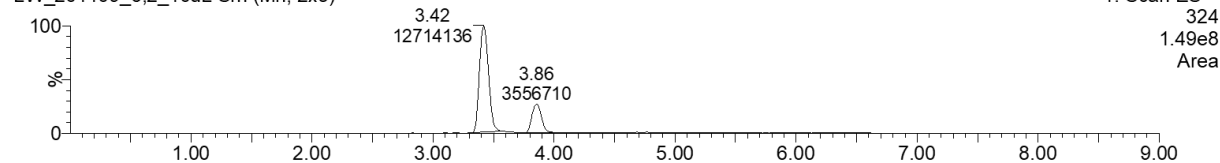
**Abbildung 8-164. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 0.62 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.41–3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.85 min.

## LW\_201109\_6,1\_10uL

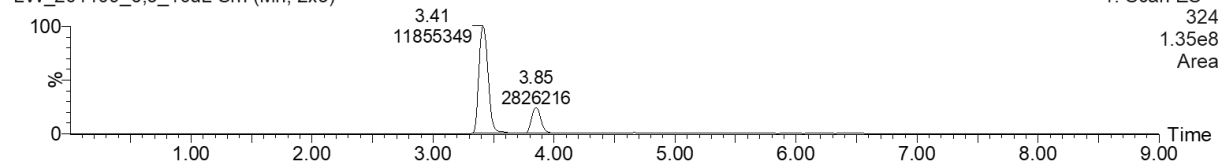
LW\_201109\_6,1\_10uL Sm (Mn, 2x3)



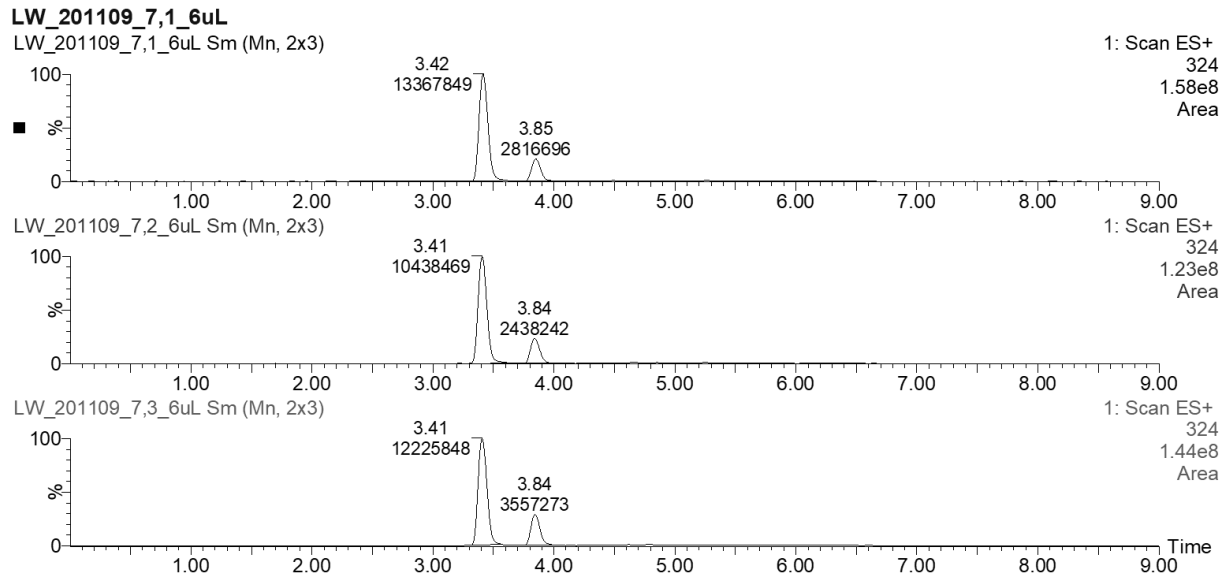
LW\_201109\_6,2\_10uL Sm (Mn, 2x3)



LW\_201109\_6,3\_10uL Sm (Mn, 2x3)



**Abbildung 8-165. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 0.79 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.41–3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.85–3.86 min.



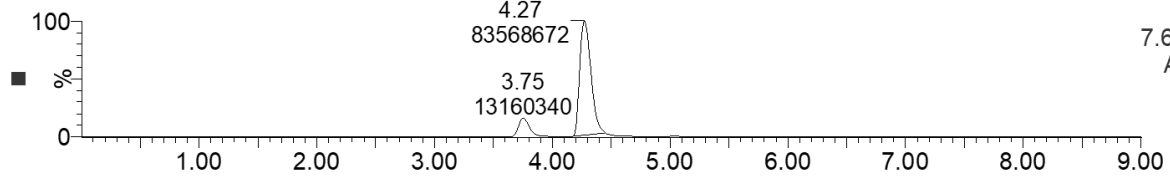
**Abbildung 8-166. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach 8 min Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer mit 4v% DMSO (Startkonzentration 1.19 mM) und AmbDH3-CLEA bei 37 °C und 300 UpM für 8 min durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.41–3.42 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.84–3.85 min.



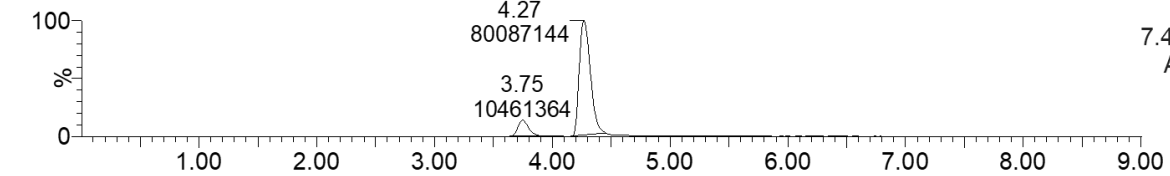
## 8.6.6.2.6. Lösungsmitteltoleranz

## LW\_191104\_Lysat\_M2

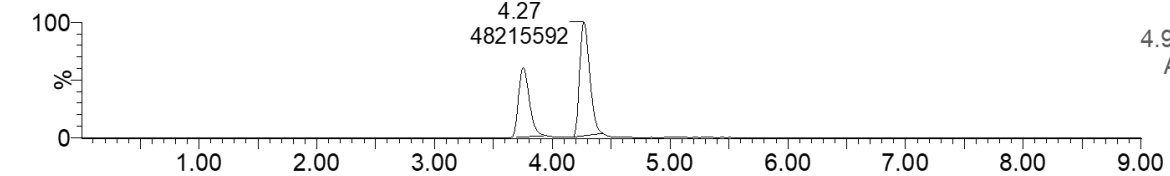
LW\_191104\_Lysat\_M2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
7.67e8  
Area

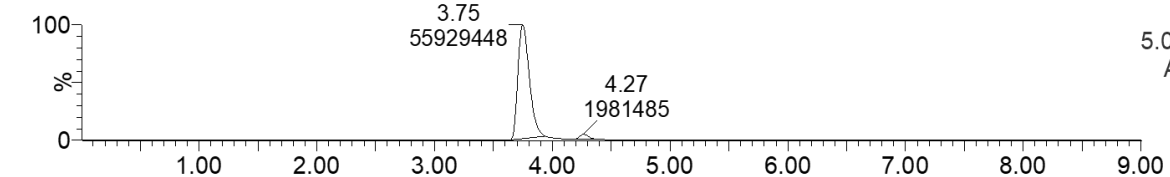
LW\_191104\_Lysat\_M5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
7.42e8  
Area

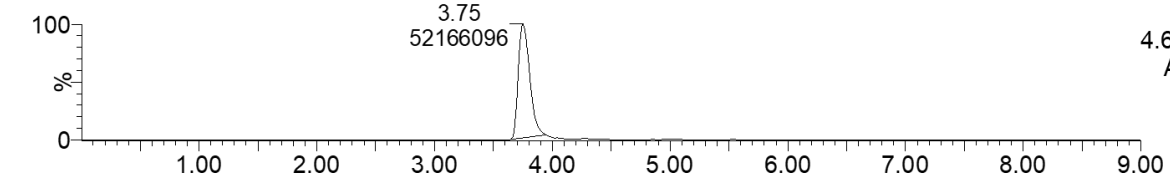
LW\_191104\_Lysat\_M10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.98e8  
Area

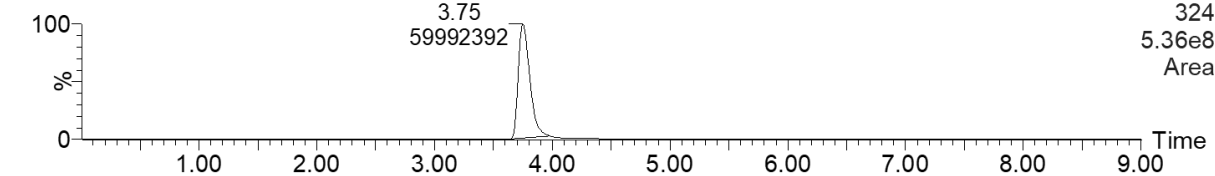
LW\_191104\_Lysat\_M25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.04e8  
Area

LW\_191104\_Lysat\_M50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.69e8  
Area

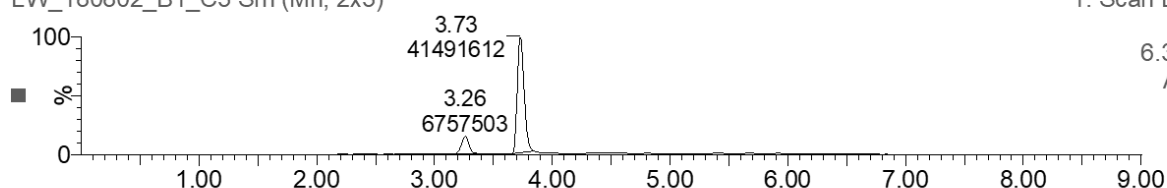
LW\_191104\_Lysat\_M75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.36e8  
Area

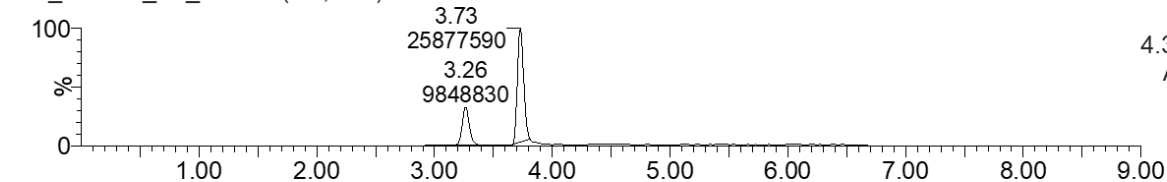
**Abbildung 8-167. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 in Gegenwart von Methanol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.75 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.27 min.

## LW\_180802\_B1\_C3

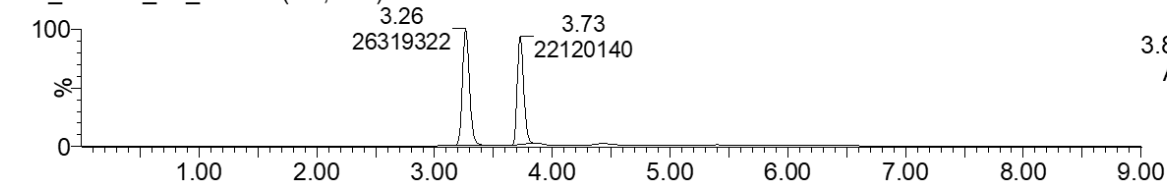
LW\_180802\_B1\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.30e8  
Area

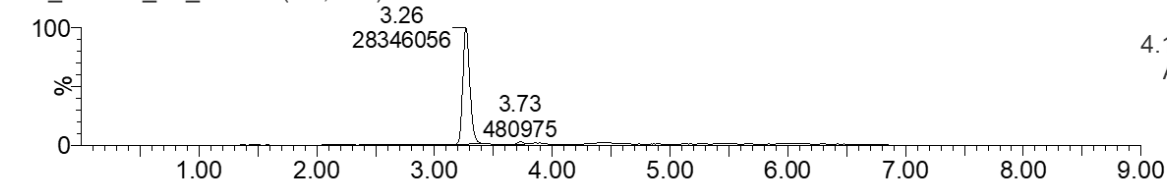
LW\_180802\_B2\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.37e8  
Area

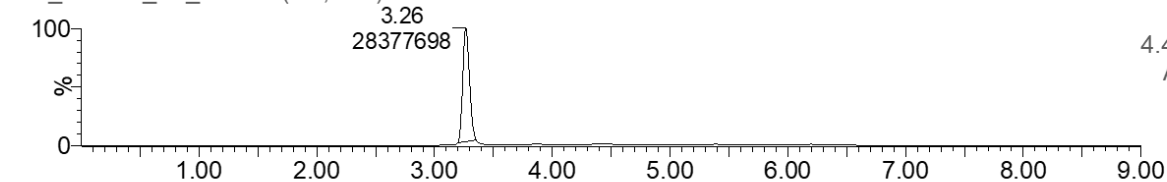
LW\_180802\_B3\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.84e8  
Area

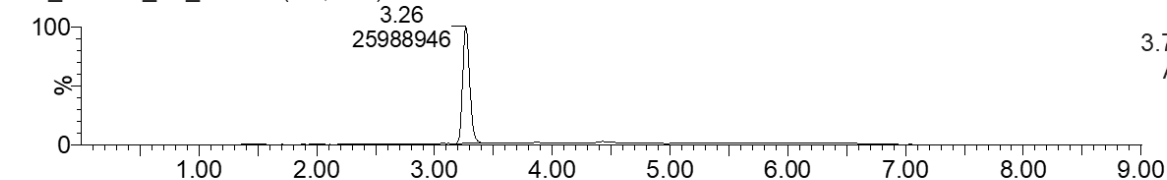
LW\_180802\_B4\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.16e8  
Area

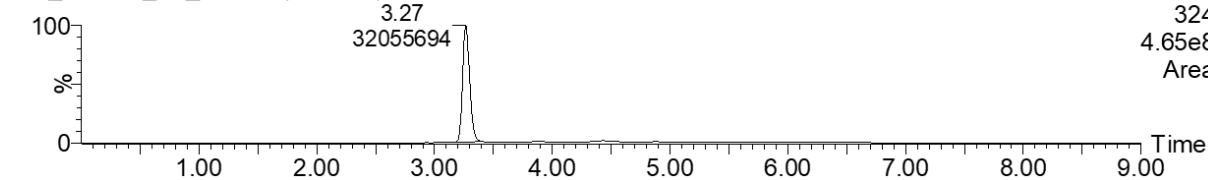
LW\_180802\_B5\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.48e8  
Area

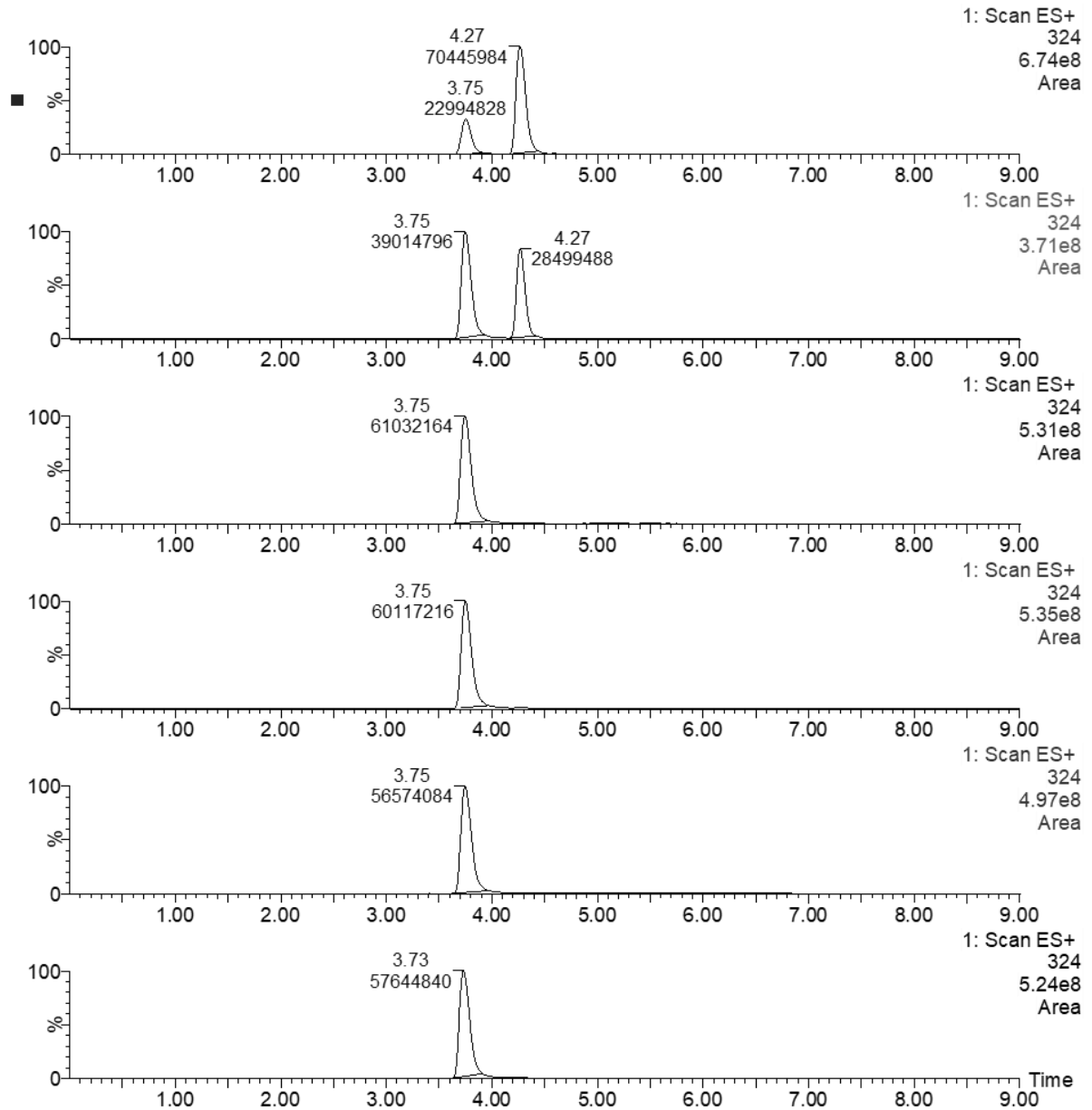
LW\_180802\_B6\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.79e8  
Area

LW\_180802\_B7\_C3 Sm (Mn, 2x3)

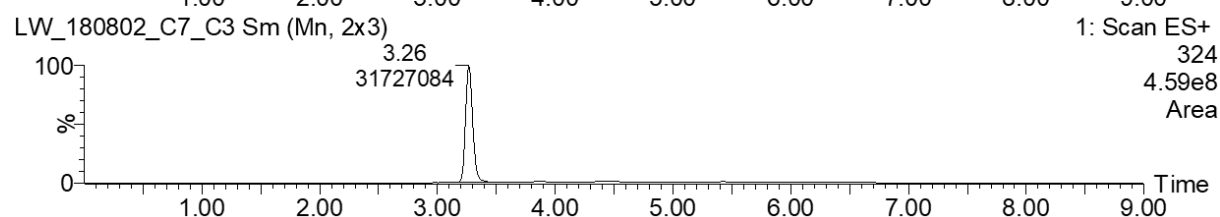
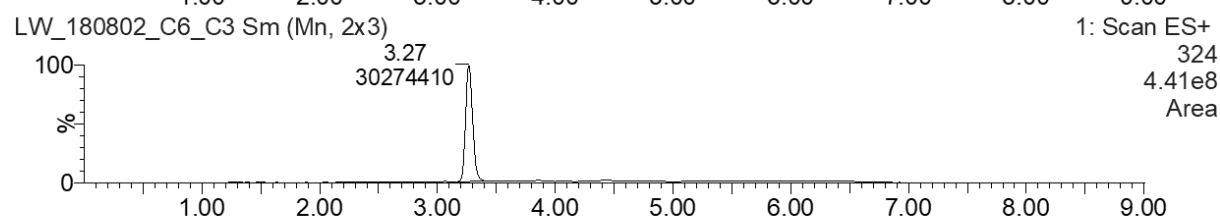
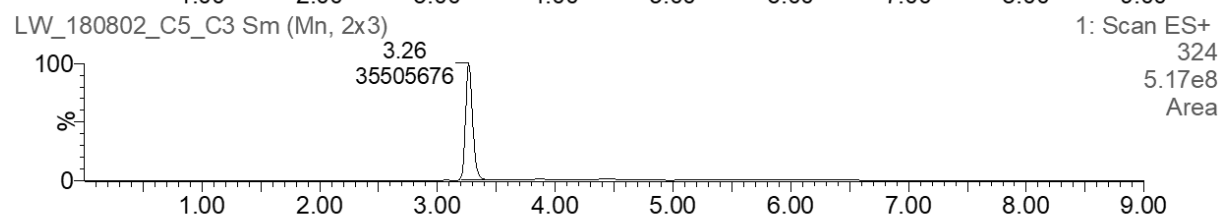
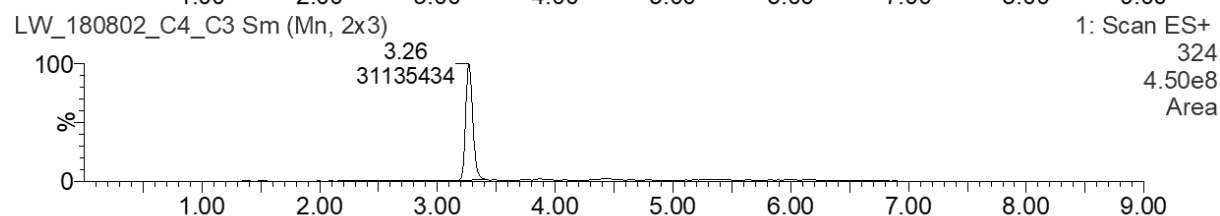
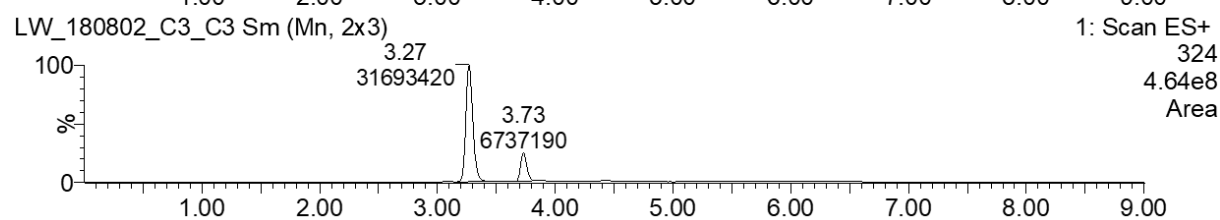
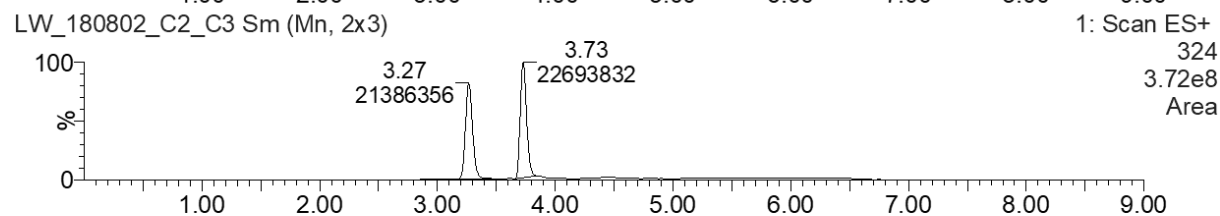
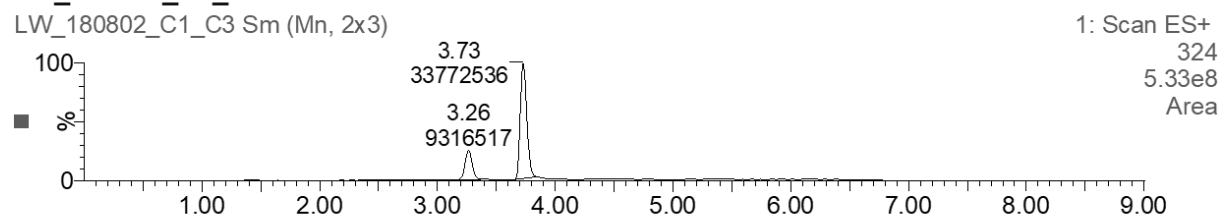
1: Scan ES+  
324  
4.65e8  
Area

**Abbildung 8-168. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Methanol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.73 min.



**Abbildung 8-169.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat **163** in Gegenwart von *iso*-Propanol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75v%). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.73–3.75 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.27 min.

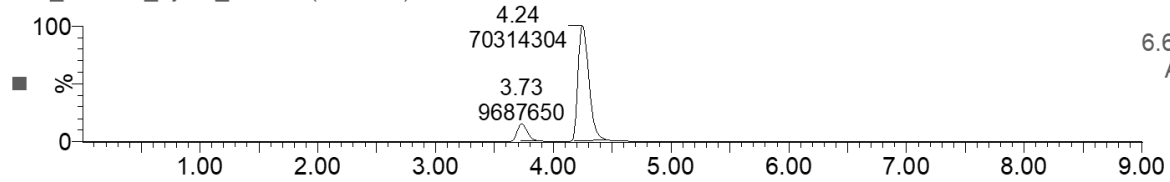
## LW\_180802\_C1\_C3



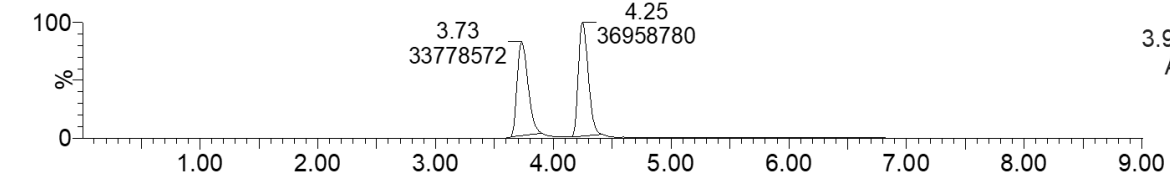
**Abbildung 8-170. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von *iso*-Propanol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.73 min.

## LW\_191104\_Lysat\_E2

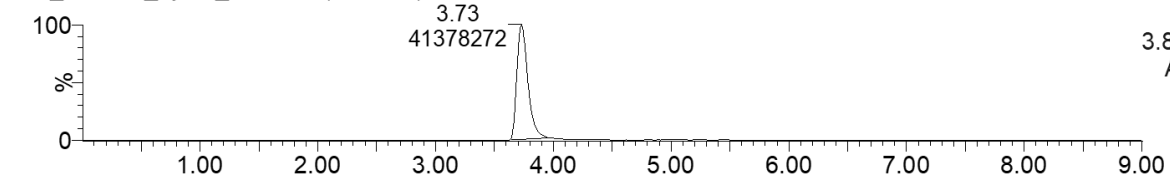
LW\_191104\_Lysat\_E2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.65e8  
Area

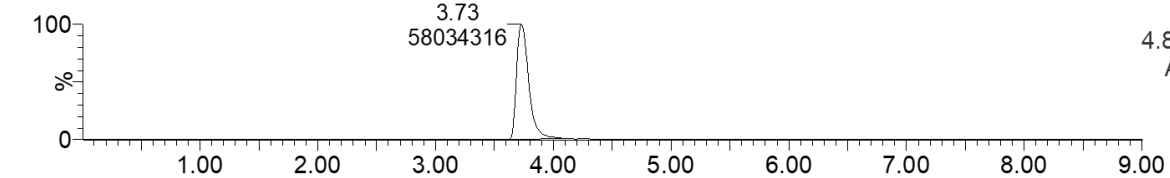
LW\_191104\_Lysat\_E5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.90e8  
Area

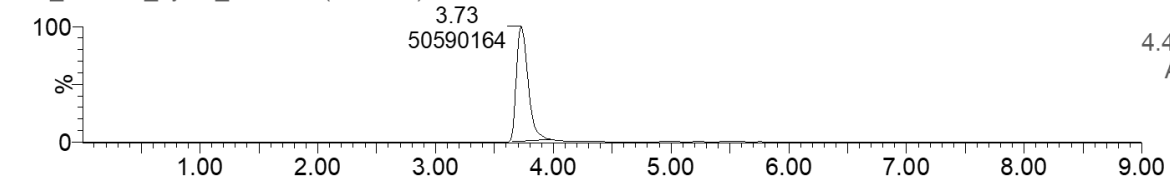
LW\_191104\_Lysat\_E10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.85e8  
Area

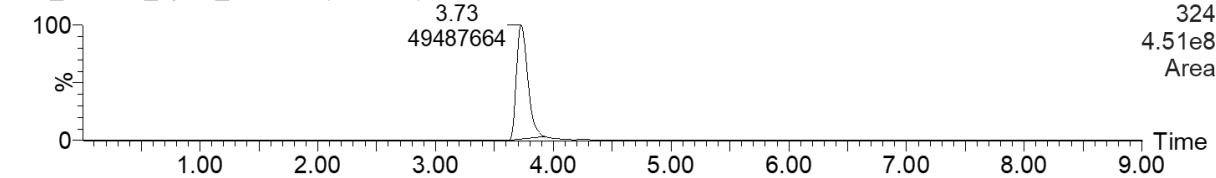
LW\_191104\_Lysat\_E25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.86e8  
Area

LW\_191104\_Lysat\_E50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.44e8  
Area

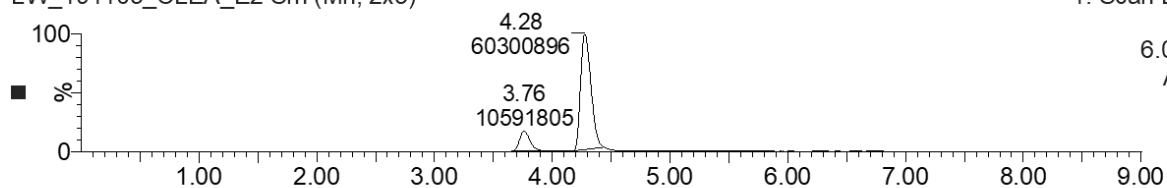
LW\_191104\_Lysat\_E75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.51e8  
Area

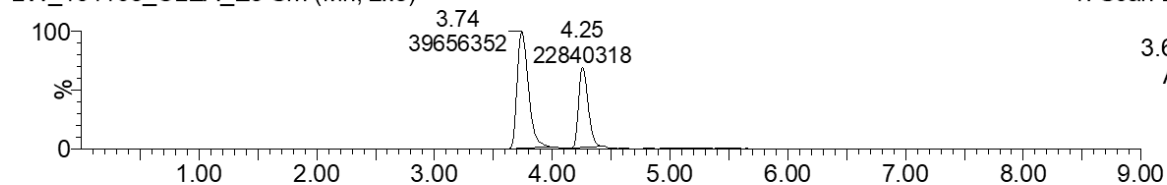
**Abbildung 8-171. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 in Gegenwart von Ethylacetat als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.73 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.24–4.25 min.

**LW\_191105\_CLEA\_E2**

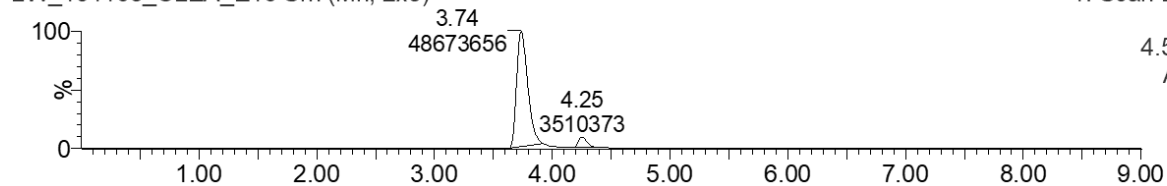
LW\_191105\_CLEA\_E2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.02e8  
Area

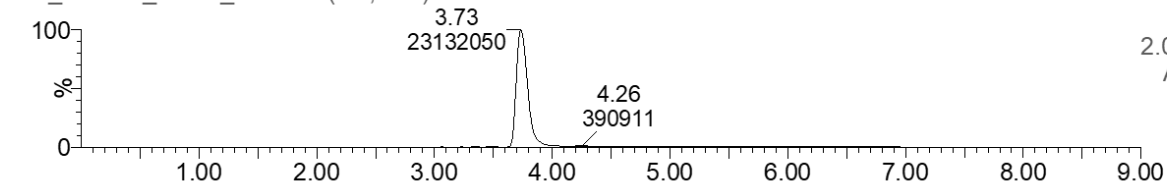
LW\_191105\_CLEA\_E5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.61e8  
Area

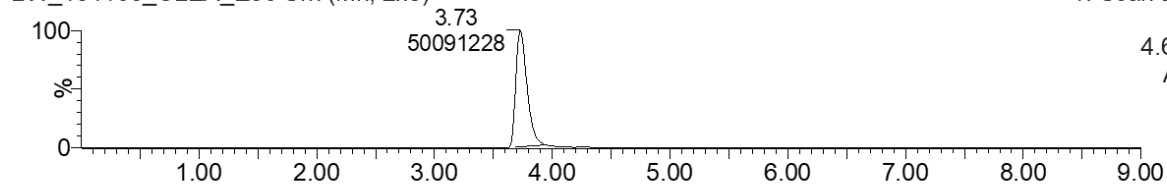
LW\_191105\_CLEA\_E10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.55e8  
Area

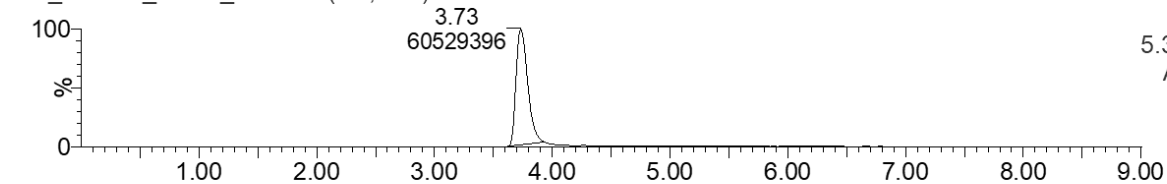
LW\_191105\_CLEA\_E25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
2.05e8  
Area

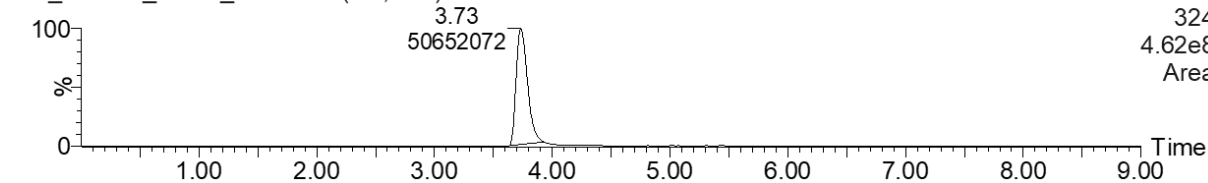
LW\_191105\_CLEA\_E50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.61e8  
Area

LW\_191105\_CLEA\_E75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.37e8  
Area

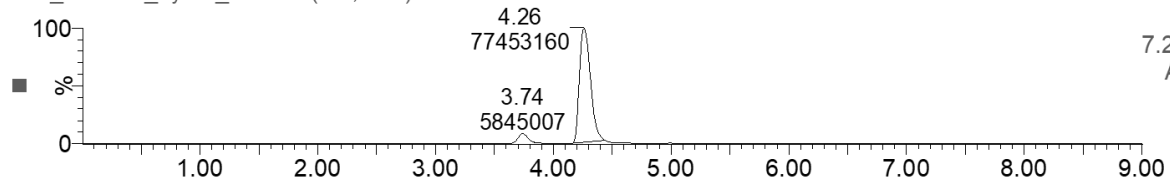
LW\_191105\_CLEA\_E100 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.62e8  
Area

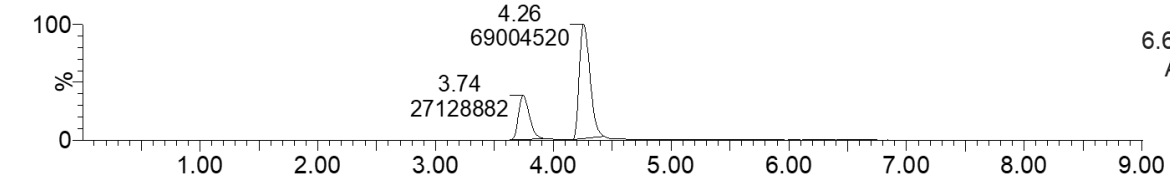
**Abbildung 8-172. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Ethylacetat als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.73–3.76 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.25–4.28 min.

## LW\_191104\_Lysat\_H2

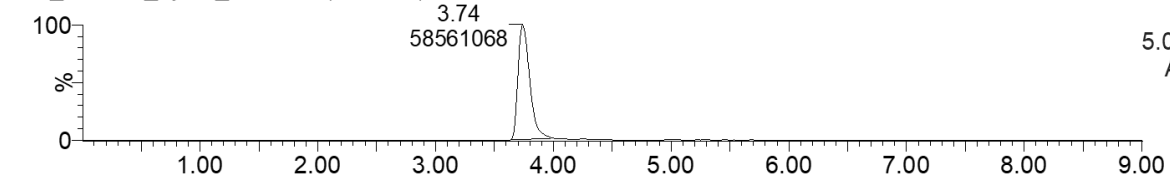
LW\_191104\_Lysat\_H2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
7.22e8  
Area

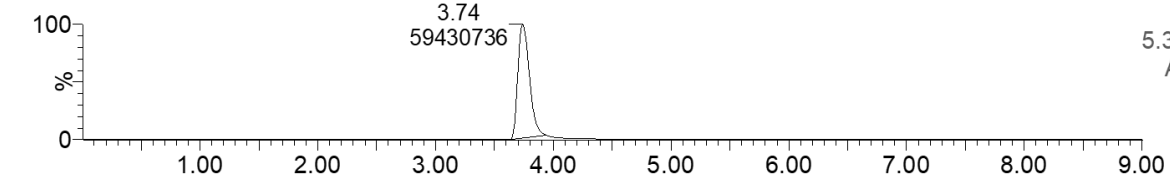
LW\_191104\_Lysat\_H5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.67e8  
Area

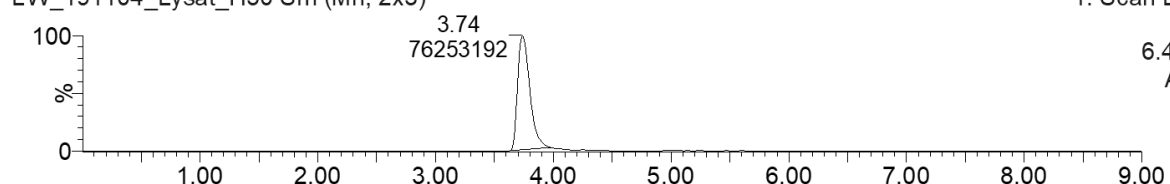
LW\_191104\_Lysat\_H10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.09e8  
Area

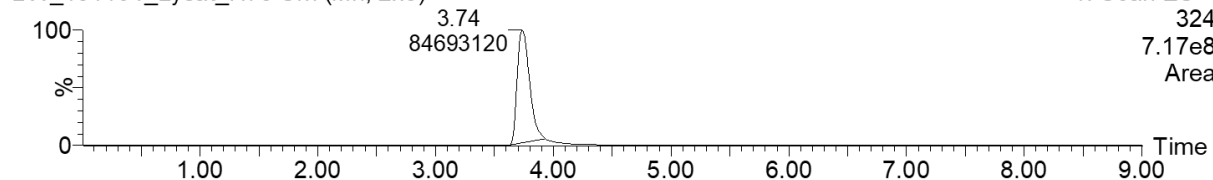
LW\_191104\_Lysat\_H25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.30e8  
Area

LW\_191104\_Lysat\_H50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.41e8  
Area

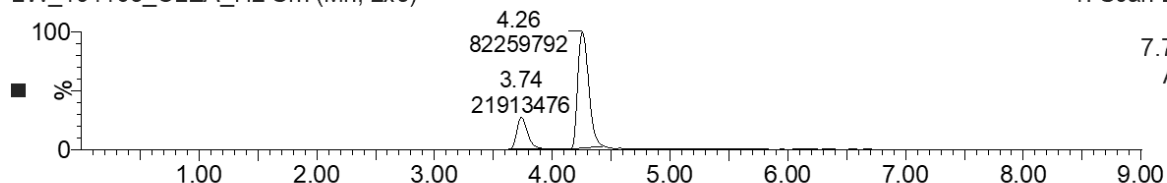
LW\_191104\_Lysat\_H75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
7.17e8  
Area

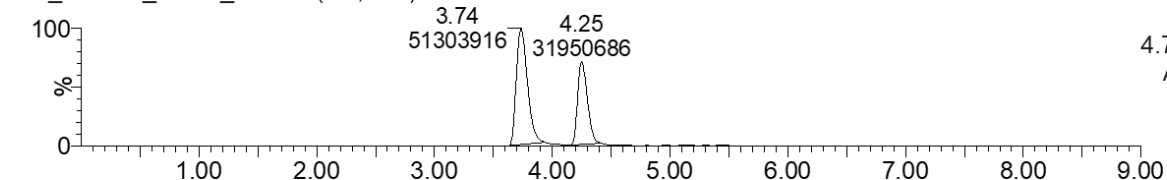
**Abbildung 8-173. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 in Gegenwart von Tetrahydrofuran als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.74 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.26 min.

## LW\_191105\_CLEA\_H2

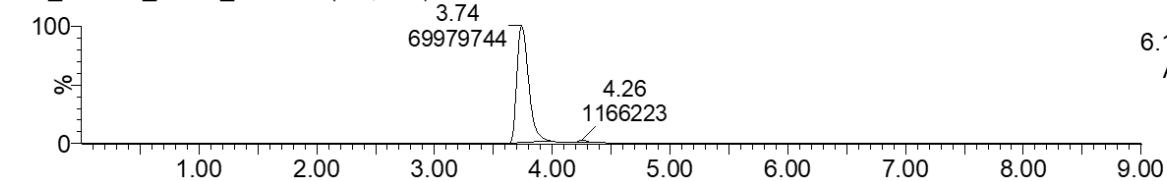
LW\_191105\_CLEA\_H2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
7.78e8  
Area

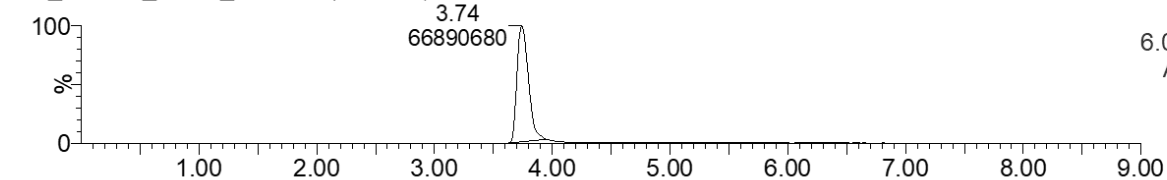
LW\_191105\_CLEA\_H5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.74e8  
Area

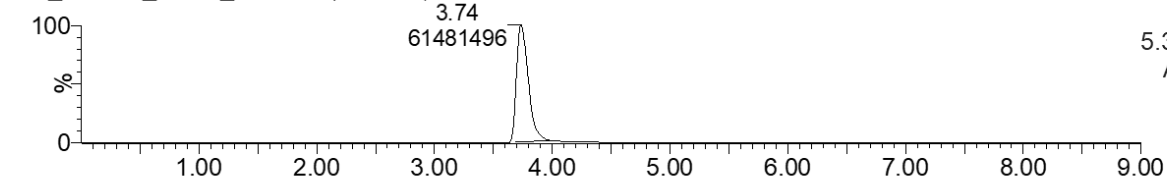
LW\_191105\_CLEA\_H10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.14e8  
Area

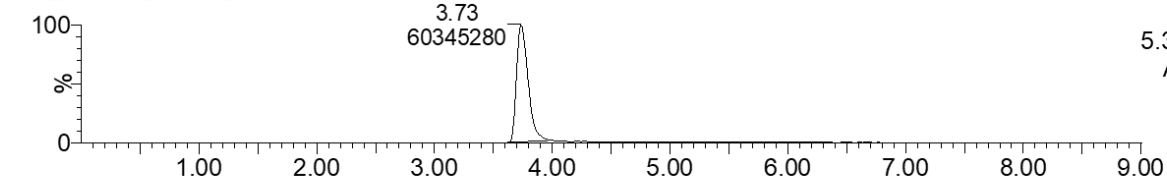
LW\_191105\_CLEA\_H25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.04e8  
Area

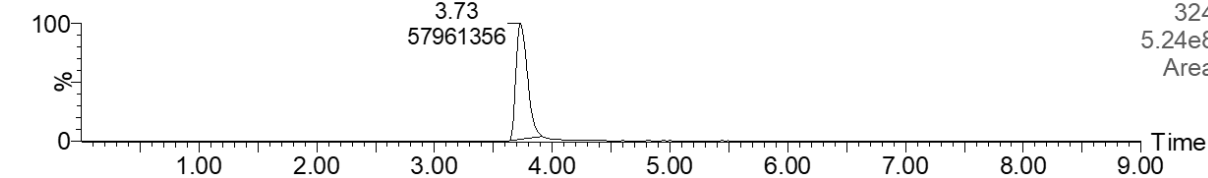
LW\_191105\_CLEA\_H50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.31e8  
Area

LW\_191105\_CLEA\_H75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.36e8  
Area

LW\_191105\_CLEA\_H100 Sm (Mn, 2x3)

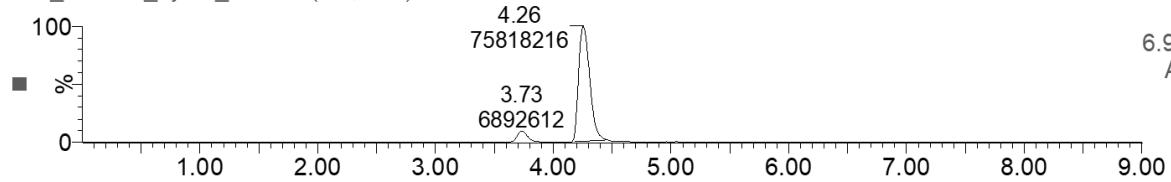
1: Scan ES+  
324  
5.24e8  
Area

**Abbildung 8-174. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Tetrahydrofuran als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.73–3.74 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.25–4.26 min.

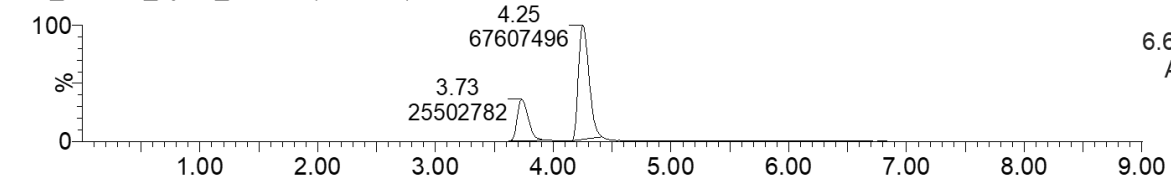


## LW\_191104\_Lysat\_D2

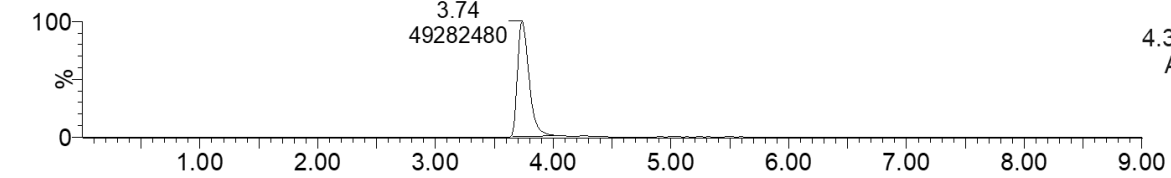
LW\_191104\_Lysat\_D2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.97e8  
Area

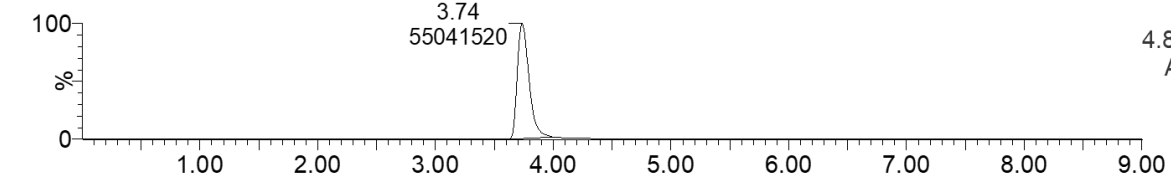
LW\_191104\_Lysat\_D5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.63e8  
Area

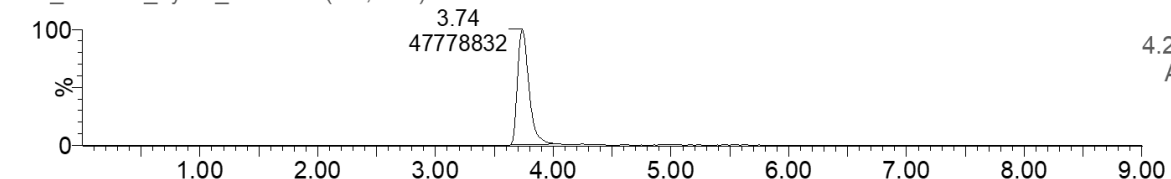
LW\_191104\_Lysat\_D10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.38e8  
Area

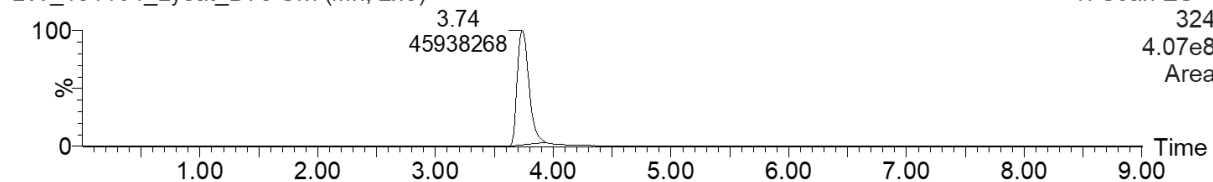
LW\_191104\_Lysat\_D25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.82e8  
Area

LW\_191104\_Lysat\_D50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.29e8  
Area

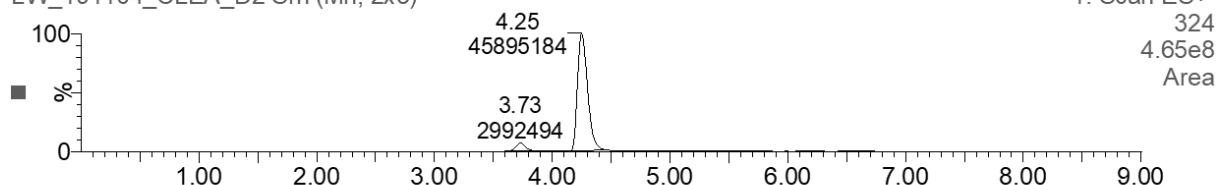
LW\_191104\_Lysat\_D75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.07e8  
Area

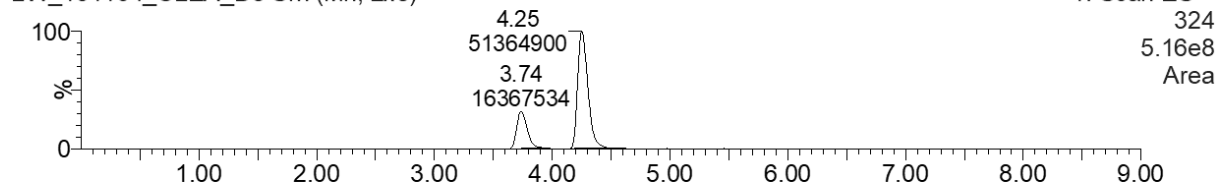
**Abbildung 8-175. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 in Gegenwart von Dichlormethan als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.73–3.74 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.25–4.26 min.

## LW\_191104\_CLEA\_D2

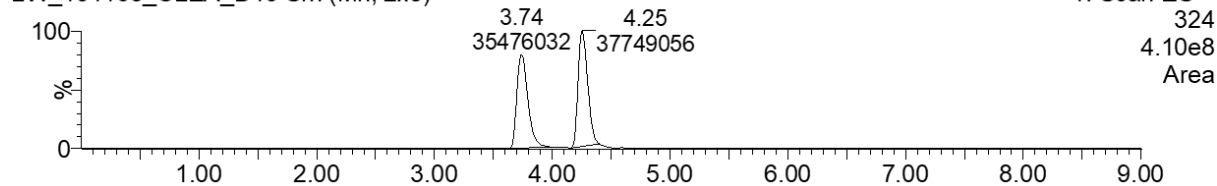
LW\_191104\_CLEA\_D2 Sm (Mn, 2x3)



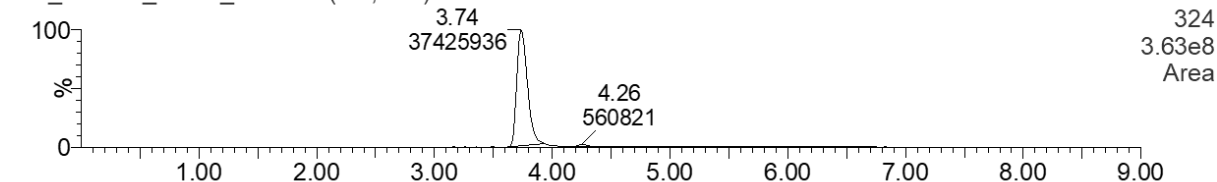
LW\_191104\_CLEA\_D5 Sm (Mn, 2x3)



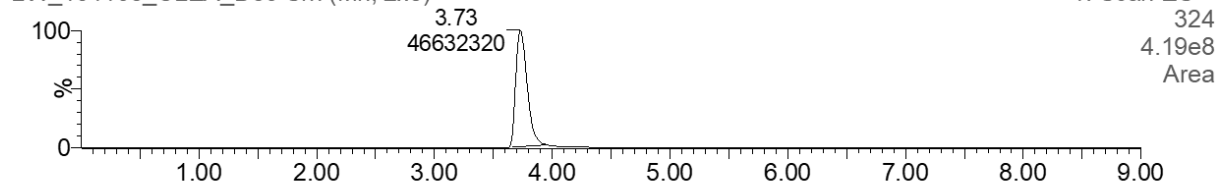
LW\_191105\_CLEA\_D10 Sm (Mn, 2x3)



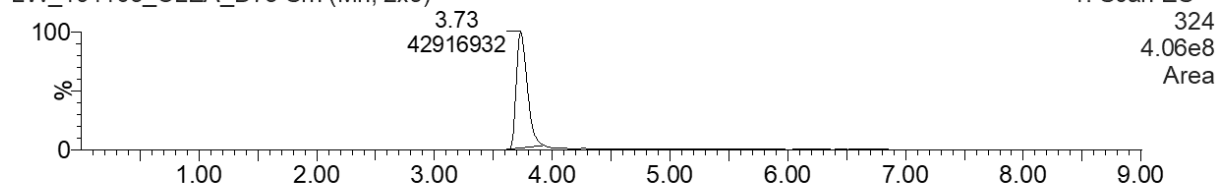
LW\_191105\_CLEA\_D25 Sm (Mn, 2x3)



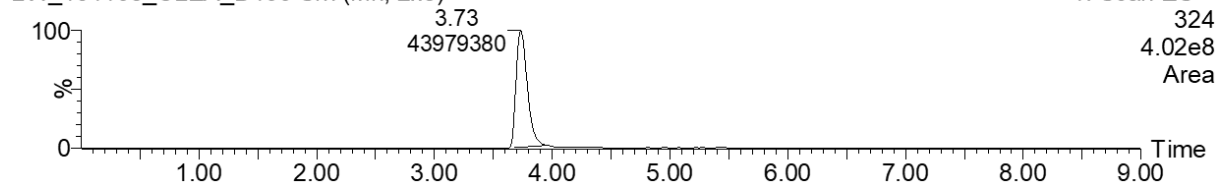
LW\_191105\_CLEA\_D50 Sm (Mn, 2x3)



LW\_191105\_CLEA\_D75 Sm (Mn, 2x3)



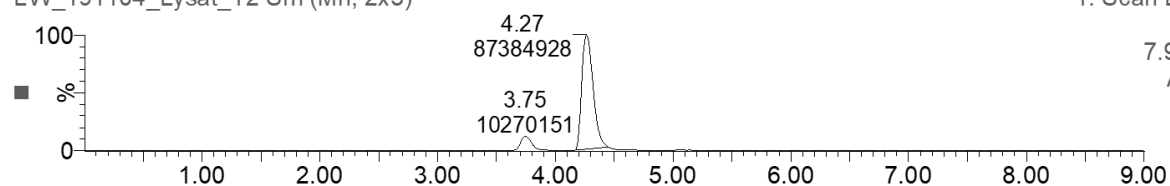
LW\_191105\_CLEA\_D100 Sm (Mn, 2x3)



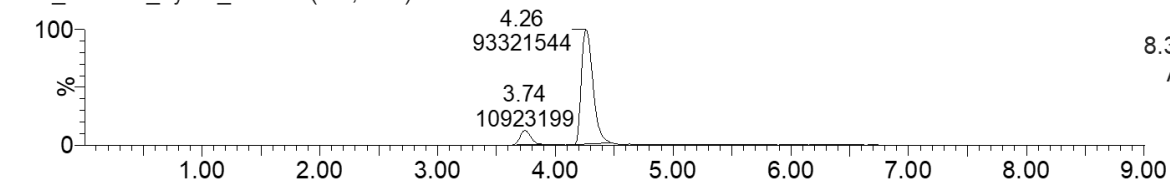
**Abbildung 8-176. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Dichlormethan als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.73–3.74 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.25–4.26 min.

## LW\_191104\_Lysat\_T2

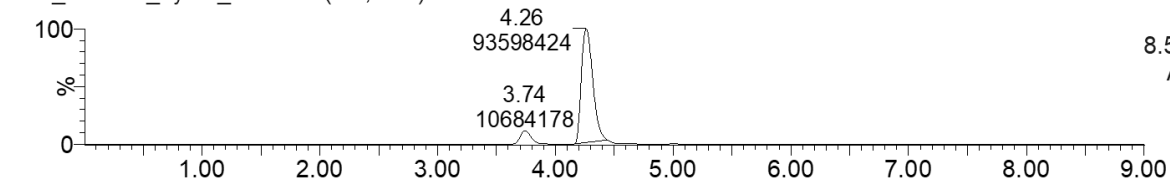
LW\_191104\_Lysat\_T2 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
7.93e8  
Area

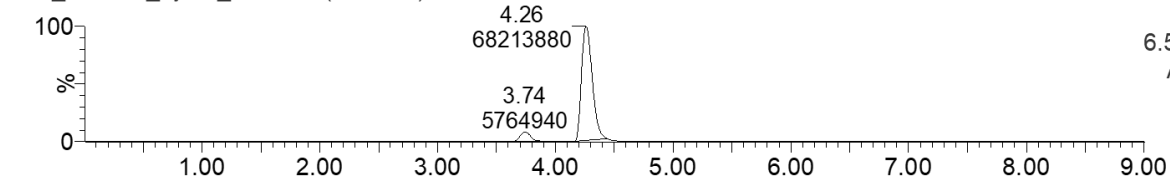
LW\_191104\_Lysat\_T5 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
8.34e8  
Area

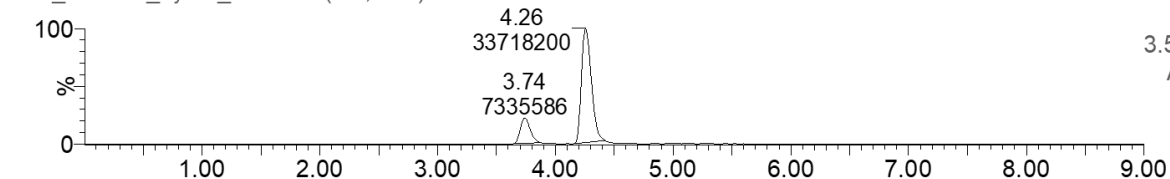
LW\_191104\_Lysat\_T10 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
8.50e8  
Area

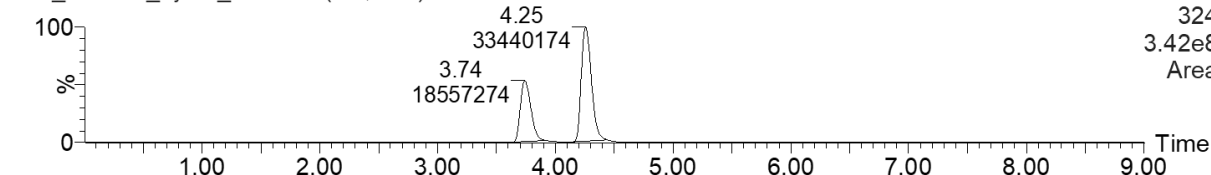
LW\_191104\_Lysat\_T25 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
6.55e8  
Area

LW\_191104\_Lysat\_T50 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.50e8  
Area

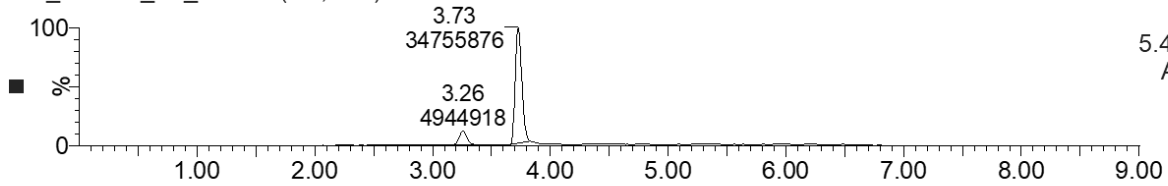
LW\_191104\_Lysat\_T75 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.42e8  
Area

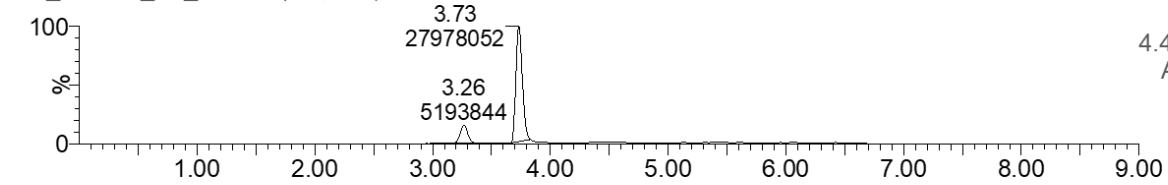
**Abbildung 8-177. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-Lysat mit Substrat 163 in Gegenwart von Toluol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.74–3.75 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.25–4.27 min.

## LW\_180802\_A1\_C3

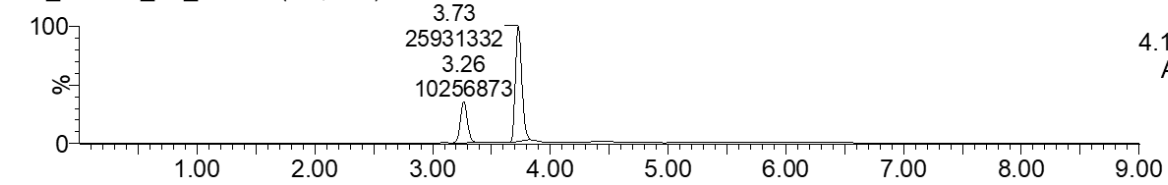
LW\_180802\_A1\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
5.47e8  
Area

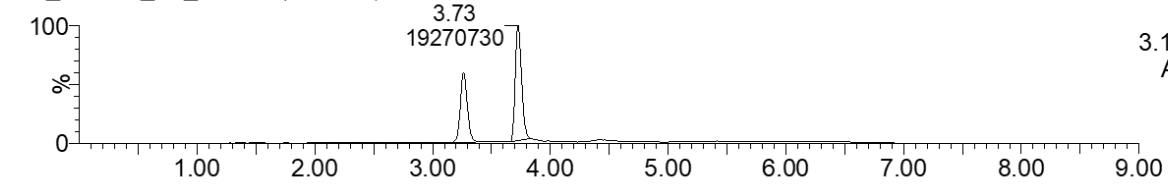
LW\_180802\_A2\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.48e8  
Area

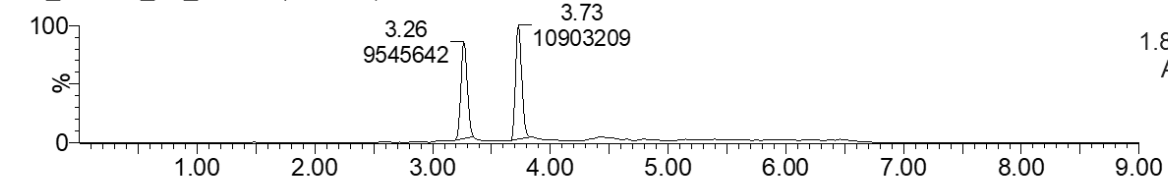
LW\_180802\_A3\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
4.18e8  
Area

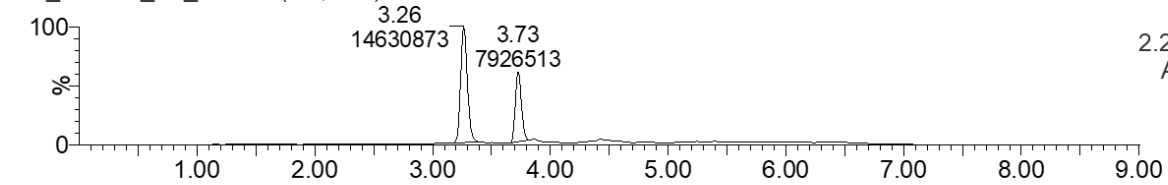
LW\_180802\_A4\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
3.15e8  
Area

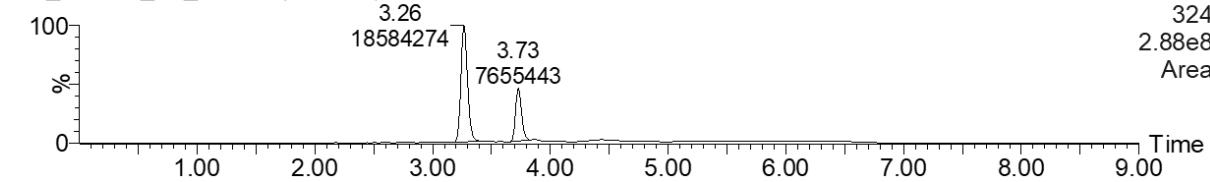
LW\_180802\_A5\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
1.85e8  
Area

LW\_180802\_A6\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
2.23e8  
Area

LW\_180802\_A7\_C3 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+  
324  
2.88e8  
Area

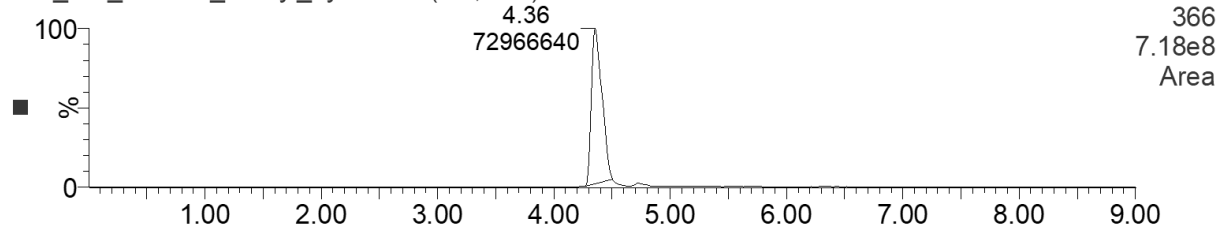
**Abbildung 8-178. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Toluol als Cosolvenz (2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungsverhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.73 min.

## 8.6.6.2.7. Substrattoleranz

**LW\_MS\_190116\_Pentyl\_Lysat**

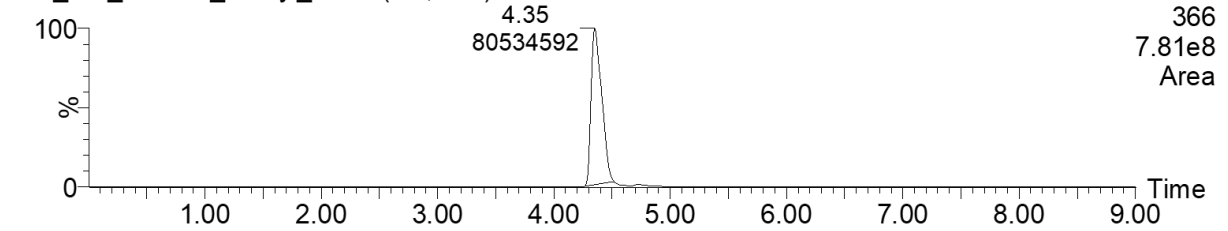
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_Lysat Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



LW\_MS\_190116\_Pentyl\_0 Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+

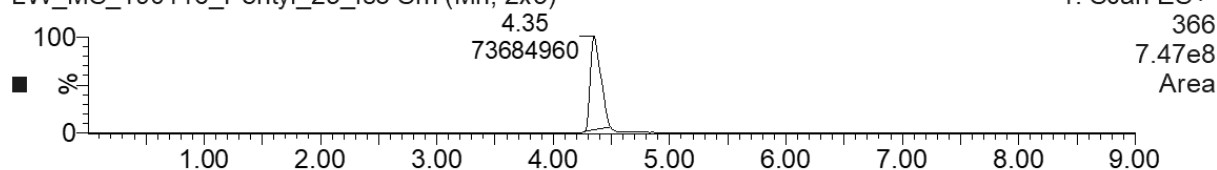


**Abbildung 8-179. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-Lysat und AmbDH-CLEA mit Substrat 171.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-Lysat (oben) bzw. AmbDH3-CLEA (unten) bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**171**) = 4.35–4.36 min.

## LW\_MS\_190116\_Pentyl\_25\_Iso

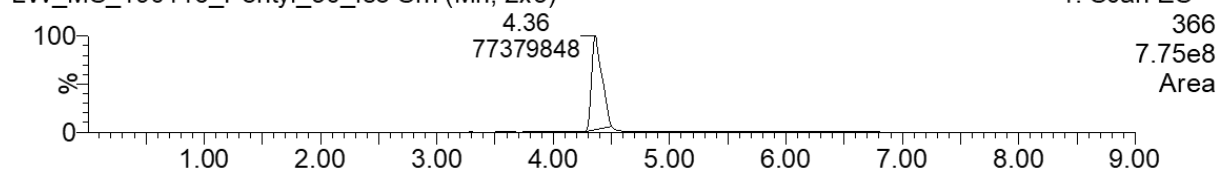
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_25\_Iso Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



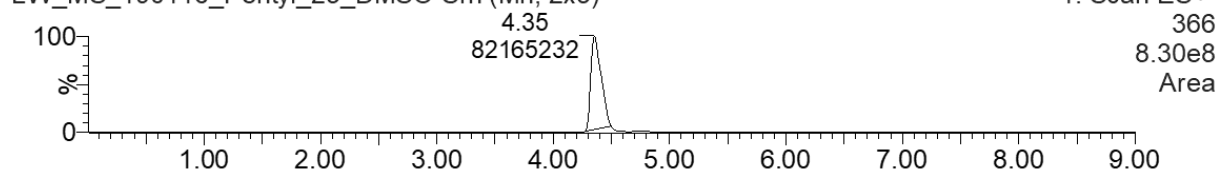
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_50\_Iso Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



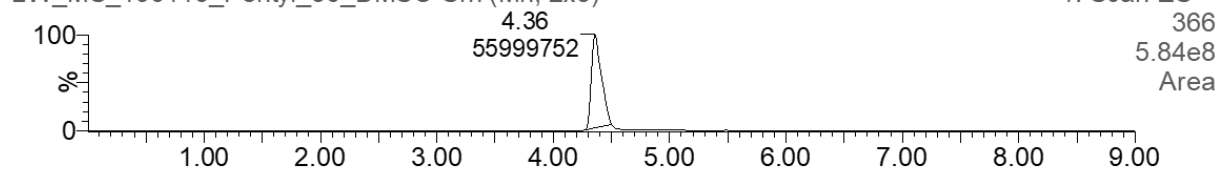
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_25\_DMSO Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



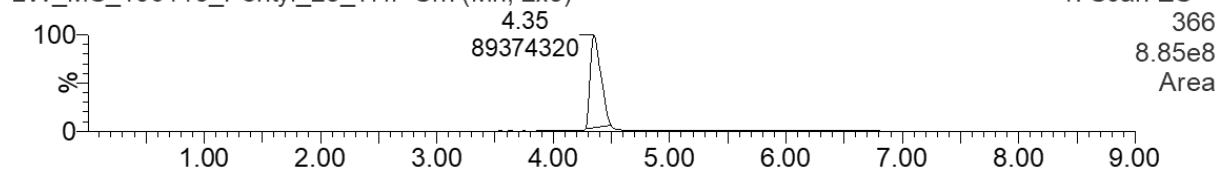
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_50\_DMSO Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



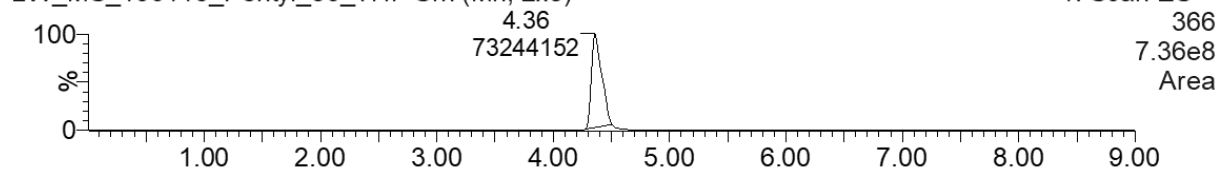
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_25\_THF Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



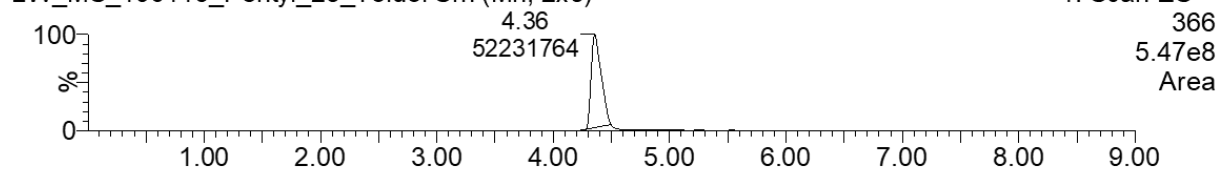
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_50\_THF Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



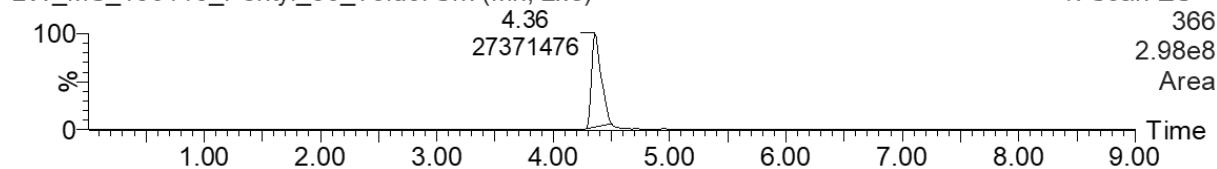
LW\_MS\_190116\_Pentyl\_25\_Toluol Sm (Mn, 2x3)

1: Scan ES+



LW\_MS\_190116\_Pentyl\_50\_Toluol Sm (Mn, 2x3)

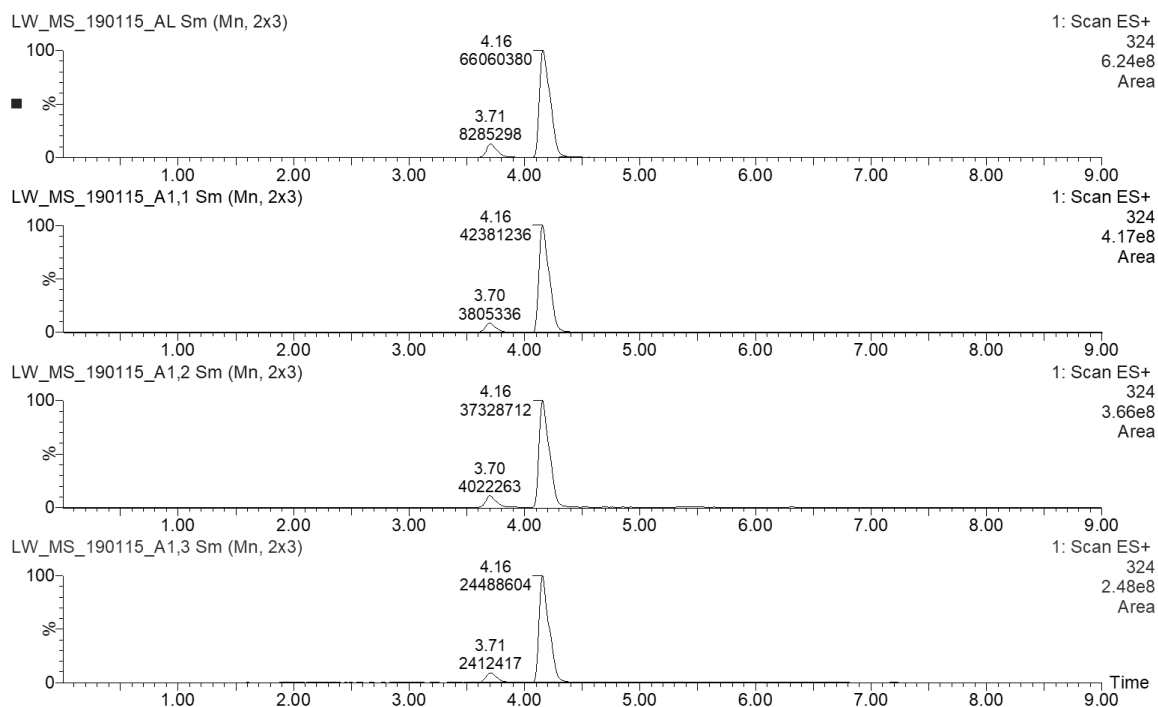
1: Scan ES+



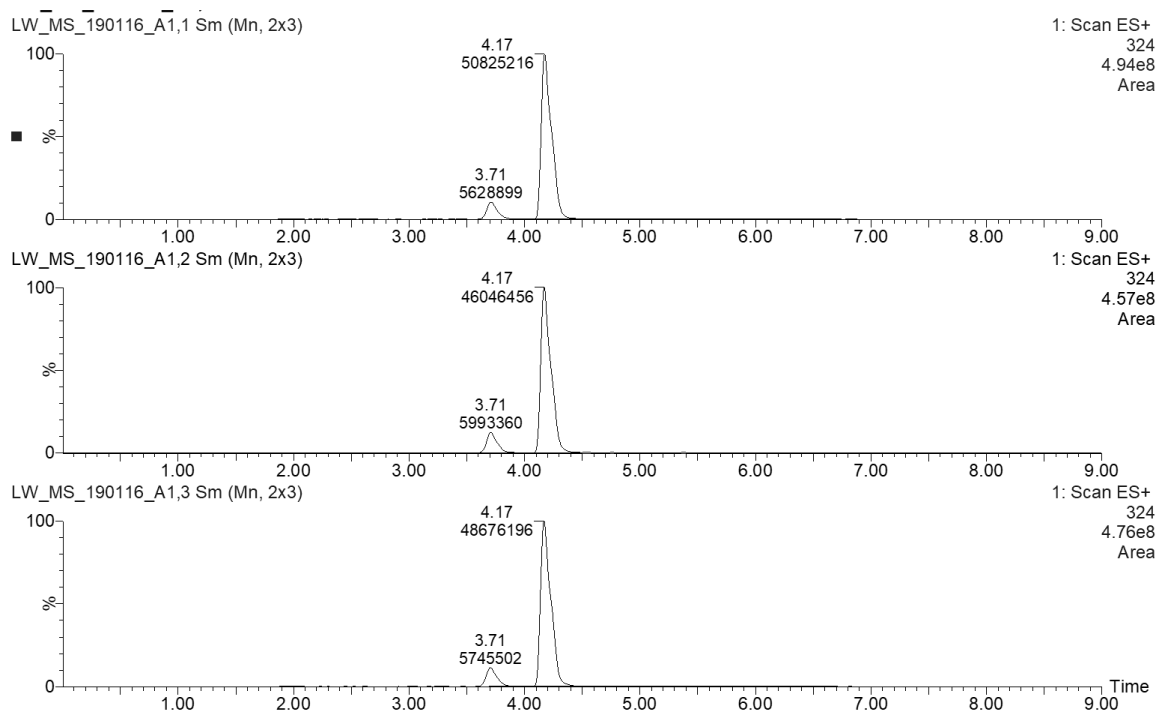
**Abbildung 8-180.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat **171** und verschiedenen Cosolventien: *iso*-Propanol, DMSO, THF und Toluol (von oben nach unten; jeweils 25 und 50v%). Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 366$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (292 nmol) Substrat **171** (Startkonzentration 2 mM) in Natriumphosphat-Puffer mit Cosolvenz und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**171**) = 4.35–4.36 min.

## 8.6.6.2.8. Wiederverwendung

## 8.6.6.2.8.1. Analytischer Maßstab (0.1 mg)



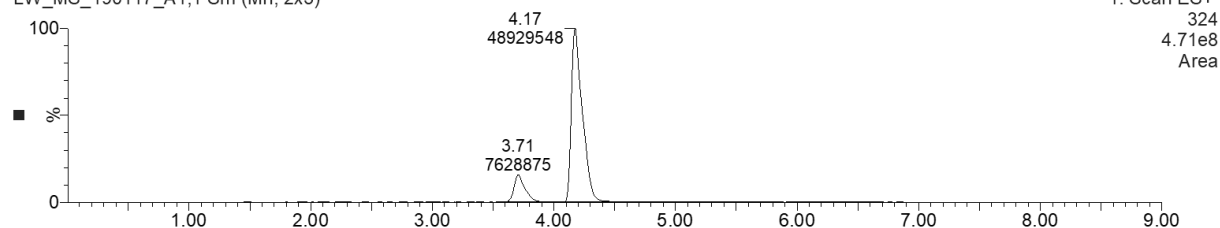
**Abbildung 8-181. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von A) AmbDH3-Lysat und B–D) AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem ersten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.70–3.71 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.16 min.



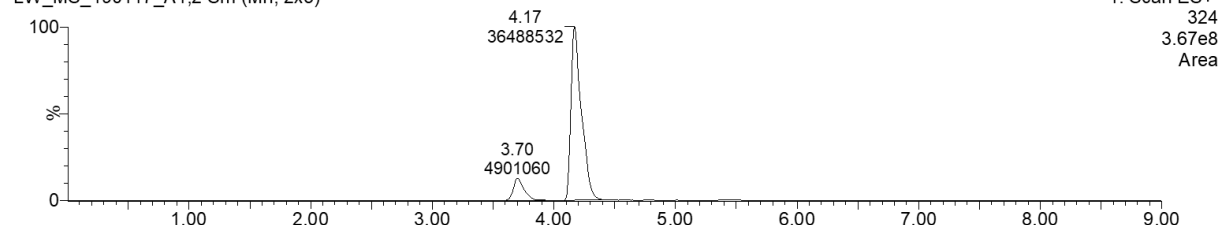
**Abbildung 8-182. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem zweiten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.71 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.17 min.

## LW\_MS\_190117\_A1,1

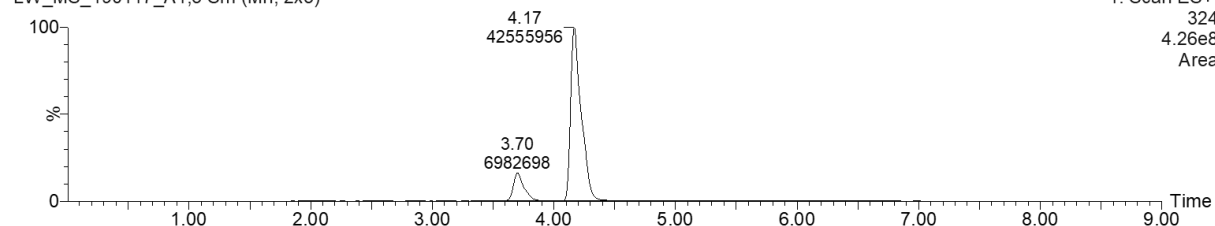
LW\_MS\_190117\_A1,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_MS\_190117\_A1,2 Sm (Mn, 2x3)



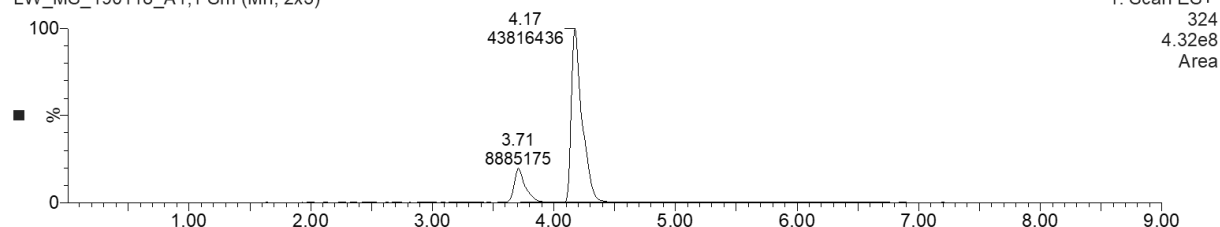
LW\_MS\_190117\_A1,3 Sm (Mn, 2x3)



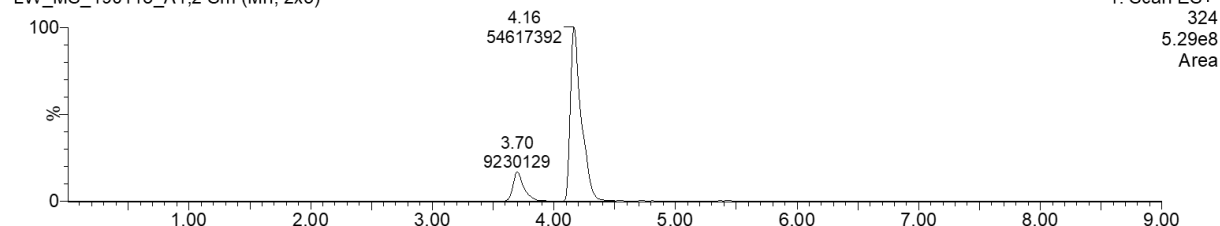
**Abbildung 8-183. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem dritten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.70–3.71 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.17 min.

## LW\_MS\_190118\_A1,1

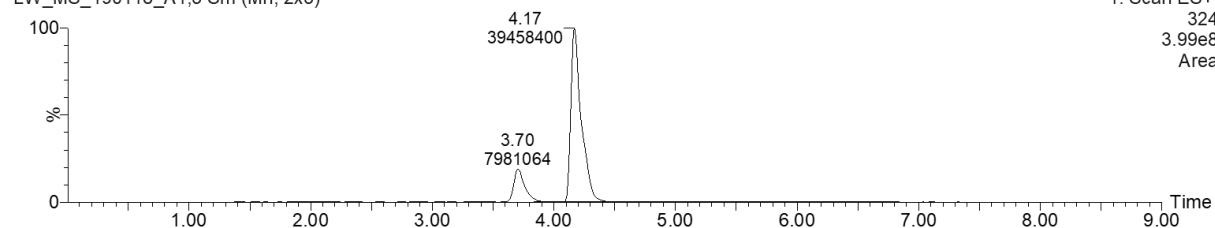
LW\_MS\_190118\_A1,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_MS\_190118\_A1,2 Sm (Mn, 2x3)

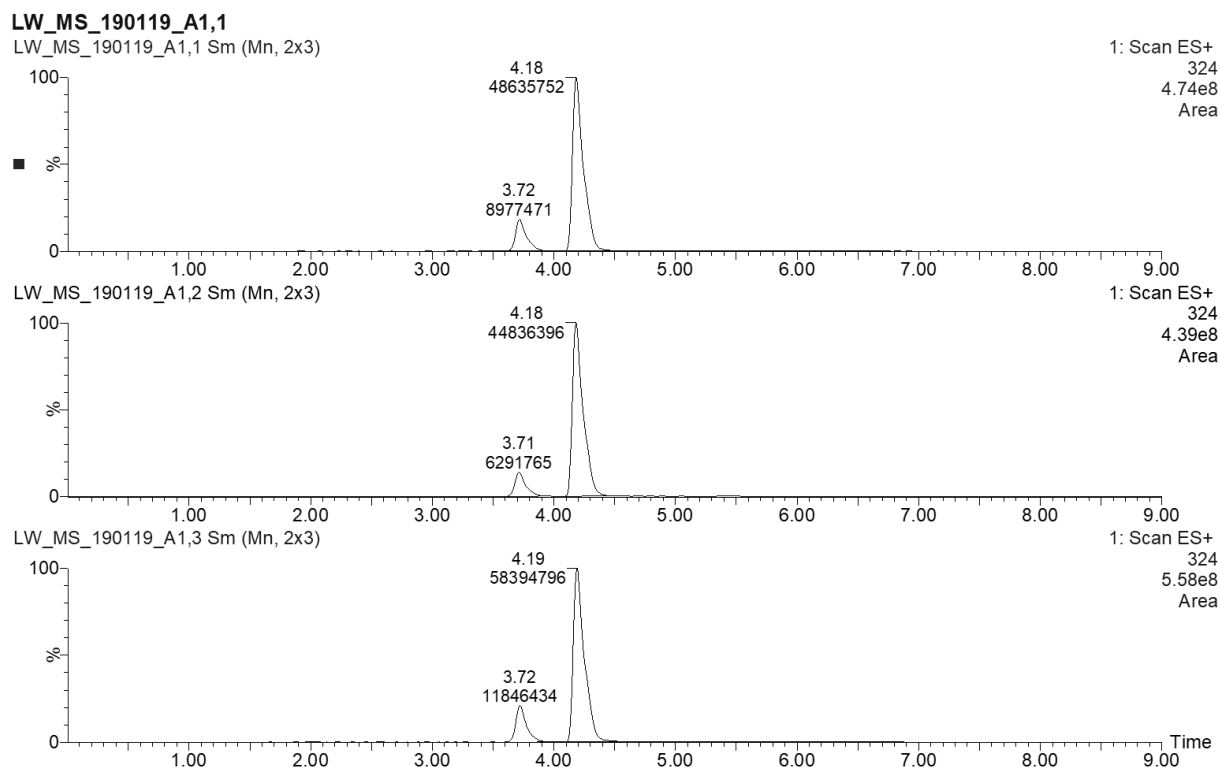


LW\_MS\_190118\_A1,3 Sm (Mn, 2x3)

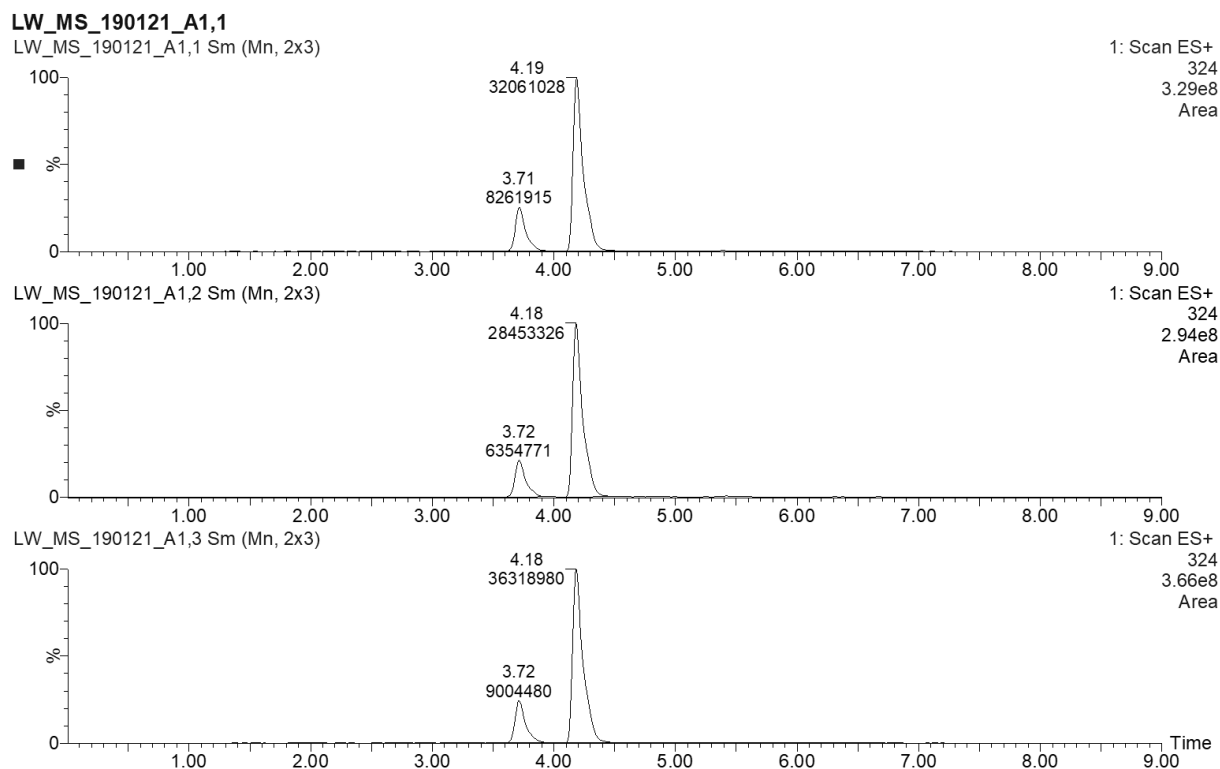


**Abbildung 8-184. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem vierten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.70–3.71 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.16–4.17 min.





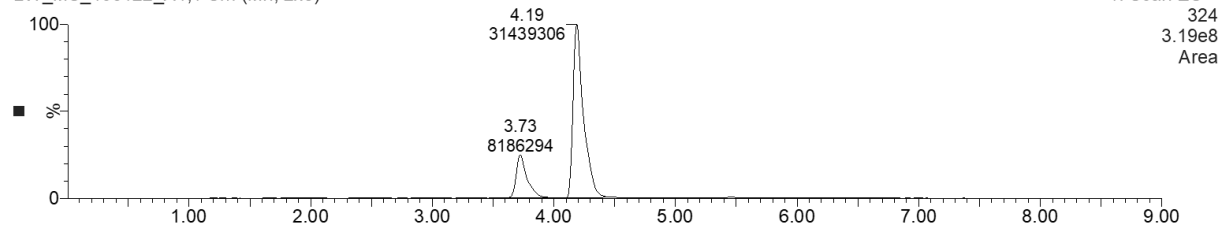
**Abbildung 8-185. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem fünften Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.71–3.72 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.18–4.19 min.



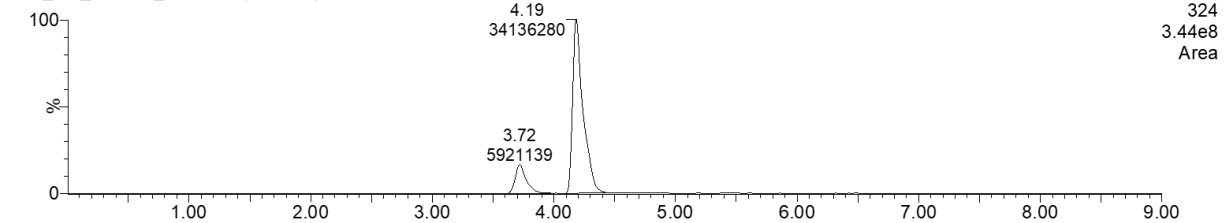
**Abbildung 8-186. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem sechsten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.71–3.72 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.18–4.19 min.

## LW\_MS\_190122\_A1,1

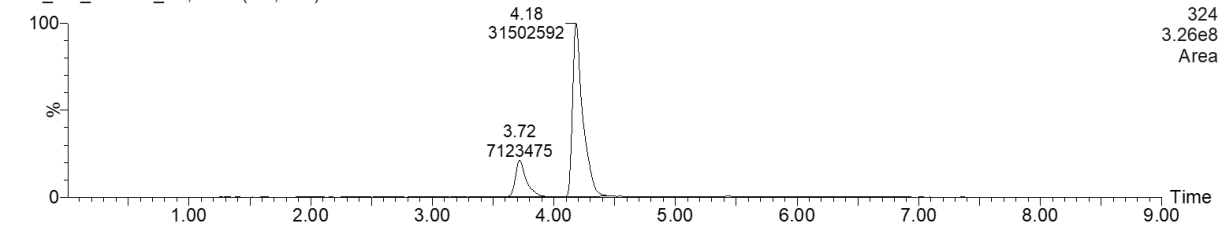
LW\_MS\_190122\_A1,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_MS\_190122\_A1,2 Sm (Mn, 2x3)



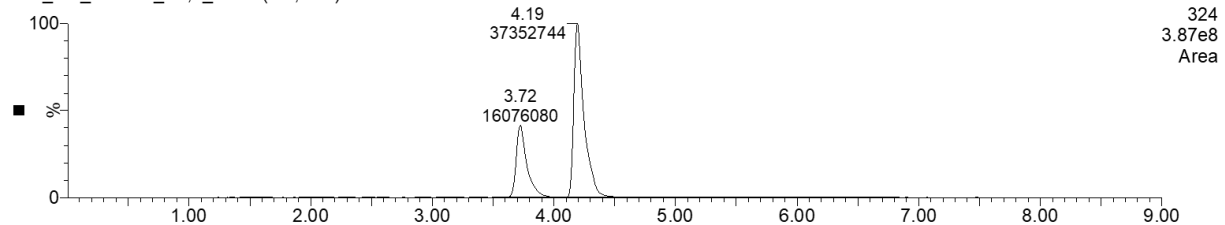
LW\_MS\_190122\_A1,3 Sm (Mn, 2x3)



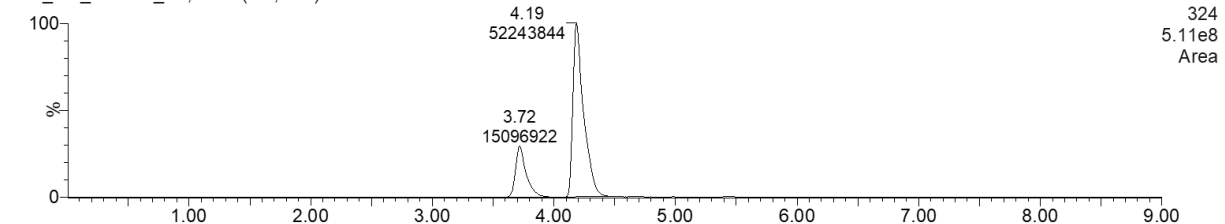
**Abbildung 8-187. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem siebten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.72–3.73 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.18–4.19 min.

## LW\_MS\_190123\_A1,1\_2

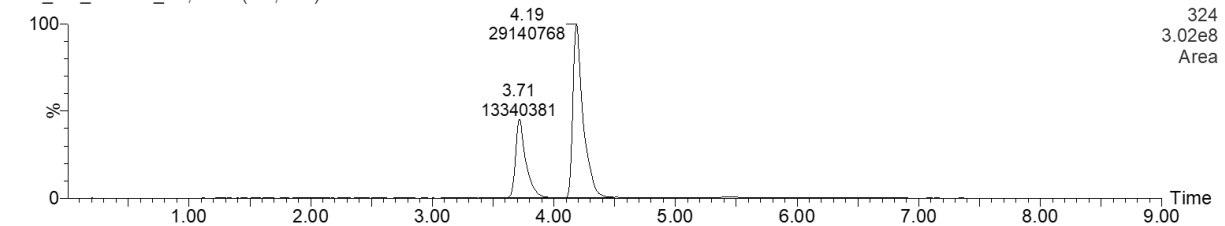
LW\_MS\_190123\_A1,1\_2 Sm (Mn, 2x3)



LW\_MS\_190123\_A1,2 Sm (Mn, 2x3)



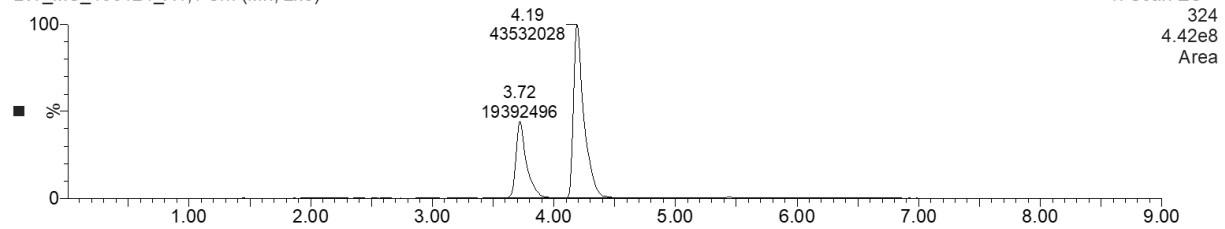
LW\_MS\_190123\_A1,3 Sm (Mn, 2x3)



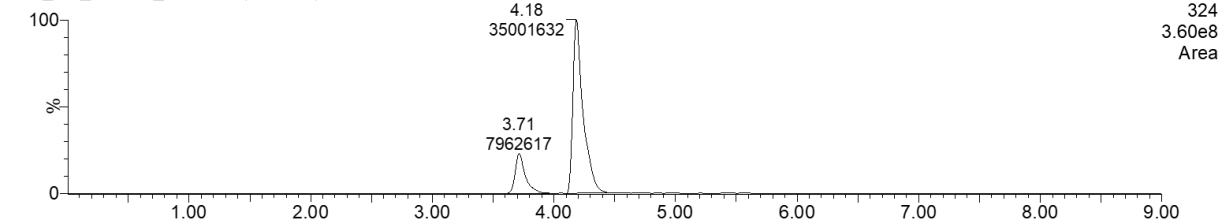
**Abbildung 8-188. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem achten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.71–3.72 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.19 min.

## LW\_MS\_190124\_A1,1

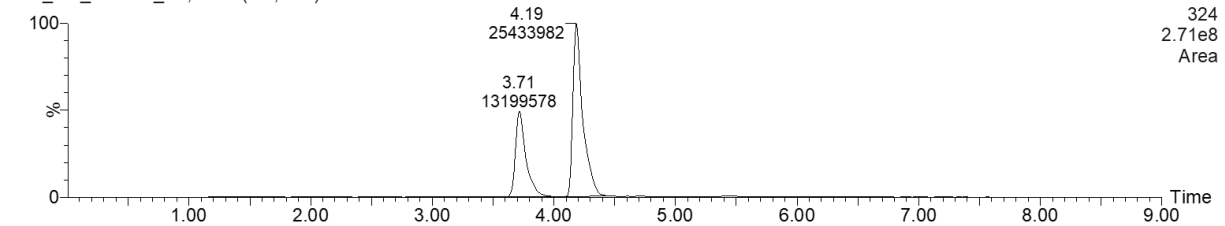
LW\_MS\_190124\_A1,1 Sm (Mn, 2x3)



LW\_MS\_190124\_A1,2 Sm (Mn, 2x3)



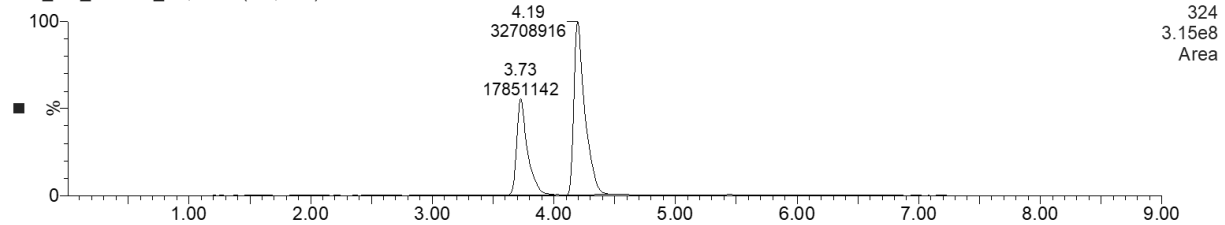
LW\_MS\_190124\_A1,3 Sm (Mn, 2x3)



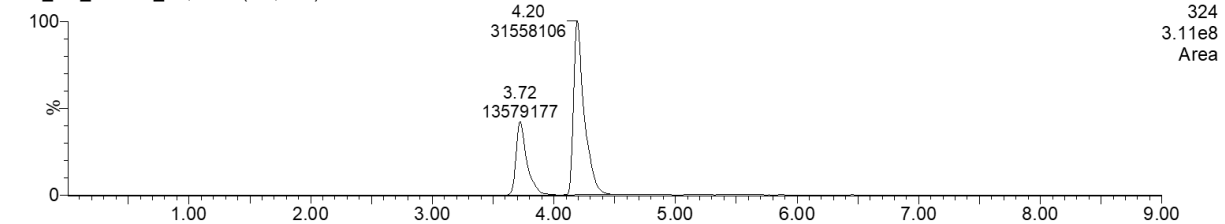
**Abbildung 8-189. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem neunten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.71–3.72 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.18–4.19 min.

## LW\_MS\_190125\_A1,1

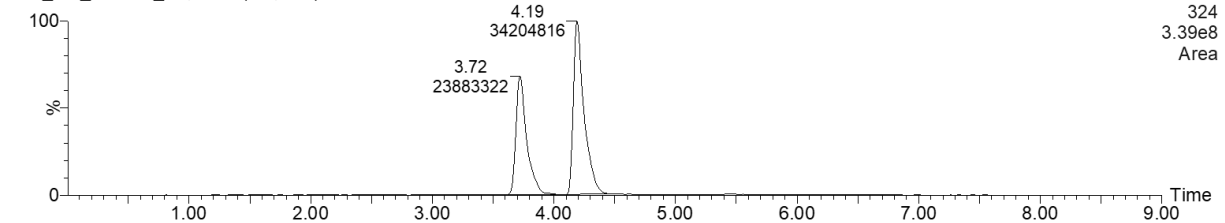
LW\_MS\_190125\_A1,1 Sm (Mn, 2x3)



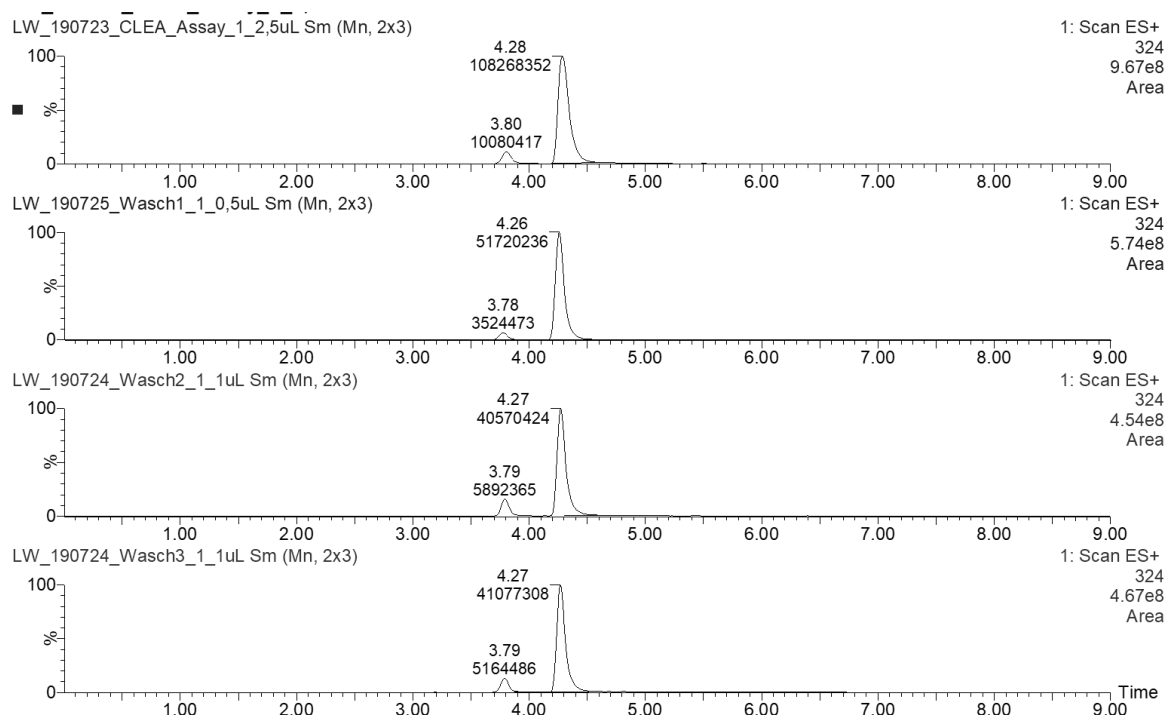
LW\_MS\_190125\_A1,2 Sm (Mn, 2x3)



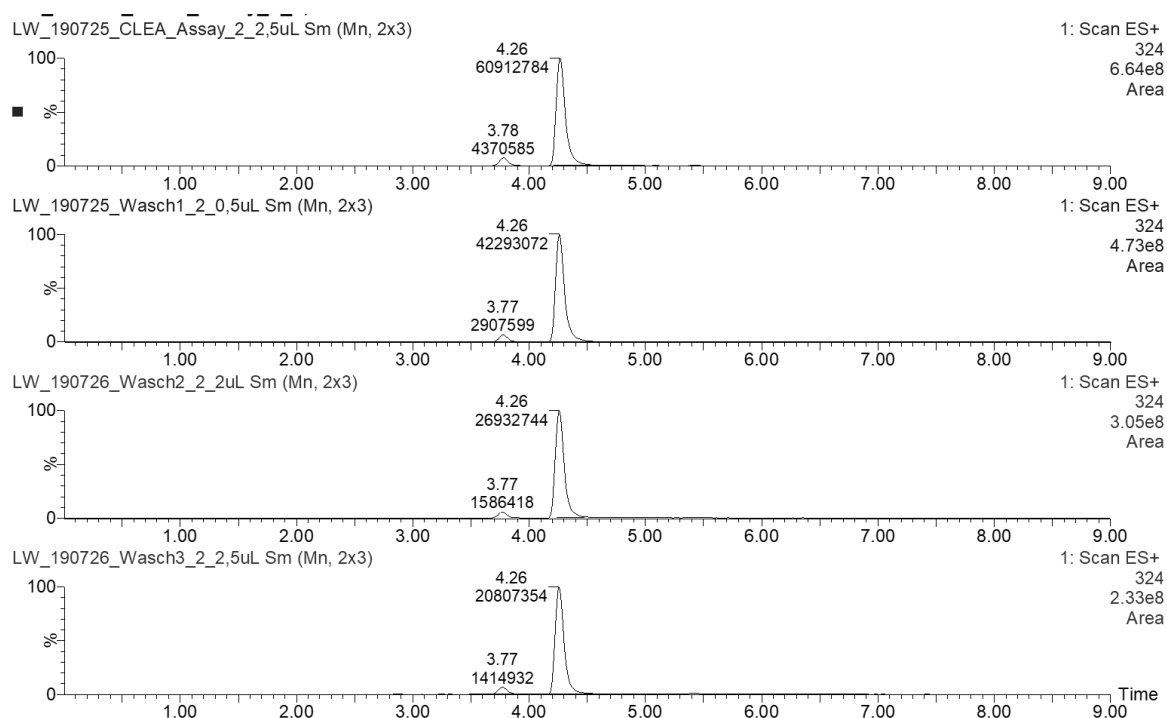
LW\_MS\_190125\_A1,3 Sm (Mn, 2x3)



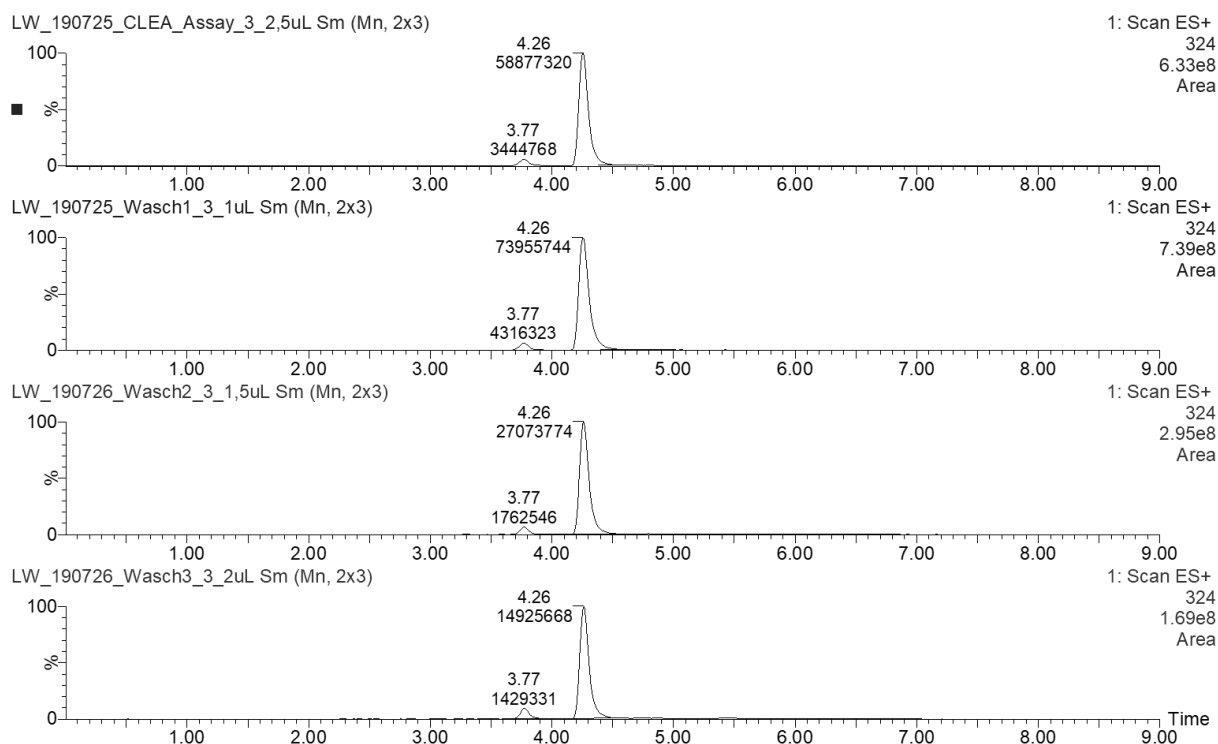
**Abbildung 8-190. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem zehnten Reaktionszyklus.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.72–3.73 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.19–4.20 min.

8.6.6.2.8.2. Präparativer Maßstab (10.0 mg; 33.2  $\mu\text{mol}$ )

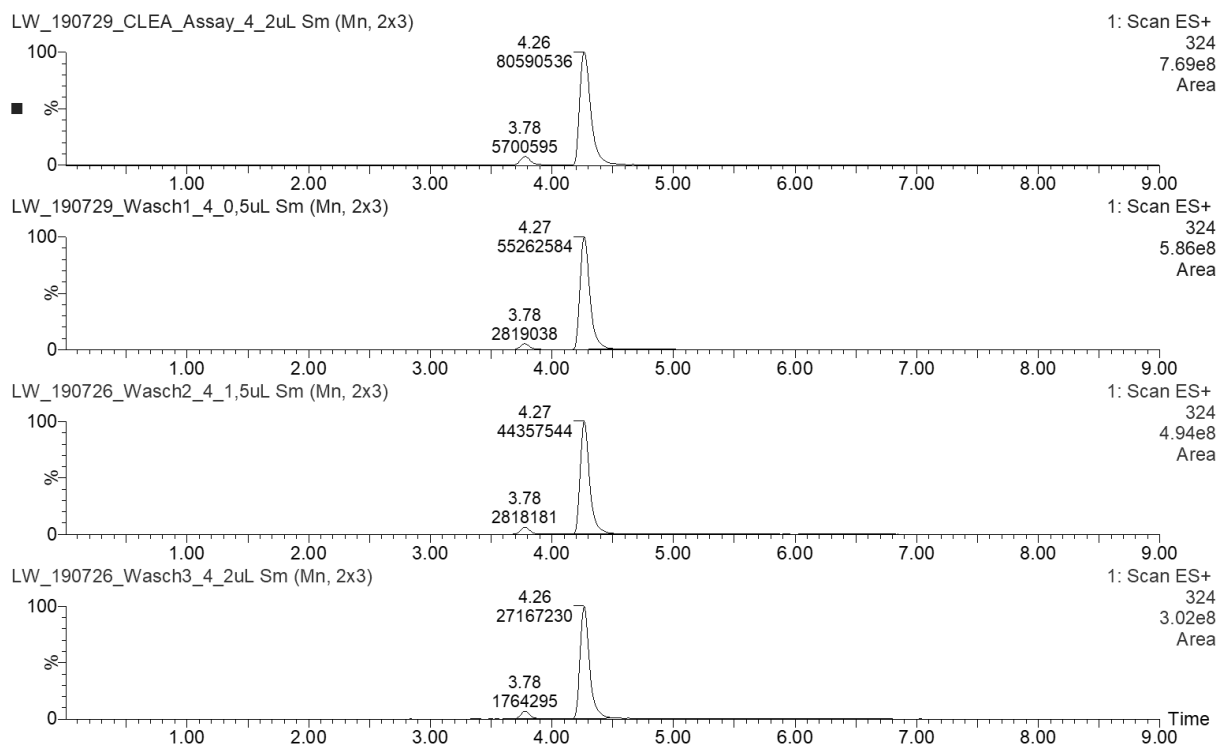
**Abbildung 8-191. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem ersten Reaktionszyklus im präparativen Maßstab: A) Extrahierte Reaktionslösung und B–D) extrahierte Waschfraktionen nach Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.78–3.80 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.26–4.28 min.



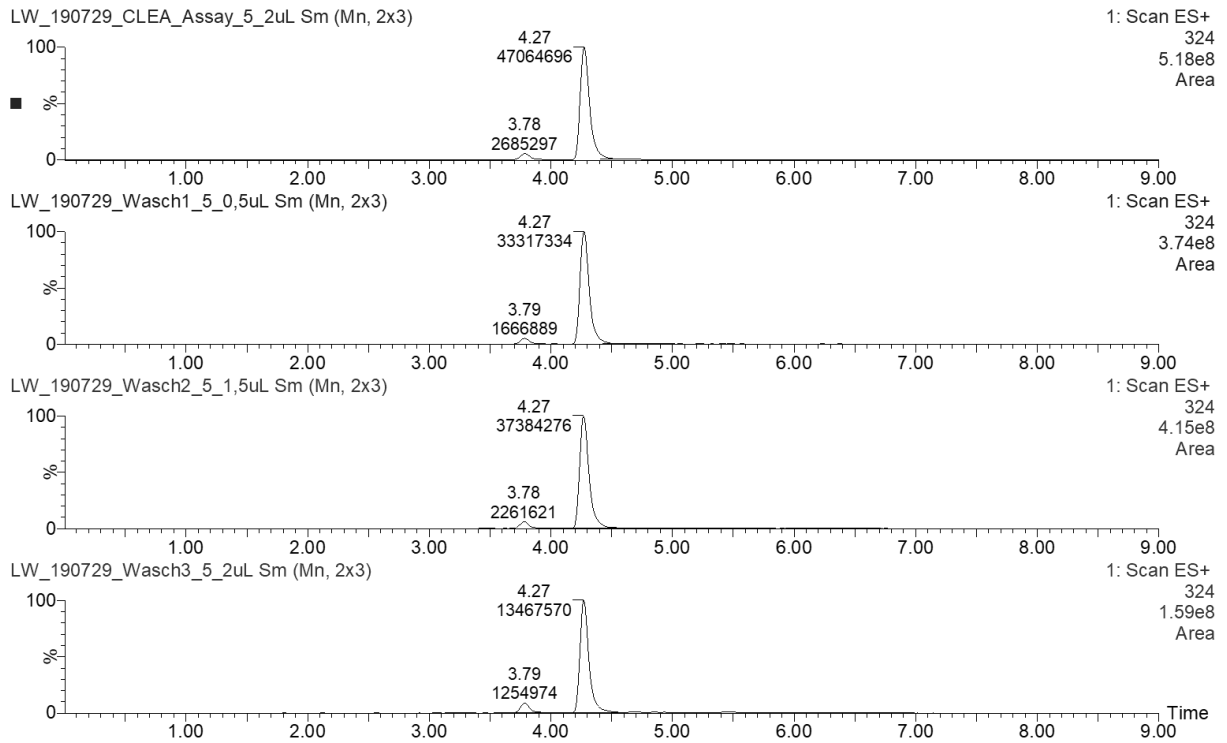
**Abbildung 8-192. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem zweiten Reaktionszyklus im präparativen Maßstab: A) Extrahierte Reaktionslösung und B–D) extrahierte Waschfraktionen nach Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.77–3.78 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.26 min.



**Abbildung 8-193. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem dritten Reaktionszyklus im präparativen Maßstab: A) Extrahierte Reaktionslösung und B–D) extrahierte Waschfraktionen nach Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikate jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.77 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.26 min.

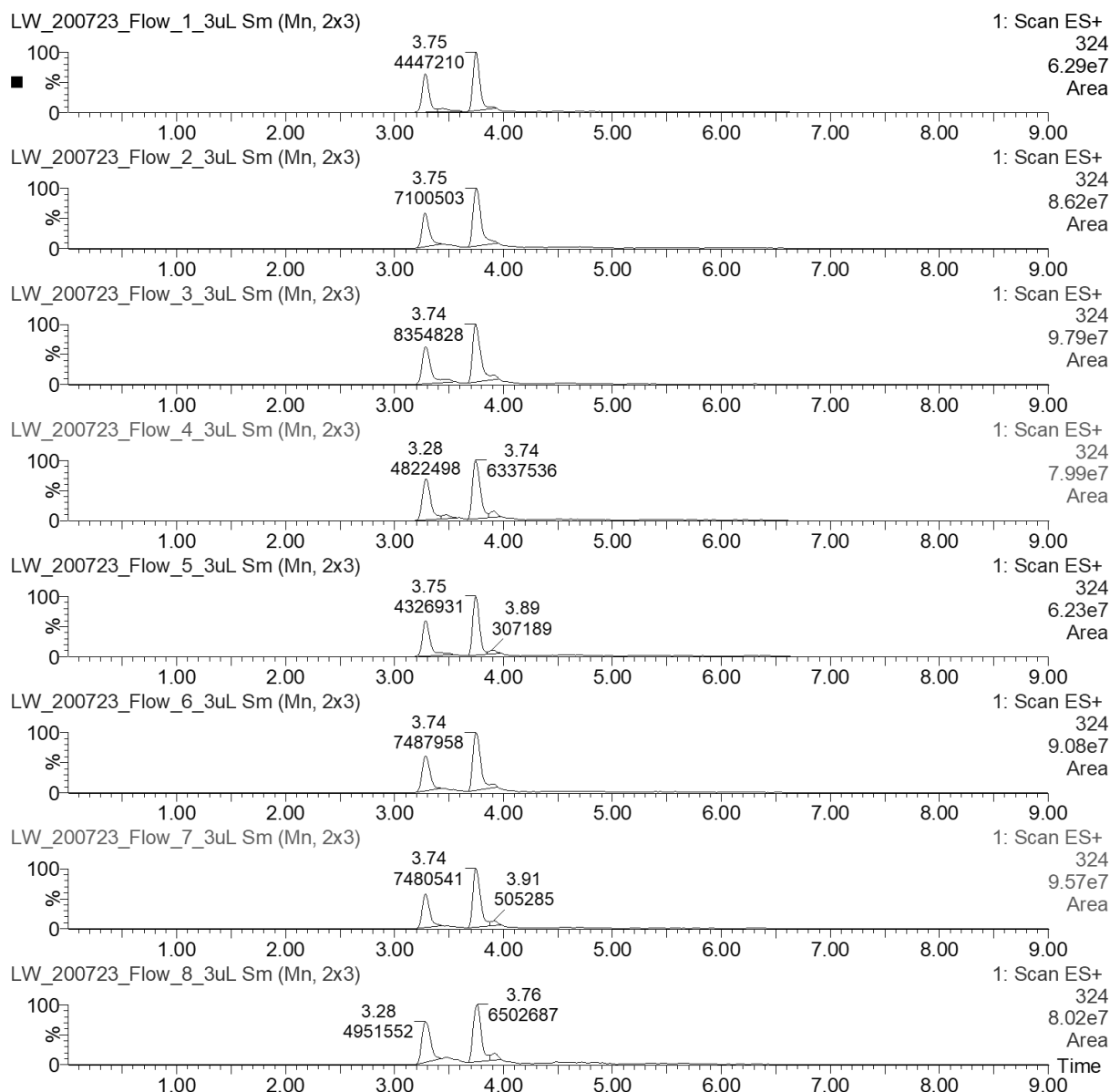


**Abbildung 8-194. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem vierten Reaktionszyklus im präparativen Maßstab: A) Extrahierte Reaktionslösung und B–D) extrahierte Waschfraktionen nach Reaktion.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikate jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.78 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.26–4.27 min.

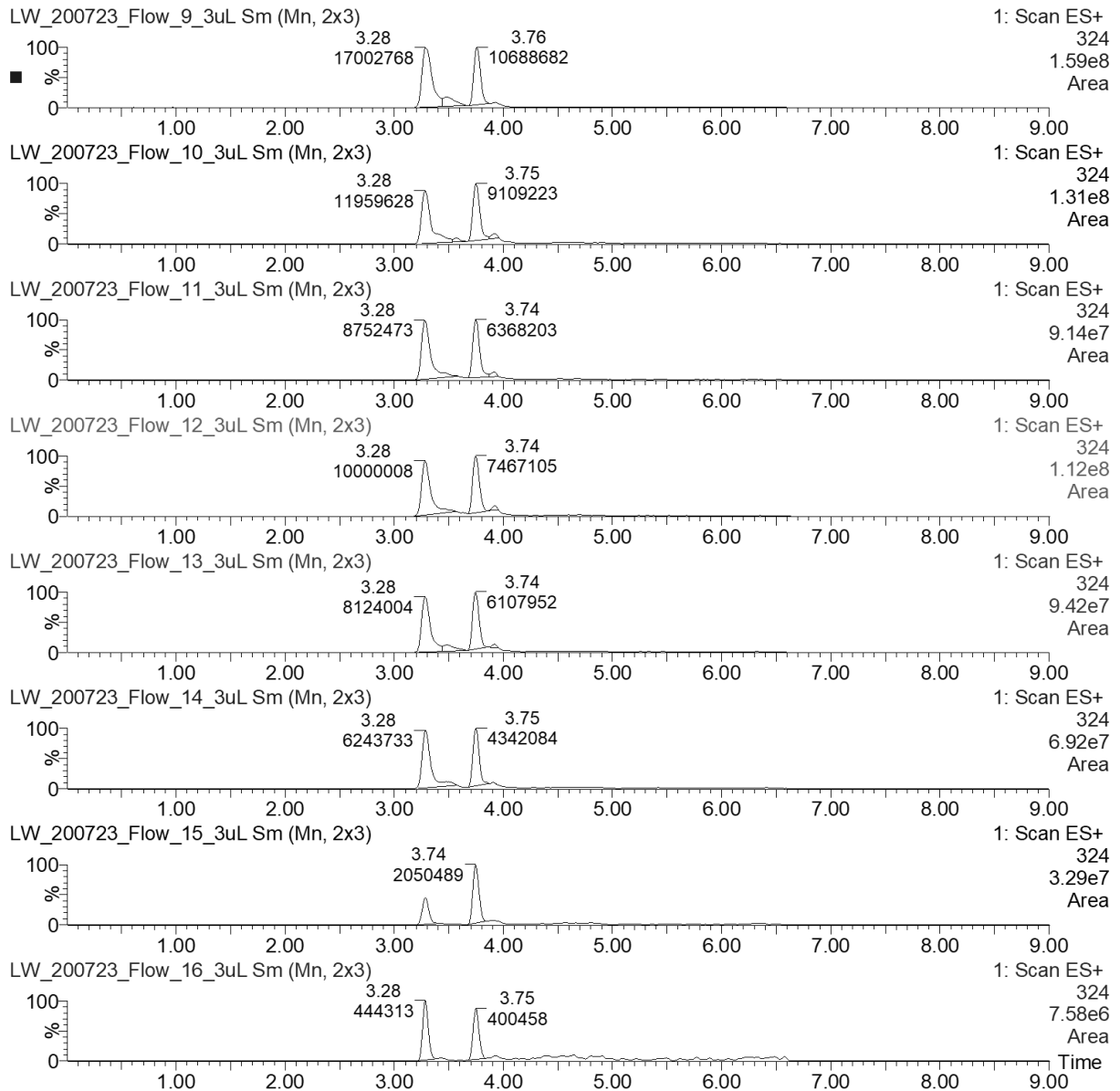


**Abbildung 8-195. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 nach dem fünften Reaktionszyklus im präparativen Maßstab: A) Extrahierte Reaktionslösung und B–D) extrahierte Waschfraktionen nach Reaktion. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden als Triplikat jeweils mit 10.0 mg (33.2  $\mu\text{mol}$ ) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 4 mM) und AmbDH3-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.78–3.79 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 4.27 min.**

## 8.6.6.2.9. Reaktion bei kontinuierlichem Fluss

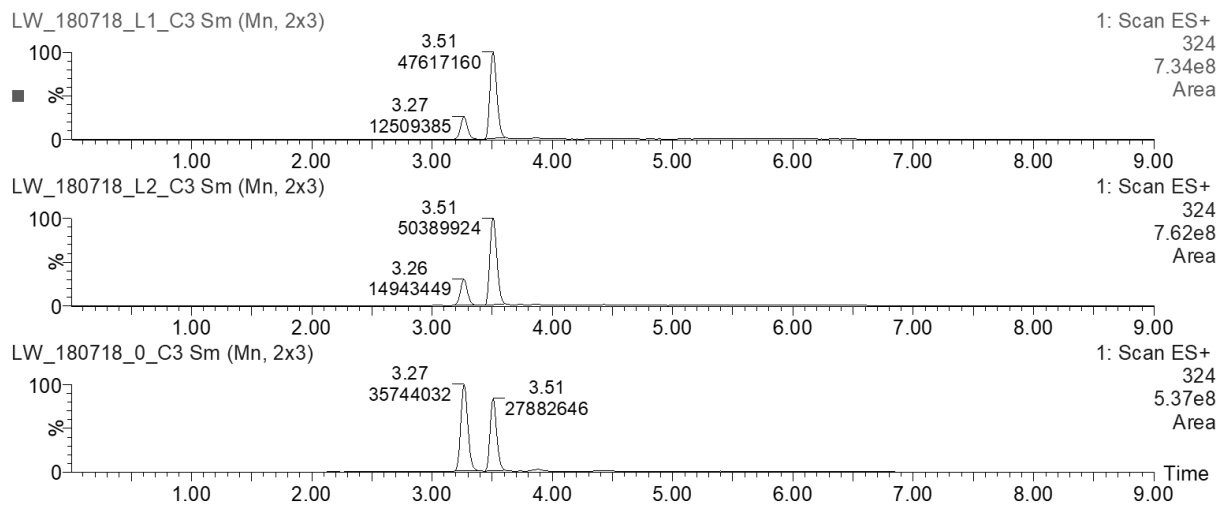


**Abbildung 8-196.** UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** unter kontinuierlichem Fluss zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion (von oben nach unten; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5 und 4.0 h. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 5.0 mg (16.6  $\mu$ mol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 0.25 mM) bei 30 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 10 mL/h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74–3.76 min.

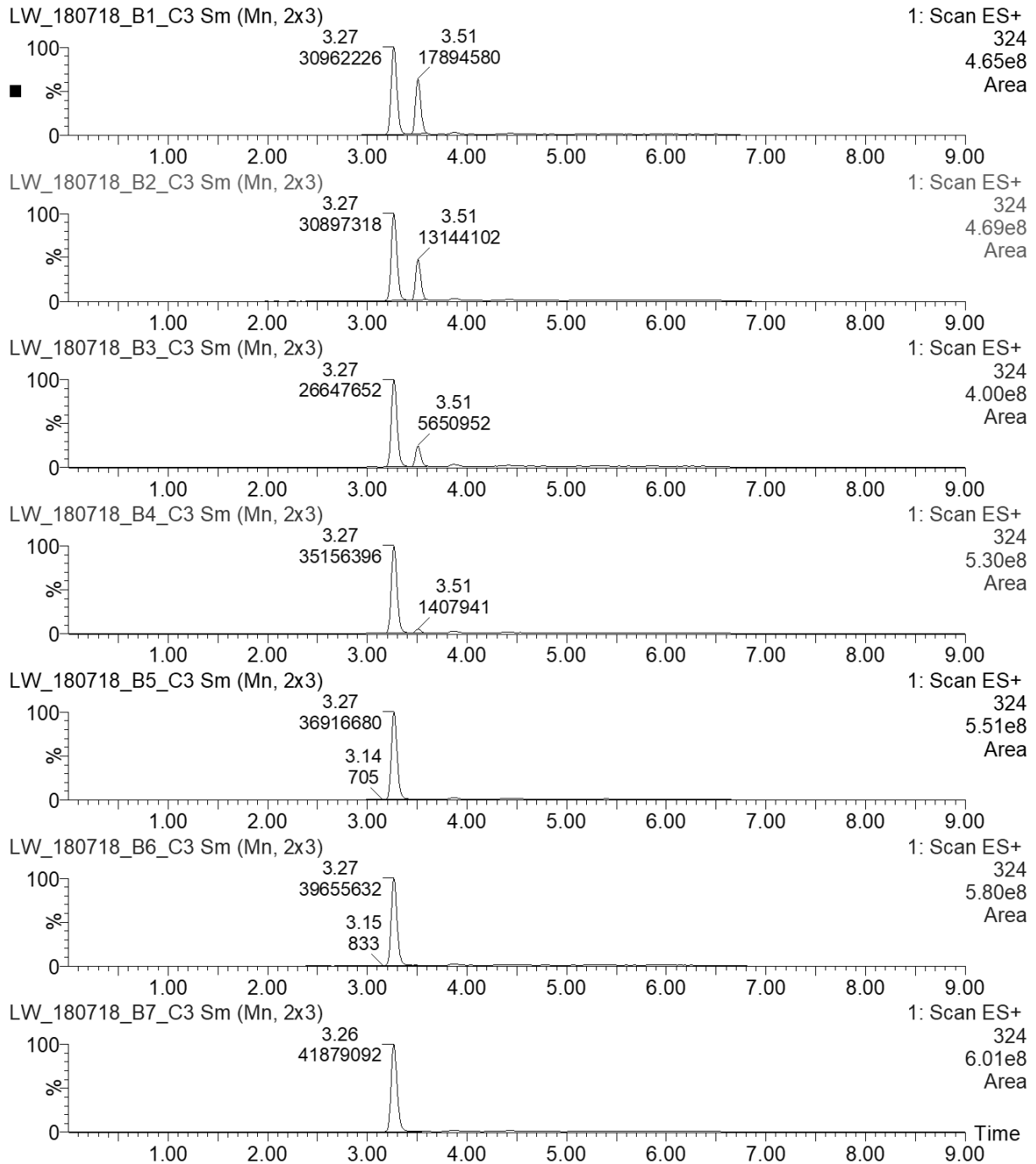


**Abbildung 8-197. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktionen von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 unter kontinuierlichem Fluss zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion (von oben nach unten; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5 und 8.5 h. Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 5.0 mg (16.6  $\mu$ mol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 0.25 mM) bei 30 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 10 mL/h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.28 min,  $t_R$  (*cis*-**164**) = 3.74–3.76 min.**

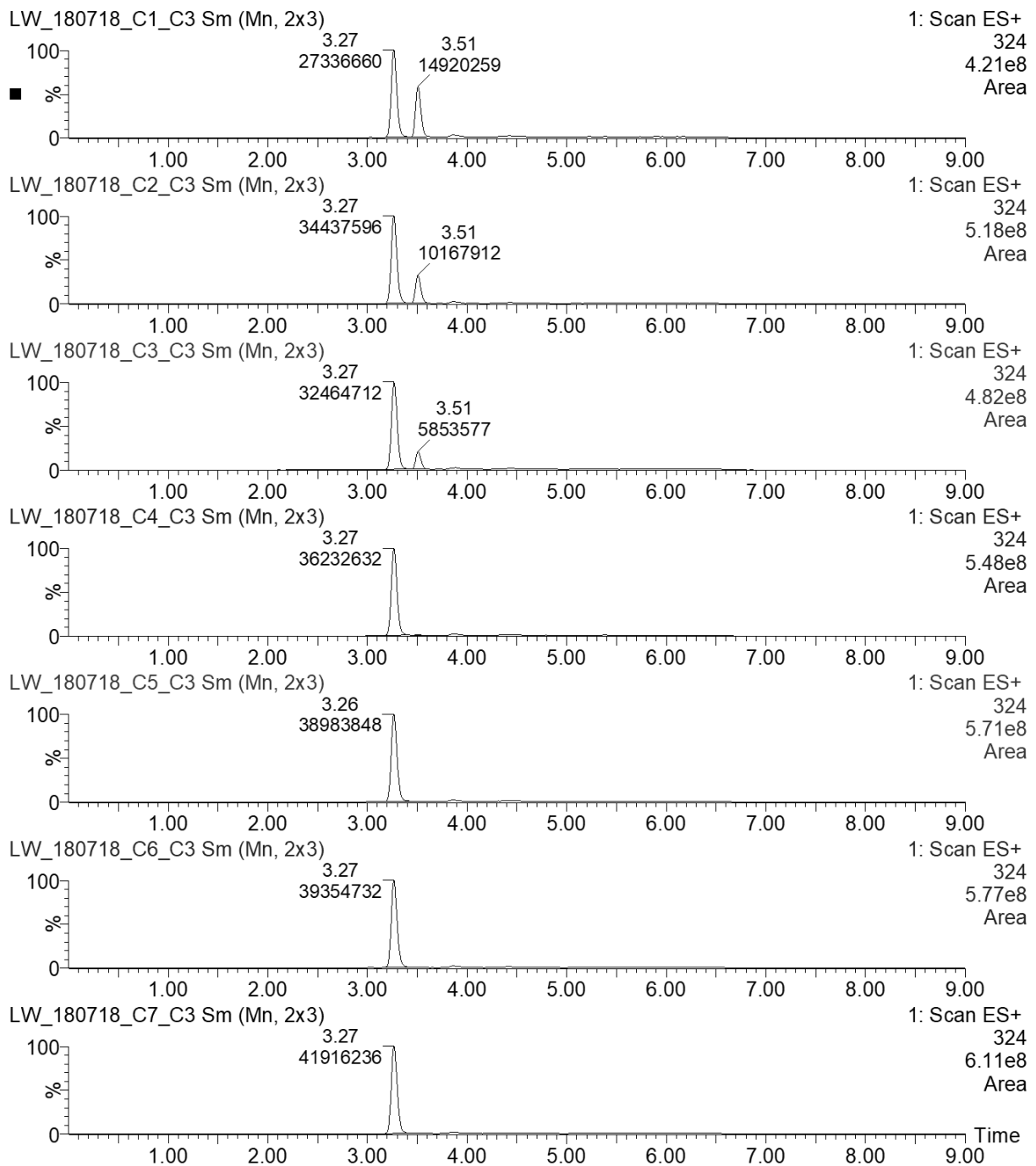


8.6.6.3. PedPS7-CLEA

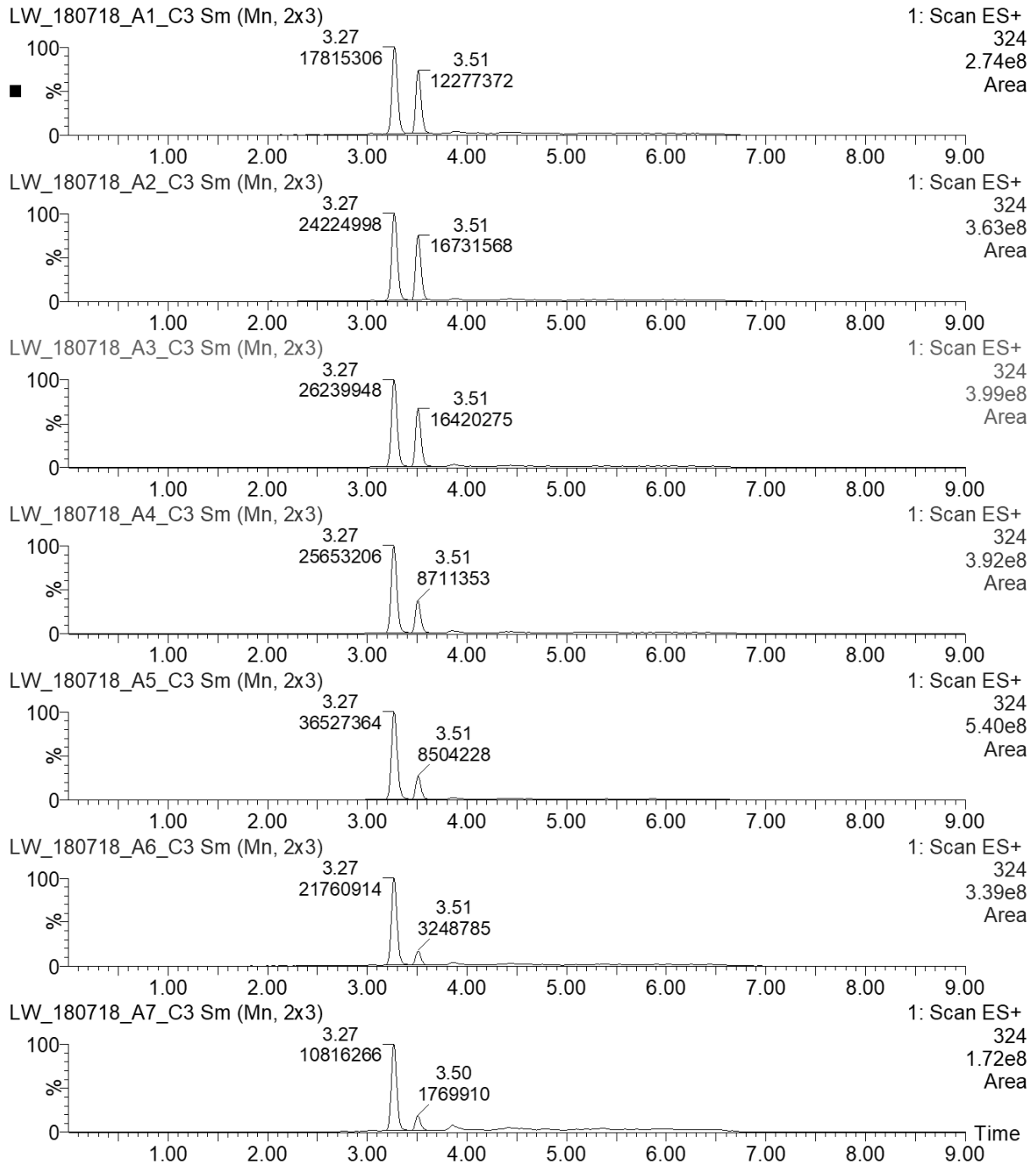
**Abbildung 8-198. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7-Lysat und PedPS7-CLEA mit Substrat 163.** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-Lysat (oben und mittig) CLEA (unten) bei 30 °C und 300  $\mu$ M für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*trans*-**164**) = 3.51 min.



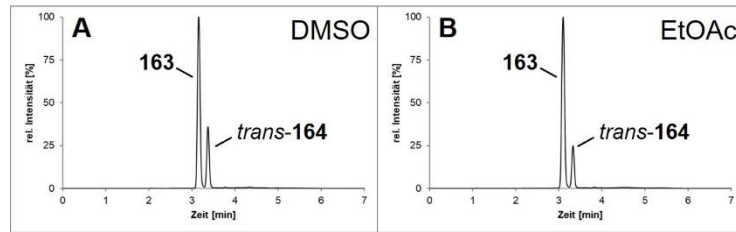
**Abbildung 8-199. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Methanol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.26–3.27 min,  $t_R$  (*trans*-**164**) = 3.51 min.



**Abbildung 8-200. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von *iso*-Propanol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*trans*-**164**) = 3.51 min.



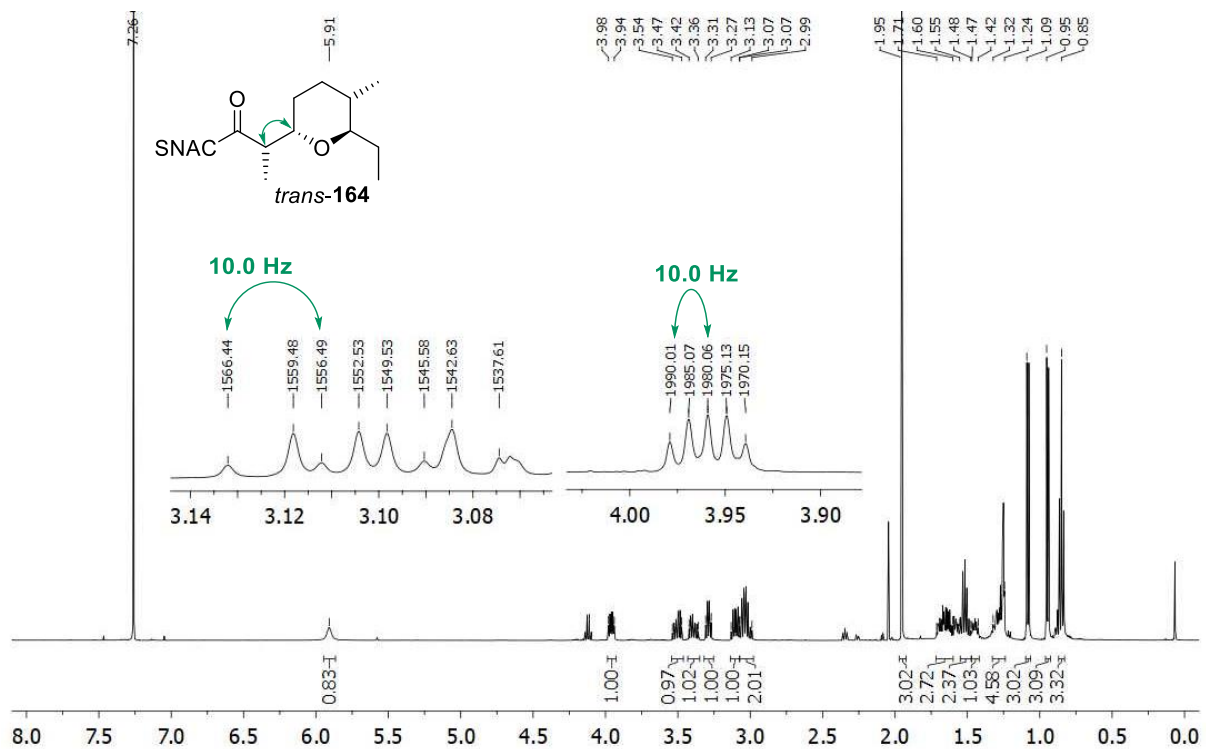
**Abbildung 8-201. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7-CLEA mit Substrat 163 in Gegenwart von Toluol als Cosolvenz (von oben nach unten 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100v%).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-CLEA in Natriumphosphat-Puffer und Cosolvenz bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.  $t_R$  (**163**) = 3.27 min,  $t_R$  (*trans*-**164**) = 3.50–3.51 min.



**Abbildung 8-202. UPLC-MS-Chromatogramme der Enzymreaktion von PedPS7-CLEA mit Substrat 163 und Cosolvenz: 0.5v% DMSO (A) bzw. 0.5v% EtOAc (B).** Gezeigt ist das gesuchte Masse/Ladungs-Verhältnis  $m/z$  mit zugehöriger Massenspur  $[M+Na]^+ = 324$ . Die Enzymreaktionen wurden jeweils mit 0.1 mg (332 nmol) Substrat **163** in Natriumphosphat-Puffer (Startkonzentration 2 mM) und PedPS7-CLEA bei 30 °C und 300 UpM für 16 h durchgeführt.

## 8.7. NMR-Spektren

### 8.7.1. Enzymaktivitätstests mit PedPS7



**Abbildung 8-203.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163.** Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 3.96$  und  $\delta(7\text{-H}) = 3.29$  ppm. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{2\text{H}-3\text{H}}$  von 10.0 Hz bestätigt die gezeigte Konfiguration an C-2.

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.91 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.98–3.94 (dt,  $J = 9.9, 5.0$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.54–3.47 (m, 1H,  $1 \times \text{NHCH}_2$ ), 3.42–3.36 (m, 1H,  $1 \times \text{NHCH}_2$ ), 3.31–3.27 (td,  $J = 6.4$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.10–3.07 (dq,  $J = 10.0, 3.1$  Hz, 1H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 3.07–2.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.71–1.60 (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.55–1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.47–1.42 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.32–1.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.09 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.95 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

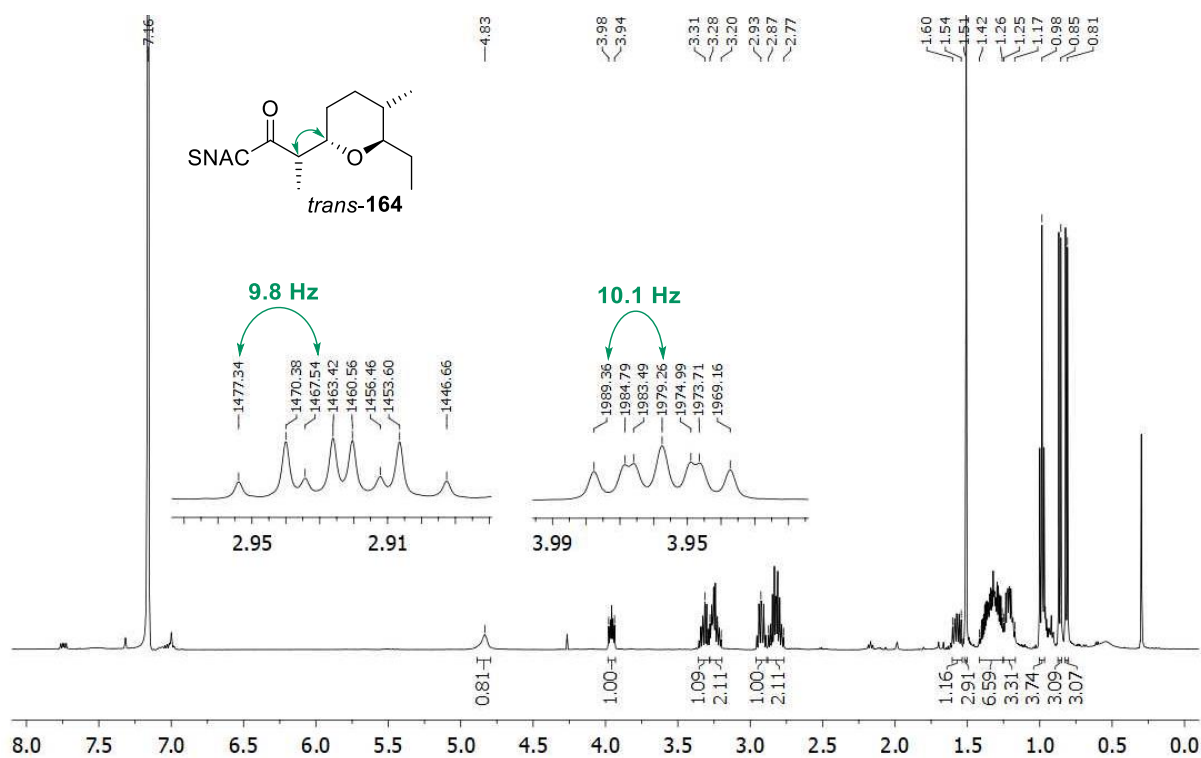


Abbildung 8-204.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 3.96$  und  $\delta(7\text{-H}) = 3.30$  ppm. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{2\text{H}-3\text{H}}$  von 9.8 Hz bestätigt die gezeigte Konfiguration an C-2.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.83 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.98–3.94 (ddd,  $J = 10.1, 5.9, 4.6$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.31 (td,  $J = 13.3, 6.6$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.28–3.20 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 2.93 (dq,  $J = 9.8, 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 2.87–2.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 1.60–1.54 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.51 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.42–1.26 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3, \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.25–1.17 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.98 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.85 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).

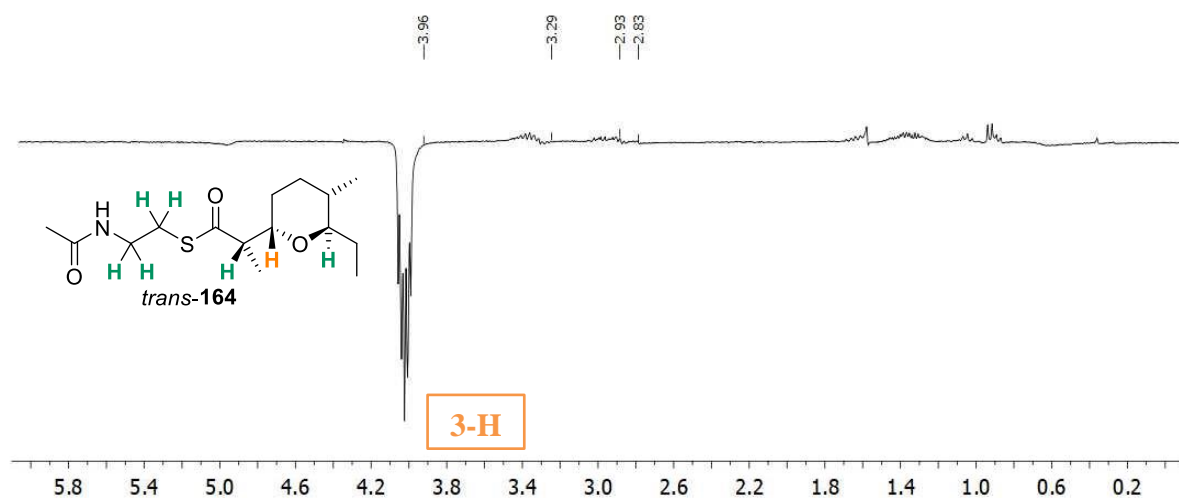


Abbildung 8-205. 1D-NOE-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163 mit Sättigung bei 3.96 ppm (3-H). Die Aufnahme erfolgte bei 300 MHz in  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Die wichtigen Protonen sind grün markiert. Das Proton, das angeregt wird ist jeweils orange hervorgehoben.

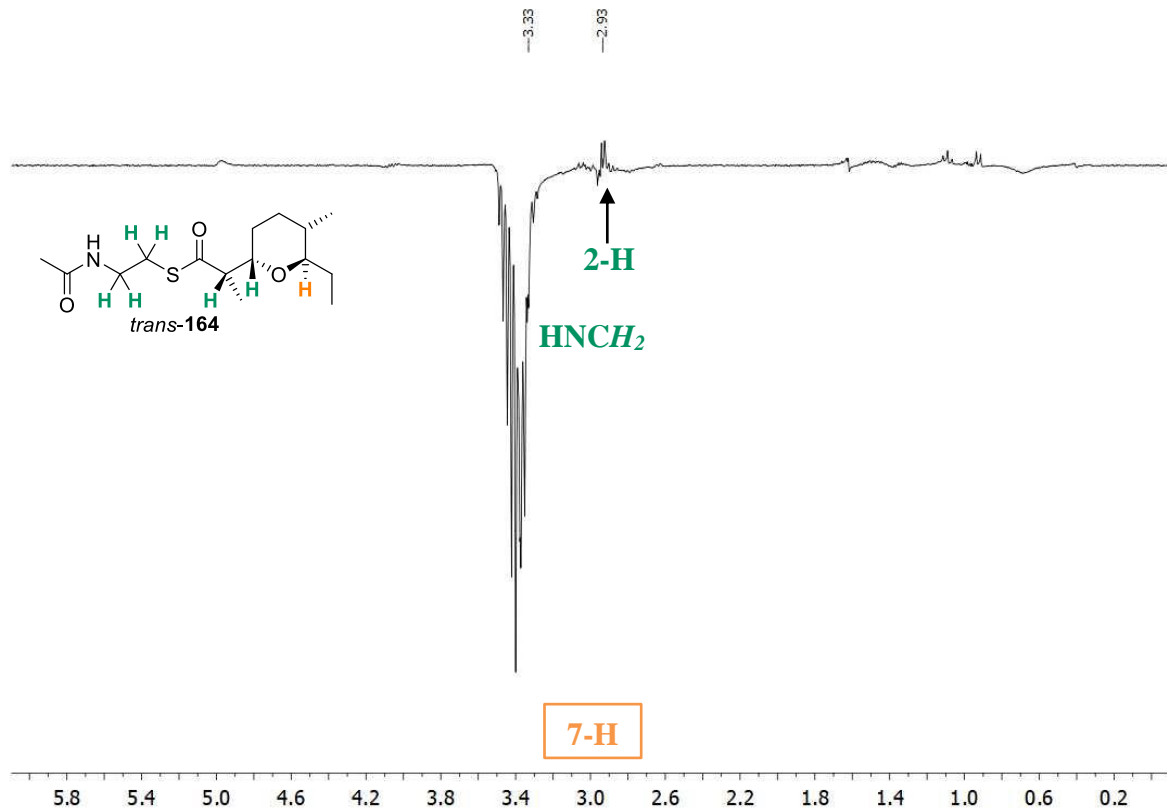


Abbildung 8-206. 1D-NOE-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163 mit Sättigung bei 3.31 ppm (7-H). Die Aufnahme erfolgte bei 300 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die wichtigen Protonen sind grün markiert. Das Proton, das angeregt wird ist jeweils orange hervorgehoben.

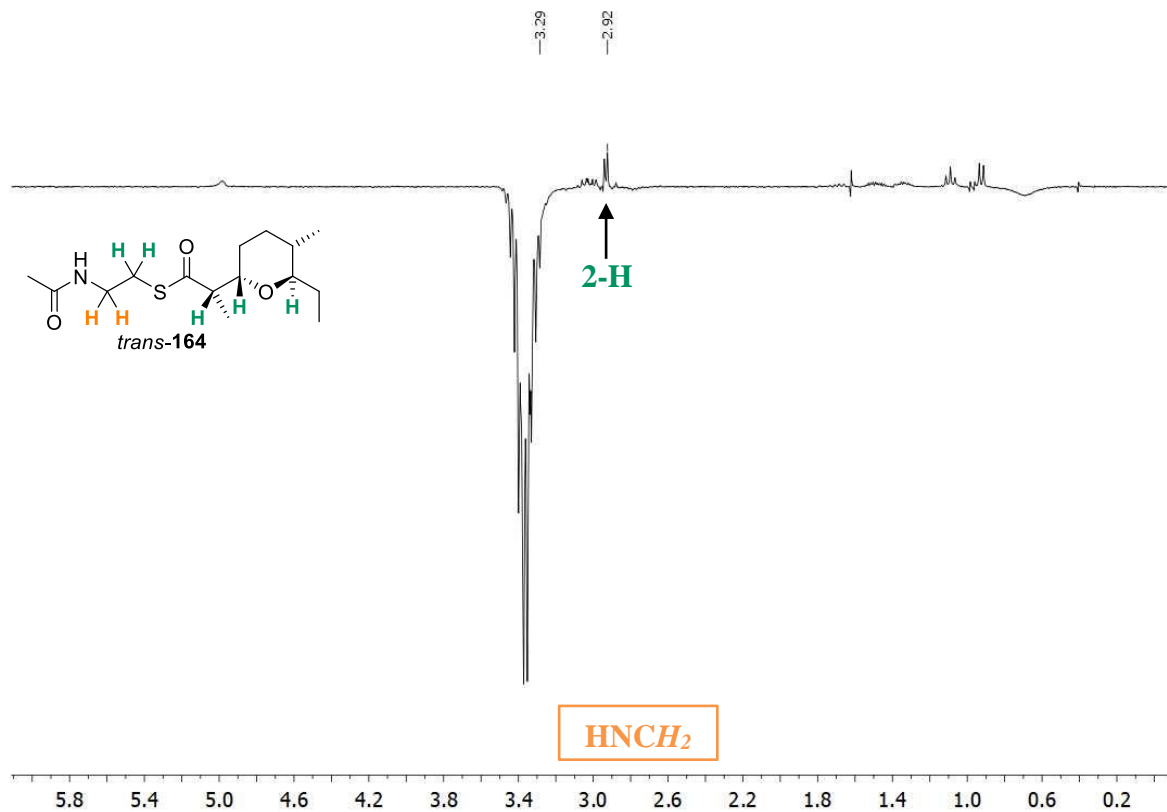


Abbildung 8-207. 1D-NOE-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163 mit Sättigung bei 3.29 ppm (HNCH<sub>2</sub>). Die Aufnahme erfolgte bei 300 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die wichtigen Protonen sind grün markiert. Das Proton, das angeregt wird ist jeweils orange hervorgehoben.

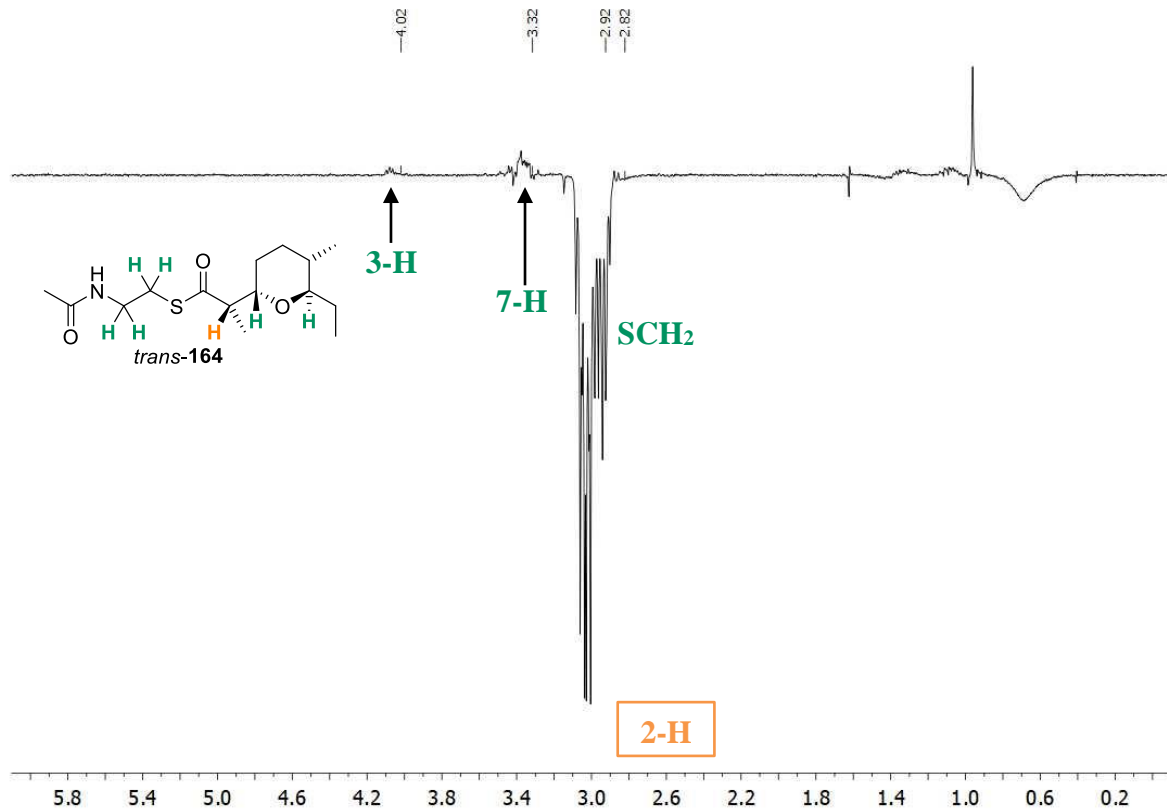


Abbildung 8-208. 1D-NOE-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163 mit Sättigung bei 2.93 ppm (**2-H**). Die Aufnahme erfolgte bei 300 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die wichtigen Protonen sind **grün** markiert. Das Proton, das angeregt wird ist jeweils **orange** hervorgehoben.

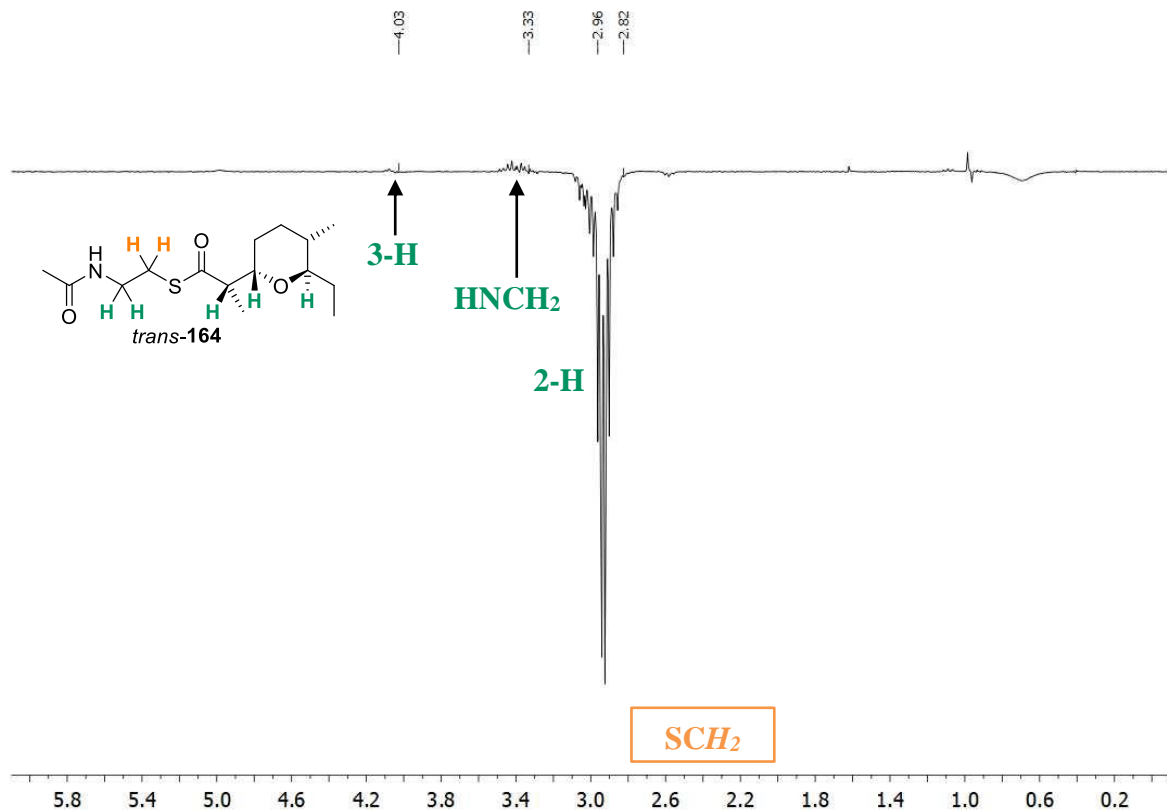


Abbildung 8-209. 1D-NOE-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163 mit Sättigung bei 2.82 ppm (**SCH<sub>2</sub>**). Die Aufnahme erfolgte bei 300 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die wichtigen Protonen sind **grün** markiert. Das Proton, das angeregt wird ist jeweils **orange** hervorgehoben.



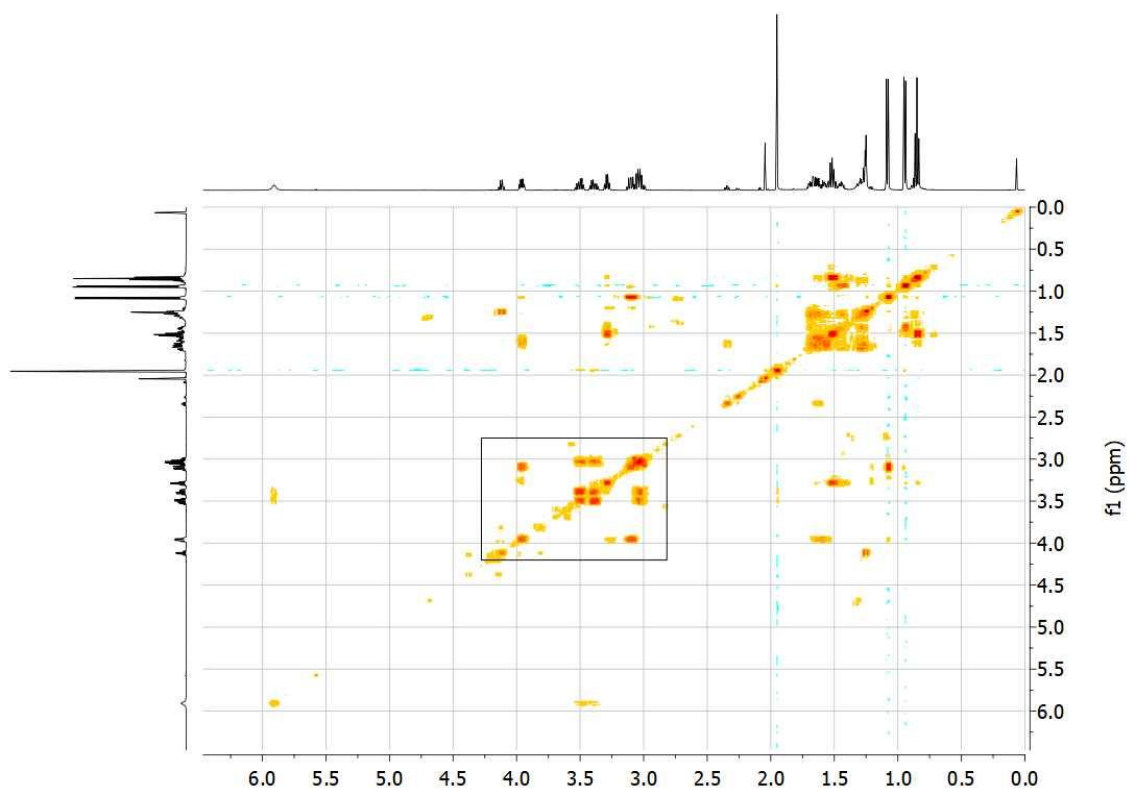


Abbildung 8-210.  $H,H$ -COSY-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der relevante Bereich ist durch einen Kasten hervorgehoben.

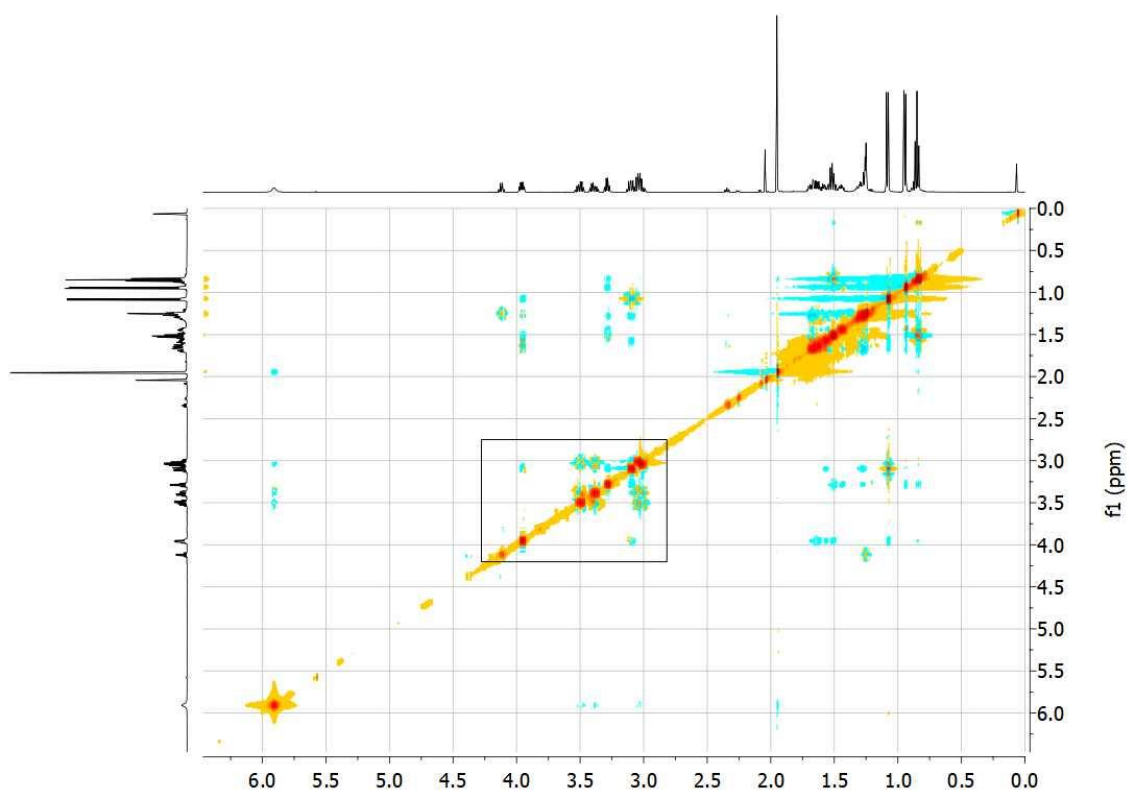


Abbildung 8-211. 2D-NOESY-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der relevante Bereich ist durch einen Kasten hervorgehoben.

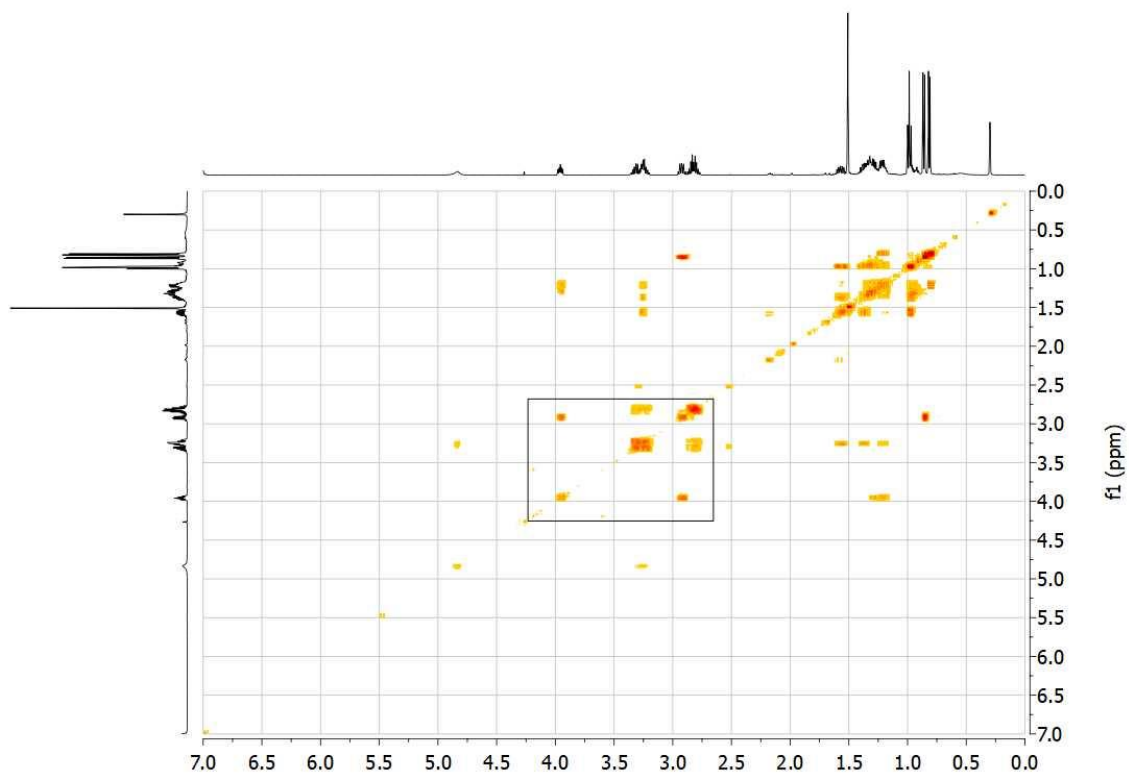


Abbildung 8-212.  $H,H$ -COSY-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Der relevante Bereich ist durch einen Kasten hervorgehoben.

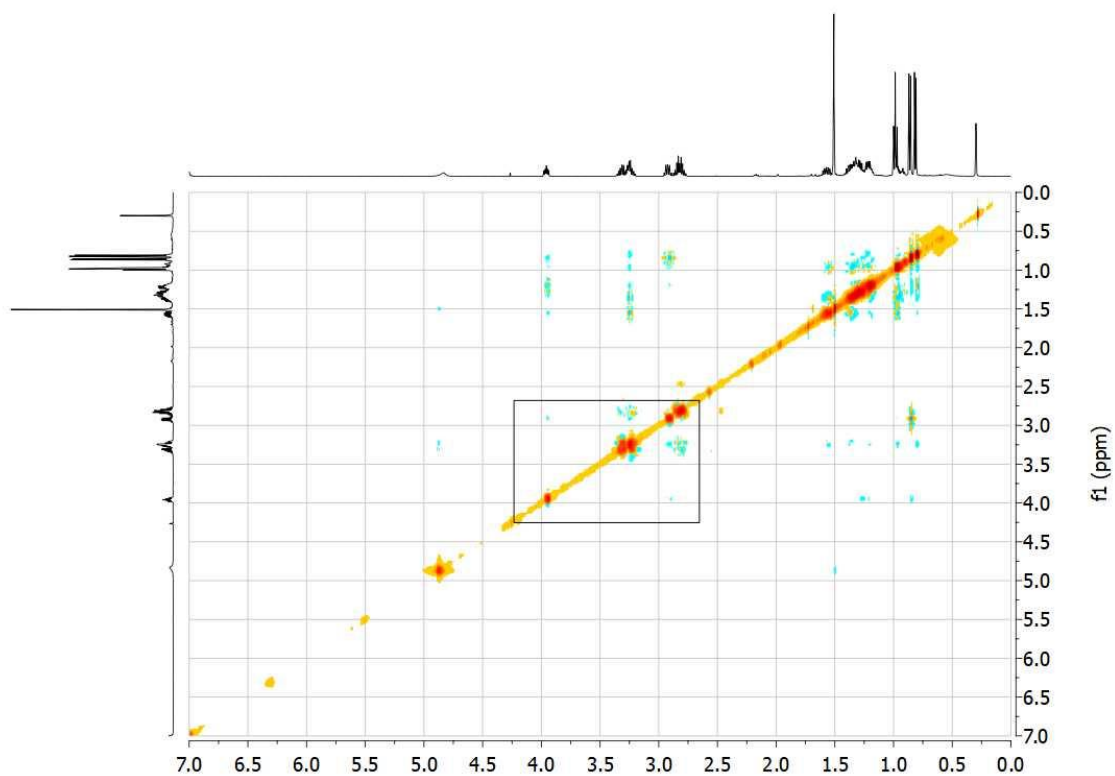
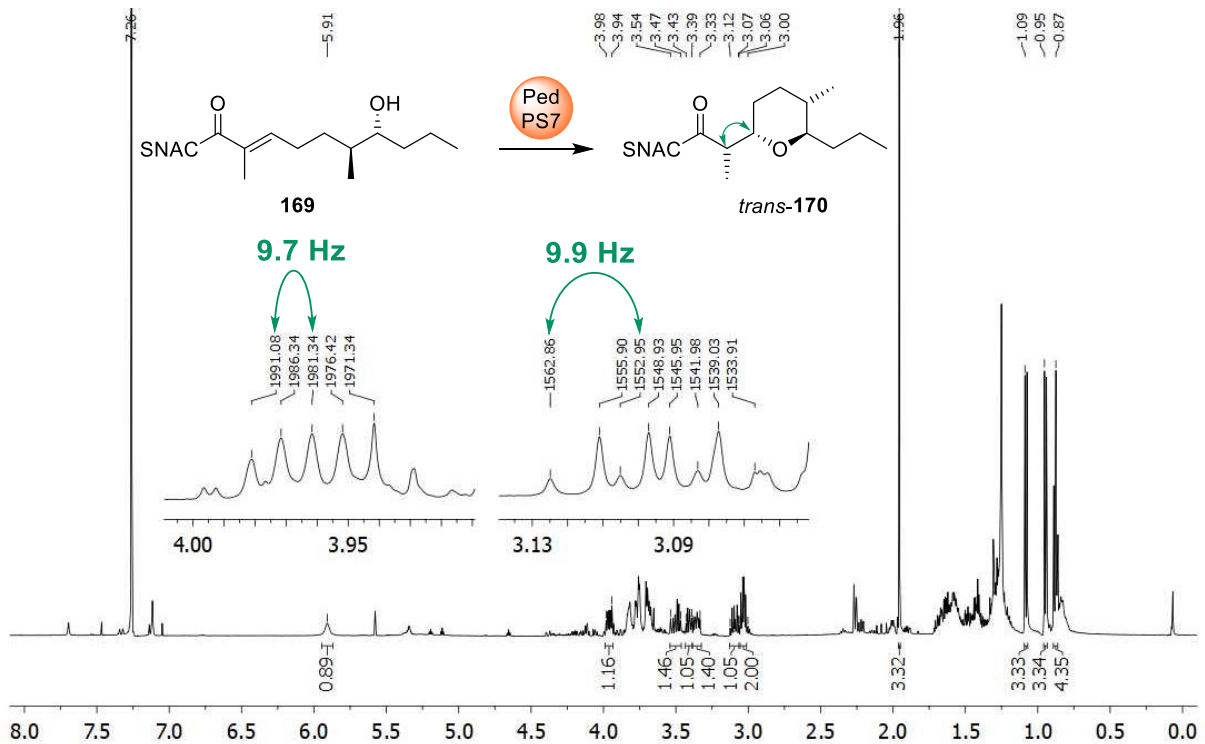
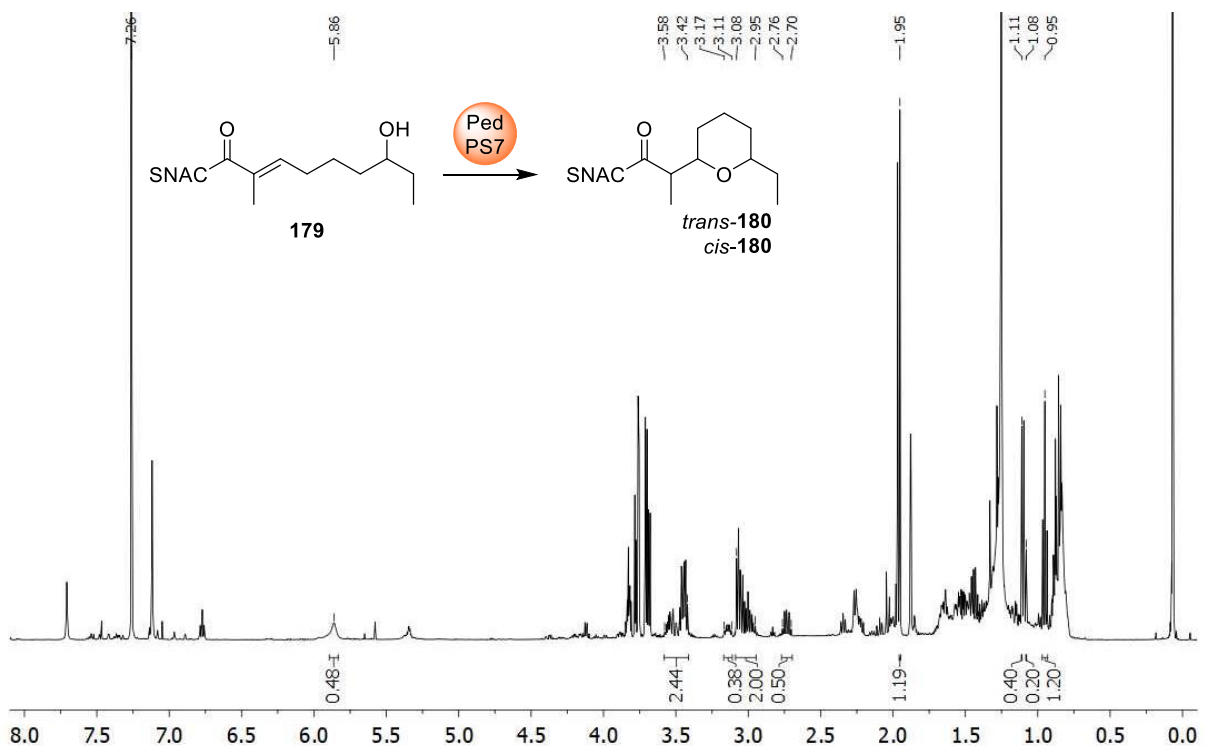


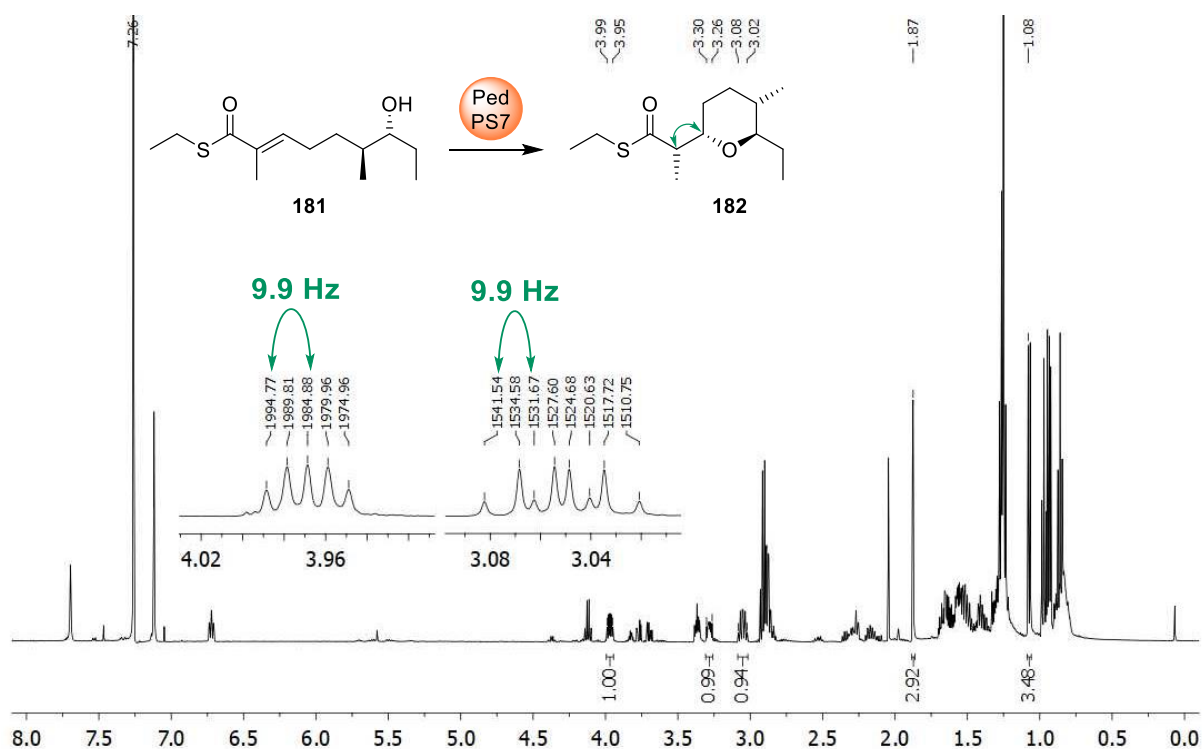
Abbildung 8-213. 2D-NOESY-Spektrum des Produkts *trans*-164 der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 163. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Der relevante Bereich ist durch einen Kasten hervorgehoben.



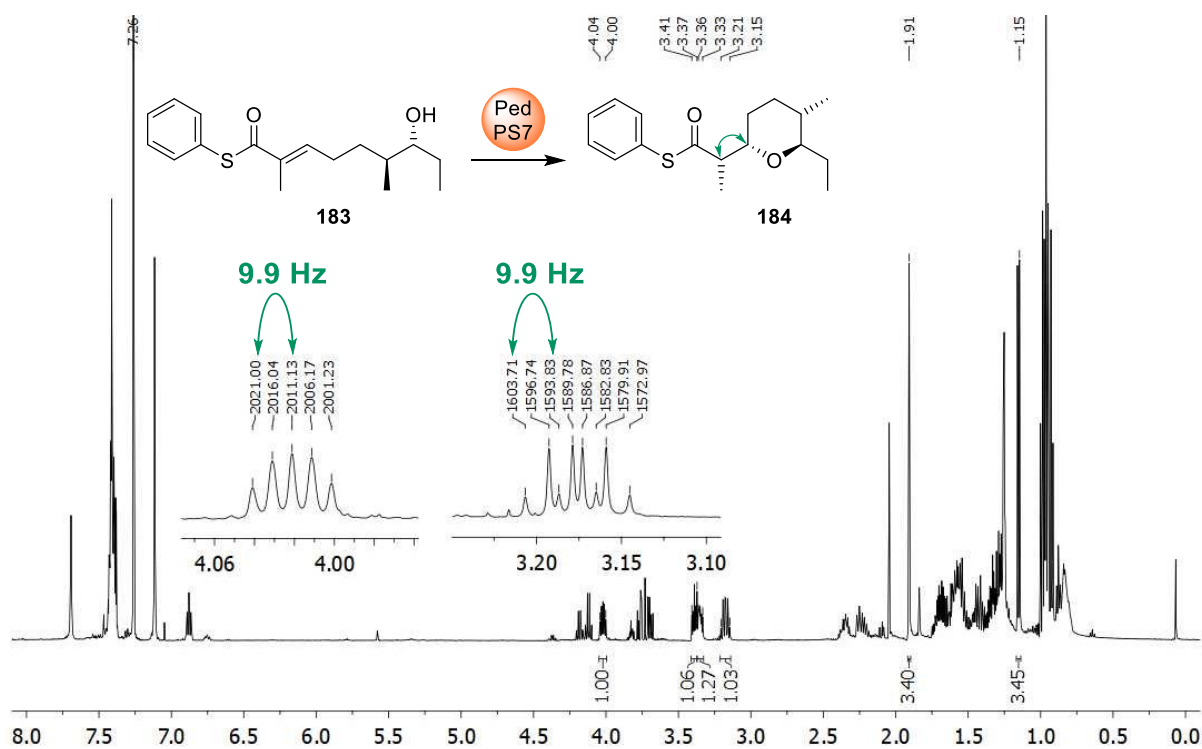
**Abbildung 8-214.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **169**. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Die Ausschnitte der NMR-Spektren zur Umsatz- und/oder Konfigurationsbestimmung sind in Abschnitt 3.4.2.1.4 dargestellt. Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(\mathbf{3-H}) = 3.96$  ppm und  $\delta(\mathbf{7-H}) = 3.35$  ppm. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{\text{H-3H}}$  von 9.7–9.9 Hz bestätigt die gezeigte Konfiguration an C-2.



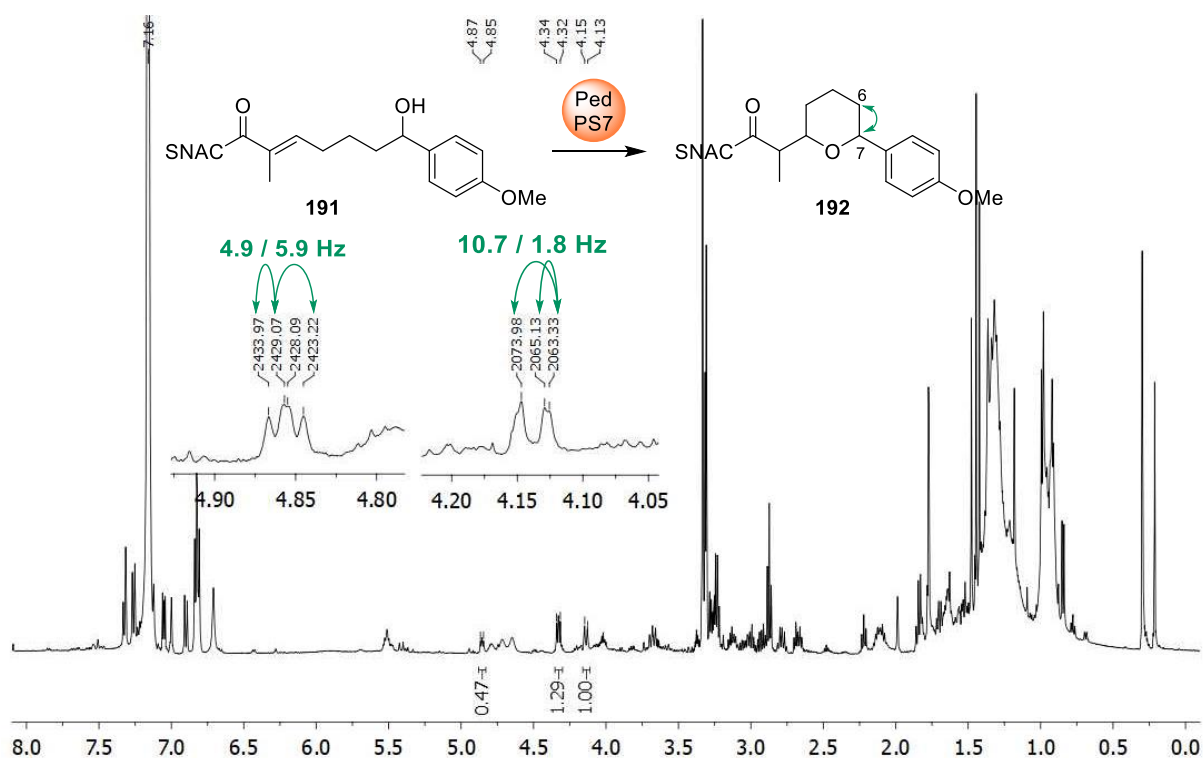
**Abbildung 8-215.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat **179**. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Die Ausschnitte der NMR-Spektren zur Umsatz- und/oder Konfigurationsbestimmung sind in Abschnitt 3.4.2.1.4 dargestellt. Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(\mathbf{3-H}) = 3.89$  ppm, sowie die 2,6-*cis*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(\mathbf{7-H}) = 3.14$  ppm.



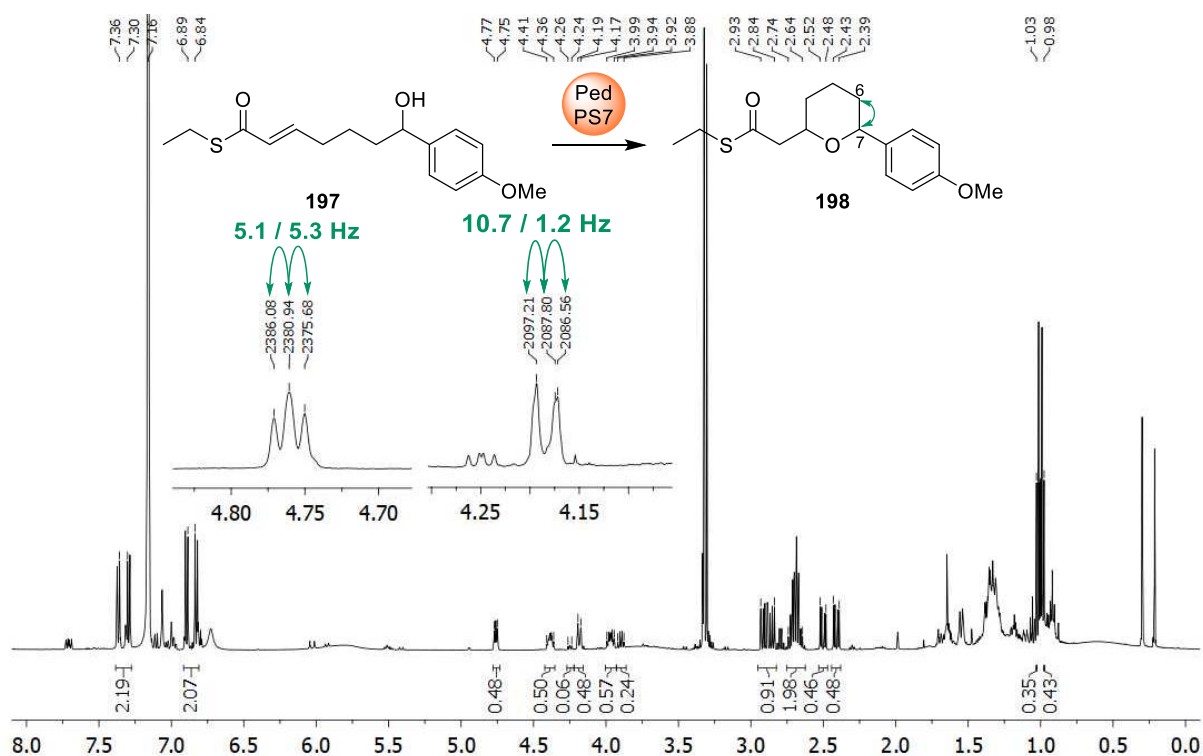
**Abbildung 8-216.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 181. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Die Ausschnitte der NMR-Spektren zur Umsatz- und/oder Konfigurationsbestimmung sind in Abschnitt 3.4.2.1.4 dargestellt. Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 3.97$  und  $\delta(7\text{-H}) = 3.28$  ppm. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{2\text{H-3H}}$  von 9.9 Hz bestätigt die gezeigte Konfiguration an C-2.



**Abbildung 8-217.**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 183. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Die Ausschnitte der NMR-Spektren zur Umsatz- und/oder Konfigurationsbestimmung sind in Abschnitt 3.4.2.1.4 dargestellt. Es zeigt sich die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von  $\delta(3\text{-H}) = 4.02$  und  $\delta(7\text{-H}) = 3.35$  ppm. Die vicinale Kopplungskonstante  $^3J_{2\text{H-3H}}$  von 9.9 Hz bestätigt die gezeigte Konfiguration an C-2.



**Abbildung 8-218.** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 191. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die Ausschnitte der NMR-Spektren zur Umsatz- und/oder Konfigurationsbestimmung sind in Abschnitt 3.4.2.1.4 dargestellt. Die vicinalen Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>6H-7H</sub> von 4.9 und 5.9 Hz bzw. 1.8 und 10.7 Hz ermöglichen die Zuordnung des Signals zu Produkt *trans*- bzw. *cis*-192.



**Abbildung 8-219.** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Produkts der Enzymreaktion von PedPS7 mit Substrat 197. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Die Ausschnitte der NMR-Spektren zur Umsatz- und/oder Konfigurationsbestimmung sind in Abschnitt 3.4.2.1.4 dargestellt. Die vicinalen Kopplungskonstanten <sup>3</sup>J<sub>6H-7H</sub> von 5.1 und 5.3 Hz bzw. 1.2 und 10.7 Hz ermöglichen die Zuordnung des Signals zu Produkt *trans*- bzw. *cis*-198. Es zeigt sich außerdem die 2,6-*trans*-THP-charakteristische Verschiebung von δ(7-H) = 4.76 ppm und δ(3-H) = 4.39 ppm, sowie die 2,6-*cis*-THP-charakteristische Verschiebung von δ(7-H) = 4.18 ppm und δ(3-H) = 3.97 ppm.

## 8.7.2. Enzymaktivitätstests mit AmbDH3-CLEA

## 8.7.2.1. Wiederverwendung

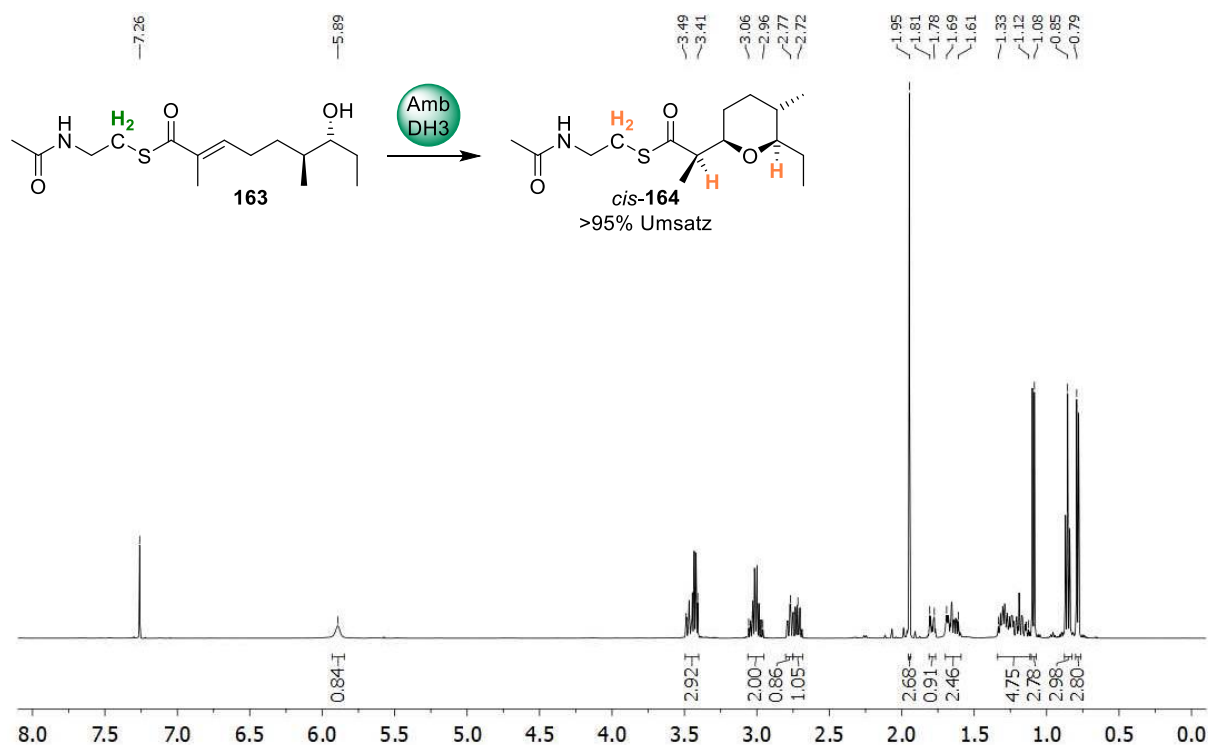
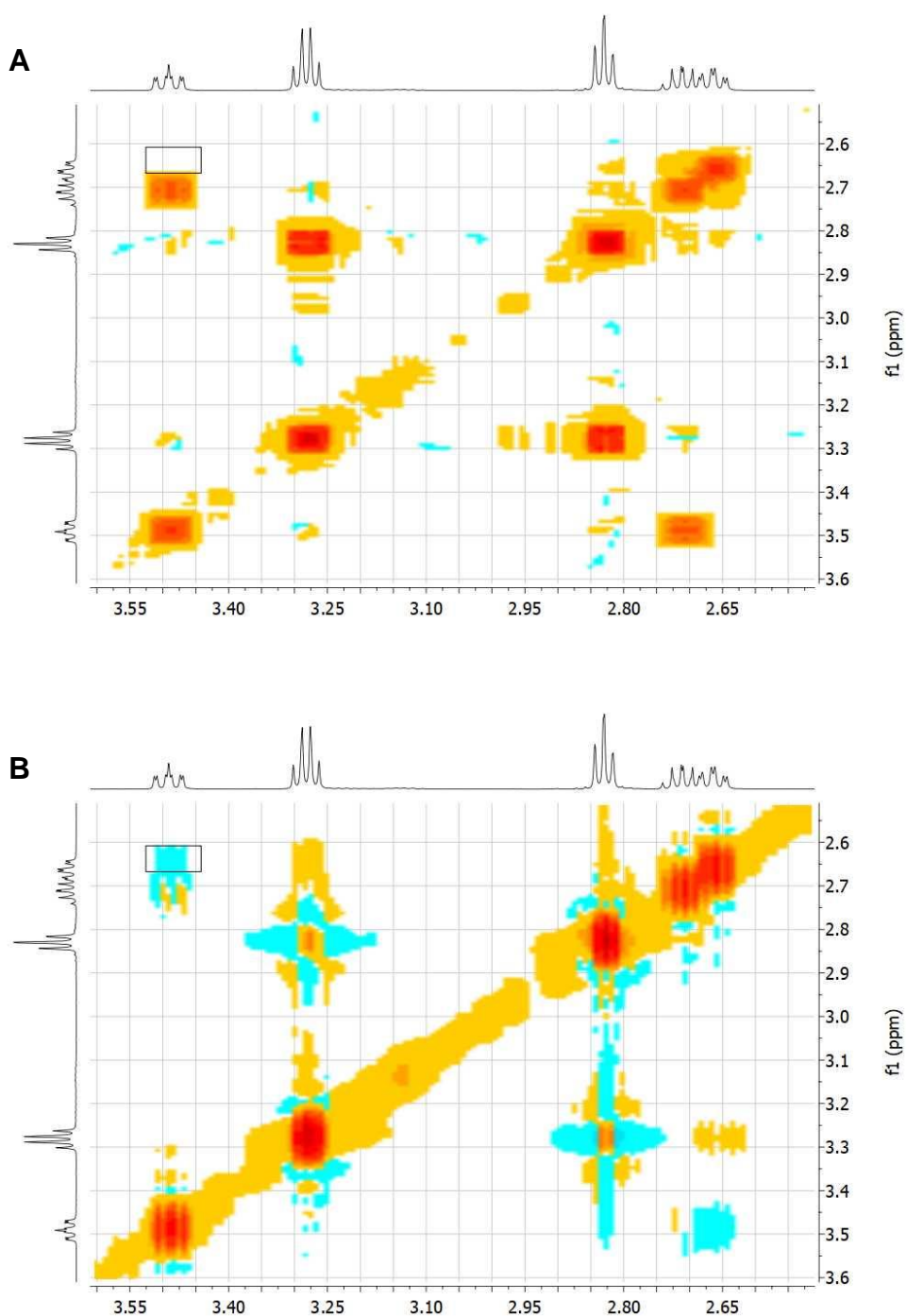


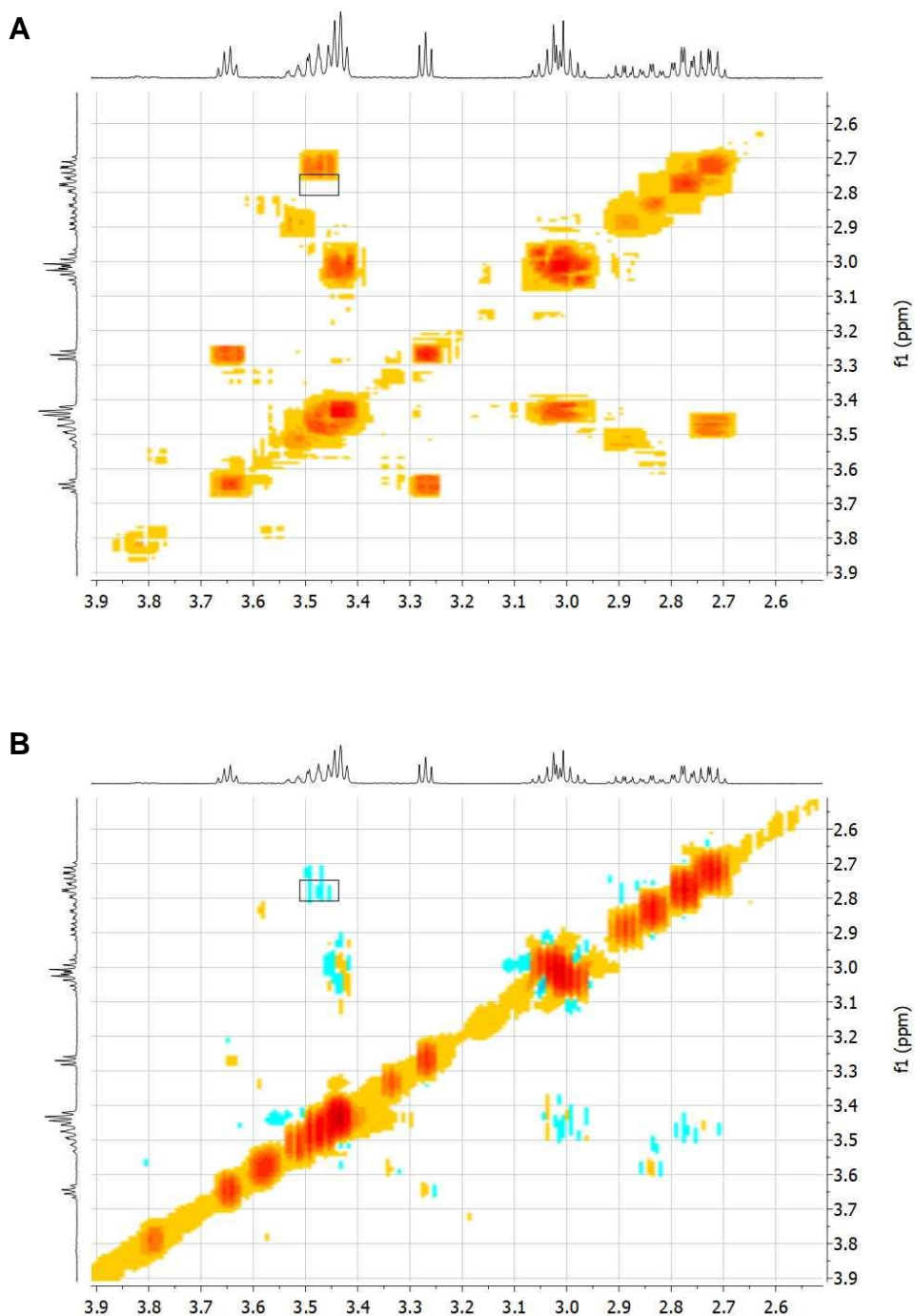
Abbildung 8-220.  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse der Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 im präparativen Maßstab nach dem ersten Reaktionszyklus. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.06\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.89 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.49–3.41 (m, 3H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.06–2.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.77 (td,  $J = 9.3, 2.6$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.72 (dq,  $J = 8.9, 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.87–1.78 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.70–1.59 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.33–1.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.08 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).



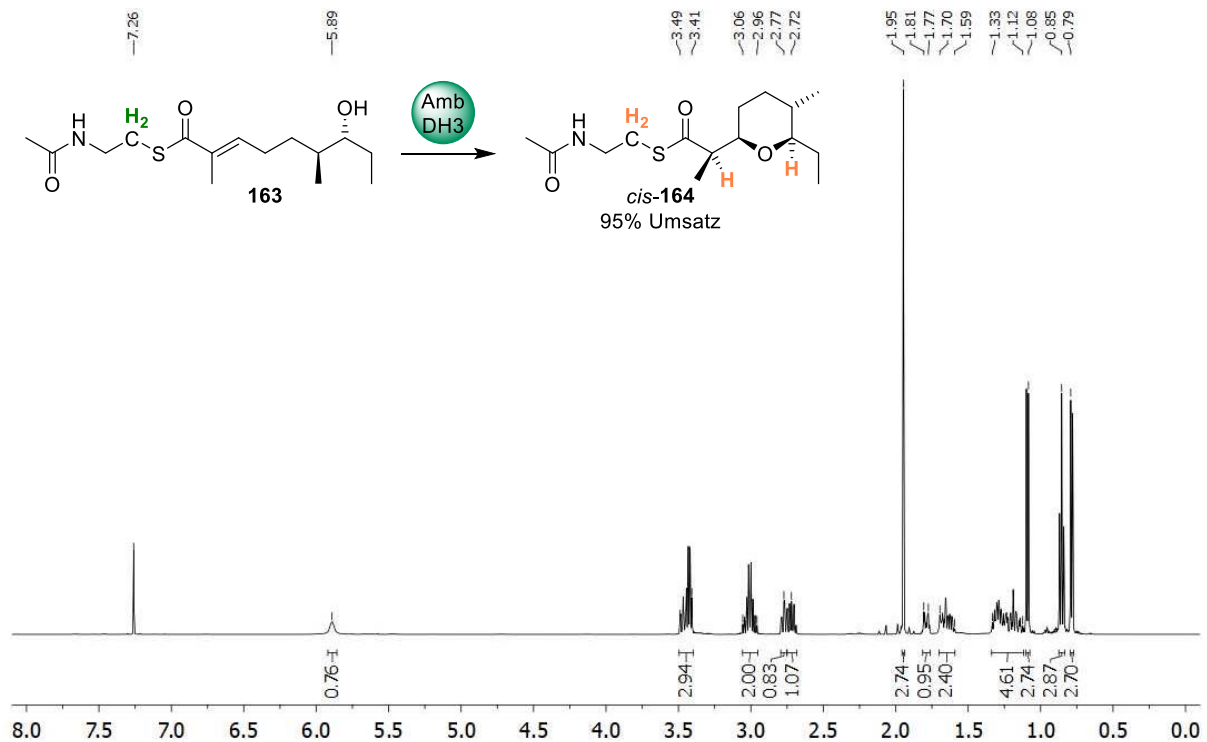


**Abbildung 8-221.** Ausschnitt aus dem  $H,H$ -COSY-Spektrum (A) und 2D-NOE-Spektrums (B) des Produkts *cis*-164 der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 im präparativen Maßstab nach dem ersten Reaktionszyklus. Die Aufnahmen erfolgten bei 500 MHz in  $C_6D_6$ . Der Bereich, der im  $H,H$ -COSY-Spektrum kein Signal für die Wechselwirkung von 3-H und 7-H ergeben sollte ist mit einem Kasten markiert. Im entsprechenden 2D-NOE-Spektrum zeigt sich eine schwache Wechselwirkung aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Protonen im *cis*-konfigurierten Pyranring.



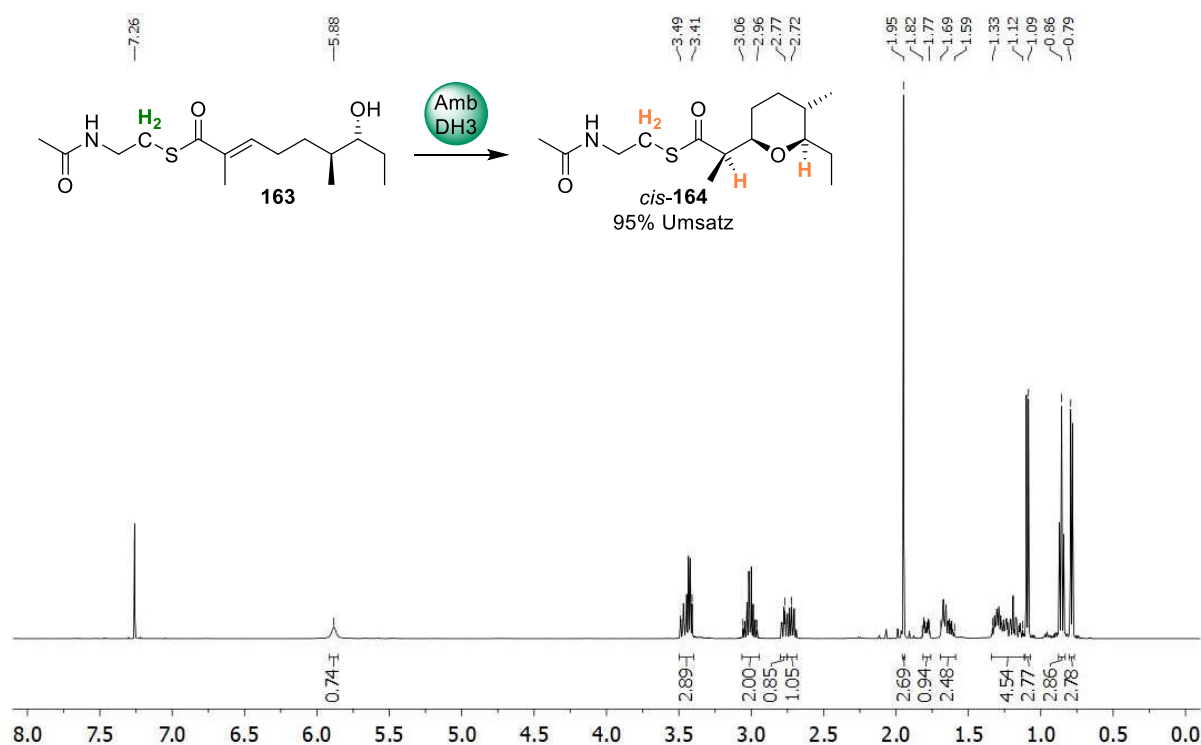
**Abbildung 8-222.** Ausschnitt aus dem  $H,H$ -COSY-Spektrum (A) und 2D-NOE-Spektrums (B) des Produkts *cis*-164 der Enzymreaktion von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 im präparativen Maßstab nach dem ersten Reaktionszyklus. Die Aufnahmen erfolgten bei 500 MHz in  $CDCl_3$ . Der Bereich, der im  $H,H$ -COSY-Spektrum kein Signal für die Wechselwirkung von 3-H und 7-H ergeben sollte ist mit einem Kasten markiert. Im entsprechenden 2D-NOE-Spektrum zeigt sich eine schwache Wechselwirkung aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Protonen im *cis*-konfigurierten Pyranring.





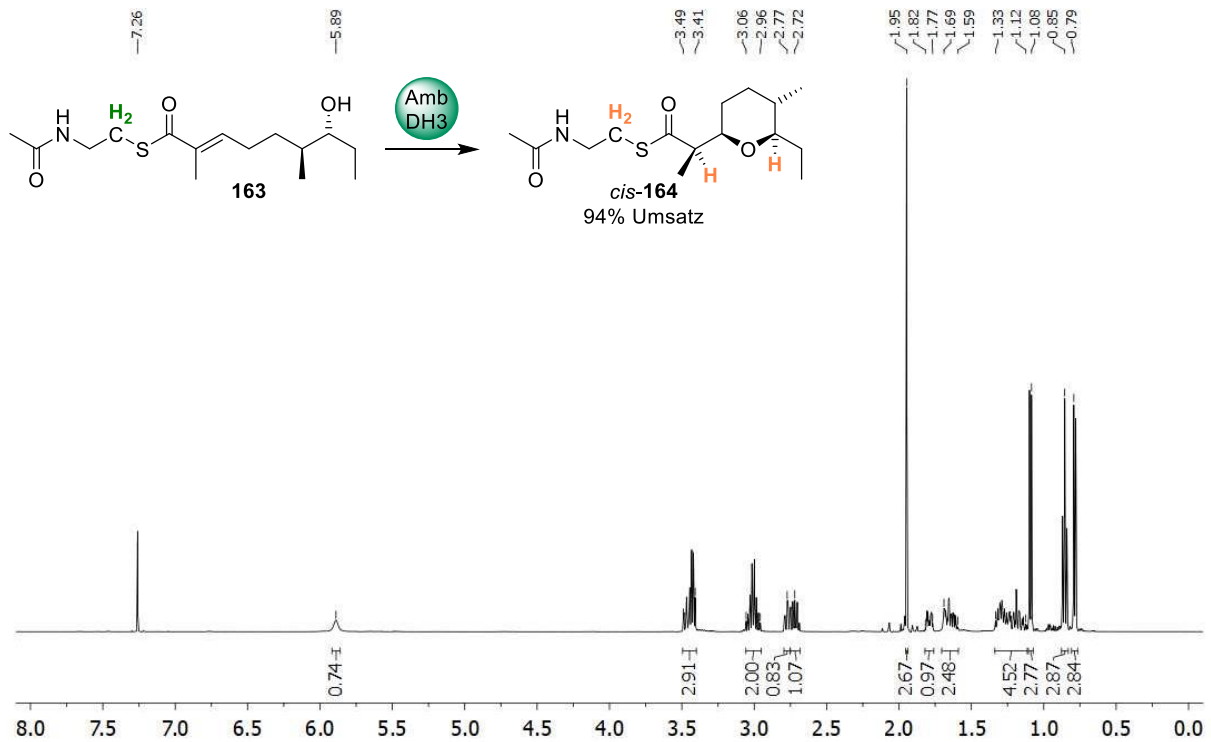
**Abbildung 8-223.** <sup>1</sup>H-NMR-Analyse der Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat **163** im präparativen Maßstab nach dem zweiten Reaktionszyklus. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in CDCl<sub>3</sub>. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.06\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 5.89 (s, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 3.49–3.41 (m, 3H, OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>), 3.06–2.96 (m, 2H, CH<sub>2</sub>S), 2.77 (td,  $J = 9.4, 2.6$  Hz, 1H, OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.72 (dq,  $J = 9.0, 7.0$  Hz, 1H, CCHCH<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, OCCH<sub>3</sub>), 1.87–1.78 (m, 1H, 1 × CH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>), 1.70–1.59 (m, 2H, 1 × CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 1 × OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.33–1.12 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>, 1 × OCHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 1 × CH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>, 1 × CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.08 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, CCHCH<sub>3</sub>), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>).



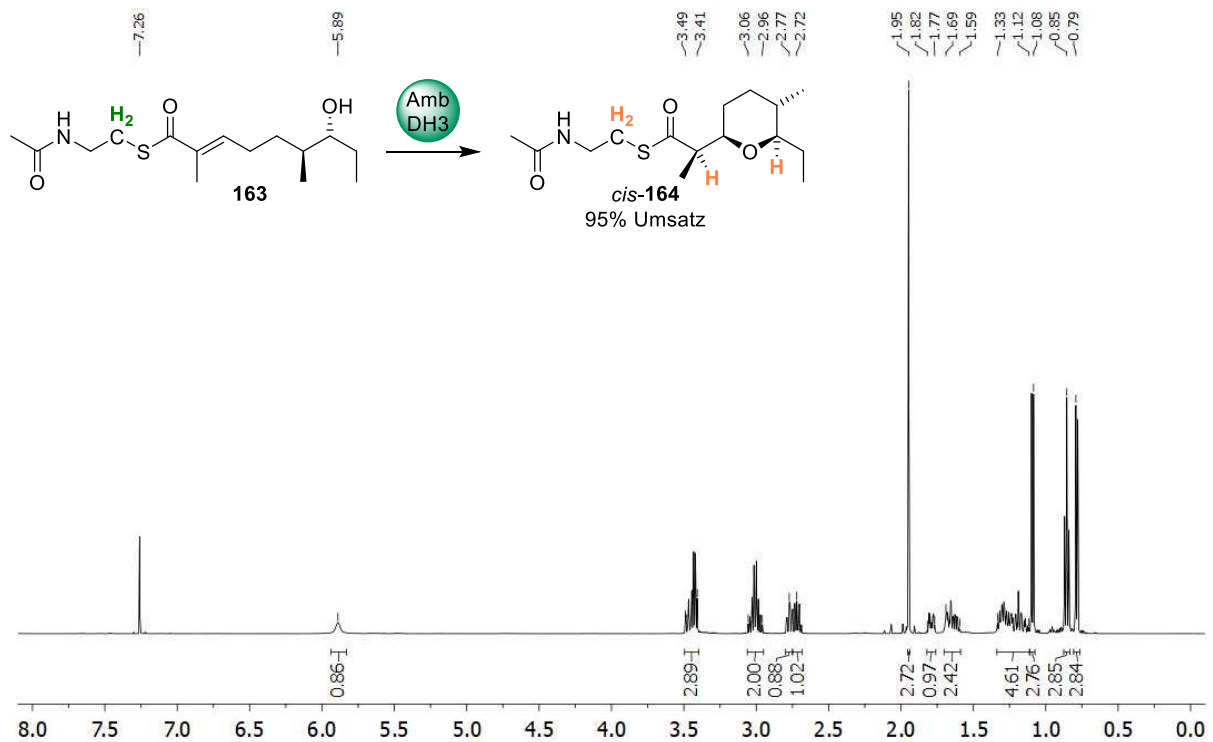
**Abbildung 8-224.**  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse der Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 im präparativen Maßstab nach dem dritten Reaktionszyklus. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.06\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.89 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.49–3.41 (m, 3H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.06–2.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.77 (td,  $J = 9.4, 2.7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.72 (dq,  $J = 8.9, 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.82–1.77 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.69–1.59 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.33–1.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.09 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).



**Abbildung 8-225.**  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse der Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 im präparativen Maßstab nach dem vierten Reaktionszyklus. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.06\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.89 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.49–3.41 (m, 3H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.06–2.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.77 (td,  $J = 9.1, 2.7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.72 (dq,  $J = 8.8, 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.82–1.77 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.69–1.59 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.33–1.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.08 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).



**Abbildung 8-226.**  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse der Umsetzung von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 im präparativen Maßstab nach dem fünften Reaktionszyklus. Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.06\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.89 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.49–3.41 (m, 3H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.06–2.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.77 (td,  $J = 9.3, 2.7$  Hz, 1H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.72 (dq,  $J = 8.9, 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.82–1.77 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.69–1.59 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.33–1.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.08 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).

## 8.7.2.2. Reaktion bei kontinuierlichem Fluß

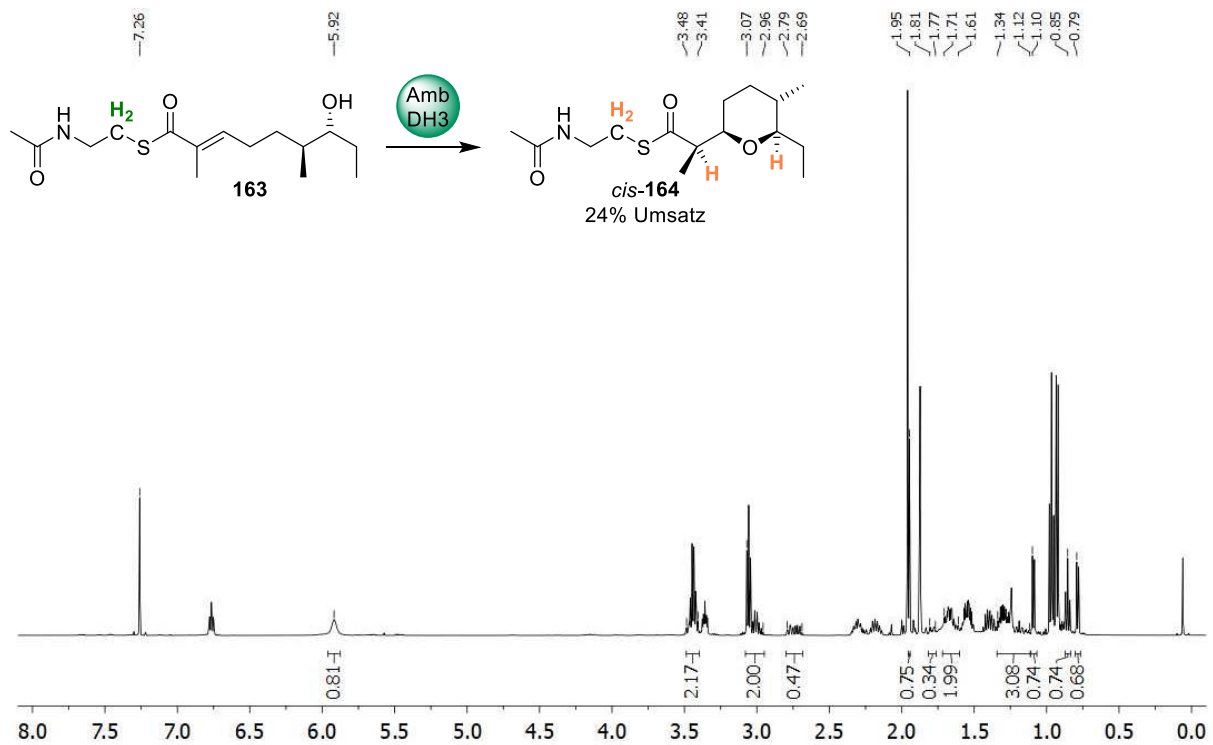
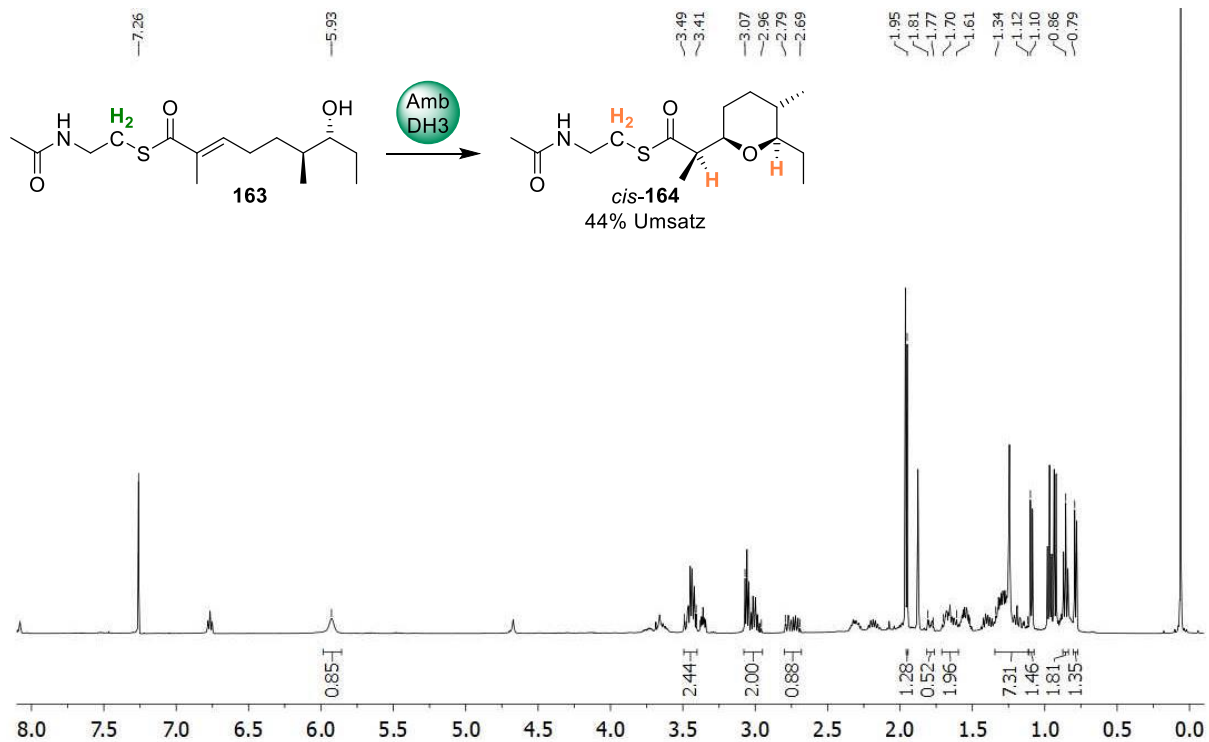


Abbildung 8-227.  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse der Reaktion bei kontinuierlichem Fluß von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 (Eintrag 3, Tabelle 3-27). Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.07\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.92 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.48–3.41 (m, 3H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.07–2.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.79–2.69 (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CCHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.81–1.77 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.71–1.61 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.34–1.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.10 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).



**Abbildung 8-228.**  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse der Reaktion bei kontinuierlichem Fuß von AmbDH3-CLEA mit Substrat 163 (Eintrag 3, Tabelle 3-27). Die Aufnahme erfolgte bei 500 MHz in  $\text{CDCl}_3$ . Der Umsatz wurde anhand der Integrale der grün und orange hervorgehobenen Protonen bestimmt:  $\delta(\text{CH}_2\text{-S}, \text{CH}_2\text{-S}) = 3.07\text{--}2.96$  ppm;  $\delta(2\text{-H}, 7\text{-H}) = 2.79\text{--}2.69$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.89 (s, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.49–3.41 (m, 3H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.06–2.96 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ), 2.79–2.69 (m, 2H,  $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CCHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H,  $\text{OCCH}_3$ ), 1.82–1.77 (m, 1H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ), 1.69–1.59 (m, 2H,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.33–1.12 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{OCHCH}_2\text{CH}_2$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ,  $1 \times \text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.08 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CCHCH}_3$ ), 0.85 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CHCH}_3$ ).

### **Danksagung**

Ich möchte mich als erstes bei meinem Doktorvater PROF. DR. FRANK HAHN für die abwechslungsreiche und spannende Thematik sowie seine Unterstützung und hilfreichen Tipps bedanken. PROF. DR. ANDREAS MÖGLICH danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei DR. ULRIKE LACHER und KERSTIN HANEMANN für die reibungslose Analytik der NMR-Spektroskopie. Gleiches gilt für das Sekretariat von IRMTRAUD HEROLD, die eine gute Zusammenarbeit mit der Verwaltung möglich machte. Ein Dank gilt zudem den Mitarbeitern der Chemikalienausgabe sowie der Einkaufsabteilung des NW1 für die schnelle Beschaffung und Bezahlung der bestellten Waren. Für die Kooperationen möchte ich mich bei DR. MATTHEW FUSZARD und DR. ANDREA DI FONZO (Lehrstuhl Biochemie, Universität Bayreuth) für die MS-MS-Analysen bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitgliedern des AK Hahn bedanken. Meinen langjährigen Bürokollegen DR. MARIUS SCHRÖDER und JOHANNES WUNDERLICH möchte ich für die (manchmal vielleicht auch fragwürdige aber dafür motivierende) musikalische Untermalung während der Labor- und Büroarbeiten danken und zudem DR. TIM HOLLMANN, DR. FREDERICK LINDNER, THERESA ROß, FLORIAN GUTH, SIMON RYDZEK, JÖRG STANG und LISA NGUYEN für die zahlreichen unterhaltsamen und ideenreichen Mittagessen. Ein besonderer Dank gilt zudem DR. TIM HOLLMANN für die gute und produktive Zusammenarbeit im Labor während gemeinsamer thematischer Überschneidungen und die Unterstützung bei chemischen Fragestellungen sowie JOHANNES WUNDERLICH für die zeitintensive Einrichtung und Instandhaltung der UPLC-MS-Anlage.

DR. MARIUS SCHRÖDER, FLORIAN GUTH, THERESA ROß, SIMON RYDZEK, JÖRG STANG und LISA NGUYEN danke ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen Tipps und Ratschläge. Außerdem möchte ich mich bei zahlreichen Praktikant\*innen, Bachelorand\*innen, Masterand\*innen und HiWis bedanken, die mich jederzeit tatkräftig unterstützt haben: LUKAS HASSINE, MAIKE SCHNEIDER, VINCENT EMANN, LISA NGUYEN, TIM ENGELGEH, FREDERIK AHRENS, TANJA KIRSCH, ANNA ZINK, JÖRG STANG und SEBASTIAN DÖRNER.

Im privaten Umfeld bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die mich sowohl während des Studiums als auch der Promotionszeit durchweg unterstützt haben. Ein ganz besonders großer Dank geht an TIMO HEITMANN für seine andauernde Geduld, bedingungslose Unterstützung und Motivationsbereitschaft.





## **(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen**

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

---

Ort, Datum, Unterschrift (Lisa Wagner)