

Enreduktasen aus der Old Yellow Enzyme (OYE) Familie [EC 1.6.99.1] reduzieren C=C-Doppelbindungen und generieren dabei bis zu zwei Stereozentren in einem Reaktionsschritt. Eine breite Palette von aktivierten Alkenen kann als Substrat dienen und somit besitzt die Reaktion das Potenzial als stereoselektive, umweltverträglichere Alternative zur Metallkatalyse, vielfältigen Einsatz in der organischen Synthese zu finden.

Eine der großen Herausforderungen in der Biokatalyse ist das Vorliegen des Katalysators und somit auch der Katalyseprodukte in nur einer enantiomeren Form. Um für die Enreduktase YqjM Varianten mit Wildtyp entgegengesetzter Stereoselektivität zu finden wurde in dieser Arbeit ein neuartiges, rationales und somit extrem effizientes Vorgehen getestet. Hierbei wurde durch Mutation einzelner Aminosäurereste die Substratbindung in der nativen Position gelockert und eine neue Bindung in geflippter Orientierung möglich gemacht. Insgesamt mussten nur 17 Enzymvarianten erstellt werden um zum Wildtyp stereokomplementäre Varianten zu finden. Die auf diese Weise in beiden enantiomeren Formen zugänglichen Produkte sind vielseitige chirale Bausteine, die in der Natur- und Wirkstoffsynthese Verwendung finden.

Daneben konnten zwei Wege zur chemoenzymatischen Synthese des breit genutzten chiralen Intermediats 2-Methylbutan-1,3-diol identifiziert werden. Diese führen zu unterschiedlicher Stereoinformation an C2-Position obwohl ein und dasselbe OYE Verwendung findet. Die Veränderung der Stereoselektivität beruht hier auf geschickter Wahl des Substrats und ist somit ein Beispiel für ein weiteres mögliches Vorgehen zur rational gesteuerten biokatalytischen Synthese von entgegengesetzten Stereozentren.

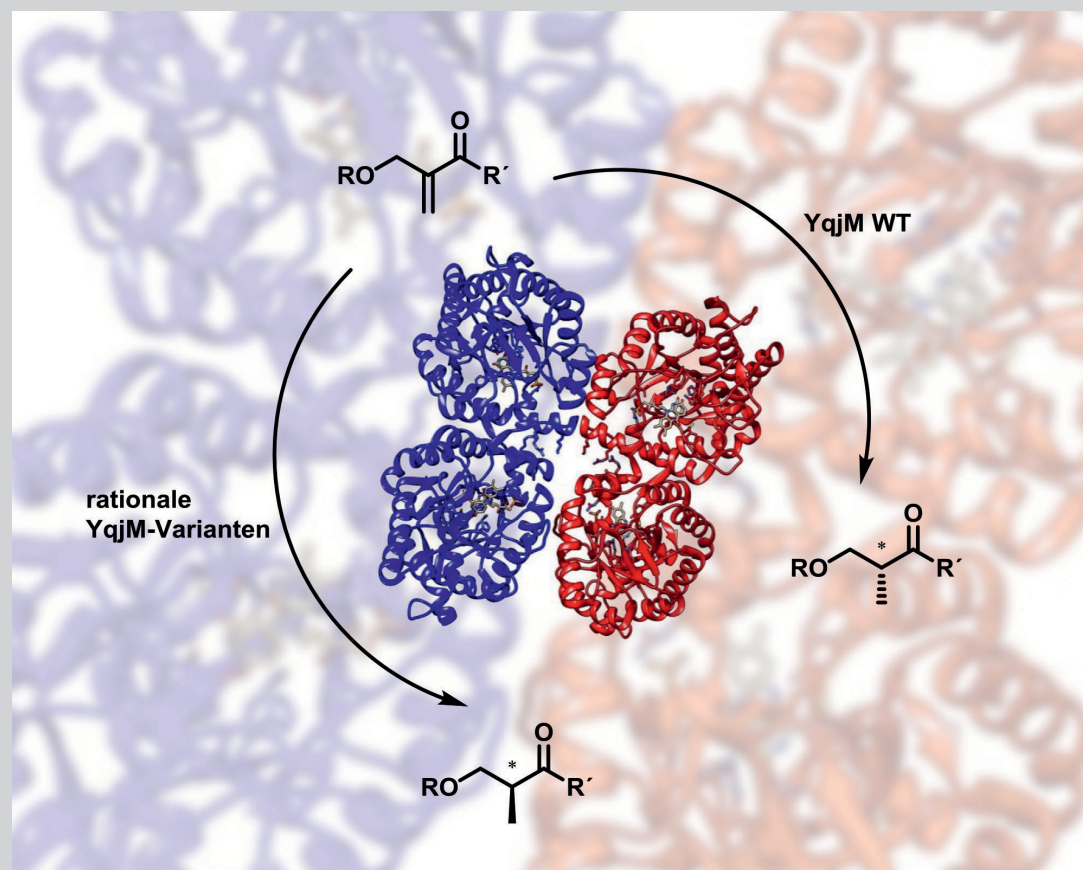
In einem weiteren Projekt konnte eine Enzymkaskade aus YqjM WT und der Laccase aus *Agaricus bisporus* zur Synthese von bestimmten arylierten Chromanonen etabliert werden.

Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese

Elisabeth Rütthlein

Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese (2016)

Elisabeth Rütthlein



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese

Elisabeth Rütthlein

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 26

ISBN 978-3-95806-218-4

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 26

Herausgegeben von Jörg Pietruszka



Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elisabeth Rütthlein
aus Würzburg

November, 2016

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Korreferent: Prof. Dr. T. J. J. Müller

Tag der mdl. Prüfung: 29. 11. 2016

Herausgeber: Prof. Jörg Pietruszka

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2017

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich, Band 26

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2016)

ISBN 978-3-95806-218-4

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils gültigen Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Meiner Familie

The organism is capable of performing highly specific chemical transformations which can never be accomplished with the customary agents. To equal nature here, the same means have to be applied, and I therefore foresee the day when physiological chemistry will not only make extensive use of the natural enzymes as agents, but when it will also prepare synthetic ferments for its purposes.

(Emil Fischer, 1902, Nobelpreis-Vorlesung)

Publikationen

Rüthlein E.; Classen T.; Dobnikar L.; Schölzel M.; Pietruszka J., *Advanced Synthesis & Catalysis* **2015**, 357, 8, 1775-1786.

Finding the Selectivity Switch - A Rational Approach towards Stereocomplementary Variants of the Ene Reductase YqjM

Poster

ORCHEM, Weimar, 15 Sep 2014 - 17 Sep 2014

Elisabeth Rüthlein, Lina Dobnikar, Thomas Classen, Jörg Pietruszka

Improving Enoate Reductases for Synthesis - A Rational Approach towards both Enantiomers of the `Roche Ester`

12th BIOTRANS, Wien, Österreich, 26 Jul 2015 - 30 Jul 2015

Elisabeth Rüthlein, Lina Dobnikar, Thomas Classen, Jörg Pietruszka

Finding the Selectivity Switch – A Rational Approach towards Stereocomplementary Variants of the Ene Reductase YqjM

Inhaltsverzeichnis

1. Vorbemerkungen und Abkürzungen	8
2. Kurzzusammenfassung	12
3. Abstract	13
4. Einleitung	14
5. Aufgabenstellung	15
6. Kenntnisstand	17
6.1 Enreduktasen aus der Old Yellow Enzyme-Familie.....	17
6.1.1 Systematische und historische Einordnung.....	17
6.1.2 Struktur von OYES.....	21
6.1.3 Reaktionsmechanismus von OYES und Cofaktorrecycling.....	22
6.1.4 Die Enreduktase YqjIM.....	25
6.2 Stereoselektivität in OYES.....	28
6.2.1 Stereokomplementäre OYE-katalysierte Bio reduktionen.....	28
6.2.2 Vorarbeiten zur Beeinflussung der Stereoselektivität von YqjIM.....	32
6.3 Chirale Synthesebausteine.....	35
6.3.1 Roche-Ester.....	35
6.3.2 2-Methylbutan-1,3-diol.....	37
7. Eigene Ergebnisse	41
7.1 Methoden und Optimierungen zur Arbeit mit dem Enzym YqjIM.....	41
7.1.1 Etablierung eines modifizierten Aktivitätstests für Enreduktasen.....	41
7.1.2 Lagerung.....	47
7.1.3 Optimierung zur Sättigung von YqjIM mit dem Cofaktor FMN.....	48
7.1.4 Tests zur Nutzung des Rohextrakts und Ammoniumsulfatfällung.....	57

7.2	Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjJM.....	60
7.2.1	Substratdesign.....	60
7.2.2	Enzymdesign.....	68
7.2.3	Bioreduktionen im analytischen Maßstab.....	70
7.2.4	Präparative Bioreduktionen mit YqjJM-Wildtyp und Varianten.....	77
7.2.5	Erweiterung des Substratspektrums.....	79
7.2.6	Vergleich mit anderen Mutagenesestudien zur Stereoselektivität von OYE5.....	82
7.2.7	Zusammenfassung und Fazit.....	83
7.3	Enzymkaskaden.....	85
7.3.1	Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (67).....	85
7.3.2	Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskade aus YqjJM und Laccase.....	95
8.	Zusammenfassung und Ausblick.....	107
9.	Experimenteller Teil.....	115
9.1	Material und Methoden – molekularbiologischer Teil.....	116
9.1.1	Die Enreduktase YqjJM.....	116
9.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	117
9.1.3	Erstellung der Plasmide durch Mutagenese.....	117
9.2	Material und Methoden – Proteinchemischer Teil.....	122
9.2.1	Verwendete Enzyme.....	122
9.2.2	Fermentation.....	122
9.2.3	Zellaufschluss.....	125
9.2.4	SDS-PAGE.....	126
9.2.5	Proteinreinigung.....	128
9.2.6	Aktivitätstests.....	129
9.2.7	Michaelis-Menten-Kinetik.....	133
9.2.8	Bestimmung des FMN-Gehalts von YqjJM.....	133
9.2.9	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	134

9.3	Material und Methoden – chemischer Teil.....	135
9.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	138
9.3.2	Synthesevorschriften und Analytik zum Kapitel 6.2 Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM.....	140
9.3.3	Synthesevorschriften und Analytik zu Kapitel 6.3.1 `Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol`	183
9.3.4	Synthesevorschriften und Analytik zu Kapitel 6.3.2 `Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskade aus YqjM und Laccase`	193
9.4	In silico-Docking.....	206
10.	Formelregister	208
11.	Danksagung.....	211
12.	Literaturverzeichnis.....	212
13.	Erklärung.....	224

1. Vorbemerkungen und Abkürzungen

Die Abbildungen, Schemata, Tabellen, angegebenen Literaturstellen sowie die im Text genannten Verbindungen wurden fortlaufend nummeriert. Die im Rahmen dieser Dissertation dargestellten Verbindungen sind ebenfalls fortlaufend nummeriert und in der Formelübersicht (**Kapitel 10**) aufgeführt. Die Benennung der Verbindungen erfolgte in der Regel gemäß der IUPAC-Nomenklatur.^[1] Die verwendeten Enzyme sind gesondert im Experimentaltel (**Kapitel 9.2.1**) aufgeführt. In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen, physikalische Größen, Symbole, Variablen und Einheiten verwendet:

A, Abs	Absorption
ADH	Alkoholdehydrogenase
Äq.	Äquivalente
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
c	Konzentration
C	Cysteinrest
Cofaktor	Nicht proteinogene Substanz, die zur Aktivität des Enzyms unerlässlich ist. Es wird keine Unterscheidung zwischen Cosubstrat, Coenzym und prosthetischer Gruppe gemacht.
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DC	Dünnschichtchromatographie
DOE	Design of Experiment
DV	Diastereomerenverhältnis
de	Diastereomerenüberschuss
E	Enantioselektivität
EE	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
ee	Enantiomerenüberschuss
EC	Enzymklasse
EI	Elektronenstoßionisation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et	Ethyl

Enred	Enreduktase
EWG	Elektronen-ziehende Gruppe (<i>electron withdrawing group</i>)
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glukosedehydrogenase
H	Histidinrest
<i>holo</i> -Enzym	mit Cofaktor gesättigtes Enzym (griech.: holos)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IMAC	Metallchelatchromatographie (<i>immobilized metal ion affinity chromatographie</i>)
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
K_{cat}	Wechselzahl
K_M	<i>Michaëlis–Menten</i> -Konstante
KP_i	Kaliumphosphatpuffer
k. U.	kein Umsatz
Me	Methyl
max.	maximal
min	Minute
mind.	mindestens
MRSA	Multiresistenter <i>Staphylococcus Aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
N	Asparaginrest

NAD/NADP	allgemeine Bezeichnung für Nikotinamidadeninucleotid bzw. das entsprechende -phosphat
NAD ⁺ /NADP ⁺	oxidierte Form der Nikotinamidcofaktoren
NADH/NADPH	reduzierte Form der Nikotinamidcofaktoren
n.d.	nicht durchgeführt
NIH	<i>National Institutes of Health</i> (USA)
NMR	Kernspinresonanz
OYE	<i>Old Yellow Enzyme</i>
o/n	über Nacht
P	Proteinpellet
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Petrolether
PETN	Pentaerythritoltetranitrat
pHB	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd
ppm	<i>parts per million</i>
R	unspezifischer Rest
R ²	Bestimmtheitsmaß
<i>rac</i>	racemisch
RT	Raumtemperatur
S	Sättigung
t _r	Retentionszeit
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TNT	Trinitrotoluol
TEMPO	2,2,6,6-TetramethylpiperidinyloxyI
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität: 1 U = 1 μmol min ⁻¹)
upm	Umdrehungen pro Minute
US	Umsatz
üs	Überstand
v	Geschwindigkeit

Y	Tyrosinrest
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

2. Kurzzusammenfassung

Enreduktasen aus der *Old Yellow Enzyme* (OYE) Familie [EC 1.6.99.1] reduzieren C=C-Doppelbindungen und generieren dabei bis zu zwei Stereozentren in einem Reaktionsschritt. Der Mechanismus besteht aus der formalen *anti*-Addition von Wasserstoff: ein Hydrid wird vom Flavin-Cofaktor übertragen und ein Proton – meist von einem Tyrosinrest – von der entgegengesetzten Seite. Eine breite Palette von aktivierten Alkenen kann als Substrat dienen, wodurch der Einsatz von OYEs in vielen asymmetrischen Synthesen möglich wird. Eine industriell relevante Anwendung, für die die Nutzbarkeit des OYEs YqJM bereits im analytischen Maßstab gezeigt worden konnte, ist die Synthese des (*R*)-*Roche*-Esters. Der *Roche*-Ester ist ein breit genutzter chiraler Baustein, der zum Beispiel in der Synthese von Naturstoffen, Vitaminen, Duftstoffen und Antibiotika zum Einsatz kommt.

Eine der großen Herausforderungen in der Biokatalyse ist das Vorliegen des Katalysators und somit auch der Katalyseprodukte in nur einer enantiomeren Form. Das leicht zugängliche Enantiomer ist der (*R*)-*Roche*-Esters bei Herstellung durch OYE-katalysierte Bioreduktion. Enreduktasen, die in dieser Reaktion (*S*)-Selektivität zeigen, sind kaum bekannt.^[5,6] Für die Enreduktase YqJM wurden bisher keine Varianten mit inverser Stereopräferenz bzgl. dieses Substrats beschrieben. Um solche Varianten zu finden wurden drei Aminosäurepositionen (H167, I69, C26) und zugehörige Mutationen identifiziert, die die Substratbindung in der nativen Position lockern und eine neue Bindung in geflippter Orientierung möglich machen könnten. Da der *Roche*-Ester außerdem mittels YqJM und der meisten anderen Enreduktasen wenig effizient umgesetzt wird, wurde eine kleine Bibliothek von aktiveren Substrat-Derivaten getestet. Die Nutzbarkeit der Produkte als synthetische Bausteine wurde dabei erhalten. Die Umsetzung aller dieser Substrate mittels der Enzym-Bibliothek aus zwölf rational erstellten YqJM-Varianten ergab schließlich wirklich eine vollständige Selektivitätsumkehr zum anderen Enantiomer des *Roche*-Esters sowie zweier Substrat-Derivate. Durch Nutzung des Wildtyps und der YqJM-Varianten konnten so schließlich der (*R*)- und (*S*)-konfigurierte *Roche*-Ester und verschiedene Derivate in präparativem Maßstab mit moderater bis guter Ausbeute und hoher Enantioselektivität hergestellt werden.

Daneben konnten zwei Reaktionswege zur chemoenzymatischen Synthese des breit genutzten chiralen Intermediats 2-Methylbutan-1,3-diol identifiziert werden, die beide eine OYE-katalysierte Reaktion beinhalten. Das eine Protokoll produziert beide Stereozentren in einem einzigen Schritt im Rahmen einer Enzymkaskade aus YqJM WT und ADH_{LR} beruhend auf dem *Morita-Baylis-Hillman*-Addukt 3-(Hydroxymethyl)but-3-en-2-on. Insgesamt kann das *syn*-(2*R*, 3*S*)-Diol somit in nur zwei Stufen erhalten werden. Dies ist die kürzeste literaturbekannte Synthese von *syn*-2-Methylbutan-1,3-diol, die bisher bekannt ist. Das zweite Protokoll macht das C2-Stereozentrum in beiden Konfigurationen mittels der gleichen Enreduktase YqJM WT zugänglich. Hierfür wurde das Substrat strategisch modifiziert. In einem weiteren Projekt konnte eine Enzymkaskade aus YqJM WT und der Laccase aus *Agaricus bisporus* zur Synthese von bestimmten arylierten Chromanonen etabliert werden. Dies kann durch weitere Optimierung der Enzym-Substrat Kombination zu einem stereospezifischen Zugang zu diesen Verbindungen führen. Substituierte Chromanone zeigen hohe biologische Aktivität und eine effiziente und stereospezifische chemoenzymatische Synthese ist daher von Interesse.

3. Abstract

Ene reductases from the Old Yellow Enzyme (OYE) family [EC 1.6.99.1] reduce C=C double bonds generating up to two new stereogenic centres within one reaction step.^[2] The mechanism involves a formal *anti*-addition of hydrogen: A hydride derived from the flavin cofactor and the addition of a proton – usually from a tyrosine – from the opposite face.^[3] A broad range of activated alkenes can act as substrates, which enables the use of ene reductases in various asymmetric syntheses.^[4]

One industrially relevant application that has been shown to be possible in analytical scale using the ene reductase YqjM is the synthesis of the (*R*)-*Roche* Ester. The *Roche* Ester is an extensively used chiral precursor in syntheses of natural products as well as in syntheses of vitamins, fragrance components and antibiotics.^[5] A challenge biocatalysis regularly faces is the accessibility of only one enantiomer. The easily accessible *Roche* Ester is the (*R*)-enantiomer in OYE-catalysed bioreductions. Ene reductases showing (*S*)-selectivity in this reaction are rare.^[5,6] For the ene reductase YqjM no variants with inverse stereo-preference for this substrate are known so far. In order to find such variants three amino acid positions (H167, I69, C26) and respective mutations were identified that might loosen substrate binding in the original position and rebind the substrate in flipped orientation. As the *Roche*-Ester precursor is a rather poor substrate for YqjM and most other ene reductases, a small library of more active derivatives was addressed, maintaining the products' usefulness as synthetic building blocks. The methyl ketone derivative showed a strong increase in catalytic efficiency compared to the ester. Thus, we added this along with the sterically more demanding ethyl ketone to our screening library. Also substrates with benzyl- or allyl-protected hydroxyl group were screened as increased conversions had been reported.^[5] A small library of twelve rational mutant enzymes revealed indeed a complete selectivity change towards the other enantiomer of the *Roche* Ester and two derivatives. Using wild type or engineered variants of YqjM (*R*)- and (*S*)-configured *Roche* Ester as well as derivatives thereof can be produced in preparative scale, with moderate to good yields and high enantioselectivities.

In addition to that, we identified two reaction pathways to synthesize the widely used chiral intermediate 2-methylbutan-1,3-diol, both involving an OYE-catalysed reduction. One protocol produces both stereo centres in one step by an enzyme cascade of YqjM wt and ADH_{LK} starting from the *Morita–Baylis–Hillman* adduct 3-(hydroxymethyl)but-3-en-2-one. The final product *syn*-(2*R*, 3*S*)-diol could thereby be synthesized in only two steps, making it the shortest synthesis of *syn*-2-methyl butan-1,3-diol so far reported. The second protocol makes it possible to produce the opposite C-2 stereo centre (2*S*) by the same OYE, YqjM wt, through strategic modification of the substrate.

Furthermore, an enzyme cascade of YqjM wt and the laccase from *Agaricus bisporus* was established for the synthesis of certain arylated chromanones. This can, by further optimization of the OYE-substrate combination, lead to a stereospecific pathway towards those compounds. Substituted chromanones show high biological activity and a highly efficient and stereospecific chemoenzymatic synthesis would therefore be desirable.

4. Einleitung

Schon seit Jahrtausenden werden Enzym-katalysierte Abbauprozesse durch Mikroorganismen zur Herstellung von Lebensmitteln wie Bier, Wein, Käse oder Brot verwendet. Die Verwendung von Mikroorganismen und Enzymen zur Herstellung komplexer Substanzen im Rahmen der chemischen Synthese ist ein im Vergleich dazu relativ neues Thema. Dieses begann ca. in der zweiten Hälfte des 19ten Jahrhunderts, als im Jahr 1880 zum ersten Mal die Gewinnung einer enantiomerenreinen Verbindung, der Milchsäure, durch Fermentation beschrieben wurde. Durch die Möglichkeit zur rekombinanten Enzymherstellung wurde ca. 100 Jahre später, ab 1983, eine breitere Palette von Enzymen in großen Mengen zugänglich und durch gentechnische Methoden wurde auch die Optimierung der Biokatalysatoren durch Proteinengineering möglich.^[2]

Erst seitdem wird die Biokatalyse langsam als universell einsetzbares Synthesewerkzeug anerkannt, das bei der Reaktionsplanung zur chemischen Synthese komplexer Substanzen nach und nach mehr Berücksichtigung findet.^[3] Besonderen Vorteil bieten Biokatalysatoren beim Aufbau von stereoreinen Zentren, da sie dabei im Vergleich zu chemischen Methoden oft höhere Selektivität zeigen. Die somit bewirkte Chiralität der Produkt-Moleküle (Spiegelbildlichkeit: z.B. Rechte Hand und linke Hand) ist in der Natur allgegenwärtig und führt zu einer unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit von Enantiomeren (spiegelbildlichen Molekülen) beispielsweise in pharmazeutischen und Agrar-Anwendungen. Meist besitzt nur eines der Stereoisomere die gewünschte Aktivität und somit ist die asymmetrische Synthese ein essentielles Werkzeug der Pharma- und Agrarindustrie zur selektiven Herstellung einzelner Isomere bioaktiver Substanzen. Im pharmazeutischen Bereich ist eine Synthese ohne Berücksichtigung der absoluten Konfiguration von stereoreinen Zentren nicht mehr denkbar und die Untersuchung der biologischen Aktivität jedes einzelnen Enantiomers wird inzwischen auch von der *Food and Drug Administration* (FDA) überprüft.

Ein häufig genutzter Schlüsselschritt zur Herstellung chiraler Substanzen ist die asymmetrische Hydrierung. Diese ist von besonderem Interesse, da innerhalb von einer Reaktion zwei Stereozentren aufgebaut werden können. Hierfür sind besonders Übergangsmetallkatalysierte Reaktionen mit Pd, Ir, Ru oder Rh als Zentralatom und chiralen Ligandensystemen sehr weit entwickelt. Im Allgemeinen werden die industriellen Reduktionsprozesse dabei unter erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck mittels Einsatz von molekularem Wasserstoffgas durchgeführt.

Die biokatalytische Variante zur asymmetrischen Hydrierung ist die Reduktion von C=C-Bindungen mittels Enreduktasen. Diese bietet gegenüber der Metallkatalyse verschiedene Vorteile: so sind die Biokatalysatoren nicht toxisch, die Reaktionen werden bei Raumtemperatur in Wasser durchgeführt und zeigen teils unübertreffliche Effizienz und Enantioselektivität. Außerdem wird kein Wasserstoffgas oder erhöhter Druck benötigt, was beides ein beträchtliches Gefahrenpotenzial birgt. Das Substratspektrum beinhaltet eine breite Palette elektronisch aktivierter Alkene und somit ist ein vielseitiger Einsatz in der chemischen Synthese denkbar. Trotzdem werden Enreduktasen noch sehr wenig industriell genutzt und sollen im Rahmen dieser Arbeit als Werkzeug für die organische Synthese weiterentwickelt werden.

5. Aufgabenstellung

Enzyme gewinnen in der organischen Synthese immer mehr an Bedeutung. Kinetische Racematspaltungen mittels Lipasen sind *State of the Art* bei der Enantiomerenentrennung. Daneben werden auch Dehydrogenasen, wie z.B. Amindehydrogenasen oder Alkoholdehydrogenasen, mehr und mehr industriell genutzt.^[4]

Die Etablierung von Enreduktasen als Werkzeuge in der Laborsynthese sowie für industrielle Anwendungen ist bisher noch nicht weitreichend gelungen. Die industrielle Anwendung beschränkt sich auf den g bis kg Maßstab.^[5] Da die katalysierte Umsetzung, die stereoselektive Hydrierung von C=C-Doppelbindungen, einen zentralen Stellenwert in der Synthesechemie einnimmt, scheint dies verwunderlich. Die seltene Verwendung hat vermutlich mehrere Gründe:

- Die Konkurrenz der Metallhydrierungskatalysatoren ist groß, Enreduktasen als Synthesewerkzeug sind im Vergleich zur Metallkatalyse ein neues Thema. Sie werden erst seit Anfang der 1990er als mögliches Werkzeug in der Synthese wahrgenommen.^[6] Die Etablierung des Wilkinson-Katalysators als erster Hydrierungskatalysator erfolgte schon 1966.^[7]
- Die meisten Enreduktasen sind unter Prozessbedingungen wie erhöhter Temperatur (>40 °C), hohen Substratkonzentrationen (50–100 g/L sind für industrielle Zwecke erforderlich)^[8] sowie mehr als 1–5 % (v/v) Lösemittel nicht sehr stabil.^[9]
- Enreduktasen benötigen einen Cofaktor bzw. ein geeignetes Cofaktorrecycling, wodurch der Einsatz schnell sehr teuer wird.
- Sie sind derzeit nicht kommerziell erhältlich.
- Die Vorhersage des Substratspektrums und der Stereoselektivität von Enreduktasen ist kaum möglich und je nach Substrat sehr variabel.
- Die Nutzung ganzer Zellen oder des Rohextrakts ist wegen konkurrierender Nebenreaktionen bei vielen Substraten nicht möglich.^[10]
- In der Literatur werden überwiegend analytische Anwendungen gezeigt.

Um dazu beizutragen, Enreduktasen für asymmetrische organische Synthesen nutzbar zu machen, sollen zu drei Themen Untersuchungen angestellt werden. Besonderes Augenmerk soll dabei auf präparative Nutzbarkeit gelegt werden.

1) Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjJM

Wie im Kenntnisstand in Kapitel **6.2.1** dargestellt, ist die Enantioselektivität von Enreduktasen kaum vorhersehbar und stark von kleinsten Veränderungen im Substrat abhängig.^[11] Zusätzlich zeigen die bekannten nativen Enreduktasen oft nur eine Stereoselektivität. Eine effiziente, generell anwendbare Strategie zur Entdeckung oder Generierung stereokomplementärer OYEs für diese Fälle existiert derzeit nicht. Daher soll in dieser Arbeit eine neue Konzept-basierte Methode getestet werden, um stereokomplementäre Enreduktase-katalysierte Reaktionen möglich zu machen.

2) Erweiterung des Substratspektrums von YqjJM

Die Kristallstruktur des Enzym YqjJM zeigt, dass das aktive Zentrum im Vergleich zu vielen anderen Vertretern der OYEs vergleichsweise weit geöffnet ist.^[12] Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Substratspektrum Erweiterungen zulässt. In der Literatur wurde für YqjJM

bisher regelmäßig eine Reihe von Standard-Substraten getestet. Hier soll an ausgewählten Beispielen eine Erweiterung des Substratspektrums getestet werden.

3) synthetische Nutzung von Enreduktasen in Enzymkaskaden

Ein Vorteil enzymatischer Synthesen ist die in vielen Fällen gegebene Kompatibilität mehrerer Enzyme in einer Eintopf- oder Kaskadenreaktion. Diese Synthesestrategie soll für Enreduktasen in Kombination mit Alkoholdehydrogenasen und Laccasen getestet werden.

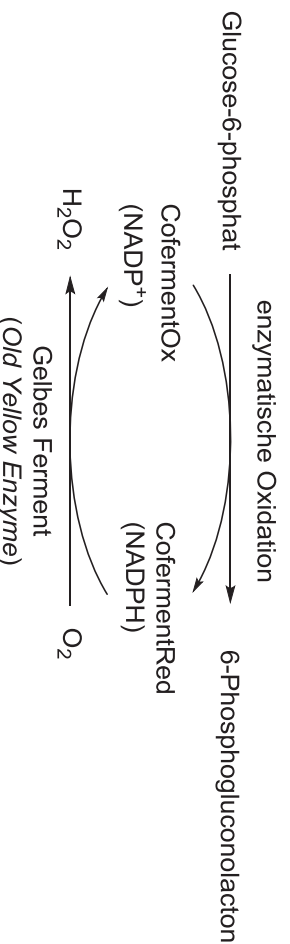
6. Kenntnisstand

6.1 Enreduktasen aus der *Old Yellow Enzyme-Familie*

6.1.1 Systematische und historische Einordnung

Old Yellow Enzymes (OYE_s) sind NAD(P)H-abhängige, Flavin-haltige Enzyme aus der Klasse der Oxidoreduktasen (EC 1.6.99.1), welche die Reduktion von aktivierten C=C-Doppelbindungen katalysieren können. Sie sind die meistgenutzte Gruppe von Enzymen zur biokatalytischen C=C-Hydrierung^[13] und mechanistisch abzugrenzen von den Enoatreduktasen (EC 1.3.1.31),^[14] einer Gruppe von Flavoproteinen, die einen Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, sowie von den Flavin-unabhängigen NADPH-abhängigen mittel- und kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase-Enzymfamilien [MDR^[15] (EC 1.3.1.-)^[16] bzw. SDR^[17] (EC 1.1.1.207–208)]. In dieser Arbeit werden nur Enzyme aus der Gruppe der OYE_s behandelt.

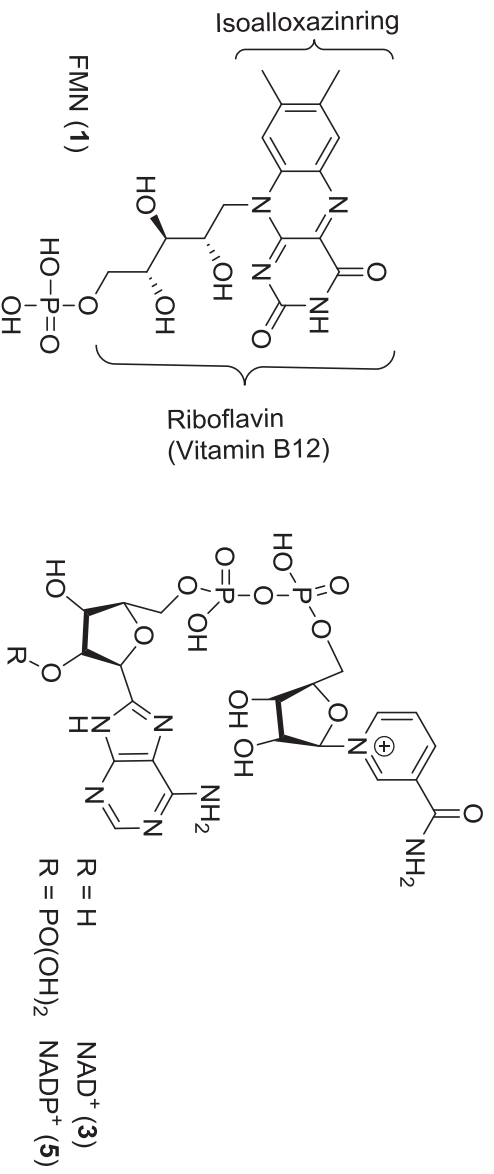
Ihre erste Erwähnung fanden OYE_s schon im Jahre 1932 durch Warburg und Christian. Sie isolierten ein sogenanntes „gelbes Ferment“ (heute: OYE 1) aus untergäriger Brauhefe (*Saccharomyces pastorianus*, früher: *Saccharomyces carlsbergensis*) und konnten seine Sauerstoff-reduzierende Wirkung in Gegenwart eines Coferments zeigen (**Schema 1**).^[18] Dieses Enzym wurde nach Isolierung eines weiteren gelben Ferments zur Abgrenzung als *Old Yellow Enzyme* (OYE) bezeichnet. Der Begriff OYE ist heute für die gesamte Gruppe dieser Enreduktasen allgemein gebräuchlich. In dieser Arbeit werden die Begriffe Enreduktase und OYE synonym verwendet.



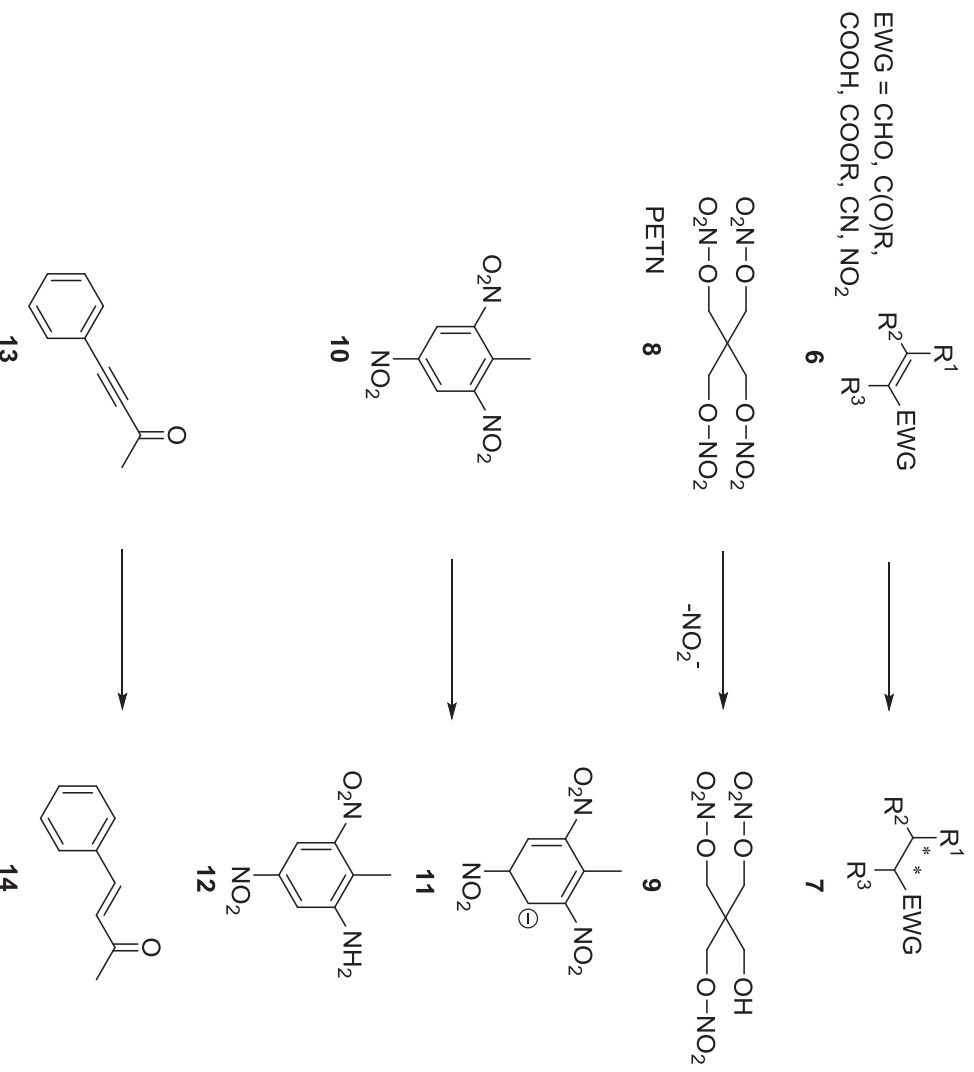
Schema 1: Wirkungsweise des gelben Ferments nach Warburg und Christian von 1932.^[18] Damals noch nicht identifizierte Reaktionspartner sind in Klammern genannt.

Die Herkunft der gelben Farbe der OYE_s konnte im Jahr 1935 von Theorell identifiziert werden.^[19] Er charakterisierte den nicht proteinogenen, gelben Farbstoff, der sich vom inaktiven apo-Enzym abtrennen ließ, als Flavimononukleotid (FMN, **1**), also den 5'-Phosphatester des Riboflavin_s (Vitamin B12). Dieser liegt in jedem aktiven Zentrum eines aktiven OYE vor und kann durch einen Nikotinamidcofaktor reduziert werden. Bei diesem – nach Warburg und Christian als Coferment beteiligten – Cofaktor kann es sich je nach Enzym bevorzugt um das Nikotinamidadeninucleotid [NADH (**2**)/NAD⁺ (**3**)] als auch um das entsprechende Phosphat [NADPH (**4**)/NADP⁺ (**5**)] handeln.^[20] Die vollständigen Strukturformeln der beiden benötigten Cofaktoren von Enreduktasen in ihrer oxidierten Form sind in **Schema 2** dargestellt. Ein Nikotinamidcofaktor gilt auch als das physiologisch genutzte Reduktionsmittel von OYE_s. Das von Warburg beobachtete Oxidationsmittel, der molekulare Sauerstoff, entspricht vermutlich jedoch nicht dem physiologisch umgesetzten Substrat, da diese Umsetzung besonders im Vergleich mit anderen Oxidasen verhältnismäßig

ineffektiv verläuft (OYE 1: $v_{\max} = 2400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Glukoseoxidase aus *Aspergillus niger*: $v_{\max} = 16 \times 10^{25} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^[21] Stattdessen ist in der Literatur eine große Bandbreite von Substraten beschrieben, die von vielen OYEs reduziert werden können (**Schema 3**).



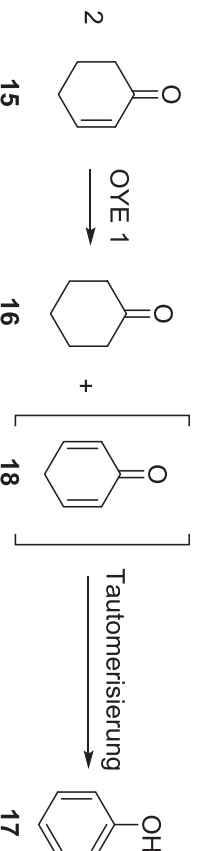
Schema 2: Vollständige strukturelle Darstellung von Flavinmononucleotid (FMN, **1**) sowie der möglichen Varianten des Nikotinamid-Cofaktors (NAD⁺, **3** oder NADP⁺, **5**), jeweils in der oxidierten Form. FMN und NAD(p)⁺ sind am Mechanismus von OYE-katalysierten Reaktionen essentiell beteiligt.



Schema 3: Substratspektrum von OYEs.^[22]

Gemeinsames Strukturmotiv ist in den meisten Fällen die C=C-Doppelbindung in Konjugation zu einer elektronenziehenden Gruppe (EWG), wie in Verbindung **6** gezeigt. So können α,β -ungesättigte Carbonyl (Enale und Enone), Carbonsäuren und Carbonsäurederivate (Ester, cyclische Imide, Nitrile, Lactone) sowie Nitroalkene zu den jeweiligen gesättigten Verbindungen **7** umgesetzt werden.^[22a] Diese Bioreduktionen sind synthetisch interessant, da je nach Substitutionsgrad der Doppelbindung bis zu zwei Stereozentren auf einmal aufgebaut werden können. Außerdem ist bekannt, dass Nitratester wie z.B. Pentaerythritol-tetranitrat (PETN, **8**) von manchen OYEs reduktiv zu den entsprechenden Alkoholen **9** gespalten werden können.^[22b, 23] So kann der Nitroaromat 2,4,6-Trinitrotoluen (TNT, **10**) zum Hydrid-Meisenheimer-Addukt **11** und zu dem entsprechenden Amin **12** umgesetzt werden.^[22c] Nitratester sind explosive Substanzen, die somit durch Umsetzung mit OYEs unschädlich gemacht werden können.^[20] Zusätzlich ist (für Xena, OPR 3, PETNR und MR) die Reduktion aliphatischer Nitroverbindungen analog der *Nef*-Reaktion bekannt und auch die Reduktion eines aktivierten Alkins [2-Phenylbutinon, **13**] zum (*E*)-Olefin **14** durch OYEs wurde gezeigt.^[24] Welches jeweils die physiologisch relevante Reduktionsreaktion ist, ist je nach Enreduktase unterschiedlich und nicht in allen Fällen bekannt. So sind einige bakterielle OYEs beispielsweise Teil der oxidativen Stressantwort (OYEs aus *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Shewanella oneidensis*)^[25] Andere sind an spezifischen Stoffwechselprozessen, wie beispielsweise der Biosynthese von Hormonen beteiligt [z.B. der Jasminsäure, OYE aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) oder des Prostaglandins F2 α , OYE aus *Trypanosoma cruzi*].^[26] Wieder andere OYEs sind Teil der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, wie z.B. der des Ergotalkaloids (OYE aus *Aspergillus fumigatus*).^[27]

Die Oxidation von Substraten außer NAD(P)H ist nur in besonderen Fällen möglich. So kann bei Abwesenheit von reduziertem Nikotinamid-Cofaktor ein und dasselbe Substrat oxidiert und reduziert werden. Dies konnte zuerst anhand der Disproportionierung von 2-Cyclohexanon (**15**) zu Cyclohexanon (**16**) und Phenol (**17**) durch OYE 1 gezeigt werden (**Schema 4**).^[21b] Als primäres Oxidationsprodukt entsteht dabei **18**, das dann zum thermodynamisch stark begünstigten Aromaten Phenol (**17**) tautomerisiert. Die Oxidation von Cyclohexanon ist außerdem vom thermophilen OYE aus *Geobacillus klaustrophilus* bekannt.^[28]



Schema 4: OYE-katalysierte Umsetzung von 2-Cyclohexanon (**15**) in Abwesenheit von NAD(P)H.

Ein gut detektierbares, historisch oft genutztes Merkmal zur Einordnung von OYEs ist die Bildung von charakteristisch gefärbten *Charge*-Transfer-Komplexen des oxidierten Enzyms mit phenolischen Substanzen, wie z.B. *p*-Chlorophenol (**19**, **Abbildung 1**).

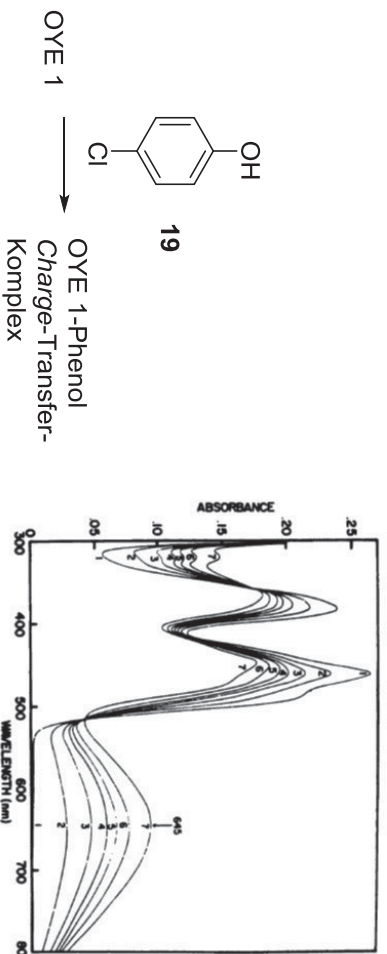


Abbildung 1: Titration von OYE 1 mit *p*-Chlorophenol (**19**). Kurve 1: OYE 1, 25 μM in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 6.5, 25 °C, Kurve 2–7: 21.4–700 μM *p*-Chlorophenol wurden zugegeben.^[29] (Verwendung der Abbildung mit

Erlaubnis der American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

Diese werden als Inhibitoren ins aktive Zentrum eingelagert und bewirken charakteristische Absorptionsbanden im langen Wellenlängenbereich (500–800 nm).^[30] Derzeit erfolgt die Einordnung meist aufgrund struktureller und mechanistischer Merkmale.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche weitere Vertreter der OYE-Familie charakterisiert. Einige synthetisch relevante Vertreter sind in **Tabelle 1** inklusive ihres Herkunftsorganismus aufgelistet. Im Folgenden werden gemeinsame strukturelle und mechanistische Merkmale genauer erklärt sowie interessante Enzyme und Umsetzungen aus stereochemischer Sicht näher erläutert.

Tabelle 1: Herkunft einiger synthetisch relevanter OYEs (adaptiert aus Winkler *et al.*).^[31]

#	Taxonomische Einordnung	Name (Organismus)	Abkürzung
1	OYEs aus Pilzen	<i>Old Yellow Enzyme 1</i> (<i>Saccharomyces pastorianus</i>) ^[32]	OYE 1
		<i>Old Yellow Enzyme 2</i> und 3 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ^[21b, 33]	OYE 2, OYE 3
		<i>Estrogen Binding Protein 1</i> (<i>Candida albicans</i>) ^[34]	EBP 1
		<i>Kluyveromyces lactis yellow enzyme 1</i> (<i>Kluyveromyces lactis</i>) ^[35]	KYE 1
		<i>Old Yellow Enzyme 2.6</i> (<i>Pichia stipitis</i>) ^[36]	OYE 2.6
2	OYEs aus Bakterien	Pentaerythritoltetranitrat-Reduktase (<i>Enterobacter cloacae PB2</i>) ^[37]	PETNR
		YqjM (<i>Bacillus subtilis</i>) ^[25a]	YqjM
		NAD(P)H-abhängige 2-Cyclohexen-1-on-Reduktase (<i>Zymomonas mobilis</i>) ^[38]	NCR _{ZM}
		TOYE (<i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus E 39</i>) ^[39]	TOYE
		Morphinon Reduktase (<i>Pseudomonas putida M10</i>) ^[40] Xenobiotika Reduktase A (<i>Pseudomonas putida</i>) ^[41]	MR Xen A

3	OYEs aus Pflanzen	12-Oxophytodienoatreduktasen 1–3 [<i>Solanum lycopersicum</i> , vorher: <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)] ^[42]	OPR 1–3
		12-Oxophytodienoatreduktasen 1–3 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) ^[43]	AtOPR 1–3

6.1.2 Struktur von OYEs

Die erste Kristallstruktur eines OYE, nämlich von OYE 1, konnte im Jahr 1994 von Fox und Karpus erhalten und aufgeklärt werden und ist seitdem in der Protein Data Bank (PDB) öffentlich zugänglich.^[32] Seitdem wurden viele weitere OYEs kristallographisch untersucht. Es zeigte sich, dass die OYEs, die nativ sowohl in Bakterien als auch in Hefen und Pflanzen vorkommen, auch strukturell Diversität zeigen. So sind Monomere, Dimere, Tetramere und sogar Quartärstrukturen höherer Ordnung bekannt. Es kann eine Einordnung in zwei Unterklassen vorgenommen werden: die klassischen OYEs (z.B. OYE 1, OPR 1–3) und die thermophili-ähnlichen (z.B. YqjM, TOYE).^[20] Hier sollen zuerst die Gemeinsamkeiten der OYE-Superfamilie dargestellt werden. Die Unterschiede der Unterklassen werden in Kapitel 6.1.4 anhand von YqjM genauer erläutert.

Bei einem strukturellen Alignment der Kristallstrukturen von OYEs zeigt sich, dass die Tertiärstruktur der Monomere in allen Fällen ein sogenanntes TIM-Barrel [(α , β)-Faltung] beinhaltet. Dieses Struktur-Motiv besteht aus acht α -Helices und acht parallelen β -Faltblättern, die entlang des Peptidrückgrates alternieren. Die β -Faltblätter bilden dabei ein sogenanntes β -Fass.^[44] Zusätzlich sind in OYEs jeweils andere Sekundärstrukturelemente vorhanden. Große Unterschiede finden sich vor allem in oberflächennahen Loop-Regionen, die oft eine Rolle in der Interaktion zwischen Monomeren spielen.^[39] Die homologe TIM-Barrell-Struktur sowie die Abweichungen in den Loop-Regionen sind beispielhaft anhand des strukturellen Alignments der Enreduktasen OYE 1, YqjM aus *Bacillus subtilis*^[12] und OYE 2.6 aus *Pichia stipitis*^[36] in **Abbildung 2** dargestellt.



Abbildung 2: Strukturelles Alignment der Monomere von drei verschiedenen OYEs: YqjM (PDB: 1Z42, braun), OYE 1 (PDB: 3TX9, blau) und OYE 2.6 (PDB: 3TJL, violett). Abbildung jeweils inklusive des Cofaktors FMN **A:** Sicht vom oberen C-terminalen Ende in den Hohlraum der TIM-Barrell-Faltung auf die parallelen β -Faltblätter, **B:** Blick auf die α -Helices an der Seite der TIM Barrell-Struktur sowie die Loop-Regionen. (Grafik erstellt mit UCSF Chimera 1.10, RMSD: 1.422 Å).

Das aktive Zentrum befindet sich jeweils am C-terminalen erweiterten Ende der TIM-Barrel-Struktur und ist somit im Abbildungsteil **B** im oberen, stark mit Loop-Regionen versehenen Bereich zu finden. Ein hoher Konservierungsgrad innerhalb der Primär- und Tertiärstruktur findet sich in den Regionen von OYE_s, welche an der Katalyse direkt beteiligt sind und zum Beispiel zur Substrat- oder FMN-Bindung beitragen.^[20] So ist FMN (**1**), das in jedem aktiven Monomer nicht kovalent gebunden vorliegt, an der (*re*)-Seite seines Isoalloxazinrings über Wasserstoffbrücken fixiert. Diejenigen Aminosäuren, welche über ihre Seitenketten mit dem Isoalloxazin interagieren, sind hoch konserviert.^[39] Auf der (*si*)-Seite des Isoalloxazinrings, die zum Lösungsmittel hin geöffnet ist, befindet sich die Substratbindestelle. Es sind insgesamt drei hoch konservierte Aminosäuren vorhanden, die an der Katalyse aktiv beteiligt sind: zwei Wasserstoffbrücken-Donoren (H/H oder H/N) und ein Tyrosinrest. Ihre Position im aktiven Zentrum ist in **Abbildung 3** am Beispiel des aktiven Zentrums der Enreduktase OYE 1 dargestellt.

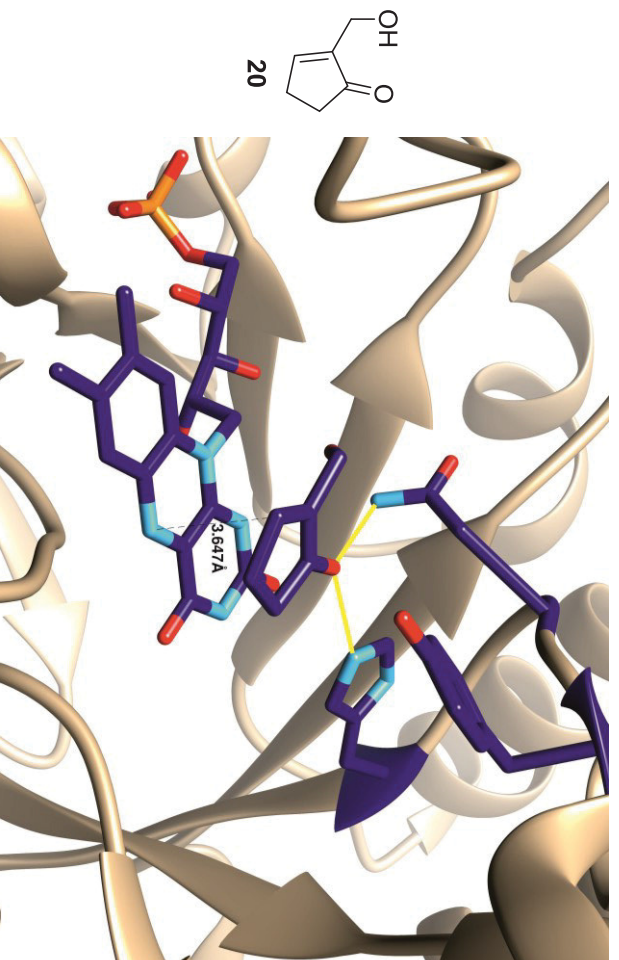
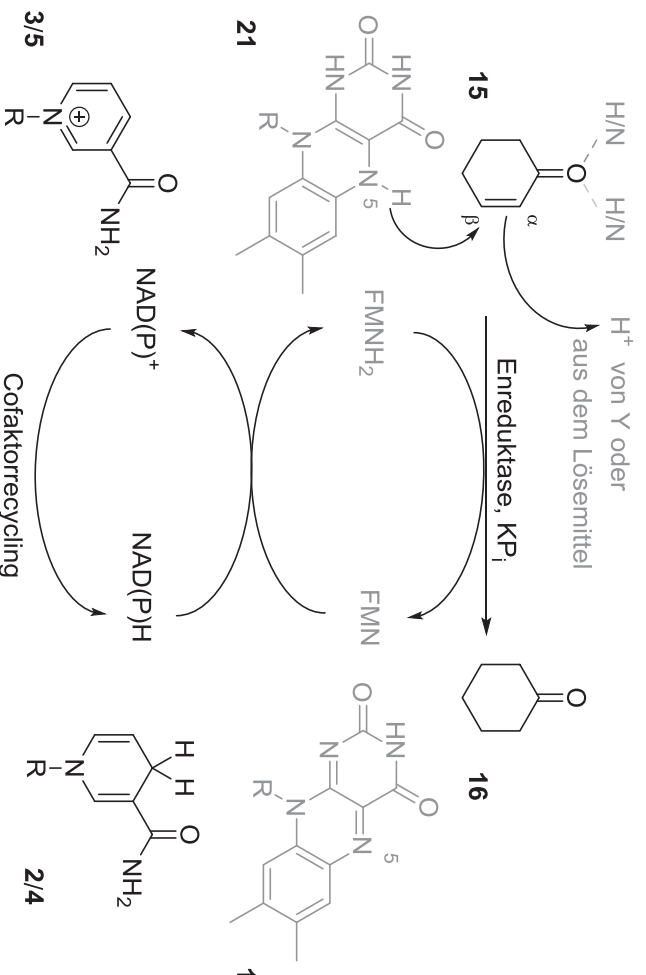


Abbildung 3: Das aktive Zentrum von OYE 1 mit dem eingelagerten Substrat 2-(Hydroxymethyl)cyclopent-2-enon (**20**) (PDB: 3TX9). Neben dem Proteinrückgrat (beige) sind explizit die katalytisch aktiven Aminosäuren H191, N194 und Y196 sowie der Cofaktor FMN dargestellt (dunkelblau). Weitere Farben: Stickstoff (hellblau), Sauerstoff (rot), Phosphor (orange). Gelbe Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar.

Um ihre relative Lage zu verdeutlichen, sind FMN und das im Proteinkristall enthaltene Substrat 2-Hydroxymethylcyclopent-2-enon (**20**) ebenfalls abgebildet. Die beiden Wasserstoffbrücken-Donoren sind so positioniert, dass sie Bindungen zur gleichen funktionellen Gruppe ausbilden können. Sie fixieren sowohl die Substrate als auch Inhibitoren oder den Nikotinamid-Cofaktor über dem Isoalloxazinring. Zusätzlich richten sie die reaktive Doppelbindung von Substraten in günstiger Position (Abstand, Winkel) zum Flavin-Cofaktor aus.^[21b]

6.1.3 Reaktionsmechanismus von OYEs und Cofaktorrecycling

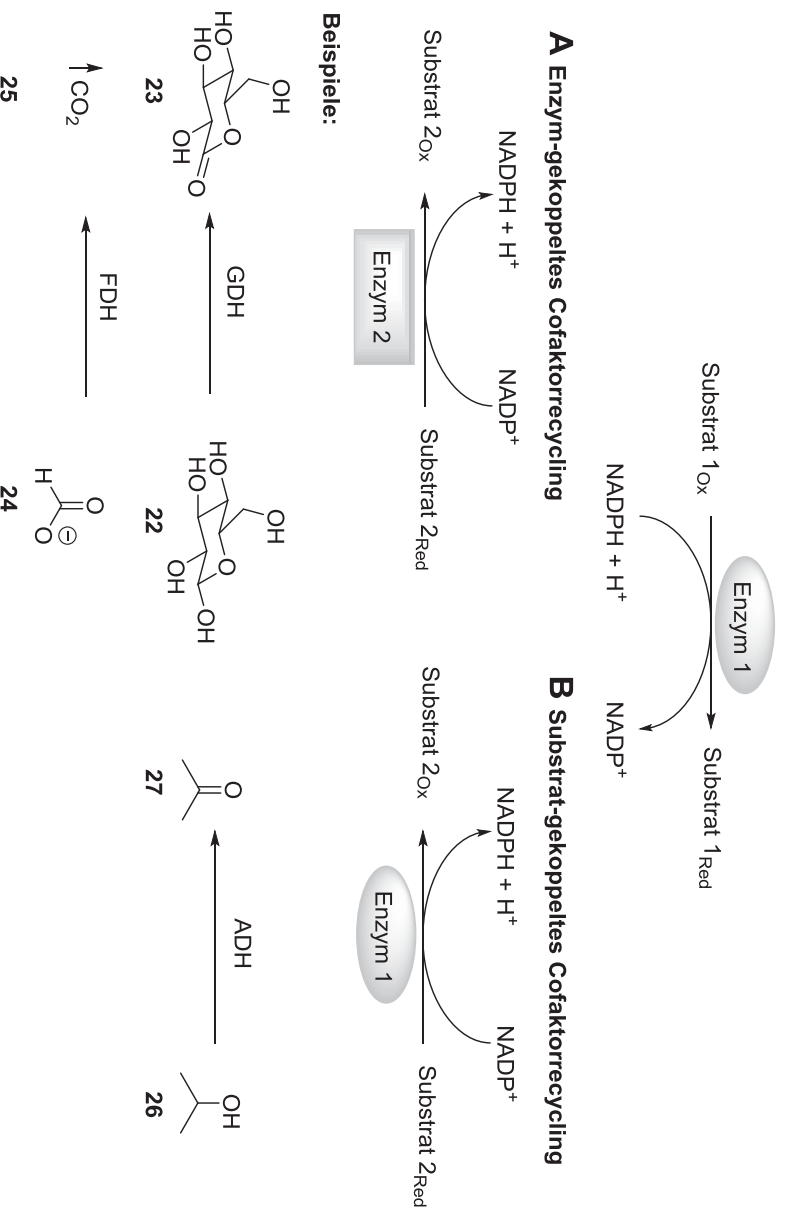
In **Schema 5** ist der Reaktionsablauf von OYE-katalysierten Reduktionen inklusive der beteiligten strukturellen Elemente des aktiven Zentrums schematisch dargestellt. Als Beispiel dient die Reduktion von 2-Cyclohexanon (**15**) zu Cyclohexanon (**16**). Ein Hydrid vom N-5-Atom des reduzierten Flavins (FMNH₂, **21**) wird (analog dem nukleophilen Angriff in der *Michael*-Reaktion) auf C_β des Substrats übertragen. Die Wasserstoffbrücken des Carbonylsauerstoffs zu zwei Histidin- oder Asparagineresten bewirken eine Fixierung des Substrats und zusätzlich eine Polarisierung der C=O-Doppelbindung. Dies begünstigt die Hydridübertragung durch Stabilisierung des dabei entstehenden Enolats, wie durch QM/MM-Berechnungen bestätigt werden konnte.^[45] Zum Ladungsausgleich erfolgt die Übertragung eines Protons auf C_α. Dieses stammt meist von einem Tyrosinrest (alternativ auch von Cystein, MR). Da FMN und Tyrosin auf unterschiedlichen Seiten der Substratebene liegen, ist die Gesamtreaktion stereoselektiv und entspricht einer *anti*-Addition von Hydrid und Proton.^[21a, 30, 46] Alternativ kann das Proton direkt vom Lösungsmittel übertragen werden, wodurch die Reaktion am C_α-Atom unselektiv wird. Um das FMN im aktiven Zentrum in seine benötigte reduzierte Form zu überführen, wird das NAD(P)H (**2/4**) in gleicher Weise wie das Substrat im aktiven Zentrum gebunden und vom Biokatalysator zu NAD(P)⁺ (**3/5**) oxidiert.



Schema 5: Mechanistischer Ablauf einer Enreduktase-katalysierten Reduktion des Referenzsubstrats 2-Cyclohexanon (**15**). Angegebene Strukturen, die Teil des aktiven Zentrums des Enzyms sind, sind in grauer Farbe dargestellt.

Aufgrund der Tatsache, dass somit nacheinander zwei verschiedene Substrate im aktiven Zentrum binden und jeweils eine bimolekulare Reaktion eingehen, wird der Mechanismus als „ping-pong-bi-bi“-Mechanismus bezeichnet.^[21b] Durch Untersuchungen des kinetischen Isotopeneffekts der Hydridübertragung in den OYEs PETNR und MR konnten von Basran *et al.* Hinweise auf einen bedeutenden Beitrag eines quantenmechanischen Tunnelmechanismus zur Gesamtreaktion gefunden werden. Für andere OYEs sind dazu derzeit keine Untersuchungen vorhanden.^[47] Die Rückgewinnung von NAD(P)H (**2/4**) erfolgt

innerhalb der lebenden Zelle im Rahmen des Gesamtmetabolismus. Da andere in der Zelle vorhandene Enzyme, wie Alkoholdehydrogenasen oder konkurrierende Enreduktasen, bei vielen OYE-Substraten zu Nebenreaktionen führen können, werden OYE-katalysierte Reaktionen meist mit aufgereinigtem Enzym *in vitro* durchgeführt. Dabei werden grundsätzlich stöchiometrische Mengen des sehr teuren reduzierten Nikotinamid-Cofaktors NAD(P)H (2/4) benötigt. Um dies zu umgehen, kann zum Beispiel ein sogenanntes Cofaktorrecyclingssystem verwendet werden. Am besten etabliert ist das enzymatische, *in situ*-Recycling von NAD(P)H.^[48] Alternativ können als Reduktionsmittel statt NAD(P)H (2/4) kostengünstigere, synthetische Nikotinamidvarianten (z.B. *N*-Benzyl- und *N*-*n*-Butyl-Nikotinamid) eingesetzt werden.^[49] Zusätzlich sind in der Literatur elektrochemische^[50] und photochemische^[51] Verfahren zur direkten Reduktion des enzymgebundenen Flavins bekannt. Da in dieser Arbeit mit enzymatischem NAD(P)H-Recycling gearbeitet wurde, wird nur dieses Verfahren an dieser Stelle genauer beschrieben. Enzymatisches Cofaktorrecycling kann Enzym- oder Substrat-gekoppelt durchgeführt werden. Enzym-gekoppelte Verfahren nutzen dabei ein weiteres Enzym sowie ein zusätzliches Co-Substrat, um den Nikotinamid-Cofaktor zu reduzieren. Im Substrat-gekoppelten Verfahren katalysiert das verwendete Enzym zum einen die angestrebte Reaktion, zum anderen auch die analoge Reduktion eines im Überschuss vorhandenen Co-Substrates. Insgesamt wird also nur ein Enzym benötigt, jedoch zwei Substrate. Wichtig ist bei beiden Verfahren eine optimale Gleichgewichtslage der Recyclingreaktion. Die enzymatischen Methoden des Cofaktorrecyclings sind mit konkreten Beispielen in **Schema 6** dargestellt.



Schema 6: Methoden zum enzymatischen Cofaktorrecycling von NAD(P)H. **A:** Enzym-gekoppeltes Verfahren, wobei ein Hilfsenzym mit eigenem Substrat zum Einsatz kommt. Beispiele sind die Oxidationen von Glukose (**22**) durch Glukosedehydrogenase (GDH) und von Formiat (**24**) durch Formiatdehydrogenase (FDH) **B:** Substrat-gekoppeltes Verfahren, bei dem zwei verschiedene Substrate von nur einem Enzym umgesetzt werden. Als Beispiel ist hier die Oxidation von Isopropanol (**26**) durch Alkoholdehydrogenase (ADH) gezeigt.

Häufig genutzte Enzym-gekoppelte Systeme, die auch für Enreduktase-katalysierte Bioreduktionen zum Einsatz kommen, sind die Glukosedehydrogenase (GDH)-katalysierte Oxidation von Glukose (**22**) zu Gluconolacton (**23**) und die Formiatdehydrogenase (FDH)-katalysierte Oxidation von Formiat (**24**) zu Kohlenstoffdioxid (**25**, CO₂). Die Gleichgewichtslage auf Produktseite wird im ersten Fall durch Hydrolyse des Lactonrings gewährleistet, in der FDH-katalysierten Reaktion durch die Bildung des gasförmigen Kohlenstoffdioxids, das aus dem Reaktionsgemisch entweichen kann. Substrat-gekoppelte Verfahren kommen häufig bei Alkoholdehydrogenase (ADH)-katalysierten Umsetzungen zum Einsatz, da diese sowohl Oxidation als auch Reduktion katalysieren. Als Co-Substrat kann dort zum Beispiel Isopropanol (**26**) dienen, das zu Aceton (**27**) oxidiert wird.^[48b]

6.1.4 Die Enreduktase YqjM

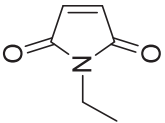
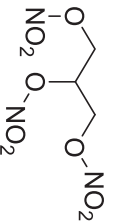
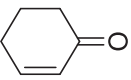
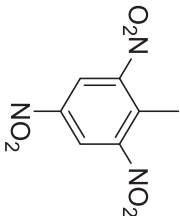
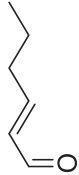
Das gelb gefärbte Enzym YqjM aus dem grampositiven Bodenbakterium *Bacillus subtilis* wurde zuerst im Jahr 2003 von T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein und P. Macheroux charakterisiert und als erstes Mitglied einer neuen Unterklasse (spätere Benennung als thermophil-ähnliche OYEs)^[20] der OYE-Superfamilie identifiziert. Die Bezeichnung YqjM stammt von der Benennung des exprimierten Gens als *yqjM*.^[52] Zu OYE 1 zeigt YqjM 33 % Sequenzidentität sowie 50 % Sequenzähnlichkeit. Es hat eine Größe von 37.4 kDa und spielt *in vivo* wahrscheinlich eine Rolle bei Entgiftungsprozessen und in der oxidativen Stressantwort. Hinweise darauf ergaben sich aus der erhöhten YqjM-Produktion in *Bacillus subtilis* bei Zugabe des giftigen xenobiotischen Stoffes Trinitrotoluol (**10**) sowie des Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid.^[25a]

Die heterologe Überexpression gelang in *E. coli* mit hoher Enzymsausbeute von bis zu 161 mg/ 1 L *E. coli*-Kultur.^[53] YqjM enthält, wie für OYEs charakteristisch, nicht kovalent gebundenes FMN im aktiven Zentrum jedes Monomers. Die Sättigung mit FMN ist jedoch nach Überexpression in *E. coli* nicht vollständig und kann durch Inkubation mit FMN gesteigert werden. Dies konnte von Fitzpatrick *et al.* durch Veränderungen im UV/Vis-Spektrum und erhöhte Aktivität [1.6-fache Aktivität bei Umsetzung von *N*-Ethylmaleinimid (**28**)] nach Inkubation mit FMN gezeigt werden.^[25a] Diese Aktivitätssteigerung konnte im Rahmen einer Studie von T. Classen optimiert werden. So konnte für eine YqjM-Lösung der Konzentration 2.5 mg/mL durch Inkubation mit 1 mM FMN die Aktivität bei Umsetzung von 2-Cyclohexenon (**15**) um mehr als das 7-fache auf >3.5 U/mg gesteigert werden. Durch Extrapolation mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergab sich, dass 95 % der Maximalaktivität – und somit 95 % Sättigung mit FMN – durch Inkubation mit 5 mM FMN erhalten werden können. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen erreichter Maximalaktivität und der Absorption bei 280, 432 und 458 nm bestimmt. So konnte der in **Gleichung 1** dargestellte proportionale Zusammenhang zwischen der FMN-Sättigung *S* und den Quotienten ($A_{458\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) sowie ($A_{432\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$) erhalten werden, der eine schnelle und einfache Messung der FMN-Sättigung möglich macht.^[53]

$$S = 3.39 \cdot \frac{A_{458\text{ nm}}}{A_{280\text{ nm}}} = 4.53 \cdot \frac{A_{432\text{ nm}}}{A_{280\text{ nm}}}$$

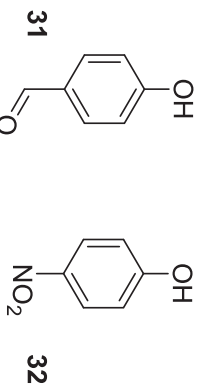
Gleichung 1: Formel zur Bestimmung der FMN-Sättigung aus Absorptionsmessungen.

Holo-YqjM akzeptiert sowohl NADH als auch NADPH als Reduktionsmittel, zeigt jedoch eine Präferenz für NADPH [1.4-fach höhere Aktivität ohne Substratzugabe, 7-fache Aktivität in Gegenwart des Substrats *N*-Ethylmaleinimid (**28**)].^[25a] Wie bei OYE 1 ist Sauerstoff ein mögliches Oxidationsmittel. YqjM weist Enreduktase-Aktivität gegenüber einer großen Anzahl literaturbekannter OYE-Substrate auf (α,β -ungesättigte Aldehyde, α -prochirale acyclische und cyclische α,β -ungesättigte Ketone, verschiedenen substituierte Maleimide, Nitroalkene, Carbonsäureester und Carbonsäuren). Außerdem ist Nitroreduktase- und Nitratreduktase-Aktivität zu beobachten.^[25a, 51, 54] Fitzpatrick *et al.* bestimmten die kinetischen Parameter gegenüber der Substrate 2-Cyclohexanon (**15**), *N*-Ethylmaleinimid (**28**), *trans*-Hex-2-enal (**29**), Trinitrotoluen (**10**) und Nitroglycerin (**30**) und konnten zeigen, dass die katalytische Effizienz für *N*-Ethylmaleinimid (**28**) mit einem Wert von $>8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ am höchsten ist (**Schema 7**).^[25a]

				
28	30	15	10	29
k_{cat}/K_M :	$>8.07 >>$	0.034	$>$	0.015
	$>$	$>$	0.0045	$>$
			$0.0018 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	

Schema 7: Ausgewählte Substrate der Enreduktase YqjM in Reihenfolge absteigender katalytischer Effizienz.^[25a]
Assaybedingungen: 25 °C, 100 mM NADPH, 20 mM Glukose und 10 U Glukose-Oxidase enthalten in 1 ml 100 mM Tris, pH 7.4.

Seit 2005 ist auch die Kristallstruktur des Enzyms in oxidiertem und reduzierter Form mit und ohne gebundenem Inhibitor [PDB: 1Z42, *p*-Hydroxybenzaldehyd (**31**, pHB) bzw. PDB: 1Z44, *p*-Nitrophenol (**32**)] in der PDB hinterlegt.^[12]



Schema 8: Struktur der beiden Inhibitoren *p*-Hydroxybenzaldehyd (**31**) und *p*-Nitrophenol (**32**), die in den Röntgenkristallstrukturen von YqjM mit abgebildet werden konnten.

Das YqjM-Monomer zeigt demnach die für OYEs typische TIM-Barrel Struktur und im aktiven Zentrum die für OYEs katalytisch essentiellen Aminosäurereste: ein Wasserstoffbrücken-ausbildendes H/H-Motiv (H164/H167) sowie einen Tyrosin-Rest (Y169), der vermutlich die Protonierung bewirkt. Anders als beispielsweise OYE 1 liegt es jedoch als Homotetramer vor (**Abbildung 4 A**). Dieses Homotetramer besteht aus zwei katalytisch abhängigen Dimer-Einheiten. Innerhalb dieser funktionalen Dimere ragt jeweils ein C-terminaler Aminosäurerest (N336) des benachbarten Monomers in die beiden aktiven Zentren. Dies ist ein Charakteristikum der thermophil-ähnlichen OYE-Unterklasse^[20] und führt dazu, dass die Einführung eines His-Tags in die Proteinstruktur zur Proteinreinigung nur am N-terminalen Ende zu aktivem Protein führt.^[53, 55] Zusätzlich zur Abweichung der Quartärstruktur von klassischen OYEs zeigte ein Sequenzalignment die Zugehörigkeit von YqjM zu dieser

Unterklasse. Kitzing *et al.* konnten so besonders im Bereich der Substratbindetasche weitere charakteristische Unterschiede finden.^[56] So sind C26 und Y28 im aktiven Zentrum von YqjM innerhalb der Unterklasse hochkonserviert. Klassische OYEs enthalten an Stelle von C26 einen Threonin-Rest im aktiven Zentrum (T37 in OYE 1), der Einfluss auf das Redoxpotenzial des FMN-Cofaktors hat.^[21b, 57] Eine Y28-äquivalente Aminosäure liegt in klassischen OYEs nicht vor. Die Kristallstrukturen zeigen außerdem, dass der Inhibitor *p*-Hydroxybenzaldehyd (**31**) im aktiven Zentrum von YqjM über die Phenolatgruppe an die beiden Histidinreste gebunden wird (**Abbildung 4B**). In OYE 1 findet die Bindung von **31** über den Aldehyd-Carbonylsauerstoff statt. Die Lage des aromatischen Rings des Inhibitors stimmt in beiden Enzymen überein.^[56]

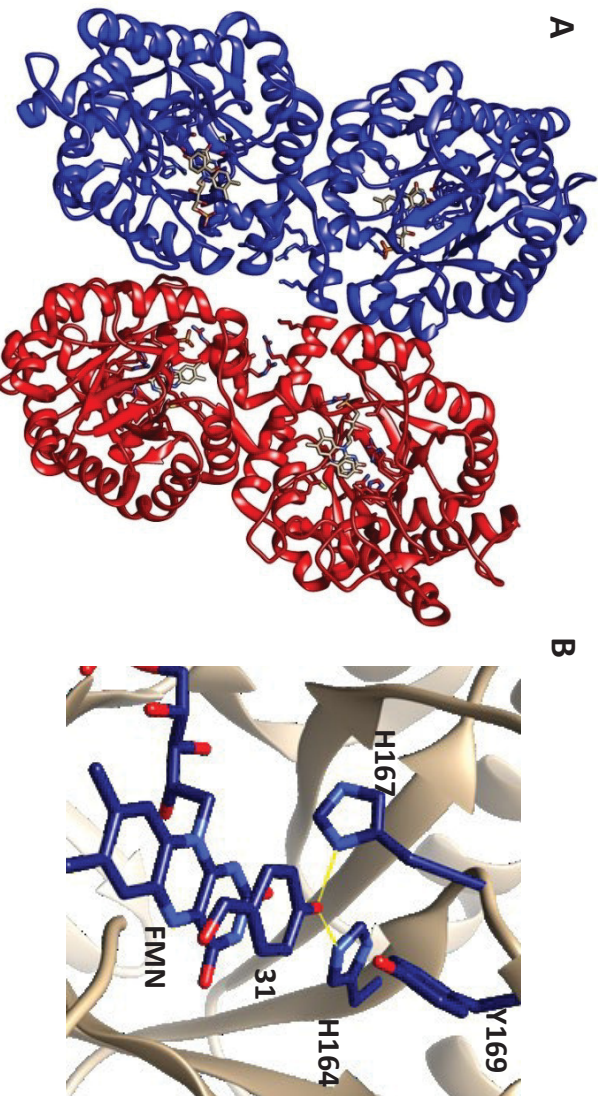
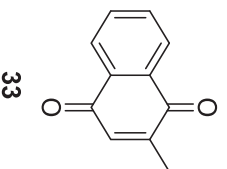


Abbildung 4: A: Quartärstruktur des Enzyms YqjM (PDB: 1Z42) als Homotetramer inklusive expliziter Darstellung der vier aktiven Zentren. Die beiden funktionalen Dimere sind in rot und blau dargestellt. **B:** Aktives Zentrum von YqjM komplexiert mit dem Inhibitor *p*-Hydroxybenzaldehyd (**31**).

Insgesamt ist das aktive Zentrum von YqjM im Vergleich zu anderen OYEs weit geöffnet, leicht erreichbar und hydrophob, was auf ein recht breites Substratspektrum hindeutet.^[56] Entsprechend konnte gezeigt werden, dass auch bicyclische Verbindungen wie Vitamin K (**33**, Menadion) im aktiven Zentrum von YqjM Platz finden und umgesetzt werden.^[56]



Schema 9: Menadion (Vitamin K, **33**).

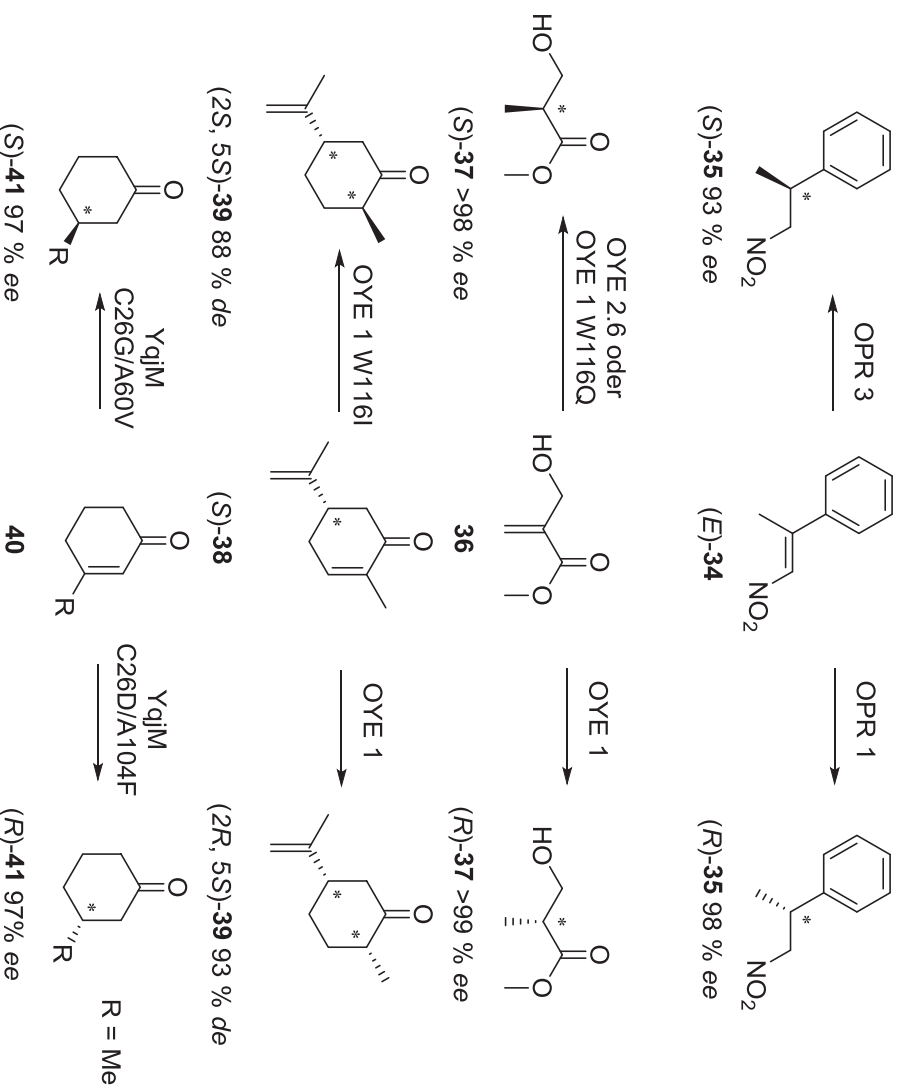
YqjM ist – anders als seine strukturelle Einordnung vermuten lässt – nicht thermophil, verliert ab ca. 50 °C seine Faltung und zeigt ab einer Temperatur von 60 °C keine Aktivität mehr.^[28]

6.2 Stereoselektivität in OYEs

6.2.1 Stereokomplementäre OYE-katalysierte Bio reduktionen

Da Biokatalysatoren nur in einer enantiomeren Form erhältlich sind, ist die Katalyse stereokomplementärer, enzymatischer Reaktionen allgemein nicht trivial. Grundsätzlich werden zwei verschiedene Herangehensweisen verfolgt: Enzym- oder Substrat-basierte Stereokontrolle. Erstere beruht darauf, dass zwei Enzyme mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz verwendet werden. Die Substrat-basierte Herangehensweise nutzt die Variabilität des Bindungsmodus eng verwandter Substrate innerhalb ein und desselben Enzyms.^[58] Im Folgenden werden ausgewählte Literaturbeispiele stereokomplementärer OYE-katalysierter Bio reduktionen, geordnet nach dieser Einteilung, vorgestellt.

Enzym-basierte Stereokontrolle kann durch zwei unterschiedliche native Enzyme oder durch Veränderung der Aminosäuresequenz des gleichen nativen Enzyms erreicht werden. Für beides gibt es in der Literatur bezüglich OYEs Beispiele (**Schema 10**).



Schema 10: Enzymkontrolle der Stereoselektivität durch Einsatz verschiedener nativer Enzyme oder Enzymvarianten.

So konnte für die beiden eng verwandten OYEs OPR 1 und OPR 3 stereokomplementäres katalytisches Verhalten bezüglich der Reduktion von (*E*)-1-Nitro-2-phenylpropan (**34**) zu 1-Nitro-2-phenylpropan (**35**) gezeigt werden.^[59] Ein weiteres Beispiel für Enzym-kontrollierte Substratkontrolle ist die Bio reduktion von 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäuremethylester (**36**). Diese ergibt bei Katalyse durch OYE 1–3, YqjIM und XenaA das (*R*)-Enantiomer des 3-Hydroxy-

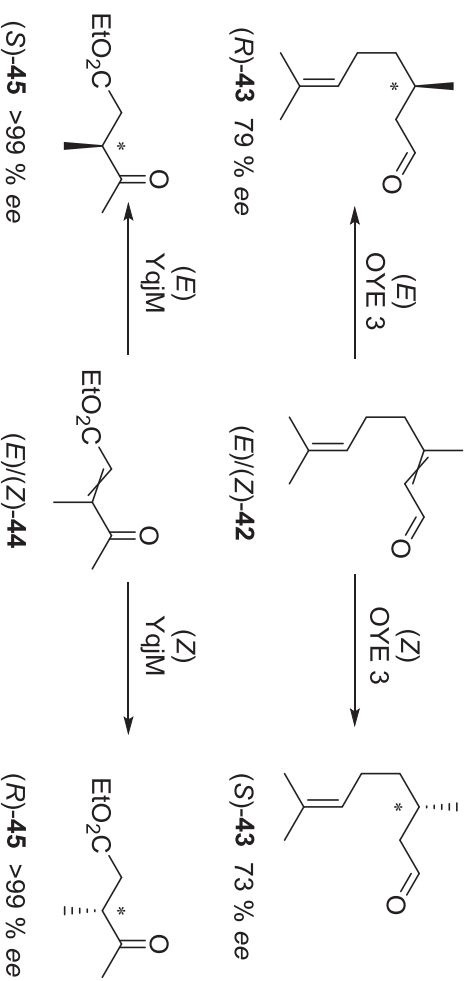
2-methylpropionsäuremethylesters (**37**, *Roche-Ester*).^[60] Lange war kein OYE zur Katalyse der (S)-selektiven Reaktion bekannt. So wurden eine Reihe von OYE-1-Varianten mit Aminosäureaustausch an Position 116 (W116X) getestet, die ursprünglich zur Erweiterung des Substratspektrums beitragen sollten. Eine dieser Varianten (W116I) hatte schon bei der Umsetzung von (S)-Carvon (**38**) zum hydrierten Produkt **39** mit Wildtyp-komplementärer (S)-Selektivität am α -Kohlenstoff geführt.^[11, 61] Auch für die Bio-reduktion von 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäuremethylester (**36**) war der Test dieser OYE-1-Bibliothek ein Erfolg; OYE-1-W116Q und OYE-W116H zeigten komplementäres Verhalten zum OYE-1-Wildtyp. Mit diesem Wissen wurde daher erneut ein natives Enzym gesucht, das in der analogen Position zu W116 eine Veränderung enthält. So wurde das einzige heute bekannte native Enzym gefunden, das zum (S)-Enantiomer von **37** führt: OYE-2.6 aus *Pichia stipitis*.^[62] Für keines dieser Enzympaare konnte jedoch komplementäre Selektivität für ein breiteres Substratspektrum festgestellt werden.^[59, 61]

Ein weiterer Fall, in dem die Veränderung der Aminosäuresequenz zu stereokomplementären Enzymen führte, ist eine Studie von Bougioukou *et al.* aus dem Jahr 2009. Darin wurden durch gerichtete Evolution Varianten der Enreduktase YqjM gesucht, die stereokomplementäre Selektivität bezüglich der Umsetzung von 3-Methyl-2-cyclohexanon (**40**, R = Me) zu 3-Methylcyclohexanon (**41**, R = Me) aufweisen. Das hier verwendete Substrat **40** wird vom YqjM-Wildtyp nicht umgesetzt. Durch Mutagenese konnte in dieser Studie schließlich sowohl die Aktivität erhöht als auch die Selektivität definiert werden. Die erhaltenen besten Varianten sind YqjM C266G/A60V zur Synthese des (S)-Enantiomers von **41** und YqjM C26D/A104F zur Synthese des (R)-Enantiomers (**Schema 10**). Diese Varianten zeigten auch für 3-substituierte 2-Cyclohexenone **40** mit größeren Substituenten (R = Et, *i*Pr, *n*Bu, CO₂Me) teils annähernd gleichbleibende Selektivität.^[63] Für Substrate mit anderen strukturellen Abweichungen wurden die Enzymvarianten bisher nicht getestet.

Eine Methode zur Vorhersage der Stereoselektivität monomerer Enreduktasen auf Grundlage der Aminosäuresequenz wurde im Jahr 2011 von Oberdorfer *et al.* vorgeschlagen. Durch Analyse der Proteinstrukturen von zwölf OYES unter Beachtung ihrer bekannten Selektivität bezüglich der Reduktion von (*E*)-1-Nitro-2-phenylpropen (**34**) wurden strukturelle Determinanten der Stereoselektivität gefunden. Diese spiegeln sich in Position 3 der für monomere OYES konservierten Aminosäuresequenz G-[FYW]-X(3)-P-G-[ILV]-[FHW] wider: bei langen, polaren oder geladenen Aminosäuren an Position 3 liegt (R)-Selektivität vor, bei Prolin in dieser Position (S)-Selektivität. Daher postulierten die Forscher, dass somit die Vorhersage der Stereoselektivität von OYES auf Grundlage der Primärsequenz möglich sei.^[64] Classen *et al.* überprüften diese Hypothese anhand eines unbekanntes nativen Enzyms (NCR_{pL} aus *Photobacterium luminescens*) mit vorhergesagter (R)-Selektivität sowie durch Sättigungsmutagenese des nativ (S)-selektiven Enzyms NCR_{ZM} an der entsprechenden Position (P67). Diese Tests führten nicht zu den jeweils vorhergesagten Selektivitäten. Die von Oberdorfer *et al.* gefundene Aminosäureposition ist somit nicht die alleinige Stereoselektivitätsdeterminante von OYES bei der Umsetzung von **34**.^[65]

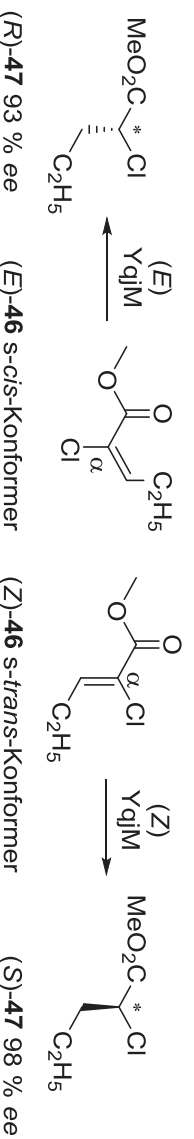
Substrat-basierte Stereokontrolle kann in OYES entweder durch Veränderung der (*E*)-/(*Z*)-Konfiguration der zu reduzierenden Doppelbindung oder durch Variation der hydrophoben, sterischen und elektronischen Eigenschaften von Substratsubstituenten erreicht werden.^[58a] Beispiele für ersteres sind in **Schema 11** und **Schema 12** dargestellt. Durch Veränderung der (*E*)-/(*Z*)-Konfiguration wird theoretisch nur die Position der beiden β -Substituenten im

aktiven Zentrum getauscht und an C_β wird somit das komplementäre Stereozentrum gebildet. Dies konnte beispielsweise für die OYE 3-katalysierte Reduktion von (*E*)- bzw. (*Z*)-Citral (**42**) zu Citronellal (**43**) sowie für die Bioreduktion von (*E*)-/(*Z*)-3-Methyl-4-oxopent-2-ensäureethylester (**44**) zum entsprechenden gesättigten Ester (**45**) gezeigt werden (**Schema 11**).^[38, 66]



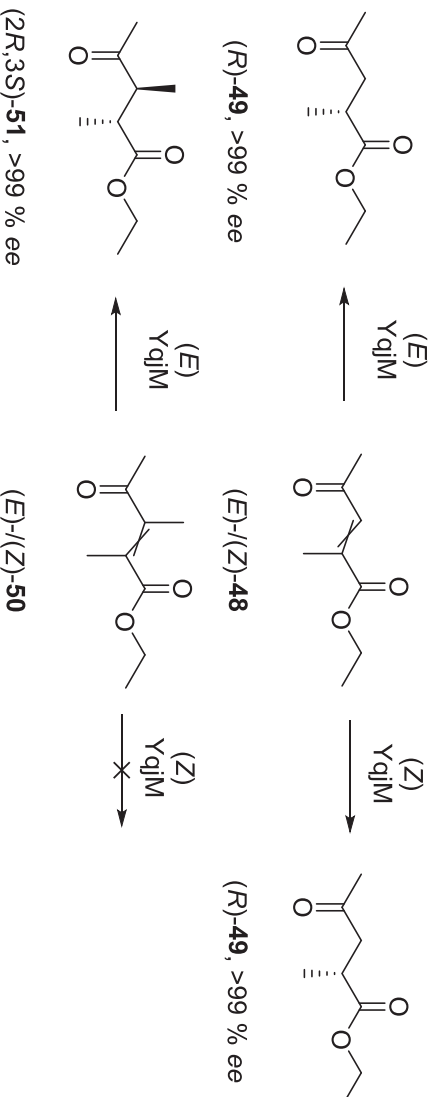
Schema 11: Beispiele für Substrat-basierte Stereokontrolle des β-Stereozentrums *via* (*E*)/(*Z*)-Konfiguration des Substrates.^[38, 66]

Zusätzlich nimmt die (*E*)-/(*Z*)-Konfiguration auch in manchen Fällen Einfluss auf das α-Stereozentrum (**Schema 12**). Ein Beispiel dafür ist die YqjM-katalysierte Reduktion von (*E*)- und (*Z*)-2-Chloropentensäuremethylester (**46**) zu den stereokomplementären Produkten (*R*)- und (*S*)-**47**.^[67] Diese Selektivität ist laut Docking-Experimenten von Oberdorfer *et al.* vermutlich auf bevorzugte Bindungsmodi zurückzuführen, die sich bezüglich der Rotation des Substrats um seine [C_α-(C=O)]-σ-Bindung (*s-cis*/*s-trans*-Isomerie) unterscheiden. Die Esterfunktion wird jeweils in gleicher Weise im aktiven Zentrum gebunden. Die Rotation führt somit zur Vertauschung der Substituenten in α-Position und komplementärer Selektivität.



Schema 12: Substrat-basierte Stereokontrolle des α-Stereozentrums *via* (*E*)/(*Z*)-Konfiguration der Substrate sowie bevorzugte Konformationsisomere (*s-cis*/*s-trans*) von (*E*)- bzw. (*Z*)-2-Chloropentensäuremethylester (**46**) im produktiven Bindungsmodus. (Dockingergebnis von Oberdorfer *et al.*)^[58a]

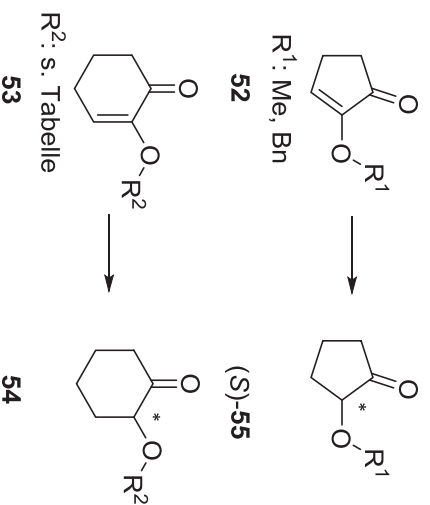
Die Nutzung von (*E*)- und (*Z*)-konfigurierten Substraten führt jedoch nicht immer zum Ziel. Beispiele dafür sind in **Schema 13** gezeigt. So ist zum Beispiel bei biokatalytischer Hydrierung von 2-Methyl-4-oxopent-2-ensäureethylester (**48**) mittels YqjM oder OYE 1 unabhängig vom eingesetzten Diastereomer nur das (*R*)-Enantiomer von **49** zugänglich. Bei Bioreduktion des 2,3-Dimethyl-4-oxopent-2-ensäureethylesters (**50**) mittels YqjM zeigt nur das (*E*)-Diastereomer (*E*)-**50** Umsatz zum entsprechenden gesättigten Ester (*R*)-**51**. Das (*Z*)-Isomer von **50** wird nicht umgesetzt.^[66]



Schema 13: Beispiele für Reaktionen, in denen die Kontrolle der Stereoselektivität *via* E/Z Isomerie nicht gelingt.^[66]

Dass auch Veränderungen der Substituenten durch Schutzgruppen zu stereokomplementären enzymatischen Reaktionen führen können, konnten Winkler *et al.* 2010 anhand der Bio-reduktion von *O*-geschützten Acyloinvarianten zeigen (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Hydroxyl-Schutzgruppen auf die Stereoselektivität von OYES bei Umsetzung von Acyloinderivaten.^[68]



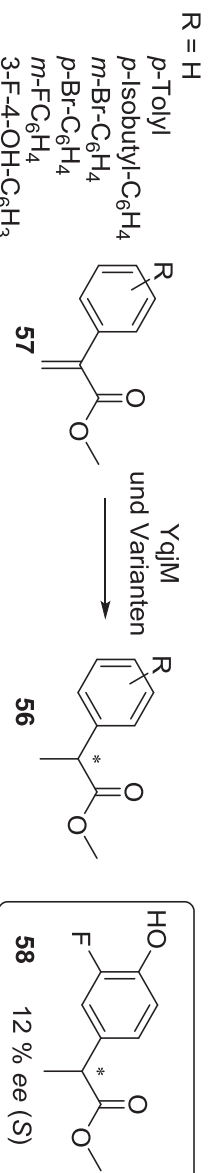
#	<i>R</i> ²	OYE 1	NCR _{ZM}	YqjIM	Xen A
		<i>ee</i> [%]	<i>ee</i> [%]	<i>ee</i> [%]	<i>ee</i> [%]
1	Me	97 (<i>R</i>)	77 (<i>R</i>)	24 (<i>R</i>)	47 (<i>S</i>)
2	Allyl	-	97 (<i>S</i>)	64 (<i>S</i>)	91 (<i>S</i>)
3	Propyl	-	96 (<i>S</i>)	62 (<i>S</i>)	92 (<i>S</i>)
4	Benzyl	87 (<i>S</i>)	93 (<i>S</i>)	71 (<i>S</i>)	85 (<i>S</i>)

Es wurden zwei Varianten 2-substituierter 2-Cyclopentenone **52** (R = Me, Bn) und vier Substratvarianten 2-substituierter 2-Cyclohexenone **53** (R = Me, Allyl, Propyl, Benzyl) in Kombination mit elf verschiedenen OYEs getestet, darunter unter anderem OYE 1–3, OPR 1 und 3, NCR_{ZM}, Xen A sowie YqJM. Dabei konnten mit fast allen Enreduktasen beide Enantiomere der substituierten Cyclohexanone **54** erreicht werden. Nur Xen A und OPR 1 zeigten für alle Substratvarianten (S)-Selektivität. Eine besonders ausgeprägte Selektivitätsänderung wurde für OYE 1 gefunden. Es ergab für das Methyl-substituierte Substrat **53** einen Enantiomerenüberschuss von 97% (R) und bei Benzyl-Substitution stattdessen 87% ee (S). NCR_{ZM} ergibt bei Methylsubstitution nur 77% ee (R)-, für die Cyclohexenone **53** mit den drei anderen Substituenten jedoch gute (S)-Selektivität (93–97% ee). Die Nutzung von YqJM führt ebenfalls zu einer Änderung des bevorzugten Produkts von (R)-**54** (R = Me) zu (S)-**54** (R = Allyl, Propyl, Benzyl), jedoch maximal moderate Selektivitäten von 24% ee (R) und 62–71% ee (S). Die Bioreduktion des Methyl- oder Benzylsubstituierten 2-Cyclopentenons **52** liefert unabhängig vom Substituenten und dem genutzten OYE (S)-konfigurierte Produkte **55**.^[68] Auch diese Methode zur Durchführung stereokomplementärer OYE-katalysierter Reduktionen ist also auf bestimmte Substrate beschränkt.

Insgesamt sind also viele verschiedene Methoden bekannt, mittels derer komplementäre Enreduktase-katalysierte Reaktion realisiert werden können. Welche jeweils zum Ziel führt, ist jedoch meist nicht vorhersehbar. Einzig die Veränderung von Enzymen durch gerichtete Evolution ist relativ universell anwendbar. Dabei werden durch gezielte oder willkürliche Mutagenese und anschließende Expression eine große Anzahl veränderter Proteine erhalten, die dann in Hochdurchsatzscreenings auf ihre Selektivität getestet werden. Die jeweils besten Varianten werden als Grundlage für folgende Mutageneserunden verwendet und somit wird das Protein nach und nach auf die gewünschte Selektivität hin optimiert. Dieses Vorgehen bedeutet jedoch trotz vieler Weiterentwicklungen immer noch einen enormen Mutagenese- und Screeningaufwand.^[69] Eine Vorhersage der Stereoselektivität von Enreduktasen ist zudem ebenfalls nicht möglich. Die jeweiligen strukturellen Gründe für die komplementäre Selektivität von Enreduktase-katalysierten Reduktionen sind sehr verschieden und müssen entsprechend für jede Enzym-Substrat-Kombination individuell analysiert werden.^[58a]

6.2.2 Vorarbeiten zur Beeinflussung der Stereoselektivität von YqJM

In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits einige Vorarbeiten zu Synthesen mittels der Enreduktase YqJM geleistet. So wurde die Anzucht des entsprechenden *E. coli*-Stammes und die Aufreinigung von YqJM über Ni-NTA in der Dissertation von T. Classen etabliert.^[53] In der Dissertation von M. Schölzel gelang die präparative Synthese von Profen-Derivaten **56** aus den entsprechenden α -Aryl-substituierten Acrylsäuremethylestern **57** mittels des aufgereinigten Enzyms YqJM (Schema 14).



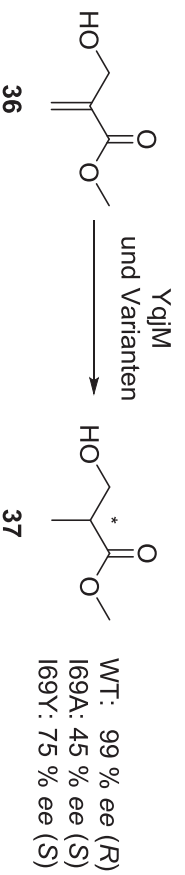
Schema 14: Biokatalytische Synthese von Profenen **56** mittels des Enzyms YqJM und dessen Varianten.^[70]

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit bereits eine Reihe von YqjM-Varianten erstellt und ihr Einfluss auf die Stereoselektivität bezüglich der Synthese verschiedener Aryl-substituierter Profene **56** getestet.^[70] Die vor Beginn dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen YqjM-Varianten sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Acht Einzelmutationen an fünf Aminosäure-Positionen und eine Doppelmutation waren bereits hinsichtlich ihres Einflusses auf die Stereoselektivität bei Umsetzungen zu Profenen getestet worden und zeigten wenig bis keinen Einfluss auf die erhaltenen Enantiomerenüberschüsse. Einzig der Austausch der protischen Aminosäure Y169 führte zu stark veränderter Selektivität mit einer maximalen *ent*-WT-(*S*)-Selektivität von 12 % *ee* bei Synthese des 2-(3-Fluoro-4-hydroxyphenyl)-propan säuremethylesters (**58**). Diese Enzym-Varianten (Y169A/F) sollten zeigen, ob der Aminosäurerest Y169 wirklich an der stereoselektiven Protonierung des α -C-Atoms im aktiven Zentrum von YqjM beteiligt ist. Die Tendenz zu geringerer Selektivität in den Umsetzungen bestätigt diese Theorie.

Tabelle 3: Überblick über Varianten von YqjM, die vor Beginn dieser Arbeit in unserer Arbeitsgruppe vorhanden waren, und die dabei erhaltene Stereoselektivität bzgl. der biokatalytischen Synthese von Profenen **56**.^[70]

#	YqjM-Variante	<i>ee</i> [%]
1	Wildtyp (Referenz)	>99 (<i>R</i>)
2	A60H	>99 (<i>R</i>)
3	A60H/H167A	k.U.
4	C26G ^[63]	>99 (<i>R</i>)
5	I69A ^[63]	>99 (<i>R</i>)
6	I69Y ^[63]	>99 (<i>R</i>)
7	Y28F	>99 (<i>R</i>)
8	Y28A	>99 (<i>R</i>)
9	Y169F	>99 (<i>R</i>)-12 (<i>S</i>)
10	Y169A	>99 (<i>R</i>)-72 (<i>R</i>)

Die Bio-reduktion einer leicht abgewandelten Form dieser Substrate zeigte jedoch stärkere Selektivitätsänderungen. Bei Umsetzung von 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäuremethylester (**36**) mit den YqjM-Varianten I69A bzw. I69Y wurde Produkt **37** mit bis zu 75 % *ee ent*-Wildtyp-(*S*)-Selektivität erhalten (**Schema 15**). Die Profen-Derivate **56**, die statt des in **37** enthaltenen α -Hydroxymethylensubstituenten Aryl-Substituenten enthalten, zeigten bei Synthese mittels dieser YqjM-Varianten keine veränderten Enantiomerenüberschüsse.



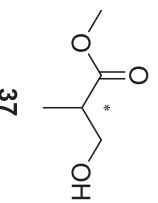
Schema 15: Kombinationen von Substrat und YqJM-Varianten, die laut den Vorarbeiten die größten Selektivitätsänderungen in der YqJM-katalysierten Bioreduktion von Acrylester **36** hervorrufen.

6.3 Chirale Synthesebausteine

Eine Möglichkeit, um komplexe enantiomerenreine Substanzen zu erhalten, ist die Synthese unter Nutzung chiraler Synthesebausteine. Diese enthalten eines oder mehrere stabile Stereozentren und sollten möglichst vielseitig funktionalisierbar sein. Viele solcher Synthesebausteine natürlichen Ursprungs, wie die Aminosäuren Threonin und Serin, Glycerinaldehyd, Apfelsäure oder Weinsäure enthalten lineare Kohlenstoffketten. Um chirale Substanzen mit tertiären oder quartären Kohlenstoffzentren zu erhalten, werden synthetische chirale Synthesebausteine mit verzweigten Kohlenstoffketten genutzt.^[71] Zwei solche Bausteine mit zentralem C₄- bzw. C₅-Baustein werden im Folgenden vorgestellt.

6.3.1 Roche-Ester

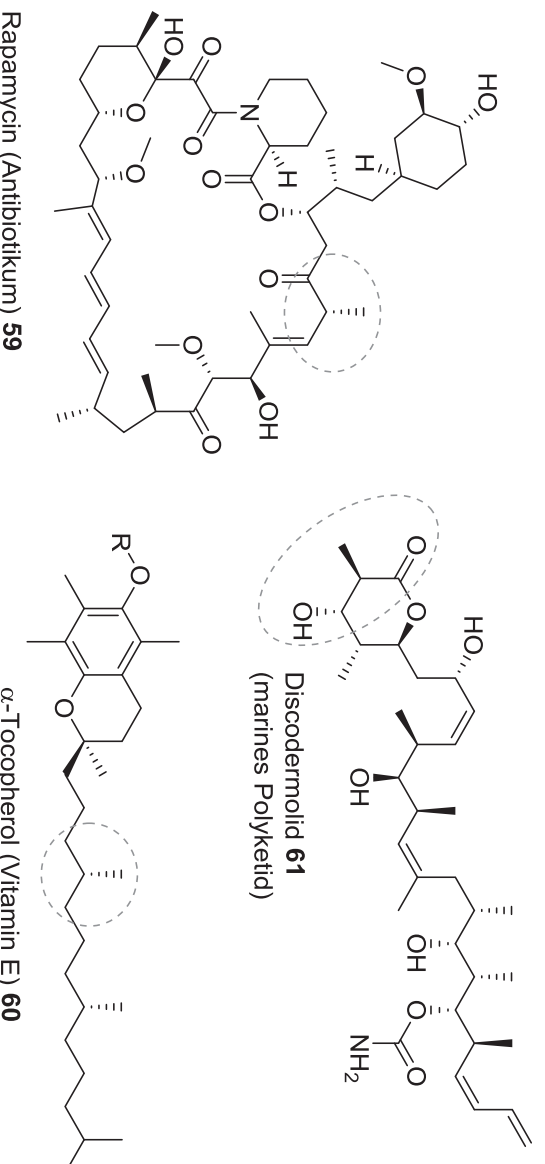
3-Hydroxy-2-methylpropionsäuremethylester (**37**, **Schema 16**) ist einer der meist genutzten chiralen Synthesebausteine in der Totalsynthese diverser Naturstoffe.^[71] Er besteht aus einem zentralen C₄-Baustein flankiert von zwei Oxyfunktionen in verschiedenen Oxidationsstufen, einem Ester, sowie einem primären Alkohol.



37

Schema 16: Struktur des Roche-Esters (**37**).

Ein Methylsubstituent generiert ein Stereozentrum in α -Stellung zur Esterfunktion. Dieses hat eine hohe Stabilität und da zusätzlich die beiden Oxyfunktionen synthetisch leicht unterschiedlich funktionalisierbar sind, wurde dieser sogenannte *Roche-Ester* (**37**) in unzähligen Synthesen stereogener Verbindungen eingesetzt, darunter unter anderem in der Synthese des Antibiotikums Rapamycin (**59**), Vitamin E (α -Tocopherol, **60**) und des bioaktiven marinen Polyketids Discodermolid (**61**, **Schema 17**).^[72]



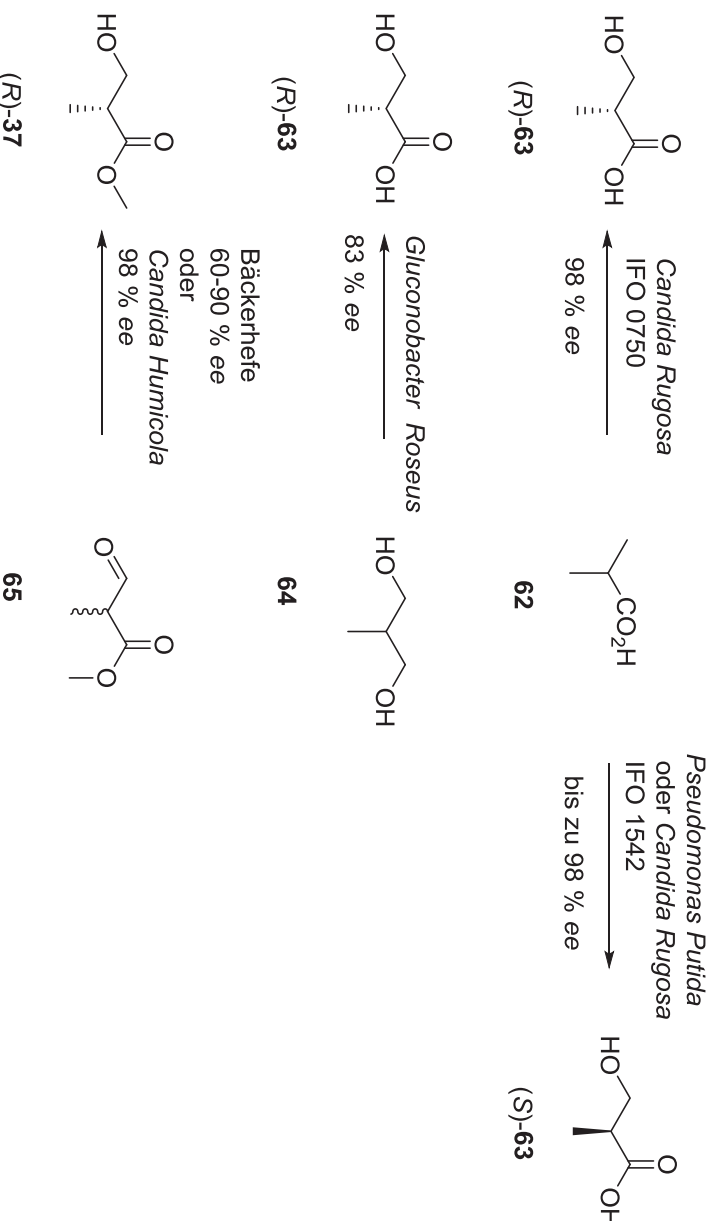
Rapamycin (Antibiotikum) **59**

α -Tocopherol (Vitamin E) **60**

Discodermolid **61**
(marines Polyketid)

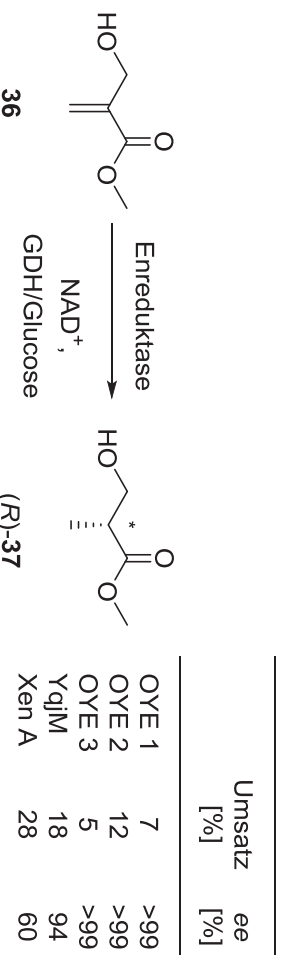
Schema 17: Zielmoleküle literaturbekannter Roche-Ester (**37**)-basierter Totalsynthesen.

Beide Enantiomere sind zu ähnlichen Preisen kommerziell erhältlich. Sie werden industriell auf mikrobiellem Weg durch β -Hydroxylierung von Isobuttersäure (**62**) und anschließender Veresterung hergestellt. Das mikrobielle Produkt, die enantiomerenreine 3-Hydroxy-2-methylpropionäure (**63**), wird zur Erhöhung der Stabilität verestert. 1981 wurden von Hasegawa *et al.* zwei verschiedene Varianten des Bakteriums *Candida Rugosa* entwickelt, durch die beide Enantiomere zugänglich sind.^[73] Das (S)-Enantiomer kann zusätzlich mittels *Pseudomonas Putida* erhalten werden (**Schema 18**).^[71, 74]



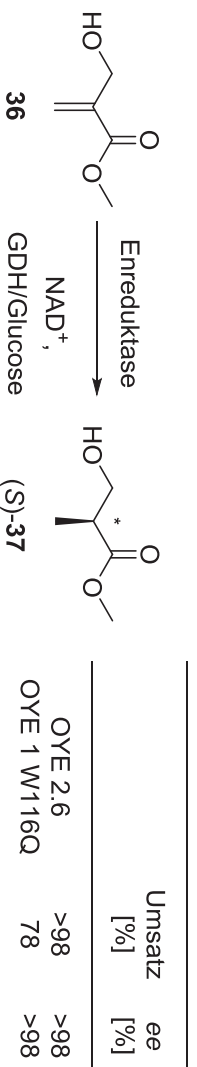
Schema 18: Mögliche mikrobielle Herstellungsprozesse des (R)- und (S)-Roche-Esters (**37**) bzw. der entsprechenden Säure **63**, die im Anschluss zur Stabilisierung verestert wird.^[71]

Andere bekannte Möglichkeiten zur mikrobiellen Synthese des (R)-Roche-Esters sind die Oxidation von 2-Methyl-1,3-propanediol (**64**) mittels *Gluconobacter Roseus* und die reduktive Racematspaltung des Aldehyds **65** mittels Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) oder *Candida Humicola*. Zusätzlich konnten Stuecker *et al.* 2010 im analytischen Maßstab zeigen, dass der (R)-Roche-Ester [(R)-**37**] via Enreduktase-katalysierter Reduktion aus der *exo*-Methylen-Verbindung **36** erhalten werden kann.^[60] Wie schon in **Schema 10** gezeigt, ist hier sowohl das (R)- als auch das (S)-Stereozentrum zugänglich. Die (R)-selektive Reaktion wird von fünf verschiedenen Wildtyp-Enzymen katalysiert und führt zu Produkt mit 60–99 % ee bei 5–28 % Umsatz (**Schema 19**).



Schema 19: Reaktionsschema der Enreduktase-katalysierten Bioerduktion zum (R)-Roche-Ester [(R)-**37**].^[60]

Der (*S*)-*Roche*-Ester (**37**) konnte von Walton *et al.* 2011 mittels OYE 2.6 oder OYE 1 W116Q in Enantiomerenüberschüssen von >98 % und >98 % Umsatz erhalten werden (**Schema 20**).^[62] Isolierte Ausbeuten wurden auf diesem Syntheseweg bisher nicht beschrieben.

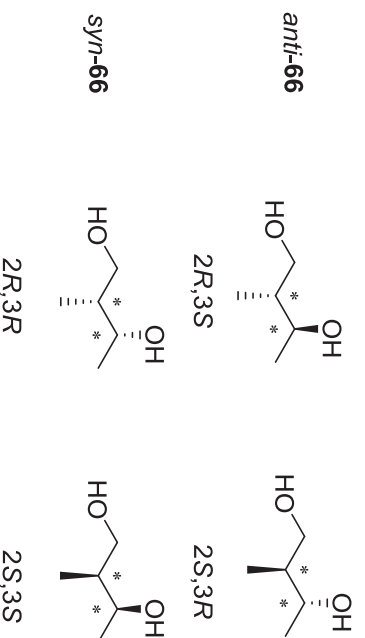


Schema 20: Reaktionsschema der Eneduktase-katalysierten Bioreduktion zum (*S*)-*Roche*-Ester [(*S*)-**37**].^[62]

Klassische chemische Synthesen des *Roche*-Esters sind zum Beispiel die enantioselektive Aldol-Addition eines Propionsäureesters mit Formaldehyd mittels chiraler Auxiliare^[75] oder die Übergangsmetall-katalysierte Reduktion von Acrylsäureestern analog zu *Roche*-Ester-Vorläufer **36** mittels Rhodium- oder Ruthenium-Komplexen. Durch Übergangsmetall-katalysierte Hydrierung können beide Enantiomere in guten bis sehr guten Selektivitäten im 5-g-Maßstab erhalten werden: das Katalysatorsystem Ru-Synphos ergibt das *t*-Butyl-Ester-Derivat des *Roche*-Esters in bis zu 94 % *ee* (*R*) oder (*S*) und 98 % Ausbeute bei 20 °C und 5 bar H₂-Druck;^[76] Rh-Indolphos ergibt den *Roche*-Ester (**37**) bei –40 °C und 20 bar H₂-Druck mit bis zu 98 % *ee* (*S*) und 87 % Ausbeute.^[77] Für einen tabellarischen Überblick zur Vielfalt der möglichen Reaktionen auf Grundlage des *Roche*-Esters sei auf den Übersichtsartikel von Banfi *et al.* verwiesen.^[71]

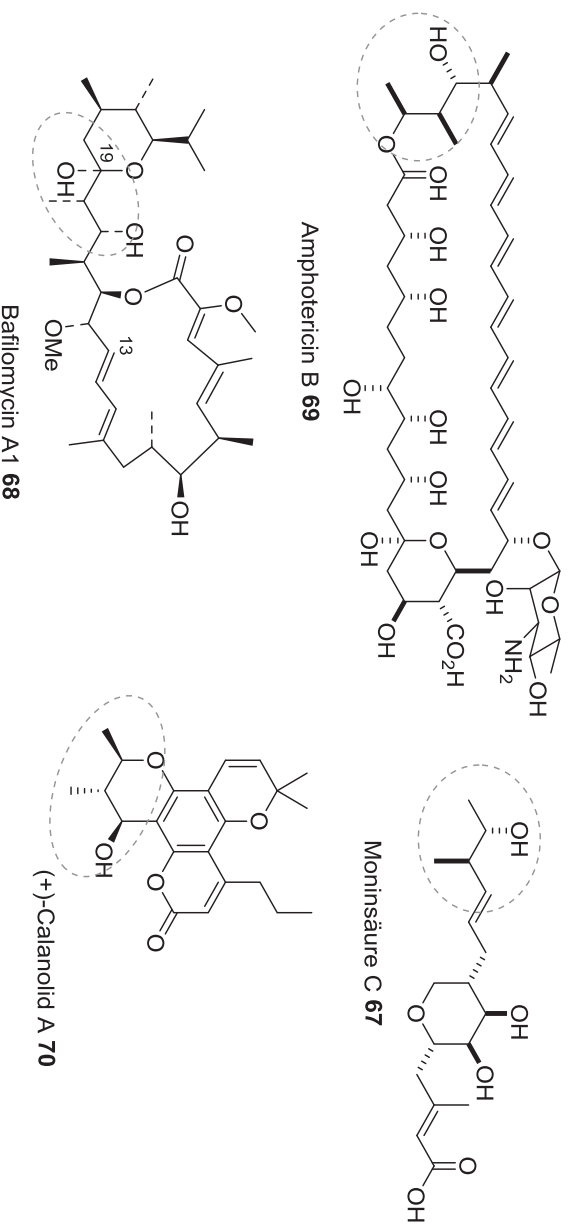
6.3.2 2-Methylbutan-1,3-diol

Ein weiterer viel genutzter, chiraler Synthesebaustein ist der in **Schema 21** gezeigte C₅-Baustein 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**). Dieser enthält zwei Stereozentren und bildet somit vier verschiedene Stereoisomere. Außerdem enthält er wiederum zwei synthetisch differenzierbare Oxyfunktionen. Die Unterscheidbarkeit ist in diesem Fall auf die unterschiedlichen sterischen und elektronischen Eigenschaften von primären und sekundären Alkoholen zurückzuführen.



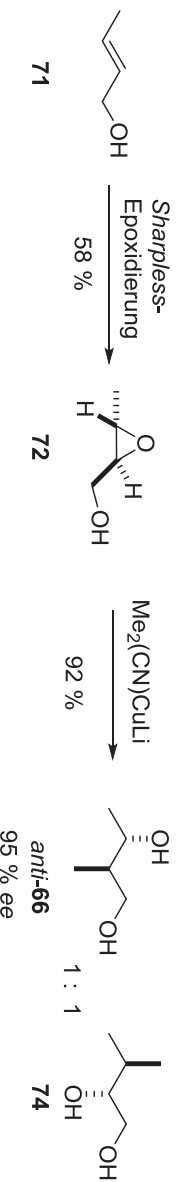
Schema 21: 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) in seinen vier stereoisomeren Formen.

Auch dieser Baustein ist in Totalsynthesen vieler chiraler Natur- und Wirkstoffe zu finden. So konnten zum Beispiel die Antibiotikavorstufe Moninsäure C (**67**), das Macrolid-Antibiotikum Bafilomycin A1 (**68**), der antifungale Wirkstoff Amphotericin B (**69**) sowie der HIV-Wirkstoff (+)-Calanolid A (**70**) unter Verwendung von **66** hergestellt werden (**Schema 22**).^[78]



Schema 22: Chirale Substanzen, deren Totalsynthese auf Grundlage des Diols **66** durchgeführt wurde, inklusive Markierung des jeweils aus **66** stammenden Molekülbereichs.^[79]

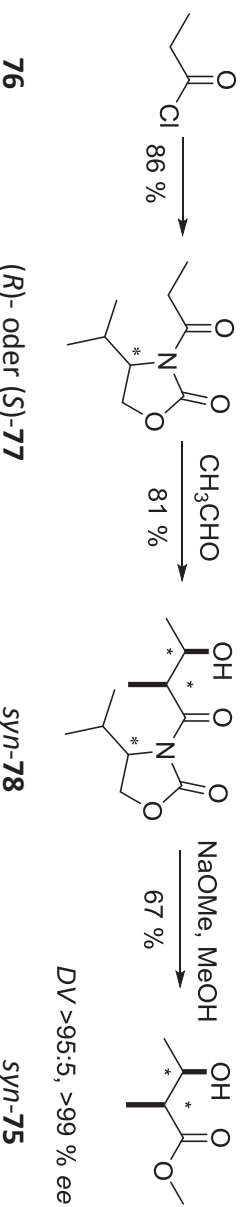
Kommerziell ist Diol **66** nicht erhältlich. Gängige Synthesen werden im Folgenden an einigen Beispielen näher erläutert. Schon 1988 berichteten White *et al.* über einen Syntheseweg zur Moninsäure C (**67**), der als Zwischenstufe das *anti*-2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) enthält.^[78a] Moninsäure C (**67**) ist ein Synthesevorläufer der Pseudomoninsäuren A und C (Bestandteile des Medikaments Mupirocin), die beide antimikrobielle Wirkung gegen grampositive Bakterien [inkl. des in Krankenhäusern verbreiteten Bakteriums *Multiresistenter Staphylococcus Aureus* (MRSA)] sowie Wirkung gegen Mykoplasma-Pathogene zeigen. Mupirocin steht auf der Liste der essentiellen Medikamente der Weltgesundheitsorganisation (WHO).^[80] Die Pseudomoninsäuren wirken als selektive, kompetitive Inhibitoren der Isoleucyl-tRNA-Synthetase von Bakterien.^[81] Das Diol **66** wurde hier zweistufig, ausgehend von (*E*)-2-Buten-1-ol (**71**) erhalten (**Schema 23**).



Schema 23: Synthetischer Zugang zu den Diolen *anti*-**66** und **74** nach White *et al.* Die Mischung ist erst in späteren Syntheseschritten trennbar.^[78a]

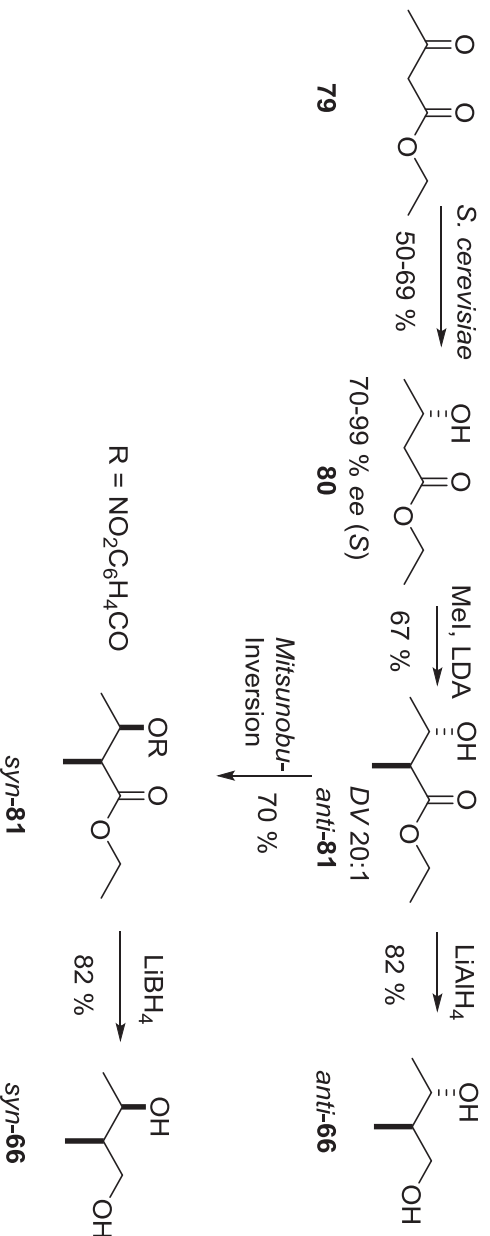
Im ersten Schritt erfolgte eine *Sharpless*-Epoxidierung zu **72** und anschließend die nukleophile Ringöffnung mittels eines Cyanocuprates.^[78a] Der zweite Schritt verläuft dabei diastereoselektiv zum *anti*-Produkt **73**, allerdings ohne Regioselektivität. Es entstehen zwei Konstitutionsisomere, die chromatographisch nicht trennbar sind: das angestrebte 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) und 3-Methylbutan-1,2-diol (**74**). Das *syn*-Diol **66** kann auf diese Weise nicht erhalten werden.

Eine Strategie, wie das *syn*-Diol **66** hergestellt werden kann, ist die Evans-Aldol-Reaktion.^[82] M. Ogan beschreibt in ihrer Bachelorarbeit die dreistufige Synthese von 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethyl ester (**75**) nach Cozzi, Helmboldt und Trotter.^[83] Diese Synthese geht von Propan säurechlorid (**76**) aus, das nach Umwandlung in das jeweilige chirale *Evans*-Addukt (*R*- oder (*S*)-**77** per Aldolreaktion jeweils zum *syn*-Enantiomer von **78** umgesetzt werden kann. Durch Veresterung mit Natrium-Methanolat entsteht der *syn*-3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethyl ester (**75**). Die Ausbeute über drei Stufen beträgt 46 %. Alternativ kann die Abspaltung des Auxiliars reduktiv mittels LiBH_4 durchgeführt werden, sodass statt des Esters in drei Stufen das 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) erhalten wird.^[79]



Schema 24: Evans-Aldol-Synthese von *syn*-**75** nach der Bachelorarbeit von Melanie Ogan.^[84]

Ein anderer dreistufiger Zugang zu 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) geht von Ethylacetacetat (**79**) aus (Schema 25). Zuerst wird die Ketogruppe von Ethylacetacetat (**79**) enzymatisch mittels Bäckerhefe enantioselektiv zu (*S*)-3-Hydroxybutansäuremethyl ester (**80**) reduziert.^[85] Das (*R*)-Enantiomer von **80** ist z.B. durch Depolymerisierung von Poly- β -hydroxybuttersäure mit >99 % *ee* zugänglich.^[86] Anschließend diastereoselektive *Frater-Seebach*-Alkylierung (20:1, *anti* zu *syn*) und Reduktion des erhaltenen Esters **81** ergibt das Diol *anti*-**66** in 38 % Ausbeute über drei Stufen.^[79, 87]

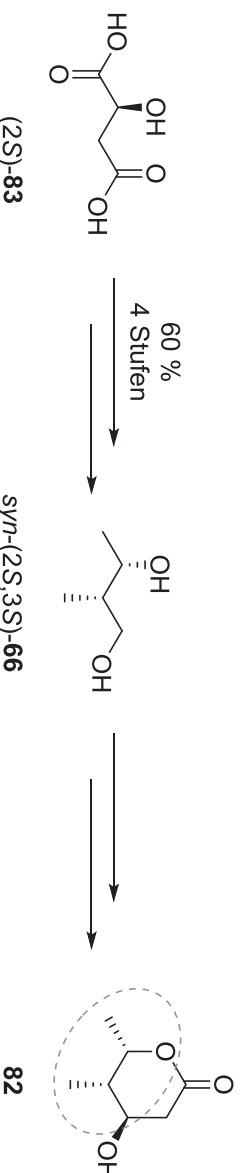


Schema 25: Syntheseweg zu *syn*- und *anti*-2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) in 38 % bzw. 27 % Gesamtausbeute.

Diese Methode birgt zudem die Möglichkeit, vor dem letzten Reduktionsschritt den sekundären Alkohol zu schützen und so die Differenzierung zwischen den beiden Hydroxy-Funktionen zu erleichtern. Um nach dieser Methode das *syn*-Diol **66** zu erhalten, kann durch *Mitsunobu*-Inversion die Konfiguration des Hydroxyl-Stereozentrums von **81** umgekehrt

werden. Nach anschließender Reduktion mit LiBH_4 wird das Diol *syn*-**66** in 27 % Ausbeute über vier Schritte erhalten.^[79, 87]

Ein weiterer Zugang zum Diol **66** wurde im Zusammenhang mit δ -Lactonstrukturen **82** als Vorstufe für Macrolid-Naturstoffe von Chandrasekar *et al.* vorgestellt (**Schema 26**).^[88] Dort wird das (2*S*,3*S*)-Diol **66** vierstufig aus (2*S*)-Hydroxybernsteinsäure (**83**) hergestellt (Gesamtausbeute 60 %). Veresterung, diastereoselektive α -Methylierung, Tosylierung und Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid führten so schließlich zum gewünschten Diol **66**. Da im letzten Schritt eine Inversion des Stereozentrums erfolgt, ist das Diol **66** als *syn*-(2*S*,3*S*)-Diastereomer zugänglich. Das ursprünglich eingesetzte Stereozentrum wurde umgekehrt. Ein Nachteil solcher *ex chiral-pool* Synthesen ist, dass meist nur das natürlich vorkommende Startmaterial kostengünstig erhältlich ist. In diesem Fall ist das verwendete Startmaterial mit L(-)-Konfiguration (**83**) etwa 4x günstiger als das andere Enantiomer (100 g, 40 USD Alfa Aesar, bzw. 176 USD, Combiblocks).^[89]



Schema 26: Herangehensweise von Chandrasekar *et al.* zur Synthese des trisubstituierten δ -Lactons **82** aus 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**).

In einem Patent aus dem Jahr 2000 wurde ein solches δ -Lacton aus dem *anti*-Diol **66** aufgebaut und diente dann als Vorstufe zur Herstellung von (+)-Calanolid A (**70**, **Schema 22**). Calanolid A ist ein Naturstoff aus dem malaysischen Baum *Calophyllum lanigerum* und wurde von den *National Institutes of Health* (NIH) als Reverse Transkriptase-Inhibitor des HIV-1 Virus sowie verschiedener Medikamenten-resistenter Varianten (G9106 und A17) eingestuft. Es gilt somit als potenzieller neuer Wirkstoff gegen HIV-1.^[78d]

7. Eigene Ergebnisse

7.1 Methoden und Optimierungen zur Arbeit mit dem Enzym YqjM

Zentrales Enzym aller in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist die Enreduktase YqjM, für die, wie im Kenntnisstand dargestellt, auch schon Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. So konnten das Plasmid mit N-terminalem Histidin-Tag aktiv exprimiert und Expressionsbedingungen etabliert werden. Die dabei erreichte Proteinausbeute lag bei bis zu 161 mg pro Liter Fermentation. Außerdem wurde die Enzymreinigung von YqjM mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA Agarose-Säulen (IMAC) und eine Methode zur Steigerung des FMN-Gehalts im aktiven Zentrum etabliert. Diese Verfahren wurden in dieser Arbeit zunächst, wie bereits beschrieben, übernommen. Im Laufe der Arbeit wurden einige weitere Optimierungen zur Isolierung und Aufbereitung von YqjM vorgenommen. Diese wurden teils im Zusammenhang mit den anderen beiden Themenblöcken begonnen, haben aber für alle Arbeiten mit YqjM in dieser Arbeit Bedeutung und werden daher vorangestellt.

7.1.1 Etablierung eines modifizierten Aktivitätstests für Enreduktasen

Zur einfachen und schnellen Messung der Aktivität von Enreduktasen wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits ein photometrischer Aktivitätstest – im Folgenden Aktivitätstest 1 genannt – etabliert, der im Experimentaltteil (**Kapitel 9.2.6.1**) näher erläutert wird. Dieser ist bei hoher spezifischer Aktivität des Enzyms (ab ca. 1 U/mg) gut nutzbar. In dieser Arbeit wurden jedoch häufig Aktivitäts-Messungen von weniger aktiven Enzym-Substrat-Kombinationen benötigt. Daher wurde die Etablierung eines optimierten Assays angestrebt (Aktivitätstest 2). Dieser beruht, wie auch Aktivitätstest 1, auf der Messung des Verbrauchs von NADPH im Assay anhand der Absorption bei 340 nm. Testreaktion ist weiterhin die Reduktion von Cyclohexanon.

Im Unterschied zu bisher soll der NADPH-Verbrauch von Enreduktasen bei fehlender Substratzugabe – die sogenannte Hintergrundaktivität – genauer analysiert und ein modifizierter Aktivitätstest mit unterdrücktem Hintergrund etabliert werden. Hierfür wurden zuerst einige Überlegungen zu möglichen Ursprüngen der Hintergrundaktivität angestellt. Folgende grundsätzlich möglichen Erklärungen wurden in Betracht gezogen:

- 1) In der Enzymlösung liegt ungebundenes FMN vor, das unabhängig vom Enzym durch NADPH reduziert werden kann.
- 2) Der Hintergrund entspricht der Gesamtstoffmenge an Enzym, das einmalig durch NADPH reduziert werden muss, bevor eine substratabhängige Reaktion beginnt.
- 3) Das FMN im aktiven Zentrum von YqjM kann auch substratunabhängig durch Luftsauerstoff reoxidiert werden und verbraucht so entkoppelt von der Substratumsatzung NADPH.^[18]

Ersteres konnte durch einen Aktivitätstest mit FMN-Lösung statt Enzymlösung ausgeschlossen werden. Dieser zeigte keinerlei NADPH-Verbrauch an. Ungebunden vorliegendes FMN stört den Aktivitätstest also nicht. Um zu evaluieren, ob der Hintergrundumsatz auf einmalige Reduktion der Gesamtstoffmenge des zugegebenen Enzyms zurückzuführen ist, wurde exemplarisch ein Aktivitätstest samt Hintergrundmessung und Enzymkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Der Hintergrundumsatz war dabei mit

0.66 $\mu\text{mol/ml}$ sehr viel höher als die im gleichen Volumen enthaltene Menge YqjIM von 0.05 μmol . Eine Erklärung der gesamten Hintergrundaktivität ist auf diese Weise also nicht möglich. Um nun die dritte Erklärung näher zu betrachten, wurde zunächst der Aktivitätstest einer Probe YqjIM vergleichend mit entgastem und nicht entgastem KP_i -Puffer ausgeführt (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Vergleichende Bestimmung der Volumenaktivität einer Probe YqjIM -WT nach Aktivitätstest 1 mit entgastem sowie nicht entgastem KP_i -Puffer.

#	Aktivität mit nicht entgastem KP_i [U/ml]	Aktivität mit entgastem KP_i [U/ml]
1	Aktivitätstest 1 10.4 \pm 0.9	9.5 \pm 1.0
2	Hintergrund 3.2 \pm 0.3	2.2 \pm 1.6
3	korrigierter Wert 7.2 \pm 1.2	7.33 \pm 2.2
4	Anteil Hintergrund* 31 %	23 %

*Anteil der Hintergrundaktivität am Messwert nach Aktivitätstest 1.

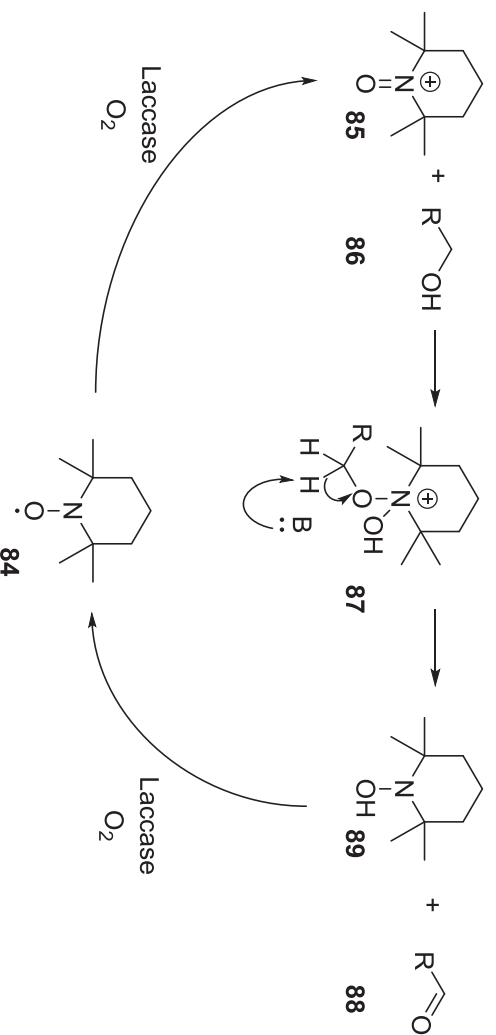
Wie erwartet sank der Anteil der Hintergrundmessung an der Gesamtmessung bei Nutzung entgastem Puffers; allerdings nur in geringem Ausmaß von 31 % auf 23 % (Zeile 4). Dies deutet auf einen Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Hintergrundaktivität hin. Der Hintergrund lässt sich jedoch nicht eliminieren und auch die Reproduzierbarkeit wird nicht besser. Stattdessen wird die Schwankungsbreite bei Messungen mit entgastem Puffer sogar bedeutend größer, weswegen diese Tests teils 6-fach durchgeführt wurden. Die größere Schwankungsbreite könnte mit dem größeren Einfluss des Pipettier- und Mischvorgangs auf die Messung zusammen hängen, da unterschiedlich viel Sauerstoff in die entgaste Lösung eingebracht wird. Die erhaltenen Mittelwerte von Messungen mit entgastem und nicht entgastem Puffer sind im Rahmen der Fehlerbereiche vereinbar.

Ein Einfluss des Sauerstoffgehalts auf die Hintergrundaktivität ist also wahrscheinlich, der Erfolg der Messung mit entgastem Puffern war aber sehr begrenzt. Daher wurde nach einer zuverlässigeren Methode gesucht, den Sauerstoffgehalt innerhalb des Aktivitätstests zu verringern. Dazu sollte ein enzymatisches Sauerstoff verbrauchendes System eingeführt werden. Dafür erschienen zwei verschiedene Oxidase-basierte Systeme denkbar.

- 1) Oxidation eines Alkohols mittels Laccase (EC 1.10.3.3) und 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO, **84**)
- 2) Oxidation von Glukose (**22**) durch Glukose-Oxidase (EC 1.1.3.4)

Da Laccasen in unserem Labor vorhanden waren, wurde zuerst die Möglichkeit überprüft, mit Laccase ein Sauerstoff verbrauchendes System zu etablieren. Dabei wurde die in **Schema 27** gezeigte TEMPO-vermittelte Alkohol-Oxidation angestrebt. Eigentliches Oxidationsmittel ist das Oxoniumkation **85**, das Laccase-katalysiert aus dem eingesetzten stabilisierten Radikal TEMPO (**84**) entsteht. Durch nukleophilen Angriff des Alkohols **86** am positiv geladenen Stickstoffatom des Oxoniumkations **85** entsteht das Intermediat **87**, und durch basenvermittelte Abspaltung des oxidierten Produkts **88** wird das Oxidationsmittel

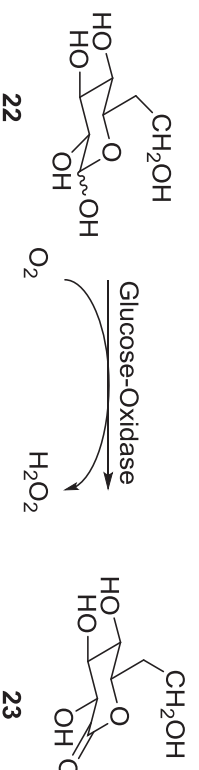
schließlich zum Hydroxylamin **89** reduziert. Dieses wird Laccase-katalysiert unter Reduktion von Sauerstoff zu Wasser wieder zu TEMPO (**84**) reoxidiert.^[90]



Schema 27: Möglicher Mechanismus der TEMPO-vermittelten Oxidation von Alkoholen mittels Laccase.^[90]

Da die sehr aktiven aromatischen Alkohole durch ihre mögliche inhibierende Wirkung auf Enreduktasen ungünstig erschienen, wurde der aliphatische Alkohol Ethanol als Substrat des Sauerstoff-verbrauchenden Systems getestet. Das Vorgehen wird in **Tabelle 36** im Experimentaltitel beschrieben. Es wurde die Laccase aus *Agaricus bisporus* verwendet und die Substrat- und Laccasemenge im Vergleich zu Fabbri *et al.* verdoppelt. Es wurde jedoch keinerlei Verminderung des Hintergrundes beobachtet. Ein Screening von anderen Alkoholen als Substrate der TEMPO-vermittelten Oxidation wurde zu Gunsten eines Tests der zweiten Oxidase nicht durchgeführt.

Die dabei verwendete Reaktion, die Glukose-Oxidase katalysierte Oxidation von Glukose (**22**) zu Gluconolacton (**23**) und Wasserstoffperoxid, ist in **Schema 28** dargestellt.



Schema 28: Sauerstoff-verbrauchendes System aus Glukose-Oxidase und Glukose.

Bei dieser kann das native Substrat der Glukose-Oxidase Glukose (**22**) verwendet werden, da es auch in hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Aktivität von Enreduktasen zeigt. Die Nutzung des nativen Substrats ist von Vorteil, da das genutzte Enzym somit optimale katalytische Effizienz zeigt. In der Literatur wurden Beispiele solcher Tests mit Glukose-Oxidase als Sauerstoff verbrauchendem System gefunden.^[25a, 63] Zur besseren Vergleichbarkeit mit Aktivitätstest 1 wurde dieser abgewandelt. Statt TRIS-Puffer pH 7 wurde weiterhin KP_i pH 6.5 genutzt und auch Substrat- und NADPH-Konzentration wurden aus Aktivitätstest 1 beibehalten. Glukose wurde in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt und von der Glukoseoxidase wurden nach Optimierung 20 U/mL Assay eingesetzt. Schließlich wurde so das in **Tabelle 37** im Experimentaltitel beschriebene Protokoll etabliert und im Vergleich mit Aktivitätstest 1 getestet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5** dargestellt. Es

wird ersichtlich, dass der Hintergrund von 31 % bis auf 1 % der gemessenen Gesamtktivität gesenkt werden kann. Der Anteil des Hintergrundes an der Gesamtmessung bei Messung ohne Sauerstoff-verbrauchendes System liegt ähnlich wie bei der anfänglichen Messung bei 31 % (**Tabelle 4**). Das Ziel, den Hintergrund zu unterdrücken, konnte also erreicht werden. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit nun mit einer Standardabweichung von ± 0.24 (ca. 4 % des Messwertes) stark verbessert. Der Aktivitätstest 1 zeigt bei Messung mit der gleichen Probe YqjM eine Standardabweichung von ± 0.64 U/ml (11 %). Diese Verbesserung ist dadurch zu erklären, dass kleine Änderungen in der Durchführung, die Einfluss auf die Sauerstoffkonzentration in Lösung haben (z.B. Pipetieren, Durchmischung der Lösungen), nun nicht mehr zu veränderten Messwerten führen. Sie werden durch das Sauerstoff-verbrauchende System überkompensiert. Somit wurde auch die Genauigkeit der Messung stark gesteigert. Die erhaltenen korrigierten Aktivitätswerte der zwei verschiedenen Aktivitätstests sind jedoch nicht vereinbar. Ohne Glukose-Oxidase wurde eine korrigierte Aktivität von 3.95 ± 0.64 U/ml erhalten, bei Messung mit dem neuen Aktivitätstest ein höherer Wert von 5.54 ± 0.23 U/ml.

Tabelle 5: Vergleich der Aktivitätsmessungen mit und ohne Glukoseoxidase anhand derselben Probe YqjM Wildtyp.

#	Aktivität (Aktivitätstest 1) [U/ml]	Aktivität (Aktivitätstest 2) [U/ml]
1	gemessene Aktivität 5.75 ± 0.64	5.6 ± 0.24
2	Hintergrundmessung 1.8	0.062 ± 0.01
3	korrigierter Wert 3.95 ± 0.64	5.54 ± 0.23
4	Anteil Hintergrund* [%] 31	1

*Anteil des Hintergrundes an der gemessenen Aktivität.

Um diese Abweichungen noch einmal genauer zu untersuchen, wurde vergleichend die gleiche Michaelis-Menten-Kinetik sowohl mittels des Aktivitätstests 1 (mit entgastem Puffer) als auch mittels des neu etablierten Tests (Aktivitätstest 2) gemessen. Als Testreaktion diente wiederum die Umsetzung von Cyclohexanon (**15**) zu Cyclohexanon (**16**, **Schema 55**), katalysiert von YqjM.WT. Die resultierenden Kurven sind in **Abbildung 5** dargestellt.

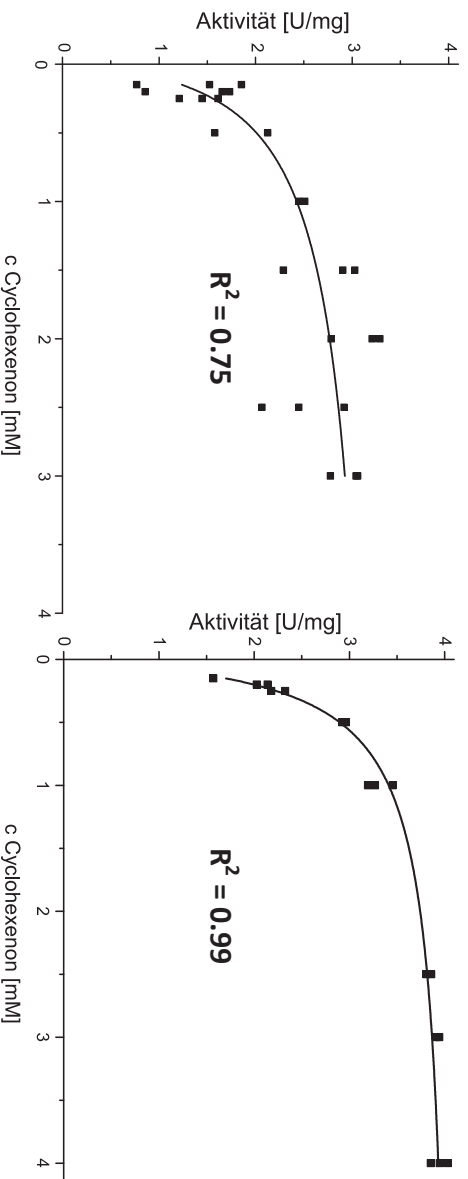


Abbildung 5: Vergleich der Präzision der Messwerte und der Fitkurven aus den Michaelis-Menten-Kinetiken der YqjM WT-katalysierten Umsetzung von 2-Cyclohexenon (**15**) mittels **A:** des bisher genutzten Aktivitätstests (Aktivitätstest 1) mit entgastem Puffer und **B:** des neu etablierten Aktivitätstests (Aktivitätstest 2), der zusätzlich ein Sauerstoff-verbrauchendes System enthält.

Anhand der Bestimmtheitsmaße (R^2) der Kurvenfits wird ersichtlich, dass die Genauigkeit der Messungen für den Assay mit Glukose/Glukoseoxidase als Sauerstoff-verbrauchendem System (Aktivitätstest 2) höher ist. Es liegt für Aktivitätstest 1 bei 0.75, für Aktivitätstest 2 bei 0.99. Die erhaltenen kinetischen Parameter sind in **Tabelle 6** gemeinsam mit den Literaturwerten aufgelistet.

Tabelle 6: Vergleich der Michaelis-Menten-Kinetik von YqjM WT mit 2-Cyclohexenon (**15**) unter Verwendung verschiedener Assays.

#	Aktivitätstest 1 mit entgastem KP_i	Aktivitätstest 2 mit Glukoseoxidase	Literatur ^[63]
1	K_M [mM]	0.25 ± 0.06	0.21 ± 0.01
2	k_{cat} [s^{-1}]*	1.97 ± 0.11	2.62 ± 0.03
3	k_{cat}/K_M ** [(mM*s) $^{-1}$]	7.95 ± 1.78	12.23 ± 0.64
			7.86 ± 0.77

*MW (YqjM) = 38 kDa, c(YqjM) = 1.7 mg/mL = 0.09 μ mol/mL

** statistische Fehlerberechnung mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung.

Mittels des Aktivitätstests 1 wird eine Michaelis-Menten-Konstante (K_M) von 0.25 mM, eine Wechsellzahl (k_{cat}) von $1.97 s^{-1}$ und eine daraus resultierende katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) von $7.95 mM^{-1}s^{-1}$ erhalten. Diese Daten sind im Rahmen der Fehler mit den Literaturwerten vereinbar.^[63] Aktivitätstest 2 zeigt eine etwas niedrigere Michaelis-Menten-Konstante von 0.21 mM und eine höhere Umsatzrate von $2.62 s^{-1}$, wodurch die katalytische Effizienz mit $12.23 mM^{-1}s^{-1}$ fast das 1.5-fache erreicht. Dies könnte dadurch begründet sein, dass weniger Enzymaktivität für die unproduktive Nebenreaktion mit Sauerstoff belegt wird. Insgesamt ist der neue Aktivitätstest gut nutzbar, um kinetische Daten hoher Genauigkeit zu erhalten. Eine direkte Vergleichbarkeit der Daten mit denjenigen aus Tests ohne Sauerstoff-

verbrauchendes System ist nicht gegeben. Soweit nicht anders angegeben wurden im Folgenden alle Angaben der YqJM-Aktivität mittels des Aktivitätstests 2 ermittelt.

7.1.2 Lagerung

In **Abbildung 6** sind die Auswirkungen verschiedener Lagermethoden auf die spezifische Aktivität von *via* IMAC über Ni-NTA gereinigtem und mit FMN rekuperiertem Enzym YqjIM WT nach 24 h im Vergleich zur Anfangsaktivität (3.3 U/mg) direkt nach der Reinigung dargestellt. Dabei zeigt sich die höchste Aktivität von 4.4 U/mg nach „Schock-Gefrieren“ in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -20 °C. So wurde sogar eine höhere spezifische Aktivität als direkt nach der Reinigung detektiert. Daher erfolgte die Lagerung von YqjIM meist aliquotiert auf diese Weise. Teils wurde das Enzym auch als Lyophilisat gelagert, da das Enzym so auch ohne vorheriges Aliquotieren in Teilmengen entnehmbar ist und für Lyophilisate hohe Langzeitstabilität erwartet werden kann. Zusätzlich ist der Effekt der Aufkonzentrierung durch Lyophilisation in den in **Kapitel 7.2.4** vorgestellten präparativen Umsetzungen mit wenig aktiven Enzymvarianten wichtig.

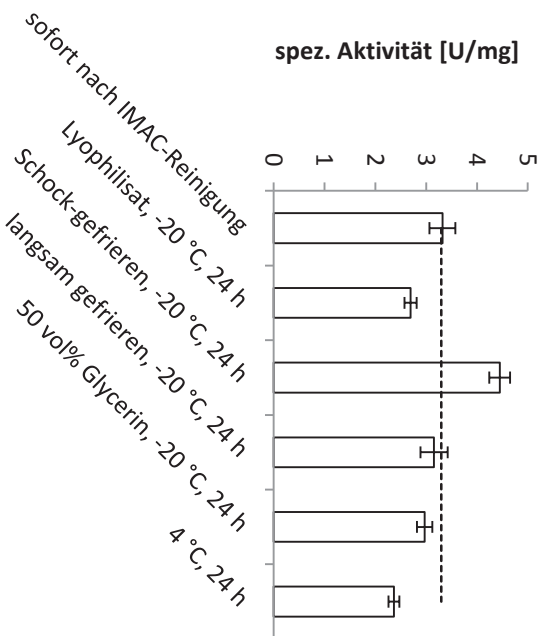


Abbildung 6: Änderung der spezifischen Aktivität des gereinigten Biokatalysators YqjIM Wildtyp nach 24 h Lagerung in unterschiedlicher Weise.

7.1.3 Optimierung zur Sättigung von YqjM mit dem Cofaktor FMN

Um YqjM möglichst effizient als Biokatalysator in der Synthese einsetzen zu können, ist der Einsatz von Enzymlösungen möglichst hoher spezifischer Aktivität von Vorteil. Daher wurde meist *via* Metallchelchromatographie (IMAC) gereinigtem Enzym gearbeitet. Da nur holo-YqjM, das den Cofaktor FMN enthält, katalytische Aktivität zeigt, wurde zusätzlich eine Sättigung der gesamten eingesetzten Enzymmenge mit dem Cofaktor FMN angestrebt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass YqjM zunächst nicht vollständig gesättigt mit dem FMN-Cofaktor vorliegt.^[25a] Daher wurde die reine Enzymlösung standardmäßig nach jeder Ni-NTA-Reinigung im Imidazol-Elutionspuffer mit 5 mM FMN inkubiert, bevor schließlich durch Größenausschluss-Chromatographie sowohl Imidazol als auch überschüssiges FMN wieder entfernt wurde. Dadurch kann eine erhöhte spezifische Aktivität von YqjM erreicht werden. Der Wert von 5 mM FMN zur Erreichung von 95 % der maximal möglichen spezifischen Aktivität des Enzyms wurde von Dr. T. Classen durch Extrapolation der Ergebnisse für 0–1 mM FMN und eine YqjM-Lösung der Konzentration 2.5 mg/ml bestimmt.^[53] Da die erzielte FMN-Sättigung der YqjM-Lösungen (photometrische Messung: **Kapitel 6.1.4**) auf diese Weise jedoch nur bei 50–84 % lag, wurde eine weitere Optimierung des Protokolls zur FMN-Sättigung angestrebt. Eine Fragestellung sollte dabei sein, inwiefern die in dieser Arbeit weit erhöhten YqjM-Konzentrationen eine Veränderung des Inkubationsprotokolls notwendig machen. Die eingesetzte FMN-Konzentration sollte dabei möglichst gering sein, da die chromatographische Abtrennung von FMN bei solch hohen Konzentrationen mehrfach durchgeführt werden muss, somit aufwendig ist und außerdem zu einer Verdünnung der Lösung führt. Zusätzlich sollte die Zeitabhängigkeit der FMN-Sättigung untersucht werden. Für alle Versuche wurde Zellpellet aus derselben Hochzelllichtfermentation (**Kapitel 9.2.2**) verwendet. Der experimentelle Ablauf der Optimierungsversuche ist in **Abbildung 7** dargestellt.

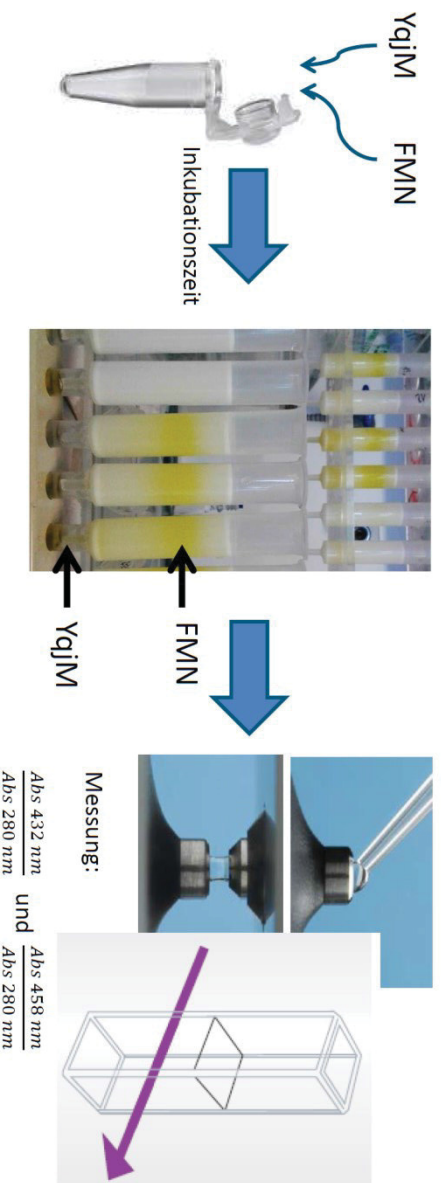


Abbildung 7: Experimenteller Ablauf der Optimierung zur FMN-Sättigung von YqjM: 1) Herstellung der Mischung von YqjM und FMN in Puffer, 2) Größenausschlusschromatographie zur Abtrennung von überschüssigem FMN, 3) Messung der Absorptionen bei 280, 432 und 458 nm.

Zunächst wurde *via* IMAC gereinigtes Enzym mit FMN zusammengegeben und für einen definierten Zeitraum inkubiert. Im Anschluss wurde überschüssiges FMN durch Größenausschluss-Chromatographie entfernt und über die Absorption bei 280, 432 und 458 nm die Sättigung gemäß **Gleichung 1** bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde wegen

des hohen experimentellen Aufwands im Vergleich zur photometrischen Messung nur zu Beginn und am Ende der Optimierung bestimmt.

Als Startpunkt wurde eine Lösung von YqjM WT der Konzentration 2.5 mg/mL mit FMN der Konzentrationen 0.1–0.8 mM inkubiert. Das FMN wurde sofort wieder entfernt und neben der photometrischen Bestimmung der FMN-Sättigung wurde auch die spezifische Aktivität gemessen (**Abbildung 8**). Beide Datenreihen wurden zunächst mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate angenähert.

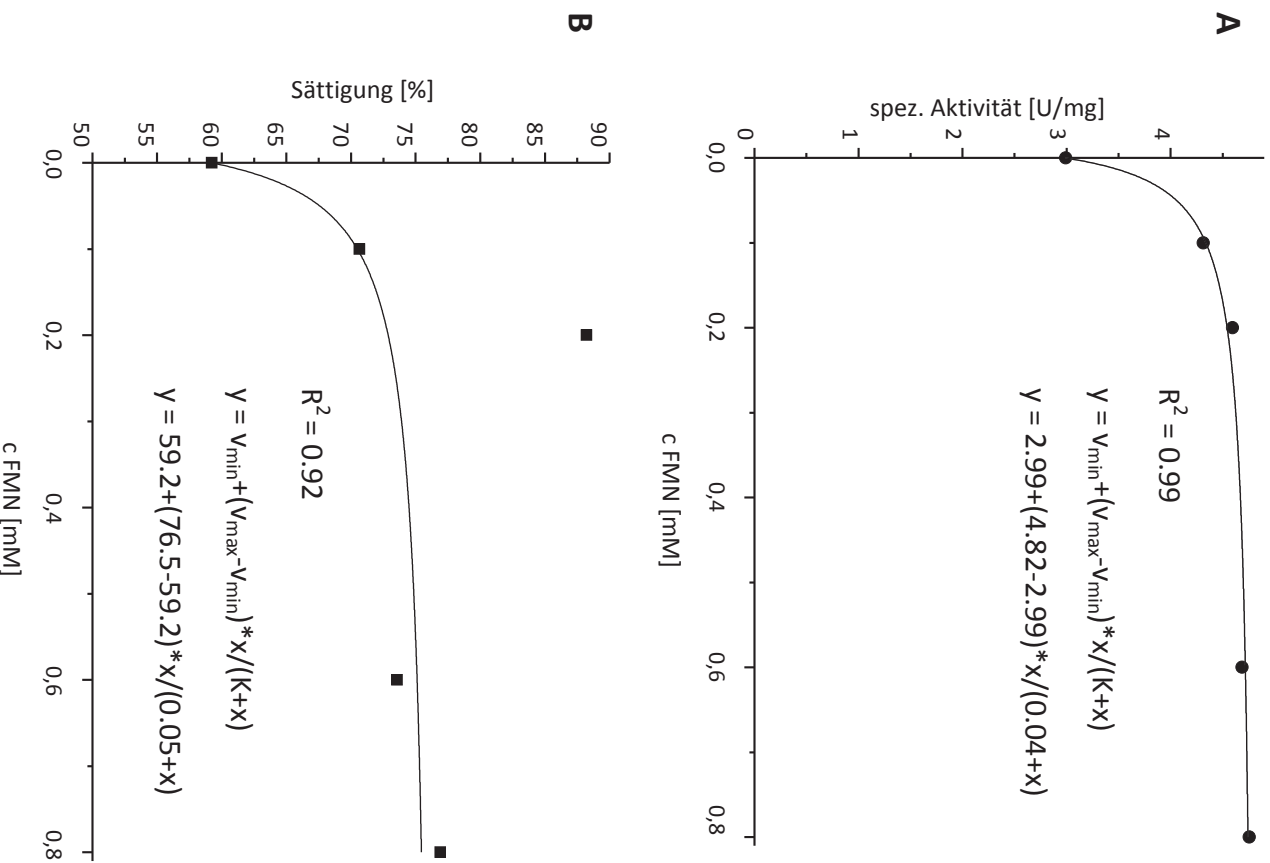


Abbildung 8: Spezifische Aktivität und FMN-Sättigung einer YqjM WT-Lösung der Konzentration 2.5 mg/mL nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen FMN. Regression erfolgte auf Basis der Michaelis-Menten-Gleichung. Die Sättigung der Probe bei 0.2 mM FMN wurde aufgrund der starken Abweichung als unplausibel angesehen und aus der Regression herausgenommen.

Die spezifische Aktivität (**Abbildung 8 A**) konnte nach Inkubation mit 0.8 mM FMN von 2.99 auf 4.75 U/mg (Aktivitätstest 2) gesteigert werden. 95 % der Maximalaktivität (4.82 U/mg) sind entsprechend der Fit-Kurve schon nach Inkubation mit 0.3 mM FMN erreicht. Dies weicht stark von der zuvor bestimmten notwendigen FMN-Konzentration von 5 mM ab. Durch die weit höhere Anfangsaktivität des YqjM WT-Enzyms dieser Arbeit (2.99 U/mg) im Vergleich zu dem in der eingangs erwähnten Optimierung verwendeten Enzym (0.5 U/mg) ist dies jedoch erklärbar. Die höhere Ausgangsaktivität des hier genutzten YqjM WT-Enzyms kommt vermutlich durch eine erhöhte Sättigung mit FMN bei Herstellung entsprechend des Hochzelllichtfermentationsprotokolls statt im Schüttelkolben zu Stande. In **Abbildung 8 B** ist die photometrisch bestimmte FMN-Sättigung der YqjM WT-Lösung in Abhängigkeit von der FMN-Konzentration dargestellt. Auch die Regression dieser Messdaten ergibt schon bei einer FMN-Konzentration von 0.3 mM eine Sättigung von 95 % des Maximalwerts. Der maximal mögliche Wert der Sättigung liegt entsprechend dieser Daten bei 77 %. Für weitere Experimente wurde die Sättigung einer YqjM WT-Lösung der Konzentration 2.5 mg/mL nach Inkubation mit 0.4 mM FMN als angestrebter Referenzwert gesetzt.

Um die Optimierung der FMN-Sättigung bezüglich der Parameter Enzymkonzentration, FMN-Konzentration und Zeit möglichst effizient durchzuführen, wurde ein Vorgehen mittels statistischer Versuchsplanung (engl.: Design of Experiment, DoE) angestrebt. In Kooperation mit L. Freier aus dem Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1, FZ Jülich) sollte dabei die Kriging-basierte Erweiterung von DoE, die dort als Softwaretoolbox entwickelt wird, angewendet werden.^[91] Kriging ist eine mathematische Methode zur Abschätzung funktionaler Zusammenhänge zwischen Einstellparametern und Messgrößen auf Grundlage bekannter Messwerte. Die geschätzten funktionalen Zusammenhänge werden - anders als bei klassischem DoE - nicht durch Regression mittels eines Polynoms, sondern durch Linearkombination benachbarter, durch einen Koeffizienten gewichteter Daten erhalten. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, dass Interpolationen flexibler sind als polynome Regressionen und somit auch komplexe nicht lineare Prozesse abgebildet werden können. Außerdem bietet Kriging neben der Modellvorhersage auch eine statistische Abschätzung der Modellunsicherheit in Form eines Konfidenzintervalls.^[92] Die theoretischen Hintergründe und die genaue Methodik der hier genutzten Kriging-basierten Versuchsplanung und Auswertung sind in der angegebenen Literaturstelle bei Freier *et al.* ausführlich dargestellt.^[91a]

Um Experimente auszuwählen wurden zunächst Randparameter gesetzt, für die der untersuchte Zusammenhang von Interesse ist. Dies war wichtig, da die Modellvorhersage durch Kriging innerhalb des gegebenen Messbereichs sicherer ist. Es sollte eine YqjM-Konzentration zwischen 2.5 und 25 mg/mL (also 63–630 μ M YqjM-Monomer) und eine FMN-Konzentration von einem Zehntel der minimalen YqjM-Konzentration bis zur 8-fachen maximalen YqjM-Konzentration (0.006–5 mM FMN) verwendet werden. Die Inkubationszeit wurde zwischen 0 und 8 h variiert. Während der ersten Runde wurden, wie bei DoE allgemein üblich, Extremfälle getestet, d.h. Kombinationen der minimalen und maximalen Eingangsparameter. Weitere Experimente wurden möglichst raumaufspannend verteilt, um die Übergangseffekte zu untersuchen. Zusätzlich wurden einige Messpunkte nahe der bereits vorhandenen gesetzt, um die Veränderung der Zielgrößen über verschiedene Skalenbereiche betrachten zu können.^[93] Darauf beruhend wurden in einer ersten Experimentrunde zwanzig Experimente, inklusive des zuvor definierten Referenzpunktes, ausgewählt. Der Referenzpunkt dient dazu mögliche Abweichungen verschiedener

Experimentrunden auszumitteln und so die Vergleichbarkeit aller Experimente zu gewährleisten. Dieser Punkt wurde in jeder der Experimentrunden 3-fach bestimmt und alle Ergebnisse wurden durch Division durch den Mittelwert auf diesen Punkt normiert. Nach Auswertung der Ergebnisse von Runde eins wurden sodann in einer zweiten Runde weitere zwanzig Experimente durchgeführt, um die Räume mit großer Veränderung der Sättigung ggf. mit mehr Daten zu füllen. So wird am Ende der gesamte Parameterraum ausgefüllt und eine sinnvolle Interpolation für alle Parameterkombinationen möglich.

Die Inkubationszeit wurde nur in der ersten Runde von Messungen berücksichtigt, da sich für keine der Proben eine zeitliche Veränderung der Sättigung ergab. In **Abbildung 9** ist der zeitliche Verlauf beispielhaft für die niedrigste YqjM-Konzentration von 2.5 mg/mL und 0.4 mM FMN und für die höchste YqjM Konzentration von 25 mg/mL und 0.1 mM FMN dargestellt.

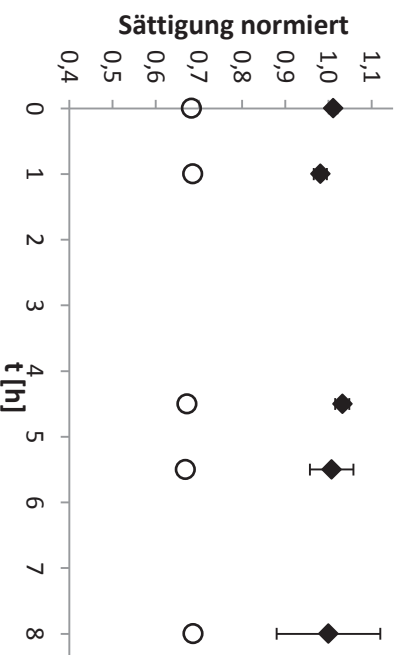


Abbildung 9: Zeitabhängigkeit der FMN-Sättigung bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen und der jeweils niedrigsten getesteten FMN-Konzentration. Viereck: 2.5 mg/mL YqjM, 0.4 mM FMN, Kreis: 25 mg/mL, 0.1 mM FMN.

In **Abbildung 10** sind die Ergebnisse aus beiden Experimentrunden nach 0 h Inkubationszeit graphisch dargestellt. Es wird ersichtlich, dass die durchgeführten Experimente aus Runde 1 (**Abbildung 10 A**) über den gesamten Parameterraum verteilt liegen. Es konnte gezeigt werden, dass der Bereich des größten Sättigungsanstiegs für Enzymlösungen zwischen 200 und 600 μM YqjM (12–25 mg/mL) im Bereich bis zu 2.5 mM FMN liegt und dass dieser kaum Daten enthält. Dies ist in **Abbildung 11** noch einmal im Detail dargestellt. Um den Parameterraum in diesem Bereich nun weiter auszufüllen, wurden die Messungen von Runde 2 (**Abbildung 10 B**) hauptsächlich in diesem Bereich angesiedelt. Die größte Sättigungssteigerung verschiebt sich dadurch zu niedrigeren FMN-Konzentrationen.

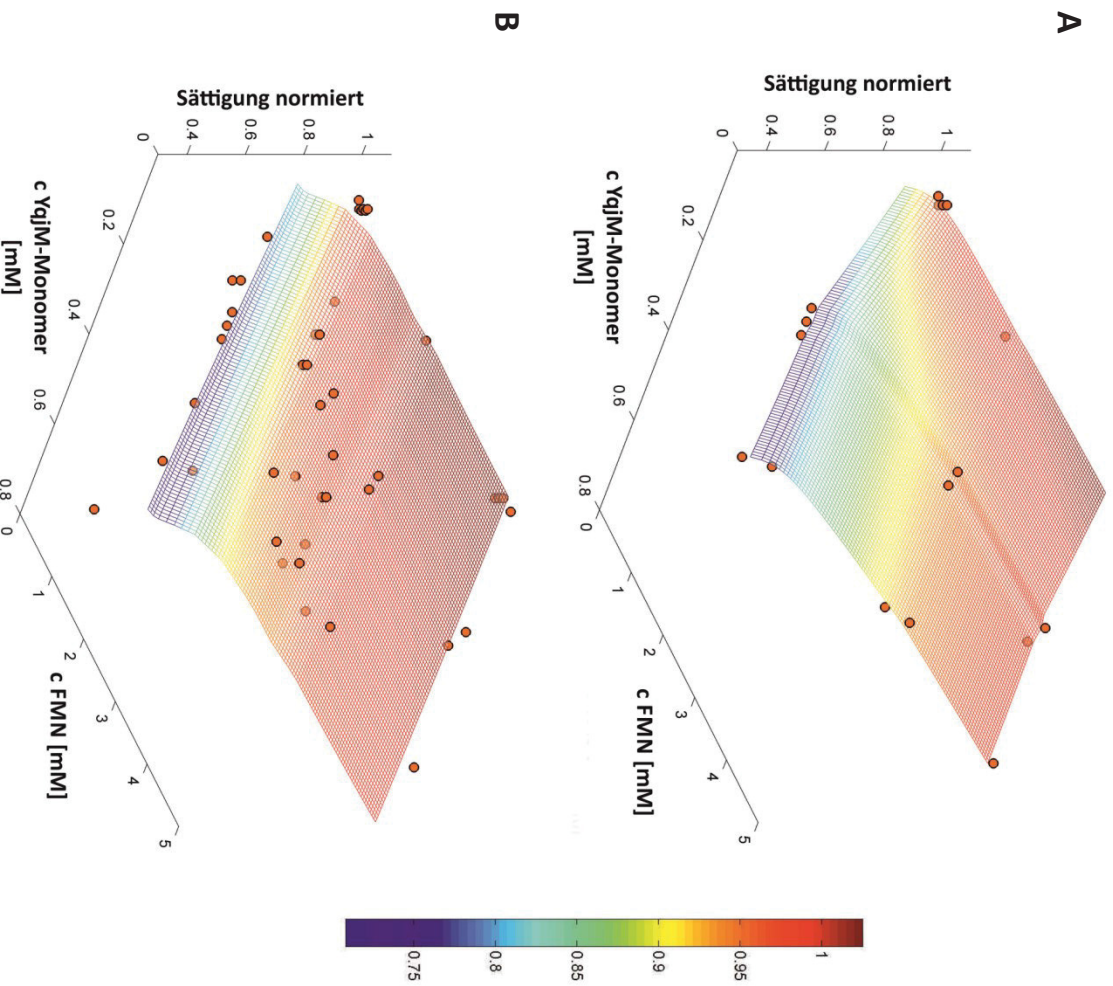


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Ergebnisse der durch DOE vorgeschlagenen Experimente und der erhaltenen Kriging-basierten Interpolation. Auf der Y-Achse ist jeweils die normierte Sättigung aufgetragen. **A:** Runde 1, **B:** Runde 1 und 2; (Grafiken erstellt mit KriKit: www.github.com/modsim/KriKit).

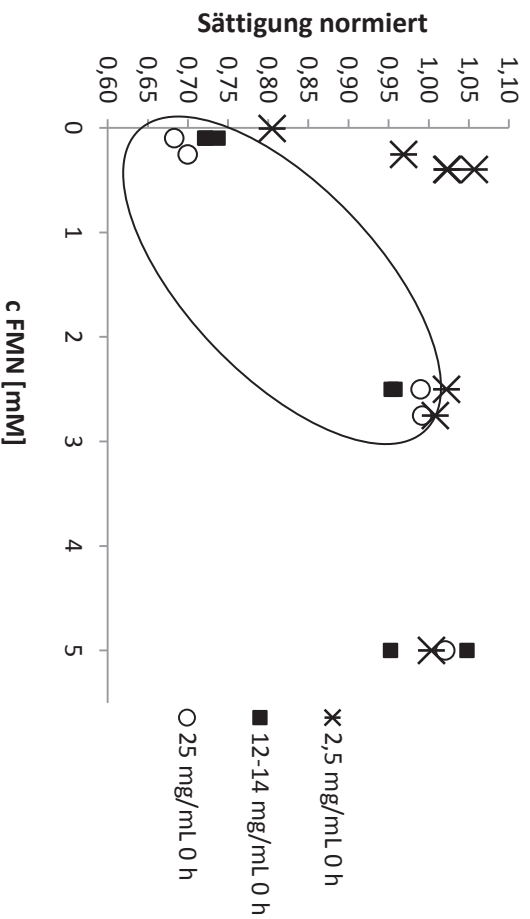


Abbildung 11: Messwerte der FMN-Sättigung nach 0 h Inkubationszeit in Abhängigkeit von der FMN-Konzentration für verschiedenen konzentrierte Enzymlösungen aus Runde 1. Der Bereich der größten Sättigungsvariation bei YqjM Konzentrationen zwischen 12 und 25 mg/mL ist markiert.

Um den so erhaltenen Datensatz in übersichtlicher Weise auszuwerten, wurde in **Abbildung 12** die FMN-Sättigung in 2D, in Abhängigkeit des FMN/YqjM-Monomer-Verhältnisses dargestellt. Der Maximalwert scheint bei visueller Analyse ab einem 10-fachen FMN-Überschuss mit Sicherheit erreicht zu sein. Zusätzlich ist das Konfidenzintervall angegeben, das eine genauere statistische Analyse der Daten möglich macht.

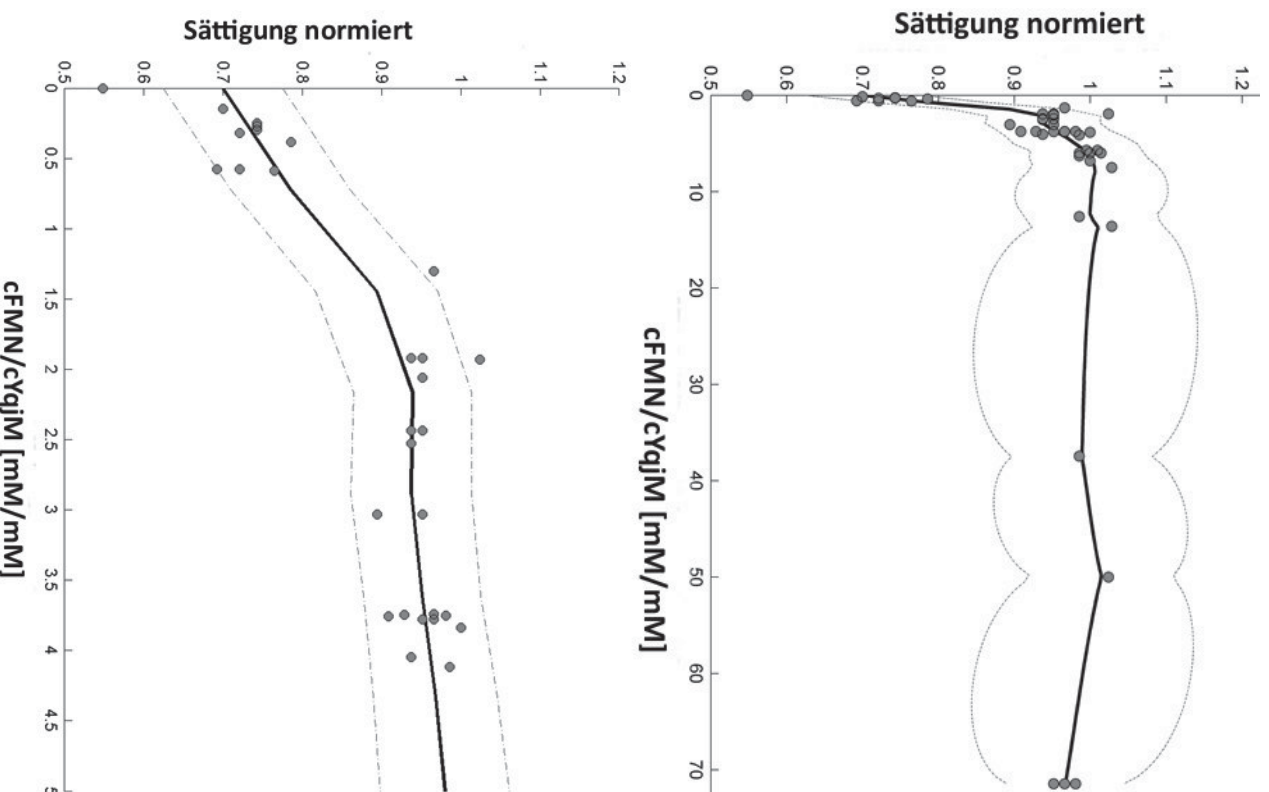


Abbildung 12: Darstellung der ermittelten FMN-Sättigungswerte in Abhängigkeit des FMN/YqjM-Verhältnisses inklusive des Konfidenzintervalls (Grafik erstellt mit KriKit: www.github.com/modsim/KriKit).

Durch einen statistischen Hypothesentest können zwei ausgewählte Variablen verglichen werden und über signifikante Abweichung voneinander entschieden werden. Hier wurde der Z-Test verwendet, um zu analysieren, welche Messwerte mit einer Sicherheit von 95 % vom Plateau abweichen.^[94] Es zeigte sich, dass demnach nur bis zu einem FMN/YqjM-Verhältnis von 1.0 eine Abgrenzung vom Plateau möglich ist. Alle Messungen mit größerem Überschuss FMN sind nicht mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Plateau abgrenzbar (**Abbildung 13**).

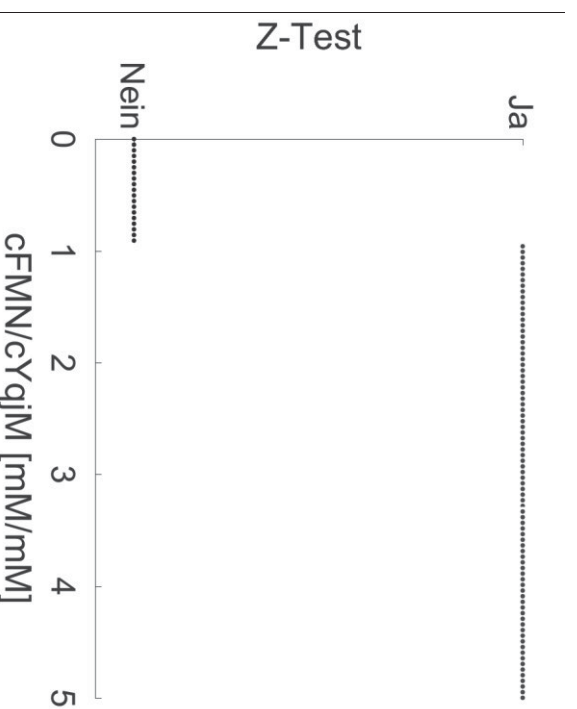


Abbildung 13: Z-Test zur Abgrenzung von Sättigungswerten vom Plateau (95 % Sicherheit), (Grafik erstellt mit KriKit: www.github.com/modsim/KriKit).

Um abschließend zu klären, ob diese Ergebnisse auch bei Messung der spezifischen Aktivität gültig bleiben, wurde für vier verschiedene Enzymproben, die laut Kriging-Analyse nicht vom Plateau abzugrenzen sind, die spezifische Aktivität bestimmt. Die ausgewählten Proben besitzen ein FMN/YqJM-Verhältnis von 2.5–71 und YqJM-Konzentrationen von 70.0–640 μM . Die vier Proben haben eine Aktivität von 4.3–4.6 U/mg (89–95 % der Maximalaktivität laut Regression in **Abbildung 8**) und sind im Rahmen des Messfehlers nicht voneinander abgrenzbar. Die Tatsache, dass alle vier die gleiche Aktivität zeigen, belegt, dass Zugabe von mehr als 2.5-fachem Überschuss FMN nicht zu signifikant größerer Sättigung und somit Aktivitätssteigerung führt.

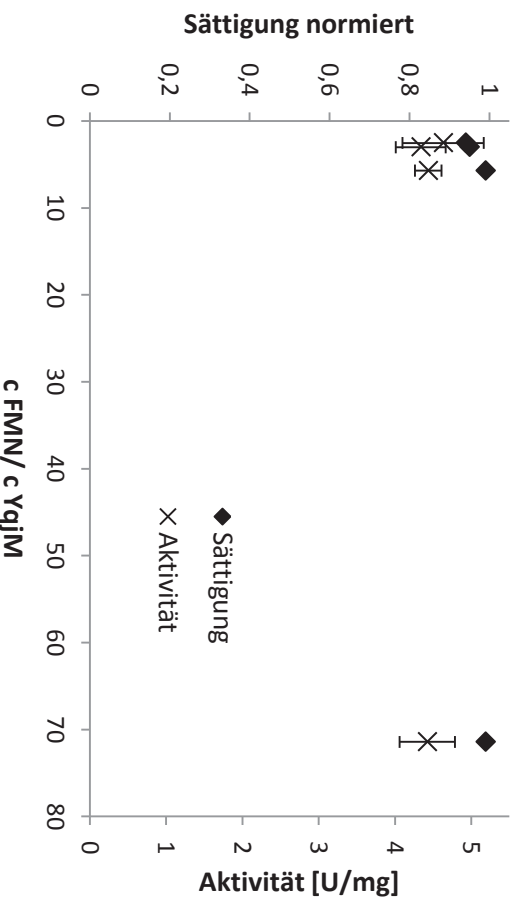


Abbildung 14: Korrelation der FMN-Sättigung und der spezifischen Aktivität mit der Menge an FMN pro YqJM. Das FMN/YqJM-Verhältnis liegt zwischen 2.5 und 71.

Insgesamt wurde im Rahmen der Optimierung also deutlich, dass keine Zeitabhängigkeit der FMN-Einlagerung ins aktive Zentrum von YqJM WT besteht. Zusätzlich wurde gezeigt, dass

auch für hochkonzentrierte YqjM-Lösungen von 25 mg/mL in unserem Fall keine Inkubation mit 5 mM FMN (8-facher Überschuß FMN) notwendig ist. Nach unserer Optimierung reicht stattdessen ein 1.0–2.5-facher FMN-Überschuß aus, um Sättigungen und spezifische Aktivitäten zu erhalten, die nicht mehr mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Maximalwert unterschiedlich sind. Die aufwendige Abtrennung von FMN in hoher Konzentration durch mehrmalige Größenausschluss-Chromatographie kann also in Zukunft vermieden werden.

Da die Arbeit mit Rohlysate aufgrund des Vorhandenseins von anderen Enzymen wie z.B. ADHs im Zelllysate für viele Reaktionen nicht empfehlenswert ist und auch bei alleiniger 85 %iger Fällung kein signifikanter Reinigungseffekt zu erwarten ist, wurde eine Optimierung der Ammoniumsulfatfällung angestrebt. Bei fraktionierter Fällung von YqjM WT mit 40–80 % Ammoniumsulfat und Messung von Aktivität und Enzymkonzentration der resuspendierten Pellets wurde jeweils im 60 %-Proteinpellet der höchste Wert erhalten (**Abbildung 15**).

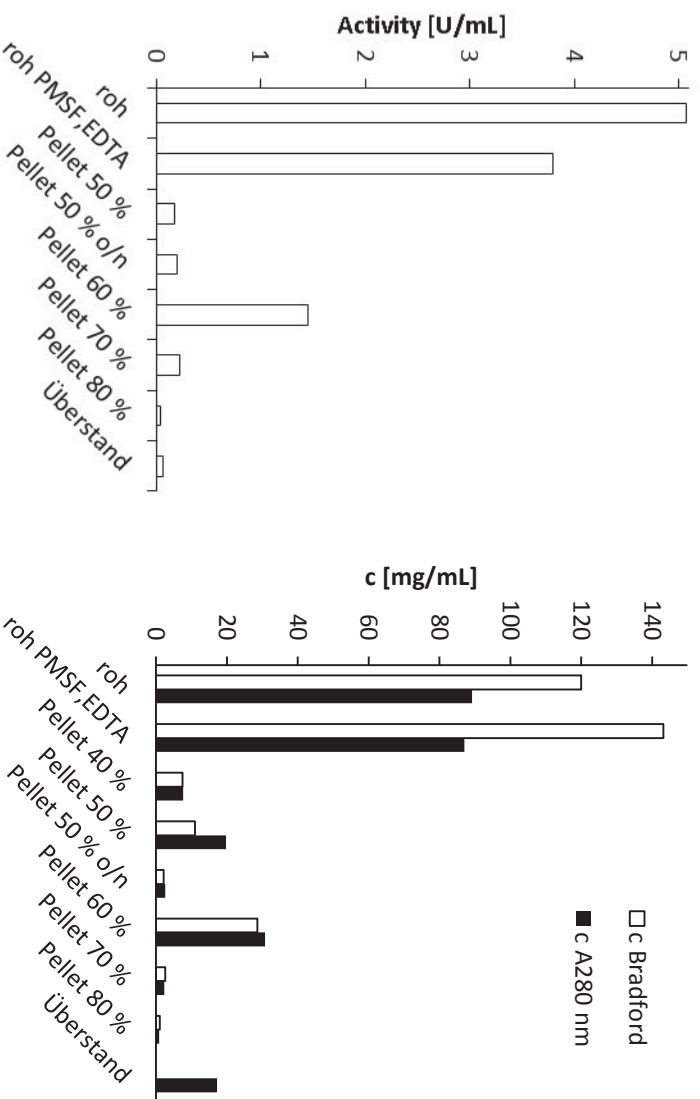


Abbildung 15: Etablierung einer Reinigung von YqjM WT durch Ammoniumsulfatfällung. Alle Werte beziehen sich auf das Ausgangsvolumen der Fällung. Das Rohextrakt wurde als Referenz ebenfalls bei 4 °C gelagert. Eine Probe wurde mit 0.1 mM PMSF, 5 mM EDTA versetzt, um Zersetzung durch Proteasen zu verhindern und ADH-Aktivität zu inhibieren.

Insgesamt konnten in diesem Pellet 30 % der Ursprungsaktivität und 35 % der Ursprungskonzentration (c A280) gefunden werden. Insgesamt lag die Rückgewinnung bei 42 % der Ursprungsaktivität und 83 % der Ursprungskonzentration (c A_{280 nm}).

Das SDS-Gel dieser Fällung sowie einer zweiten Fällung mit bei 60–90 % Ammoniumsulfat erhaltenen Proteinpellets ergab, dass YqjM bei 50–70 % Ammoniumsulfat als Hauptbestandteil enthalten ist (**Abbildung 17**). Daher wurde zur fraktionierten Fällung in weiteren Versuchen ein Vorgehen durch Zugabe von zuerst 40 % und dann 70 % Ammoniumsulfat festgelegt. In einer ersten Ausführung der Fällung nach diesem Protokoll wurden im 70 %-Pellet 78 % der Aktivität und 30 % des Proteins (c A_{280 nm}) im Vergleich zum Rohlysate zurückgewonnen (**Abbildung 17**). Gleichzeitig wurde das Enzym aufkonzentriert, ein Reinigungseffekt erzielt (Faktor 2.6 –0.16 U/mg im 70 %-Pellet statt 0.06 U/mg im Rohlysate) und das Enzym in eine gut lagerbare Form überführt.

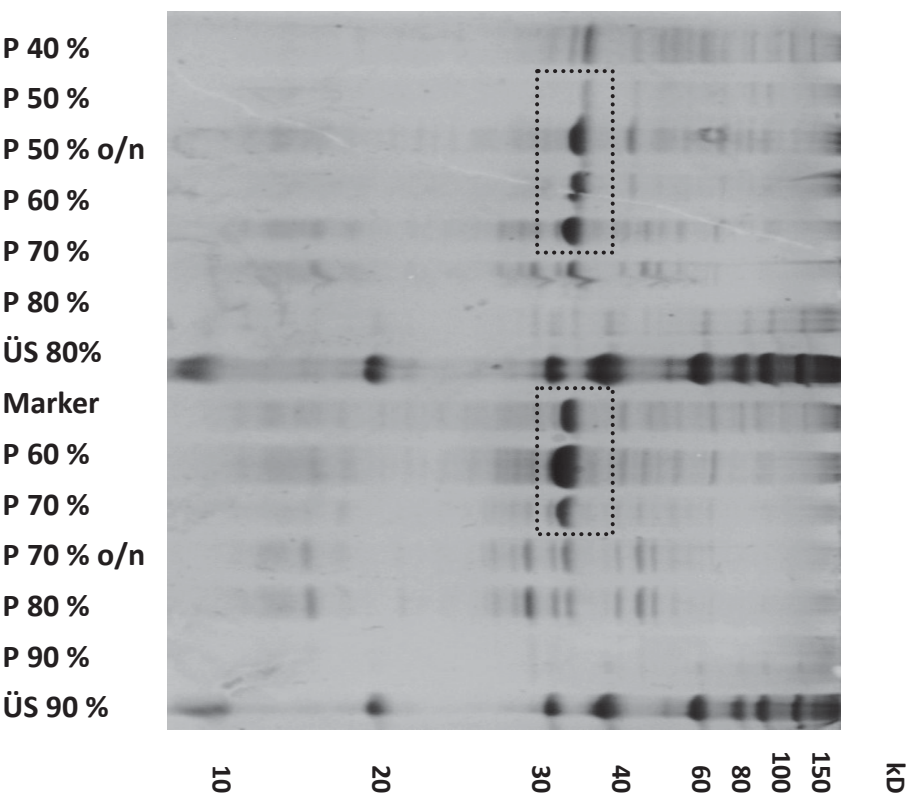


Abbildung 16: SDS-Gel der einzelnen Proteinpellets (P) und des jew. letzten Überstandes (ÜS) nach Fällung von YqjM WT durch verschiedene Konzentrationen Ammoniumsulfat. (o/n: Inkubation in der Ammoniumsulfatlösung bei 4 °C über Nacht.) Diejenigen Fraktionen, die in zukünftigen Versuchen gleichzeitig refällt werden sollen, sind mit einem schwarzen Kasten umrandet.

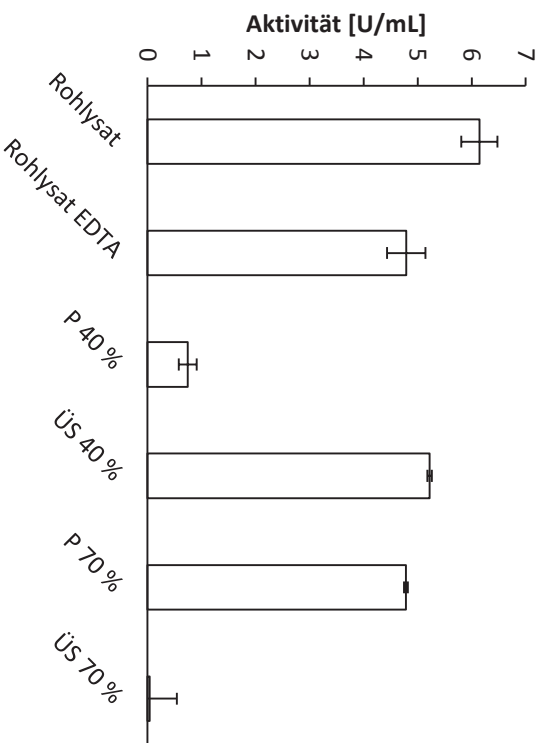


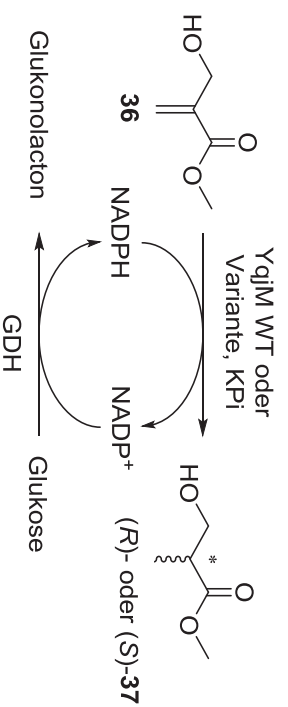
Abbildung 17: Aktivitäten der einzelnen Fraktionen bei Durchführung der Ammoniumsulfatfällung entsprechend des zuvor ermittelten Protokolls durch fraktionierte Zugabe von 40 % und 70 % Ammoniumsulfat. Alle Proben wurden im Ursprungsvolumen von 10 mL gemessen.

7.2 Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM

Im Kenntnisstand sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, wie stereokomplementäre Enreduktase-katalysierte Reaktionen erhalten werden können. In dieser Arbeit soll eine Konzept-basierte Methode zum spiegelbildlichen Umbau des aktiven Zentrums von Enreduktasen getestet werden. Dazu soll neben dem Enzym auch das Substrat in günstiger Weise gewählt und variiert werden. Günstige Substrate sind dabei solche, die zu synthetisch wertvollen Produkten führen, in ihrer Lage im aktiven Zentrum veränderbar sind und trotzdem möglichst hohe Selektivität und hohen Umsatz zeigen. Im folgenden Kapitel (7.2.1) wird die Auswahl geeigneter Screeningsubstrate beschrieben. Im Anschluss (Kapitel 7.2.2) wird auf die Methode und die Ergebnisse zum Design eines stereokomplementären Biokatalysators eingegangen. Alle Enzymumsetzungen in diesem Kapitel wurden mit IMAC-gereinigtem Enzym (Protokoll in Kapitel 9.2.5.1) durchgeführt. Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden zu großen Teilen bereits veröffentlicht.^[95]

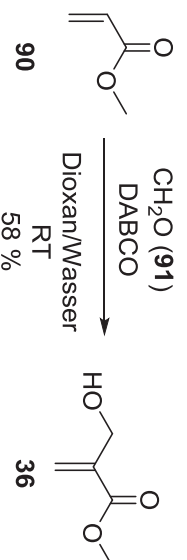
7.2.1 Substratdesign

Wie im Kenntnisstand (Kapitel 6.2.1) dargestellt, ist die Einflussnahme auf den Bindungsmodus von 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäuremethylester (**36**) durch gezielte Punktmutationen im aktiven Zentrum im Vergleich zu den Profen-Substraten **57** erleichtert. Daher wurde **36** als Modellsubstrat für ein Screening nach stereokomplementären Enzymvarianten in Betracht gezogen. Zusätzlich wird in der Bioreduktion von **36** als Produkt der sogenannte *Roche-Ester* (**37**) gebildet. Dieser ist ein breit einsetzbarer chiraler Synthesebaustein mit hoher industrieller Bedeutung.^[60, 71] Stueckler *et al.* konnten in einer wegweisenden Studie zeigen, dass fünf verschiedene Enreduktasen die Umsetzung von Substrat **36** zum (*R*)-Enantiomer von **37** katalysieren.^[60] Zur Katalyse der (*S*)-selektiven Reaktion ist jedoch nur ein Wildtyp-Enzym [OYE 2.6, >98 % *ee* (*S*)] bekannt.^[62] Die Bandbreite an (*S*)-selektiven Enzymen zu erweitern ist also von besonderem Interesse. Die niedrig substituierte terminale Doppelbindung schien außerdem für eine Analyse der Stereospezifität-beeinflussenden Wechselwirkungen gut geeignet. Somit wurde die Reduktion des *Roche-Ester*-Vorläufers **36** mit Enzym-gekoppeltem Cofaktorrecycling durch Glukosedehydrogenase (GDH) (Schema 29) als Modellreaktion für weitere Studien zur Enantioselektivität von YqjM-katalysierten Bioreduktionen ausgewählt.



Schema 29: Modellreaktion zur Untersuchung der Stereospezifität von YqjM-Varianten

Die Synthese des Substrats erfolgte mittels *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion aus den kostengünstigen Startmaterialien Acrylsäuremethylester (**90**) und Formaldehyd (**91**) mit einer Ausbeute von 58 % (Schema 30).



Schema 30: Reaktionsschema zur Synthese des YqjM-Substrats 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäuremethylester (**36**) durch *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion.

Eine ungünstige Eigenschaft des gewählten Modellsubstrats **36** zeigte sich bereits in den ersten Testansätzen im 1 mL-Maßstab. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (**Tabelle 8**, Eintrag 1) wurden nur sehr geringe Umsätze von bis zu 7 % erreicht. Dies entspricht ungefähr dem erreichten Wert aus den Vorarbeiten (8 %, **Tabelle 8**, Eintrag 6), bei denen abweichend bei pH 7 statt 6.5 und mit höherer NADP^+ -Konzentration gearbeitet wurde. Der in dieser Arbeit zunächst gewählte pH-Wert von 6.5 entspricht dem Stabilitätsoptimum von YqjM. Somit sollte eine längere Halbwertszeit des Enzyms in der Reaktion erreicht werden. Es wurde eine niedrige NADP^+ -Konzentration getestet, da in der Dissertation von T. Fischer von einem inhibierenden Effekt des Cofaktors NADP^+ auf ADHS berichtet worden war.^[96] Dieser Effekt sollte hier in Bezug auf die Enreduktase YqjM untersucht werden. Keine der Herangehensweisen führte jedoch zu einer Erhöhung des Umsatzes im Vergleich zu den Vorarbeiten.

Um für die weiteren Screeningversuche unter optimalen Assay-Bedingungen zu arbeiten, wurden außerdem folgende Reaktionsbedingungen variiert: die Temperatur, die Menge des Cofaktor-regenerierenden Enzyms GDH und der pH-Wert (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Standard-Assay zur Optimierung des Umsatzes bei Biorreduktion des Roche-Ester Vorläufers mit YqjM WT. Reaktionsbedingungen: 5 mM Substrat **36**, 0.3 U YqjM WT, 20 μM NADP^+ , 20 mM Glukose, 1 % (v/v) MeTHF in 20 mM KP, Inkubation für 24 h, 300 upn.

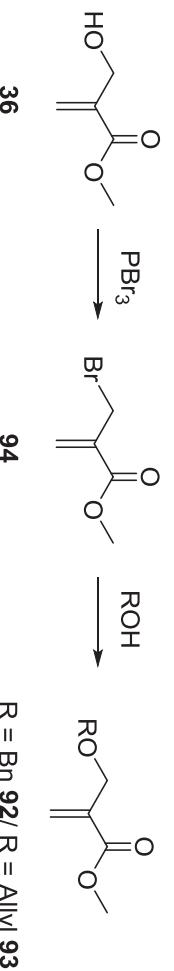
#	Temperatur [°C]	GDH [U]	pH-Wert	Umsatz [%]
1	25	1	6.5	7
2	25	5	6.5	8
3	25	10	6.5	6
4	25	10	7.5	14
5	30	10	6.5	7
6*	30	0.5	7.0	8

* Ergebnis aus der Dissertation von M. Schölzel, Verwendung von 200 μM NADP^+ .

Die Variation der Menge an GDH zwischen 1 U und 5 U und die Temperaturerhöhung von 25 °C auf 30 °C zeigten keinen signifikanten Einfluss auf den Umsatz. Bei Erhöhung des pH-Wertes von 6.5 auf 7.5 wurde jedoch eine Verdopplung des Umsatzes auf 14 % beobachtet (Eintrag 5). Dies war schon für eine andere Umsetzung mit hydroxyl-substituierten Reaktanden [Produkt: 2-(3-Fluor-4-hydroxyphenyl)acrylsäuremethylesters (**58**)] beobachtet

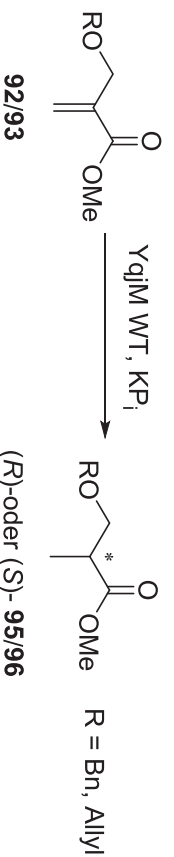
worden und könnte mit einer erhöhten Löslichkeit dieser Substrate in schwach basischem Lösemittel zusammenhängen.^[70] Für weitere Versuche wurden daher als Standardbedingungen der pH-Wert 7.5, 1 U GDH und 30 °C gewählt. Durch Erhöhung der Enzymmenge konnte der Umsatz weiter gesteigert werden (0.6 U YqJM WT, 34 % Umsatz). Die Screening-Bedingungen konnten also optimiert werden. Allgemein ist der *Roche*-Ester-Vorläufer **36** jedoch kein optimales Substrat für Bioreduktionen mittels YqJM, da die Umsätze auch nach Optimierung der Reaktionsbedingungen gering bleiben und somit wahrscheinlich eine niedrige katalytische Effizienz der Enzym-Substrat-Kombination besteht (genauere Analyse dazu siehe **Tabelle 12, Abbildung 20**).

Aufgrund dessen sowie der Tatsache, dass Stereokomplementarität grundsätzlich nicht nur Enzym-, sondern auch Substrat-basiert erreicht werden kann,^[54b] wurde das Substratspektrum erweitert. Die zusätzlichen Substratvarianten sollten die Nutzbarkeit der Produkte als vielfältige Synthesebausteine nicht einschränken, jedoch hinsichtlich ihrer sterischen und elektronischen Eigenschaften Variationen aufweisen. Zusätzlich wurde bei jeder Substratvariante eine Erhöhung der katalytischen Effizienz in Kombination mit dem YqJM-Wildtyp-Enzym angestrebt. Eine Möglichkeit zur Erhöhung des Umsatzes durch Substrat-Engineering wird in der bereits erwähnten Studie zur OYE-katalysierten Synthese des *Roche*-Esters von Stueckler *et al.* beschrieben.^[60] So führte die Schützung der polaren Hydroxylgruppe mit Benzyl- bzw. Allyl-Substituenten dort zum 3- bzw. 4-fachen Umsatz in der YqJM-katalysierten Reduktion. Die Benzyl- und Allyl-geschützten Substratvarianten, 2-(Benzylloxymethyl)acrylsäuremethylester (**92**) bzw. 2-(Allyloxymethyl)acrylsäuremethylester (**93**), wurden entsprechend in dieser Studie als verwandte Screening-Substrate hergestellt. Die Synthese erfolgte in zwei Stufen ausgehend vom *Roche*-Ester-Vorläufer **36** über die Zwischenstufe des 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylesters (**94**) und anschließende nukleophile Substitution mit Benzylalkohol bzw. Allylalkohol (**Schema 58**). So wurde die Benzyl-geschützte Variante **92** in einer Gesamtausbeute von 53 % erhalten. Das Allyl-geschützte Substrat **93** konnte in 63 % Ausbeute aus **36** erhalten werden. Für die Benzylschützung wurde auch eine einstufige, Palladium-katalysierte Variante der Schützung von **36** getestet, die jedoch mit 28 % Ausbeute keinen Vorteil brachte.



Schema 31: Allgemeines Schema der Herstellung geschützter Derivate von **36**.

Die Ergebnisse der Testumsetzungen von **92** und **93** mittels YqJM entsprechend **Schema 32** sind in **Tabelle 9** gezeigt.



Schema 32: Testreaktionen der geschützten Substratvarianten **92** und **93** mittels YqJM WT.

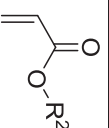
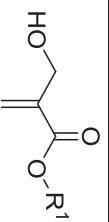
Beide Substrate zeigten im Standard-Assay mit 0.6 U Enzym fast 90 % Umsatz zum Produkt und sowohl der 3-Benzyloxy-2-methylpropansäuremethylester (**95**) als auch der 3-Allyloxy-2-methylpropansäuremethylester (**96**) wurden mit >99 % *ee* (*R*)-Selektivität erhalten. Diese Biorreduktionen zeigen also auch bei hohen Umsätzen stabile Selektivitätswerte. Dies ist für die Umsetzung des ungeschützten Substrats **36** nicht in gleichem Maße gegeben. Der erhaltene *Roche*-Ester **37** ergab bei 34 % Umsatz nur noch 96 % *ee* (*R*)-Selektivität (**Tabelle 9**, Eintrag 1).

Tabelle 9: Ergebnisse der Testreaktionen der geschützten Substratvarianten **92** und **93** (**Schema 32**) mittels YqjM WT im Vergleich zum *Roche*-Ester-Vorläufer **36**. Reaktionsbedingungen: Substrat (5–10 mM), YqjM WT, NADP⁺ (200 μM), Glukose (20 mM), GDH (1 U), 1 % (v/v) MeTHF in KP_i (20 mM, pH 7.5), Inkubation für 24 h, 300 upm, 30 °C. Abschätzung des Umsatzes *via* GC an chiraler stationärer Phase mittels Referenzsubstanzen.

#	R	0.3 U	0.6 U	<i>ee</i>
	(Edukt/Produkt)	Umsatz [%]	Umsatz [%]	[%]
1	H (36/37)	14	34	99 bzw. 96 (<i>R</i>)
2	Bn (92/95)	65	89	99 (<i>R</i>)
3	Allyl (93/96)	80	88	99 (<i>R</i>)

Um eine größere Vielfalt an Substraten hoher Reaktivität für das Stereoselektivitätsscreening zur Verfügung zu haben, wurde eine weitere Möglichkeit zur Umsatzsteigerung in OYE-katalysierten Umsetzungen getestet. So wurde von Tasnadi *et al.* eine Umsatzsteigerung in der YqjM-katalysierten Reduktion verwandter Acrylsäureestersubstrate bei Variation der Estergruppen beschrieben. Dort konnte der Umsatz von 27 % auf 91 % gesteigert werden, indem statt des Acrylsäuremethylesters (**97**), der Ethyl- (**98**), *n*-Butyl- (**99**) oder *t*-Butyl-Ester (**100**) verwendet wurde.^[67] Daher wurde dieser Effekt für die entsprechenden Estervarianten des Modellsubstrats **36** untersucht. Die Ergebnisse wurden per GC/MS analysiert und die Umsätze anhand dessen abgeschätzt (**Tabelle 10**). Dabei zeigte sich ein starker Rückgang des Umsatzes auf 0.3 % für den Ethylester **101**, eine geringe Steigerung auf 1.5 % für den *n*-Butylester **102** und keinerlei Reaktion für die *tert*-Butyl-Variante des *Roche*-Esters **103**. Der literaturbekannte hohe Umsatz für den Acrylsäure-*n*-Butylester (**99**) konnte im gleichen Ansatz mit 80 % reproduziert werden. Vermutlich wird der Bindungsmodus des Modellsubstrats **36** im Vergleich zu den Acrylsäureestern **104–105** durch die zusätzliche Hydroxymethylengruppe stark verändert.

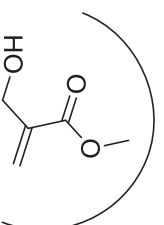
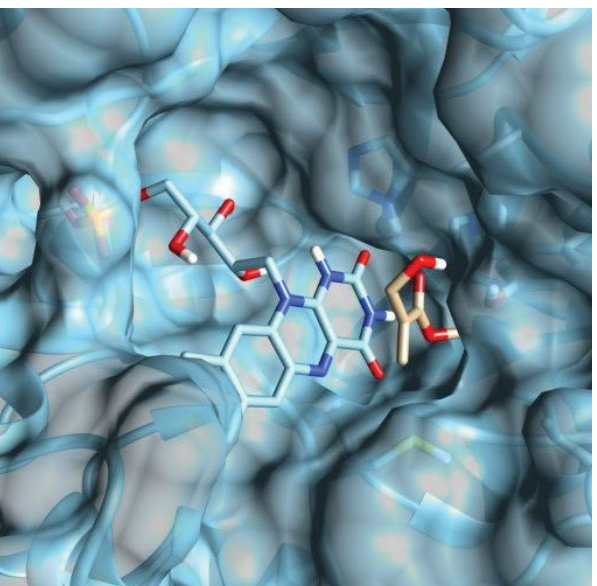
Tabelle 10: Testansätze zur Überprüfung der Hypothese, dass Ester mit längeren Alkylketten R erhöhten Umsatz in YqjM WT-katalysierten Bioreduktionen von Acrylsäureester-Derivaten liefern, und Vergleichswerte aus der Literatur. Reaktionsbedingungen: Substrat (5 mM), YqjM WT (0.3 U), NADP⁺ (200 µM), Glukose (20 mM), GDH (1 U), 1 % (v/v) MeTHF in KP₁ (20 mM, pH 7.5), Inkubation für 24 h, 300 upm, 30 °C. Abschätzung des Umsatzes *via* GC/MS.



#	R ¹	Umsatz [%]	R ²	Umsatz [%]	Umsatz (Lit.)* [%]
1	Me (36)	14.0	Me (90)	n.d.	27
2	Et (101)	0.3	Et (98)	n.d.	42
3	<i>n</i> Bu (102)	1.5	<i>n</i> Bu (99)	80	91
4	<i>t</i> Bu (103)	0	<i>t</i> Bu (100)	0	1

*Ergebnisse von Tasnadi *et al.*^[67], Assay-Bedingungen: Substrat (10 mM), NADH (15 mM) in Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 7.5), 30 °C, 24 h.

Durch Docking-Experimente sollten weitere Informationen über den Bindungsmodus des Roche-Ester-Vorläufers **36** im aktiven Zentrum von YqjM WT gefunden werden. Demnach ist im produktiven (*R*)-selektiven Bindungsmodus des Roche-Ester-Vorläufers **36** der sterisch offenere Bereich des aktiven Zentrums (vorderer Bereich in **Abbildung 18**) durch die Hydroxymethylengruppe besetzt.



sterisch offener Bereich

Abbildung 18: Docking-Experiment zur Simulation des Bindungsmodus des Modellsubstrats **36** im aktiven Zentrum von YqjM WT (zur Verfügung gestellt von Dr. T. Classen) und graphische 2D-Darstellung der sterischen Gegebenheiten.

Die Esterfunktion befindet sich im hinteren Bereich, der kaum Hohlräume für große Substituenten bietet. Die gute Stereoselektivität der Reaktion von **36** zu **37** von >95 % *ee*

zeigt, dass ein alternativer geflippter Bindungsmodus unter „Austausch“ von Ester und Hydroxymethylengruppe kaum möglich ist. Die Acrylsäureester **90–99** können im Gegensatz dazu auch mit der Estergruppe in Richtung des offenen Raums gebunden werden und ergaben somit auch mit $R = n\text{Bu}$ hohen Umsatz. Die bessere Umsetzung des Acrylsäure- n -Butylesters im Vergleich zum Ethylester kann vermutlich durch den größeren hydrophoben Anteil des Moleküls erklärt werden. Dies erleichtert die Wechselwirkung mit dem stark hydrophoben aktiven Zentrum von YqjM. Da die Erhöhung der katalytischen Effizienz bezüglich des Wildtyp-Enzyms durch Einführung längerer Ester somit nicht gelungen war, wurden die Substrate **101–103** nicht für weitere Testansätze verwendet. Stattdessen wurden Varianten von **36** in Betracht gezogen, die statt der Estergruppen stärker elektronenziehende funktionelle Gruppen konjugiert zur C=C-Doppelbindung enthalten. Somit ist die Polarisierung der C=C-Doppelbindung erhöht und die Übertragung des Hydrids elektronisch erleichtert. Dies könnte zu erhöhter katalytischer Effizienz führen (niedrigerer K_M -Wert, erhöhter k_{cat}). Demnach würde die zu **36** analoge Keto-Verbindung **106** höhere und die Aldehyd-Variante **107** die höchsten Umsätze in der Bioreduktion zeigen (**Abbildung 19**).

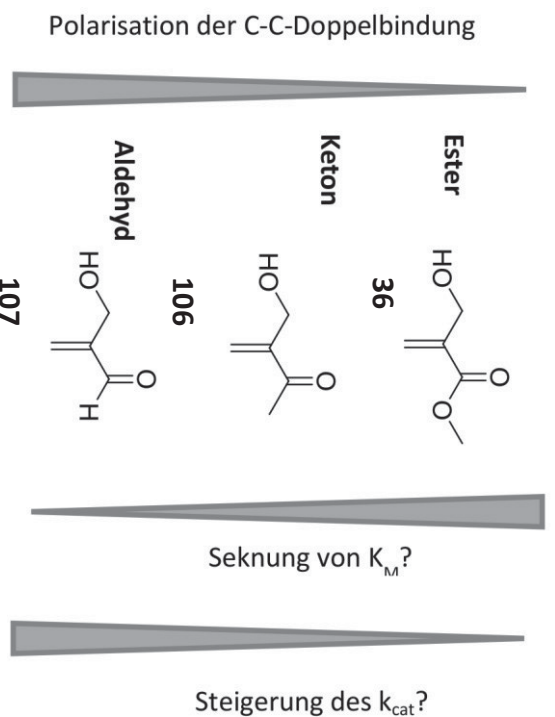


Abbildung 19: Testsubstrate mit steigender Polarisierung der C=C-Doppelbindung und somit möglicherweise erniedrigter Michaels-Menten-Konstante (K_M) bzw. erhöhter maximaler Wechselzahl (k_{cat}) bei Umsetzung durch OYES.

Da die Synthese des Aldehyds **107** zunächst nicht gelang (Syntheseversuche siehe **Kapitel 9.3.2.3**) und im Rahmen von **Kapitel 7.3.1** Substratinhibition von YqjM bei Umsetzung eines sehr ähnlichen Aldehyds substrats festgestellt wurde, wurde nur der Umsatz des Methylketons **106** im Standard-Assay bestimmt (**Tabelle 11**). Diese Bioreduktion verlief mit 0.6 U YqjM WT vollständig zum 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**, Eintrag 2). Zusätzlich wurde das Ethylketon **109** synthetisiert und getestet. Dieses war aufgrund seiner sterisch größeren Ähnlichkeit zum Methyl ester **36** von Interesse und zeigte ebenfalls vollständigen Umsatz zum jeweiligen Produkt, dem 1-Hydroxy-2-methylpentan-3-on (**110**, Eintrag 3). Um die Steigerung der katalytischen Effizienz des Methylketons **106** im Vergleich zum Ester **36** quantifizieren zu können, wurde die Michaelis-Menten-Kinetik beider Substrate mit YqjM WT aufgenommen. Dazu wurde der in **Kapitel 9.2.6.1** beschriebene Aktivitätstest 2 mit Sauerstoff-verbrauchendem System durch Glukoseoxidase verwendet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 12** und als Graphen in **Abbildung 20** dargestellt. Zusätzlich erfolgte auf die gleiche

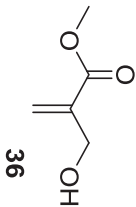
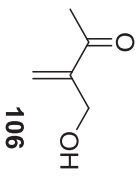
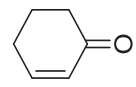
Weise die Messung der Kinetik des sehr aktiven Substrats 2-Cyclohexenon (**15**) mit YqjIM WT, um mit diesen Referenzwerten vergleichen zu können.

Tabelle 11: Umsatz und Enantiomerenüberschuss bei YqjIM WT-katalysierter Umsetzung der Substratvarianten **106** und **109** im Vergleich zum Roche-Ester-Vorläufer **36**. Reaktionsbedingungen: Substrat (5–10 mM), YqjIM WT (0.6 U), NADP⁺ (200 μM), Glukose (20 mM), GDH (1 U), 1 % (v/v) MeTHF in K_P (20 mM, pH 7.5), Inkubation für 24 h, 300 upm, 30 °C. Abschätzung des Umsatzes *via* GC an chiraler stationärer Phase mittels Referenzsubstanzen.



#	R (Edukt/ Produkt)	Umsatz [%]	ee [%]
1	OMe (36/37)	34	96 (R)
2	Me (106/108)	>99	98 (R)
3	Et (109/110)	>99	59 (R)

Tabelle 12: Michaelis-Menten-Kinetik der YqjIM WT-katalysierten Bio-reduktion verschiedener Substrate. Die Daten von 2-Cyclohexenon (**15**) dienen als Referenz für eine YqjIM-katalysierte Reaktion sehr hoher katalytischer Effizienz.

#	Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]*	k_{cat}/K_M [$mM^{-1}s^{-1}$]**
1		91.80 ± 6.46	0.52 ± 0.12	0.21 ± 0.01
2		0.67 ± 0.02	2.51 ± 0.18	2.62 ± 0.03
3		0.0073 ± 0.0006	4.83 ± 1.17	12.23 ± 0.64

*Molekulargewicht von YqjIM: 38 kDa, **Fehler durch statistische Fehlerfortpflanzung nach Gauß.

2-Cyclohexenon (**15**) wird mit einer maximalen Wechsellzahl (k_{cat}) von 2.62 s^{-1} und einem K_M -Wert von 0.21 mM umgesetzt. Somit kann für **15** eine katalytische Effizienz von 12.23 $mM^{-1}s^{-1}$ errechnet werden. Für das Estersubstrat **36** wurden, wie erwartet, jeweils schlechtere Werte erhalten. So stieg die Michaelis-Menten Konstante im Vergleich zu Cyclohexenon (**15**) um das 460-fache auf 91.8 mM an und auch die maximal mögliche Wechsellzahl sank auf 0.76 s^{-1} , was insgesamt einer katalytischen Effizienz von 0.007 $mM^{-1}s^{-1}$ entspricht. Für das Keton **106** zeigten sich wiederum bessere katalytische Eigenschaften. Der K_M -Wert lag mit 0.52 mM in der gleichen Größenordnung wie jener für 2-Cyclohexenon (**15**). Bezüglich der Wechsellzahl zeigen diese beiden Substrate keinen Unterschied. Die

katalytische Effizienz des Ketons **106** beträgt $4.83 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Somit konnte durch den Wechsel vom Estersubstrat **36** zum Methylketon **106** eine um das 680-fach erhöhte katalytische Effizienz erreicht werden. Die Hypothese, dass YqjM-katalysierte Reaktionen von Ketonen bessere katalytische Eigenschaften zeigen als die von Estern, konnte für diesen Fall bestätigt werden.

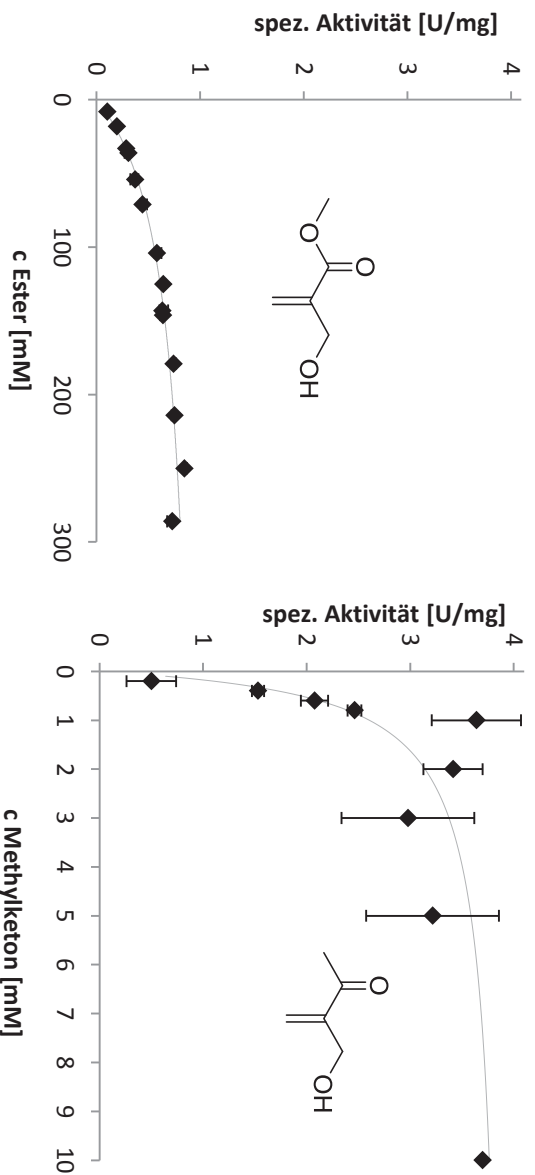
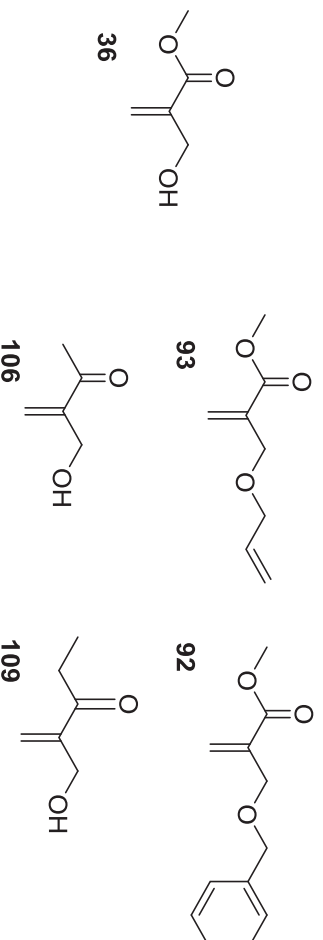


Abbildung 20: Graphen der Michaelis-Menten-Kinetiken von Ester **36** und Methylketon **106** mit YqjM WT. Die X-Achse im linken Graph zeigt den 30-fachen Bereich im Vergleich zu derjenigen im rechten Graph.

Somit wurden insgesamt fünf vielversprechende Screeningsubstrate identifiziert, die im Folgenden für Bioreduktionen mit Enzymvarianten getestet werden sollen (**Schema 33**).



Schema 33: Überblick über die identifizierten Screeningsubstrate, die im Folgenden in präparativen Bioreduktionen zum Einsatz kommen.

Dies sind neben dem Roche-Ester Vorläufer **36** vier Derivate, die bezüglich ihres sterischen und elektronischen Aufbaus variieren. Alle vier Derivate zeigen außerdem im Vergleich zu Substrat **36** bessere katalytische Eigenschaften, wodurch die präparative Nutzbarkeit der Bioreduktionen mittels YqjM WT oder YqjM-Varianten wahrscheinlicher wird.

Wie im Kenntnisstand (**Kapitel 6.2.1**) beschrieben, sind nur für Substrat **36** stereokomplementäre Bioreduktionen bekannt. Die präparative Nutzbarkeit in OYE-katalysierten Bioreduktionen wurde noch für keines der Substrate nachgewiesen. Da durch die Bioreduktionen der vorgestellten Substrate (**Schema 33**) interessante chirale Synthesebausteine erhalten werden können,^[71, 88, 97] soll im Folgenden neben der Analyse

der Stereoselektivität der enzymatischen Umsetzungen mit YqjIM WT und YqjIM-Varianten auch die Durchführung in präparativem Maßstab erfolgen.

7.2.2 Enzymdesign

Um stereokomplementäre Enzyme und Enzymvarianten zu finden, gibt es, wie in **Kapitel 6.2.1** beschrieben, verschiedene Wege. Für Enreduktasen ist das Vorhandensein von nativen stereokomplementären Enzymen nicht selbstverständlich und die Stereoselektivität kann schon durch kleine Veränderungen der Substratstruktur stark verändert werden - sie ist also für jedes Enzym sehr variabel.^[111] Daher haben Methoden zur Generierung von komplementären Enzymvarianten durch Mutagenese einen hohen Stellenwert. Die am breitesten anwendbare Methode zur Generierung stereokomplementärer Enzymvarianten ist derzeit die gerichtete Evolution,^[69] die jedoch, wie im Kenntnisstand beschrieben, einen enormen Mutagenese- und Screening-Aufwand bedeutet. Hier sollte eine rationale, konzeptbasierte Strategie zur Generierung von stereokomplementären Enreduktase-Varianten getestet werden, mittels derer nur eine sehr begrenzte Anzahl von Enzymvarianten erstellt und getestet werden muss. Die Enreduktase YqjIM schien hierfür geeignet zu sein, da sowohl die Kristallstruktur als auch die Position der mechanistisch unmittelbar beteiligten Aminosäurereste (His164, His167, Tyr169) bekannt waren.^[56] Die angewandte Strategie beruht auf einer grundlegenden Umgestaltung des aktiven Zentrums, wobei statt einer bloßen Veränderung der sterischen Umgebung des Substrats der mechanistisch essentielle Aminosäurerest Histidin 167 verändert werden sollte. Ein solcher Eingriff war in bisherigen Studien zur Stereoselektivität von Enreduktasen entweder ganz vermieden worden (YqjIM),^[63] führte nicht zu Varianten mit verbesserter Selektivität (OYE 2.6),^[98] oder die erhaltenen Varianten zeigten verstärkte statt komplementäre Selektivität (PETN-Reduktase).^[99]

Als Grundlage des hier angewandten Konzepts diente das Dockingergebnis des Modellsubstrats **36** im aktiven Zentrum von YqjIM WT. Der daraus resultierende, produktive Bindungsmodus ist in **Abbildung 21A** dargestellt. Dieser wird als produktiv angesehen, da zwei durch den Reaktionsmechanismus festgelegte Voraussetzungen erfüllt sind: 1) Die Position des Carbonylsauerstoffs liegt im Abstand und Winkel einer Wasserstoffbrücke zu den beiden Histidinresten H164 und H167, sodass das Substrat elektronisch aktiviert wird. Das Vorliegen von Wasserstoffbrücken wurde mittels der Software UCSF Chimera analysiert.^[100] Diese nutzt die geometrischen Kriterien nach Mills *et al.* mit zusätzlichen Toleranzbereichen, um fehlende Genauigkeiten in den Kristallstrukturen und im Dockingergebnis zu berücksichtigen.^[101] 2) Der Kohlenstoff der Doppelbindung in β -Stellung zur Carbonylgruppe (C₆) muss außerdem in enger Nachbarschaft (ca. 3–4 Å) zu N-5 des im aktiven Zentrum verankerten FMNs liegen, sodass das Hydrid übertragen werden kann. Bei Betrachtung der molekularen Oberfläche des Proteins, wie schon in **Abbildung 18** dargestellt, wird ersichtlich, dass das aktive Zentrum im vorderen Teil der Abbildung sehr offen ist und im hinteren Teil relativ wenig Raum für Substituenten bietet. Das Modellsubstrat **36** wird entsprechend des Dockingergebnisses mit der Hydroxymethylengruppe in Richtung des offenen Raums gebunden.

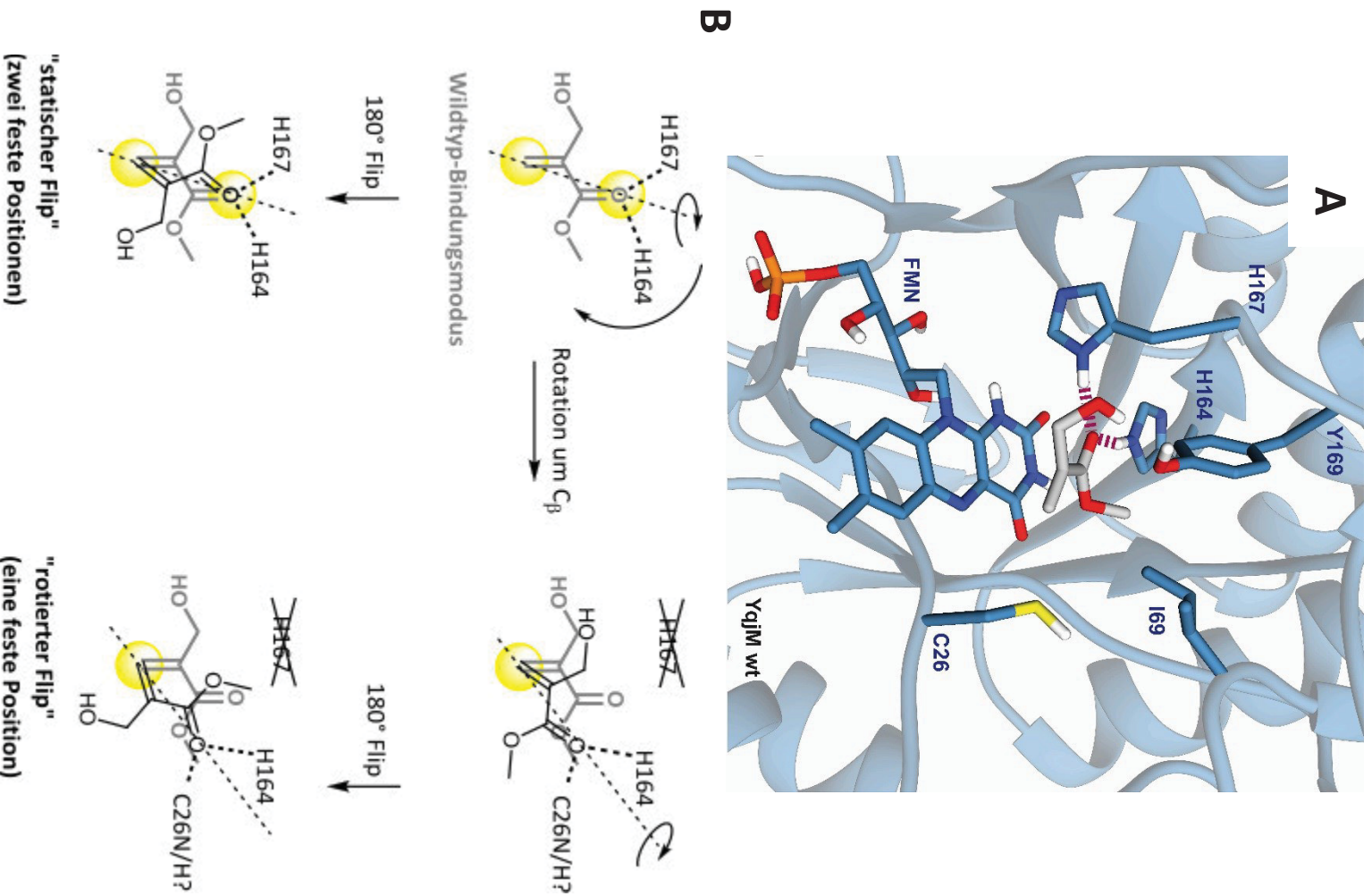


Abbildung 21: A: Darstellung des Proteinrückgrates und der mechanistisch wichtigen Aminosäurereste im aktiven Zentrum von YqjM-Wildtyp (PDB: 1Z42) inklusive des gebundenen Cofaktors FMN und des postulierten Bindungsmodus des *Roche-Ester-Vorläufers 36* (eigenes Dockingergebnis), **B:** Schematische Darstellung verschiedener möglicher Strategien zur Generierung stereokomplementärer, produktiver Bindungsmodi in Enreduktasen am Beispiel des aktiven Zentrums von YqjM. **links:** Statischer Flip, **rechts:** Rotierter Flip. Feste Positionen innerhalb des aktiven Zentrums sind mit gelben Sphären hinterlegt, der Wildtyp-Bindungsmodus ist in grauer Farbe dargestellt.

Um nun einen Bindungsmodus komplementärer Selektivität zu erhalten, muss eine 180° Rotation des Substrats um die Achse entlang des Carbonylsauerstoffs und C_β [(C=O)-C_β] bewirkt werden („Flip“). Dazu werden in der Literatur meist nur die mechanistisch nicht direkt beteiligten Aminosäuren verändert, und somit wird die Position dieser Achse beibehalten (**Abbildung 21B**, links unten).^[11] Dieses Vorgehen wird fortan als „statischer Flip“ bezeichnet. In dieser Arbeit sollen strategisch zwei Punktmutationen ins aktive Zentrum eingebracht werden, um das zweischrittige, in **Abbildung 21B** rechts schematisch dargestellte Konzept des „rotierten Flips“ zu realisieren. Darin wird der 180° Flip durch eine Rotation des Substrats um C_β bewirkt. Durch die erste Mutation, H167A, wird der Wasserstoffbrücken-bindende, mechanistisch essentielle Aminosäurerest Histidin 167 entfernt und so die Bindung des Substrats in seiner ursprünglichen Position gelockert. Um das Substrat zu reaktivieren und in geflippter Weise neu zu fixieren, wird als zweites ein Histidin- oder Asparaginrest in Position 26 installiert (C26H bzw. C26N). Somit wird der Freiheitsgrad der Rotation rund um C_β geschaffen, durch den die Substratsubstituenten in sterisch stärker beanspruchte Bereiche des aktiven Zentrums gelangen. Dies soll schließlich den 180°-Flip um die Achse (C=O)-C_β auslösen. Das aktive Zentrum wird somit grundlegend umgestaltet.

In **Abbildung 21** ist das Substrat **36** in *s-trans* Konformation dargestellt. Alternativ kann das Substrat auch als *s-cis*-Rotamer im aktiven Zentrum des Wildtyp-Enzyms und der Enzymvariante gebunden werden. Dies verändert die generelle Argumentation jedoch nicht. Nur eine Änderung der Substratkonformation vom Wildtyp zur Enzymvariante würde vermutlich die Übertragung von Hydrid und Proton aus gleichbleibender Richtung bewirken. Die Carbonylfunktion würde ihre neue Position allein durch die intramolekulare Rotation einnehmen, die die *s-cis/s-trans*-Isomerie bewirkt. Dass beide Konformationen grundsätzlich möglich sind, wurde bereits im Kenntnisstand beschrieben.^[58a]

7.2.3 Bio reduktionen im analytischen Maßstab

Das Screening der Enzymvarianten bezüglich Umsatz und Stereoselektivität bei Umsetzung der beschriebenen Substratvarianten erfolgte mittels IMAC-gereinigtem Enzym anhand der zuvor beschriebenen Substrate (**Kapitel 7.2.1**). Als Assay wurde das ebenfalls in diesem Kapitel beschriebene optimierte Protokoll (pH = 7.5) verwendet. Die jeweils erreichte Stereoselektivität der Enzym-Varianten ist in **Abbildung 22** als Säulendiagramm im Überblick dargestellt. In **Tabelle 13** sind die Enantiomerenüberschüsse und Umsätze zusätzlich als Zahlenwerte aufgeführt. Die Einzelmutation H167A, durch die die native Bindung im aktiven Zentrum gelockert wird, beeinflusst den Bindungsmodus in fast allen Fällen. Die einzige Ausnahme bildet der allylgeschützte Ester **96**, der wie vom Wildtyp auch mit >99 % (R)-Selektivität gebildet wird. Die C26N/H Einzelmutation, die einen alternativen Bindungsmodus des Substrats möglich machen soll, zeigt weniger Einfluss auf die Enantioselektivität der drei Ester-Substrate und des Methylketons **106**, wie in Gegenwart der intakten Bindungsstelle aus H164 und H167 zu erwarten ist. Eine Ausnahme bildet die Umsetzung zum Ethylketon **110** mittels YqJM C26H. Dort wird komplett stereokomplementäres Verhalten im Vergleich zum Wildtyp [WT: 60 % *ee* (R)-; C26H: 60 % *ee* (S)-Selektivität] bei >99 % Umsatz erreicht. Dieser Effekt verringert sich durch Kombination mit der Mutation H167A auf eine Selektivität von nur noch 20 % *ee* (R). Das Konzept des „rotierten Flips“, das einen additiven Effekt der beiden Mutationen vorhersagen würde, ist für diesen Fall nicht anwendbar. Die Enzymvariante C26N zeigte insgesamt kaum

Aktivität und ergab auch bei erhöhter Enzymmenge nur für drei von fünf Substraten geringen Umsatz von 2–8%.

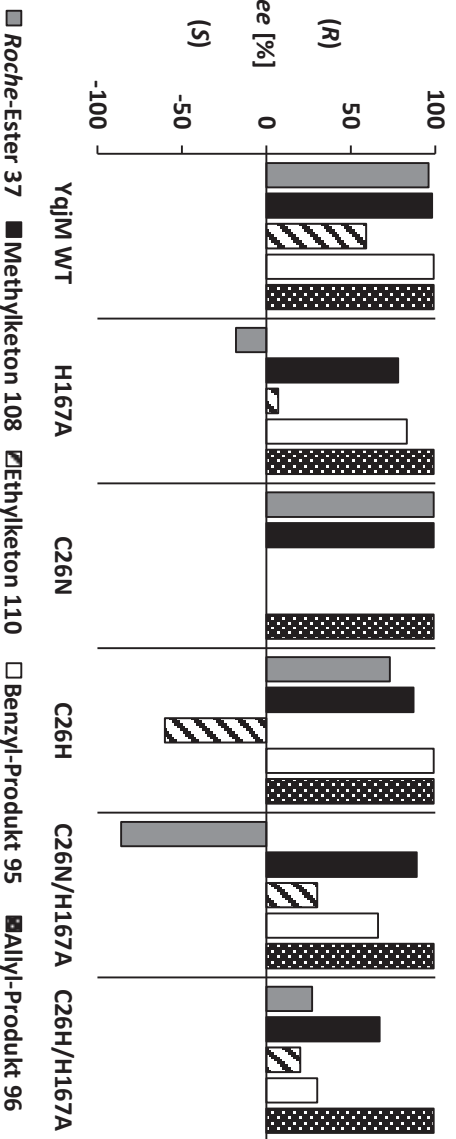
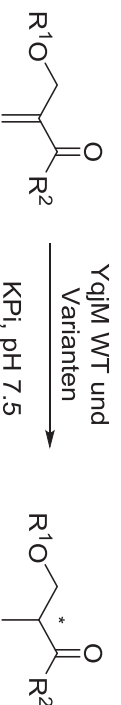


Abbildung 22: Übersicht über die erreichten Enantiomerüberschüsse bei Umsetzung der Substratbibliothek mittels YqjM WT und der ersten Reihe von Enzymvarianten.

Tabelle 13: Umsatz und Enantiomerüberschüsse bei Umsetzung der ausgewählten *exo*-Methylen-Substrate mittels YqjM WT und Varianten. Assay siehe S. 138. Die Analytik erfolgte mittels GC an chiraler stationärer Phase anhand von Referenzsubstanzen.



#	YqjM R ¹ /R ² (Edukt/Produkt)	WT US [%] ee [%]	H167A US [%] ee [%]	C26H US [%] ee [%]	C26N US [%] ee [%]	C26N/ H167A US [%] ee [%]	C26H/ H167A US [%] ee [%]
1	H/OMe (36/37)	34 (R)	5 (S)	5 (R)	2 (R)	10 (S)	12 (R)
2	H/Me (106/108)	>99 (R)	97 (R)	99 (R)	5 (R)	>99 (R)	20 (R)
3	H/Et (109/110)	>99 (R)	89 (R)	>99 (S)	0 -	94 (R)	54 (R)
4	Bn/OMe (92/95)	89 (R)	42 (R)	64 (R)	0 -	6 (R)	7 (R)
5	Allyl/OMe (93/96)	88 (R)	80 (R)	74 (R)	8 (R)	46 (R)	26 (R)

US: Umsatz

Um die Wildtyp-komplementären Selektivitäten von C26H bezüglich Produkt **110** und der Variante C26N/H167A bezüglich des Roche-Esters **37** näher zu analysieren, wurden in einer Kooperation mit T. Classen *in-silico*-Docking-Studien und Kristallisationsversuche mit C26N/H167A durchgeführt. Nur die Dockingstudien führten zum Erfolg und es wurden anhand der in **Kapitel 7.2.2** dargestellten Kriterien die in **Abbildung 23A** dargestellten vermutlichen Bindungsmodi gefunden. Das Ethylketon-Substrat **109** bildet demnach innerhalb des aktiven Zentrums von YqjM C26H durch den sterischen Anspruch des zusätzlichen Histidins eine intramolekulare Wasserstoffbrücke aus. Der resultierende Sechsering wechselwirkt *via* Wasserstoffbrücken so mit den Histidinresten 164 und 167, dass die Aktivierung im geflippten Bindungsmodus erfolgt, und somit invers konfigurierte Produkte entstehen. Ein derart geflippter Bindungsmodus wurde nicht mehr als Docking-Ergebnis beobachtet, wenn die Mutation Histidin 167 zu Alanin zusätzlich besteht. Bei Reduktion des Methylesters **36** kann im Gegensatz dazu eine Verstärkung des Effekts der H167A Mutation durch Kombination mit C26N beobachtet werden. Bei Katalyse mittels H167A zeigt sich ein Enantiomerenüberschuss von 18 % *ee* (*S*), bei Katalyse mittels C26N/H167A wird mit 86 % *ee* sogar hohe Wildtyp-komplementäre (*S*)-Selektivität erreicht. Dies entspricht dem angestrebten Konzept des „rotierten Flips“. Durch Docking konnte der in **Abbildung 23B** gezeigte, vermutliche Bindungsmodus von **36** in YqjM C26N/H167A gefunden werden.

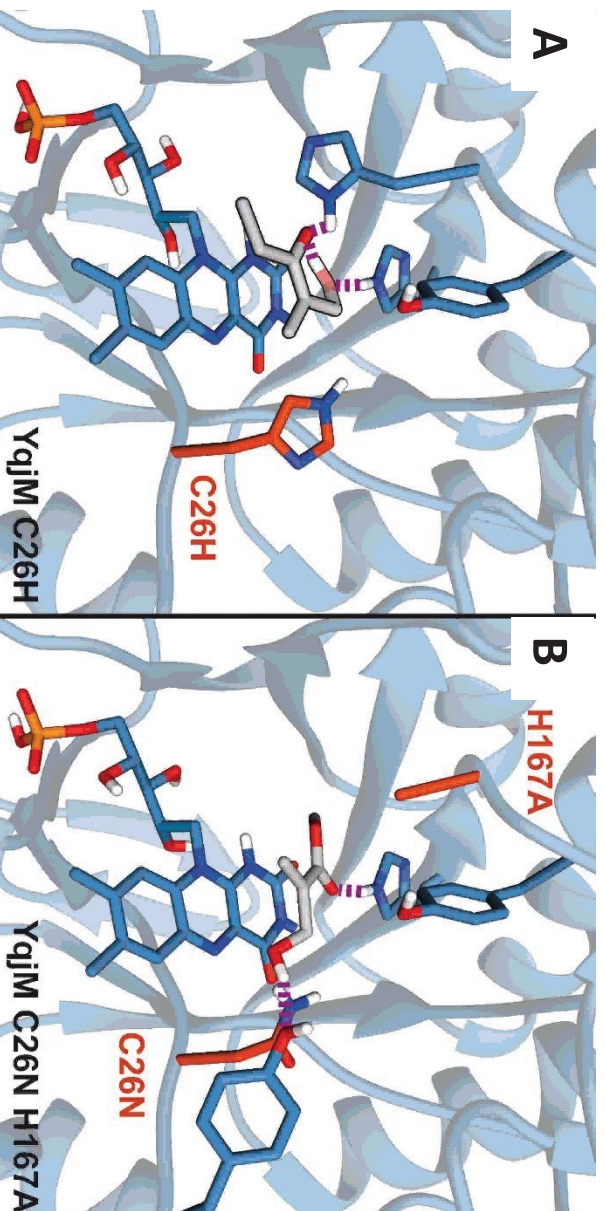
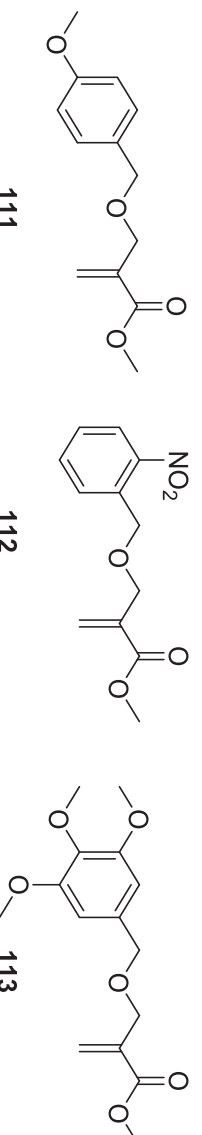


Abbildung 23: Darstellung der durch *In-silico*-Docking identifizierten möglichen Bindungsmodi von A: Ethylketon **109** im aktiven Zentrum von YqjM C26H und B: Methyl ester **36** im aktiven Zentrum von YqjM C26N/H167A.

Der eingeführte Asparaginrest und der Verlust der Wasserstoffbrücke zu H167 führen darin zu einem geflippten Bindungsmodus, der eine zusätzliche Rotation sowie eine neue Wasserstoffbrückenbindung enthält. Diese neue Bindung erfolgt jedoch anders als angestrebt nicht über die Carbonyl-, sondern über die Hydroxyl-Funktion. Eine neue Wasserstoffbrückenbindung am Carbonylsauerstoff hätte zu der angestrebten Reaktivierung geführt, die dem erhaltenen Biokatalysator nun fehlt. Somit wurde ein Biokatalysator hoher komplementärer Selektivität erhalten, die Aktivität ist jedoch für präparative Zwecke zu gering. Der Bindungsmodus des allylgeschützten Estersubstrats **93** konnte durch keine der

Mutationen beeinflusst werden. Der Enantiomerenüberschuss beträgt gleichbleibend >99% *ee* (*R*). Die Reduktion des benzylgeschützten Esters **92** zeigt bei Katalyse mittels YqJM C26H/H167A signifikant weniger (*R*)-Produkt [30% *ee* (*R*)]. Diese Ergebnisse waren vielversprechend, aber nicht für Umsetzungen im größeren Maßstab anwendbar, da die vielversprechendste Enzym-Substrat-Kombination (YqJM C26N/H167A – Roche-Ester-Vorläufer **36**) trotz Erhöhung der Enzymmenge nur bis zu 10% Umsatz zeigte. Daher wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde nochmals das Substrat variiert. Zum anderen wurde die Identifikation anderer möglicherweise stereoselektivitätsbeeinflussender Mutationen angestrebt.

Da sich der benzylgeschützte Ester **92** bezüglich seines Bindungsmodus als veränderbar gezeigt hatte, wurde die Benzylschutzgruppe im Rahmen einer Bachelorarbeit von L. Öhler sterisch und elektronisch variiert.^[102] Es wurden die *p*-Methoxybenzyl-geschützte Variante **111**, die *o*-Nitrobenzyl-geschützte **112** und die 3,4,5-Trimethoxybenzyl-geschützte Variante **113** synthetisiert und getestet (**Schema 34**).



Schema 34: Verwandte Screeningsubstrate mit unterschiedlichen Benzylschutzgruppen.

Dabei zeigte sich, dass keines der Substrate erhöhte *ent*-WT-Selektivität bei Umsetzung mit YqJM Wildtyp oder Varianten aufwies. Zur Identifikation anderer selektivitätsbeeinflussender Mutationen wurden zunächst die aus den Vorarbeiten vorhandenen YqJM-Varianten C26G, Y28F, Y28A, A60H, A60H/H167A^[70] erneut getestet. Dabei konnte der hohe Einfluss der Mutationen I69A und I69Y auf die Stereoselektivität bei Umsetzung des Methylesters **36** reproduziert werden [I69A: 40% *ee* (*S*), I69Y: 69% *ee* (*S*)]. I69A war eingeführt worden, um mehr Raum im aktiven Zentrum zu schaffen. I69Y sollte durch eine zusätzliche protische Funktion über dem Substrat eine selektive Protonierung nach verändertem Bindungsmodus durch eine zweite Mutation sicherstellen. Die anderen getesteten Varianten zeigten Wildtyp-analoge Selektivität (C26G, Y28F, Y28A) oder keinen Umsatz (A60H, A60H/H167A) (**Abbildung 24**).

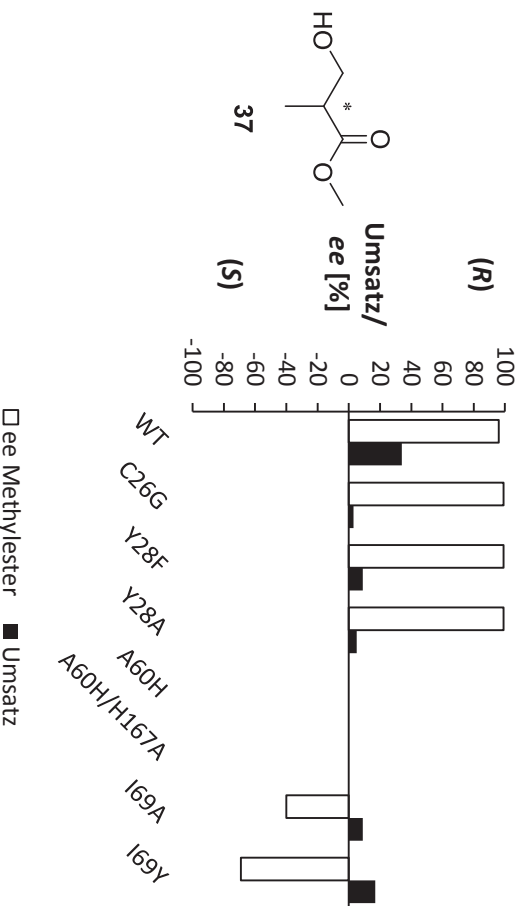


Abbildung 24: Umsatz und Enantiomerenüberschuss der Bioreduktion von *Roche*-Ester-Vorläufer **36** zum

Roche-Ester (**37**), katalysiert durch YqjM WT und sieben YqjM-Varianten aus den Vorarbeiten.

Daher wurden die Mutationen für I69A und I69Y im Folgenden mit den bereits erstellten erwiesenermaßen selektivitätsbeeinflussenden Einfach-Varianten C26N, C26H und H167A kombiniert. Somit wurden fünf neue YqjM-Varianten erhalten: C26H/I69A, C26H/I69Y, H167A/I69A, H167A/I69Y und C26N/I69A. Das Plasmid mit der Mutation für C26N/I69Y konnte trotz Nutzung unterschiedlicher Mutagenesemethoden nicht erstellt werden. Die fünf neuen YqjM-Varianten sowie I69A und I69Y wurden mit den bekannten fünf Screeningsubstraten (**Schema 33**) im optimierten Standard-Assay bei pH 7.5 analysiert. Selektivität und Umsatz der Bioreduktionen zum *Roche*-Ester **37**, zu den hydroxygeschützten Methylestern **95** und **96** und zu den beiden Keto-Verbindungen **108** und **110** sind in **Abbildung 25** jeweils in einem Säulendiagramm dargestellt. Die Daten dazu sind in **Tabelle 41** und **Tabelle 42** im Experimentaltelteil enthalten.

Bei Umsetzung der optimierten Substrate **106**, **109** und **92** zu den Reduktionsprodukten **108**, **110** und **95** mittels I69A und I69Y wurde, wie zuvor im Fall des *Roche* Esters **37**, ein Einfluss auf die Selektivität festgestellt. So wurde verringerte (*R*)-Selektivität für das für das 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**) und den reduzierten Benzylester **95** gefunden, das Ethylketon **110** ergab sogar moderate (*S*)-Selektivität. Nur bei der Bioreduktion des allylgeschützten Esters **93** zu **96** zeigte sich fast vollständig erhaltene Wildtyp-Selektivität mit einem Enantiomerenüberschuss von 94–9Tab % (*R*). Zusätzlich wurde für die beiden I69-Varianten in allen Fällen erhöhte Aktivität im Vergleich zur ersten Reihe von Enzymvarianten festgestellt. Mittels der erstellten Zweifach-Varianten konnten für drei Substrate, nämlich den ungeschützten Methyl ester **36**, die Benzyl-geschützte Variante **92** und das Ethylketon **109** Reaktionen mit ≥ 90 % Enantiomerenüberschuss komplementär zum Wildtyp erreicht werden. Für ersteres erfüllten sogar drei verschiedene Doppelmutanten dieses Kriterium (C26N/I69A, H167A/I69Y and H167A/I69A) und fast alle kombinierten Einzelmutationen zeigten additives oder mehr als additives Verhalten.^[103] Für das Methylketon **106** zeigte nur eine dieser Varianten (C26N/I69A) moderate (*S*)-Selektivität von 68 % *ee*. Die gleiche Mutante zeigte mit 94 % *ee* (*S*) auch das beste Screening-Ergebnis für die Umsetzung zum Ethylketon **110**. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der neue Bindungsmodus in diesem Fall

durch *van der Waals*-Wechselwirkungen mit dem neu eingeführten unpolaren Alkylrest zu Stande kommt.

Im Gegensatz dazu haben für die Hydroxyl-geschützten Ester-Substrate **92** und **93** die Enzymvarianten H167A/I69A und H167A/I69Y den größten Einfluss auf die Stereochemie. Diese Varianten ergaben für das allylische Substrat **93** racemisches Produkt bzw. 11 % *ee* (S)-**96**, bei Umsetzung des Benzyl-substituierten Substrats **92** konnte mit beiden Enzymen sehr hohe komplementäre Selektivität von 90 % *ee* (S) erreicht werden. Durch Docking-Studien konnte gezeigt werden, dass sich durch den Austausch von Isoleucin 69 ein Hohlraum bildet, der dann durch die Allyl- und bevorzugt die Benzylgruppe eingenommen werden kann (**Abbildung 26**).

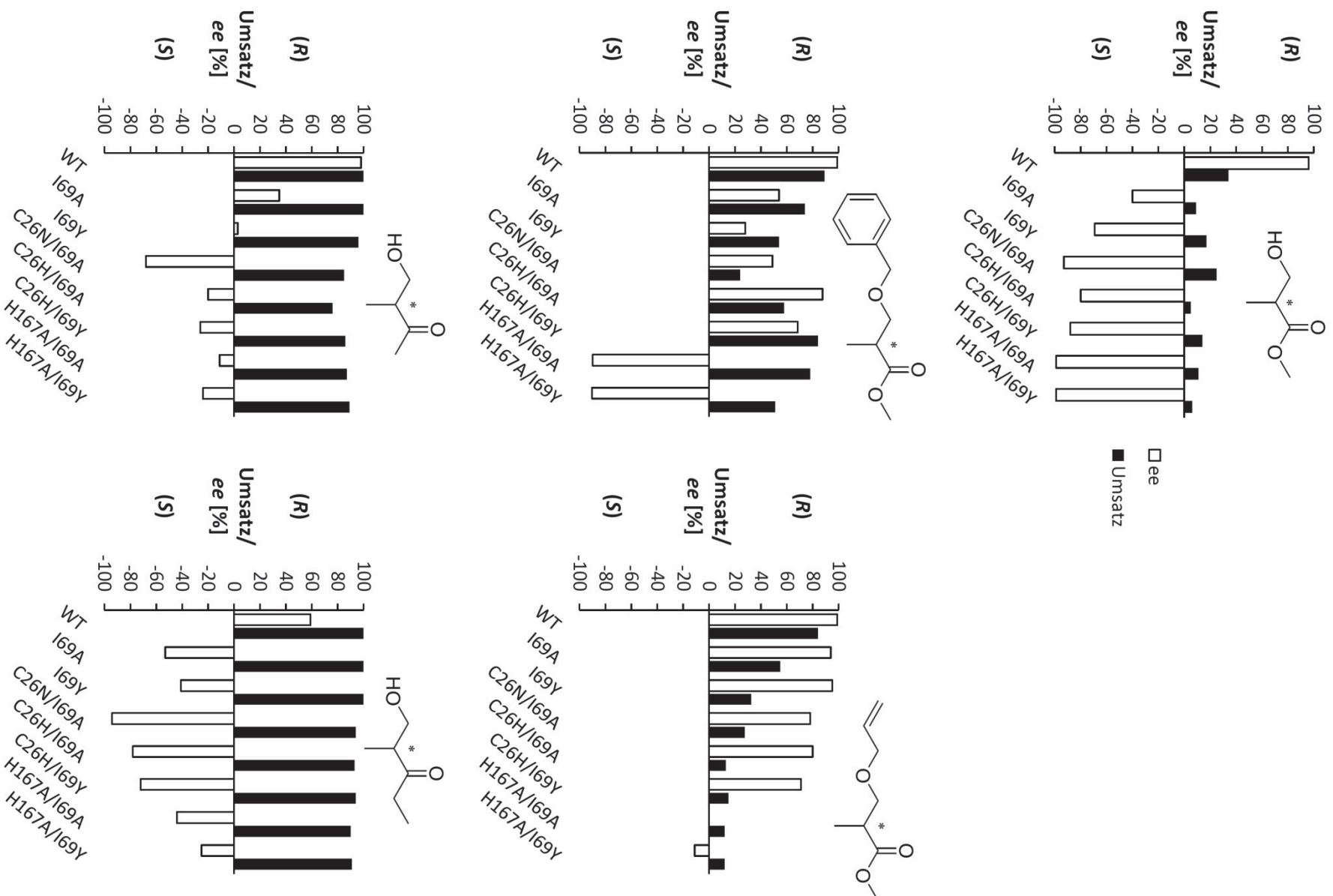


Abbildung 25: Umsatz und Enantiomerenüberschuss bei Bioreduktion der Screening-Substrate zu den Produkten **37**, **95** und **96**, **108** und **110** mittels YqjM WT und I69-YqjM-Varianten.

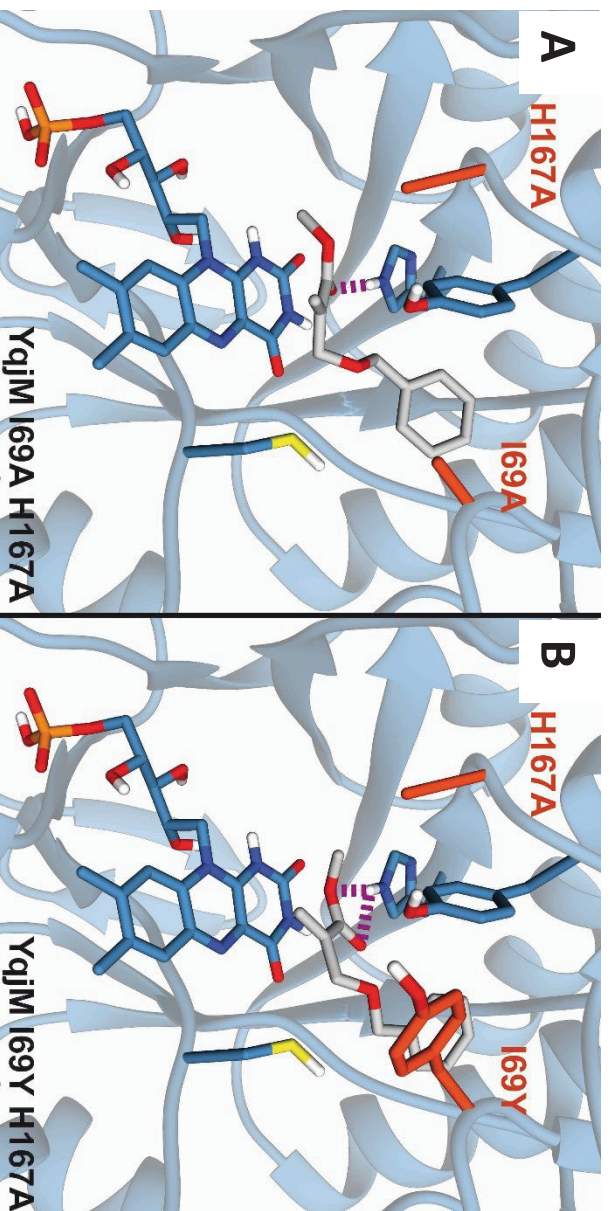


Abbildung 26: Darstellung der durch *In-silico*-Docking identifizierten möglichen Bindungsmodi des Benzyl-substituierten Methyl-ester-Substrats **92** **A:** im aktiven Zentrum von YqjM 169A/H167A und **B:** im aktiven Zentrum von YqjM 169Y/H167A.

Der zusätzliche Verlust einer Wasserstoffbrücke zu H167 macht einen geflippten Bindungsmodus in der Nähe des Hohlräume möglich. Zudem wird Bindungsenergie durch hydrophobe Interaktionen gewonnen. Dieser Sachverhalt ist für die im Vergleich zu Alanin sehr große Aminosäure Tyrosin trotzdem analog, da das Tyrosin in YqjM 169Y/H167A eine abgewinkelte Konformation einnimmt (**Abbildung 26 B**). Da H167A/169A und H167A/169Y für alle Substrate einen ähnlichen Effekt auf die Stereoselektivität haben, ist diese Erklärung eher wahrscheinlich als die ursprünglich angenommene Funktion von 169Y, einen beschleunigenden und selektivitätfördernden Effekt auf die Protonierung zu haben.

Insgesamt konnten durch die zweite Reihe von Mutanten für drei von fünf Substraten YqjM Varianten mit $\geq 90\%$ *ee* Wildtyp-komplementärer Selektivität gefunden werden. Diese zeigen alle besseren Umsatz als die zuerst gefundene komplementäre Variante C26N/H167A (C26N/169A - **36**: 25 %, C26N/169A - **109**: 94 % und H167A/169A - **92**: 78 % statt 10 % Umsatz für **36** - C26N/H167A) und wurden daher im Folgenden auf ihre Nutzbarkeit in präparativen Umsetzungen getestet.

7.2.4 Präparative Bioreduktionen mit YqjM-Wildtyp und Varianten

Um die synthetische Anwendbarkeit der erhaltenen Enzym-Substrat-Kombinationen zu zeigen, wurden präparative Umsetzungen mit den besten Paarungen durchgeführt. Für den Roche-Ester-Vorläufer **36** wurden YqjM Wildtyp [96–99 % *ee* (*R*) im Screening] und die aktivste Enzymvariante mit $>90\%$ *ee* (*S*)-Selektivität (C26N/169A) ausgesucht. Im Fall des Allylesters **93** sowie der Ketosubstrate **106** und **109** war jeweils nur eine Kombination aus dem Screening vielversprechend (WT - **93**; WT - **106**; C26N/169A - **109**). Präparative Bioreduktionen des benzyllischen Substrats **92** wurden mittels der beiden gleichermaßen hoch (*S*)-selektiven Varianten H167A/169A und H167A/169Y durchgeführt. Es wurde jeweils 1 mmol Substrat in 10 oder 20 mL K_P umgesetzt. Im Unterschied zu den analytischen Umsetzungen wurde der pH-Wert mittels eines pH-Statens konstant gehalten (**Abbildung 27**). Dies ist notwendig, da durch das Cofaktorrecyclingsystem Glukose/GDH im Verlauf der

Reaktion Glukonsäure gebildet wird und somit der pH ohne Gegensteuerung absinken würde.



Abbildung 27: Versuchsaufbau für präparative YqjM-katalysierte Biorreduktionen mittels pH-Stat.

Zusätzlich wurden die Kolben mit Argon überschichtet und mit einem Argon gefüllten Ballon versehen, da Sauerstoff die Enzyme substratunabhängig reoxidieren kann.

Die Ergebnisse der präparativen Umsetzungen sind in **Tabelle 14** dargestellt. Für den ungeschützten Ester **36** wurde mit einer Selektivität von 90 % *ee* das (R)- (YqjM WT) und mit 85 % *ee* das (S)-Produkt (C26N/169A) isoliert. Die Ausbeuten waren für die Umsetzungen mit Wildtyp und Enzymvariante ähnlich (47 % und 44 %). Die geschützten Ester-Substrate ergaben die Produkte in Selektivitäten von >99 % *ee* (R) (Allyl **93** - WT) bzw. 77 % *ee* (S)- Selektivität (Benzyl **92** - H167A/169A) bei 50 % bzw. 10 % Ausbeute. Die niedrige Ausbeute bei Umsetzung der Benzylverbindung ist auf entstandenes unbekanntes Nebenprodukt zurückzuführen. Da die Selektivität dieser Reaktion mit 77 % *ee* (S) ebenfalls geringer war als erwartet, wurden keine weiteren Optimierungen durchgeführt. Die präparative Umsetzung mittels YqjM H167A/169Y ergab eine noch geringere Selektivität von 55 % *ee* (S) bei einem Umsatz von 60 % und wurde daher ebenfalls nicht weiter verfolgt. Die Keto-Derivate lieferten beide Stereoisomere in 93 % *ee* und in hohen Ausbeuten von 86 % (Methylketon **106** - WT) und 95 % (Ethylketon **109** - C26N/169A). Es wurde je nach Substrat eine Menge von 3–30 mg des Wildtyp-Biokatalysators und 40–160 mg der Enzymvarianten eingesetzt, wobei die Enzymzugabe sukzessive in mehreren Portionen erfolgte. Demnach setzte YqjM Wildtyp die Substrate mit einer Wechselzahl (*Turnover Number*, TON) zwischen 1300 und 13900 in allen Fällen vollständig um. Die mit Abstand höchste Zahl wurde dabei für das allylische Substrat **93** erreicht, für das eine Stereoselektivitäts-Beeinflussung durch die eingefügten Veränderungen fast nicht möglich war. Die in den Kinetiken gezeigte große Steigerung der katalytischen Effizienz der YqjM WT-Umsetzung vom Ester **36** hin zum Methylketon **106** spiegelt sich auch in der 5-fach höheren Wechselzahl wieder (Eintrag 1 und 3). Für die veränderten Enzyme sind die Wechselzahlen, wie erwartet, jeweils geringer als für den Wildtyp und liegen zwischen 248 und 878. Auch mittels der Enzymvarianten konnten jedoch hohe Umsätze von 85–100 % erreicht werden.

Tabelle 14: Präparative Bioreduktionen von Substraten **36**, **106**, **109**, **92** und **93** mittels der im Screening ermittelten jeweils vielversprechendsten Biokatalysatoren.

#	Substrat ^{a)}	YqJM-Variante	ee ^{b)} [%]	Ausbeute ^{c)} [%]	Verhältnis ^{d)} Produkt: Substrat	Biokatalysator [mg]	TON ^{e)}
1	36	WT	90 (R)	47	100:0	30	1336
3	106	WT	93 (R)	86	100:0	6	6941
5	93	WT	>99 (R)	50	100:0	3	13895
2 ^{f)}	36	C26N/169A	85 (S)	44	85:15	160	248
4	109	C26N/169A	93 (S)	95	100:0	40	878
6 ^{f)}	92	H167A/169A	77 (S)	10	95:5 ^{g)}	100	400

- a) Umsetzung von jeweils 1 mmol Substrat.
 b) Bestimmt *via* GC mittels Referenzmaterialien. Der Stereodeskriptor des bevorzugt gebildeten Enantiomers ist in Klammern angegeben.
 c) Bei unvollständigem Umsatz sind die Ausbeuten auf das Gemisch aus Produkt und verbliebenem Startmaterial bezogen, das jew. in der Spalte Verhältnis angegeben ist.
 d) Bestimmt *via* ¹H-NMR.
 e) Molekulargewicht von YqJM: 39.7 kg mol⁻¹.
 f) Reaktion durchgeführt bei pH 6.5 statt 7.5 und in nur 10 mL Puffer.
 g) Zusätzlich entstand ein unbekanntes Nebenprodukt.

Bei Betrachtung der erreichten Selektivitäten fällt auf, dass die Stereoselektivitäten aus den Reaktionen im analytischen Maßstab teils nicht vollständig reproduziert werden konnten. So konnte zum Beispiel für den ungeschützten *Roche*-Ester **37** nur 90 % *ee* (R) (WT) und 85 % *ee* (S)-Selektivität (C26N/169A) erreicht werden statt jeweils über 90 % *ee*, wie zuvor im Assay. Erklärungsansätze für diesen Unterschied sind die im präparativen Maßstab höhere Substratkonzentration (6–20 mg mL⁻¹ statt 1 mg mL⁻¹) und der nicht kontrollierte pH-Wert im kleinen Maßstab. Dass kleine Veränderungen im Cofaktorrecycling einen Einfluss auf die Stereoselektivität haben können, wurde schon in verschiedenen Studien gezeigt.^[54a, 99] Für das Methylketon konnte durch Inkubation des Produkts unter Assaybedingungen (pH 7.5) ohne Enzym gezeigt werden, dass der *ee*-Wert dabei von 93 % *ee* (R) auf 88 % *ee* (R) sinkt. Eine zu lange Reaktionsdauer ist also in Hinsicht auf einen hohen Enantiomerenüberschuss nicht zu empfehlen. Insgesamt konnten jedoch sowohl die Ester- als auch die Keto-Verbindungen in beiden Konfigurationen in guter bis exzellenter Selektivität erhalten werden.

7.2.5 Erweiterung des Substratspektrums

Um die Bandbreite der Nutzbarkeit der vielversprechendsten YqJM-Varianten (C26N/H167A, C26N/169A, C26H/169A, C26H/169Y, H167A/169A, H167A/169Y) zu testen, wurden vier weitere α,β -ungesättigte Ester hinsichtlich eines Einflusses der Mutationen auf ihre Stereopräferenz untersucht: Das phenylsubstituierte Acrylsäurederivat **57** (R = H), drei verschiedene Ethylester mit dreifach- bzw. vierfach-substituierter Doppelbindung [2-Methyl-4-oxopent-2-ensäureethylester (**48**), 3-Methyl-2-oxopentensäureethylester (**44**) und der 2,3-Methyl-4-oxopent-2-ensäureethylester (**50**)]. Zusätzlich wurde das strukturell stark abweichende Nitro-aktivierte Olefin (*E*)-1-Nitro-2-phenylpropen getestet (**34**, **Abbildung 28**).

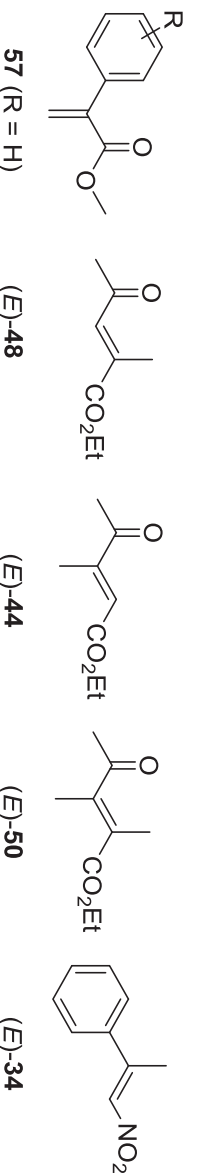


Abbildung 28: Strukturen der Substrate, anhand derer die Generalisierbarkeit der Selektivitäts-beeinflussenden Wirkung der YqjM-Varianten getestet wurde.

Alle fünf sind bekannte YqjM-Substrate, für die, wie im Kenntnisstand beschrieben, schon Studien zur YqjM-Selektivität durchgeführt worden sind.^[66, 70] Zur Herstellung der (S)-konfigurierten Produkte aus **57** und **48** ist derzeit keine OYE-katalysierte Bioreduktion bekannt. Aus (E) -**50** kann mittels YqjM WT das (2*R*, 3*S*)-Produkt erhalten werden. Die stereoisomeren Reduktionsprodukte aus **44** sind durch Nutzung der *E/Z*-isomeren Formen des Substrats erhältlich. (E) -**34** wird von OPR 1 und OPR 3 zu den enantiomeren C=C-Reduktionsprodukten (*R*)- bzw. (*S*)-**35** umgesetzt.

Die Ergebnisse des Screenings der ersten drei Estersubstrate mit den YqjM Varianten sind in **Abbildung 29** aufgeführt. Auf den Bindungsmodus des phenyl-substituierten Acrylsäureesters **57** konnte kein Einfluss festgestellt werden. Alle Katalysatorvarianten bewirken eine Bildung der Produkte in nahezu vollständiger (96 – >99 %) WT-(*R*)-Selektivität. Die dreifach substituierten Olefine **44** und **48** zeigen – obwohl in stark verringertem Ausmaß – ein ähnliches Verhalten wie Methyl ester **36**. Die gleichen drei Enzymvarianten (C26N/169A, H167A/169A und H167A/169Y), die dort den größten Einfluss zeigten, ergaben auch hier Reduktionsprodukte mit signifikant verändertem Enantiomerenüberschuss.

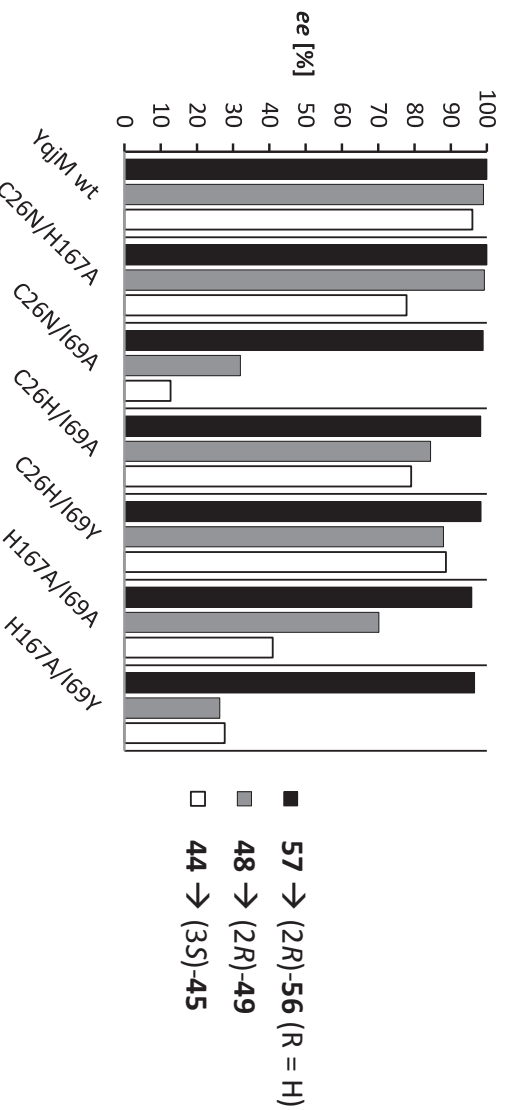


Abbildung 29: Stereoselektivität der Bioreduktionen von Substraten **57**, **48** und **44** mittels YqjM und den zuvor erfolgreich getesteten YqjM-Varianten.

Die Ergebnisse der Umsetzungen des (E) -konfigurierten vierfach olefinisch substituierten Esters **50** sind in **Abbildung 30** dargestellt. Hier können vier Diastereomere entstehen. Bei Katalyse mittels YqjM WT konnte die von Classen *et al.* gezeigte Bildung des *anti*-(2*R*, 3*S*)-Diastereomers **51** reproduziert werden.^[66] Bei Nutzung der Katalysatorvarianten entsteht zusätzlich in geringem Ausmaß eines der *syn*-Diastereomere, ein Stereozentrum bleibt in

allen Fällen unverändert. Der Enantiomerenüberschuss liegt somit für beide Enantiomerenpaare bei >99 %, der Diastereomerenüberschuss (*de*) variiert zwischen 69 und 99 % *anti*-(2*R*, 3*S*). Insgesamt ist der Einfluss auf den Bindungsmodus hier geringer als für **44** und **48**.

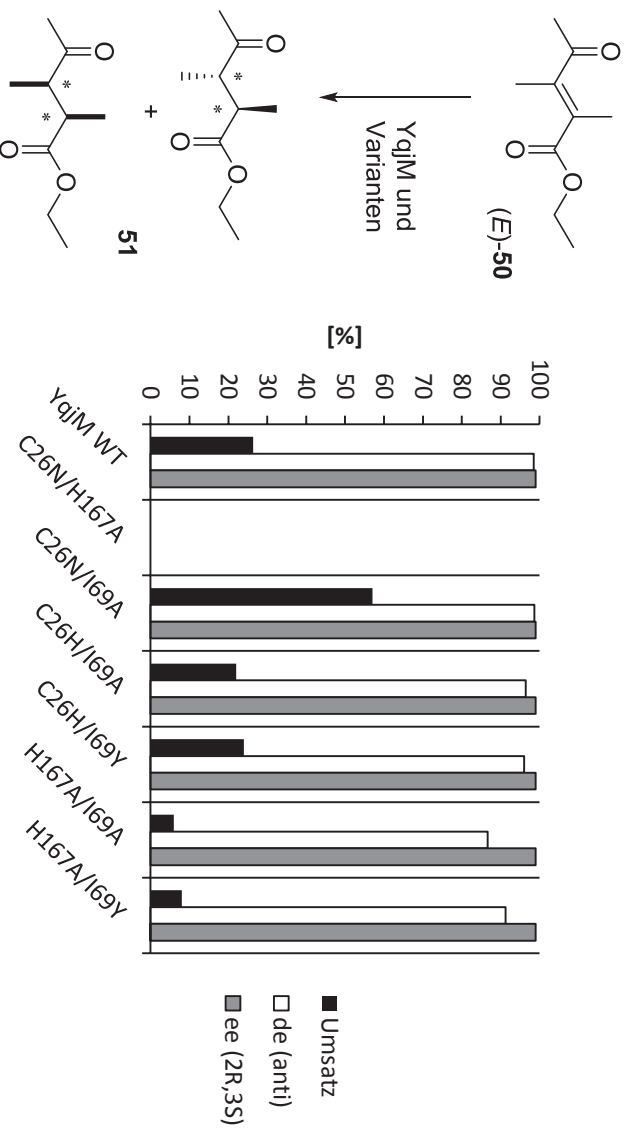


Abbildung 30: Umsatz und Stereoselektivität der Bio-reduktion von **50** mittels YqjM und den zuvor erfolgreich getesteten (S)-selektiven YqjM-Varianten.

Der Einfluss auf nur eines von zwei Stereozentren ist interessant, da dies nicht durch einen vollständig geflippten Bindungsmodus des Substrats im aktiven Zentrum hervorgerufen werden kann. Eine weniger selektive Protonierung oder eine *E/Z*-Isomerisierung des diastereomerenreinen Substrats (*E*)-**50** hätten zum Beispiel diesen Effekt. Auf letzteres gibt es einen Hinweis: Für die Umsetzungen mittels der Enzymvarianten wird – anders als bei der Bio-reduktion mit dem Wildtypenzym – jeweils eine geringe Menge (0,3–1 %) des (*Z*)-Isomers im Chromatogramm detektiert.

Ein Einfluss auf die Selektivität bei Bio-reduktion des strukturell stark von allen anderen Substraten abweichenden β -disubstituierten Nitroolefins (*E*)-**34** war nicht möglich. Es zeigte sich gleichbleibend hohe (*S*)-Selektivität (>99 % *ee*), bei Bildung vieler Nebenprodukte. Verbessert werden konnte durch die Nutzung der Enzymvarianten jedoch die Chemo-selektivität der Reaktion. YqjM WT bildet nur zu einem Anteil von 5 % das postulierte C=C-Reduktionsprodukt **35**. Das stattdessen gebildete Hauptprodukt verschwindet bei Umsetzung mit den Enzymvarianten ganz. Der Anteil von **35** am gesamten gebildeten Produkt wird von 5 % (WT) auf bis zu 47 % (C26H/I69Y) gesteigert. Die Nebenprodukte bei der YqjM-katalysierten Umsetzung von (*E*)-**34** sind vermutlich auf Nitroreduktase-Aktivität oder der *Nef*-Reaktion analoge Aktivität von YqjM zurückzuführen. Für andere Enreduktasen wurde, wie im Kenntnisstand beschreiben, beides schon berichtet.

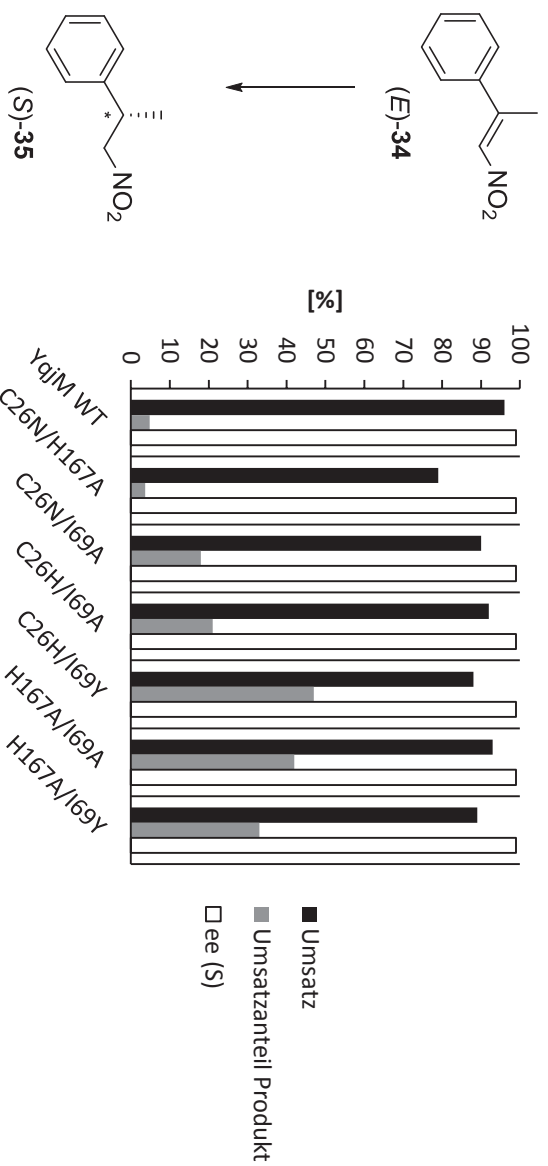


Abbildung 31: Umsatz und Stereoselektivität der Bioreduktion von (E)-34 mittels YqjM und den zuvor erfolgreich getesteten (S)-selektiven YqjM-Varianten.

Nach analytischen Tests zur Bioreduktion von sechs weiteren Substraten mittels der vielversprechendsten Enzymvarianten wurde also in zwei Fällen [(E)-48, (E)-44] ein signifikanter Einfluss auf die Stereoselektivität festgestellt. Beide Substrate enthalten eine Esterfunktion und drei olefinische Substituenten. Obwohl keine komplementäre Selektivität im Vergleich zum Wildtyp erreicht werden konnte, kann diese Veränderung ein fortgeschrittener Startpunkt für eine weitere Optimierung sein.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es sinnvoll ist die gefundenen Mutationen zu testen, wenn enantiokomplementäre Bioreduktionen strukturell verwandter Substrate benötigt werden. Kleinste Veränderungen im Substrat können jedoch, wie schon von Jon Stewart festgestellt,^[11] den Einfluss der neu eingeführten Wechselwirkungen komplett zu Nichte machen. Dies wird besonders für den Profenvorläufer 57 oder den allylgeschützten Roche-Ester-Vorläufer 93 im Vergleich zum Benzylsubstrat 92 deutlich. Auffällig ist, dass diese Substrate im Vergleich zu den anderen bei gleicher eingesetzter Enzymmenge höheren Umsatz zeigen, und somit scheinbar mit erhöhter Bindungsaffinität die Möglichkeit die Selektivität zu ändern schwieriger wird. In welcher Weise sich strukturell entferntere Substrate, wie cyclische Strukturen oder Olefine mit Aldehyd- oder Nitrilgruppen zur Aktivierung und ähnlichem Substitutionsmuster verhalten, muss noch untersucht werden.

7.2.6 Vergleich mit anderen Mutagenesestudien zur Stereoselektivität von OYES

Um Einblick zu erhalten, ob die in dieser Studie erfolgreich für YqjM angewandten Mutationen generell zur Stereoselektivitätsänderung in OYES genutzt werden können, sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Zur Analyse der vorhandenen Daten sind in **Tabelle 15** die Mutagenesepositionen aus dieser Arbeit (H167, I69 und C26 in YqjM) mit den veränderten Aminosäurepositionen aus vorhergehenden Mutagenesestudien in Bezug gesetzt. In diesen Studien wurden stereokomplementäre Enzymvarianten von OYE 2.6,^[36] OYE 1,^[14, 62] YqjM^[63] bzw. PETN-Reduktase erhalten.^[99]

Tabelle 15: Überblick zu Aminosäurepositionen, die in Enreduktasen die Stereoselektivität der Biorreduktion von **36** (fett gedruckt) oder anderer Substrate beeinflussen, und analoge Positionen in homologen Enzymen. Die für das Alignment genutzten Proteinstrukturen stammen aus der PDB: YqjM (1Z4Z),^[56] OYE 1 (3TX9),^[111] OYE 2.6 (3TJL),^[36] PETN Reduktase (1H50)^[99], die genutzte Software ist UCSF Chimera.

#	Enzym			Spezifische Mutation ^{a)} -Substrat		
	YqjM	OYE 1	OYE 2.6	PETNR	Literatur	diese Studie
1	169	Y82 ^{b)}	Y78^{b)}	Y68 ^{b)}	Y78W- 36 , ^[36] I69T- 40 ^[63]	I69A/Y
2	C26	T37	T35	T26	C26D/G- 40 , ^[63] T26S-(E)- 34 ^[99]	C26N/H
3	H167	N194	H191	H184	-	H67A
4	A104	W116	I113	W102	W116H/Q- 36 , ^[62] W116I-(S)- 38 , ^[111] I113V/C- 36 ^[36]	-
5	-	F250	F247	F240	F247A/H- 36 ^[36]	-
6	A60	G72	A68	A58	A60V- 40 ^[63]	-

- a) Mutation, die (allein oder in Kombination) die Stereoinvertion für das gezeigte Substrat bewirkt.
 b) Alignment anhand der 3D-Struktur anstatt der Primärsequenz.

Diese Gegenüberstellung zeigt, dass Mutationen an Positionen analog zu 169 und C26 bereits OYE-Varianten komplementärer Selektivität bezüglich der Biorreduktion von 3-substituierten Cyclohexenonen (**40**), (S)-Carvon (**38**), (E)-2-Phenyl-1-nitropropan (**34**) und auch Roche-Ester-Vorläufer **36** ergeben haben. Ihre Nutzbarkeit wurde nun unter Einführung anderer spezifischer Aminosäuren auch für die Biorreduktionen der hier vorgestellten Baylis-Hillman-Addukte demonstriert. Die H167-Mutationsstelle wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal erfolgreich zur Stereoinvertion einer Enreduktase aus der OYE-Familie angewandt.

7.2.7 Zusammenfassung und Fazit

Insgesamt wurden mittels der verfolgten rationalen Mutagenese-Strategie erfolgreich synthetisch nutzbare YqjM-Varianten mit hoher dem Wildtyp entgegengesetzter Stereopräferenz in der Biorreduktion der untersuchten *Morita–Boylis–Hillman*-Addukte erhalten. Durch das innovative Konzept-basierte Vorgehen – inklusive der teilweisen Beschädigung des aktiven Zentrums durch Mutation der Aminosäure H167 – wurde der Mutagenese-Aufwand im Vergleich zur Sättigungsmutagenese (19 Varianten pro Aminosäureposition) und gerichteter Evolution (>1000 Klone)^[104] bedeutend reduziert. Nur 17 Einzel- und Doppel-Varianten mussten generiert und bezüglich ihrer Stereopräferenz untersucht werden, um für drei von fünf strukturell verwandten Substraten (**36**, **109** und **92**) Enzyme mit komplementärer Stereoselektivität (90–99 % *ee*) zum WT zu finden. Die vorgeschlagenen strategischen Einzelmutationen beeinflussten die Stereoselektivität in fünf von neun Fällen (C26N/H, H167A, I69A/Y). Zwei der drei selektivsten stereokomplementären YqjM-Varianten aus dem Screening (C26N/I69A, H167A/I69A und H167A/I69Y) enthalten die Mutation H167. Durch *in silico* Docking konnten plausible Bindungsmodi gefunden werden, die den – entsprechend dem Konzept des „rotierten Flips“ postulierten – zusätzlichen Rotationsfreiheitsgrad enthalten, der eine grundsätzlich neue Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum möglich macht. Ein Vergleich der drei erfolgreich veränderten Aminosäurepositionen mit denen aus vorhergehenden Studien zu OYEs zeigt, dass

Mutationen an Positionen 169 und C26 schon zuvor Enzymvarianten mit WT-entgegengesetzter Selektivität für 3-substituierte Cyclohexenone **40** und *Roche*-Ester-Vorläufer **36** ergaben. Diese Positionen haben nun ihre Anwendbarkeit im Kontext bestimmter hier genutzter *Morita–Boylis–Hillman*-Addukte gezeigt, was die Bandbreite an generell hilfreichen Mutationsstellen bei der Selektivitätsänderung von OYEs erweitert.

Ein Screening eines breiteren Substratspektrums mit den besten Enzym-Varianten ergab keine weiteren Bioreduktionen mit Wildtyp-entgegengesetzter Stereoselektivität, jedoch ähnliche Trends der Enantiomerenüberschüsse bei Umsetzung der dreifach-substituierten strukturell verwandten Substrate (*E*)-**44** und (*E*)-**48**.

Außerdem konnte die synthetische Nutzbarkeit der vielversprechendsten Bioreduktionen aus dem Screening für das gezeigte Substratspektrum aus geschützten und ungeschützten *Morita–Boylis–Hillman*-Addukten (**36**, **106**, **109**, **92** und **93**) mit YqjM WT und Varianten im präparativem Maßstab gezeigt werden. Es konnten alle fünf strukturell verwandten Produkte mit (*R*)- oder (*S*)-konfiguriertem Stereozentrum in 77–99 % *ee* und bis zu 95 % Ausbeute erhalten werden. Alle erhaltenen Produkte sind weit verbreitet chirale synthetische Intermediate und können mit dem vorgestellten chemoenzymatischen Ansatz in zwei (**37**, **108**, **110**) oder vier (**96**, **95**) Reaktionsschritten aus einfachen nicht-chiralen Startmaterialien hergestellt werden.

7.3 Enzymkaskaden

Um multifunktionalisierte, asymmetrische Strukturen aufzubauen, sind entsprechend der klassischen organischen Synthese oft viele einzelne Syntheseschritte, inklusive Schutzungs- und Entschützungsverfahren, notwendig. Insbesondere Aufarbeitung und Reinigung der Zwischenstufen führen dabei zu einem großen Zeit- und Ressourcenaufwand. Schaut man sich im Vergleich dazu die Biosynthese komplexer Naturstoffe an, findet man in vielen Fällen sequentielle Transformationen zum Aufbau komplexer Strukturen. Eine sequentielle Transformation ist nach Tietze *et al.* eine Abfolge von Reaktionsschritten, bei der ohne Isolierung der Intermediate mehrere Bindungen geknüpft oder gebrochen werden.^[105] Beispiele dafür sind die Biosynthesen von Alkaloiden, Terpenen und Steroiden.^[106] Dabei kommen jeweils mehrere Biokatalysatoren unter denselben Bedingungen zum Einsatz und diese katalysieren mehrere Umwandlungsschritte ohne Isolierung einer Zwischenstufe. Solche auch als Enzymkaskaden bezeichneten Transformationen, werden in der chemischen Synthese in sogenannten Eintopf-Reaktionen realisiert.

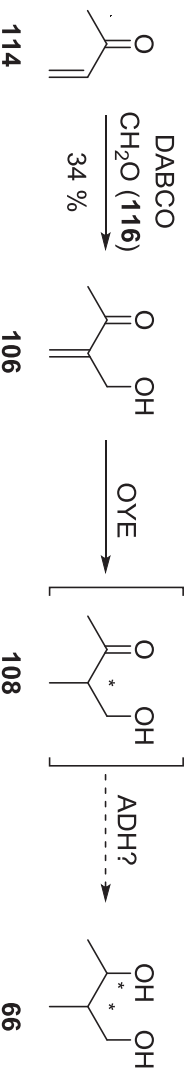
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Kombinationen von Enzymen in einer Enzymkaskade getestet. Zum einen sollte, aufbauend auf Substrat **106** aus **Kapitel 4.2**, mittels Enreduktase und ADH ein effizienter stereoselektiver Zugang zu 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) gefunden werden (**Kapitel 7.3.1**). Als nächstes sollte eine Enreduktase-katalysierte Reduktion mit einer Laccase-katalysierten oxidativen Arylierung in einer Eintopf-Reaktion kombiniert werden (**Kapitel 7.3.2**).

7.3.1 Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**)

Nachdem im Projekt zur Stereoselektivität der Enreduktase YqjM beide Stereoisomere des C₄-Synthesebausteins **37** (*Roche*-Ester) zugänglich gemacht werden konnten, sollte im Folgenden ein stereoselektiver Zugang zum chiralen C₅-Baustein 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) gefunden werden (**Schema 21**). Dieser kommt, wie im Kenntnisstand (**Kapitel 6.3.2**) beschrieben, in vielen Synthesen von Natur- und Wirkstoffen zum Einsatz. Die derzeit genutzten Synthesewege sind 2- bis 4-stufig, wobei insbesondere für die *syn*-Diastereomere derzeit nur 3 oder 4-stufige Synthesen bekannt sind. Zudem werden teils chirale Startmaterialien oder chirale Auxiliare, also Stereozentren in stöchiometrischer Menge, verwendet. Chirale Chemikalien sind meist teurer als achirale oder stehen nur in der nativ vorkommenden enantiomeren Form kostengünstig zur Verfügung [3-Hydroxybernsteinsäure (**83**) 25 g, D-(+): 151.80 €/ L(-): 21.60 €, Acros; 4-Benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinone (**77**) 5 g, (R): 170 €/ (S): 164 €, Sigma-Aldrich, 20.07.2016]. OYEs und ADHs sind grundsätzlich zum selektiven Aufbau der in **66** enthaltenen Stereozentren aus einem achiralen Substrat befähigt. Beide wurden außerdem schon im Rahmen von Eintopfsynthesen, gemeinsam unter denselben Reaktionsbedingungen eingesetzt.^[66, 107] Daher erschien ein Vorgehen unter Nutzung dieser beiden Biokatalysatoren in einer Enzymkaskade sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei mögliche Synthesewege zur Herstellung von **66** mittels einer solchen Eintopfreaktion getestet werden. Besonderes Augenmerk wurde bei der Versuchsplanung zunächst auf den stereoselektiven Aufbau des C-2-Stereozentrums gelegt.

Die erste Strategie (**Schema 35**) beruht auf der aus **Kapitel 7.2.4** bekannten Umsetzung von 3-Hydroxymethyl-3-buten-2-on (**106**) zu 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**) mittels YqjM WT, die dort im präparativen Maßstab mit 86 % Ausbeute und 93 % *ee* (R)-selektiv realisiert wurde. **108** sollte nun in einem weiteren Reduktionsschritt durch eine

Alkoholdehydrogenase zu **66** umgesetzt werden. Bei Durchführung der Enzymreaktionen im Eintopf könnten so beide Stereozentren in einem einzigen Syntheseschritt aufgebaut werden. Die Synthese von YqJM-Substrat **106** erfolgte einstufig aus den achiralen, kostengünstigen Edukten 3-Buten-2-on (**114**, 1 L, 184.70 €, Acros) und Formaldehyd (**115** 1 L, 37.60 € Sigma-Aldrich, 20.07.2016). Insgesamt kann dieser Syntheseweg also in zwei Stufen zum Diol **66** führen.



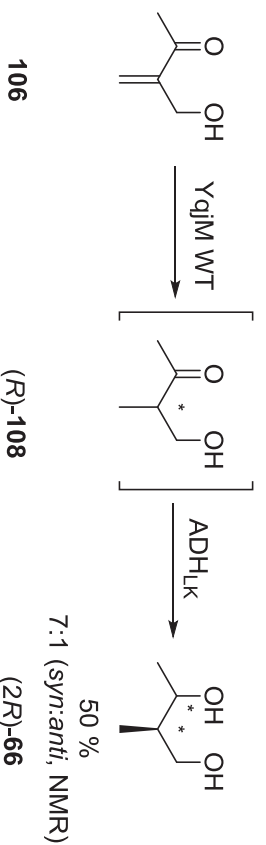
Schema 35: Angestrebter chemoenzymatischer Syntheseweg zum chiralen Synthesebaustein **66**. Beide biokatalytischen Schritte sollen im Eintopfverfahren durchgeführt werden.

Dieses grundsätzliche Konzept sollte zunächst erprobt werden. Daher wurden Testansätze durchgeführt, um eine Alkoholdehydrogenase zu finden, die die Reduktion des Bioreduktions-Produkts (*R*)-**108** zum Diol **66** katalysiert (**Tabelle 16**). In einem Test von fünf verschiedenen Alkoholdehydrogenasen konnten mit ADH_{LB}, ADH_{LK} und ADH₀₀₈ drei aktive Enzyme gefunden werden. ADH_{LK} zeigte mit 16 % den höchsten Umsatz und wurde daher für einen präparativen Versuch der Eintopfreaktion ausgewählt.

Tabelle 16: Testansätze um eine Alkoholdehydrogenase zu finden, die die Reaktion von (*R*)-**108** zu **66** katalysiert. Bedingungen: K_P, 100 mM, pH 7 (1 mM MgCl₂), 9 % (v/v) *i*-PrOH, 1 µL Substrat **108**, 0.1 mM NADP⁺, 1 U ADH. ADH_{SC} und ADH_T ergaben keinen Umsatz. Analytik erfolgte mittels GC/MS. Edukt (*R*)-**108** wurde aus der Bioreduktion von **106** mittels der Enreduktase YqJM WT mit 93 % *ee* erhalten (siehe **Kapitel 7.2.4**).

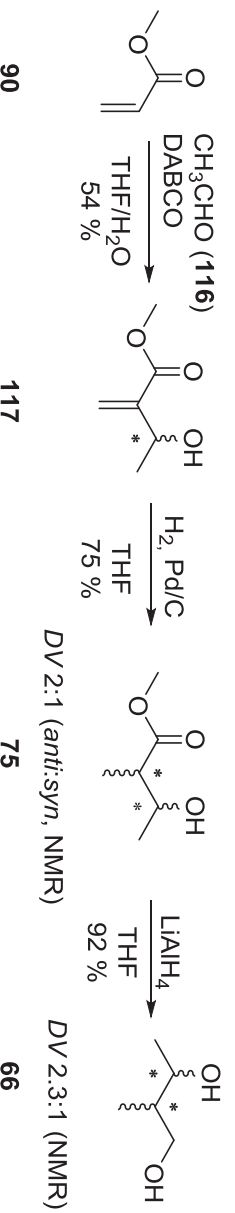
#	Enzym	Umsatz [%]
1	ADH _{LB}	8
2	ADH _{LK}	16
3	ADH ₀₀₈	2

Die präparative Umsetzung von **106** wurde mittels YqJM WT und ADH_{LK} konsekutiv als Eintopf durchgeführt und **66** wurde in einer Ausbeute von 50 % (128 mg) erhalten (**Schema 36**). Das Diastereomerenverhältnis betrug laut ¹H-NMR 7:1. Das im Überschuss vorhandene Diastereomer ist das *syn*-Diastereomer. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Eintopfsynthese gemäß **Schema 35** möglich ist. Eine höhere Stereoselektivität wäre jedoch erstrebenswert. Das erhaltene Diastereomerenverhältnis von 7:1 kann nicht allein auf die unvollständige Enantioselektivität der YqJM WT-Reduktion [93 % *ee* (*R*):(*S*)] nach [Aufarbeitung] zurückgeführt werden. Stattdessen können dazu zwei weitere Faktoren beitragen. Zum einen eine Racemisierung von Intermediat **108** im Verlauf der Reaktion, zum anderen eine unvollständige Stereoselektivität der ADH_{LK}.



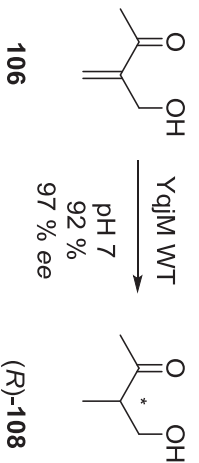
Schema 36: Eintopfreaktion mittels YqjM WT und ADH LK zur Herstellung von (2R)-66.

Um zu klären, welcher der Effekte eine Rolle spielt, sollte der Enantiomerenüberschuss beider Diastereomere ermittelt werden. Dazu wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Fischer eine Produktreferenz aller vier Stereoisomere von **66** hergestellt.^[108] Das Vorgehen dazu ist in **Schema 37** abgebildet.



Schema 37: Vorgehen zur Synthese der racemischen Referenzsubstanz aller vier Stereoisomere von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**).

In einer *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion wurde aus Acrylsäuremethylester (**90**) und Acetaldehyd (**116**) in 54 % Ausbeute der 3-Hydroxy-2-methylenbutansäuremethylester (**117**) hergestellt. Die C=C-Doppelbindung wurde im Durchfluss unter Palladium-Katalyse hydriert und der in 75 % Ausbeute erhaltene 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethylester (**75**) schließlich mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert (Ausbeute 92 %). Somit konnte das Diol **66** in 37 % Ausbeute über drei Stufen erhalten werden. Für dieses Stereoisomerengemisch wurde versucht eine Enantiomerenanalytik mittels GC zu erstellen. Dies gelang mit den in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Säulenmaterialien nicht. Daher wurden zunächst Belege für eine Racemisierung des Intermediats **108** im Reaktionsverlauf gesucht. Für dieses war eine GC-Enantiomerenanalytik vorhanden. Bei einem Inkubationsexperiment von **108** unter den Reaktionsbedingungen (Kp, 20 mM pH 7.5, 0.5 M Glukose, 5 mM NADP⁺, 1 U GDH) konnte festgestellt werden, dass eine langsame Racemisierung von **108** während der Enzymumsetzung stattfindet. Nach 24 h betrug der Enantiomerenüberschuss des eingesetzten Bioreduktionsprodukts **108** statt 93 % nur noch 88 % *ee* (*R*). Es wurde vermutet, dass ein neutraler pH-Wert die Racemisierung verlangsamen könnte und daher wurde in einer folgenden präparativen Umsetzung von **106** zu **108** mittels YqjM WT bei pH 7 gearbeitet und auch bei der Aufarbeitung darauf geachtet den pH-Wert konstant zu halten. Dazu wurde in der Aufarbeitung die Nutzung des sauren Salzes Ammoniumsulfat zur Proteinfällung vermieden. Stattdessen wurde Natriumchlorid verwendet. Auf diese Weise konnte Intermediat **108** mit 97 % *ee* nach Aufarbeitung erhalten werden. Somit konnte gezeigt werden, dass 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) in einer Eintopfreaktion ausgehend vom Methylketon **106** mit hoher (*R*)-Selektivität bezüglich des C2-Stereozentrums hergestellt werden kann.



Schema 38: Präparative Umsetzung von **106** zu **108** unter optimierten Reaktions- und Aufarbeitungsbedingungen.

Um auch die (2*S*)-Stereoisomere von **66** auf diesem Syntheseweg zu erhalten, wird ein OYE mit komplementärer Stereoselektivität benötigt. Die Stereoselektivitäten der zu diesem Zeitpunkt in unserem Labor vorhandenen OYEs bezüglich der Umsetzung von **106** zu **108** sind in **Abbildung 32** im Überblick dargestellt.

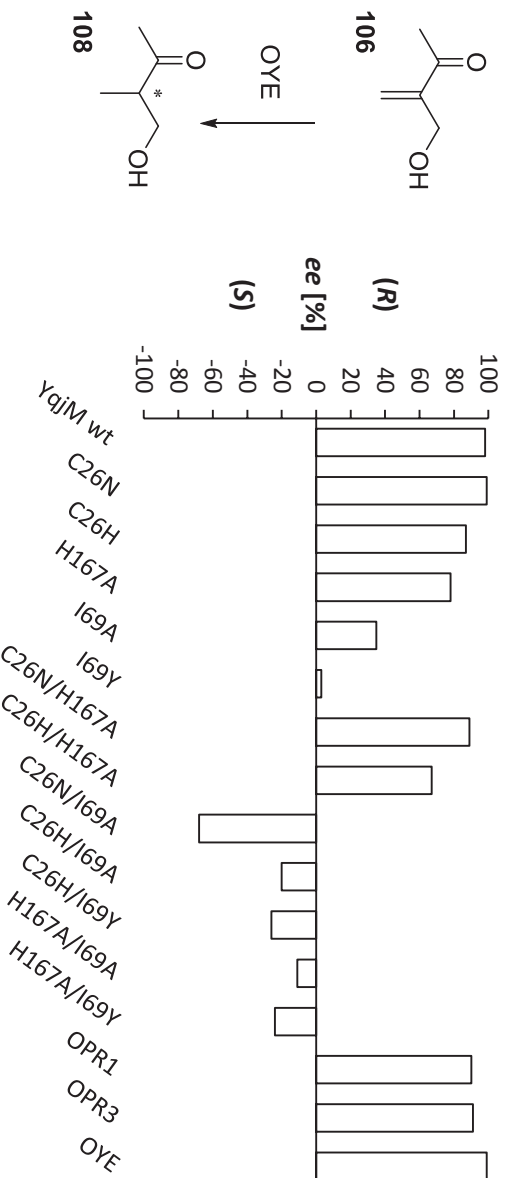
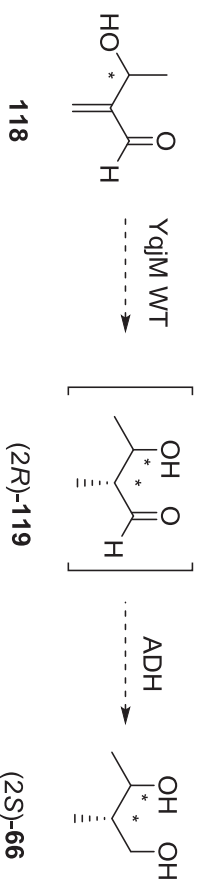


Abbildung 32: Enantiomerenüberschuss des Reaktionsprodukts **108** bei Bio-reduktion von **106** mittels verschiedener OYEs.

YqjM WT und auch die Wildtyp-Enreduktasen OPR1, OPR3 und OYE1 wiesen übereinstimmend (*R*)-Selektivität auf. Die getesteten Punktmutationen im aktiven Zentrum von YqjM zeigten, wie in **Kapitel 7.2.3** gezeigt, einen Einfluss auf die Stereoselektivität. Es konnte jedoch nur eine maximale *ent*-Wildtyp-Selektivität von 68% *ee* (*S*) erhalten werden. Dies ist für den Einsatz in Naturstoffsynthesen nicht ausreichend. Daher wurde zur Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) mit (*2S*)-Stereozentrum eine zweite Synthesestrategie vorgeschlagen (**Schema 39**). Diese beruhte im Gegensatz zu dem in **Kapitel 7.2** gewählten Weg zur Generierung stereokomplementärer Enreduktase-katalysierter Bio-reduktionen nicht auf gezielter Veränderung des Enzyms, sondern des Substrats. Statt 3-Hydroxymethyl-3-buten-2-on (**106**) sollte 3-Hydroxy-2-methylbutanal (**118**) als OYE-Substrat eingesetzt werden. Durch Bio-reduktion entsteht daraus Intermediat **119**, das im nachfolgenden Schritt mittels einer ADH zum Diol **66** reduziert werden kann.



Schema 39: Alternative Strategie zur chemoenzymatischen Synthese von (2S)-66.

Bei Katalyse des ersten Schritts mittels YqJM WT ist statt der (2R)- nun die (2S)-Konfiguration im finalen Produkt **66** zu erwarten. In **Abbildung 33** sind die Überlegungen zur Stereoselektivität der YqJM WT-katalysierten Bioreduktion von **118** im Vergleich zu derjenigen von **106** nochmals im Überblick dargestellt. Der Aldehyd **118** besitzt zwar das gleiche Kohlenstoffgrundgerüst wie das OYE-Substrat **106**, das katalytische Motiv, die α,β -ungesättigte Carbonylstruktur, ist jedoch in spiegelbildlicher Form enthalten. Die Fixierung und Aktivierung des Substrats in der Enreduktase erfolgt also auf der entgegengesetzten Seite des Kohlenstoffgerüsts und somit sollte bei Nutzung der gleichen Enreduktase die gegensätzliche Enantioselektivität bezüglich des C-2-Stereozentrums im Diol **66** erhalten werden.

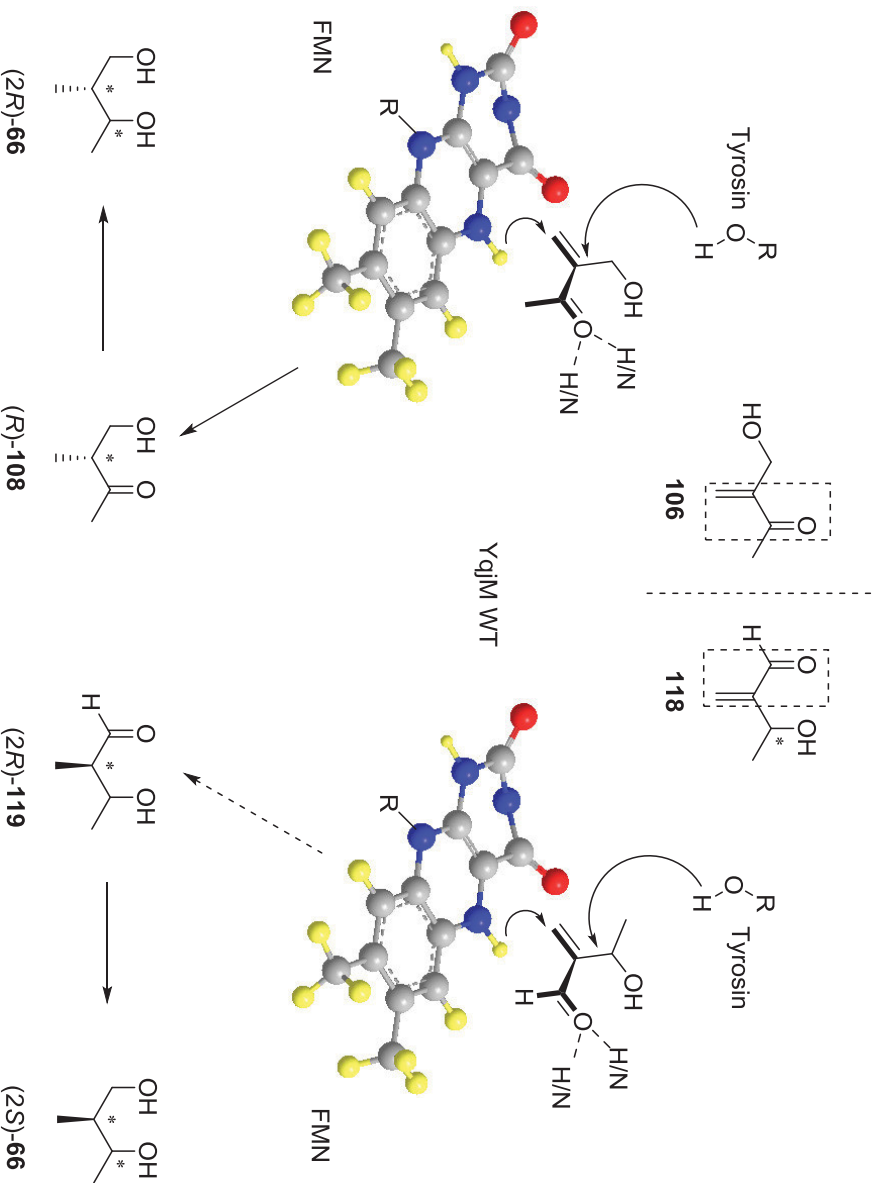


Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der beiden grundsätzlichen Synthesestrategien zur Herstellung von **66** und Veranschaulichung der Stereoselektivität in der YqJM WT-katalysierten Bioreduktion von **106** bzw. **118**. (gelb: Wasserstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, grau: Kohlenstoff).

Zur Überprüfung dieser Vorhersage wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Fischer einige Experimente unternommen.^[108] So wurde zunächst der Aldehyd **118** mittels *Morita*-

Baylis–Hillman Reaktion hergestellt und nach Optimierung bezüglich des Lösemittels in 81 % Ausbeute erhalten. In Testansätzen zur Bioreduktion von **118** mittels YqJM WT wurden jedoch eine Vielzahl von Nebenprodukten detektiert und es wurden Hinweise auf Substratinhibition von YqJM WT durch **118** gefunden. Daher wurde als Alternative zum Aldehyd **118** der entsprechende Methyl ester **117** synthetisiert (Synthese wie in **Schema 37** gezeigt) und auf Umsetzung mittels YqJM WT getestet. Das dabei entstehende Produkt der 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethyl ester (**75**) kann ebenfalls zum Diol **66** reduziert werden und die in **Abbildung 33** dargestellten Überlegungen zur Stereoselektivität der OYE-Reaktion gelten analog. Es wurde also zunächst angestrebt die vorhergesagte Stereoselektivität in der YqJM WT-katalysierten Umsetzung von **117** zu **75** zu bestätigen. Dazu wurde die Reaktion im präparativen Maßstab durchgeführt und das Produkt in 85 % Ausbeute mit einem Diastereomerenverhältnis von 1:1 erhalten. Dies deutet angesichts des eingesetzten racemischen Substrats **117** auf eine vollständige Stereoselektivität von YqJM WT für diese Umsetzung hin.



Schema 40: Präparative Bioreduktion von Methyl ester **117** mittels YqJM WT.

Zur Bestätigung dessen und zur Bestimmung der Konfiguration der Produkte wurde für das Stereoisomerenmisch von **75**, das aus der Synthese der Referenz **66** vorhanden war, eine GC-Enantiomerenanalytik erstellt. In **Abbildung 34** sind die GC-Chromatogramme der Referenzen sowie der Enzymumsetzung vergleichend dargestellt.

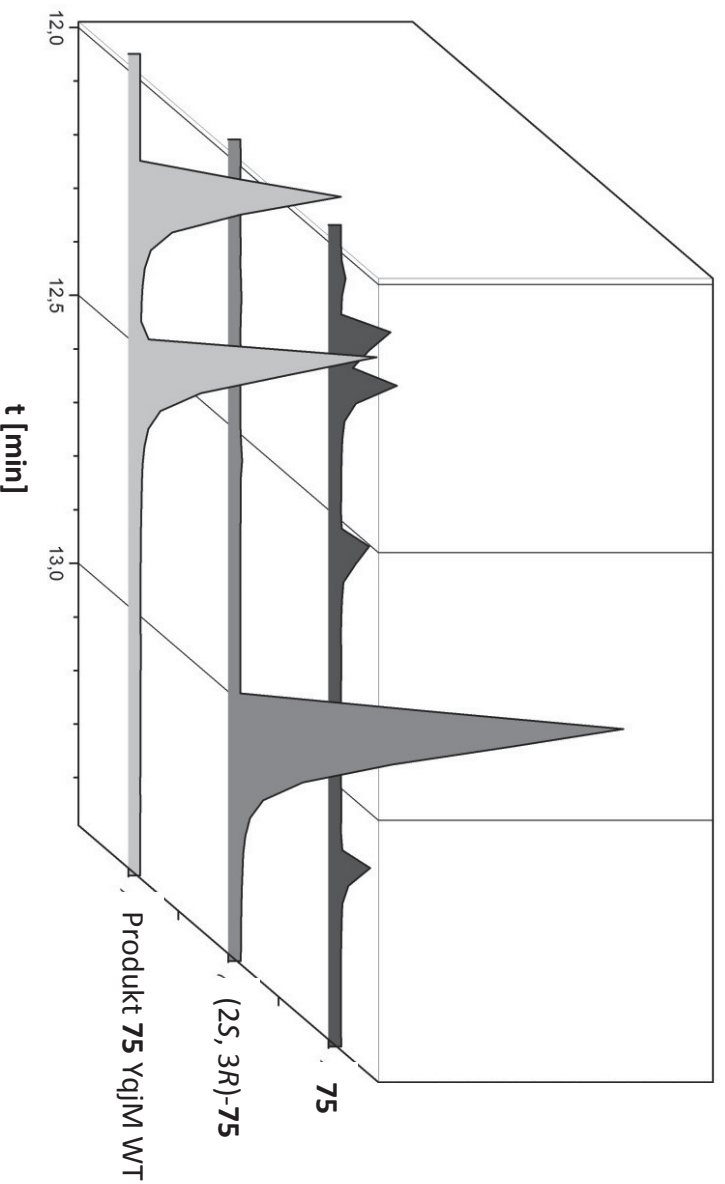
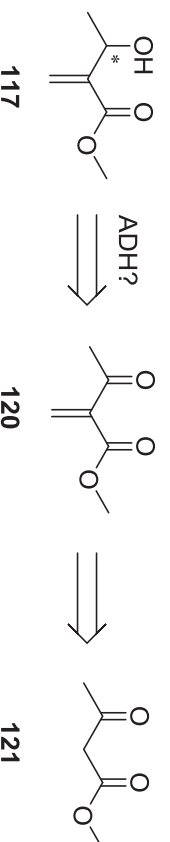


Abbildung 34: GC-Chromatogramme der racemischen Referenz des 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethyl esters (**75**), der Referenzsubstanz mit (2S, 3R)-Konfiguration und des Produkts aus der Bioreduktion mittels YqJM WT.

Die Zuordnung der GC-Signale zu *syn*- bzw. *anti*-Diastereomeren konnte entsprechend des aus dem $^1\text{H-NMR}$ bekannten Diastereomerenverhältnisses von 2:1 erfolgen. Die *syn*-Diastereomere untereinander konnten mittels einer Referenzsubstanz von **75** mit (2*S*, 3*R*)-Konfiguration exakt zugeordnet werden. Diese war von M. Ogan und Dr. R. Vahabi im Rahmen eines anderen Projekts per *Evans*-Aldol-Reaktion hergestellt worden und wurde von ihr zur Verfügung gestellt. Somit konnte die absolute Konfiguration eines der Produkte aus der Bioreduktion als (2*R*, 3*S*) bestimmt werden. Da für das zweite Stereoisomer aus der Bioreduktion sowohl bekannt ist, dass das C-3-Stereozentrum entgegengesetzt, also 3*R*-konfiguriert ist, als auch, dass es sich um ein *anti*-Diastereomer handelt, konnte es eindeutig als (2*R*, 3*R*)-**75** identifiziert werden. Die vollständige Stereoselektivität der Bioreduktion von **117** zu (2*R*)-**75** mittels YqJM WT konnte also bestätigt werden. Somit kann nun durch Reduktion der Carboxylgruppe zum Alkohol das (2*S*)-Diol **66** erhalten werden. Als Reduktionsmethode kann jedoch, anders als für den Aldehyd **118**, keine Alkoholdehydrogenase zum Einsatz kommen. Biokatalysatoren zur Reduktion der Carboxylgruppe existieren zwar, waren jedoch in der Arbeitsgruppe Pietruszka zu diesem Zeitpunkt nicht vorhanden. Wie schon zuvor in der Synthese der Referenzsubstanz **66** gezeigt (**Schema 37**) ist jedoch die chemische Reduktion von **75** mittels Lithiumaluminiumhydrid möglich.

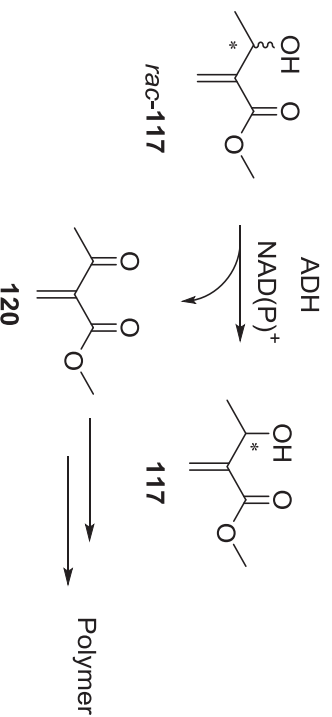
Da nun Wege zur Herstellung beider C-2-Stereozentren gefunden waren, beschäftigten wir uns im Folgenden mit der selektiven Generierung des C-3-Stereozentrums von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**). Insbesondere für den zweiten Syntheseweg, der diesbezüglich noch vollkommen unselektiv verlief war ein stereoselektiver Zugang zu C-3 noch offen. Grundsätzlich ist eine *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion analog der Synthese von *rac*-**117** (**Schema 37**) unter Nutzung eines chiralen Katalysators auch zur Synthese der enantiomerenreinen Substanz denkbar. Dies zeigte sich jedoch schon in der Literaturrecherche als schwierig, da asymmetrische Katalysatoren bisher nur für Verbindungen mit größeren Substituenten als Methyl auf Seite des Acrylsäureesters oder des Aldehyds hohe Enantiomerenüberschüsse liefern.^[109] Bei Nutzung eines Hydrazids als chirales Auxiliär kann nach Yang *et al.* bis zu 94% *ee* erreicht werden.^[110] Dies bedeutet jedoch zwei weitere Syntheseschritte zum Einbau und Entfernung des chiralen Auxiliärs und zusätzlich die Synthese des chiralen Auxiliärs selbst. Daher wurde nach einer anderen Möglichkeit zur Darstellung von **117** in enantiomerenreiner Form gesucht. Zunächst wurde überlegt vom 2-Methylen-3-oxobutansäuremethylester (**120**) auszugehen und von dort mittels ADH-Reduktion enantioselektiv zu **117** zu gelangen (**Schema 41**). Die Synthese von **120** aus 3-Oxybutansäuremethylester (**121**) nach de Fusco *et al.* gelang jedoch nicht, da die Produktsubstanz **120** unter den Reaktionsbedingungen sofort polymerisierte (siehe Bachelorarbeit L. Fischer).^[108, 111]



Schema 41: Retrosynthetische Vorgehensweise zur Herstellung des enantiomerenreinen Methylesters **117**.

Stattdessen wurde daher angestrebt sich diesen Polymerisationseffekt zu Nutze zu machen und eine kinetische Racematspaltung von *rac*-**117** unter Nutzung einer ADH durchzuführen.

Bei Oxidation von **117** mittels einer ADH würde **120** entstehen, das bei Polymerisation unmittelbar aus dem Reaktionsgemisch verschwinden wäre. Somit bliebe bei selektiver Reaktion der ADH nur eines der beiden Enantiomere von **117** zurück (**Schema 42**).



Schema 42: Vorgehen zur kinetischen Racematspaltung von *rac*-**117** durch stereoselektive ADH-katalysierte Oxidation zu **120**, welches als Polymer aus dem Reaktionsgemisch verschwindet.

Um dazu eine selektive ADH zu finden wurden elf Enzyme in Testreaktionen auf ihre Selektivität in der Oxidation von *rac*-**117** getestet. Dabei entstand, wie erwartet, in keinem Fall ein per GC detektierbares Produkt. Da zur Bestimmung der Enantioselektivität (E) eines Katalysators nach **Gleichung 2** neben dem Produkt-Enantiomerenüberschuss auch der Reaktionsumsatz benötigt wird, wurde letzterer durch Normierung der detektierten Signale auf einen im Extraktionsösemittel enthaltenen internen Standard bestimmt.

$$E = \frac{\ln((1 - US) \cdot (1 - ee_S))}{\ln((1 - US) \cdot (1 + ee_S))}$$

Gleichung 2: Gleichung zur Bestimmung der Enantioselektivität (E) eines Katalysators aus dem Substrat-Enantiomerenüberschuss (ee_S) bei einem bestimmten Umsatz (US).

Die Ergebnisse der Testansätze sind in **Abbildung 35** dargestellt. Die beiden selektivsten Enzyme ADH_{LK} (S) und ADH evo 1.1.030 (R) zeigten Enantioselektivitäten von 6 bzw. 8. Dies reicht für eine effiziente Racematspaltung nicht aus, da somit nur eine Isolierung von ca. 20 % enantiomerenreinem Substrat mittels ADH evo 1.1.030 (E = 8) möglich wäre. Das vorgeschlagene Reaktionsprinzip erscheint jedoch weiterhin praktikabel und könnte mit einer anderen, selektiveren ADH entsprechend mit höherer Ausbeute zu enantiomerenreinem OYE-Substrat **117** führen.

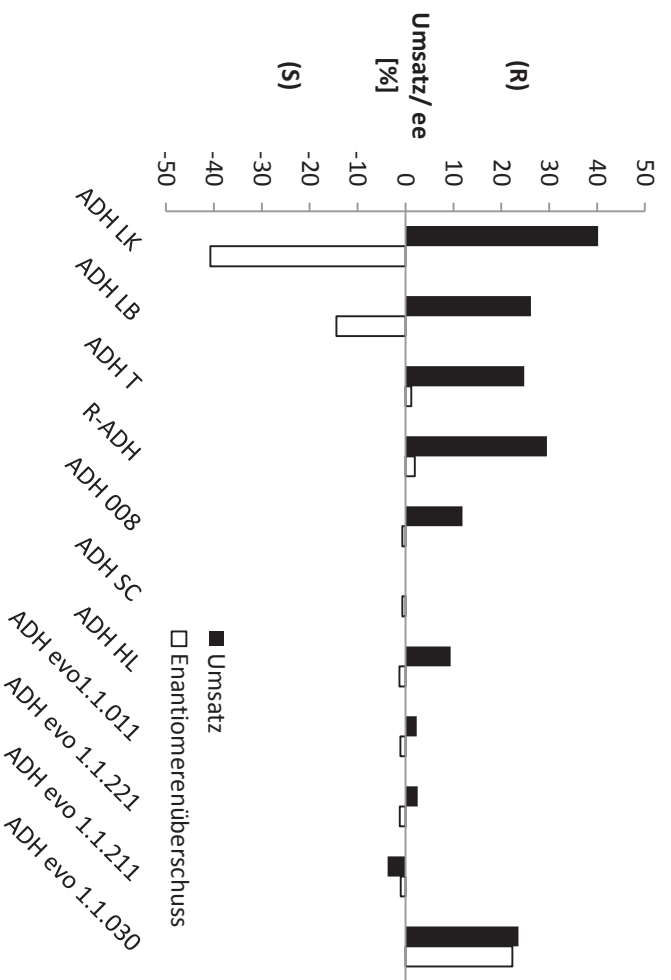


Abbildung 35: Umsatz und Enantiomerenüberschuss von **117** nach Umsetzung von *rac*-**117** mittels elf verschiedener Alkoholdehydrogenasen. Daraus ergeben sich folgende Enantioselektivitäten der drei selektivsten ADHs: ADH LK: E = 6, ADH LB: E = 2, ADH evo 1.1.030: E = 8.

Insgesamt wurden somit zwei verschiedene Reaktionswege zur chemoenzymatischen Darstellung von (2*R*)- bzw. (2*S*)-2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) etabliert.

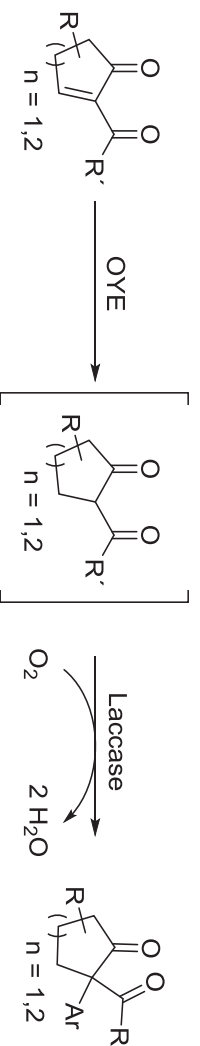
In einem zweistufigen Prozess aus *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion und einer konsekutiven Eintopf-Reaktion mittels YqJM WT und ADH_{LK} konnte das (2*R*)-Diol **66** erhalten werden. Das Diastereomerenverhältnis war mit 7:1 (*syn*: *anti*) moderat, das (2*R*)-Stereozentrum aus der YqJM WT-Reaktion kann jedoch mit bis zu 97 % in sehr gutem Enantiomerenüberschuss erhalten werden. Die Ausbeute betrug 34 % in der *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion und 50 % in der Enzymkaskade. Durch eine Optimierung des Isolierungsprotokolls des sehr polaren Produkts **66** aus der Pufferlösung kann möglicherweise noch eine Ausbeuteverbesserung im zweiten Schritt erreicht werden. Wie angestrebt, konnte somit gezeigt werden, dass eine Enzymkaskade aus einer ADH und einem OYE zur Synthese von **66** möglich ist. Dies schafft, basierend auf achiralen, kostengünstigen Edukten, auch erstmals einen zweistufigen Zugang zum *syn*-(2*R*, 3*S*)-Diol **66**.

Zur Synthese von (2*S*)-**66** konnte ebenfalls eine Synthesestrategie unter OYE-Katalyse etabliert werden, obwohl alle zur Verfügung stehenden OYEs gleichermaßen (i*R*)-Enantioselektivität bezüglich der Umsetzung von **106** zur Diol-Vorstufe **108** zeigten. Durch gezieltes Design eines alternativen Substrats, des 3-Hydroxy-2-methylenbutansäuremethylesters (**117**), war unter Nutzung von ein und demselben OYE wie in der ersten Strategie, der Aufbau des entgegengesetzten C-2-Stereozentrums in **66** möglich. Die Enantiomerenreinheit des intermediär erhaltenen (2*R*)-**75** betrug >99 % *ee* (i*R*). Wie für die racemische Referenz gezeigt werden konnte, kann **75** durch Reduktion mittels LiAlH₄ in 92 % Ausbeute zu **66** reduziert werden. Insgesamt kann also (2*S*)-**66** auf diesem Weg mit exzellenter Stereoselektivität bezüglich des C-2-Stereozentrums erhalten werden. Die Ausbeute über drei Stufen beträgt 42 %. Eine praktikable Synthese des

enantiomerenreinen Substrats **117** war auf dem hier getesteten Weg einer kinetischen Racematspaltung von **117** mittels ADH nicht möglich. Im Anschluss an diese Arbeit, im Rahmen der Masterarbeit von M. Mantel, wurde jedoch ein Zugang zu enantiomerenreinem OYE-Substrat **117** etabliert.^[112]

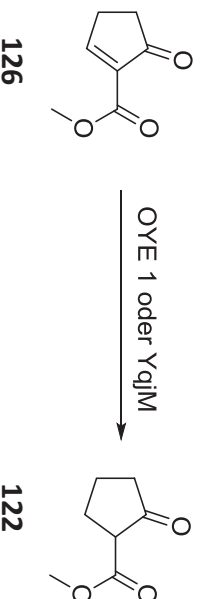
7.3.2 Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskade aus YqjM und Laccase

Um eine Kaskadenreaktion aus OYE-katalysierter C=C-Reduktion und anschließender Laccase-katalysierter oxidativer Arylierung gemäß **Schema 43** zu realisieren, wurden verschiedene cyclische α,β -ungesättigte- β -Dicarbonylverbindungen hinsichtlich einer Umsetzung mittels Enreduktasen getestet.



Schema 43: Allgemeines Schema der angestrebten OYE- und Laccase-katalysierten Kaskadenreaktion.

Zunächst wurde die Synthese des Laccase-Substrats 2-Cyclopentanonecarbonsäuremethylester (**122**) aus 2-(2-Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**) mittels YqjM oder OYE 1 angestrebt (**Schema 44**).



Schema 44: Bioreduktion des 2-(2-Cyclopentenon)carbonsäuremethylesters (**126**) zum 2-Cyclopentanonecarbonsäuremethylester (**122**).

126 wurde von Dr. M. Bielitzka für Tests bereitgestellt. Die Produktreferenz ist kommerziell erhältlich. Im analytischen Ansatz lieferte YqjM bis zu 73 % Umsatz und OYE 1 bis zu 67 % Umsatz (**Tabelle 17**, Eintrag 2 und 4). Im präparativen Ansatz mit YqjM WT wurde jedoch die Produktion von Nebenprodukten beobachtet und auch bei weiterer YqjM- und Cofaktorzugabe ein maximaler Umsatz zu Produkt **122** von 35 %. Die Arbeit mit diesem System wurde daraufhin eingestellt.

Tabelle 17: Enzymscreening für die Umsetzung von 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**). Bedingungen: KP, 20 mM, 1 % (v/v) THF, 0.3 U Enreduktase.

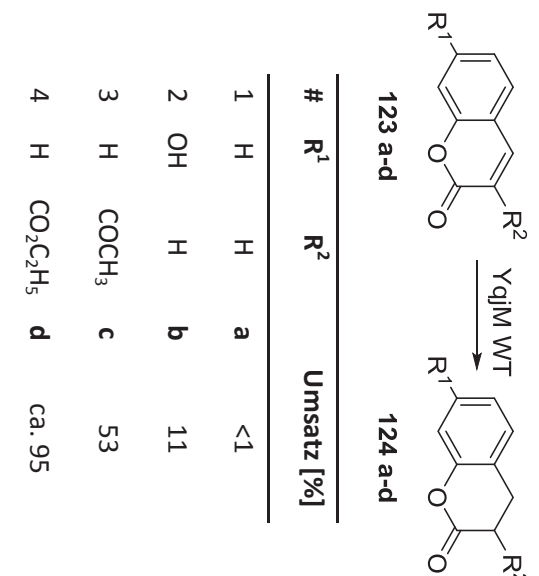
#	Enzym	pH	Umsatz [%]
1	YqjM	6.5	57
2	YqjM	7.5	73
3	OYE 1	6.5	53
4	OYE 1	7.5	67

Stattdessen wurde eine Erweiterung des Substratspektrums von YqjM bezüglich bicyclischer Substanzen angestrebt. Da YqjM WT, wie im Kenntnisstand beschrieben, ein im Vergleich zu

anderen Enreduktasen offenes aktives Zentrum besitzt und zum Beispiel das bicyclische Molekül Vitamin K (**33**) umsetzt, war die Umsetzung dieser Substanzen mittels YqjM zu erwarten. Zwei Substanzklassen – Cumarine und Chromone – wurden hinsichtlich einer Umsetzung mit YqjM WT getestet. Verschiedene Vertreter beider Substanzklassen sind in ihrer C=C-reduzierten Form schon als Substrate für Laccase-katalysierte oxidative Arylierungen zum Einsatz gekommen.^[113]

Die erste Reihe von Substanzen sind der pflanzliche Sekundärmetabolit Cumarin ($R^1 = H$, $R^2 = H$, **123a**) und verschiedene seiner Derivate **123b-d** (**Tabelle 18**). Durch Reduktion der aktivierten C=C-Doppelbindung von **123a-d** entstehen die 3,4-Dihydrocumarine **124a-d**. Unsubstituiertes 3,4-Dihydrocumarin (**124a**) ist ein divers genutzter Aromastoff^[114] und seine Derivate besitzen vielerlei biologische Aktivität.^[115] Die Analytik der Testansätze erfolgte mittels GC/MS und die Retentionszeiten und EI-Fragmentierungen von Edukten und Produkten erfolgreicher Umsetzungen sind im Experimentaltel in **Tabelle 49** dargestellt. Soweit nicht anders angegeben sind die Substrate kommerziell erhältlich.

Tabelle 18: Überblick der durchgeführten analytischen Bioreduktionen von Cumarin-Derivaten (**123**) zu 3,4-Dihydrocumarinen (**124**). Reaktionsbedingungen: 5 mM Substrat, 0.3 U Enreduktase, 200 μ M NADP⁺, 20 mM Glukose, 1 U GDH, 1 % (v/v) THF in 20 mM KP, pH 7, Inkubation für 24 h, 300 upm, 30 °C.



Da unsubstituiertes Cumarin (**123a**) schlechte Löslichkeit in Puffer besitzt, wurde THF als Cosolvens eingesetzt und zusätzlich das besser wasserlösliche 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon, **123b**) getestet. Für Cumarin (**123a**) konnte fast kein Umsatz (<1%), für **123b** nur 11% Umsatz in der GC/MS detektiert werden (Eintrag 1 und 2). Daher wurden im Anschluss zwei Cumarin-Derivate mit elektronenziehendem Substituenten in 3-Position untersucht: 3-Acetylcumarin (**123c**) und 3-Cumarincarbonsäureethylester (**123d**). Beide Substrate zeigten in THF gute Löslichkeit und konnten im Assay mit 1% THF mittels beider Enzyme zu >50% (GC/MS) umgesetzt werden (siehe Eintrag 3 und 4). Der Ester **123d** wurde stärker umgesetzt als das Keton **123c**. Beide Substrate zeigten jedoch nur in sehr geringem Maße das erwartete Produkt **124**. Stattdessen wurde für Keton **123c** ein Nebenprodukt (t_R : 9.4 min), für den Ester **123d** zwei Nebenprodukte detektiert. Da für das Produkt **124d** die Referenzsubstanz aus einem Laccase-Projekt unserer Arbeitsgruppe vorhanden war, wurde diese Bioreduktion genauer untersucht. Wie in **Abbildung 36** gezeigt, ergab sich für diese

Reaktion in der GC/MS ein Hauptprodukt bei 8.7 min und zwei Nebenprodukte bei 10.0 und 10.7 min. Die Produktreferenz **124d** zeigte unter den gleichen Bedingungen in der GC/MS nur ein Signal bei 10.7 Minuten. Somit sind die anderen beiden Signale keine reinen Artefakte durch die harschen Bedingungen der GC, sondern entstehen während der Biokatalyse.

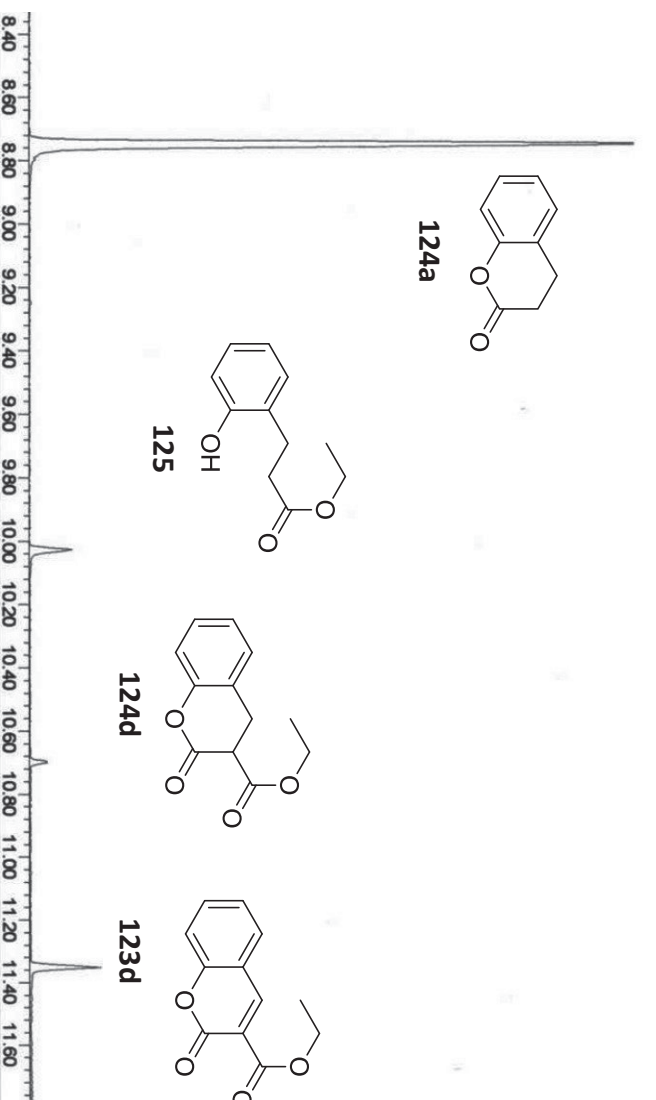
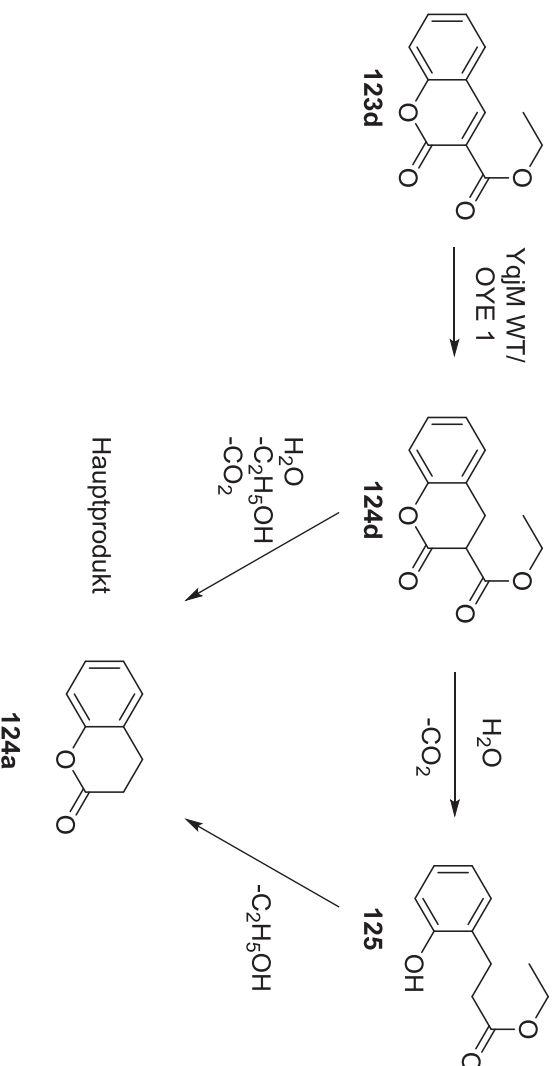


Abbildung 36: Ausschnitt des GC/MS-Chromatogramms der Umsetzung von 3-Cumarylcarbonic säureethylester (**123d**) mittels YqjM WT bei pH 7.

Nach Inkubation von **124d** unter den Reaktionsbedingungen (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5) ergab sich jedoch auch ohne Enzymzugabe das gezeigte Produktspektrum. Da das Substrat **123d** nach Inkubation unter den Reaktionsbedingungen stabil bleibt, sind die Produkte bei 8.7 min und 10.0 min somit aus dem Enreduktaseprodukt **124d** entstanden. Der vermutliche Reaktionsmechanismus ist in **Schema 45** dargestellt. Die gefundenen EI-Fragmentierungen, anhand derer die Strukturen der beiden unbekanntesten Produkte identifiziert wurden, sind in **Tabelle 19** aufgeführt.



Schema 45: Anhand der GC/MS identifizierte Folgereaktionen des Bioreduktionsprodukts **124d**.

Die Fragmentierung des hauptsächlich entstandenen Produkts bei einer Retentionszeit von 8.7 min (Eintrag 1) entspricht derjenigen des 3,4-Dihydrocumarins (**124a**). Dieses kann durch Verseifung der Ethylestergruppe von **124d** und anschließende Decarboxylierung entstehen. Alternativ kann zuerst eine Ringöffnung und Decarboxylierung stattfinden und nachfolgend unter Abspaltung von Ethanol zur Entstehung von **124a** führen. Dabei entsteht als Zwischenprodukt, das in geringerem Maße detektierte Produkt der vermutlichen Struktur **125** (Tabelle 19, Eintrag 2).

Tabelle 19: Fragmentierungen der beiden in der GC/MS detektierten Nebenprodukte bei Umsetzung von 3-Cumarincarbonsäureethylester (**123d**) mittels YqjM oder OYE 1.

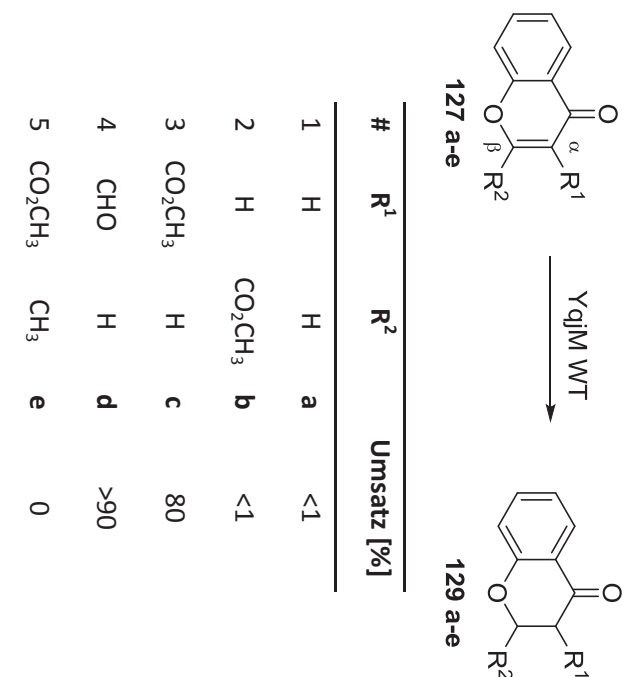
#	Substanz	t_r [min]	Fragmentierung m/z (relative Intensität)
1	124a	8.7	148 (50) [(M) ⁺], 120 (80) [(M-CO) ⁺], 106 (5) [(C ₇ H ₆ O) ⁺], 91 (100) [(C ₇ H ₇) ⁺], 78 (75) [(C ₇ H ₆ O-CO) ⁺], 63 (30) [(C ₇ H ₇ -C ₂ H ₄) ⁺], 51 (33) [(C ₄ H ₃) ⁺]. (Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur.) ^[116]
2	125	10.0	194 (25) [(M) ⁺], 148 (60) [(M-C ₂ H ₆ O) ⁺], 120 (100) [(M-C ₂ H ₆ O-CO) ⁺], 107 (30) [(C ₇ H ₇ O) ⁺], 91 (48) [(C ₇ H ₇) ⁺], 77 (27) [(C ₆ H ₅) ⁺].

In den bekanntesten Laccase-katalysierten Arylierungen wurde kein solcher Zerfall des dortigen Edukts **124d** beobachtet (Bedingungen: 200 mM KP_i, pH 6, 33 % (v/v) CH₃CN oder THF, 22 °C, 18–48 h).^[113a] Dies kann zum Beispiel auf die im Vergleich zur YqjM-Reaktion niedrigere Temperatur in dieser Reaktion (22 °C statt 30 °C) zurückzuführen sein. Denn auch in der von Suljić *et al.* durchgeführten Hydrierung von **123d** mittels des *Pearlman*-Katalysators in Methanol spielte die Temperatur eine wichtige Rolle für eine selektive Umsetzung.^[113a] Zudem kann die geringe Bildung der Folgeprodukte von **124d** im Reaktionsmedium der Laccaseumsetzung mit der Nutzung einer stark erhöhten Menge Cosolvens in Zusammenhang stehen. Für die OYE-katalysierte Reaktion kann die Cosolvensmenge nicht entsprechend erhöht werden, da sowohl in eigenen Experimenten als auch in der

Dissertation von Dr. M. Schölzel gezeigt werden konnte, dass eine solch hohe Menge Cosolvens mit den hier genutzten Enreduktasen OYE 1 und YqjM nicht kompatibel ist. [YqjM zeigt bei 10 % (v/v) MeTHF 13 %, bei 1 % (v/v) 98 % Umsatz von **56** (R = H),^[70] OYE 1 mit 1 % (v/v) CH₃CN 74 % Umsatz von 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**), bei 33 % (v/v) CH₃CN nur noch 9 %].

Da diese Folgereaktionen des Produkts eine Weiterführung der Bioreduktion von **123d** als Kaskade problematisch erscheinen ließ, wurden zusätzlich 1-Benzopyran-4-on (Chromon; R¹ = H, R² = H: **127a**) und die Chromon-Derivate **128b–e** auf ihre Umsetzung zu den 4-Chromanonen **129a–e** mittels Enreduktasen hin untersucht (**Tabelle 20**). Verschieden substituierte Derivate von 4-Chromanon (**129a**) können gemäß eines Patentes der Bayer AG zum Beispiel als Wachstumsförderer in der Tierzucht eingesetzt werden.^[117] Die Analytik der Testansätze erfolgte wiederum mittels GC/MS und die Retentionszeiten und EI-Fragmentierungen von Edukten und Produkten sind im Experimentaltitel in **Tabelle 50** dargestellt. Unsubstituiertes Chromanon **130a** zeigte im GC/MS-Chromatogramm <1 % Umsatz zum gewünschten Produkt **129a** (Eintrag 1). Dies kann zum Beispiel auf die geringe Löslichkeit im Reaktionsmedium zurückzuführen sein. Da die Einführung eines Carbonsäureesters schon bei den Cumaringen zu erhöhtem Umsatz geführt hatte, wurde hier wiederum diese Strategie verfolgt. Der Effekt des Carbonsäureesters sollte diesmal sowohl in 2- als auch in 3-Position getestet werden. Die beiden Estersubstrate **127b** und **127c** mussten aus der entsprechenden Säure synthetisiert werden und wurden in hohen Ausbeuten (**127b**: 89 %, **127c**: 94 %) erhalten.

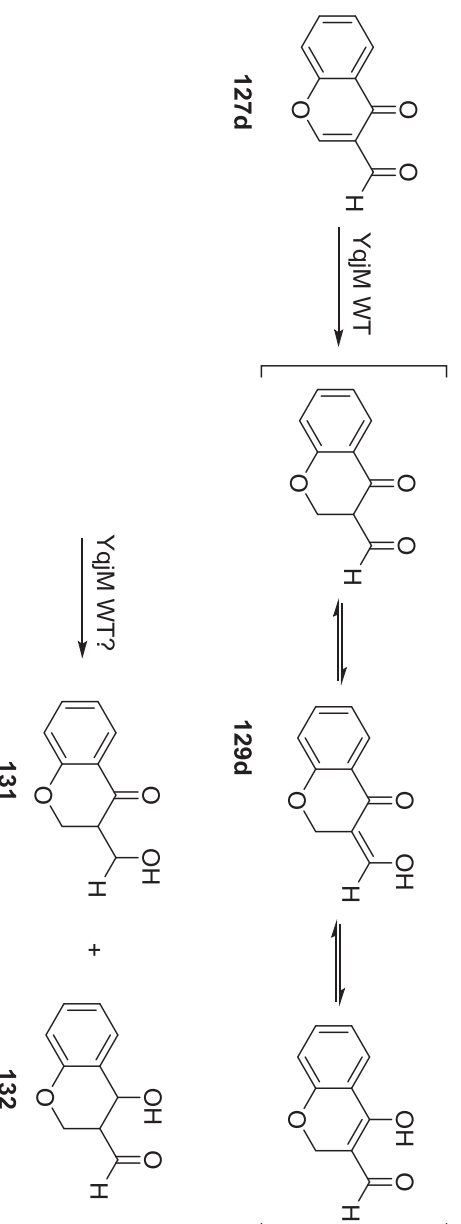
Tabelle 20: Überblick der durchgeführten analytischen Bioreduktionen von Chromon-Derivaten **127a–e** zu den 4-Chromanonen **129a–e**. Reaktionsbedingungen: 5 mM Substrat, 0.3 U Enreduktase, 200 μ M NADP⁺, 20 mM Glukose, 1 U GDH, 1 % (v/v) THF oder MeTHF in 20 mM K_P, pH 7, Inkubation für 24 h, 300 upm, 30 °C.



Die Löslichkeit beider Substanzen (**127b** und **c**) in THF war im Vergleich zu **127a** stark verbessert. Enzymtests im analytischen Maßstab ergaben nur Spuren des Produkts **129b** (Eintrag 2), jedoch 80 % Umsatz von **127c** zu **129c** (Eintrag 3). Der bessere Umsatz des 3-Chromoncarbonsäuremethylesters (**127c**) ist vermutlich auf die dort verstärkte positive

Polarisierung von C_β zurückzuführen, die zum erleichterten Angriff des Hydrids aus YqjIM führt. In der Struktur **127b** wird die ursprüngliche Polarisierung der Doppelbindung stattdessen durch die neue Esterfunktion abgeschwächt.

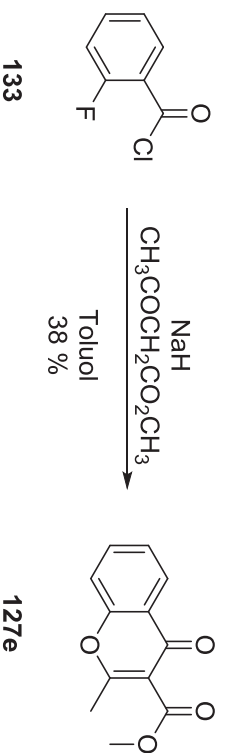
Da der zum 3-Chromoncarbonsäuremylester (**127c**) analoge Aldehyd, 3-Formylchromon (**127d**), durch den stärkeren elektronenziehenden Effekt eine bessere elektronische Aktivierung der Doppelbindung besitzt, wurde dieser ebenfalls als Substrat getestet. Wie vermutet, konnte im Vergleich zu **127c** ein erhöhter, selektiver Umsatz von >90 % detektiert werden. Das EI-Fragmentierungsmuster zeigte nicht den Molekülpeak von **129d** ($m/z = 176$) und stattdessen einen höchsten Massenpeak von $m/z = 160$. Dieser würde eine Massendifferenz von -16 und somit die eher ungewöhnliche Abspaltung eines Sauerstoffradikals aus der β -Dicarbonylverbindung **129d** bedeuten. (Dies wurde für das EI-MS-Spektrum der analogen zusätzlich EtO-Aryl-substituierten Verbindung nicht beobachtet.)^[118] Daher wurde vermutlich nicht das erwartete Produkt **129d** gebildet. Stattdessen wurde der in **Schema 46** dargestellte Reaktionsweg postuliert, der durch C=C-Reduktion der Enol-Form von **129d** zum zweifach reduzierten 3-Hydroxymethylchromanon (**131**) bzw. dem analog entstandenen 4-Hydroxychromon-3-carbaldehyd (**132**) führt. Aus beiden kann durch Abspaltung von Wasser das Fragment mit $m/z = 160$ erhalten werden.



Schema 46: Postulierter Reaktionsweg des 3-Formylchromons (**127d**) in der Biorreduktion mittels YqjIM WT.

Mit Substrat **127c** konnte also schon ein vielversprechendes Substrat für eine Enreduktase-Laccase-Reaktionskaskade gefunden werden. Alle bisher getesteten Substrate ergaben jedoch trotz der Fähigkeit von OYEs zu stereoselektiven Umsetzungen ein Racemat als Produkt. Grund dafür ist die in **Schema 46** für **129d** gezeigte Tautomerisierung. Um nun ein zweites, stabiles Stereozentrum mittels der Enreduktase generieren zu können, wurde in Position zwei des Substrats **127c** zusätzlich ein Methylsubstituent eingebracht. Ein Stereozentrum in dieser Position führt nach Experimenten in unserer Arbeitsgruppe außerdem zu vollständiger relativer Stereoselektivität für das *anti*-Diastereomer bei anschließender Laccase-katalysierter Arylierung in 3-Position.^[133b] Normalerweise verlaufen Laccase-katalysierte Reaktionen ohne Stereoselektivität. Das somit interessante 2-methylierte Chromon **127e** wurde entsprechend der Literatur durch zweifache nukleophile Substitution von Halogenen durch Enolate mit einer Ausbeute von 38 % aus 2-Fluorobenzoessäurechlorid (**133**) hergestellt (**Schema 47**). Der Versuch zur Herstellung der Referenz entsprechend der Literaturvorschrift gelang nur im Gemisch mit einem großen

Überschuss eines unbekanntem Nebenprodukts.^[113b] Das Signal im GC/MS-Chromatogramm mit dem plausiblen Fragmentierungsschema von **129e** konnte jedoch identifiziert werden und auf dieser Grundlage wurden Testansätze durchgeführt.



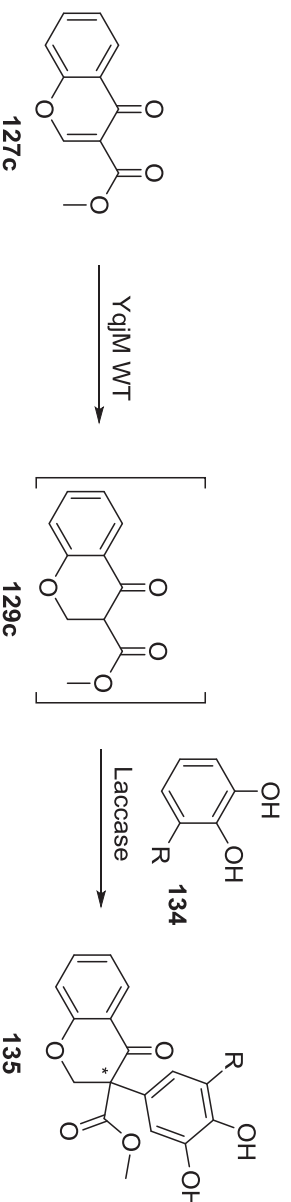
Schema 47: Synthese von 3-(2-Methylchromon)carbonsäuremethylester (**127e**).

Bei Katalyse durch YqJM WT, YqJM C26G, OYE 1, OPR3 und NCR_{ZM} oder NCR_{PL} wurde jedoch kein Umsatz detektiert (**Schema 48**). Bei Umsetzung mittels OPR1 entstanden mehrere Produkte. Keines davon entsprach dem erwarteten Produkt **129e**.



Schema 48: Testreaktionen zur Umsetzung von **127e** mittels verschiedener Enreduktasen und Varianten.

Da die Ergebnisse zur Umsetzung von **127c** zu **129c** mittels YqJM WT somit am vielversprechendsten waren, wurde im Folgenden anhand dieser Reaktion eine Kaskade von YqJM WT in Kombination mit einer Laccase angestrebt. Die geplante Kaskade ist in **Schema 49** dargestellt.



Schema 49: Geplante Kaskadenumsetzung von 3-Chromoncarbonsäuremethylester (**127c**) mittels YqJM WT und einer Laccase zum 3-arylierten Produkt **135**.

Zunächst sollte die Enreduktase-Reaktion einzeln im präparativen Maßstab durchgeführt werden, wobei die Reaktionsbedingungen so weit wie möglich an diejenigen der Laccase-katalysierten Umsetzung angenähert sein sollten. Die Laccase-katalysierte Umsetzung von **127c** mit 3-Methylcatechol (**134**, R = Me) zum 3-arylierten Produkt **135** wurde in unserem Labor von Dr. S. Suljić bereits mit zwei verschiedenen Laccasen durchgeführt. Dabei wurde mit der Laccase aus *Streptomyces wicaceus* (Ssl 1) bei pH 9 in einem Gemisch aus Puffer und 33 % (v/v) Acetonitril eine Ausbeute von 89 % erhalten. Die oxidative Arylierung von **129c** mit der kommerziell erhältlichen Laccase aus *Agaricus bisporus* ist dort ebenfalls

beschrieben und ergab ohne Optimierung, bei pH 6, wiederum im Gemisch von Puffer mit 33 % (v/v) Acetonitril eine Ausbeute von 62 %.^[113b] Da YqjM, wie die meisten Enreduktasen, nur bei pH-Werten nahe 7 stabil ist und für letztere Laccase in der Arbeitsgruppe Pietruszka bereits eine Durchführung bei neutralen Bedingungen erfolgreich getestet worden war, wurde trotz der geringeren Ausbeute die Laccase aus *Agaricus bisporus* für die Kaskade ausgewählt. Als Cosolvens wurde in Vortests im analytischen Maßstab zunächst 1 % (v/v) Methyltetrahydrofuran (MeTHF) eingesetzt. Dabei ergab sich mit 1 U YqjM WT bei pH 6.5 (K_P, 20 mM) nach 14 h ein Umsatz von 61 %. Da mit Acetonitril nach Suljić *et al.* in der Laccase-Umsetzung im Vergleich zu THF höhere Umsätze generiert wurden, wurde auch dieses als Cosolvens getestet.^[113b] Zusätzlich zeigt Acetonitril eine höhere Löslichkeit des Substrats **127c**. (Eine 1 M Lösung ist möglich; in MeTHF ist 500 mM unmöglich.) Bei Nutzung von 1 % (v/v) Acetonitril konnte im Vergleich zu MeTHF ein höherer Umsatz von 78 % erreicht werden. Bei Steigerung des Volumenanteils von Acetonitril auf bis zu 5 % (v/v) nimmt der Umsatz kontinuierlich auf bis zu 45 % ab (**Abbildung 37 A**). Daher wurde ein möglichst niedriger Cosolvensanteil von maximal 3 % (v/v) als sinnvoll für eine präparative Umsetzung angesehen. Zusätzlich zeigten sich in den Testansätzen teils Nebenprodukte. Diese konnten durch einen möglichst niedrigen pH Wert (pH 6–6.5) und eine kurze Reaktionszeit ggf. verringert werden. Außerdem wurden mit 2 % (v/v) Acetonitril als Cosolvens verschiedene pH-Werte getestet. Der höchste Umsatz (16 %) wurde bei pH 6.5 erhalten. Ein Entgasen des Puffers mit Argon brachte im Assay keinen Vorteil (**Abbildung 37 B**). Zugabe einer weiteren Portion von YqjM, GDH und NADP⁺ zum Assay mit 2 % (v/v) Acetonitril nach 12 h brachte keine Steigerung des Umsatzes.

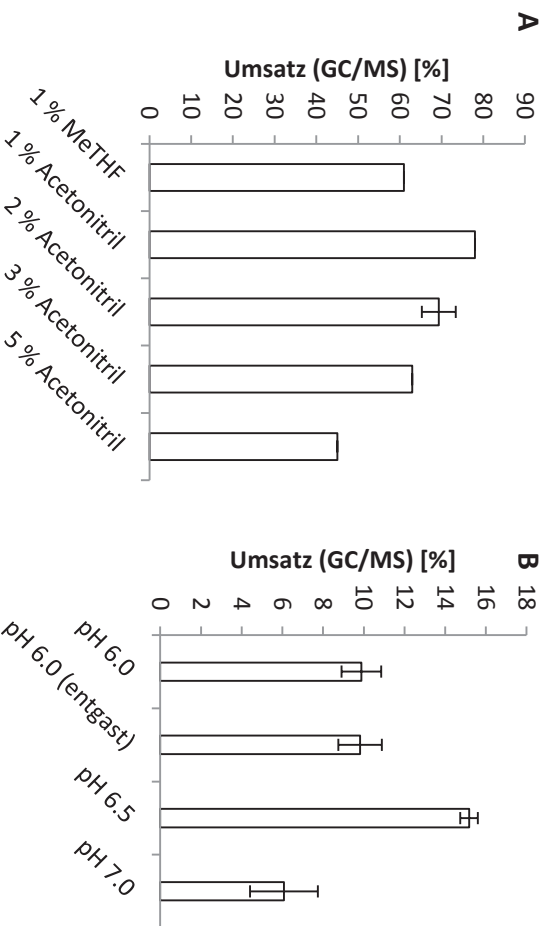
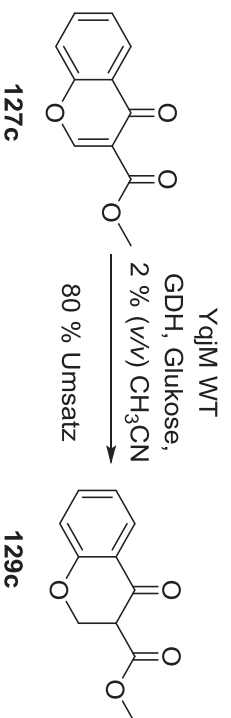


Abbildung 37: Testansätze zur Optimierung der Cosolvenzugabe und des pH-Werts bei Umsetzung von 3-Chromoncarbonsäuremethyl-ester (**127c**) mittels YqjM WT. Bedingungen: 1 U GDH, 20 mM Glukose, 0.2 mM NADP⁺, 5 mM Substrat, K_P, 20 mM. **A:** pH 6.5, 1 U YqjM, **B:** 2 % (v/v) Acetonitril, 0.3 U YqjM.

Daher wurde die Umsetzung im präparativen Maßstab bei pH 6.5 mit 2 % (v/v) Acetonitril und einer hohen Enzymmenge (1 U YqjM WT pro 1 mg Substrat) durchgeführt und zeigte innerhalb von ca. 2 h 80 % Umsatz (GC/MS) zum gewünschten Produkt (**Schema 50**). Der zeitliche Reaktionsverlauf ist in **Abbildung 38** als Graph dargestellt.



Schema 50: Präparative Bio-reduktion von 3-Chromoncarbonsäuremethylester (**127c**) mittels YqjM WT.

Nach Aufarbeitung konnte das Rohprodukt in hoher Ausbeute und moderater Reinheit (NMR) gewonnen werden. Eine chromatographische Reinigung wurde nicht durchgeführt, da im Anschluss die eigentlich angestrebte Kaskade durchgeführt werden sollte.

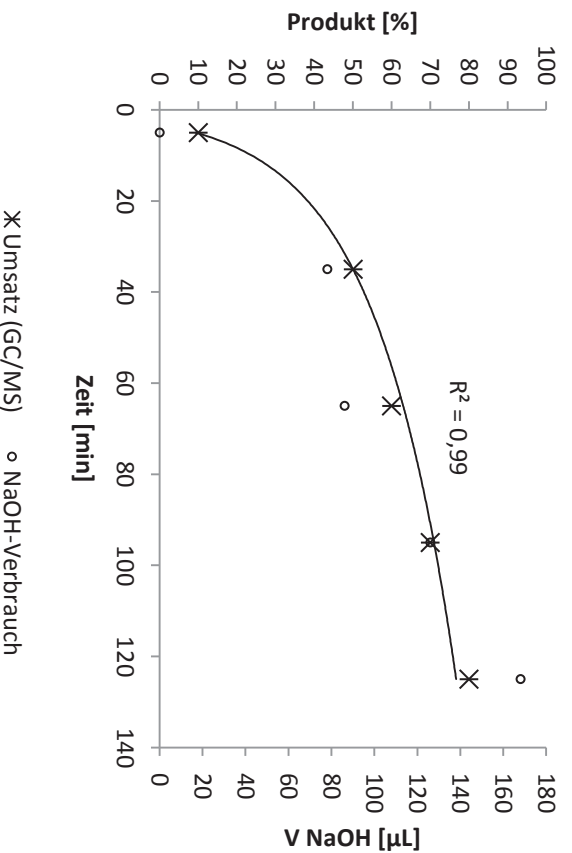


Abbildung 38: Reaktionsfortschritt der präparativen Umsetzung von **127c** via GC/MS bzw. anhand des NaOH Verbrauchs zur pH-Titration.

In einem Test der Kaskade im analytischen Maßstab wurde zu einem Ansatz mit 5 mM Substrat [2 % (v/v) Acetonitril, K_p: 20 mM pH 6.5] nach 80 % Umsatz (HPLC, 67 % GC/MS) 1 U Laccase und 6 mM 3-Methoxycatechol (**134**, R = OMe) zugegeben. Dabei konnten die in **Abbildung 39** dargestellten HPLC-Chromatogramme erhalten werden. Demnach ist bis zuletzt das YqjM-Substrat **127c** im Reaktionsgemisch enthalten. Der weitere Umsatz mittels YqjM kann zum Beispiel durch Inhibition der Enreduktase durch das Catechol **134** verhindert worden sein. Das Enreduktaseprodukt **129c** ist nicht mehr im Chromatogramm zu sehen. Es wurde vollständig zum Racemat **135** umgesetzt. Bezogen auf **127c** wurde **135** mit einem Umsatz von 89 % gebildet. Weitere Assays zur Eintopfreaktion in 100 mM Puffer bei pH 6.0 und 6.5 ergaben ähnlichen Umsatz zu **135** nach 3 h (83 bzw. 86 %, HPLC). Der pH-Wert von 6.5 kann also während der Reaktion beibehalten werden. Die Cosolvensmenge von 2 % (v/v) erwies sich bei der genutzten Substratkonzentration von 5 mM als praktikabel für beide Stufen. Bei höheren Substratkonzentrationen ist vermutlich eine höhere Cosolvensmenge empfehlenswert.

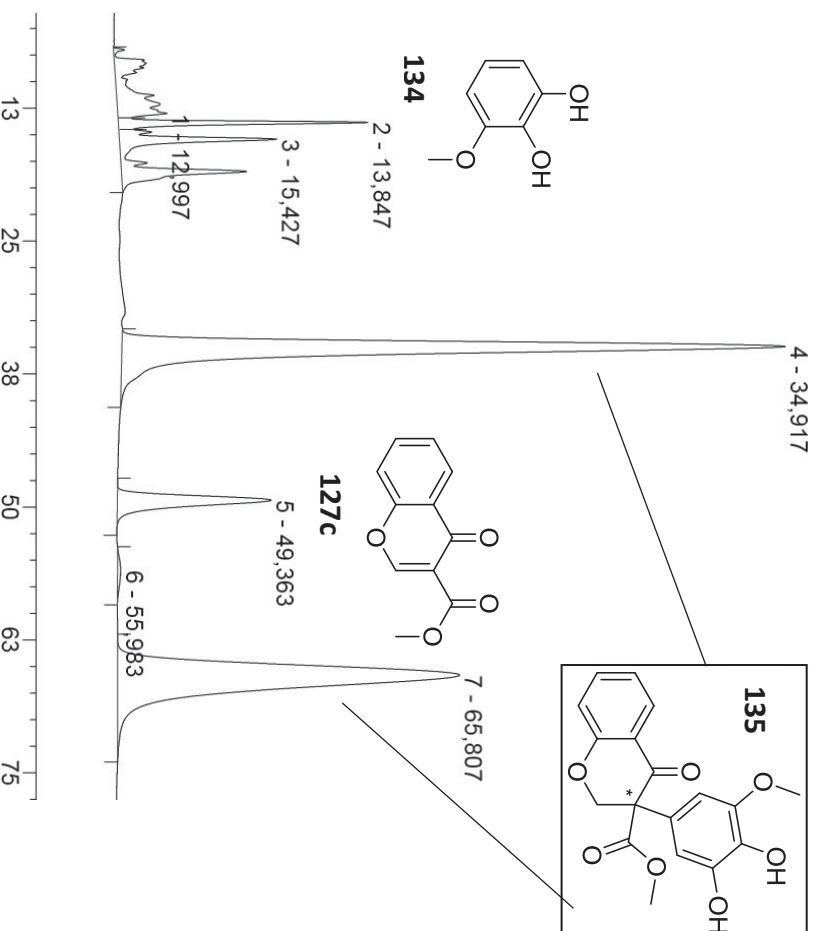
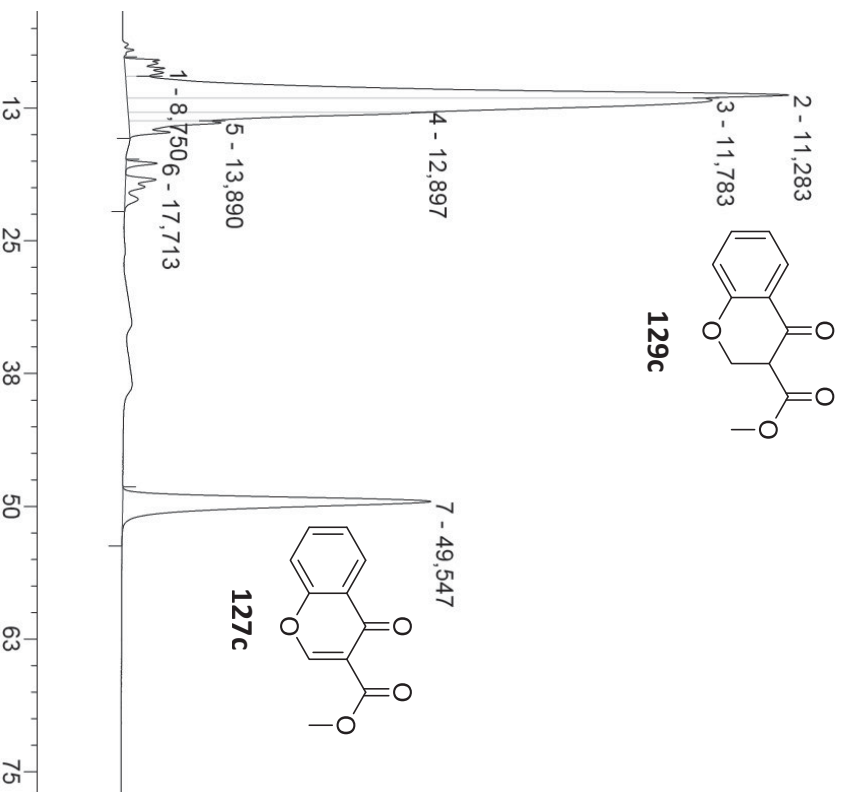


Abbildung 39: Ausschnitte aus den HPLC-Chromatogrammen der YqjM-Laccase-Eintopfumsatzung gemäß **Schema 49** (250 nm). **Oben:** Umsatz von **127c** mittels 1 U YqjM WT zu **129c**, 16 h, 30 °C, Umsatz 80 %. **Unten:** Chromatogramm nach Zugabe von 1 U Laccase und 6 mM 3-Methoxycatechol (**134**) und 3 h Inkubation bei 25 °C, 89 % Umsatz zu **135**.

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass die Enreduktase-katalysierte Bioreduktion von **127c** zu **129c** im präparativen Maßstab möglich ist. Im analytischen Maßstab wurde außerdem gezeigt, dass die Eintopfreaktion aus Reduktion mittels Enreduktase und Laccase-katalysierter Arylierung funktioniert. Die Durchführung der Eintopfreaktion im präparativen Maßstab muss in Zukunft noch durchgeführt werden, um die Praktikabilität zu ermitteln. Außerdem wäre, wie schon erwähnt, die Durchführung der analogen Reaktionsfolge mit **127e** als Substrat wünschenswert, da dann zwei definierte stabile Stereozentren durch die Reaktionsfolge gebildet werden könnten. Daher wurden Überlegungen angestellt, mit welchem OYE diese Umsetzung möglich sein könnte. Für die zu **127e** strukturell ähnlichen monocyclischen 3-substituierten Cyclohexenone (**40**, R = Me/ Et/ *i*Pr/ *n*Bu/ CO₂Me), die ebenfalls von nativen Enreduktasen nicht umgesetzt werden, wurden in einer Studie aus der Arbeitsgruppe Reetz per gerichteter Evolution aktive YqjM-Varianten entwickelt.^[63] Um diese Enzymvarianten mit dem interessanten Substrat **127e** testen zu können, wurde eine Kooperation angestrebt. Dabei wurden vier (5)- und sechs (*R*)-selektive Enzymvarianten als interessant angesehen (**Tabelle 21**).

Tabelle 21: Enzymvarianten von YqjM, die bezüglich der Umsetzung von **127e** getestet werden sollen (Kooperation mit S. Höbenreich, Universität Marburg).^[63]



#	YqjM- Variante	ee (40 → 41) [%]	R
1	C26G	>90 (<i>S</i>)	CO ₂ Me
2	C26G/A60C*	>90 (<i>S</i>)	CO ₂ Me
3	C26G/A60V*	>90 (<i>S</i>)	Me/ Et
4	C26G/A60I	>90 (<i>S</i>)	Me
5	C26D/I69T	>90 (<i>R</i>)	Me/Et/ <i>i</i> Pr/ <i>n</i> Bu/ CO ₂ Me
6	C26D/I69V	>80 (<i>R</i>)	Me
7	C26D/A104Y	>90 (<i>R</i>)	Me
8	C26D/A104F*	>90 (<i>R</i>)	Me/Et/ <i>n</i> Bu/ CO ₂ Me
9	C26D/A104H	>80 (<i>R</i>)	Me
10	C26D/I69T	>90 (<i>R</i>)	Me/Et/ <i>i</i> Pr/ <i>n</i> Bu/ CO ₂ Me

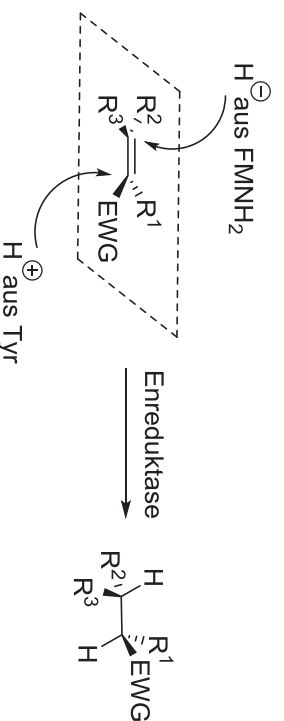
* präparativ genutzte Variante

Die Plasmide der Enzymvarianten liegen nun in unserer Arbeitsgruppe vor und können hinsichtlich Aktivität und Stereospezifität in der Bioreduktion von **127e** getestet werden.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Durch den steigenden Bedarf an optisch reinen Substanzen in großen Teilen der Industrie (Arzneimittel, Nahrungsmittel, Pflanzenschutz) besteht ein großes Interesse an effizienten, hochselektiven Methoden zur asymmetrischen Synthese.^[4] Enzyme als Biokatalysatoren sind dabei von besonderem Interesse, da sie oft exquisite Enantio-, Regio- und Chemoselektivität zeigen. Daneben gelten biokatalytische Prozesse im Vergleich zu klassisch-chemischen Verfahren als besonders umweltfreundlich, da sie bei moderater Temperatur und Atmosphärendruck in Wasser durchgeführt werden können. Somit wurde die Biokatalyse im Verlauf der letzten zehn Jahre zu einer immer häufiger genutzten Methode zur Synthese von optisch aktiven Substanzen in Labor- und Industrie-Anwendungen.^[119]

Eine Klasse von Enzymen, die für die organische Synthese von besonderem Interesse sind, sind die Enreduktasen aus der *Old Yellow Enzyme*-Familie (OYEs). Diese reduzieren C=C-Doppelbindungen und produzieren dabei bis zu zwei neue Stereozentren in einem Reaktionsschritt.^[120] Chemische asymmetrische Hydrierungen von C=C-Doppelbindungen folgen dabei meist einem *cis*-Hydrierungsmechanismus, bei dem beide Wasserstoffe von derselben Seite übertragen werden.^[121] Die enzymatische Reduktion mittels OYEs erfolgt hingegen durch *trans*-Übertragung der Atome, also von entgegengesetzten Seiten der Doppelbindungsebene (**Schema 51**).^[122] Da außerdem das Substratspektrum von OYEs eine breite Palette aktivierter Alkene umfasst, sind vielfältige Anwendungen in der asymmetrischen Synthese möglich.^[60] Trotzdem ist der industrielle Einsatz von Enreduktasen im Vergleich zu anderen Enzymen derzeit noch relativ begrenzt. Daher sollten in dieser Arbeit Enreduktasen für den Einsatz in der asymmetrischen organischen Synthese weiterentwickelt werden. Ziel war es, präparativ nutzbare Zugänge zu chiralen Intermediaten für die Synthese von Natur- und Wirkstoffen zu erhalten. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen dabei das sogenannte „Problem des anderen Enantiomers“ in der Biokatalyse sowie die Entwicklung neuer Enzymkaskaden unter Nutzung von Enreduktasen.



Schema 51: Stereochemischer Ablauf der Enreduktase-katalysierten Hydrierung von aktivierten Alkenen. (EWG: Elektronen-ziehende funktionelle Gruppe).

Das „Problem des anderen Enantiomers“ in der Biokatalyse besagt, dass der enzymatische Zugang zu beiden Produkt-Enantiomeren auf biokatalytischem Weg nicht, wie bei klassischer chemischer Katalyse, durch Nutzung der enantiomeren Katalysatoren möglich ist. Da in der Natur nur L-Aminosäuren existieren, ist mittels Mikroorganismen jeweils nur ein Enantiomer des Biokatalysators zugänglich. Stattdessen müssen in der Biokatalyse alternative Wege zum anderen Produkt-Enantiomer gefunden werden. In dieser Arbeit wurden hierfür zwei rationale Herangehensweisen beschrieben und erfolgreich zur Synthese stereokomplementärer chiraler Intermediate mittels der Enreduktase YqjM angewandt. Für

das erste Verfahren (**Kapitel 7.2**) wurden durch Mutagenese gezielte Veränderungen im Enzym vorgenommen. Die zweite Vorgehensweise beruht auf strategischer Nutzung zweier verschiedener Substrate in der Bioreduktion mittels YqjM WT, wodurch sich nach einem weiteren Reaktionsschritt zwei verschiedene Stereozentren im selben Produkt ergaben. Diese Vorgehensweise wird wegen der jeweils angestrebten Enzymkaskade im **Kapitel 7.3** behandelt.

Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM

Um stereokomplementäre YqjM-Varianten zu erhalten, wurde in **Kapitel 7.2** eine Mutagenese-Strategie vorgeschlagen, die durch gezielte Punktmutationen im aktiven Zentrum von YqjM WT einen 180°-geflippten Substrat-Bindungsmodus bewirken sollte. Als Modell-Substrat diente zunächst der Methyl ester **36**, der durch OYE-katalysierte Bioreduktion in das viel genutzte chirale Intermediat **37** (Roche-Ester) umgewandelt werden kann. Der theoretische Hintergrund zu den gewählten Mutationen, der sogenannte „rotierte Flip“, ist in **Abbildung 40** dargestellt.

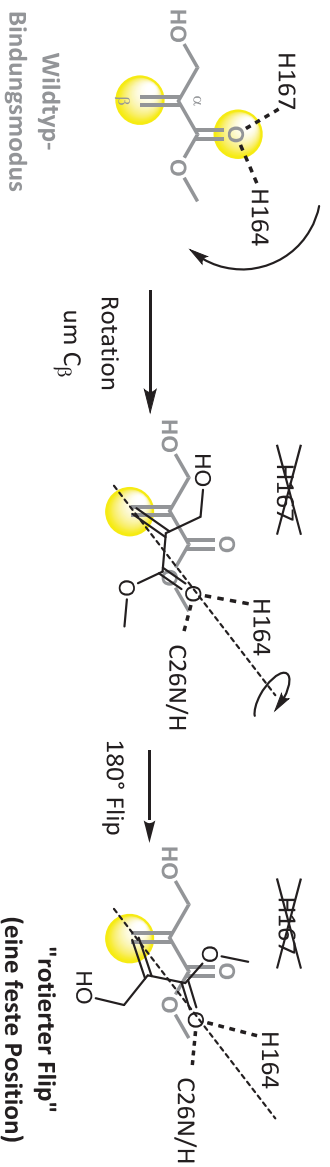
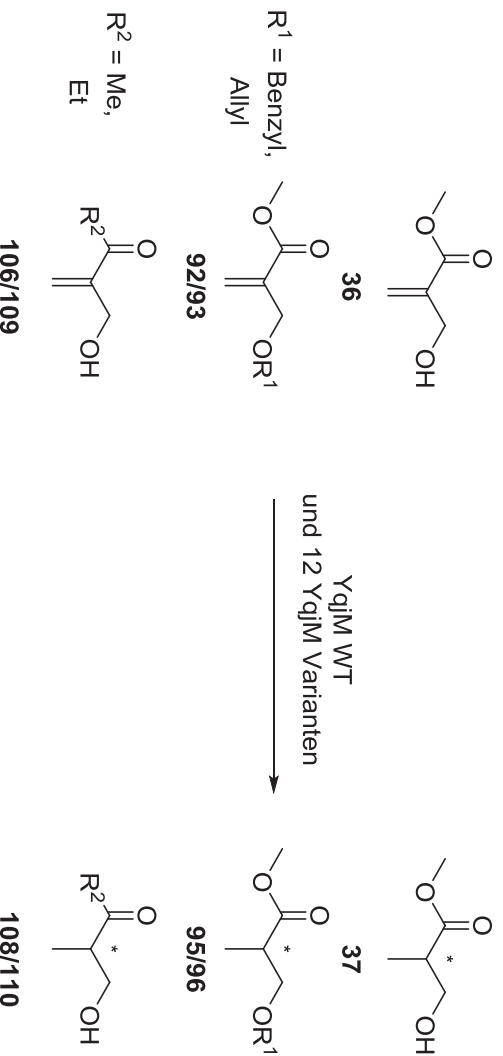


Abbildung 40: Angestrebte Veränderung des Bindungsmodus von Substrat **36** im aktiven Zentrum von YqjM WT unter Beibehaltung einer festen Position (gelbe Markierung).

So wurde durch die Mutation H167A die Auslöschung einer Bindungs- und Aktivierungsstelle des Substrats und somit eine Lockerung der ursprünglichen Bindungsposition angestrebt. Dies hatte bisher noch in keiner Mutagenese-Studie zu OYES erfolgreich zu stereokomplementären Varianten geführt. Der gleichzeitige Einbau einer neuen Bindungsstelle an Position 26 (C26N/H), auf der gegenüberliegenden Seite, sollte schließlich zur Reaktivierung des Substrats führen und eine Rotation um C_β bewirken. Diese Rotation sollte dann, gemäß der Vorhersage, eine 180°-Drehung („Flip“) des Substrats um die Carbonyl-Sauerstoff C_β-Achse auslösen, da der Hydroxymethylen-Rest nur so genügend Raum im aktiven Zentrum von YqjM findet. Im geflippten Bindungsmodus werden Hybrid und Proton jeweils von der dem Wildtyp entgegengesetzten Seite übertragen und es entsteht das enantiomere (spiegelbildliche) Produkt.

Die nach diesem Konzept erhaltenen YqjM-Varianten (C26N/H167A, C26H/H167A, C26N, C26H und H167A) wurden anhand der in **Schema 33** gezeigten Bioreduktionen bezüglich ihrer Stereoselektivität charakterisiert. Neben dem Roche-Ester-Vorläufer **36** kamen vier weitere *Morita–Boylis–Hillman*-Addukte als Substrate zum Einsatz. Die weiteren Substrate wurden nach zwei Gesichtspunkten ausgewählt. Zum einen sollten die erhaltenen Produkte eine möglichst hohe synthetische Relevanz als chirale Intermediate besitzen, zum anderen sollten sie möglichst hohen Umsatz im Standard-Assay mit YqjM WT zeigen. So wurde

mittels YqJM WT aus **36** der *Roche*-Ester **37** mit 34 % Umsatz erhalten. Substrat **92** und **93** wurden mit jeweils knapp 90 % Umsatz zu den Hydroxyl-geschützten, analog nutzbaren *Roche*-Ester Derivaten **95** und **96** umgesetzt und aus **106** und **109** wurden die Keto-Verbindungen **108** und **110** mit >99 % Umsatz erhalten. Alle Umsetzungen mit YqJM WT zeigten (*R*)-Selektivität.



Schema 52: Überblick über die Bioreduktionen, für die die Stereoselektivität von YqJM WT und der rational erstellten YqJM-Varianten getestet wurde.

Bei Umsetzung der Screening-Substrate mittels der ersten fünf YqJM-Varianten wurde bereits ein Biokatalysator mit hoher WT-entgegengesetzter (*S*)-Selektivität identifiziert. Der (*S*)-*Roche*-Ester **37** kann mittels YqJM C26N/H167A mit 86 % *ee* erhalten werden. Durch Docking wurde sowohl die postulierte Rotation um C_β als auch die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrückenbindung bestätigt. Diese Wasserstoffbrückenbindung trägt jedoch, anders als beabsichtigt, nicht zur Reaktivierung des Substrats bei. Die erhaltene YqJM-Variante zeigt also die gewünschte Stereoselektivität, ist aber wegen ihrer geringen spezifischen Aktivität präparativ unbrauchbar. Daher wurden zusätzliche Punktmutationen gesucht, die eine Veränderung der Stereoselektivität von YqJM bewirken. In der vorangegangenen Arbeit zur rationalen Mutagenese von YqJM von Dr. M. Schölzel waren, nach Tests von sieben Punktmutationen, zwei als selektivitätsbeeinflussend identifiziert worden: I69A und I69Y. Diese beiden wurden daher mit den Punktmutationen dieser Arbeit kombiniert und es wurden fünf neue Zweifach-Varianten erstellt. In **Abbildung 41** sind die Enantioselektivitäten der fünf Einfach- und sieben Zweifach-Varianten, die somit in dieser Arbeit bezüglich der Bioreduktion der fünf Screeningsubstrate getestet wurden, im Überblick dargestellt.

Es wird deutlich, dass durch Kombination der Einzelmutationen C26N, C26H und H167A mit I69A und I69Y weitere stereokomplementäre YqJM-Varianten in der Bioreduktion von *Morita-Baylis-Hillman*-Addukten erzeugt werden konnten. Neben dem *Roche*-Ester **37** wurden nun auch die Benzyl-geschützte Ester-Variante **95** und das Ethylketon **110** mit ≥90 % *ee* ent-Wildtyp-(*S*)-Selektivität erhalten. Die besten Ergebnisse im Screening wurden mit YqJM H167/I69A, H167A/I69Y und C26N/I69A erhalten. Zwei der drei selektivsten stereokomplementären YqJM-Varianten aus dem Screening enthalten also die Mutation H167. Durch *in silico* Docking konnten plausible Bindungsmodi gefunden werden, die wiederum den – entsprechend dem Konzept des „rotierten Flips“ postulierten – zusätzlichen

Rotationsfreiheitsgrad um C_{β} enthalten, der eine grundsätzlich neue Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum möglich macht.

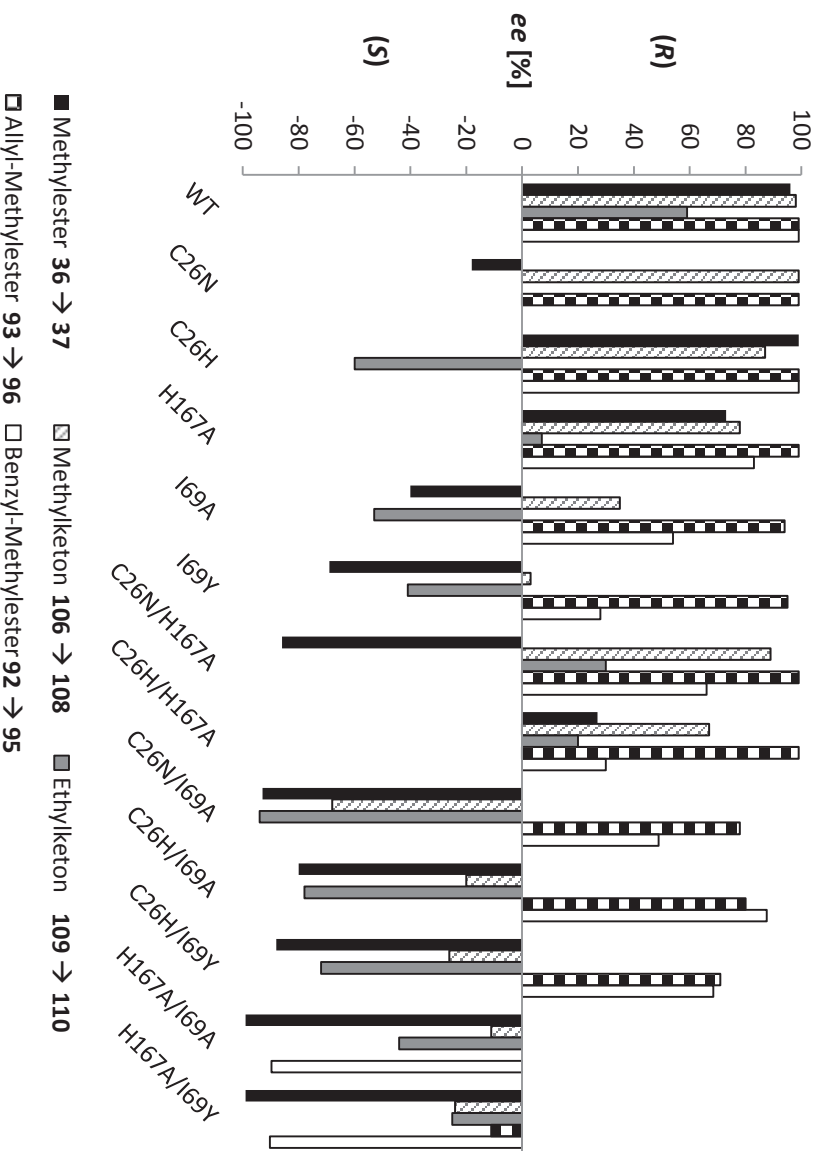


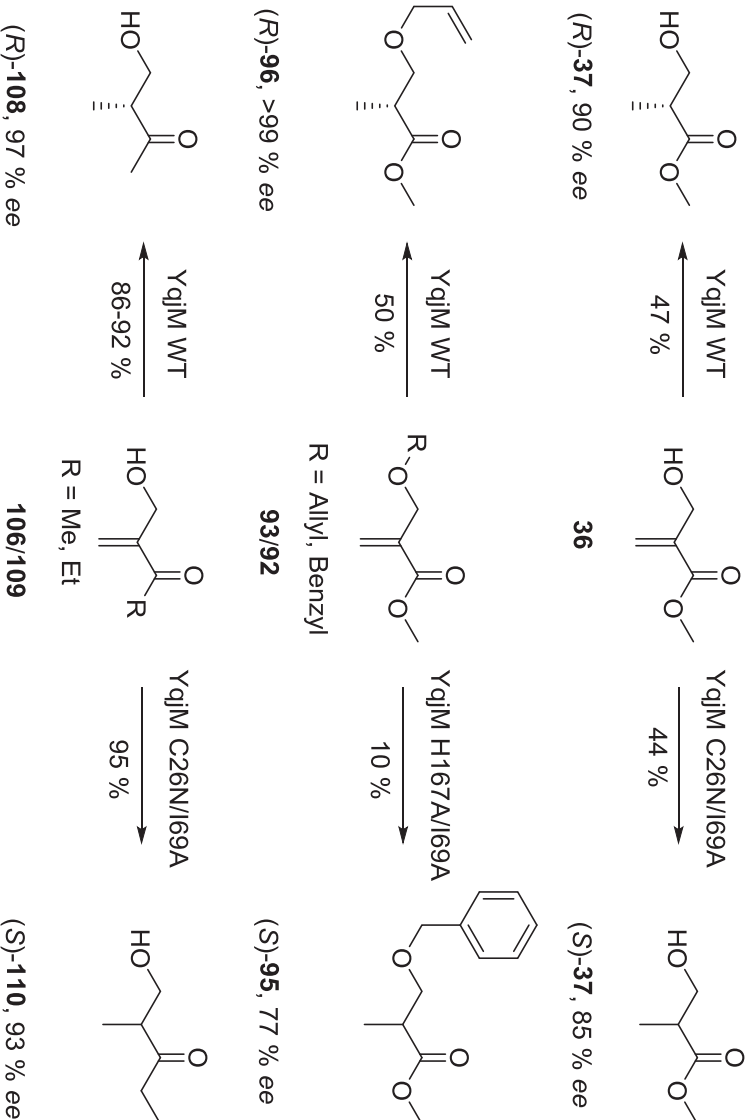
Abbildung 41: Übersicht zur Enantioselektivität von YqjM WT und den erstellten YqjM-Varianten bei Bioreduktion der Substratbibliothek.

Insgesamt wurde durch das innovative Konzept-basierte Vorgehen – inklusive der teilweisen Beschädigung des aktiven Zentrums durch Mutation der Aminosäure H167 – der Mutagenese-Aufwand zur Erstellung stereokomplementärer Enzym-Varianten im Vergleich zur Sättigungsmutagenese (19 Varianten pro Aminosäureposition) und gerichteter Evolution (>1000 Klone) bedeutend reduziert.^[104] Nur 17 Einzel- und Doppel-Varianten mussten insgesamt generiert und bezüglich ihrer Stereopräferenz untersucht werden, um für drei von fünf strukturell verwandten Substraten (**36**, **109** und **92**) Enzyme mit komplementärer Stereoselektivität (90–99 % ee) zum WT zu finden.

Ein Vergleich der drei erfolgreich veränderten Aminosäurepositionen mit denen aus vorhergehenden Studien zu OYEs zeigte, dass Mutationen an Positionen I69 und C26 schon zuvor Enzymvarianten mit WT-entgegengesetzter Selektivität für 3-substituierte Cyclohexenone **40** und *Roche*-Ester-Vorläufer **36** ergaben. Diese Positionen haben nun ihre zusätzliche Anwendbarkeit im Kontext bestimmter hier genutzter *Morita-Baylis-Hillman*-Addukte gezeigt. Dies erweitert die Bandbreite an generell hilfreichen Mutationsstellen bei der Selektivitätsänderung von OYEs. Ein Screening eines breiteren Substratspektrums mit den besten Enzym-Varianten ergab keine weiteren Bioreaktionen mit Wildtyp-entgegengesetzter Stereoselektivität, jedoch ähnliche Trends der Enantiomerenüberschüsse bei Umsetzung der dreifach-substituierten strukturell verwandten Substrate (*E*)-3-Methyl-4-

oxopent-2-ensäureethylester [(*E*)-**44**] und (*E*)-2-Methyl-4-oxopent-2-ensäureethylester (*E*)-**48**.

Außerdem konnte die synthetische Nutzbarkeit der vielversprechendsten Bioreduktionen aus dem Screening für das gezeigte Substratspektrum aus geschützten und ungeschützten *Morita–Boylis–Hillman*-Addukten (**36**, **106**, **109**, **92** und **93**) mit YqjM WT und Varianten im präparativem Maßstab gezeigt werden (Schema 53). Es konnten alle fünf strukturell verwandten Produkte mit (*R*)- oder (*S*)- konfiguriertem Stereozentrum mit 77–99 % *ee* und bis zu 95 % Ausbeute erhalten werden. Alle erhaltenen Produkte sind weit verbreitete chirale synthetische Intermediate und können mit dem vorgestellten chemoenzymatischen Ansatz in zwei (**37**, **108**, **110**) oder vier (**96**, **95**) Reaktionsschritten aus einfachen nicht-chiralen Startmaterialien hergestellt werden. Diese Syntheseansätze können nun in Natur- und Wirkstoffsynthesen zum Einsatz kommen, wobei besonders eine Nutzung im Eintopf mit weiteren Biokatalysatoren eine aussichtsreiche Strategie darstellt. Hinsichtlich der Mutagenesestrategie nach dem Konzept des „rotierten Flips“ wären Tests mit weiteren Enreduktasen aus der OYE-Familie interessant, um zu sehen, ob auch deren Stereoselektivität sich auf diese Weise beeinflussen lässt.



Schema 53: In präparativem Maßstab durchgeführte stereokomplementäre Bioreduktionen mittels YqjM WT und in dieser Arbeit erstellter YqjM-Varianten.

Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**)

Im ersten Teil von **Kapitel 7.3** wurden zwei verschiedene Reaktionswege zur chemoenzymatischen Darstellung des chiralen Synthesebausteins (*2R*)- bzw. (*2S*)-2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) etabliert, wobei ebenfalls eine Strategie zur Erstellung komplementärer Stereozentren mittels YqjM erfolgreich erprobt wurde. Diesmal kam ein und dasselbe Enzym, YqjM WT, zur Erstellung des (*R*)- und des (*S*)-Stereozentrums an C-2-

Position in **66** zum Einsatz. Die Selektivitäts-Umkehr wurde durch eine Veränderung im genutzten Substrat bewirkt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 42** im Überblick dargestellt.

So konnte das (2*R*)-Diol **66** in einem zweistufigen Prozess aus *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion und einer konsekutiven Eintopf-Reaktion mittels YqjM WT und ADH_{Lk} erhalten werden. Das Diastereomerenverhältnis des Produkts **66** war mit 7:1 (*syn:anti*) moderat. Das (2*R*)-Stereozentrum aus der YqjM WT-katalysierten Reaktion wurde jedoch mit bis zu 97 % in sehr gutem Enantiomerenüberschuss erhalten.

Die Ausbeute betrug 34 % in der *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion und 50 % in der Enzymkaskade. Durch eine Optimierung des Isolierungsprotokolls des sehr polaren Produkts **66** aus der Pufferlösung kann möglicherweise noch eine Ausbeuteverbesserung im zweiten Schritt erreicht werden. Die Diastereoselektivität in der Kaskadenreaktion kann möglicherweise durch eine Durchführung bei neutralem pH Wert verbessert werden. Um neben dem (2*R*,3*R*)- auch das (2*R*,3*S*)-Isomer in hoher Reinheit zu erhalten, kann die Durchführung der Kaskade mittels YqjM und anderen ADHS getestet werden.

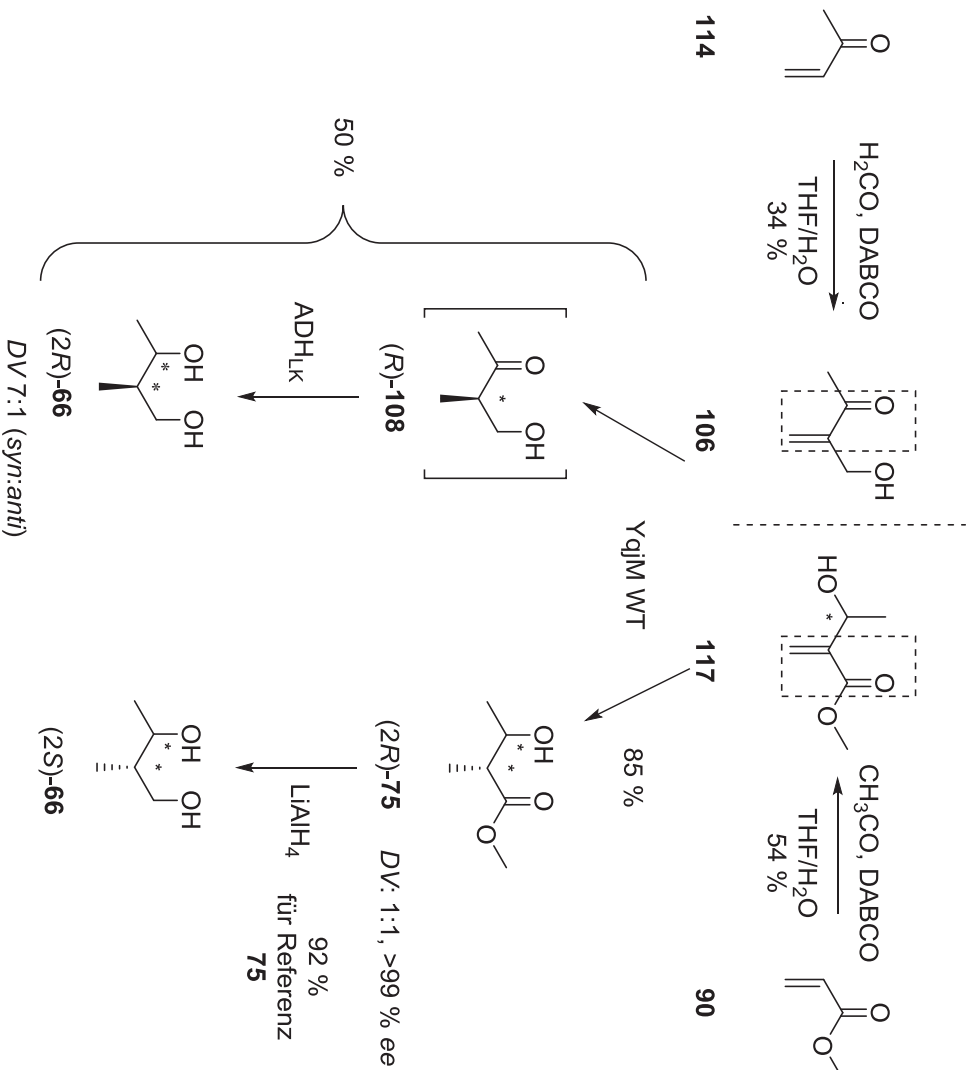


Abbildung 42: Überblick zu den in dieser Arbeit etablierten Strategien zur chemoenzymatischen Synthese von (2*R*)- bzw. (2*S*)-**66**.

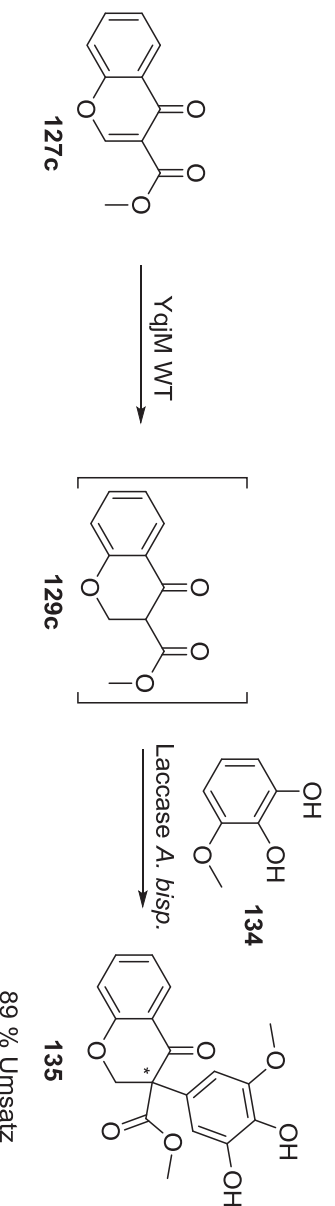
Wie angestrebt, konnte somit gezeigt werden, dass eine Enzymkaskade aus einer ADH und einem OYE zur Synthese von **66** möglich ist. Dies schafft, basierend auf achiralen,

kostengünstigen Edukten, auch erstmals einen zweistufigen Zugang zum *syn*-(2*R*, 3*R*)-Diol **66**.

Zur Synthese von (2*S*)-**66** konnte ebenfalls eine Synthesestrategie unter OYE-Katalyse etabliert werden, obwohl alle zur Verfügung stehenden OYEs gleichermaßen (*R*)-Enantioselektivität bezüglich der Umsetzung von **106** zur Diol-Vorstufe **108** zeigten. Durch gezieltes Design eines alternativen Substrats, des 3-Hydroxy-2-methylenbutansäuremethylesters (**117**), war unter erneuter Nutzung von YqjM WT der Aufbau des entgegengesetzten C-2-Stereozentrums in **66** möglich. Die Enantiomerenreinheit des Intermediär aus **117** erhaltenen Produkts (2*R*)-**75** betrug >99% *ee*. Wie für die Referenzsubstanz gezeigt werden konnte, kann **75** durch Reduktion mittels LiAlH₄ in 92% Ausbeute zu **66** reduziert werden. Insgesamt kann also (2*S*)-**66** auf diesem Weg mit exzellenter Stereoselektivität bezüglich des C-2-Stereozentrums erhalten werden. Die Ausbeute über drei Stufen beträgt 42%. Eine praktikable Synthese des enantiomerenreinen Substrats **117** war auf dem hier getesteten Weg einer kinetischen Racematspaltung von **117** mittels ADH nicht möglich. Im Anschluss an diese Arbeit, im Rahmen der Masterarbeit von M. Mantel, wurde jedoch ein Zugang zum enantiomerenreinen OYE-Substrat **117** etabliert.^[112] Somit sind neben dem (2*R*,3*R*)-Diastereomer von **66** auch (2*S*,3*R* und (2*S*,3*S*)-**66** auf chemoenzymatischem Weg zugänglich. Dieser synthetische Zugang kann nun in der Synthese von Natur- und Wirkstoffen, wie der Antibiotikavorstufe Moninsäure C (**67**), des Macrolid-Antibiotikums Baflomycin A1 (**68**), des antifungalen Wirkstoffs Amphotericin B (**69**) oder des HIV-Wirkstoffs (+)-Calanolid A (**70**) zum Einsatz kommen.

Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskadenreaktion von YqjM und einer Laccase

Zur Verwirklichung einer Enzymkaskade aus Enreduktase und Laccase wurde im zweiten Teil von **Kapitel 7.3** zunächst die Möglichkeit der OYE-katalysierten Synthese von bekannten Laccase-Substraten bzw. günstiger Derivate getestet. Die getesteten Substanzen stammen aus den Familien der Cyclopentenone, der Cumarine und der Chromone. Nach Umsatztests von zehn Substraten mittels YqjM WT wurde der 3-Chromoncarbonsäuremethylester (**127c**), mit 80% glattem Umsatz zum gewünschten Produkt, als am geeignetsten für eine Kaskadenumsetzung ausgewählt. Es wurde gezeigt, dass die YqjM WT-katalysierte Bioreduktion von **127c** zu **129c** im präparativen Maßstab möglich ist. Im analytischen Maßstab wurde außerdem gezeigt, dass die Eintopfreaktion aus Reduktion mittels Enreduktase und Laccase-katalysierter Arylierung funktioniert (**Schema 49**). Der mittels HPLC ermittelte Umsatz zum racemischen Produkt **135** betrug 89%.



Schema 54: Kaskadenumsetzung von 3-Chromoncarbonsäuremethylester (**127c**) mittels YqjM WT und der Laccase aus *Agaricus bisporus* zum 3-arylierten Produkt **135**.

Die Eintropfreaktion im präparativen Maßstab muss in Zukunft noch durchgeführt werden, um die Praktikabilität zu ermitteln. Wenn das Laccase-Substrat einer solchen Reaktionsfolge ein definiertes Stereozentrum in C-2-Position enthält, ist der selektive Erhalt eines einzelnen Produktstereoisomers möglich.^[123] Daher wurde auch **127e** als OYE-Substrat getestet. Dieses konnte mittels der OYEs, die während dieser Arbeit zur Verfügung standen, nicht umgesetzt werden. Durch eine Kooperation sind nun jedoch YqjM-Varianten in unserer Arbeitsgruppe vorhanden, die eine solche stereoselektive Enzymkaskade möglich machen könnten.

Insgesamt konnten im Verlauf dieser Arbeit also zwei Strategien zur Generierung stereokomplementärer OYE-katalysierter Reaktionen entwickelt und für YqjM erfolgreich erprobt werden. Ob die gleichen Vorgehensweisen auch für andere OYEs möglich sind, muss im Anschluss an diese Arbeit untersucht werden. Außerdem wurden zwei Enzymkaskaden unter Verwendung des OYEs YqjM WT etabliert, mittels derer der chirale Synthesebaustein (2*R*)-2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) sowie das arylierte Chromanon **135** in effizienter Weise hergestellt werden können.

9. Experimenteller Teil

Aufgeteilt in einen molekularbiologischen, einen proteinchemischen und einen chemischen Teil werden in diesem Kapitel die experimentellen Details näher erläutert, sowie alle genutzten Materialien und Geräte aufgeführt. In **Tabelle 22** ist eine Übersicht über alle genutzten Geräte gegeben. Alle anderen Materialien sind an der jeweiligen Stelle bei den Protokollen aufgelistet.

Tabelle 22: Übersicht über die in dieser Arbeit genutzten Geräte.

#	Geräte	Fabrikat, Hersteller
1	FPLC-System	ÄKTA Purifier, Amersham Bioscience / GE Healthcare
2	Säulen: Ni ²⁺ -Nitrilotriessigsäure (Ni ²⁺ -NTA) PD-10 Desalting Column	Qiagen, Hilden GE Healthcare (München)
3	Mechanisches Hochdruckzellaufschlussgerät	FRENCH® Press, Thermo Electron Oberhausen GmbH
4	Lyophilie	Lyovac GT2, Steris; Alpha 2–4, Martin Christ
5	pH-Elektrode	pH Elektrode IJ44, Nordantec GmbH; Solvotrode, Metrohm
6	pH-Meter	pH Meter 766 Calimatic, Knick; pH Meter 691, Metrohm Eppendorf
7	Pipetten	Titrimo 744 oder 848, Metrohm
8	Titratoren	JA-20, Beckmann;
9	Rotoren	SS 34, Thermo Scientific Incubator 1000, Heidolph
10	Schüttler	1000 / 500 Power supply, BioRad; Power Pac 300, BioRad
11	SDS-Stromgerät	SD14, Dr. Hielscher GmbH
12	Sonotroden	Sartorius
13	Sterifiltrierer	Eppendorf
14	Thermomixer	UP 200S, Dr. Hielscher GmbH
15	Ultraschallprozessor	NanoDrop 2000c, Thermo Scientific
16	UV-Vis Spektrophotometer	Reax 2000, Heidolph;
17	Vortexer	Genie 2, Vortex Mini Spin®, Eppendorf
18	Zentrifugen	Heraeus Biofuge pico Hettich Rotina 35R Beckmann Coulter GS15-R Dupont Sorvall RC-5B / RC-5B plus
19	PCR-Thermocycler	VWR Doppio

9.1 Material und Methoden – molekularbiologischer Teil

Zur Klonierung wurden Restriktionsenzyme von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) verwendet. Die Vektoren wurden bei Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft und Oligonukleotide wurden als entsalzte Lyophilisate bei Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben. Plasmidpräparationen erfolgten mit dem 'innuPrep Plasmid Mini Kit' von Analytik Jena. Als Längenstandard für DNA-Agarosegele wurde Roti®-Mark 10–150 von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

9.1.1 Die Enreduktase YqjM

Der zentrale Biokatalysator dieser Arbeit ist die Enreduktase YqjM aus *Bacillus subtilis*. Dieser wurde aus dem in **Abbildung 43** gezeigten Plasmid pHT::yqjM hergestellt. Das Gen von YqjM wurde in unserer Arbeitsgruppe entsprechend einer Beschreibung aus der Literatur erhalten.^[66] Der Vektor pHT benennt die HISTEVCassette in pET22b und enthält neben dem T7-Promotor und dem *lac*-Operon zur Regulation der Überexpression von yqjM eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. Die HISTEVCassette ist N-terminal mit der Gensequenz von YqjM verbunden. Zur Expression wird der Vektor in das Bakterium *E. coli* BL21 (DE3) transformiert, das genomisch verankert, *lac*-reguliert die T7-RNA-Polymerase produziert. Somit kann durch Induktion mit IPTG das Protein YqjM produziert werden.

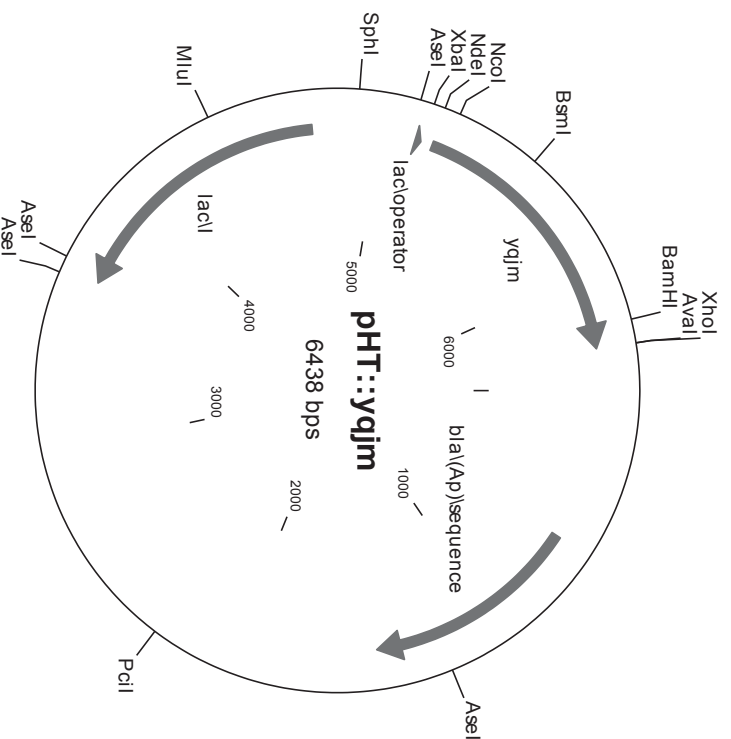


Abbildung 43: Vektorkarte des Plasmids pHT::yqjM, das in dieser Arbeit zur Produktion des Enzyms YqjM genutzt wurde.

Das aus pHT::yqjM erhaltene Protein YqjM hat ein Molgewicht von 39,8 kDa und besteht aus 356 Aminosäuren. Die Aminosäuresequenz ist nachfolgend aufgeführt:

```
MHHHHHHAMTENTLYOGAMARKLFTPTIKDMTLKNRIVMSPMCMYSSHEKDGKLTFFHMAHYISRAI
GOVGLIVEASAVNPQGRITDODDLIGWSDHEIEGFAKLTQVKKEQGSKIGIQLAHAGRKAELEGDIFAPSAI
AFDEOSATPVEMSAEKVKETVQEFFKQAAARAKAEGFDVIEIHAHAGLYLHIEFLSPLSNHRTDEYGGSPEN
```

RYRFLREIIDEVKQVWDGPLFVRVSASDYTEKGLDIADHIGFAKWMKEQGVLLIDCSSGALVHADINVP
GYQVFAEKIREQADMATGAVGMITDGSMAEELLQNGRADLIFIGRELLRDPFFARTAKQLNTEIPAPV
QYERGW.

9.1.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* mit dem jeweiligen Plasmid wurden jeweils 100 µL chemisch kompetenter Zellen verwendet, die aliquotiert vobereitet und bei -80 °C gelagert wurden. Dazu wurden 0.4–1 µL (ca. 100 ng) Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Sodann wurde für 90 s bei 42 °C erhitzt, 1 mL LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C im Rotor inkubiert. Die erhaltene Kultur wurde bei 200 rcf für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 – 100 µL abdekantiert, das Pellet im verbliebenen LB resuspendiert und auf Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Es wurden die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) zur Proteinproduktion und Dh5α zur Plasmidpräparation und Sequenzierung verwendet.

9.1.3 Erstellung der Plasmide durch Mutagenese

Die Vorgehensweise zur Erstellung der veränderten Plasmide ist in **Abbildung 44** als Flussdiagramm dargestellt.

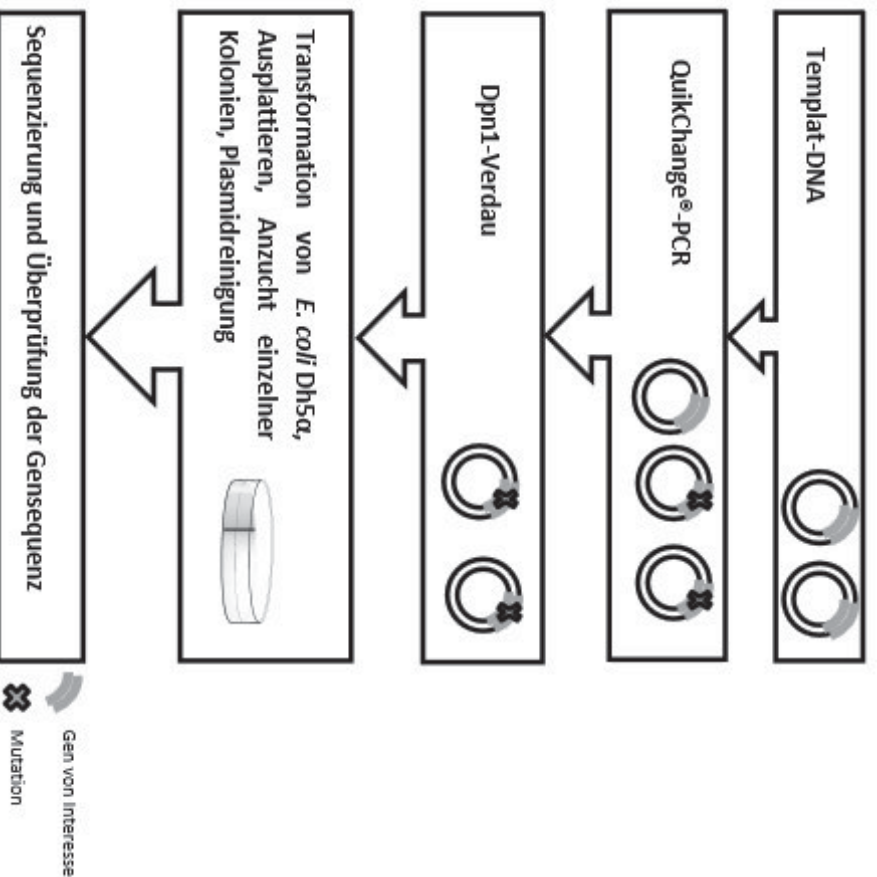


Abbildung 44: Vorgehensweise zur Erstellung der Plasmide mit den angestrebten, spezifischen Mutationen.

Auf Grundlage des vorhandenen Plasmids pHT::yqjM (Vektorkarte siehe **Abbildung 43**) wurden per QuikChange®-PCR (Stratagene, LaJolla, CA) jeweils Einfachmutationen eingefügt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in **Tabelle 23** aufgelistet.

Zur Einführung von Doppelmutationen wurden zwei konsekutive PCRs durchgeführt. In schwierigen Fällen (C26N, C26H) führte teilweise die Nutzung längerer Oligonukleotide oder die Anwendung einer anderen PCR-Methode wie Overlap-Extension-PCR zum Erfolg. Das erhaltene Gemisch aus Templat- und Ziel-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Dpn1 verdaut, in *E. coli* DH5 α mit dem Plasmid transformiert, ausplattiert und kultiviert. Einzelne Kolonien wurden durch Anzucht vervielfältigt, die Plasmid-DNA wurde gereinigt und der Erfolg der Mutation durch Sequenzierung mittels T7 oder pBR3-Primern überprüft. Anschließend wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Plasmid transformiert und im 1-L-Maßstab das für YqjM codierende Gen exprimiert. Die verwendeten Primer und die Protokolle der PCR-Methoden sind in **Kapitel 9.1.3** aufgeführt. In **Abbildung 45** ist beispielhaft das DNA-Agarosegel der erfolgreichen QuikChange[®]-PCR zur Erstellung des Plasmids pHT::yqjM_H167A aufgeführt.

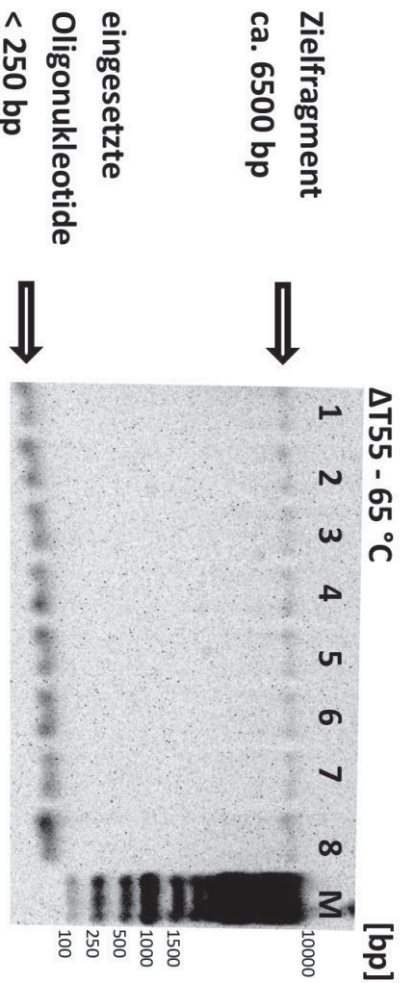


Abbildung 45: Beispielhaftes Agarosegel einer erfolgreichen QuikChange[®]-PCR anhand des Plasmids pHT::yqjM_H167A. Die erwartete Gensequenz hat eine Größe von 6438 Basenpaaren. Die acht PCR-Proben wurden einem Gradienten von Annealingtemperaturen zwischen 55 und 65 °C ausgesetzt. Der Marker (1kb Ladder, Fermentas) ist als M markiert und beschriftet.

9.1.3.1 QuikChange[®]-PCR

Primer-Design:

Zum Primerdesign wurden folgende Richtlinien angewandt: Beide Primer sollten in der Mitte die Mutation enthalten und zueinander komplementär sein. Es wurde eine Größe von 25–45 Basen angestrebt, wobei davon 15–20 im Gen enthalten sein sollten. Der Schmelzpunkt laut OligoCalc^[124] sollte bei etwa 60 °C liegen und der GC-Gehalt mindestens 40 % betragen. Am Ende der Primersequenz soll möglichst ein Guanin oder Cytosin liegen.

Durchführung:

Die Oligonukleotide wurden bei Lieferung entsprechend der Herstellerangaben auf 100 μ M Konzentration verdünnt. Vor Pipettieren der PCR wurden jeweils Lösungen mit 10 μ M Konzentration erstellt. Die QuikChange[®]-PCRs wurden nach dem in **Tabelle 24** beschriebenen Schema zusammen pipettiert, wobei ein Mastermix aller Bestandteile mit Ausnahme der Polymerase erstellt wurde, dieser auf acht PCR-Tubes verteilt und schließlich kurz vor Beginn der PCR mit der Polymerase vermischt wurde. In

Tabelle 25 ist das Temperaturprogramm zur Durchführung der PCR dargestellt. Nach Ende des Temperaturprogramms wurden jeweils 2.5 µL aus jedem PCR-Vial auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe **Abbildung 45**). Anschließend wurde mit Dpn1 verdaut, in *E. coli* Dh5α transformiert, ausplattiert und einzelne Klone im Gärrohrchen angezogen, präpariert und sequenziert.

Tabelle 23: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide, die als forward-Primer für QuikChange[®]-Mutagenese eingesetzt wurden. Der zweite Primer hat jeweils die komplementäre Gensequenz.

#	Name	Sequenz 5' → 3'
1	C26N_fw	TGTCATGTCCGCAATGAACATGTATTCTTCTCATG
2	C26H_fw	TGTCATGTCCCAATGCAATGTATTCTTCTCATG
3	I69Y_fw	CCTCAAGGACGATATACTGACCAAGACTTA
4	I69A_fw	CCTCAAGGACGAGCGACTGACCAAGAC
5	H167A_fw	AAATTCATGCGGCGGGGATATTTAAT

Tabelle 24: Pipettierschema und Protokoll zur Durchführung einer QuikChange-PCR mit Pfu-Polymerase.

PCR x-fach	1x		8x	
	Stamm	C _{final}	V	V
	[mM]	[mM]	[µL]	[µL]
10x Pfu Puffer				
			2	16
dNTPS				
	40	0.8	0.4	3.2
Templat (5-50 ng für 160 µL)				
	-	-	0.1	1
Primer fw				
	0.01	0.0005	1	8
Primer rv				
	0.01	0.0005	1	8
Pfu Polymerase				
	-	-	1	8
Aqua dest.				
	-	-	14.5	116
V_{ges.}			20	160

Tabelle 25: Temperaturprogramm zur Mutagenese mittels QuikChange®-PCR bei Nutzung der Pfu-Polymerase.

	T [°C]	t [min]
Vorheizen des Deckels	110	
Initiales Denaturieren	95	0.5
Cyclen 16x		
Denaturieren	95	0.5
Annealen (T-Gradient)	$T_M \pm 5$	1
Elongation	68	6
Finale Elongation	68	10
Kühlen	4	∞

* T_M , Schmelztemperatur der jeweils genutzten Oligonukleotide, ermittelt mittels des Onlinetools OligoCalc^[124]

9.1.3.2 Overlap Extension-PCR

Zur Mutagenese mittels Overlap-Extension-PCR wurden zusätzlich zu den QuikChange® Primern kommerziell erhältliche T7 Primer verwendet. Es wurden zwei PCRs analog dem Protokoll in **Tabelle 24** durchgeführt, wobei jedoch einmal der forward-Primer mit der Mutation und der reverse-T7-Primer, und bei der anderen der reverse-Primer mit der Mutation und der forward-T7-Primer zum Einsatz kam. Die im Agarosegel überprüften Amplifikate wurden sodann mit dpn1 verdaut und in einer dritten PCR beide als Templat zusammen mit den beiden T7-Primern eingesetzt. Das Protokoll für die dritte PCR ist in **Tabelle 26** aufgeführt.

Das Temperaturprogramm unterscheidet sich nur in der Elongationszeit, die wegen der kleineren Amplifikate nur 1 min benötigt, und der Cyclenzahl, die wegen der exponentiellen Amplifikation erniedrigt werden kann. Das Amplifikat der dritten PCR wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI verdaut, mit gereinigtem ebenfalls auf diese Weise verdautem, linearisiertem Vektor pHT ligiert und schließlich transformiert.

Tabelle 26: Pipettier-Protokoll für die PCR 3 bei Vorgehen entsprechend der Overlap-Extension-PCR.

PCR x-fach	1x		8x	
	C_{Stamm}	C_{final}	V	V
	[mM]	[mM]	[μL]	[μL]
10x Pfu Puffer			2	16
dNTPS	40	0.8	0.4	3.2
Templat (PCR1+PCR2)	-		2x 1	2x8
T7-Primer fw	0.01	0.0005	1	8
T7-Primer rv	0.01	0.0005	1	8
Pfu Polymerase	-	-	1	8
Aqua dest.	-		12.6	101
V ges.			20	160

9.2 Material und Methoden – Proteinchemischer Teil

Chromatographische Säulen und Materialien wurden von GE Healthcare (München) und Qiagen (Hilden) erworben. Die Elution von Protein wurde auf einem ÄKTA-HPLC-Pumpensystem (Amersham Bioscience / GE Healthcare) durchgeführt. Für den Zellaufschluss wurde eine Druckzelle von Thermo Fisher Scientific (Schwert) genutzt. NADP⁺ und NADPH wurde freundlicherweise von Codexis (Redwood City, USA) zur Verfügung gestellt.

9.2.1 Verwendete Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind inklusive ihres nativen Organismus in **Tabelle 27** dargestellt.

Tabelle 27: Verwendete Enzyme inklusive ihres nativen Herkunftsorganismus und Beschaffungsmöglichkeit.

#	Enzymbezeichnung	nativer Organismus	Quelle
1	YqjM	<i>Bacillus subtilis</i>	PCR
2	OYE 1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Plasmid ^[125]
3	OPR 1	<i>Solanum lycopersicum</i> , vorher: <i>Lycopersicum esculentum</i> (Tomate)	Plasmid ^[126]
4	OPR 3	<i>Solanum lycopersicum</i> , vorher: <i>Lycopersicum esculentum</i> (Tomate)	Plasmid ^[127]
5	NCR ZM	<i>Zymomonas mobilis</i>	Plasmid ^[153]
6	NCR PL	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Plasmid ^[153]
7	ADH HL	<i>Equus caballus</i>	Plasmid von M. Pohl zur Verfügung gestellt
8	ADH LB	<i>Lactobacillus brevis</i>	Plasmid
9	ADH LK	<i>Lactobacillus kefir</i>	Plasmid
10	ADH-T	<i>Thermoanaerobacter species</i>	Plasmid
11	ADH Evo 1.1.011	-	evoxy, Monheim
12	ADH Evo 1.1.031	-	evoxy, Monheim
13	ADH Evo 1.1.041	-	evoxy, Monheim
14	ADH Evo 1.1.191	-	evoxy, Monheim
15	ADH Evo 1.1.201	-	evoxy, Monheim
16	ADH Evo 1.1.211	-	evoxy, Monheim
17	ADH Evo 1.1.221	-	evoxy, Monheim
18	GDH	-	Zellpellet von Hummel AG
19	Glukose-Oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Lyophilisat Sigma-Aldrich
20	Laccase	<i>Agaricus bisporus</i>	Lyophilisat Sigma-Aldrich

9.2.2 Fermentation

Alle Nährmedien wurden vor der Nutzung autoklaviert. Antibiotikum wurde kurz vor Nutzung zugegeben. Es wurden jeweils am Abend vorher 5 ml Vorkultur in einem Kulturröhrchen in LB-Medium mit Antibiotikum (0.1 mg/ml Ampicillin) angeimpft und bei 37 °C im Inkubationsrotor inkubiert.

Nährmedien:

LB-Medium:

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, auffüllen auf 1000 ml mit destilliertem Wasser.

TB-Medium:

Es wurden zwei Komponenten getrennt angesetzt und autoklaviert. Erst kurz vor der Nutzung wurden beide gemischt.

Komponente 1: 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, auf 900 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

Komponente 2: 2.31 g KH_2PO_4 , 12.54 g K_2HPO_4 , auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen.

Fermentation im Schüttelkolben

In einem 2.5 L-Fernbachkolben wurde 1 L TB-Medium vorgelegt und mit 0.1 mg/ml Ampicillin versehen. Es wurden 10 ml Vorkultur zugegeben, der Kolben mit Alufolie verschlossen und im Schüttler bei 120 rpm und 25 °C inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD, 600 nm) von ca. 0.7 wurde zur Induktion 0.1 mM IPTG zugegeben und über Nacht bei 20 °C unter Schütteln weiter inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, das Medium verworfen und das Nassgewicht des Zellpellets ermittelt. Es wurde zwischen 8 und 13 g Zellpellet erhalten.

Hochzelldichte-Fermentation

Die Hochzelldichtefermentation erfolgte in Zusammenarbeit mit H. Gieren (IMET, HHU Düsseldorf). Um im 15 L-Maßstab *E. coli*-Zellen im Fed-Batch-Verfahren zu fermentieren, wurden 10 L Batch-Medium und 5 L Feed-Lösung benötigt. Um diese herzustellen, wurden zuerst folgende Stammlösungen hergestellt.

Für eine Fermentation wurden 1500 ml der Stammlösung HZD-Batch nach dem Protokoll in **Tabelle 28** hergestellt. Die HZD-Feed-Lösung wurde aus 500 ml HZD-Batch und 75 g Hefeextrakt hergestellt. Diese beiden Lösungen wurden gemeinsam mit einer Magnesiumsulfat-Lösung ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 200 g L^{-1}) und zwei verschiedenen Glukose-Lösungen (50 ml, 400 g L^{-1} bzw. 4180 ml, 718 g L^{-1}) autoklaviert. Zusätzlich wurden eine Vitaminlösung (**Tabelle 29**, links), eine Ampicillin- (200 g L^{-1}) und eine IPTG-Stammlösung (233 g L^{-1}) in destilliertem Wasser hergestellt und sterilfiltriert. Die nach dem Protokoll in **Tabelle 29**, rechts hergestellte Spurenelementlösung wurde in 5 M Salzsäure statt Wasser hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden entsprechend dem Protokoll in **Tabelle 30** 10 L Batch-Medium und 5 L Feed-Lösung hergestellt.

Tabelle 28: Protokoll zur Herstellung der Stammlösung HZD-Batch in destilliertem Wasser.

#	HZD-Batch	g L ⁻¹
1	Ammoniumchlorid	2
2	Ammoniumsulfat	20
3	KH ₂ PO ₄	130
4	K ₂ HPO ₄	100
5	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	60
6	Hefeextrakt	30

Die Fermentation wurde in einem 40 L-Fermenter des Modells Techfors (Infors HT Bottmingen, Schweiz) bei 30–40 % Sauerstoffpartialdruck, pH 7 und 30 °C durchgeführt. Zum Ausgleich des pH-Werts wurden eine 25 %ige Ammoniaklösung und eine 85 %ige Phosphorlösung verwendet. Es wurde mit 100 mL Vorkultur (OD₆₀₀ 0.7–0.8) in LB-Medium angeimpft und 2 mM mit IPTG induziert. Es wurden jeweils ca. 2 kg Pellet von *E. coli* BL21(DE3)_pHT_yqjM und *E. coli* BL21(DE3)_pHT_yqjM C26N/H167A erhalten.

Tabelle 29: Protokoll zur Herstellung der Vitamin-Lösung in destilliertem Wasser und der Spurenelementlösung in 5 M Salzsäure.

Vitaminlösung	g L ⁻¹	Spurenelementlösung	g L ⁻¹
Riboflavin (Vitamin _{B2})	0.1	CaCl ₂ *2 H ₂ O	10
Thiamin-HCl (Vitamin _{B1})	10	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0.5
Nicotinsäure	0.5	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0.25
Pyridoxin-HCl	0.5	MnSO ₄ * H ₂ O	2.5
Ca-Phantotenat	0.5	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	1.75
Biotin	0.001	H ₃ BO ₃	0.125
Folsäure	0.002	AlCl ₃ * 6 H ₂ O	2.5
Cyanocobalamin (Vitamin _{B12})	0.01	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.5
		FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10

Tabelle 30: Protokolle zur Herstellung von Batch-Medium und Feed-Lösung aus den Stammlösungen bei Hochzelllichtfermentation.

Batch-Medium	ml	Feed-Lösung	ml
HZD-Batch	1000	HZD-Feed	500
Antischaum AF 289	3	Glukose-Lösung (718 g L ⁻¹)	4180
Glukose-Lösung (400 g L ⁻¹)	50	MgSO ₄ -Lösung (200 g L ⁻¹)	250
MgSO ₄ -Lösung (200 g L ⁻¹)	50	Vitaminlösung	25
Vitaminlösung	50	Spurenelementlösung	20
Spurenelementlösung	40	Antischaum AF289	2
Inokulum	100		
destilliertes Wasser	8700		

9.2.3 Zellaufschluss

Ultraschall:

Das Zellmaterial der Hochzelllichte-(HZD)-Fermentation wurde durch Ultraschallbehandlung aufgeschossen. Dafür wurden 20 % (w/v) der Zellen in ca. 200 ml KP₁-Puffer (20 mM, pH 6.5 für YqjM pH 7 für sonstige Enzyme) resuspendiert, in einer Schottflasche auf Eis gestellt und kontinuierlich in eine gekühlte Glasapparatur mit Sonotrode gepumpt und dort für 1 h beschallt (**Abbildung 46**, Ultraschallprozessor UP 2005 und Sonotrode SD14, Dr. Hielscher GmbH, Telthof, Deutschland). Die Einstellung des Ultraschall-Desintegrators erfolgte auf 70 % der Maximalamplitude und einem Zyklus von 0.5. Im weiteren Verlauf wurden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (40 min, max. Geschwindigkeit, 4 °C).^[128] Der Überstand, der die löslichen Zellbestandteile und das rekombinante Enzym beinhaltet, wurde direkt als Rohextrakt für Enzymreaktionen eingesetzt oder wie beschrieben aufgereinigt.

French-Press[®]

Der Zellaufschluss erfolgte alternativ zur Ultraschallbehandlung durch Hochdruckhomogenisation mittels French-Press[®]. Dafür wurden 20 % (w/v) der Zellen in 20 mM KP₁-Puffer resuspendiert und dreifach in einer French-Press[®]-Druckzelle (40 K Zelle, Volumen 30 ml) bei einem Druck von max. 1000 psi aufgeschossen. Nach dem Aufschluss der Zellen erfolgte die Gewinnung des Rohextraktes durch Abzentrifugieren der Zellbruchstücke für 20 min bei 18.000 g und 4 °C. Der Überstand wurde direkt weiter für die Enzymreaktionen eingesetzt oder wie beschrieben aufgereinigt.

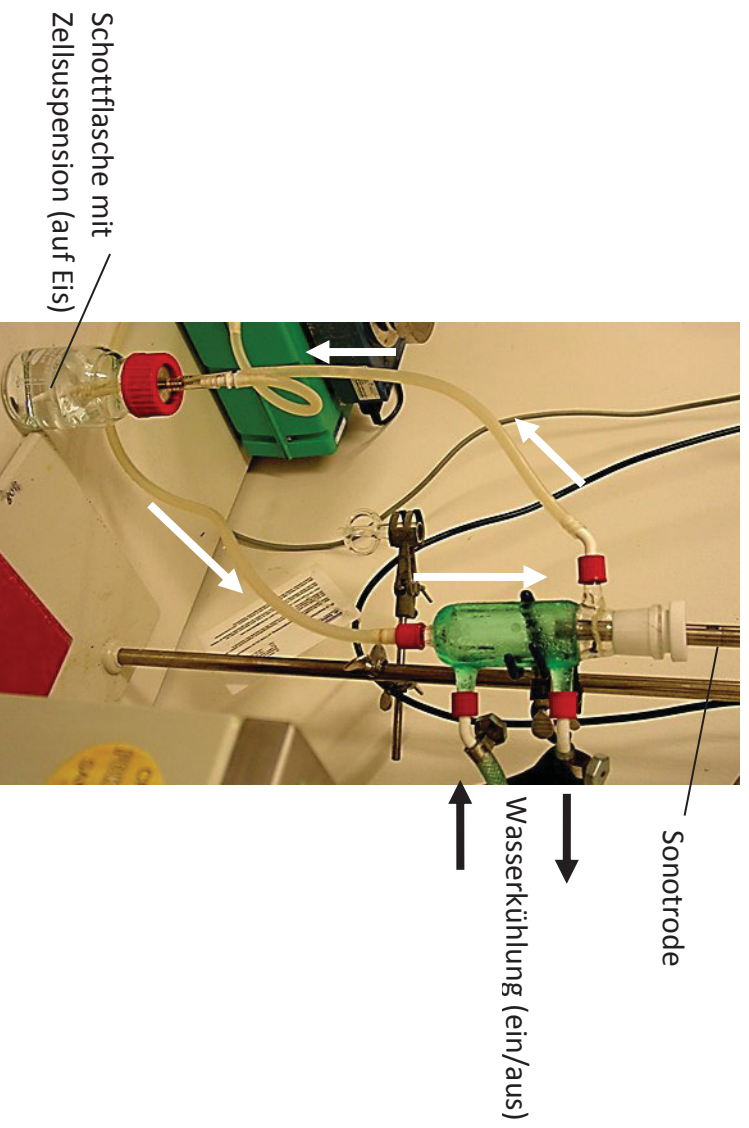


Abbildung 46: Gekühlte Glasapparatur zur kontinuierlichen Ultraschallbehandlung von Zellsuspensionen.

9.2.4 SDS-PAGE

Zur Analyse der Proteinreinheit wurde Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS)-gebundenen Proteinen durchgeführt. Die Proteine werden bei der Probenvorbereitung denaturiert und linearisiert und von dem anionischen Tensid SDS umgeben. Somit wird die Eigenladung der Proteine maskiert und die einheitlich negativ geladenen Proteine können mittels Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Als Längenstandard wurde der 'Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder' von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Zur Gelvorbereitung und zur Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN 3®-System von Bio-Rad (CA, USA) genutzt. Zur Probenvorbereitung wurde ein Teil des 5-fach Probenpuffers (Protokoll, **Tabelle 31**) und vier Teile einer proteinhaltigen Lösung zusammengegeben und für 20 min bei 99 °C erhitzt.

Tabelle 31: Protokoll zu Herstellung des SDS-Probenpuffers (5-fach konzentriert).

Komponente	Konzentration
Tris, pH 6.8	500 mM
Saccharose	30 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
DDT	50 mM
Bromphenolblau	0.1 % (w/v)

Die Proteinlösung wurde so verdünnt, dass bei aufgereinigten Proben ca. 20 µg Protein in 75 µL Probe enthalten sind.

Die Gele wurden selbst gegossen. Dazu wurde zuerst ein Trenngel (15 % Polyacrylamid)) in die Gel-Form eingefüllt und, nach 30–60 min Trockenzzeit, das Sammelgel. In das Sammelgel wurde sofort ein Kamm eingefügt, um Probentaschen zu generieren. Sodann wurde das Gel wiederum trocknen gelassen und entweder sofort genutzt oder bei 4 °C in feuchte Tücher gewickelt gelagert. Die Herstellung von Trenn- und Sammelgel erfolgte jeweils aus einer Stammlösung aus Tris/HCl-Puffer, SDS und ggf. Glycerin. Die vorbereiteten Stammlösungen wurden dann mit Acrylamid/Bisacrylamid als Monomer, Tetramethylethylenediamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator und Ammoniumpersulfat (APS) als Polymerisationsinitiator vermischt und dadurch polymerisiert. Die Protokolle zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel sowie der jeweiligen Stammlösungen sind in **Tabelle 32** und **Tabelle 33** aufgeführt.

Tabelle 32: Vorgehen zur Herstellung des Trenngels.

Trenngel-Stammlösung	[mL]	Trenngel	[µL]
Glycerin	114.9	Acrylamid/Bisacrylamid	1500
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	81.76	Trenngel-Stammlösung	2250
SDS [10 % (w/w)]	3.31	TEMED	1.875
		APS	18.75

Tabelle 33: Vorgehen zur Herstellung des Sammelgels.

Sammelgel-Stammlösung	[mL]	Sammelgel	[µL]
Aqua dest.	125.5	Acrylamid/Bisacrylamid	300
0.5 M Tris/HCl pH 6.8	52.6	Sammelgel-Stammlösung	1710
SDS [10 % (w/w)]	21.9	TEMED	1.875
		APS	18.75

Das fertige Gel wurde in SDS-Laufpuffer [25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/w) SDS, pH 8.8] mit Proben und dem Marker beladen und bei 100 V ins Trenngel einlaufen gelassen. Schließlich wurde bei 200 V innerhalb von ca. 30–45 min die Trennung durchgeführt. Die Gele wurden sofort unter Schütteln über Nacht mit kolloidalem Coomassie (Protokoll: **Tabelle 34**) eingefärbt.

Tabelle 34: Protokoll zur Herstellung von kolloidalem Coomassie.

Coomassie	Konzentration
Phosphorsäure	2 % (w/v)
Ethanol	10 % (v/v)
Aluminiumsulfat (Al ₂ (SO ₄) 3x 6 H ₂ O	5 % (w/v)
Coomassie Brilliant Blau G-250	0,02 % (w/v)

9.2.5 Proteinreinigung

9.2.5.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Zur Reinigung von YqjM WT und Varianten mittels des in der Proteinsequenz enthaltenen His-Tags wurde entsprechend der von T. Classen etablierten Methode vorgegangen.^[53] Mittels einer Spritzenpumpe wurde zuerst die Ni-NTA-Säule (V 5 mL) mit 10 Säulenvolumina des eingesetzten Puffers äquilibriert. Sodann wurden maximal 30 mL Rohextrakt im kontinuierlichen Fluss innerhalb von 20 min auf die Säule geladen und kurz mit reinem Puffer nachgespült. Im Anschluss wurde die mit YqjM beladene, gelb gefärbte Säule im Pumpensystem ÄKTA installiert und mit Imidazol-haltigem Puffer der Konzentrationen 20 mM und 250 mM in zwei Stufen eluiert. Die Elutionslösung der zweiten Konzentrationsstufe wurde in 5 mL-Fractionen gesammelt und es wurden anhand der Absorption bei 280 nm die Proteinkonzentration abgeschätzt und 20 mL der Proteinlösung gesammelt. Der gesamte Vorgang wurde mit dem gleichen Rohextrakt noch einmal wiederholt und die erhaltenen Proteinlösungen wurden ggf. mit FMN versetzt. In Vivaspin-Konzentratoren (MWCO 10 kDa) wurde die Lösung entsprechend des Zentrifugationsprotokolls aufkonzentriert und durch Größenausschlusschromatographie wurden Imidazol und überschüssiges FMN entfernt. Bei Zugabe von >1mM FMN wurde vor Konzentrationsbestimmung eine zweite Größenausschluss-chromatographie durchgeführt.

Es wurden im Allgemeinen ca. 15-20 mg YqjM pro Gramm Zellpellet erhalten.

9.2.5.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Fällung von YqjM WT mittels Ammoniumsulfat wurde Rohextrakt aus einer Fermentation im Schüttelkolben auf eine Aktivität von 5-6 U/mL bzw. eine Enzymkonzentration (A280 nm) von 90–100 mg/mL eingestellt. Sodann wurde das Rohextrakt (V = mindestens 10 mL) bei 4 °C unter kräftigem Rühren mittels eines Magnetrührers vorsichtig bis zur 40 %igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt (226 mg/mL). Die Lösung wurde für 1 h bei 4°C gerührt und bei 10000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und unter Rühren bei 4 °C wurde die Lösung bis zur 70 %igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Wiederum wurde für 1 h unter Rühren inkubiert, abzentrifugiert und abdekantiert. Das erhaltene Pellet der 70 %igen Fällung wurde entweder im Ausgangsvolumen Wasser (dest.) resuspendiert und sofort in Enzymreaktionen eingesetzt oder bei Nutzung kleinerer Volumina zusätzlich entsalzt.

9.2.6 Aktivitätstests

Die Enzymaktivität wird in der Einheit Unit (U) angegeben, wobei 1 U derjenigen Stoffmenge Substrat in μmol entspricht, die pro Minute umgesetzt wird. Es handelt sich nicht um eine SI-Einheit, aber um die in der Proteinchemie normalerweise genutzte Größe. Es ist zu beachten, dass die Angabe der Aktivität für ein Enzym immer nur exakt für die genutzten Bedingungen gültig ist, und somit neben der Aktivität eines Enzyms immer auch der zugehörige Test angegeben werden muss.

Die Enzymaktivität wurde photometrisch durch zeitabhängige Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt (Messwert: $\Delta A \text{ min}^{-1}$). Dies entspricht einer indirekten Messung des Substratumsatzes anhand von Verbrauch oder Produktion von NAD(P)H (4), da bei 340 nm selektiv nur die reduzierte Form des Nikotinamidcofaktors absorbiert. Diese besitzt einen Extinktionskoeffizient bei 340 nm von $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Messzeit betrug zwischen 30 und 60 s, die Konzentration der eingesetzten Enzymlösung wurde jeweils so angepasst, dass im Messzeitraum nur die konstante Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen wurde (linearer Kurvenverlauf $A \rightarrow t$). Der Zusammenhang zwischen NADPH-Konzentration und Absorption wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (**Gleichung 3**) hergestellt.

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon_{340} \cdot d \cdot c$$

- A Absorption
 I/I_0 Intensität/ Intensität bei $c = 0$
 d Schichtdicke der Küvette = 1 cm

Gleichung 3: Lambert-Beer'sche Gleichung.

Die Umrechnung der gemessenen Absorptionsänderung pro Minute in die Enzymaktivität erfolgt dann nach **Gleichung 4**.

$$\text{Aktivität} \left[\frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot \frac{V}{\epsilon_{340} \cdot v \cdot d} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \cdot K_f$$

V Testvolumen (1000 μl)

v Probenvolumen der Enzymlösung (10 μl)

K_f Küvettenfaktor (16.08 mmol L^{-1})

Gleichung 4: Zusammenhang zwischen Aktivität und dem Messwert, Absorption pro Minute.

Diese stellt mittels Lambert-Beer über den sogenannten Küvettenfaktor den proportionalen Zusammenhang zwischen Aktivität und Absorption pro Minute her. Der Küvettenfaktor ist eine Konstante, die sich aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von NAD(P)H, der Schichtdicke der Küvette und einer Assay-spezifischen Volumenkorrektur zusammensetzt.

Um Messgenauigkeit und die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes (**Gleichung 3**) zu gewährleisten, wurden nur Messungen innerhalb des Absorptionsbereich von 0.2–1 berücksichtigt. Die Gültigkeit von Lambert-Beer im gewählten Messbereich wurde durch

Messung einer Eichkurve gezeigt (**Abbildung 47**). Es wird ersichtlich, dass eine lineare Regression der gemessenen Absorptionswerte nur bei niedrigen Konzentrationen NADPH möglich ist. Der im Assay genutzte Messbereich bis 0.15 mM NADPH ist noch einmal vergrößert dargestellt und durch eine lineare Regression angenähert. Es wird in diesem Bereich ein hohes Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0.99 erreicht. In diesem Messbereich können also Aktivitätstests durchgeführt werden.

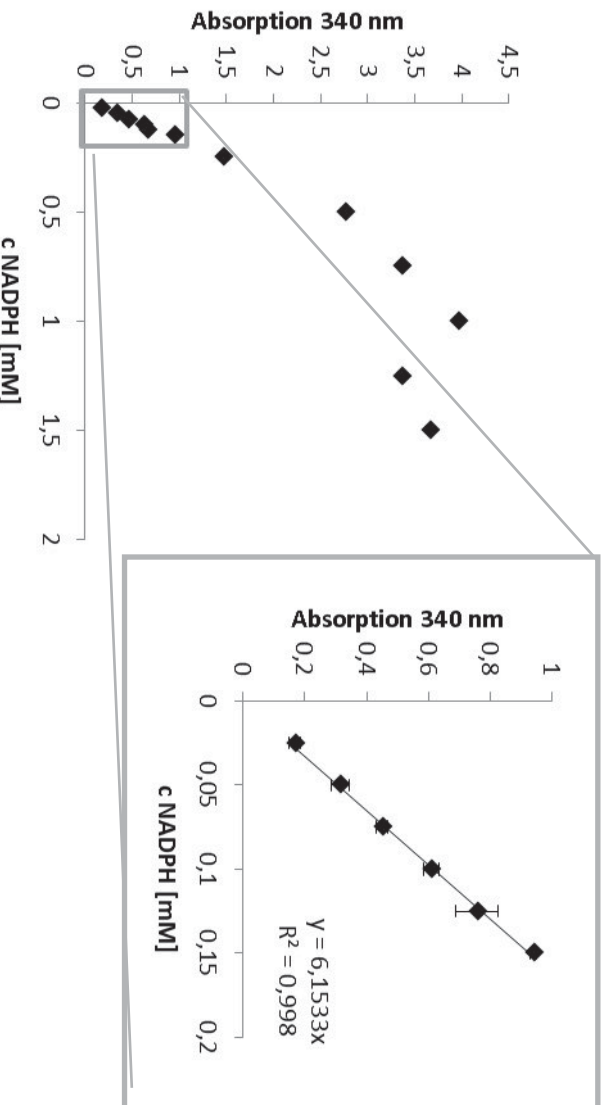
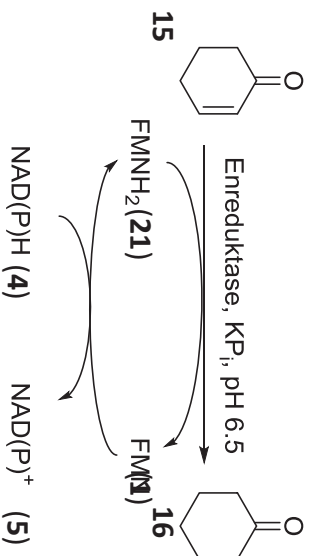


Abbildung 47: Bestimmung der Korrelation von Absorption bei 340 nm und NADPH-Konzentration zwischen 0 mM und 2 mM NADPH und lineare Regression zwischen 0 und 0.15 mM zur Bestimmung des linearen Bereichs.

Jede Messung wurde dreifach durchgeführt und arithmetisch gemittelt. Als Reaktionsgefäße dienten 1 mL-Glasküvetten oder UV-durchlässige Plastik-Küvetten. Die verwendete Messtemperatur ist 30 °C. Die Zusammensetzungen der Tests für die verschiedenen Enzyme inklusive Pipettierschema werden im Folgenden dargestellt. Die Bestandteile wurden jeweils in der genannten Reihenfolge zusammengegeben.

9.2.6.1 Enreduktasen

Die Testreaktion, auf die sich alle angegebenen Aktivitätswerte von Enreduktasen beziehen, ist die Biooxidation von 2-Cyclohexanon (**15**) zu Cyclohexanon (**16**) (**Schema 55**). Zusätzlich zum angegebenen Assay erfolgte jeweils auch eine Dreifachbestimmung des Hintergrundes der gleichen Mischung ohne Substratzugabe. Es wurden zwei verschiedene Tests verwendet. Eine Zuordnung ist daher bei jeder Aktivitätsangabe vermerkt. Der erste Test, der sich besonders für Enzym-Substrat Kombinationen hoher spezifischer Aktivität eignet, ist in **Tabelle 35** beschrieben. Gegebenenfalls wurde der verwendete Puffer direkt vor dem Test 2 h in einer Flasche mit Vakuumaufsatz unter Rühren entgast. Zusätzlich wurden zur Etablierung eines Sauerstoff-verbrauchenden Systems die in **Tabelle 36** und **Tabelle 37** dargestellten, modifizierten Aktivitätstests für Enreduktasen getestet.



Schema 55: Darstellung der Bioreduktion von 2-Cyclohexenon (15), die als Standardreaktion im bereits etablierten Aktivitätstest für Enreduktasen verwendet wird. Bedingungen: KP_i 20 mM, pH 6.5, 1.5 mM NADPH, 1 mM Substrat, 10 µL Enzymlösung.

Tabelle 35: Aktivitätstest 1 zur Bestimmung der Volumenaktivität von Enreduktasen.

	Stammlösung		V [µL]	C _{Ende} [mM]
	C _{Stammlösung} [mM]	V		
KP _i , pH 6.5	20	790		
Substrat in KP _i	10	100	1	
NADPH in H ₂ O	1.5	100	0.15	
Enreduktase in KP _i 20 mM, pH 6.5	-	10	-	

Tabelle 36: Vorgehen zum Test eines möglichen Aktivitätstests mit Laccase/TEMPO/EtOH als Sauerstoff-verbrauchendes System.

	Stammlösung		V [µL]	C _{Ende} [mM]
	C _{Stammlösung} [mM]	V		
KP _i , pH 6.5 (entgast)	20	790		
2-Cyclohexenon (15) in KP _i	10	100	1	
NADPH in H ₂ O	1.5	100	0.15	
EtOH	-	2	35	
TEMPO (84)	60	100	6	
	[U/mL]	[µL]	[U/mL]	
Enreduktase in KP _i 20 mM, pH 6.5	-	10	-	
Laccase (<i>Agaricus bisporus</i>)	80	62	5	

Tabelle 37: Aktivitätstest 2 zur Bestimmung der Volumenaktivität von Enreduktasen mit Glukose/Glukoseoxidase als Sauerstoff-verbrauchendes System.

	$c_{\text{Stamm}}^{\text{Lösung}}$ [mM]	V [μL]	c_{Ende} [mM]
KP _i , pH 6.5	20	370 ^{b)}	
Substrat in KP _i	10	50 ^{b)}	1
Glukose in KP _i	1000	10 ^{b)}	100
Glukose- Oxidase ^{a)}		10 ^{b)}	20 U/ml
NADPH in H ₂ O	1.5	50	0.15
Enreduktase in KP _i 20 mM, pH 6.5	-	10	

^{a)}Stammlösung mit 3.5 mg/ml, 267 U/mg Lyophilisat ^{b)} ggf. wurde ein Mastermix aus den markierten Bestandteilen hergestellt.

Der Aktivitätstest 2 wurde mit 500 μL Gesamtvolumen und 10 μL Enzymlösung durchgeführt, wodurch die nach **Gleichung 4** errechnete Aktivität mit dem Faktor 0.5 korrigiert werden muss.

9.2.6.2 Alkoholdehydrogenasen

Für Aktivität-Assays von Alkoholdehydrogenasen wurde Acetophenon (ADH_{LB}, ADH_T) oder Benzaldehyd (ADH_{HL}) verwendet. Das Protokoll ist in **Tabelle 38** dargestellt.

Tabelle 38: Aktivitätstest zur Bestimmung der Volumenaktivität von Alkoholdehydrogenasen.

	$c_{\text{Stamm}}^{\text{Lösung}}$ [mM]	Volumen [μL]	c_{Ende} [mM]
KP _i , pH 7, 1 mM MgCl ₂	100	0	-
Substrat in KP _i	11	970	11
NAD(P)H in H ₂ O	10	20	0.2
ADH in KP _i , pH 7	-	10	-

9.2.6.2.1 Glukosedehydrogenase

Tabelle 39: Aktivitätstest zur Bestimmung der Volumenaktivität von Glukosedehydrogenase.

	Stammlösung [mM]	Volumen [µL]	C _{Ende} [mM]
KP, pH 7	100	790	-
Substrat in KP _i	10	100	1
NAD(P) ⁺ in H ₂ O	10	100	1
GDH in KP _i	-	10	-

9.2.7 Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Messung der Kinetik wurden die in **Kapitel 9.2.6** beschriebenen Aktivitätstests verwendet. Statt der angegebenen Substratlösung wurde jedoch jeweils eine Konzentrationsreihe hergestellt und nacheinander mit der gleichen Menge Enzym vermessen.

Die erhaltenen Messwerte wurden mittels der Enzymkonzentration in spezifische Aktivitäten umgewandelt und mit Hilfe der Software Origin 9.1 nach dem Modell einer *Michaelis-Menten*-Funktion (**Gleichung 5**) angenähert.

$$f(x) = \frac{v_{max} \cdot x}{K_M + x}$$

Gleichung 5: *Michaelis-Menten*-Funktion.

Aus der Kurve ergeben sich somit Werte für die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{max} . Aus letzterer wurde mittels des Molekulargewichts von YqjM (38 kg/mol) die Wechselzahl k_{cat} [s⁻¹] und schließlich nach k_{cat} / K_M die katalytische Effizienz errechnet.

9.2.8 Bestimmung des FMN-Gehalts von YqjM

Die Sättigung von YqjM mit FMN kann anhand von **Gleichung 6** ermittelt werden. Diese beruht auf der experimentellen Korrelation der spezifischen Aktivität mit der FMN-Sättigung, wobei die extrapolierte maximale Aktivität einer Sättigung von 1, also 100 % entspricht. Diese betrug in dieser Messung mittels des Aktivitätstests 1 für YqjM WT ca. 4 U mg⁻¹. Durch Inkubation mit 5 mM FMN kann 95 %ige Sättigung einer YqjM-Lösung mit 2.5 mg mL⁻¹ Proteingehalt erreicht werden.

$$S = 3.39 \cdot \frac{A_{458nm}}{A_{280nm}} = 4.53 \cdot \frac{A_{432nm}}{A_{280nm}}$$

Gleichung 6: Formel zur Bestimmung der FMN-Sättigung von YqjM anhand von Absorptionsmessungen.

9.2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden, entweder mittels Bradford-Assay oder näherungsweise anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt.

Zur Bestimmung der Enzymkonzentration von YqjM *via* der Absorption bei 280 nm wurden bereits eingehende Untersuchungen durchgeführt.^[66] Dabei konnte für YqjM ein spezifischer von der FMN-Sättigung S abhängiger Extinktionskoeffizient bestimmt werden. (**Gleichung 7**)

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} = 1.015 \cdot S + 0.8 \left[\frac{\text{mL}}{\text{mg} \cdot \text{cm}} \right]$$

Gleichung 7: Spezifischer Extinktionskoeffizient von YqjM bei 280 nm.

Für einige Sättigung von 1 besteht daher ein Extinktionskoeffizient von 1.815. Nach Inkubation mit 5 mM FMN wurde falls nicht weitere Angaben gemacht sind zur Vereinfachung der Extinktionskoeffizient als 2 angenommen.

9.3 Material und Methoden – chemischer Teil

Glasgeräte und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht selbst synthetisiert, von den Firmen Alfa Aesar, Sigma-Aldrich Co., VWR International / Merck KGaA, Acros Organics (Thermo Fisher Scientifics Inc.) oder TCI Europe bezogen. Die verwendeten Lösungsmittel waren entweder in reiner Form kommerziell erhältlich oder wurden nach bekannten Methoden^[129] weitgehend von Wasser und Verunreinigungen befreit. Dichlormethan, Toluol, THF und Diethylether wurden mittels des Lösungsmittelrücknungssystems der Firma MBraun (MB SPS-800) getrocknet. Für Reaktionen unter Schutzgasatmosphäre (Stickstoff- oder Argonatmosphäre) wurden Glasgeräte verwendet, die über Nacht bei 110 °C im Trockenschrank gelagert wurden. Die entsprechenden Reaktionen wurden nach üblicher Methode unter Anwendung der *Schlenk*-Technik durchgeführt.^[130]

Produktaufarbeitung

Falls es nicht anders bei den jeweiligen Versuchen angegeben ist, wurden die verschiedenen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer destillativ entfernt. Das Wasserbad wurde hierfür auf eine Temperatur von ca. 40 °C (bei leicht flüchtigen Substanzen auf 30 °C) eingestellt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, wobei dieser je nach Lösungsmittel variierte. Das Trocknen der Substanzen erfolgte im Vakuum bei ca. 10⁻³ mbar, um vorhandene Lösungsmittelsuren zu entfernen.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Fertigfolien der Firma Macherey-Nagel, POLYGRAM® SIL G / UV₂₅₄ mit Fluoreszenz-Indikator verwendet. Die Detektion erfolgte entweder über UV-Absorption, mittels einer wässrigen Kaliumpermanganat-Lösung oder mittels einer Cer-Molybdat-Lösung [10 g Ce(SO₄)₂·4 H₂O, 25 g Molybdatophosphorsäure, 60 mL konz. H₂SO₄, 940 mL H₂O], und anschließender Entwicklung mit einem Heißluftföhn.

Säulenchromatographie

Für die chromatographische Trennung mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 M der Firma Macherey-Nagel (40–63 µm, 230–400 mesh) verwendet. Die jeweils benötigten Lösungsmittel enthielten Gemische aus tiefsiedendem Petrolether (Sdp. 40–60 °C) und Essigsäureethylester oder *n*-Pentan, Diethylether und Dichlormethan.

HPLC

Die Enantiomerenanalytik der chiralen Verbindungen wurde mit einem Gerät der Firma Dionex/ThermoFischer (UltiMate 3000) durchgeführt. Es wurden folgende chirale Säulen der Firma Daicel verwendet: Chiralpak IC (ϕ = 0.46 cm, Länge = 25 cm), Chiracel OD-H (ϕ = 0.46 cm, Länge = 25 cm) und Chiralpak IA (ϕ = 0.46 cm, Länge = 25 cm). Als mobile Phase dienten Gemische aus *n*-Heptan und Isopropanol, die jeweils vor den Messungen im Ultraschall-Bad (Firma Branson Modell 1210 und 1510) entgast wurden. Die verwendeten Wellenlängen, die Retentionszeiten, die stationären Phasen sowie die jeweiligen Flussraten (mL*min⁻¹) sind im Experimentaltteil angegeben.

Kernresonanzspektroskopie

Die Messungen der NMR-Spektren erfolgten an folgenden Geräten:

^1H -NMR-Spektren:	Bruker Avance/DRX 600	(Messfrequenz: 600 MHz)
^{13}C -NMR-Spektren:	Bruker Avance/DRX 600	(Messfrequenz: 151 MHz)

Sämtliche NMR-Messungen wurden in deutlerierten Lösungsmitteln aufgenommen. Die Spektren wurden auf die charakteristischen Lösungsmittelsignale kalibriert. Die chemische Verschiebung wurde in ppm und die Größe der Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Bei der Beschreibung der Multiplizitäten der einzelnen Signale wurde auf die folgenden gängigen Abkürzungen zurückgegriffen: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) und br (verbreitetes Signal). Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand der Kopplungskonstanten, Multiplizitäten, DEPT-, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren.

Massenspektrometrie/Gaschromatographie

Die Massenspektren wurden entweder am Institut für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf oder am Zentralinstitut für Engineering Elektronik und Analytik (ZEA) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Im Institut für Bioorganische Chemie wurde für MS-Messungen ein GC-MS mit Elektronenstoßionisation (EI) und Quadrupolmassenanalysator der Firma Hewlett Packard, Modell HP6890 mit der Kapillarsäule HP5MS genutzt. Hier wurde in allen Messungen dasselbe Standardtemperaturprogramm verwendet. Die Angabe der EI-Fragmente erfolgte typischerweise relativ zu dem Hauptfragmentpeak (100 %).

Für die Gaschromatographie wurde außerdem ein Gerät mit Flammenionisationsdetektor (FID) der Firma Thermofischer (Modell: Trace GC) verwendet. Hier standen vier verschiedene chirale Säulenmaterialien der Firma Macherey-Nagel zu Verfügung: FS Lipodex G, FS Lipodex E, Hydrodex β TBDAC und Hydrodex β 3P. Die verwendete Säule und das zugehörige Programm sind jeweils bei der analysierten Substanz mit angeben.

Drehwerte

Die Drehwerte der optisch aktiven Substanzen wurden mittels Polarimeter der Firma PerkinElmer des Typs 341 bei 589 nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Messungen erfolgten in einer temperierten zylindrischen Messzelle mit der Pfadlänge 1 dm. Die verwendete Konzentration, Temperatur und das Lösungsmittel sind beim jeweiligen Versuch aufgeführt. Durch mindestens zwei unabhängige – arithmetisch gemittelte – Messungen wurden die Drehwerte nach **Gleichung 8** berechnet.

$$[\alpha]_D^{20} = 100 \cdot \frac{\alpha_{\text{Gerät}}}{c \cdot d}$$

$\alpha_{\text{Gerät}}$	gemessener Wert [°]
$[\alpha]_D^{20,0}$	spezifischer Drehwert der Verbindung bei der Wellenlänge der Natriumlampe und 20.0 °C [° mL / cg dm].
c	Konzentration der vermessenen Lösung [cg/mL].
d	Länge der vermessenen Flüssigkeitssäule [dm].

Gleichung 8: Gleichung zur Berechnung des spezifischen Drehwerts aus den Messdaten.

Infrarotspektren

Die Infrarotspektren wurden an einem PerkinElmer SpectrumOne IR-Spektrometer aufgenommen. Hierbei wurden die Proben im ATR-Verfahren (abgeschwächte Totalreflexion) als Film vermessen. Die Lage der Absorptionsbanden im Spektrum wurde in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] angegeben und die Zuordnung auf charakteristische Banden reduziert.

Schmelzpunkte

Mit einem Messgerät der Firma Büchi (Melting Point B-540) wurden die Schmelzpunkte gemessen und nicht korrigiert. In den Fällen, bei denen kein exakter Schmelzpunkt ermittelt werden konnte, sind die Schmelzbereiche angegeben.

9.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

9.3.1.1 Bio reduktionen im analytischen Maßstab

Alle Bio reduktionen im analytischen Maßstab wurden in 1.5 mL Eppendorf-Tubes durchgeführt und soweit nicht anders angegeben mit IMAC-gereinigtem Enzym durchgeführt. Unter Umsatz wird, soweit nicht anders angegeben, der per GC oder HPLC detektierte Umsatz zu Produkt(en) verstanden. Eventuell nicht sichtbare Nebenprodukte wurden dabei, falls nicht anders angegeben, nicht berücksichtigt. Die Testreaktionen wurden entsprechend der in **Tabelle 40** angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert und im temperierten Schüttler bei 30 °C und 250 upm für 24 h inkubiert. Der jeweils anfangs eingestellte Anfangs-pH-Wert ist bei jedem Experiment angegeben.

Tabelle 40: Protokoll des Standard-Testansatzes für Enreduktasumsetzungen im 1 mL-Maßstab.

Substanz	C _{Stamm} [mM]	V [µL]	C _{Ende} [mM] / Gehalt
KP _i	20	auf 1 mL Auffüllen	
Glukose in KP _i	1000	20	20
NADP ⁺ in KP _i	5	40	0.2
Substrat	Reinstoff	1	-
	500	10	5
Cosolvens	-	10	1 % (v/v)
GDH	-	-	ca. 1 U
Enreduktase	-	-	0.3–1 U

Zur Aufarbeitung wurde die Reaktion nach der Inkubationszeit mit 450 µL Methyl-*tert*-butylether (MTBE) oder Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen und sofort per GC an chiralen Säulenmaterialien, GC/MS oder HPLC analysiert. Als Positivkontrolle wurde jeweils das Substrat Cyclohexanon mit der gleichen Enzymmenge umgesetzt. Bei Einsatz von 0.3 U YqjM WT wird Cyclohexanon zu 100 % umgesetzt. Bei unbekanntem Substrat wurden Negativkontrollen ohne Enzymzugabe vermessen um das Verhalten des Substrats unter den Reaktionsbedingungen zu untersuchen.

9.3.1.2 Bioreduktion im präparativen Maßstab mittels YqjM

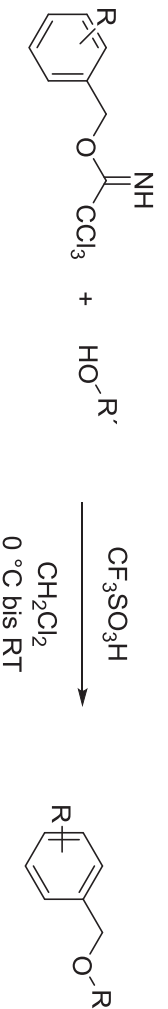
Das Substrat (ca. 1 mmol) wurde unter Argon in einem Zweihalskolben vorgelegt und nacheinander mit KP₁ (100 mM, pH 7.5 entgast), NADP⁺ (0.3 mM), Glukose (250 mM), 2-Methyltetrahydrofuran [1% (v/v)] and GDH (ca. 2.5 U in KP₁-Puffer, pH 7) versetzt und mittels eines Teflonmagnetrührstäbchens gerührt. Sodann wurde eine pH-Elektrode und eine Bürette mit automatischem Titriersystem installiert um den pH-Wert korrekt einzustellen und während der Reaktion konstant zu halten. Zuletzt wurde eine geeignete Enreduktase zugegeben. Das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches betrug 20 mL (Substratkonzentration 50 mM). Nach 24 h wurde der Reaktionsfortschritt kontrolliert und ggf. eine weitere Menge Enzym, NADP⁺ und GDH zugegeben um möglichst vollständigen Umsatz zu erreichen.

Zur Aufarbeitung wurde die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumsulfat (0.8 g mL⁻¹) gequenchet und für mindestens 1 h gerührt. Dann wurde das Gemisch über Celite gefiltert, die wässrige Phase mit MTBE oder EE extrahiert, getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Ggf. folgte eine Aufreinigung. Die Produkte wurden soweit nicht anders angegeben per ¹H-NMR, GC (chirale stationäre Phase) und Polarimetrie analysiert und mit den Referenzsubstanzen verglichen.

9.3.1.3 Reduktion mittels H-Cube™

Das Substrat wurde als 50 mM Lösung in den H-Cube™ eingetragen und über die Katalysatorkartusche geleitet. Nach abgeschlossener Reaktion wurde der H-Cube™ mit THF (10 mL/mmol) gespült. Die Überprüfung des Umsatzes erfolgte mittels GC oder ¹H-NMR. Bei unvollständigem Umsatz wurde die Reaktionslösung erneut in den H-Cube™ eingetragen. Nach Erreichung des vollständigen Umsatzes wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt.

9.3.1.4 Benzylische Schützung mittels Trichloroacetimidat



Schema 56: Allgemeines Schema der Benzylschützungen von Alkoholen mittels Trichloroacetimidat.

Unter N₂-Atmosphäre wurde der Alkohol (1 Äq.) in Dichlormethan (3.5 mL/mmol Alkohol) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde das Benzyl-Trichloroacetimidat-Reagenz (**136**, 1.5 Äq.) und Trifluormethansulfonsäure (11 µL/mmol Alkohol) gegeben. Anschließend wurde die Kühlung entfernt und die Reaktion für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde der Reaktionsansatz über Celite filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Produkt mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die wässrige Lösung wurde nochmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten, organischen

Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.

9.3.1.5 Reduktion mittels LiAlH_4

Lithiumaluminiumhydrid (1.25 Äq.) in THF (1 mL/mmol) wurde unter Inertgas-Atmosphäre (N_2) auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Das Substrat wurde in THF (1 mL/mmol) gelöst und über 1 h unter Rühren der Reaktionslösung zugetropft. Danach wurde über 1 h bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ und 2 h bei RT weitergerührt und die Temperatur danach auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt. Es erfolgte die Zugabe von Wasser (47 μL /mmol), NaOH (47 μL /mmol) und erneut Wasser (141 μL /mmol). Das gefällte Aluminiumhydroxid wurde abfiltriert und das Filtrat mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Einengen der organischen Phase erfolgte am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck.

9.3.2 Syntheseschritten und Analytik zum Kapitel 7.2 Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM

9.3.2.1 Substratsynthesen mittels der *Morita–Baylis–Hillman*-Reaktion

Einen direkten Zugang zu 2-Hydroxymethyl-substituierten, α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen bietet die in **Schema 57** dargestellte *Morita–Baylis–Hillman*-Reaktion. Diese wurde daher soweit möglich zur Herstellung derartiger Substrate genutzt. Es wurden die Ester **36**, **102**, **103**, **101**, **117**, die Ketone **106** und **109** sowie der Aldehyd **118** auf diese Weise hergestellt und ihre Syntheseschritten sind im Folgenden dargestellt. Die Herstellung des Aldehyden **107** *via Morita–Baylis–Hillman*-Reaktion (**Kapitel 9.3.2.3**) war nicht erfolgreich könnte aber mit den Erkenntnissen aus der Syntheseoptimierung von **118** vermutlich ebenso erfolgen.



Schema 57: Allgemeines Schema der *Morita–Baylis–Hillman*-Reaktion.

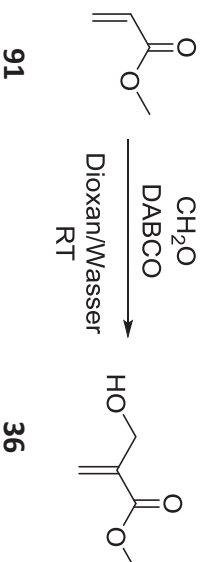
Morita–Baylis–Hillman-Reaktion - Variante A

Die ungesättigte Carbonylverbindung wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus 1,4-Dioxan oder THF und Wasser (1:1, v/v) vorgelegt. Dazu wurde der Aldehyd (wässrige Lsg.) getropft und anschließend der Aminkatalysator zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt bis per $^1\text{H-NMR}$ keines der Edukte mehr detektiert wurde. Zur Aufarbeitung wurde angesäuert (pH 3-4), mit Ethylacetat extrahiert, mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und bei vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt.

Morita–Bowly–Hillman-Reaktion - Variante B

In Anlehnung an eine Vorschrift von Nicolaou *et al.*^[131] wurde in einem Schlenk-Kolben unter Stickstoff die ungesättigte Carbonylverbindung in 2/3 des Gesamtvolumens THF vorgelegt. Dazu wurde bei 0 °C Formaldehyd gegeben, der Katalysator im übrigen THF gelöst und ebenfalls bei 0 °C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf RT aufgewärmt und weiter gerührt bis die Reaktionskontrolle per DC oder ¹H-NMR zeigte, dass die Nebenprodukte bedeutend zunahmen. Zur Aufarbeitung wurde gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt.

9.3.2.1.1 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäuremethylester (**36**)



Optimierte Versuchsvorschrift:

Die Verbindung wurde nach der Vorschrift **A** für *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktionen dargestellt. Es wurden 4.10 mL Acrylsäuremethylester (**90**) (1.5 Äq., 45 mmol), 3.0 mL Formaldehyd (37 %ig, 1 Äq., 30 mmol) und 5.1 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (1.5 Äq., 45.0 mmol) in 45 mL Dioxan-Wasser-Gemisch eingesetzt. Das Produkt **36** wurde als schwach gelbes Öl in ca. 90 % Reinheit (NMR) erhalten und für weitere chemische Umsetzungen in dieser Form eingesetzt.

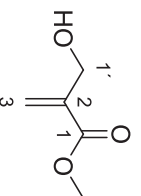
Ausbeute (**36**) (116.12 g/mol): 2.03 g (17.5 mmol, 58 %).

Um für Enzymassays eine optimale Reinheit zu erhalten wurden 1.24 g (10.7 mmol) des Rohprodukts weiter aufgereinigt. Durch Vakuumdestillation (0.15 mbar, 30 °C Übergangstemperatur) nach Zugabe des Polymerisationsinhibitors Phenothiazin (35 mg, 0.18 mmol) wurde das Produkt als farbloses Öl, ohne große Ausbeuteverluste im Vergleich zum Rohprodukt erhalten.

Ausbeute (**36**) (116.12 g/mol): 1.21 g (10.4 mmol).

DC $R_f = 0.4$ (PE/EE, 50:50).

Färbung erfolgte mittels schwefelsaurer Cerammoniummolybat-Lösung.



¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 6.27 (dt, ² $J_{3a,3b} = 0.9$ Hz, ⁴ $J_{3a,1'} = 0.8$ Hz, 1H, 3-H_a), 5.85 (dt, ⁴ $J_{3b,1'} = 1.4$ Hz, ² $J_{3b,3a} = 0.9$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.34 (ddd, ² $J_{1',OH} = 6.6$ Hz, ⁴ $J_{1',3b} = 1.4$ Hz, ⁴ $J_{1',3a} = 0.8$ Hz, 2H, 1'-H), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.24 (br, 1H, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 166.9 (C-1), 139.4 (C-3), 126.1 (C-2), 62.8 (C-1'), 52.1 (OCH₃).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3660-3010 (O-H v, br), 2955 (C-H v, aliph.), 1719 (C=O v), 1635 (C=C v), 1438, 1216 (C-O v), 1155, 1054.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 115 (3) [(M-H)⁺], 87 (100), 85 (72) [(M-CH₃O)⁺], 84 (73) [(C₄H₄O₂)⁺], 55 (70) [C₃H₃O]⁺].

t_R (GC/MS): 4.2 min

Nach längerer Lagerung zeigte sich ein Abbauprodukt: m/z (%) = 115, 99, 83, 69, 55.

t_R (GC/MS): 4.0 min.

Siedepunkt:

30 °C (0.15 mbar)

entspricht ca. 230 °C (1 atm)

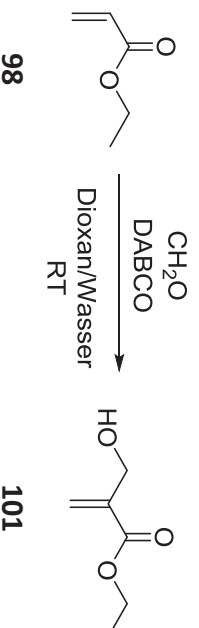
GC:

Säule: Lipodex G

Temperaturprogramm: 50 °C (40' iso), 5 °C/min auf 120 °C (5' iso).

t_R: 42.3 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein. ^[132]

9.3.2.1.2 2-(Hydroxymethyl)-acrylsäureethylester (101)

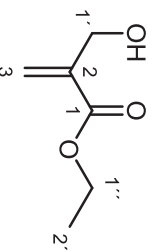
Die Verbindung wurde nach der allgemeinen Vorschrift für *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktionen **A** durchgeführt. Es wurden 740 µL Formaldehyd (37 %ig, 1 Äq., 10 mmol), 3.25 mL Acrylsäureethylester (3 Äq., 30 mmol) und 3.8 g DABCO (3 Äq., 30 mmol) in 10 mL Dioxan-Wasser-Gemisch eingesetzt. Das Produkt wurde nach 6 Tagen Rühren in einer Rohausbeute von 1.16 g erhalten. Aufreinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE, 70:30) ergab das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute (**101**, 130.14 g/ mol): 586 mg (4.5 mmol, 45 %)

DC

$R_f = 0.37$ (PE/EE, 70:30)

Färbung erfolgte mittels einer wässrigen Kaliumpermanganatlösung.



101

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz):

δ [ppm] = 6.26 (dt, $^2J_{3a,3b} = 1.3$ Hz, $^4J_{3a,1'} = 0.8$ Hz, 1H, 3- H_a), 5.83 (dt, $^4J_{3b,1'} = 1.4$ Hz, $^2J_{3b,3a} = 1.3$ Hz, 1H, 3- H_b), 4.33 (ddd, $^3J_{1',\text{OH}} = 6.6$ Hz, $^4J_{1',3b} = 1.4$, $^4J_{1',3a} = 0.8$ Hz, 2H, 1'-H), 4.25 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.1$ Hz, 2H, 1''-H), 2.30 (t, br, $^3J_{\text{OH},1'} = 6.6$ Hz, 1H, OH), 1.32 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, 3H, 2''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz):

δ [ppm] = 166.5 (C-1), 139.7 (C-2), 125.8 (C-3), 62.9 (C-1'), 61.1 (C-1''), 14.3 (C-2'').

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3430 (O-H v, br), 2984 (C-H v, aliph.), 1709 (C=O v), 1638 (C=C v), 1449, 1388, 1155, 1055, 949.

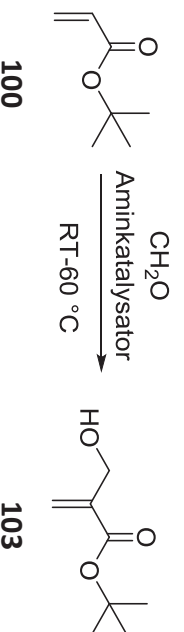
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 129 (2) [(M-H) $^+$], 113 (8) [(M-OH) $^+$], 101 (61) [(M-C₂H₅) $^+$], 85 (100) [(M-C₂H₅O) $^+$], 73 (41) [(M-C₃H₅O) $^+$], 55 (52) [(C₃H₃O) $^+$].

t_R (GC/MS): 4.9 min

NMR- und IR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[133]

9.3.2.1.3 2-(Hydroxymethyl)acrylsäure-*tert*-butylester (**103**)



Diese *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift **A** durchgeführt. Es wurden 74.5 μL Formaldehyd-Lösung (37 %ig, 1 Äq., 1 mmol), 439.4 μL Acrylsäure-*tert*-butylester (**100**) (3 Äq., 3 mmol) und 379 g DABCO (3 Äq., 3 mmol) in 1 mL Dioxan-Wasser-Gemisch eingesetzt. Das Gemisch wurde nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur, das kaum zu Umsatz führte, für 6 h auf 60 °C erhitzt. Nachdem per $^1\text{H-NMR}$ vollständiger Umsatz detektiert wurde, wurde aufgearbeitet und das Rohprodukt als gelbliches Öl erhalten.

Rohausbeute (**103**, 158.20 g/ mol): 30 mg (0.19 mmol, 19 %).

Alternative Vorgehensweise:

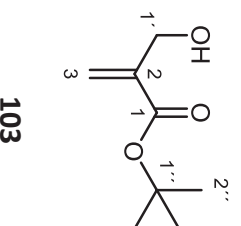
In Anlehnung an eine Vorschrift von Zhang *et al.*^[134] wurden 744 μL Formaldehyd-Lösung (37 %ig, 1 Äq., 10 mmol), 952 μL Acrylsäure-*tert*-butylester (**100**) (0.65 Äq., 6.5 mmol) und 82 mg DABCO (0.07 Äq., 0.65 mmol) in 2.5 mL THF-Wasser-Gemisch (v/v 1:1) bei 55 °C gerührt bis per $^1\text{H-NMR}$ vollständiger Umsatz detektiert wurde (ca. 7 Tage). Nach Aufarbeitung wurde *via* Säulenchromatographie (PE/EE, 70:30) aufgereinigt und das Produkt als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**103**, 158.20 g/ mol): 464 mg (2.93 mmol, 29 %).

DC

$R_f = 0.4$ (PE/EE, 70:30)

Färbung erfolgte mittels einer wässrigen Kaliumpermanganatlösung.



$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz):

δ [ppm] = 6.15 (dt, $^2J_{3a,3b} = 1.5$ Hz, $^4J_{3a,1} = 0.8$ Hz, 1H, 3- H_a), 5.74 (dt, $^2J_{3b,3a} = 1.5$ Hz, $^4J_{3b,1} = 1.4$ Hz, 1H, 3- H_b), 4.28 (dd, $^4J_{1',3b} = 1.4$ Hz, $^4J_{1',3a} = 0.8$ Hz, 2H, 1'-H), 1.51 (s, 9H, 2''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz):

δ [ppm] = 165.9 (C-1), 140.9 (C-2), 125.0 (C-3), 81.6 (C-1'), 63.0 (C-1''), 28.2 (C-2'').

IR (ATR, Film):

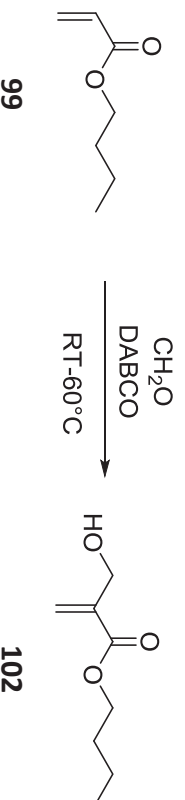
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3462 (ν O-H, br), 2979, 2934 (ν C-H, aliph.), 1706 (ν C=O), 1638 (ν C=C), 1369, 1148 (ν C-O-C), 1054 (ν CH₂-OH), 847.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 143 (1) [(M-CH₃)⁺], 103 (9), 85 (43) [(M-C₄H₉O)⁺], 73 (8) [(C₄H₉O)⁺], 57 (100) [(C₃H₅O)⁺], 56 (76).

t_R (GC/MS): 5.6 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein.^[135]

9.3.2.1.4 2-(Hydroxymethyl)acrylsäure-*n*-butylester (102)

Die Verbindung wurde nach der allgemeinen Vorschrift für *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktionen **A** durchgeführt. Es wurden 75 µl Formaldehyd (37 %ig, 1 Äq., 1 mmol), 430 µl *n*-Butylacrylat (**99**) (3 Äq., 3 mmol) und 379 mg DABCO (3 Äq., 3 mmol) in 2 ml Lösungsmittel-Wasser-Gemisch eingesetzt.

Dioxan-Wasser: Rohausbeute (**102**, 158.19 g/ mol): 92 mg (0.58 mmol, 58 %)

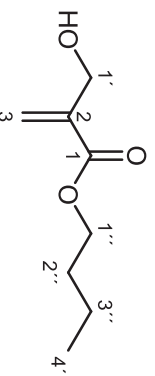
THF-Wasser: Rohausbeute (**102**, 158.19 g/ mol): 97 mg (0.61 mmol, 61 %)

Im 10 mmol Maßstab wurde mit 10 ml Dioxan-Wasser-Gemisch gearbeitet, da hier etwas weniger Nebenprodukte gebildet wurden. Das Produkt wurde nach 7 Tagen Rühren in einer Rohausbeute von 1.54 g erhalten. Aufreinigung durch Säulenchromatographie (PE/EE, 70:30) ergab das Produkt als farbloses Öl.

Ausbeute (**102**, 158.19 g/mol): 1.03 g (6.5 mmol, 65 %)

DC

R_f = 0.5 (PE/EE, 70:30).



102

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 6.25 (dt, $^2J_{3a,3b} = 1.3$ Hz, $^4J_{3a,1'} = 0.7$ Hz, 1H, 3-H_a) 5.82 (dt, $^2J_{3b,3a} = 1.3$ Hz, $^4J_{3b,1'} = 1.3$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.33 (ddd, $^3J_{1',OH} = 6.6$ Hz, $^4J_{1',3b} = 1.3$ Hz, $^4J_{1',3a} = 0.7$ Hz, 2H, 1'-H), 4.19 (t, $^3J_{1'',2''} = 6.6$ Hz, 2H, 1''-H), 2.24 (t, $^3J_{OH,1'} = 6.6$ Hz, 1H, OH), 1.67 (tt, $^3J_{2'',3''} = 7.5$ Hz, $^3J_{2'',1''} = 6.6$ Hz, 2H, 2''-H), 1.42 (tq, $^3J_{3'',2''} = 7.5$ Hz, $^3J_{3'',4''} = 7.4$ Hz, 2H, 3''-H), 0.95 (t, $^3J_{4'',3''} = 7.4$ Hz, 3H, 4''-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 166.4 (C-1), 139.5 (C-2), 125.6 (C-3), 64.8 (C-1'), 62.7 (C-1''), 30.6 (C-2'), 19.2 (C-3''), 13.7 (C-4'').

IR (ATR, Film):

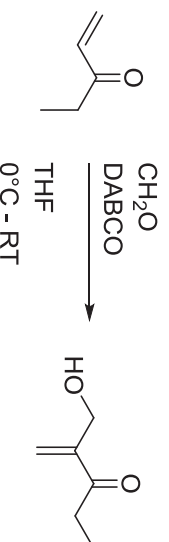
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3429 (ν O-H, br), 2961, 2935, 2875 (ν C-H, aliph.), 1710 (ν C=O), 1635 (ν C=C), 1158 (ν C-O-C), 1052 (ν CH₂-OH), 946, 818.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 129 (3) [(M-C₂H₅)⁺], 102 (11) [(M-C₄H₈)⁺], 85 (100) [(C₄H₅O₂)⁺], 73 (30) [(C₄H₅O)⁺], 57 (51) [(C₃H₅O)⁺], 56 (52) [(C₃H₄O)⁺], 55 (34) [(C₃H₃O)⁺].

t_R (GC/MS): 6.9 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein.^[133]

9.3.2.1.5 2-(Hydroxymethyl)pent-1-en-3-on (109)

137

109

Diese *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift **B** durchgeführt. Es wurden 410 µl Ethylvinylketon (**137**; 1 Äq., 4 mmol), 447 µl Formaldehyd (37 %ige Lösung, 1.5 Äq., 6 mmol) und 50.5 mg DABCO (0.1 Äq., 0.4 mmol) verwendet. Die Gesamtmenge THF betrug 3 ml und die Reaktion wurde nach 3 h Rühren aufgearbeitet. Die Extraktion erfolgte mit Diethylether. Das Produkt wurde möglichst sofort per

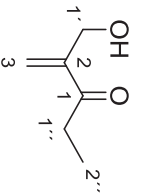
Vakuumdestillation aufgereinigt (0.072 mbar, Übergangstemperatur 40-45 °C). Das Reinprodukt **109** wurde als oranges Öl erhalten.

Ausbeute (**109**, 114 g/mol): 73 % (334 mg, 2.93 mmol)

DC

$R_f = 0.33$ (PE/EE = 80:20).

$R_f = 0.46$ (PE/EE = 50:50), Färbung erfolgte jeweils mit Kaliumpermanganat-Lösung.



109

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 6.11 (dt, $^4J_{3a,1'} = 0.7$ Hz, $^4J_{3a,3b} = 0.4$ Hz, 1H, 3-H_a), 5.99 (dt, $^4J_{3b,1'} = 1.3$ Hz, $^4J_{3b,3a} = 0.4$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.32 (dd, $^4J_{1',3b} = 1.3$ Hz, $^4J_{1',3a} = 0.7$ Hz, 1H, 1'-H), 2.75 (q, $^3J_{1'',2''} = 7.3$ Hz, 2H, 1''-H), 2.36 (s, br, 1H, OH), 1.11 (t, $^3J_{2'',1''} = 7.3$ Hz, 3H, 2''-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 203.2 (C-1), 146.8 (C-2), 125.0 (C-3), 62.9 (C-1'), 31.2 (C-1''), 8.2 (C-2'').

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3413 (O-H v, br), 2980, 2940 (C-H v, aliph.), 1666 (C=O v), 1378, 1066, 1019, 978, 946.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 113 (2) [(M-H)⁺], 85 (100) [M-C₂H₅]⁺, 57 (35) [(M-C₃H₅O)⁺].

t_R (GC/MS): 4.8 min

Siedepunkt:

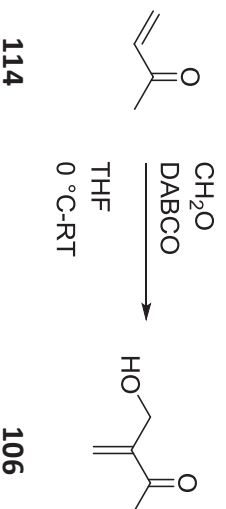
40-45 °C (0.072 mbar)

entspricht ca. 220 °C (1 atm)

- GC:** FS-Lipodex E
- Säule:** FS-Lipodex E
- Temperaturprogramm:** 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).
- t_R:** 17.5 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein. ^[136]

9.3.2.1.6 3-(Hydroxymethyl)but-3-en-2-on (106)



Diese *Morita-Baylis-Hillman*-Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift **B** durchgeführt. Es wurden 21.7 mL Methylvinylketon (**114**, 1 Äq., 20 mmol), 3.8 mL Formaldehyd (37%ige Lösung, 2.5 Äq., 50 mmol) und 2.53 g DABCO (1 Äq., 20 mmol) verwendet. Die Gesamtmenge THF betrug 27 mL und die Extraktion erfolgte nach 24 h Reaktionszeit mit Ethylacetat. Nach Aufreinigung des Rohprodukts per Säulenchromatographie (PE/EE, 50:50) wurde das Produkt als hellgelbes Öl spektroskopisch rein erhalten.

Ausbeute (**106**, 100 g/mol): 34 % (681 mg, 6.8 mmol).

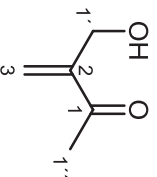
Literaturausbeute: 30 % ^[131]

Nach zusätzlicher Vakuumdestillation bei 0.12 mbar (Übergangstemperatur 40 °C) kann das Produkt als farbloses Öl erhalten werden.

DC

R_f = 0.3 (PE/EE = 50:50).

Färbung erfolgte mittels schwefelsaurer Cerammoniummolybdatlösung.



106

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 6.13 (s, 1H, 3-H_a), 6.05 (dt, ⁴J_{3b,1'} = 1.3 Hz, ⁴J_{3b,3a} = 1.3 Hz, 1H, 3-H_b), 4.32 (ddd, ³J_{1',OH} = 6.5 Hz, ⁴J_{1',3b} = 1.3 Hz, ⁴J_{1',3a} = 0.7 Hz, 2H, 1'-H), 2.38 (s, 3H, 1''-H), 2.35 (t, ³J_{OH,1} = 6.5 Hz, 1H, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 200.5 (C-1), 147.3 (C-2), 126.3 (C-3), 62.6 (C-1'), 26.1 (C-1'').

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3409 (O-H v, br), 2927 (C-H v, aliph.), 1666 (C=O v), 1367, 1303, 1220, 1135, 1052 (C-O v), 1030, 973.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 99 (2) [(M-H)⁺], 85 (100) [M-CH₃]⁺, 57 (8) [C₃H₅O]⁺, 55 (9) [(C₃H₃O)⁺].

t_R (GC/MS): 3.8 min

Siedepunkt:

ca. 40 °C (0.12 mbar)

entspricht ca. 240 °C bei Atmosphärendruck (1.013 mbar = 1 atm).

Lit.: 55 °C (0.7–1 Torr) entsprechen 230 °C (1 atm).

GC:

Säule: Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R: 14.6 min

oder

Säule: FS-Lipodex G

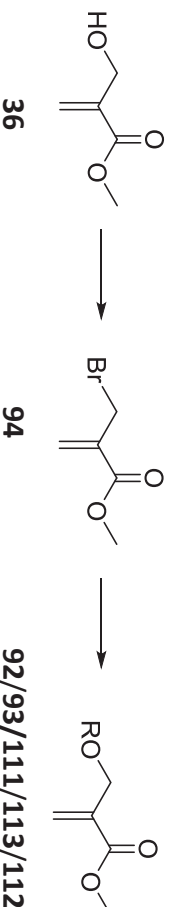
Temperaturprogramm: 50 °C (40' iso), 15 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R: 32.6 min

Die gemessenen NMR und IR-Daten stimmen mit der Literatur überein.^[136-137]

9.3.2.2 Synthese der Hydroxyl-geschützten Roche-Ester-Vorläufer

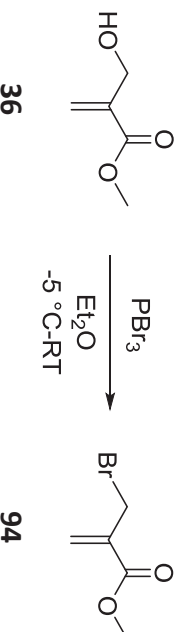
Die Hydroxyl-geschützten Varianten des Roche-Ester-Vorläufers **36**, wurden zweistufig aus diesem über die Zwischenstufe des 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (**138**) und anschließende nukleophile Substitution mit den verschiedenen Benzylalkoholen bzw. Allylalkohol hergestellt (**Schema 58**). So wurde die Benzyl-geschützte Variante **92** in einer Gesamtausbeute von 53 % erhalten. Das Allyl-geschützte Substrat konnte in 63 % Ausbeute aus **36** erhalten werden. Außerdem wurden die benzylgeschützten Varianten **111**, **113** und **112** so erhalten.



Schema 58: Allgemeines Schema der Herstellung geschützter Derivate von **36**.

Für die Benzylschützung wurde auch eine einstufige, Palladium-katalysierte Variante der Schützung getestet, die jedoch mit 28 % Ausbeute keinen Vorteil brachte.

9.3.2.2.1 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (**94**)



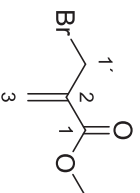
In Anlehnung an eine Vorschrift von Villieras *et al.*^[138] wurde in einem Schlenk-Rohr unter Inertgasbedingungen 2-(Hydroxymethyl)-2-propensäuremethylester (**36**, 1 Äq, 4.5 g, 39 mmol) in trockenem Diethylether (225 mL) vorgelegt. Dazu wurde vorsichtig bei -5 °C Phosphortribromid (0.54 Äq, 2 mL, 21 mmol) zugetropft und unter Erwärmen auf Raumtemperatur ca. 2 h weitergerührt, bis DC und ¹H-NMR vollständigen Umsatz anzeigten.

Zum Quenchen erfolgte Zugabe von Wasser bei 0 °C. Es wurde mit Diethylether extrahiert, mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde unter vermindertem Druck das Lösemittel entfernt. Das Produkt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (Eluent: Dichlormethan) als schwach gelbes Öl erhalten.

Ausbeute (**94**, 179 g/mol): 72 % (5 g, 27.9 mmol).

DC

R_f = 0.7 (CH₂Cl₂). Färbung mit wässriger Kaliumpermanganat-Lösung.

**92****¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 6.34 (d, ²J_{3a,3b} = 0.7 Hz, 1H, 3-H_a), 5.96 (dt, ²J_{3b,1'} = 0.9 Hz, ⁴J_{3b,3a} = 0.7 Hz, 1H, 3-H_b), 4.18 (d, ⁴J_{1',3b} = 0.9 Hz, 2H, 1'-H), 3.82 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 165.5 (C-1), 137.5 (C-2), 129.4 (C-3), 52.5 (OCH₃), 29.4 (C-1').

IR (ATR, Film):

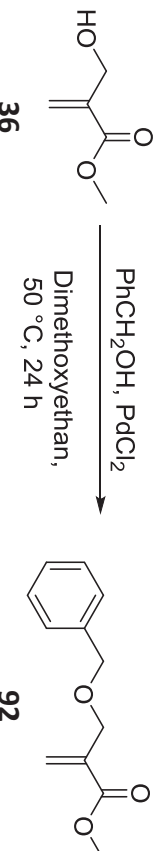
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2950 (C-H v, aliph.), 1731 (C=O v), 1459 (C-H-δ), 1174.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV): 15-08-2012

m/z (%) = 180 (19) [M⁺(Br⁸¹)], 178 (19) [M⁺(Br⁷⁹)], 149 (29) [(C₄H₄Br⁸¹O)⁺], 147 (39) [(C₄H₄Br⁷⁹O)⁺], 121 (22) [(C₃H₄Br⁸¹)⁺], 119 (23) [(C₃H₄Br⁷⁹)⁺], 99 (100) [(M-Br)⁺].

t_R (GC/MS): 5.0 min

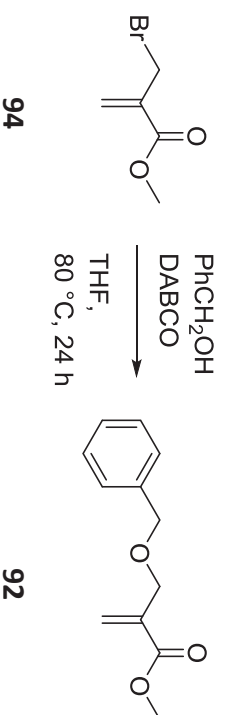
Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein. ^[139]

9.3.2.2.2 2-(Benzyloxymethyl)acrylsäuremethylester (92)

In Anlehnung an eine Vorschrift von Hosokawa *et al.* wurde in einem sekurierten Schlenk-Kolben der *Roche*-Ester-Vorläufer **36** (1 Äq., 1 mmol, 116 mg) in 2 mL Dimethoxyethan vorgelegt. Bei Raumtemperatur wurden Palladium(II)chlorid (3 mol%, 0.03 mmol, 5.2 mg) und Benzylalkohol (5 Äq., 5 mmol, 541 mg) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei 50 °C für 24 h gerührt. Zur Aufarbeitung wurden die Feststoffe über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Sodann wurde das Rohprodukt mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und säulenchromatographisch (Eluent: Dichlormethan) aufgereinigt, wobei das Produkt **92** als farbloses Öl erhalten wurde.

Ausbeute (**92**, 206 g/mol): 28 % (58 mg, 0.3 mmol).

Literaturausbeute: 52 % ^[60] oder 62 % ^[140]

Alternative Synthesevorschrift:

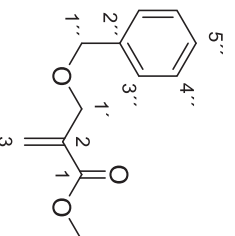
In einem *Schlenk*-Kolben unter Stickstoff wurden 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (**94**) (1 Äq., 13.97 mmol, 2.5 g) und Benzylalkohol (1.85 Äq. 25.84 mmol, 2.67 mL) in THF (11 mL) vorgelegt. Sodann wurde DABCO (1.4 Äq., 19.55 mmol, 2.19 g) in 12 mL THF zugefropt. Die entstandene Suspension wurde für 24 h auf 80 °C erhitzt und der Reaktionsfortschritt per DC beobachtet. Nachdem vollständiger Umsatz erreicht war, wurde der entstandene Feststoff über Celite abfiltriert. Das Filtrat wurde eingeeengt, mit Diethylether versetzt und mit 1%iger HCl- sowie gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat und Entfernung des Lösemittels unter vermindertem Druck ergab sich ein gelbes Öl, das mittels Flashchromatographie (Eluent: Dichlormethan) aufgereinigt wurde. Das Produkt **92** wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**92**) (206 g/mol): 73 % (2.1 g, 10.2 mmol). Literaturausbeute: 80 %.^[144]

DC

$R_f = 0.5$ (CH_2Cl_2).

Färbung erfolgte mittels schwefelsaurer Cerammoniummolybdat-Lösung.

**¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 7.35 (d, $^3J_{3'',4''} = 4.4$ Hz, 4H, 3''-H und 4''-H), 7.27-7.32 (m, 1H, 5''-H), 6.33 (dt, $^2J_{3a,3b} = 1.7$ Hz, $^4J_{3a,1'} = 1.3$ Hz, 1H, 3-H_a), 5.94 (dt, $^2J_{3b,3a} = 1.7$ Hz, $^4J_{3b,1'} = 1.7$ Hz, 1H, 3-H_b), 4.59 (s, 2H, 1''-H), 4.24 (dd, $^4J_{1',3a} = 1.3$ Hz, $^4J_{1',3b} = 1.7$ Hz, 2H, 1''-H), 3.77 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 166.5 (C-1), 138.2 (C-2'), 137.3 (C-2), 128.6 (C_{ar}), 127.9 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 126.2 (C-3), 72.9 (C-1''), 68.5 (C-1'), 52.0 (OCH₃).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 1720 (C=O ν), 1637 (C=C ν), 1099.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 107 (61) [(C₇H₇O)⁺], 100 (43) [(C₅H₈O₂)⁺], 91 (100) [(C₇H₇)⁺], 79 (24), 69 (27), 65 (25).

t_r (GC/MS): 10.0 min

Siedepunkt:

103.6 °C (7 mbar), dies entspricht 250 °C (1 atm).

HPLC:

Eluent: Heptan/2-Propanol (99.8:0.2)

Säule: Chiracel OD-H

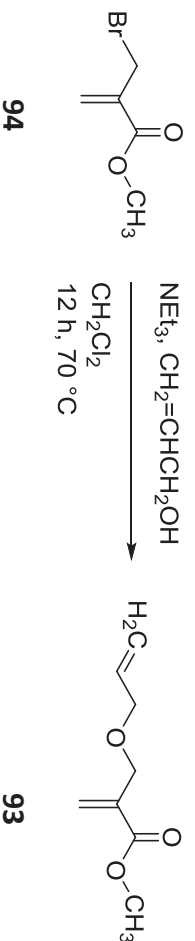
Flussrate: 0.75 mL/min

t_r^* (UV205 nm): 18.9–20.9 min, 15 °C

*Durch den hohen Anteil unpolaren, sehr flüchtigen Laufmittels können sich Retentionszeiten verschieben.

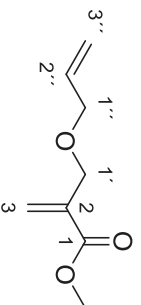
Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[141]

9.3.2.2.3 2-(Allyloxymethyl)acrylsäuremethylester (**93**)



In Anlehnung an eine Vorschrift von Thompson *et al.*^[142] wurden 2-(Bromomethyl)acrylsäure-methylester (**94**) (1 Äq., 2.5 g, 14.0 mmol) und Allylalkohol (2 Äq., 1.90 mL, 27.9 mmol) in 25 mL Dichlormethan vorgelegt. Sodann wurde unter Rühren im Eisbad langsam Triethylamin (1.1 Äq., 2.14 mL, 15.4 mmol) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und am nächsten Tag am Rückfluss erhitzt bis per ¹H-NMR vollständiger Umsatz nachgewiesen werden konnte (ca. 24 h). Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit 1%iger Salzsäure extrahiert, die wässrige Phase nochmals rückextrahiert, die organischen Phasen schließlich über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **93** wurde in reiner Form als leicht rötliches Öl erhalten.

Ausbeute (**93**, 156.18 g/mol): 88 % (1.93 g, 12.4 mmol).



93

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 6.31 (dt, ² $J_{3a,3b}$ = 1.5 Hz, ⁴ $J_{3a,1}$ = 1.3 Hz, 1H, 3-H_a), 5.93 (ddt, ³ $J_{2'',3''a}$ = 17.3 Hz, ³ $J_{2'',3''b}$ = 10.4 Hz, ³ $J_{2'',1''}$ = 5.5 Hz, 1H, 2''-H), 5.90 (dt, ⁴ $J_{3b,1'}$ = 1.9 Hz, ² $J_{3b,3a}$ = 1.5 Hz, 1H, 3-H_b), 5.30 (dq, ³ $J_{3''a,2''}$ = 17.3 Hz, ⁴ $J_{3''a,1''}$ = 1.7 Hz, ² $J_{3''a,3''b}$ = 1.7 Hz, 1H, 3''-H_a), 5.20 (ddt, ³ $J_{3''b,2''}$ = 10.4 Hz, ² $J_{3''b,3''a}$ = 1.7 Hz, ⁴ $J_{3''b,1''}$ = 1.3 Hz, 1H, 3''-H_b), 4.20 (dd, ⁴ $J_{1',3b}$ = 1.9 Hz, ⁴ $J_{1',3a}$ = 1.3 Hz, 2H, 1'-H), 4.05 (ddd, ³ $J_{1'',2''}$ = 5.5 Hz, ⁴ $J_{1'',3''a}$ = 1.7 Hz, ⁴ $J_{1'',3''b}$ = 1.3 Hz, 2H, 1''-H), 3.77 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 166.5 (C-1), 137.3 (C-3), 134.6 (C-3''), 126.0 (C-2), 117.3 (C-2'), 71.8 (C-1'), 68.3 (C-1''), 52.0 (OCH₃).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3030 (C_{unges.}-H v), 2861 (C_{ges.}-H v), 1720 (C=O v), 1637 (C=C v), 1099 (C-O-C v), 738, 699.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 125 (15) [(M-CH₃O)⁺], 115 (100) [(M-C₃H₅)⁺], 100 (78) [(C₅H₈O₂)⁺], 83 (99) [(C₄H₃O₂)⁺], 69 (78), 59 (50) [(C₂H₃O₂)⁺], 55 (46).

t_R (GC/MS): 5.75 min

GC:

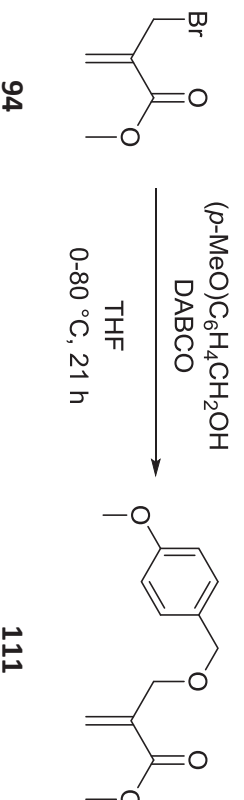
Säule: FS-Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R: 11.4 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten NMR-Daten überein. [60]

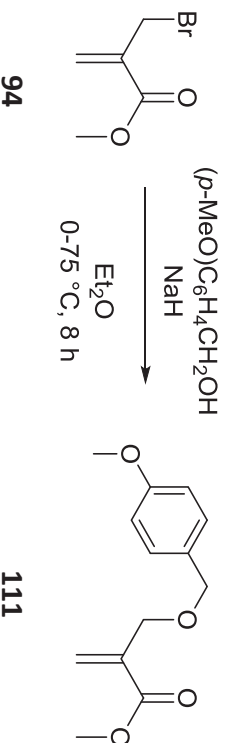
9.3.2.2.4 2-(*p*-Methoxybenzylmethyl)acrylsäuremethylester (**111**)



Unter N₂-Atmosphäre wurden 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (**94**) (1 Äq., 0.24 mL, 2 mmol) und *p*-Methoxybenzylalkohol (1.20 Äq., 0.30 mL, 2.40 mmol) in trockenem THF (1.5 mL) vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde das in THF (1 mL) gelöste DABCO (1.5 Äq., 0.34 g, 3 mmol) dazu getropft. Nachdem die Suspension für 21 h auf 80 °C erhitzt wurde, wurde sie mit Salzsäure-Lösung (3.5 %, 1 M, 2 mL) versetzt. Die organische Phase wurde mit MTBE (5 mL) verdünnt. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert. Die gesammelte organische Phase wurde mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösemittel wurden unter vermindertem Druck destillativ entfernt. Es erfolgte eine chromatographische Aufreinigung an Kieselgel (PE/EE, 90:10).

Ausbeute (**111**, 236.26 g/mol): 317 mg (1.3 mmol, 67 %)

Alternativer Syntheseweg:



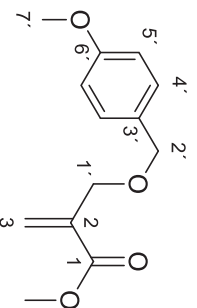
Unter N₂-Atmosphäre wurde Natriumhydrid (1.7 Äq., 40 mg, 1.7 mmol) in Diethylether (1.5 mL) suspendiert. Nachdem die Suspension auf 0 °C abgekühlt war, wurde *p*-Methoxybenzylalkohol (1.2 Äq., 0.15 mL, 1.2 mmol) dazugegeben und die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ether entfernt und 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (**94**) (1 Äq., 0.12 mL, 1 mmol) in THF (1 mL) dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 7.5 h bei 75 °C gerührt, anschließend mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (3.5 mL) und MTBE (5 mL) versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der vorherigen Versuchsdurchführung.

Ausbeute (**111**, 236.26 g/mol): 181 mg (0.77 mmol, 77 %).

Da die DC und das ¹H-NMR-Spektrum des ersten Syntheseweges dieses Produktes sauberer waren, wurde die Analytik des ersten Syntheseweges ausgewertet.

DC

R_f = 0.84 (PE/EE, 50:50).



111

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 7.28 (d, ³J_{4',5'} = 8.5 Hz, 2H, 4'-H), 6.88 (d, 2H, ³J_{5',4'} = 8.5 Hz, 5'-H), 6.31 (dt, ²J_{3b,3a} = 1.5 Hz, ⁴J_{3b,1'} = 1.5 Hz, 1H, 3-H_b), 5.92 (dt, ⁴J_{3a,1'} = 1.8 Hz, ²J_{3a,3b} = 1.5 Hz, 1H, 3-H_a), 4.51 (s, 2H, 2'-H), 4.21 (dd, ⁴J_{1',3a} = 1.8 Hz, ⁴J_{1',3b} = 1.5 Hz, 2H, 1'-H), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 3.81 (s, 3H, 7'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 52.2 (OMe), 55.6 (C-7'), 68.4 (C-1'), 72.8 (C-2'), 114.2 (C-5'), 126.4 (C-3), 129.7 (C-4'), 130.5 (C-3'), 137.5 (C-2), 159.4 (C-6'), 166.7 (C-1).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2953 (CH₃-v), 2860 (C-H-v), 1718 (C=O-v), 1637 (C=C-v), 1612 (C=C-v, arom.), 1513, 1245 (C-O-C-v), 1082, 815.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 236 (1) [M⁺], 137 (90) [(C₈H₉O₂)⁺], 121 (100) [(C₈H₉O)⁺], 109 (20), 91 (19) [(C₇H₇)⁺], 77 (41) [(C₆H₅)⁺], 65 (11) [(C₅H₅)⁺], 59 (11) [(C₂H₃O₂)⁺], 55 (21).

HPLC:

Säule: Chiracel OD-H

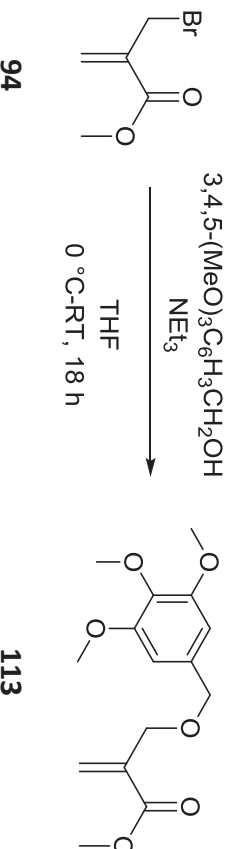
Flussgeschwindigkeit: 0.5 mL/min

Eluent: Heptan/Propan-2-ol (99:1)

Temperatur: RT

t_R (UV225 nm): 22.7 min, 23.6 min

9.3.2.2.5 2-[(3,4,5-Trimethoxybenzyl)oxymethyl]acrylsäuremethylester (113)

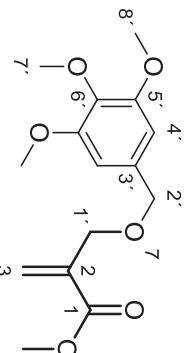


Unter N₂-Atmosphäre wurde zunächst 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (**94**) (1 Äq., 0.12 ml, 1 mmol,) in THF (1 ml) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Tropfenweise wurde 3,4,5-Trimethoxybenzylalkohol (1.5 Äq., 0.24 ml, 1.5 mmol) dazugegeben. Frisch destilliertes Triethylamin (2.2 Äq., 0.30 ml, 2.2 mmol) wurde ebenfalls langsam zugetropft und der Reaktionsansatz für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde dieser mit Salzsäure-Lösung (3.5 %, 1 M, 2 ml) und MTBE versetzt. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bevor sie mit Magnesiumsulfat getrocknet wurden. Das Lösemittel wurde unter verminderten Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mit PE/EE im Verhältnis 70:30 gereinigt.

Ausbeute (**113**, 296.32 g/mol): 207 mg (0.7 mmol, 70 %).

DC

R_f = 0.27 (PE/EE, 70:30).



¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 3.77 (s, 3H, COOCH₃), 3.84 (s, 3H, 7'-H), 3.87 (s, 6H, 8'-H), 4.24 (dd, ⁴J_{1',3a} = 1.7 Hz, ⁴J_{1',3b} = 1.3 Hz, 2H, 1'-H), 4.52 (s, 2H, 2'-H), 5.93 (dt, ⁴J_{3a,1'} = 1.7 Hz, ²J_{3a,3b} = 1.5 Hz, 1H, 3-H_a), 6.34 (dt, ²J_{3b,3a} = 1.5 Hz, ⁴J_{3a,1'} = 1.3 Hz, 1H, 3-H_b), 6.58 (s, 2H, 4'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 51.8 (OCH₃), 56.1 (C-8'), 60.8 (C-7'), 68.3 (C-1'), 72.8 (C-2'), 104.5 (C-4'), 126.1 (C-3), 133.6 (C-4'), 137.1 (C-6'), 137.4 (C-2), 153.2 (C-5'), 166.3 (C-1).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2942 (CH₃ v), 1721 (C=O v), 1636 (C=C v), 1591 (C=C v, arom.), 1125 (C-O-C v), 1099 (C-O-C v), 818.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 296 (26) [M^+], 197 (35) [$[C_{10}H_{13}O_4]^+$], 181 (100) [$[C_{10}H_{13}O_3]^+$], 167 (27) [$[C_9H_{11}O_3]^+$], 151 (40) [$[C_8H_7O_3]^+$], 138 (18) [$[C_7H_6O_3]^+$], 125 (8), 110 (7), 95 (12), 83 (11), 69 (11), 59 (10) [$[C_2H_3O_2]^+$], 55 (10).

HPLC:

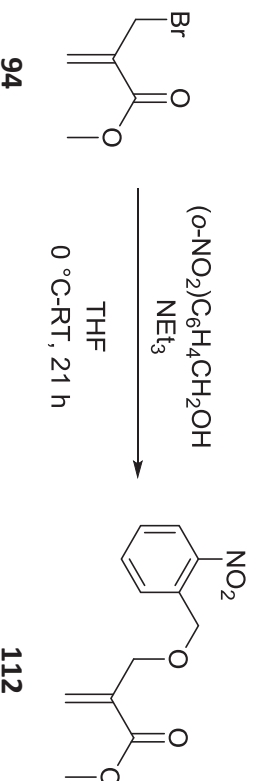
Säule: Chiralpak IA

Flussgeschwindigkeit: 0.5 mL/min

Eluent: Heptan/Propan-2-ol (90:10)

Temperatur: RT

t_R (UV200 nm): 20.5 min

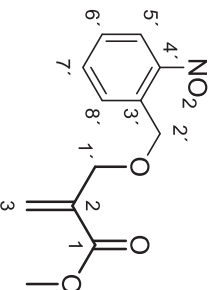
9.3.2.2.6 2-(*o*-Nitrobenzyloxymethyl)acrylsäuremethylester (112)

Unter N₂-Atmosphäre wurde *o*-Nitrobenzylalkohol (0.23 g, 1.3 mmol, 1.3 Äq.) in THF (1 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2-(Bromomethyl)acrylsäuremethylester (94) (0.12 mL, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) und von Triethylamin (300 µL, 2.2 mmol, 2.2 Äq.). Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktion für 21 h bei Raumtemperatur gerührt. Zum Aufarbeiten wurde Salzsäure-Lösung (3.5 %, 1 M, 2 mL) und Diethylether (5 mL) dazugegeben. Das Produkt wurde mit Essigsäureethylester (3 x 15 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (1 x 10 und 2 x 5 mL) und mit gesättigter Natriumhydrogen-carbonat-Lösung (3 x 5 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde das Lösemittel unter verminderten Druck abgezogen und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie mit PE/EE im Verhältnis 80:20 aufgereinigt. Das Produkt bildet einen gelblich amorphen Feststoff.

Ausbeute (112, 251.24 g/mol): 227 mg (0.9 mmol, 90 %).

DC:

R_f = 0.60 (PE/EE 80:20).



112

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 3.78 (s, 3H, OCH₃), 4.34 (dd, 2H, ⁴J_{1',3a} = 1.7 Hz, ⁴J_{1',3b} = 1.3 Hz, 1'-H), 4.97 (s, 2H, 2'-H), 5.96 (dt, 1H, ²J_{3a,3b} = 1.8 Hz, ⁴J_{3a,1'} = 1.7 Hz, 3-H_a), 6.36 (dt, 1H, ²J_{3b,3a} = 1.8 Hz, ⁴J_{3b,1'} = 1.3 Hz, 3-H_b), 7.45 (ddd, 1H, ²J_{6',5'} = 8.2 Hz, ⁴J_{6',7'} = 7.5 Hz, ²J_{6',8'} = 1.3 Hz, 6'-H), 7.66 (td, 1H, ²J_{7',8'} = 7.8 Hz, ⁴J_{7',6'} = 7.5 Hz, ²J_{7',5'} = 1.2 Hz, 7'-H), 7.82 (dd, 1H, ²J_{8',7'} = 7.8 Hz, ⁴J_{8',6'} = 1.3 Hz, 8'-H), 8.08 (dd, 1H, ²J_{5',6'} = 8.2 Hz, ⁴J_{5',7'} = 1.2 Hz, 5'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 52.1 (OCH₃), 69.5 (C-1'), 69.5 (C-2'), 100.1 (C-3), 124.9 (C-6'), 126.6 (C-5'), 128.2 (C-8'), 128.7 (C-7'), 133.8 (C-3'), 135.0 (C-2), 136.9 (C-4'), 166.3 (C-1).

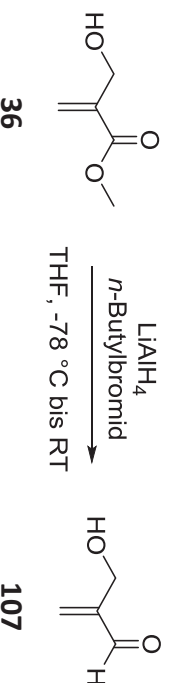
IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2954 (CH₃ v), 1721 (C=O v), 1637 (C=C v), 1525 (NO₂ v), 1439 (C-H δ), 1341 (NO₂ v), 1105 (C-O-C v), 730.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 220 (1) [(M - OMe)⁺], 135 (69) [(C₇H₅NO₂)⁺], 120 (62) [(C₇H₆NO)⁺], 104 (42), 89 (53), 78 (100) [(C₆H₆)⁺], 69 (39), 59 (38) [C₂H₃O₂⁺], 51 (40).

Schmelzbereich: 45–55 °C.

9.3.2.3 Versuche zur Herstellung von 2-(Hydroxymethyl)acrylaldehyd (107)Reduktion des Esters mittels *in situ* gebildetem AlH₃

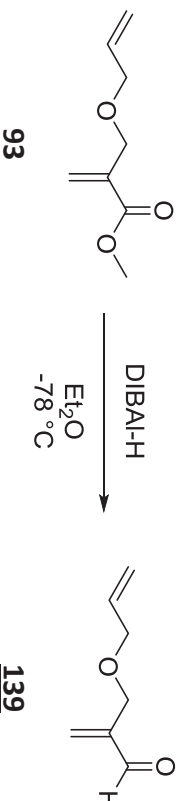
In Anlehnung an eine Vorschrift von Byun *et al.*,^[143] wurde in einem Schlenk-Kolben unter N₂ LiAlH₄ (54 mg, 1.42 mmol, 1.4 Äq.) in THF (2.5 mL) vorgelegt, bei 0 °C langsam *n*-Butylbromid (151 mg, 1.1 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft und 2.25 h im Eisbad gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf –78 °C gekühlt und eine Lösung von 2-(Hydroxymethyl)acrylsäuremethylester (**36**, 116 mg, 1 mmol, 1.0 Äq.) in THF (0.5 mL)

zugetropft. Nach ca. 1 h wurde die Reaktion auf RT aufgetaut und nach insgesamt 3 h mit 1 mL Wasser gequench und über 45 h bei RT unter N₂ rühren gelassen. Schließlich wurde das Reaktionsgemisch durch Silica filtriert und mit Chloroform/Methanol 9:1 gewaschen, die entstandene Lösung über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösemittel entfernt.

m_{roh} = 94 mg

Im ¹H-NMR zeigte sich ein Edukt zu Produkt Verhältnis von 5:1. Zusätzlich wurden Nebenprodukte gebildet. Aufgrund des geringen Produktgehalts wurde die Reaktion verworfen. In der Literatur ist der Aldehyd nur als *in situ* gebildete Zwischenstufe angegeben und wurde nicht isoliert.

Reduktion des ungeschützten oder Allyl-geschützten Esters mittels DIBAL-H zu 2-(Allyloxymethyl)acrolein (139)



155 mg (1 mmol, 1 Äq.) Allyl-geschützter Ester **93** wurden in Diethylether (abs., 4.6 mL/mmol) in einem *Schlenk*-Kolben vorgelegt und bei -78 °C DIBAL-H langsam innerhalb von 20 Minuten zugetropft (1.2 mL, 1 M in Hexan, 1.2 Äq.). Die Lösung wurde bei -78 °C gerührt und nach 20, 40 und 60 Minuten wurde der Reaktionsfortschritt mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Da nach 60 min ein Produktpot entstanden war und die Nebenprodukte zunahmen, wurde gequench.

DC:

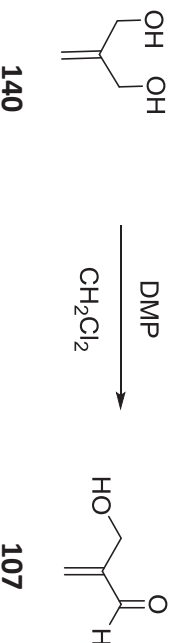
R_f = 0.38 (PE/EE, 70:30)

Färbung erfolgte mittels schwefelsaurer Cerammoniummolybdatlösung.

Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch in eine gesättigte Lösung von *Rochelle's*-Salz (Natriumtartrat-Hexahydrat, 2 mL pro mmol DIBAL-H) geschüttet und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt bis die Emulsion sich in zwei Phasen teilte. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether extrahiert und die organischen Phasen schließlich mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck aufkonzentriert (30 °C Badtemperatur).

Im ¹H-NMR zeigte sich 50 % Umsatz, jedoch kaum Aldehyd. Stattdessen bildete sich vermutlich der Alkohol.

Dess-Martin-Oxidation

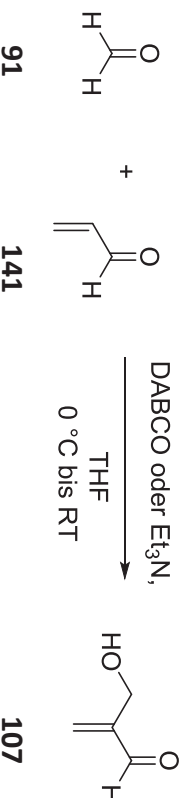


In Anlehnung an eine Vorschrift von Thongsornkleeb *et al.*^[144] wurde 2-Methylen-1,3-propanediol (**140**, 88 mg 1 mmol, 1 Äq.) in Dichlormethan vorgelegt (6 mL/mmol) und auf 0 °C gekühlt. Dess-Martin-Periodinan (DMP, 441 mg, 1.1 mmol, 1.1 Äq.) wurde zugegeben und für 1.5 h gerührt. Die Reaktionskontrolle per ¹H-NMR zeigte zu diesem Zeitpunkt ca. 50 % Umsatz zu Produkt.

Zur Aufarbeitung wurde mit *n*-Pentan verdünnt und eine wässrige Lösung von Na₂O₃/NaHCO₃ langsam zugegeben bis pH 7 erreicht war. Es wurde mit Pentan und Ethylacetat extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingengt.

Nach Aufarbeitung wurde kein Produkt **107** isoliert.

Morita–Baylis–Hillman-Reaktion



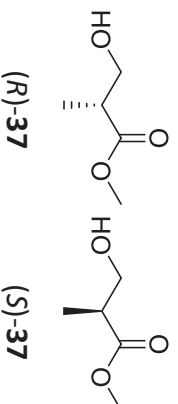
Die Reaktion wurde zweimal, einmal mit DABCO, einmal mit Triethylamin als Katalysator durchgeführt. In Anlehnung an Nicolaou *et al.*^[131] wurde eine wässrige Lösung von Formaldehyd (186 µL, 37 %ig, 2.5 mmol, 2.5 Äq.) in THF (1 mL) in einem Schlenk-Kolben unter N₂ vorgelegt. Es wurde Acrolein (**141**, 67 µL, 1 mmol, 1 Äq.) dazugegeben und auf 0 °C (NaCl-Eisbad!) gekühlt. Sodann wurde eine Lösung von DABCO (126 mg, 1 mmol, 1 Äq.) bzw. Triethylamin (158 µL, 1 mmol, 1 Äq.) in 0.5 mL THF zugegeben. Es wurde langsam unter Rühren auf Raumtemperatur aufgewärmt und bei RT für max. 64 h gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC und GC/MS überprüft.

Es wurde laut ¹H-NMR kein Produkt **107** erhalten.

9.3.2.4 Synthesevorschriften und Analytik der Produkte

9.3.2.4.1 3-Hydroxy-2-methylpropionsäuremethylester (Roche-Ester, **37**)

Referenzverbindung



Enantiomerenreine Produktreferenzen wurden in (*R*)- und (*S*)-Konfiguration bei Sigma-Aldrich käuflich erworben.

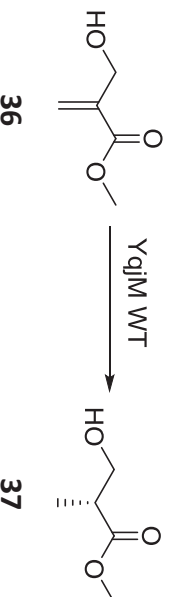
Drehwert:

(*R*): $[\alpha]_D^{20} = -15.7$ (c 1.69, CHCl_3), >99 % *ee*.

(*S*): $[\alpha]_D^{20} = +16.3$ (c 3.02, CHCl_3), >99 % *ee*.

Der literaturbekannte Drehwert für das (*S*)-Enantiomer beträgt $[\alpha]_D^{20} = +15.4$ [c 3.1, CHCl_3 , 98 % *ee* (*S*)].^[77]

Bioreduktion zu (*R*)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäuremethylester [(*R*)-Roche-Ester, (*R*)-**37**]

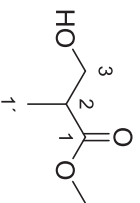


Die Reaktion wurde im 1 mmol-Maßstab entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** durchgeführt. Es wurden 104 U (ca. 30 mg) aufgereinigtes Enzym YqjM WT verwendet. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**37**, 118 g/mol): 55 mg (0.47 mmol, 47 %).

$[\alpha]_D^{20} = -13.5$ (c 0.96, CHCl_3), 90 % *ee* (*R*).

Turnover Number (TON): 1336

**37****¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.68–3.77 (m, 2H, 3-H), 2.69 (ddq, ³J_{2,1'} = 7.2 Hz, ³J_{2,3b} = 7.3 Hz, ³J_{2,3a} = 4.6 Hz, 1H, 2-H), 2.30 (brs, OH), 1.19 (d, ³J_{1',2} = 7.2 Hz, 3H, 1'-H).

Das ¹H-NMR stimmt mit den publizierten NMR-Daten sowie den Referenzdaten überein. [77]

Zur Analyse des Enantiomerenüberschusses wurden je nach Überschussenantionmer verschiedene GC-Methoden verwendet, die sich in der Reihenfolge der Elution der beiden Enantiomere unterscheiden. Durch Elution des im Überschuss vorhandenen Enantiomers zuletzt konnte jeweils eine Basislinientrennung erreicht werden.

GC (Methode 1)

Säule: FS-Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 65 °C (30' iso), 20 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R: (S): 31.1 min

(R): 32.4 min

Bioreduktion zu (S)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäuremethylester [(S)-Roche-Ester, (S)-37]**36****37**

Die Reaktion wurde im 1 mmol-Maßstab entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** durchgeführt. Es wurden 160 mg des Biokatalysators YqjM C26N/169A eingesetzt. Das Produkt wurde als gelbes Öl ohne Aufreinigung in spektroskopisch reiner Form erhalten.

Ausbeute (**37**, 118 g/mol): 52 mg (0.44 mmol, 44 %).

$[\alpha]_D^{20} = +10.4$ (c 0.79, CHCl₃), 85 % ee (S)

Turnover Number (TON): 248

Das ¹H-NMR entspricht der Literatur sowie der Produktreferenz. [77]

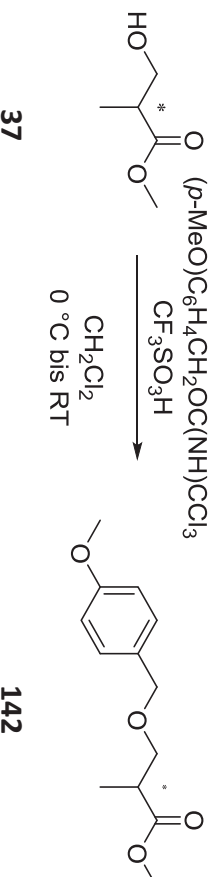
GC (Methode 2):

Säule: FS-Lipodex G

Temperaturprogramm: 50 °C (40' iso), 20 °C/ min auf 150 °C (5' iso)

t_R: (R): 24.3–25.3 min

(S): 27.4–27.8 min

9.3.2.4.2 (R)- bzw. (S)-3-(p-Methoxybenzyl)-2-methylpropansäuremethylester (142)Synthese der Referenzsubstanz

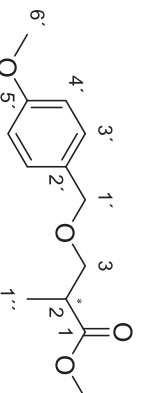
Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift für Schützungen mittels Trichloroacetimidat (**Kapitel 9.3.1.4**) durchgeführt. Es wurden 94 µl *Roche*-Ester (**37**) (1 Äq., 0.85 mmol) und 246 µl *p*-Methoxybenzyl-2,2,2-trichloroacetimidat (1.5 Äq., 1.27 mmol) und Trifluormethansulfonsäure (9 µl) verwendet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE, 90:10) aufgereinigt und als Öl erhalten.

Ausbeute (**142**, 238.28 g/mol):

(R): 90.0 mg (0.38 mmol, 45 %).

[α]_D²⁰ = –8.5 (c 1, CHCl₃), >99 % *ee* (HPLC, Säule). Lit.: [α]_D²⁰ = –8.6° (c 1.96, CHCl₃).^[145]

(S): 97.3 mg (0.41 mmol, 48 %).

[α]_D²⁰ = +8.2 (c 1, CHCl₃), >99 % *ee* (HPLC, Säule). Lit.: [α]_D²⁰ = +8.3 (c 1.57, CHCl₃).^[172c]**¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 1.17 (d, ³J_{1'',2} = 7.1 Hz, 3H, 1''-H), 2.77 (ddq, ³J_{2,1'b} = 7.3 Hz, ³J_{2,1''} = 7.1 Hz, ³J_{2,3a} = 5.9 Hz, 1H, 2-H), 3.46 (dd, ²J_{3a,3b} = 9.2 Hz, ³J_{3a,2} = 5.9 Hz, 1H, 3-H_a), 3.63 (dd, ²J_{3b,3a} = 9.2 Hz,

$^3J_{3b,2} = 7.3$ Hz, 1H, 3-H_b), 3.69 (s, 3 H, COOCH₃), 3.80 (s, 3H, 6'-H), 4.45 (s, 2H, 1'-H), 6.87 (d, $^3J_{4',3'} = 8.6$ Hz, 2H, 4'-H), 7.24 (d, $^3J_{3',4'} = 8.6$ Hz, 2H, 3'-H).

13 C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 14.4 (C-1'), 40.5 (C-2), 52.1 (OCH₃), 55.6 (C-6'), 72.0 (C-3), 73.1 (C-1'), 114.1 (C-4'), 129.6 (C-3'), 130.6 (C-2'), 159.5 (C-5'), 175.7 (C-1).

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 238 (8) [M⁺], 137 (91) [C₈H₉O₂⁺], 121 (100) [C₈H₉O⁺], 109 (12), 91 (9), 77 (21) [C₆H₅⁺], 59 (9) [C₂H₃O₂⁺].

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2952 (C-H v), 1737 (C=O v), 1612 (C=C v), 1513, 1250, 1174, 1088, 1035, 820.

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein. ^[146]

HPLC:

Säule: Chiracel OD-H

Flussgeschwindigkeit: 0.5 mL/min

Eluent: Heptan/Propan-2-ol (99:1)

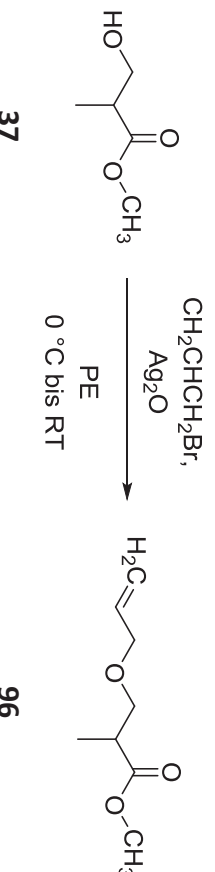
Temperatur: RT

t_R (UV 225 nm):* (R): 21.8–22.6 min

(S): 25.9–26.8 min

*Durch den hohen Anteil unpolaren, sehr flüchtigen Laufmittels können sich Retentionszeiten verschieben. Die Identifizierung der Signale wurde mittels Coinjektion der Referenzsubstanzen sichergestellt.

9.3.2.4.3 3-(Allyloxy)-2-methylpropan säuremethylester (96)



In Anlehnung an eine Vorschrift von Quintard *et al.* ^[147] wurde in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Schlenk-Kolben, unter Inertbedingungen (N₂) eine Suspension von

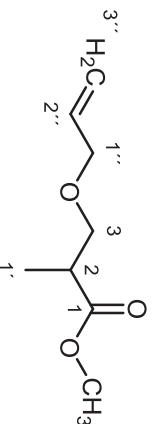
Magnesiumsulfat (1 Äq, 107 mg, 0.90 mmol) und Ag₂O (1.33 Äq., 270 mg, 1.2 mmol) in Petroether (4 mL) vorgelegt und der enantiomerenreine Roche-Ester (**37**, 1 Äq., 100 µL, 0.90 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde für 1 h bei RT gerührt, dann auf 0 °C abgekühlt und das Allylbromid (1.5 Äq, 117 µL, 1.35 mmol) langsam zutropft. Nach 30 min wurde eine weitere Portion Ag₂O zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch über Celite filtriert, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Nach Aufreinigung *via* Flashchromatographie (PE/EE, 90:10) wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**96**, 158.20 g/mol): (R): 85 mg (0.54 mmol, 60 %).

$[\alpha]_D^{20} = -17.0$ (c 1.03, CHCl₃), >99 % *ee* (GC, Säule).

(S): 97 mg (0.61 mmol, 68 %), >99 % *ee* (GC, Säule).

Literatur: (S)-Enantiomer, $[\alpha]_D^{20} = +13.0$ (c 1.7, CHCl₃), *ee* nicht angegeben.^[147]



96

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 5.88 (ddt, ³J_{2'',3''b} = 17.2 Hz, ³J_{2'',3''a} = 10.5 Hz, ³J_{2',1'} = 5.5 Hz, 1H, 2''-H), 5.26 (ddt, ³J_{3''b,2''} = 17.2 Hz, ²J_{3''b,3''a} = 1.7 Hz, ⁴J_{3''b,1''} = 1.6 Hz, 1H, 3''-H_b), 5.17 (ddt, ³J_{3''a,2''} = 10.5 Hz, ²J_{3''a,3''b} = 1.7 Hz, ⁴J_{3''a,1''} = 1.3 Hz, 1H, 3''-H_a), 3.98 (dddd, ³J_{1'',2''} = 5.5 Hz, ⁴J_{1'',3''b} = 1.6 Hz, ⁴J_{1'',3''a} = 1.3 Hz, 2H, 1''-H), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.63 (dd, ²J_{3a,3b} = 9.2 Hz, ³J_{3a,2} = 7.2 Hz, 1H, 3-H_a), 3.46 (dd, ²J_{3b,3a} = 9.2 Hz, ³J_{3b,2} = 5.9 Hz, 1H, 3-H_b), 2.76 (ddq, ³J_{2,1'} = 7.2 Hz, ³J_{2,3a} = 7.2 Hz, ³J_{2,3b} = 5.9 Hz, 1H, 2-H), 1.18 (d, ³J_{1',2} = 7.2 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 175.5 (C-1), 134.8 (C-2'), 117.1 (C-3''), 72.2 (C-1''), 72.1 (C-3)*, 51.9 (OCH₃), 40.3 (C-2), 14.1 (C-1').

* ggf. vertauschbar

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2953, 2857, 1737, 1647, 1436, 1364, 1199, 1088, 992, 925.

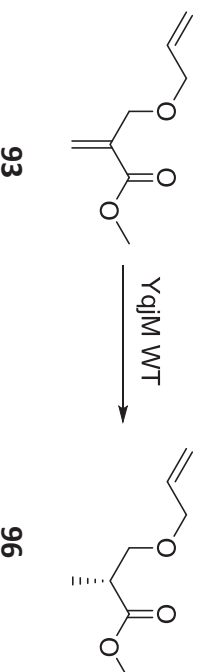
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 127 (37) [(M-CH₃O)⁺], 117 (68) [(M-C₃H₅)⁺], 101 (98) [(C₅H₉O₂)⁺], 85 (63), 73 (34), 69 (45), 59 (100) [(C₂H₃O₂)⁺], 57 (77) [(C₃H₅O)⁺], 55 (24).

t_R (GC/MS): 5.3 min

GC:**Säule:** FS-Lipodex E**Temperaturprogramm:** 60 °C (5' iso), 5 °C/ min auf 150 °C (5' iso).**t_R:** (R) 9.6 min

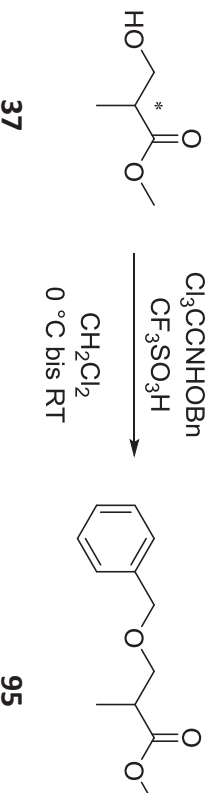
(S) 9.9 min

Die NMR-Spektren stimmen mit denjenigen aus der Literatur überein.^[60]**Bioreduktion zu (R)-3-(Allyloxy)-2-methylpropansäuremethylester [(R)-96]**

Die Reaktion wurde im 1 mmol-Maßstab entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** durchgeführt. Es wurden 10 U (ca. 3 mg) aufgereinigtes Enzym YqjM WT verwendet. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute (**96**, 158.20 g/mol): 79 mg (0.5 mmol, 50 %).
$$[\alpha]_D^{20} = -14.8 \text{ (c 1.06, CHCl}_3\text{), } >99 \text{ \% ee (R) (GC).}$$

Turnover Number (TON): 13895

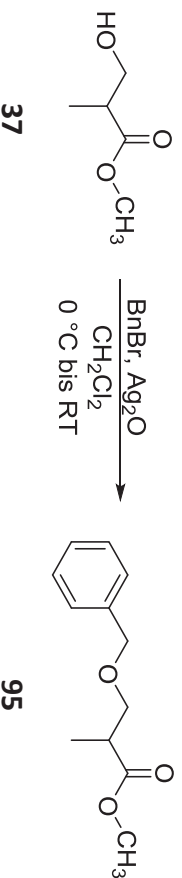
Das ¹H-NMR entspricht der Literatur sowie der Produktreferenz.^[60]**9.3.2.4.4 2-(Benzylloxymethyl)propansäuremethylester (95)****Synthese der Referenzsubstanz**

Die Reaktion wurde nach der allgemeinen Vorschrift für Schützungen mittels Trichloroacetimidat (**Kapitel 9.3.1.4**) durchgeführt. Es wurden 94 µl enantiomerenreiner Roche-Ester (**37**) (1 Äq., 0.85 mmol) und 246 µl *p*-Methoxybenzyl-2,2,2-trichloroacetimidat (1.5 Äq., 1.27 mmol) und Trifluormethansulfonsäure (9 µl) verwendet. Reaktionskontrolle

erfolgte per $^1\text{H-NMR}$. Nach 18 h wurde nochmals 10 μL Trifluormethansulfonsäure zugegeben und weitere 20 h gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (PE/EE, 80:20) aufgereinigt und als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**95**, 208.26 g/mol): 10 mg (0.05 mmol, 6 %).

Alternative Synthesevorschrift:



In einem weiteren Ansatz wurde analog der Synthese von 2-(Allyloxymethyl)propansäuremethylester (**96**) vorgegangen. Es wurden 110 mg enantiomerenreiner Roche-Ester (**37**, 1 Äq., 0.93 mmol), 175 mg Benzylbromid (1.1 Äq., 1.02 mmol), 323 mg Silberoxid (1.5 Äq., 1.4 mmol) und 118 mg Natriumsulfat (0.9 Äq., 0.84 mmol) verwendet. Als Lösemittel dienten 2 ml Dichlormethan. Reaktionskontrolle erfolgte per GC-MS.

Da nach 48 h das Benzylbromid vollständig umgesetzt war, jedoch noch Roche-Ester (**37**) vorhanden war, wurden nochmals 180 mg Benzylbromid zugegeben. Nach 36 h Rühren bei RT war die Reaktion beendet und das Reaktionsgemisch wurde wie bei **96** beschrieben aufgearbeitet. Aufreinigung erfolgte mittels Flashchromatographie (PE/Et₂O, 20:1 bis 10:1) und das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**95**) (208.26 g/mol):

(*R*): 125 mg (0.6 mmol, 65 %).

$[\alpha]_D^{20} = -12.5$ (c 1.17, CHCl₃), Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -12.5$ (c 2.4, CHCl₃)^[148]

(*S*): 272 mg (1.3 mmol, 67 %).

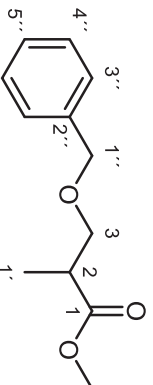
$[\alpha]_D^{20} = +12.0$ (c 1.27, CHCl₃), Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +12.1$ (c 10, CHCl₃)^[149]

DC:

$R_f = 0.55$ (PE/EE, 80:20).

$R_f = 0.33$ (PE/Et₂O, 10:1)

Färbung mittels Molybdip oder UV-Detektion möglich



95

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 7.39–7.25 (m, 5H, H_{ar}), 4.52 (d, ⁴J_{1',3''} = 2.6 Hz, 2H, 1''-H), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.66 (dd, ²J_{3a,3b} = 9.1 Hz, ³J_{3a,2} = 7.2 Hz, 1H, 3-H_a), 3.50 (dd, ²J_{3b,3a} = 9.1 Hz, ³J_{3b,2} = 6.0 Hz, 1H, 3-H_b), 2.79 (ddq, ³J_{2,1'} = 7.1 Hz, ³J_{2,3b} = 6.0 Hz, ²J_{3a} = 7.2 Hz, 1H, 2-H), 1.18 (d, ³J_{1',2} = 7.1 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 175.5 (C-1), 138.3 (C-2'), 128.5 (C_{ar}), 127.8 (C_{ar}), 127.7 (C_{ar}), 73.3 (C-1'), 72.1 (C-3), 51.9 (OCH₃), 40.4 (C-2), 14.2 (C-1').

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2950 (C-H v), 1737 (C=O v), 1660 (C=C v), 1451, 1363, 1202 (C-O v), 1094, 835, 742.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 208 (3) [M⁺], 121 (42) [(C₈H₆O)⁺], 107 (93) [(C₇H₇O)⁺], 102 (61), 91 (100) [(C₇H₇)⁺], 87 (72), 79 (33), 65 (39) [(C₅H₅)⁺], 59 (14) [(C₂H₃O₂)⁺].

t_R (GC/MS): 9.7 min

HPLC:

Eluent: Heptan/2-Propanol (99.8:0.2)

Säule: Chiracel OD-H

Detektion: UV 205 nm

Methode 1: Flussrate: 0.5 mL/min, RT

t_R*: (R): 23.5–28.3 min

(S): 28.5–36.1 min

Methode 2: Flussrate 0.75 mL/min, 5 μ L Einspritzvolumen, 20 °C

t_R^* : (R): 18.2–18.9 min
(S): 23.2–25.6 min

*Durch den hohen Anteil unpolaren, sehr flüchtigen Laufmittels können sich Retentionszeiten verschieben. Die Identifizierung der Signale wurde mittels Coinjektion der Referenzsubstanzen sichergestellt.

NMR- und IR-Spektren stimmen mit den publizierten Daten überein. ^[148]

Bioreduktion zu (S)-2-(Benzyloxymethyl)propan säuremethylester [(S)-95]



Die Reaktion wurde im 1 mmol-Maßstab entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** durchgeführt. Es wurden 100 mg aufgereinigtes Enzym YqjM H167A/169A verwendet. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute (**95**) (208.26 g/mol): 20 mg (0.1 mmol, 10 %).

77 % *ee* (S) (HPLC, Säule).

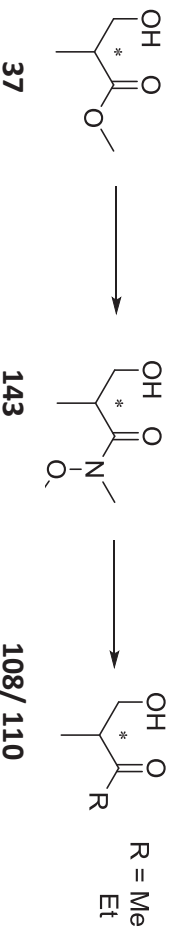
Turnover Number (TON): 400

HPLC (Methode 1): t_R^* : (R): 28.3 min
(S): 36.1 min

Das ¹H-NMR entspricht der Literatur sowie der Produktreferenz. ^[148]

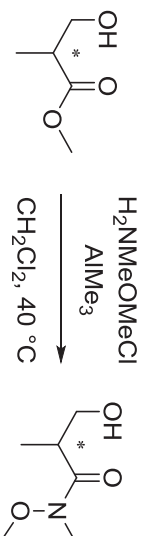
9.3.2.5 Synthese der Keto-Referenzsubstanzen 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (108**) und 1-Hydroxy-2-methyl-3-pentanon (**110**)**

Die Synthese der enantiomerenreinen Referenzsubstanzen 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**) und 1-Hydroxy-2-methylpentan-3-on (**110**) erfolgte zweistufig auf Grundlage des *Roche*-Esters (**37**), der in enantiomerenreiner Form kommerziell erhältlich ist. **37** wurde über die Zwischenstufe des *Weinreb*-Amids **143** per *Grignard*-Reagenzien in Ketone umgewandelt.



Schema 59: Syntheseplan zur Herstellung der enantiomerenreinen Referenzsubstanzen **108** und **110** aus dem *Roche*-Ester (**37**).

9.3.2.5.1 N,O-Dimethyl-3-hydroxy-2-methyl-propanhydroxamsäure (143)



37

143

Optimierte Reaktionsvorschrift

In Anlehnung an eine Vorschrift von Basha *et al.* [150] wurde das N,O-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (2.1 Äq., 400 mg, 4.1 mmol) in Dichlormethan (6 mL) unter N₂ vorgelegt, das Trimethylaluminium (2 M Lösung in Hexan, 2.1 Äq., 2.1 mL, 4.1 mmol) langsam zuge tro pft und mindestens 15 min bei RT gerührt. Dann wurde der enantiomerenreine Roche-Ester (37, 1 Äq., 236 mg, 2.0 mmol) in 2 mL Dichlormethan zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei RT gerührt. Im Anschluss wurde bei 40 °C gerührt bis die Reaktion beendet war (ca. 5-6 h). Reaktionskontrolle erfolgte per GC/MS.

Die Hydrolyse erfolgte mit wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (20 %ig, w/v) bei 0 °C. Nach Erwärmen der Suspension auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von Diethylether und Wasser. Die klaren Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mehrmals mit Ethylacetat und Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, wobei das Rohprodukt fast rein erhalten wurde. Das Produkt wurde teils so im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Gegebenenfalls erfolgte Aufreinigung per Flashchromatographie (Et₂O/EE, 3:1 dann MeOH/CH₂Cl₂, 1:15) und das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (143, 147.17 g/mol): (S): 210 mg (1.4 mmol, 71 %), 80 % ee (GC, Säule)

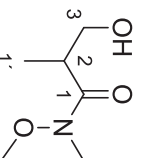
$$[\alpha]_D^{20} = +44.4 \text{ (c 0.85, CHCl}_3\text{)}$$

(R): ohne Aufreinigung 230 mg (ca. 1.6 mmol, 78 %).

DC:

R_f = 0.2 (Et₂O/EE, 3:1),

R_f = 0.46 (CH₂Cl₂/MeOH, 15:1), Färbung erfolgte mit einer wässrigen Kaliumpermanganatlösung und Erhitzen.

**143****¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 3.77–3.67 (m, 2H, 3-H), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.21 (s, 3H, NCH₃), 3.11–3.01 (m, 1H, 2-H), 2.65 (t, br, ³J_{OH,3} = 6.5 Hz, 1H, OH), 1.16 (d, ³J_{1,2} = 7.1 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 177.1 (C-1), 65.0 (C-3), 61.7 (OCH₃), 37.7 (C-2), 32.1 (NCH₃), 13.8 (C-1').

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3420 (O-H v), 2937, 2939, 2878, 1631 (C=O v), 1463, 1388, 1320, 1180, 1025, 991.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 147 (1) [(M)⁺], 117 (8) [(M-CH₂O)⁺], 87 (35) [(C₄H₇O₂)⁺], 61 (100), 59 (78) [(C₃H₇O)⁺].

t_R (GC/MS): 6.5 min

GC:

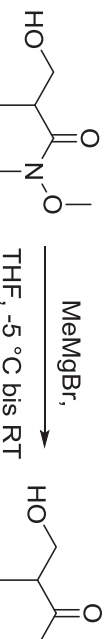
Säule: FS-Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R : (R): 21.0 min

(S): 20.5 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten NMR-Daten überein. ^[151]

9.3.2.5.2 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (108)Synthese der Referenzsubstanz**143****108**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Luke *et al.*^[151] wurde das *Weinreb*-Amid (**143**, 1 Äq., 200 mg, 1.36 mmol) unter Schutzgas in 3 mL THF vorgelegt. Sodann wurde das Methylmagnesiumbromid (3 M in Et₂O, 2.16 mmol, 0.719 mL) langsam bei unter –5 °C mittels Spritzenpumpe zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei –5 °C gerührt, langsam aufgetaut und bei RT gerührt bis die Reaktionskontrolle vollständigen Umsatz anzeigte.

Dann wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 N HCl bei 0 °C gestoppt und für 30 min auf 30–35 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde 3x mit Ethylacetat extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**108**, 102.13 g/mol):

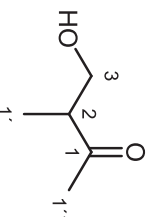
(S): 53 mg (0.52 mmol, 38 %), 88 % *ee* (GC, Säule).

$[\alpha]_D^{20} = -24.0$ (c 0.50, CHCl₃).

(R): 31 mg (0.3 mmol, 35.3 %), 96 % *ee* (GC, Säule).

DC

R_f = 0.35 (Et₂O/PE, 75:25), Färbung KMnO₄.



108

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 3.72 (ddd, ²J_{3a,3b} = 11.2 Hz, ³J_{3a,2} = 7.3 Hz, ³J_{3a,OH} = 6.0 Hz, 1H, 3-H_a), 3.67 (ddd, ²J_{3b,3a} = 11.2 Hz, ³J_{3b,OH} = 6.8 Hz, ³J_{3b,2} = 4.2 Hz, 1H, 3-H_b), 2.74 (ddd, ³J_{2,3a} = 7.3 Hz, ³J_{2,1'} = 7.3 Hz, ³J_{2,3b} = 4.2 Hz, 1H, 2-H), 2.20 (s, 3H, 1''-H), 2.17 (dd, ³J_{3b,OH} = 6.8 Hz, ³J_{3a,OH} = 6.0 Hz, 1H, OH), 1.14 (d, ³J_{1',2} = 7.3 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 213.0 (C-1), 64.3 (C-3), 48.9 (C-2), 29.0 (C-1'), 13.3 (C-1'').

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3550-3050 (O-H ν, br), 2935 (C-H ν), 2880 (C-H ν), 1702 (C=O ν), 1359, 1031 (C-O-C ν), 732.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 102 (4) [M^+], 87 (5) [($M-CH_3$) $^+$], 84 (33) [($M-H_2O$) $^+$], 72 (20) [($M-CH_2O$) $^+$], 69 (34) [($C_4H_5O_2$) $^+$], 61 (100), 59 (15), 57 (41) [(C_3H_5O) $^+$], 55 (13) [(C_3H_3O) $^+$].

t_R (GC/MS): 3.5 min

GC:

Säule: FS-Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R : (R): 15.8 min

(S): 15.5 min

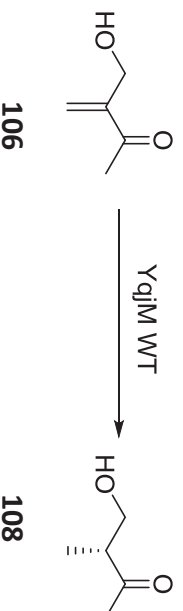
Oder alternativ:

Temperaturprogramm: 50 °C (40' iso), 20 °C/min 150 °C (5' iso)

t_R : (R): 20.2–21.0 min

(S): 21.8–22.3 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein.^[152]

Bioreduktion zu (R)-4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on [(R)-108]

Die Reaktion wurde im 1 mmol-Maßstab entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** durchgeführt. Es wurden 20 U (6 mg) aufgereinigtes Enzym YqjM WT verwendet. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten. Die Enantiomerenanalytik per GC wurde nach Methode 1 durchgeführt.

Ausbeute (**108**) (208.26 g/mol): 88 mg (0.86 mmol, 86 %),

$[\alpha]_D^{20} = +24.1$ (c 1.05, $CHCl_3$), 93 % *ee* (R) (GC, Säule).

Turnover Number (TON): 6941

NMR und MS-Daten stimmen mit der Literatur sowie den Produktreferenzen überein.^[152]

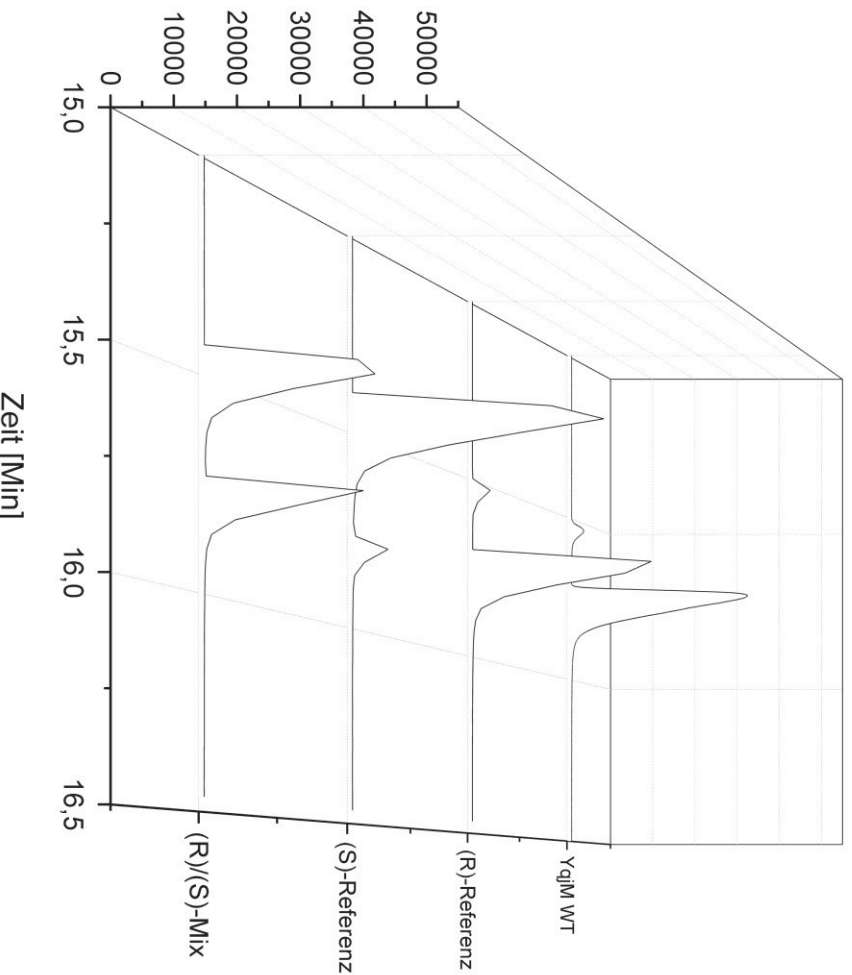
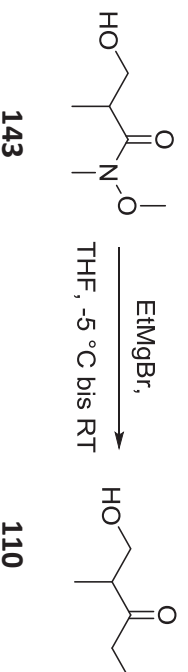


Abbildung 48: Vergleich der Gas-Chromatogramme der Produktreferenz und des Bioreduktionsprodukts von 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**).

9.3.2.5.3 1-Hydroxy-2-methyl-3-pentanon (**110**)

Synthese der Referenzsubstanz:



Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**). Es wurden 91 mg des *Weinreb*-Amids **143** (1 Äq., 0.62 mmol) und 0.51 mL Ethylmagnesiumbromid (2.5 Äq., 1.55 mmol) in 2 mL THF verwendet. Die Aufreinigung erfolgte *via* Flashchromatographie (Et₂O/EE, 3:1) und das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

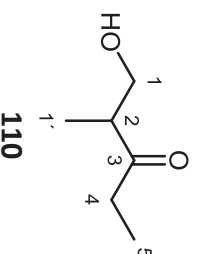
Ausbeute (**110**, 116.16 g/mol): (S): 23 mg (0.20 mmol, 32%), 79 % *ee* (GC, Säule)

$[\alpha]_D^{20} = -13.4$ (c 0.98, CHCl₃).

Literatur: $[\alpha]_D^{20} = -22$ (c 0.85, CHCl₃), *ee* nicht angegeben. ^[151]

DC:

$R_f = 0.62$ (Et₂O/EE, 3:1), Färbung mittels KMnO₄.

**¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 3.77–3.62 (m, 2H, CH₂OH), 2.76 (ddq, ³J_{2,1'} = 7.3 Hz, ³J_{2,1a} = 4.3 Hz, ³J_{2,1b} = 4.3 Hz, 1H, CHCH₃), 2.57 (dq, ³J_{4b,4a} = 17.9 Hz, ³J_{4b,5} = 7.3 Hz, 1H, CH₂CH₃), 2.47 (dq, ³J_{4a,4b} = 17.9 Hz, ³J_{4a,5} = 7.3 Hz, 1H, CH₂CH₃), 2.23 (s, 1H, OH), 1.13 (d, ³J_{1',2} = 7.3 Hz, 3H, CHCH₃), 1.06 (t, ³J_{5,4} = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 215.7 (C_{quartär}), 64.6 (CH₂), 47.8 (CH), 35.0 (COCH₂), 13.5 (CHCH₃), 7.7 (CH₂CH₃).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3412 (O-H v, br), 2939 (C-H v), 2881 (C-H v), 1700 (C=O v), 1459, 1410, 1377, 1224, 1108, 1043 (C-O-C v), 976, 803.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 116 (1) [M⁺], 98 (9) [(M-H₂O)⁺], 87 (8) [(M-C₂H₅)⁺], 75 (68) [(M-H₂O)⁺], 69 (24), 59 (41), 57 (100) [(C₃H₅O)⁺], 55 (15).

t_R (GC/MS): 4.5 min.

GC:

Säule: FS-Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R : (R): 16.6 min

(S): 16.3 min

Bioreduktion zu (S)-1-Hydroxy-2-methyl-3-pentanon [(S)- 110]

Die Reaktion wurde im 1 mmol-Maßstab entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** durchgeführt. Es wurden 40 mg aufgereinigtes Enzym YqjM C26N/169A verwendet. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute (**103**, 208.26 g/mol): 98 mg (0.84 mmol, 95 %),

$[\alpha]_D^{20} = -15.31$ (c 1.20, CHCl₃), 93 % *ee* (*S*) (GC, Säule).

NMR- und MS-Daten stimmen mit der Literatur sowie den Produktreferenzen überein. ^[151]

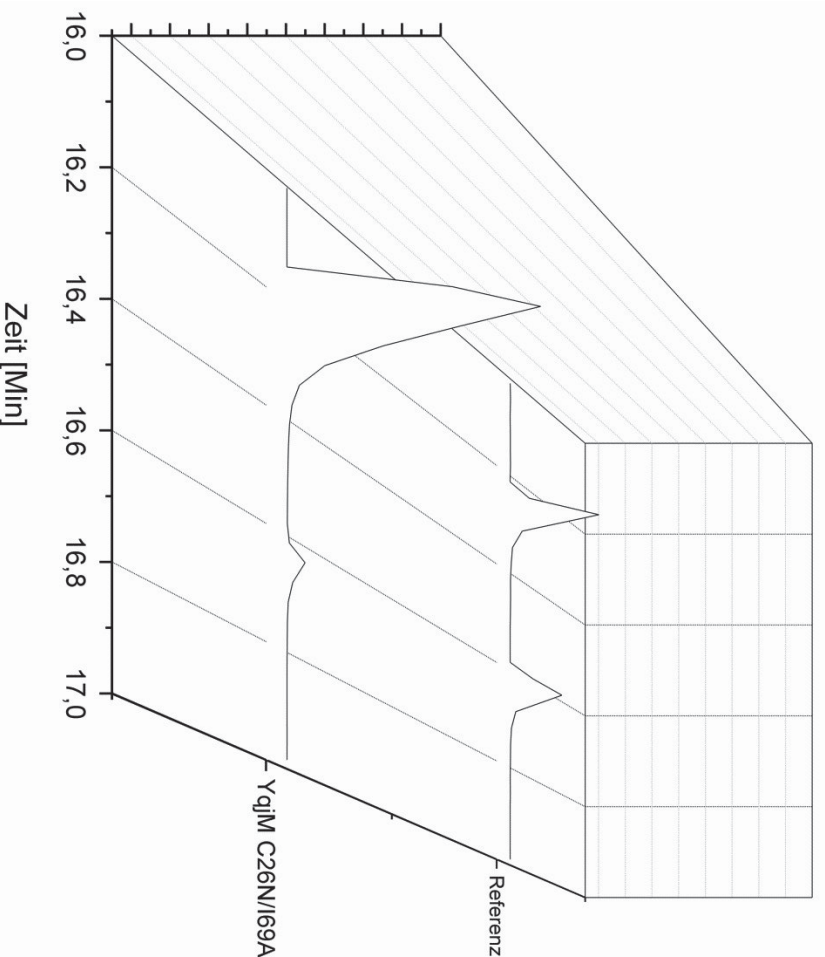
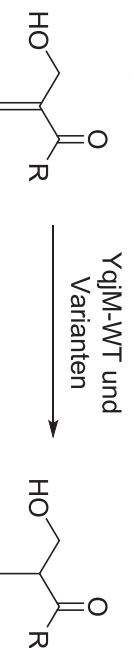


Abbildung 49: Vergleich der Gas-Chromatogramme der Produktreferenz und des Bioreduktionsprodukts von 1-Hydroxy-2-methylpentan-3-on (**110**).

9.3.2.6 Bioreduktionen im analytischen Maßstab zum Kapitel `Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM`

Im Folgenden sind die Ergebnisse der analytischen Umsetzungen aus dem **Kapitel 7.2** `Studien zur Selektivitätsänderung der Enreduktase YqjM` in Tabellen zusammengefasst. Alle Umsätze und Enantiomerenüberschüsse wurden mittels GC an chiraler stationärer Phase abgeschätzt. Die genutzten GC-Programme und Säulenmaterialien sind für die Ergebnisse in **Tabelle 41** und **Tabelle 42** bei der jeweiligen Synthesevorschrift des Produktreferenzmaterials in **Kapitel 9.3.2.4** zu finden.

Tabelle 41: Ergebnisse der Testansätze, die zur Bestimmung der Stereoselektivität von YqJM WT und Varianten bezüglich der Umsetzung des Roche-Ester-Vorläufers **36** und der beiden Keton-Varianten **106** und **109** dienten. Umsätze mit 0.6 U YqJM WT oder jew. geeigneter Menge Enzymvariante und bei pH 7.5. Abschätzung des Umsatzes und Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels GC an chiraler stationärer Phase.



#	YqJM-Variante	R = OMe (36/37)		R = Me (106/108)		R = Et (109/110)	
		Umsatz [%]	ee [%]	Umsatz [%]	ee [%]	Umsatz [%]	ee [%]
1	Wildtyp	34	96 (R)	100	98 (R)	100	58 (R)
2	C26N	2	99 (R)	5	99 (R)	0	-
3	C26H	54	76 (R)	99	87 (R)	100	60 (S)
4	H167A	5	18 (S)	97	78 (R)	89	7 (R)
5	C26N/H167A	10	86 (S)	100	89 (R)	94	30 (R)
6	C26H/H167A	11	27 (R)	20	67 (R)	54	20 (R)
7	I69A	9	40 (S)	100	35 (R)	100	53 (S)
8	I69Y	17	69 (S)	96	3 (R)	100	41 (S)
9	C26G	3	99 (R)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	Y28F	9	99 (R)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	Y28A	5	99 (R)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	A60H	0	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
13	A60H/H167A	0	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	C26N/I69A	25	93 (S)	85	68 (S)	94	94 (S)
15	C26H/I69A	5	80 (S)	76	20 (S)	93	78 (S)
16	C26H/I69Y	14	88 (S)	86	26 (S)	94	72 (S)
17	H167A/I69A	11	99 (S)	87	11 (S)	90	44 (S)
18	H167A/I69Y	6	99 (S)	89	24 (S)	91	25 (S)

Die Edukte und Produkte der in **Tabelle 43** und **Tabelle 45** gezeigten Bioreduktionen wurden in anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe Pietruszka bereits verwendet, vollständig

charakterisiert und eine GC-Analytik etabliert. Die Synthese erfolgte wie dort beschrieben. Die Literaturangaben der Synthesevorschriften und Analytik und die hier verwendeten GC-Programme sind in **Tabelle 44** aufgeführt.

Tabelle 42: Ergebnisse der Testansätze, zur Bestimmung der Stereoselektivität von YqJM WT und Varianten bezüglich der Umsetzung der geschützten Varianten des *Roche*-Ester-Vorläufers **92** und **93**. Umsätze mit 0,6 U WT oder einer geeigneten Menge der YqJM-Varianten und bei pH 7,5. Abschätzung des Umsatzes und Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels GC an chiraler stationärer Phase.



#	YqJM-Variante	R = Bn (92/95)		R = Allyl (93/ 96)	
		Umsatz [%]	ee [%]	Umsatz [%]	ee [%]
1	Wildtyp	89	99 (R)	88	99 (R)
2	C26N	0	-	8	99 (R)
3	C26H	64	99 (R)	74	99 (R)
4	H167A	42	83(R)	80	99 (R)
5	C26N/H167A	0	-	46	99 (R)
6	C26H/H167A	7	30 (R)	26	99 (R)
7	I69A	74	54 (R)	55	94 (R)
8	I69Y	54	28 (R)	52	95 (R)
9	C26N/I69A	24	49 (R)	33	76 (R)
10	C26H/I69A	58	88 (R)	13	80 (R)
11	C26H/I69Y	84	68 (R)	15	71 (R)
12	H167A/I69A	78	90 (S)	12	0
13	H167A/I69Y	51	90 (S)	12	11 (S)

Tabelle 43: Übersicht zu Umsatz und Stereoselektivität der analytischen Bioreduktion von 2-Phenylacrylsäuremethylester (**57**, R = H) zu Profen **56** (R = H) sowie der beiden Methyl-substituierten 4-Oxopentensäuren **48** und **44** zu **49** und **45** mittels der vielversprechendsten *ent*-WT-selektiven YqjM-Varianten (pH 7.5 und 0.6 U YqjM WT oder geeignete Menge der YqjM-Varianten).

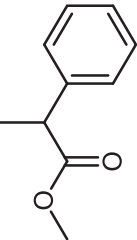
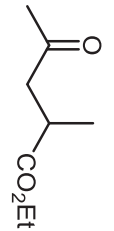
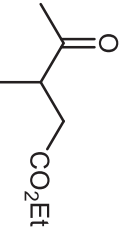
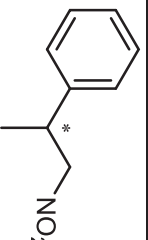
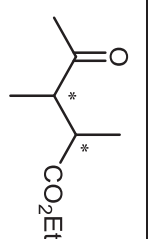
#	YqjM-Variante		56 (R = H)		49		45	Umsatz		ee	
								Umsatz [%]	ee [%]	Umsatz [%]	ee [%]
1	Wildtyp	45	100 (R)	100	99 (R)	100	96 (R)				
2	C26N/H167A	6	100 (R)	7	99 (R)	100	78 (R)				
3	C26N/I69A	38	99 (R)	100	32 (R)	100	13 (R)				
4	C26H/I69A	72	98 (R)	100	84 (R)	100	79 (R)				
5	C26H/I69Y	75	98 (R)	100	88 (R)	100	89 (R)				
6	H167A/I69A	78	96 (R)	94	70 (R)	100	41 (R)				
7	H167A/I69Y	88	97 (R)	94	26 (R)	100	28 (R)				

Tabelle 44: GC-Temperaturprogramme, chirale Säulenmaterialien und Retentionszeiten von Substraten und Produkten aus **Kapitel 6.2**, deren Enantiomerenanalytik in vorhergehenden Arbeiten in der Arbeitsgruppe Pietruszka etabliert wurde.

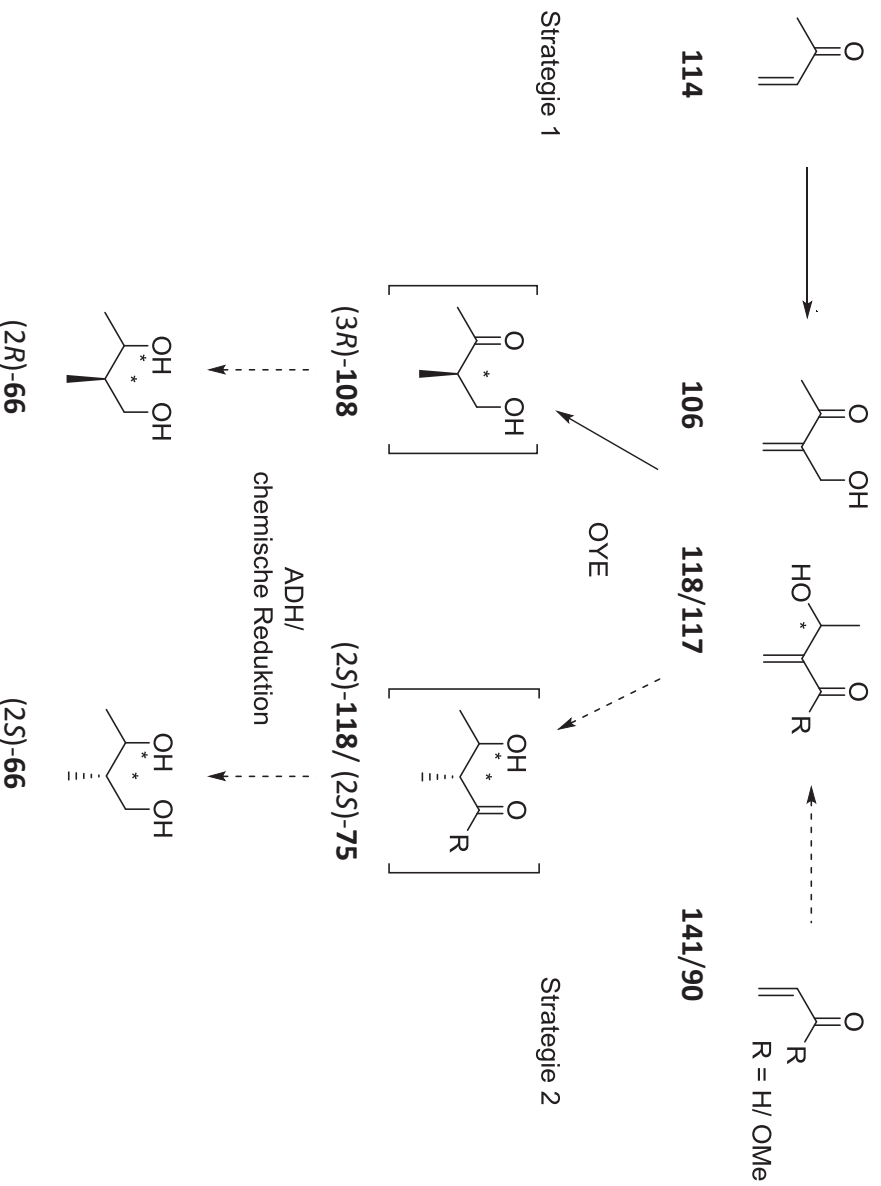
#	Bioreduktion	Säule	Temperaturprogramm	t _r (Edukt) [min]	t _r (Produkt) (R)-/(S) [min]
1	57 → 56 (R = H) ^[70]	Hydrodex β3P	110 °C (5' iso), 2 °C/min auf 135 °C (0' iso), 10 °C/min auf 150 °C (3' iso).	13.7	10.2/9.9
2	48 → 52 ^[66]	Lipodex G	60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).	13.1	11.6/11.9
3	44 → 45 ^[66]	Hydrodex β TBDAC	85 °C (4' iso), 1 °C/min auf 115 °C, (1' iso)	23.2	23.4/ 24.4
4	34 → 35 ^[65]	Lipodex E	120 °C (1' iso), 10 °C/min auf 150 °C, (5' iso).	8-8.9	6.3/6.2
5	50 → 51 ^[66]	Hydrodex β3P	70 °C (5' iso) 1 °C/min auf 110 °C, 20 °C/min auf 150 °C, (1' iso).	36.1	25.4/26.31 <i>syn</i> 27.4 (2R/3S) 27.8 (2S/3R)

Tabelle 45: Übersicht zu Umsatz und Stereoselektivität der analytischen Bioreduktion der Nitroverbindung **34** zu **35** sowie des Ethylesters **50** zu **51** mittels der vielversprechendsten *ent*-WT-selektiven YqjM-Varianten (Ansätze bei pH 7,5, 0,6 U YqjM WT oder geeignete Menge der YqjM-Varianten).

#	YqjM-Variante	35			51					
		Umsatz [%]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]	<i>de</i> [%]			
										
		zum Produkt			(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)/(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>) (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)					
1	Wildtyp	96	5	99	26	99/99	98			
2	C26N/H167A	79	4	99	0	-	-			
3	C26N/I69A	90	18	99	57	99/99	99			
4	C26H/I69A	92	21	99	22	99/99	96			
5	C26H/I69Y	88	47	99	24	99/99	96			
6	H167A/I69A	93	42	99	6	99/99	87			
7	H167A/I69Y	89	33	99	8	99/99	91			

9.3.3 Synthesevorschriften und Analytik zu Kapitel 7.3.1 'Strategien zur asymmetrischen Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol'

Aufbauend auf den Ergebnissen aus Kapitel 7.2 sollte eine multienzymatische Eintopfsynthese zur Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**) etabliert werden. Die beiden hierzu getesteten Synthesestrategien sind in Schema 60 im Überblick dargestellt.



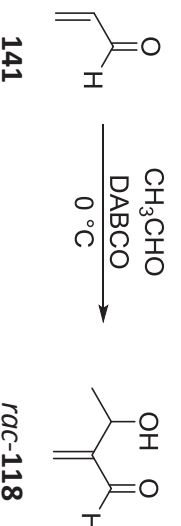
Schema 60: Übersicht zu Synthesestrategien für 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**). In diesem Kapitel neu zu etablierende Schritte sind durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet.

9.3.3.1 Substratsynthesen

9.3.3.1.1 3-(Hydroxymethyl)but-3-en-2-on (106)

Die Vorschrift zur Synthese von Substrat **106** sowie die Analytik sind in Kapitel 9.3.2.1.6 zu finden.

9.3.3.1.2 3-Hydroxy-2-methylenbutanal (118)



Lösungsmittel-Screening

Es wurde DABCO (1 Äq., 51 mg, 0.4 mmol) in einem *Schlenk*-Kolben in Lösungsmittel (2 mL) vorgelegt und unter Inertgasatmosphäre (N₂) Acetaldehyd (2.5 Äq., 44 mg, 1 mmol) und zuletzt Acrolein (1 Äq., 22 mg, 0.4 mmol) zugegeben. Der Ansatz wurde 24 h bei 0 °C bis RT gerührt und der Umsatz zum Produkt per ¹H-NMR bestimmt. Die Umsätze sind in **Tabelle 46** dargestellt.

Tabelle 46: Lösungsmittel-Screening zur Optimierung des Umsatzes in der *Morita–Baylis–Hillman*-Reaktion zu 3-Hydroxy-2-methylenbutanal (**118**).

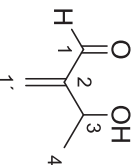
#	Lösungsmittel	Verhältnis	Umsatz in %
1	THF/H ₂ O	10:1	82
2	THF/H ₂ O	1:1	36
3	Dioxan/H ₂ O	10:1	45
4	Dioxan/H ₂ O	1:1	42
5	H ₂ O	-	5
6	THF	-	0

Optimierte Synthesvorschrift:

In einem *Schlenk*-Kolben wurde unter Inertgas-Atmosphäre DABCO (1 Äq., 1 g, 8 mmol) vorgelegt und ein THF-Wasser-Gemisch (44 mL, 10:1) zugegeben. Es wurde Acetaldehyd (2.5 Äq., 0.88 g, 20 mmol) und nach Temperatureinstellung auf 0 °C Acrolein (1 Äq., 0.45 g, 8.0 mmol) zugegeben und bei 0 °C bis RT bis zum vollständigen Umsatz gerührt. Der Umsatz wurde mittels ¹H-NMR bestimmt und vollständiger Umsatz der Edukte war nach 3 h erreicht. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck aufkonzentriert und das Produkt nach fraktionierter Vakuumdestillation als leicht gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute (**118**, 100.12 g/mol): 645 mg (6.44 mmol, 81 %).

Literatúrausbeute: 65 %, 240 h. ^[153]



118

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 9.59 (s, 1H, 1-H), 6.48 (dd, 1H, ⁴J_{1',3} = 1.4 Hz, ²J_{1'a,1'b} = 0.4 Hz, 1'-H_a), 6.07 (dd, 1H, ⁴J_{1'b,3} = 0.7 Hz, ²J_{1'b,1'a} = 0.4 Hz, 1'-H_b), 4.68 (dddd, ³J_{3,4} = 6.4 Hz, ³J_{3,OH} = 5.2 Hz, ⁴J_{3,1'a} = 1.4 Hz, ⁴J_{3,1'b} = 0.7 Hz, 1H, 3-H), 1.39 (d, ³J_{4,3} = 6.4 Hz, 3H, 4-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 194.5 (C-1), 133.2 (C-1'), 124.6 (C-2), 65.3 (C-3), 21.9 (C-4).

GC/MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 100 (6) [M⁺, 85 (100) [(C₄H₆O₂)⁺], 71 (26) [(C₄H₇O)⁺], 55 (37) [(C₃H₃O)⁺].

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3395 (O-H v, br), 2977, 2936 (CH₃ v.), 1683, 1447, 1412, 1372, 1259 (C-H δ).

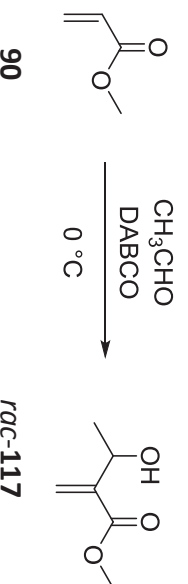
GC:

Säule: FS-Lipodex E

Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R: 13.0 min, 14.9 min.

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[154]

9.3.3.1.3 3-Hydroxy-2-methylenbutansäuremethylester (117)

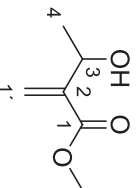
90

rac-117

In einem Schlenk-Kolben unter Inertgas-Atmosphäre (N₂) wurde DABCO (1 Äq., 1 g, 8 mmol) in einem Lösungsmittel-Wasser-Gemisch (44 ml, 10:1) bei RT vorgelegt und Acetaldehyd (2.5

Äq., 0.88 g, 20 mmol) und Acrylsäuremethylester (**90**, 1 Äq., 0.69 g, 8 mmol) zugegeben. Die Reaktion wurde parallel einmal mit THF und einmal mit Dioxan als Lösungsmittel durchgeführt. Nach 24 h konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ bei beiden Reaktionsansätzen vollständiger Umsatz festgestellt werden und daher wurden die Ansätze zusammen aufgearbeitet. Aufreinigung erfolgte per Vakuumdestillation (0.1 mbar, Übergangstemperatur: 50 °C) und das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (117, 130.14 g/mol): 1.13 g (8.65 mmol, 54 %)



117

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz):

δ [ppm] = 6.22 (s, 1H, 1'-H_a), 5.83 (dd, $^3J_{3,4} = 0.7$ Hz, 0.4 Hz, 1H, 1'-H_b), 4.62 (dq, $^3J_{3,4} = 6.5$ Hz, $^3J_{3,\text{OH}} = 6.1$ Hz, 1H, 3-H), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 2.61 (d, $^3J_{\text{OH},3} = 6.1$ Hz, 1H, OH), 1.39 (d, $^3J_{4,3} = 6.5$ Hz, 3H, 4-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz):

δ [ppm] = 167.2 (C-1), 143.5 (C-2), 124.3 (C-1'), 67.3 (C-3), 52.1 (OCH₃), 22.2 (C-4).

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 130 (6) [M^+], 115 (100) [(C₅H₇O₃)⁺], 98 (93) [(C₅H₆O₂)⁺], 85 (100) [(C₄H₅O₂)⁺], 55 (100) [(C₄H₇)⁺].

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3425 (O-H v), 2977 (CH₃-v), 1712 (C=O v), 1630 (C=C v), 1439, 1401, 1367 (C-H δ).

Siedepunkt: 50 °C, 0.1 mbar, (ca. 250 °C, 1 atm)

GC:

Säule: Lipodex E

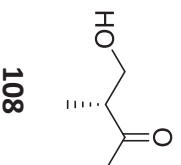
Temperaturprogramm: 60 °C (5' iso), 5 °C/min auf 150 °C (5' iso).

t_R: 13.47 min, 13.9 min

Die NMR-Daten stimmen mit den Literaturdaten überein. ^[155]

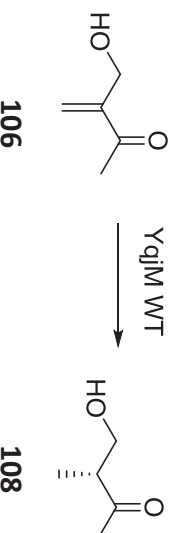
9.3.3.2 Produktsynthesen

9.3.3.2.1 4-Hydroxy-3-methylbutan-2-on (**108**)



Sämtliche Analytik, die Vorschrift zur Synthese der Referenzsubstanz **108** sowie eine Synthesevorschrift zur Bioreduktion von **106** zu **108** mittels YqjM WT sind im Experimentaltitel **Kapitel 9.3.2.5.2** behandelt.

Alternative Vorschrift zur Synthese via Bioreduktion mittels YqjM WT



Es wurden 108 mg Substrat (**106**, 1.08 mmol, 1 Äq) entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** umgesetzt. Anders als dort beschrieben wurde bei pH 7 und 25 °C gearbeitet und es wurde 0.5 mM NADP⁺ zugegeben. Das Enzym YqjM WT wurde als resuspendiertes Pellet aus einer Ammoniumsulfat-Fällung (40/70 %) eingesetzt (A = 16.2 U/ml). Insgesamt wurden 58 U YqjM WT in zwei Portionen zugegeben. Nach 24 h war entsprechend des GC-Chromatogramms vollständiger Umsatz erreicht und die Reaktion wurde aufgearbeitet. Dazu wurde die Reaktionslösung mit Natriumchlorid gesättigt und über Nacht gerührt. Nach einer Filtration über Celite wurde mit MTBE extrahiert. Das Produkt wurde als leicht grünliches Öl erhalten.

Ausbeute (108, 102.13 g/mol): 100 mg (0.99 mmol, 92 %), 97 % *ee* (*R*), GC.

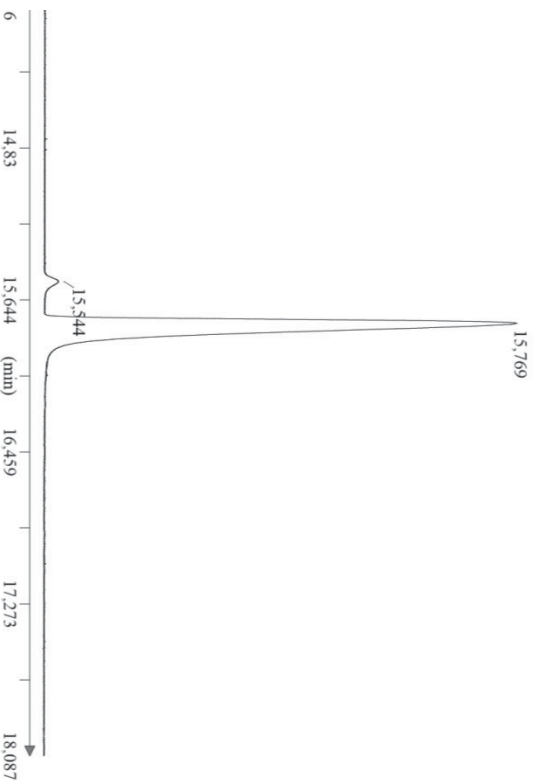
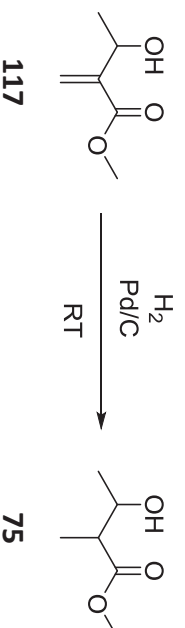


Abbildung 50: GC-Chromatogramm des Bio-reduktionsprodukts **108**.

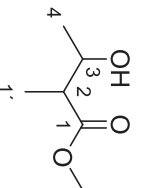
9.3.3.2.2 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethylester (75)

Synthese der Referenzverbindung



Entsprechend der allgemeinen Vorschrift für Hydrierungen (**Kapitel 9.3.1.3**) wurde 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethylester (**117**, 200 mg, 1.53 mmol) in THF (50 mL) umgesetzt. Die Reaktionstemperatur betrug 30 °C und als Katalysator diente Palladium auf Kohle (10 % Pd/C, 30 mm). Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung als farblose Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute (**75**, 132 g/mol): 153 mg (1.16 mmol, 75 %)



75

anti-Diastereomer:

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 3.89 (ddq, ³J_{3,2} = 7.1 Hz, ³J_{3,4} = 6.3 Hz, ³J_{3,OH} = 5.8 Hz, 1H, 3-H), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 2.61 (d, ³J_{OH,3} = 5.8 Hz, 1H, OH), 2.46 (dq, ³J_{2,1'} = 7.3 Hz, ³J_{2,3} = 7.1 Hz, 1H, 2-H), 1.22 (d, ³J_{4,3} = 6.3 Hz, 3H, 4-H), 1.20 (d, ³J_{1',2} = 7.3 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 69.6 (OCH₃), 51.9 (C-3), 47.0 (C-2), 20.9 (C-4), 14.1 (C-1').

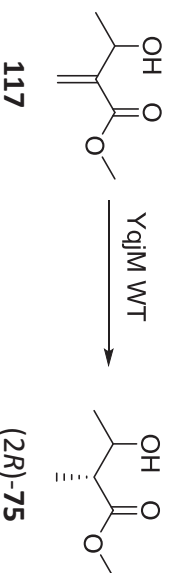
syn-Diastereomer:

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 4.07 (dq, ³J_{3,4} = 6.4 Hz, ³J_{3,OH} = 4.3 Hz, ³J_{3,2} = 3.8 Hz, 1H, 3-H), 3.72 (s, 3H, OCH₃), 3.49 (d, ³J_{OH,3} = 4.3 Hz, 1H, OH), 2.51 (dq, ³J_{2,1'} = 7.2 Hz, ³J_{2,3} = 3.8 Hz, 1H, 2-H), 1.19 (d, ³J_{4,3} = 6.4 Hz, 3H, 4-H), 1.18 (d, ³J_{1',2} = 7.2 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 68.1 (OCH₃), 51.9 (C-3), 45.5 (C-2), 19.9 (C-4), 11.1 (C-1').

MS (EI, positive Ionen, 70 eV): m/z (%) = 117 (15) [(M-CH₃)⁺], 88 (100) [(C₄H₈O₂)⁺], 57 (90) [(C₃H₅O)⁺].**IR (ATR, Film):** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3421 (O-H ν), 2977 (CH₃ ν), 1716 (C=O ν), 1456, 1436, 1378 (C-H δ).**GC:****Säule:** Lipodex E**Temperaturprogramm:** 60 °C (1'iso), 15 °C/min auf 185 °C, 120 °C/min auf 280 °C, (5'iso).**t_R:** (*anti*): 12.2 min (2S,3S) und 12.3 min (2R,3R).(*syn*): 12.6 min (2R,3S) und 13.2 min (2S,3R).**Diastereomerenverhältnis (GC/¹H-NMR) 2:1 (*syn*: *anti*)**Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein. ^[83c, 156]**Bioreduktion mit YqjIM WT zu (2R)-3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethylester (75)**

Es wurden 50 mg (0.38 mmol, 1 Äq) 3-Hydroxy-2-methylenbutansäuremethylester (**117**) entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in **Kapitel 9.3.1.2** umgesetzt. Anders als dort beschrieben wurde bei pH 7 und 25 °C gearbeitet und es wurden 10 mL KP₁ eingesetzt (Substratkonzentration 38 mM). Das Enzym YqjIM WT wurde als lyophilisiertes mit FMN rekuperiertes Rohextrakt eingesetzt. Insgesamt wurden 105 mg Lyophilisat (0.3 U/mg, 32 U) in drei 35 mg-Portionen (nach 0 h, 1 h, 18 h) zugegeben. Nach 44 h war entsprechend des GC/MS-Chromatogramms vollständiger Umsatz erreicht und die Reaktion wurde entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift aufgearbeitet. Die Extraktion erfolgte mit MTBE. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten und enthielt laut ¹H-NMR noch etwa 2 % Edukt. Eine chromatographische Aufreinigung (Et₂O/EE, 3:1) war nicht möglich.

Ausbeute (**75**, 132.18 g/mol): 39 mg (0.29 mmol, 78 %).

Im Rahmen der Bachelorarbeit von L. Fischer wurden zuvor je 150 mg (1.15 mmol, 1 Äq.) Substrat **117** in Gefäßen aus drei verschiedenen Materialien (Glas, Polyethylen und Polystyrol) bei etwas abgewandelten Bedingungen umgesetzt.^[108] Wie zuvor wurde bei einer Substratkonzentration von 38 mM, also in 30 mL K_P (100 mM, pH 7) gearbeitet. Es wurde jedoch nicht unter Argon gearbeitet und außerdem wurde die NADP⁺-Konzentration stark erhöht auf 2 mM NADP⁺. Es wurden 55 U Glukose-Dehydrogenase und 60 U IMAC-gereinigtes Enzym YqjM eingesetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Abschätzung des Umsatzes erfolgte mittels GC an chiraler stationärer Phase. Die Aufarbeitung erfolgte für alle drei Ansätze gemeinsam, da das Gefäß keinen Einfluss auf den Umsatz in der Reaktion hatte. Es wurde gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift vorgegangen. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**75**, 132.18 g/mol): 387 mg (2.9 mmol, 85 %),

NMR- und MS-Daten stimmen mit der Literatur sowie den Produktreferenzen überein.^[83c, 156]

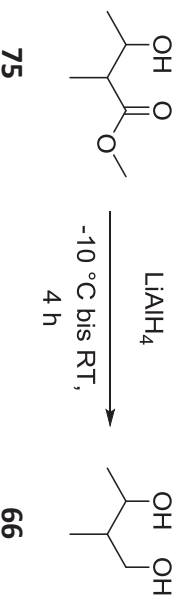
Diastereomerenverhältnis (GC/¹H-NMR) 1:1 (*syn*: *anti*)

Enantiomerenüberschuss: *syn*: >99 % (2*R*,3*R*)

anti: >99 % (2*R*,3*S*)

9.3.3.3 Vorschriften zur Synthese von 2-Methylbutan-1,3-diol (**66**)

Synthese der Referenzsubstanz (alle 4 Diastereomere)



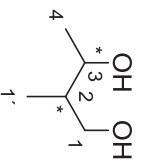
Entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Reduktion mittels LiAlH₄ (**Kapitel 9.3.1.5**) wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Inertgas-Atmosphäre (N₂) Lithiumaluminiumhydrid (55.5 mg, 1.46 mmol, 1.25 Äq.) in THF (1.5 mL) vorgelegt und auf –10 °C gekühlt. Es wurde ein Stereoisomerengemisch von 3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethylester (**75**, 2:1 *syn*: *anti*, 155 mg, 1.17 mmol, 1 Äq.) in THF (1 mL) über 1 h zuge tropft. Nach vollständiger Zugabe wurde 1 h bei –5 °C gerührt und das Gemisch dann auf RT aufgewärmt und nochmal 2 h bei RT gerührt. Danach erfolgte die Aufarbeitung entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift. Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit erhalten und bedurfte keiner weiteren Aufreinigung.

Ausbeute (**66**, 104.15 g/mol): 111 mg (1.07 mmol, 92 %)

DC:

R_f = 0.15 (PE/EE, 50:50).

Färbung mittels wässriger Kaliumpermanganatlösung und Erhitzen.



syn-Diastereomer:

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 4.03 (qd, ³J_{3,4} = 6.5 Hz, ³J_{3,2} = 3.1 Hz, 1H, 3-H), 3.71 (dd, ²J_{1a,1b} = 10.7, ³J_{1,2} = 6.9 Hz, 1H, 1-Ha), 3.67 (dd, ²J_{1b,1a} = 10.7 Hz, ³J_{1b,2} = 4.5 Hz, 1H, 1-Hb), 2.67 (s, 2H, OH), 1.81 (dddd, ³J_{2,1'} = 7.1 Hz, ³J_{2,1a} = 6.9 Hz, ³J_{2,1b} = 4.5 Hz, ³J_{2,3} = 3.1 Hz, 1H, 2-H), 1.19 (d, ³J_{4,3} = 6.5 Hz, 3H, 4-H), 0.89 (d, ³J_{1',2} = 7.1 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 70.9 (C-3), 66.7 (C-1), 40.3 (C-2), 19.7 (C-4), 10.9 (C-1').

anti-Diastereomer:

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 3.75–3.57 (m, 3H, 1-H und 2-H), 1.69–1.60 (m, 1H, 3-H), 1.22 (d, ³J_{4,3} = 6.2 Hz, 3H, 4-H), 0.84 (d, ³J_{1',2} = 7.0 Hz, 3H, 1'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 73.8 (C-3), 68.3 (C-1), 41.9 (C-2), 22.1 (C-4), 13.8 (C-1').

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 89 (22) [(M-CH₃)⁺], 71 (100) [(M-CH₃-H₂O)⁺], 56 (83) [(C₄H₈)⁺].

t_R: 4.2 min

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3325 (O-H ν), 2969, 2929, 2882 (CH₃ ν), 1454, 1375 (C-H δ).

Diastereomenverhältnis (¹H-NMR):

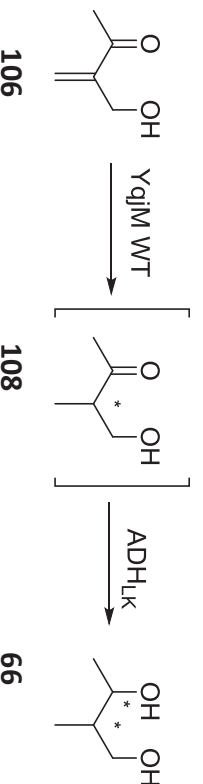
DV = ca. 2.3:1 (*syn:anti*)

Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.^[79]

Synthese ausgehend vom Produkt der Bioreduktion

Entsprechend der allgemeinen Vorschrift zur Reduktion mittels LiAlH_4 (**Kapitel 9.3.1.5**) wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Inertgas-Atmosphäre (N_2) Lithiumaluminiumhydrid (27 mg, 0.71 mmol, 1.25 Äq.) in THF (0.75 mL) vorgelegt und auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Es wurde (2*R*)-3-Hydroxy-2-methylbutansäuremethylester (**75**, 75 mg, 0.75 mmol) in THF (0.5 mL) über 1 h zuge tropft. Nach vollständiger Zugabe wurde 1 h bei $-5\text{ }^\circ\text{C}$ und 2 h bei RT gerührt. Danach erfolgte die Aufarbeitung nach Vorschrift. Im $^1\text{H-NMR}$ waren deutliche Verunreinigungen zu sehen. Die säulenchromatographische Auftrennung war nicht möglich.

Synthese als Kaskadenumsetzung von YqjIM WT und ADH_{LK}



In einem 100 mL-Zweihalskolben wurden 100 mL KP_i -Puffer (100 mM, pH 7.5) vorgelegt und Cofaktor (NADP^+ , 77.8 mg), 3-(Hydroxymethyl)but-3-en-2-on (**106**, 500.6 mg) und Glukose (9.9 g) zugegeben. Mittels Titrator wurde der pH-Wert gemessen und bei 7.5 konstant gehalten. Nach dem Einstellen des Titrators wurden die Enzyme YqjIM (1. Zugabe 1 mL, 2. Zugabe 1.1 mL nach 3 h, 3. Zugabe 0.4 mL nach 26 h, $A = 11\text{ U/mL}$) und GDH (0.25 mL, $A = 104\text{ U/mL}$) zugegeben und die Reaktion gestartet.

Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wurden zur Hälfte der Lösung 250 μL ADH_{LK} zugegeben und zwei Stunden weitergerührt (GC-Kontrolle). Die Reaktion wurde mangels vollständigen Umsatzes übers Wochenende weiter gerührt und nach 67 h wurden weitere 250 μL ADH_{LK} und Cofaktor (NADP^+ , 77.8 mg) zugegeben. Es wurde für 2 h weitergerührt und sodann durch Zugabe von 40 g Ammoniumsulfat das Enzym ausgefällt. Die Extraktion erfolgte mit MTBE und nach Trocknung über Na_2SO_4 wurde das Lösemittel bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE, 50:50) und das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute (**66**, 104.15 g/mol): 128 mg (1.23 mmol, 50 %)

Diastereomerenverhältnis ($^1\text{H-NMR}$)

$DV = 7:1$ (*syn:anti*)

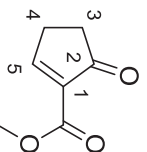
NMR und MS -Daten stimmen mit der Literatur sowie der Produktreferenz überein.^[79]

9.3.4 Synthesevorschriften und Analytik zu Kapitel 7.3.2 `Substratscreening zur Verwirklichung einer Kaskade aus YqJM und Laccase`

9.3.4.1 Substrate

9.3.4.1.1 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (126)

Die Substanz wurde von Dr. M. Biehlitz im Rahmen einer Kooperation bereitgestellt.



126

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 8.43 (t, ³J_{5,4} = 2.8 Hz, 1H, 5-H), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 2.75 (td, 2H, ³J_{4,3} = 6.9 Hz, ³J_{4,5} = 2.8 Hz, 4-H), 2.58–2.56 (m, 2H, 3-H).

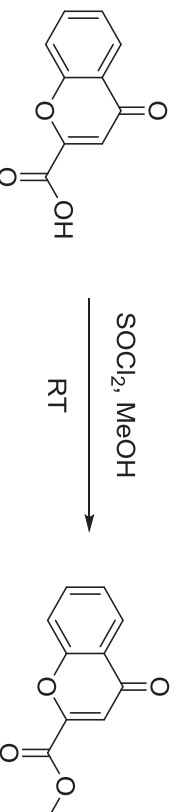
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 140 (17) [(M)⁺], 110 (46), 80 (34), 53 (100).

t_r (GC/MS): 7.8 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein. ^[157]

9.3.4.1.2 Chromon-2-carbonsäuremethylester (127b)



144

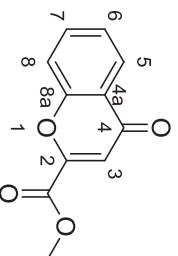
127b

Zu einer rührenden Lösung von Chromon-2-carbonsäure (**144**, 190 mg, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) in einem Gemisch aus 2 ml Methanol und 2 ml THF wurde unter Kühlung bei 0 °C Thionylchlorid (179 mg, 1.50 mmol, 1.5 Äq.) zugetropft und bei Raumtemperatur für 20 h gerührt bis laut ¹H-NMR vollständiger Umsatz erreicht war. Sodann wurde das Reaktionsgemisch eingengt, mit Wasser verdünnt, mit Ethylacetat extrahiert und mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne Aufreinigung als weißes Pulver erhalten.

Ausbeute (**127b**, 204.18 g/mol): 180 mg (0.88 mmol, 88 %).

DC:

R_f = 0.26 (PE/EE 80:20).

**127b****¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):**

δ [ppm] = 8.20 (dd, ³J_{5,6} = 8.0 Hz, ⁴J_{5,7} = 1.7 Hz, 1H, 5-H), 7.74 (ddd, ³J_{7,8} = 8.7 Hz, ³J_{7,6} = 7.2 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.7 Hz, 1H, 7-H), 7.61 (dd, ³J_{8,7} = 8.7 Hz, ⁴J_{8,6} = 1.1 Hz, 1H, 8-H), 7.45 (ddd, 1H, ³J_{6,5} = 8.0 Hz, ³J_{6,7} = 7.2 Hz, ⁴J_{7,5} = 1.1 Hz, 6-H), 7.12 (s, 1H, 3-H), 4.02 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 178.5 (C-4), 161.2 (CO₂CH₃), 156.1 (C-4a), 152.1 (C-2), 134.9 (C-7), 126.1 (C-6), 125.9 (C-5), 124.6 (C-8a), 118.9 (C-8), 115.1 (C-3), 53.7 (CO₂CH₃).

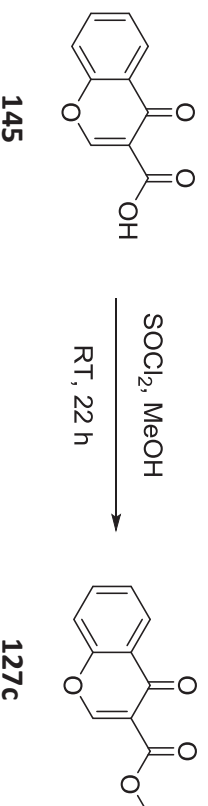
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 204 [(M)⁺] t_R (GC/MS): 11.0 min

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1741 (C=O v), 1660 (C=O v), 1622 (C=C v arom.), 1465 (C=C v arom.), 1394, 1302, 1260, 1240, 1128, 1094, 771.

Die angegebenen NMR-Daten stimmen mit den publizierten Daten überein.^[158]

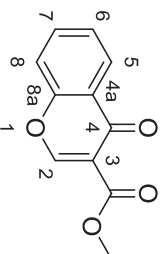
9.3.4.1.3 Chromon-3-carbonsäuremethylester (127c)**145****127c**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Suljić *et al.*^[113b] wurden in einem Schlenk-Kolben unter Stickstoff 120 mL MeOH vorgelegt, bei 0 °C langsam Thionylchlorid (24.0 mL, 330 mmol, 38 Äq.) zugetropft und für 1.5 h unter Aufwärmen auf Raumtemperatur gerührt. Sodann wurde die Chromon-3-carbonsäure (**145**, 1.66 g, 8.70 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und für weitere 17 h bei Raumtemperatur gerührt bis die Säure vollständig abreagiert hatte. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch aufkonzentriert und per Flashchromatographie gereinigt (PE/EE, 75:25). Das Produkt wurde als gelblich-weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute (**127c**, 204.18 g/mol): 1.68 g (8.20 mmol, 94 %).

DC:

$R_f = 0.18$ (PE/EE, 70:30).



127c

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz):

δ [ppm] = 8.69 (s, 1H, 2-H), 8.30 (dd, $^3J_{5,6} = 8.0$ Hz, $^4J_{5,7} = 1.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.71 (ddd, $^3J_{7,8} = 8.6$ Hz, $^3J_{7,6} = 7.2$ Hz, $^4J_{7,5} = 1.7$ Hz, 1H, 7-H), 7.50 (dd, $^3J_{8,7} = 8.6$ Hz, $^4J_{8,6} = 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.47 (ddd, $^3J_{6,5} = 8.0$ Hz, $^3J_{6,7} = 7.2$ Hz, $^4J_{6,8} = 1.0$ Hz, 1H, 6-H), 3.94 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 151 MHz):

δ [ppm] = 173.4 (C-4), 164.1 (CO_2CH_3), 162.0 (C-2), 155.6 (C-8a), 134.2 (C-5), 126.6 (C-7), 126.3 (C-8), 125.2 (C-4a), 118.1 (C-6), 116.1 (C-3), 52.4 (CH_3).

IR (ATR, Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 1745 (C=O v), 1709 (C=O v), 1660, 1617, 1570, 1464, 1437, 1394, 1343, 1312, 1120, 1094, 768.

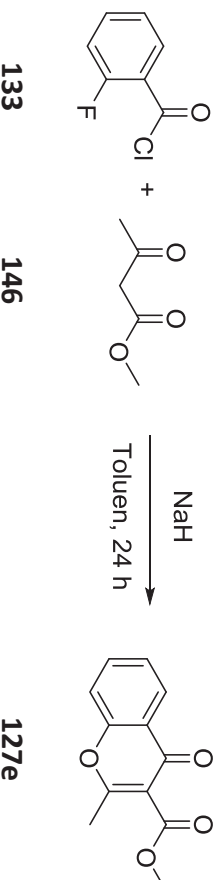
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 204 (22) $[(\text{M})^+]$, 173 (81) $[(\text{M}-\text{CH}_3\text{O})^+]$, 146 (100) $[(\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2)^+]$, 121 (63), 104 (14) $[(\text{C}_7\text{H}_4\text{O})^+]$, 92 (23) $[(\text{C}_6\text{H}_4\text{O})^+]$, 89 (31), 63 (35), 53 (39).

t_R (GC/MS): 11.0 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten NMR-Daten überein.^[159]

9.3.4.1.4 2-Methylchromon-3-carbonsäuremethylester (**127e**)



133

146

127e

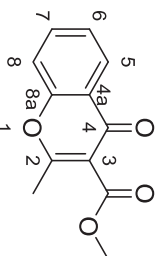
In Anlehnung an eine Vorschrift von Suljić *et al.*^[113b] wurde eine Mischung von 293 mg (2.50 mmol, 1.0 Äq.) Methylacetylsäureester (**146**, trocken) und 13 ml Toluol in einem

Schlenk-Kolben unter N_2 vorgelegt und nach Zugabe von Natriumhydrid (61.0 mg, 2.50 mmol, 1.0 Äq.) für 12 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Sodann wurde eine Lösung von 2-Fluorbenzoylchlorid (400 mg, 2.50 mmol, 1.0 Äq.) in 6 ml Toluol innerhalb einer Minute dazugegeben und für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Es wurde mit 25 ml Wasser gequench und 2x mit Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Flashchromatographie (Eluent: PE/EE, 80:20). Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute (**127e**, 218.2 g/mol): 208 mg (0.95 mmol, 40 %).

DC

R_f = 0.22 (PE/EE, 80:20).



127e

1H -NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 8.21 (dd, $^3J_{5,6}$ = 8.0 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.7 Hz, $^5J_{5,8}$ = 0.5 Hz, 1H, 5-H), 7.67 (ddd, $^3J_{7,8}$ = 8.5 Hz, $^3J_{7,6}$ = 7.2 Hz, $^4J_{7,5}$ = 1.7 Hz, 1H, 7-H), 7.43 (ddd, $^3J_{8,7}$ = 8.5 Hz, $^4J_{8,6}$ = 1.0 Hz, $^5J_{8,5}$ = 0.5 Hz, 1H, 8-H), 7.41 (ddd, $^3J_{6,5}$ = 8.0 Hz, $^3J_{6,7}$ = 7.2 Hz, $^4J_{6,8}$ = 1.0 Hz, 1H, 6-H), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 2.53 (s, 3H, CH₃).

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 218 (34) [(M)⁺], 203 (13) [(M-CH₃)⁺], 187 (100) [(M-OCH₃)⁺], 160 (55), 121 (38), 92 (19), 67 (29).

t_R = 11.2 min

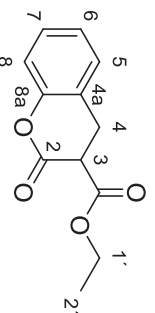
Schmelzpunkt: 119 °C

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten NMR-Daten überein.^[113b]

9.3.4.2 Produktreferenzen

9.3.4.2.1 3,4-Dihydrocoumarin-3-carbonsäureethylester (**124d**)

Dieser Ester wurde im Rahmen der Kooperation von Dr. S. Suljić als Produktreferenz erhalten und von diesem vollständig charakterisiert.^[113b] Die Bioreduktionen dazu sind in **Kapitel 9.3.4.3.2** behandelt.



124d

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 7.28 (ddd, $^3J_{7,6}$ = 8.2 Hz, $^3J_{7,8}$ = 7.4 Hz, $^4J_{7,5}$ = 1.6 Hz, 1H, 7-H), 7.21 (dd, $^3J_{5,6}$ = 7.5 Hz, $^4J_{5,7}$ = 1.6 Hz, 1H, 5-H), 7.12 (ddd, $^3J_{6,7}$ = 8.6 Hz, $^3J_{6,5}$ = 7.5 Hz, $^4J_{6,8}$ = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 7.07 (dd, $^3J_{8,7}$ = 8.2 Hz, $^4J_{8,6}$ = 1.2 Hz, 1H, 8-H), 4.23 (dq, $^2J_{1'a,1'b}$ = 10.8 Hz, $^3J_{1':2'}$ = 7.1 Hz, 1H, 1'-H_a), 4.18 (dq, $^2J_{1'b,1'a}$ = 10.8 Hz, $^3J_{1':2'}$ = 7.1 Hz, 1H, 1'-H_b), 3.76 (dd, $^3J_{3,4}$ = 8.6 Hz, $^3J_{3,4}$ = 6.0 Hz, 1H, 3-H), 3.42 (dd, $^2J_{4,4}$ = 16.0 Hz, $^3J_{4,3}$ = 8.6 Hz, 1H, 4-H), 3.18 (dd, $^2J_{4,4}$ = 16.0 Hz, $^3J_{4,3}$ = 6.0 Hz, 1H, 4-H), 1.21 (t, $^3J_{2',1'}$ = 7.1 Hz, 3H, 2'-H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 151 MHz):

δ [ppm] = 167.7 (CO₂Et), 165.0 (C-2), 151.6 (C-8a), 128.9 (C-7), 128.4 (C-5), 125.0 (C-6), 120.9 (C-4a), 117.0 (C-8), 62.3 (C-1'), 46.5 (C-3), 27.5 (C-4), 14.1 (C-2').

IR (ATR, Film):

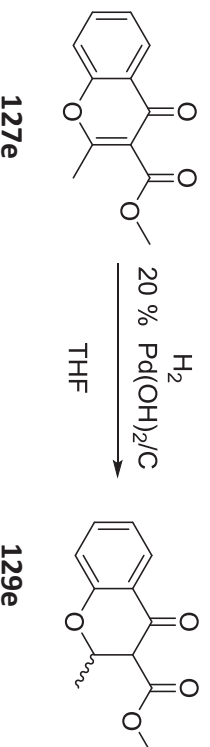
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1745 (C=O v), 1709 (C=O v), 1660, 1617, 1464, 1437, 1394, 1343, 1212, 1120, 1094, 768.

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 220 (5) [(M)⁺], 173 (25), 147 (100) [(M-C₃H₅O₂)⁺], 118 (28), 106 (27) [(C₇H₆O)⁺], 91 (23) [(C₇H₇)⁺], 78 (20) [(C₆H₆)⁺], 65 (15) [(C₅H₅)⁺].

t_R (GC/MS): 10.7 min.

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten NMR-Daten überein.^[113b]

9.3.4.2.2 3-(2-Methyl-4-chromanon)carbonsäuremethylester (129e)

127e

129e

Es wurde entsprechend der allgemeinen **Arbeitsvorschrift 9.3.1.3** vorgegangen, wobei bei 20 °C, 7 bar, 60 % Wasserstoff und einem Fluss von 0.3 mL/min gearbeitet wurde.^[113b] Es wurden 50.0 mg (0.23 mmol) 3-(2-Methylchromon)carbonsäuremethylester (**127e**)

eingesetzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurden 39.4 mg eines klaren, leicht pinken Öls erhalten, das entsprechend des GC/MS-Chromatogramms kein Edukt und zwei Produkte enthielt (t_R : 9.7 und 9.8 min). Eine Isolierung des gewünschten Produkts per Säulenchromatographie war nicht möglich.

DC: $R_f = 0.48-0.76$ (PE/EE, 70:30).

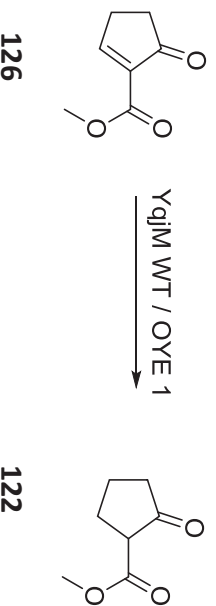
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 220 (26) [(M)⁺], 205 (100) [(M-CH₃)⁺].

t_R (GC/MS): 9.7 min.

9.3.4.3 Bio reduktionen

9.3.4.3.1 Bio reduktionen von 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**)



Schema 61: Bio reduktion von 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**) mittels Enreduktasen.

Die angestrebte Bio reduktion von 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**) mittels einer Enreduktase ist in **Schema 61** dargestellt. Es wurde entsprechend der allgemeinen Vorschrift für Bio reduktionen im analytischen Maßstab (**Kapitel 9.3.1**) vorgegangen. Das Edukt **126** wurde von Dr. M. Biehlitz zur Verfügung gestellt. Das Produkt war kommerziell erhältlich. Der Umsatz wurde mittels GC/MS bestimmt. Die analytischen Daten zu dieser Umsetzung sind in **Tabelle 47** gezeigt.

Tabelle 47: EI-MS Fragmentierungen von Edukt und Produkt der Bio reduktion aus **Schema 61**.

#	Substanz	t_R [min]	EI-Fragmentierung m/z
1	126	7.8	140 (17) [(M) ⁺], 110 (46), 80 (34), 53 (100).
2	122	6.2	142 (3) [(M) ⁺], 114 (36), 87 (35), 55 (100).

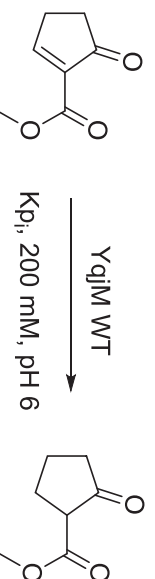
Zunächst wurde eine Versuchsreihe mit YqjM WT und OYE 1 bei verschiedenen pH-Werten und mit THF als Cosolvens durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in **Tabelle 17** dargestellt. In einer weiteren Versuchsreihe (**Tabelle 48**) wurde zusätzlich der Einsatz von 1 % (v/v) oder 33 % (v/v) Acetonitril als Cosolvens getestet (Eintrag 3 und 4) und der Einsatz von 200 mM KPi bei pH 6 (Eintrag 2), um die Reaktionsbedingungen an die Laccase-katalysierte Reaktion anzupassen.

Tabelle 48: Screening zur Bio-reduktion von 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylester (**126**). Bedingungen: 0.3 U Enzym, 30 °C, 300 rpm, 24 h, K_{P1} 20 mM, 1 % (v/v) Cosolvens, wenn nicht anders angegeben.

#	Enzym	pH	Cosolvens	Umsatz [%]
1	OYE 1	6.5	THF	68
2	OYE 1	6.0 ^{a)}	THF	73
3	OYE 1	6.5	CH ₃ CN	74
4	OYE 1	6.5	CH ₃ CN ^{b)}	9

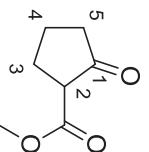
^{a)}K_{P1} 200 mM, ^{b)}33 % (v/v)

Bio-reduktion des 2-(Cyclopentenon)carbonsäuremethylesters (**126**) im präparativen Maßstab



In einem 25 mL-Zweihalskolben wurden 10 mL K_{P1} (100 mM, pH 6.0) vorgelegt und nacheinander 85 mg Substrat (1 Äq., 0.6 mmol, c 50 mM), 100 µL THF (1 %, v/v), 360 mg Glukose (c 250 mM), 100 µL NADP⁺ (100 mM Lösung, 0.02 Äq.), 10 U GDH und 10 U YqjM zugeben und bei 30 °C und unter Konstanthaltung des pH-Wert gerührt. Nach 18 h waren laut GC/MS 35 % Umsatz erreicht. Nach weiterer Enzym- und Cofaktorzugabe und Reaktionskontrolle nach 24 h war ein größerer Anteil Nebenprodukte und keine Vermehrung des Produkts zu beobachten. Daher wurde die Reaktion durch Zugabe von HCl (37 %ig) bis pH 2 gequenchet und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (PE/EE, 70:30) war nicht möglich.

Rohausbeute (**122**, 142.15 g/mol): 69 mg



122

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (t, ³J_{2,3} = 9.0 Hz, 1H, 2-H), 2.38–2.23 (m, 4H, 4-H/ 5-H), 2.17–2.09 (m, 1H, 3-H_a), 1.94–1.83 (m, 1H, 3-H_b).

MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 142 (3) [(M)⁺], 114 (36), 87 (35), 55 (100).

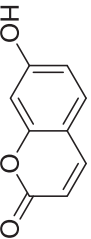
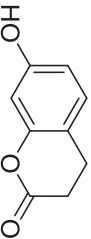
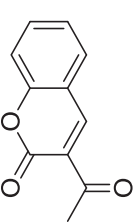
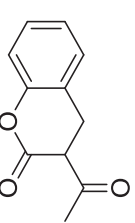
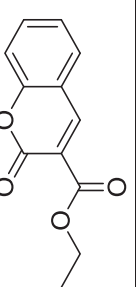
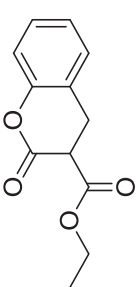
t_R (GC/MS): 6.2 min

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten Daten überein. ^[160]

9.3.4.3.2 Bioreduktionen von Cumarinen

Die Ergebnisse der Bioreduktionen von Cumarinen sind in **Kapitel 7.3, Tabelle 18** dargestellt. In **Tabelle 49** sind die jeweils gefundenen EI-Fragmentierungen und Retentionszeiten von Edukten und angestrebten Produkten im Überblick dargestellt. Die EI-Fragmentierungen entstandener Nebenprodukte bei Umsetzung von **123bd** sind in **Kapitel 7.3, Tabelle 19** dargestellt und werden dort diskutiert.

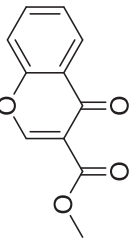
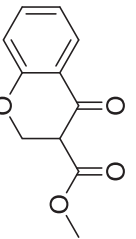
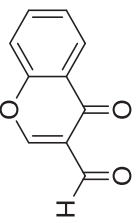
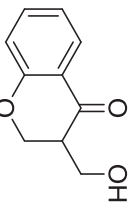
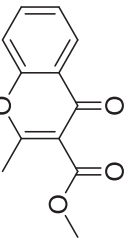
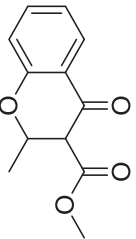
Tabelle 49: Fragmentierungen der in der GC/MS detektierten Edukte und Produkte bei Umsetzung der verschieden substituierten Cumarine (**123b-d**).

#	Substanz	t_r [min]	EI-Fragmentierung m/z
1		11.2	162 (70) [(M) ⁺], 134 (100) [(M-CO) ⁺], 105 (27) [(C ₇ H ₅ O) ⁺], 78 (32) [(C ₆ H ₆) ⁺], 63 (17), 51 (25) [(C ₄ H ₃) ⁺].
	123b		
2		10.7	164 (100) [(M) ⁺], 136 (50) [(M-CO) ⁺], 122 (25) [(C ₇ H ₆ O ₂) ⁺], 107 (23) [(C ₇ H ₆ O) ⁺], 94 (25) [(C ₆ H ₆ O) ⁺], 79 (15), 66 (20) [(C ₆ H ₆ O-CO) ⁺], 51 (15) [(C ₄ H ₃) ⁺].
	124b		
3		10.7	188 (45) [(M) ⁺], 173 (100) [(M-CH ₃) ⁺], 145 (15) [(M-C ₂ H ₃ O) ⁺], 118 (24), 89 (50) [(C ₇ H ₅) ⁺], 63 (35).
	123c		
4		10.4 (breit)	190 [(M) ⁺], 173, 147 [(M-C ₂ H ₃ O) ⁺], 120 [(C ₈ H ₈ O) ⁺], 91 [(C ₇ H ₇) ⁺], 78 [(C ₆ H ₆) ⁺], 63, 51 [(C ₄ H ₃) ⁺].
	124c		
5		11.4	218 (23) [(M) ⁺], 173 (80) [(M-C ₂ H ₅ O) ⁺], 146 (100) [(M-C ₂ H ₄ -CO ₂) ⁺], 118 (32), 101 (18) [(C ₈ H ₅) ⁺], 89 (60) [(C ₇ H ₅) ⁺], 63 (34), 51 (9) [(C ₄ H ₃) ⁺].
	123d		
6		10.7	220 (5) [(M) ⁺], 173 (25), 147 (100) [(M-C ₃ H ₅ O ₂) ⁺], 118 (28), 106 (27) [(C ₇ H ₆ O) ⁺], 91 (23) [(C ₇ H ₇) ⁺], 78 (20) [(C ₆ H ₆) ⁺], 65 (15) [(C ₅ H ₅) ⁺].
	124d		

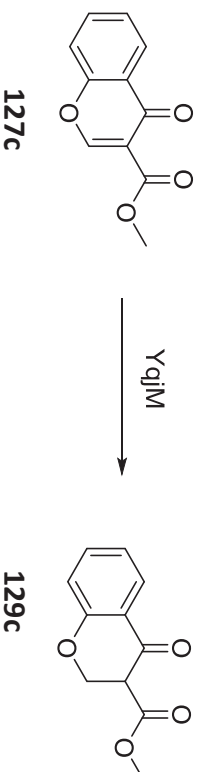
9.3.4.3.3 Bioreduktionen von Chromonen

Die Ergebnisse der Bioreduktionen von Chromonen sind in **Kapitel 7.3, Tabelle 20** dargestellt. In **Tabelle 50** sind die jeweils gefundenen EI-Fragmentierungen und Retentionszeiten von Edukten und Produkten im Überblick dargestellt.

Tabelle 50: EI-MS-Fragmentierungen der detektierten Edukte und Produkte bei Testreaktionen von Chromonen mit Enreduktasen.

#	Substanz	t_R [min]	EI-Fragmentierung m/z
1		11.0	204 (22) [(M) ⁺], 173 (81) [(M-CH ₃ O) ⁺], 146 (100) [(C ₉ H ₆ O ₂) ⁺], 121 (63), 104 (14) [(C ₇ H ₄ O) ⁺], 92 (23) [(C ₆ H ₄ O) ⁺], 89 (31), 63 (35), 53 (39).
2		8.2	148 (54) [(C ₉ H ₈ O ₂) ⁺], 120 (86) [(C ₇ H ₄ O ₂) ⁺], 92 (100) [(C ₆ H ₄ O) ⁺], 64 (29), 63 (30).
3		10.3	174 (1) [(M) ⁺], 146 (100) [(M-CO) ⁺], 120 (39) [(C ₇ H ₄ O ₂) ⁺], 104 (45) [(C ₇ H ₄ O) ⁺], 92 (39) [(C ₆ H ₄ O) ⁺], 89 (28), 63 (32), 53 (24).
4		9.4	160 (95) [(M-H ₂ O) ⁺], 131 (93), 120 (31) [(C ₇ H ₄ O ₂) ⁺], 104 (28) [(C ₇ H ₄ O) ⁺], 92 (100) [(C ₆ H ₄ O) ⁺], 77 (36) [(C ₆ H ₅) ⁺], 64 (40), 63 (53), 51 (21) [(C ₄ H ₃) ⁺].
5		11.2	218 (34) [(M) ⁺], 203 (13) [(M-CH ₃) ⁺], 187 (100) [(M-OCH ₃) ⁺], 160 (55), 121 (38), 92 (19), 67 (29).
6		9.7	220 (25) [(M) ⁺], 205 (100) [(M-CH ₃) ⁺].
	129e		

Bioreduktion von 3-Chromoncarbonsäuremethylester (127c) zu 3-(4-Chromanon)carbonsäure-methylester (129c) im präparativen Maßstab

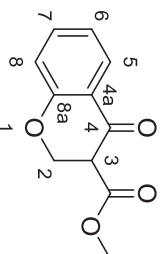


In einem 50 mL-Zweihalskolben unter Argon wurden 20 mL KP₁ (100 mM, pH 6.5) vorgelegt und nacheinander 27 mg des 3-Chromoncarbonsäuremethylesters (**127c**, 1.0 Äq., 0.13 mmol), Cofaktor NADP⁺ (0.1 Äq., 10.1 mg, 0.01 mol), 400 µL Acetonitril (2 %, v/v) und 446 mg Glukose (4.55 mmol, 225 mM) zugegeben. Sodann wurde mittels des Titrators der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls exakt eingestellt. Im Anschluss daran wurde der Titrator neu gestartet und die Enzyme (5 U GDH, 27 U YqjIM WT) wurden zugegeben. Die Umsatzbestimmung erfolgte mittels GC/MS sowie anhand des NaOH Verbrauchs. (Kontrolle erfolgte alle 30 min. Nach 125 min zeigte die Reaktion einen Umsatz von ca. 80 % (GC/MS) und wurde über Nacht bei –20 °C gelagert.

Zur Aufarbeitung wurde die Reaktion am nächsten Morgen auf Raumtemperatur aufgetaut und Ammoniumsulfat zugegeben bis Sättigung erreicht war (ca. 0.8 g/mL). Sodann wurde die Suspension für 2 h gerührt um die Enzyme auszufällen. Dann erfolgte eine Filtration des Gemischs über Celite und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde nach Trocknung über MgSO₄ eingengt und das Produkt wurde als Öl erhalten.

Rohausbeute (**129**): 27 mg (100 %)

Laut ¹H-NMR ist das Produkt als Hauptbestandteil vorhanden. Eduktgehalt ca. 20 % (¹H-NMR).



129

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz):

δ [ppm] = 11.93 (br s, 1H, OH)*, 7.92 (dd, ³J_{5,6} = 8.0 Hz, ⁴J_{5,7} = 1.7 Hz, 1H, 5-H_{ar}), 7.65 (dd, ³J_{5,6} = 7.7 Hz, ⁴J_{5,7} = 1.7 Hz, 1H, 5-H_{ar})*, 7.59 (ddd, ³J_{7,8} = 8.4 Hz, ³J_{7,6} = 7.2 Hz, ⁴J_{7,5} = 1.7 Hz, 1H, 7-H_{ar}), 7.34–7.29 (m, 1H, 7-H_{ar})*, 7.05 (ddd, ³J_{6,5} = 8.0 Hz, ³J_{6,7} = 7.2 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.0 Hz, 1H, 6-H_{ar}), 7.00 (ddd, ³J_{6,5} = 7.7 Hz, ³J_{6,7} = 6.4 Hz, ⁴J_{6,8} = 1.0 Hz, 1H, 6-H_{ar})*, 6.98 (dd, ³J_{8,7} = 8.4 Hz, ⁴J_{8,6} = 1.0 Hz, 1H, 8-H_{ar}), 6.86 (dd, ³J_{8,7} = 8.2 Hz, ⁴J_{8,6} = 1.0 Hz, 1H, 8-H_{ar})*, 4.95 (s, 2H, 2-H)*, 4.80 (dd, ²J_{2a,2b} = 11.6 Hz, ³J_{2a,3} = 8.2 Hz, 1H, 2-H_a), 4.62 (dd, ²J_{2b,2a} = 11.6 Hz, ³J_{2b,3} = 4.5 Hz, 1H, 2-H_b), 3.82 (s, 1H, OCH₃)*, 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (dd, ³J_{3,2a} = 8.2 Hz, ³J_{3,2b} = 4.5 Hz, 1H, 3-H). *Enol-Form des Produkts.

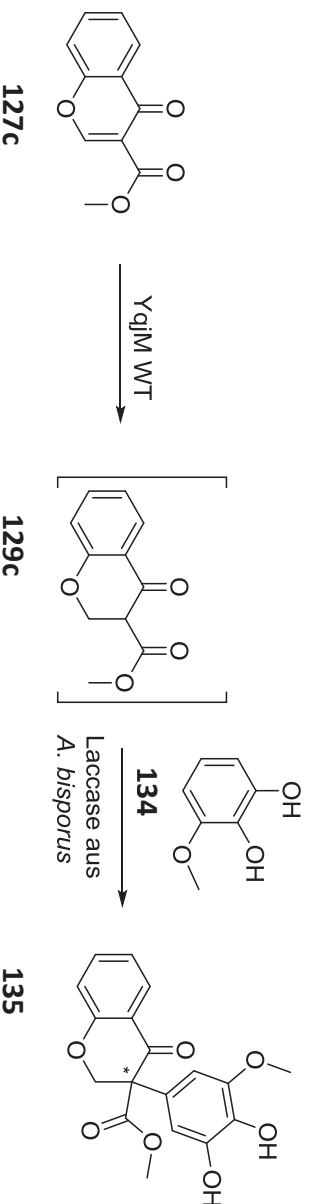
MS (EI, positive Ionen, 70 eV):

m/z (%) = 148 (54) $[(C_9H_8O_2)^+]$, 120 (86) $[(C_7H_4O_2)^+]$, 92 (100) $[(C_6H_4O)^+]$, 64 (29), 63 (30).

t_R (GC/MS): 8.2 min.

Die angegebenen analytischen Daten stimmen mit den publizierten NMR-Daten überein.^[113b]

9.3.4.3.4 Eintopfreaktion von 3-Chromanoncarbonsäuremethylester (127c) im analytischen Maßstab



Zur Durchführung der Eintopfreaktion wurde zunächst entsprechend dem allgemeinen Protokoll für Bioreduktionen im analytischen Maßstab gearbeitet. Es wurden 1.1 mg Substrat **127c** (1 Äq., 5 μmol), K_P des pH-Werts 6.5 (20 mM), 1 U YqjIM und abweichend vom Standardprotokoll 2 % (v/v) Acetonitril als Cosolvens verwendet. Es wurde bei 30 °C und 300 rpm inkubiert und nach 14 h konnten 70 % Umsatz (GC/MS) erreicht werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden 10 μL Laccase (*Agaricus bisporus*, 1 U) 20 μL einer 300 mM Lösung von 3-Methoxycatechol (**134**, 6 mM) in Puffer zugegeben und für weitere 3 h bei 25 °C und 300 rpm inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte durch Extraktion mit 450 μL Ethylacetat oder MTBE. Zur Phasenbildung wurde gegebenenfalls zentrifugiert. Das HPLC-Chromatogramm der Umsetzung ist in **Abbildung 39** gezeigt.

Die Referenzsubstanz wurde von Dr. S. Suljić in einer Kooperation erstellt und die Reaktion wurde mittels der darauf beruhenden HPLC-Methode analysiert.

HPLC

Säule: Chiralpak IC, 250x46 mm, Fa. Daicel

Eluent: Heptan/2- Propanol (50:50)

Flußrate: 0.5 mL/min

Detektion: 215 und 250 nm

Temperatur: 25 °C

Einspritzvolumen : 20 μL

t_R (127c):	49.4 min
t_R (134):	13.8 min
t_R (135):	34.9 und 65.8 min
t_R (129c):	11.3 und 11.8 min

9.4 *In silico*-Docking

Zum Zweck der Illustration wurden in Zusammenarbeit mit T. Classen Docking-Studien durchgeführt und diese können als Erklärungshilfe für die erhaltenen praktischen Versuchsergebnisse dienen. Diese Docking-Ergebnisse sind jedoch nicht zum Beweis bestimmter Bindungsmodi gedacht. Die Wildtyp-Struktur und die Varianten wurden *in silico* mittels der Software *UCSF Chimera 1.8*^[100] generiert, wobei von der YqjM WT-Struktur pdb: 1z42^[56] ausgegangen wurde, die *p*-Hydroxybenzaldehyd (**31**) als Inhibitor enthält. Alle Atome von Nicht-Aminosäuren außer FMN wurden gelöscht, um ein möglichst offenes aktives Zentrum zu erhalten. Mutationen wurden entsprechend der *Dunbrack* Rotamer-Bibliothek^[161] mit Rücksicht auf sterische Überlappungen eingefügt. Wenn sterische Überlappungen auftraten, wurde eine Struktur-Minimierung durchgeführt. Nach Protonierung wurde die Vorbereitung der Strukturen für das Docking in *AutoDock Tools 4.2*^[162] in PMV finalisiert. Docking-Algorithmen wurden nach Ihrer Fähigkeit, den Bindungsmodus des Inhibitors aus der pdb-Struktur 1z42 zu reproduzieren, ausgewählt. Daher wurde der genetische Algorithmus in *AutoDock 4.2*^[163] verwendet. Notwendige Übersichtskarten für den zu durchsuchenden Raum mit FMN und einem Sulfat als Zentrum [(x, y, z) = (17.314, 54.744, 26.091)] und einer Seitenlänge von 22.5 Å (Rasterabstand 0.375 Å) wurden generiert. Die Daten der Karten-Generierung und des Dockings befinden sich weiter unten in diesem Abschnitt.

Die Liganden wurden mittels der Softwarepakete *Chem 3D v12.0 3D* von *CambridgeSoft* und *ADT 4.2* vorbereitet. Aufgrund empirischer Ergebnisse wurde die Bindung zwischen der *exo*-Methylengruppe und der Carbonylgruppe als nicht-rotationsfähig in der *s-trans*-Konformation festgesetzt. Ein Rotationsfreiheitsgrad ergab keine produktiven Bindungsmodi. Das virtuelle Screening wurde mittels der Software *Raccoon*^[164] durchgeführt.

Grid File:

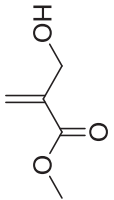
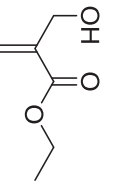
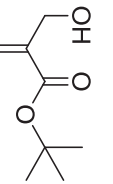
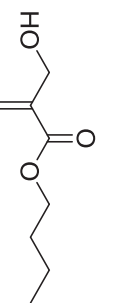
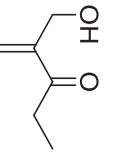
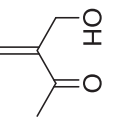
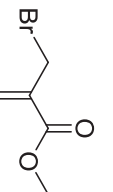
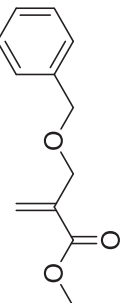
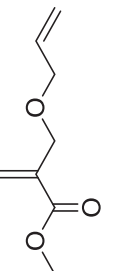
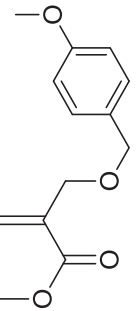
```
npts 60 60 60          # num.grid points in xyz
gridfld YqjM_wt.maps.fld  # grid_data_file
spacing 0.375         # spacing(A)
receptor _types A C H HD N NA OA P S SA # receptor atom types
ligand _types C OA    # ligand atom types
receptor YqjM_wt.pdbqt # macromolecule
gridcenter 17.314 54.744 26.091 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5           # store minimum energy w/in rad(A)
map YqjM_wt.C.map     # atom-specific affinity map
map YqjM_wt.OA.map    # atom-specific affinity map
elecmap YqjM_wt.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap YqjM_wt.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465    # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant
```

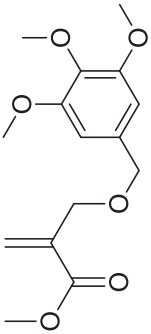
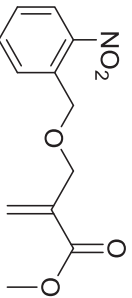
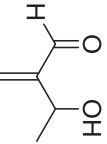
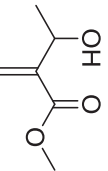
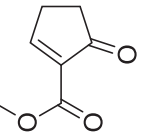
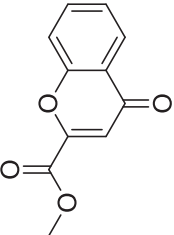
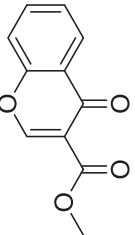
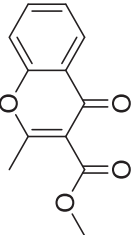
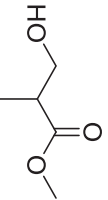
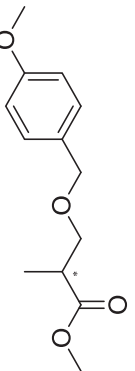
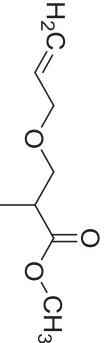
Docking Parameter File:

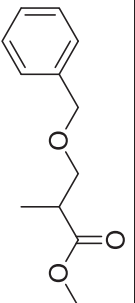
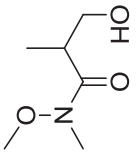
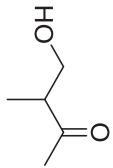
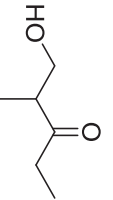
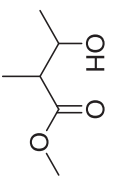
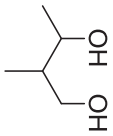
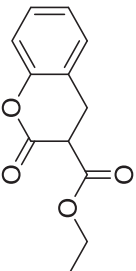
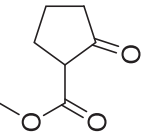
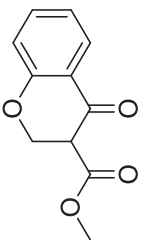
```
autodock_parameter_version 4.2 # used by autodock to validate parameter set
outlev 1                       # diagnostic output level
intelec                        # calculate internal electrostatics
seed pid time                  # seeds for random generator
ligand_types A C OA           # atoms types in ligand
fld YqjM_C26H.maps.fld        # grid_data_file
```


10. Formelregister

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Verbindungen synthetisiert:

#	Strukturformel	Nummer (diese Arbeit)	Versuchsnummer (Laborbuch)*
1	Substrate 	36	ER-4
2		101	ER-42
3		103	ER-46
4		102	ER-45
5		109	ER-88-3/ LDC-5
6		106	ER-67
7		94	ER-19
8		92	ER-21
9		93	ER-20-3
10		111	LO-32

11		113	LO-33
12		112	LO-27
13		118	LF1 rein
14		117	LDC3
15		126	mb759
16		127b	ER-29
17		127c	ER-47 / LDC-16
18		127e	LDC-6
19 Produkte		37	Biokatalyse: ER-113 (R), ER-104 (S)
20		142	Referenz: LO35a/b (R)/(S)
21		96	Referenz: ER-25 Biokatalyse: ER-39-4 (R)

22		95	Referenz: ER-123, ER-26 Biokatalyse: ER-118
23		143	ER-80
24		108	Referenz: ER-81-4 Biokatalyse: KL-7, ER-126
25		110	Referenz: ER-101 Biokatalyse: LDC-20
26		75	Referenz: LF Ersatz HCubeRed Biokatalyse: ER-108
27		66	KL-7a
28		124d	mb739
29		122	ER-37-2
30		129c	ER-106-3

*Abkürzungen verweisen auf folgende Laborbücher: ER, Elisabeth Rühllein; KL, Kiril Lutsenko; LO, Laura Öhler; LF, Lukas Fischer; mb, Max Bieltzka; LDC, Lina Dobnikar.

11. Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Professor Jörg Pietruszka für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu meinem Wunschthema Biokatalyse meine Arbeiten zur Dissertation durchführen zu können und die große thematische Freiheit, die er mir dabei ließ. Professor Thomas J. J. Müller danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Thomas Classen und Saskia Schuback bedanke ich mich für die Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitsmethoden, sowie bei Tom auch für viele interessante Anregungen und die Unterstützung bei den Docking-Experimenten. Außerdem danke ich Sonja Meyer zu Berstenhorst für die Beratung zu molekularbiologischen Problemstellungen.

Melanie Schölzel danke ich für das Bereitstellen der von ihr erstellten YqjM-Bibliothek sowie die Beantwortung von Fragen zu diesem Thema. Dietrich Böse danke ich für die Unterstützung am Beginn meiner chemischen Arbeiten.

Ich danke allen Studenten die sich während der letzten Jahre mit Teilprojekten dieser Arbeit beschäftigt haben. Dies waren (chronologisch geordnet) Laura Öhler, Kiril Lutsenko, Magdalena Sommer, Lukas Fischer, Lina Dobnikar und Marvin Mantel. Die Zusammenarbeit hat mit immer viel Spaß gemacht und ich möchte mich für euer großes Engagement bedanken.

Ich danke den technischen Angestellten unseres Instituts für ihre Unterstützung. Beatrix Paschold danke ich besonders für die Erstellung der Enreduktasen OPR 1 und OPR 3 sowie die Bereitstellung des ein oder anderen aufgereinigten Enzyms, Vera Ophoven für ihre Unterstützung zur Synthese von asymmetrischen Katalysatoren für Morita-Baylis-Hillman-Reaktionen und Holger Gieren für die Zusammenarbeit bei der Hochzelllichtfermentation. Birgit Henßen danke ich für die Durchführung von GC- und HPLC-Messungen und die kompetente Hilfe bei bürokratischen Vorgängen jeder Art.

Sonja danke ich für den ruhigen Platz in Ihrem Büro zum Schreiben und Markus Dick, Claudia Holec, Sanel Suljić und meiner Mutter danke ich für das Korrektur lesen meiner Arbeit.

Und dem gesamten IBOC danke ich für die gute Zusammenarbeit, interessante Vorträge, die Diskussionen in unseren vielen verschiedenen Seminaren und die im Laufe der Jahre immer mehr von gegenseitigem Respekt und Wertschätzung geprägte Atmosphäre.

12. Literaturverzeichnis

- [1] G. P. Moss, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2193-2222; Basic Terminology of Stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996),
- [2] A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, 2 ed., Wiley-VCH, **2006**.
- [3] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268; Industrial Biocatalysis today and tomorrow,
- [4] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 788-824; Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates, (*Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806-843).
- [5] C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis,
- [6] L. M. Schopfer, V. Massey, in *A Study of Enzymes* (Ed.: S. A. Kuby), CRC Press, Cleveland, **1991**, pp. 247-269.
- [7] J. A. Osborn, F. H. Jardine, J. F. Young, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc. A* **1966**, 1711-1732; The preparation and properties of tris(triphenylphosphine)halogenorhodium(I) and some reactions thereof including catalytic homogeneous hydrogenation of olefins and acetylenes and their derivatives,
- [8] D. J. Pollard, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66-73; Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now,
- [9] T. Reiß, W. Hummel, S. P. Hanlon, H. Iding, H. Gröger, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1302-1311; The Organic-Synthetic Potential of Recombinant Ene Reductases: Substrate-Scope Evaluation and Process Optimization,
- [10] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 3070-3095; New Generation of Biocatalysts for Organic Synthesis, (*Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3132-3158).
- [11] Y. A. Pompeu, B. Sullivan, J. D. Stewart, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2376-2390; X-ray Crystallography Reveals How Subtle Changes Control the Orientation of Substrate Binding in an Alkene Reductase,
- [12] K. Kitzing, T. B. Fitzpatrick, C. Wilken, J. Sawa, G. P. Bourenkov, P. Macheroux, T. Clausen, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27904-27913; The 1.3 Å crystal structure of the flavoprotein YqjM reveals a novel class of Old Yellow Enzymes,
- [13] H. S. Toogood, N. S. Scrutton, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 2182-2194; Enzyme engineering toolbox - a 'catalyst' for change,
- [14] M. Bühler, H. Simon, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1982**, *363*, 609-626; On the Kinetics and Mechanism of Enolate Reductase,
- [15] T. Hirata, A. Matsushima, Y. Sato, T. Iwasaki, H. Nomura, T. Watanabe, S. Toyoda, S. Izumi, *J. Mol. Cat. B* **2009**, *59*, 158-162; Stereospecific hydrogenation of the CC double bond of enones by *Escherichia coli* overexpressing an enone reductase of *Nicotiana tabacum*,
- [16] D. J. Mansell, H. S. Toogood, J. Waller, J. M. X. Hughes, C. W. Levy, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 370-379; Biocatalytic Asymmetric Alkene Reduction: Crystal Structure and Characterization of a Double Bond Reductase from *Nicotiana tabacum*,
- [17] K. L. Ringer, M. E. McConkey, E. M. Davis, G. W. Rushing, R. Croteau, *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *418*, 80-92; Monoterpene double-bond reductases of the (-)-menthol

- biosynthetic pathway: isolation and characterization of cDNAs encoding (-)-isopiperitenone reductase and (+)-pulegone reductase of peppermint, O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, 20, 688-688; Ein zweites sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum,
- [18] O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, 20, 688-688; Ein zweites sauerstoffübertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum,
- [19] H. Theorell, *Biochem. Z.* **1935**, 278, 263-290; Das gelbe Oxydationsferment,
- [20] H. S. Toogood, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemCatChem* **2010**, 2, 892-914; Biocatalytic Reductions and Chemical Versatility of the Old Yellow Enzyme Family of Flavoprotein Oxidoreductases,
- [21] a) R. M. Kohli, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32763-32770; The Oxidative Half-reaction of Old Yellow Enzyme: the Role of Tyrosine 196, b) P. A. Karplus, K. M. Fox, V. Massey, *FASEB J.* **1995**, 9, 1518-1526; Flavoprotein structure and mechanism. 8. Structure-function relations for old yellow enzyme, c) K. R. Frederick, J. Tung, R. S. Emerick, F. R. Masiarz, S. H. Chamberlain, A. Vasavada, S. Rosenberg, S. Chakraborty, L. M. Schopfer, L. M. Schopfer, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 3793-3802; Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme,
- [22] a) R. Stuermer, B. Hauer, M. Hall, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 203-213; Asymmetric bio-reduction of activated C=C bonds using enoate reductases from the old yellow enzyme family, b) P. R. Binks, C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, *Appl. Environm. Microbiol.* **1996**, 62, 1214-1219; Degradation of pentaerythritol tetrannitrate by *Enterobacter cloacae* PB2, c) C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, *Appl. Environm. Microbiol.* **1998**, 64, 2864-2868; Aerobic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase,
- [23] H. Khan, R. J. Harris, T. Barna, D. H. Craig, N. C. Bruce, A. W. Munro, P. C. E. Moody, N. S. Scrutton, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21906-21912; Kinetic and Structural Basis of Reactivity of Pentaerythritol Tetranitrate Reductase with NADPH, 2-Cyclohexenone, Nitroesters, and Nitroaromatic Explosives,
- [24] a) K. Durchschein, B. Ferreira-da Silva, S. Wallner, P. Macheroux, W. Kroutil, S. M. Glueck, K. Faber, *Green Chem.* **2010**, 12, 616-619; The flavoprotein-catalyzed reduction of aliphatic nitro-compounds represents a biocatalytic equivalent to the Nef-reaction, b) A. Müller, R. Stürmer, B. Hauer, B. Rosche, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 3316-3318; Stereospecific Alkyne Reduction: Novel Activity of Old Yellow Enzymes, (*Angew. Chem.* **2007**, 119, 3380-3382).
- [25] a) T. B. Fitzpatrick, N. Amrhein, P. Macheroux, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 19891-19897; Characterization of YqjM, an Old Yellow Enzyme Homolog from *Bacillus subtilis* Involved in the Oxidative Stress Response, b) S. Ehira, H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa, *Microbiology* **2010**, 156, 1335-1341; A novel redox-sensing transcriptional regulator CyER controls expression of an Old Yellow Enzyme family protein in *Corynebacterium glutamicum*, c) A. Brige, D. van den Hemel, W. Carpenter, L. de Smet, J. J. van Beeumeen, *Biochem. J.* **2006**, 394, 335-344; Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from *Shewanella oneidensis* indicate differences in physiological function,
- [26] a) F. Schaller, C. Biesgen, C. Müssig, T. Altmann, E. W. Weiler, *Planta* **2000**, 210, 979-984; 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis., b) B. K. Kubata, Z. Kabututu, T. Nozaki, C. J. Munday, S. Fukuzumi, K. Ohkubo, M. Lazarus, T. Maruyama, S. K. Martin, M. Duzsenko, Y. Urade,

- J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 1241-1251; A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi,
- [27] J. Z. Cheng, C. M. Coyle, D. G. Panaccione, S. E. O'Connor, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1776-1777; A Role for Old Yellow Enzyme in Ergot Alkaloid Biosynthesis,
- [28] M. Schittmayer, A. Glieder, M. K. Uhl, A. Winkler, S. Zach, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Gruber, S. Kambourakis, J. D. Rozzell, M. Winkler, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 268-274; Old Yellow Enzyme-Catalyzed Dehydrogenation of Saturated Ketones,
- [29] Abramowitz, Massey, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 5327-5336; Interaction of phenols with old yellow enzyme. Physical evidence for charge-transfer complexes.,
- [30] B. J. Brown, Z. Deng, P. A. Karplus, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32753-32762; On the Active Site of Old Yellow Enzyme: Role of Histidine 191 and Asparagine 194,
- [31] C. K. Winkler, G. Tasnádi, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 381-389; Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds,
- [32] K. M. Fox, P. A. Karplus, *Structure* **1994**, *2*, 1089-1105; Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins,
- [33] E. Haas, *Biochem. Z.* **1938**, *298*, 378-390; Isolierung eines neuen gelben Ferments,
- [34] J. Buckman, S. M. Miller, *Biochem. Cell Biol.* **1998**, *14326-14336*; Binding and reactivity of *Candida albicans* estrogen binding protein with steroid and other substrates.,
- [35] J. F. Chaparro-Riggers, T. A. Rogers, E. Vazquez-Figueroa, K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1521-1531; Comparison of Three Enoate Reductases and their Potential Use for Biotransformations,
- [36] Y. A. Pompeu, B. Sullivan, A. Z. Walton, J. D. Stewart, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1949-1960; Structural and Catalytic Characterization of *Pichia stipitis* OYE 2.6, a Useful Biocatalyst for Asymmetric Alkene Reductions,
- [37] C. E. French, S. Nicklin, N. C. Bruce, *J. Bacteriol.* **1996**, *6623-6627*; Sequence and properties of pentaerythritoltrinitrate reductase from *Enterobacter cloacae* PB2,
- [38] A. Müller, B. Hauer, B. Rosche, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *98*, 22-29; Asymmetric alkene reduction by yeast old yellow enzymes and by a novel *Zymomonas mobilis* reductase,
- [39] B. V. Adalbjornsson, H. S. Toogood, A. Fryszakowska, C. R. Pudney, T. A. Jowitz, D. Leys, N. S. Scrutton, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 197-207; Biocatalysis with Thermotable Enzymes: Structure and Properties of a Thermophilic 'ene'-Reductase related to Old Yellow Enzyme,
- [40] C. E. French, N. C. Bruce, *Biochem. J.* **1994**, *301* (Pt. 1), 97-103; Purification and characterization of morphinone reductase from *Pseudomonas putida* M10,
- [41] D. S. Blehert, B. G. Fox, G. H. Chambliss, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6254-6263; Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases,
- [42] J. Strassner, A. Furchholz, P. Macheroux, N. Amrhein, A. Schaller, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35067-35073; A homolog of old yellow enzyme in tomato – spectral properties and substrate specificity of the recombinant protein.,
- [43] C. Biesgen, E. W. Weiler, *Planta* **1999**, *208*, 155-165; Structure and regulation of OPR1 and OPR2, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*,

- [44] D. Reardon, G. K. Farber, *FASEB J.* **1995**, *9*, 497-503; The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins,
- [45] R. Lonsdale, M. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14733-14742; Reduction of α,β -Unsaturated Ketones by Old Yellow Enzymes: Mechanistic Insights from Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Calculations,
- [46] B. J. Brown, J. W. Hyun, S. Duwuri, P. A. Karplus, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2138-2145; The role of glutamine 114 in old yellow enzyme,
- [47] a) S. Hay, C. R. Pudney, N. S. Scrutton, *FEBS Journal* **2009**, *276*, 3930-3941; Structural and mechanistic aspects of flavoproteins: probes of hydrogen tunnelling, b) J. Basran, R. J. Harris, M. J. Sutcliffe, N. S. Scrutton, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 43973-43982; H-tunneling in the Multiple H-transfers of the Catalytic Cycle of Morphine Reductase and in the Reductive Half-reaction of the Homologous Pentaerythritol Tetranitrate Reductase,
- [48] a) A. Weckbecker, Gröger, W. Hummel, *Biosystems Engineering I: Creating Superior Biocatalysts*, Vol. 120, Springer-Verlag, Berlin, **2010**(b) R. Wichmann, D. Vasic-Racki, in *Technology Transfer in Biotechnology*, Vol. 92 (Ed.: U. Kragl), Springer Berlin Heidelberg, **2005**, pp. 225-260.
- [49] a) C. E. Paul, S. Gargiulo, D. J. Opperman, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, A. Taglieber, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 180-183; Mimicking Nature: Synthetic Nicotinamide Cofactors for C=C Bio-reduction Using Enoate Reductases, b) C. K. Winkler, D. Clay, E. van Heerden, K. Faber, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 3085-3092; Overcoming co-product inhibition in the nicotinamide independent asymmetric bio-reduction of activated C=C-bonds using flavin-dependent ene-reductases, c) T. Knaus, C. E. Paul, C. W. Levy, S. de Vries, F. G. Mutti, F. Hollmann, N. S. Scrutton, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1033-1039; Better than Nature: Nicotinamide Biomimetics That Outperform Natural Coenzymes,
- [50] a) F. Hollmann, A. Schmid, E. Steckhan, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 169-171; The First Synthetic Application of a Monoxygenase Employing Indirect Electrochemical NADH Regeneration, (*Angew. Chem.* **2001**, *113*, 190-193)b) K. Fisher, S. Mohr, D. Mansell, N. J. Goddard, P. R. Fielden, N. S. Scrutton, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 1505-1511; Electro-enzymatic viologen-mediated substrate reduction using pentaerythritol tetranitrate reductase and a parallel, segmented fluid flow system,
- [51] A. Taglieber, F. Schulz, F. Hollmann, M. Rusek, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 565-572; Light-driven biocatalytic oxidation and reduction reactions: scope and limitations,
- [52] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Gollightly, G. Grandi, G. Guiseppe, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Kläerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro,

- T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelleet *al.*, *Nature* **1997**, *390*, 249-256; The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*,
- [53] T. Classen, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2013**; Über Enzyme als facettenreiche Katalysatoren in der Organischen Chemie.
- [54] a) M. Hall, C. Stueckler, H. Ehammer, E. Pointner, G. Oberdorfer, K. Gruber, B. Hauer, R. Stuermer, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 411-418; Asymmetric Bioreduction of C=C Bonds using Enoate Reductases OPR1, OPR3 and YqjM: Enzyme-Based Stereocontrol, b) C. Stueckler, M. Hall, H. Ehammer, E. Pointner, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5409-5411; Stereocomplementary Bioreduction of α,β -Unsaturated Dicarboxylic Acids and Dimethyl Esters using Enoate Reductases: Enzyme- and Substrate-Based Stereocontrol,
- [55] T. B. Fitzpatrick, S. Auweter, K. Kitzing, T. Clausen, N. Amrhein, P. Macheroux, *Protein Expr Purif* **2004**, *36*, 280-291; Structural and functional impairment of an Old Yellow Enzyme homologue upon affinity tag incorporation,
- [56] K. Kitzing, T. B. Fitzpatrick, C. Wilken, J. Sawa, G. P. Bourenkov, P. Macheroux, T. Clausen, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27904-27913; The 1.3 Å Crystal Structure of the Flavoprotein YqjM Reveals a Novel Class of Old Yellow Enzymes,
- [57] D. Xu, R. M. Kohli, V. Massey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3556–3561; The role of threonine 37 in flavin reactivity of the old yellow enzyme,
- [58] a) G. Oberdorfer, K. Gruber, K. Faber, M. Hall, *Synlett* **2012**, 1857-1864; Stereocontrol Strategies in the Asymmetric Bioreduction of Alkenes, b) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 194-200; Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst,
- [59] M. Hall, C. Stueckler, W. Kroutil, P. Macheroux, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 3934-3937; Asymmetric bioreduction of activated alkenes using cloned 12-oxophytodienoate reductase isoenzymes OPR-1 and OPR-3 from *Lycopersicon esculentum* (tomato): a striking change of stereoselectivity, (*Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4008-4011).
- [60] C. Stueckler, C. K. Winkler, M. Bonnekessel, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 2663-2666; Asymmetric Synthesis of (R)-3-Hydroxy-2-methylpropanoate ('Roche Ester') and Derivatives via Biocatalytic C-C-Bond Reduction,
- [61] S. K. Padhi, D. J. Bougioukou, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3271-3280; Site-Saturation Mutagenesis of Tryptophan 116 of *Saccharomyces pastorianus* Old Yellow Enzyme Uncovers Stereocomplementary Variants,
- [62] A. Z. Walton, W. C. Conerly, Y. Pompeu, B. Sullivan, J. D. Stewart, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 989-993; Biocatalytic Reductions of Baylis–Hillman Adducts,
- [63] D. J. Bougioukou, S. Kille, A. Taglieber, M. T. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3287-3305; Directed Evolution of an Enantioselective Enoate-Reductase: Testing the Utility of Iterative Saturation Mutagenesis,
- [64] G. Oberdorfer, G. Steinkellner, C. Stueckler, K. Faber, K. Gruber, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1562-1566; Stereopreferences of Old Yellow Enzymes: Structure Correlations and Sequence Patterns in Enoate Reductases,
- [65] T. Classen, J. Pietruszka, S. M. Schuback, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 711-713; Revisiting the Enantioselective Sequence Patterns in Enoate Reductases,
- [66] T. Classen, M. Korpak, M. Schölzel, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2014**, *1321-1331*; Stereoselective Enzyme Cascades: An Efficient Synthesis of Chiral γ -Butyrolactones,

- [67] G. Tasnadi, C. K. Winkler, D. Clay, N. Sultana, W. M. Fabian, M. Hall, K. Ditrich, K. Faber, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 10362-10367; A substrate-driven approach to determine reactivities of alpha,beta-unsaturated carboxylic esters towards asymmetric bioreduction,
- [68] C. K. Winkler, C. Stueckler, N. J. Mueller, D. Pressnitz, K. Faber, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6354-6358; Asymmetric Synthesis of O-Protected Acyloins Using Enoate Reductases: Stereochemical Control through Protecting Group Modification,
- [69] M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 138-174; Laboratory Evolution of Stereoselective Enzymes: A Prolific Source of Catalysts for Asymmetric Reactions, (*Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144-182).
- [70] M. Schölzel, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2012**; Enreduktasen in der organischen Synthese.
- [71] L. Banfi, G. Guanti, *Synthesis* **1993**, 1029-1056; Asymmetrized 2-Methyl-1,3-propanediol and Its Equivalents: Preparation and Synthetic Applications,
- [72] a) S. V. Ley, M. N. Tackett, M. L. Maddess, J. C. Anderson, P. E. Brennan, M. W. Cappi, J. P. Heer, C. Helgen, M. Kori, C. Kouklovsky, S. P. Marsden, J. Norman, D. P. Osborn, M. Á. Palomero, J. B. J. Pavey, C. Pinel, L. A. Robinson, J. Schnaubelt, J. S. Scott, C. D. Spilling, H. Watanabe, K. E. Wesson, M. C. Willis, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 2874-2914; Total Synthesis of Rapamycin, b) N. Cohen, W. F. Eichel, R. J. Lopresti, C. Neukom, G. Saucy, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3505-3511; Synthetic Studies on (2R,4'R,8'R)-a-Tocopherol. An Approach Utilizing Side Chain Synthons of Microbiological Origin, c) E. de Lemos, F.-H. Porée, A. Bourin, J. Barbion, E. Agouridas, M.-I. Lannou, A. Commerçon, J.-F. Betzer, A. Pancrazi, J. Ardisson, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 11092-11112; Total Synthesis of Discodermolide: Optimization of the Effective Synthetic Route,
- [73] K. Mori, S. Senda, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 541-546; Synthesis of the enantiomers of cis-2-methyl-5-hexanolide, the major component of the sex pheromone of the carpenter bee,
- [74] C. T. Goodhue, J. R. Schaeffer, *Biotechnol. Bioeng.* **1971**, *13*, 203-214; Preparation of L(+) β -hydroxyisobutyric acid by bacterial oxidation of isobutyric acid,
- [75] W. Choy, P. Ma, S. Masamune, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3555-3556; Enantioselective synthesis of β -hydroxyisobutyric acid: a useful synthon in the synthesis of polypropionate-type natural products,
- [76] C. Pautigny, S. Jeulin, T. Ayad, Z. Zhang, J.-P. Genêt, V. Ratovelomanana-Vidal, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2525-2532; Convenient General Asymmetric Synthesis of Roche Ester Derivatives through Catalytic Asymmetric Hydrogenation: Steric and Electronic Effects of Ligands,
- [77] J. Wassenaar, M. Kuil, J. N. H. Reek, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1610-1614; Asymmetric Synthesis of the Roche Ester and its Derivatives by Rhodium-INDOLPHOS-Catalyzed Hydrogenation,
- [78] a) J. D. White, P. Theramongkol, C. Kuroda, J. R. Engebrecht, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5909-5921; Enantioselective total synthesis of (-)-monic acid C via carbosulfenylation of a dihydroopyran, b) K. A. Scheidt, T. D. Bannister, A. Tasaka, M. D. Wendt, B. M. Savall, G. J. Fegley, W. R. Roush, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6981-6990; Total Synthesis of (-)-Bafilomycin A1, c) A. M. Szpilman, D. M. Cereghetti, J. M. Manthorpe, N. R. Wurtz, E. M. Carreira, *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 7117-7128; Synthesis and Biophysical Studies on 35-Deoxy Amphotericin B Methyl Ester, d) X. Ze-qi, H. Yuan, J.

- Crabb, R. Samy, L. Ailing, H. Cao, **2000**, Methods for preparing antiviral calanolide compounds WO/2000/064903, I. Sarawak Medichem Pharmaceuticals.
- [79] S. Dandapani, M. Jeske, D. P. Curran, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9447-9462; Synthesis of All 16 Stereoisomers of Pinesaw Fly Sex Pheromones – Tools and Tactics for Solving Problems in Fluorous Mixture Synthesis,
- [80] WHO **2015**, *WHO Model List of Essential Medicines, 19th list*, [http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/\(27.07.2016\)](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/(27.07.2016)).
- [81] J. M. Hughes, G., *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 330-335; On the Mode of Action of Pseudomonic Acid: Inhibition of Protein Synthesis in *Staphylococcus Aureus*,
- [82] D. A. Evans, J. Bartroli, T. L. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2127-2129; Enantioselective aldol condensations. 2. Erythro-selective chiral aldol condensations via boron enolates,
- [83] a) P. G. Cozzi, E. Solari, C. Floriani, A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli, *Chem. Ber.* **1996**, 1361-1368; Interaction Modes of Titanium Tetrachloride with the Carbonyl Functionality, b) H. Helmboldt, D. Köhler, M. Hiersemann, *Org. Lett.* **2006**, 1573-1576; Synthesis of the Norjatropane Diterpene (-)-15-Acetyl-3-propionyl- 17-norcharaciol, c) N. S. Trotter, S. Takahashi, T. Nakata, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 957-959; Simple and Efficient Synthesis of (+)-Methyl 7-Benzoylpederate, a Key Intermediate toward the Mycalamides,
- [84] M. Ogan, Bachelor-Arbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2014**; Auf dem Weg zur Pederensäure – ein chemoenzymatischer Ansatz.
- [85] a) D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber, M. F. Züger, in *Org. Synth.*, John Wiley & Sons, Inc., **2003b**) C. Medson, A. J. Smallridge, M. A. Trehwella, *Tetrahedron: Asym.* **1997**, *8*, 1049-1054; The stereoselective preparation of β -hydroxy esters using a yeast reduction in an organic solvent, c) B. Wipf, E. Kupfer, R. Bertazzi, H. G. W. Leuenberger, *Hel. Chim. Acta* **1983**, *66*, 485-488; Production of (+)-(S)-Ethyl 3-Hydroxybutyrate and (-)-(R)-Ethyl 3-Hydroxybutyrate by Microbial Reduction of Ethyl Acetoacetate,
- [86] E. A. Dawes, P. J. Senior, in *Adv. Microb. Physiol.*, Vol. 10 (Eds.: A. H. Rose, D. W. Tempest), Academic Press, **1973**, pp. 135-266.
- [87] G. Fräter, U. Müller, W. Günther, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1269-1277; The stereoselective α -alkylation of chiral β -hydroxy esters and some applications thereof, S. Chandrasekhar, C. Rambabu, S. J. Prakash, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1213-1215;
- [88] Total synthesis of 6-epiprelactone-V via a syn-selective oxygen tethered intramolecular Michael reaction,
- [89] EMOLECULES **2015**, *Hydroxybernsteinsäure* https://reaxys.emolecules.com/cgi-bin/rene/show_hitlist.cgi?h=279960860 (27.05.2015).
- [90] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187-1209; Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry,
- [91] a) L. Freier, J. Hemmerich, K. Schöler, W. Wiechert, M. Oldiges, E. von Lieres, *Eng. Life Sci.* **2016**, *16*, 1618-2863; Framework for Kriging-based iterative experimental analysis and design: Optimization of secretory protein production in *Corynebacterium glutamicum*, b) L. Freier, E. von Lieres **2016**, *KriKit - DoE and Analysis Toolkit*, www.github.com/modsim/KriKit (13.07.2016).
- [92] D. R. De Cock, Dissertation, Iowa State University **2003**; Kriging as an alternative to polynomial regression in response surface analysis.
- [93] D. L. Zimmerman, *Environmetrics* **2006**, *17*, 635-652; Optimal network design for spatial prediction, covariance parameter estimation and empirical prediction.,

- [94] P. Mariappan, *Biostatistics: An Introduction*, Pearson Education, India, **2013**.
- [95] E. Rütthlein, T. Classen, L. Dobnikar, M. Schölzel, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1775-1786; Finding the Selectivity Switch - A Rational Approach towards Stereocomplementary Variants of the Ene Reductase YqjIM,
- [96] T. Fischer, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2012**; Chemoenzymatische Synthese von Vinylactonen – Enantiomerenreine Bausteine in der Natur- und Wirkstoffsynthese.
- [97] G. Florence, G. Koch, O. Loiseleur, S. J. Mickel, I. Paterson (Novartis AG), **2004**, Synthese du discodermolide, WO 2004009574 A1, N. AG.
- [98] A. Patterson-Orazem, B. Sullivan, J. D. Stewart, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5628-5632; Pichia stipitis OYE 2.6 variants with improved catalytic efficiencies from site-saturation mutagenesis libraries,
- [99] H. S. Toogood, A. Fryszkowska, M. Hulley, M. Sakuma, D. Mansell, G. M. Stephens, J. M. Gardiner, N. S. Scrutton, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 738-749; A Site-Saturated Mutagenesis Study of Pentaerythritol Tetranitrate Reductase Reveals that Residues 181 and 184 Influence Ligand Binding, Stereochemistry and Reactivity,
- [100] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605-1612; UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis,
- [101] J. E. J. Mills, P. M. Dean, *J. Computer-Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 607-622; Three-dimensional hydrogen-bond geometry and probability information from a crystal survey,
- [102] L. Öhler, Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2013**; Versuche zur chemoenzymatischen Synthese von Roche-Estern.
- [103] M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 2658-2666; The Importance of Additive and Non-Additive Mutational Effects in Protein Engineering, (*Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2720-2729).
- [104] S. Hoebenreich, F. E. Zilly, C. G. Acevedo-Rocha, M. Zilly, M. T. Reetz, *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 317-331; Speeding up Directed Evolution: Combining the Advantages of Solid-Phase Combinatorial Gene Synthesis with Statistically Guided Reduction of Screening Effort,
- [105] L. F. Tietze, U. Beifuss, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 131-163; Sequential Transformations in Organic Chemistry: A Synthetic Strategy with a Future, (*Angew. Chem.* **1993**, *105*, 137-170).
- [106] R. B. Herbert, *Nat. Prod. Rep.* **1991**, *8*, 185-209; The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites,
- [107] a) N. Oberleitner, C. Peters, J. Muschiol, M. Kadow, S. Saß, T. Bayer, P. Schaaf, N. Iqbal, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3524-3528; An Enzymatic Toolbox for Cascade Reactions: A Showcase for an In Vivo Redox Sequence in Asymmetric Synthesis, b) E. Brenna, F. G. Gatti, L. Malpezzi, D. Monti, F. Parmeggiani, A. Sacchetti, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 4811-4822; Synthesis of Robalozotan, Ebalzotan, and Rotigotine Precursors via the Stereoselective Multienzymatic Cascade Reduction of α,β -Unsaturated Aldehydes, c) C. Peters, R. Kölzsch, M. Kadow, L. Skalden, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1021-1027; Identification, Characterization, and Application of Three Enoate Reductases from *Pseudomonas putida* in In Vitro Enzyme Cascade Reactions, d) E. Brenna, F. G. Gatti, D. Monti, F. Parmeggiani, A. Sacchetti,

- ChemCatChem* **2012**, 4, 653-659; Cascade Coupling of Ene Reductases with Alcohol Dehydrogenases: Enantioselective Reduction of Prochiral Unsaturated Aldehydes,
- [108] L. Fischer, Bachelorarbeit, Universität Düsseldorf **2014**; Entwicklung einer chemoenzymatischen Kaskadenreaktion – auf dem Weg zum chiralen Synthesebaustein 2-Methylbutan-1,3-diol.
- [109] a) K.-S. Yang, W.-D. Lee, J.-F. Pan, K. Chen, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 915-919; Chiral Lewis Acid-Catalyzed Asymmetric Baylis–Hillman Reactions, b) Y. Wei, M. Shi, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 6659-6690; Recent advances in organocatalytic asymmetric Morita-Baylis-Hillman/aza-Morita-Baylis-Hillman reactions,
- [110] K.-S. Yang, K. Chen, *Org. Lett.* **2000**, 2, 729-731; Diastereoselective Baylis–Hillman Reactions: The Design and Synthesis of a Novel Camphor-Based Chiral Auxiliary,
- [111] C. De Fusco, T. Fuoco, G. Croce, A. Lattanzi, *Org. Lett.* **2012**, 14, 4078-4081; Noncovalent Organocatalytic Synthesis of Enantioenriched Terminal Aziridines with a Quaternary Stereogenic Center,
- [112] M. Mantel, Master-Arbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Jülich), **2015**; Auf dem Weg zur chemoenzymatischen Synthese des Polyketidrückgrats der Chondramide sowie deren Stereoisomeren.
- [113] a) S. Suljić, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 1007-1020; Synthesis of 3-Arylated 3,4-Dihydrocoumarins: Combining Continuous Flow Hydrogenation with Laccase-Catalysed Oxidation, b) S. Suljić, F. B. Mortzfeld, M. Gunne, V. B. Urlacher, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2015**, 7, 1380-1385; Enhanced Biocatalytic Performance of Bacterial Laccase from *Streptomyces sviveus*: Application in the Michael Addition Sequence Towards 3-Arylated 4-Oxochromanes,
- [114] T. B. Adams, D. B. Greer, J. Doull, I. C. Munro, P. Newberne, P. S. Portoghese, R. L. Smith, B. M. Wagner, C. S. Weil, L. A. Woods, R. A. Ford, *Food Chem. Toxicol.* **1998**, 36, 249-278; The FEMA GRAS Assessment of Lactones Used as Flavour Ingredients,
- [115] a) M. Toshikawa, E. Uchida, N. Chatani, H. Kobayashi, Y. Naitoh, Y. Okuno, H. Matsuda, J. Yamahara, N. Murakami, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 3352-3354; Thunberginols C, D, and E, new antiallergic and antimicrobial dihydroisocoumarines, b) J. Posakony, M. Hirao, S. Stevens, J. A. Simon, A. Bedalov, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2635-2644; Inhibitors of Sir2: Evaluation of Splitomicin Analogues, c) M. Ding, F. Zhou, Y.-L. Liu, C.-H. Wang, X.-L. Zhao, J. Zhou, *Chemical Science* **2011**, 2, 2035-2039; Cinchona alkaloid-based phosphoramidate catalyzed highly enantioselective Michael addition of unprotected 3-substituted oxindoles to nitroolefins, d) A.-M. Katsori, D. Hadjipavlou-Litina, *Exp. Op. Therap. Patents* **2014**, 24, 1323-1347; Coumarin derivatives: an updated patent review (2012 – 2014),
- [116] J. R. Hwu, Y. S. Wein, Y.-J. Leu, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1493-1499; Calcium Metal in Liquid Ammonia for Selective Reduction of Organic Compounds,
- [117] A. D. Widdig, H. J. D. Kabbe, M. D. Scheer, R. D. Sitt, **1979**, Chromanon derivatives, process for their preparation, and their use as medicines and growth-promoting agents, EP0004624 A3, Bayer.
- [118] P. Kamotra, A. K. Gupta, R. Gupta, *Indian J. Chem., Sect B* **2007**, 46, 866-868; Microwave-assisted synthesis of substituted-4-oxo-4H-1-benzopyran-3-carboxaldehydes using Vilsmeyer reagent over silica gel,
- [119] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185-194; Engineering the third wave of biocatalysis,
- [120] M. A. Swiderska, J. D. Stewart, *J. Mol. Cat. B* **2006**, 42, 52-54; Stereoselective enone reductions by *Saccharomyces carlsbergensis* old yellow enzyme,

- [121] R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2008-2022; Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture), (*Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2108-2123).
- [122] E. Brenna, G. Fronza, C. Fuganti, D. Monti, F. Parmeggiani, *J. Mol. Cat. B* **2011**, *73*, 17-21; Enantioselective CC bond reduction of unsaturated α -chloro esters by old yellow enzymes,
- [123] S. Suljić, J. Pietruszka, D. Worgull, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1822-1830; Asymmetric Bio- and Organocatalytic Cascade Reaction – Laccase and Secondary Amine-Catalyzed α -Arylation of Aldehydes,
- [124] W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W43-W46; OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator,
- [125] K. Saito, D. J. Thiele, M. Davio, O. Lockridge, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20720–20724; The cloning and expression of a gene encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*,
- [126] J. Strassner, A. Fürholz, F. Schaller, P. Macheroux, E. W. Weiler, N. Amrhein, A. Schaller, in *Flavins and Flavoproteins* (Eds.: S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux, H. Sund), Agency for Scientific Publ., Berlin, **1999**, pp. 655-658.
- [127] C. Breithaupt, R. Kurzbauer, H. Lilie, A. Schaller, J. Strassner, R. Huber, P. Macheroux, T. Clausen, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 14337-14342; Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: Self-inhibition by dimerization,
- [128] G. Kolter, Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2010**; Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone.
- [129] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. ed., Oxford, Great Britain, **1994**.
- [130] J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Advanced Practical Organic Chemistry*, 2. ed., Taylor & Francis Group, Boca Raton, **1998**.
- [131] K. C. Nicolaou, M. H. D. Postema, N. D. Miller, G. Yang, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2821-2823; A Novel Approach to the CP-225,917 and CP-263,114 Core, (*Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2922-2925).
- [132] F. Coelho, W. P. Almeida, D. Veronese, C. R. Mateus, E. C. Silva Lopes, R. C. Rossi, G. P. C. Silveira, C. H. Pavam, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7437-7447; Ultrasound in Baylis–Hillman reactions with aliphatic and aromatic aldehydes: scope and limitations,
- [133] D. Basavaiah, M. Krishnamacharyulu, A. J. Rao, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2061-2069; The Aqueous Trimethylamine Mediated Baylis-Hillman Reaction,
- [134] Y. Zhang, Z. Shen, D. Yang, C. Feng, J. Hu, G. Lu, X. Huang, *Macromolecules* **2010**, *43*, 117-125; Convenient Synthesis of PtBA-g-PMA Well-Defined Graft Copolymer with Tunable Grafting Density,
- [135] A. Bergmann, O. Reiser, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 7613-7615; Enantioselective Synthesis of Xanthatin,
- [136] J. B. Kraiem, H. Amri, *Synth. Commun.* **2012**, *43*, 110-117; Concise Synthesis of α -(Hydroxymethyl) Alkyl and Aryl Vinyl Ketones,
- [137] B. C. Gerwick III, P. R. Graupner, S. C. Fields, P. R. Schmitzer, W. K. Brewster, **2006**, Methylidene mevalonates and their use as herbicides, *US7393812 (B2)*, D. A. LLC.
- [138] J. Villieras, M. Rambaud, *Synthesis* **1982**, 924-926; Wittig-Horner Reaction in Heterogeneous Media; 1. An Easy Synthesis of Ethyl α -Hydroxymethylacrylate and Ethyl α -Halomethylacrylates using Formaldehyde in Water,

- [139] S. Brass, N.-S. Chan, C. Gerlach, T. Luksch, J. Böttcher, W. E. Diederich, *J. Organom. Chem.* **2006**, 691, 5406-5422; Synthesis of 2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepines as privileged ligand scaffolds for the design of aspartic protease inhibitors via a ring-closing metathesis approach,
- [140] T. Hosokawa, T. Sugafuji, T. Yamanaka, S.-I. Murahashi, *J. Organom. Chem.* **1994**, 470, 253-255; Elimination of β -palladium hydroxide in the PdII-catalyzed reaction of methyl (α -hydroxymethyl)acrylate with alcohols,
- [141] E. Sagot, D. S. Pickering, X. Pu, M. Umberti, T. B. Stensbøl, B. Nielsen, M. Chapelet, J. Bolte, T. Gefflaut, L. Bunch, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4093-4103; Chemo-Enzymatic Synthesis of a Series of 2,4-Syn-Functionalized (S)-Glutamate Analogues: New Insight into the Structure–Activity Relation of Ionotropic Glutamate Receptor Subtypes 5, 6, and 7,
- [142] R. D. Thompson, W. L. Jarrett, L. J. Mathias, *Macromolecules* **1992**, 25, 6455-6459; Unusually facile cyclopolymerization of a new allyl ether substituted acrylate and confirmation of repeat unit structure by inadequate NMR,
- [143] H.-S. Byun, K. C. Reddy, R. Bittman, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 1371-1374; Improved syntheses of ethyl α -(bromomethyl)acrylate and 2-methylene-1,3-propanediol via ethyl α -(hydroxymethyl)acrylate,
- [144] C. Thongsornkleeb, R. L. Danheiser, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2364-2367; A Practical Method for the Synthesis of 2-Alkynylpropenals,
- [145] J. Mulzer, M. Berger, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 891-898; Total Synthesis of the Boron-Containing Ion Carrier Antibiotic Macrolide Tartrolon B,
- [146] J. Mulzer, A. Mantoulidis, E. Öhler, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7456-7467; Total Syntheses of Epothilones B and D,
- [147] D. Quintard, P. Bertrand, C. Bachmann, J.-P. Gesson, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4762-4770; Synthesis and Conformational Analysis of Macrocycles Related to 10-Oxa-epothilone,
- [148] I. Paterson, V. A. Steadman neé Doughty, M. D. McLeod, T. TrieseImann, *Tetrahedron* **2011**, 67, 10119-10128; Stereocontrolled total synthesis of (+)-concanamycin F: the strategic use of boron-mediated aldol reactions of chiral ketones,
- [149] I. Paterson, R. D. Norcross, R. A. Ward, P. Romea, M. A. Lister, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11287-11314; Studies in Macrolide Synthesis: A Stereocontrolled Synthesis of Oleandolide Employing Reagent- and Substrate-Controlled Aldol Reactions of (S)-1-(Benzyloxy)-2-methylpentan-3-one,
- [150] A. Basha, M. Lipton, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 4171-4172; A mild, general method for conversion of esters to amides,
- [151] G. P. Luke, J. Morris, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 3013-3019; Titanium and Boron Mediated Aldol Reactions of β -Hydroxy Ketones,
- [152] a) G. E. Keck, C. A. Wager, T. Sell, T. T. Wager, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2172-2173; An Especially Convenient Stereoselective Reduction of β -Hydroxy Ketones to Anti 1,3 Diols Using Samarium Diodide, b) M. Santelli, J. Viala, *Tetrahedron* **1978**, 34, 2327-2330; Hydrolysis oxirylcarbinyl tosylates,
- [153] E. Ciganek, *The Catalyzed α -Hydroxyalkylation and α -Aminoalkylation of Activated Olefins (The Morita-Baylis-Hillman Reaction)*, Vol. 51, John Wiley and Sons Inc., **1997**.
- [154] J. S. Hill, N. S. Isaacs, *J. Chem. Res. (M)* **1988**, 2641 - 2676; Nucleophile-Catalysed Additions of Aldehydes and Ketones to Acrylic Compounds: The Effectiveness of High Pressures,

- [155] a) Y. Yamane, K. Sugawara, N. Nakamura, S. Hayase, T. Nokami, T. Itoh, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 4638-4649; Development of n-Type Semiconductor Based on Cyclopentene- or Cyclohexene-Fused [C60]-Fullerene Derivatives, b) J. C. Gilbert, J. Yin, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5482-5490; An approach toward the total synthesis of subergoric acid,
- [156] J. S. Clark, G. Yang, A. P. Osnowski, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1460-1463; Synthesis of the C-1-C-17 Fragment of Amphidinolides C, C2, C3, and F,
- [157] a) S. V. Ley, P. J. Murray, B. D. Palmer, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 4765-4769; Total synthesis of the sesquiterpene (\pm)-hirsutene using an organoselenium-mediated cyclization reaction, b) C. Wang, X. Gu, M. S. Yu, D. P. Curran, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8355-8370; Synthesis of fused bicyclic rings by tandem radical ring expansion/cyclization: Evaluating competing intramolecular reactions,
- [158] J. Liu, Z. Li, P. Tong, Z. Xie, Y. Zhang, Y. Li, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 1632-1643; TMSI-Promoted Vinyllogous Michael Addition of Siloxyfuran to 2-Substituted Chromones: A General Approach for the Total Synthesis of Chromanone Lactone Natural Products,
- [159] N. Wang, S. Cai, C. Zhou, P. Lu, Y. Wang, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 647-652; One-pot synthesis of 2-aryl-3-alkoxycarbonyl chromones through a cascade Lewis acid-catalyzed aldehyde olefination/oxa-Michael addition/oxidation,
- [160] E. Abraham, T. D. W. Claridge, S. G. Davies, B. Odell, P. M. Roberts, A. J. Russell, A. D. Smith, L. J. Smith, H. R. Storr, M. J. Sweet, A. L. Thompson, J. E. Thomson, G. E. Tranter, D. J. Watkin, *Tetrahedron: Asym.* **2011**, *22*, 69-100; A systematic study of the solid state and solution phase conformational preferences of β -peptides derived from C(3)-alkyl substituted transpenticin derivatives,
- [161] R. L. Dunbrack Jr, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 431-440; Rotamer Libraries in the 21st Century,
- [162] M. F. Sanner, *J. Mol. Graphics Mod.* **1999**, *17*, 57-61; Python: A Programming Language for Software Integration and Development,
- [163] D. S. Goodsell, Garrett M. Morris, Arthur J. Olson, *J. Mol. Recognit.* **1996**, 1-5; Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock,
- [164] S. Forli, *Raccoon AutoDock VS: an automated tool for preparing AutoDock virtual screenings*, <http://autodock.scripps.edu/resources/raccoon> (12/10/2014).

13. Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, gemäß § 5 Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vom 06.02.2012, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Des Weiteren versichere ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe und die vorliegende Arbeit bei keiner anderen Institution eingereicht worden ist.

Filderstadt, Oktober 2016

Elisabeth Rütthlein

Band 18
**Enantioselektive Allyladditionen und Diels-Alder Reaktionen –
Effiziente Werkzeuge in der Synthese Tetrahydroanthrachinon-
und Dihydro- α -pyron-haltiger Naturstoffe**
D. Böse (2015), 411 pp
ISBN: 978-3-95806-046-3

Band 19
**Etablierung von P450 BM3 Monooxygenasen als chemo-
und stereoselektive Biokatalysatoren für die organische Synthese**
K. Neufeld (2015), 458 pp
ISBN: 978-3-95806-043-2

Band 20
**Investigation of Differently Substituted Allylboronic Esters
in Allylation Reactions**
R. Vahabi (2015), 288 pp
ISBN: 978-3-95806-102-6

Band 21
Yeasts as Production Hosts for Biocatalysts
K. Morka (2015), 197 pp
ISBN: 978-3-95806-103-3

Band 22
**Kolorimetrische und fluorimetrische Assays
-Auf der Jagd nach neuen Biokatalysatoren für die Synthesechemie-**
B. Laininger (2016), 220 pp
ISBN: 978-3-95806-133-0

Band 23
Laccasen in der organischen Synthese
S. Sulić (2016), 248 pp
ISBN: 978-3-95806-136-1

Band 24
**Strukturelle Untersuchungen zur Aktivität und Stabilität
in Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen**
M. Dick (2016), 200 pp
ISBN: 978-3-95806-165-1

Band 25
**Rationales Design der Acetaldehyd-abhängigen Aldolasen
und deren Anwendung in der organischen Synthese**
C. Bisterfeld (2016), 259 pp
ISBN: 978-3-95806-197-2

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 26

Enreduktasen in der asymmetrischen Synthese

E. Rütthlein (2017), 224 pp

ISBN: 978-3-95806-218-4