

# **Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren bis zum fertigen Naturstoff**

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von

**David Dickmann**

aus Düsseldorf

Düsseldorf, September 2020

aus dem Institut für Bioorganische Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jörg Pietruszka
2. Prof. Dr. Constantin Czekelius

Tag der mündlichen Prüfung:

30.09.2020

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht oder vorgetragen.

### Artikel in Fachzeitschriften:

D. Dickmann, M. Diekmann, C. Holec, J. Pietruszka, *Tetrahedron* **2019**, 75, 689-696; 'The first chemoenzymatic total synthesis of the phytotoxic nonenolide putaminoxin and its (5*S*,6*E*,9*S*)-diastereomer'.

### Poster-Präsentationen:

13<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, 09.07 - 13.07.2017, Budapest, Ungarn; D. Dickmann, C. Holec, K. Neufeld, J. Pietruszka, „*Tailoring of a P450 monooxygenase for chemoenzymatic allylic oxidations in organic chemistry.*”

67. Mosbacher Kolloquium, 30.03 – 02.04.2016, Mosbach/Baden, Deutschland; D. Dickmann, C. Holec, K. Neufeld, J. Pietruszka, „*Towards synthetic applications of cytochrome P450 monooxygenases.*”

### Vorträge:

BioLiSy-Projekt Meeting, 06.06 – 08.06.2018, Pushchino, Russland; D. Dickmann, T. Classen, J. Pietruszka, „*Towards functional expression of a novel laccase from Rhizoctonia solani F-895.*”

BioLiSy-Projekt Meeting, 07.06 – 10.06.2016, Pushchino, Russland; D. Dickmann, T. Classen, J. Pietruszka, „*Heterologous expression and molecular characterisation of alkaliphilic laccases.*”

# Inhaltsverzeichnis

1	Kurzeinleitung .....	8
1.1	Biokatalyse .....	8
1.2	Oxidoreduktasen.....	10
2	Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase .....	13
2.1	Einleitung .....	14
2.1.1	Laccasen .....	14
2.1.2	Lignane, Lignansynthese und das BioLiSy-Projekt .....	18
2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	24
2.2.1	Charakterisierung und Expression von Laccasen aus <i>R. solani</i> in <i>E. coli</i> .....	24
2.2.2	Ermittlung der Originalsequenz der <i>R. solani</i> F-895 Laccase .....	27
2.2.3	Expressionsversuche der <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>E. coli</i> .....	30
2.2.4	Expressionsversuche der <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>S. cerevisiae</i> .....	35
2.2.5	Versuche zur Optimierung der heterologen Expression der <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>S. cerevisiae</i> .....	43
2.3	Kurzzusammenfassung.....	50
2.4	Short Summary.....	52
2.5	Ausblick.....	54
3	Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 .....	57
3.1	Einleitung .....	58
3.1.1	Struktur von CYP102A1 (P450 BM3) .....	59
3.1.2	Katalysezyklus von P450 BM3 .....	62
3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	64
3.2.1	Allylische Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (11) mit Hilfe von P450 BM3.....	64
3.2.2	Optimierung der allylischen Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (11) mit Hilfe von P450 BM3 .....	65
3.2.3	Entwicklung eines Screenings für die Detektion von vicinalen Diolen, in P450 BM3 katalysierten Reaktionen .....	70

3.2.4	Generierung einer Mutantenbibliothek für die bevorzugt $\alpha$ -ständige Hydroxylierung von Substraten mit polaren Substituenten .....	89
3.3	Kurzzusammenfassung.....	92
3.4	Short Summary.....	93
3.5	Ausblick.....	94
4	Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-Diastereomer [(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-37] .....	96
4.1	Einleitung .....	97
4.1.1	Totalsynthese von Nonenoliden auf Basis von intermolekularen Veresterungen und Ringschlussmetathesen.....	98
4.1.2	Totalsynthese von Nonenoliden auf Basis von Kupplungsreaktionen und anschließender Makrolaktonisierung .....	101
4.1.3	Vergleich der Strukturdaten von isolierten und synthetisierten Nonenoliden.....	103
4.1.4	Erste Versuche zur chemoenzymatischen Synthese von Putaminoxin (37) und seinen Analoga .....	106
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	108
4.2.1	Chemoenzymatische Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-Diastereomer [(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-37] .....	108
4.2.2	Vergleich der Strukturdaten der neu synthetisierten Nonenolide und Strukturvorschlag für das phytotoxische Nonenolid Putaminoxin (5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-37.....	112
4.3	Kurzzusammenfassung.....	116
4.4	Short Summary.....	117
4.5	Ausblick.....	118
5	Material und Methoden .....	119
5.1	Geräte .....	119
5.2	Software.....	120
5.3	Chemikalien und Lösungsmittel.....	121
5.4	Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten .....	121
5.4.1	Verwendete Medien und Puffer.....	121
5.4.2	Allgemeine Kultivierungsbedingungen für Flüssigkulturen .....	123
5.4.3	Allgemeine Anzucht auf Agarplatten.....	123
5.4.4	Verwendete Stämme.....	124

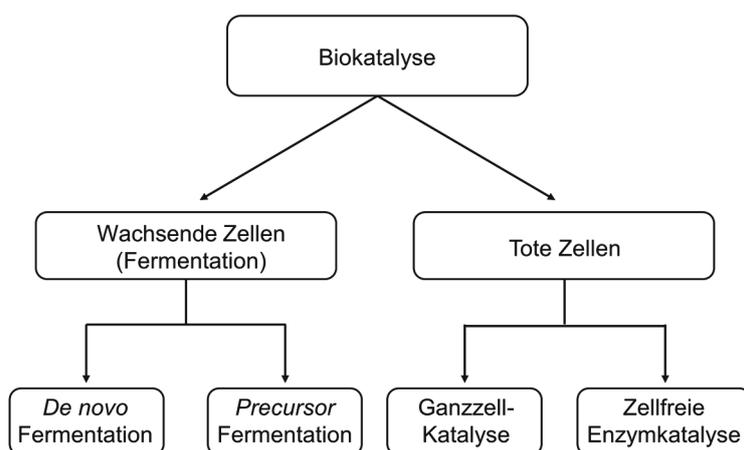
5.4.5	Verwendete Plasmide .....	124
5.4.6	Verwendete Primer .....	127
5.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	131
5.4.8	Klassische PCR .....	132
5.4.9	<i>QuikChange</i> <sup>TM</sup> PCR .....	132
5.4.10	<i>DpnI</i> -Verdau .....	134
5.4.11	Agarose-Gelelektrophorese .....	134
5.4.12	Restriktion von DNA-Molekülen .....	134
5.4.13	Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA .....	135
5.4.14	Ligation von DNA-Fragmenten .....	135
5.4.15	Subklonierung .....	136
5.4.16	Sequenzierung .....	136
5.4.17	Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	136
5.4.18	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	137
5.4.19	Isolation genomischer DNA aus <i>R. solani</i> F-895 .....	137
5.4.20	Sequenzierung genomischer DNA von <i>R. solani</i> F-895 .....	137
5.4.21	Isolation der RNA von <i>R. solani</i> F-895 .....	138
5.4.22	Sequenzierung des Transkriptoms von <i>R. solani</i> F-895 .....	140
5.4.23	Erzeugung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	140
5.4.24	Erzeugung und Transformation chemisch kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	141
5.4.25	Verwendete Enzyme .....	143
5.4.26	Eigenhändige Produktion von Enzymen in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	144
5.4.27	Produktion von <i>R. solani</i> Laccasen in <i>E. coli</i> .....	145
5.4.28	Produktion von <i>R. solani</i> F-895 Laccase in <i>S. cerevisiae</i> .....	146
5.4.29	Produktion von FDH* in <i>E. coli</i> .....	146
5.4.30	Produktion von PTDH in <i>E. coli</i> .....	146
5.4.31	Produktion von P450 BM3 in <i>E. coli</i> .....	146
5.4.32	Herstellung von zellfreien Rohlysaten von <i>E. coli</i> .....	147
5.4.33	Proteinaufreinigung .....	148
5.4.34	Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen .....	149

5.4.35	Deglykosilierung von Proteinen .....	150
5.4.36	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	150
5.4.37	Untersuchung von Proteinen mit MALDI-TOF .....	151
5.4.38	Western-Blot .....	152
5.4.39	Bestimmung von Enzymaktivitäten mit photometrischen Assays .....	152
5.4.40	Bestimmung der P450-Monooxygenase Konzentration.....	155
5.4.41	Biokatalytische Umsetzungen mit der P450 BM3 Monooxygenase .....	155
5.4.42	Biokatalytische Umsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen .....	159
5.5	Chemische Arbeiten .....	160
5.5.1	Allgemeine Geräte und Methoden.....	160
5.5.2	Chemische und biochemische Synthesen von Verbindungen .....	163
6	Abkürzungsverzeichnis .....	187
7	Formelregister .....	189
8	Anhang .....	191
8.1	Vektorkarten und Sequenzen.....	195
8.1.1	Vektorkarten.....	195
8.1.2	Sequenzen.....	199
8.2	SDS-Gele.....	231
8.3	NMR-Spektren .....	232
8.4	NMR-Vergleich publizierter Nonenolide.....	252
9	Literaturverzeichnis.....	257
10	Danksagung .....	272
11	Erklärung .....	274

## 1 Kurzeinleitung

### 1.1 Biokatalyse

Enzyme werden seit über 100 Jahren erfolgreich in der Synthesechemie und im Rahmen von fermentativen Prozessen sogar seit Jahrtausenden von der Menschheit eingesetzt.<sup>[1]</sup> In der Biokatalyse unterscheidet man grundsätzlich zwischen dem Einsatz lebender, sich teilender Zellen und toter Zellen bzw. dem Einsatz von isolierten Enzymen aus diesen toten Zellen. Bei ersterem Prozess werden mikrobielle Zellen dazu verwendet aus dem zur Verfügung gestellten Nährmedium sowohl die notwendigen Katalysatoren zu produzieren und zu regenerieren als auch das Substrat umzusetzen. Dieses ist ebenfalls Bestandteil des Nährmediums, oder wurde diesem hinzugefügt. Geschieht dieser Prozess im Rahmen des Primär- oder Sekundärmetabolismus des Organismus spricht man von *de novo* Fermentation, werden dagegen dem Organismus fremde Substrate umgesetzt spricht man von *precursor* Fermentation.<sup>[2]</sup> Bei der Verwendung toter Zellen unterscheidet man dagegen den Einsatz ganzer Zellen mit dem Einsatz aus den Zellen isolierter Enzyme (Abbildung 1).



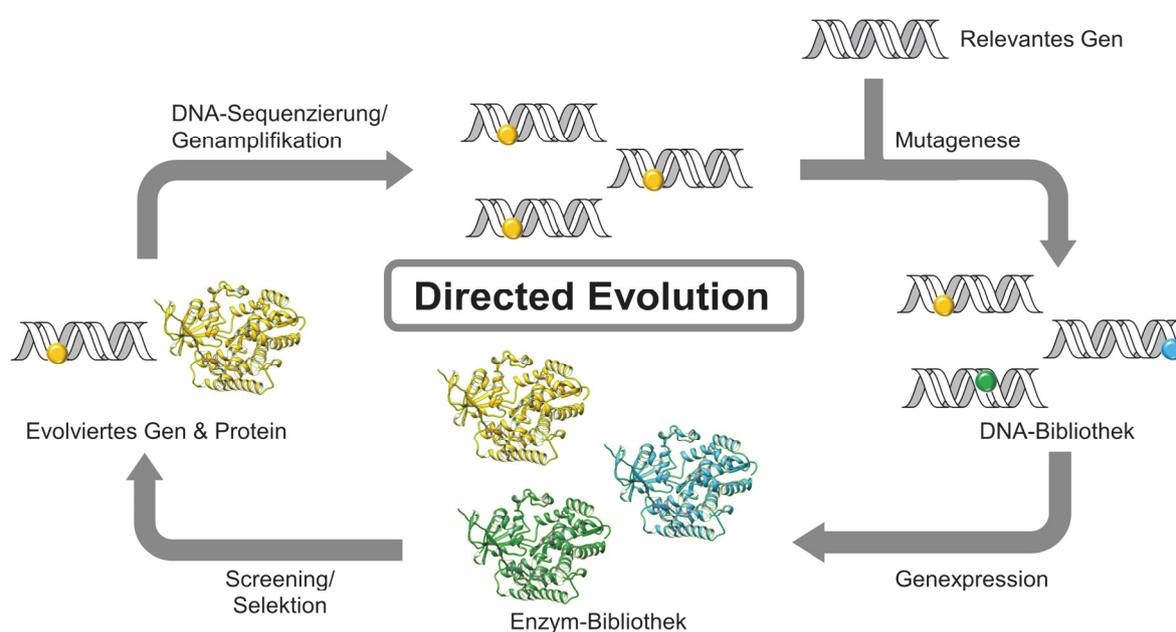
**Abbildung 1:** Grundsätzliche biokatalytische Prozesse in Anlehnung an Sheldon *et al.*<sup>[2]</sup>

Die weit verbreitete Nutzung dieser natürlichen Katalysatoren, außerhalb fermentativer Prozesse, erfolgte im letzten Jahrhundert z.B. in Form von Waschmittelzusatz, der Umwandlung von Glucose zu süßerer Fructose in der Lebensmittelindustrie, oder in der Semisynthese von Antibiotika in der pharmazeutischen Chemie.<sup>[3]</sup> Da Enzyme als Biokatalysatoren häufig ein sehr spezifisches Substratspektrum aufweisen, bedingt durch das Anforderungsprofil der natürlichen Umgebung, war ihr Einsatz in der Synthese und Feinchemie zunächst eingeschränkt. Dies änderte sich jedoch mit dem Aufkommen des „*Protein Engineerings*“ in den 1980er bis 1990er Jahren. Es konnte gezeigt werden, dass Enzyme gezielt verändert und ihre Eigenschaften optimiert werden können, um neue Reaktionen zu ermöglichen und Einsatzgebiete zu erschließen.<sup>[4, 5]</sup> Der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren für die Generierung neuer und verbesserter Varianten an Biokatalysatoren, basierend auf Strukturdaten, auch „*rational protein design*“ genannt, führte daher zu einem rapiden Anstieg der Nutzbarkeit von

## Kurzeinleitung Biokatalyse

Enzymen und wurde dementsprechend von *Bornscheuer et al.* als zweite Welle der Biokatalyse beschrieben.<sup>[3]</sup>

Die Basis für einen weiteren Meilenstein in der Biokatalyse wurde Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts gelegt. So optimierten Chen und Arnold *et al.* das Enzym Subtilisin nicht durch gezielten Austausch von Aminosäuren, sondern durch künstliche Evolution unter Laborbedingungen.<sup>[6]</sup> Dabei wurden nach dem Zufallsprinzip viele Varianten des Enzyms generiert und auf verbesserte Eigenschaften untersucht. Varianten, welche verbesserte Eigenschaften aufwiesen, konnten im Anschluss einem weiteren Zyklus von zufälliger Änderung und anschließender Untersuchung („*Screening*“) unterworfen werden (Abbildung 2).<sup>[7]</sup>



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Prozesses von „*directed evolution*“ in Anlehnung an Zeymer *et al.*<sup>[8]</sup>

Dieses neue Prinzip der „*directed evolution*“ von Enzymen eröffnete völlig neue Möglichkeiten in der Biokatalyse und führte nach *Bornscheuer et al.* zu einer dritten Welle der Biokatalyse.<sup>[3, 9-12]</sup> Die enorme Signifikanz dieser neuen Methode äußerte sich 2018 in der Verleihung des Nobelpreises für Prof. Frances Arnold. Diese Ehrung zeugt davon wie die Biokatalyse erfolgreich Einzug in die moderne Chemie gehalten hat. Nichtsdestotrotz gelten auch heute noch dieselben Einschränkungen für den Einsatz von Enzymen in der Chemie, welche bereits zu Beginn einer breiten Anwendung von Enzymen im Wege standen. Sie weisen eine geringe Thermostabilität auf, besitzen häufig ein enges Substratfenster, oder eine geringe oder ungewünschte Stereo- und Regioselektivität.<sup>[13]</sup> Inzwischen stehen jedoch zahlreiche Werkzeuge zur Verfügung, mit denen diese Nachteile minimiert oder gar beseitigt werden können. Der Wunsch von Gesellschaften, Staaten und der Industrie nach neuen bioökonomischeren Herstellungsverfahren führt dabei zwangsläufig auch zu vermehrtem Einsatz biokatalytischer Verfahren. Der rapide Fortschritt in der Bioinformatik, der Gensequenzierung und der

## Kurzeinleitung Oxidoreduktasen

Gensynthese, dem Zugriff auf Strukturdaten von Enzymen und Hochdurchsatzscreenings hat schon heute die Anzahl potenziell nutzbarer Enzyme für die Industrie exponentiell gesteigert.<sup>[14]</sup> Darüber hinaus konnten Coelho *et al.* vor kurzem Reaktionen mit Enzymen realisieren, welche in der Natur überhaupt nicht durchgeführt werden und bis dato auf die klassische Chemie beschränkt waren, wie Cyclopropanierungen.<sup>[15]</sup> Diese und weitere Entwicklungen, auch in verwandten Feldern wie dem „*metabolic engineering*“, sind Indikatoren eines weiteren Quantensprungs in der Biokatalyse und lassen darauf schließen, dass diese in der Industrie der Zukunft eine wichtige Rolle einnehmen wird.<sup>[16]</sup>

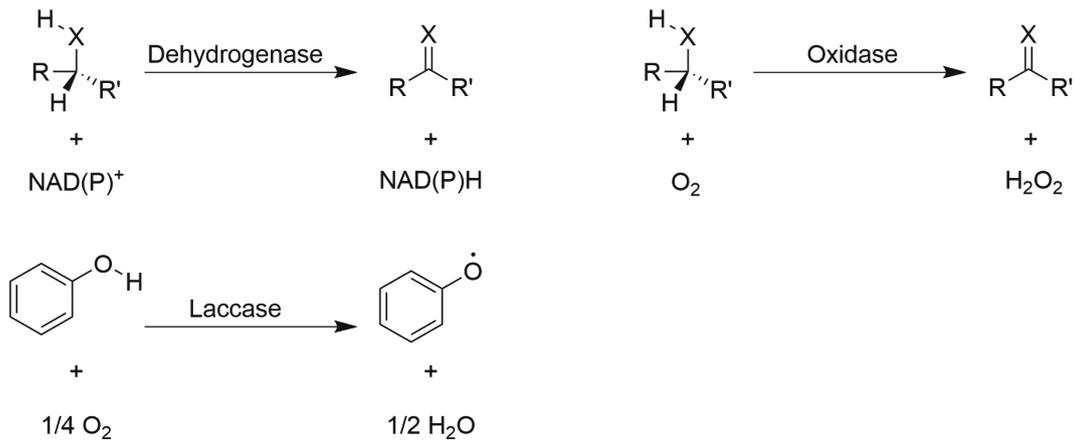
### 1.2 Oxidoreduktasen

Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen und stellen die erste Gruppe von Enzymen nach EC-Klassifikation dar.<sup>[17]</sup> Sie katalysieren allgemein die Reaktion  $A^- + B \rightarrow A + B^-$ .<sup>[18]</sup> Demnach findet bei jeder Oxidationsreaktion auch ein Reduktionsschritt statt und bei jeder Reduktionsreaktion eine gleichzeitige Oxidation. Die weitere Unterteilung der Oxidoreduktasen in ihre Klassen wird durch die funktionelle Gruppe bedingt, welche als Elektronendonator bzw. Elektronenakzeptor fungiert. Es gibt dementsprechend 22 übergeordnete Klassen von Oxidoreduktasen, die sich jeweils in weitere Unterklassen aufspalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei dieser Unterklassen näher untersucht, die Alkoholdehydrogenasen (EC 1.1.1), die Laccasen (EC 1.10.3.2) und die Monooxygenasen (EC 1.13.12, EC 1.14.13-18).

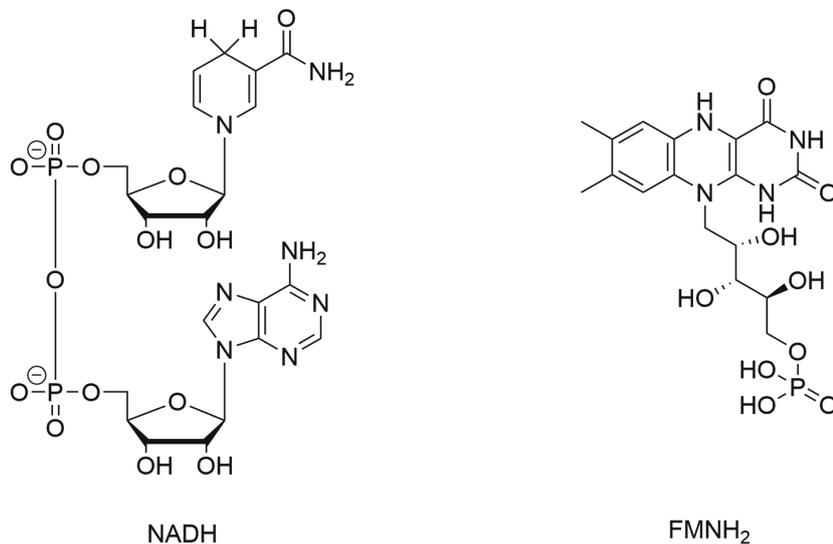
Damit Oxidoreduktasen ihre jeweilige Reaktion katalysieren können tragen diese meist einen oder mehrere Cofaktoren z.B. ein Flavin, Häm, Nicotinamid oder ein Metallion, in manchen Fällen sogar eine Kombination dieser Cofaktoren.<sup>[19]</sup> Der allgemeine Mechanismus von Oxidoreduktasen lässt sich aber in nur zwei Hauptgruppen unterteilen, den Dehydrogenierungen und den Oxyfunktionalisierungen.<sup>[20]</sup> Zu den dehydrogenierenden Oxidoreduktasen zählen beispielsweise die Alkoholdehydrogenasen (EC 1.1.1), die Flavin-abhängigen Oxidasen (EC 1.1.3), die Kupfer-abhängigen Oxidasen (EC 1.1.3) und die Laccasen (EC 1.10.3.2). Ihnen ist gemein, dass sie ein Hydrid von einem heteroatom-substituierten Kohlenstoff abstrahieren und meist auf einen Cofaktor wie Flavin und Nicotinamid übertragen (Abbildung 3).<sup>[20]</sup>

Kurzeinleitung  
Oxidoreduktasen

**A**

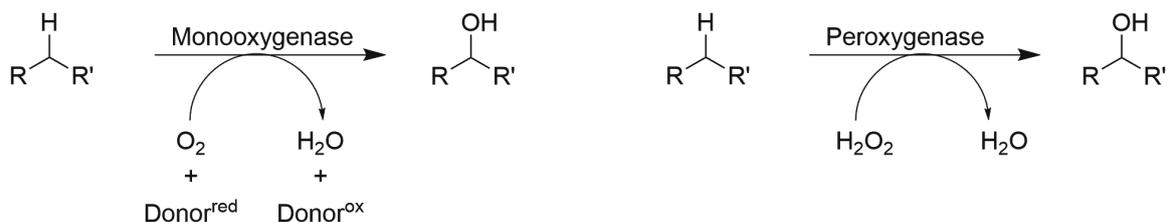


**B**



**Abbildung 3: A)** Beispiele dehydrogenierender Oxidoreduktasen nach Dong *et al.*<sup>[20]</sup> **B)** Gängige Cofaktoren in dehydrogenierenden Oxidoreduktasen.

Der zweite Mechanismus, die Oxyfunktionalisierung, beruht dagegen auf der reduktiven Aktivierung von molekularem Sauerstoff, oder bereits reduziertem Wasserstoffperoxid, gefolgt von einer elektrophilen Insertion der aktivierten Spezies in das entsprechende Substrat. Die reduktive Aktivierung des molekularen Sauerstoffs nutzen sowohl Mono- als auch Dioxygenasen (Monooxygenasen: EC 1.13.12, EC 1.14.13-18; Dioxygenasen: EC 1.13.11, EC 1.14.11, EC 1.14.12), während bereits reduziertes Wasserstoffperoxid von den Peroxygenasen genutzt wird (EC 1.11.2.1) (Abbildung 4).<sup>[19, 20]</sup>

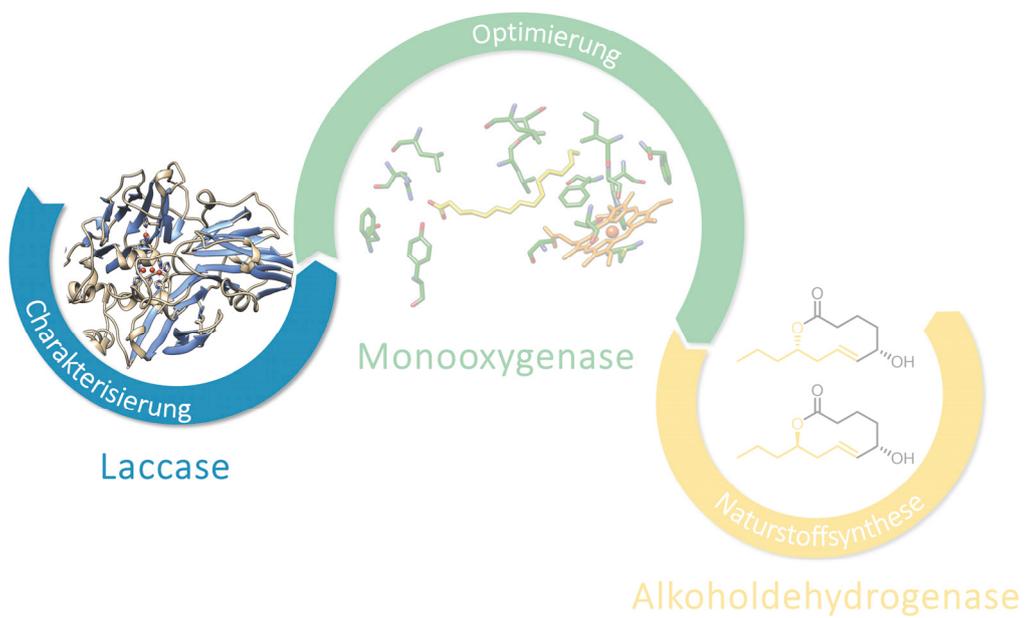


**Abbildung 4:** Ausgewählte Beispiele von Oxidoreduktasen welche die reduktive Aktivierung von Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid nutzen, in Anlehnung an Dong *et al.*<sup>[20]</sup>

## Kurzeinleitung Oxidoreduktasen

Bei den genannten Beispielen handelt es sich um prominente Oxidoreduktasen, welche heute bereits in der Industrie eingesetzt werden, deren Potential aber noch bei weitem nicht ausgeschöpft ist. Ihre Einsatzgebiete sind dabei sehr divers und reichen von selektiven Syntheseschritten in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, über Lebensmittelzusatzstoffe und Aromen in der Lebensmittelchemie, bis hin zur Bereitstellung von Biodiesel als Alternative zu fossilen Brennstoffen.<sup>[19, 21]</sup> Die Anforderungen an das Enzym variieren dementsprechend stark mit dem Anwendungsgebiet. Die hohen Anforderungen der Industrie sind auch ein Grund dafür, dass es Enzyme bis heute noch nicht aus der Nische der Spezialanwendungen in die breite Massenanwendung geschafft haben. Fehlende oder ungewünschte Selektivitäten, fehlende kommerzielle Verfügbarkeit und Inkompatibilität mit den harschen Produktionsbedingungen, wie hohe Substratkonzentrationen, hohe Temperaturen und Einsatz von Lösungsmitteln, stehen einer breiten Anwendung häufig noch im Weg.<sup>[21]</sup> Zudem führt der Einsatz von Enzymen, nicht wie häufig angenommen, zwangsläufig zu einem nachhaltigeren oder saubereren Prozess.<sup>[22]</sup> Für eine „grüne“ Chemie muss ein großes Repertoire an Bedingungen abgedeckt werden.<sup>[23, 24]</sup> Die hohe Erzeugung von Schmutzwasser, geringe Produkttiter und notwendige Extraktionen der Produkte mit einer großen Menge Lösungsmittel werden beim Einsatz von Enzymen jedoch oftmals vernachlässigt.<sup>[22]</sup> Dennoch finden Enzyme als Biokatalysatoren immer häufiger den Weg in die Industrie und werden als Option in neuen Synthesestrategien berücksichtigt, speziell für Synthesen in denen stereo-, regio-, oder chemoselektive Umsetzungen stattfinden sollen.<sup>[25]</sup> Dies gilt auch für Oxidoreduktasen, welche den Zugang zu neuen retrosynthetischen Schnitten ermöglichen, welche mit klassischen chemischen Methoden nicht, oder nur umständlich realisierbar sind. Einige dieser Möglichkeiten sind beispielsweise die selektive C-H-Oxidation und *late-stage* Funktionalisierungen komplexer Moleküle.<sup>[26, 27]</sup> Mit der Suche nach Oxidoreduktasen mit neuen oder verbesserten Eigenschaften, der Optimierung bekannter Oxidoreduktasen mittels Mutagenese und Screening, bis hin zum finalen Einsatz dieser Enzyme in der Naturstoffsynthese, wird das Spektrum für den Einsatz in der Chemie stetig erweitert. Diese Optimierungsansätze wurden an drei unterschiedlichen Oxidoreduktasen durchgeführt, mit dem Ziel, neue oder bessere Katalysatoren für die Chemie bereitzustellen.

## 2 Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase



## 2.1 Einleitung

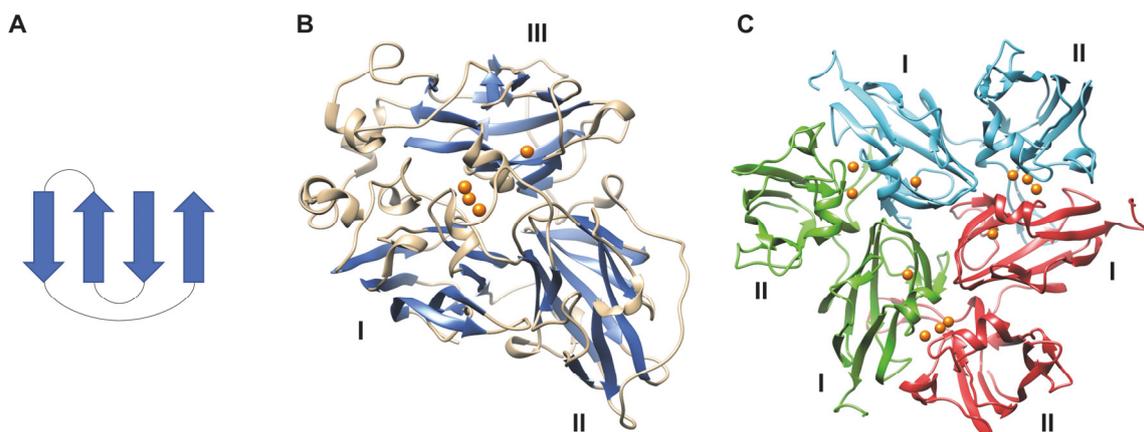
Der erste Ansatz zur Bereitstellung neuer oder besserer Katalysatoren in der Chemie ist das Auffinden neuer Enzyme mit interessanten Eigenschaften. Das Ziel des ersten Projektes dieser Arbeit war die heterologe Expression und anschließende Charakterisierung einer kürzlich beschriebenen, putativen Laccase aus dem Pilz *Rhizoctonia solani* VKM F-895.<sup>[28]</sup>

### 2.1.1 Laccasen

Laccasen (EC 1.10.3.2) sind Multi-Kupfer Oxidasen, welche die Oxidation von phenolischen und nicht-phenolischen Substraten unter Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysieren.<sup>[29]</sup> Ursprünglich wurden diese Enzyme nur in Eukaryoten gefunden, doch inzwischen ist bekannt, dass sie ubiquitär verbreitet sind und ebenfalls in zahlreichen Bakterien vorkommen.<sup>[30]</sup> Sie sind involviert in der Pathogenität, der Immunabwehr, der Morphogenese von Organismen, als auch der Umsetzung komplexer organischer Substrate wie Lignin und Cellulose.<sup>[31]</sup> In den letzten Jahren wurden Laccasen vermehrt in der Industrie eingesetzt, bevorzugt in der Textilindustrie, der Stoff- und Papierindustrie und der Lebensmittelindustrie. Neuartige Anwendungsgebiete sind dagegen die Verwendung in Biosensoren, in der medizinischen Diagnostik und dem biologischen Abbau von umweltschädlichen Substanzen, wie Herbiziden und Pestiziden.<sup>[32, 33]</sup> Nicht zuletzt sind Laccasen auch für die synthetische und nachhaltige Chemie von besonderem Interesse, da sie selektiv phenolische und nicht-phenolische Substrate oxidieren können und als Nebenprodukt lediglich Wasser erzeugen.<sup>[34-37]</sup>

#### 2.1.1.1 Struktur und Mechanismus von Laccasen

Laccasen gehören zur Superfamilie der Cupredoxine und beinhalten das strukturelle Grundmotiv dieser Enzyme, die Cupredoxin-Falte. Diese besteht aus  $\beta$ -Faltblättern, die in einem so genannten „*Greek-key barrel*“ angeordnet sind (Abbildung 5, A). Zur Ausbildung einer geschlossenen Fass-Struktur, ordnen sich dafür  $\beta$ -Faltblätter, welche in ihrer Aminosäuresequenz weit auseinander liegen, in räumlicher Nähe an. Das klassische „*Greek-key barrel*“ formiert sich aus vier antiparallel ausgerichteten  $\beta$ -Faltblättern. Die ersten drei  $\beta$ -Faltblätter sind durch Haarnadel-Strukturen miteinander verbunden, woraufhin eine längere Verbindung zum vierten  $\beta$ -Faltblatt folgt. Dieses befindet sich trotz der längeren Verbindung wiederum in räumlicher Nachbarschaft zum ersten  $\beta$ -Faltblatt (Abbildung 5, A).<sup>[38]</sup> Oftmals besitzen Laccasen nicht das klassische „*Greek-key barrel*“, sondern eine Cupredoxin-Falte aus mehr als vier  $\beta$ -Faltblättern. Das Grundprinzip der antiparallelen Anordnung der Faltblätter zu einer dreidimensionalen Fassstruktur bleibt jedoch erhalten (vgl. Abbildung 5, B).



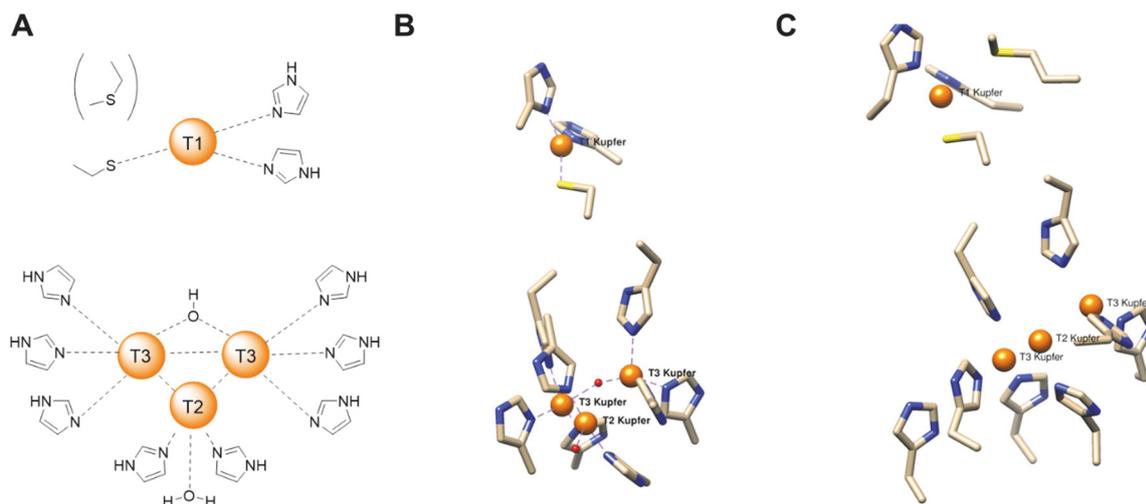
**Abbildung 5:** **A)** Klassische Anordnung von  $\beta$ -Faltblättern im „Greek-key barrel“ in Anlehnung an Hakulinen *et al.*<sup>[38]</sup> **B)** Dreidimensionale Darstellung einer klassischen drei-Domänen Laccase aus *Trametes versicolor* (PDB-Eintrag: 1GYC) Die Cupredoxin-Falten wurden blau hervorgehoben.<sup>[39]</sup> **C)** Dreidimensionale Darstellung eines Homotrimeren einer kleinen zwei-Domänen Laccase aus *Streptomyces sviveus* (PDB-Eintrag: 4M3H).<sup>[40]</sup>

Die Cupredoxin-Falte wurde in dieser Form zuerst in Kupferproteinen gefunden, die aus nur einer Cupredoxin-Domäne bestehen, wie Plastocyanin und Azurin.<sup>[41, 42]</sup> Gewöhnliche Laccasen enthalten dagegen drei gleichartige Cupredoxin-Domänen und gehören somit zu den Multi-Domänen Cupredoxinen (Abbildung 5, B). Sie sind folglich verwandt mit der Nitritreduktase, der Ascorbat-Oxidase, der Bilirubin-Oxidase und Ceruloplasmin, welche ebenfalls mehrere Cupredoxin-Domänen enthalten.<sup>[38]</sup> Vor einem Jahrzehnt wurden neben den üblichen drei-Domänen Laccasen auch Laccasen gefunden welche aus nur zwei Cupredoxin Domänen bestehen.<sup>[43]</sup> Diese speziellen Laccasen wurden zwei-Domänen Laccasen bzw. kleine Laccasen getauft, sind strukturelle Homotrimere und stammen allesamt aus Bakterien (Abbildung 5, C).<sup>[43-46]</sup>

Laccasen besitzen zwei separate Kupferbindestellen, eine Monokupferbindestelle (beinhaltet das T1 Kupferion) und eine Trikupferbindestelle (beinhaltet das T2, T3 und T3' Kupferion), welche sich in einem ungefähren Abstand von 12 Å von der Monokupferbindestelle entfernt befindet.<sup>[38]</sup> In den klassischen drei-Domänen Laccasen befindet sich die Monokupferbindestelle in der dritten Domäne, wohingegen die Trikupferbindestelle zwischen Domäne eins und Domäne drei lokalisiert ist (Abbildung 5, B) Die kleineren zwei-Domänen Laccasen werden nach der jeweiligen Anordnung der vier Kupferatome in weitere Untergruppen unterteilt. So repräsentieren die kleinen Laccasen aus *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces sviveus* die Untergruppe B, in denen das T1 Kupfer jeweils in Domäne zwei lokalisiert ist und die Trikupferbindestellen jeweils zwischen Domäne eins und zwei, in den Schnittstellen des strukturellen Trimeren zu finden sind (Abbildung 5, C).<sup>[43]</sup> In den kleinen Laccasen der Untergruppe C befindet sich das T1 Kupfer wiederum in Domäne eins.<sup>[44]</sup> Bei der Untergruppe A handelt es sich wiederum um einen vorhergesagten evolutionären Vorläufer der zwei-Domänen Laccasen, welcher in beiden Domänen eine Bindestelle für das T1 Kupfer enthält.<sup>[47]</sup> Unabhängig von der Anordnung der Kupferbindestellen in den jeweiligen Domänen ist die allgemeine Geometrie der Kupferatome in Laccasen hochkonserviert. Die Trikupferbindestelle besteht üblicherweise aus insgesamt acht Histidinen. Die T3 Kupfer der Trikupferbindestelle werden von

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Einleitung

jeweils drei Histidinen koordiniert, während das T2 Kupfer von zwei weiteren Histidinen koordiniert wird. Das T1 Kupfer wird von weiteren zwei Histidinen und einem Cystein koordiniert (Abbildung 6, A).<sup>[38]</sup> Die bakteriellen Laccasen CotA und SLAC sowie mgLAC haben zusätzlich noch ein Methionin, welches das T1 Kupfer koordiniert, wohingegen pilzliche Laccasen an dieser Stelle ein nicht koordinierendes Leucin oder Phenylalanin besitzen (Abbildung 6, B, C).<sup>[38, 48]</sup> Zusätzlich befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite von Met/Leu/Phe ein Isoleucin, welches den konservierten Teil der hydrophoben Region rund um das T1 Kupfer komplettiert.



**Abbildung 6:** **A)** Schematische Darstellung der Kupferbindestelle in Laccasen in Anlehnung an Cannatelli *et al.*<sup>[37]</sup> Das Methionin am T1-Kupfer kommt nur in den kleinen zwei-Domänen Laccasen vor und ist deshalb in Klammern gesetzt. **B)** Dreidimensionale Struktur der Kupferbindestelle aus einer klassischen drei-Domänen Laccase aus *Trametes versicolor* (PDB-Eintrag 1GYC).<sup>[39]</sup> **C)** Dreidimensionale Struktur der Kupferbindestelle aus einer kleinen zwei-Domänen Laccase aus *Streptomyces sviveus* (PDB-Eintrag: 4M3H).<sup>[40]</sup>

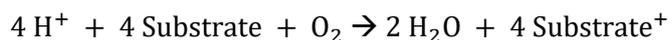
Im Gegensatz zur tetraedischen Anordnung des T1 Kupfers anderer Multikupfer Oxidasen ist das T1 Kupfer in Pilz-Laccasen trigonal planar zwischen dem Schwefelatom des Cysteins und den  $\delta 1$  Stickstoffatomen der zwei Histidine koordiniert.<sup>[37]</sup> Der Ladungstransferübergang des Cysteinschwefels und des Cu(II)-Atoms ist dabei für die intensive Absorptionsbande bei ca 600 nm verantwortlich, welche die tiefblaue Färbung dieser Enzyme zur Folge hat.<sup>[49]</sup> Vereinzelt gibt es auch Laccasen die das charakteristische Absorptionsspektrum des T1 Kupfers nicht aufweisen. Diese „gelben“ oder auch „weißen“ Laccasen oxidieren eine ähnliche Bandbreite von Substraten, werden aber nicht von allen Wissenschaftlern als „echte“ Laccasen anerkannt.<sup>[29]</sup> Trotzdem gilt das T1 Kupfer aller Laccasen als primärer Elektronenakzeptor. An dieser Stelle finden vier Ein-Elektronen Oxidationen von vier Substraten statt, welche im Anschluss über das hochkonservierte Tripeptid aus His/Cys/His auf das Trikupfercluster übertragen werden. Dort wiederum findet die Reduktion von gebundenem Sauerstoff zu Wasser statt. Die Reduktion des T1 Kupfers ist dabei vermutlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Reaktion, welcher wiederum von der Differenz des Standardpotentials des T1 Kupfers und dem des zu reduzierenden Substrates abhängt.<sup>[50]</sup> Das Standardpotential des T1 Kupfers wurde deshalb für zahlreiche Laccasen ermittelt und schwankt teilweise erheblich zwischen 400 mV für pflanzliche Laccasen und 790 mV für Laccasen pilzlichen Ursprungs.<sup>[50]</sup> Die Abstinenz eines vierten

koordinierenden Rests in Pilz-Laccasen, im Vergleich zu den tetraedisch koordinierten T1 Kupfern anderer Multikupfer Oxidasen, scheint für die hohen Standardpotentiale dieser Laccasen dabei eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>[51]</sup>

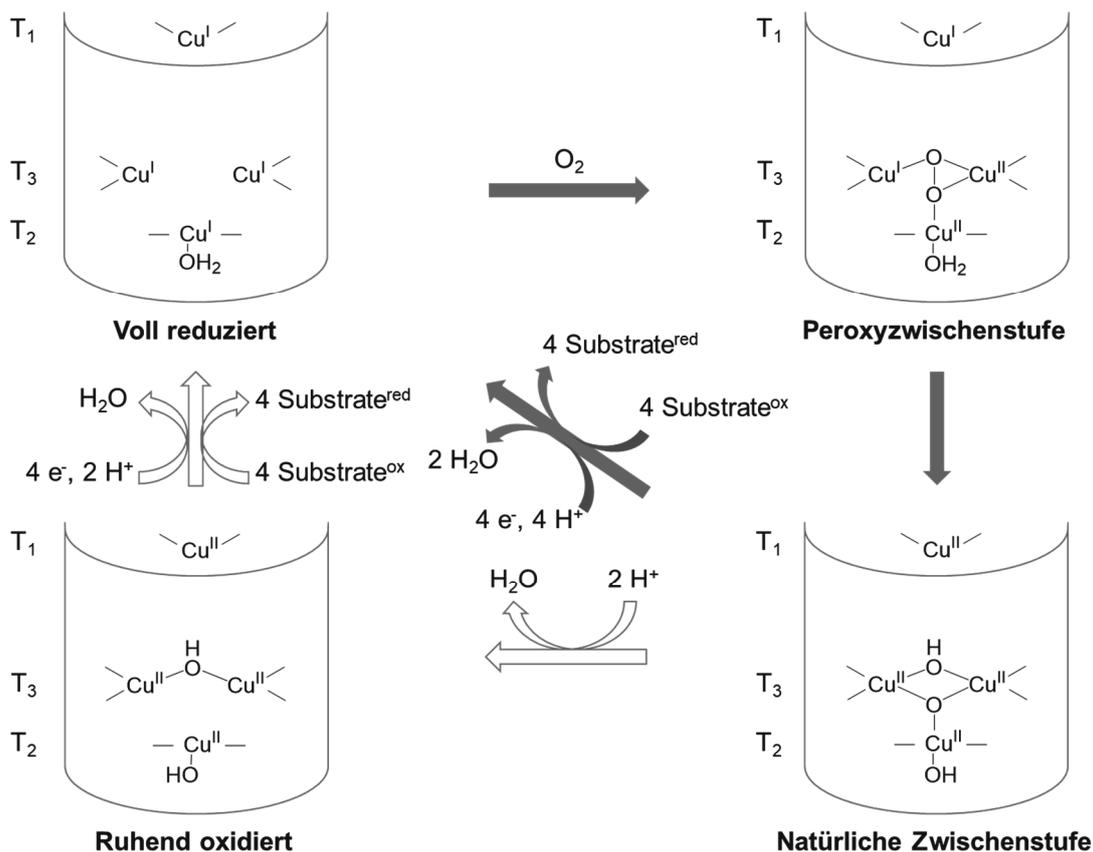
Untersuchungen mittels Röntgenkristallografie zeigen, dass das zu reduzierende Substrat in allen Drei-Domänen Laccasen ähnlich gebunden wird. Dieses scheint dabei nicht direkt mit dem T1 Kupfer zu interagieren, sondern interagiert stattdessen über eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem der Histidine, welche wiederum das T1 Kupfer koordinieren.<sup>[38]</sup> Dieses Histidin ist demnach vermutlich der eigentliche, primäre Elektronenakzeptor. Das Histidin der Monokupferbindestelle liegt dabei frei in der Substratbindetasche, welche bei den Laccasen eher eine an der Oberfläche befindliche, relativ breite Einkerbung ist.<sup>[52]</sup> Der geringe sterische Anspruch der Substratbindetasche bedingt auch die verhältnismäßig hohe Bandbreite an Substraten, welche durch die Laccase oxidiert werden können.

Ausgehend vom vollständig reduzierten Kupfercluster kann Sauerstoff gebunden werden und es bildet sich die sogenannte Peroxyzwischenstufe (Abbildung 7). Die Reaktion mit Sauerstoff erfolgt anschließend in zwei Zwei-Elektronen Schritten, von denen der zweite jedoch so schnell ist, dass es sich formal um eine Vier-Elektronen Reaktion handelt. Die hohe Geschwindigkeit des zweiten Schrittes ergibt sich dabei aus der hohen Triebkraft der Zwei-Elektronen Reduktion des Peroxyintermediats in Kombination mit der triangularen Anordnung der drei Kupferatome der Trikupferbindestelle.<sup>[53]</sup> Aus dieser Reaktion folgt die katalytisch relevante, voll oxidierte Form des Enzyms, die natürliche Zwischenstufe. Unter Aufnahme von vier Elektronen über das T1 Kupfer, aus vier Substraten, kann so unter Freisetzung von zwei Wassermolekülen wieder in die vollständig reduzierte Form übergegangen werden. Alternativ kann nach Aufnahme von zwei Protonen nur ein einzelnes Wassermolekül freigesetzt werden und in die ruhende, oxidierte Zwischenstufe übergegangen werden. Auch aus dieser Zwischenstufe kann die Aufnahme von vier Elektronen unter Freisetzung eines zweiten Wassermoleküls erfolgen. Dieser Prozess ist allerdings langsam und daher nicht Teil des eigentlichen katalytischen Zyklus (Abbildung 7). Bei der Oxidationsreaktion mittels Laccasen entstehen somit insgesamt vier, typischerweise instabile, freie Radikale aus den Substraten. Diese können in einem Folgeschritt einer weiteren Oxidation unterliegen, oder aber disproportionieren oder polymerisieren.<sup>[29]</sup> Damit ergibt sich folgende Gesamtgleichung für die Laccasereaktion (Formel 1).<sup>[53]</sup>

**Formel 1:** Allgemeine Reaktionsgleichung von Laccasen.



## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Einleitung

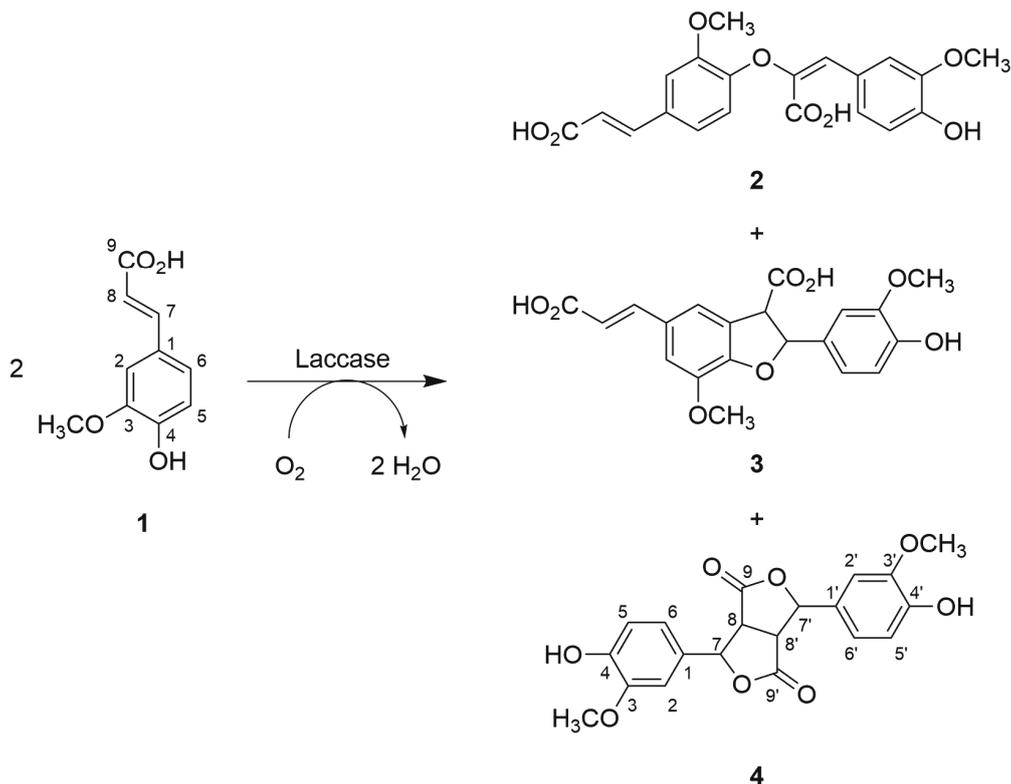


**Abbildung 7:** Katalysezyklus von Laccasen in Anlehnung an Solomon *et al.*<sup>[53]</sup> Dunkelgraue Pfeile = Katalysezyklus.

### 2.1.2 Lignane, Lignansynthese und das BioLiSy-Projekt

Ein prominentes Beispiel einer typischen Laccase-katalysierten Reaktion ist die oxidative Dimerisierung von zwei Phenylpropanoiden. Mit Hilfe von Laccasen erhält man somit Zugriff auf eine ganze Reihe komplexer Biomoleküle. Ein bekanntes Beispiel ist die oxidative Kupplung des Phenylpropanoids Ferulasäure (1) zu einer Reihe unterschiedlicher Dimerisierungsprodukte 2-4 (Abbildung 8).<sup>[54]</sup> Bei diesen Dimerisierungsprodukten aus zwei Phenylpropanoiden kann es sich um sogenannte Lignane handeln, dimere C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-Körper welche über das mittlere β-C-Atom (bzw. C-8-Atom) miteinander verknüpft sind.

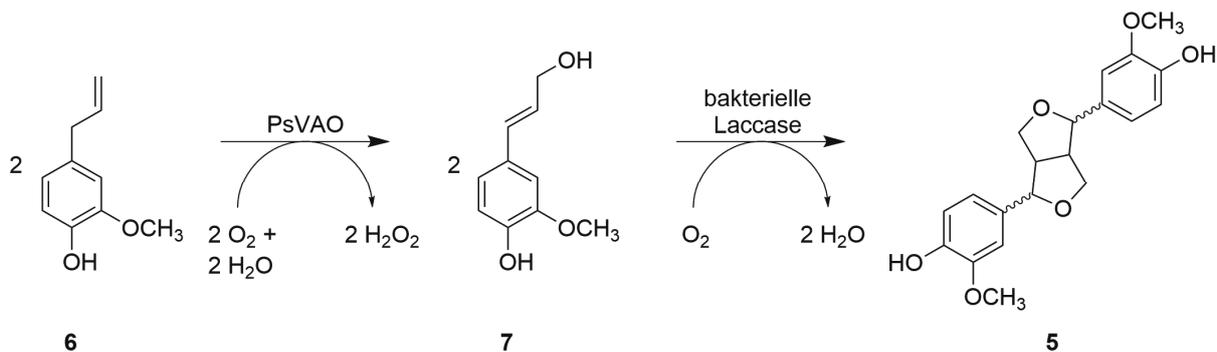
Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase  
Einleitung



**Abbildung 8:** Darstellung einiger möglicher Produkte aus der Kopplung von zwei Molekülen Ferulasäure (1), in einer Laccase katalysierten Reaktion, in Anlehnung an Carunchio *et al.*<sup>[54]</sup>

Lignane sind in Pflanzen weit verbreitete Sekundärmetabolite die sowohl in Wurzeln, Rhizomen, Stämmen und Blättern als auch in deren Samen und Früchten vorkommen.<sup>[55]</sup> Letzteres trägt dazu bei, dass Menschen und Tiere ein großes Repertoire dieser Biomoleküle über die Nahrung aufnehmen.<sup>[56]</sup> Obwohl ihr molekulares Grundgerüst aus relativ simplen Einzeleinheiten besteht, weisen sie eine gewaltige strukturelle Vielfalt auf. Diese Vielfalt basiert auf der Möglichkeit die Phenylpropan-Untereinheiten auf unterschiedliche Art und Weise miteinander zu verknüpfen, sowie auf Grund von Folgeoxidation und Polymerisation.<sup>[57]</sup> Klassischerweise werden Lignane in zwei Untergruppen kategorisiert, die klassischen Lignane und die Neolignane.<sup>[58]</sup> Die klassischen Lignane sind β-β' (8-8') miteinander verknüpft (Abbildung 8, 4), wohingegen die Neolignane anderweitig miteinander verknüpft sind (Abbildung 8, 2-3).<sup>[55]</sup> Die biologische Aktivität von Lignanen wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben und zusammengefasst. Neue Anwendungsgebiete in der Krebstherapie und weiterer pharmakologischer Aspekte und die inzwischen bessere Zugänglichkeit, haben das Interesse allerdings neu entfacht.<sup>[59, 60]</sup> Lignane besitzen antioxidative, antitumorale, antimikrobielle und immunosuppressive Eigenschaften. Deshalb werden Lignane auf ihren Nutzen in Nahrungsergänzungsmitteln und Krebstherapien intensiv untersucht.<sup>[56, 60]</sup> Diese Vielzahl an Eigenschaften hat folgerichtig auch zu gesteigener Aufmerksamkeit in der Synthese von natürlichen und modifizierten Lignanen geführt.<sup>[55]</sup> Dabei konkurrieren klassische Synthesen mit der Isolation aus der natürlichen Ressource und der Bereitstellung durch biotechnologische Verfahren.<sup>[61-63]</sup> Das Beispiel von Pinoresinol (5) zeigt dabei eindrucksvoll, wie biotechnologische Verfahren den Zugang zu solch

komplexen Naturstoffen, als Alternative zur reinen klassischen Synthese, ermöglichen können.<sup>[64, 65]</sup> Dafür wurde in einer Ein-Topf-Kaskade erst Eugenol (**6**) mit Hilfe einer Vanillylalkohol-Oxidase aus *Penicillium simplicissimum* (PsVAO) zu Coniferylalkohol (**7**) umgesetzt und im Folgeschritt mit einer bakteriellen Laccase zu Pinoresinol (**5**) dimerisiert (Abbildung 9). Dabei ist jedoch anzumerken, dass die letzte Reaktion nicht selektiv erfolgt und das Pinoresinol (**5**) in einem Produktgemisch vorliegt, aus dem es vorerst isoliert werden muss.



**Abbildung 9:** Biokatalytische Ein-Topf-Kaskade zur Synthese von Pinoresinol (**5**), ausgehend von Eugenol (**6**) nach Ricklefs *et al.*<sup>[65]</sup>

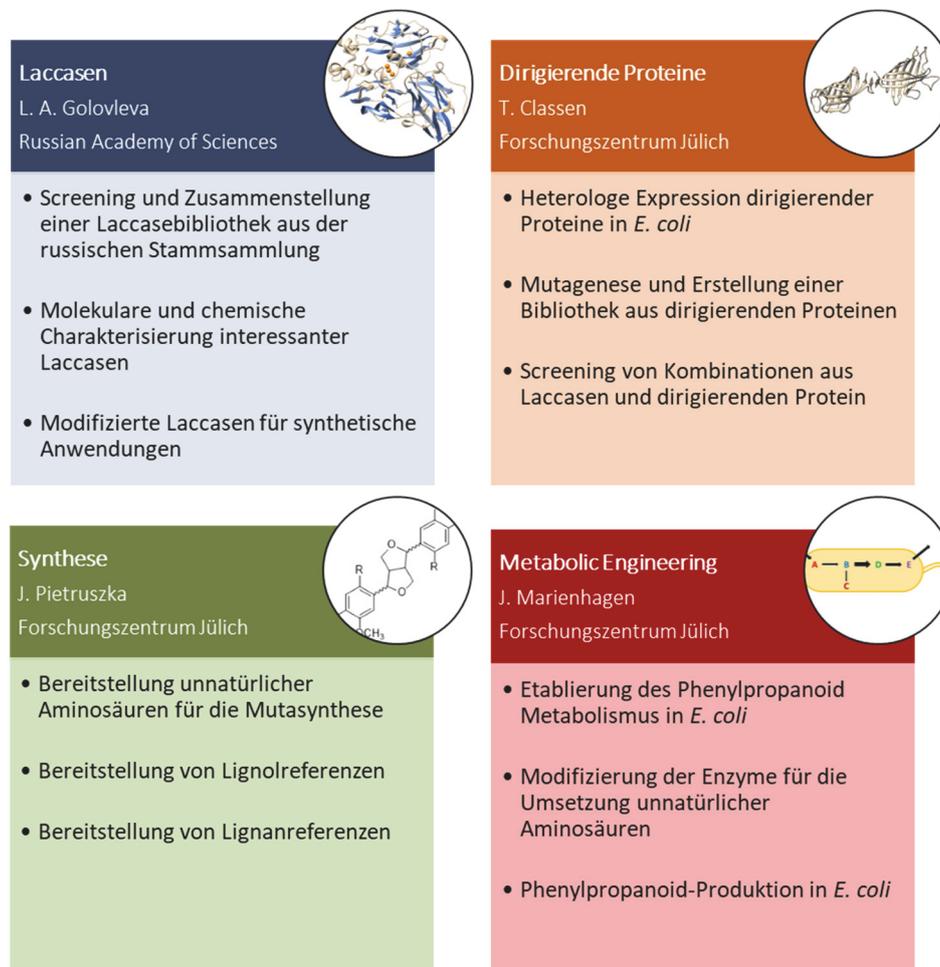
Das BioLiSy-Projekt wurde ins Leben gerufen, um einen neuen bioökonomischen Zugang zu solchen Lignanen zu erhalten. Der Produktionsprozess sollte dabei vollständig in Bakterien erfolgen. Dafür wurde das Projekt in vier übergeordnete Projekte eingeteilt. Das erste Projekt enthält die Suche nach neuen Laccasen mit einem neutralen bis alkalischen Aktivitätsprofil, aus der russischen Stammsammlung, durch die Mitarbeiter der *Russian Academy of Sciences*, unter Leitung von Frau Prof. Dr. Golovleva. Durch Screenings und initiale Charakterisierung sollen so neue und geeignete Laccasen für die zukünftige Lignansynthese gefunden werden. Ein neutrales bis alkalisches Aktivitätsprofil der Laccase ist dabei notwendig, da die Kupplung der phenolischen Substrate der Lignansynthese bevorzugt im neutralen bis alkalischen pH stattfindet.<sup>[66]</sup> Der Grund dafür ist eine erhöhte Dissoziation des phenolischen Protons bei höheren pH-Werten. Diese geht einher mit einem sinkenden Standardpotentials des Substrates und damit einem Anstieg des Redoxpotentials in der Laccase-Reaktion. Dementgegen wirkt jedoch eine Inhibierung der Laccase durch Hydroxidionen bei höheren pH-Werten.<sup>[66]</sup> Aus diesem Grund sind Laccasen welche eine erhöhte Aktivität und Stabilität im alkalischen Milieu aufweisen von besonderem Interesse (siehe Kapitel 2.1.2.1).

Das zweite Arbeitspaket unter der Leitung von Dr. Thomas Classen (Forschungszentrum Jülich, IBG-1) beschäftigt sich mit dirigierenden Proteinen. Diese Pflanzenproteine vermitteln Selektivität, in der ursprünglich unselektiven Polymerisation der freien Radikale aus Laccase-Reaktionen.<sup>[67]</sup> Das Ziel ist es, diese Enzyme erstmalig löslich und funktional in Bakterien zu exprimieren, zu charakterisieren und im Anschluss in der Laccase katalysierten Reaktion einzusetzen. Diese erlauben anschließend eine enantioselektive Kupplung der phenolischen Substrate zu wertvollen Lignanen.

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Einleitung

Das Ziel des dritten Arbeitspaketes von Prof. Dr. Jörg Pietruszka (Forschungszentrum Jülich, IBG-1/IBOC) ist die Synthese unnatürlicher Aminosäuren und die Bereitstellung von Lignol- und Lignanreferenzen. Dadurch soll nicht nur die Möglichkeit bestehen natürliche Lignane zu synthetisieren, sondern auch Derivate dieser bioaktiven Moleküle. Die Lignol- und Lignanreferenzen dienen wiederum der Analytik.

Die unnatürlichen Aminosäuren werden im letzten Arbeitspaket unter Anleitung von Prof. Dr. Jan Marienhagen eingesetzt. Dieses Arbeitspaket beschäftigt sich mit der Stammentwicklung und Implementation des Phenylpropanoid Metabolismus in *E. coli*, mit dem Ziel der Mutasynthese, bis hin zur Lignansynthese (Abbildung 10).<sup>[68]</sup> In diesem letzten Arbeitspaket sollen schlussendlich neue Laccasen, dirigierende Proteine und synthetisierte Aminosäuren und Lignolderivate zusammenlaufen, um eine biologische Lignansynthese in *E. coli* zu ermöglichen.



**Abbildung 10:** Schematische Übersicht über das BiLiSy-Projekt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird sich nur auf jenen Bereich konzentriert, welcher zwischen Arbeitspaket eins und zwei liegt. Die im ersten Arbeitspaket identifizierten Laccasen sollen nach anfänglicher Charakterisierung auf ihre Exprimierbarkeit im Zielorganismus *E. coli* hin untersucht und wenn möglich näher charakterisiert werden. Für den Fall einer erfolgreichen Expression in *E. coli* werden diese dann dem zweiten und vierten Arbeitspaket zur Verfügung gestellt.

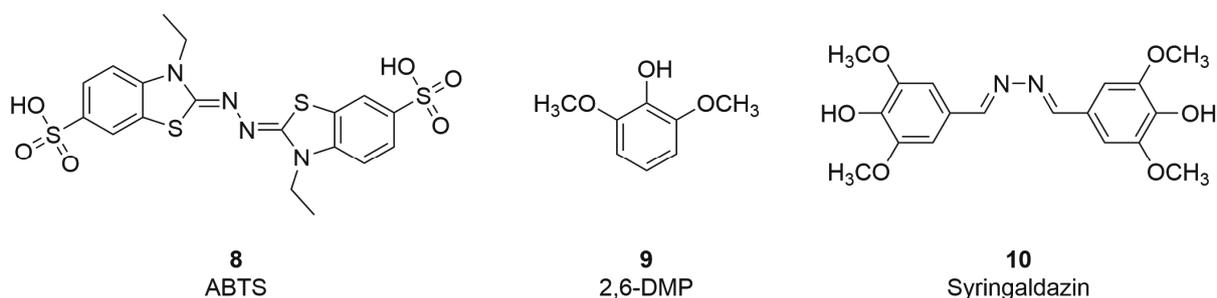
### 2.1.2.1 Suche nach Pilz-Laccasen mit neutralem bis basischem Aktivitätsprofil

Um auch schwer oxidierbare, Lignin-basierte Substrate oxidieren zu können, besitzen Pilz-Laccasen aus einigen Basidiomyceten ein ausgesprochen hohes Redoxpotential von 730-790 mV gegenüber einer Standardelektrode. Dahingegen können Laccasen aus Ascomyceten und anderen Basidiomyceten Redoxpotentiale von 410-710 mV aufweisen und jene aus Bakterien und Pflanzen sogar nur 340-490 mV.<sup>[69]</sup> Ein höheres Standardpotential erlaubt eine höhere Bandbreite an möglichen Substraten, weshalb Laccasen mit höherem Standardpotential von größerer biotechnologischer Bedeutung sind. Eine weitere wichtige Eigenschaft für den biotechnologischen Einsatz ist die Temperatur und pH-Stabilität von Laccasen, da ihr Einsatz in der industriellen Umgebung häufig mit höheren Temperaturen, oder einem aziden oder alkalischen pH einhergeht.<sup>[70, 71]</sup> Das Aktivitätsprofil von Pilz-Laccasen liegt allerdings zumeist im aziden Bereich. Dies macht Laccasen mit einer Kombination aus hohem Standardpotential und neutralem bis alkalischem Aktivitätsprofil selten.<sup>[31]</sup> Daraus bedingt wurden zahlreiche Versuche unternommen um alkalophile Laccasen zu identifizieren, zu exprimieren, oder bereits bekannte Laccasen alkalistabil zu modifizieren.<sup>[46, 72-80]</sup> Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen des BioLiSy-Projektes von den Kollegen der *Russian Academy of Sciences* eine Plattform für die schnelle Identifizierung von Pilz-Laccasen mit neutralem bis alkalischen Aktivitätsprofil entwickelt.<sup>[28]</sup> Die Untersuchung der russischen Stammsammlung offenbarte einige interessante Laccase-Aktivitäten, unter anderem für den Basidiomyceten *Rhizoctonia solani* VKM F-895 (*R. solani* F-895).

### 2.1.2.2 Laccasen aus *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia solani* (auch *Rhizoctonia praticola*) ist ein im Boden vorkommender, filamentöser Basidiomycet, der nahezu alle Nutzpflanzen befallen kann. Er ist verantwortlich für Ernteverluste beim Anbau von Reis, Soja, Kartoffel, Mais und Zuckerrübe.<sup>[81-84]</sup> Er wird in 14 unterschiedliche Anastomosegruppen (AG) eingeteilt. Innerhalb dieser Gruppen ist der Pilz in der Lage seine Hyphen miteinander zu verschmelzen (Anastomose). Alle 14 AGs und ihre Untergruppen sind genetisch isoliert und repräsentieren abweichende evolutionäre Stränge.<sup>[84]</sup> Neben Untersuchungen zur Pathogenität lag ein Hauptaugenmerk der Forschung auf der außergewöhnlichen, alkalischen Laccaseaktivität dieser Pilze. Vereinzelt Erkenntnisse deuten sogar auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Laccaseaktivität und der Pathogenität des Organismus hin.<sup>[85, 86]</sup> Bereits Ende des letzten Jahrhunderts wurden mehrere Varianten von Laccasen aus *R. solani* entdeckt und anschließend isoliert und genauer beschrieben.<sup>[87-89]</sup> Eine der charakterisierten Laccasen von Wahleithner *et al.* zeigten bereits das gewünschte Aktivitätsprofil der Laccasen von pH 6.5-7.5 gegenüber phenolischen Substraten. Jede der insgesamt vier gefundenen Laccasen (lcc1-4) wurden auf einem separaten Gen kodiert, es handelt sich demnach nicht um posttranslational modifizierte Isoenzyme. Anhand ihrer Größe, der Organisation von Introns/Exons und der Transkriptionskontrolle, wurden sie in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei wurden lcc1-3 der ersten Gruppe zugeordnet und lcc4 der zweiten Gruppe. Zwei rekombinante Varianten und eine natürliche Variante wurden in *Aspergillus oryzae* exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. Die

rekombinante Laccase lcc1 besaß ein Molekulargewicht von 50-100 kDa, während lcc4 ein Homodimer aus zwei Monomeren mit einem Molekulargewicht von 66 kDa darstellt. Die Laccase lcc1 wies ein pH-Optimum von pH 7 für die Oxidation von phenolischen Substraten aus, wohingegen lcc4 ein pH-Optimum von pH 6 aufwies.<sup>[89]</sup> In einem ähnlichen pH-Bereich konnte im Rahmen des BioLiSy-Projektes Laccase-Aktivität im Kulturüberstand des *R. solani* Stammes VKM F-895 detektiert werden.<sup>[28]</sup> Dieser zeigte eine Aktivität gegenüber 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) (**8**) bei einem pH  $\leq 5$ , was entsprechend dem beschriebenen Oxidationsmechanismus des Substrates, unter Bildung eines Kationradikals, den Erwartungen entspricht.<sup>[90]</sup> Zusätzlich wurde die Laccaseaktivität gegenüber 2,6-Dimethoxyphenol (2,6-DMP) (**9**) und Syringaldazin (**10**) getestet und ein Optimum von pH 7-8 detektiert (Abbildung 11).<sup>[28]</sup>



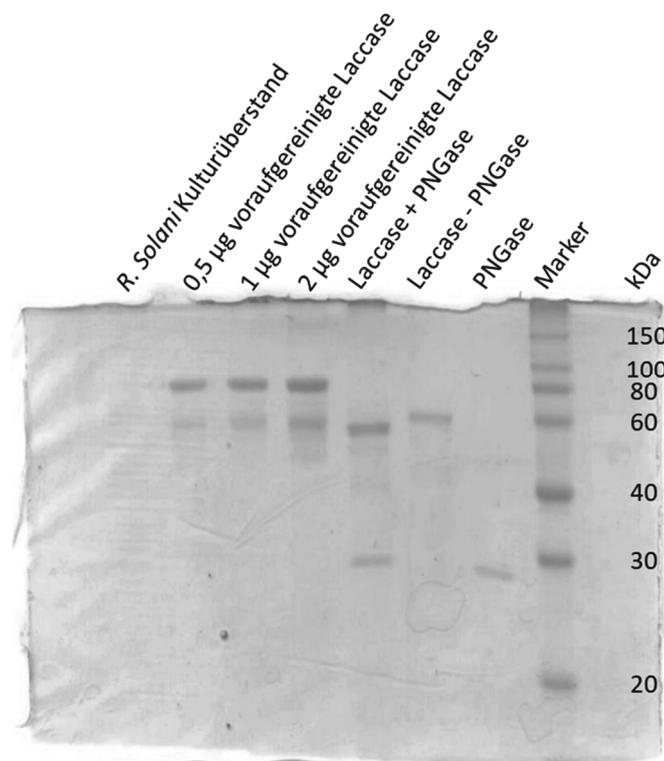
**Abbildung 11:** Klassische Substrate für die Detektion von Laccaseaktivität. Die oxidierten Formen von ABTS (**8**), 2,6-DMP (**9**) und Syringaldazin (**10**) besitzen ein Absorptionsmaximum bei 436 nm (dunkelgrün), 470 nm (orange) und 525 nm (rot) und können photometrisch nachgewiesen werden.

Damit liegt die Aktivität gegenüber phenolischen Substraten wie 2,6-DMP (**9**) und Syringaldazin (**10**) in einem ähnlichen Bereich wie zuvor von Wahleithner *et al.* beschrieben.<sup>[89]</sup> Da die von Wahleithner *et al.* beschriebene *R. solani* Laccase zusätzlich ein hohes Standardpotential von +710 mV gegenüber einer Standardelektrode aufwies, handelt es sich hierbei um Enzyme mit potentiell interessanten Eigenschaften für die biotechnologische Anwendung.<sup>[66, 69]</sup> Dementsprechend wurde im Rahmen der Kooperation sowohl der Organismus, als auch eine vorab aufgereinigte Probe des Enzyms von Kolomytseva *et al.* für die weitere Untersuchung bereitgestellt. Ziel war es die Sequenz dieser Laccase zu entschlüsseln und wenn möglich löslich und funktional in *E. coli* zu exprimieren und zu charakterisieren.

## 2.2 Ergebnisse und Diskussion

### 2.2.1 Charakterisierung und Expression von Laccasen aus *R. solani* in *E. coli*

Um das für die Laccaseaktivität verantwortliche Enzym näher zu charakterisieren sollte die von Kolomytseva *et al.* zur Verfügung gestellte, bereits gereinigte Proteinprobe mittels SDS-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Analyse untersucht werden. Zusätzlich wurde sie vorab mit der Peptid-*N*-Glycosidase (PNGase) behandelt um das Protein zu deglykosylieren.<sup>a</sup> Diese Behandlung sollte dazu dienen, Aufschluss über den Glykosylierungsgrad des Enzyms zu erhalten, da das Molekulargewicht sekretierter Laccasen häufig bis zu 25 % durch Glykosylierungen bedingt ist.<sup>[91]</sup> Sie haben meist 3-10 Glykosylierungsstellen, welche typischerweise die Aminosäureabfolge Asn-X-Thr/Ser beinhalten.<sup>[92]</sup> Die Untersuchung mittels SDS-Gelelektrophorese offenbarte, dass es sich bei der putativen Laccase aus *Rhizoctonia solani* F-895 (RSL F-895) um ein ca. 60 kDa großes Protein handelt, welches natürlicherweise ebenfalls stark glykosyliert ist. Mit Glykosylierung weist die natürlich sekretierte Laccase ein Gesamtmolekulargewicht von etwa 80 kDa auf (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Vergleich der deglykosylierten und nicht deglykosylierten Proben der aufgereinigten *R. solani* F-895 Laccase (bereitgestellt von Golovleva *et al.*, *Russian Academy of Sciences*) mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese. Die Laccaseprobe ohne PNGase F wurde ebenso behandelt wie die Probe mit PNGase F, aber ohne Zugabe des Enzyms. Marker = Roti-Mark 10-150. Experiment und Gel wurden bereitgestellt von Jamila Rosengarten (IBG-1, Forschungszentrum Jülich).

Damit besitzt RSL F-895 ein ähnliches Molekulargewicht, wie die bereits beschriebenen Laccasen aus anderen *R. solani* Stämmen.<sup>[89]</sup> Es ist mit ca. 25 % des Gesamtmolekulargewichtes jedoch etwas stärker

<sup>a</sup> Die Deglykosylierung, SDS-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Untersuchung wurden von Jamila Rosengarten (FZ Jülich, IBG-1/IBOC), Jennifer Aschenbrenner und Tino Polen (beide FZ Jülich, IBG-1) durchgeführt.

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

glykosyliert.<sup>[89]</sup> Zur weiteren Untersuchung wurde eine betreffende Proteinbande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut, um mit Hilfe einer MALDI-TOF Analyse Sequenzinformationen zu erlangen. Für die Untersuchung wurden die Daten, mit Hilfe der BLAST-Funktion des *National Center of Biotechnology* der Vereinigten Staaten von Amerika (NCBI), mit denen aus vorangegangenen Genomsequenzierungen verwandter *R. solani* Stämme verglichen, da für *R. solani* F-895 keine Sequenzdaten zur Verfügung stehen.<sup>[93]</sup> Auf diese Weise konnten vier unterschiedliche Peptide von RSL F-895 identifiziert werden, welche mit einer putativen Oxidoreduktase (NCBI-Eintrag: RSOL\_189940) aus dem bereits sequenzierten Stamm *R. solani* AG-3 Rhs1AP übereinstimmen (Abbildung 13).<sup>[93]</sup>

### Aminosäuresequenz für die Laccase aus AG-3 Rhs1AP: 561 AS

```
MRTAQEPFKRNELIVRSLHRRSALFHPALTFNMHSRIALLSLLAAVSQPAFAAVRNYGLVIKVKVAPDGFERSI
VSVNGQLPGTLITANKGDTLHINVTNQLTDPTMRRATTIHHWGLFQATTADEDGPAFVTQCPIAQNLSYTYEIP
HDQTGTMWYHAHLASQYVDGLRGPLVIYDPNDPHKALYDVDDKDTVVMLEDWYHTPAPVLEHQMFSDNTALLSP
VPDGLINGKGRYVGGPQVPRSVINVTRGKRYRLRVINASAIQSFTFSIEGHRLTVIEADGIPHEPLVVDSEFQIY
AGQRYSVIVETNQTAANYWIRAPMTVAGAGTNANLDPTNVFAVLHYNGAPNAEPTTEQGTAGTALVEENLHALI
NPGAPGGSAPADVSLNLAIGRSTVDGILRFTFNNIKYEAPSLPTLLKILANNASTNADFGTNEHTLVLPHNKVIE
LNITGGADHPIHLHGHVFDVVKSLGGTPNYVNPPRRDVVRVGGTGVVLRFKTDNPGPWFVHCHIDWHLEAGLALV
FAEAPSEVRQGTQSVQPNQAWEQLCPKYQALPTDLQ
```

**Abbildung 13:** Aminosäuresequenz einer putativen Laccase aus *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP (NCBI-Eintrag: RSOL\_189940). Die vier in der MALDI-TOF Analyse der aufgereinigten Laccase aus *Rhizoctonia solani* F-895 gefundenen Peptide wurden hervorgehoben. Die Auswertung der MALDI-TOF Ergebnisse wurde von Tino Polen (IBG-1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

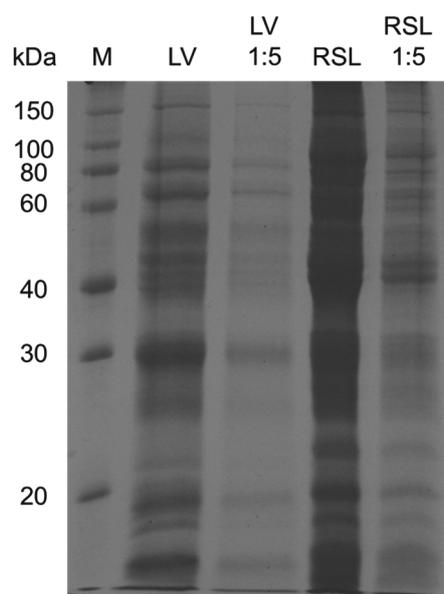
Die aus dem Sequenzabgleich resultierende Laccase (RSL) wäre demnach 561 Aminosäuren lang und hätte ein Molekulargewicht von ca. 61 kDa. Gemäß den Erkenntnissen aus der SDS-Gelelektrophorese entspricht dies dem der unglykosylierten Laccase aus *R. solani* F-895.

Daraufhin wurde ein Expressionsvektor für *Escherichia coli* designed, welcher das synthetische, codonoptimierte Gen (basierend auf GenBank Accession Number: 01000322.1), der Laccase aus AG-3 Rhs1AP enthält. Zusätzlich befindet sich vor dem Gen eine TAT-Sekretionssequenz welche eine Sekretion korrekt gefalteter Proteine aus *E. coli* ermöglicht.<sup>[94]</sup> Der für die Expression ausgewählte Vektor pColA besitzt zwei „multiple-cloning sites“ (MCS) und wurde ausgewählt, um im Falle einer erfolgreichen Expression des Laccase-Gens in *E. coli*, parallel eines der Gene der dirigierenden Proteine aus dem Arbeitspaket 2 unkompliziert in die zweite MCS klonieren zu können. Auf diese Weise wäre eine einfache Coexpression einer Laccase und eines dirigierenden Proteins in *E. coli* durchführbar. Zu Beginn sollten jedoch vorerst nur Versuche mit der Expression des neuen, synthetischen Laccase-Gens erfolgen. Dafür wurden *E. coli* vom Typ DH5 $\alpha$  und BL21(DE3) durch das Einbringen des neuen Vektors, mit der putativen Laccase aus *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP (RSL), transformiert. Ein initialer Versuch der heterologen Expression wurde im Anschluss in BL21(DE3) durchgeführt.

Nach der Kultivierung in Anlehnung an eine Vorschrift von Gunne *et al.*<sup>[46]</sup> und dem anschließenden Zellaufschluss der *E. coli* Zellen, wurden jeweils Proben für die Untersuchung mittels SDS-

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

Gelelektrophorese vorbereitet und das Zellysats und der Kulturüberstand zusätzlich auf Laccase-Aktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9) bei pH 5, 7.5 und 9 überprüft. Auf dem SDS-Gel konnte jedoch keine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa identifiziert werden, welche nicht auch in der Leervektorprobe vorhanden war (Abbildung 14). Zusätzlich konnte keine Laccase-Aktivität im Zellysats oder Kulturüberstand der *E. coli*-Zellen detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher kann angenommen werden, dass die lösliche und funktionale Expression des synthetischen Laccase-Gens in *E. coli* nicht erfolgreich war, da sowohl im SDS-Gel als auch in der Aktivitätsmessung keine Hinweise auf eine erfolgreiche Expression der Laccase gefunden werden konnten.



**Abbildung 14:** SDS-Gelelektrophorese des Zellysats, nach heterologer Expression des synthetischen Gens aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP (RSL), in *E. coli* BL21(DE3). LV = Leervektorkontrolle, M = Marker Roti-Mark 10-150. Es wurden jeweils 20 µL des behandelten Zellysats aufgetragen, inklusive einer jeweils 1:5 verdünnten Probe.

Dass der initiale Versuch der Expression einer ursprünglich sekretierten Laccase pilzlichen Ursprungs in *E. coli* misslingt ist nicht untypisch. Die in *E. coli* zumeist erfolgreich heterolog exprimierten Laccasen stammen hauptsächlich aus anderen Bakterien wie *Streptomyces* und *Bacillus*.<sup>[95]</sup> Erst 2008 konnte erstmals eine Laccase aus einem ligninolytischem Pilz erfolgreich in Bakterien wie *E. coli* exprimiert werden.<sup>[96]</sup> Dass die Expression ligninolytischer Enzyme in *E. coli* eine große Herausforderung darstellt, ist bekannt. Zumeist führt die heterologe Expression dieser Enzyme in *E. coli* zu einer Aggregation inaktiver, fehlgefalteter Proteine, sogenannter „inclusion-bodies“.<sup>[97]</sup> Gründe dafür sind wahrscheinlich das hochreduktive Umfeld im Cytoplasma der Bakterien, im Vergleich zum oxidativen Umfeld in Eukaryoten, als auch die fehlende Möglichkeit post-translationale Modifikationen wie Glykosylierungen, durchzuführen.<sup>[98]</sup> Im Jahr 2012 konnte erstmals eine rekombinante Pilz-Laccase aus *Meripilus giganteus* in *E. coli* exprimiert werden, deren Aktivität im Anschluss mittels ABTS-Aktivitätsassay nachgewiesen werden konnte.<sup>[99]</sup> Auch in diesem Fall war die anschließende Aktivität jedoch gering und lag weit unter dem Niveau der Laccase-Aktivität aus dem Ursprungsorganismus. Eine weitere erfolgreiche heterologe Expression einer Pilzlaccase in *E. coli* gelang mit der Laccase aus

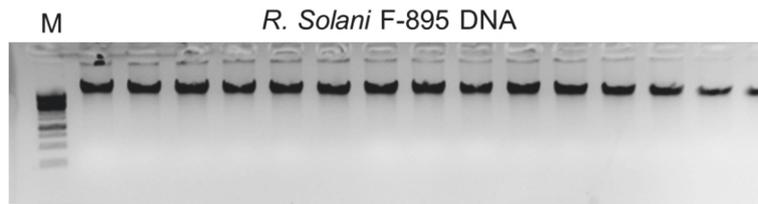
*Rigidoporus lignosus*. Diese Laccase zeigte ebenfalls nur eine sehr geringe Aktivität und eine Reaktionszeit von einer Stunde war notwendig, um eine messbare Umsetzung von Syringaldazin beobachten zu können.<sup>[100]</sup> Ein erst kürzlich publiziertes Beispiel einer erfolgreichen heterologen Expression einer Pilz-Laccase in *E. coli* ist die Laccase aus *Setosphaeria turcica*. In diesem Fall konnte die Expression der Laccase mit einer Aktivität von ca. 128 U/mg Protein realisiert werden. Eine Quantifizierung der Menge heterolog produzierter Laccase fand jedoch nicht statt.<sup>[101]</sup> Trotz ausführlicher Recherche konnten keine weiteren Beispiele für die erfolgreiche heterologe Expressionen von Pilz-Laccasen in *E. coli* gefunden werden.

### 2.2.2 Ermittlung der Originalsequenz der *R. solani* F-895 Laccase

Da die Expression des synthetischen Laccase-Gens aus *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP initial nicht erfolgreich verlief, wurde das Augenmerk vorerst auf die Ermittlung der Originalsequenz aus *R. solani* F-895 fokussiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte noch nicht ausgeschlossen werden, dass ausschließlich das Gen der putativen Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP nicht in *E. coli* exprimierbar war. Selbiges muss aber nicht notwendigerweise für die Originalsequenz des Laccase-Gens aus *R. solani* F-895 gelten. Mittels MALDI-TOF Analyse konnten bereits vier Peptidsequenzen der mutmaßlichen Laccase aus F895 identifiziert werden (Abbildung 13). Anhand des Proteinabgleichs mit der Datenbank konnten die Peptide der putativen Laccase aus AG-3 Rhs1AP zugeordnet werden. Für die weiteren Experimente wurde jedoch die vollständige und spezifische Proteinsequenz der F895-Laccase benötigt. Um diese zu identifizieren sollte zunächst die genomische DNA aus dem Pilzmycel gewonnen werden.

Um diese zu ermitteln wurde *R. solani* F-895 erneut kultiviert. Bei dieser Gelegenheit wurde die Anzucht des Organismus in Kartoffel-Glukose Medium mit der Anzucht in Glycerol-Medium verglichen. Zusätzlich wurde einer der Kolben mit einer Metallspirale versehen, da der Pilz stets als festes, gallertartiges Mycel wuchs, was den folgenden Zellaufschluss für die DNA-Isolation erschwerte. Durch die Metallspirale sollte der Pilz homogen im Medium verteilt vorliegen, statt als feste Struktur am Gefäßrand, knapp über der Flüssigkeitsschicht. Die Auswertung der Trockenmasse zeigte allerdings, dass *R. solani* F-895 in dem Kolben mit Metallspirale ein sehr viel geringeres Wachstum aufwies als in der vergleichbaren Probe ohne Metallspirale. Aus dem Kolben mit Metallspirale konnten nur 160 mg Trockenmasse geerntet werden. Demgegenüber konnten 750 mg Trockenmasse aus der Kultivierung ohne Metallspirale geerntet werden. Anstatt homogen im Medium verteilt vorzuliegen wuchs *R. solani* F-895 in der Probe mit Metallspirale nur lokal konzentriert und an der Metallspirale selbst angeheftet. Da *R. solani* F-895 stets außerhalb des Flüssigmediums, am Gefäßrand wuchs, kann davon ausgegangen werden, dass zu starke Bewegung den Pilz an schnellem Wachstum hindert. Am besten wuchs *R. solani* F-895 in Kartoffel-Glukose Medium, in dem es eine Trockenmasse von 1.6 g nach sechs Tagen aufwies. Das lyophilisierte Zellpellet des in Kartoffel-Glukose Medium angewachsenen Pilzes wurde anschließend für die Isolation der genomischen DNA verwendet (Abbildung 15).

Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase  
Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 15:** Agarose-Gelelektrophorese der Isolation genomischer DNA aus *R. solani* F-895, mit Hilfe des *DNeasy® Plant Mini-Kits* von *Qiagen*. M = Marker 1kb DNA-Ladder (*Thermo Fisher*).

Das vereinigte Eluat der genomischen DNA wurde im Anschluss von Polen *et al.* (FZ Jülich, IBG-1) für die Genomsequenzierung eingesetzt. Es wurde das gesamte Genom des Organismus sequenziert, da eine Großzahl der Gene und codierten Proteine der unterschiedlichen *R. solani* Anastomosegruppen einzigartig für die jeweilige Gruppe sind.<sup>[83]</sup> Eine Genom- und Transkriptomsequenzierung von *R. solani* F-895 könnte demnach eine Vielzahl neuer Gene und sekretierter Proteine offenbaren, welche einen Mehrwert für biotechnologische Anwendungen und Untersuchungen der Pathogenität dieser Pilze haben könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich jedoch nur auf die für das Projekt relevanten Informationen im Zusammenhang mit der *R. solani* F-895 Laccase beschränkt.

Mit den Daten aus der Sequenzierung wurde sowohl ein „*de novo Assembly*“ durchgeführt, als auch eine Abbildung der Daten gegen einer Referenzsequenz („*mapping*“) durchgeführt.<sup>ab</sup> Als Referenzgenom diente das Genom von *R. solani* AG-3 Rhs1AP, auf dessen Basis auch das synthetische Gen der RSL bestellt wurde.<sup>[93]</sup> Die aus den beiden unterschiedlichen Ansätzen erhaltenen Sequenzen für die *R. solani* F-895 Laccase wurden anschließend verglichen. Dabei wurden diverse Unterschiede festgestellt, die unter anderem zu einer Verschiebung des Leserasters führen würden. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist eine unterschiedliche Vorhersage der Intron- und Exonsequenzen des betroffenen Gens im „*de novo Assembly*“ und „*mapping*“ Ansatz. Weiterhin wurde im „*de novo Assembly*“ direkt zu Beginn der kodierenden Gensequenz ein Stop-Codon identifiziert, welches zu einem Abbruch der Translation führen würde (Abbildung 16). Daraus resultiert, dass die Laccase aus *R. solani* F-895 im Vergleich zur Laccase aus AG-3 Rhs1AP am N-Terminus um insgesamt 32 Aminosäuren verkürzt wäre.

AG-3	ATCGCACCGCTCAAGAGCCATTTAAAAGGAACGAGCTGATTGTGCGGTCTCTTCATCGG	60
F-895	ATCGGTAGGGCTTGA GAACCATTTAAAAGGGATGAGTCGATTGTGCGGTCTCTCCATCGG	60
	***** * *** ** ***** * ** ***** ***** *****	
AG-3	CGGTCTGCTCTGTTCCATCCAGCACTCACCTTCAATATGCACTCCCGCATTGCTCTTTTA	120
F-895	CGGTCTGCTCTGTTCCATCCAGCACTCACCTCCAATATGCTCTCTCACATCAGTCTTCTC	120
	***** ***** ** * ** ***** *	

**Abbildung 16:** Sequenzabgleich der ersten 120 Nukleotide der DNA-Sequenz der Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP (GenBank Accession Number: 01000322.1) mit der Sequenz aus dem „*de novo Assembly*“ des Genoms aus *R. solani* F-895. Das entdeckte Stop-Codon im Leseraster der Sequenz aus *R. solani* F-895 wurde rot hervorgehoben. Die Start-Codons für die jeweiligen Laccasegene wurden hellblau markiert und im Falle der *R. solani* F-895 Laccase angepasst.

<sup>b</sup> Das „*Assembly*“ und „*mapping*“ der Genomdaten wurde von Tino Polen (IBG-1, FZ Jülich) durchgeführt.

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass sich nach dem „*de novo Assembly*“ des *R. solani* F-895 Genoms das Stop-Codon zum Ende der Gensequenz nicht mehr im Leseraster des vorhergesagten *R. solani* F-895 Laccasegens befindet. Dies lässt darauf schlussfolgern, dass die Intron- und Exonsequenzen des Gens neu überprüft werden müssen. Dafür wurde vorerst ein Needleman-Wunsch „*global Aligment*“ der neuen Sequenz aus dem „*de novo Assembly*“, mit dem Referenzgen aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP durchgeführt (siehe Anhang).<sup>[102]</sup> Innerhalb dieses „*Alignments*“ wurden die voraussichtlich codierenden Bereiche (Exons) markiert welche am Ende für die putative 561 Aminosäuren lange Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP (NCBI-Eintrag: RSOL\_189940) codieren. Im Anschluss wurden die dazu komplementären Bereiche der Sequenz des „*de novo Assembly*“ markiert, welche dementsprechend für die putative Laccase aus *R. solani* F-895 codieren würden. Dabei galt die Annahme, dass die Exons und Introns für beide Gene gleich organisiert sind. Aus dem daraus resultierenden, codierenden Bereich, ergab sich eine neue mögliche Gensequenz für RSL F-895, welche für eine 529 Aminosäuren lange Laccase codieren würde (Abbildung 17).

**Gensequenz :** 1557 bp

```
ATGCTCTCTCACATCAGTCTTCTCTCTTTGCTTGCTGCGGTCTCACAGCCCGCCTTTGCTGCCGTCCGCGACTACCAGTTTCAT
CATCAAGAACGTCAATACCGCTCCCGATGGCTTTGAGCGATCTATTGCTCCGTCATGGCCAGGTTCCCTGGGACGTTAATCA
CGGTAACAAGGGTGATACGTTGCATGTGAATGTCACAAATCTTCTCAGTATCCAACGATGCGTCGTGTACAACAATTCAT
TGGCACGGATTGTTCCAAGCTACTACTGCTGATGAGGATGGTCTGCTTGTGTCACGCAATGTCCATTGCACAGAATTTGTC
TTATACATACGAGATCCCACTGCACGACCAAAACGGAACTATGTGGTATCACGCCATCTTGCAAGTCAATATGTGGATGGAT
TGCGGGGACCTTTGGTCATATATGACCCCAATGATCCACACAAGTCACTCTACGATGTGGACGATGCTAGCACCGTGGTTATG
CTCGAAGACTGGTATCACACTCCGGCACCCACTCTAGAACACCAAAATGTCTCGACTAGCAATACCGCCTTACTCTCTCCGGT
TCCGGACTCGGGTCTTATCAATGGAAAAGGTCGCTACGTGGGCGGACCCCAAGTCCCCCGGTGCGTAATCAACGTGACTCGCG
GAAACGATATCGCTTGCGCGTGATCAATGCTTCCGATTTGGTTTCATTCACTTTTTCGATCGAGGGACATCGCTTGACTGTC
ATTGAGGCCGATGGAATCCACACTGAGCCTTTGGTCGTCGATAGTTTCCAGATCTATGCCGGTCAACGCTATTCTGTCAATTTG
CGAAGCCAACCAGACCCTGCTAACTACTGGGTACGCGCTCCAATGACAGTTCGAGGGGCTGGTACCAATGCCAACCTTGACC
CCACTAATGTCTTTGCCGTGCTGCATTACGAAGGAGCGCCAGCGGCGAGCCTACGACTGAGCAAGGTACTGCGATTGGTACT
GCGTTGGTGAAGAAAACCTGCATGCGCTGATAAACCCCGGTGCTCCGGGCGGTTCTGCCCCAGCAGACGTTAGCCTTAACCT
CGCGATAGGACGTTCTACTGTCGACGGAATCTTAGGTTTACCTTCAACAATATCAAGTATGAGGCTCCATCGCTTCCAACGC
TTCTTAAGATCCTATCTAACGGAGCTTCTAATAATGCTGATTTTGACGCAAGTGAACACACTATCGTACTGCCCCATAATAAA
GTTATTGAATCAACATTACTGGAGGTGCAGATCACCCATTCATCTCCAGGCCACGTTATTTGACGCTCAAGTCCCTCCG
TGGTACCCCGAAGTATGTGAACCTTCCGAGGGATCGTTCGTTGTCGAGGACGCGGTGTCGCTTCTGTTCAAGACCG
ATAACCTGGTCCCTGGTTCGTTCACTGCCACATTGACTGGCACTTGGAAAGCCGGACTTGCCTTAGTCTTTGCCGAAGCTCCT
GACGAGGTTCCGAGGGTCCCAGTCTGTTTCCAGCCAGTGGTTTCCGAAACCAACTCTGCCCAAGTATGCGGCTCTCCCTGC
CGAGTTGCAGTAA
```

**Aminosäuresequenz :** 529 AS

```
MLSHISLLSLLAAVSQPAFAAVRDYQFI IKNVNTAPDGFERSIVSVNGQVPGTLITANKGDTLHVNVNLLTDPT
MRRATTIHHWGLFQATTADEDGPAFVTQCPIAQNLSYTYEIPLHDQGTGMWYHAHLASQYVDGLRGPLVIYDPND
PHKSLYDVDDASTVVMLEDWYHTPAPTLEHQMFSTSNALLSPVPDSGLINGKGRYVGGPQVPRSVINVTRGKRY
RLRVINASAIGSFTFSIEGHRLTVIEADGIPHEPLVVDSFQIYAGQRYSVIVEANQTAANYWVRAPMTVAGAGTN
ANLDPTNVFAVLHYEGAPSGEPTTEQGTAIGTALVEENLHALINPGAPGGSAPADVSLNLAIGRSTVDGILRFTE
NNIKYEAPSLPTLLKILSNGASNNADFDASEHTIVLPHNKVIELNITGGADHPIHLHGHVFDVVKSLGGTPNYVN
PPRRDVVRVGGTGVVLRFKTDNPGPWFVHCHIDWHLEAGLALVFAEAPDEVRRQGSQSVQPSGSWNQLCPKYAALP
AELQ
```

**Abbildung 17:** Codierende Gensequenz für die Laccase aus *R. solani* F-895 (RSL F-895) und daraus resultierende Aminosäuresequenz des Proteins, inklusive übereinstimmender Sequenzen aus der MALDI-TOF Analyse der gereinigten Proteinprobe. Die Vorhersage des codierenden Teils (Exon) der Gensequenz basiert auf dem „*Alignement*“ der Gensequenz aus dem „*Assembly*“ der Genomsequenzierung von *R. solani* F-895 mit der Gensequenz der putativen Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP (GenBank Accession Number: 01000322.1) und anschließender Markierung der komplementären Bereiche (siehe Anhang). Zuvor identifizierte Peptide aus der MALDI-TOF Analyse sind gelb markiert. Auf Basis der Originalsequenz neu identifizierte Peptide sind grün unterlegt. Eine mit Hilfe der *Phobius signale peptide* Software vorhergesagte Signalsequenz wurde hellblau markiert.

Im Anschluss wurde diese neu vorausgesagte Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt und mit der Aminosäuresequenz der putativen Laccase aus *R. Solani* AG-3 Rhs1AP verglichen (siehe Anhang). Anhand der neuen Aminosäuresequenz konnten zusätzliche drei Peptide aus der MALDI-TOF Analyse identifiziert werden, welche einzigartig für RSL F-895 sind und nicht in der Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP vorkommen (Abbildung 17). Dies kann als starkes Indiz dafür gewertet werden, dass die neue Sequenz der gesuchten Originalsequenz entspricht. Die neue Sequenz entspricht jedoch noch immer der Annahme, dass die Exons und Introns der Laccasen aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP und F-895 gleich organisiert vorliegen. Um dies zu verifizieren wurde zusätzlich das Transkriptom von *R. solani* F-895 untersucht. Dafür wurde der Pilz in Glycerol-Medium und in Erbsen-Medium kultiviert. Während im ersten Medium keine Laccaseaktivität im Kulturüberstand gemessen werden konnte, konnte für die Expression in Erbsen-Medium Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9) gemessen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Es ist daher davon auszugehen, dass der Pilz die extrazellulären Laccasen nur dann produziert und sekretiert, wenn er für das Wachstum ausschließlich Lignin-haltige Nährstoffe zur Verfügung stehen hat.<sup>[103, 104]</sup> Im Anschluss an die Kultivierung wurde die RNA isoliert und die erhaltenen RNA-Proben jeweils für die Untersuchung des Transkriptoms an die Arbeitsgruppe von Prof. Björn Usadel (FZ Jülich, IBG-2) übergeben. Die folgende Untersuchung des Transkriptoms von *R. solani* F-895 bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse aus der Genomsequenzierung. So konnten keine RNA-Daten erhalten werden, welche der N-terminalen Sequenz von RSL entspricht. Dies stützt die zuvor in der Genomsequenzierung erhaltenen Daten, wobei es sich bei RSL F-895 um eine verkürzte Variante handeln könnte. Die Analyse der neu generierten Daten mit Hilfe des *Phobius signale peptide* Programms zeigte zusätzlich, dass die neue Sequenz vermutlich ein 20 Aminosäuren langes, N-terminales Sekretionssignal enthält (Abbildung 17). Für diesen Bereich konnten jedoch keine Peptide in der MALDI-TOF Analyse gefunden werden. Es ist möglich, dass die Signalsequenz beim Export des Proteins aus *R. solani* F-895 entfernt wird.

### 2.2.3 Expressionsversuche der *R. solani* F-895 Laccase in *E. coli*

Auf Basis der Genomdaten, der Transkriptomdaten und den Daten der MALDI-TOF Analyse wurde ein weiteres synthetisches Gen, ohne Sequenz für das vorhergesagte Signalpeptid, geordert. Dieses wurde für die entsprechende Klonierung in den pColA Vektor so designed, dass es an beiden Enden *NcoI*-Restriktionsschnittstellen besitzt. Das synthetische Gen wurde folglich mit dem *NcoI*-Restriktionsenzym geschnitten und in den Zielvektor kloniert. Die korrekte Ausrichtung des Gens wurde anschließend mittels Sequenzierung des betreffenden Bereiches des Vektors verifiziert. Nach der erfolgreichen Sequenzierung wurden drei unterschiedliche *E. coli*-Stämme durch das Einbringen des Vektors transformiert. Bei den unterschiedlichen Stämmen handelte es sich um die Stämme BL21(DE3), Rosetta (DE3) und Arctic Express (DE3). Der erste Stamm repräsentiert dabei den standardmäßigen Expressionsstamm, wohingegen Rosetta (DE3) und Arctic Express (DE3) speziell für die heterologe Expression von schwierig zu exprimierenden Genen entwickelt wurden. Rosetta (DE3) enthält im Gegensatz zu BL21(DE3) seltene tRNAs für die Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA. Da

diese Codons in *E. coli* ansonsten nur sehr limitiert vorkommen, kann die Supplementierung die Expression von eukaryotischen Genen in *E. coli* ermöglichen oder verbessern.<sup>[105]</sup> Der Stamm Arctic Express (DE3) wurde dagegen für die Expression unter niedrigen Temperaturen (10-13 °C) optimiert, da bei diesen Temperaturen die Zellen mehr Zeit haben das Protein korrekt zu prozessieren.<sup>[106]</sup> Der *E. coli* eigene Chaperonin-Komplex aus GroEL/ES weist bei dieser Temperatur nur eine geringe Aktivität auf. Daher exprimiert Arctic Express (DE3) zusätzlich die kälteadaptierten Chaperonine aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica*. Diese besitzen eine hohe Aktivität bei 4–12 °C und können das Wachstum von *E. coli* bei geringen Temperaturen, sowie die lösliche Expression heterologer Proteine weiter verbessern.<sup>[107]</sup>

Die drei unterschiedlichen Stämme wurden im Anschluss auf eine mögliche Produktion löslicher und aktiver Laccase getestet. Als Kontrolle dienten jeweils Kulturen, welche nur den Leervektor enthielten. Nach der Kultivierung wurde die optische Dichte der Kulturen bestimmt, um zu kontrollieren, ob die heterologe Expression von RSL F-895 zu einem verringerten Wachstum der Zellen führt. Ein verringertes Wachstum kann bei der heterologen Expression auftreten, wenn das wirtsfremde Gen für den Organismus beispielsweise eine hohe Belastung des Metabolismus zur Folge hat.<sup>[108]</sup> Interessanterweise wuchsen alle Kulturen in denen die putative Laccase aus *R. solani* F-895 (RSL F-895) exprimiert wurde besser als die Kontrollkulturen, welche nur den Leervektor (LV) enthielten (Tabelle 1).

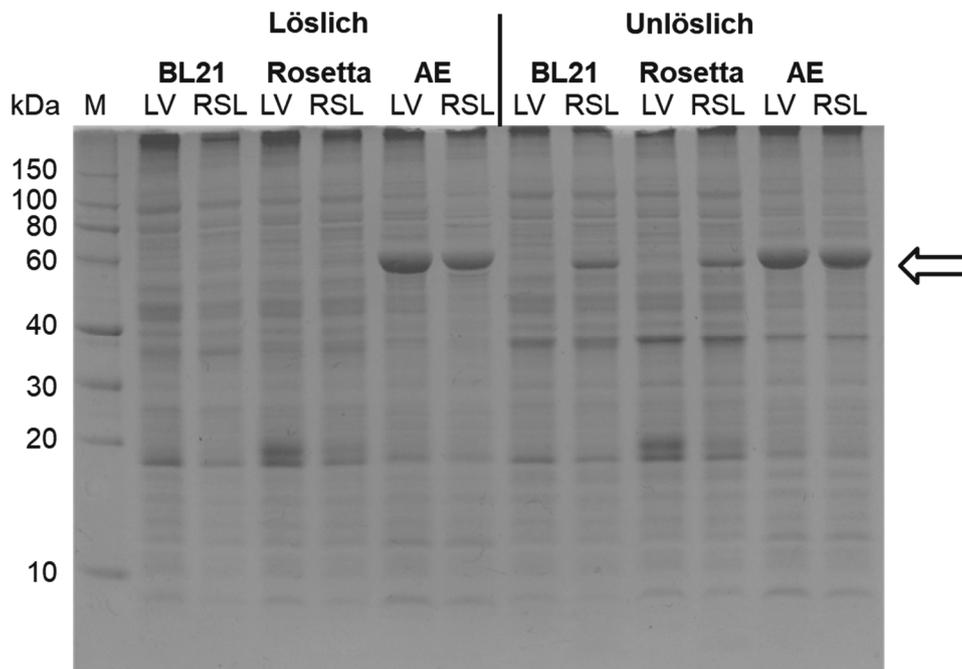
**Tabelle 1:** Einfluss der Expression von RSL F-895 auf das Wachstum unterschiedlicher *E. coli*-Stämme. Die Kulturen wurden jeweils auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0.1 inokuliert und für ca. drei Stunden bis auf eine optische Dichte von ~0.6 angezogen, bevor die Expression durch Zugabe von IPTG induziert wurde. Die Kulturen wurden für 20 Stunden bei einer Temperatur von 25 °C (BL21 (DE3), Rosetta (DE3)) bzw. 13 °C (Arctic Express (DE3)) und 130 rpm inkubiert. Als Kontrolle diente der jeweilige Stamm mit Leervektor (LV).

	LV	RSL F-895
	[OD <sub>600 nm</sub> ]	[OD <sub>600 nm</sub> ]
BL21 (DE3)	7.57	9.41
Rosetta (DE3)	5.24	6.94
Arctic Express (DE3)	1.29	1.92

Es ist zwar bekannt, dass die heterologe Expression zu erhöhten Wachstumsraten führen kann, diese beruhen aber meist auf positive Eigenschaften der heterolog exprimierten Proteine auf den Organismus.<sup>[107,109]</sup> Ein solch positiver Nebeneffekt ist bei der bekanntermaßen schwierigen Expression von ligninolytischen Proteinen aus Pilzen in *E. coli* nicht zu erwarten. Es ist aber auf der anderen Seite wichtig, dass die Expression nicht zu einer Verminderung des Wachstums führt.

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

Nach der Zellernte wurden die jeweiligen Kulturen zur besseren Vergleichbarkeit mit Kaliumphosphatpuffer auf dieselbe optische Dichte ( $OD_{600} = 10$ ) eingestellt, mit Ultraschall aufgeschlossen und das Zelllysate (lösliche Fraktion) mittels Zentrifugation vom Zellpellet (unlösliche Fraktion) getrennt. Die im Zellpellet enthaltenen unlöslichen Proteine und die im Lysat enthaltenen löslichen Proteine, wurden anschließend mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und untersucht. Dabei zeigte sich, dass in keiner löslichen Fraktion eine Bande bei dem erwarteten Molekulargewicht von 57 kDa sichtbar war (Abbildung 18). Im Falle der Expression in Arctic Express (DE3) handelt es sich bei der intensiven Bande bei 60 kDa um ein Chaperonin (Cpn60), ersichtlich aus der Betrachtung der Leervektorkontrolle.<sup>[110]</sup> Stattdessen konnte allerdings eine schmale Bande bei ~60 kDa in der unlöslichen Fraktion von BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) detektiert werden, welche sich in der entsprechenden Höhe befindet und in den Leervektorkontrollen nicht vorhanden ist (Abbildung 18). Nichtsdestotrotz ist es in keinem der verwendeten Stämme gelungen die Laccase löslich zu exprimieren (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der Expression von RSL F-895 in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen. Aufgetragen wurde sowohl die lösliche als auch die unlösliche Fraktion, nach Lyse der Zellen mit Hilfe von Ultraschall. M = Roti-Mark 10-150, LV = Leervektorkontrolle, RSL = RSL F-895, AE = Arctic Express. Die erwartete Bandenhöhe bei ~57 kDa wurde mit einem Pfeil markiert.

Dies führt zu der Annahme, dass das Gen zwar erfolgreich exprimiert wurde, das Protein aber nicht korrekt gefaltet vorlag. Als solches kann es bekanntermaßen in sogenannten „inclusion bodies“ aggregieren und eingeschlossen sein.<sup>[111]</sup> Die Proteinbanden bei ~57 kDa in den unlöslichen Fraktionen von BL21 (DE3) und Rosetta (DE3) sind für eine stark induzierte Expression zusätzlich von geringer Intensität. Daher ist es zudem möglich, dass Probleme bei der Translation vorlagen oder das fehlgefaltete Protein teilweise proteolytisch abgebaut wurde. Andererseits könnten geringe Mengen lösliches und funktionales Protein vorgelegen haben, diese jedoch auf Grund ihrer geringen Konzentration auf dem

SDS-Gel nicht ersichtlich sein. Aus diesem Grund wurden zusätzliche Aktivitätstests gegenüber den Substraten ABTS (8) und 2,6-DMP (9) durchgeführt. Es konnte jedoch für keine der Proben Laccase-Aktivität detektiert werden. Da es vorkommen kann, dass die Proteinaggregate in den „*inclusion bodies*“ ebenfalls noch Aktivität aufweisen können, wurden an dieser Stelle auch die unlöslichen Fraktionen untersucht.<sup>[112-114]</sup> Auch diese Untersuchungen blieben jedoch ohne Erfolg.

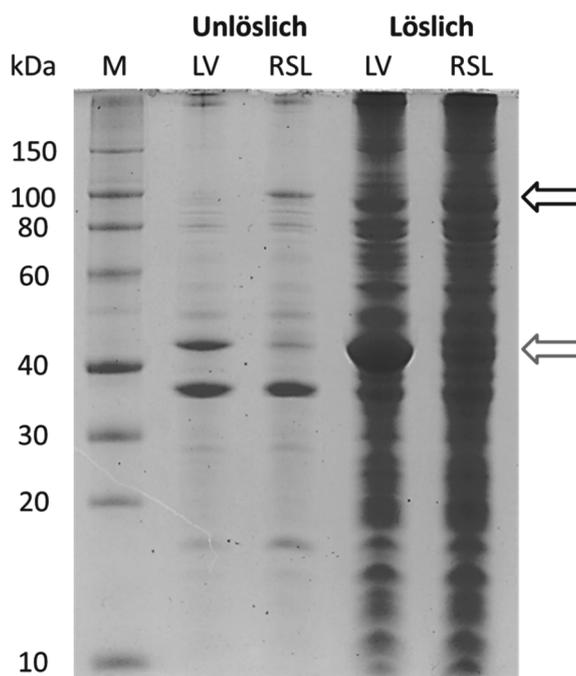
In einem Prozess von Entfaltung und Refaltung können Enzyme aus „*inclusion bodies*“ manchmal in eine lösliche und aktive Form überführt werden. Dieser Prozess wurde zuvor an zahlreichen Beispielen erfolgreich durchgeführt.<sup>[115-117]</sup> Er ist jedoch mit verhältnismäßig großem Aufwand verbunden und garantiert ebenfalls nicht den Erhalt von löslichem und aktivem Protein. In Anbetracht der geringen produzierten Menge und dem Ziel das Protein biotechnologisch zu verwenden wurde dieser Ansatz nicht verfolgt.

Stattdessen wurde eine weitere Möglichkeit getestet ein zuvor unlösliches Protein, löslich in *E. coli* zu exprimieren. Dies geschieht indem man es mit einem sogenannten „Löslichkeitstag“ fusioniert. Bei diesem handelt es sich um ein nachweislich gut exprimierbares Peptid oder Protein.<sup>[118-120]</sup> Eines der prominentesten Beispiele für einen Löslichkeitsvermittler ist das Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli*.<sup>[121-123]</sup> Es kann nicht nur eine erhöhte Löslichkeit des fusionierten Proteins in *E. coli* ermöglichen, sondern auch die korrekte Faltung in seiner aktiven Form vermitteln.<sup>[123]</sup> Der zugrunde liegende Mechanismus, welcher zur erhöhten Löslichkeit fusionierter Enzyme führt ist jedoch noch nicht vollständig entschlüsselt worden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass MBP eine eher passive Rolle einnimmt und nicht direkt als Chaperon mit dem fusionierten Enzym interagiert und auch keine Chaperone aktiv rekrutiert.<sup>[124]</sup> Stattdessen wurde ein Modell als „Holdase“ vorgeschlagen.<sup>[125]</sup> In diesem Modell fungiert MBP als Fusionsprotein, welches die Aggregation des ungefalteten Fusionspeptides solange verhindert, bis ein Chaperonkomplex die korrekte Faltung ermöglicht. Erst kürzlich konnte mit Hilfe des MBP die heterologe Expression einer L-amino Oxidase aus *R. solani* in *E. coli* realisiert werden.<sup>[126]</sup>

Dementsprechend sollte das synthetische Gen für RSL F-895 in den kommerziellen Vektor pMal-c5x eingebracht werden. Bei dem Vektor pMal-c5x handelt es sich um einen kommerziellen Vektor, auf dem sich bereits das *malE* Gen für das Maltose-Bindeprotein aus *E. coli* befindet. Dieses ist über einen Linker N-Terminal mit dem zu fusionierenden Gen verbunden. In dieser Linkersequenz befindet sich außerdem eine zusätzliche Protease-Schnittstelle, an der sich nach erfolgreicher Expression das Zielprotein von dem Maltose-Bindeprotein trennen lässt. Dies ist notwendig, da die Aktivität oder Substratspezifität des Zielproteins durch die Fusion an das MBP beeinflusst werden kann.<sup>[127]</sup> Weiterhin ermöglicht die Fusion an das MBP die Aufreinigung des Fusionsproteins mit Hilfe einer Amylose basierten Affinitätschromatographie.<sup>[128, 129]</sup> Für die Klonierung wurde das neue Laccasegen erneut mit dem *NcoI*-Restriktionsenzym aus dem Vektor pColA ausgeschnitten und in den Vektor pMal-c5x transferiert. Die erfolgreiche Klonierung wurde erneut durch Sequenzierung des betreffenden

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

Genabschnitts verifiziert. Im Anschluss an die erfolgreiche Klonierung wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit dem neuen Vektor transformiert und die Expression des Fusionsproteins getestet. Gemäß dem vorherigen Protokoll wurden erneut die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen, mit Hilfe von Ultraschall und Zentrifugation, getrennt und diese anschließend über SDS-Gelelektrophorese untersucht. Während das MBP in der Leervektorprobe in hohem Maße löslich exprimiert wurde, ließ sich jedoch keine vergleichbare Expression eines löslichen Fusionsproteins erkennen (Abbildung 19). Das Maltosebindeprotein war demnach nicht in der Lage die lösliche Expression von RSL F-895 in *E. coli* zu vermitteln.



**Abbildung 19:** SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der Expression eines Fusionsproteins des Maltosebindeproteins aus *E. coli* und RSL F-895, in *E. coli* BL21 (DE3). Aufgetragen wurde sowohl die lösliche als auch die unlösliche Fraktion, nach Lyse der Zellen mit Hilfe von Ultraschall. M = Roti-Mark 10-150, LV = Leervektorkontrolle, RSL = MalE RSL F-895. Die Bande für MBP bei ~42 kDa wurde mit einem grauen Pfeil und die erwartete Bande für das Fusionsprotein bei ~100 kDa mit einem schwarzen Pfeil markiert.

In der unlöslichen Fraktion ist jedoch eine schwache Bande des möglichen Fusionsproteins bei ca. 100 kDa erkennbar, welche in der Leervektorkontrolle nicht vorhanden ist. Daher ist zu vermuten, dass eine schwache Expression des Fusionsproteins vorgelegen haben könnte, dieses aber in seiner Gesamtheit unlöslich war. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass das MBP zwar korrekt gefaltet war, der Fusionspartner aber nicht.<sup>[122]</sup> Dies muss nicht zwangsläufig zur Unlöslichkeit des gesamten Fusionsproteins führen. Die Kombination von korrekt gefaltetem MBP und unkorrekt gefaltetem Fusionspartner führte bei Sachdev *et al.* zu einem insgesamt löslichen Komplex, in dem der Fusionspartner allerdings keine Aktivität aufwies.<sup>[122]</sup> Es bestand demnach die Möglichkeit, dass nur ein bestimmter Anteil des Fusionsproteins unlöslich vorlag und zusätzlich eine geringe Konzentration lösliches Fusionsprotein vorhanden war. Daher wurde erneut ein Aktivitätstest mit den löslichen Proben durchgeführt. Es konnte jedoch erneut keine Laccase-Aktivität detektiert werden. Die Fusionsproteine

lagen demnach entweder vollständig unlöslich und inaktiv vor, oder es gab einen Anteil fusionierter und löslicher Laccase, der aber trotzdem keine Aktivität zeigte, da er nicht korrekt gefaltet war.

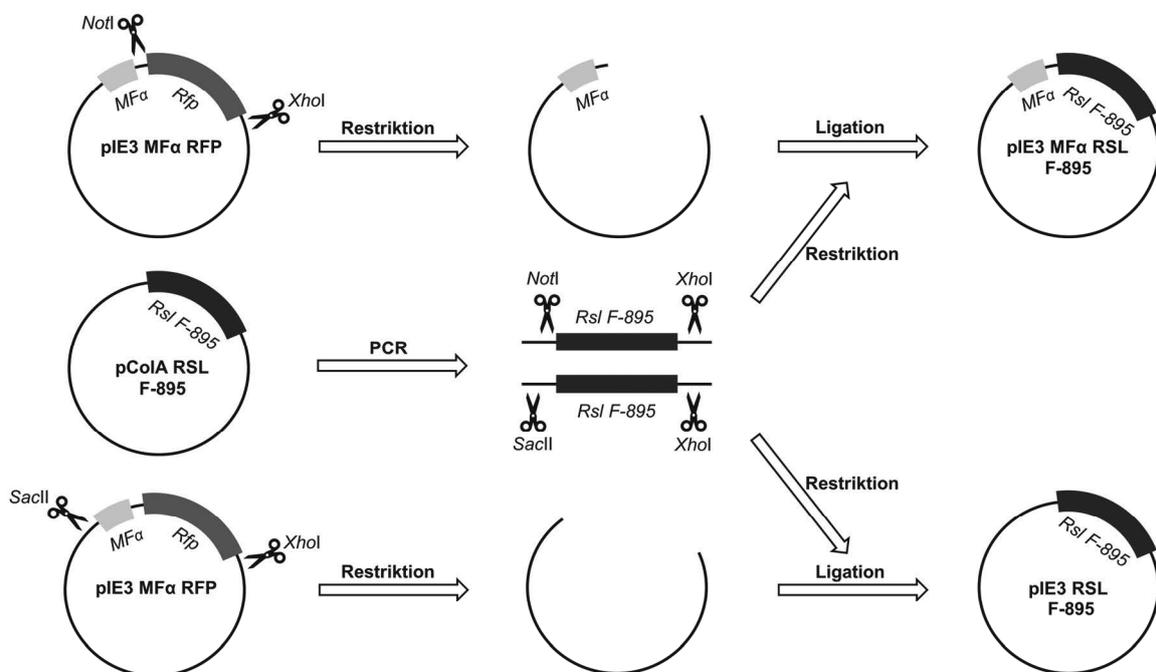
#### 2.2.4 Expressionsversuche der *R. solani* F-895 Laccase in *S. cerevisiae*

Da die Expression von RSL F-895 als Fusionsprotein mit dem MBP in *E. coli* ebenfalls nicht erfolgreich verlief wurde alternativ ein eukaryotisches Expressionssystem ausprobiert. Der große Vorteil eines eukaryotischen Expressionssystems liegt in der Fähigkeit das Zielprotein post-translational modifizieren zu können. Da RSL F-895 in seiner ursprünglichen Form stark glykosyliert vorliegt, kann dies ein Grund dafür sein, dass sie sich nicht löslich in *E. coli* exprimieren ließ. Die Glykosylierung ist oftmals wichtig für die Löslichkeit dieser Proteine, als auch häufig mitverantwortlich für deren adhäsive Eigenschaften. Beide Aspekte können für sekretierte, ligninolytische Laccasen von großer Bedeutung sein.<sup>[130]</sup>

Als neuer Hostorganismus wurde *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt, da für diesen Organismus bereits ein Expressionsstamm und entsprechende „Shuttle“-Plasmide, die als Vektor zwischen *E. coli* und *S. cerevisiae* fungieren können, vorlagen. Als Stamm diente *S. cerevisiae* BY4741 (Y00000). Dieser ist prototroph für den „Mating Factor  $\alpha$ “ ( $MF\alpha$ ) und weist vier Auxotrophien für die Aminosäuren Histidin, Leucin, Methionin und für die Nukleinbase Uracil auf.<sup>[131]</sup> Komplementiert wird das System von einem Plasmid, welches das *Ura3*-Gen enthält, wodurch die Hefe nach Aufnahme des Plasmides in der Lage ist Uracil zu produzieren. Das entsprechende Medium wird mit den notwendigen Aminosäuren (His, Leu, Met) supplementiert, enthält aber für die Suche nach erfolgreich transformierten *S. cerevisiae* Klonen kein Uracil. Erfolgreich transformierte Klone können somit auf Agarplatten unter Abwesenheit von Uracil identifiziert werden, da nur diese in der Lage sind zu wachsen. Das  $MF\alpha$ -Gen wiederum erlaubt die Sekretion von Proteinen in das Medium, im Anschluss an ihre Expression. Dafür wird das Gen des Zielproteins auf dem Plasmid (z.B. *Rsl F-895*) mit der Gensequenz für das Präpro-Segment des  $\alpha$ -Faktor Paarungspheromon der Hefen ( $MF\alpha$ ) fusioniert. Auf diese Weise wird ein Fusionsprotein aus dem Zielprotein und der Präpro-Sequenz erhalten, welches durch die Hefe über membranständige Transporter sekretiert werden kann. In diesem Prozess wird die Präpro-Sequenz wiederum von der Dipeptidyl Aminopeptidase A abgespalten.<sup>[132, 133]</sup> Die Sekretion von Proteinen in das Medium kann dabei einen großen Vorteil gegenüber der Expression in den Zellen darstellen. Sie vereinfacht im Anschluss an die Fermentation die weitere Prozessierung, da sich im Kulturüberstand wenig Proteine befinden. Dadurch wird die Aufreinigung des Zielproteins erheblich erleichtert.<sup>[134]</sup> Weiterhin erlaubt die Sekretion eine kontinuierliche Fermentation, da durch Austausch des Mediums das Protein erhalten werden kann ohne die Zellen zerstören zu müssen.<sup>[135]</sup> Da noch keinerlei Informationen über die heterologe Expression der Laccase aus *R. solani* F-895 in *S. cerevisiae* bekannt sind, wurde sowohl ein Konstrukt mit entsprechendem Sekretionssignal konstruiert, als auch ein Konstrukt ohne Sekretionssignal. Diese Variante erlaubt es auszuschließen, dass die Präpro-Sequenz einen Einfluss auf die Faltung und Aktivität des Enzyms hat.

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

Um diesen Plan zu realisieren wurde der Vektor pIE3\_RFP („red fluorescent protein“) genutzt, welcher auf der Basis des Vektors pIE3\_YFP („yellow fluorescent protein“) basiert.<sup>[136, 137]</sup> Der Vektor enthält sowohl das *Ura3*-Gen, als auch die Gensequenz für das Präpro-Segment (*MF $\alpha$* ), für die Sekretion über den „Mating Factor  $\alpha$ “-Apparat. Das Gen steht wiederum unter der Kontrolle des starken *Gall*-Promotors.<sup>[138]</sup> Für die zwei unterschiedlichen Klonierungen wurde das Gen für RSL F-895 mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“ = PCR) aus dem pColA-Vektor amplifiziert und gleichzeitig mit einer *Xho*I-Schnittstelle versehen. Auf diese Weise konnte das Laccasegen auf zwei unterschiedliche Arten in den Zielvektor integriert werden. Im ersten Ansatz ersetzt das Laccasegen die vorherige Gensequenz des rot fluoreszierenden Proteins. Damit entsteht ein Konstrukt für RSL F-895 mit Sekretionssignal (*MF $\alpha$*  RSL F-895). Für das zweite Konstrukt wurden sowohl das Sekretionssignal als auch das *Rfp*-Gen durch das Laccasegen ersetzt, wodurch eine Variante der Laccase ohne Sekretionssignal (RSL F-895) exprimiert wird (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Klonierungsstrategie für die Generierung der zwei Plasmide für die Expression der *R. solani* F-895 Laccase, mit und ohne Sekretionssignal, in *S. cerevisiae*.

Der Erfolg der PCR und der Restriktionen wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und die jeweiligen DNA-Fragmente aufgereinigt. Diese wurden anschließend aus dem Gel eluiert und die entstandenen Enden über einen Ligationsschritt miteinander verbunden. Durch dieses Vorgehen wurden beide Vektoren erhalten und die korrekte Sequenz des betreffenden Genabschnitt über eine Sequenzierung verifiziert. Infolgedessen wurde *S. cerevisiae* durch das jeweilige Einbringen der Vektoren transformiert und die erfolgreiche Transformation durch eine erneute Sequenzierung des relevanten Genabschnittes bestätigt.

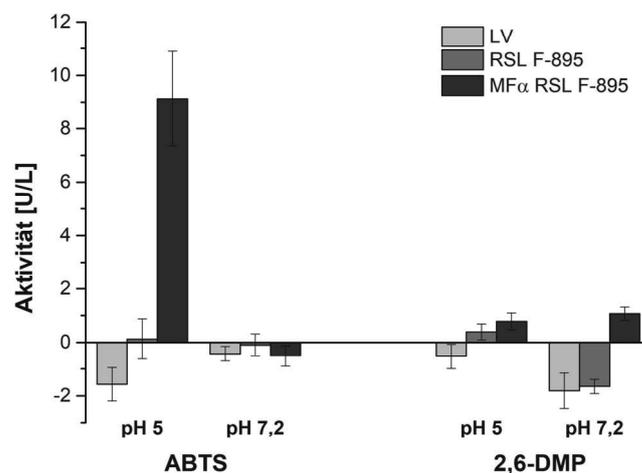
Die neu generierten *S. cerevisiae* Stämme wurden in Hefe-Pepton-Medium mit Galaktose kultiviert. Nach der Zellernte durch Zentrifugation wurde der Kulturüberstand abdekantiert und das Zellpellet mit

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

Ultraschall aufgeschlossen. Sowohl das erhaltene Zellysate als auch der Kulturüberstand wurden auf Laccaseaktivität untersucht. Parallel wurden Proben für die Untersuchung mittels SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Im Falle einer erfolgreichen Expression würde Laccaseaktivität im Zellysate des Konstruktes ohne Sekretionssequenz erwartet, wohingegen die Laccaseaktivität des Konstruktes mit Sekretionssignal zum überwiegenden Teil im Kulturüberstand erwartet würde. Es konnte jedoch weder im Zellysate, noch im Kulturüberstand beider Varianten Laccaseaktivität detektiert werden. Weiterhin war keine Proteinbande auf dem SDS-Gel erkennbar, welche nicht ebenfalls in der Negativkontrolle vorhanden war (siehe Anhang, Abbildung 126). Die initiale Expression in *S. cerevisiae* war demzufolge nicht erfolgreich.

Ein möglicher Grund kann dabei die Anwesenheit von Glukose aus der Vorkultur gewesen sein. In Anwesenheit von Glukose wird die Expression von Genen unter der Kontrolle des *Gall*-Promotors über zwei unterschiedliche Systeme unterdrückt. Solange Glukose im Medium existiert werden diese Gene nicht abgelesen und eine Expression findet nicht statt.<sup>[138, 139]</sup> Wird die restliche Glukose verbraucht benötigt das System trotzdem mehrere Stunden bis die Gene unter der Kontrolle des *Gall*-Promotors wieder normal abgelesen werden. In Folge dessen wurde die Glukose-Konzentration in der Vorkultur auf 0.1 % (w/v) reduziert und der Rest durch Raffinose ersetzt. Zusätzlich wurde erprobt, ob die Zugabe von Kupfer einen Einfluss auf die erfolgreiche Expression der Laccase in *S. cerevisiae* hat. Oftmals besteht ein Zusammenhang zwischen der Zugabe von Kupfer und der heterologen Expression aktiver Laccase.<sup>[140, 141]</sup> Weder die Verringerung der Glukose-Konzentration in der Vorkultur, noch die Zugabe von Kupfer führten jedoch zur Detektion von Laccaseaktivität oder zu einer sichtbaren Proteinbande auf dem SDS-Gel, welche nicht in den Negativkontrollen ersichtlich war (siehe Anhang, Abbildung 127). Aufgrund dessen wurde die Expressionstemperatur auf 20 °C herabgesetzt, da die erfolgreiche heterologe Expression von Laccasen in *S. cerevisiae* von der Temperatur abhängen kann und niedrigere Temperaturen diese begünstigen können.<sup>[142]</sup> Um ein ausreichendes Wachstum der Hefe zu gewährleisten wurde die Expressionszeit auf 44 Stunden erhöht. Im Anschluss wurde der Kulturüberstand erneut auf Laccaseaktivität untersucht. Dieses Mal konnte eine geringe Laccaseaktivität im Kulturüberstand der Variante detektiert werden, welche das Sekretionssignal enthielt (Abbildung 21).

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

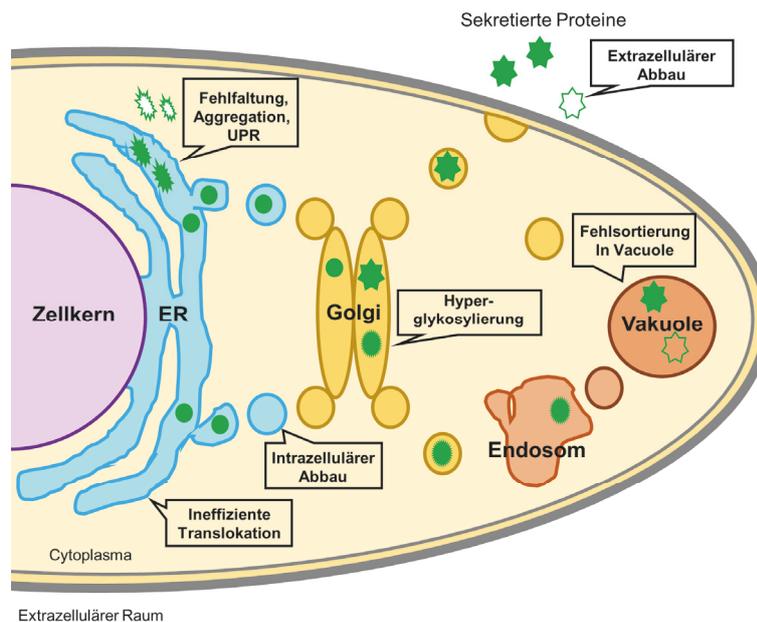


**Abbildung 21:** Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9), bei 25 °C, im Kulturüberstand der heterologen Expression von RSL und MF $\alpha$  RSL aus *R. solani* F-895 in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. Gemessen wurde die Aktivität jeweils in 20 mM Natrium-Acetat Puffer bei pH 5 und in 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer bei pH 7.2 in Anlehnung an Kolomytseva *et al.*<sup>[28]</sup> LV = Leervektorkontrolle. Alle Proben wurden drei Mal gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

In der Leervektorkontrolle (LV) sowie der Expression der Variante ohne Sekretionssignal (RSL F-895) konnte dagegen erwartungsgemäß keine Laccaseaktivität im Kulturüberstand detektiert werden. Um zu testen ob auch eine aktive Form von RSL F-895 und MF $\alpha$  RSL F-895 innerhalb der Zellen von *S. cerevisiae* vorliegt, wurden diese erneut mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zellysate auf Laccaseaktivität überprüft. Überraschenderweise wurde jedoch in keinem Zellysate Laccaseaktivität festgestellt (Ergebnisse nicht gezeigt). Auch das Zellysate von MF $\alpha$  RSL F-895 wies keine Aktivität auf, obwohl sich Laccaseaktivität im Kulturüberstand befand. Diese Beobachtungen können unterschiedliche Gründe haben. Es kann sein, dass eine vorgeschaltete Sequenz für die korrekte Faltung des Enzyms notwendig ist, da auch die natürliche Laccase eine Sekretionssequenz besitzt. Möglicherweise liegt die Laccase erst durch die extrazelluläre Sekretion in aktiver Form vor und aggregiert intrazellulär, analog zu Prozessen in *E. coli*, in „inclusion bodies“.<sup>[143]</sup> Probleme bei der korrekten Faltung des Enzyms sind dabei eines der Hauptengpässe in der heterologen Expression von Proteinen in Hefe.<sup>[144]</sup> Erst die Anwesenheit einer Sekretionssequenz kann manchmal zu einer korrekten Translokation des Enzyms vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), zum Golgi-Apparat und der Plasmamembran führen. Auf diesem Weg befinden sich zudem zahlreiche Kontrollsysteme der Hefe. Einer dieser Systeme ist das „unfolded protein response“ (UPR). Dieses wird durch das zu lange Binden von Chaperonen an teilweise fehlgefaltete Proteine aktiviert und stimuliert die Proteolyse. Zusätzlich wird die Transkription und Translokation des betreffenden Proteins inhibiert.<sup>[134]</sup> Es ist außerdem möglich, dass die korrekte Glykosylierung für die Aktivität des Proteins essenziell ist.<sup>[145]</sup> Weiterhin haben Smith *et al.* bei der heterologen Expression von Prochymosin aus dem Kalb, in *S. cerevisiae*, festgestellt, dass der Großteil des intrazellulär vorkommenden Fusionsproteins nicht vollständig glykosyliert vorlag, sondern nur die im Endoplasmatischen Retikulum angehängten basalen

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

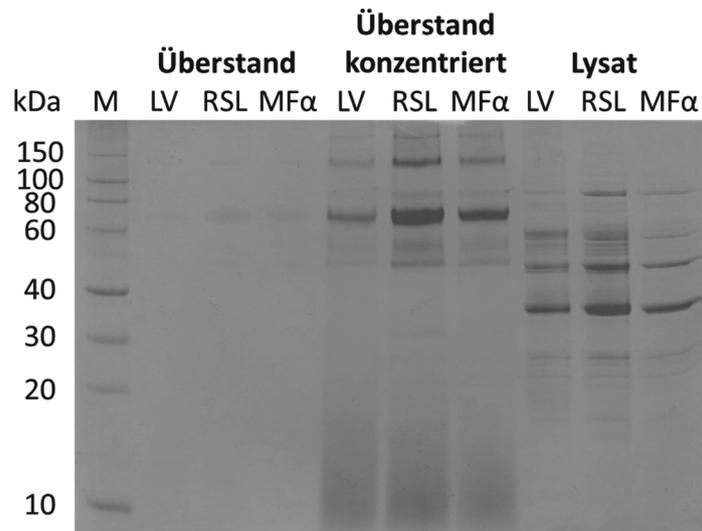
Oligosaccharide vorhanden waren.<sup>[135]</sup> Sie kamen zu dem Schluss, dass jene Proteine, welche im Golgi-Apparat vollständig glykosyliert wurden, rapide aus der Zelle transportiert worden und deshalb nicht aufzufinden waren. Anhand der Ergebnisse ist zu vermuten, dass eine solche vollständige Glykosylierung für die Löslichkeit und Aktivität der Laccase aus *R. solani* F-895 ebenfalls essenziell ist. Dies wäre eine Erklärung für die beobachtete Laccaseaktivität im Kulturüberstand bei gleichzeitiger Abwesenheit von Laccaseaktivität im Zellysate. Es ist jedoch auch möglich, dass ein anderer der vielen möglichen Engpässe ein Problem für die heterologe Expression von RSL F-895 in *S. cerevisiae* darstellt (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der möglichen Engpässe bei der heterologen Expression sekretierter Proteine in *S. cerevisiae* in Anlehnung an Idiris *et al.*<sup>[134]</sup>

Zusätzlich zu den Aktivitätstests wurden erneut Proben des Lysats und des Kulturüberstandes mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Um die geringe Konzentration an Proteinen im Kulturüberstand zu erhöhen, wurde dieser mit Hilfe einer Filtermembran, mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa, aufkonzentriert. Auf diese Weise könnten auch geringe Mengen der sekretierten Laccase auf dem SDS-Gel sichtbar werden. Beim Vergleich der Gelbanden konnte jedoch keine Proteinbande im Kulturüberstand von MF $\alpha$  RSL F-895 erkannt werden, welche nicht ebenfalls in der Leervektorkontrolle, oder in RSL F-895 ohne Sekretionssequenz, vorhanden war (Abbildung 23).

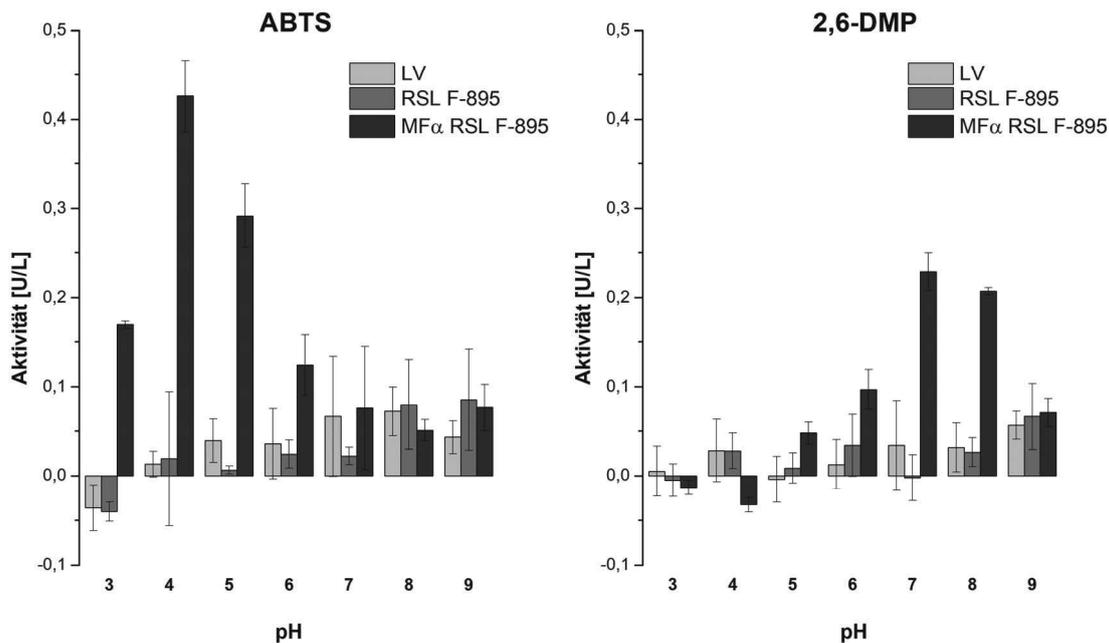
Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase  
Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 23:** SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der heterologen Expression von RSL F-895 und MFα RSL F-895 in *S. cerevisiae*. Die Proben wurden im Anschluss an eine 44 stündige Kultivierung bei 20 °C, nach der Zellernte mittels Zentrifugation, entnommen. Der Kulturüberstand wurde mit Hilfe von Vivaspin 500 Filtern (Cutoff 30 kDa, Sartorius) 10-fach aufkonzentriert. Die geernteten Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Lysate wurden die unterschiedlichen Kulturen vorab auf dieselbe OD<sub>600</sub> von 100 eingestellt. M= Roti-Mark 10-150, LV = Leervektorkontrolle, RSL = RSL F-895, MFα = MFα RSL F-895.

Im Zelllysat derselben Kulturen konnte anhand des SDS-Gels ebenfalls keine starke Expression der Laccase festgestellt werden. Da sich trotz dieser Ergebnisse Laccaseaktivität im Kulturüberstand von *S. cerevisiae* MFα RSL F-895 detektieren ließ, erfolgte im nächsten Schritt eine nähere Charakterisierung des verantwortlichen Enzyms. Dafür wurde die Aktivität in Abhängigkeit vom pH ermittelt, um zu überprüfen ob das Aktivitätsprofil vergleichbar mit jenem der Laccase aus dem Ursprungsorganismus ist.<sup>[28]</sup> Dafür wurde die Expression unter gleichen Bedingungen wiederholt und Proben des Kulturüberstandes anschließend bei unterschiedlichem pH, in Britton-Robinson Puffer, auf Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9) untersucht. Die Wiederholung des Experiments zeigte, dass sich das Aktivitätsprofil rekonstruieren ließ (Abbildung 24).

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 24:** Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9), bei 25 °C, im Kulturüberstand der heterologen Expression von RSL und MFα RSL aus *R. solani* F-895 in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. LV = Leervektorkontrolle. Alle Proben wurden drei Mal in Britton-Robinson Puffer pH 3-9 gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

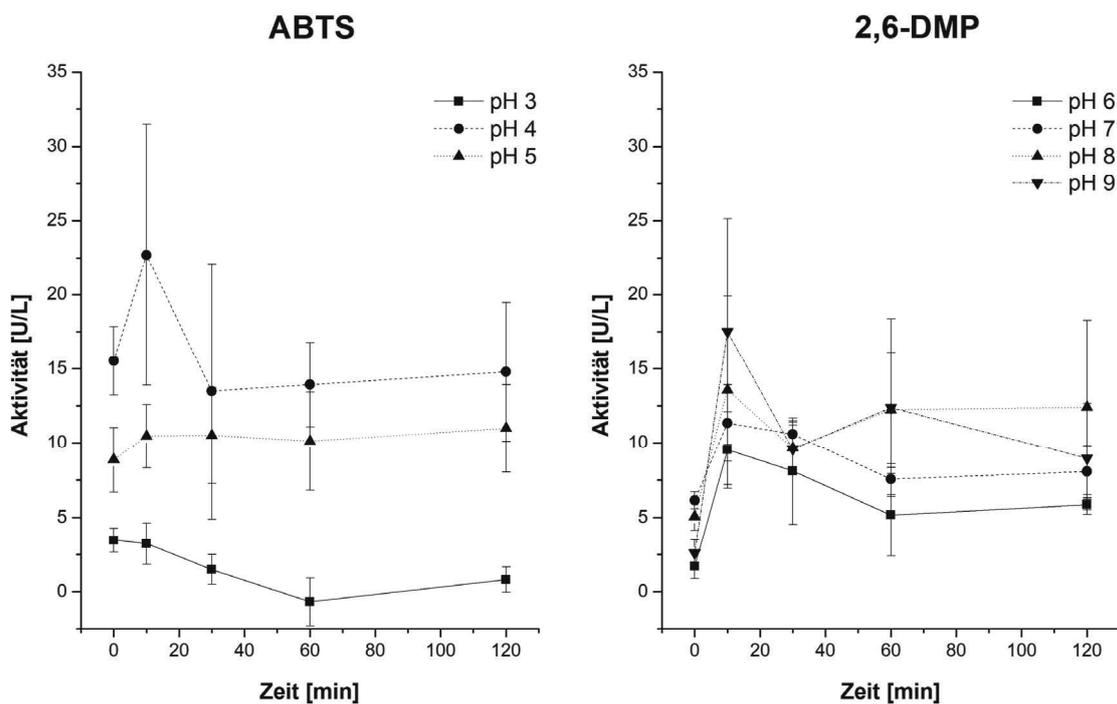
Die Laccaseaktivität im Kulturüberstand zeigte ein Optimum gegenüber ABTS (8) im Bereich pH 3-5 und gegenüber dem phenolischen Substrat 2,6-DMP (9) im neutralen bis alkalischen Bereich von pH 6 bis 8. Erneut konnte keine Laccaseaktivität in den Kulturüberständen der Leervektorprobe, oder der Laccase ohne Sekretionssequenz detektiert werden. Auffällig ist dagegen, dass die Aktivität in diesem Versuch deutlich geringer war als im vorherigen Versuch (Abbildung 21). Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, dass das Wachstum der Hefe ebenfalls geringer ausfiel und nur eine optische Dichte bei 600 nm von 60, statt 111 erreicht wurde. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass die höhere optische Dichte der vorangegangenen Kultivierung auf eine erhöhte Konzentration an Galaktose im Medium zurückzuführen war (4 % statt 2 % w/v). Da Galaktose gleichzeitig als Kohlenstoffquelle und Induktor für die Expression der Laccase dient, kann die geringere Konzentration sowohl zum verringerten Wachstum als auch zur verringerten Produktion der Laccase geführt haben. Diese beiden Effekte wurden kürzlich von Iimura *et al.* bei der heterologen Expression einer Laccase aus *Trametes versicolor* in *S. cerevisiae* beschrieben.<sup>[146]</sup> Gemäß dem ersten Experiment und den Erkenntnissen von Iimura *et al.* wurde die Galaktosekonzentration in zukünftigen Expressionen stets auf 4 % (w/v) eingestellt.<sup>[146]</sup>

Die Anpassung der Galaktosekonzentration führte zu einem erneuten Anstieg der optischen Dichte bei 600 nm auf ca. 100, nach 44 Stunden Inkubation der Kulturen. Zusätzlich gab es auch wieder einen Anstieg der Aktivitäten auf bis zu 15 U/L gegenüber ABTS (8), in Britton-Robinson Puffer bei pH 4 und 25 °C und bis zu 6 U/L gegenüber 2,6-DMP (9), in Britton-Robinson Puffer bei pH 7 und 25 °C (Abbildung 25). Das Aktivitätsprofil war dabei identisch zu den vorherigen Versuchen und entspricht der Beschreibung von Kolomytseva *et al.*<sup>[28]</sup> Da in den Proben ohne Laccase keine Aktivität zu

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

verzeichnen war, ist davon auszugehen, dass die Aktivität auf der erfolgreichen heterologen Expression der RSL F-895 in *S. cerevisiae* beruht.

Um die Laccase näher zu charakterisieren wurde zusätzlich die pH-Stabilität der Laccase und die Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Dazu wurden Proben des Kulturüberstandes von *S. cerevisiae* MFA RSL F-895 bis zu 120 Minuten in Britton-Robinson Puffer mit einem pH von 3-9 inkubiert und in definierten Zeitabständen Aktivitätsmessungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Laccase über den Zeitraum von 120 Minuten in pH 4-5 stabil geblieben ist, während sich die Aktivität bei pH 3 innerhalb von 30 min halbierte und nach 60 min verschwand.

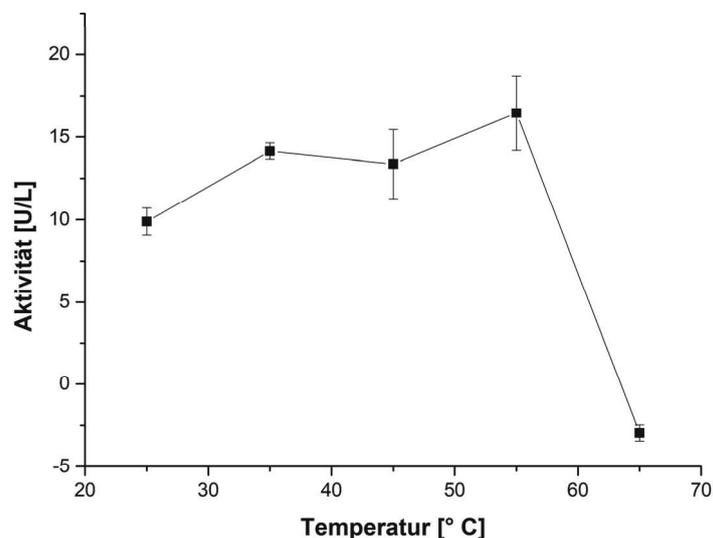


**Abbildung 25:** Verlauf der Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9), bei 25 °C, nach Inkubation in Britton-Robinson-Puffer bei pH 3-9. Als Probe diente der Kulturüberstand der heterologen Expression von MFA RSL in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. Alle Proben wurden drei Mal gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Die Aktivität gegenüber 2,6-DMP (9) im neutralen bis alkalischen Bereich nahm dagegen initial zu (Abbildung 25). Dies ist eventuell auf eine Trübung der Proben zurückzuführen, welche im Rahmen längerer Inkubationszeiten im alkalischen pH-Bereich zu beobachten war. Dies führte auch zu einer erhöhten Schwankung der Messwerte in diesem Bereich. Vermutlich denaturieren die Enzyme im Kulturüberstand bei längerer Inkubation im alkalischen Milieu und verfälschen damit die Messwerte.<sup>[147]</sup>

Für die Untersuchung der Laccaseaktivität in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur wurden die Aktivitätsmessung gegenüber ABTS (8) bei pH 4 näher betrachtet, da dies in allen vorangegangenen Experimenten der Bereich der höchsten Laccaseaktivität war. Es zeigte sich, dass die Aktivität im Kulturüberstand bis zu einer Temperatur von 55 °C um 5 U/L zunahm, bei 65 °C jedoch abrupt endete

(Abbildung 26). Es ist daher anzunehmen, dass die Laccase bei einer Temperatur zwischen 55 °C und 65 °C denaturiert.



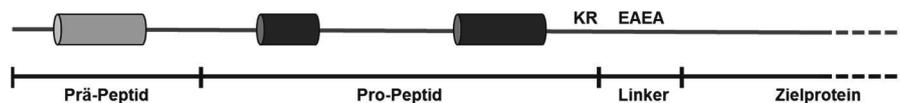
**Abbildung 26:** Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) bei 25 °C bis 65 °C in Britton-Robinson-Puffer, bei pH 4. Als Probe diente der Kulturüberstand der heterologen Expression von MF $\alpha$  RSL in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. Alle Proben wurden drei Mal in Britton-Robinson Puffer pH 4 gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

### 2.2.5 Versuche zur Optimierung der heterologen Expression der *R. solani* F-895 Laccase in *S. cerevisiae*

Die Gesamtaktivität im Kulturüberstand nach 44 Stunden Expression blieb nach mehreren Kultivierungen auf einem Niveau von 10-15 U/L. Damit ist sie etwas niedriger als bei vergleichbaren heterologen Expressionen von Laccasen pilzlichen Ursprunges in *S. cerevisiae*. So konnten Imura *et al.* 45 U/L im Kulturüberstand der Expression der *Trametes versicolor* Laccase in *S. cerevisiae* erreichen.<sup>[146]</sup> Bulter *et al.* konnten eine initial schwache Expression der *Myceliophthora thermophila* Laccase von 0,6 U/L mit Hilfe von „directed evolution“ um das etwa 170-fache steigern.<sup>[148]</sup> Blevé *et al.* erreichten eine maximale Aktivität von 77 U/L bei der heterologen Expression der Laccase aus *Pleurotus eryngii*.<sup>[149]</sup> Oftmals mussten für diese gemessenen Aktivitäten jedoch entweder das Enzym, oder die Kultivierungsbedingungen optimiert werden. Um im Fall der heterologen Expression von RSL F-895 die Aktivität im Kulturüberstand zu erhöhen wurde daher versucht die Sekretion der Laccase zu optimieren, da nur Aktivität im Kulturüberstand detektiert werden konnte, nicht aber im Zelllysat. Eine Erhöhung der Sekretionseffizienz könnte demnach zu einem Anstieg aktiver Laccase im Überstand führen.

Das MF $\alpha$ -Präpro-Peptid besteht aus zwei Regionen, dem Prä-Peptid, welches aus 19 Aminosäuren und dem Pro-Peptid, welches aus 67 Aminosäuren besteht. Die Prozessierung des MF $\alpha$ -Signals geschieht in drei Schritten. Zuerst wird das Prä-Peptid von einer Signalpeptidase im Endoplasmatischen Retikulum

abgespalten. Im Golgi-Apparat wird anschließend die Pro-Peptidsequenz zwischen einem terminalen Arginin und Lysin abgespalten. Zum Schluss entfernt das Ste13-Protein die Glu-Ala-Wiederholungssequenz am Ende des Sekretionspeptides.<sup>[150]</sup> Von der Prä-Sequenz wird vermutet, dass sie die Translokation in das ER vermittelt, während das Pro-Peptid eventuell die Translation verlangsamt und so die korrekte Faltung des darauffolgenden Enzyms vereinfacht und als Chaperonin für das zu sekretierende Protein wirkt.<sup>[151, 152]</sup> In beiden Fällen ist die Glykosylierung der Arginine der Präpro-Sequenz von zentraler Bedeutung, da sowohl die N-, als auch die C-terminalen Aminosäuren der Sequenz für den Sekretionsapparat zugänglich sein müssen. In dem bis zu diesem Zeitpunkt genutzten Konstrukt fehlten jedoch die in den Ursprungsorganismen üblichen C-terminalen Glu-Ala-Wiederholungssequenzen am Ende der MF $\alpha$ -Sekretionssequenz. Stattdessen besaß das verwendete Konstrukt nur eine RAAD-Linkersequenz. Bitter *et al.* beobachteten, dass sekretierte Fusionsproteine vermehrt noch Glu-Ala-Wiederholungssequenzen am aminoterminalen Ende des prozessierten Proteins besaßen und vermuteten daher, dass die Ste13-Protease einen limitierenden Faktor in der Sekretion des Fusionsprotein darstellt.<sup>[132]</sup> Aus diesem Grund wurde mit Hilfe einer PCR ein Konstrukt erstellt, welches zwei Glu-Ala-Wiederholungssequenzen vor dem N-Terminus der Laccase und hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin des Sekretionspeptides, besitzt (MF $\alpha$  RSL F-895 Linker) (Abbildung 27).

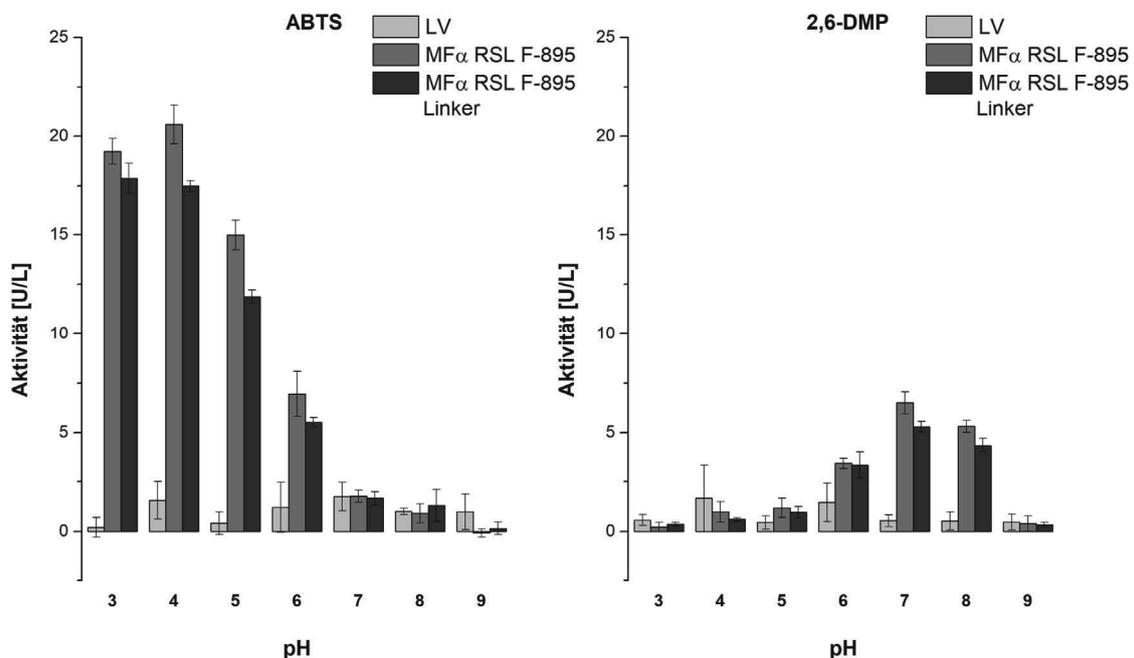


**Abbildung 27:** Struktur und Anordnung des Präpro-Peptids des  $\alpha$ -Pheromonfaktors aus Hefe, in Anlehnung an Lin-Cereghino *et al.* Relevante Aminosäuren für die finale Abspaltung der Präpro-Sequenz wurden hervorgehoben. Bekannte  $\alpha$ -helikale Strukturen des Signalpeptids wurden in Form von Walzen eingezeichnet. KR: Lysin, Arginin; EAEA: Glu-Ala-Wiederholungssequenz.<sup>[150, 153]</sup>

*S. cerevisiae* wurde analog zu vorherigen Versuchen mit dem neuen Konstrukt transformiert und die Expression des neuen Fusionsproteins untersucht, um zu testen, ob eine vermehrte Sekretion in das Kulturmedium stattfindet. Zum Vergleich wurde erneut eine Leervektorkontrolle, als auch die vorherige Variante mit fehlender Glu-Ala-Wiederholungssequenz, unter denselben Bedingungen kultiviert. Die Untersuchung der Aktivität des Kulturüberstandes der drei Proben zeigte dasselbe Aktivitätsprofil wie bereits zuvor. Die abgeänderte Linkersequenz hatte dementsprechend keinen Einfluss auf die pH-abhängige Aktivität der Laccase (Abbildung 28). Das Aktivitätsniveau für das ursprüngliche Konstrukt war dieses mal etwas höher als bei den zuvor untersuchten Expressionen, mit einem Optimum von ca. 20 U/L bei pH 4 gegenüber ABTS (8) und ca. 6 U/L bei pH 7 gegenüber 2,6-DMP (9). Die Aktivität im Kulturüberstand der neuen Variante, mit der optimierten Sekretionssequenz war dagegen mit jeweils ca. 18 U/L und ca. 5 U/L minimal geringer. Die leicht geringere Aktivität könnte auf die ebenfalls geringere optische Dichte nach 44 h zurückzuführen sein (Abbildung 28). So wies die Kultur mit der ursprünglichen Variante des Fusionsenzym eine OD<sub>600</sub> von 100 auf, während die Kultur mit der neuen Linker-Variante nur eine OD<sub>600</sub> von 83 aufwies. Zu diesem Zeitpunkt kann noch keine

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

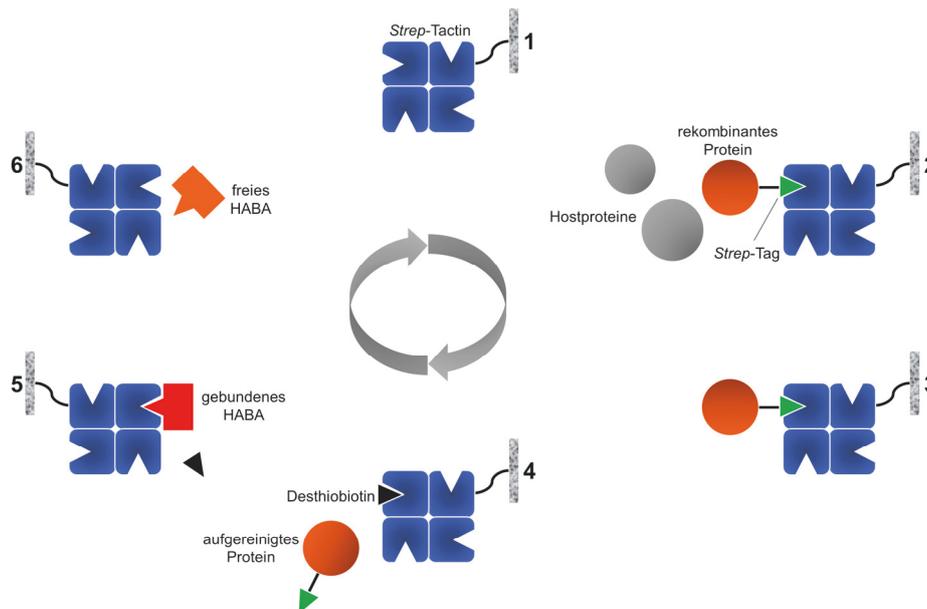
Aussage darüber getroffen werden, ob die Sekretion mit der neuen Linkersequenz verbessert worden ist, da keine Möglichkeit besteht das Protein aufzureinigen und damit unabhängig vom Wachstum der Hefen zu quantifizieren. Zusätzlich waren die Aktivitätsunterschiede zu gering, um ohne vorherige Aufreinigung des Enzyms, der neuen Linkersequenz einen signifikanten Einfluss beizumessen.



**Abbildung 28:** Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9), bei 25 °C, im Kulturüberstand der heterologen Expression von MFα RSL F-895 und MFα RSL F-895 Linker in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. LV = Leervektorkontrolle. Alle Proben wurden drei Mal in Britton-Robinson-Puffer pH 3-9 gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Um die Menge sekretierter Laccase und deren spezifische Aktivität bestimmen zu können sollte im nächsten Schritt ein Affinitätstag an das Enzym angebracht werden. Bedingt durch die geringen Mengen Laccase im Kulturüberstand, wurde sich für einen *Strep*-Tag entschieden, da dieser eine vergleichsweise hohe Spezifität aufweist. Dadurch ist eine Isolation des Zielproteins, trotz geringer Konzentration, in hoher Reinheit möglich.<sup>[154]</sup> Der *Strep*-Tag ist ein acht Aminosäuren langes Peptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), welches eine intrinsische Affinität zu Streptavidin aufweist.<sup>[155, 156]</sup> Es kann an rekombinante Enzyme fusioniert werden, um deren Isolation aus einem komplexen Gemisch aus Proteinen zu ermöglichen. Dazu wird eine optimierte Variante des Streptavidin (*Strep*-Tactin) an einer Matrix immobilisiert, über die das komplexe Proteingemisch geleitet werden kann. Rekombinantes Protein interagiert in Folge dessen mit Streptavidin und verbleibt auf der Matrix. In einem Folgeschritt kann das rekombinante Protein mit Hilfe von Biotin, oder Analoga wie Desthiobiotin, von der Säule verdrängt werden, um das reine Zielprotein zu erhalten (Abbildung 29). Ein weiterer großer Vorteil des *Strep*-Tags ist, dass er sowohl die Proteinfaltung, als auch die Sekretion und Funktion des Zielproteins zumeist nicht negativ beeinflusst und dabei weitestgehend resistent gegenüber zellulären Proteasen ist.<sup>[157]</sup>

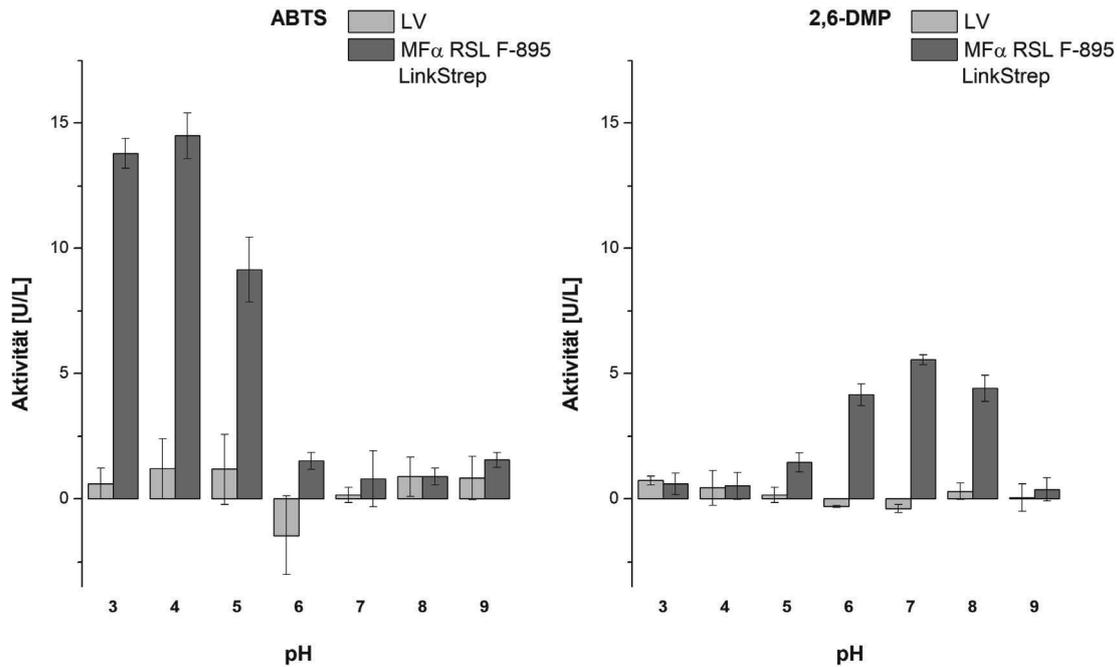
## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung der Aufreinigung eines rekombinanten Proteins mit *Strep*-Tag, mit Hilfe des *Strep*-Tactin Systems, in Anlehnung an Schmidt *et al.*<sup>[157]</sup> **1-2.** Eine Proteinlösung, welche das rekombinante Protein mit *Strep*-Tag enthält, wird auf die Säule mit immobilisiertem *Strep*-Tactin gegeben. **3.** Hostproteine werden von der Säule gewaschen. **4.** Das Fusionsprotein wird von Desthiobiotin kompetitiv verdrängt wodurch das aufgereinigte Protein von der Säule eluiert. **5.** Desthiobiotinelution wird durch Zugabe einer 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA) haltigen Lösung beschleunigt, was einen roten Farbumschlag der Säule zur Folge hat. **6.** HABA wird durch mehrmaliges Waschen mit Puffer entfernt wodurch die Säule wieder regeneriert und erneut eingesetzt werden kann.

Da sich am N-Terminus der Laccase bereits das Sekretionssignal befindet, wurde der *Strep*-Tag mittels PCR am C-Terminus der Laccase angebracht. Das Einbringen des *Strep*-Tags mit Hilfe von PCR hatte jedoch zwei Deletionen im Gen zur Folge. Diese konnten allerdings in einer nachfolgenden *QuikChange*<sup>®</sup> PCR wieder rückgängig gemacht werden. Im Anschluss an die erfolgreiche Erzeugung des neuen Konstruktes (MF $\alpha$  RSL F-895 LinkStrep) und der Verifizierung mittels Sequenzierung, wurde *S. cerevisiae* erneut transformiert. Die Expression der Laccase wurde anschließend unter den bereits zuvor getesteten Bedingungen durchgeführt. Die Laccaseaktivität des Kulturüberstandes wurde in Britton-Robinson Puffer pH 3-9 untersucht, um sicherzustellen, dass der Affinitätstag keinen negativen Einfluss auf die Aktivität oder die Sekretion des Enzyms hat.

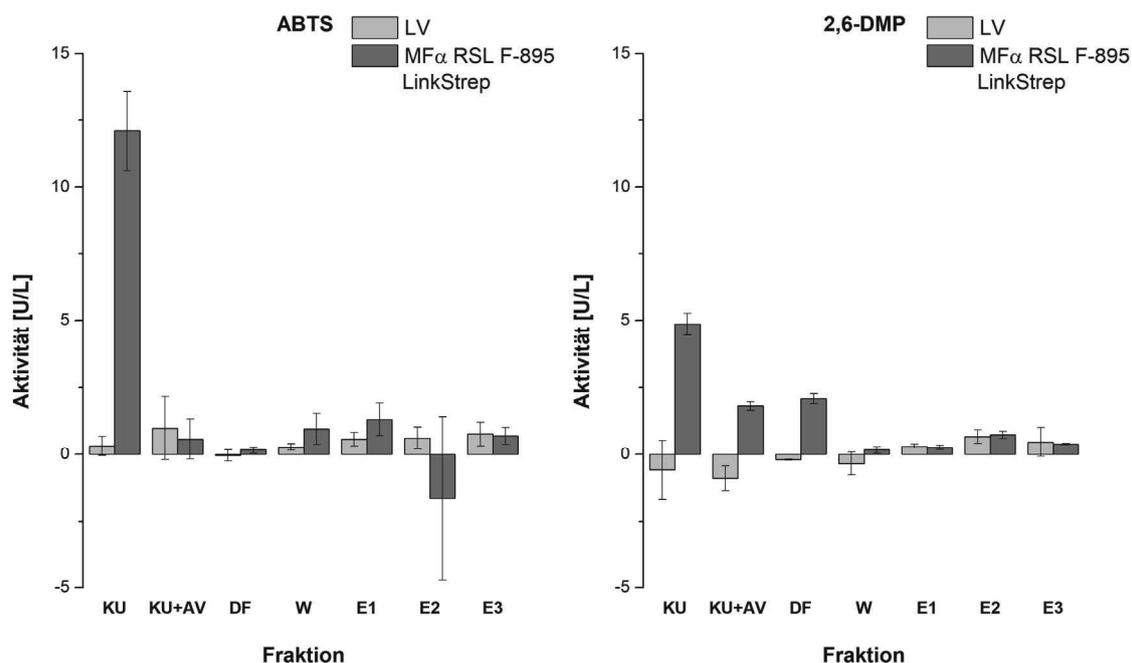
## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 30:** Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9), bei 25 °C, im Kulturüberstand der heterologen Expression von MFα RSL F-895 LinkStrep in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. LV = Leervektorkontrolle. Alle Proben wurden drei Mal in Britton-Robinson-Puffer pH 3-9 gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Das Aktivitätsprofil von MFα RSL F-895 LinkStrep wurde in Anbetracht der Daten nicht von der Anwesenheit des C-terminalen *Strep*-Tags beeinflusst. Erneut wurden Aktivitäten von ca. 15 U/L gegenüber ABTS (8) bei 25 °C in Britton-Robinson Puffer bei pH 4 und ca. 5 U/L gegenüber 2,6-DMP (9) bei pH 7 detektiert (Abbildung 30). Im Anschluss an die Aktivitätstests wurde versucht die Laccase mit Hilfe des *Strep*-Tactin Systems aus dem Kulturüberstand zu isolieren. Dafür wurde es vorab mit einer Avidin enthaltenden Blockerlösung behandelt, da die Kulturüberstände von Hefekulturen natürlicherweise Biotin enthalten können. Avidin bindet Biotin mit hoher Affinität und entfernt es so aus dem System.<sup>[158]</sup> Die Anwesenheit von Biotin würde dazu führen, dass dieses irreversibel an das *Strep*-Tactin bindet und die Bindung des Fusionsproteins verhindern würde. Im Anschluss an die Behandlung mit der Blockerlösung wurde der Kulturüberstand über eine *Strep*-Tactin Säule gegeben und nach Herstellerangaben gewaschen. Das Zielprotein wurde eluiert und die Säule anschließend regeneriert. Nach jedem Behandlungsschritt wurde eine Probe entnommen, um zu kontrollieren, in welcher der Fraktionen Laccaseaktivität vorhanden ist. Es zeigte sich, dass bereits die Behandlung mit der Avidin-Blockerlösung zu einem vollständigen Verlust der Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) in Britton-Robinson Puffer bei pH 4 führte (Abbildung 31). Dies kann eventuell daran gelegen haben, dass dieser Schritt bei pH 8 durchgeführt werden musste, da nur in leicht alkalischem Milieu eine vollständige Bindung des Biotins an Avidin stattfindet. Möglicherweise war deshalb der pH-Wert in der Aktivitätsmessung nicht pH 4, sondern höher, weshalb keine Aktivität gegenüber ABTS (8) festgestellt werden konnte. Dies ist deshalb wahrscheinlich, da parallel Aktivität derselben Probe gegenüber 2,6-DMP (9) bei pH 7 detektiert werden konnte, obwohl auch in diesem Fall die Behandlung mit der

Blockerlösung zu einer verringerten Aktivität führte (Abbildung 31). Die Untersuchung der folgenden Fraktionen zeigte jedoch, dass das Fusionsprotein vermutlich nicht an die *Strep*-Tactin Säule gebunden hat, da sich die gesamte Laccaseaktivität die gegenüber 2,6-DMP (9) detektiert werden konnte, im Durchfluss wiederfinden ließ. Dementsprechend wurde in keine der folgenden Fraktionen Laccaseaktivität detektiert. Es ist davon auszugehen, dass die Aufreinigung der Laccase mittels *Strep*-Tactin System initial nicht erfolgreich gewesen ist. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch eine Untersuchung mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot bestätigt, auf denen keine Bande für das Fusionsprotein zu finden war (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 31:** Laccaseaktivität gegenüber ABTS (8) und 2,6-DMP (9), bei 25 °C im Verlauf der Aufreinigung von MF $\alpha$  RSL F-895 LinkStrep aus dem Kulturüberstand der heterologen Expression in *S. cerevisiae*, nach 44 Stunden Kultivierung der Hefe in Erlenmeyerkolben mit Schikane, bei 20 °C und 130 rpm, in YP<sub>Gal</sub>-Medium. LV = Leervektorkontrolle. Alle Proben wurden drei Mal in Britton-Robinson-Puffer pH 4 (ABTS) oder pH 7 (2,6-DMP) gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. KU = Kulturüberstand, KU+AV = Kulturüberstand nach Behandlung mit Avidin-Blockerlösung, DF = Durchfluss, W = Waschfraktion, E 1-3 = Elutionsfraktionen 1-3.

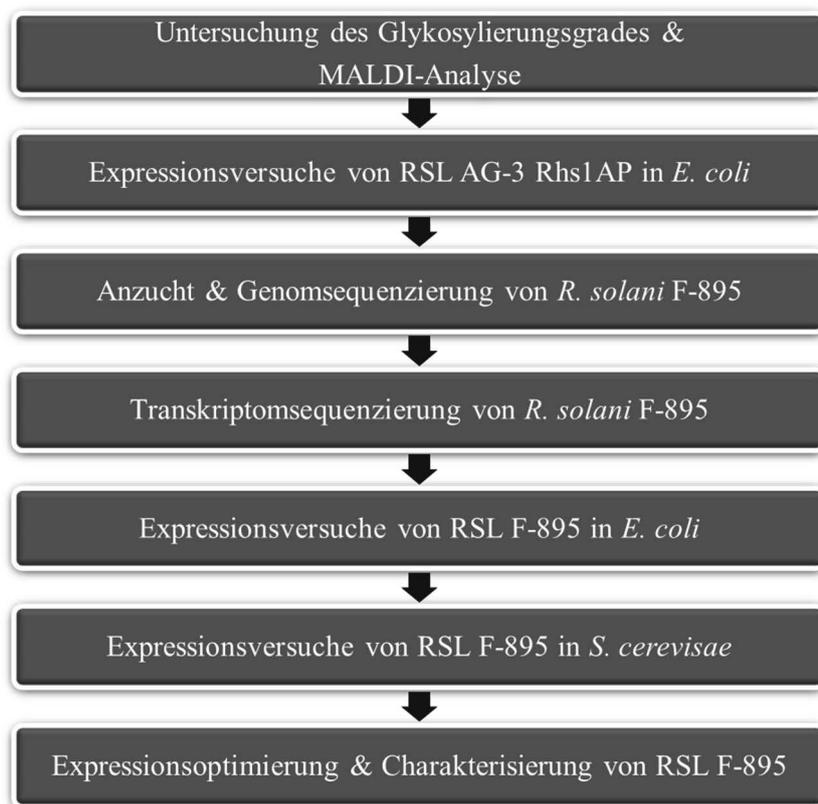
Das Fehlschlagen der Aufreinigung mittels *Strep*-Tactin System kann unterschiedliche Gründe haben. So ist es möglich, dass der *Strep*-Tag intramolekular mit der Laccase interagiert, wodurch das Peptid nicht für eine Interaktion mit *Strep*-Tactin zur Verfügung steht.<sup>[159]</sup> Außerdem ist es möglich, dass die Laccase nicht nur am N-Terminus prozessiert wird, sondern auch am C-Terminus.<sup>[160]</sup> Dies könnte eine Abspaltung des *Strep*-Tags zur Folge haben, wodurch die Laccase nicht mehr an die Säule binden kann. Diese C-Terminale Anhänge wurden jedoch in Laccasen aus *Ascomyceten* statt *Basidiomyceten* beobachtet und diese Laccasen besaßen ein konserviertes Peptid aus Asp-Ser-Gly-Leu/Val/Ile am C-Terminus. Beides trifft nicht auf die Laccase aus *R. solani* F-895 zu.

Obwohl die Aufreinigung der Laccase nicht erfolgreich verlief konnten drei unterschiedliche Varianten von RSL F-895 in *S. cerevisiae* exprimiert und sekretiert werden. Dabei konnten in Abhängigkeit von

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Ergebnisse und Diskussion

der optischen Dichte der Kulturen Aktivitäten von 12-20 U/L gegenüber ABTS (8) im Kulturüberstand, nach 48 h Kultivierung erreicht werden (Abbildung 28, Abbildung 30, Abbildung 31). Damit ist die Aktivität im Kulturüberstand in der heterologen Expression deutlich geringer als jene, welche im Kulturüberstand des Ursprungsorganismus ermittelt wurde.<sup>[28]</sup> Diese betrug 218 U/mL gegenüber ABTS (8) nach drei Tagen Anzucht in einem Medium aus sieben unterschiedlichen Gräsern.<sup>[28]</sup> Das Aktivitätsmaximum gegenüber dem phenolischen Substrat 2,6-DMP (9) lag in allen Untersuchungen bei pH 7-8 und spiegelt damit ebenfalls das Ergebnis der Aktivitätsuntersuchung im Überstand des Ursprungsorganismus wieder. Dieses wurde bei einem pH von 7.3 ermittelt.<sup>[28]</sup> Die Aktivität des Ursprungsorganismus konnte zwar nicht erreicht werden, es stehen nun aber zahlreiche molekularbiologische Werkzeuge zur Verfügung um die Ausbeute an Laccase in *S. cerevisiae* noch zu erhöhen.

Eine Gesamtübersicht über den Prozess von der Bereitstellung der aufgereinigten Proteinprobe aus dem Ursprungsorganismus bis zur Optimierung der heterologen Expression in *S. cerevisiae* liefert Abbildung 32.



**Abbildung 32:** Ablauf von der initialen Untersuchung der bereitgestellten Proteinprobe aus *R. solani* F-895 bis zur heterologen Expression und Sekretion der putativen Laccase in *S. cerevisiae*.

### 2.3 Kurzzusammenfassung

Nachdem von den Kooperationspartnern eine aufgereinigte Proteinprobe mit Laccaseaktivität im alkalischen Milieu und der dazugehörige Hostorganismus zur Verfügung gestellt wurde, gelang es sowohl den Organismus in unterschiedlichen Medien zu kultivieren als auch das Protein näher zu charakterisieren. Es wurde festgestellt, dass das sekretierte Protein stark glykosyliert vorliegt und eine erste Untersuchung mit MALDI-TOF erlaubte die Zuordnung zu einem verwandten Gen einer putativen Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1AP.<sup>°</sup> Der initiale Versuch diese putative Laccase heterolog in *E. coli* zu exprimieren schlug jedoch fehl.

An dieser Stelle war jedoch nicht auszuschließen, dass die originale Laccase aus *R. solani* F-895 in *E. coli* exprimierbar ist. Daher wurden Anstrengungen unternommen die Originalsequenz der Laccase zu ermitteln. Da zusätzlich noch keinerlei genetische Information über den Wirtsorganismus vorlag, wurde beschlossen das gesamte Genom zu entschlüsseln, da die Genome und Transkriptom von *R. solani*-Stämmen große Unterschiede voneinander aufweisen können.<sup>[83]</sup> Die somit neu gewonnenen Daten wären nicht redundant und besäßen auch außerhalb des Projektes eine hohe Relevanz für zukünftige biotechnologische Untersuchungen. Das Genom von *R. solani* F-895 wurde erfolgreich isoliert und sequenziert, woraufhin weitere MALDI-Peptide aus der ursprünglichen Analyse zugeordnet werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Intron- und Exon-Strukturen des Gens jedoch nur mit Hilfe von „*in-silico*“-Methoden vorhergesagt werden, weshalb das vollständige Gen noch nicht mit absoluter Sicherheit zugeordnet werden konnte. Zusätzlich fehlten Informationen über den N-Terminus des Gens, der noch nicht aufgeklärt werden konnte. Aus diesem Grund wurde zusätzlich auch das Transkriptom des Organismus untersucht. Dieses konnte in Folgeexperimenten ebenfalls isoliert und sequenziert werden. Die Sequenzdaten bestätigten die vorhergesagte Sequenz aus der Genomisolation und die weitere Untersuchung zeigte, dass das Ursprungsprotein mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Sekretionssignal vor dem N-Terminus besitzt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den beobachteten Laccaseaktivitäten in Kulturüberständen von *R. solani* F-895. Anhand der Gesamtdaten wurde ein neues synthetisches Gen, mit der Originalsequenz aus *R. solani* F-895, in *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) und Arctic Express (DE3) exprimiert. Es konnte jedoch in keinem der unterschiedlichen *E. coli*-Stämme lösliches und funktionales Protein nachgewiesen werden. In einem weiteren Versuch wurde das Protein mit einem Löslichkeitsvermittler, dem Maltosebindprotein aus *E. coli*, fusioniert. Dieses Protein ist häufig in der Lage eine lösliche Expression, von zuvor unlöslich exprimierten Proteinen, zu ermöglichen.<sup>[123, 129]</sup> Auch dieser Versuch blieb jedoch erfolglos.

Auf Grund der erfolglosen heterologen Expression der Laccase im prokaryotischen Organismus *E. coli*, wurde das Protein im eukaryotischen Organismus *S. cerevisiae* produziert. Dieser Organismus ist im Gegensatz zu *E. coli* in der Lage das Protein post-translational zu modifizieren. Da die Laccase vom

---

<sup>°</sup> Die Deglykosylierung, SDS-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Analyse wurden von Jamila Rosengarten (FZ Jülich, IBOC), Jennifer Aschenbrenner und Tino Polen (FZ Jülich, IBG-1) durchgeführt.

## Charakterisierung und heterologe Expression einer neuen Pilz-Laccase Kurzzusammenfassung

Ursprungsorganismus sekretiert wird, wurde neben einer Variante ohne Sekretionssignal, eine weitere Variante mit einer N-terminalen Sekretionssequenz aus *S. cerevisiae* versehen. Beide Varianten wurden in *S. cerevisiae* exprimiert und für die Variante mit Sekretionssignal konnte Laccaseaktivität im Überstand detektiert werden. Diese war zwar sehr gering, zeigte jedoch die gleiche pH-Abhängigkeit wie die Aktivität im Überstand des Ursprungsorganismus.<sup>[28]</sup> Es konnte keine Aktivität für die Variante ohne Sekretionssignal im Überstand festgestellt werden und keine Aktivität in den jeweiligen Zellysaten beider Varianten.

Um die scheinbar obligatorische Sekretion zu verbessern wurde versucht die Linkersequenz zwischen Sekretionssignal und Protein zu optimieren. Dies führte jedoch nicht wie gewünscht zu erhöhter Laccaseaktivität im Überstand. Um das Protein dennoch zu charakterisieren, wurde es zusätzlich mit einem C-terminalen *Strep*-Tag versehen, damit die Möglichkeit zur Aufreinigung des Proteins besteht. Der initiale Versuch das Enzym aufzureinigen blieb jedoch erfolglos. Dennoch konnten drei unterschiedliche Varianten des Enzyms erstmalig heterolog in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Die höchsten erhaltenen Aktivitäten in den Kulturüberständen waren mit 20 U/L jedoch deutlich geringer als jene im Kulturüberstand des Ursprungsorganismus mit 218 U/mL. Es existiert nun zusätzlich eine Plattform für molekularbiologische Arbeiten zur Verbesserung der Laccaseproduktion und Sekretion. Die mögliche Anwendung des Proteins im Rahmen des ursprünglichen Projekts, zur Lignansynthese in *E. coli*, ist dagegen aufgrund der fehlenden Exprimierbarkeit in *E. coli* vorerst nicht durchführbar gewesen.

## 2.4 Short Summary

The cooperation partners of the BioLiSy-project from Russia provided a purified laccase sample and its original host *R. solani* VKM F-895. The purified laccase-sample was deglycosylated and analysed via SDS-gelelectrophoresis. In addition, a MALDI-TOF analysis was performed. The investigation via gelelectrophoresis showed that the secreted protein is heavily glycosylated by its host organism. It showed a molecular weight of ~80 kDa in its glycosylated form and a molecular weight of 60 kDa in its unglycosylated form. The MALDI-TOF analysis revealed four peptides which align to the sequence of a putative Laccase from another *R. solani* strain, the strain AG-3 Rhs1Ap.<sup>d</sup>

A synthetic gene of the putative laccase was expressed in *E. coli*, but no sign of laccase production or activity could be detected. To rule out that the failed expression of the putative laccase from *R. solani* AG-3 Rhs1Ap is indicative of a failed expression of the laccase of interest from *R. solani* VKM F-895, investigations towards the original laccase sequence were undertaken. Since there exists no sequence information for *R. solani* F-895, the fungus was cultivated and the genomic DNA isolated. The whole genome was sequenced, and the introns and exons predicted with “*in-silico*” methods.<sup>e</sup> A comparison of the new DNA-sequence and the former MALDI-TOF analysis revealed two more peptides which could not be assigned to the laccase before, since they are specific for the laccase from *R. solani* F-895. Additionally, a stop codon was found in the N-terminal region of the protein, revealing the fact, that the laccase from *R. solani* F-895 is shorter. After the analysis of the genomic DNA, the organism was cultivated again, and the RNA was isolated to reveal the transcriptome and the mature sequence of the laccase.<sup>f</sup> In addition to the intron-free sequence of the laccase a host-specific signal peptide was identified.

The new laccase without its signal peptide was expressed in *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3) and Arctic Express (DE3) but no soluble and active laccase could be obtained. Therefore, the laccase was fused to a known solubility-tag, the MalE-protein from *E. coli*. Despite the solubility tag, no soluble or active laccase could be obtained in *E. coli*.

Since the expression of the fungal ligninolytic enzyme was unsuccessful in the prokaryotic organism, the expression organism was changed to the eukaryotic organism *S. cerevisiae*. The eukaryotic organism can perform the probably mandatory post-translational transformations of the laccase. Since the laccase is secreted in the fungus, two different variants were expressed in *S. cerevisiae*. The first variant was the laccase without a signal peptide, while the second was fused to the signal peptide of the mating factor alpha pheromone of *S. cerevisiae*. A low amount of laccase activity could be detected in the culture medium of the second variant, while no activity could be detected in the culture medium of the first variant. No laccase activity was observed in the cell lysate of both variants. The pH-dependant activity

---

<sup>d</sup> Jamila Rosengarten (FZ Jülich, IBOC), Jennifer Aschenbrenner and Tino Polen (FZ Jülich, IBG-1) performed the deglycosylation and initial SDS-gelelectrophoresis and MALDI-TOF analysis.

<sup>e</sup> Tino Polen (FZ Jülich, IBG-1) provided the genome sequencing and data analysis.

<sup>f</sup> The Usadel AG (FZ Jülich, IBG-4) provided the transcriptome sequencing and data analysis.

pattern towards ABTS (8) and 2,6-DMP (9) resembled the activity pattern of the originally secreted ligninolytic protein from *R. solani* F-895. Since the secretion of the enzyme seems to be mandatory, efforts were undertaken to increase the amount of secreted protein in *S. cerevisiae*. To achieve a higher amount of secreted laccase the linker-sequence between the signal peptide and the protein was optimized. Despite the effort no increased activity could be detected in the culture medium afterwards.

To further analyze the laccase and measure the amount of secreted protein a C-terminal affinity tag was fused to the laccase. Initial efforts to purify the protein were not successful though. Despite these failed efforts, all three different variants of the laccase could be heterologously expressed in *S. cerevisiae* for the first time, leading to laccase activities of 15-20 U/L in the culture medium after 48 hours. This is severely lower than the reported 218 U/mL in the culture medium of the fungus after three days.<sup>[28]</sup> In addition a platform for further improvements of laccase production and secretion in *S. cerevisiae* was established. Due to the insoluble and inactive expression in the prokaryote *E. coli* an application in the BioLiSy-project was not yet possible.

## 2.5 Ausblick

Da die Aufreinigung und Charakterisierung des Proteins noch nicht erfolgen konnte, kann zu diesem Zeitpunkt auch noch nicht mit absoluter Sicherheit bestimmt werden, ob es sich bei dem für die Laccaseaktivität verantwortlichen Enzym um die Laccase aus *R. solani* F-895 handelt. Obwohl in keiner der anderen Proben Laccaseaktivität nachgewiesen werden konnte und auch das Aktivitätsprofil übereinstimmt, steht der absolute Beweis in Form einer MALDI-TOF Untersuchung noch aus. Dafür könnte der Kulturüberstand, welcher ansonsten nur geringe Konzentrationen an Protein enthält, nach Aufkonzentration direkt mittels MALDI-TOF untersucht werden. Alternativ könnten weitere Versuche unternommen werden die Laccase aus dem Kulturüberstand zu isolieren. Unabhängig davon für welche der beiden Methoden sich entschieden wird, wäre eine Deglykosylierung des Proteins für die Untersuchung durch SDS-Gelelektrophorese zu empfehlen. Post-translational modifizierte Proteine können ungleichmäßig glykosyliert, in sogenannten Glykoformen vorliegen.<sup>[161]</sup> Dabei könnte es sich um einen der Gründe handeln, dass keine distinkte Proteinbande der Laccase im SDS-Gel erkennbar ist. Die Laccase könnte in mehreren Glykoformen vorliegen und das Molekulargewicht würde sich folglich über einen breiten Bereich erstrecken. Dies gilt besonders in Anbetracht möglicher Hypermannosylierung wie sie unter anderem in *S. cerevisiae* möglich ist.<sup>[144, 145, 162, 163]</sup>

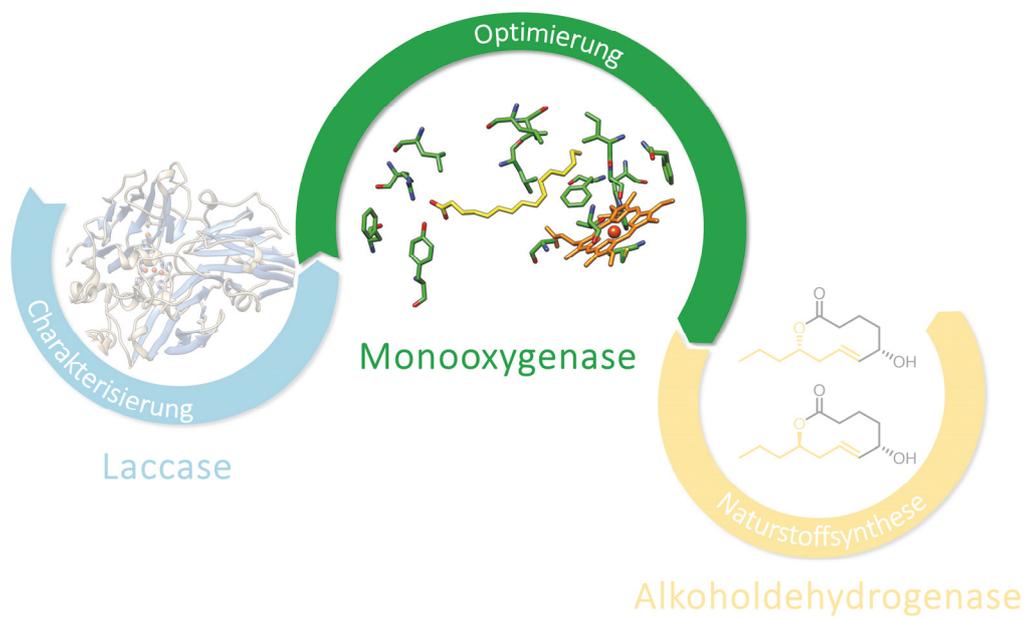
Sollte sich für die Aufreinigung des Proteins entschieden werden, müsste verifiziert werden, ob die vorhandene Strategie mittels *Strep*-Tags durchführbar ist. Andererseits müsste eine alternative Methode eingesetzt werden.<sup>[154, 164]</sup> An dieser Stelle wäre eine weitere klassische Variante mit einem Polyhistidin-Tag denkbar, welcher auch im späteren Verlauf der Arbeit mit anderen Enzymen verwendet wurde. Zusätzlich wäre eine Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatografie denkbar, für den Fall, dass die C-terminalen Affinitätstags generell nicht zugänglich sind oder zu einer verringerten Expression oder Sekretion führen.<sup>[165]</sup> Da für die Variante mit dem *Strep*-Tag vergleichbare Aktivität im Überstand detektiert werden konnte ist letzteres vermutlich nicht der Grund für die fehlgeschlagene Aufreinigung. Sofern die Möglichkeit der Aufreinigung besteht sollte eine Quantifizierung der Menge sekretierter Laccase und eine präzise Charakterisierung des Enzyms folgen. Besonders die kinetischen Parameter, pH-Aktivität, pH-Stabilität, Temperaturstabilität und das Redoxpotential wären von großer Bedeutung, um das Potential der Laccase für biokatalytische Umsetzungen einschätzen zu können.<sup>[166]</sup> Weiterhin könnte eine erfolgreiche Kristallisation des Enzyms Aufschluss darüber geben, weshalb es auch bei neutralem bis alkalischem pH aktiv ist und an welchen Stellen eine gezielte Optimierung des Enzyms sinnvoll sein könnte.<sup>[69]</sup> In Anbetracht der vermutlich sehr geringen Mengen an Laccase, welche sich im Kulturüberstand von *S. cerevisiae* befindet, wäre für die biokatalytische Nutzung des Enzyms ein Wechsel des Expressionshosts erforderlich. Da die Sekretion der Laccase ein entscheidender Faktor zu sein scheint und *S. cerevisiae* bekanntermaßen ein schlechter Sekretionshost ist, wäre ein Wechsel auf einen eukaryotischen Host mit erhöhtem Sekretionspotential wie *Pichia pastoris* möglicherweise sinnvoll.<sup>[163, 167, 168]</sup>

RSL F-895 wird vom Ursprungsorganismus sekretiert und auch in *S. cerevisiae* war eine Sekretion des Proteins notwendig, um Laccaseaktivität zu erhalten. In Anbetracht dieses Zusammenhangs ist ebenfalls eine alternative Sekretion zur TAT-Sekretion im ursprünglich angedachten Expressionshost *E. coli* denkbar. Das Cytoplasma von *E. coli* ist eine reduktive Umgebung mit vielen Proteasen. In dieser Umgebung ist eine korrekte Faltung von heterologen Proteinen häufig nicht möglich.<sup>[169]</sup> Besonders die Ausbildung von Disulfidbrücken ist unter diesen Bedingungen erheblich erschwert und kann zu einer Fehlfaltung von heterolog exprimierten Proteinen führen.<sup>[170]</sup> Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist die Fusion eines Sekretionssignals an das Zielprotein, welches zu einer Delokalisierung des Enzyms aus dem Cytoplasma in das Periplasma oder den Kulturüberstand führt.<sup>[171]</sup> Eine solche Delokalisierung führt oftmals zu korrekt gefalteten Proteinen mit erhöhter Stabilität.<sup>[172]</sup> Dabei stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Auswahl. Die Sekretion kann über den Typ I Sekretionsapparat direkt in das Kulturmedium erfolgen, da dieser das gesamte Periplasma, von der inneren bis zur äußeren Membran, überspannt. Allerdings ist dieser Apparat in Bezug auf die Größe des Proteins beschränkt, da er nur globuläre Proteine mit einer Länge von ca. 200 Aminosäuren exportieren kann.<sup>[173]</sup> Die übliche Variante ist jedoch jene über den komplexeren Typ II Sekretionsapparat. Dieser exportiert Proteine nicht in einem Schritt über beide Membranen, sondern über zwei separate Schritte. Dabei erfolgt die Sekretion über die innere Membran mit Hilfe des Sec- oder Tat-Apparates.<sup>[174]</sup> Die Sekretion von rekombinanten Proteinen über diesen Apparat ist gut beschrieben und es gibt einige Beispielsysteme, welche sich für einen Test mit der RSL F-895 gut eignen würden. Bekannte Signalpeptide sind PelB, von der PektatlyaseB aus *Erwinia carotovora*,<sup>[175]</sup> OmpA vom „outer membrane protein A“,<sup>[176]</sup> und PhoA von der alkalinen Phosphatase aus *E. coli*.<sup>[170, 177]</sup> Die Signalpeptide werden dabei jeweils bei der Translokation über die innere Membran von einer Peptidase abgespalten, wodurch das native Protein im Periplasma vorliegen würde. Dadurch würde nicht nur die Authentizität des N-Terminus garantiert, sondern die Laccase befindet sich in einem weniger reduktiven Umfeld mit einer geringen Anzahl an Fremdproteinen und weniger Proteasen.<sup>[171]</sup> Das Tat-System mit dessen Hilfe die Laccase aus *R. solani* AG-3 Rhs1Ap (RSL) in *E. coli* exprimiert und sekretiert werden sollte exportiert ausschließlich gefaltete Proteine.<sup>[178]</sup> Dies könnte problematisch für den Fall sein, dass das Zielprotein unkorrekt gefaltet vorliegt und in „inclusion bodies“ aggregiert. Als solches kann es das Translokations-System sogar verstopfen und toxisch für die Zelle sein.<sup>[179]</sup> Ein Grund für die Fehlfaltung von RSL und RSL F-895 kann sowohl das Fehlen post-translationaler Modifikationen sein, als auch das stark reduktive Milieu des Cytoplasmas von *E. coli*.<sup>[97]</sup> Ein letzter Ansatz zur funktionellen Expression der Laccasen aus *R. solani* in *E. coli* könnte demnach eine Sekretion über den Sec-Apparat sein. Dieser exportiert das ungefaltete Protein bereits während der Translation.<sup>[178]</sup> Auf diesem Weg könnten die Laccasen erst im Periplasma von *E. coli* den Faltungsprozess außerhalb des reduktiven Umfelds vollziehen.

Von diesen Maßnahmen unabhängig ist eine Codonoptimierung der ursprünglichen Gensequenz für die bessere heterologe Expression im prokaryotischen Host *E. coli* und den eukaryotischen Hosts *S. cerevisiae* und *Pichia pastoris* ratsam.<sup>[180, 181]</sup> Gene aus Fremdorganismen wie *R. solani* beinhalten

häufig Codons, welche vom heterologen Host selten genutzt werden oder gar regulatorische Elemente, welche die Expression limitieren.<sup>[181]</sup> Eine Optimierung der Sequenz könnte zu höheren Ausbeuten an sekretierter Laccase in *S. cerevisiae* führen, was die weitere Untersuchung der Laccase deutlich vereinfachen könnte.<sup>[182]</sup> Im Falle der heterologen Expression in *E. coli* wäre dadurch möglicherweise überhaupt erst eine Produktion der Laccase denkbar. Anhand der bisherigen Experimente gab es keine Hinweise auf eine erfolgreiche Expression des Gens im prokaryotischen Host, selbst dann nicht, wenn mit dem *MalE*-Gen ein stark exprimiertes Gen C-Terminal an das Laccasegen fusioniert wurde. Die unoptimierte Ursprungssequenz könnte demnach zu einem Transkriptionsstop geführt haben. Die Codonoptimierung für *E. coli* könnte demnach zu einer erfolgreichen Translation des Gens führen. Es ist jedoch zu beachten, dass dies nicht zu einer erfolgreichen Produktion eines löslichen Proteins führen muss, sondern zu einer Aggregation des Proteins in unlöslichen „*inclusion bodies*“ wie bereits zuvor beschrieben. Die Optimierung der Codons führt in diesem Fall nur zu mehr unlöslichem Protein, nicht jedoch zu einer funktionalen heterologen Expression im prokaryotischen Host.<sup>[183]</sup> Um eine erste Einschätzung davon zu erhalten, ob eine Codonoptimierung sinnvoll ist, wurde das *Rare Codon Analysis Tool* der Firma *Genscript* eingesetzt. Dieses ergab einen *Codon Adaption Index* von 0.63 für die Expression in *S. cerevisiae*, bei einem Idealwert von 0.8 bis 1.0. Der GC-Gehalt stellt mit ~52% kein Problem dar. Zusätzlich beinhaltet das Ursprungsgen jedoch doppelt seltene Arginin-Codons, welche zu einer Verlangsamung der Translation oder einer vollständigen Dissoziation des Translationsapparates führen können.<sup>[184]</sup> Das identische Bild zeigt sich für die Analyse für *E. coli*. Demzufolge ist eine Codon-Optimierung des Gens für eine verbesserte Expression in *S. cerevisiae* sinnvoll.<sup>[185, 186]</sup> Diese ließe sich zudem kombinieren mit der vorher genannten Möglichkeit unterschiedliche Affinitätstags am N-Terminus des Laccasegens anzubringen.

### 3 Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3



### 3.1 Einleitung

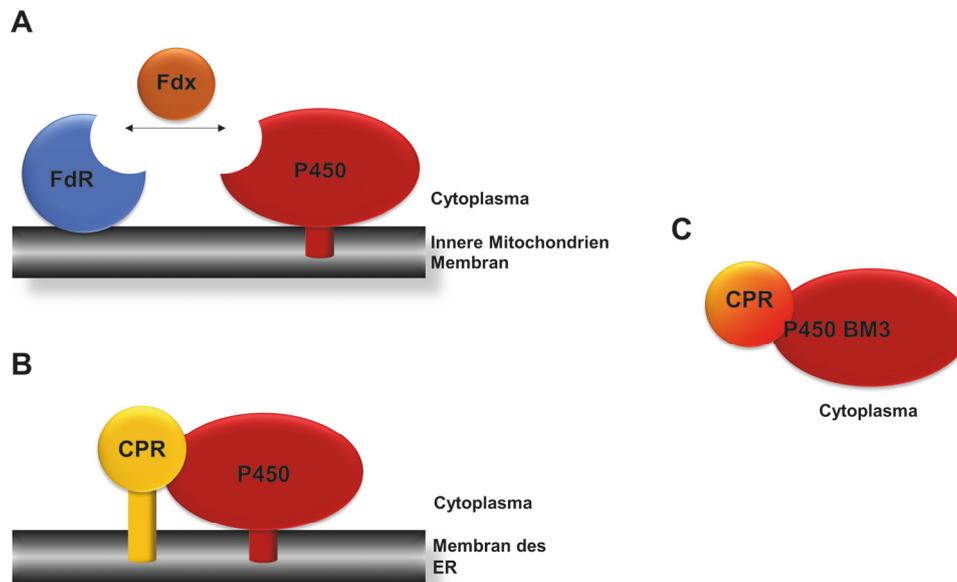
Ein weiterer Ansatz zur Bereitstellung neuer oder besserer Katalysatoren in der Chemie ist die Optimierung bereits bekannter Biokatalysatoren. Dieser Prozess ist Inhalt des zweiten Teils dieser Arbeit, der Optimierung einer biokatalytisch relevanten P450 Monooxygenase.

Ein prominentes Beispiel für eine solche biokatalytisch relevante Monooxygenase ist CYP102A1 (bzw. P450 BM3), eine P450 Monooxygenase aus *Bacillus subtilis*. CYP102A1 gehört wie alle Monooxygenasen zur Gruppe der Oxygenasen (vgl. Kapitel 1.2) und inseriert ein zuvor aktiviertes Sauerstoffatom aus O<sub>2</sub> in ein organisches Molekül, während das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird.<sup>[187]</sup> Die Aktivierung des Sauerstoffs geschieht in Monooxygenasen dabei meist mit Hilfe von Kofaktoren, welche als Elektronendonoren dienen. Die Elektronen werden dafür auf den Sauerstoff übertragen, bevor dieser im Anschluss in das organische Substrat inseriert werden kann.<sup>[188]</sup> Monooxygenasen sind in der Natur ubiquitär verbreitete Enzyme, welche sowohl in der Biosynthese und dem Metabolismus von Steroiden und Lipiden, als auch der Detoxifizierung hydrophober, wirtsfremder Moleküle eine tragende Rolle spielen.<sup>[189, 190]</sup> Ihre Rolle in der Detoxifizierung hydrophober Moleküle verdanken sie dabei ihrem hochvariablen aktiven Zentrum, wodurch diese Enzyme eine enorme Bandbreite an Substraten oxidieren können.<sup>[191]</sup> Die hohe Vielfalt an möglichen Substraten in Verbindung mit der Möglichkeit Sauerstoffatome gezielt in ein Zielmolekül einbringen zu können, ist dabei einer der Gründe weshalb diese Enzyme hochinteressant für biotechnologische Anwendungen sind.<sup>[192]</sup>

P450 BM3 gehört zu den Cytochrom P450 Monooxygenasen und damit zu den externen, Häm-abhängigen Monooxygenasen (EC 1.14.13-15.X). Im Gegensatz zu den internen Monooxygenasen beziehen diese die für die Reaktion notwendigen Elektronen, nicht aus dem Substrat, sondern von einem externen Redoxpartner. Ihren speziellen Namen verdanken diese Enzyme dabei ihren spektralen Eigenschaften (P = Pigment), mit einem typischen Absorptionsmaximum des reduzierten CO-gebundenen Komplexes bei ca. 450 nm.<sup>[193]</sup> Diese charakteristische Eigenschaft wird bis heute ausgenutzt um den Gehalt an aktiver Monooxygenase in einem komplexen Proteingemisch zu bestimmen.<sup>[194]</sup> Die Häm-abhängigen Monooxygenasen werden wiederum weiter in Untergruppen unterteilt, in Abhängigkeit von ihrem Redoxpartner. Mitochondriale Monooxygenasen (Klasse I) erhalten ihre Elektronen von Ferredoxin (Fdx), einem Eisen-Schwefel Protein, welche diese wiederum von einer membranständigen NAD(P)H-abhängigen Ferredoxin-Reduktase (FdR) erhält. Ferredoxin dient in diesem System als eine Art „Elektronenshuttle“, welches zwei Elektronen von der Reduktase auf das Hämprotein überträgt (Abbildung 33, A). In mikrosomalen Monooxygenasen (Klasse II) dagegen werden diese zwei Elektronen direkt von einer FMN und FAD enthaltenden, NAD(P)H-abhängigen, Cytochrom P450-Reduktase (CPR) auf das Hämprotein übertragen, ohne dass ein Shuttleprotein an dem Prozess beteiligt ist (Abbildung 33, B).<sup>[195]</sup> Beinahe alle bakteriellen Monooxygenasen zählen zu den Monooxygenasen der Klasse I, wohingegen eukaryotische Monooxygenasen zumeist nach dem Prinzip der Klasse II funktionieren.<sup>[196]</sup> Bakterielle Monooxygenasen

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Einleitung

lassen sich im Gegensatz zu ihren eukaryotischen Verwandten dabei meist leichter löslich exprimieren, aufreinigen und kristallisieren.



**Abbildung 33:** Schematischer Vergleich zwischen **A)** mitochondrialen (Klasse I) und **B)** mikrosomalen Monooxygenasen (Klasse II) und **C)** P450 BM3 in Anlehnung an Dickmann.<sup>[197]</sup>

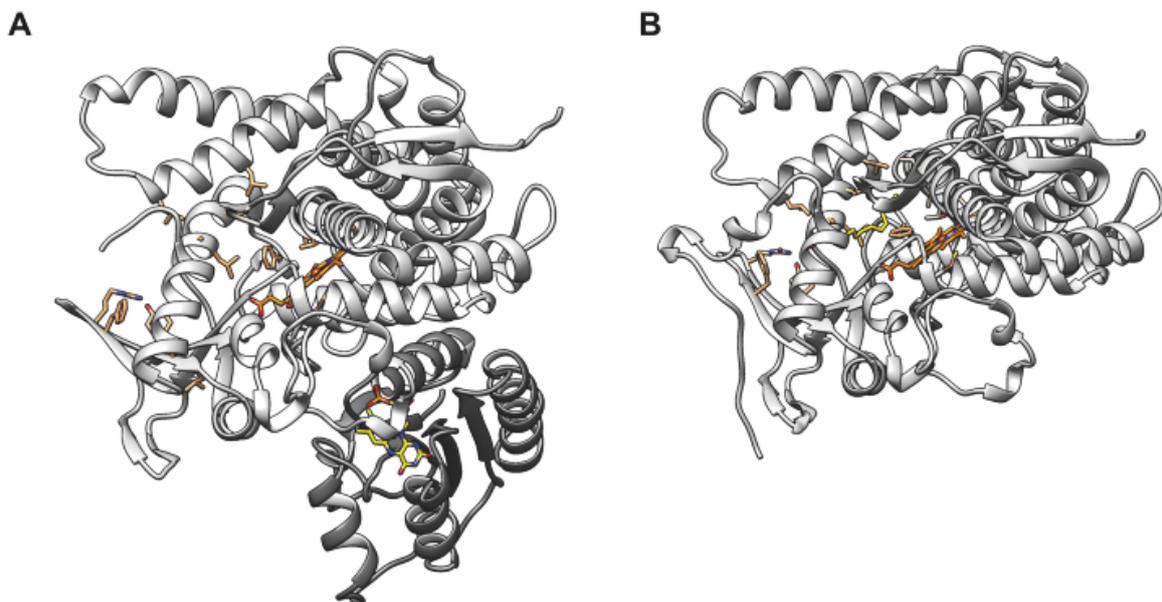
Die große Besonderheit von P450 BM3 ist, dass es sich bei dieser Monooxygenase um eine bakterielle Monooxygenase handelt, welche aber über eine Peptidbrücke mit einer Cytochrom-Reduktase verbunden ist. Es handelt sich demnach nicht nur um eine bakterielle Monooxygenase der Klasse II, sondern weiterhin um ein autarkes Fusionsprotein, welches zusätzlich in löslicher Form vorliegt, da es nicht wie viele andere Monooxygenasen membrangebunden ist (Abbildung 33, C).<sup>[193]</sup> Überdies ist es die Monooxygenase mit der bis heute höchsten, jemals gemessenen katalytischen Aktivität.<sup>[198]</sup> Diese hohe Aktivität beruht dabei vermutlich auf dem vergleichsweise effizienten Elektronentransfer vom NADPH-Cofaktor, über die fusionierte Cytochrom-Reduktase Domäne, auf das Häm-Eisen der Monooxygenase.<sup>[195]</sup> Da sich P450 BM3 verhältnismäßig einfach heterolog in *E. coli* exprimieren lässt, gehört es zu den am besten untersuchten Monooxygenasesystemen.<sup>[199, 200]</sup>

### 3.1.1 Struktur von CYP102A1 (P450 BM3)

Bei der bakteriellen Monooxygenase CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* handelt es sich um ein insgesamt 119 kDa großes Fusionsprotein, welches sich aus einer 66 kDa großen Reduktase-Domäne und einer 55 kDa großen Monooxygenase-Domäne zusammensetzt.<sup>[201]</sup> Während die Reduktase-Domäne auch ohne ihren Fusionspartner in aktiver Form vorliegt, ist die Monooxygenase-Domäne auf die Zufuhr von Elektronen aus der Reduktasedomäne angewiesen. Sie zeigte nach Abspaltung der Reduktasedomäne, im Anschluss an einen tryptischen Verdau, keinerlei Aktivität gegenüber den natürlichen Substraten mehr.<sup>[201]</sup> In der Reduktasedomäne befinden sich jeweils die Cofaktoren FMN und FAD, während die Monooxygenase jeweils ein Häm enthält. Nach der tryptischen Spaltung der beiden Domänen zeigten diese im Anschluss keinerlei Affinität mehr füreinander und derselbe Effekt

wurde observiert, wenn beide Domänen unabhängig voneinander exprimiert wurden.<sup>[202]</sup> Es findet demnach kaum bis gar kein Elektronentransfer zwischen den beiden Domänen statt, wenn diese nicht miteinander verbunden sind. Daher spielt die Linkerregion zwischen den beiden Domänen ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Aktivität des Flavocytochroms.<sup>[203]</sup>

Die Häm-Domäne besitzt einen 8-10 Å langen, hydrophoben Substrattunnel, welcher hauptsächlich aus unpolaren, hydrophoben Aminosäuren besteht. Am Eingang des Substrattunnels befinden sich ebenfalls hydrophobe Aminosäuren, welche dem Lösungsmittel ausgesetzt sind und von denen vermutet wird, dass sie eine Rolle im initialen Kontakt zu den lipophilen Substraten einnehmen.<sup>[204]</sup> Bis heute wurden Kristallstrukturen der substratfreien Häm-Domäne des Wildtyps,<sup>[204, 205]</sup> von substratgebundenen Strukturen,<sup>[206, 207]</sup> von der Struktur der FAD-Domäne (ohne FMN-Domäne) im Komplex mit der Häm-Domäne,<sup>[208]</sup> sowie von Teilstrukturen weiterer Varianten publiziert.<sup>[209-211]</sup> Es ist jedoch keine Struktur des gesamten Fusionsproteins des Wildtyps verfügbar. Ebenso ist keine der substratgebundenen Strukturen in einer „aktiven Konformation“, da sich das zu oxidierende Kohlenstoff der Substrate in zu großem Abstand zum Häm-Eisen befindet.<sup>[210]</sup> Einer der Gründe dafür könnte sein, dass P450 BM3 nach Bindung des Substrates eine erhebliche Strukturänderung vollzieht, in deren Verlauf der Eingang des Substrattunnels geschlossen wird (Abbildung 34). Diese Konformationsänderung kann möglicherweise nicht im Anschluss an die Kristallisation vollzogen werden, wenn das Enzym mit Substrat versetzt wird, wodurch es in seiner offenen Konformation verbleibt.<sup>[205]</sup>



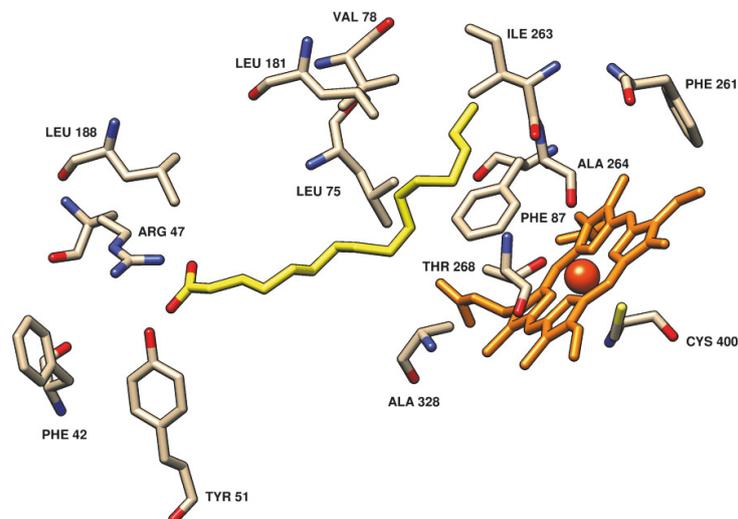
**Abbildung 34:** Vergleich der substratfreien und substratgebundenen Struktur von P450 BM3. Orange = Häm. Sandbraun = prominente Aminosäuren F42, Y51, A74, L75, V78, F87, L181, L188, F261, I263, A264, T268, A328, C400. Gelb = FMN, Palmitoleinsäure. Hellgrau = Häm-Domäne. Dunkelgrau = Teil der Reduktasedomäne **A)** Substratfreie P450 BM3, (PDB-Eintrag 1BVY) **B)** Häm-Domäne von P450 BM3 mit gebundener Palmitoleinsäure (PDB-Eintrag 1FAG).<sup>[207, 208]</sup>

Dagegen sprechen allerdings Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie. Diese zeigen ebenfalls einen Abstand des Substrates von 7.6 Å bis 7.8 Å zum Häm-Eisen, also dem Abstand, der in den

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Einleitung

Kristallstrukturen beobachtet wurde. Wurde die Häm-Domäne jedoch mit Dithionit reduziert, bewegte sich das Substrat mehrere Angström näher an das Häm-Eisen heran, auf eine vergleichbare Distanz wie in verwandten Monooxygenasen.<sup>[207]</sup> Ein weiterer Effekt, der die Aussagekraft der Kristallstrukturen erschwert, ist die Flexibilität des Fusionsproteins über sein Linkerpeptid. Dadurch ist es schwierig vom Fusionsprotein eine einheitliche, hochaufgelöste Kristallstruktur zu erhalten.

Die erhaltenen Kristallstrukturen zeigen, dass sich das Häm am Ende des hydrophoben Tunnels befindet und das Häm-Eisen über Cys400 als Thiolat mit dem Enzym verbunden ist. Orthogonal über dem Häm befindet sich Phe87, welches sich unter Bindung eines Substrates parallel zum Häm ausrichtet und somit den terminalen Rest der natürlichen Substrate (Fettsäuren der Länge C-12 bis C-20) in eine hydrophobe Tasche zwingt. Diese Tasche aus den Aminosäuren Leu75, Val78, Ile263, Ala264 und Phe78 ist vermutlich einer der Hauptgründe dafür, dass P450 BM3 diese Fettsäuren bevorzugt in  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3 oxidiert, nicht aber in terminaler Position.<sup>[207, 212, 213]</sup> Im Verlaufe der Zeit wurde eine Vielzahl von weiteren prominenten Aminosäurepositionen in der Häm-Domäne identifiziert, welche entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften der Monooxygenase haben (Abbildung 35). So ist davon auszugehen, dass Arg47 und Tyr51 einen Einfluss auf die Koordination des Carboxylrestes der Fettsäuren haben, welche bevorzugt von P450 BM3 oxidiert werden.<sup>[207]</sup> Thr268 ist dagegen wichtig für die Bindung von O<sub>2</sub> und den Elektronentransfer.<sup>[209]</sup> Phe42 befindet sich wiederum am Eingang des Substrattunnels und verschließt den Substrateingang vermutlich als eine Art hydrophobe Deckelstruktur, nachdem ein Substrat im aktiven Zentrum gebunden wurde.<sup>[196]</sup> Ala74, Leu181 und Leu188 stehen alle im direkten Kontakt mit dem Substrat und Mutationen in diesen Positionen führen häufig zu veränderten Produktspektren.<sup>[214-218]</sup> Auch wenn es sich bei den genannten Beispielen um prominente Positionen handelt, gibt es unzählige weitere Positionen, z.B. auch in der FMN-Domäne und abseits vom aktiven Zentrum, welche einen erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften der P450 BM3 haben können.<sup>[200, 219]</sup>



**Abbildung 35:** Darstellung des aktiven, substratgebundenen Zentrums von P450 BM3 mit prominenten Aminosäurepositionen (PDB-Eintrag 1FAG).<sup>[207]</sup> Orange = Häm. Gelb = Palmitoleinsäure.

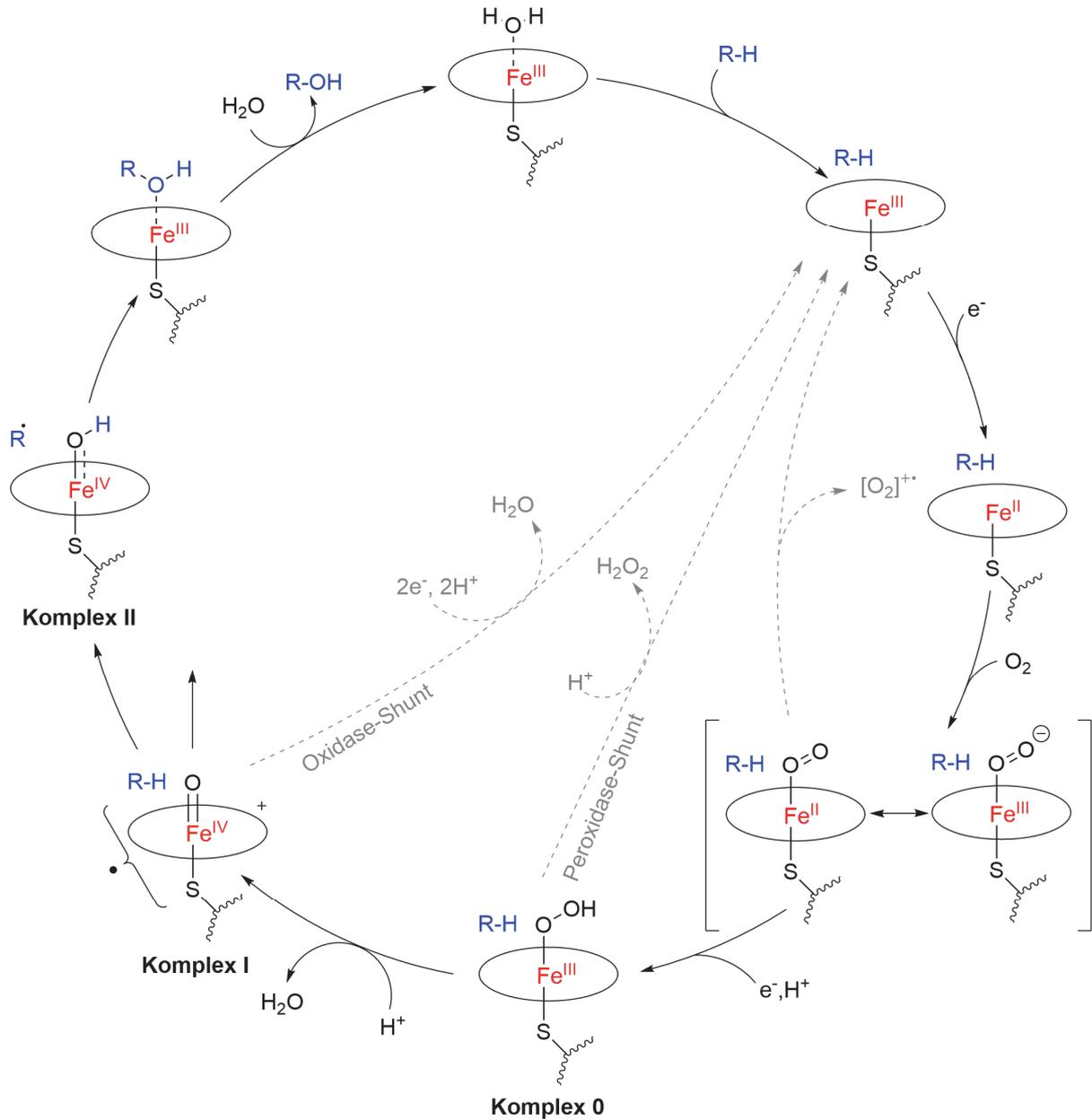
Erst kürzlich wurde zudem herausgefunden, dass CYP102A1 an seiner Reduktase-Domäne dimerisiert und dementsprechend als Homodimer vorliegt.<sup>[220, 221]</sup> Als solches könnten die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren der Reduktasedomäne, wie Cys 773 ebenfalls ein lohnendes Ziel für Untersuchungen oder für Immobilisierungsversuche sein. So musste diese Position für die erfolgreiche Kristallisierung der Reduktasedomäne beispielsweise durch ein Alanin ersetzt werden.<sup>[211]</sup>

### 3.1.2 Katalysezyklus von P450 BM3

Der Katalysezyklus von P450 Monooxygenasen hat die Forschung lange vor ein großes Rätsel gestellt, bevor es mehreren Arbeitsgruppen gelang die katalytisch aktive, sehr kurzlebige Spezies (Komplex I) zu erzeugen und einzufangen.<sup>[222, 223]</sup> Dafür wurde die P450 Monooxygenase CYP119 aus dem thermophilen Organismus *Sulfolobus acidocaldarius* mit *meta*-Chlorbenzoesäure behandelt um Komplex I zu erzeugen und die wässrige Lösung sofort in flüssiges Ethan (89 K) gesprüht um den hochreaktiven Komplex zu „trappen“. Nach dem Entfernen des Ethans bei ~120 K wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten anschließend spektroskopisch untersucht werden.<sup>[223]</sup> Auf diese Weise konnte die Funktionsweise von P450 Monooxygenasen und damit auch P450 BM3 endgültig aufgeklärt werden. Die Oxidation von Substraten findet dabei generell am Häm-Eisen statt, welches über ein hochkonserviertes Cystein an die Monooxygenase gebunden ist (Abbildung 35). Bindet ein Substrat unter Verdrängung eines Wassermoleküls, erfolgt eine Ein-Elektronen Reduktion des Häm Eisens und die Bindung eines Sauerstoffmoleküls. Diese Verbindung wird im Anschluss reduziert und protoniert, wodurch eine Eisen-III-Spezies (Komplex 0) erzeugt wird (Abbildung 36). Die Protonierung dieser Spezies hat die heterolytische Spaltung des gebundenen Sauerstoffs, unter Abspaltung von Wasser, zur Folge und generiert den erwähnten, kurzlebigen Komplex I. Diese hochreaktive Spezies ist nun in der Lage ein Wasserstoff vom gebundenen Substrat zu abstrahieren, wodurch eine Eisen-IV-Spezies (Komplex II) im aktiven Zentrum vorliegt. Gleichzeitig entsteht ein Substratradikal, welches in einem Folgeschritt von der Monooxygenase hydroxyliert werden kann, wodurch der Katalysezyklus vervollständigt wird. Das hydroxylierte Substrat verlässt das aktive Zentrum und wird wieder durch ein schwach koordinierendes Wassermolekül ersetzt und der Zyklus beginnt von vorne (Abbildung 36).<sup>[224, 225]</sup> Dieser Ablauf stellt jedoch nur den Idealfall dar. In der Realität kann an unterschiedlichen Stellen des Zyklus ein unproduktiver Verbrauch der Reduktionsäquivalente eintreten, ohne dass eine Oxidation des Substrates erfolgt. Diese unproduktiven Entkopplungsreaktionen, auch Shunt-Reaktionen genannt, generieren dabei schädliche, hochreaktive Sauerstoffspezies, welche sowohl das Enzym, als auch den gesamten Organismus schädigen können.<sup>[226]</sup> Die erste der möglichen Entkopplungsreaktionen ist eine Autooxidation nach Bindung von O<sub>2</sub> und Substrat im aktiven Zentrum. Dabei kommt es zu einer Freisetzung eines reaktiven Sauerstoffradikals. Eine zweite Entkopplungsreaktion kann dann im Komplex 0 eintreten, wenn dieser unter Freisetzung eines Peroxides hydriert wird. Die im Peroxidase-Shunt freigesetzten Peroxide können dabei ebenfalls Schäden am Enzym hervorrufen. Die dritte und letzte Möglichkeit der Entkopplung findet am Komplex I statt. Im sogenannten Oxidase-Shunt wird der Eisen-IV-Komplex durch die

Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3  
Einleitung

Reduktasedomäne, unter Freisetzung eines Wassermoleküls, reduziert. Diese Reaktion steht in direkter Konkurrenz zur Oxidation des Substrates und ist bevorzugt, wenn sich das Substrat zu weit von der aktiven Spezies entfernt befindet. [227, 228]



**Abbildung 36:** Katalysezyklus von P450 Monooxygenasen mit möglichen Entkopplungsreaktionen, in Anlehnung an McQuarters *et al.* und Denisov *et al.* [224, 225]

Ein vollständiger Reaktionszyklus kann demnach durch die nachfolgende Gleichung zusammengefasst werden (Formel 2).

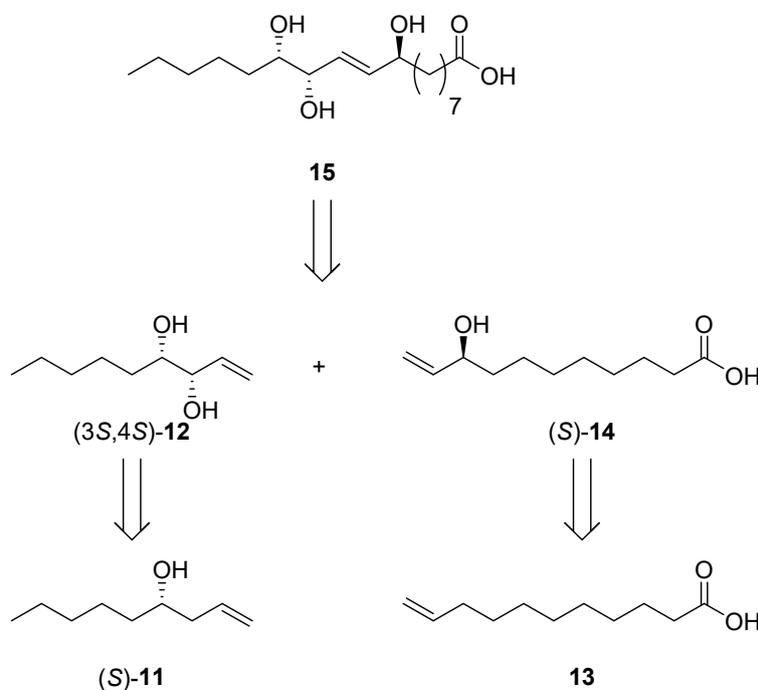
**Formel 2:** Reaktionsgleichung für einen vollständigen Katalysezyklus von P450 BM3.



## 3.2 Ergebnisse und Diskussion

### 3.2.1 Allylische Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (**11**) mit Hilfe von P450 BM3

Allylische Oxidationen sind in der klassischen Chemie ein hochrelevantes Thema, da es sich bei Allylalkoholen um ein in der Natur omnipräsentes Strukturmotiv handelt, welches zusätzlich viele weitere Möglichkeiten für Folgesynthesen wie Cyclopropanierungen, Epoxidierungen, Dihydroxylierungen und C-C-Verknüpfungen offenbart.<sup>[229]</sup> Die für allylische Oxidationen notwendigen Reagenzien, auf Basis von Selen oder Chrom, sind jedoch häufig toxisch und die Reaktionsbedingungen oftmals harsch. Ihr Einsatz in der Naturstoffsynthese ist daher eingeschränkt.<sup>[230]</sup> Darüber hinaus ist die Effizienz und vor allem die fehlende Selektivität der Umsetzung häufig ein Problem, welches den Einsatz zusätzlich erschwert. Ein solches Beispiel war in einer vorangegangenen Arbeit die allylische Hydroxylierung von (*S*)-Non-1-en-4-ol [(*S*)-**11**] zum gewünschten *syn*-Diol [(*3S,4S*)-**12**] (Abbildung 37).<sup>[197]</sup>



**Abbildung 37:** Retrosynthetischer Ansatz für die chemoenzymatische Synthese von Pinellinsäure (**15**) nach Neufeld und Dickmann.<sup>[197, 231]</sup>

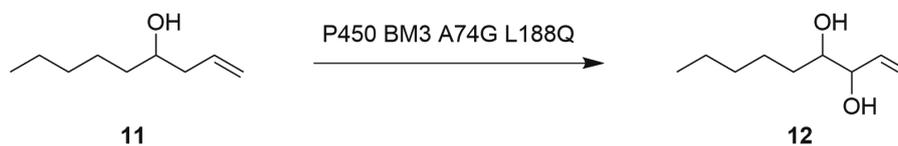
Im Rahmen dieser Arbeit, zur Untersuchung der chemoenzymatischen Synthese von Pinellinsäure (**15**), wurde versucht die allylische Hydroxylierung des Homoallylkohols **11** mit Hilfe von Selendioxid, zu optimieren. Die Effizienz der Umsetzung konnte jedoch nicht entscheidend gesteigert werden. Die Umsetzung des ungeschützten Homoallylkohols war unselektiv und das Einbringen von Schutzgruppen führte zu einer Verschiebung der Selektivität zum ungewünschten *anti*-Diol [*anti*-**12**].<sup>[197]</sup> Dieser Effekt basierte vermutlich auf dem sterischen Anspruch der Schutzgruppen und wurde bereits in vorherigen Naturstoffsynthesen beschrieben.<sup>[232]</sup> Bereits zuvor wurde gezeigt, dass die Mutante P450 BM3 A74G L188Q zur selektiven allylischen Hydroxylierung von Undecensäure (**13**) eingesetzt werden kann.<sup>[218]</sup> Daher wurden initiale Versuche mit dieser Monooxygenase und dem

Homoallylalkohol **11** unternommen. Es zeigte sich, dass die Variante P450 BM3 A74G L188Q ebenfalls in der Lage ist das nicht natürliche Substrat **11** in allylischer Position zu hydroxylieren. Zusätzlich erfolgte diese Hydroxylierung mit einer bevorzugten Selektivität für das gewünschte *syn*-Diol [*syn*-**12**]. Eine fehlende Regioselektivität führte jedoch zur Bildung zahlreicher Nebenprodukte, aus denen das gewünschte Produkt nicht isoliert werden konnte. Weiterhin war der Umsatz des Homoallylalkohols nicht vollständig, so dass erheblicher Optimierungsbedarf bestand.

### 3.2.2 Optimierung der allylischen Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (**11**) mit Hilfe von P450 BM3

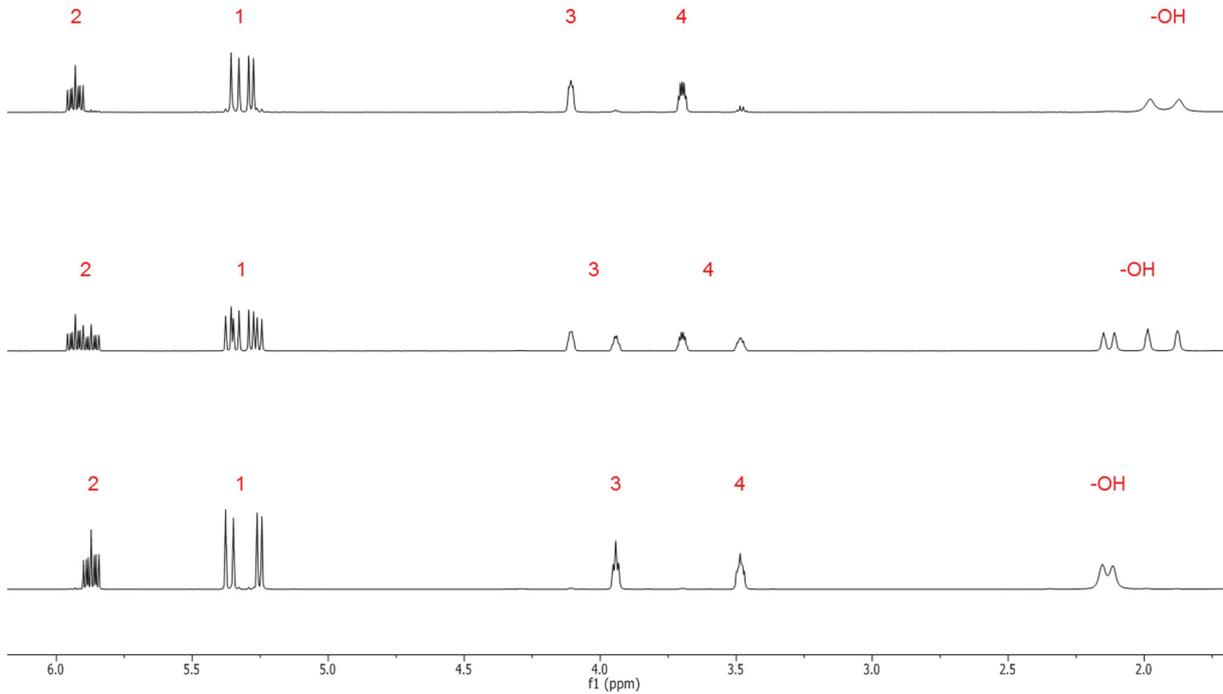
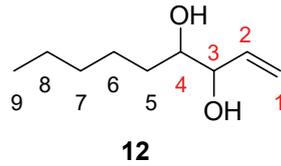
Zu Beginn wurde versucht den Umsatz des Substrates zu erhöhen und parallel die Verteilung von *syn*- [*syn*-**12**] und *anti*-konfiguriertem Diol [*anti*-**12**] zu ermitteln. Dazu wurde getestet, ob die Zugabe geringer Mengen Kosolvenz, in Form von Dimethylsulfoxid (DMSO), einen positiven Einfluss auf den Umsatz des racemischen Homoallylalkohols **11** zum 3,4-Diol **12** hat. Die Zugabe von Kosolvenzien kann bekanntermaßen einen positiven Effekt auf die Umsetzung hydrophober Substrate, mit Hilfe der P450 BM3, ausüben.<sup>[233]</sup> Um diesen Effekt zu beobachten, wurden die typischen, terminalen Protonensignale der Allylgruppe im NMR beobachtet und deren Verteilung zwischen dem Substrat **11** und dem 3,4-Diolprodukt **12** miteinander verglichen. Die chemische Verschiebung dieser Signale unterscheidet sich im NMR zwischen *syn*- [*syn*-**12**] und *anti*-Diol [*anti*-**12**] und ist darüber hinaus einzigartig für das 3,4-konfigurierte Diol **12** (Tabelle 2, Abbildung 38). Die restlichen Regioisomere wurden bei dieser ersten Untersuchung nicht näher betrachtet, da deren Signale im Roh-NMR nicht voneinander zu unterscheiden waren. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von DMSO keinen beträchtlichen Anstieg des Produktsignals, im Vergleich zum Substratsignal, zur Folge hatte. Das Verhältnis des Signals vom 3,4-Diol **12** zum Signal des Substrates **11** verblieb in allen Fällen in einem Bereich von etwa 30:70. In Anbetracht der Tatsache, dass es zusätzlich weitere Nebenprodukte gibt, ist die Menge an gebildetem 3,4-Diol **12** damit verhältnismäßig gering. Das Verhältnis von *syn*- [*syn*-**12**] zu *anti*-Diol [*anti*-**12**] blieb in allen untersuchten Proben in einem Bereich von etwa 75:25. Dies deutet darauf hin, dass die Stereoselektivität der Hydroxylierung ebenfalls nicht signifikant beeinflusst wird.

**Tabelle 2:** Einfluss von DMSO und Reaktionstemperatur auf das Verhältnis der terminalen, allylischen Protonensignale des Homoallylkohols **11** und des 3,4-Diols **12**, sowie auf das Verhältnis der Signale von *syn*-[*syn*-**12**] und *anti*-Diol [*anti*-**12**] im Anschluss an eine Umsetzung des Homoallylkohols **11** mit P450 BM3 A74G L188Q. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  3 mL: P450 BM3 Rohextrakt (9  $\mu$ M Endkonzentration), 30 % (v/v) Aktivitätspuffer, 1.8 kU Katalase, GDH-Glukose-NADPH Recycling, 10 mM Substrat, KPi-Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h. Verglichen wurden nur die Signale von Substrat **11** und 3,4-Diol **12** und miteinander ins Verhältnis gesetzt.



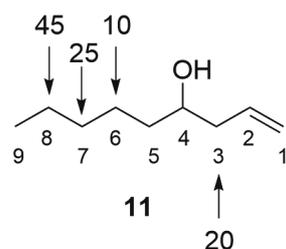
Temperatur [ °C]	DMSO- Konzentration [%]	Anteil <b>11</b> -Signal [%]	Anteil <b>12</b> -Signal [%]	Anteil [ <i>syn</i> - <b>12</b> ] [%]	Anteil [ <i>anti</i> - <b>12</b> ] [%]
30	0	75.8	24.2	75	25
30	1	71.9	28.1	76	24
30	2	69.9	30.1	75	25
30	3	69.9	30.1	78	22
37	0	74.6	25.4	82	18
37	1	64.5	35.5	72	28
37	2	76.9	23.1	79	21
37	3	70.9	29.1	74	26

Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3  
Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 38:** Relevante Tieffeldsignale im Protonenspektrum von **12**. Oben: [*anti*-**12**]; Mitte: Gemisch aus [*anti*-**12**] und [*syn*-**12**]; Unten: [*syn*-**12**].<sup>[197]</sup>

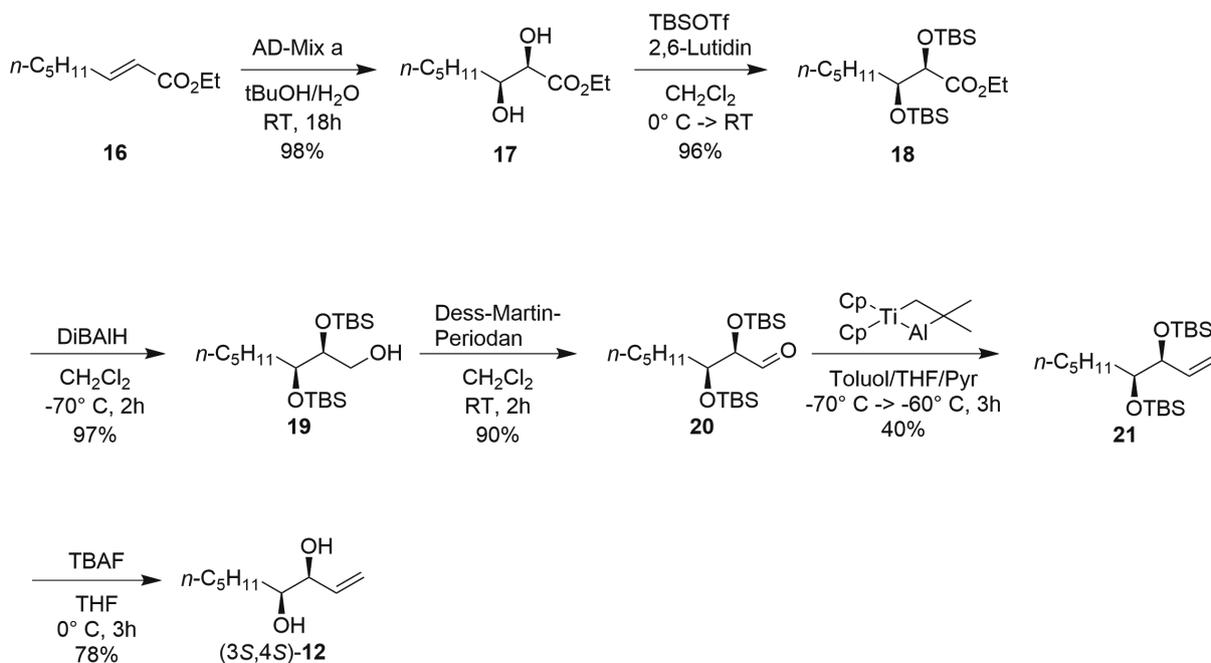
Um einen besseren Eindruck über die Verhältnisse der unterschiedlichen Produkte zu erhalten wurde eine Reaktion im größeren Maßstab durchgeführt und die Produkte anschließend säulenchromatografisch voneinander getrennt. Es gelang zwar nicht die Regioisomere vollständig voneinander zu trennen, es konnten aber vier Hauptprodukte im Anschluss an eine Untersuchung der Produkte mittels NMR und GC/MS identifiziert werden. Es zeigte sich, dass der Homoallylkohol **11** von der Monooxygenase bevorzugt in Position 8 hydroxyliert wird, gefolgt von Position 7 (Abbildung 39). Als dritthäufigstes Produkt entstand demnach das gewünschte 3,4-Diol **12**, gefolgt von einer geringen Menge an 4,6-Diol. Die Verhältnisse der isolierten Hauptprodukte beliefen sich auf ungefähr 45:25:20:10. Demnach korreliert das Muster der Hydroxylierung von **11** mit denen der natürlichen Substrate der wildtypischen Monooxygenase, welche bevorzugt in  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3 Position hydroxyliert werden.<sup>[212]</sup>



**Abbildung 39:** Positionen an denen P450 BM3 A74G L188Q das Substrat **11** bevorzugt hydroxyliert. Die Zahlen an den Pfeilen geben die ungefähre Verteilung der isolierten Hauptprodukte an.

Im Falle des Homoallylalkohols **11** würde demnach die Hydroxylgruppe in Position 4 die Position der Carboxylgruppe der natürlichen Substrate einnehmen, welche durch die Aminosäuren Y51 und R47 koordiniert wird.<sup>[207, 209]</sup> Die hydrophobe Alkylkette würde analog zu den Fettsäuren ins aktive Zentrum ragen (Abbildung 35). Die Hydroxylierung in allylischer Position wäre in Folge einer solchen Orientierung des Substrates jedoch nicht zu erwarten. Es muss demnach eine gewisse Flexibilität in der Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum des Enzyms vorliegen.

Untersuchungen der Reaktion mittels NMR waren auf Grund der Ähnlichkeit der Produkte an diesem Punkt nicht weiter zielführend. Daher wurde versucht sowohl eine Methode für die Unterscheidung der unterschiedlichen Regioisomere mittels GC/MS, als auch der unterschiedlichen Stereoisomere des 3,4-Diols **12** mittels Gaschromatografie, über chiraler stationärer Phase, zu finden. Für die Zuordnung der Signale der Stereoisomere des 3,4-Diols **12**, wurde dafür nach einer Vorschrift von Miura *et al.* das (3*S*,4*S*)-Non-1-en-3,4-diol [(3*S*,4*S*)-**12**] synthetisiert (Abbildung 40).<sup>[234]</sup>

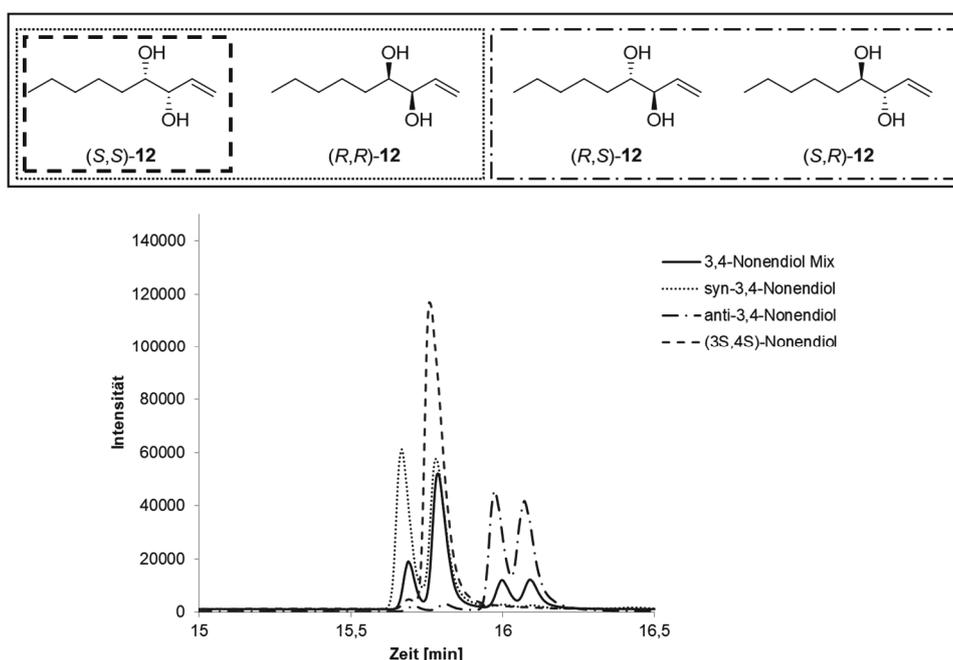


**Abbildung 40:** Synthese von (3*S*,4*S*)-Non-1-en-3,4-diol [(3*S*,4*S*)-**12**], ausgehend von (2*E*)-Ethyl oct-2-ensäure (**16**), nach einer Vorschrift von Miura *et al.*<sup>[234]</sup>

Da aus einer vorangegangenen Arbeit sowohl ein Gemisch aller Stereoisomere des 3,4-Diols **12**, als auch der getrennten *syn*- [*syn*-**12**] und *anti*-konfigurierten Produkte [*anti*-**12**] zur Verfügung stand,

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

konnte so die Entwicklung eines Trennprogrammes und eine anschließende Zuordnung der Signale erfolgen.<sup>[197]</sup> Die erste Auftrennung der Regioisomere mittels GC/MS war dabei nicht erfolgreich, da zu viele ähnliche Produkte entstanden, welche sich nicht vollständig voneinander trennen ließen. Die Auftrennung der *syn*- [*syn*-**12**] und *anti*-Stereoisomere [*anti*-**12**] des synthetisierten 3,4-Diols **12**, mittels Gaschromatografie über chiraler stationärer Phase, war dagegen erfolgreich. Die Signale der *syn*-Isomere [*syn*-**12**] konnten anschließend erfolgreich zugeordnet werden (Abbildung 41). Die Untersuchung mehrerer Umsetzungen von Non-1-en-4-ol (**11**) mit P450 BM3 zeigte jedoch auch in diesem Fall, dass die Signale der Regioisomere mit denen des 3,4-Diols **12** überlappen. Somit konnte auf Anhieb keine chromatografische Methode zur Auftrennung aller unterschiedlichen Produkte der Reaktion gefunden werden.

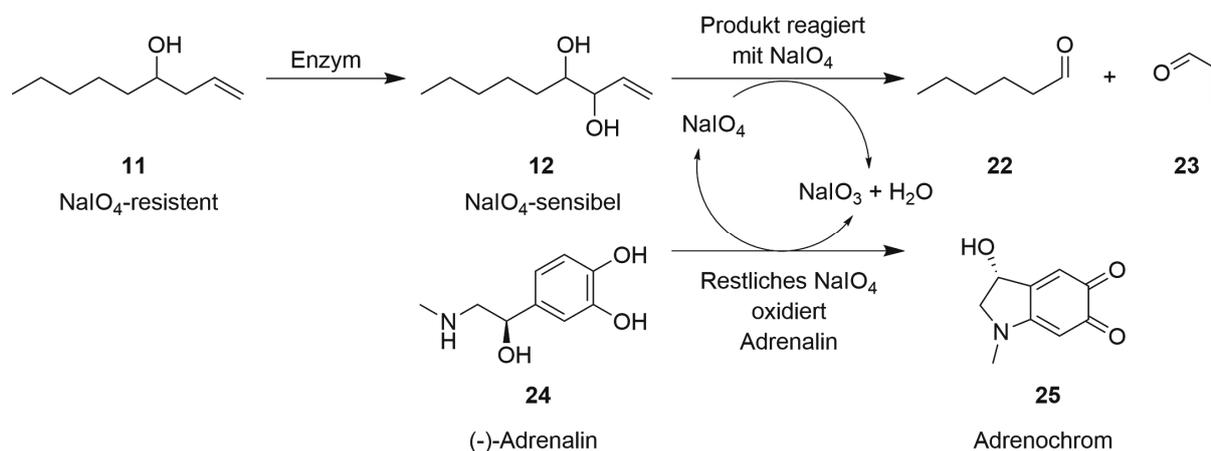


**Abbildung 41:** Trennung der *syn*- [*syn*-**12**] und *anti*-Diastereomere [*anti*-**12**] von Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Gaschromatografie über chiraler stationärer Phase.

Um das Trennproblem zu lösen müsste eine Vielzahl unterschiedlicher stationärer Phasen und Programme ausprobiert werden. Der Mehrwert eines solchen zeitlichen Aufwands war für das Diol-Produkt **12** allerdings nicht gegeben. Stattdessen wurde die grundsätzliche Fragestellung aufgeworfen, ob es eine Möglichkeit gibt P450 BM3 systematisch so zu verändern, dass sie bevorzugt in Nachbarschaft zu einer bereits bestehenden Hydroxylgruppe hydroxyliert. Damit würden sich die Beobachtungen aus der allylischen Hydroxylierung des Homoallylkohols **11** eventuell auf weitere Substrate übertragen lassen. Für die Untersuchung einer solchen These würde es jedoch vorerst eines Screenings bedürfen, welches gezielt nur 1,2-Diole, in Anwesenheit weiterer Diolprodukte, nachweisen kann. Mit einem solchen Screening wäre die Untersuchung der Hydroxylierung von **11** ebenfalls möglich.

### 3.2.3 Entwicklung eines Screenings für die Detektion von vicinalen Diolen, in P450 BM3 katalysierten Reaktionen

Vor der Generierung neuer Enzymvarianten stand damit die Entwicklung einer Plattform, mit der sich nicht nur Non-1-en-4-ol (**11**) auf  $\alpha$ -ständige Hydroxylierung zu einer bestehenden Hydroxygruppe untersuchen lassen kann. Stattdessen wäre eine Plattform wünschenswert, auf dessen Basis sich eine Vielzahl von Substraten untersuchen ließe. Dabei war es besonders wichtig, dass ausschließlich vicinale Diole detektiert werden. Weiterhin sollte eine solche Screening-Plattform möglichst sensitiv, schnell, kostengünstig und gut reproduzierbar sein. Sie sollte idealerweise in Mikrotiterplatten durchführbar sein und einfach handzuhaben. Eine Methode die viele dieser Punkte vereint ist die Detektion von Natriumperiodat sensitiven Verbindungen mit Hilfe von Adrenalin (**24**) (Abbildung 42).<sup>[235]</sup> Diese Methode wurde bereits erfolgreich für hydrolysierende Enzyme wie Epoxid-Hydrolasen durchgeführt und ist in der Lage 1,2-Diole, 1,2-Aminoalkohole, 1,2-Diamine,  $\alpha$ -Hydroxyketone, Thiole und Thioether, mit Hilfe einer chromogenen Folgereaktion zu quantifizieren. Dafür wird zuerst ein Natriumperiodat resistentes Substrat mit Hilfe eines Enzyms zu einem Natriumperiodat sensitiven Produkt umgewandelt. Dieses kann in einer Folgereaktion mit Natriumperiodat reagieren, wodurch dieses verbraucht wird. Im Anschluss wird Adrenalin zu der Reaktion gegeben und durch die verbliebene Menge Natriumperiodat zu dem chromogenen Adrenochrom (**25**) oxidiert, welches eine intensive rote Farbe hat und bei einer Wellenlänge von 490 nm photometrisch quantifizierbar ist (Abbildung 42). Ein Abschwächen, oder Ausbleiben dieser roten Farbe korreliert demnach mit der Menge an gebildetem vicinalem Diol.

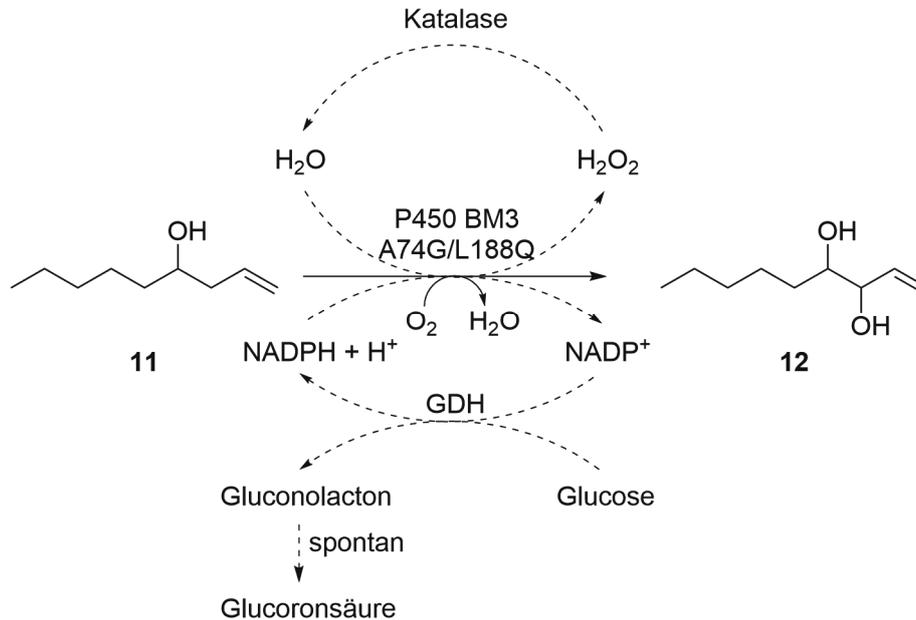


**Abbildung 42:** Prinzip des Adrenalin-Nachweises am Beispiel der Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (**11**) zu Non-1-en-3,4-diol (**12**), in Anlehnung an Fluxa *et al.*<sup>[236]</sup>

Diese Nachweisreaktion ist robust für hydrolytische Enzyme und kann sowohl für Hochdurchsatzscreenings, als auch zur Aufnahme von Aktivitätsprofilen dienen, da die Reaktion von pH 2 bis 10 konstant abläuft.<sup>[236]</sup> Im Gegensatz zu den bisher publizierten Systemen handelt es sich bei der Monooxygenase-Reaktion jedoch um ein komplexeres System. Da P450 BM3 auf den teuren Kofaktor NADPH angewiesen ist, wird dieses im Verlaufe der Reaktion durch ein Kofaktor-Recyclingssystem regeneriert. Dafür wird eine Glucose-Dehydrogenase (GDH) eingesetzt, welche

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

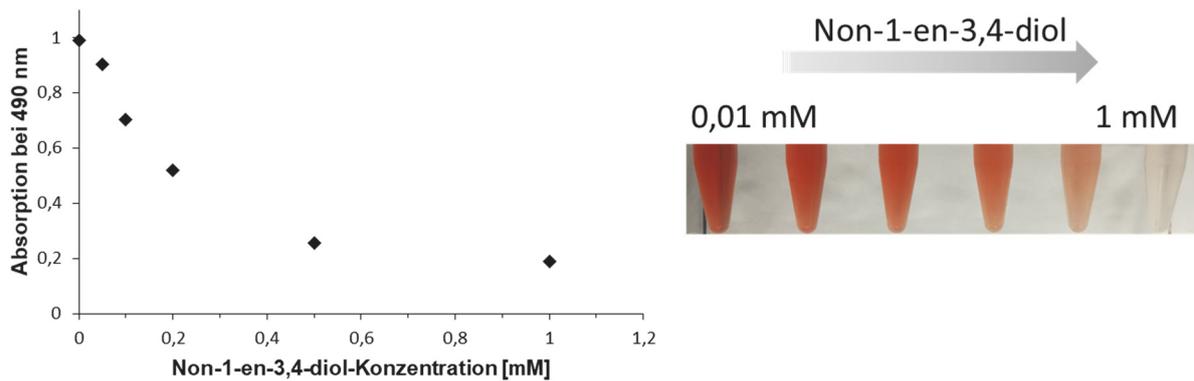
Glucose unter Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$  zum Gluconolacton oxidiert. Dadurch wird sichergestellt, dass trotz des Einsatzes geringer Mengen immer genug Äquivalente an  $\text{NADPH}$  in der Reaktion vorhanden sind. Zusätzlich befindet sich das Enzym Katalase im System, welches dabei hilft, die in den Shunt-Reaktionen generierten, reaktiven Peroxyspezies, abzubauen (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** Reaktionssystem von P450 BM3 A74G L188Q mit gekoppeltem Kofaktorrecycling durch die Glucose-Dehydrogenase, am Beispiel der Oxidation von Non-1-en-4-ol (**11**). Für die vereinfachte Darstellung wurde nur eines der möglichen Produkte abgebildet.<sup>[197]</sup>

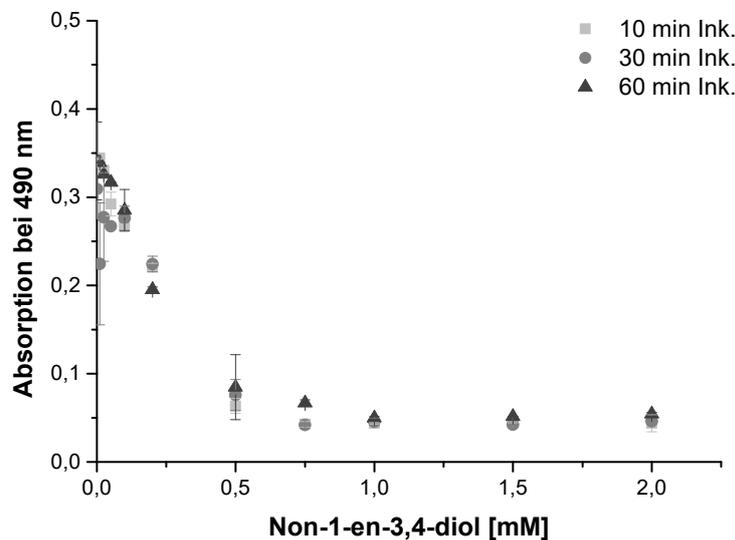
In diesem komplexen Reaktionssystem gibt es mehrere potenzielle Störfaktoren, die einen direkten Nachweis des Produktes aus dem Reaktionsgemisch, mit Hilfe des Adrenalin-Nachweises, verhindern. Zum einen benötigt die Reaktion die Anwesenheit von Kofaktoren wie  $\text{NADPH}$ , welche wiederum selber Natriumperiodat sensitiv sind, da sie Riboseeinheiten enthalten. Zum anderen liegt zusätzlich eine sehr hohe Konzentration an Glucose im Reaktionsgemisch vor, welche ebenfalls Natriumperiodat sensitiv ist. Die hohe Konzentration an Glucose ist notwendig, um sicherzustellen, dass immer genug  $\text{NADPH}$  in der Reaktion vorliegt, da es sich bei allen Reaktionen jeweils um Gleichgewichtsreaktionen handelt. Eine hohe Glucosekonzentration garantiert dadurch einen steten Verbrauch von  $\text{NADP}^+$  durch die GDH. Um die Bildung des Produktes nachweisen zu können müsste es demnach aus dem Reaktionsmedium extrahiert werden, um diese Störfaktoren zu entfernen.

Um eine erste Einschätzung der Sensitivität des Farbnachweises und der Kompatibilität mit dem Mustersubstrat Non-1-en-3,4-diol (**12**) zu erhalten, wurde eine Konzentrationsreihe des Diols in Puffer angesetzt und mit Natriumperiodat und Adrenalin (**24**) versetzt. Es zeigte sich, dass in reinem Puffer Produktkonzentrationen von 0,05 mM bereits zu einer messbaren Abschwächung der Absorption führen, welche ab einer Konzentration von 1 mM des Diols zum Ausbleiben einer Farbreaktion führt (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Nachweis von Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Adrenalin (**24**). In Anlehnung an eine Vorschrift von Fluxa *et al.* wurden 700  $\mu\text{L}$  Substratlösung in  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) mit 100  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und eine Stunde bei 25  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 100  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm vermessen wurde.<sup>[236]</sup>

Um zu überprüfen, ob eine Inkubationszeit des Diols mit dem Natriumperiodat von einer Stunde notwendig ist, wurden im nächsten Schritt die Signale nach Inkubationszeiten von 10, 30 und 60 Minuten miteinander verglichen. Gleichzeitig wurde das Gesamtvolumen der Reaktion auf 90  $\mu\text{L}$  reduziert, um mit einem Volumen zu arbeiten, welches in Mikrotiterplatten vermessbar ist. Dabei wurde ersichtlich, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Reaktionszeit von 10 Minuten zu denselben Ergebnissen führte wie eine längere Inkubationszeit von 60 Minuten (Abbildung 45).



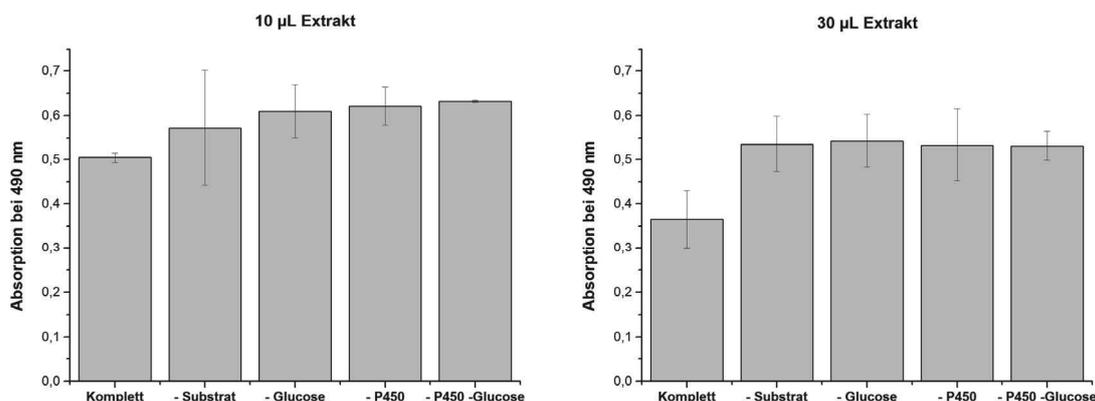
**Abbildung 45:** Nachweis von Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Adrenalin (**24**). In Anlehnung an eine Vorschrift von Fluxa *et al.* wurden 70  $\mu\text{L}$  Substratlösung in  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) mit 10  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 bis 60 Minuten bei 25  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm vermessen wurde. Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.<sup>[236]</sup>

Im Folgeschritt sollte untersucht werden, ob es möglich ist, Produkt aus dem komplexen Reaktionsgemisch der P450 BM3 Reaktion heraus zu extrahieren und im Anschluss mittels Adrenalin-Nachweis zu untersuchen. Dazu wurden in 15 mL Falcon-Reaktionsgefäßen typische Reaktionsansätze

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

einer P450 Reaktion, mit 9  $\mu\text{M}$  Endkonzentration an P450 BM3 und 5 mM Endkonzentration des Homoallylalkohol **11**, im 3 mL Maßstab angesetzt und die Reaktion analog zu den vorangegangenen Reaktionen bei 30 °C über Nacht durchgeführt. Diese wurden anschließend mit 1 mL Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) versetzt und 10 Sekunden stark geschüttelt. Es wurden 10  $\mu\text{L}$  bzw. 30  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abgenommen und auf 70  $\mu\text{L}$  respektive 50  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer gegeben. Im Folgeschritt wurden die Proben wie zuvor mit Natriumperiodatlösung und Adrenalinlösung behandelt und auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  gebracht. Die Absorption der Proben wurde bei 490 nm verfolgt.

Um den individuellen Einfluss der Störfaktoren zu untersuchen, wurden zusätzlich Reaktionsansätze in einem geringeren Maßstab von 200  $\mu\text{L}$  angesetzt, in denen jeweils einer der Störfaktoren abwesend war. Die Verhältnisse der restlichen Komponenten wurden dabei konstant gehalten. Diese Reaktionsansätze wurden ebenfalls mit MTBE extrahiert und mit den Proben der P450 Reaktion verglichen. So enthielt der erste dieser Testansätze alle Komponenten der P450 Reaktion aber kein Substrat, der zweite Ansatz alle Komponenten aber keine Glucose, der dritte Ansatz alle Komponenten außer dem P450 Rohextrakt und der vierte und letzte Ansatz weder P450 Rohextrakt noch Glucose (Abbildung 46). Wie bei den vollständigen Reaktionsansätzen, wurden auch bei diesen Proben einmal 10  $\mu\text{L}$  und einmal 30  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abgenommen und mit Natriumperiodat und Adrenalin (**24**) behandelt. Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass die Extraktion der komplexen Reaktionsansätze ausreicht um die möglichen Störfaktoren wie Glucose oder Enzym aus dem System zu entfernen. Auch das Substrat zeigt wie erwartet keine Sensibilität gegenüber Natriumperiodat.

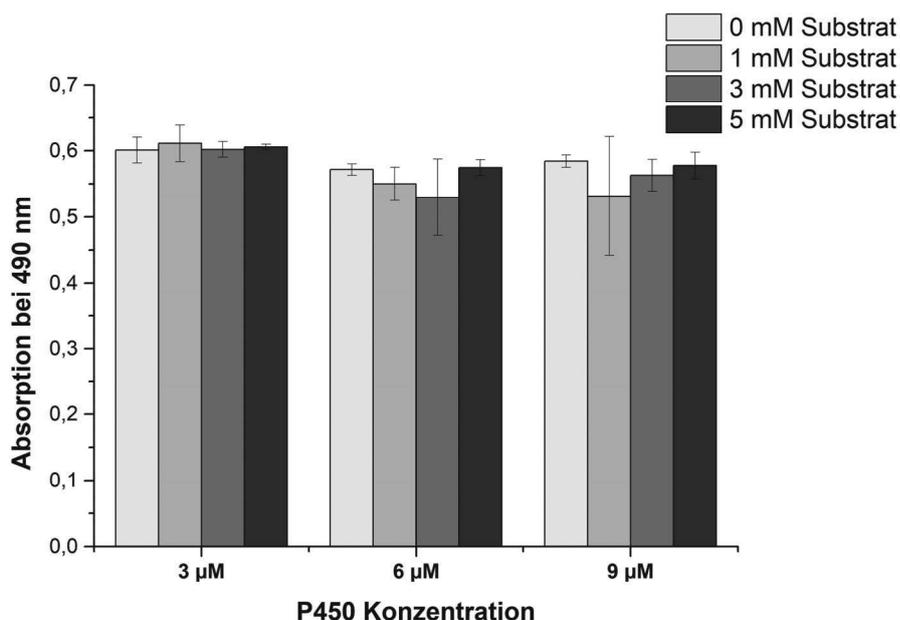


**Abbildung 46:** Untersuchung der P450 BM3 GQ katalysierten Oxidation von Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Adrenalin-Assay und Abgleich mit Testreaktionen in denen kritische Komponenten (Substrat, Enzym, Glucose) fehlen. Es wurden 10 bzw. 30  $\mu\text{L}$  der organischen Phase, aus der Extraktion der Reaktionslösungen, in 50  $\mu\text{L}$  bzw. 70  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) überführt und mit 10  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Multitierplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  3 mL: P450 BM3 A74G L188Q Rohextrakt (9  $\mu\text{M}$  Endkonzentration), 1.8 kU Katalase, GDH-Glucose-NADPH Recycling, 5 mM Substrat,  $\text{KPi}$ -Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h, 30 °C. Testreaktionen mit fehlenden Komponenten besaßen dieselbe Zusammensetzung der Reaktionslösung in kleinerem Maßstab von 200  $\mu\text{L}$ . Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Zusammengefasst wurde in keiner der untersuchten Testreaktionen eine reduzierte Absorption festgestellt. Nur in der vollständigen P450 Reaktion, wurde eine solche Abnahme detektiert, was für die Anwesenheit einer detektierbaren Menge von vicinalem Diol spricht (Abbildung 46). Für ein stärkeres Signal mussten dafür 30  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abgenommen werden, was im folgenden Schritt eine größere organische Phase in der Adrenalin-Reaktion und der anschließenden Messung zur Folge hat.

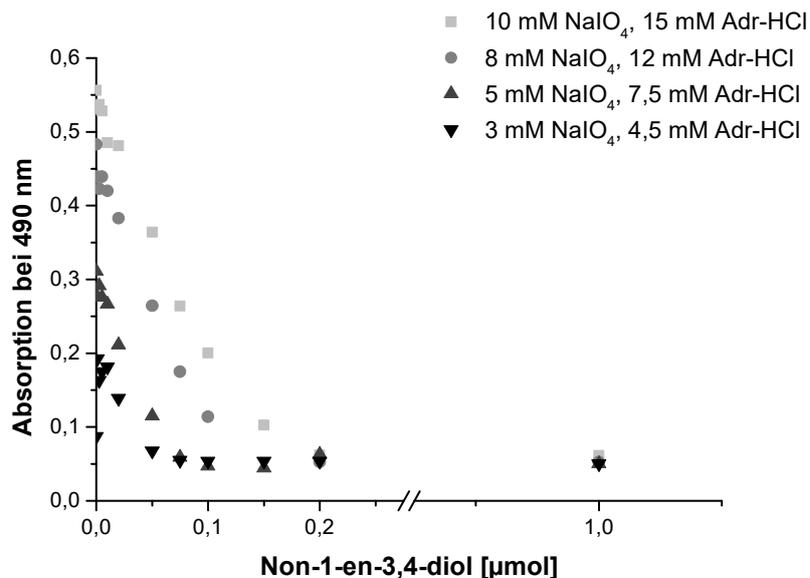
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese Ergebnisse auch unter tatsächlichen Screeningbedingungen reproduzierbar sind. Für die Untersuchung von P450 BM3 Mutantenbibliotheken wurden die unterschiedlichen Varianten der Monooxygenase, in 2 mL Multititerplatten, heterolog in *E. coli* exprimiert. Dafür werden 500  $\mu\text{L}$  Nährmedium mit dem Bakterium angezogen und die Zellen im Anschluss an die erfolgreiche Expression durch Zentrifugation geerntet. Die erhaltenen Zellpellets werden mit Hilfe von Lysozymlösung aufgeschlossen und das Lysat nach Abtrennung der Zelltrümmer in eine neue 2 mL Mikrotiterplatte überführt. In dieser findet in einem Volumen von 500  $\mu\text{L}$  die eigentliche Reaktion statt.<sup>[231]</sup> Die ausreichende Bildung von vicinalem Diol und die anschließende Extraktion müssen also auch in diesem Maßstab zu einem messbaren Signal im darauffolgenden Adrenalin-Nachweis führen. Unter Screening-Bedingungen kann dabei kein Einfluss auf die Konzentration an Monooxygenase genommen werden. Diese beruht auf der Effizienz des Aufschlusses und der Effizienz der heterologen Expression der entsprechenden Variante des Enzyms. Daher wurde getestet, ob unter den gegebenen Bedingungen eine Konzentration von 3-9  $\mu\text{M}$  Monooxygenase ausreicht, um ein ausreichendes Signal zu erhalten. Dazu wurden in einer 2 mL Mikrotiterplatte 500  $\mu\text{L}$  Reaktionsansätze mit 3, 6 und 9  $\mu\text{M}$  P450 BM3 A74G L188Q angesetzt und diese im Anschluss an die Reaktion extrahiert. Dafür musste zuerst das organische Lösungsmittel von MTBE auf Essigsäureethylester gewechselt werden, da MTBE einen zu hohen Dampfdruck besitzt und aus der Multikanalpipette tropft. Zusätzlich zu der Konzentration an Monooxygenase wurde eine Substratkonzentration von 0, 1, 3 und 5 mM untersucht. Für die Extraktion wurden die 500  $\mu\text{L}$  Reaktionsansätze mit 250  $\mu\text{L}$  Essigsäureethylester extrahiert und 10  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abgenommen und wie im vorherigen Experiment behandelt. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass in keiner der Proben unter Screening-Bedingungen ein ausreichendes Signal gemessen werden konnte (Abbildung 47).

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 47:** Untersuchung des Einflusses von Substrat- und Enzymkonzentration in der P450 BM3 GQ katalysierten Oxidation von Non-1-en-4-diol (**11**) im Screening-Maßstab, mittels Adrenalin-Assay. Es wurden 10 µL der organischen Phase, aus der Extraktion der Reaktionslösungen, in 70 µL KPi-Puffer (50 mM, pH 7.5) überführt und mit 10 µL Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10 µL Adrenalinlösung (1 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500 µL: P450 BM3 A74G L188Q Rohextrakt, 0.3 kU Katalase, GDH-Glucose-NADPH Recycling, 1-5 mM Substrat, KPi-Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h, 30 °C. Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Da kein Signal für alle angesetzten Proben detektiert werden konnte, war davon auszugehen, dass entweder nicht genug vicinales Diol gebildet wurde oder aber das Screening generell nicht sensitiv genug ist für die geringen Konzentrationen bzw. Stoffmengen an Produkt, die in der P450 katalysierten Reaktion entstehen. Bei den typischen Substraten einer P450 katalysierten Reaktion handelt es sich allerdings zumeist um geringfügig lösliche Substanzen. Werden Substratkonzentrationen von 10 mM erreicht, entspricht das in einem Reaktionsvolumen von 500 µL einer Stoffmenge von 5 µmol. Um einen Eindruck davon zu erhalten in welchem Stoffmengenbereich unter den gegebenen Screeningbedingungen ein ausreichendes Signal detektiert werden kann, wurden jeweils 10 µL einer Konzentrationsreihe von Non-1-en-3,4-diol (**12**) direkt mittels Adrenalin-Nachweis behandelt. Zusätzlich wurde die Konzentration der Natriumperiodat-Lösung und der Adrenalin-Lösung variiert. Das Verhältnis von 1:1,5 zwischen dem Periodat und dem Adrenalin wurde jedoch stets beibehalten. Damit wurde überprüft, ob die Sensitivität des Screenings in niedrigen Konzentrationsbereichen zunimmt, wenn man die Menge an Oxidationsmittel reduziert. Die Untersuchung zeigte, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Detektion des vicinalen Diols ab einer Stoffmenge von 0.025 µmol möglich ist. Eine Verringerung der Natriumperiodat-Stoffmenge trug allerdings nicht zu erhöhter Sensitivität bei. Stattdessen fiel das Nachweisfenster für höhere Stoffmengen an vicinalem Diol geringer aus, da die Lösung früher vollständig entfärbt vorliegt (Abbildung 48).

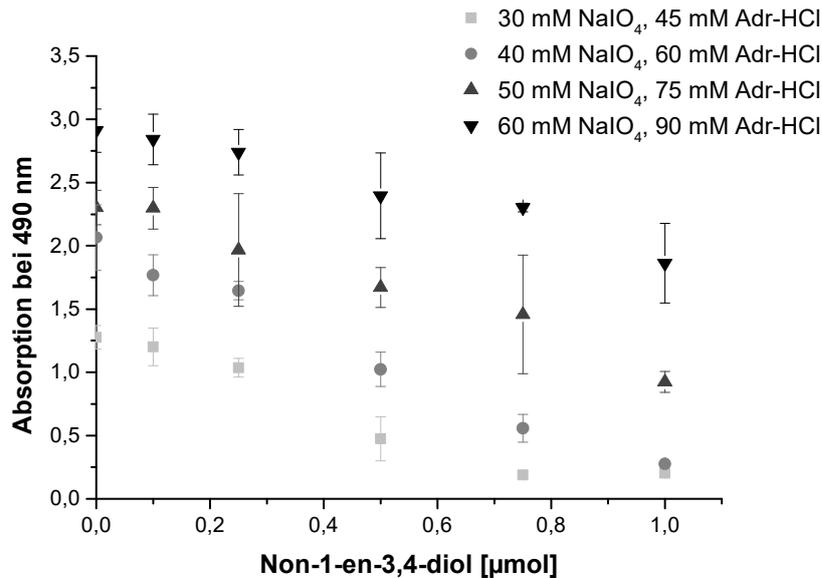


**Abbildung 48:** Direkter Nachweis von Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Adrenalin-Nachweis und Einfluss verringerter Mengen Natriumperiodat und Adrenalin auf den messbaren Bereich. Es wurden 10  $\mu\text{L}$  Non-1-en-3,4-diol-Lösung in 70  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) überführt und mit 10  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (3-10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (4.5-15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde getestet, ob die Extraktion eines 500  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatzes, mit anschließender Aufkonzentrierung der organischen Phasen ausreicht, um eine solche Stoffmenge an Diol bereitzustellen. Dafür wurde ein Konzentrationsbereich von 0.2 mM bis 2 mM des Diols **12** in Puffer vorgelegt. Dies würde in der eigentlichen Reaktion einem Umsatz des Homoallylkohols **11** zum Diolprodukt **12** von 4 % bis zu 40 % entsprechen und damit einer Stoffmenge von 0.1-1  $\mu\text{mol}$ . Diese Stoffmengen gelten für den Fall, dass eine Substratkonzentration von 5 mM eingesetzt wird und sich 100 % des Diols **12** extrahieren lassen würden. Weiterhin muss es möglich sein, die gesamte organische Phase abzunehmen, bevor man das Lösungsmittel abdampfen lässt. Die Ansätze wurden gemäß dieser Annahme extrahiert, aufkonzentriert und ebenfalls mit Hilfe des Adrenalin-Nachweises untersucht.

In diesem Test wurden die Reaktionsansätze mit 300  $\mu\text{L}$  Essigsäureethylester extrahiert und 200  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abgenommen und das Lösungsmittel abgedampft. Die erhaltenen Stoffmengen sind demnach um 33 % reduziert. Im Anschluss wurden die Proben wie zuvor mit Natriumperiodat und Adrenalin behandelt. Dieses Mal wurden jedoch höhere Konzentrationen der beiden Reagenzien eingesetzt, um zu überprüfen, ob der Verlauf der Datenpunkte ebenfalls linear bleibt. Das Diol **12** konnte tatsächlich auf diese Art erfolgreich extrahiert und detektiert werden und steigende Mengen an Natriumperiodat und Adrenalin (**24**) zeigten keinen Einfluss auf den linearen Zusammenhang der Messergebnisse (Abbildung 49). Bereits ein 10 %-iger Umsatz des Homoallylkohols **11** zum vicinalen Diol **12** (0.5  $\mu\text{mol}$  Produkt), wäre anhand dieser Ergebnisse detektierbar. Bei dem Einsatz der höherkonzentrierten Lösungen an Adrenalin und Periodat kommt es jedoch erwartungsgemäß auch zu einem Anstieg der Absorption, weshalb die Konzentrationen in zukünftigen Untersuchungen nicht zu hoch gewählt werden sollten, auch wenn größere Mengen Produkt untersucht werden.

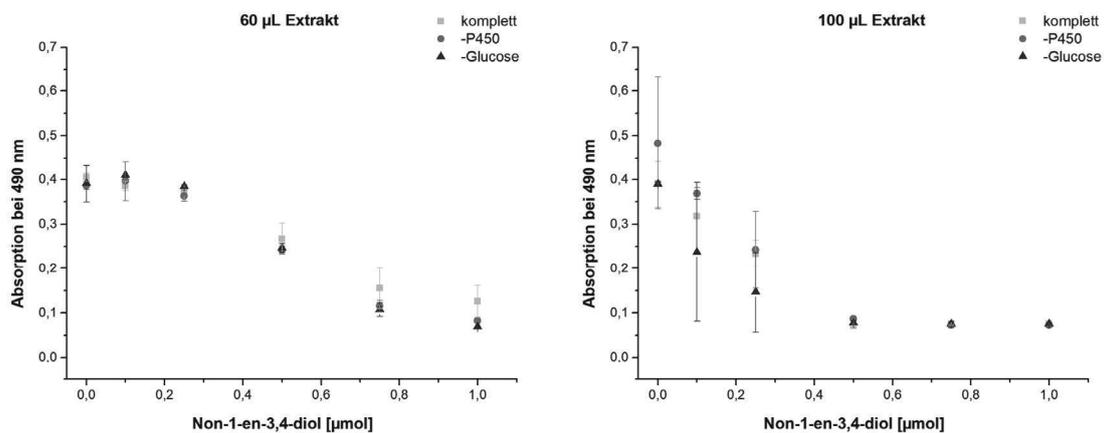
## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 49:** Nachweis von unterschiedlichen Stoffmengen an Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Adrenalin-Nachweis, im Anschluss an eine Extraktion aus KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.5) und dem Eindampfen der Proben. Auf die aufkonzentrierten Reste wurden 10  $\mu\text{L}$  DMSO gegeben und im Anschluss 70  $\mu\text{L}$  KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.5). Die Mischung wurde mit 10  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (30-45 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (45-90 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Extraktion und anschließende Aufkonzentration des Diols nicht nur aus einem einfachen Puffersystem realisierbar ist, sondern auch aus dem komplexen Reaktionsgemisch der P450 Monooxygenasereaktion. Bereits in den zuvor extrahierten Proben hatte sich gezeigt, dass die Extraktion der Monooxygenasereaktion zu der Ausbildung einer erheblichen Interphase führt, welche das Abnehmen der organischen Phase erschwert. Im Fall der zuletzt getesteten Ansätze wurde, im Gegensatz zu den vorherigen Ansätzen ohne Aufkonzentrierung, eine beträchtliche Menge der organischen Phase abgenommen (66 %). Dies erhöhte zwar signifikant die Sensitivität, erschwerte jedoch in hohem Maße die Handhabung. Aus diesem Grund war eine Extraktion des 500  $\mu\text{L}$  Reaktionsgemisches der P450 Monooxygenase mit 300  $\mu\text{L}$  Essigsäureethylester und anschließender Abnahme von 200  $\mu\text{L}$  der organischen Phase nicht möglich, da eine zu große Interphase entstand. Bereits eine sehr geringe Menge dieser Interphase führte zu einem vollständigen Ausbleiben der anschließenden Farbreaktion, vermutlich da sich auch große Mengen Glucose mit in der Interphase befinden. Daher wurde die Menge organisches Lösungsmittel auf 500  $\mu\text{L}$  erhöht und davon nur 60 bzw. 100  $\mu\text{L}$  abgenommen. Das hat zur Folge, dass vermutlich ein wesentlich geringerer Anteil des Produktes tatsächlich detektiert werden kann. Zusätzlich zu den Proben, welche alle Komponenten der P450-Reaktion enthielten, wurde erneut eine Probe ohne Rohlysat der Monooxygenase und eine Probe ohne Glucose extrahiert und gleichermaßen behandelt und vermessen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass diese beiden Störfaktoren einen negativen Einfluss auf die Extraktion des Produktes haben. Die Untersuchung der Proben ergab, dass die Extraktion und anschließende Aufkonzentrierung auch aus dem komplexen Gemisch möglich ist und die Anwesenheit von P450 Rohlysat und Glucose nicht zu

verminderter Extraktion des Diols **12** führen (Abbildung 50). Trotz der größeren Menge an organischem Lösungsmittel war es in Einzelfällen schwierig 100  $\mu\text{L}$  der organischen Phase im Anschluss an die Extraktion zu entnehmen, ohne dabei Teile der Interphase mit zu entnehmen. Die schwierigere Handhabbarkeit spiegelt sich auch in den größeren Abweichungen nieder. 60  $\mu\text{L}$  der organischen Phase ließen sich dagegen verlässlich entnehmen, dafür waren aber geringe Stoffmengen an Diol **12** im komplexen Reaktionsansatz nicht mehr detektierbar. Solange eine Extraktion der Proben notwendig ist, wäre demnach immer ein Kompromiss zwischen guter Handhabbarkeit und hoher Sensitivität des Screenings notwendig.



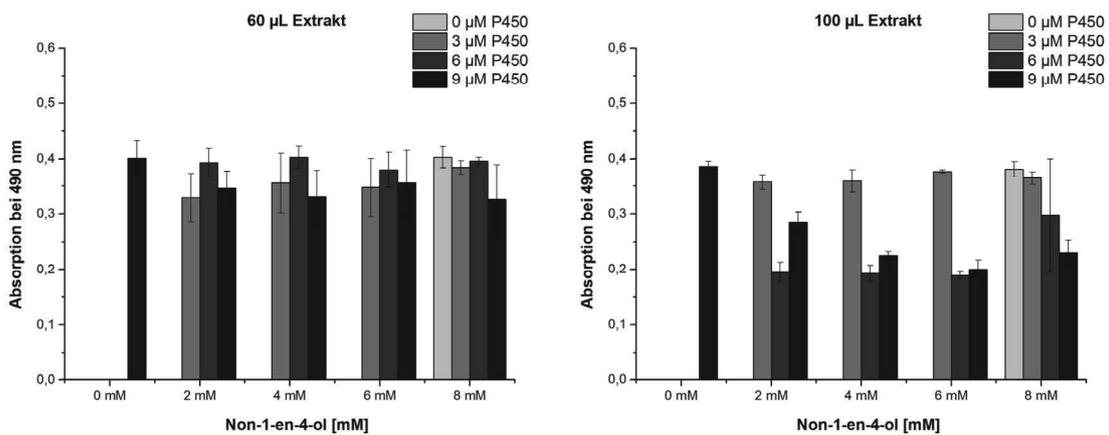
**Abbildung 50:** Nachweis von unterschiedlichen Stoffmengen an Non-1-en-3,4-diol (**12**) mittels Adrenalin-Nachweis, im Anschluss an eine Extraktion aus einer P450 BM3 GQ Reaktionsmischung und dem Eindampfen einer 60  $\mu\text{L}$  bzw. 100  $\mu\text{L}$  Probe der organischen Phase. Auf die aufkonzentrierten Reste wurden 10  $\mu\text{L}$  DMSO gegeben und im Anschluss 70  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5). Die Mischung wurde mit 10  $\mu\text{L}$  Natriumperodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Mit Hilfe der neuen Erkenntnisse wurden erneut Reaktionsansätze im Screening-Maßstab mit unterschiedlicher Konzentration an P450 A74G L188Q und unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat durchgeführt. Dabei wurde observiert, ob die geringe Menge an vicinalem Diol, welche in dieser Reaktion generiert wird, mit dem neuen Protokoll detektierbar ist. Dafür wurden die 500  $\mu\text{L}$  Reaktionsansätze mit 500  $\mu\text{L}$  Essigsäureethylester extrahiert und im Anschluss versucht 60 bzw. 100  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abzunehmen. Diese wurden analog zum vorherigen Experiment aufkonzentriert und mittels Adrenalin-Nachweis zu untersucht. Als Kontrollen dienten jeweils eine Probe, welche eine hohe Konzentration an P450 BM3 A74G L188Q enthielt (9  $\mu\text{M}$ ), aber kein Substrat und eine Probe, welche eine hohe Menge Substrat enthielt (8 mM), aber kein P450 Rohlysat.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Monooxygenase nicht genug vicinales Diol aus dem Homoallylalkohol **11** gebildet hatte, um diese Menge mit Hilfe des Adrenalin-Nachweises, unter Einsatz von 60  $\mu\text{L}$  der organischen Phase, nachzuweisen. Entnahm man dagegen 100  $\mu\text{L}$  der organischen Phase im Anschluss an die Extraktion und verdampfte das Lösungsmittel, konnten für höhere Konzentrationen an eingesetzter Monooxygenase ein Signal detektiert werden (Abbildung 51). Dagegen war kein Signal in

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

den Kontrollreaktionen ersichtlich, welche entweder nur Substrat oder nur Monooxygenase enthielten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in der Reaktion genug vicinales Diol gebildet worden ist, um die Reaktion mit Hilfe des Adrenalin-Assays untersuchen zu können. Weiterhin zeigte sich, dass erst ab einer Monooxygenase-Konzentration von 6  $\mu\text{M}$  ausreichend gewünschtes Produkt gebildet wurde. Substratkonzentrationen zwischen 2-6 mM hatten dagegen keinen Einfluss. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass es sich nur um Endpunktmessungen handelt, es können also keine Aussagen über den Verlauf der Reaktion getätigt werden. Eventuell wäre im Verlauf der Reaktion ein Einfluss beider Variablen sichtbar.



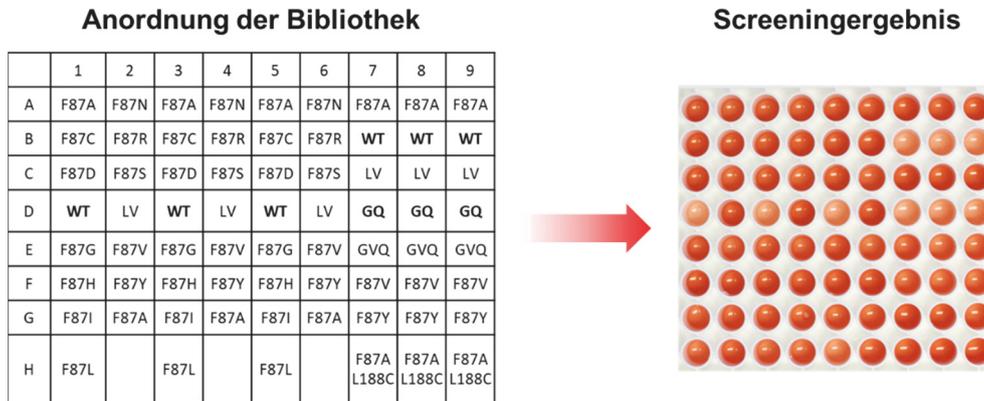
**Abbildung 51:** Untersuchung des Einflusses von Substrat- und Enzymkonzentration in der P450 BM3 GQ katalysierten Oxidation von Non-1-en-4-diol (**11**) im Screening-Maßstab, mittels Adrenalin-Assay. Die Überreste aus der Extraktion der Reaktionslösungen und anschließenden Abdampfen des Lösungsmittels, wurden in 10  $\mu\text{L}$  DMSO aufgenommen und mit 70  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) und 10  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500  $\mu\text{L}$ : P450 BM3 A74G L188Q Rohextrakt (3-9  $\mu\text{M}$  Endkonzentration), 0,3 kU Katalase, GDH-Glucose-NADPH Recycling, 0-8 mM Substrat,  $\text{KPi}$ -Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h, 30  $^{\circ}\text{C}$ . Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Als nächstes sollte das Screening mit exprimierten P450 BM3 Bibliotheken getestet werden. Wie bereits erwähnt werden für die Erstellung und Untersuchung der Bibliotheken Varianten der Monooxygenase in 2 mL Mikrotiterplatten exprimiert und die Zellen mittels Zentrifugation geerntet. Im Anschluss erfolgt ein Aufschluss dieser Zellen mit Hilfe von Lysozym und dem Abtrennen der Zelltrümmer über erneute Zentrifugation, nach dem Vorbild vorhergegangener Screening-Untersuchungen.<sup>[231, 237]</sup> Es wurde dementsprechend überprüft, ob das Screening auch unter diesen Bedingungen funktioniert. In einem ersten Test konnte dabei kein ausreichendes Signal für eine der Varianten detektiert werden (Abbildung 52). Alle Proben zeigten eine ähnliche Absorption. Diese war im selben Bereich wie die Absorption von jenen Proben, in denen *E. coli* nur einen leeren Vektor enthielt, also keine P450 BM3 exprimiert wurde.

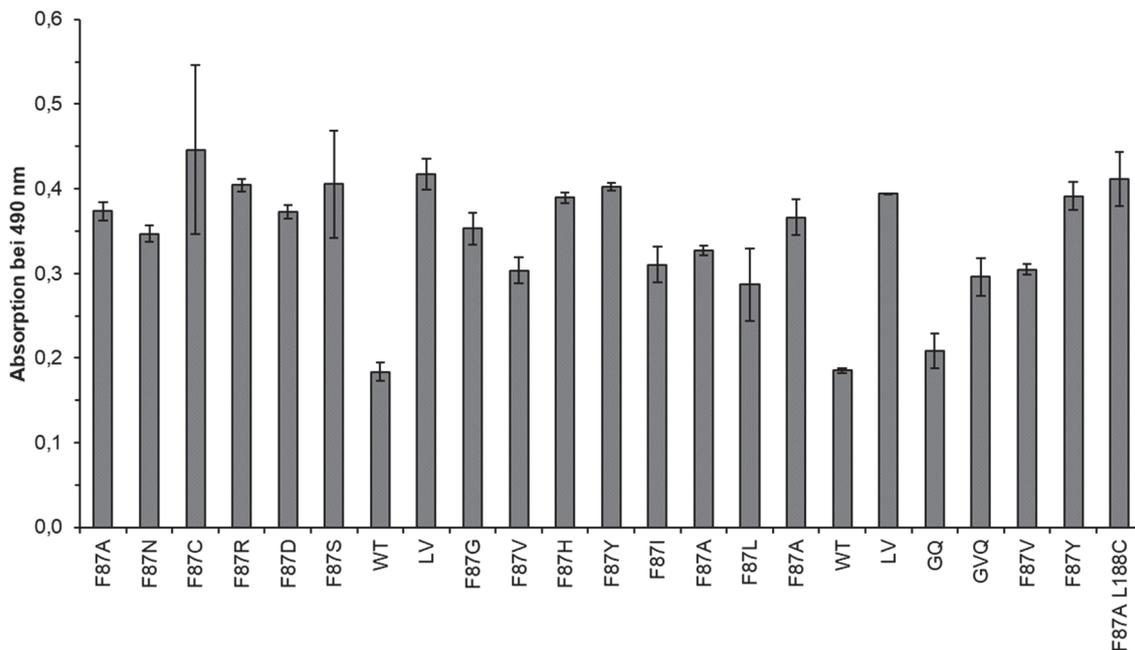


## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

werden, da die vorliegende Plattform dazu bisher keine Möglichkeit bietet. Nichtsdestotrotz wurde das Screening in einem weiteren Versuch mit höherem Anteil an abgenommener, organischer Phase wiederholt. Dieses Mal ergab sich tatsächlich ein klares Muster im Adrenalin basierten Nachweis von vicinalem Diol, welches der Anordnung der P450 BM3 Varianten auf der Mikrotiterplatte entsprach (Abbildung 53).



**Abbildung 53:** Vergleich der Anordnung einer P450 BM3 Bibliothek mit dem Muster der Farbreaktion des Adrenalin basierten Nachweises von vicinalem Diol, im Anschluss an die Oxidation von Non-1-en-4-ol (**11**), mit unterschiedlichen Varianten von P450 BM3. WT = Wildtyp, LV = Leervektor, GQ = A74G L188Q, GVQ = A74G F87V L188Q. P450 BM3 Varianten in denen die rote Färbung signifikant schwächer war wurden hervorgehoben.



**Abbildung 54:** Untersuchung einer Monooxygenase-Bibliothek auf die Bildung von vicinalem Diol aus Non-1-en-4-ol (**11**). 500  $\mu$ L Reaktionsansätze in 1 mL Multiterplatten wurden mit 500  $\mu$ L Essigsäureethylester extrahiert und 300  $\mu$ L der organischen Phase abgenommen und das Lösungsmittel abdampfen gelassen. Die Überreste wurden in 10  $\mu$ L DMSO aufgenommen und mit 70  $\mu$ L  $KP_i$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) und 10  $\mu$ L Natriumperodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25  $^{\circ}$ C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu$ L Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500  $\mu$ L: 200  $\mu$ L P450 BM3 Rohlysate, 0.3 kU Katalase, GDH-Glucose-NADPH Recycling, 6 mM Substrat,  $KP_i$ -Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h, 30  $^{\circ}$ C. Für jede Untersuchung wurden jeweils drei gleichartige Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. WT = Wildtyp, LV = pET28 Leervektor, GQ = A74G L188Q, GVQ = A74G F87V L188Q.

Auch die Auswertung der Daten zeigte einen klaren Zusammenhang zwischen dem Ausbleiben der roten Färbung in Anwesenheit von vicinalem Diol und der Anordnung der Varianten der Monooxygenase (Abbildung 54). Jene Varianten, welche dabei nach diesem Screeningergebnis die höchste Menge an vicinalem Diol erzeugten, waren der Wildtyp und die bereits zuvor eingesetzte Variante A74G L188Q.

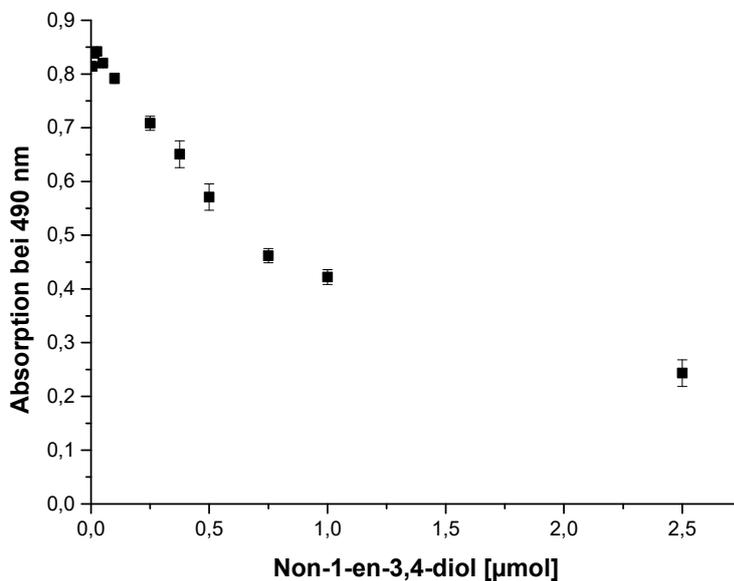
Trotz intensiver Bemühungen konnte dieses Ergebnis in anderen Bibliotheken nicht reproduziert werden. Zumeist war das Abnehmen einer solchen Menge des organischen Lösungsmittels nicht möglich, ohne gleichzeitig Interphase mit in die Multipipette zu ziehen. Zum anderen wurde in den Reaktionen vermutlich nicht genug Diol gebildet, um ein ausreichendes Signal zu erzeugen.

### 3.2.3.1 Testen alternativer Kofaktor-Recyclingsysteme für das vicinale Diol-Screening

Da im Besonderen die Handhabung der Extraktion der Proben eine enorme Hürde darstellte und die Reproduzierbarkeit stark beeinträchtigte, wurden Möglichkeiten gesucht dieses Problem zu umgehen. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf das notwendige Cofaktor-Recycling System mit der Glucose-Dehydrogenase gelegt. Dieses ist der Hauptgrund dafür, dass die Extraktion der Proben überhaupt notwendig ist, da die sehr hohe Konzentration an Glucose die direkte Messung von weiteren vicinalen Diolen unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde versucht das etablierte Cofaktor-Recycling durch andere Varianten zu ersetzen. Eine mögliche Alternative stellte dabei die Formiat-Dehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* dar. Diese Dehydrogenase katalysiert natürlicherweise die Oxidation von Formiat zu Kohlenstoffdioxid, unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu NADH. Die Reaktion ist dabei unter normalen Bedingungen irreversibel und das entstandene  $\text{CO}_2$  lässt sich einfach aus dem Reaktionsgemisch entfernen und stört nicht bei der weiteren Aufreinigung des Produktes.<sup>[240]</sup> Auf Grunde dessen wurde bereits früh das Potential dieses Enzyms in der enzymkatalysierten chiralen Synthese entdeckt.<sup>[241, 242]</sup> Auf der anderen Seite ist die Geschwindigkeit und die operative Stabilität des Enzyms verhältnismäßig gering und alle natürlich vorkommenden Formiat-Dehydrogenasen sind ausschließlich in der Lage NADH zu regenerieren, nicht aber NADPH.<sup>[240]</sup> Daher wurden Bemühungen unternommen die Expressionsfähigkeit des Enzyms in *E. coli* zu verbessern und  $\text{NADP}^+$  als Cofaktor zu akzeptieren.<sup>[243, 244]</sup> Als solches ist dieses Enzym auch in der Lage das Cofaktor-Recycling in P450 BM3 katalysierten Reaktionen zu betreiben.<sup>[244-246]</sup> Eine modifizierte Variante, welche in der Lage ist  $\text{NADP}^+$  zu oxidieren ( $\text{FDH}^*$ ), wurde heterolog in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert und im Anschluss über ein His-Tag System aufgereinigt.<sup>[244]</sup> Auf diese Weise konnte aufgereinigtes Enzym mit einer Aktivität von 1.8 U/mL im Zielpuffer isoliert werden. Bevor das alternative Cofaktor-Recyclingsystem im Rahmen des vicinalen Diol Screenings eingesetzt wurde, erfolgte ein Test auf die direkte Untersuchung des komplexen Reaktionssystems, mit Hilfe des Adrenalin-Nachweises. Die Reaktion wurde davor vorab nicht wie üblich extrahiert. Dazu wurden definierte Mengen von Non-1-en-3,4-diol (**12**) in unterschiedliche Reaktionsansätze gegeben und diese mit Natriumperiodat und Adrenalin (**24**) behandelt. Da dieses Mal keine Aufkonzentrierung der untersuchten Proben erfolgen konnte, wurden 100  $\mu\text{L}$  des Reaktionsansatzes direkt untersucht. Auf Grund dessen musste für ein ausreichendes Absorptionssignal parallel die Menge an Natriumperiodat und Adrenalin (**24**) erhöht werden.

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

Schlussendlich konnte das vicinale Diol aber erfolgreich bis zu einer Konzentration von  $\sim 0.2$  mM nachgewiesen werden, was einer Stoffmenge von  $\sim 0.1$   $\mu\text{mol}$  im typischen Reaktionsansatz von  $500$   $\mu\text{L}$  entspricht (Abbildung 55).



**Abbildung 55:** Nachweis von unterschiedlichen Stoffmengen an Non-1-en-3,4-diol (**12**) aus einem P450 BM3 Reaktionsansatz mit  $\text{FDH}^+$  basiertem Cofaktorrecycling, mittels Adrenalin-Nachweis. Es wurden  $100$   $\mu\text{L}$  aus dem Reaktionsansatz entnommen und mit  $40$   $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung ( $10$  mM) versetzt und  $10$  Minuten bei  $25$   $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden weitere  $40$   $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung ( $15$  mM) dazugegeben und die Reaktion für  $5$  min inkubiert, bevor die Absorption bei  $490$  nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsansatz:  $\Sigma$   $500$   $\mu\text{L}$ :  $200$   $\mu\text{L}$  P450 BM3 Rohlysät,  $0.3$  kU Katalase,  $\text{FDH}^+$ -Formiat-NADPH Recycling,  $0$ - $2.5$   $\mu\text{mol}$  Substrat,  $\text{KPI}$ -Puffer  $50$  mM, pH  $7.5$ . Für jede Untersuchung wurden drei Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

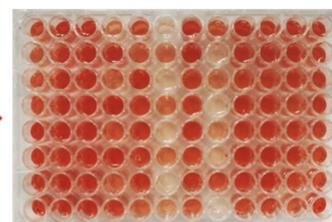
Damit ist es erneut im selben Bereich wie in den ersten Experimenten ohne vorab Extraktion (Abbildung 45). Die Sensitivität ist demzufolge ebenfalls wieder verringert, aber im Gegenzug muss keine Extraktion der Reaktionsansätze mehr erfolgen.

Analog zu den vorangegangenen Screeningversuchen mit  $\text{GDH}$  basiertem Cofaktorrecycling System, wurden unterschiedliche P450 BM3 Bibliotheken mit dem alternativen Recyclingsystem auf die  $\alpha$ -ständige Hydroxylierung von Non-1-en-4-ol (**11**) untersucht. Erneut zeigte sich ein definiertes Muster auf der Platte, welches mit der Anordnung der unterschiedlichen Varianten der untersuchten Platte übereinstimmte (Abbildung 56). Bei näherer Betrachtung der Daten fiel jedoch auf, dass auch in jenen Proben ein Signal für die Entstehung vicinaler Dirole detektiert wurde, in denen keine Monooxygenase exprimiert wurde. Zusätzlich dazu ergab sich auch kein kohärentes Bild bei der Betrachtung jener Varianten, welche mehrfach in der untersuchten Bibliothek vorkamen, wie Variante F87A (Abbildung 57). Da das Muster der Signale jedoch die Verteilung der Varianten widerspiegelt, ist es nur schwer vorstellbar, dass es sich bei den Signalen um Zufallsprodukte handelt. Möglicherweise wurden bereits zuvor Fehler in der Anfertigung der Bibliothek begangen, wodurch das Muster der Anordnung nicht dem tatsächlichen Muster entsprach.

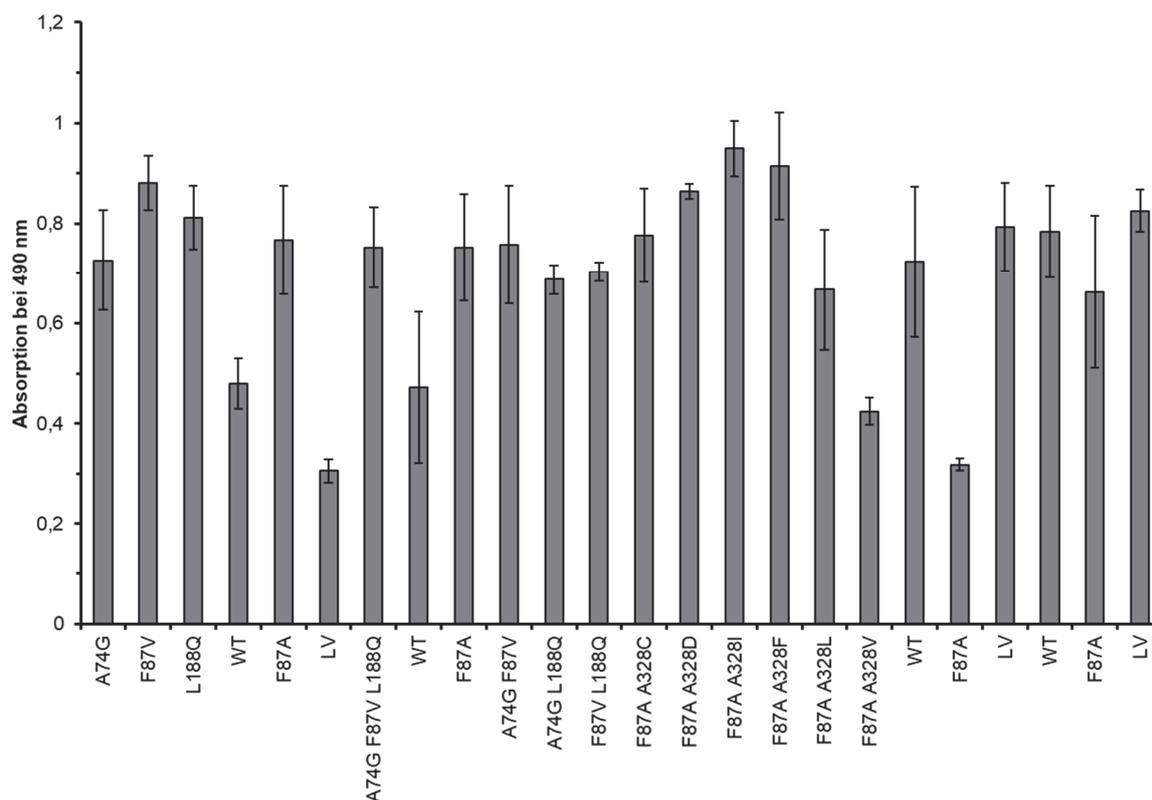
### Anordnung der Bibliothek

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A74G	F87V	L188Q	WT	F87A	LV	A74G F87V L188Q	WT	F87A	A74G F87V	A74G L188Q	F87V L188Q
B	F87A A328C	F87A A328D	F87A A328I	F87A A328F	F87A A328L	F87A A328V	WT	F87A	LV	WT	F87A	LV
C	A74G	F87V	L188Q	WT	F87A	LV	A74G F87V L188Q	WT	F87A	A74G F87V	A74G L188Q	F87V L188Q
D	F87A A328C	F87A A328D	F87A A328I	F87A A328F	F87A A328L	F87A A328V	WT	F87A	LV	WT	F87A	LV
E	A74G	F87V	L188Q	WT	F87A	LV	A74G F87V L188Q	WT	F87A	A74G F87V	A74G L188Q	F87V L188Q
F	F87A A328C	F87A A328D	F87A A328I	F87A A328F	F87A A328L	F87A A328V	WT	F87A	LV	WT	F87A	LV
G	A74G	F87V	L188Q	WT	F87A	LV	A74G F87V L188Q	WT	F87A	A74G F87V	A74G L188Q	F87V L188Q
H	F87A A328C	F87A A328D	F87A A328I	F87A A328F	F87A A328L	F87A A328V	WT	F87A	LV	WT	F87A	LV

### Screeningergebnis



**Abbildung 56:** Vergleich der Anordnung der P450 BM3 Bibliothek mit dem Muster der Farbreaktion des Adrenalin basierten Nachweises von vicinalem Diol, im Anschluss an die Oxidation von Non-1-en-4-ol (**11**) mit unterschiedlichen Varianten von P450 BM3 und FDH<sup>+</sup> basiertem Cofaktorrecycling. WT = Wildtyp, LV = Leervektor. Ansätze mit P450 BM3 Varianten, in denen die rote Färbung signifikant schwächer war, wurden hervorgehoben.



**Abbildung 57:** Untersuchung einer Monoxygenase-Bibliothek auf die Bildung von vicinalem Diol aus Non-1-en-4-ol (**11**). Im Anschluss an die Reaktion wurden 100  $\mu$ L jeder Probe mit 40  $\mu$ L Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 40  $\mu$ L Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500  $\mu$ L: 200  $\mu$ L P450 BM3 Rohlysate, 0.3 kU Katalase, FDH<sup>+</sup>-Formiat-NADPH Recycling, 6 mM Substrat, KP<sub>i</sub>-Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h, 30 °C. Für jede Untersuchung wurden jeweils vier gleichartige Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. WT = Wildtyp, LV = pET28 Leervektor.

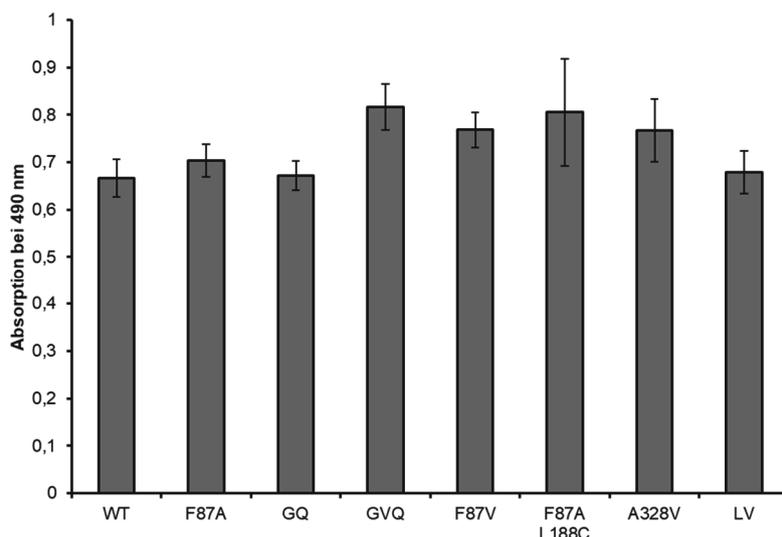
## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

Für zukünftige Untersuchungen wurde aus diesem Grunde eine neue, vereinfachte Bibliothek zusammengestellt, auf der nur wenige ausgewählte Varianten der P450 BM3 vorhanden waren. Mit Hilfe dieser stark simplifizierten Bibliothek sollte überprüft werden, ob generell ein Muster bei den Umsetzungen mit der P450 BM3 und dem anschließenden Screening zu erwarten sind. Weiterhin kann diese Bibliothek dazu dienen vier unterschiedliche Substrate parallel zu untersuchen. Die Auswahl fiel neben dem Wildtyp und einer Leervektorkontrolle auf die Varianten F87A, F87V, A74G L188Q, A74G F87V L188Q, F87A L188C und A328V (Abbildung 58).

	Substrat 1			Substrat 2			Substrat 3			Substrat 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	WT											
B	F87A											
C	GQ											
D	GVQ											
E	F87V											
F	F87A L188C											
G	A328V											
H	LV											

**Abbildung 58:** Neu angeordnete P450 BM3 Bibliothek mit prominenten Varianten für die weitergehende Untersuchung der Screeningbedingungen und der Möglichkeit der initialen Untersuchung unterschiedlicher Substrate.

Die F87 Varianten wurden ausgewählt, da es sich um eine Schlüsselposition direkt über dem Häm-Eisen handelt, welche besonders für die Regioselektivität und Umsetzung sterisch anspruchsvoller Substrate wie Steroiden, Alkaloiden und Opiaten, eine bedeutende Rolle spielt.<sup>[187, 200, 247]</sup> Als eine weitere Schlüsselposition wurde Position A328 ausgewählt, da auch für diese Position bekannt ist, dass sie während der Oxidation mit allen Substraten interagiert und dementsprechend ebenfalls einen großen Einfluss auf die Orientierung der Substrate hat.<sup>[248]</sup> Der Einfluss der Positionen A74 und L188 auf die selektive, allylische Oxidation von Fettsäuren, als auch in der unnatürlichen Produktion von Indol, wurden ebenfalls beschrieben.<sup>[218, 249]</sup> Die Kombination von Aminosäureaustauschen an den entsprechenden Positionen konnte zudem für die benzyliche Hydroxylierung aromatischer Substrate genutzt werden, weshalb auch die Variante F87A L188C in die Bibliothek aufgenommen wurde.<sup>[237, 250]</sup> Diese Zusammenstellung erlaubt ein möglichst breites Spektrum an potenziellen Substraten. Reaktionsansätze mit der neuen und simplifizierten Bibliothek wurden ebenfalls mit dem FDH\*-basierten Kofaktorrecycling durchgeführt. Dabei konnte jedoch erneut kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Varianten und einer Leervektorprobe detektiert werden (Abbildung 59).



**Abbildung 59:** Untersuchung einer Monoxygenase-Bibliothek auf die Bildung von vicinalem Diol aus Non-1-en-4-ol (**11**). Im Anschluss an die Reaktion wurden 100  $\mu\text{L}$  jeder Probe mit 40  $\mu\text{L}$  Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 40  $\mu\text{L}$  Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500  $\mu\text{L}$ : 200  $\mu\text{L}$  P450 BM3 Rohlysate, 0.3 kU Katalase,  $\text{FDH}^+$ -Formiat-NADPH Recycling, 6 mM Substrat,  $\text{KPi}$ -Puffer 50 mM, pH 7.5, 20 h, 30  $^{\circ}\text{C}$ . Für jede Untersuchung wurden jeweils 12 gleichartige Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. WT = Wildtyp, LV = pET28 Leervektor, GQ = A74G L188Q, GVQ = A74G F87V L188Q.

Parallel zu den Versuchen mit dem  $\text{FDH}^+$ -basierten Kofaktorrecycling wurde eine weitere Möglichkeit der Regeneration von NADPH in Betracht gezogen. Die Phosphit-Dehydrogenase (PTDH) aus *Pseudomonas stutzeri* ist in der Lage, Phosphit in Phosphat umzuwandeln und im Rahmen dieser Oxidation  $\text{NAD}^+$  oder  $\text{NADP}^+$  zu reduzieren (Abbildung 60).

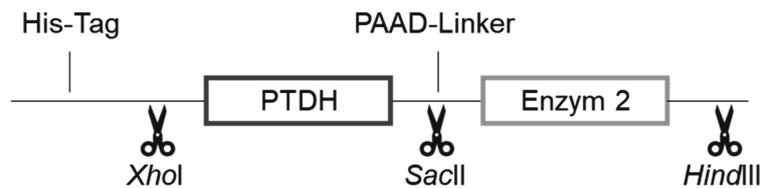


**Abbildung 60:** Regeneration von NAD(P)H mit Hilfe der Phosphit-Dehydrogenase aus *P. stutzeri*, unter gleichzeitiger Oxidation von Phosphit zu Phosphat.

Sie kann dieses über ein breites pH-Fenster und besitzt eine niedrige Michaelis-Menten Konstante sowohl für Phosphit, als auch für  $\text{NAD}^+$ .<sup>[251]</sup> Natürlicherweise wird  $\text{NAD}^+$  von der Phosphit-Dehydrogenase gegenüber  $\text{NADP}^+$  bevorzugt, sie besitzt aber dennoch eine 33-fach höhere katalytische Effizienz für das Substrat  $\text{NADP}^+$  als die leistungsstärkste Formiat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas sp.*, bei vergleichbarer Wechselzahl.<sup>[252]</sup> Mit Hilfe von „directed evolution“ Experimenten konnte die geringe Stabilität dieses Enzyms behoben werden, so dass ein Einsatz in der Biokatalyse möglich wurde.<sup>[253, 254]</sup> Seitdem erfreut sich dieses Enzym steigender Beliebtheit und kürzlich ist es Beyer *et al.* gelungen ein funktionales Fusionsprotein aus PTDH und der P450 BM3 in *E. coli* zu exprimieren.<sup>[255]</sup> Dieses Fusionsprotein war anschließend deutlich aktiver, als die Kombination nicht-fusionierter Enzyme. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein synthetisches Gen, welches für die 18-fach mutierte und damit optimierte Variante der Phosphit-Dehydrogenase kodiert, auf dem pBAD-Vektor bereitgestellt. Dieser Vektor wurde bereits zuvor erfolgreich für die Expression des Fusionsproteins

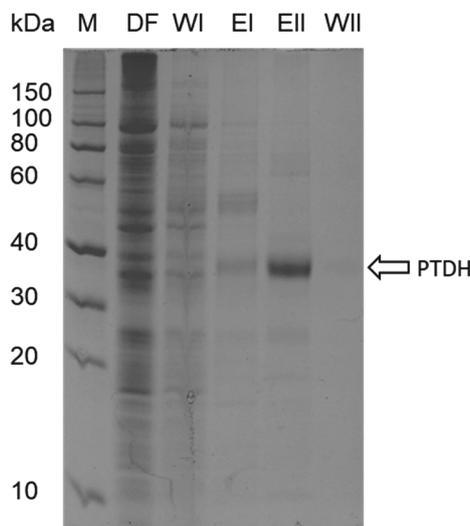
## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

eingesetzt.<sup>[255]</sup> Analog zur Publikation wurde ein C-terminaler His-Tag für die Isolation des Enzyms und eine kurze Linkersequenz am N-Terminus des Enzyms angebracht. Anstelle der publizierten SRSAAG-Sequenz wurde jedoch nur eine kürzere PAAD-Sequenz als Linker vorinstalliert. Diese kann jedoch im Rahmen von Klonierungsarbeiten modifiziert werden. Für die Nutzung der PTDH im vicinalen Diol-Screenings spielt dies keine Rolle, da in diesem Fall die PTDH isoliert von den Varianten der Monooxygenase zur Reaktion gegeben wird. Für zukünftige Experimente besteht aber die Möglichkeit potente Varianten der P450 BM3, oder anderer NADPH abhängiger Enzyme, an die PTDH zu fusionieren (Abbildung 61).



**Abbildung 61:** Vereinfachte Darstellung der „multiple cloning site“ des pBAD-Vektors für die potenzielle Generierung von PTDH-Fusionsproteinen.

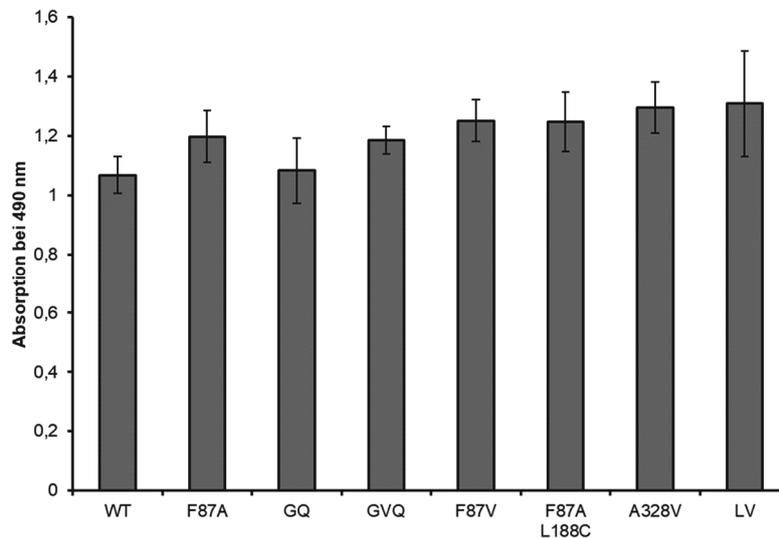
*E. coli* BL21 (DE3) wurden mit dem pBAD-Vektor transformiert und die Expression durch Zugabe von 0.02 % (*w/v*) Arabinose induziert. Das ca. 37 kDa große Protein konnte im Anschluss an die Expression erfolgreich über das His-Tag System isoliert werden und die Aktivität gegenüber NADP<sup>+</sup> betrug ca. 1 U/mL bei 25 °C, in KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.5, 4 mM Natriumphosphit) (Abbildung 62).



**Abbildung 62:** SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der Aufreinigung der PTDH, mit Hilfe des His-Tag Systems, im Anschluss an die Expression in *E. coli* BL21 (DE3). M = Marker, DF = Durchfluss, W I = Waschschrift 1, E I = Elutionsfraktion 1, E II = Elutionsfraktion 2, W II = Waschschrift II.

Das isolierte Enzym wurde im Anschluss bei 4 °C gelagert und war selbst nach einem Zeitraum von 2 Monaten noch immer aktiv. Die Aktivität lag mit 1,4 U/mL sogar leicht über dem initial gemessenen Wert. Damit war die PTDH zwar außerordentlich lagerstabil, die gezeigte Aktivität war dennoch nicht wie erhofft höher als die der FDH\*. Die vorangegangenen Versuche mit der vereinfachten P450-Bibliothek wurden im Anschluss mit dem PTDH basierten Kofaktor-Recycling wiederholt. Auch in diesem Fall

waren jedoch die Signalunterschiede zwischen den unterschiedlichen Varianten von P450 BM3 und einer Leervektorprobe zu gering. Die Unterschiede in den Signalstärken lagen zumeist im Bereich der Standardabweichung (Abbildung 63). Auch in dieser Untersuchung zeigte sich jedoch erneut, dass in den Proben des Wildtyps und der Variante A74G L188Q eine leicht verringerte Absorption im Vergleich zu den restlichen Proben ersichtlich ist.

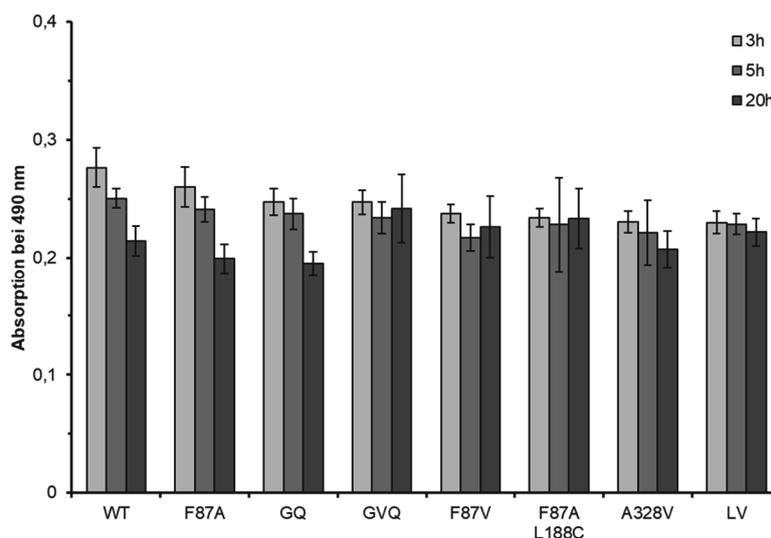


**Abbildung 63:** Untersuchung einer Monoxygenase-Bibliothek auf die Bildung von vicinalen Diol aus Non-1-en-4-ol (11). Im Anschluss an die Reaktion wurden 100  $\mu$ L jeder Probe mit 40  $\mu$ L Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25  $^{\circ}$ C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 40  $\mu$ L Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500  $\mu$ L: 200  $\mu$ L P450 BM3 Rohlysat, 0,3 kU Katalase, PTDH-Phosphit-NADPH Recycling, 6 mM Substrat, KPi-Puffer 50 mM, pH 7,5, 20 h, 30  $^{\circ}$ C. Für jede Untersuchung wurden jeweils 12 gleichartige Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. WT = Wildtyp, LV = pET28 Leervektor, GQ = A74G L188Q, GVQ = A74G F87V L188Q.

In Anbetracht der geringfügigen Unterschiede der Absorptionen wurde in einem letzten Test überprüft, ob es sich bei den Unterschieden in der Absorption nur um zufällig geringfügige Unterschiede handelt, oder aber Trends in der Entwicklung der Absorption ersichtlich sind. Dafür wurden noch einmal Reaktionsansätze mit den prominenten P450-Varianten und Formiat-Dehydrogenase basiertem Kofaktor-Recycling angesetzt und mit Hilfe des Adrenalin-Assays untersucht. Dieses Mal wurden jedoch Proben nach 3, 5 und 20 Stunden entnommen und untersucht. Würden geringe, aber detektierbare Mengen vicinales Diol in der Reaktion entstehen, müsste eine ebenfalls geringe Abnahme der Absorption bei 490 nm über den Verlauf der Reaktion ersichtlich sein. Tatsächlich wurde eine geringfügige Abnahme der Absorption bei 490 nm für die Varianten WT, F87A und A74G L188Q über den Verlauf von 20 Stunden beobachtet (Abbildung 64). Diese Abnahme der Absorption war in der Leervektorprobe dagegen nicht ersichtlich und korreliert zusätzlich mit den zuvor gemachten Beobachtungen der vorangegangenen Untersuchungen. Weiterhin wurde jedoch auch festgestellt, dass die generelle Absorption der Proben bereits in einem Bereich schwankt, der diese geringfügigen Unterschiede schwer detektierbar macht.

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

Es bleibt damit festzuhalten, dass die direkte Untersuchung der P450-Reaktionsansätze, auf die Bildung von vicinalen Diolen mit Hilfe des Adrenalin-Nachweises möglich ist, wenn man das Kofaktor-Recycling mit der FDH\* oder der PTDH betreibt. Die geringe Sensitivität des Nachweises, in Kombination mit den geringen Mengen an erzeugtem vicinalen Diol, bei Verwendung des Mustersubstrates Non-1-en-4-ol (**11**), führt jedoch dazu, dass die praktische Anwendbarkeit des Screenings für die Untersuchung von Mutantenbibliotheken noch nicht gegeben ist.

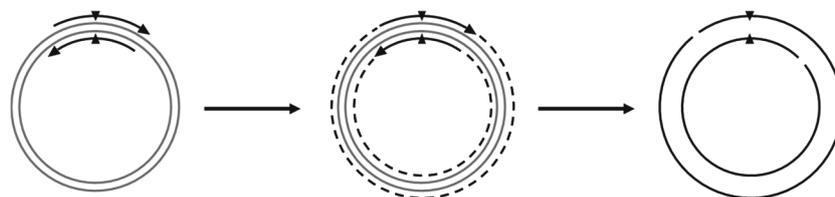


**Abbildung 64:** Untersuchung einer Monooxygenase-Bibliothek auf die Bildung von vicinalen Diol aus Non-1-en-4-ol (**11**). Nach jeweils 3, 5 und 20 Stunden wurden 100  $\mu$ L der Reaktionsansätze entnommen und jede Probe mit 10  $\mu$ L Natriumperiodatlösung (10 mM) versetzt und 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 10  $\mu$ L Adrenalinlösung (15 mM) dazugegeben und die Reaktion für 5 min inkubiert, bevor die Absorption bei 490 nm in Mikrotiterplatten vermessen wurde. Reaktionsbedingungen:  $\Sigma$  500  $\mu$ L: 200  $\mu$ L P450 BM3 Rohlysate, 0,3 kU Katalase, FDH\*-Formiat-NADPH Recycling, 6 mM Substrat, KPi-Puffer 50 mM, pH 7,5, 30 °C. Für jede Untersuchung wurden jeweils 12 gleichartige Proben gemessen und die ermittelten Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. WT = Wildtyp, LV = pET28 Leervektor, GQ = A74G L188Q, GVQ = A74G F87V L188Q.

### 3.2.4 Generierung einer Mutantenbibliothek für die bevorzugt $\alpha$ -ständige Hydroxylierung von Substraten mit polaren Substituenten

Parallel zu der Etablierung eines Screenings wurden neue Varianten von P450 BM3 erzeugt, welche bevorzugt  $\alpha$ -ständig zu einer bereits bestehenden Hydroxygruppe, oder einem anderen polaren Substituenten hydroxylieren sollen. Natürlicherweise hydroxyliert P450 BM3, in  $\omega$ -1 bis  $\omega$ -3 Position, also dem hydrophoben Ende von Fettsäuren der Länge C-12 bis C-20.<sup>[212]</sup> Dabei wird der polare Carboxylrest von den ebenfalls polaren Aminosäuren R47 und Y51 in der Nähe des Substrateinganges koordiniert, während die Aminosäuren rund um das Häm hydrophober Natur sind (Abbildung 35). Positioniert man in einem Gedankenexperiment das bisherige Mustersubstrat Non-1-en-4-ol (**11**) im aktiven Zentrum, würde man davon ausgehen, dass die Hydroxygruppe ebenfalls bevorzugt am hydrophileren Substrateingang koordiniert wird, während der hydrophobe Rest weiter in das aktive Zentrum hineinragt, analog zu den natürlichen Substraten (Abbildung 35). Die Verteilung der Regioisomere bei der Hydroxylierung von **11** untermauert diese Annahme, da auch hier bevorzugt an Position 7 und 8 hydroxyliert wurde (Abbildung 39). Um zu überprüfen, ob sich dieses Prinzip der

Koordination ausnutzen lässt, um Moleküle wie Non-1-en-4-ol (**11**) bevorzugt in Nachbarschaft zur bereits existierenden OH-Gruppe zu hydroxylieren, wurden deshalb gezielt unpolare Aminosäuren in der Nähe des Häms, durch eine Auswahl an polaren Aminosäuren substituiert. Dies ermöglicht eine Koordination der polaren Hydroxygruppe über dem Häm und damit eine Umorientierung des Substrates im aktiven Zentrum. Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich für die Akzeptanz kürzerer Fettsäuren der Länge C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> durchgeführt.<sup>[214]</sup> Nach Betrachtung der substratgebundenen Kristallstruktur und Anhand der Literaturdaten, wurde sich für die Positionen L75, L181 und I263 entschieden.<sup>[204]</sup> Diese liegen auf der entgegengesetzten Seite des Häm-Eisens und sind teilweise an der Ausbildung der hydrophoben Tasche beteiligt. Diese ist vermutlich dafür verantwortlich, dass die natürlichen Fettsäuresubstrate nicht terminal hydroxyliert werden, da sich das hydrophobe Ende in der besagten Tasche befindet.<sup>[204]</sup> Die Optimierung des Enzyms war mittels „*directed evolution*“, oder rationalem Design möglich und es wurde sich für das rationale Design entschieden. Die Entscheidung ist darin begründet, dass die Optimierung mittels „*directed evolution*“ automatisch mit einem hohen Screening-Aufwand verbunden ist, da eine große Vielzahl von Varianten erstellt wird.<sup>[26, 249]</sup> Aus arbeitstechnischer Sicht war dieser Weg nicht realisierbar, weshalb sich für eine kleine komprimierte Bibliothek entschieden wurde. Dafür wurden die drei Aminosäurepositionen L75, L181 und I263 jeweils durch die Aminosäuren K, H, Q, N und T ausgetauscht. Dies geschah mit Hilfe von *QuikChange*<sup>™</sup> PCR (*Stratagene*, La Jolla, Kanada). In dieser PCR-basierten Strategie wird der gesamte Vektor mit Hilfe zweier komplementärer Primer amplifiziert, welche gleichzeitig die Information für den erwünschten Basenaustausch beinhalten. Im Anschluss an die Amplifikation des gesamten Vektors mit Hilfe der DNA-Polymerase wird der methyliert vorliegende Parentalstrang mit Hilfe von *DpnI* verdaut. Dieses Restriktionsenzym schneidet spezifisch nur methylierte DNA, wodurch der neu generierte Doppelstrang, mit der enthaltenen Punktmutation, unversehrt bleibt. Im Anschluss kann der neue Strang mittels Agarose-Gelelektrophorese von der restlichen DNA getrennt und in den Zielorganismus transferiert werden (Abbildung 65).



**Abbildung 65:** Darstellung des Grundprinzips der *QuikChange*<sup>™</sup> Methode in Anlehnung an Liu *et al.*<sup>[256]</sup> Grau = methylierter Parentalstrang, Schwarz = Unmethylierter und modifizierter Strang, ▲ = Punktmutation.

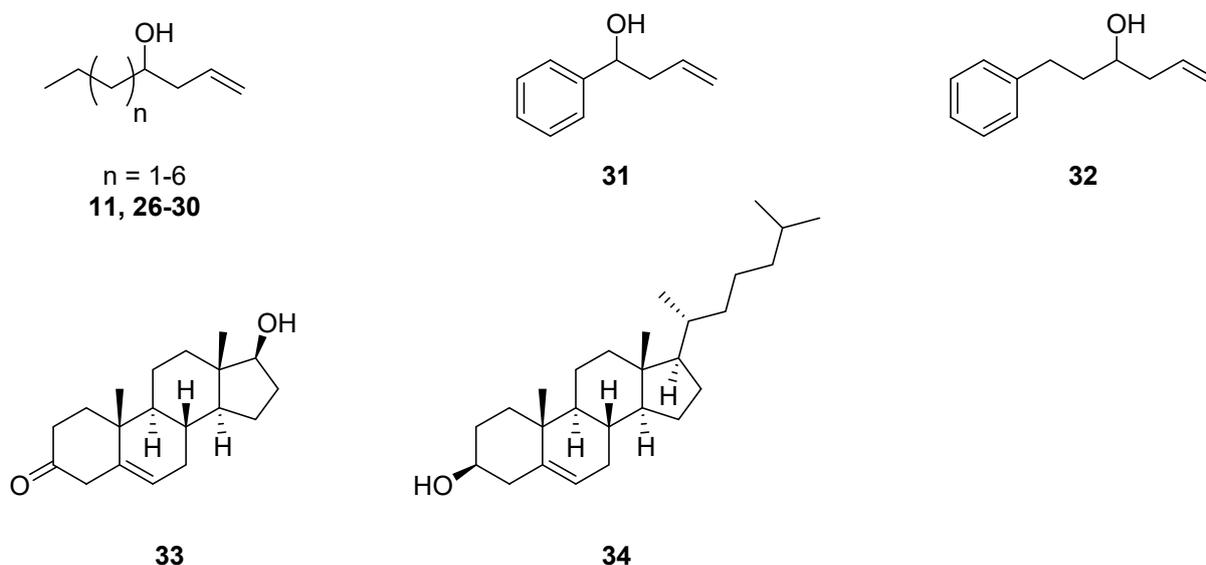
Da bei dieser Methode jeweils eine Lücke in den DNA-Strängen verbleibt, kann der neu generierte Doppelstrang nicht mehr als Vorlage für eine weitere Amplifikation dienen. Dadurch ist die Amplifikation auf den Parentalstrang beschränkt und verläuft linear statt exponentiell. Dies führt zu deutlich verringerten Ausbeuten an Plasmid im Vergleich zu anderen PCR-Methoden. Weiterhin ist es möglich, dass die beiden komplementären Primer miteinander interagieren, wodurch ein weiterer Effizienzverlust möglich ist.<sup>[257, 258]</sup> Aus diesem Grund wurde beim Design der Primer darauf geachtet,

## Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3 Ergebnisse und Diskussion

dass diese kompatibel miteinander sind und ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen. Um diese generellen Probleme zu vermindern wurde zusätzlich ein Zwei-Stufen Protokoll verwendet, indem beide Primer erst getrennt voneinander zu dem Parentalstrang gegeben wurden und nur einer der beiden Stränge teilweise amplifiziert wurde. Vor dem zweiten Schritt wurden dann die Ansätze beider Primer miteinander vereinigt und die Amplifikation des gesamten Stranges fortgesetzt.

Anhand der vorherigen Ergebnisse aus den Screening-Versuchen und dem Präparativansatz, sollten die drei ausgewählten Positionen L75, L181 und I263 sowohl im Wildtyp, als auch in Variante A74G L188Q ausgetauscht werden, da für beide Varianten die Ergebnisse auf die jeweils größte Menge an gebildetem 3,4-Diol **12** hindeuteten. Daher wurde das *QuikChange*<sup>TM</sup> Protokoll für alle 30 möglichen Varianten durchgeführt und es konnten 28 Varianten erfolgreich erzeugt werden. Nur die Variante I263Q und die Dreifachmutante A74G L75T L188Q konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung gestellt werden. Für beide Varianten ergaben sich jeweils Probleme in der Amplifikation der DNA, welche auf die bekannten Komplikationen der *QuikChange*<sup>TM</sup> zurückzuführen sein können. Für die Erzeugung der fehlenden Varianten ist demnach ein neues Primerdesign erforderlich.

An dieser Stelle sollte die Untersuchung der neu generierten P450 BM3 Varianten auf eine bevorzugt  $\alpha$ -ständige Hydroxylierung erfolgen. Dafür wurde eine Reihe von unterschiedlichen Substraten zur Verfügung gestellt, welche theoretisch mit dem neuen Screening untersucht werden können. Dabei wurde das Augenmerk sowohl auf eine Reihe einfacher Homoallylalkohole gelegt, welche Ähnlichkeit zum bisherigen Mustersubstrat Non-1-en-4-ol (**11**) aufweisen, als auch anspruchsvollere und interessantere Moleküle wie Steroide (Abbildung 66). Eine regioselektive,  $\alpha$ -ständige Hydroxylierung dieser komplexeren Moleküle wäre ebenfalls mit Hilfe des neuen Screenings detektierbar. Da auch diese Substratklassen bereits erfolgreich regioselektiv, mit Hilfe der P450 BM3, hydroxyliert werden konnten, sollte eine Untersuchung dieser Moleküle mit dem Adrenalin-Screening ebenfalls möglich sein.<sup>[259, 260]</sup>



**Abbildung 66:** Synthetisierte und kommerziell erworbene Substrate, für die Untersuchung  $\alpha$ -ständiger Hydroxylierungen mit Hilfe des Adrenalin-Screenings.

Da die Funktionsfähigkeit des angedachten Screenings bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht endgültig bewiesen werden konnte, war es jedoch nicht möglich eine Untersuchung der neuen Varianten durchzuführen.

### 3.3 Kurzzusammenfassung

Nachdem in vorangegangenen Arbeiten festgestellt wurde, dass P450 BM3 in der Lage ist den Homoallylalkohol Non-1-en-4-ol (**11**) in allylischer Position zu hydroxylieren, wurde die Reaktion näher untersucht und ein Eindruck von der Produktverteilung der regioisomeren Produkte gewonnen.<sup>[197]</sup> Der initiale Versuch, ein geeignetes chromatographisches Trennprogramm für die Vielzahl an Regio-, und Stereoisomeren zu finden, misslang. Um neben des bereits untersuchten Homoallylalkohols **11** eine breite Palette synthetisch interessanter Substrate untersuchen zu können, wurde beschlossen eine Screeningplattform für die Bildung vicinaler Diole, in P450 katalysierten Reaktionen, zu etablieren. Die Auswahl fiel auf ein bereits publizierten, vicinalen Diol-Nachweis mit Hilfe von Natriumperiodat und Adrenalin.<sup>[236]</sup> Es wurde getestet ob diese Art des Screenings auch auf das komplexe System einer P450 BM3 katalysierten Reaktion übertragbar ist. Dabei wurde festgestellt, dass der Nachweis von vicinalen Diolen auch innerhalb dieser komplexen Systeme möglich ist und in der allylischen Oxidation von Non-1-en-4-ol (**11**) im größeren Maßstab, ausreichende Mengen vicinales Diol generiert werden. Die Anwesenheit von Störfaktoren wie Glucose erforderte jedoch eine Extraktion der Reaktionsansätze, was zwar zu erhöhter Sensitivität des Diol-Nachweises führt, allerdings eine schwierige Handhabung des Screenings zur Folge hat. Der Nachweis von vicinalem Diol konnte ebenfalls in der Untersuchung von P450 BM3 Bibliotheken erfolgen. Auf Grund der schwierigen Handhabung waren diese Ergebnisse jedoch nicht reproduzierbar.

Um die Handhabung des Screenings zu vereinfachen wurde das Cofaktor-Recycling System gewechselt, da die hohe Konzentration an Glucose die Extraktion der Proben vorher zwingend notwendig machte. Sowohl die Formiat-Dehydrogenase, als auch die Phosphit-Dehydrogenase wurden dafür erfolgreich eingesetzt. Die folgenden Reaktionsansätze mussten nicht mehr extrahiert werden, die anschließend fehlende Aufkonzentrierung führt jedoch auch zu einer geringeren Nachweisgrenze an vicinalem Diol. Eine solche Menge wurde unter Screeningbedingungen jedoch nicht zuverlässig in der biokatalytischen Umsetzung von Non-1-en-4-ol (**11**) erzeugt.

Parallel zur Entwicklung des Screenings wurden 28 neue Mutanten vom Wildtyp und von P450 BM3 A74G L188Q erzeugt. Diese beiden Varianten wurden ausgewählt, da sie zuvor die größte Menge vicinales Diol in der Oxidation des Homoallylalkohols **11** erzeugten. Dafür wurden die hydrophoben Aminosäuren L75, L181 und I263 jeweils durch die Aminosäuren K, H, Q, N und T substituiert. Diese Aminosäuren sind an der Ausbildung einer hydrophoben Tasche des Enzyms beteiligt. Diese liegt auf der gegenüberliegenden Seite des Häms im aktiven Zentrum und spielt eine Rolle in der Ausrichtung hydrophober Substrate.<sup>[204]</sup> Der Austausch dieser hydrophoben Aminosäuren durch Aminosäuren mit polaren Substituenten könnte demnach eine Umorientierung von Substraten im aktiven Zentrum zur

Folge haben und damit Hydroxylierungen in vicinaler Position zu bereits existierenden Hydroxygruppen oder Ketogruppen begünstigen. Eine Verschiebung des Produktspektrums hin zu vicinalen Diolen bzw.  $\alpha$ -Hydroxyketonen wäre dadurch möglich. Die generierten Mutanten konnten jedoch noch nicht auf diesen Effekt hin getestet werden, da das Adrenalin basierte Screening noch keine verlässlichen Daten liefert.

### 3.4 Short Summary

Previously carried out experiments showed that P450 BM3 GQ variant can hydroxylate the non-natural substrate non-1-en-4-ol (**11**) in allylic position with a preference for the *syn*-configured vicinal diol.<sup>[197]</sup> Further experiments were conducted to gain an impression of the distribution of generated regioisomers. To quantify the different products a separation of the different regio- and stereoisomers via gas-chromatography was tested, but not successful. To open the possibility of investigating more potential substrates than just the homoallylic alcohol **11**, the establishment of a screening-method for the generation of vicinal diol products with P450 BM3 was attempted. An already published screening-method for the detection of diol-products in cofactor-independent enzyme catalyzed reactions was chosen as a starting point. This screening utilizes sodium periodate and adrenaline to photometrically detect vicinal diols.<sup>[235, 236]</sup> It was shown that enough vicinal diol was produced in the P450 BM3 catalyzed oxidation of **11** in bigger scales, to detect it with the adrenaline-assay. The presence of high concentrations of glucose and other disruptive factors demanded an extraction of the reaction mixture though. The extraction and concentration of the extract led to lower detection limits of the product on the one-hand, but significantly increased the difficulty of sample handling on the other hand. Even though the generation of vicinal diol products in the oxidation of **11** with different variants of P450 BM3 could be verified, the difficult sample-handling did not allow to reproduce these results.

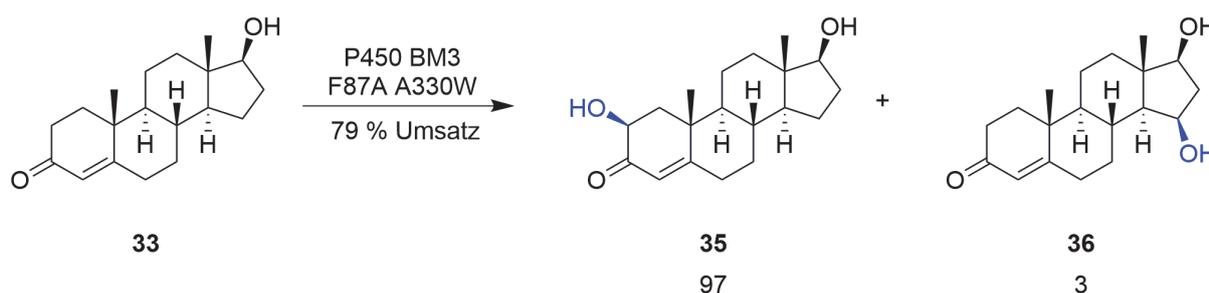
Therefore, alternative cofactor-recycling systems were tested which allow for the direct measurement of the samples, without a previous extraction-step. A formiate dehydrogenase and a phosphite dehydrogenase were successfully employed in the cofactor recycling and vicinal diols could be directly detected without previous extraction of the reaction mixture. The absence of an extraction- and concentration-step lowered the detection limit though. This limit was not reliably reached in the oxidation of **11** with P450 BM3.

Parallel to the development of the screening, 28 new mutants of the wildtype of P450 BM3 and P450 BM3 GQ were successfully generated. The wildtype and P450 BM3 GQ were chosen, because they previously produced the highest amounts of vicinal diol in the oxidation of the homoallylic alcohol **11**. The hydrophobic amino acids L75, L181 and I263 were substituted with the amino acids K, H, Q, N and T. L75, L181 and I263 are part of the hydrophobic pocket in the active center of P450 BM3 and play a key-role in the orientation of substrates.<sup>[204]</sup> The substitution of these hydrophobic amino acids might therefore lead to a reorientation of substrates and allow for the preferred hydroxylation in vicinal

position of alcohols and ketones. These newly generated variants could not be tested yet, since the adrenalin-assay did not yield reliable results yet.

### 3.5 Ausblick

Bevor in Bezug auf das Screening und die mögliche  $\alpha$ -ständige Hydroxylierung von Alkoholen weitere Versuche unternommen werden sollten, müsste eine endgültige Verifizierung der praktischen Anwendbarkeit des Screenings erfolgen. In einem „*proof of principle*“-Ansatz wäre an dieser Stelle die Umsetzung eines Alkohols oder Ketons denkbar, welcher bekanntermaßen in ausreichender Menge von P450 BM3  $\alpha$ -ständig hydroxyliert wird. Die Umsetzung von Non-1-en-4-ol (**11**) ist in diesem Zusammenhang nicht optimal, da weder der Umsatz des Substrates besonders hoch ist noch die regioselektive Hydroxylierung in allylischer Position. Ein Beispiel für eine solche Umsetzung mit einem interessanten Substrat ist die selektive Hydroxylierung von Testosteron (**33**) mit Hilfe unterschiedlicher Varianten von P450 BM3 (Abbildung 67).<sup>[259, 261]</sup> Ein Hindernis könnte jedoch die geringe Löslichkeit solcher Substrate in wässrigen Medien darstellen. So wurden nur Endkonzentrationen von 1 mM der Steroide im zitierten Screening eingesetzt. An dieser Stelle müsste demnach evaluiert werden, ob eine Extraktion und Aufkonzentrierung der Proben eine Notwendigkeit darstellt.



**Abbildung 67:** P450 BM3 F87A A330W katalysierte, selektive Umsetzung von Testosteron (**33**) zu einem Natriumperiodat sensitiven  $\alpha$ -Hydroxyketon **35**, welches sich theoretisch mit Hilfe des Adrenalin-Assays nachweisen ließe.

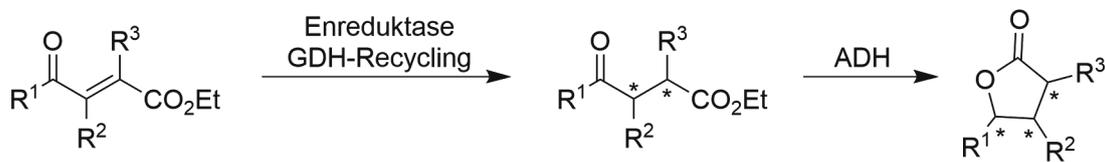
In Folge einer Verifizierung des Screenings könnte eine Untersuchung der neu generierten Varianten von P450 BM3 im genannten Kontext erfolgen. Ziel wäre es dabei einen Trend auszumachen, der für eine vermehrte Umorientierung von Substraten im aktiven Zentrum spricht, hin zu polaren Gruppen in der Proximität des Häm-Eisens.

Eine weiteres Interessantes Anwendungsgebiet eröffnet sich durch das neue Cofaktor-Recycling System mit der Phosphit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri*. Die Anordnung des PTDH-Gens auf dem pBAD-Vektor erlaubt die einfache Fusion von Cofaktor-abhängigen Enzymen an die Dehydrogenase. Nach dem Vorbild von Beyer *et al.*<sup>[255, 262]</sup> könnten interessante Varianten der P450 BM3 an die Dehydrogenase fusioniert werden und bereits erfolgreich getestete biokatalytischen Umsetzung mit dem Fusionsenzym erfolgen. So könnte die selektive Umsetzung von  $\omega$ -Alkensäuren mit Hilfe der P450 BM3 GQ als Fusionsprotein mit PTDH durchgeführt werden.<sup>[218]</sup> Auch die selektive benzoylische Hydroxylierung von Benzoesäureestern mit der P450 BM3 F87A L188C wären mit dem Fusionsprotein

Versuche zur Regioselektiven Hydroxylierung mit P450 BM3  
Ausblick

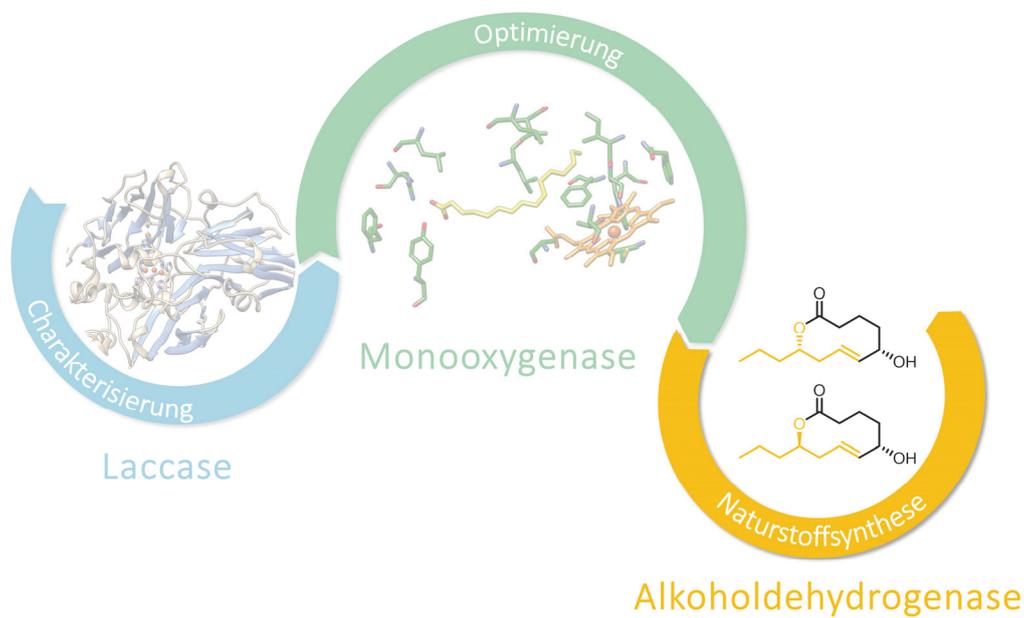
optimierbar.<sup>[237]</sup> Dabei ist jedoch darauf zu achten, dass das Fusionsprotein nicht erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden konnte. Stattdessen musste auf den *E. coli* Top10-Stamm ausgewichen werden.<sup>[255]</sup>

Die Fusion der PTDH muss allerdings nicht ausschließlich mit der P450 BM3 erfolgen. Auch weniger komplizierte Enzymsysteme, welche ebenfalls auf ein Recycling von NAD(P)H angewiesen sind, könnten als Fusionspartner dienen. So wurde kürzlich die Synthese von  $\gamma$ -Butyrolactonen in einer sequenziellen Ein-Topf-Synthese mit einer Enreduktase und einer Alkoholdehydrogenase gezeigt.<sup>[263]</sup> Die selektive Reduktion von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Ketoestern mit Hilfe einer Enreduktase ist dabei ebenfalls eine interessante Reaktion, in der eine Fusion aus Enreduktase und PTDH Anwendung finden könnte, um das bisherige GDH-Recycling zu ersetzen (Abbildung 68).



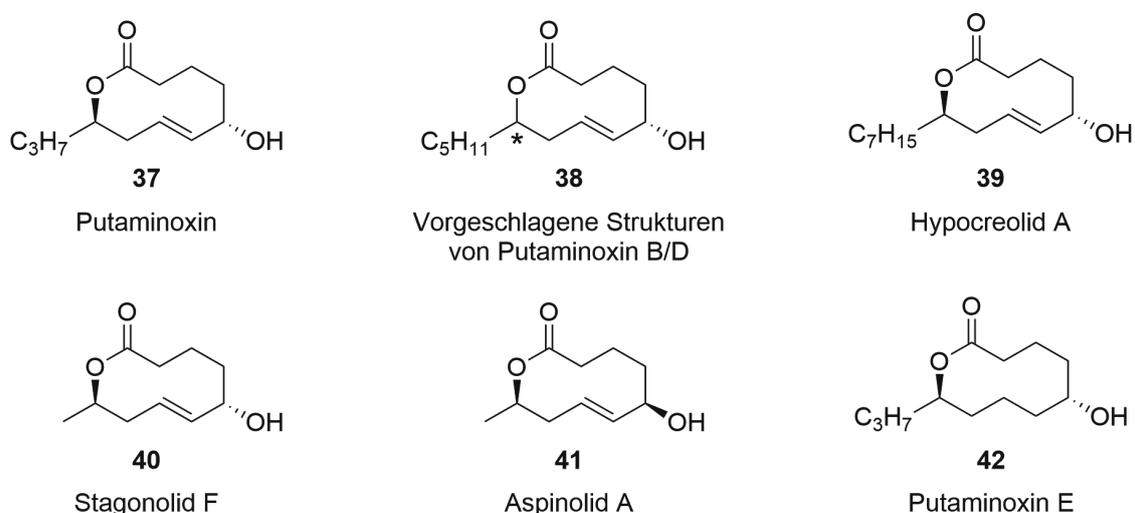
**Abbildung 68:** Ein-Topf-Synthese von  $\gamma$ -Butyrolactonen, ausgehend von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten  $\gamma$ -Ketoestern, mit Hilfe einer Enreduktase und einer Alkoholdehydrogenase.<sup>[263]</sup>

#### 4 Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]



#### 4.1 Einleitung

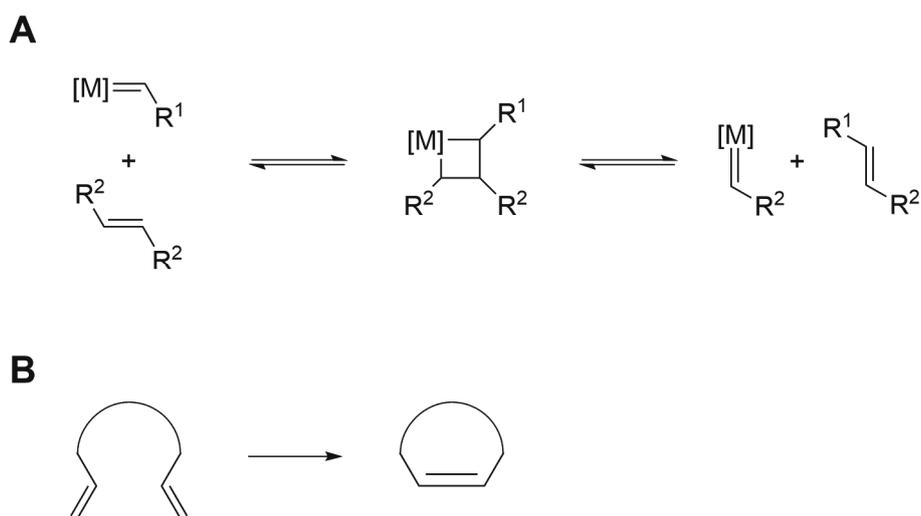
Putaminoxin (37) ist ein phytotoxisches, 10-gliedriges Makrolakton aus dem Pilz *Phoma putaminum*. Dieser zur Familie der Ascomyceten zählende Pilz ist unter anderem für das Auftreten von Blattfäule, auf dem auf Wiesen weit verbreiteten Korbblütler *Erigeron annuus* (auch Feinstrahl oder weißes Berufkraut genannt), verantwortlich. Um herauszufinden welche Substanz für das Auftreten der Blattfäule verantwortlich ist, wurden in einer vorangegangenen Untersuchung Flüssigkulturen des Pilzes filtriert und das Medium auf Phytotoxizität untersucht. Tatsächlich waren die Filtrate phytotoxisch und verursachten die Ausbildung von Necrose, wenn Blätter von *E. annuus* und anderer Pflanzen damit behandelt wurden.<sup>[264]</sup> Schlussendlich konnte das Makrolakton Putaminoxin (37) aus diesen Filtraten isoliert und als phytotoxische Quelle ausgemacht werden. Eine erste spektroskopische Untersuchung des Makrolaktons offenbarte, dass es eine Doppelbindung an Position 6 und zwei Hydroxygruppen in Position 5 und 9 besaß. Das dadurch vorhandene stereogene Zentrum an Position 5 wurde anhand der spektroskopischen Daten als (*S*)-konfiguriert bestimmt, während die Doppelbindung *E*-konfiguriert vorliegt. Die Konfiguration des stereogenen Zentrums an Position 9 konnte dagegen initial nicht bestimmt werden.<sup>[264]</sup> Auf die Charakterisierung folgten später erste Totalsynthesen der Verbindung in dessen Zuge das stereogene Zentrum an Position 9 als (*R*)-konfiguriert deklariert wurde.<sup>[265]</sup> Die Bestimmung der Konfiguration erfolgte dabei erneut über spektroskopische Methoden in Abgleich mit den Daten von Evidente *et al.*<sup>[264]</sup> Basierend auf ihrem potentiellen Nutzen als Herbizid, wurden Kulturmedien der Gattung *Phoma* intensiver studiert. In diesen weiteren Untersuchungen gelang die Isolation einer ganzen Palette dieser Nonenolide wie Putaminoxine, Stagonolide, Aspinolide und Herbarumine.<sup>[266-273]</sup> Parallel zur Isolation immer neuer phytotoxischer Nonenolide erfolgten weitere Totalsynthesen dieser interessanten Verbindungen (Abbildung 69).<sup>[265, 274-285]</sup> Für die Synthese wurden dabei allgemein zwei unterschiedliche Strategien für den Aufbau des Grundgerüsts verfolgt, welche in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet werden.



**Abbildung 69:** Ausgewählte Beispiele prominenter Nonenolide, welche im Rahmen von Totalsynthesen beschrieben worden sind.

#### 4.1.1 Totalsynthese von Nonenoliden auf Basis von intermolekularen Veresterungen und Ringschlussmetathesen

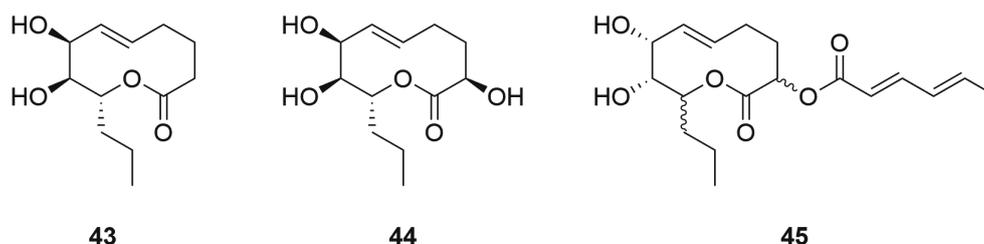
Der am häufigsten verwendete Ansatz zum Aufbau des Grundgerüsts dieser Nonenolide ist die Ringschlussmetathese, im Anschluss an eine intermolekulare Veresterung von zwei Olefinen. Die Ringschlussmetathese erlangte große Popularität nachdem Fu und Grubbs 1992 damit neue Ansätze zur einfachen Synthese von Monozyklen publizierten.<sup>[286]</sup> Seit der Vorstellung dieser Highlights erfreut sich diese Methode großer Beliebtheit und konnte für die Synthese einer Vielzahl von Monozyklen mit unterschiedlichsten Substituenten verwendet werden.<sup>[287, 288]</sup> In Form einer intramolekularen Kreuzmetathese verläuft die Ringschlussmetathese dabei über eine [2+2]-Cycloadditionsreaktion zwischen einem Metallalkyliden und einem Olefin, über eine Metallcyclobutan-Zwischenstufe (Abbildung 70). Derselbe Mechanismus kann auch in der Reaktion eines Metallalkyliden mit einem Olefin erfolgen, die dabei entstehende Metall-Oxo-Spezies ist jedoch stabil, wodurch das Metall nicht mehr für eine weitere Reaktion zur Verfügung steht. Dadurch ist in solchen Fällen die Zugabe stöchiometrischer Mengen des Katalysators erforderlich.<sup>[287]</sup>



**Abbildung 70:** **A)** Mechanismus der [2+2]-Cycloaddition in Metathesereaktionen. **B)** Schematische Darstellung einer Ringschlussmetathese in Anlehnung an Grubbs und Deiters *et al.*<sup>[287, 288]</sup>

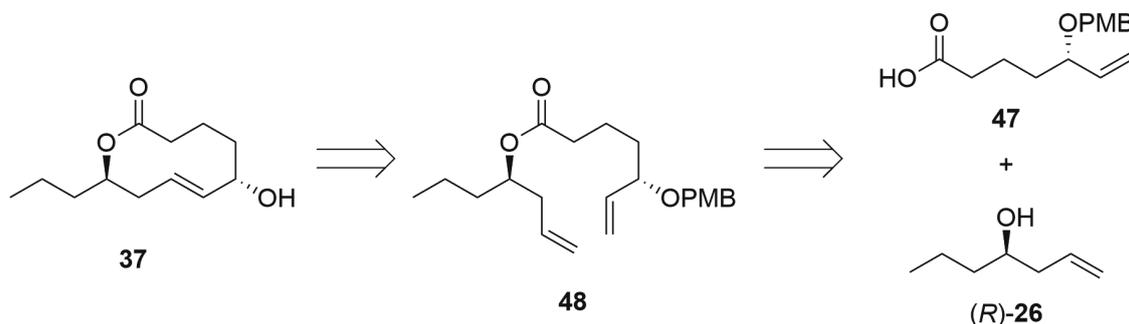
Einen solchen Ansatz zur Synthese dieser phytotoxischen Nonenolide wurde beispielsweise von Fürstner *et al.* für die Synthese von Herbarumin I (**43**) und II (**44**) verwendet (Abbildung 71). In der Ringschlussmetathese entstand jedoch ein Gemisch aus (*E*)- und (*Z*)-konfigurierten, zyklischen Olefinen und es war noch keine verlässliche Methode verfügbar, die Konfiguration der neu geformten Doppelbindung zu beeinflussen.<sup>[274]</sup> Nichtsdestotrotz gelang die Synthese der gewünschten Verbindungen und damit ein Muster zur Synthese weiterer Makrolaktone wie Pinolidoxin (**45**). Für diesen potenten Inhibitor der Phenylalanin-Ammoniak Lyase zeigten sich zu diesem Zeitpunkt bereits erste Unstimmigkeiten bezüglich der absoluten Konfiguration der stereogenen Zentren.<sup>[274]</sup> Ein Problem, welches auch in den Folgesynthesen der Putaminoxine auftrat.<sup>[285]</sup>

Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]  
 Einleitung



**Abbildung 71:** Struktur der totalsynthetisch hergestellten, phytotoxischen Nonenolide Herbarumin I (43) und II (44) aus *Mycosphaerella lethalis*, sowie von Pinolidoxin (45), einem potenten Inhibitor der Phenylalanin-Ammoniak Lyase.<sup>[274]</sup>

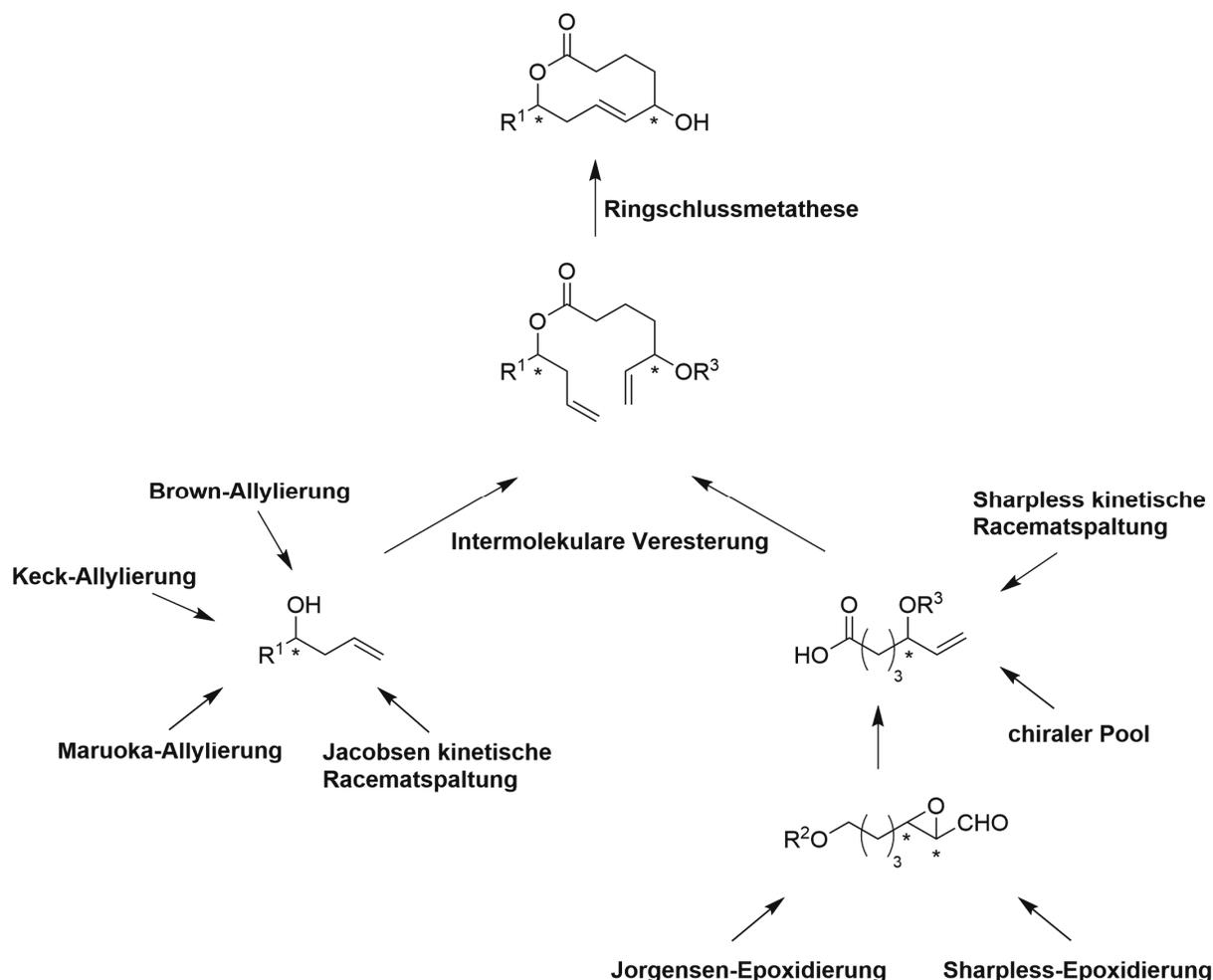
Einen ähnlichen Ansatz zum Aufbau des Grundgerüsts wählten Sabitha *et al.* für die erste Totalsynthese von Putaminoxin (37).<sup>[265]</sup> In einem ersten Schritt wurden die beiden Hauptbausteine, mit jeweils einem stereogenen Zentrum, miteinander verestert und im Anschluss fand eine Ringschlussmetathese statt (Abbildung 72). Der erste Baustein (*R*)-Hept-1-en-4-ol [(*R*)-26], wurde dafür unter Verwendung der Keck-Allylierung aus Butyraldehyd 46 hergestellt,<sup>[289]</sup> während der zweite Baustein, der geschützte Allylalkohol 47, nach einer zuvor beschriebenen Methode aus einem Epoxid hervorging.<sup>[290]</sup> Anhand der NMR-spektroskopischen Untersuchung und des Drehwertes, in Kombination mit den Informationen aus der Isolation und ersten Zuordnung der stereogenen Zentren nach Evidente *et al.*, wurde Putaminoxin (37) als (5*S*,6*E*,9*R*)-konfiguriert deklariert.<sup>[264]</sup>



**Abbildung 72:** Retrosynthetischer Ansatz von Sabitha *et al.* für die Synthese von Putaminoxin 37 (Sabitha 2009).<sup>[265]</sup> PMB = *para*-Methoxybenzyl.

Dieses grundsätzliche Schema der Retrosynthese wurde infolgedessen für zahlreiche Synthesen verwandter Substanzen wie Stagonolid F (40), Aspinolid A (41) und Hypocreolid A (39) verwendet. Diese unterscheiden sich wie zuvor gezeigt nur in der Konfiguration des Homoallyl- bzw. Allylalkohols und der Länge der Seitenkette an Position 9 des finalen Makrolaktons. Daher konnte die Abfolge von Veresterung zweier Hauptbausteine und anschließender Ringschlussmetathese einfach übertragen werden. Die Unterschiede in der Synthese beschränkten sich daher auf die Erzeugung der enantiomerenreinen Allyl- und Homoallylalkohole. Perepogu *et al.* erzeugten den Homoallylalkohol indem sie eine kinetische Racematspaltung eines Epoxidvorläufers nach Jacobsen durchführten, während der Homoallylalkohol ebenfalls aus einem Epoxidvorläufer mit Hilfe einer asymmetrischen Sharpless Epoxidierung hervorging.<sup>[276]</sup> Auf diesem Wege gelang ihnen die erste Synthese von Stagonolid F (40). Einen sehr ähnlichen Ansatz verfolgten später auch Chinnababu *et al.* und

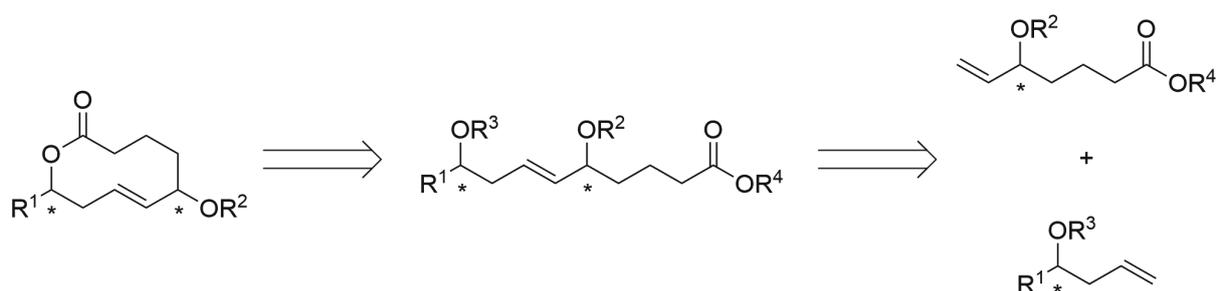
Chowdhury *et al.* für die Synthese von Stagonolid F (**40**) und Aspinolid A (**41**).<sup>[275, 283]</sup> Weiterhin verfolgten Shelke *et al.* einen organokatalytischen Ansatz zur Bereitstellung des Homoallylkohols, indem sie eine  $\alpha$ -Aminooxylierung oder eine Jørgensen Epoxidierung verwendeten. Damit gelang ihnen die Synthese sowohl von Aspinolid A (**41**), als auch von Stagonolid F (**40**).<sup>[281, 284]</sup> Kamal *et al.* dagegen nutzten den chiralen Pool für die Synthese von Stagonolid F (**40**), Aspinolid A (**41**) und Putaminoxin (**37**), indem sie für die Bereitstellung des Allylkohol-Bausteins von (*R*)- oder (*S*)-Apfelsäure ausgingen.<sup>[278]</sup> Chithaluri *et al.* kombinierten eine Maruoka-Allylierung für die Synthese des Homoallylkohols und eine Sharpless kinetische Racematspaltung für die Trennung der Enantiomere des Allylkohols, für die Synthese von Putaminoxin E (**42**). Bei dieser Endstufe der Synthese handelte es sich um Putaminoxin (**37**) im Anschluss an eine Reduktion der Doppelbindung an Position 6.<sup>[280]</sup> Alle diese Ansätze arbeiteten mit leicht unterschiedlichen Methoden zum Aufbau der beiden Hauptbausteine, die anschließende Strategie über die Veresterung und Ringschlussmetathese waren jedoch jeweils gleich (Abbildung 73).



**Abbildung 73:** Übersicht über die verwendeten Reaktionstypen zur Bereitstellung der Hauptbausteine für die Synthese von Nonenoliden, anhand der primären Strategie der intermolekularen Veresterung und anschließenden Ringschlussmetathese.

#### 4.1.2 Totalsynthese von Nonenoliden auf Basis von Kupplungsreaktionen und anschließender Makrolaktonisierung

Die häufigste Alternative zur intermolekularen Veresterung zweier Hauptbausteine und anschließender Ringschlussmetathese, stellt eine einfache Umkehr der letzten beiden Schritte dar. Anstatt die beiden Hauptbausteine miteinander zu verestern, werden diese beiden vorerst über eine Kupplungsreaktion miteinander verknüpft. Erst im Anschluss findet eine Laktonisierung statt, welche dieses Mal aber intramolekular verläuft und somit den Ringschluss vollzieht. Die in der Retrosynthese erdachten Schnittstellen am Ester und der Doppelbindung bleiben also erhalten und es findet eine einfache Umkehr der Reihenfolge dieser Schritte statt (Abbildung 74).

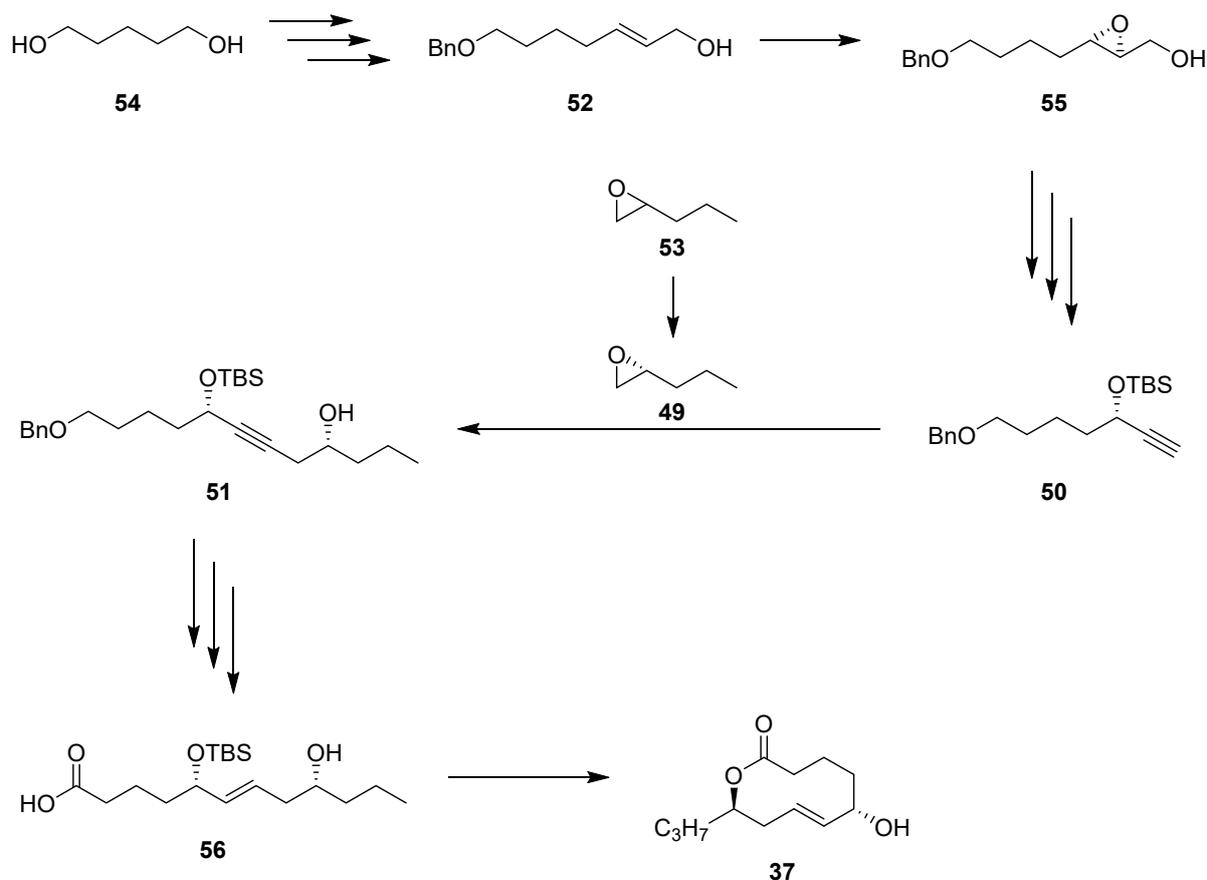


**Abbildung 74:** Darstellung des zweiten, grundlegenden Prinzipes zur Retrosynthese von Nonenoliden. Nach einer Kupplungsreaktion zweier Hauptbausteine (hier am Beispiel des typischen Allyl- und Homoallylalkohols), erfolgt eine intramolekulare Veresterung zum Makrolakton.

Erstmals wurde diese Strategie von Götz *et al.* für die Synthese und Strukturaufklärung von Hypocreolid A (39) eingesetzt.<sup>[277]</sup> Ursprünglich war auch für diese Synthese eine Ringschlussmetathese vorgesehen. Diese ergab jedoch unter Verwendung des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation ein 3:2-Gemisch von (*Z*)- zu (*E*)-Lakton. Die Ringschlussmetathese erwies sich stark abhängig von der Wahl des Katalysators, doch auch die Verwendung alternativer Katalysatoren, wie dem Hoveyda-Grubbs Katalysator der zweiten Generation, führte nicht primär zum erwünschten Produkt. Teilweise wurde sogar ausschließlich eine (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung erhalten. Daher wurde dieser Ansatz verworfen und stattdessen eine Kreuzmetathese mit anschließender Yamaguchi-Makrolaktonisierung durchgeführt.<sup>[277]</sup> Die Generierung der stereogenen Zentren erfolgte dieses Mal einerseits über die bereits erwähnte Maruoka-Keck Allylierung für den Homoallylbaustein, andererseits aber über eine asymmetrische Hydrogenierung eines Ketons nach Noyori.<sup>[291, 292]</sup> Damit konnte der Allylalkohol-Baustein selektiv erzeugt werden, welcher im Folgeschritt mit dem Homoallylkohol in der Kreuzmetathese verknüpft wurde.<sup>[277]</sup>

Einen ähnlichen Ansatz wählten Sabitha *et al.* und Yadav *et al.* für die Synthese von Aspinolid A (41) und Putaminoxin (37).<sup>[279, 282]</sup> Auch sie verknüpften erst zwei enantiomerenreine Hauptbausteine, bevor sie eine Yamaguchi-Laktonisierung zum Produkt durchführten. Im Gegensatz zu beinahe allen vorherigen Synthesen verwendeten sie jedoch nicht die klassischen Allyl- und Homoallylbausteine. Stattdessen öffneten sie ein terminales Epoxid 49 regioselektiv mit einem Alkin 50, um einen

Homopropargylalkohol **51** zu erhalten (Abbildung 75). Dieser konnte wiederum im Anschluss an eine (*E*)-selektive Birch-Reduktion der Dreifachbindung und einer Oxidation des primären Alkohols, zum Produkt **37** laktonisiert werden. Für die Synthese der enantiomerenreinen Hauptbausteine **49** und **50** wurden nach Yadav *et al.* erneut eine asymmetrische Epoxidierung von Olefin **52** nach Sharpless, bzw. eine kinetische Racematspaltung des terminalen Epoxids **53** nach Jacobsen durchgeführt. Sabitha *et al.* gaben dahingegen keine Auskünfte darüber, mit Hilfe welcher Reaktion sie die stereogenen Zentren an Position 5 und 9 des Nonenolids aufgebaut haben. Auch sie setzten allerdings auf zwei Epoxide, was die Vermutung nahelegt, dass auch sie erneut eine asymmetrische Epoxidierung nach Sharpless und eine kinetische Racematspaltung nach Jacobsen durchführten.



**Abbildung 75:** Hauptschritte der Synthese von Putaminoxin (**37**) nach Yadav *et al.*<sup>[282]</sup> Bn = Benzyl, TBS = Tributylsilyl.

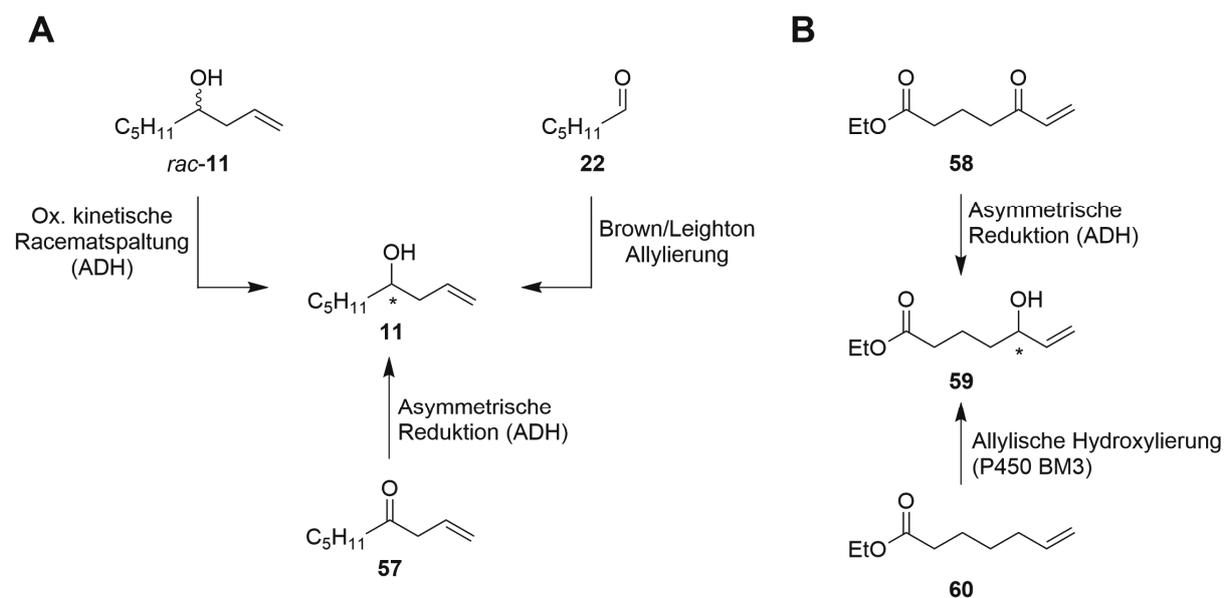
Erst kürzlich gelangen Bisterfeld und Holec *et al.* die Synthese der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**).<sup>[285]</sup> Nach dem Vorbild von Götz *et al.* waren die Schlüsselschritte die Kreuzmetathese eines Allylalkohols mit einem Homoallylalkohol, gefolgt von einer Yamaguchi-Makrolaktonisierung. Das Besondere an dieser Synthese lag jedoch an der Erzeugung der enantiomerenreinen, sekundären Alkohole. Im Gegensatz zu den klassisch chemischen Methoden der vorangegangenen Synthesen von Nonenoliden, nutzen Bisterfeld und Holec *et al.* enzymatische Methoden für die Generierung der beiden stereogenen Zentren. Dabei setzten sie sowohl Alkohol-Dehydrogenasen als auch Monooxygenasen ein (Abbildung 76). Im Falle des Homoallylalkohols **11**

## Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5S,6E,9S)-Diastereomer [(5S,6E,9S)-37] Einleitung

verglichen sie anschließend die enzymatischen Methoden mit der klassischen Allylierung nach Brown oder Leighton.<sup>[293, 294]</sup>

Im Rahmen der Synthese stellten sie fest, dass enzymatische Methoden ebenbürtig oder sogar besser als klassisch chemische Methoden sein können und deshalb im Rahmen von Retrosynthesen in Betracht gezogen werden sollten. Dieser neue Blickwinkel auf die Synthese komplexer Naturstoffe wurde ebenfalls erst kürzlich in einigen Reviews ausführlich thematisiert.<sup>[25, 295, 296]</sup> Bisterfeld und Holec *et al.* gelangen auf diesem Weg nicht nur die Synthese der vorgeschlagenen Struktur von Putaminoxin B und D (**38**) sondern auch der Enantiomere bzw. Diastereomere.

In der darauffolgenden Strukturanalyse dieser erstmals synthetisierten Verbindungen, fielen Bisterfeld und Holec *et al.* jedoch auf, dass die <sup>13</sup>C NMR-Spektren der synthetisierten Verbindungen nicht mit denen der zuvor isolierten Verbindungen in Einklang gebracht werden konnten.<sup>[266, 267, 285]</sup> Daraufhin verglichen sie die <sup>13</sup>C NMR-Spektren mit denen weiterer Nonolide und stellten weitere Unregelmäßigkeiten fest, die allerdings einer gewissen Systematik folgten. Infolgedessen wurde ein erster systematischer Vergleich der bis dato bereitgestellten Strukturdaten angestrebt.



**Abbildung 76:** Von Bisterfeld und Holec *et al.* genutzte Methoden zur Darstellung des Allylalkohols **59** und des Homoallylalkohols **11** im Rahmen der Synthese der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**).<sup>[285]</sup>

### 4.1.3 Vergleich der Strukturdaten von isolierten und synthetisierten Nonenoliden

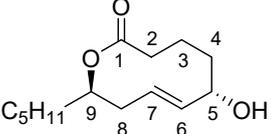
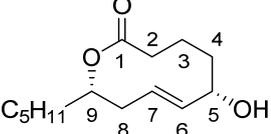
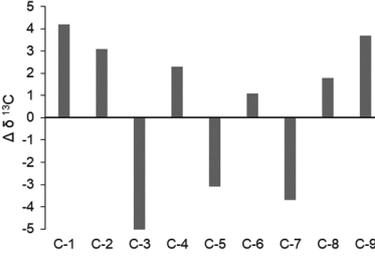
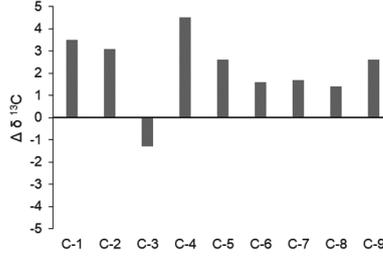
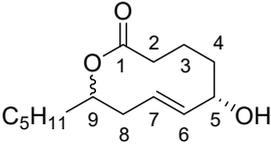
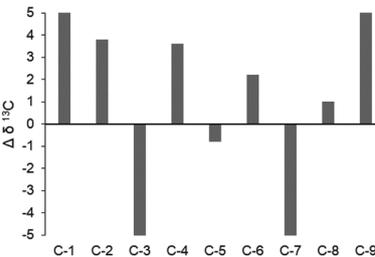
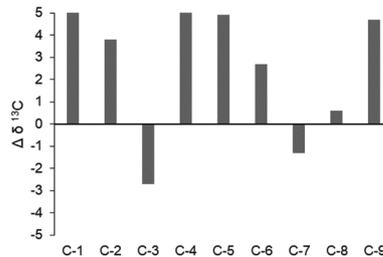
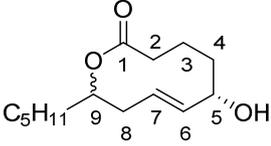
In Folge der aufgedeckten Unregelmäßigkeiten in den <sup>13</sup>C NMR-Daten im Anschluss an die chemoenzymatische Totalsynthese der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**), erstellten Bisterfeld und Holec *et al.* eine Übersicht über die bis dato zur Verfügung stehenden Daten.<sup>[285]</sup>

Als Vergleiche dienten die Daten jener Nonenolide, welche sich nur in der Konfiguration der stereogenen Zentren an Position 5 und 9, sowie der Länge der Alkylkette an Position 9 unterschieden. Es erfolgte kein Vergleich zu Strukturdaten von (*Z*)-konfigurierten Nonenoliden oder solchen mit weiteren Substituenten wie Pinolidoxin (**45**). Weiterhin wurde sich auf den Vergleich der Drehwerte

und der  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren reduziert, da sich die Signale der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren teilweise überlagern und nicht eindeutig auflösen sind.

Aus dem Vergleich der Strukturdaten ergab sich, dass die angegebenen chemischen Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$  NMR der isolierten Putaminoxine B und D (**38**) mit keinem der vier synthetisierten Stereoisomere von Bisterfeld und Holec *et al.* in Einklang gebracht werden konnten (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR-Daten von synthetisierten und isolierten Verbindungen der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**). Dargestellt sind die Differenzen der chemischen Verschiebung in Anlehnung an Bisterfeld und Holec *et al.* [266, 267, 285] Chemische Verschiebungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur bis zu einem maximalen Betrag von +/- 5 aufgetragen.

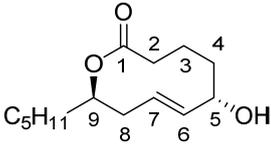
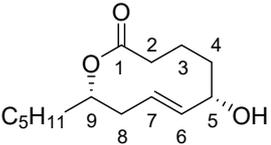
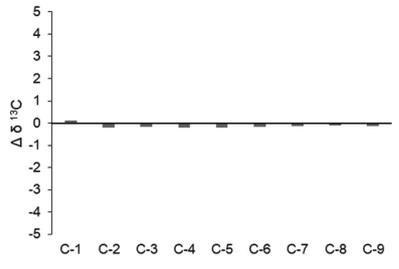
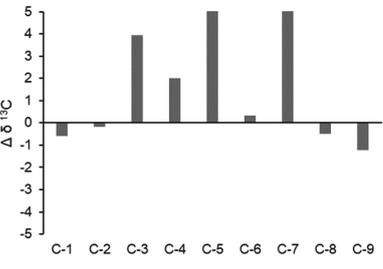
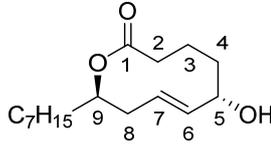
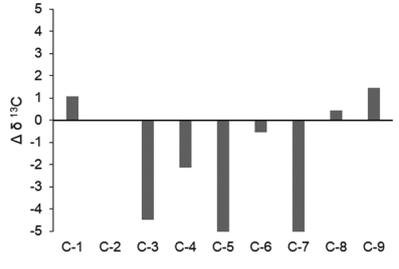
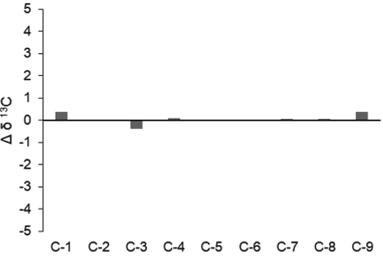
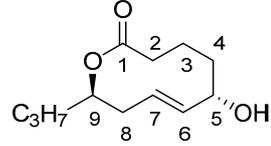
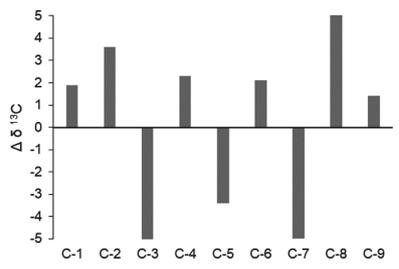
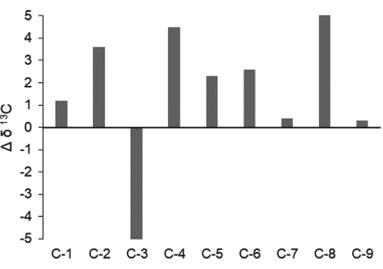
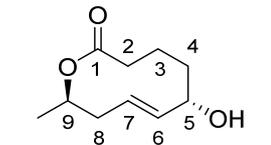
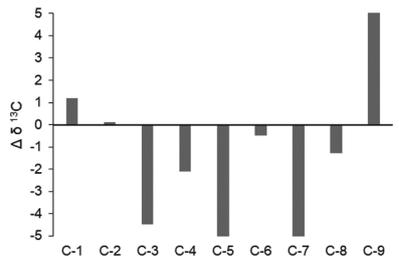
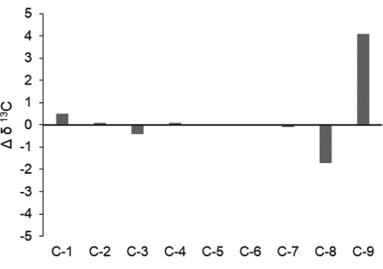
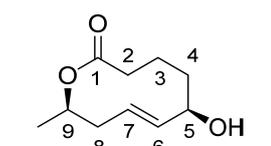
 <p>(5S,6E,9R)-<b>38</b></p>	 <p>(5S,6E,9S)-<b>38</b></p>	
 <p><math>\Delta \delta^{13}\text{C}</math></p> <p>C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 C-7 C-8 C-9</p>	 <p><math>\Delta \delta^{13}\text{C}</math></p> <p>C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 C-7 C-8 C-9</p>	 <p>(5S,6E,9?)-<b>38</b> Putaminoxin B</p>
 <p><math>\Delta \delta^{13}\text{C}</math></p> <p>C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 C-7 C-8 C-9</p>	 <p><math>\Delta \delta^{13}\text{C}</math></p> <p>C-1 C-2 C-3 C-4 C-5 C-6 C-7 C-8 C-9</p>	 <p>(5S,6E,9?)-<b>38</b> Putaminoxin D</p>

Während in diesen Fällen keinerlei Systematik im Vergleich der Daten ersichtlich war, zeigte sich bei einem darauffolgenden Abgleich mit weiteren Nonenoliden wie Putaminoxin (**37**), Hypocreolid A (**39**) und Aspinolid A (**41**) jeweils ein klarer Trend. So stimmten die chemischen Verschiebungen der (5S,6E,9R)- konfigurierten Verbindung [(5S,6E,9R)-**38**] perfekt mit denen des ebenfalls (5S,6E,9R)- konfigurierten Hypocreolid A (**39**) von Götz *et al.* überein.<sup>[277]</sup> Die einzigen Unterschiede lagen in den chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Alkylkette in Position 9. Dies ist allerdings nicht verwunderlich, da diese Alkylketten eine unterschiedliche Länge haben. Für alle sich im Ring befindlichen Kohlenstoffatome waren die chemischen Verschiebungen jedoch quasi identisch. Dasselbe ließ sich am Beispiel der (5S,6E,9S)-konfigurierten Verbindung [(5S,6E,9S)-**38**] im Abgleich mit Aspinolid A (**41**) von Fuchser und Zeeck beobachten.<sup>[269]</sup> Erneut waren die chemischen Verschiebungen

Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]  
 Einleitung

der Kohlenstoffatome im Ring quasi identisch, die Unterschiede beschränkten sich erneut auf die Signale an der Alkylkette (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Vergleich der chemischen Verschiebungen der Ringkohlenstoffatome im  $^{13}\text{C}$  NMR von Nonenoliden, in Anlehnung an Bisterfeld und Holec *et al.*<sup>[285]</sup> Als Basis dienen die  $^{13}\text{C}$  NMR Daten aus der Synthese der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (38). Diese wurden mit den erhobenen  $^{13}\text{C}$  NMR Daten von Hypocreolid A (39), Putaminoxin (37), Stagonolid F (40) und Aspinolid A (41) verglichen und die Differenz der chemischen Verschiebung aufgetragen.<sup>[265, 269, 272, 277]</sup> Chemische Verschiebungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur bis zu einem maximalen Betrag von +/- 5 aufgetragen.

 <p>(5<i>S</i>,6<i>E</i>,9<i>R</i>)-38</p>	 <p>(5<i>S</i>,6<i>E</i>,9<i>S</i>)-38</p>	
		 <p>(5<i>S</i>,6<i>E</i>,9<i>R</i>)-39</p>
		 <p>(5<i>S</i>,6<i>E</i>,9<i>R</i>)-37</p>
		 <p>(5<i>S</i>,6<i>E</i>,9<i>R</i>)-40</p>
		 <p>(5<i>R</i>,6<i>E</i>,9<i>R</i>)-41</p>

Interessanterweise zeigte der Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR-Daten der (5*S*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Verbindung [(5*S*,6*E*,9*R*)-**38**] mit den  $^{13}\text{C}$  NMR-Daten des synthetisierten, (5*S*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Putaminoxin (**37**) von Sabitha *et al.* jedoch, dass diese nicht zueinander passten.<sup>[265]</sup> Stattdessen passten die chemischen Verschiebungen der (5*S*,6*E*,9*S*)-konfigurierten Verbindung [(5*S*,6*E*,9*S*)-**38**] sehr gut zu denen des Putaminoxins (**37**) (Tabelle 4). Der Vergleich mit Stagonolid F (**40**) wiederum ergab erneut keinerlei Übereinstimmung der Signale, mit keinem der beiden synthetisierten Diastereomere von **38**. Zusätzlich zu den  $^{13}\text{C}$  NMR-Daten zeigte sich beim Vergleich der Drehwerte dieser Verbindungen, dass das stereogene Zentrum an Position 9 eine höhere Priorität genießt. Dementsprechend zeigten all jene verglichenen Nonenolide, im Falle einer (9*R*)-Konfiguration, einen negativen Drehwert. Dies war unabhängig davon, welche Konfiguration parallel am C-5-Atom vorlag.<sup>[285]</sup> An dieser Stelle konnten jedoch keine weiteren Aussagen über die absoluten Konfigurationen der Verbindungen getätigt werden. Für eine weitergehende Untersuchung, besonders der Zusammenhänge zwischen den vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**) und Putaminoxin (**37**), bedurfte es einer weiteren Totalsynthese von Putaminoxin (**37**) und seines (5*S*,6*E*,9*S*)- [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] oder (5*R*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Diastereomers [(5*R*,6*E*,9*R*)-**37**]. Nur so ließe sich eine mögliche Zuordnung jener Verbindungen durchführen, welche angeblich gleich konfiguriert vorliegen, deren  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren diesen Fakt jedoch nicht widerspiegeln. Aus diesem Grund wurde die chemoenzymatische Synthese von Putaminoxin (**37**) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] nach dem Vorbild von Bisterfeld und Holec *et al.* angestrebt, um mehr Informationen über die Strukturen dieser phytotoxischen Verbindungen zu erhalten.

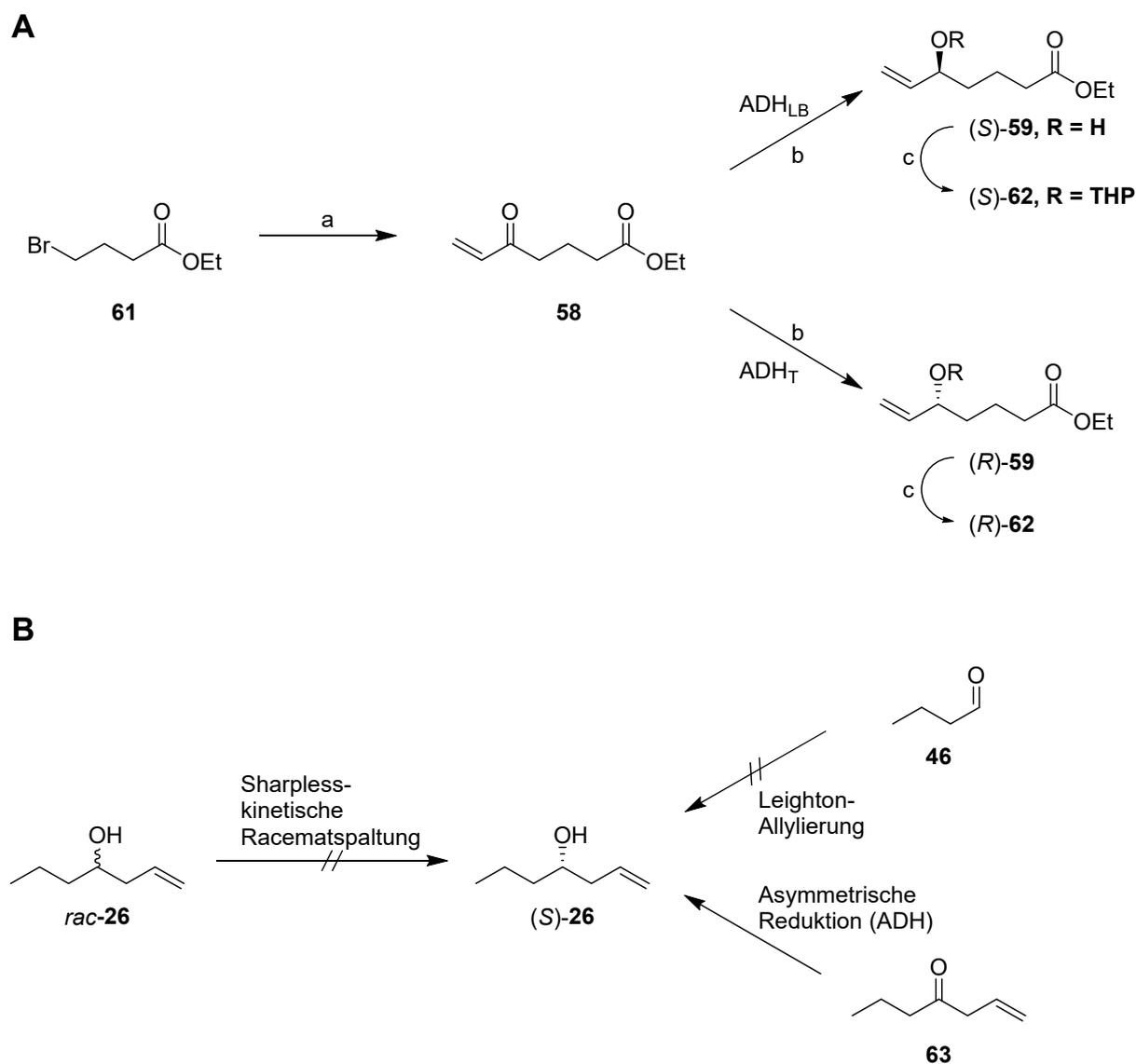
#### 4.1.4 Erste Versuche zur chemoenzymatischen Synthese von Putaminoxin (**37**) und seinen Analoga

Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurden erste Untersuchungen zur chemoenzymatischen Synthese von Putaminoxin (**37**) durchgeführt.<sup>[297]</sup> Der Retrosyntheseplan orientierte sich dabei an der chemoenzymatischen Synthese der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**) von Bisterfeld und Holec *et al.* und damit der Verknüpfung eines Allylalkohols mit einem Homoallylalkohol und anschließender Makrolaktonisierung (Abbildung 74).<sup>[285]</sup> Dabei gelang die Synthese der Allylalkohole (*S*)-**59** und (*R*)-**59** in Anlehnung an Vorschriften von Weber *et al.* und Fischer *et al.*<sup>[298, 299]</sup> Für die asymmetrische Reduktion des Ketons **58** wurden die stereokomplementären Alkohol-Dehydrogenasen aus *Lactobacillus brevis* (ADH<sub>LB</sub>) und *Thermoanaerobacter brockii* (ADH<sub>T</sub>, früher *Thermoanaerobium*) eingesetzt. Die Allylalkohole wurden für die anschließende Kreuzmetathese jeweils mit einer Tetrahydropyran-Schutzgruppe versehen (Abbildung 77).

Für die Synthese des zweiten Bausteins, dem Homoallylalkohol **26** wurden mehrere Ansätze ausprobiert. Die stereoselektive Allylierung von Butanal **46** mit dem kommerziell erhältlichen Leighton-Reagenz war dabei nicht erfolgreich, genauso wie eine kinetische Racematspaltung des Homoallylalkohols mit Hilfe der Sharpless-Epoxidierung. Die asymmetrische Reduktion des Ketons **58**

Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]  
 Einleitung

mit unterschiedlichen Alkoholdehydrogenasen zeigte dagegen, dass die ADH<sub>T</sub> als Einzige in der Lage war, die sterisch sehr ähnlichen Seitenreste des Homoallylkohols zu diskriminieren. Dabei konnten jedoch noch keine hohen Enantiomerenüberschüsse erreicht werden (Abbildung 77). Diese deuteten aber darauf hin, dass eine oxidative kinetische Racematspaltung des Homoallylkohols **26** möglich wäre. Da die Alkoholdehydrogenase jedoch nicht in der Lage ist absolut zwischen dem Pentyl- und Pentenylrest des Hept-1-en-4-ols (**26**) zu unterscheiden, müsste ein Umsatz über 50 % erfolgen, um einen ausreichenden Enantiomerenüberschuss zu erhalten. Dies würde wiederum eine geringere Ausbeute zur Folge haben.<sup>[297]</sup>

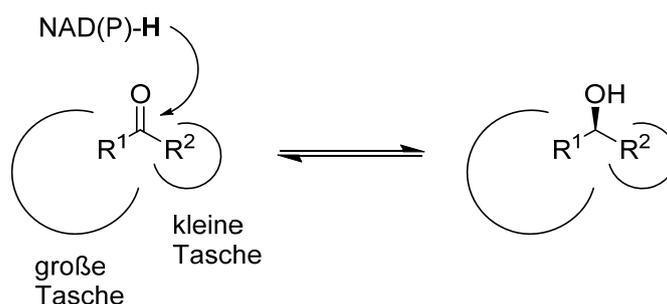


**Abbildung 77: A)** Synthese der Allylbausteine für die Synthese von Putaminoxin (**37**) und seinen Analoga nach Weber *et al.* und Bisterfeld und Holec *et al.*<sup>[285, 299]</sup> a) Zn, I<sub>2</sub>, DMA, 80 °C, 2 h; Acryloylchlorid, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, RT, 15 h; b) ADH<sub>T/LB</sub>, Aceton, NADP<sup>+</sup>, KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), 30 °C, 130 rpm, 3.5 h; c) PPTS, DHP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 14 h; **B)** Unterschiedliche Versuche zur Darstellung von (S)-Hept-1-en-4-ol [(S)-**26**].<sup>[297]</sup>

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

### 4.2.1 Chemoenzymatische Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]

Basierend auf den Ergebnissen der Arbeit von Diekmann wurde die kinetische Racematspaltung von Hept-1-en-4-ol (**26**) näher untersucht.<sup>[297]</sup> Bereits zuvor zeigten Bisterfeld und Holec *et al.*, dass die kinetische Racematspaltung von Non-1-en-4-ol (**11**) mit Hilfe von Alkoholdehydrogenasen eine Alternative zu den herkömmlichen Allylierungsreaktionen sein kann.<sup>[285, 300]</sup> Im Gegensatz zu Non-1-en-4-ol (**11**) handelt es sich bei Hept-1-en-4-ol (**26**) jedoch um ein beinahe symmetrisches Substrat. Da die Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* seine Substrate anhand des sterischen Anspruchs der Substituenten am Keton unterscheidet ist die Diskriminierung im Falle des Heptenols **26** sehr viel anspruchsvoller. Der Unterschied der beiden Substituenten beträgt in diesem Fall nur zwei Wasserstoffatome. Die Alkoholdehydrogenase fixiert die Substituenten des Substrats in zwei unterschiedlich großen Taschen im aktiven Zentrum.<sup>[301]</sup> Der sterisch anspruchsvolle Rest kann somit nur in die größere der beiden Taschen hineinpassen. Die definierte Ausrichtung des Substrates bedingt für alle größeren Substrate einen *si*-facialen Angriff des Hydrids vom NAD(P)H auf das elektrophile Kohlenstoffatom (Abbildung 78).<sup>[241]</sup> Dies gilt jedoch nur für die Annahme, dass der sterisch anspruchsvollere Rest eine höhere Priorität nach IUPAC-Nomenklatur genießt, im Falle der Homoallylalkohole **11** und **26** dagegen besitzt der sterisch anspruchsvollere Rest die geringere Priorität. Die Orientierung des Substrates bleibt zwar bestehen und der Hydridangriff folgt aus derselben Orientierung, der Nomenklatur entsprechend handelt es sich für diese Substrate jedoch um einen *re*-facialen Angriff, welcher zur Ausbildung eines (*R*)-Alkohols führen würde. Im Umkehrschluss findet somit auch eine Oxidation des (*R*)-Alkohols in der oxidativen kinetischen Racematspaltung statt, unter Anreicherung des (*S*)-Alkohols.



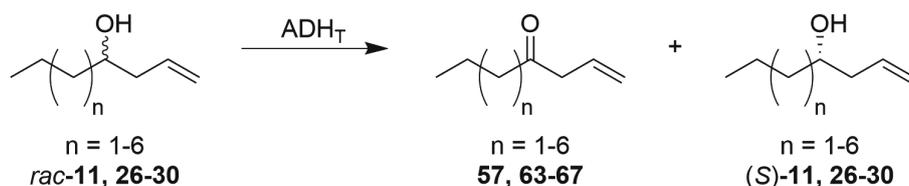
**Abbildung 78:** Fixierung von Substraten mit unterschiedlichen Substituenten im aktiven Zentrum der ADH<sub>T</sub>, in Anlehnung an Hummel *et al.*<sup>[241]</sup> R<sup>1</sup> = sterisch anspruchsvoller Rest, R<sup>2</sup> = sterisch wenig anspruchsvoller Rest.

Die Möglichkeit mit Hilfe der ADH<sub>T</sub> unterschiedlich lange, aliphatische Homoallylalkohole enantiomerenrein bzw. enantiomerenangereichert darzustellen, könnte als Basis für weitere chemoenzymatische Synthesen von Nonenoliden, mit unterschiedlichen Kettenlängen am C-9 Atom, dienen. Um herauszufinden, in welchem Kettenlängen-Bereich der Einsatz der ADH<sub>T</sub> sinnvoll ist, wurden racemische Gemische von Homoallylalkoholen der Kettenlänge C-7 bis C-12 mit der

Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5S,6E,9S)-Diastereomer [(5S,6E,9S)-37]  
Ergebnisse und Diskussion

Alkoholdehydrogenase oxidiert. Die racemischen Homoallylalkohole wurden dafür kommerziell erworben oder vorab selbst synthetisiert (siehe Kapitel 5.5.2). Es zeigte sich, dass die ADH<sub>T</sub> optimal für die oxidative kinetische Racematspaltung der Substrate Oct-1-en-4-ol (**27**) und Non-1-en-4-ol (**11**) eingesetzt werden kann. Für diese verbindet sie eine hohe Selektivität mit kurzer Reaktionszeit unter den getesteten Bedingungen. Für die Oxidation der längeren Kettenlängen wird die Reaktionszeit dagegen graduell länger und die geringe Löslichkeit der Substrate erlaubte keine konstante Bestimmung des Umsatzes, da die Substrate nicht homogen im Reaktionsmedium verteilt vorlagen. Die Notwendigkeit den Umsatz mittels analytischer Methoden zu verfolgen, um die Reaktion an einem geeigneten Zeitpunkt abbrechen zu können, macht lange Reaktionszeiten zusätzlich unerwünscht. Im Anschluss an eine Verringerung der Konzentration der längeren Homoallylalkohole **28-30** auf 7.5 mM statt der üblichen 10 mM, konnten auch für diese enantiomerenreine Produkte nach 4-24 Stunden erhalten werden (Tabelle 5). Erfreulicherweise war die ADH<sub>T</sub> ebenfalls in der Lage die Alkylketten des beinahe symmetrischen Hept-1-en-4-ols (**26**) zu unterscheiden, so dass nach 58 % Umsatz ein Enantiomerenüberschuss (*ee*) von 94 % erreicht wurde.

**Tabelle 5:** Oxidative kinetische Racematspaltung von aliphatischen Homoallylalkoholen mit Hilfe der ADH<sub>T</sub>. Reaktionsbedingungen: Homoallylalkohol (10 mM), Aceton (5 vol.-%), ADH<sub>T</sub> (0.5 U/mL), NADP<sup>+</sup> (300 mM), KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), 30 °C, 130 rpm.

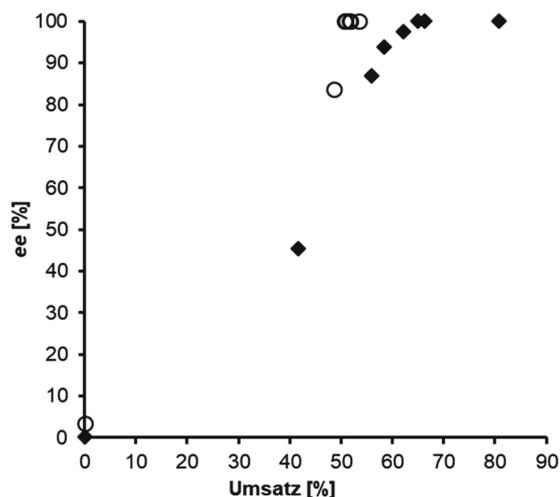


Substrat	Produkt	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]	Zeit [h]
<b>26</b> (n = 1)	( <i>S</i> )- <b>26</b> (n = 1)	58	94	3
<b>27</b> (n = 2)	( <i>S</i> )- <b>27</b> (n = 2)	50	>99	3
<b>11</b> (n = 3)	( <i>S</i> )- <b>11</b> (n = 3)	50	>99	3
<b>28</b> (n = 4)	( <i>S</i> )- <b>28</b> (n = 4)		>99 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
<b>29</b> (n = 5)	( <i>S</i> )- <b>29</b> (n = 5)		99 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
<b>30</b> (n = 6)	( <i>S</i> )- <b>30</b> (n = 6)		90 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Substratkonzentration wurde auf 7.5 mM reduziert

In vorangegangenen Experimenten mit der ADH<sub>T</sub> konnten Keinan *et al.* keinen Umsatz in der asymmetrischen Reduktion von Hept-1-en-4-on (**63**) beobachten.<sup>[302]</sup> Es wurde vermutet, dass die *n*-Pentyl Seitenketten der Verbindung nicht in die kleine Tasche des Enzyms passen. Der beobachtete

*ee* von 94 % nach 58 % Umsatz zeigte, dass diese im Gegensatz zur minimal kleineren *n*-Pentenyl Seitenkette tatsächlich nicht gut in die kleine Tasche passt, die Diskriminierung jedoch nicht so gut ist, wie die gegenüber der etwas längeren *n*-Butyl Seitenkette des Oct-1-en-4-ols (**27**). Dadurch lag der *ee* nach 50 % Umsatz nicht bei >99 % und es fand eine kontinuierliche, aber langsame Umsetzung des verbleibenden (*S*)-Hept-1-en-4-ols [(*S*)-**26**] statt (Abbildung 79).

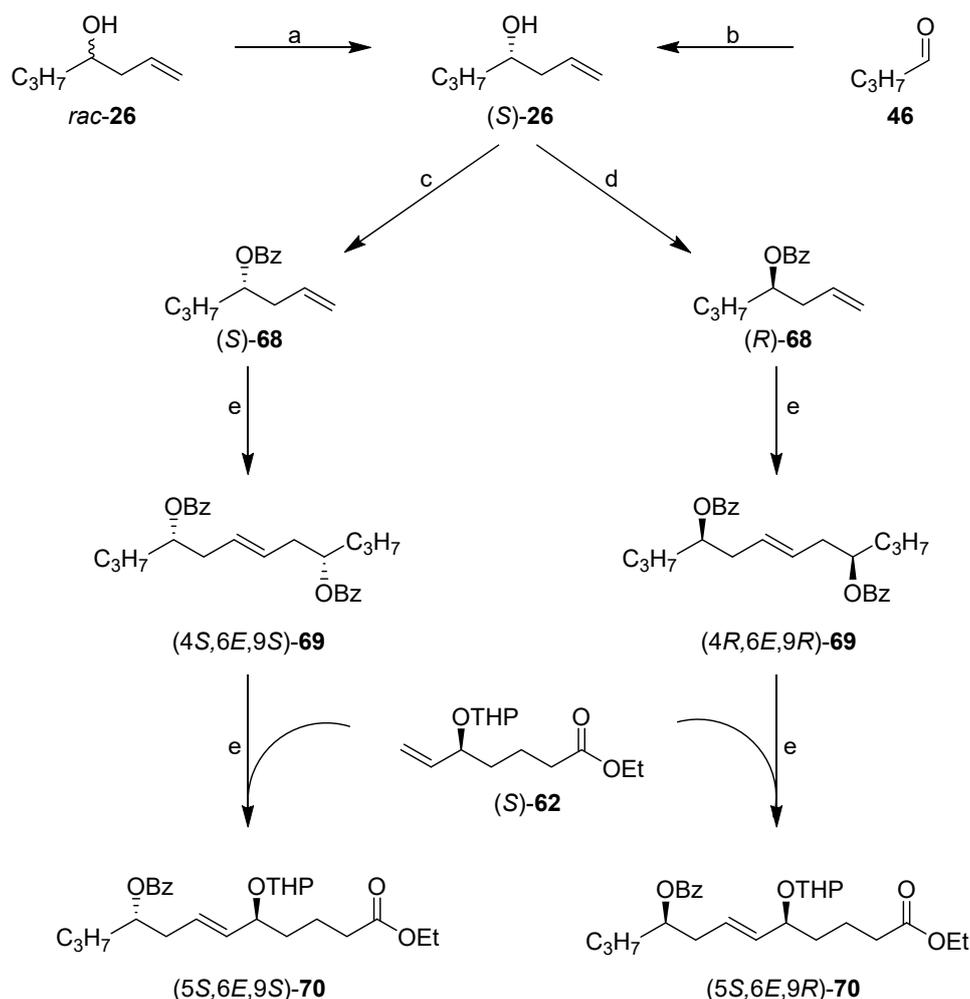


**Abbildung 79:** Oxidative kinetische Racematspaltung von  $\blacklozenge$  Hept-1-en-4-ol (**26**) und  $\circ$  Oct-1-en-4-ol (**27**) mit der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii*. Reaktionsbedingungen: Homoallylalkohol (10 mM), Aceton (5 % (v/v)), ADH<sub>T</sub> (0.5 U/mL), NADP<sup>+</sup> (300 mM), KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), 30 °C, 130 rpm. Proben wurden nach 0 h, 1 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h und 24 h entnommen, extrahiert und mit Hilfe von Gaschromatografie über chiraler stationärer Phase untersucht.

Auch im Falle des kleineren und beinahe symmetrischen Substrates Hept-1-en-4-ol (**26**) wurde gemäß vorherigen Untersuchungen bevorzugt das (*R*)-Enantiomer oxidiert.<sup>[300, 302, 303]</sup> An dieser Stelle ist darauf zu achten, dass für die anderen untersuchten Substrate zumeist der sterisch anspruchsvollere Rest eine höhere Priorität nach Prelog besaß. Im Fall der sterisch minimal weniger anspruchsvolleren *n*-Pentenyl Seitenkette ist dieser Zusammenhang jedoch umgekehrt, so dass jeweils das (*S*)-Enantiomer übrigblieb. Die Reaktion wurde in einem größeren Maßstab von 250 mL wiederholt und das erwünschte (*S*)-Hept-1-en-4-ol [(*S*)-**26**] konnte in 25 % Ausbeute und einem (*S*)-*ee* von 94 % isoliert werden. Eine parallele asymmetrische Allylierung von Butanal (**46**) mit Hilfe des Brown-Reagenzes ergab eine Ausbeute von 23 % mit einem (*S*)-*ee* von 95 %. In beiden Fällen führte die Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck vermutlich zu Ausbeuteverlusten, da das Produkt volatil ist. Nichtsdestotrotz konnte der enantiomerenangereicherte Homoallylalkohol für die weitere Synthese von Putaminoxin (**37**) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] eingesetzt werden. Für die spätere Kreuzmetathese mit dem geschützten Allylalkoholbaustein **62** musste der Homoallylalkohol **26** dafür mit einer Schutzgruppe versehen werden. In vorangegangenen Synthesen wurde er dafür jeweils mit einer Acetyl-Schutzgruppe versehen.<sup>[277, 285]</sup> Dies führte jedoch im Falle des Hept-1-en-4-ols (**26**) zu sehr geringen Ausbeuten, vermutlich da das Produkt noch volatil als das Substrat war. Deshalb wurde der Homoallylalkohol stattdessen mit einer Benzoylschutzgruppe versehen und das geschützte Produkt

Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]  
Ergebnisse und Diskussion

**68** konnte auf diese Art in 89 % Ausbeute gewonnen werden. Für die Synthese von Putaminoxin (**37**) wurde der Homoallylalkohol jedoch in (*R*)-Konfiguration benötigt. Es stand jedoch keine stereokomplementäre Alkoholdehydrogenase für die kinetische Racematspaltung des Homoallylalkohols *rac*-**26** zur Verfügung und eine Brown-Allylierung von Butanal (**46**) führte nur zu einem (*R*)-*ee* von 72 %. Deshalb wurde stattdessen das stereogene Zentrum des (*S*)-Hept-1-en-4-ol [(*S*)-**26**] mit Hilfe einer Mitsunobu-Veresterung invertiert und gleichzeitig geschützt. Dies gelang in einer Ausbeute von 83 %. In der anschließenden Kreuzmetathese mit dem THP-geschützten Allylalkohol (*S*)-**62** zeigte sich, dass primär das Homodimer **69** des geschützten Homoallylalkohols **68** entstand. Das gewünschte Heterodimer **70** konnte dagegen nur in 24 % Ausbeute erhalten werden (Abbildung 80).

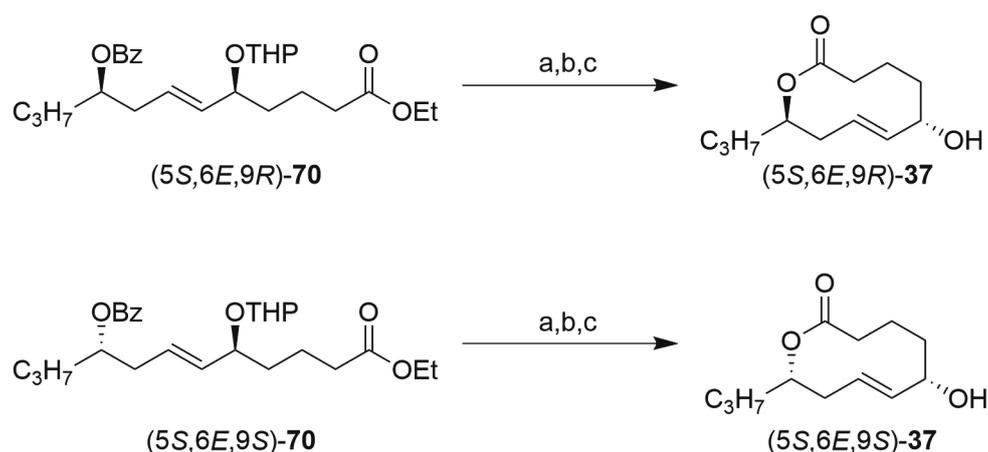


**Abbildung 80:** THP = Tetrahydropyranyl, Bz = Benzoyl. Reaktionsbedingungen: a) ADH<sub>T</sub>, Aceton, NADP<sup>+</sup>, KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>), 30 °C, 130 rpm, 3.5 h; b) (+)-*B*-Allyldiisopinocampheylboran, Et<sub>2</sub>O, -78 °C, 1 h; c) Benzoylchlorid, Pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24 h; d) Benzoessäure, Triphenylphosphin, Diisopropylazodicarboxylat, THF, 4.5 h; e) Grubbs-Katalysator 2te Generation, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 40 °C, 24 h.

Dieser Zusammenhang wurde bereits zuvor beobachtet,<sup>[285]</sup> weshalb in der vorangegangenen Synthese erst einmal der geschützte Homoallylalkohol **68** zum entsprechenden Homodimer **69** verknüpft wurde, bevor dieses in einer zweiten Metathesereaktion mit dem geschützten Allylalkohol **62** eingesetzt wurde. Die Metathese zum Homodimer (**(4*S*,6*E*,9*S*)-69** bzw. (**(4*R*,6*E*,9*R*)-69**), unter Verwendung des Grubbs-Katalysators der zweiten Generation, ergab für beide Enantiomere des geschützten Homoallylalkohols

**68** gute Ausbeuten von 83-86 %. Die darauffolgende Kreuzmetathese mit dem geschützten Allylalkohol (*S*)-**62** ergab aber erneut nur eine maximale Ausbeute von 41 % für das Heterodimer **70** (Abbildung 80). Unreagierte Allylalkohol **62** und das unreaktierte Homodimer **69** konnten jedoch jeweils zurückgewonnen werden. Diese konnten erneut in einer zweiten Metathesereaktion eingesetzt werden, welche eine gleichwertige Ausbeute von 40 % für das Heterodimer **70** ergab.

Die letzten Schritte der Synthese umfassten die Entschützung der beiden Ester-Schutzgruppen am Carboxylende, sowie an der Hydroxylgruppe in Position 9. Daraufhin folgte eine Yamaguchi-Makrolaktonisierung zur Schließung des Ringes, bevor die Entschützung der THP-Schutzgruppe zum Erhalt des Putaminoxin [(5*S*,6*E*,9*R*)-**37**] und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] führte. In Anlehnung an die Vorschrift von Götz *et al.* wurden die Zwischenprodukte dabei nicht isoliert.<sup>[277]</sup> Putaminoxin [(5*S*,6*E*,9*R*)-**37**] und sein (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] konnten über diese drei Schritte in einer Ausbeute von 57-66 % erhalten werden (Abbildung 81). Im Anschluss an die erfolgreiche Synthese des phytotoxischen Nonenolids (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** und seines Diastereomers (5*S*,6*E*,9*S*)-**37**, wurde erneut eine Untersuchung der chemischen Verschiebungen im <sup>13</sup>C NMR vorgenommen.



**Abbildung 81:** THP = Tetrahydropyranyl, Bz = Benzoyl, Reaktionsbedingungen: a) LiOH, THF:MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1:1), 60 °C, 48 h; b) 1. 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid, Et<sub>3</sub>N, THF, 25 °C, 2 h; 2. 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridin (DMAP), Toluol, Reflux, 3 h; c) PPTS, *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O, EtOH, 40 °C, 16 h.

#### 4.2.2 Vergleich der Strukturdaten der neu synthetisierten Nonenolide und Strukturvorschlag für das phytotoxische Nonenolid Putaminoxin (5*S*,6*E*,9*R*)-**37**

Der Vergleich der <sup>13</sup>C NMR Daten der neu synthetisierten Verbindungen, mit denen zuvor isolierter und synthetisierter Nonenolide, offenbarte ähnliche Diskrepanzen wie jene, welche zuvor von Bisterfeld und Holec *et al.* aufgedeckt worden sind.<sup>[285]</sup> Die <sup>13</sup>C NMR Daten des neu synthetisierten Putaminoxins [(5*S*,6*E*,9*R*)-**37**] und seines Diastereomers (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** passten nicht zu jenen, welche von Evidente *et al.* und Sabitha *et al.* publiziert worden sind.<sup>[264, 265]</sup> Stattdessen passten die Daten zu denen der vorgeschlagenen Strukturen von Putaminoxin B und D (**38**) von Bisterfeld und Holec *et al.*, aber auch zu jenen von Götz *et al.* für Hypocreolid A (**39**) und denen von Fuchser und Zeeck für Aspinolid A (**41**).<sup>[269, 277, 285]</sup> So waren die chemischen Verschiebungen der Ringkohlenstoffe des neu synthetisierten

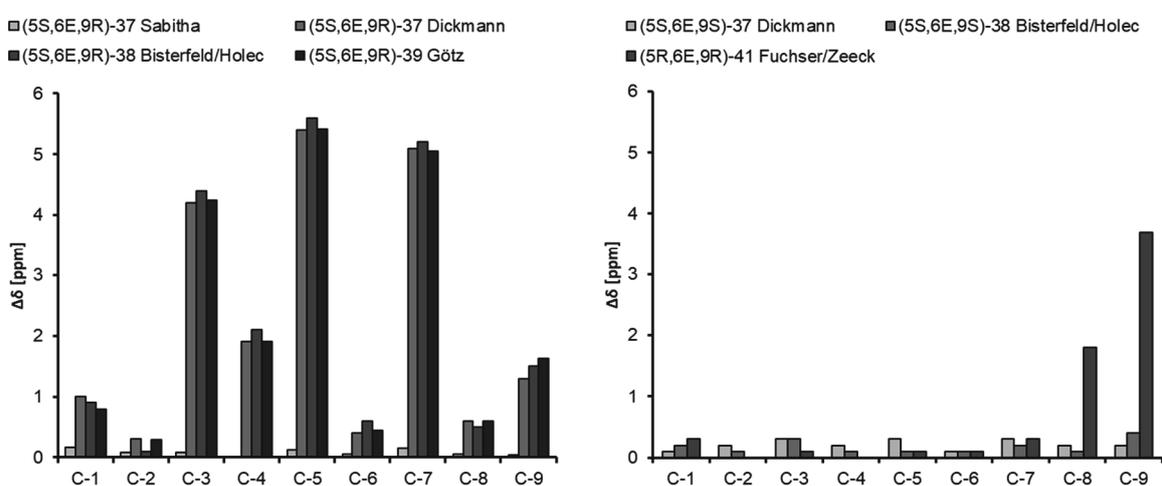
Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]  
Ergebnisse und Diskussion

Putaminoxins [(5*S*,6*E*,9*R*)-37] quasi identisch mit denen der ebenfalls (5*S*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Verbindung (5*S*,6*E*,9*R*)-38 von Bisterfeld und Holec *et al.* (Tabelle 6).<sup>[285]</sup>

**Tabelle 6:** Vergleich der <sup>13</sup>C NMR Signale der neu synthetisierten Verbindungen (5*S*,6*E*,9*R*)-37 und (5*S*,6*E*,9*S*)-37 mit zuvor publizierten Daten synthetisierter und isolierter Nonenolide. Signale relevanter Positionen wurden farblich hervorgehoben. Grün = Verschiebung passt zu (5*S*,6*E*,9*R*)-37, Rot = Verschiebung passt zu (5*S*,6*E*,9*S*)-37.

Nr.	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-37			(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-37		
	Diese Arbeit	Sabitha <i>et al.</i> <sup>[265]</sup>	Evidente <i>et al.</i> <sup>[264]</sup>	Diese Arbeit	Bisterfeld und Holec <i>et al.</i> <sup>[285]</sup>	Götz <i>et al.</i> <sup>[277]</sup>
C-1	176.8	175.6	175.8	175.9	176.7	176.6
C-2	35.9	35.7	35.6	35.8	35.7	35.9
C-3	18.0	22.3	22.2	22.5	17.8	18.0
C-4	36.8	38.7	38.7	38.9	36.6	36.8
C-5	68.6	74.1	74.0	74.3	68.4	68.6
C-6	136.8	137.1	137.2	137.3	136.6	136.8
C-7	126.4	131.7	131.5	131.8	126.3	126.5
C-8	40.9	40.4	40.3	40.5	40.8	40.9
C-9	76.6	75.3	75.3	75.5	76.8	76.9
C-10	36.5	36.4	36.3	36.6	34.2	34.4
C-11	19.3	19.1	19.1	19.3	25.6	26.1
C-12	14.0	13.9	13.8	14.0	31.6	29.5
C-13					22.7	29.3
C-14					14.1	31.9
C-15						22.8
C-16						14.2

Dasselbe galt für das (5*S*,6*E*,9*S*)-konfigurierte Diastereomer (5*S*,6*E*,9*S*)-**37**, welches ebenfalls quasi identische Verschiebungen wie das (5*S*,6*E*,9*S*)-konfigurierte Nonenolid (5*S*,6*E*,9*S*)-**38** von Bisterfeld und Holec *et al.* aufwies.<sup>[285]</sup> Dementsprechend passten die neuen Daten auch zu den Daten jener Nonenolide, welche dieselbe Konfiguration aufwiesen aber eine kürzere oder längere Alkylkette an Position C-9 besaßen, wie Aspinolid A (**41**) und Hypocreolid A (**39**). Die Positionen, an denen sich diese Zusammenhänge besonders gut erkennen lassen, sind die Positionen 1,3,4,5,7 und 9. Die größten Differenzen in der chemischen Verschiebung konzentrieren sich dabei auf die Positionen 3,5 und 7 (Tabelle 6). Die Visualisierung dieser Unterschiede macht deutlich, dass die Daten der ursprünglich von Evidente *et al.* isolierte Verbindung, sehr gut zu jenen der (5*S*,6*E*,9*S*)-, bzw. (5*R*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Nonenolide passt, nicht jedoch zu jenen der (5*S*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Nonenolide. Die einzige Ausnahme bildet die Synthese von Putaminoxin (**37**) von Sabitha *et al.* nach der das stereogene Zentrum an Position 9 bestimmt wurde (Abbildung 82).<sup>[265]</sup>



**Abbildung 82:** Separater Vergleich der chemischen Verschiebungen im  $^{13}\text{C}$  NMR, von (5*S*,6*E*,9*R*)-konfigurierten und (5*S*,6*E*,9*S*)-, bzw. (5*R*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Nonenoliden, mit jenen von Evidente *et al.* publizierten für das ursprünglich isolierte und angeblich (5*S*,6*E*,9?)-konfigurierte Putaminoxin [(5*S*,6*E*,9?)-**37**].<sup>[264, 265, 269, 277, 285]</sup>

Darüber hinaus wurden zusätzlich zu den NMR-Daten die spezifischen Drehwerte der isolierten und synthetisierten Verbindungen verglichen. Dabei zeigte sich, dass das stereogene Zentrum an Position 9 die Drehrichtung der Verbindungen diktiert, da alle (9*R*)-konfigurierten Nonenolide einen negativen spezifischen Drehwert aufwiesen, während alle (9*S*)-konfigurierten Verbindungen einen positiven spezifischen Drehwert besaßen (Tabelle 7). Die ursprünglich von Evidente *et al.* isolierte Verbindung wies ebenfalls einen negativen Wert auf.<sup>[264]</sup> Daher ist davon auszugehen, dass auch dieses Nonenolid (9*R*)-konfiguriert vorliegt. Das neu synthetisierte (5*S*,6*E*,9*R*)-konfigurierte Nonenolid [(5*S*,6*E*,9*R*)-**37**] besitzt ebenfalls einen negativen spezifischen Drehwert, während das (5*S*,6*E*,9*S*)-konfigurierte Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] einen positiven Drehwert aufweist. Damit reihen sich die Drehwerte dieser Verbindungen nahtlos in das Schema der bereits publizierten Daten ein (Tabelle 7). Kombiniert man die Erkenntnisse aus der Untersuchung der  $^{13}\text{C}$  NMR Daten, mit jenen aus dem Vergleich der

Synthese von Putaminoxin (37) und seinem (5*S*,6*E*,9*S*)-Diastereomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]  
Ergebnisse und Diskussion

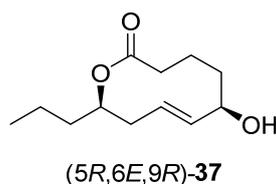
spezifischen Drehwerte, kommt man zu der Annahme, dass es sich bei dem ursprünglich isolierten Nonenolid um eine (5*R*,6*E*,9*R*)-konfigurierte Verbindung handeln muss.

**Tabelle 7:** Vergleich der spezifischen Drehwerte isolierter und synthetisierter Nonenolide.

Autor	Molekül	Spez. Drehwert
Evidente <i>et al.</i> <sup>[264]</sup>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9?)-37	$[\alpha]_D^{25} = -23.1$ (c = 1.6), CHCl <sub>3</sub>
Sabitha <i>et al.</i> <sup>[265]</sup>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-37	$[\alpha]_D^{25} = -25.2$ (c = 1.0), CHCl <sub>3</sub>
Diese Arbeit	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-37	$[\alpha]_D^{25} = -13.4$ (c = 0.7), CHCl <sub>3</sub>
Diese Arbeit	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-37	$[\alpha]_D^{25} = +22.3$ (c = 0.7), CHCl <sub>3</sub>
Bisterfeld und Holec <i>et al.</i> <sup>[285]</sup>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-38	$[\alpha]_D^{20} = -25.6$ (c = 1.0), CHCl <sub>3</sub>
Bisterfeld und Holec <i>et al.</i> <sup>[285]</sup>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )-38	$[\alpha]_D^{20} = +16.1$ (c = 1.0), CHCl <sub>3</sub>
Götz <i>et al.</i> <sup>[277]</sup>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-39	$[\alpha]_D^{25} = -29.0$ (c = 0.35), CHCl <sub>3</sub>
Fuchser und Zeeck <sup>[269]</sup>	(5 <i>R</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )-41	$[\alpha]_D^{25} = -43.8$ (c = 0.3), MeOH

Die Betrachtung von <sup>13</sup>C NMR Daten weiterer Nonenolide wie Stagonolid F (40) zeigte zusätzliche Unstimmigkeiten (siehe Anhang). Weiterhin erschien nach der Synthese von Sabitha *et al.* eine weitere Synthese von (5*S*,6*E*,9*R*)-Putaminoxin [(5*S*,6*E*,9*R*)-37] durch Kamal *et al.*<sup>[278]</sup> Für diese wurden jedoch keine analytischen Daten der Zielverbindung angegeben. Stattdessen erfolgte nur ein Verweis darauf, dass diese mit jenen vorangegangener Synthesen übereinstimmen. Diese Daten würden sich demnach im selben Maße nicht in Einklang mit den Daten der anderen Nonenolide bringen, wie jene von Sabitha *et al.*<sup>[265]</sup> Weitere Synthesen dieser Makrolaktone könnten demnach für mehr Klarheit bezüglich der Konfiguration dieser bioaktiven Moleküle sorgen. Dies ist vor allem deshalb relevant, da die Konfiguration des stereogenen Zentrums an Position 9 dieser Nonenolide einen erheblichen Einfluss auf die Phytotoxizität, aber auch auf antimikrobielle Eigenschaften haben kann.<sup>[280]</sup>

Anhand aller bisher zur Verfügung stehenden Daten wird für das ursprünglich isolierte Putaminoxin (37) eine (5*R*,6*E*,9*R*)-Konfiguration vorgeschlagen (Abbildung 83). Diese erklärt als einzige die Ähnlichkeit der <sup>13</sup>C NMR Daten zu jenen Nonenoliden welche (5*S*,6*E*,9*S*)- bzw. (5*R*,6*E*,9*R*)-konfiguriert sind und gleichzeitig den negativen Drehwert der Verbindung.



**Abbildung 83:** Vorgeschlagene Struktur für das ursprünglich isolierte und phytotoxische Nonenolid Putaminoxin (**37**), anhand des Vergleiches von  $^{13}\text{C}$  NMR Daten und spezifischen Drehwerten synthetisierter und isolierter Nonenolide.

### 4.3 Kurzzusammenfassung

Im Rahmen des dritten Projektes wurden die Grenzen des Substratfensters der Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobacter brockii* für die kinetische Racematspaltung von aliphatischen, linearen Homoallylalkoholen ausgetestet. Dabei wurde festgestellt, dass die Alkoholdehydrogenase in der Lage ist die Seitenketten des beinahe symmetrischen Homoallylalkohols Hept-1-en-4-ol (**26**) zu unterscheiden und somit einen Baustein für die stereoselektive Synthese von Putaminoxin (**37**) bereitzustellen. Die Unterscheidung ist jedoch nicht so absolut wie für die längeren Homoallylalkohole Oct-1-en-4-ol (**27**) und Non-1-en-4-ol (**11**), was zu verringerten Enantiomerenüberschüssen bei 50 % Umsatz führt. Für die Oxidation von Kettenlängen  $>\text{C-10}$  verlängert sich der Zeitraum bis zu einem Umsatz von 50 % erheblich, so dass die kinetische Racematspaltung mit Hilfe der ADH nur in einem beschränkten Fenster dieser Substrate sinnvoll ist. Nichtsdestotrotz konnten mit Hilfe des enantiomerenangereicherten Homoallylalkohols **26** die chemoenzymatische Synthese des phytotoxischen Naturstoffs Putaminoxin (**37**) erfolgen. Da in vorangegangenen Publikationen Unregelmäßigkeiten im  $^{13}\text{C}$  NMR der Stereoisomere von verwandten Nonenoliden festgestellt wurden, wurden sowohl das (5*S*,6*E*,9*R*)-Stereoisomer [(5*S*,6*E*,9*R*)-**37**] als auch das (5*S*,6*E*,9*S*)-Stereoisomer [(5*S*,6*E*,9*S*)-**37**] synthetisiert.<sup>[285]</sup>

Die anschließende Untersuchung der neu erhobenen NMR-Daten bestätigte das Bild der zuvor gemachten Beobachtungen von Bisterfeld und Holec *et al.*<sup>[285]</sup> Die Daten waren nicht konsistent mit denen vorheriger Synthesen von Putaminoxin (**37**), welches (5*S*,6*E*,9*R*)-konfiguriert sein soll. Anhand der NMR-Daten, der spezifischen Drehwerte und dem Abgleich dieser Werte mit den Daten anderer (5*S*,6*E*,9*R*)- und (5*S*,6*E*,9*S*)-, bzw. (5*R*,6*E*,9*R*)-konfigurierter Nonenolide, wurde ein neuer Strukturvorschlag für das ursprünglich isolierte, phytotoxische Macrolacton erstellt. Dieser sieht eine (5*R*,6*E*,9*R*)-Konfiguration vor, da diese alle Unterschiede in den Daten erklären würde.

#### 4.4 Short Summary

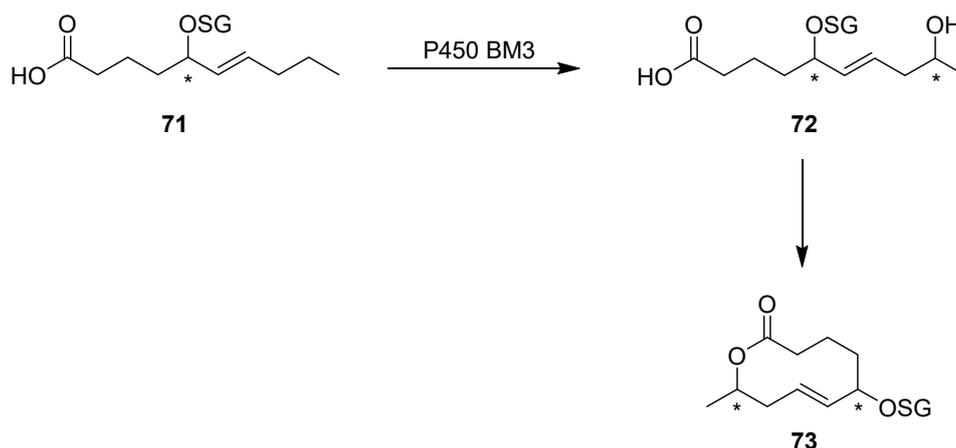
In the third project of this work the alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter brockii* was tested for its limits in the kinetic resolution of aliphatic, linear homoallylic alcohols with chainlengths from C-7 to C-12. It was shown that the dehydrogenase is capable of distinguishing between the side chains of the nearly symmetrical substrate Hept-1-en-4-ol (**26**) and therefore providing a building block for the chemoenzymatic synthesis of the phytotoxic nonenolide Putaminoxin (**37**). The distinction is not as good as for the longer aliphatic homoallylic alcohols like Oct-1-en-4-ol (**27**) and Non-1-en-4-ol (**11**) leading to a decreased enantiomeric excess at 50 % conversion. The oxidation of longer aliphatic homoallylic alcohols with chainlengths of >C-10 took much longer, making the kinetic resolution only feasible for the shorter chain homoallylic alcohols. Nevertheless, the chemoenzymatic synthesis of putaminoxin (**37**) could be completed employing the enantioenriched homoallylic alcohol **26**. Since a previous publication revealed inconsistencies in the <sup>13</sup>C NMR data of isolated and synthesized nonenolides, both (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** and its (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** diastereomer were synthesized.<sup>[285]</sup>

The following analysis of the <sup>13</sup>C NMR data confirmed the inconsistencies observed by Bisterfeld and Holec *et al.*<sup>[285]</sup> The newly acquired <sup>13</sup>C NMR data of (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** did not fit the previous data of putaminoxin (**37**), which is reportedly (5*S*,6*E*,9*R*)-configured as well. After a comprehensive comparison of the NMR data and the specific rotatory values of isolated and synthesized (5*S*,6*E*,9*R*)-, (5*S*,6*E*,9*S*)- and (5*R*,6*E*,9*R*)-configured nonenolides, a different configuration of putaminoxin (**37**) is proposed. According to the data a (5*R*,6*E*,9*R*)-configuration for putaminoxin (**37**) can explain the observed differences between the different nonenolides and is therefore suggested.

## 4.5 Ausblick

Um das Gesamtbild dieser phytotoxischen Nonenolide zu komplettieren wäre eine Totalsynthese des neuen Strukturvorschlags von Putaminoxin [(5*R*,6*E*,9*R*)-**37**] und seinem (5*R*,6*E*,9*S*)-Stereoisomer [(5*R*,6*E*,9*S*)-**37**] denkbar. Die Strukturdaten der (5*R*,6*E*,9*R*)-konfigurierten Verbindung [(5*R*,6*E*,9*R*)-**37**] müssten anschließend zu den erhobenen Daten für die ursprünglich von Evidente *et al.* isolierte Verbindung passen.<sup>[264]</sup> Dementsprechend wäre auch ein anschließender Test der Phytotoxizität dieser Verbindung erstrebenswert.

Alternativ zu den zwei beschriebenen Synthesestrategien könnte eine weitere chemoenzymatische Synthese der verwandten Nonenolide Aspinolid A (**41**) und Stagonolid F (**40**) erfolgen. Besonders die Synthese des Stagonolid F (**40**) wäre dabei von erhöhtem Interesse, da sich die bisher publizierten Daten dieser Verbindung nicht in Einklang mit denen der anderen Nonenolide bringen lassen (siehe Anhang). Für diese beiden Verbindungen wäre ein Ansatz mit Hilfe der P450 BM3 denkbar, da es sich prinzipiell um intramolekular veresterte, aliphatische Fettsäuren handelt. Für die intramolekulare Veresterung wird dabei die Hydroxygruppe in  $\omega$ -1 Position verwendet. Eine direkte Hydroxylierung dieser Position könnte ein vielversprechender Ansatz für die Verwendung von P450 BM3 sein. Dafür müsste vorab die Vorläuferverbindung **71** nach bekanntem Muster synthetisiert werden und im Anschluss eine selektive Hydroxylierung erfolgen (Abbildung 84). Problematisch könnte dabei allerdings die Hydroxygruppe in Position 5 sein, welche vorab mit einer geeigneten Schutzgruppe versehen werden müsste. Ein weiteres Produkt könnte außerdem durch eine Hydroxylierung in  $\omega$ -2 Position entstehen. Diese allylische Position ist gegenüber der homoallylischen Position aktiviert und die Hydroxylierung an dieser Position könnte demnach bevorzugt sein.



**Abbildung 84:** Mögliche Synthesestrategie für die Nonenolide Aspinolid A (**41**) oder Stagonolid F (**40**), mit Hilfe von regioselektiver Hydroxylierung von **71** mit P450 BM3 und anschließender intramolekularer Veresterung. SG = Schutzgruppe.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte

**Tabelle 8:** Allgemeine Laborgeräte des regelmäßigen Gebrauchs.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Pipetten</b>	
Pipette 0.1–2.5 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 1–10 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
10–100 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
0.5–5 mL	<i>Gilson</i> , Middleton, WI, USA
<b>Schüttler</b>	
Rotorschüttler für Kulturröhrchen	<i>BioCote</i> Ltd, Wolverhampton, UK
<i>TiMix</i> , Schüttler mit Inkubationshaube für Reaktionsplatten	<i>Edmund Bühler</i> GmbH, Hechingen, Deutschland
<i>MixMate PCB-11</i> , Schüttelblock für Multiterplatten	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Thermomixer compact</i> , beheizter Schüttelblock für 1.5–2 mL Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Unimax 1010</i> , Plattformschüttler für Flüssigkulturen; mit <i>Inkubator 1000</i> , Inkubationshaube	<i>Heidolph Instruments</i> GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
<i>Beleux MKR23</i> , Schüttelblock	<i>Hettich Benelux</i> B.V., Geldermalsen, Niederlande
<i>HT Multitron Standard</i> , Schüttelinkubator	<i>Infors HT</i> , Bottmingen, Schweiz
<i>VKS-75 control</i> , Plattformschüttler	<i>Edmund Bühler</i> GmbH, Hechingen, Deutschland
<b>Zentrifugen</b>	
<i>Optima L-80 XP</i> , Ultrazentrifuge	<i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA
<i>Type50.2TiRotor</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA
<i>Centrifuge 5424R</i> , Kühlzentrifuge mit Festwinkelrotor	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Centrifuge 5810R</i> , Kühlzentrifuge mit Festwinkelrotor	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf Concentrator 5301</i> , Vakuumzentrifuge	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Sorvall F10S-4x1000</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sorvall F9S</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA

*Sorvall RC6+*, gekühlte Standkühlzentrifuge *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA

---

### **Waagen**

*2004MP*, Ultrafeinwaage *Sartorius AG*, Göttingen, Deutschland

*LAI200S*, Feinwaage *Sartorius AG*, Göttingen, Deutschland

*MCI*, Laborwaage *Sartorius AG*, Göttingen, Deutschland

### **Photometer**

*Nano Drop 2000c*, Kleinvolumenphotometer *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA

*Shimadzu UV-1800*, kühlbares/beheizbares *Shimadzu*, Duisburg, Deutschland

Spektrophotometer (CPS-240A)

*Infinite M1000 Pro*, Mikrotiterplattenphotometer *Tecan GmbH*, Männedorf, Schweiz

### **Sonstiges**

*Sonorex RK 100 H*, Ultraschallbad *Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, Deutschland

*Biometra TProfessional Basic Gradient*, *Analytik Jena AG*, Jena, Deutschland

PCR-Cycler

*Mini Protean Tetra System*, Gel- *Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Deutschland

*Rotavapor R-205*, Rotationsverdampfer *Büchi Labortechnik GmbH*, Essen, Deutschland

*EOS 1000D*, Digitale Spiegelreflexkamera *Canon Deutschland GmbH*, Krefeld, Deutschland

*MR 3001 K*, Magnetrührer mit Heizplatte; *Heidolph Instruments GmbH & Co.KG*, Schwabach, Deutschland

Kontaktthermometer

*Sonopuls*, Ultraschall Zelldisruptor mit diversen *Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, Deutschland

Horngrößen (1.5–50 mL)

*HG3002LCD Typ 3458*, Heißluftgebläse für *Steinel Vertrieb GmbH*, Herzebrock-Clarholz, Deutschland

50-650 °C

---

## **5.2 Software**

Für die Visualisierung von Proteinstrukturen wurde das Programm *Chimera 1.13.1* verwendet und die Zeichnung von chemischen Strukturen und Reaktionsgleichungen wurde mit Hilfe von *ChemDraw Professional 16.0* umgesetzt. Die Bearbeitung und Auswertung von mathematischen Datensätzen erfolgte mit *Microsoft Excel 365* und *OriginPro 9.0G*. Die Erstellung und Bearbeitung von Bildern und Grafiken erfolgte mit *Microsoft Powerpoint 365* und für die Auswertung von NMR-Spektren wurde *MestReNova 8* genutzt. Für die Erstellung von Klonierungsstrategien wurde *CloneManager 9,0* verwendet und für das Erstellen von Textdokumenten *Microsoft Word 365*.

### 5.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien wurden von kommerziellen Herstellern erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Lösungsmittel für die Synthese wurden vorab mittels Destillation aufgereinigt. Für wasserfreie Synthesen wurden Lösungsmittel mittels gängiger Methoden getrocknet, sowie Glasgeräte und Magnetrührstäbchen vorab bei 120 °C ausgeheizt. Wasserfreies THF, Toluol und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wurde einem Lösungsmitteltrocknungssystem von *MBraun* entnommen. Die Entfernung von Lösungsmitteln erfolgte unter reduziertem Druck in Rotationsverdampfern der Firma *Büchi* oder *Heidolph*. Reaktionen unter Ausschluss von Sauerstoff fanden in Schlenkkolben oder Schlenkröhrchen unter Inertgasatmosphäre statt.

### 5.4 Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

#### 5.4.1 Verwendete Medien und Puffer

**Tabelle 9:** Verwendete Medien für mikro- und molekularbiologische Arbeiten.

Medium	Zusammensetzung	Zweck
LB-Medium ( <i>Luria-Bertani</i> ) <sup>[304]</sup>	10 g/L Trypton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt, mit NaOH auf pH 7 eingestellt	Kultivierung von <i>E. coli</i>
LB-Agar	LB-Medium + 2 % (w/v) Agar-Agar	Kultivierung von <i>E. coli</i>
TB-Medium ( <i>Terrific-Broth</i> )	50.8 g/L <i>Terrific-Broth</i> -Fertigmedium ( <i>Roth</i> ), 0.04 % (v/v) Glycerin	Proteinexpression in <i>E. coli</i>
Y <sub>D</sub> -Medium ( <i>Yeast-Peptide-Dextrose</i> )	20 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Glucose (steril filtriert)	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>
Y <sub>Gal</sub> -Medium ( <i>Yeast-Peptide-Galactose</i> )	20 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 40 g/L Galactose (steril filtriert)	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>
Y <sub>Raf</sub> -Medium ( <i>Yeast-Peptide-Raffinose</i> )	20 g/L Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Raffinose (steril filtriert)	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 9

SC-Medium -Ura ( <i>Synthetic-Complete</i> ohne Uracil)	1.675 g/L Hefe-Stickstoff-Basismedium ( <i>Roth</i> ), 5 g Glucose oder Raffinose, 192.5 mg/L <i>Complete-Supplement-Medium -Ura (Formedium)</i>	Selektionsmedium für <i>S. cerevisiae</i>
SC-Agar	SC-Medium + 2 % (w/v) Agar-Agar	Selektionsmedium für <i>S. cerevisiae</i>
Glycerol-Medium	3 % (v/v) Glycerol, 2,5g/L Pepton, 1g/L NaCl, 1.5 g/L Fleischextrakt	Kultivierung von <i>R. solani</i>
Kartoffel-Glucose-Medium	26.5 g/L Kartoffel-Extrakt Glukose Bouillon ( <i>Roth</i> )	Kultivierung von <i>R. solani</i>
Erbsen-Medium (Myasoedova 2017)	165 mg/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 200 mg/L KH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20 mg/L K <sub>2</sub> HSO <sub>4</sub> , 67 mg/L MgSO <sub>4</sub> -Hydrat, 2.5 g/L Erbsenmehl	Laccaseexpression in <i>R. solani</i>

**Tabelle 10:** Verwendete Puffer für mikro- und molekularbiologische Arbeiten, sowie enzymkatalysierte Reaktionen.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Zweck</b>
Tris-HCl-Puffer (x Mol)	Trizma-Base (x Mol), mit HCl auf entsprechenden pH eingestellt	Puffersystem für Enzymreaktionen
KP <sub>i</sub> -Puffer (x Mol)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (x Mol), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (x Mol), vereinigt und auf entsprechenden pH eingestellt	Puffersystem für Enzymreaktionen
BM3-Puffer	50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer (pH 8.0), 50 mM Tris-HCl- Puffer (pH 8.0), 250 mM KCl	Zusatzpuffer für P450 BM3 katalysierte Reaktionen
TE-Puffer (Tris-EDTA)	10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.0), 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 10

Natrium-Acetat-Puffer (pH 5.0)	20 mM Natriumacetat, mit Essigsäure auf pH 5.0 eingestellt	azides Puffersystem für Laccasereaktion
Glycin-NaOH-Puffer (pH 9.0)	50 mM Glycin, mit NaOH auf pH 9.0 eingestellt	alkalisches Puffersystem für Laccasereaktion
Britton-Robinson-Puffer (pH 3-9)	40 mM Essigsäure, 40 mM Borsäure, 40 mM Phosphorsäure, mit 0,2 M NaOH-Lösung auf entsprechenden pH eingestellt	Puffersystem für Laccasereaktionen

---

---

#### 5.4.2 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für Flüssigkulturen

Für die Kultivierung von Bakterien und Hefen wurden ausschließlich autoklavierte Puffer und Medien eingesetzt. Für diesen Zweck wurden diese vorab bei 120 °C und 200 kPa für 20 min autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben, Fermbachkolben und Kulturröhrchen, welche ebenfalls vorab bei 120 °C sterilisiert wurden. Diese wurden mit 20 % des maximalen Volumens mit Medium befüllt. Antibiotika wurden den Medien kurz vor dem Einsatz unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. Medien, Reagenzien und Zusätze, welche nicht stabil gegenüber dem Autoklaviervorgang sind, wurden über Sterilfilter mit einer Porengröße von 0.22 µm steril filtriert. Die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen erfolgte nach Animpfen von einer Agarplatte bei 37 °C, in LB-Medium, für 12-14 h. Die Anzucht von *S. cerevisiae* in Flüssigkulturen erfolgte nach Animpfen von einer Agarplatte bei 30 °C, in YPD-Medium, für 1-3 Tage.

Für die generelle Anzucht von *R. solani* F-895 in Flüssigkulturen wurden von einer Agarplatte (bereitgestellt von den Kooperationspartnern der AG Golovleva, Russian Academy of Science) 100 mL Glycerol-Medium oder Kartoffel-Glucose-Medium mit den Sporen angeimpft. Nach 3-4 Tagen bei 30 °C und 110 rpm bildete sich festes Mycel am Gefäßrand und ballförmiges Mycel im Medium. Eine sterile 5 mL Pipettenspitze wurde mit einer Schere abgeschnitten, um die Öffnung zu vergrößern und anschließend ein Mycelball aufgesaugt und in einen neuen Kolben mit 100 mL Medium überführt. Dort wurde *R. solani* F-895 bei 30 °C und 110 rpm für weitere 3-6 Tage kultiviert.

#### 5.4.3 Allgemeine Anzucht auf Agarplatten

Agarplatten wurden jeweils mit ~100 µL Zellkultur von *E. coli* oder *S. cerevisiae* beträufelt. Diese wurden im Anschluss mit sterilen Glaskugeln (ø 3 mm) oder einer sterilen Pipettenspitze gleichmäßig auf der Platte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C (*E. coli*) oder über drei Nächte bei 30 °C (*S. cerevisiae*) inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Einzelne Kulturen wurden bei Bedarf mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und in Flüssigkulturen überführt.

#### 5.4.4 Verwendete Stämme

Mikrobiologische Arbeiten wurden in den Hostorganismen *E. coli* und *S. cerevisiae* durchgeführt.

**Tabelle 11:** Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle	Zweck
Mach 1	F <sup>-</sup> $\Delta lacX74$ $hsdR(r_k^- m_k^+)$ $\Delta rec1398$ $endA1$ $tonA$	<i>Invitrogen</i>	Klonierung, DNA-Amplifikation
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> $dcm$ $ompT$ $hsdS(r_B^- m_B^-)$ $gal$ $\lambda$ (DE3)	<i>Stratagene</i>	Protein-Expression
Rosetta (DE3)	F <sup>-</sup> $dcm$ $ompT$ $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ $gal$ $\lambda$ (DE3) pRARE(Cam <sup>R</sup> )	<i>Novagen</i>	Heterologe Expression mit Supplementierung seltener tRNA
Arctic Express (DE3)	F <sup>-</sup> $dcm$ $ompT$ $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ Tet <sup>r</sup> $gal$ $\lambda$ (DE3) $endA$ The[cpn10 cpn60 Gent <sup>r</sup> ]	<i>Agilent</i>	Heterologe Expression unlöslicher Proteine mit Hilfe von Chaperonen

**Tabelle 12:** Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle	Zweck
BY4741 (Y00000)	<i>MATa</i> $his3D1$ $leu2D0$ $met15D0$ $ura3D0$	Peter Kusen <sup>a</sup> gemäß Brachmann <i>et al.</i> <sup>[131]</sup>	Expression mit Möglichkeit zur Sekretion

<sup>a</sup> Institut für bioorganische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

#### 5.4.5 Verwendete Plasmide

Für die Transformation von Hostorganismen wurden jeweils zirkuläre DNA Vektoren (Plasmide) eingesetzt. Diese beinhalten die jeweilige Sequenz für das gewünschte Polypeptid mit einem vorgeschalteten Promotor, als auch einen Replikationsursprung und einen oder mehrere Selektionsmarker.

**Tabelle 13:** Im Rahmen der Arbeit eingesetzte Plasmide.

Plasmid	Promotor	Selektionsmarker	Zielenzym(e)	Quelle
pET21b (+)	T7	<i>AmpR</i>	FDH*	Claudia Holec <sup>a</sup>
pET28a (+)	T7	<i>KanR</i>	P450 BM3	Claudia Holec <sup>a</sup> , diese Arbeit
pBADHisA	Ara	<i>AmpR</i>	PTDH	<i>ThermoFisher</i>
pCOLADuet-1	T7	<i>KanR</i>	RSL, RSL F-895	<i>GenScript</i> , diese Arbeit
pMal-c5x	T7	<i>AmpR</i>	MalE-RSL F-895	<i>New England Biolabs</i> , diese Arbeit
pIE3	Gal	<i>AmpR, Ura3</i>	RFP, RSL F-895	Peter Kusen <sup>a</sup> , diese Arbeit

<sup>a</sup> Institut für bioorganische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Von den Enzymen P450 BM3 und RSL F-895 wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Varianten erzeugt. Alle Varianten von P450 BM3 wurden dabei auf dem Plasmid pET28a (+) generiert (Tabelle 14), während alle Varianten von RSL F-895 auf pIE3 generiert wurden (Tabelle 15).

**Tabelle 14:** In dieser Arbeit erzeugte und verwendete Varianten von P450 BM3 auf dem Plasmid pET28a (+).

Nr.	Variante(n)	Erzeugung	Quelle
1	WT BB		Claudia Holec <sup>a</sup>
2	A74G		Claudia Holec <sup>a</sup>
3	L188Q		Claudia Holec <sup>a</sup>
4	A74G L188Q		Claudia Holec <sup>a</sup>
5	A74G L188Q BB	a	diese Arbeit
6	A74G F87V		Claudia Holec <sup>a</sup>
7	F87V L188Q		Claudia Holec <sup>a</sup>
8	A74G F87V L188Q		Claudia Holec <sup>a</sup>
9-20	A328D,F,G,H,I,K,L,N,R,S,V,Y		Claudia Holec <sup>a</sup>

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 14

21-33	F87A A328D,F,G,H,I,K,L,N,R,S,V,Y,C		Claudia Holec <sup>a</sup>
34-45	F87A,C,D,G,H,I,L,V,N,R,S,Y		Claudia Holec <sup>a</sup>
46	F87A L188C		Claudia Holec <sup>a</sup>
47-51	L75 K,H,Q,N,T BB	b	diese Arbeit
52-56	L181 K,H,Q,N,T BB	b	diese Arbeit
57-60	I263 K,H,N,T BB	c	diese Arbeit
61-64	A74G L75K,H,Q,N L188Q BB	d	diese Arbeit
65-69	A74G L181K,H,Q,N,T L188Q BB	d	diese Arbeit
70-74	A74G L188Q I263K,H,Q,N,T BB	e	diese Arbeit

a) Plasmid A74G L188Q und WT BB mit *NcoI* und *Pfl23II* geschnitten und Insert aus A74G L188Q in WT BB kloniert. b) *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR mit WT BB und Subklonierung in WT BB mit *NcoI*, *Pfl23II*. c) *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR mit WT BB und Subklonierung in WT BB mit *Bsu36I*, *BamHI*. d) *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR mit A74G L188Q und Subklonierung in WT BB mit *NcoI*, *Pfl23II*. e) *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR mit WT BB und Subklonierung in A74G L188Q BB mit *Bsu36I*, *BamHI*. BB = enthält *Bsu36I* und *BamHI* Schnittstelle.

<sup>a</sup> Institut für bioorganische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

**Tabelle 15:** In dieser Arbeit erzeugte und verwendete Varianten von RSL F-895 auf dem Plasmid pIE3.

Nr.	Variante(n)	Erzeugung	Quelle
75	RSL F-895	a	diese Arbeit
76	MF $\alpha$ RSL F-895	b	diese Arbeit
77	MF $\alpha$ RSL F-895 Linker	c	diese Arbeit
78	MF $\alpha$ RSL F-895 LinkStrep	d	diese Arbeit

a) über PCR mit pCOLA RSL F-895 entsprechende Restriktionsschnittstelle eingefügt, mit *NotI* und *XhoI* in pIE3 RFP kloniert. b) über PCR mit pCOLA RSL F-895 entsprechende Restriktionsschnittstelle eingefügt, mit *SacII* und *XhoI* in pIE3 RFP kloniert. c) PCR mit pIE3 MF $\alpha$  RSL F-895, mit *SacII* und *XhoI* in pIE3 MF $\alpha$  RSL F-895 kloniert. d) PCR mit pIE3 MF $\alpha$  RSL F-895 Linker, mit *SacII* und *XhoI* in pIE3 MF $\alpha$  RSL F-895 kloniert.

### 5.4.6 Verwendete Primer

Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden als Lyophilisat von der Firma *Sigma-Aldrich* bezogen und vor der Nutzung gemäß den Herstellerangaben mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt (Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Primer.

Nr.	Name	5' → 3' Sequenz	Zweck
1	pACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	Sequenzierung pACYC
2	pACYCDuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA	Sequenzierung pACYC
3	P450_BM3_L75K_fw	TTAAGTCAAGCGAAAAAATTTGTA CGTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→K
4	P450_BM3_L75K_rv	ATCACGTACAAATTTTTTCGCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→K
5	P450_BM3_L75H_fw	TTAAGTCAAGCGCATAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→H
6	P450_BM3_L75H_rv	ATCACGTACAAATTTATGCGCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→H
7	P450_BM3_L75Q_fw	TTAAGTCAAGCGCAGAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→Q
8	P450_BM3_L75Q_rv	ATCACGTACAAATTTCTGCGCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→Q
9	P450_BM3_L75N_fw	TTAAGTCAAGCGAACAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→N
10	P450_BM3_L75N_rv	ATCACGTACAAATTTGTTTCGCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→N
11	P450_BM3_L75T_fw	TTAAGTCAAGCGACCAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→T
12	P450_BM3_L75T_rv	ATCACGTACAAATTTGGTCGCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L75→T

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 16

13	P450_BM3_L181K_fw	TATGGTCCGTGCAAAAGATGAAGC AATGAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→K
14	P450_BM3_L181K_rv	TTCATTGCTTCATCTTTTGCACGGA CCATA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→K
15	P450_BM3_L181H_fw	TATGGTCCGTGCACATGATGAAGC AATGAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→H
16	P450_BM3_L181H_rv	TTCATTGCTTCATCATGTGCACGGA CCATA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→H
17	P450_BM3_L181Q_fw	TATGGTCCGTGCACAGGATGAAGC AATGAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→Q
18	P450_BM3_L181Q_rv	TTCATTGCTTCATCCTGTGCACGGA CCATA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→Q
19	P450_BM3_L181N_fw	TATGGTCCGTGCAAACGATGAAGC AATGAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→N
20	P450_BM3_L181N_rv	TTCATTGCTTCATCGTTTGCACGGA CCATA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→N
21	P450_BM3_L181T_fw	TATGGTCCGTGCAACCGATGAAGC AATGAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→T
22	P450_BM3_L181T_rv	TTCATTGCTTCATCGGTTGCACGGA CCATA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 L181→T
23	P450_BM3_I263K_fw	ATTACATTCTTAAAAGCGGGACAC GAAACAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→K
24	P450_BM3_I263K_rv	TTGTTTCGTGTCCCGCTTTTAAGAA TGTAAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→K
25	P450_BM3_I263H_fw	ATTACATTCTTACATGCGGGACACG AAACAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→H
26	P450_BM3_I263H_rv	TTGTTTCGTGTCCCGCATGTAAGAA TGTAAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→H

Fortsetzung nächste Seite

Material und Methoden  
Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Fortsetzung Tabelle 16

27	P450_BM3_I263Q_fw	ATTACATTCTTACAGGCGGGACACG AAACAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→Q
28	P450_BM3_I263Q_rv	TTGTTTCGTGTCCCGCCTGTAAGAA TGTAAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→Q
29	P450_BM3_I263N_fw	ATTACATTCTTAAACGCGGGACACG AAACAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→N
30	P450_BM3_I263N_rv	TTGTTTCGTGTCCCGCGTTTAAGAA TGTAAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→N
31	P450_BM3_I263T_fw	ATTACATTCTTAACCGCGGGACACG AAACAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→T
32	P450_BM3_I263T_rv	TTGTTTCGTGTCCCGCGGTTAAGAA TGTAAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 I263→T
33	P450_BM3(GQ)_L75K _fw	TTAAGTCAAGGCAAAAAATTTGTA CGTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→K
34	P450_BM3(GQ)_L75K _rev	ATCACGTACAAATTTTTGCCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→K
35	P450_BM3(GQ)_L75H _fw	TTAAGTCAAGGCCATAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→H
36	P450_BM3(GQ)_L75H _rev	ATCACGTACAAATTTATGGCCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→H
37	P450_BM3(GQ)_L75Q _fw	TTAAGTCAAGGCCAGAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→Q
38	P450_BM3(GQ)_L75Q _rev	ATCACGTACAAATTTCTGGCCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→Q
39	P450_BM3(GQ)_L75N _fw	TTAAGTCAAGGCAACAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→N
40	P450_BM3(GQ)_L75N _rev	ATCACGTACAAATTTGTTGCCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→N

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 16

41	P450_BM3(GQ)_L75T_ fw	TTAAGTCAAGGCACCAAATTTGTAC GTGAT	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→T
42	P450_BM3(GQ)_L75T_ rev	ATCACGTACAAATTTGGTGCCTTGA CTTAA	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> P450 BM3 GQ L75→T
43	P450_BM3_Seq744	GCCGCTTGATGACGAGAAC	Sequenzierung pET28a(+)
44	pMal seq fw	ATGTCCGCTTTCTGGTATGCCGT	Sequenzierung pMal
45	pMal seq rev	ACTCAGGAGAGCGTTCACC	Sequenzierung pMal
46	DD_Gibson_RSL F- 895_DEL_SP_fw	GATATACCATGGCCGTCCGCGACTA CCAGTTCATCATCAAG	Entfernung Signalsequenz RSL F-895+SP, <i>QuikChange</i> <sup>®</sup> PCR zum korrigieren von MF $\alpha$ RSL F-895 LinkStrep
47	DD_Gibson_RSL F- 895_DEL_SP_rev	GCTGCCCATGGTTACTTTTCAA ACTGCGGGTG	Entfernung Signalsequenz RSL F-895+SP
48	RSL_F895_r- pIE3_MFa_fw	AGAGCGGCCGCGGACATGGCCGTC CGCGACTAC	Einfügen von Schnittstellen für Einbringen von RSL F-895 in piE3 RFP
49	RSL_F895_r- pIE3_Mfa_rev	ATGCGGCCGCGACTCGAGTATGAT GGTGATGGCTGCTGCCCATGGTT	Einfügen von Schnittstellen für Einbringen von RSL F-895 in piE3 RFP
50	pYES263 seq fw	CGTCAAGGAGAAAAACCCCGGA	Sequenzierung pIE3
51	pIE3_pro_Ter_fw	CATTATCGCTTCTCCGGGC	Sequenzierung pIE3
52	pIE3_pro_Ter_rev	GCTTCCGGCTCCTATGTTG	Sequenzierung pIE3

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 16

53	pIE3_MCS_rev	GAATGTAAGTGCGGGAGG	Sequenzierung pIE3, PCR zum Einfügen der Linkersequenz in MF $\alpha$ RSL F-895  Einfügen Linkersequenz in MF $\alpha$ RSL F-895,
54	pIE3_Mfa_RSL_F895- SP_Linker	GCGGCCGCGGAAGCTGAAGCTGCC GTCCGCGACTACCAGTTCATC	PCR zum Einfügen des <i>Strep</i> -Tags in MF $\alpha$ RSL F-895
55	RSL_F895-SP_StrepTag	CTCGAGTTACTTCTCGAATTGTGGA TGAGACCATGCTGCTGCCTTTTCAA ACTGCGGGTGGCTCCACTGCAA	Einfügen <i>Strep</i> -Tag in MF $\alpha$ RSL F-895 Linker
56	pIE3_RSL_F895- SP_Strep_seq_rev	TCGAGAAGTAACTCGAG	Sequenzierung pIE3
57	RSL_F895- SP_StrepTag_fw	TTGCAGTGGAGCCACCCGCAGTTTG AAAAGGCAGCAGCATGGTCTCATC CACAATTCGAGAAGTAACTC	<i>QuikChange</i> <sup>®</sup> PCR zur Korrektur von zwei Deletionen
58	T7_fw	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung T7 Promotor

#### 5.4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Generierung der unterschiedlichen Varianten von P450 BM3 und RSL F-895 wurden sowohl die klassische PCR als auch die *QuikChange*<sup>™</sup> PCR eingesetzt. Klassische PCR wurde dabei zur Einfügung von Restriktionsschnittstellen und zur Amplifikation von Genabschnitten eingesetzt, während die *QuikChange*<sup>™</sup> PCR zum gezielten Basenaustausch eingesetzt wurde. Als Polymerase diente ausschließlich die *Phusion*<sup>™</sup>-Polymerase der Firma *Thermo Scientific*. Nach Erhalt eines neuen Primers wurde jeweils eine Gradienten PCR durchgeführt, um die optimale Anlagerungstemperatur zu ermitteln. Dabei wurden die Grenzen des jeweiligen Temperaturgradienten so gewählt, dass sie ca. 5 °C oberhalb und unterhalb der vorhergesagten Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Primer lagen. Hatten beide Primer eine größere Diskrepanz bei der Schmelztemperatur wurden die Grenzen entsprechend weiter gesteckt, dieser Fall wurde aber beim Design des Primerpaares möglichst vermieden. Für den Fall das mehrere PCR-Ansätze mit gleichen Komponenten durchgeführt wurden, wurde vorab ein Mastermix

hergestellt und im Anschluss auf einzelne Ansätze aufgeteilt. Der Erfolg einer jeden PCR wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### 5.4.8 Klassische PCR

Für die klassische PCR wurden zwei Primer genutzt, welche den betreffenden Genbereich flankieren. Einer der Primer (häufig mit *fw* oder *for* Endung im Namen) ist dabei in Richtung des betreffenden Genabschnittes orientiert, während der zweite Primer (häufig *rev* Endung im Namen) entgegengesetzt orientiert ist. Für Sequenzierungen und Amplifikationen sind die Primer dabei vollständig komplementär zur *Template*-DNA gewählt worden. Sollte eine Restriktionsschnittstelle eingefügt, oder ein kurzer Genabschnitt angefügt werden, enthielt einer der beiden Primer die notwendige Information.

**Tabelle 17:** In Rahmen der Arbeit verwendetes Pipettierschema und Temperaturprogramm für die klassische PCR.

Pipettierschema		Temperaturprogramm			
Komponente	Volumen	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
GC-Puffer (5x)	5 µL	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
dNTPs (10 mM)	0.5 µL	Denaturierung	98 °C	10 s	
Primer_fw (10 µM)	0.5 µL	Anlagerung (Primerabhängig)	+/- 5 °C, T <sub>M</sub>	30 s	30
Primer_rev (10 µM)	0.5 µL	Elongation	72 °C	45 s	
Template-DNA (30- 100 ng/µL)	0.5 µL	Finale Elongation	72 °C	10 min	
<i>Phusion</i> <sup>TM</sup> - Polymerase	0.25 µL				
ddH <sub>2</sub> O	12.75 µL				

### 5.4.9 *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR

Zur gezielten Einführung von Punktmutationen wurde jeweils ein Zweistufiges *QuikChange*<sup>TM</sup> Protokoll durchgeführt. In der ersten Stufe wurden dabei Ansätze mit Vorwärtsprimer und Ansätze mit Rückwärtsprimer getrennt voneinander behandelt, bevor sie im zweiten Schritt miteinander vereinigt wurden. Für die *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR wurden dafür jeweils komplementäre Primerpaare entworfen, welche in der Mitte ihrer Sequenz die Information für den Nukleotidaustausch enthielten. Im Gegensatz zur klassischen PCR wird in der *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR das gesamte Plasmid amplifiziert (Abbildung 65).

Material und Methoden  
Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

**Tabelle 18:** In Rahmen der Arbeit verwendetes Pipettierschema und Temperaturprogramm für die *QuikChange™* PCR.

Pipettierschema			Temperaturprogramm			
Komponente	Volumen		Schritt 1: Ansatz 1 und 2 getrennt			
	Ansatz 1	Ansatz 2	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
GC-Puffer (5x)	5 µL	5 µL	Initiale Denaturierung	98 °C	60 s	
dNTPs (10 mM)	0.5 µL	0.5 µL	Denaturierung	98 °C	30 s	
Primer_fw (10 µM)	0.5 µL	-	Anlagerung (Primerabhängig)	+/- 5 °C, T <sub>M</sub>	45 s	30
Primer_rev (10 µM)	-	0.5 µL	Elongation	72 °C	4.2 min*	
Template-DNA (30-100 ng/µL)	0.5 µL	0.5 µL	Finale Elongation	72 °C	10 min*	
<i>Phusion™</i> - Polymerase	0.25 µL	0.25 µL	Schritt 2: Ansatz 1 und 2 vereinigt			
ddH <sub>2</sub> O	18.25 µL	18.25 µL	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
			Denaturierung	98 °C	30 s	30
			Anlagerung (Primerabhängig)	+/- 5 °C, T <sub>M</sub>	30 s	
			Elongation	72 °C	4.2 min*	
			Finale Elongation	72 °C	10 min*	

\* die Elongationsdauer richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Plasmides und der Geschwindigkeit der Polymerase (*Phusion*-Polymerase = 2 kb/min). Die Polymerase bekommt genug Zeit für 80% des Plasmides in Elongation und 120 % des Plasmides in finaler Elongation.

#### 5.4.10 *DpnI*-Verdau

Im Anschluss an eine *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR wurde jeweils ein Verdau der methylierten Template-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym *DpnI* vorgenommen, damit ausschließlich Plasmid-DNA mit der erwünschten Mutation intakt bleibt. Dafür wurden 14 µL des PCR-Produktes mit 2 µL *DpnI* versetzt und für 14-16 h bei 37 °C inkubiert. 10 µL dieses Ansatzes wurden im Anschluss für die Transformation von *E. coli* eingesetzt, welche auf Selektivagarplatten auf die erfolgreiche Transformation untersucht wurden.

#### 5.4.11 Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische und präparative Trennung von DNA-Molekülen wurde jeweils eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese trennt die Moleküle gemäß ihrer Größe, indem die Wanderstrecke der Moleküle durch ein Agarose-Gel, in einem elektrischen Feld untersucht wird. Die Größe der Moleküle korreliert dabei mit der Wanderstrecke und kann anhand eines beigefügten Standards quantifiziert werden. Dafür wurde vorab ein 1 %-iges Agarose-Gel (w/v) aus Agarose in TE-Puffer erzeugt. Diese Mischung wurde dazu einmal aufgekocht, um die Agarose zu lösen und im Anschluss bei 60 °C gelagert. Agarose-Gele wurden sofort vor Verwendung frisch gegossen und mit 0.1 % Ethidiumbromid oder *MidoriGreen*<sup>TM</sup> (*NipponGenetics*) versetzt. Die Polymerisation fand durch Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur statt. Als DNA-Größenstandard diente die *1 kb DNA Ladder* der Firma *Fermentas*. Von dieser wurden jeweils 4 µL in eine der Taschen des Gels gegeben. Vor dem Auftragen von DNA-Proben wurden diese mit 20 % ihres Volumens an DNA-Probenpuffer (5x) versetzt, und die elektrophoretische Auftrennung wurde anschließend für 35 min bei 180 V in TAE-Puffer (1x) durchgeführt (Tabelle 19). Die Visualisierung der Banden fand mit Hilfe von UV-Licht statt und bei Bedarf mit Hilfe eines Skalpells dem Gel entnommen. Die Elution der DNA aus dem Gelstück fand wiederum mit Hilfe des *innuPrep DNA-Mini Kits* der Firma *Analytik Jena* statt. Die Elution erfolgte dabei als einziges nicht nach Herstellerangaben, sondern mit ddH<sub>2</sub>O.

**Tabelle 19:** In der Arbeit verwendete Puffer für die elektrophoretische Auftrennung von DNA.

Puffer	Zusammensetzung
5x DNA-Probenpuffer	0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 40 % (v/v) Glycerol
10x TAE-Puffer-Stammlösung	0.4 mM Tris, 10 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8 eingestellt

#### 5.4.12 Restriktion von DNA-Molekülen

Für die Restriktion von DNA (mit Ausnahme von *DpnI*) wurden Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffersysteme der Firma *ThermoFisher Scientific* in einer Ansatzgröße von 20 µL eingesetzt. In seltenen Fällen, in denen eine größere Menge geschnittener DNA benötigt wurde, wurden

die Ansätze bis zu einem Maßstab von 60 µL hochskaliert. Die Restriktion von DNA fand nach Herstellerangaben statt. Für die Kombination von zwei Restriktionsenzymen in einem Ansatz wurde der Online-Service *DoubleDigest Calculator* der Firma *ThermoFisher Scientific* genutzt, um das ideale Puffersystem und die idealen Verhältnisse an Restriktionsenzymen zu ermitteln. Jeweils ein Beispiel für eine Standardrestriktion zweier kompatibler Restriktionsenzyme und ein Beispiel zweier inkompatibler Restriktionsenzyme ist in Tabelle 20 angegeben. Wurde nur ein Restriktionsenzym eingesetzt, fand im Anschluss an die Restriktion eine Behandlung mit thermosensitiver Alkaliner Phosphatase (FastAP) statt, um eine Religation der linearen Plasmid-DNA zu unterbinden.

**Tabelle 20:** Standardrestriktionsansatz zweier kompatibler Restriktionsenzyme und Ansatz zweier inkompatibler Restriktionsenzyme, in Anlehnung an die jeweiligen Vorschriften des *DoubleDigest Calculator* von *ThermoFisher Scientific*.

Standardansatz kompatibler Enzyme			Beispielansatz inkompatibler Enzyme		
Komponente	Menge	Durchführung	Komponente	Menge	Durchführung
Plasmid-DNA (ca. 30-100 ng/µL)	10 µL		Plasmid-DNA (ca. 30-100 ng/µL)	10 µL	1 h, 37 °C
Tango-Puffer (10x)	2 µL	3 h, 37 °C →	Puffer G (10x)	2 µL	(nur <i>XhoI</i> ), Zugabe von
<i>Bsu36I</i>	1 µL	20 min, 80 °C	<i>NotI</i>	4 µL	<i>NotI</i> , 1 h, 37 °C
<i>Pfl23II</i>	1 µL		<i>XhoI</i>	2 µL	→ 20 min, 80 °C
ddH <sub>2</sub> O	6 µL		ddH <sub>2</sub> O	6 µL	

#### 5.4.13 Dephosphorylierung linearer Plasmid-DNA

Zur Verhinderung von Religation linearer Plasmid-DNA, welche mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten worden ist, wurde die thermosensitive Alkaline Phosphatase von *ThermoFisher Scientific* eingesetzt. Dafür wurde im Anschluss an die Restriktion 1 µL FastAP zum Restriktionsansatz gegeben und der Ansatz für 20 min bei 37 °C inkubiert. Zur Deaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz anschließend für 5 min bei 75 °C erhitzt.

#### 5.4.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA und Insert-DNA, wurde die T4 DNA-Ligase (*ThermoFisher Scientific, NewEngland Biolabs*) mit zugehörigem Puffer eingesetzt. Dazu wurden die zugehörigen Komponenten auf Eis pipettiert. Für die spätere Transformation wurden 10 µL des Ansatzes auf kompetente *E. coli* gegeben.

**Tabelle 21:** Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Komponente	Menge	Durchführung
Insert-DNA	12 µL	
linearisierte Vektor-DNA	6 µL	16 °C, 16 h
T4 DNA-Ligase	0.2 µL	
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	2 µL	

#### 5.4.15 Subklonierung

Da bei der Amplifikation des gesamten Plasmides im Rahmen einer *QuikChange*<sup>TM</sup> PCR mit der *Phusion*-Polymerase Fehler auftreten können, wurde der gewünschte Genabschnitt, im Anschluss an die Isolation des neuen Plasmides aus den transformierten *E. coli*, mit Hilfe von geeigneten Restriktionsenzymen ausgeschnitten. Das Insert wurde im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert und in das ursprüngliche Plasmid (vor PCR) zurück inseriert. Dieses wurde dafür vorab mit denselben Restriktionsenzymen behandelt und mittels Agarose-Gelelektrophorese vom ursprünglichen Insert getrennt. Die Ligation des neuen Inserts mit dem ursprünglichen Plasmid ergab das neue Plasmid mit der erwünschten Punktmutation, womit *E. coli* erneut transformiert wurde.

#### 5.4.16 Sequenzierung

Erfolgreiche Klonierungen und die Einführungen von Mutationen wurden mittels DNA-Sequenzierung verifiziert. Dies geschah als Service (*SurpremeRun*) durch die Firma *GATC Biotech* bzw. *Eurofins*. Dafür wurden der Firma 20 µL DNA-Probe mit einer Konzentration von 30-100 ng/µL zugesendet. War für die Sequenzierung ein Primer notwendig, welcher nicht durch *GATC Biotech/Eurofins* bereitgestellt werden konnte, wurde zusätzlich der benötigte Primer (Tabelle 16) in einer Konzentration von 10 pmol/µL mitversandt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mittels *CloneManager*.

#### 5.4.17 Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Amplifikation und Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden sterile Kulturröhrchen mit 5 mL LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum versehen. Das Medium wurde mit einer einzelnen Kultur von einer Agarplatte inokuliert und bei 37 °C für mindestens 20 h geschüttelt. Im Anschluss fand die Isolation der Plasmid-DNA mit Hilfe des *innuPrep Plasmid Mini Kit* der Firma *Analytik Jena* gemäß der Herstellervorgaben statt. Die DNA wurde jedoch mit sterilem H<sub>2</sub>O statt der Elutionslösung von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA mit Hilfe einer Absorptionsmessung auf dem *Nanodrop 2000c* von *Thermo Scientific* ermittelt und die DNA für die spätere Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **5.4.18 Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden sterile Kulturröhrchen mit 5 mL Dropout-Minimalmedium versehen. Das Medium wurde mit einer einzelnen Kultur von einer Agarplatte inokuliert und bei 30 °C für mindestens 48 h geschüttelt. Im Anschluss fand die Isolation der Plasmid-DNA mit Hilfe des *Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kit* der Firma *Zymo Research* gemäß der Herstellervorgaben statt. Die DNA wurde jedoch mit sterilem H<sub>2</sub>O statt der Elutionslösung von der Säule eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA mit Hilfe einer Absorptionmessung auf dem *Nanodrop 2000c* von *Thermo Scientific* ermittelt und die DNA für die spätere Verwendung bei –20 °C gelagert.

#### **5.4.19 Isolation genomischer DNA aus *R. solani* F-895**

Für die Isolation genomischer DNA aus *R. solani* wurde der Pilz für 4 Tage bei 30 °C in Kartoffel-Glukose-Medium angezogen und das Mycel mittels Zentrifugation geerntet (12000 rpm, 8 min). Anschließend wurden ca. 100 mg des Mycels in einem 2 mL Eppendorf-Gefäß vorgelegt und mit Glasperlen versehen. Das Mycel mit den Glasperlen wurde für 30 s in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für 1 min bei 30 Hz in einer Kugelmühle geschüttelt. Das Einfrieren und Schütteln wurde ein weiteres Mal wiederholt und in Probe mit jeweils 20 mg aufgeschlossene Zellmasse aufgeteilt. Mit jeder dieser Proben wurde die DNA-Isolation mit Hilfe des *DNeasy Plant Mini-Kit* der Firma *Qiagen* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 100 µL TE-Puffer statt des beigelieferten Elutionspuffers. Zur Überprüfung der gelungenen Isolation wurde die DNA-Konzentration der jeweiligen Proben ermittelt und diese mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Proben wurden vereinigt und dem Kooperationspartner (AG Polen, IBG-1 Forschungszentrum Jülich) für die Sequenzierung der genomischen DNA zur Verfügung gestellt.

#### **5.4.20 Sequenzierung genomischer DNA von *R. solani* F-895**

Die Sequenzierung der genomischen DNA wurde von den Kooperationspartnern im Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1, Forschungszentrum Jülich), unter der Leitung von Tino Polen durchgeführt. Die genomische DNA wurde dafür aliquotiert (4 µg je Aliquot) und mit Hilfe des *Bioruptor*<sup>®</sup> *Pico* Ultraschall von *Diagenode* auf eine durchschnittliche Größe von 600 bp fragmentiert. Für die Anfertigung von DNA-Bibliotheken wurden erneut 2 µg Aliquots der fragmentierten DNA mit dem *TruSeq DNA PCR-free* Kit von *Illumina* nach Herstellerangaben behandelt. Die resultierenden Bibliotheken wurden mit Hilfe des *KAPA library quantification* Kits der Firma *Peqlab* quantifiziert und nach Normalisierung vereinigt. Die vereinigten Bibliotheken wurden mit dem *MiSeq System* von *Illumina* sequenziert. Dafür wurde das „paired-end sequencing“ mit einem Leseraster von 2x 150 Basen verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mit der beigelieferten Software von *Illumina*.

#### 5.4.21 Isolation der RNA von *R. solani* F-895

Für die Isolation der RNA aus *R. solani* F-895 wurde *R. solani* F-895 sowohl in Glycerol-Medium, als auch in Erbsen-Medium angezogen. Im Anschluss an die Kultivierung wurden 40 mL der Kultur inklusive Mycel mit 5 mL einer Stop-Lösung (Tabelle 22) versetzt, gevortext, die Probe zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C, 3 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Proben bis zur Verwendung bei –80 °C zwischengelagert. Für den Aufschluss und die Isolation der RNA wurden anschließend zwei unterschiedliche Protokolle verwendet, welche beide zum erfolgreichen Erhalt der RNA führten.

Im ersten Protokoll wurde das gefrorene Pellet auf Eis aufgetaut und mit 1.5-2 mL Glasperlen versehen (diese wurden zuvor mit konz. HCl gewaschen). Anschließend wurde Lösung 1 zum Pellet gegeben und die Probe für 1 min gevortext. Anschließend wurde die Probe für 2 min bei 75 °C inkubiert und erneut für 1 min gevortext. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 75 °C für 5 min und eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm, für 5 min. Die obere Phase wurde in ein neues Falcon-Reaktionsgefäß überführt, mit Lösung 2 versetzt und für 30 s gevortext. Erneut erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm für 5 min. Die obere Phase wurde in ein weiteres Falcon-Reaktionsgefäß überführt, Lösung 3 hinzugefügt und für 30 s gevortext. Erneut erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm für 5 min. Die obere Phase wurde in ein weiteres Falcon-Reaktionsgefäß überführt und mit Lösung 4 versetzt. Es wurden zusätzlich 70 % des erhaltenen Gesamtvolumens an Ethanol zu der Lösung gegeben und die Lösungen durch Schwenken vermischt. Die Isolation der RNA erfolgte anschließend mit Hilfe des *RNeasy Kit* der Firma *Qiagen*, nach Herstellerangaben, ab dem Punkt wo 650 µL der Proben erstmalig auf die Säule gegeben werden. Zusätzlich wurde ein *DNase on column digest* von *Qiagen* durchgeführt, um die Proben von DNA zu befreien. Dies geschah ebenfalls nach Herstellerangaben. Die Elution der RNA erfolgte entgegen der Herstellerangaben mit RNase freiem H<sub>2</sub>O. Der Erfolg der Isolation wurde durch RNA-Konzentrationsbestimmung am *Nanodrop*, als auch mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Material und Methoden  
Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

**Tabelle 22:** Benötigte Puffer und Lösungen für die RNA-Isolation mit Hilfe von saurem Phenol.

Komponente	Zusammensetzung
Puffer A	20 mM Na-Acetat-Puffer pH 5.5 1 mM EDTA
Stop-Lösung	10 % gepuffertes Phenol in Ethanol
Lösung 1	3.5 mL saures Phenol, <sup>a</sup> 2 mL Puffer A, 160 µL SDS-Lösung (10 % (w/v))
Lösung 2	3 mL Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth)
Lösung 3	3 mL Chloroform
Lösung 4	2 mL Lysis-Puffer ( <i>RNeasy Kit</i> , Qiagen)

→ Alle Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser angesetzt (0.1 % Endkonzentration, über Nacht gerührt und autoklaviert).

a) 200 mL Phenol mit 200 mL Puffer A versetzt und gerührt, 1 h im Kühlschrank, obere Phase abgenommen, Vorgang 2x wiederholt und saures Phenol in 50 mL Falcon-Reaktionsgefäße mit Alufolie aliquotiert. Während des gesamten Vorgangs vor Licht geschützt.

Um einen negativen Effekt des sauren Phenols auf die spätere RNA-Sequenzierung auszuschließen wurde ein weiteres Protokoll zur Isolation der RNA durchgeführt. Dafür wurde *R. solani* F-895 erneut in Glycerol-Medium und in Erbsen-Medium angezogen und das Mycel geerntet und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Mycel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C zwischengelagert.

Jeweils 140 mg des gefrorenen Mycels wurden in ebenfalls schockgefrorenen 1.5 mL Eppendorf-Gefäßen abgewogen und anschließend in einen Mörser überführt und mechanisch aufgeschlossen. Dafür wurde das Mycel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mehrmals gründlich mit einem Stößel zermahlen. Das zermahlene Mycel wurde in 1.5 mL Eppendorf-Gefäße transferiert und anschließend das *RNeasy Kit* von Qiagen gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Auch dieses Mal erfolgte ein *DNase on column digest* nach den Herstellerangaben von Qiagen. Entgegen der Herstellerangaben wurde die RNA mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert. Der Erfolg der Isolation wurde durch RNA-Konzentrationsbestimmung am *Nanodrop*, als auch mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die isolierte RNA wurde dem Kooperationspartner (AG Usadel, IBG-2 Forschungszentrum Jülich) für die weitere Untersuchung zur Verfügung gestellt.

#### 5.4.22 Sequenzierung des Transkriptoms von *R. solani* F-895

Vor der eigentlichen Sequenzierung der RNA wurden nach Erhalt der Proben erneut die Menge an RNA mit Hilfe des *Qubit* Fluorometers von *ThermoFisher* quantifiziert und ein erneuter DNase-Verdau durchgeführt. Es erfolgte eine Qualitätsanalyse der RNA mit Hilfe der *TapeStation* von *Agilent*. Nachdem die ausreichende Qualität des Ausgangsmaterials ermittelt wurde, konnte die Erstellung der mRNA-Bibliothek mit dem *TruSeq stranded mRNA* Kits der Firma *illumina*, nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Danach wurde ein Sequenzierungslauf mit dem *NextSeq*-System von *illumina* durchgeführt und die erhaltenen Rohdaten ausgewertet. Es erfolgte sowohl eine genom-basierte Auswertung der erhaltenen Daten als auch eine *de novo* Auswertung. Bei ersteren wurden die erhaltenen Daten mit den bereits publizierten Daten von *Rhizoctonia solani* AG-3 verglichen. Dazu wurden vorerst die Adaptersequenzen mit der *Trimmomatic* Software entfernt.<sup>[305]</sup> Um zu verifizieren, dass alle Adaptersequenzen erfolgreich entfernt wurden erfolgte eine Analyse mittels *FastQC* von *illumina*. Mit *Hisat2* erfolgte anschließend das „mapping“ der Daten auf die des Referenzgenoms.<sup>[306]</sup> Mit Hilfe des *SAMtools* Programms wurden die Daten sortiert und konvertiert, damit anschließend Genmodelle auf Basis der Daten mit *StringTie* erzeugt werden konnten.<sup>[307, 308]</sup> Die erstellten Genmodelle wurden mit *gffread* in eine FASTA-Datei formatiert und mit Hilfe der *blastn* Funktion vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA) auf eine mögliche Laccasesequenz untersucht. Es erfolgte eine Analyse des „open reading frame“ (ORF) mit Hilfe der *CLC workbench* von *Qiagen* und anschließend die Untersuchung auf mögliche Signalsequenzen mit Hilfe der *Phobius signale peptide* Suchfunktion.

#### 5.4.23 Erzeugung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 400 mL LB-Medium in Fermbach-Kolben, mit Hilfe einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0.1 inokuliert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm für 3-4 h, bis eine OD<sub>600</sub> von ~0.6 erreicht wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet und das Zellpellet in 10 mL einer eisgekühlten MgCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM) resuspendiert. Die gelösten Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde danach in 2 mL einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung (100 mM, 15 % (w/v) Glycerol) resuspendiert und jeweils 50 µL in vorab sterilisierte, 1.5 mL Eppendorfgeläße aliquotiert. Diese wurden sofort verschlossen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde ein Aliquot jeweils vorsichtig für 5 min auf Eis aufgetaut.

Chemisch kompetente *E. coli* wurden mit 1 µL Plasmid-DNA (oder 10 µL Ligationsansatz/*DpnI*-Verdau) mit einer Konzentration von ~ 30-100 ng/µL versetzt und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Zellen für 90 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, bevor sie mit 500 µL sterilem LB-Medium versetzt wurden. Nach einer 1-3-stündigen Inkubation bei 37 °C, für die Ausbildung der jeweiligen Antibiotikaresistenz, wurden die Kulturen zentrifugiert und der zellfreie Überstand abgegossen. Die Zellen wurden in den verbleibenden ~100 µL im Eppendorf-Geläße

resuspendiert und auf eine Agar-Platte mit entsprechendem Selektionsmarker gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **5.4.24 Erzeugung und Transformation chemisch kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen**

Zur Erzeugung chemisch kompetenter *S. cerevisiae* wurde sich der Lithiumacetat/Einzelstrang-Träger-DNA/Polyethylenglykol-Methode von Gietz *et al.* bedient.<sup>[309]</sup> Dazu wurde vorab eine 5 mL Vorkultur von *S. cerevisiae* Y00000 in YP<sub>D</sub>-Medium bei 30 °C über Nacht auf einem Roller angezogen. Nach 12-16 h Inkubation wurde die optische Dichte der Vorkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt und im Anschluss zwei 50 mL Hauptkulturen in vorgewärmtem YP<sub>D</sub>-Medium auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0.1 eingestellt. Diese wurden bei 30 °C für ca. 4 h auf eine OD<sub>600</sub> von ~ 0.6 angezogen und mittels Zentrifugation (3000g, 5 min) geerntet. Die erhaltenen Pellets wurden in 25 mL sterilem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (3000g, 5 min). Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal mit 25 mL sterilem Wasser wiederholt und die Zellen zentrifugiert (3000g, 5 min). Im Anschluss wurden die Zellpellets der Kulturen in jeweils 1 mL sterilem Wasser resuspendiert und in ein 1.5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Dort wurden sie für 30 s bei 13000g zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde erneut in 1 mL sterilem Wasser resuspendiert und im Anschluss 100 µL Aliquots auf 1.5 mL Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Jedes dieser Aliquots kann im Anschluss für eine Transformation eingesetzt werden (immer frisch angesetzt, Einfrieren und Auftauen senkt die Transformationseffizienz). Zu jeweils einem 100 µL Aliquot wurden 360 µL eines Transformationsmixes (Tabelle 23) gegeben. Sollten mehrere unterschiedliche Transformanden erzeugt werden wurde erst ein Mastermix ohne Plasmid-DNA erstellt und 336 µL auf die Aliquots gegeben. Anschließend wurden dann 34 µL der jeweiligen Plasmid-DNA in sterilem Wasser auf das Aliquot gegeben. Zellen mit Transformationsmix wurden stark gevortext und für 40 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden die Aliquots zentrifugiert (13000g, 30 s) und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 1 mL sterilem Wasser resuspendiert und 2 oder 20 µL auf eine Agarplatte mit Selektionsmedium gegeben und anschließend für 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

**Tabelle 23:** Zusammensetzung des Transformations-Mixes für die Transformation von *S. cerevisiae*.

<b>Transformationsmix-Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>L]</b>
PEG 3000 (50 % (w/v))	240
LiAc (1 M)	36
Einzelstrang Lachs-Sperma DNA (2 mg/mL)	50
Plasmid-DNA in sterilem Wasser (~500 ng Plasmid-DNA)	34
Gesamtvolumen	360

Für die Bereitstellung des Polyethylenglykol-Mixes wurden 50 g PEG unter Erwärmung in 30 mL destilliertem Wasser gelöst. Im Anschluss wurden weitere 70 mL destilliertes Wasser dazugegeben und die Lösung autoklaviert. Eine sterile Lithiumacetat-Lösung wurde durch Lösen von 10.2 g Lithiumacetat-Dihydrat in 100 mL destilliertem Wasser und anschließendem Autoklaviervorgang erzeugt. Für die Herstellung der einzelsträngigen Lachs-Sperma-DNA-Lösung wurden 200 mg Lachssperma DNA in 100 mL TE-Puffer bei 4 °C gelöst. Dieser Vorgang kann mehrere Stunden dauern. Im Anschluss wurden 1 mL Aliquots in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und bei -20 °C gelagert. Vor Verwendung wurde die DNA für 5 min in kochendem Wasser denaturiert und im Anschluss sofort mit Hilfe eines Eisbades abgekühlt. Ein Aliquot kann 4-5 Mal auf diese Art behandelt werden, ohne dass eine Verschlechterung der Transformationseffizienz eintritt.

### 5.4.25 Verwendete Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden in *E. coli* oder *S. cerevisiae* produziert, kommerziell erworben, oder von Mitarbeitern des Instituts zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 24:** Im Rahmen der Doktorarbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Herkunft	Anwendung
ADH <sub>T</sub> ( <i>Thermoanaerobacter brockii</i> )	Die Produktion erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Classen <i>et al.</i> <sup>[310]</sup> durch H. Gieren <sup>a</sup> und B. Paschold <sup>b</sup> und wurde als Zellpellet zur Verfügung gestellt	Biokatalytische Umsetzungen
ADH <sub>LB</sub> ( <i>Lactobacillus brevis</i> )	Die Produktion erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Classen <i>et al.</i> <sup>[310]</sup> durch H. Gieren <sup>a</sup> und B. Paschold <sup>b</sup> und wurde als Zellpellet zur Verfügung gestellt	Biokatalytische Umsetzungen
GDH ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Die Produktion erfolgte durch H. Gieren <sup>a</sup> und wurde als zellfreier Glycerolstock von C. Holec <sup>b</sup> bereitgestellt	Cofaktor-Regeneration
FDH* ( <i>Candida boidinii</i> )	Die Produktion erfolgte eigenhändig in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cofaktor-Regeneration
PTDH ( <i>Pseudomonas stutzeri</i> )	Die Produktion erfolgte eigenhändig in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cofaktor-Regeneration
P450 BM3 ( <i>Bacillus megaterium</i> )	Die Produktion erfolgte eigenhändig in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), einige Varianten und Bibliotheken wurden von C. Holec <sup>b</sup> bereitgestellt	Biokatalytische Umsetzungen
RSL ( <i>Rhizoctonia solani</i> AG-3 Rhs1AP)	Die Produktion erfolgte eigenhändig in <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Charakterisierung

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 24

RSL F-895 ( <i>Rhizoctonia solani</i> F-895)	Die Produktion erfolgte eigenhändig in <i>E. coli</i> BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Arctic Express (DE3), und <i>S. cerevisiae</i> Y00000	Charakterisierung
Katalase ( <i>M. lysodeiktikus</i> )	~150 kU/mL je nach Charge, <i>Sigma-Aldrich</i>	Disproportionierung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in biokatalytischen Umsetzungen

<sup>a</sup> Institut für molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

<sup>b</sup> Institut für bioorganische Chemie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

#### 5.4.26 Eigenhändige Produktion von Enzymen in *E. coli* und *S. cerevisiae*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* und *S. cerevisiae* wurde eine Reihe von Zusätzen benötigt. Antibiotika dienten zur Selektion von transformierten *E. coli* mit entsprechendem Selektionsmarker auf den verwendeten Plasmiden. Von allen Antibiotika und dem Induktor IPTG wurden Stammlösungen angesetzt, welche anschließend im Verhältnis 1:1000 zu den Nährmedien gegeben wurden. Für das Ansetzen hochkonzentrierter Zuckerlösungen wurden diese in einem Wasserbad erwärmt. Alle verwendeten Zusätze wurden vor der Zugabe zu den Nährmedien über einen Sterilfilter filtriert (Tabelle 25).

**Tabelle 25:** Verwendete Zusätze im Rahmen von Expressionsversuchen in *E. coli* und *S. cerevisiae*.

Zusatz	Zusammensetzung	Zweck	Lagerung
Ampicillin-Stammlösung	100 µg/mL Kanamycin-Sulfat in ddH <sub>2</sub> O	Selektion	-20 °C
Kanamycin-Sammlösung	50 µg/mL Kanamycin-Sulfat in ddH <sub>2</sub> O	Selektion	-20 °C
Gentamycin-Stammlösung	20 µg/mL Gentamycin-Sulfat in ddH <sub>2</sub> O	Selektion	-20 °C
IPTG-Stammlösung	0,1 M IPTG in ddH <sub>2</sub> O	Induktion der Expression, T7-Promotorsysteme	-20 °C

Fortsetzung nächste Seite

Material und Methoden  
Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Fortsetzung Tabelle 25

CuSO <sub>4</sub> - Stammlösung	100 mM Kupfersulfat-Pentahydrat in ddH <sub>2</sub> O	Zusatz für Laccaseexpression	frisch angesetzt
Glukose- Stammlösung	40 % (w/v) Glukose in ddH <sub>2</sub> O	C-Quelle	frisch angesetzt
Raffinose- Stammlösung	20 % (w/v) Raffinose in ddH <sub>2</sub> O	C-Quelle	frisch angesetzt
Galaktose- Stammlösung	30 % (w/v) Galaktose in ddH <sub>2</sub> O	C-Quelle, Induktion der Expression <i>Gall</i> - Promotorsysteme	frisch angesetzt
Arabinose- Stammlösung	40 % (w/v) Arabinose in ddH <sub>2</sub> O	Induktion der Expression, <i>AraC</i> - Promotorsysteme	frisch angesetzt
Aminolevulinsäure- Stammlösung	0.5 M Aminolevulinsäure in ddH <sub>2</sub> O	Expression von P450 BM3	-20 °C
Thiamin- Stammlösung	100 mg/mL Thiamin-Hydrochlorid in ddH <sub>2</sub> O	Expression von P450 BM3	-20 °C
Spurenelement- Stammlösung	3 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.6 mM ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.6 mM MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 60 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 60 mM FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0.6 mM CuSO <sub>4</sub> , 0.8 mM CoCl <sub>2</sub>	Expression von P450 BM3	4 °C

#### 5.4.27 Produktion von *R. solani* Laccasen in *E. coli*

Für die versuchte Expression von *R. solani* Laccasen in *E. coli* wurden 100 mL LB-Medium mit Kanamycin in einem sterilen 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane vorgelegt. Das Medium wurde mit einer Vorkultur *E. coli* BL21 (DE3) pColA RSL (bzw. RSL F-895) auf eine OD<sub>600</sub> von 0.1 angeimpft und bei 13°-37 °C und 130 rpm geschüttelt. Die Temperatur hing dabei von dem verwendeten *E. coli*-Stamm ab. Während Arctic Express (DE3) bei 13 °C inkubiert wurde, wurde BL21 (DE3) bei 25°-37 °C inkubiert. Die Expression wurde nach ca. 2-3 h (OD<sub>600</sub> ~ 0.6) durch die Zugabe von IPTG induziert und die Kulturen für 24 h bei 130 rpm geschüttelt. In einigen Fällen wurde Kupfersulfat (0.2 mM Endkonzentration) als Zusatz für eine möglicherweise erhöhte Expressionsrate zum Nährmedium

gegeben.<sup>[40, 311]</sup> Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (12000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Expressionserfolg wurde mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsassays überprüft.

#### **5.4.28 Produktion von *R. solani* F-895 Laccase in *S. cerevisiae***

In Anlehnung an eine Vorschrift von Iimura *et al.*<sup>[146]</sup> wurden 50 mL YP<sub>Raf</sub>-Medium in einem sterilen 250 mL Erlenmeyerkolben mit einer Vorkultur *S. cerevisiae* pIE3 RSL F-895 (bzw. Linker oder LinkStrep) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 inokuliert. Diese Kultur wurde für 20 h bei 25 °C und 130 rpm geschüttelt und anschließend die OD<sub>600</sub> erneut vermessen. Eine definierte Menge Kulturmedium, welche einer OD<sub>600</sub> = 1 in 50 mL entspricht, wurde mittels Zentrifugation (12000 rpm, 5 min) geerntet und anschließend in 50 mL YP<sub>Raf</sub> resuspendiert. Die Kultur wurde für 48 h bei 20 °C und 130 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation geerntet und sowohl der Kulturüberstand, als auch das Zelllysat nach Zellaufschluss, mittels SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsassays auf eine erfolgreiche Expression überprüft.

#### **5.4.29 Produktion von FDH\* in *E. coli***

In Anlehnung an eine Vorschrift von Ricke<sup>[246]</sup> wurde 1 L TB-Medium mit Kanamycin in einem 3 L Fermbachkolben, aus einer Vorkultur *E. coli* BL21 (DE3) pET21(+) FDH\* auf eine OD<sub>600</sub> von 0.1 inokuliert und diese für 2-3 h bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0.6 angezogen. Zur Induktion der Expression wurde anschließend IPTG hinzugegeben und die Kultur bei 20 °C und 130 rpm für 48 h geschüttelt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (18000 rpm, 4 °C, 30 min). Es erfolgte ein Aufschluss der Zellen und anschließend eine Aufreinigung des Proteins mittels Ni-NTA Affinitätschromatografie. Die erfolgreiche Expression und Aufreinigung wurde mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsassays überprüft.

#### **5.4.30 Produktion von PTDH in *E. coli***

In Anlehnung an eine Vorschrift von Beyer *et al.*<sup>[255]</sup> wurde 1 L TB-Medium mit Ampicillin in einem 3 L Fermbachkolben, aus einer Vorkultur von *E. coli* BL21 (DE3) pBAD PTDH auf eine OD<sub>600</sub> von 0.1 inokuliert und diese für 2-3 h bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> ~ 0.6 angezogen. Zur Induktion der Expression wurde anschließend Arabinose auf eine Endkonzentration von 0.02 (w/v) hinzugegeben und die Kultur bei 30 °C und 130 rpm für 18 h geschüttelt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (18000 rpm, 4 °C, 30 min). Es erfolgte ein Aufschluss der Zellen und anschließend eine Aufreinigung des Proteins mittels Ni-NTA Affinitätschromatografie. Die erfolgreiche Expression und Aufreinigung wurde mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsassays überprüft.

#### **5.4.31 Produktion von P450 BM3 in *E. coli***

##### **5.4.31.1 Produktion in Kolben**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Neufeld<sup>[250]</sup> wurde 1 L TB-Medium mit Kanamycin und den Zusätzen Thiamin, Aminolevulinsäure und Spurenelementlösung (alle im Verhältnis 1:1000 aus Stammlösung) in einem 3 L Fermbachkolben, aus einer Vorkultur von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a (+)

P450 BM3 auf eine  $OD_{600}$  von 0.1 inokuliert und diese für 2-3 h bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer  $OD_{600} \sim 0.6$  angezogen. Zur Induktion der Expression wurde anschließend IPTG hinzugegeben und die Kultur bei 25 °C und 130 rpm für 36 h geschüttelt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (18000 rpm, 4 °C, 30 min). Die erfolgreiche Expression wurde mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und einer Monooxygenase spezifischen Konzentrationsbestimmung überprüft.

#### **5.4.31.2 Produktion in Mikrotiterplatten**

Für die Untersuchung von P450 BM3 Bibliotheken wurden Varianten des Enzyms in Mikrotiterplatten nach einer Vorschrift von Neufeld exprimiert.<sup>[250]</sup> Dafür wurden in einer sterilen 96-Well Mikrotiterplatte 150 µL LB-Medium mit Kanamycin vorgelegt. In jedes Well wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine einzelne Kolonie von transformierten *E. coli*, mit der gewünschten P450 BM3 Variante, übertragen. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Deckel und Klebeband verschlossen und für 10-15 h bei 37 °C und 900 rpm inkubiert. Sollte aus der Platte eine Glycerinkultur zur Lagerung und für zukünftige Expressionen entstehen, wurde in jedes Well 150 µL steriles Glycerin (50 % (w/v)) gegeben und diese Platte bei -80 °C gelagert. Für die Expression der Monooxygenasen wurde in einer 2 mL Deepwell-Platte jeweils 500 µL TB-Medium mit Zusätzen (siehe Expression im Kolben, Ausnahme 0.5 mM Endkonzentration an IPTG statt der üblichen 0.1 mM) vorgelegt und diese mit 10 µL aus der Vorkulturplatte angeimpft. Die Platten wurden mit luftdurchlässiger Folie verschlossen und bei 30 °C und 900 rpm für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (4000 rpm, 15 min, 4 °C) geerntet, der Überstand abdekantiert und die Platte bei -20 °C gelagert oder sofort verwendet. Eine rote Färbung der Pellets deutete dabei auf eine erfolgreiche Expression der Monooxygenase hin.

#### **5.4.32 Herstellung von zellfreien Rohlysaten von *E. coli***

Für die Herstellung zellfreier Rohlysate größerer Mengen an *E. coli*-Kultur (2-30 mL) wurde ein mechanischer Aufschluss mit der Hilfe von Ultraschall durchgeführt. Für die Herstellung zellfreier Rohlysate im Rahmen der Untersuchung von P450-Bibliotheken wurde ein enzymatischer Aufschluss mittels Lysozyms gewählt.

##### **5.4.32.1 Mechanischer Zellaufschluss mit Ultraschall**

Für den Zellaufschluss mit Ultraschall wurde ein Zellpellet in vorgekühltem Puffer gelöst [20 % (w/v)] und anschließend auf Eis gekühlt. Der Aufschluss erfolgte durch einen Ultraschallhomogenisator mit einer Pulslänge und Intensität von ~40 % für 10 min auf Eis. Es erfolgte eine Pause für 1 min. und eine weitere Behandlung mit Ultraschall für 10 min bevor die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (18000 rpm, 15 min, 4 °C) sedimentiert wurden. Der nun zellfreie Überstand wurde abdekantiert und sofort verwendet, oder für maximal 12 h bei 4 °C zwischengelagert. Zellfreie Rohlysate von PTDH waren bis zu einem Monat bei 4 °C lagerbar ohne messbaren Aktivitätsverlust.

### 5.4.32.2 Enzymatischer Zellaufschluss mit Lysozym

Für den Zellaufschluss kleinerer Volumina in Mikrotiterplatten, wurde ein enzymatischer Zellaufschluss mit Hilfe von Lysozym durchgeführt. Dafür wurde eine der exprimierten P450 BM3 Bibliotheken für 30 min bei 4 °C aufgetaut und anschließend 240 µL einer frisch angesetzten Lysozym-Lösung (5 mg/mL Lysozym aus Hühnereiweiß (~70 kU/mg *Sigma Aldrich*) in ddH<sub>2</sub>O) in jedes Well gegeben. Die Zellpellets wurden in der Lysozym-Lösung durch auf- und abpipetieren resuspendiert und die Platte anschließend bei 37 °C und 900 rpm für 1 h geschüttelt. Eine Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 15 min) erlaubte das vorsichtige Abnehmen von 200 µL der zellfreien Kulturüberstände und die Überführung dieser in eine neue Platte. Die Rohlysate wurden sofort frisch eingesetzt.

### 5.4.33 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung von Proteinen erfolgte durch affinitätschromatografische Methoden. Dafür besaßen die betreffenden Proteine einen Affinitätstag, der mit der stationären Phase einer Säule interagiert und dadurch die Aufreinigung erlaubt (vgl. Abbildung 29). In dieser Arbeit wurden sowohl Polyhistidintags (FDH\*, PTDH), als auch StrepTactin<sup>®</sup>-Tags (RSL F-895) genutzt.

Das zellfreie Rohlysate des thermostabilen Enzyms ADH<sub>T</sub> wurde für 15-20 min bei 65 °C inkubiert, um thermolabile Enzyme zu denaturieren. Eine darauffolgende Zentrifugation (12000 rpm, 4 °C, 30 min) lieferte das teilweise aufgereinigte Enzym im Überstand.

#### 5.4.33.1 Aufreinigung von Proteinproben mittels Ni-NTA Affinitätschromatografie

Proteine, die mit einem Polyhistidintag versehen waren, wurden mit Hilfe der Nickel-Nitriloessigsäure-Affinitätschromatografie (Ni-NTA) aufgereinigt. Dabei wird die Affinität von chelatgebundenem Nickel, gegenüber den Histiden des Proteins ausgenutzt, um diese an der stationären Phase der Säule zu immobilisieren. In einem Folgeschritt kann das immobilisierte Enzym mit Hilfe von Imidazol von der Säule verdrängt werden. Bei den verwendeten Säulen handelte es sich um *Ni-NTA Superflow Cartridges* der Firma *Qiagen* mit einem Säulenvolumen von 5 mL. Zum Beladen der Säulen mit Puffern und Rohlysate wurden Peristaltikpumpen der Firma verwendet.

**Tabelle 26:** Für die Ni-NTA Affinitätschromatografie benötigte Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Äquilibrierungspuffer	50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer (pH 7.5), 1 M NaCl, 10 mM Imidazol
Waschpuffer 1	50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer (pH 7.5), 1 M NaCl, 20 mM Imidazol
Waschpuffer 2	50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer (pH 7.5), 300 mM NaCl, 1 M Imidazol
Elutionspuffer	50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer (pH 7.5), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Ethanollösung	20 % (v/v) Ethanol in ddH <sub>2</sub> O

Vor Verwendung der Säulen wurden diese mit zwei Säulenvolumen Äquilibriumspuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde langsam das zellfreie Rohlysat (max 30 mL) über die Säule gegeben, der Durchfluss aufgefangen und ein weiteres Mal auf die Säule gegeben. Durch das Waschen mit zwei Säulenvolumen an Waschpuffer 1 wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Säule eluiert. Die Elution des Zielproteins erfolgte anschließend durch Zugabe von zwei Säulenvolumen an Elutionspuffer, wobei das Zielprotein erst in der zweiten Fraktion erwartet wird. Um die Säule von Restprotein zu befreien wurde ein weiteres Säulenvolumen an Waschpuffer 2 über die Säule gegeben. Zum Schluss wurde ein Säulenvolumen Ethanollösung auf die Säule gegeben und diese bis zur nächsten Verwendung bei 4 °C gelagert. Bei jedem der durchgeführten Schritte wurde der Säulendurchfluss als getrennte Fraktion aufgefangen und im Anschluss mittels SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsassay auf die Anwesenheit des Zielproteins untersucht. Dafür wurde jede Fraktion bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

#### **5.4.33.2 Aufreinigung von Proteinproben mittels StrepTactin® Affinitätschromatografie**

Da die *StrepTactin*® Affinitätschromatografie im Rahmen dieser Arbeit für die Aufreinigung eines Proteins aus dem Kulturüberstand von *S. cerevisiae* verwendet wurde, erfolgte vor dem eigentlichen Protokoll eine Behandlung des Kulturüberstandes mit einer Avidin-Blockerlösung derselbigen Firma. Das beigefügte Avidin dient dazu, möglicherweise vorhandenes Biotin aus dem Kulturüberstand zu entfernen, da dieses ansonsten irreversibel an die Säule binden könnte. Aus diesem Grund wurden in Anlehnung an die Herstellerangaben 45 mL des Kulturüberstandes mit 5 mL 10x Puffer W (1 M Tris/HCl-Puffer, 1.3 M NaCl, pH 8.0) auf einen pH-Wert zwischen pH 7.5 und pH 8 eingestellt. Anschließend wurde 1 mL der Blocking-Lösung dazu gegeben und die Probe für 15 min bei 25 °C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 10000 rpm und es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

Proteine, die mit einem Strep-Tag versehen waren, wurden anschließend mit Hilfe der *StrepTactin*® Affinitätschromatografie aufgereinigt. Das Grundlegende Prinzip ist dabei ähnlich der Ni-NTA Affinitätschromatografie und wurde vorab bereits erläutert (Abbildung 29). Für die Aufreinigung wurden *StrepTactin*® *Superflow* Säulen, mit einem Säulenvolumen von 5 mL, der Firma *iba-lifesciences* genutzt. Die Durchführung geschah anhand der beigefügten Herstellerangaben nach dem „Short“-Protokoll. Die Elutionsschritte erfolgten mit 0.8, 1.4, und 0.8 mL Elutionspuffer.

Um den Erfolg der Aufreinigung zu verfolgen wurden vor jedem Arbeitsschritt Proben für eine Untersuchung mittels SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsassays entnommen.

#### **5.4.34 Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen**

Zum Umpuffern von Proteinlösungen wurden PD10-Größenausschlusschromatografie Säulen mit einem Säulenvolumen von 3.5 mL der Firma *GE-Healthcare* verwendet. Dafür wurden diese vorab mit drei Säulenvolumen des Zielpuffers äquilibriert, bevor 2.5 mL der Proteinlösung auf die Säule gegeben wurden. Die Elution erfolgte anschließend mit einem Säulenvolumen an Zielpuffer und die Säule wurde

im Anschluss mit drei Säulenvolumen an Zielpuffer gespült. Zum Schluss wurde die Säule mit 20 %-iger Ethanollösung (Tabelle 26) überschichtet und bei 4 °C gelagert.

Um Proteinlösungen aufzukonzentrieren wurden *VivaSpin*<sup>®</sup>-Konzentratoren der Firma *Sartorius* mit einem entsprechendem *Molecular Weight CutOff (MWCO)* eingesetzt. Für das Aufkonzentrieren von FDH\* Proteinlösungen wurden Filter mit einem *MWCO* von 10 kDa eingesetzt, während zum Aufkonzentrieren von RSL F-895 Filter mit einem *MWCO* von 50 kDa eingesetzt wurden. Es wurden je nach Volumen der Proteinlösung *Vivaspin*<sup>®</sup> 20 (5-20 mL Proteinlösung) oder *Vivaspin*<sup>®</sup> 500 (500 µL Proteinlösung) Filter eingesetzt. Die Aufkonzentrierung erfolgte mittels Zentrifugation nach Herstellerangaben, bis zu einem gewünschten Volumen, bei 4 °C.

#### **5.4.35 Deglykosilierung von Proteinen**

Die Deglykosilierung von Proteinen wurde mit Hilfe der PNGase F von *New England Biolabs* gemäß den beigefügten Herstellerangaben durchgeführt. Als Kontrolle diente jeweils eine Probe mit der das Protokoll ohne beifügen der PNGase durchgeführt wurde, als auch eine Probe in der ausschließlich PNGase ohne Glycoprotein vorlag.

#### **5.4.36 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde jeweils eine SDS-PAGE durchgeführt. Dafür wurden Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (5x) versetzt und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Je nach Taschengröße des zuvor gegossenen SDS-Gels wurden 10-15 µL der jeweiligen aufgeköchten Proteinproben in eines der Taschen des Gels gegeben. Das Gel wiederum bestand aus einem 12 %-igen Trenngel und einem 4 %-igen Sammelgel. Zusätzlich zu den Proben wurde in eine der Taschen 5 µL des kommerziellen Proteinstandards *PageRuler*<sup>®</sup> *Prestained Protein Ladder* der Firma *ThermoFisher* vorgelegt. Für die Auftrennung mittels Elektrophorese wurden die entsprechenden Elektrophoresekammern und Netzteile der Firma *Bio-Rad* verwendet. In die äußere Kammer wurde dafür der Anodenpuffer und in die innere Kammer der Kathodenpuffer gefüllt. Die Proben wurden bei 30 V für 20 min und 60 V für 6 min im Sammelgel fokussiert, bevor die Trennung der Proteine für 45 min bei 180 V durchgeführt wurde. Die Gele wurden im Anschluss an die Elektrophorese für 10 min in Fixierlösung geschwenkt, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und über Nacht in kolloidaler Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Am nächsten Tag wurden die Gele aus der Färbelösung genommen und mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt.

**Tabelle 27:** Für die SDS-Gelelektrophorese verwendete Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (5x)	Natriumdodecylsulfat 10 % (w/v), Saccharose 30 % (w/v), Bromphenolblau 0.1 % (w/v), 50 mM Dithiothreitol, 500 mM Tris/HCl pH 6.8
Anodenpuffer	0.1 M Tris, 225 mM HCl, pH 8.9
Kathodenpuffer	0.1 M Tris, 0.1 M Tricin, 0.1 % SDS (w/v), pH 8.25
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v), in ddH <sub>2</sub> O
3x Gelpuffer	3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % SDS (w/v), pH 8.45
4 % Sammelgel	0.4 mL <i>Rotiphorese</i> <sup>®</sup> Gel 30 ( <i>Roth</i> ), 0.75 mL Gelpuffer (3x), 1.85 mL H <sub>2</sub> O, 25 µL APS-Lösung, 2.5 µL TEMED ( <i>Roth</i> )
12 % Trenngel	1.68 mL <i>Rotiphorese</i> <sup>®</sup> Gel 30 ( <i>Roth</i> ), 1.68 mL Gelpuffer (3x), 1.18 mL H <sub>2</sub> O, 0.5 g Glycerol, 25 µL APS-Lösung, 2.5 µL TEMED ( <i>Roth</i> )
Fixierlösung	30 % Ethanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v), in ddH <sub>2</sub> O
Färbelösung	2 % Phosphorsäure (w/v), 10 % Ethanol (v/v), 5 % Aluminiumsulfat (w/v), 0.02 % Coomassie Brilliant Blau G-250 (w/v)

#### 5.4.37 Untersuchung von Proteinen mit MALDI-TOF

Die Durchführung von MALDI-TOF Experimenten erfolgte durch die Kooperationspartner im Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1, Forschungszentrum Jülich), unter der Leitung von Tino Polen.

Relevante Proteinbanden wurden gemäß einer Vorschrift von Pahlke *et al.* aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mit MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht.<sup>[312]</sup> Monoisotopische Massen wurden zugeordnet und für die hauseigene Datenbanksuche mit der *Mascot* Software der Firma *Matrix Science* genutzt. Dafür wurde die Proteindatenbank der „Shotgun“-Sequenzierung von *R. solani* AG-1 IA (AFRT00000000.1) als Basis benutzt. Um später die am besten passende, ursprüngliche Laccasesequenz von RSL F-895 aus der Probe zu finden, wurde eine selbst angelegte Proteindatenbank aus den Genom- und Transkriptomdaten von *R. solani* F-895 genutzt.

### 5.4.38 Western-Blot

Für den Nachweis von Proteinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde das Western-Blot Verfahren verwendet. Dafür wurden die zuvor auf einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine horizontal auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Das vorangegangene SDS-Gel wurde dafür nicht vorab eingefärbt, sondern sofort nach der Elektrophorese eingesetzt. Als Kontrolle des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die PVDF-Membran, wurde bei der vorherigen SDS-PAGE eine vorgefärbte Proteinleiter mit aufgetragen. Für den Transfer wurden sowohl *Whatman*-Papier und die Blot-Kissen in Transfer-Puffer als auch PVDF-Membran in Methanol vorab eingeweicht. Der Western-Blot wurde mit Hilfe des *Novex*<sup>®</sup> *Mini-Cell* Systems der Firma *Invitrogen* durchgeführt. Dafür wurde die Kathode mit einem Blot-Kissen und zwei Seiten *Whatman*-Papier bedeckt und das SDS-Gel darauf positioniert. Danach wurde die PVDF-Membran mit der entsprechenden Seite auf das SDS-Gel gelegt und erneut zwei Seiten *Whatman*-Papier und ein Blot-Kissen darüber positioniert. Die Systemkammer wurde schließlich mit der Anodenseite geschlossen und vertikal im Tank positioniert. Der Tank wurde mit Transfer-Puffer befüllt und mit einem Magnetrührstäbchen und Eis versehen. Unter Rühren erfolgte der Elektrotransfer der Proteine bei 30 V für 1 h. Der spezifische Nachweis von Proteinen mit *Strep*-Tag erfolgte anschließend mit Antikörpern und konjugierter Meerrettichperoxidase der Firma *iba*, gemäß den Herstellerangaben.

**Tabelle 28:** Benötigte Puffer und Lösungen für den Nachweis von Proteinen mit *Strep*-Tag.

Komponente	Zusammensetzung
Transfer-Puffer	3 g/L Tris, 14.4 g/L Glycin in ddH <sub>2</sub> O
PBS-Puffer	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.4), 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 115 mM NaCl
Block-Lösung	PBS-Puffer, 3 % Rinderserumalbumin (w/v), 0.5 % Tween 20 (v/v)
PBS-Tween-Puffer	PBS-Puffer, 0.1 % Tween 20 (v/v)
Chloronaphtol-Lösung	3 % 4-Chloro-1-naphtol (w/v) in Methanol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) in ddH <sub>2</sub> O

### 5.4.39 Bestimmung von Enzymaktivitäten mit photometrischen Assays

#### 5.4.39.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten NAD(P)H-abhängiger Enzyme

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten NAD(P)H abhängiger Enzyme (FDH\*, ADHs, PTDH) wurde photometrisch die Zu- oder Abnahme der Absorption bei 340 nm, auf dem *UV-1800* Spektrophotometer von *Shimadzu* verfolgt. Die anschließende Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Formel 3). Es wurden jeweils Dreifachmessungen vorgenommen und der Mittelwert bestimmt. 1 Unit (U) entspricht dabei dem Umsatz von 1 µM Substrat in 1 Minute.

Material und Methoden  
Mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

**Formel 3:** Formel zur Ermittlung der Volumenaktivität nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$\text{Volumenaktivität} \left[ \frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot V_P}{d \cdot \varepsilon \cdot V_E} \cdot T_F$$

$V_P$  = Probenvolumen,  $V_E$  = Volumen der Enzymlösung,  $d$  = Küvettendurchmesser (1 cm),  $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (NAD(P)H = 6.22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 340 nm),  $T_F$  = Zeitfaktor für 1 min. (60)

Das Puffersystem, die Temperatur und das Substrat wurden dem jeweilig untersuchten Enzym angepasst (Tabelle 29). Nach Zugabe von NAD(P)H wurde geblanct und die Zu- oder Abnahme der Absorption nach Zugabe der Enzymlösung für 60 s, in 5 s Intervallen, verfolgt.

**Tabelle 29:** Ansatzgrößen zur Bestimmung der Enzymaktivität NAD(P)H-abhängiger Enzyme.

<b>ADH</b>		
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>
100 mM KP <sub>i</sub> -Puffer, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7.0	-	790 µL
Acetophenon	100 mM in ddH <sub>2</sub> O	100 µL
NADPH	15 mM in ddH <sub>2</sub> O	100 µL
Zellfreies Lysat	-	10 µL
<b>FDH*</b>		
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>
50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer, 225 mM Na-Formiat, pH 7.5	-	890 µL
NADPH	20 mM in ddH <sub>2</sub> O	100 µL
Zellfreies Lysat	-	10 µL
<b>PTDH</b>		
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>
50 mM KP <sub>i</sub> -Puffer, 4 mM Na-Phosphit, pH 7.5	-	890 µL
NADPH	15 mM in ddH <sub>2</sub> O	100 µL
Zellfreies Lysat	-	10 µL

### 5.4.39.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten von Laccasen

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten von Laccasen wurde die Umsetzung der Substrate 2,6-DMP (9) und ABTS (8) in Anlehnung an Kolomytseva *et al.* photometrisch beobachtet.<sup>[28]</sup> Dabei wurde ebenfalls das *UV-1800* Spektrophotometer von *Shimadzu* für eine geringe Anzahl an Proben mit einem Probenvolumen von 1 mL, als auch der *Microplate Reader Infinite M1000 Pro* von *Tecan* für eine größere Anzahl an Proben mit einem Probenvolumen von 100 µL. Für die Bestimmung der Aktivität wurde erneut die Formel nach dem Lambert-Beerschen Gesetz genutzt (Formel 3) und die Parameter entsprechend angepasst. Die Oxidation von ABTS (8) und 2,6-DMP (9) wurden bei 436 nm und 470 nm verfolgt.

$V_P$  = Probenvolumen (Küvette = 1 mL, MTP = 100 µL),  $V_E$  = Volumen der Enzymlösung (Küvette = 100 µL, MTP = 10 µL),  $d$  = Küvettendurchmesser (Küvette = 1 cm, MTP = 0.3 cm),  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (ABTS (8) = 29300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 436 nm, 2,6-DMP (9) = 35645 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 470 nm)<sup>[28]</sup>,  $T_F$  = Zeitfaktor für 1 min. (60 da  $\Delta t = 1$  s).

Erneut wurden Dreifachmessungen durchgeführt und der Mittelwert, sowie die Standardabweichung bestimmt.

**Tabelle 30:** Ansatzgrößen für die Bestimmung von Laccaseaktivitäten in Küvetten und Multitierplatten.

Küvette		
Komponente	Stammlösung	Menge
50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.2	-	800 µL
ABTS (8) o. 2,6-DMP (9)	1 mM in Tris/HCl-Puffer	100 µL
Zelllysate o. Kulturüberstand	-	100 µL

Küvette		
Komponente	Stammlösung	Menge
20 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5	-	800 µL
ABTS (8) o. 2,6-DMP (9)	1 mM in Na-Acetat-Puffer	100 µL
Zelllysate o. Kulturüberstand	-	100 µL

Fortsetzung nächste Seite

<b>Mikrotiterplatte</b>		
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>
Britton-Robinson-Puffer pH 3-9	-	80 µL
ABTS (8) o. 2,6-DMP (9)	1 mM in ddH <sub>2</sub> O	10 µL
Zellysat o. Kulturüberstand	-	10 µL

#### 5.4.40 Bestimmung der P450-Monooxygenase Konzentration

Die Bestimmung der Monooxygenasekonzentration erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Umura und Sato mit Hilfe von CO-Differenzspektroskopie.<sup>[194]</sup> Dafür wurden 200 µL der Proteinproben in 1.8 mL KP<sub>i</sub>-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 2 mL verdünnt und mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt. Es wurde zusätzlich 1 µL einer 7 %-igen Methylviologen-Lösung dazu gegeben und die Proben 10x invertiert. 1 mL der Probe wurde jeweils abgenommen und in ein separates Eppendorf-Gefäß überführt, diese diente später als unbehandelte Referenz. Die erste Probe wurde anschließend 1 Minute mit Kohlenmonoxid begast (1 Blase pro Sekunde), während die zweite dementsprechend unbehandelt blieb. Für beide Proben wurde jeweils die Absorption bei 450 nm und bei 490 nm, bei 30 °C vermessen, die Differenz zwischen den beiden Werten ermittelt und die Konzentration anschließend mittels folgender Formel ermittelt (Formel 4).

**Formel 4:** Formel zur Ermittlung der P450-Konzentration.

$$P450 - \text{Konzentration [mM]} = \frac{\Delta A_{450\text{nm}} - \Delta A_{490\text{nm}} \cdot \frac{V_P}{V_E}}{\varepsilon \cdot d}$$

$V_P$  = Probenvolumen,  $V_E$  = Volumen der Enzymlösung,  $d$  = Küvettendurchmesser (1 cm),  $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (91 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei 450 nm und 490 nm).<sup>[194]</sup>

#### 5.4.41 Biokatalytische Umsetzungen mit der P450 BM3 Monooxygenase

##### 5.4.41.1 Umsetzungen zur Untersuchung der P450-Bibliothek auf die Bildung von vicinalen Diolen

Um die Bildung vicinaler Dirole durch Varianten von P450 BM3 zu untersuchen wurden 200 µL der zellfreien Lysate einer exprimierten P450-Bibliothek (siehe Produktion von P450 in Mikrotiterplatten und Aufschluss mittels Lysozyms) in eine 2 mL Deepwell-Platte gegeben, in der jeweils 300 µL eines

sterilfiltrierten Reaktionsmixes (Tabelle 31) vorgelegt worden sind. Anschließend wurde die Platte bei 30 °C und 900 rpm, für 16-18 h geschüttelt.

**Tabelle 31:** Jeweilige Zusammensetzung von 40 mL Reaktionsmix für unterschiedliche Cofaktor-Recyclingsysteme in P450 BM3 katalysierten Reaktionen. Die Endkonzentrationen beziehen sich nicht auf den Reaktionsmix, sondern auf die finalen 500 µL Reaktionsansatz in der Deepwell-Platte, nach Zugabe der 200 µL des zellfreien Enzymlysats.

<b>FDH*-Recycling</b>			
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Non-1-en-4-ol	300 mM in DMSO	1.334 mL	6 mM
Natriumformiat	-	906.4 g	200 mM
NADP <sup>+</sup>	50 mM in ddH <sub>2</sub> O	266 µL	0.2 mM
Katalase	130.7 kU/mL	132.6 µL	0.6 kU/mL
FDH*	variabel	variabel	0.6 U/mL

<b>GDH-Recycling</b>			
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Non-1-en-4-ol	300 mM in DMSO	1.334 mL	6 mM
Glukose	3 M	8 mL	400 mM
NADP <sup>+</sup>	50 mM in ddH <sub>2</sub> O	266 µL	0.2 mM
Katalase	130.7 kU/mL	132.6 µL	0.6 kU/mL
GDH	variabel	variabel	0.5 U/mL

<b>PTDH-Recycling</b>			
<b>Komponente</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Non-1-en-4-ol	300 mM in DMSO	1.334 mL	6 mM
Dinatriumphosphit	-	34,6 mg	4 mM
NADP <sup>+</sup>	50 mM in ddH <sub>2</sub> O	266 µL	0,2 mM
Katalase	130.7 kU/mL	132.6 µL	0.6 kU/mL
PTDH	variabel	variabel	0.6 U/mL

#### **5.4.41.2 Generelle Durchführung des Adrenalin-Assays mit vorangehender Extraktion der Reaktionsansätze**

Für den Nachweis vicinaler Dirole mit Hilfe des Adrenalin-Assays wurden die Reaktionsansätze anschließend mit 500-600  $\mu\text{L}$  Ethylacetat versetzt und die organische Phase mit einer 100  $\mu\text{L}$  Multikanalpipette 50x auf- und abpipettiert. Die Platte wurde für 15 min und 4000 rpm, bei 4 °C zentrifugiert. Es wurden 250-300  $\mu\text{L}$  der organischen Phase abgenommen und in einer lösungsmittelresistenten Mikrotiterplatte von *Greiner Bio One* überführt. Das Lösungsmittel wurde für 2 h bei 40 °C abgedampft und 10  $\mu\text{L}$  DMSO auf die Überreste gegeben. Es wurden 70  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.5) und 10  $\mu\text{L}$  Natriumperiodat-Lösung (10 mM in  $\text{KPi}$ -Puffer) dazu gegeben, 10x auf- und abpipettiert und die Platte für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalin-Hydrochlorid-Lösung (15 mM in  $\text{KPi}$ -Puffer) dazu gegeben, erneut 10x auf- und abpipettiert und ein weiteres Mal für 5 min bei 25 °C inkubiert. 90  $\mu\text{L}$  der Lösung wurden anschließend in eine durchsichtige Multitierplatte von *Greiner Bio One* überführt und die Absorption der Proben bei 490 nm in einem Plattenphotometer vermessen.

#### **5.4.41.3 Generelle Durchführung des Adrenalin-Assays ohne vorangehende Extraktion der Reaktionsansätze**

Da eine Extraktion bei Verwendung von  $\text{FDH}^*$  oder  $\text{PTDH}$  basierendem Cofaktor-Recycling keine Notwendigkeit darstellt, konnte der Adrenalin-Nachweis vicinaler Dirole in diesen Fällen auch ohne Extraktion durchgeführt werden. Die Platte mit den Reaktionsansätzen wurde dafür vorab für 15 min und 4000 rpm, bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  der Reaktionsansätze mit einer Multikanalpipette in eine durchsichtige Multitierplatte von *Greiner Bio One* überführt und mit 40  $\mu\text{L}$  Natriumperiodat-Lösung (10 mM in  $\text{KPi}$ -Puffer) versetzt. Zum Mischen der Lösungen wurde 10x auf- und abpipettiert und die Platte für 30 min bei 25 °C inkubiert. Danach wurden weitere 10  $\mu\text{L}$  Adrenalin-Hydrochlorid-Lösung (15 mM in  $\text{KPi}$ -Puffer) hinzugegeben, erneut gemischt und die Platte für 5 min bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption der Proben bei 490 nm in einem Plattenphotometer ermittelt.

#### **5.4.41.4 Semipräparative Umsetzungen von Homoallylalkoholen mit P450 BM3**

Für Umsetzungen im semipräparativen Maßstab wurden 15 mL Reaktionsansätze in 50 mL Falcon-Reaktionsgefäßen angesetzt, in Anlehnung an Neufeld *et al.*<sup>[218]</sup> Diese wurden anschließend für 5 min mit Sauerstoff begast (1 Blase pro Sekunde) und anschließend für 14-16 h, bei 30 °C und 300 rpm geschüttelt. Für die Untersuchung mittels NMR wurde jeweils 1 mL des Reaktionsansatzes entnommen und mit 1 mL deuteriertem Chloroform extrahiert.

**Tabelle 32:** Ansatzgrößen für die semipräparativen Umsetzungen von Homoallylalkoholen mit P450 BM3 am Beispiel von Non-1-en-4-ol (**11**).

Komponente	Stammlösung	Menge	Endkonzentration
Non-1-en-4-ol	-	25 µL	6 mM
BM3-Puffer	-	4.5 mL	30 % (v/v)
P450 BM3	variabel	variabel	9 µM
Glukose	3.3 M	1.8 mL	400 mM
NADP <sup>+</sup>	50 mM in ddH <sub>2</sub> O	30 µL	0.1 mM
Katalase	130.7 kU/mL	52.5 µL	470 U/mL
GDH	variabel	variabel	0.2 U/mL
KP <sub>i</sub> -Puffer (50 mM, pH 7.5)	-	ad. 15 mL	-

#### 5.4.41.5 Präparative Umsetzung von Non-1-en-4-ol (**11**) mit P450 BM3

Für die präparative Umsetzung von Non-1-en-4-ol (**11**) mit zellfreiem Rohlysate von P450 BM3, wurde ein steriler 250 mL Dreihalskolben mit Septen verschlossen und durch eine der Septen eine abgeknickte Kanüle eingestochen, um das sterile Befüllen des Kolbens zu erlauben. Über einen 0.2 µm Sterilfilter wurden 100 mL Reaktionsansatz (Tabelle 33) in den Kolben gefüllt. Unter schwachem Rühren wurde die Lösung für 5 min mit Sauerstoff begast (1 Blase pro Sekunde) und anschließend das Substrat tropfenweise hinzugegeben. Der Dreihalskolben wurde an einen *Titrino 848* Titrator der Firma *Metrohm* angeschlossen, welcher durch schrittweise Zugabe von NaOH den pH-Wert der Reaktion konstant bei pH 7.5 hielt. Die Reaktion wurde für 16 h bei 30 °C unter leichtem Rühren inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung durch Zugabe von HCl auf einen pH-Wert von 3-4 angesäuert und anschließend Ammoniumsulfat bis zur Sättigung der Lösung hinzugegeben. Das Ausfällen der Proteine erfolgte bei 4 °C über Nacht. Der Reaktionsansatz wurde anschließend über einen Whatman-Filter filtriert und die Rückstände mit Ethylacetat gewaschen. Der Durchfluss wurde ebenfalls mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Diese wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend unter reduziertem Druck an einem Rotationsverdampfer entfernt. Für die Untersuchung der verschiedenen Produkte wurde das Rohprodukt anschließend mittels Säulenchromatographie aufgetrennt (PE:EE = 7:3). Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels NMR und GC/MS untersucht, um einen Eindruck über die Produktverteilung der Reaktion zu erhalten.

**Tabelle 33:** Ansatzgrößen für die präparativen Umsetzungen von Homoallylalkoholen mit P450 BM3 am Beispiel von Non-1-en-4-ol (**11**).

Komponente	Stammlösung	Menge	Endkonzentration
Non-1-en-4-ol	-	100 mg	7 mM
BM3-Puffer	-	30 mL	30 % (v/v)
P450 BM3	variabel	variabel	9 $\mu$ M
Glukose	3.3 M	12.2 mL	400 mM
NADP <sup>+</sup>	50 mM in ddH <sub>2</sub> O	200 $\mu$ L	0.1 mM
Katalase	130.7 kU/mL	350 $\mu$ L	470 U/mL
GDH	variabel	variabel	0.2 U/mL
KP <sub>i</sub> -Puffer (50 mM, pH 7.5)	-	ad. 100 mL	-

#### 5.4.42 Biokatalytische Umsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

##### 5.4.42.1 Oxidative kinetische Racematspaltung von Homoallylalkoholen im analytischen Maßstab

In einem 250 mL Erlenmeyerkolben wurde der Homoallylalkohol (0.5 mmol) zusammen mit Aceton (5 % (v/v) Endkonzentration), ADH<sub>T</sub> (25 U) und NADP<sup>+</sup> (300  $\mu$ M Endkonzentration) in KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) auf ein Endvolumen von 50 mL vorgelegt. Die Reaktion wurde bei 30 °C und 130 rpm geschüttelt und nach jeweils 0, 1, 3, 4, 5, 6, 8 und 24 h 200  $\mu$ L der Reaktion eine Probe entnommen. Diese Probe wurde mit 500 mL MTBE, welcher 2.5 mM 1-Hexanol an internen Standard enthält, extrahiert und mittels Gaschromatografie über chiraler, stationärer Phase untersucht. Die jeweiligen Trennprogramme wurden jeweils in der Synthesevorschrift der Homoallylalkohole angegeben.

##### 5.4.42.2 Oxidative kinetische Racematspaltung von Homoallylalkoholen im präparativen Maßstab

Die oxidative kinetische Racematspaltung von Alkoholen im präparativen Maßstab ist als Synthesevorschrift für das entsprechende Produkt im Abschnitt chemische Arbeiten (5.5) beschrieben.

## 5.5 Chemische Arbeiten

### 5.5.1 Allgemeine Geräte und Methoden

#### 5.5.1.1 Dünnschichtchromatografie (DC)

Für die Beobachtung von Reaktionsverläufen wurden Reaktionsproben mittels DC-Analyse kontrolliert. Dafür wurden *Polygram® SIL G/UV<sub>245</sub>* Dünnschichtchromatographiefolien von *Machery-Nagel* eingesetzt. Die Visualisierung der Verbindungen erfolgte durch Färbung mit Cer-Molybdat-Lösung (10 g Cerium(IV)sulfat-tetrahydrat, 25 g Phosphormolybdänsäure und 60 mL konzentrierte Schwefelsäure in 940 mL ddH<sub>2</sub>O) oder Anisaldehyd-Lösung (3 mL Anisaldehyd und 6 mL konzentrierte Schwefelsäure in 300 mL Eisessig) und anschließender Entwicklung durch Erhitzen mit einem Heißluftfön.

#### 5.5.1.2 Standard-Säulenchromatografie

Die säulenchromatografische Auftrennung von Substanzen erfolgte über Silikagel mit einer Partikelgröße von 40-63 µm.

#### 5.5.1.3 Drehwertbestimmung

Die spezifischen Drehwerte synthetisierter Verbindungen wurden an einem *PerkinElmer 341* und *Krüpps Optotronic* Polarimeter, unter Ausnutzung der Natrium D-Linie (589 nm), in einer 10 mm langen Zelle durchgeführt. Dafür wurde vorab eine bestimmte Menge der Verbindung in entsprechendem Lösungsmittel (meist CHCl<sub>3</sub>) gelöst. Es wurden mindestens 10 Messungen durchgeführt und der Mittelwert genommen. Die Angabe der Drehwerte erfolgte anhand der nachfolgenden Formel (Formel 5).

**Formel 5:** Formel zur Ermittlung des spezifischen Drehwertes.

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{\alpha}{d \cdot c}$$

$\alpha$  = Mittelwert der Drehwerte,  $d$  = Durchmesser der Küvette,  $c$  = Konzentration der Probe,  $T$  = Temperatur,  $\lambda$  = Wellenlänge.

#### 5.5.1.4 Infrarotspektroskopie (IR)

Für die Aufnahme von IR-Spektren wurden die Verbindungen als Film auf einem *PerkinElmer SpectrumOne* und *SpectrumTwo* untersucht. Die Lage der Absorptionsbanden wurden in cm<sup>-1</sup> angegeben.

#### 5.5.1.5 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR)

Die Aufnahme von <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C NMR Spektren erfolgten auf einem *Avance/DRX 600 NMR Spektrometer* von *Bruker* bei 600 und 151 MHz und Raumtemperatur. Dafür wurden die Verbindungen zuvor in deuteriertem Chloroform gelöst. Die chemischen Verschiebungen wurden in Relation zu den Lösungsmittelsignalen des Chloroforms [<sup>1</sup>H:  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) = 7.26 ppm] und [<sup>13</sup>C:  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) = 77.16 ppm]

für das zentrale Signal des Triplets, angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand von Kopplungskonstanten, als auch Dept- und 2D-Experimenten wie COSY und HSQC. Die Multiplizitäten der Signale wurden mit s für Singulett, brs für breites Singulett, d für Dublett, t für Triplett, q für Quartett und m für Multipllett angegeben.

#### 5.5.1.6 Massenspektrometrie (MS)

GC-MS (EI: 70 eV): Massenspektren von flüchtigen Verbindungen wurden mit Hilfe des *HP 6890 Series* Gaschromatographen von *Hewlett Packard*, ausgestattet mit einer *HP-5ms* Säule von *Agilent Technologies* (30 mm x 0.25 mm) und einem anschließenden Massendetektor (*Mass Selective Detector 5973*), aufgenommen. Die Proben wurden zuvor in MTBE gelöst (~1 mg/mL, HPLC-grade) und 1 µL Probe injiziert. Standard-Temperaturprogramm: 60 °C-1 min, 15 °C pro Minute bis 185 °C, 120 °C pro Minute bis 280 °C, 280 °C-5 min. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des *MSD Chem Station* Programms und die Angabe der Fragmente in Relation zum Basissignal.

Hochauflösende Massen (HRMS) wurden als Service der Zentralanalytik des Forschungszentrums Jülich (ZEA-3) in Anspruch genommen.

#### 5.5.1.7 Gaschromatografie (GC)

Für gaschromatografische Untersuchungen wurde ein *Trace GC* Gaschromatograph von *Thermo Finnigan*, oder ein *Trace GC Ultra* von *Thermo Scientific*, oder ein *GC-17* Gaschromatograph von *Shimadzu*, jeweils mit Flammenionisationsdetektor (FID), betrieben. Bei den verwendeten Säulen handelte es sich um die *FS-Lipodex G* (25 m x 0.25 mm, *Machery-Nagel*), *FS-Hydrodex-βTBDAC* (25 m x 0.25 mm, *Machery-Nagel*) oder *FS-Hydrodex-β3p* (25 m x 0.25 mm, *Machery-Nagel*) im Falle der Gaschromatographen von *Thermo Fisher* und um eine *CP-Chirasil-Dex CB* Säule (25m x 0.25 mm, *Varian*) im Falle des Gaschromatographen von *Shimadzu*. Injektion und Detektion auf dem Gaschromatographen von *ThermoFisher* erfolgten bei 210 ° und 220 °C und Helium (13 mL/min) diente als Trägergas. Injektion und Detektion auf dem Gaschromatographen von *Shimadzu* erfolgten bei 250 °C und H<sub>2</sub> (getrocknet) wurde mit variabler Flussrate als Trägergas für die *Thermo Fisher* Geräte verwendet. Proben wurden in MTBE gelöst (~1 mg/mL, HPLC-grade) und 1 µL Probe injiziert. Das Temperaturprogramm wurde in Abhängigkeit von der Substanz gewählt und ist gemeinsam mit den Retentionszeiten an entsprechender Stelle angegeben. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der beigelieferten *Thermo Scientific Chrom-Card* Software (Version 2.7) bzw. *Shimadzu CLASS VP<sup>TM</sup>*-Software (Version 4.3) des Herstellers.

#### 5.5.1.8 Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC)

HPLC-Messungen über chiraler stationärer Phase wurden auf einem *Dionex*-System, ausgerüstet mit einem *WPS-3000TSL* Autosampler und einem *DAD-3000* UV-Detektor, durchgeführt. Als Säule fungierte eine *Lux-Amylose-1* Säule (250 mm x 4.6 mm, *Phenomenex*) und als Lösungsmittel eine definierte Mischung aus *n*-Heptan und 2-Propanol bei einer Flussrate von 0.5 mL/min, bei

Raumtemperatur. Das Mischungsverhältnis der Lösungsmittel wurde in Abhängigkeit von der Substanz gewählt und ist gemeinsam mit den Retentionszeiten an entsprechender Stelle angegeben.

#### 5.5.1.9 Ermittlung von Umsätzen

Um die jeweiligen Umsätze einer Reaktion zu quantifizieren wurde vorab von dem zu untersuchenden Substrat eine Kalibrierkurve aufgenommen. Dafür wurden definierte Mengen oder Konzentrationen an Substrat in Lösungsmittel gelöst und mit einer fixen Menge an externem Standard versehen. Dieser sollte wiederum ähnliche Eigenschaften wie das Substrat aufweisen, allerdings nicht zur selben Retentionszeit wie Substrat oder Produkt eluieren. Steigende Konzentrationen an Substrat, mit fixer Menge an externem Standard, wurden anschließend gemeinsam über derselben stationären Phase getrennt, auf der später der Umsatz von Substrat zu Produkt beobachtet wird. Die Signalintensitäten aufsteigender Konzentrationen an Substrat wurden in Relation zu den Signalintensitäten des externen Standards gesetzt und somit eine Kalibriergerade erstellt. Abgebildet wurden auf dieser das theoretische Verhältnis von Substrat zu Standard (Y-Achse) gegen das tatsächlich gemessene Verhältnis der Signalintensitäten (X-Achse). Von jeder definierten Substratkonzentration wurden für die Kalibriergerade Mehrfachmessungen durchgeführt und der Mittelwert inklusive Standardabweichung ermittelt. In der zu untersuchenden Reaktion wurde schließlich das Substrat mit Lösungsmittel extrahiert, welche ebenfalls eine definierte Menge des Standards enthält. Anhand der anschließend ermittelten Verhältnisse der Signalintensitäten von Substrat und Standard, im Verlauf der Reaktion, konnten anhand der Kalibriergeraden definierte Stoffmengen zugeordnet werden und damit schlussendlich der Umsatz.

#### 5.5.1.10 Ermittlung von *ee*-Werten

Für die Ermittlung von *ee*-Werten wurden die betreffenden Enantiomere über chiraler stationärer Phase (GC oder HPLC) getrennt. Anhand der relativen Signalintensitäten konnte anschließend der Enantiomerenüberschuss bestimmt werden (Formel 6).

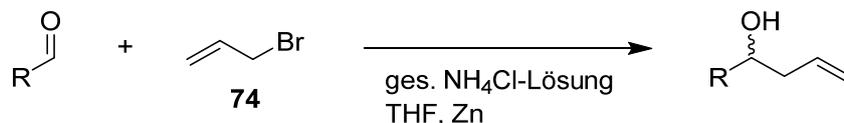
**Formel 6:** Formel zur Ermittlung von *ee*-Werten.

$$ee[\%] = \frac{SI(E1) - SI(E2)}{SI(E1) + SI(E2)} \cdot 100$$

*ee* = Enantiomerenüberschuss, SI = Signalintensität, E1 = überschüssiges Enantiomer, E2 = Enantiomer 2.

## 5.5.2 Chemische und biochemische Synthesen von Verbindungen

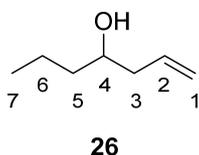
### Allgemeine Synthese von Homoallylalkoholen:



**Abbildung 85:** Allgemeine Synthese von Homoallylalkoholen nach Wilson *et al.*<sup>[313]</sup>

Die allgemeine Synthese von racemische Homoallylalkoholen erfolgte in Anlehnung an eine Vorschrift von Wilson *et al.* (Abbildung 85).<sup>[313]</sup> Es wurde in einem offenem 100-500 mL Rundkolben der entsprechend benötigte Aldehydvorläufer (1 Äq.) in gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (1 mL/mmol Aldehyd), zusammen mit THF (0.2 mL/mmol Aldehyd) vorgelegt. Zu der Lösung wurde Zinkpulver (1.6 Äq.) hinzugegeben und langsam unter Rühren Allylbromid **74** (1.5 Äq.) dazu getropft (Lösung erwärmt sich). Die Reaktion wurde für 160 min. bei Raumtemperatur gerührt und nach vollständigem Umsatz wurden die Feststoffe über Watte abfiltriert und die wässrige Phase 3x mit Essigsäureethylester (EE) extrahiert. Vereinigte organische Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel zum Erhalt des Rohproduktes unter reduziertem Druck entfernt. Die nachfolgende Aufreinigung der jeweiligen Homoallylalkohole erfolgte durch Vakuumdestillation, oder durch eine Chromatographiesäule und ist an der entsprechenden Stelle angegeben.

### Synthese von Hept-1-en-4-ol (**26**):



Racemisches Hept-1-en-4-ol (**26**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und anschließend mit Hilfe von fraktionierter Vakuumdestillation (3 mbar, ~53-55 °C Übergangstemperatur) aufgereinigt. Die Destillation lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 42 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[314]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (87:13)]= 0.2.

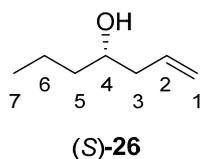
**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [cm<sup>-1</sup>]= 3355, 2964, 2929, 2874, 1643, 995, 912.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>7,6</sub> = 7.2 Hz, 3H, 7-H), 1.32 – 1.58 (m, 5H, 4-OH, 5-H, 6-H), 2.14 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.30 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.66 (m, 1H, 4-H), 5.09-5.16 (m, 2H, 1-H), 5.79-5.87 (m, 1H, 2-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.23 (C-7), 19.01 (C-6), 39.14 (C-5), 42.11 (C-3), 70.55 (C-4), 118.21 (C-1), 135.06 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%) = 55 (100), 57 (18), 73 (30).

### Synthese von (*S*)-Hept-1-en-4-ol [(*S*)-**26**]:



#### Brown-Allylierung:

Eine 5 mL (+)-*B*-Allyldiisopinocampheylboran-Lösung (5 mmol, 1 M in *n*-Pentan) wurde in 5 mL trockenem Diethylether gerührt und auf -78 °C gekühlt. Eine Lösung Butanal (**46**) (403 µL, 4.5 mmol) in 500 µL trockenem Diethylether wurde langsam dazu getropft. Das Gemisch wurde für eine Stunde gerührt und die Reaktion dabei langsam auf Raumtemperatur aufwärmen gelassen. 1.6 mL einer 3 M NaOH-Lösung und 650 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % (w/w)) wurden sukzessive hinzugefügt und die Lösung für eine Stunde refluxiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit H<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend unter reduziertem Druck eingengt. Die chromatographische Aufreinigung des Rohproduktes über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O, 87:13) lieferte das Produkt als farbloses Öl (118 mg, 1.03 mmol, 23 %, 95 % *ee*). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten und denen der racemischen Verbindung **26** überein.<sup>[315]</sup>

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12.3$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>, 95% *ee*)

**Literatur:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -12.7$  (c 0.53, CHCl<sub>3</sub>)

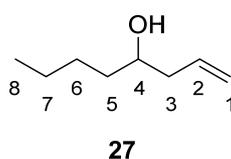
#### Oxidative kinetische Racematspaltung:

Ein 1 L Erlenmeyer Kolben wurde mit Hept-1-en-4-ol (**26**) (500 µL, 3.68 mmol), Aceton (5 % (v/v) Endkonzentration), ADH<sub>T</sub> (119 U) und NADP<sup>+</sup> (300 µM Endkonzentration) in KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) auf ein Gesamtvolumen von 250 mL befüllt. Die Reaktion wurde bei 30 °C und 130 rpm für 3.5 h geschüttelt und anschließend durch Zugabe von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gestoppt und extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingengt. Die folgende Chromatographie über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O, 87:13) lieferte das Produkt (*S*)-**26** als farbloses Öl (103 mg, 0.90 mmol, 24 %, 94 % *ee*). Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten, denen der Synthese mittels *Brown*-Allylierung und denen der racemischen Verbindung **26** überein.<sup>[315]</sup>

**Enantiomerenanalytik:**

Säule:	Hydrodex- $\beta$ TBDAC	
Temperaturprogramm:	40 °C (5 min), 1 °C/min $\rightarrow$ 75 °C, 10 °C/min $\rightarrow$ 150 °C	
Retentionszeiten:	$t_R = 36$ min	( <i>R</i> )-Hept-1-en-4-ol [( <i>R</i> )- <b>26</b> ]
	$t_R = 35$ min	( <i>S</i> )-Hept-1-en-4-ol [( <i>S</i> )- <b>26</b> ]

**Synthese von Oct-1-en-4-ol (27):**



Racemisches Oct-1-en-4-ol (**27**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und anschließend mit Hilfe von fraktionierter Vakuumdestillation (1 mbar, ~63 °C Übergangstemperatur) aufgereinigt. Die Destillation lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 6 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[316]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EtOAc(90:10)]= 0.38.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 912, 995, 1641, 2860, 2929, 3340.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.91 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7.2 Hz, 3H, 8-H), 1.26 – 1.53 (m, 7H, 4-OH, 5-H, 6-H, 7-H), 2.14 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.31 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.65 (m, 1H, 4-H), 5.14 (m, 2H, 1-H), 5.83 (m, 1H, 2-H).

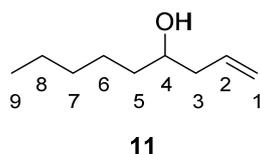
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.1 (C-8), 22.7 (C-7), 27.9 (C-6), 36.5 (C-5), 42.0 (C-3), 70.7 (C-4), 118.1 (C-1), 134.9 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%) = 57 (12), 69 (100), 87 (50).

**Enantiomerenanalytik:**

Säule:	Lipodex G	
Temperaturprogramm:	40 °C (120 min), 1 °C/min $\rightarrow$ 80 °C (0 min), 20 °C/min $\rightarrow$ 150 °C (2 min)	
Retentionszeiten:	$t_R = 108.5$ min	( <i>R</i> )-Oct-1-en-4-ol [( <i>R</i> )- <b>27</b> ]
	$t_R = 111.5$ min	( <i>S</i> )-Oct-1-en-4-ol [( <i>S</i> )- <b>27</b> ]

### Synthese von Non-1-en-4-ol (**11**):



Racemisches Non-1-en-4-ol (**11**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und anschließend mit Hilfe von fraktionierter Vakuumdestillation (50 mbar, ~58 °C Übergangstemperatur) aufgereinigt. Die Destillation lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 58 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[300]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (95:5)]= 0.21.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 911, 865, 726, 865, 911, 994, 1026, 1124, 1378, 1459, 1641, 2860, 2929, 2957, 3078, 3350.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>9,8</sub> = 7.2 Hz, 3H, 8-H), 1.24-1.39 (m, 5H, 6-H<sub>a</sub>, 7-H, 8-H), 1.40-1.51 (m, 3H, 5-H, 6-H<sub>b</sub>), 1.54-1.60 (m, 1H, 4-OH), 2.14 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.30 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.65 (m, 1H, 4-H), 5.14 (m, 2H, 1-H), 5.83 (m, 1H, 2-H).

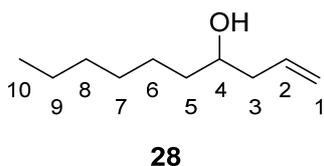
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.2 (C-9), 22.8 (C-8), 25.5 (C-6), 32.0 (C-7), 36.9 (C-5), 42.1 (C-3), 70.9 (C-4), 118.2 (C-1), 135.1 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%) = 55 (98), 57 (14), 71 (12), 83 (100), 101 (49).

### Enantiomerenanalytik:

Säule:	CP-Chirasil-Dex CB	
Temperaturprogramm:	60 °C (5 min), 5 °C/min → 100 °C (10 min), 20 °C /min → 150 °C (5 min)	
Retentionszeiten:	<i>t<sub>R</sub></i> = 21.4 min	( <i>R</i> )-Non-1-en-4-ol [( <i>R</i> )- <b>11</b> ]
	<i>t<sub>R</sub></i> = 20.7 min	( <i>S</i> )-Non-1-en-4-ol [( <i>S</i> )- <b>11</b> ]

**Synthese von Dec-1-en-4-ol (28):**



Racemisches Dec-1-en-4-ol (**28**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und anschließend mit Hilfe von fraktionierter Vakuumdestillation (50 mbar, 55-72 °C Übergangstemperatur) aufgereinigt. Die Destillation lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 40 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[317]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (90:10)]= 0.42.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 911, 993, 2856, 2906, 3345.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>10,9</sub> = 6.8 Hz, 3H, 10-H), 1.24-1.38 (m, 7H, 6-H<sub>a</sub>, 7-H, 8-H, 9-H), 1.39-1.51 (m, 3H, 5-H, 6-H<sub>b</sub>), 2.14 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.30 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.65 (m, 1H, 4-H), 5.14 (m, 2H, 1-H), 5.83 (m, 1H, 2-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.1 (C-10), 22.6 (C-9), 25.6 (C-6), 29.3, 31.8 (C-7, C-8), 36.9 (C-5), 42.0 (C-3), 70.7 (C-4), 118.1 (C-1), 134.9 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%) = 55 (100), 69 (25), 97 (85), 115 (30).

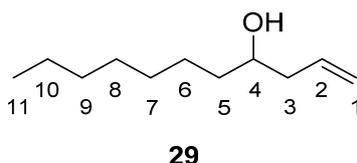
**Enantiomerenanalytik:**

---

Säule:	FS-Hydrodex $\beta$ 3P	
Temperaturprogramm:	60 °C (5 min), 1 °C/min $\rightarrow$ 150 °C (5 min)	
Retentionszeiten:	$t_R$ = 52.5 min	( <i>R</i> )-Dec-1-en-4-ol [( <i>R</i> )- <b>28</b> ]
	$t_R$ = 51.5 min	( <i>S</i> )-Dec-1-en-4-ol [( <i>S</i> )- <b>28</b> ]

---

### Synthese von Undec-1-en-4-ol (**29**):



Racemisches Undec-1-en-4-ol (**29**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und anschließend mit Hilfe von fraktionierter Vakuumdestillation (50 mbar, 86 °C Übergangstemperatur) aufgereinigt. Die Destillation lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 53 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[318]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (90:10)]= 0.44.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 911, 993, 2852, 2924, 3339.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>11,10</sub> = 6.9 Hz, 3H, 11-H), 1.21-1.38 (m, 9H, 6-H<sub>a</sub>, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H) 1.39-1.51 (m, 3H, 5-H, 6-H<sub>b</sub>), 2.14 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.31 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.65 (m, 1H, 4-H), 5.14 (m, 2H, 1-H), 5.83 (m, 1H, 2-H).

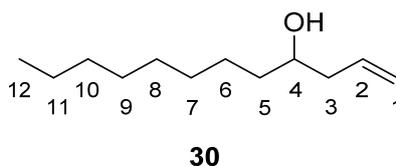
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.1 (C-11), 22.7 (C-10), 25.7 (C-6), 29.3, 29.6, 31.8 (C-7, C-8, C-9), 36.8 (C-5), 42.0 (C-3), 70.7 (C-4), 118.1 (C-1), 134.9 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 55 (45), 69 (100), 111 (25), 129 (20).

### Enantiomerenanalytik:

Säule:	FS-Hydrodex $\beta$ 3P	
Temperaturprogramm:	60 °C (5 min), 1 °C/min $\rightarrow$ 150 °C (5 min)	
Retentionszeiten:	$t_R$ = 63.5 min	( <i>R</i> )-Undec-1-en-4-ol [( <i>R</i> )- <b>29</b> ]
	$t_R$ = 62.4 min	( <i>S</i> )-Undec-1-en-4-ol [( <i>S</i> )- <b>29</b> ]

**Synthese von Dodec-1-en-4-ol (30):**



Racemisches Dodec-1-en-4-ol (**30**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und anschließend mit Hilfe von fraktionierter Vakuumdestillation (50 mbar, 85-110 °C Übergangstemperatur) aufgereinigt. Die Destillation lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 26 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[319]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (90:10)]= 0.51.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [cm<sup>-1</sup>]= 722, 912, 994, 1465, 1641, 2854, 2923, 3343.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>12,11</sub> = 6.9 Hz, 3H, 12-H), 1.20-1.38 (m, 12H, 6-H<sub>a</sub>, 7-H, 8-H, 9-H, 10-H, 11-H), 1.39-1.50 (m, 3H, 5-H, 6-H<sub>b</sub>), 2.14 (m, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.30 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.64 (m, 1H, 4-H), 5.14 (m, 2H, 1-H), 5.83 (m, 1H, 2-H).

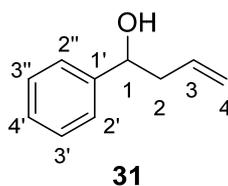
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.1 (C-12), 22.7 (C-11), 25.7, 29.3, 29.6, 29.7, 31.9 (C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), 36.9 (C-5), 42.0 (C-3), 70.7 (C-4), 118.1 (C-1), 134.9 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 55 (50), 57 (25), 69 (100), 83 (70), 143 (30).

**Enantiomerenanalytik:**

Säule:	FS-Hydrodex $\beta$ 3P	
Temperaturprogramm:	60 °C (5 min), 1 °C/min $\rightarrow$ 150 °C (5 min)	
Retentionszeiten:	$t_R = 74.3$ min	( <i>R</i> )-Dodec-1-en-4-ol [( <i>R</i> )- <b>30</b> ]
	$t_R = 73.4$ min	( <i>S</i> )-Dodec-1-en-4-ol [( <i>S</i> )- <b>30</b> ]

### Synthese von 1-Phenylbut-3-en-1-ol (**31**):



Racemisches 1-Phenylbut-3-en-1-ol (**31**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und die Reaktionslösung anschließend über Watte filtriert und die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Vereinigte organische Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und die Produkte anschließend säulenchromatografisch über Silikagel aufgetrennt (PE:EE 95:5). Die Säulenchromatografie lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 74 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[320]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (95:5)]= 0.11.

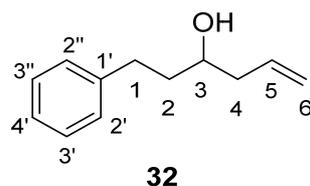
**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [cm<sup>-1</sup>]= 700, 757, 915, 1047, 1217, 1366, 1739, 3026, 3387.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 2.52 (m, 2H, 2-H), 4.75 (dd, <sup>3</sup>J<sub>1,2a</sub> = 5.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1,2b</sub> = 7.9 Hz, 1H, 1-H), 5.14 (dd, <sup>2</sup>J<sub>4a,4b</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4a,3</sub> = 10.0 Hz, 1H, 4-H<sub>a</sub>), 5.17 (dd, <sup>2</sup>J<sub>4b,4a</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4b,3</sub> = 17.2 Hz, 1H, 4-H<sub>b</sub>), 5.82 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 7.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4a</sub> = 10.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4b</sub> = 17.2 Hz, 1H, 3-H), 7.27-7.38 (m, 5H, 2'-H, 2''-H, 3'-H, 3''-H, 4'-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 44.0 (C-2), 73.4 (C-1), 118.6 (C-4), 126.0, 127.7, 128.6 (C-2', C-2'', C-3', C-3'', C-4'), 134.6 (C-3), 144.0 (C-1').

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 77 (45), 79 (80), 107 (100).

**Synthese von 1-Phenylhex-5-en-3-ol (32):**



Racemisches 1-Phenylbut-3-en-1-ol (**31**) wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Wilson *et al.*<sup>[313]</sup> synthetisiert und die Reaktionslösung anschließend über Watte filtriert und die wässrige Phase dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Vereinigte organische Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und die Produkte anschließend säulenchromatografisch über Silikagel aufgetrennt (PE:EE 92:8). Die Säulenchromatografie lieferte das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit in 75 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[317]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (92:8)] = 0.22.

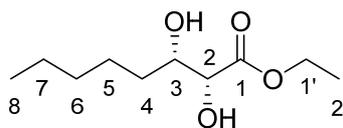
**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [cm<sup>-1</sup>] = 699, 747, 915, 994, 1047, 1217, 1366, 1454, 1496, 1738, 2928, 3026, 3358.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm] = 1.79 (m, 2H, 1-H), 2.19 (m, 1H, 4-H<sub>a</sub>), 2.33 (m, 1H, 4-H<sub>b</sub>), 2.69 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2a,3</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2a,1a</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2a,1b</sub> = 13.7 Hz, 1H, 2-H<sub>a</sub>), 2.81 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2b,3</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2b,1b</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2a,1a</sub> = 13.7 Hz, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 3.68 (tt, <sup>3</sup>J<sub>3,4b</sub> = 4.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 7.5 Hz, 1H, 3-H), 5.15 (m, 2H, 6-H), 5.82 (m, 1H, 5-H), 7.17-7.31 (m, 5H, 2'-H, 2''-H, 3'-H, 3''-H, 4'-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm] = 32.2 (C-2), 38.6 (C-1), 42.2 (C-4), 70.1 (C-3), 117.4 (C-6), 126.0, 128.6 (C-2', C-2'', C-3', C-3'', C-4'), 134.7 (C-5), 142.2 (C-1').

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%) = 91 (100), 92 (18), 117 (60), 135 (45).

### Synthese von Ethyl-(3*S*,4*S*)-dihydroxyoctansäure (**17**):



**17**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Miura *et al.*<sup>[234]</sup> wurden in einem 250 mL Rundkolben mit Magnetrührer 45 mL *tert*-BuOH und 40 mL ddH<sub>2</sub>O vorgelegt und mit 16.4 g AD-Mix  $\alpha$  versetzt und bei Raumtemperatur heftig gerührt. Es wurden 2.0 g (11.8 mmol) (*2E*)-Oct-2-ensäureethylester zur Reaktion gegeben und diese für 18 Stunden weiter heftig gerührt. Die Reaktion wurde mit 17.8 g Natriumsulfit gequenched und anschließend mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatografische Aufreinigung des Produktes über Silikagel (PE:EE 75:25) lieferte das Produkt **17** (2.3 g, 11.5 mmol) in 98 % Ausbeute und >99% *ee*. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[234]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (75:25)]= 0.17.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 866, 1028, 1093, 1136, 1207, 1370, 1733, 2859, 2929, 3424.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 7.0 Hz, 3H, 8-H), 1.21-1.42 (m, 8H, 2'-H, 5-H<sub>a</sub>, 6-H, 7-H), 1.43-1.51 (m, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 1.54-1.64 (m, 2H, 4-H), 1.95-2.15 (brs, 1H, 3-OH), 3.08-3.24 (brs, 1H, 2-OH), 3.87 (m, 1H, 3-H), 4.07 (s, 1H, 2-H), 4.28 (q, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.0 Hz, 2H, 1'-H).

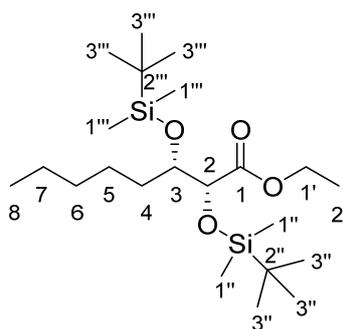
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.1 (C-8), 14.3 (C-2'), 22.7, 31.8 (C-6, C-7), 25.5 (C-5), 33.9 (C-4), 62.2 (C-1'), 72.7 (C-3), 73.2 (C-2), 173.8 (C-1).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%)= 55 (15), 76 (82), 104 (100).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 11.0$  (c 1.45, CHCl<sub>3</sub>).

**Literatur:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 14.4$  (c 1.00, EtOH).<sup>[234]</sup>

**Synthese von (2*R*,3*S*)-2,3-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)octansäureethylester (**18**):**



**18**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Miura *et al.*<sup>[234]</sup> wurden in einem sekurierten 250 mL Schlenkcolben 104 mL wasserfreies CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 1.0 g (4.9 mmol) Diol **17** vorgelegt. Der Reaktionslösung wurden 3.4 mL frisch destilliertes 2,6-Lutidin hinzugefügt und diese anschließend auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden langsam 3.2 mL TBS-Triflat dazu getropft und langsam auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Nach 18 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von NaCl gequenched und mit ddH<sub>2</sub>O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Vereinigte organische Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, der Feststoff abfiltriert und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatografische Aufreinigung des Rohproduktes über Silikagel (PE:EE 98.5:1.5) lieferte das Produkt **18** (2.0 g, 4.7 mmol) in 96 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[234]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (98.5:1.5)] = 0.16.

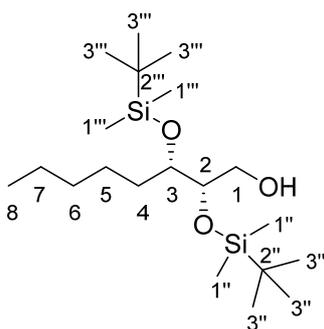
**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>] = 673, 776, 836, 901, 1032, 1104, 1251, 1362, 1463, 1736, 2858, 2929.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm] = 0.04 (s, 6H, 1''-H, 1'''-H), 0.05 (s, 3H, 1'''-H), 0.07 (s, 3H, 1''-H), 0.87 (s, 9H, 3'''-H), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>8,7</sub> = 6.9 Hz, 3H, 8-H), 0.91 (m, 9H, 3''-H), 1.16-1.38 (m, 11H, 2'-H, 4-H<sub>a</sub>, 5-H, 6-H, 7-H), 1.71 (m, 1H, 4-H<sub>b</sub>) 3.83 (m, 1H, 3-H), 4.15 (m, 3H, 1'-H, 2-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm] = -5.0, -4.7, -4.3, -4.2 (C-1'', C-1'''), 14.2 (C-8), 14.4 (C-2'), 18.2, 18.4 (C-2'', C-2'''), 22.8, 25.6, 32.0 (C-5, C-6, C-7), 25.9, 25.9 (C-3'', C-3'''), 32.7 (C-4), 60.6 (C-1'), 74.7 (C-3), 75.0 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%) = 73 (75), 75 (18), 133 (18), 147 (20), 187 (18), 216 (20).

### Synthese von (2*S*,3*S*)-2,3-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)octan-1-ol (**19**):



**19**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Miura *et al.*<sup>[234]</sup>, wurden in einem sekurierten 250 mL Schlenkcolben 126 mg (290  $\mu$ mol) des geschützten Diols **18** in 2.5 mL wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  vorgelegt und auf  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Es wurden langsam 1.2 mL DIBALH (1 M in Cyclohexan, 0.8 mmol) hinzuge tropft und die Reaktionslösung über Nacht auf Raumtemperatur aufwärmen gelassen. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Rochette-Salzlösung gequenched und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung und ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Der Feststoff wurde über Watte und Celite abfiltriert und die verbliebenen organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatografische Aufreinigung des Produktes über Silikagel (PE:EE 96:4) lieferte das Produkt **19** (110 mg, 280  $\mu$ mol) in 97 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[234]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (96:4)]= 0.33.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]= 699, 776, 837, 914, 1031, 1217, 1252, 1365, 1455, 1737, 2857, 2929, 3378.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.07 (s, 3H, 1'''-H), 0.08 (s, 3H, 1''-H), 0.09 (s, 6H, 1''-H, 1'''-H) 0.89 (m, 21H, 3''-H, 3'''-H, 8-H), 1.16-1.37 (m, 6H, 4-H<sub>a</sub>, 5-H<sub>a</sub>, 6-H, 7-H), 1.46 (m, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 1.68 (m, 1H, 4-H<sub>b</sub>), 2.33 (brs, 1H, 1-OH), 3.57 (dd, <sup>2</sup>J<sub>1a,1b</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1a,2</sub> = 5.7 Hz, 1H, 1-H<sub>a</sub>), 3.65 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>3,4a</sub> = 10.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 4.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4b</sub> = 2.8 Hz, 1H, 3-H), 3.74 (dd, <sup>2</sup>J<sub>1b,1a</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>1b,2</sub> = 5.7 Hz, 1H, 1-H<sub>b</sub>), 3.77 (dt, <sup>3</sup>J<sub>2,1a</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,1b</sub> = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 4.0 Hz, 1H, 2-H).

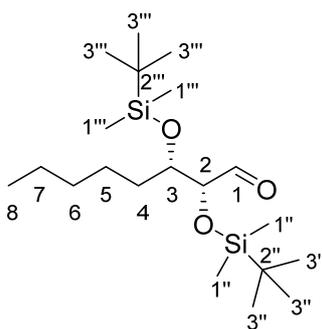
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= -4.5, -4.5, -4.4, -4.1 (C-1'', C-1'''), 14.2 (C-8), 18.1, 18.1(C-2'', C-2'''), 22.7, 32.0 (C-6, C-7), 25.9, 26.0 (C-3'', C-3'''), 26.4 (C-5), 30.6 (C-4), 63.1 (C-1), 73.9 (C-2), 75.6 (C-3).

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 91 (100), 92 (18), 117 (48), 135 (35).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -32.8$  (c 1.12,  $\text{CHCl}_3$ ).

**Literatur:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.0$  (c 1.05,  $\text{CHCl}_3$ ).<sup>[234]</sup>

**Synthese von (2*R*,3*S*)-2,3-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)octan-1-on (20):**



**20**

In einem Schlenkkolben wurden 0.5 g (1.3 mmol) des geschützten primären Alkohols **19** in 13.5 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> vorgelegt und mit 0.8 g (1.2 mmol) Dess-Martin Periodan versetzt. Die Reaktion wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach vollständigem Umsatz mit 10 mL gesättigter Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung und 10 mL Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung gequenched und weitere 30 min heftig gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und vereinigte organische Phasen mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, über Watte und Celite filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (PE:EE 98:2) lieferte das Produkt **20** (0.5 g, 1.2 mmol) in 90 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[234]</sup>

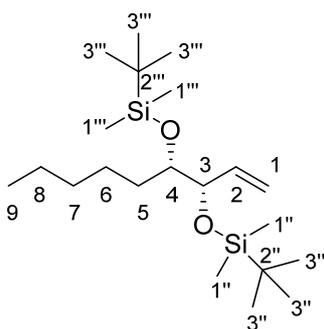
**R<sub>f</sub>-Wert:** [PE:EE (98:2)]= 0.44.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 775, 837, 1128, 1738, 2858, 2930.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.04 (s, 3H, 1'''-H), 0.07 (s, 6H, 1''-H, 1'''-H), 0.08 (1''-H), 0.88 (m, 12H, 3'''-H, 8-H), 0.92 (s, 9H, 3''-H), 1.18-1.34 (m, 6H, 4-H<sub>a</sub>, 5-H<sub>a</sub>, 6-H, 7-H), 1.38 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>5b,4a</sub> = 5.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5b,6</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5b,4b</sub> = 13.2 Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 1.72 (ddt, <sup>2</sup>J<sub>4b,4a</sub> = 4.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4b,3</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4b,5b</sub> = 13.2 Hz, 1H, 4-H<sub>b</sub>), 3.86 (dt, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 4.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4b</sub> = 9.0 Hz, 1H, 3-H), 4.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 4.5 Hz, 1H, 2-H), 9.76 (s, 1H, 1-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= -5.2, -4.6, -4.5, -3.6 (C-1'', C-1'''), 14.0 (C-8), 18.0, 18.3 (C-2'', C-2'''), 22.5, 31.7 (C-6, C-7), 25.6 (C-5), 25.7, 25.7 (C-3'', C-3'''), 32.6 (C-4), 74.6 (C-3), 80.0 (C-2), 203.9 (C-1).

### Synthese von (3*S*,4*S*)-3,4-Bis(*tert*-butyldimethylsilyloxy)non-1-en (**21**):

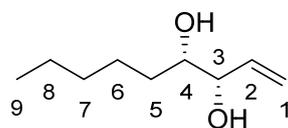


**21**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Miura *et al.*<sup>[234]</sup> wurden in einem sekurierten 25 mL Schlenkkolben 200 mg (510  $\mu$ mol) des Aldehyds **20** in einem Gemisch (3:1:0.03) aus 7.8 mL trockenem Toluol, 2.6 mL trockenem THF und 78  $\mu$ L trockenem Pyridin vorgelegt und auf -70 °C gekühlt. Es wurden vorsichtig 1.2 mL Tebbe-Reagenz (0.5 M in Toluol, 0.6 mmol) hinzugegeben und die Reaktion für drei Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 mL Triethylamin und 10 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Gasentwicklung!) gequenchet und anschließend mit MTBE extrahiert. Vereinigte organische Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung und ddH<sub>2</sub>O gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Der Feststoff wurde über Watte und Celite abfiltriert und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan  $\rightarrow$  *n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 98:2) lieferte das Produkt **21** (81 mg, 0.2 mmol) in 41 % Ausbeute. Das erhaltene Produkt wurde anschließend sofort für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (98:2)]= 0.87.

### Synthese von (3*S*,4*S*)-Non-1-en-3,4-diol [(3*S*,4*S*)-**12**]:



**(3*S*,4*S*)-12**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Miura *et al.*<sup>[234]</sup> wurden 81 mg (0,2 mmol) des terminalen Olefins **21** in einem Schlenkkolben vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden langsam 0.63 mL TBAF-Lösung (1 M in THF, 0.63 mmol) dazu getropft und die Reaktion über 12 Stunden auf Raumtemperatur aufwärmen gelassen. Die Reaktion wurde mit gesättigter Ammoniumchloridlösung verdünnt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Vereinigte organische Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung und ddH<sub>2</sub>O gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Der Feststoff wurde über Watte und Celite abfiltriert und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Die

Material und Methoden  
Chemische Arbeiten

säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan:EE 75:25) lieferte das Produkt [(3*S*,4*S*)-**12**] (26 mg, 0.2 mmol) in 78 % Ausbeute. Die analytischen Daten stimmen mit den Literaturdaten überein.<sup>[234]</sup>

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:EE (75:25)]= 0.37.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 726, 923, 991, 1049, 1378, 1737, 2860, 2930, 3365.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.89 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 6.9 Hz, 3H, 9-H), 1.21-1.55 (m, 8H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H), 2.11 (brs, 1H, 4-OH), 2.15 (brs, 1H, 3-OH), 3.48 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5a</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>4,3</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>4,5b</sub> = 9.3 Hz, 1H, 4-H), 3.94 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>3,2</sub> = 6.1 Hz, 1H, 3-H), 5.31 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>1a,1b</sub> = 1.3 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>1a,3</sub> = 1.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>1a,2</sub> = 10.4 Hz, 1H, 1-H<sub>a</sub>), 5.36 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>1b,1a</sub> = 1.3 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>1b,3</sub> = 1.3 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>1b,2</sub> = 17.0 Hz, 1H, 1-H<sub>b</sub>), 5.87 (dddd, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2,1a</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2,1b</sub> = 17.0 Hz).

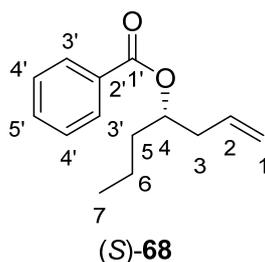
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.0 (C-9), 22.6, 31.8 (C-7, C-8), 25.3 (C-6), 32.9 (C-5), 74.4 (C-4), 76.2 (C-3), 117.4 (C-1), 137.7 (C-2).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%)= 55 (75), 57 (33), 58 (100), 69 (8), 83 (33), 101 (7).

**Isomerenanalytik:**

Säule:	FS-Hydrodex $\beta$ -TbDAc	
Temperaturprogramm:	100 °C (60 min), 1 °C/min $\rightarrow$ 120 °C (5 min)	
Retentionszeiten:	<i>t</i> <sub>R</sub> = 67.2 min	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-Non-1-en-3,4-diol [(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )- <b>12</b> ]
	<i>t</i> <sub>R</sub> = 69.6 min	(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )-Non-1-en-3,4-diol [(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> )- <b>12</b> ]
	<i>t</i> <sub>R</sub> = 72.4 min	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> )- bzw. (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-Non-1-en-3,4-diol [ <i>anti</i> - <b>12</b> ]
	<i>t</i> <sub>R</sub> = 74.4 min	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> )- bzw. (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-Non-1-en-3,4-diol [ <i>anti</i> - <b>12</b> ]

### Synthese von (*S*)-Hept-1-en-4-ylbenzoesäureethylester [(*S*)-68]:



Zu einer Lösung von (*S*)-26 (150 mg, 1.31 mmol) in 5 mL trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, wurden langsam 198 µL Benzoylchlorid (1.71 mmol) und 179 µL Pyridin (2.23 mmol) getropft und die Reaktion anschließend bei Raumtemperatur für 24 Stunden weiter gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Vereinigte organische Phasen wurden mit gesättigter Kupfer-(II)-Sulfat Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Der Feststoff wurde über Watte und Celite abfiltriert und die organische Phase am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 98:2) lieferte das Produkt (*S*)-68 (254 mg, 1.16 mmol) in 89 % als farbloses Öl.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (98:2)]= 0.23.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 2959, 2929, 2866, 1713, 1269, 1111, 710.

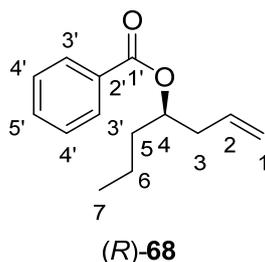
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.93 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>1,2</sub> = 7.4 Hz, 3H, 7-H), 1.34-1.49 (m, 2H, 6-H), 1.59-1.75 (m, 2H, 5-H), 2.45 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>3,2</sub> = 7.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>3,4</sub> = 5.9 Hz, 2H, 3-H), 5.06 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>1a,1b</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>1a,2</sub> = 10.1Hz, 2H, 1-H<sub>a</sub>), 5.11 (dt <sup>2</sup>*J*<sub>1b,1a</sub> = 1.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>1b,2</sub> = 17.2Hz, 2H, 1-H<sub>b</sub>), 5.78-5.87 (ddt, <sup>3</sup>*J*<sub>2,1b</sub> = 17.2Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2,1a</sub> = 10.1Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>2,3</sub> = 7.2Hz, 1H, 2-H), 7.40-7.45 (m, 2H, 4'-H<sub>a</sub>,4'-H<sub>b</sub>), 7.52-7.56 (m, 1H, 5'-H), 8.00-8.04 (m, 2H, 3'-H<sub>a</sub>, 3'-H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.11 (C-7), 18.77 (C-6), 36.01 (C-5), 38,89 (C-5), 73.98 (C-4), 117.87 (C-1), 128.45 (C-4'), 129.69 (C-3') 130.94 (C-2'), 132.87 (C-5'), 133.89 (C-2), 166.38 (C-1').

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%)= 77 (35), 105 (100).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +15.7$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>, 95% *ee*).

**Synthese von (*R*)-Hept-1-en-4-ylbenzoesäureethylester [(*R*)-68]:**



In einem Schlenkkolben wurden 116 mg (950  $\mu\text{mol}$ ) Benzoesäure in 5 mL trockenem THF gelöst und mit 251 mg (0.96 mmol) Triphenylphosphin und 100 mg (880  $\mu\text{mol}$ ) (*S*)-Hept-1-en-4-ol [(*S*)-26] versetzt, bevor die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt wurden. Anschließend wurden 188  $\mu\text{L}$  (950  $\mu\text{mol}$ ) DIAD langsam, unter Rühren, zur Reaktionslösung getropft und die Reaktion auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Nach 4.5 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ -Lösung gestoppt und die organische Phase mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung und  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen. Vereinigte organische Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und der Feststoff anschließend über Watte und Celite abfiltriert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt und die folgende säulenchromatografische Aufreinigung des Produktes über Silikagel (*n*-Pentan: $\text{Et}_2\text{O}$  98:2) lieferte das Produkt (*R*)-68 (159 mg, 730  $\mu\text{mol}$ ) als farbloses Öl in 83 % Ausbeute. Die erfolgreiche Invertierung des stereogenen Zentrums wurde mittels HPLC über chiraler stationärer Phase bestätigt.

**$R_f$ -Wert:** [*n*-Pentan: $\text{Et}_2\text{O}$  (98:2)]= 0.23.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]= 2959, 2929, 2866, 1713, 1269, 1111, 710.

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ [ppm]= 0.93 (t,  $^3J_{1,2} = 7.4$  Hz, 3H, 7-H), 1.34-1.49 (m, 2H, 6-H), 1.59-1.75 (m, 2H, 5-H), 2.45 (dd,  $^3J_{3,2} = 7.2$  Hz,  $^3J_{3,4} = 5.9$  Hz, 2H, 3-H), 5.06 (dt,  $^2J_{1a,1b} = 1.6$  Hz,  $^3J_{1a,2} = 10.1$  Hz, 2H, 1- $\text{H}_a$ ), 5.11 (dt  $^2J_{1b,1a} = 1.6$  Hz,  $^3J_{1b,2} = 17.2$  Hz, 2H, 1- $\text{H}_b$ ), 5.78-5.87 (ddt,  $^3J_{2,1b} = 17.2$  Hz,  $^3J_{2,1a} = 10.1$  Hz,  $^3J_{2,3} = 7.2$  Hz, 1H, 2-H), 7.40-7.45 (m, 2H, 4'- $\text{H}_a$ , 4'- $\text{H}_b$ ), 7.52-7.56 (m, 1H, 5'-H), 8.00-8.04 (m, 2H, 3'- $\text{H}_a$ , 3'- $\text{H}_b$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$ [ppm]= 14.11 (C-7), 18.77 (C-6), 36.01 (C-5), 38.89 (C-5), 73.98 (C-4), 117.87 (C-1), 128.45 (C-4'), 129.69 (C-3'), 130.94 (C-2'), 132.87 (C-5'), 133.89 (C-2), 166.38 (C-1').

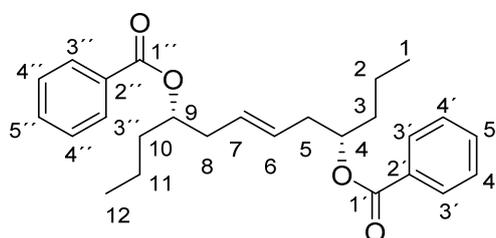
**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 77 (35), 105 (100).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 17,4$  (c 1.0,  $\text{CHCl}_3$ , 94% *ee*).

## Enantiomerenanalytik:

Säule:	Lux-Amylose 1	
Elutionsprogramm:	<i>n</i> -Heptan/2-Propanol (99.8:0.2) als Lösungsmittel mit einer Flussrate von 0.5 mL/min	
Retentionszeiten:	$t_R = 11.78$ min	( <i>S</i> )-Hept-1-en-4-ylbenzoat [( <i>S</i> )- <b>68</b> ]
	$t_R = 13.13$ min	( <i>R</i> )-Hept-1-en-4-ylbenzoat [( <i>R</i> )- <b>68</b> ]

## Synthese von (4*S*,6*E*,9*S*)-Dodec-6-en-4,9-diylidibenzoessäureethylester [(4*S*,6*E*,9*S*)-**69**]:



(4*S*,6*E*,9*S*)-**69**

In einem Schlenkkolben wurden 151 mg (690  $\mu$ mol) des Benzoyl-geschützten (*S*)-Hept-1-en-4-ol [(*S*)-**68**] in 5 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  vorgelegt und 30 mg (30  $\mu$ mol) Grubbs Katalysator der zweiten Generation dazu gegeben. Die Reaktion wurde auf 40 °C aufgewärmt und für 24 Stunden gerührt. Der Reaktionsansatz wurde über Watte und Celite filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 94:6) lieferte das Produkt (4*S*,6*E*,9*S*)-**69** (116 mg, 280  $\mu$ mol) in 83 % Ausbeute als farbloses Öl.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (94:6)]= 0.23.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [cm<sup>-1</sup>]= 2958, 2873, 1714, 1451, 1270, 1111, 710.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.82-0.93 (m, 6H, 1-H, 12-H), 1.23-1.45 (m, 4H, 2-H, 11-H), 1.51-1.70 (m, 4H, 3-H, 10-H), 2.33-2.53 (m, 4H, 5-H, 8-H), 5.12 (m, 2H, 4-H, 9-H), 5.53 (m, 2H, 6-H, 7-H), 7.40-7.45 (m, 4H, 4'-H<sub>a</sub>, 4'-H<sub>b</sub>, 4''-H<sub>a</sub>, 4''-H<sub>b</sub>), 7.52-7.56 (m, 2H, 5'-H, 5''-H), 8.00-8.04 (m, 4H, 3'-H<sub>a</sub>, 3'-H<sub>b</sub>, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>).

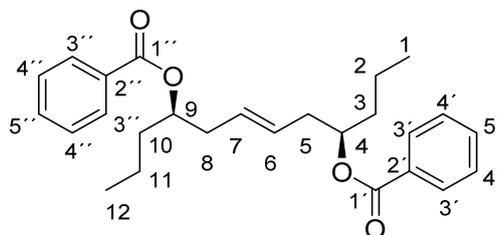
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.07 (C-1, C-12), 18.73 (C-2, C-11), 35.76 (C-3, C-10), 37.56 (C-5, C-8), 74.19 (C-4, C-9), 128.43 (C-4', C-4''), 128.60 (C-6, C-7), 129.66 (C-3', C-3''), 130.88 (C-2', C-2''), 132.86 (C-5', C-5''), 166.31 (C-1', C-1'').

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 77(40), 105 (100).

**HRMS:**  $m/z = 409.2374$  (kalkuliert für  $C_{26}H_{33}O_4^+$  409.2373).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = 19.5$  (c 0.7,  $CHCl_3$ ).

**Synthese von (4*R*,6*E*,9*R*)-Dodec-6-en-4,9-diyldibenzoessäureethylester [(4*R*,6*E*,9*R*)-69]:**



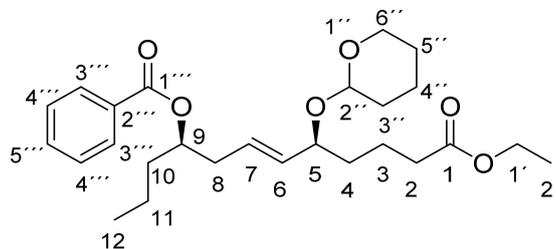
(4*R*,6*E*,9*R*)-69

In einem Schlenk Kolben wurden 150 mg (690  $\mu$ mol) des Benzoyl-geschützten (*R*)-Hept-1-en-4-ol [(*R*)-68] in 5 mL trockenem  $CH_2Cl_2$  vorgelegt und 30 mg (30  $\mu$ mol) Grubbs Katalysator der zweiten Generation dazu gegeben. Die Reaktion wurde auf 40 °C aufgewärmt und für 24 Stunden gerührt. Der Reaktionsansatz wurde über Watte und Celite filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 94:6) lieferte das Produkt (4*R*,6*E*,9*R*)-69 (121 mg, 280  $\mu$ mol) in 86 % Ausbeute als farbloses Öl.

Die analytischen Daten stimmen mit denen des Enantiomers (4*S*,6*E*,9*S*)-69 überein.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = +28.3$  (c 1,  $CHCl_3$ ).

**Synthese von (5*S*,6*E*,9*R*)-5-(Tetrahydropyran-2''-yloxy)-9-Benzoyldodec-6-enethylsäureester [(5*S*,6*E*,9*R*)-70]:**



(5*S*,6*E*,9*R*)-70

Zu einer Lösung von 100 mg (240  $\mu$ mol) des Homodimers (4*R*,6*E*,9*R*)-69 und 121 mg (470  $\mu$ mol) (*S*)-62 in 5 mL trockenem  $CH_2Cl_2$ , wurden 22 mg (20  $\mu$ mol) Grubbs Katalysator der zweiten Generation gegeben und die Reaktion bei 40 °C für 3 Tage gerührt. Der Reaktionsansatz wurde über Watte und Celite filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die

säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 93:7 → 83:17 → 75:25) lieferte das Produkt (5*S*,6*E*,9*R*)-**70** (90 mg, 0.2 mmol) in 41 % Ausbeute als farbloses Öl. Unreagiertes Homodimer (4*R*,6*E*,9*R*)-**69** (44 mg, 0.1 mmol, 44 %) und (*S*)-**62** (34 mg, 0.1 mmol, 28 %) konnten ebenfalls reisoliert werden. Auf Grund der THP-Schutzgruppe wurde das Produkt (5*S*,6*E*,9*R*)-**70** als Mischung aus Diastereomeren erhalten, welche als A und B deklariert wurden, Das Diastereomerenverhältnis von A zu B betrug 1:1.2 anhand der <sup>1</sup>H NMR Daten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (75:25)]= 0.33.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 2938, 2873, 1716, 1272, 1112, 1022, 712.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.93 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>12,11</sub> = 7.4 Hz, 6H, 12-H<sup>AB</sup>), 1.24 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2',1'</sub> = 7.1 Hz, 6H, 2'-H<sup>AB</sup>), 1.28-1.76 (m, 28H, 3-H<sup>AB</sup>, 4-H<sup>AB</sup>, 10-H<sup>AB</sup>, 11-H<sup>AB</sup>, 3''-H<sup>AB</sup>, 4''-H<sup>AB</sup>, 5''-H<sup>AB</sup>), 2.25 (m, 4H, 2-H<sup>AB</sup>), 2.43 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>8,9</sub> = 5.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>8,7</sub> = 5.6 Hz, 4H, 8-H<sup>AB</sup>), 3.31-3.36 (dt, <sup>2</sup>*J*<sub>6''bB,6''aB</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''bB,5''aB</sub> = 4.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''bB,5''bB</sub> = 4.5 Hz, 1H, 6''-H<sup>B</sup>), 3.36-3.41 (dt, 1H, <sup>2</sup>*J*<sub>6''bA,6''aAc</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''bA,5''aA</sub> = 4.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''bA,5''bA</sub> = 4.8 Hz, 6''-H<sup>A</sup>) 3.72-3.78 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>6''aB,6''bB</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''aB,5''bB</sub> = 8.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''aB,5''aB</sub> = 3.3 Hz, 1H, 6''-H<sup>B</sup>), 3.78-3.83 ( dt, <sup>2</sup>*J*<sub>6''aA,6''bA</sub> = 11.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''aA,5''bA</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6''aA,5''aA</sub> = 5.6 Hz, 1H, 6''-H<sup>A</sup>), 4.00-4.04 (m, 2H, 5-H<sup>A</sup>, 5-H<sup>B</sup>), 4.11 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>1',2'</sub> = 7.1 Hz, 4H, 1'-H<sup>AB</sup>), 4.47 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2''B,3''B</sub> = 3.6 Hz, 1H, 2''-H<sup>B</sup>), 4.64 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2''A,3''A</sub> = 3.7 Hz, 1H, 2''-H<sup>A</sup>), 5.18 (m, 2H, 9-H<sup>A</sup>, 9-H<sup>B</sup>), 5.32 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>6B,7B</sub> = 15.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6B,5B</sub> = 8.3 Hz, 1H, 6-H<sup>B</sup>), 5.54-5.70 (m, 3H, 6-H<sup>A</sup>, 7-H<sup>AB</sup>), 7.40-7.45 (m, 4H, 4'''-H<sup>aAB</sup>, 4'''-H<sup>bAB</sup>), 7.52-7.57 (m, 2H, 5'''-H<sup>AB</sup>), 8.01-8.05 (m, 4H, 3'''-H<sup>aAB</sup>, 3'''-H<sup>bAB</sup>).

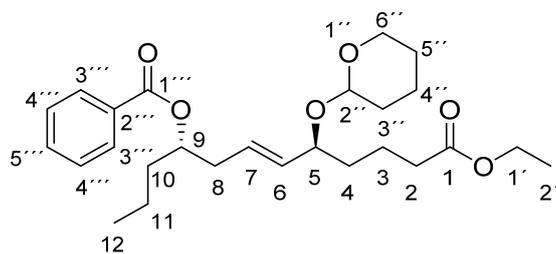
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.11 (C-12), 14.40 (C-2'), 18.75/18.76 (C-11), 19.66/19.81 (C-4''), 20.78/21.27 (C-3), 25.60/25.67, 30.83/30.94, 35.31 (C-10, C-3'', C-5''), 34.36/34.38 (C-2), 36.02/36.20 (C-4), 37.27/37.36 (C-8), 60.31/60.34 (C-1') 62.48/62.60 (C-6'') 73.87/74.17 (C-9), 75.39/76.76 (C-5), 95.04 (C-2<sup>B''</sup>), 97.52 (C-2<sup>A''</sup>) 126.64 (C-7), 128.43/128.47 (C-4'''), 129.36/129.70 (C-3'''), 130.83/130.94 (C-2'''), 132.86/132.93 (C-5'''), 133.64/134.68 (C-6), 166.22/166.28 (C-1'''), 173.62/173.70 (C-1).

**MS (EI, 70 eV):** *m/z* (%)= 77 (25), 105 (100), 164 (40), 341 (18).

**HRMS:** *m/z* = 469.2560 (kalkuliert für C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup> 469.2561).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 9.5$  (c 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**Synthese von (5*S*,6*E*,9*S*)-5-(Tetrahydropyran-2''-yloxy)-9-Benzoyldodec-6-enethylsäureester [(5*S*,6*E*,9*S*)-70]:**



**(5*S*,6*E*,9*S*)-70**

Zu einer Lösung von 94 mg (0.2 mmol) des Homodimers (4*S*,6*E*,9*S*)-**69** und 124 mg (480  $\mu$ mol) (*S*)-**62** in 5 mL trockenem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , wurden 22 mg (20  $\mu$ mol) Grubbs Katalysator der zweiten Generation gegeben und die Reaktion bei 40 °C für 3 Tage gerührt. Der Reaktionsansatz wurde über Watte und Celite filtriert und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatografische Aufreinigung über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 92:8  $\rightarrow$  80:20  $\rightarrow$  70:30) lieferte das Produkt (5*S*,6*E*,9*S*)-**70** (47 mg, 0.1 mmol) in 23 % Ausbeute als farbloses Öl. Unreagiertes Homodimer (4*S*,6*E*,9*S*)-**69** (59 mg, 0.2 mmol, 58 %) und (*S*)-**62** (60 mg, 0.2 mmol, 48 %) konnten ebenfalls reisoliert werden. Auf Grund der THP-Schutzgruppe wurde das Produkt (5*S*,6*E*,9*S*)-**70** als Mischung aus Diastereomeren erhalten, welche als A und B deklariert wurden, Das Diastereomerenverhältnis von A zu B betrug 1:1.2 anhand der <sup>1</sup>H NMR Daten.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (70:30)]= 0.37.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  [cm<sup>-1</sup>]= 2937, 2873, 1716, 1272, 1112, 1022, 713.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.93 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>12,11</sub> = 7.4 Hz, 6H, 12-H<sup>AB</sup>), 1.24 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2',1'</sub> = 7.1 Hz, 6H, 2'-H<sup>AB</sup>), 1.28-1.76 (m, 28H, 3-H<sup>AB</sup>, 4-H<sup>AB</sup>, 10-H<sup>AB</sup>, 11-H<sup>AB</sup>, 3''-H<sup>AB</sup>, 4''-H<sup>AB</sup>, 5''-H<sup>AB</sup>), 2.19 (m, 4H, 2-H<sup>AB</sup>), 2.44 (m, 4H, 8-H<sup>AB</sup>), 3.37-3.45 (m, 2H 6''-H<sub>b</sub><sup>A</sup>, 6''-H<sub>b</sub><sup>B</sup>) 3.79-3.85 (m, 2H 6''-H<sub>a</sub><sup>A</sup>, 6''-H<sub>a</sub><sup>B</sup>), 3.98 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>5A,4aA</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>5A,6A</sub> = 6.2 Hz, 1H, 5-H<sup>A</sup>), 4.03 (q <sup>3</sup>*J*<sub>5B,6B</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>5B,4aB</sub> = 6.5 Hz, 1H, 5-H<sup>B</sup>) 4.10 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>1',2'</sub> = 7.1 Hz, 4H, 1'-H<sup>AB</sup>), 4.57 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2'',3''B</sub> = 3.7 Hz, 1H, 2''-H<sup>B</sup>), 4.64 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>2'',3''A</sub> = 3.7 Hz, 1H, 2''-H<sup>A</sup>), 5.18 (m, 2H, 9-H<sup>A</sup>, 9-H<sup>B</sup>), 5.31 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>6B,7B</sub> = 15.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6B,5B</sub> = 8.3 Hz, 1H, 6-H<sup>B</sup>), 5.53-5.59 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>6A,7A</sub> = 15.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>6A,5A</sub> = 7.1 Hz, 1H, 6-H<sup>A</sup>), 5.64 (m, 2H, 7-H<sup>AB</sup>), 7.40-7.45 (m, 4H, 4''-H<sub>a</sub><sup>AB</sup>, 4''-H<sub>b</sub><sup>AB</sup>), 7.52-7.57 (m, 2H, 5''-H<sup>AB</sup>), 8.01-8.05 (m, 4H, 3''-H<sub>a</sub><sup>AB</sup>, 3''-H<sub>b</sub><sup>AB</sup>).

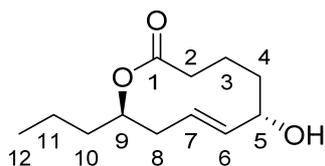
**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.12 (C-12), 14.39 (C-2'), 18.76 (C-11), 19.77/19.82 (C-4''), 20.70/21.20 (C-3), 25.59/25.70, 30.86/30.98, 35.24 (C-10, C-3'', C-5''), 34.28/34.31 (C-2), 36.01/36.04 (C-4), 37.26/37.50 (C-8), 60.31/60.34 (C-1'), 62.46/62.68 (C-6''), 73.78/74.00 (C-9), 75.36/77.23 (C-5), 94.92/97.74 (C-2''), 126.76/129.22 (C-7), 128.42/128.46 (C-4'''), 129.67 (C-3'''), 130.76/130.85 (C-2''), 132.88/132.94 (C-5'''), 133.59/134.74 (C-6), 166.24/166.28 (C-1'''), 173.61/173.68 (C-1).

**MS (EI, 70 eV):**  $m/z$  (%)= 77 (25), 105 (100), 164 (40), 341 (20).

**HRMS:**  $m/z$  = 469.2560 (kalkuliert für  $C_{26}H_{38}O_6Na^+$  469.2561).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{20} = 17.0$  (c 1.0,  $CHCl_3$ ).

**Synthese von (5*S*,6*E*,9*R*)-5-Hydroxy-9-propyl-6-nonen-9-olid [(5*S*,6*E*,9*R*)-37]:**



**(5*S*,6*E*,9*R*)-37**

In Anlehnung an eine Vorschrift von Götz *et al.* (Götz 2010), wurden zu einer Lösung von 44 mg (0.1 mmol) (5*S*,6*E*,9*R*)-70 in 10.2 mL THF:MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1:1) 11.3 mg (470  $\mu$ mol) LiOH gegeben und die Reaktionslösung bei 60 °C, für 48 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 30 mL Diethylether verdünnt und mit gesättigter KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeeengt. Zum erhaltenen Rohprodukt wurden 12 mL trockenes THF, 86  $\mu$ L (0.6 mmol) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid und 84  $\mu$ L (0.6 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktion wurde für 60 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 25 mL trockenem Toluol verdünnt und über Watte und Celite filtriert. Zum Filtrat wurden weitere 40 mL trockenes Toluol gegeben und der Ansatz über 2.5 Stunden zu einer refluxierenden Lösung von 86 mg (0.7 mmol) DMAP in 50 mL trockenem Toluol getropft. Der Ansatz wurde nach vollständiger Zugabe für weitere 30 min gerührt und anschließend auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Die Reaktion wurde mit 1 M wässriger HCl-Lösung gequenched und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Vereinigte organische Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der verbleibende Rest wurde in 12 mL Ethanol gelöst und mit 27 mg (0.1 mmol) PPTS und 5.6 mg (30  $\mu$ mol) *p*-TsOH Monohydrat versetzt. Die Reaktion wurde auf 40 °C aufgewärmt und für 16 Stunden gerührt, bevor sie durch Zugabe von 40 mL Eiswasser und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenched wurde. Die Reaktionslösung wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und vereinigte organische Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Der Feststoff wurde über Watte und Celite abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatografische Aufreinigung des Produktes über Silikagel (*n*-Pentan:DE 65:35) lieferte das Produkt (5*S*,6*E*,9*R*)-37 (12 mg, 60  $\mu$ mol) in 57 % Ausbeute.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (65:35)]= 0.16.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 3441, 2963, 2931, 2874, 1727, 1442, 1226, 1158.

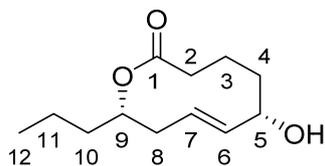
**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ[ppm]= 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>12,11</sub> = 7.4 Hz, 3H, 12-H), 1.32-1.60 (m, 4H, 4-H<sub>a</sub>, 10-H<sub>a</sub>, 11-H), 1.62-1.70 (m, 2H, 3-H<sub>a</sub>, 10-H<sub>b</sub>), 1.75-1.91 (br s, 1H, 5-OH), 1.93-2.16 (m, 4H, 2-H<sub>a</sub>, 3-H<sub>b</sub>, 4-H<sub>b</sub>, 8-H<sub>a</sub>), 2.40-2.50 (m, 2H, 2-H<sub>b</sub>, 8-H<sub>b</sub>), 4.44 (br s, 1H, 5-H), 5.04 (ddd, J = 10.5 Hz, 8.3 Hz, 4.7 Hz, 1H, 9-H), 5.44 (dd, J = 15.5 Hz, 1.7 Hz, 1H, 6-H), 5.55 (dddd, J = 15.5 Hz, 10.5 Hz, 4.9 Hz, 2.4 Hz, 1H, 7-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ[ppm]= 14.01 (C-12), 18.01 (C-3), 19.31 (C-11), 35.91 (C-2), 36.45 (C-10), 36.84 (C-4), 40.91 (C-8), 68.60 (C-5), 76.60 (C-9), 126.42 (C-7), 136.82 (C-6), 176.79 (C-1).

**HRMS:** m/z = 213.1486 (kalkuliert für C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 213.1485).

**Drehwert:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = 13.4 (c 0.7, CHCl<sub>3</sub>).

### Synthese von (5*S*,6*E*,9*S*)-5-Hydroxy-9-propyl-6-nonen-9-olid [(5*S*,6*E*,9*S*)-37]:



(5*S*,6*E*,9*S*)-37

In Anlehnung an eine Vorschrift von Götz *et al.*<sup>[277]</sup>, wurden zu einer Lösung von 35 mg (80 μmol) (5*S*,6*E*,9*S*)-70 in 8.1 mL THF:MeOH:H<sub>2</sub>O (2:1:1) 9.0 mg (0.4 mmol) LiOH gegeben und die Reaktionslösung bei 60 °C, für 48 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 25 mL Diethylether verdünnt und mit gesättigter KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingengt. Zum erhaltenen Rohprodukt wurden 8 mL trockenes THF, 71 μL (0.5 mmol) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid und 67 μL (0.5 mmol) Triethylamin gegeben. Die Reaktion wurde für 120 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 20 mL trockenem Toluol verdünnt und über Watte und Celite filtriert. Zum Filtrat wurden weitere 20 mL trockenes Toluol gegeben und der Ansatz über 2.5 Stunden zu einer refluxierenden Lösung von 67 mg (0.6 mmol) DMAP in 57 mL trockenem Toluol getropft. Der Ansatz wurde nach vollständiger Zugabe für weitere 30 min gerührt und anschließend auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Die Reaktion wurde mit 1 M wässriger HCl-Lösung gequenched und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Vereinigte organische Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und unter reduziertem Druck am Rotationsverdampfer eingengt. Der verbleibende Rest wurde in 7 mL Ethanol gelöst und mit 22 mg (90 μmol) PPTS und 4.5 mg (20 μmol) *p*-TsOH Monohydrat versetzt. Die Reaktion wurde auf 40 °C aufgewärmt und für 16 Stunden gerührt, bevor sie durch Zugabe von 20 mL Eiswasser und gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenched wurde. Die Reaktionslösung wurde mit Essigsäureethylester extrahiert

und vereinigte organische Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Der Feststoff wurde über Watte und Celite abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatografische Aufreinigung des Produktes über Silikagel (*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O 60:40 → 50:50) lieferte das Produkt (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** (11 mg, 50 μmol) in 66 % Ausbeute.

**R<sub>f</sub>-Wert:** [*n*-Pentan:Et<sub>2</sub>O (50:50)]= 0.19.

**FT-IR:**  $\tilde{\nu}_{\max}$  [cm<sup>-1</sup>]= 3426, 2956, 2926, 2866, 1728, 1442, 1181, 1002.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 0.92 (t, <sup>3</sup>J<sub>12,11</sub> = 7.2 Hz, 3H, 12-H), 1.32-1.59 (m, 5H, 4-H<sub>a</sub>, 5-OH, 10-H<sub>a</sub>, 11-H), 1.62-1.70 (m, 1H, 10-H<sub>b</sub>), 1.86-1.97 (m, 3H, 3-H, 8-H<sub>a</sub>), 1.98-2.06 (m, 2H, 2-H<sub>a</sub>, 4-H<sub>b</sub>), 2.35 (m, 1H, 8-H<sub>b</sub>), 2.44 (m, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 4.01 (m, 1H, 5-H), 5.03 (m, 1H, 9-H), 5.32 (dt, *J* = 15.0 Hz, 6.5 Hz, 1H, 6-H), 5.54 (m, 1H, 7-H).

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ [ppm]= 14.01 (C-12), 19.28 (C-11), 22.45 (C-3), 35.82 (C-2), 36.58 (C-10), 38.88 (C-4), 40.51 (C-8), 74.28 (C-5), 75.48 (C-9), 131.83 (C-7), 137.30 (C-6), 175.93 (C-1).

**HRMS:** *m/z* = 213.1485 (kalkuliert für C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 213.1485).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +22.3$  (c 0.7, CHCl<sub>3</sub>).

## 6 Abkürzungsverzeichnis

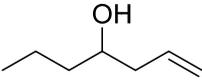
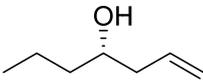
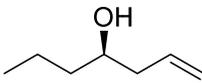
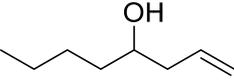
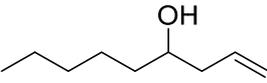
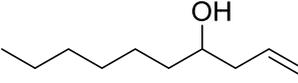
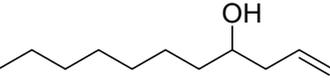
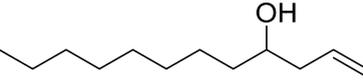
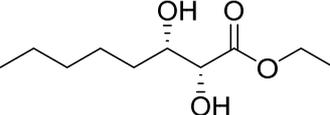
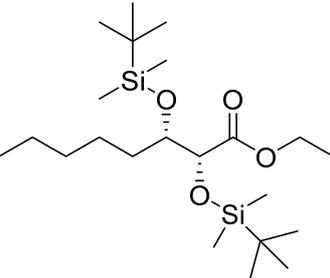
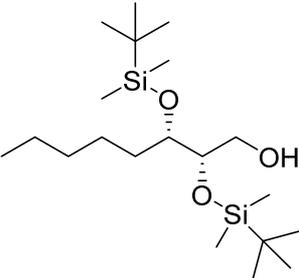
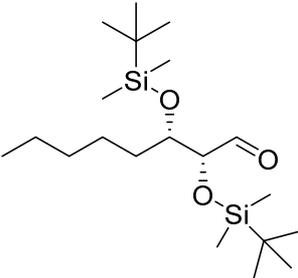
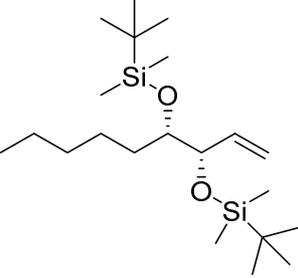
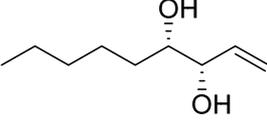
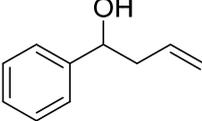
A	Adenin
Å	Ångström (Längeneinheit, $10^{-10}$ m)
Abs	Absorption
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Amp	Ampicillin
Äq.	Äquivalente
brsm	eng. " <i>based on recovered starting material</i> "
C	Cytosin
COSY	eng. " <i>correlation spectroscopy</i> "
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
$\delta$	Chemische Verschiebung in der Kernspinresonanzspektroskopie
d	eng. " <i>day(s)</i> ", Tag(e)
Da	Dalton (atomare Masseinheit)
DC	Dünnschichtchromatografie
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	eng. " <i>desoxyribonucleic acid</i> "
<i>de</i>	eng. „ <i>diastereomeric excess</i> "
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
<i>ee</i>	eng. " <i>enantiomeric excess</i> "
EDTA	eng. „ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> "
EI	Elektronenstoßionisation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronensprayionisation
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiat-Dehydrogenase
Fdx	Ferredoxin
FdR	Ferredoxin-Reduktase
FMN	Flavinmononukleotid
G	Guanin
GC	Gaschromatografie
GDH	Glukosedehydrogenase
HABA	2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HPLC	eng. " <i>high Performance Liquid Chromatography</i> "
HRMS	eng. " <i>high resolution mass spectrometry</i> "
HSQC	eng. " <i>heteronuclear single quantum coherence</i> "

## Abkürzungsverzeichnis

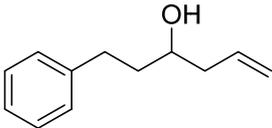
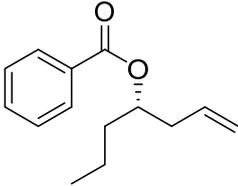
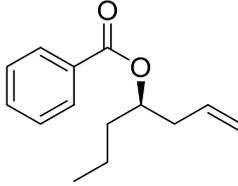
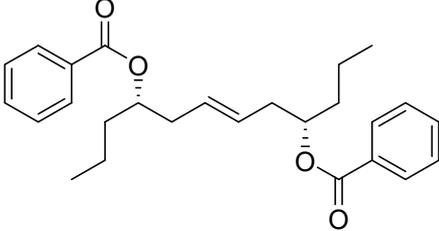
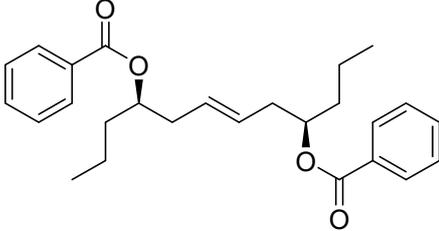
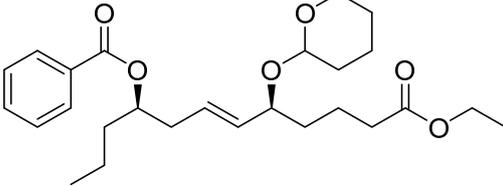
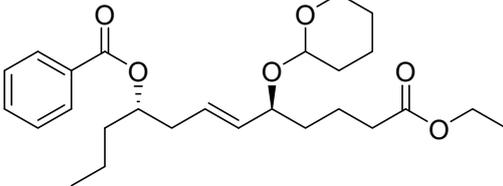
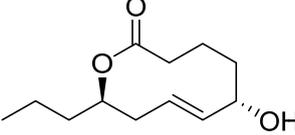
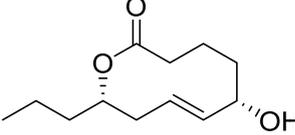
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
$^xJ$	<i>J</i> -Kopplung
Kan	Kanamycin
konz.	konzentriert
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat
LM	Lösungsmittel
LV	Leervektor
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
MWCO	eng. „ <i>molecular weight cutoff</i> “
NAD(P) <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NMR	eng. „ <i>nuclear magnetic resonance</i> “
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	eng. „ <i>polymerase chain reaction</i> “
PE	Petrolether
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
PTDH	Phosphit-Dehydrogenase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
rpm	eng. „ <i>revolutions per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n); Singulett
SDS	eng. „ <i>sodium dodecylsulfate</i> “
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
U	eng. „ <i>Unit</i> “ (Einheit der Enzymaktivität, angegeben in $\mu$ mol Substratumsatz pro Minute unter definierten Bedingungen)
UPR	eng. „ <i>unfolded protein response</i> “
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
% (v/v)	Volumenanteil am Volumen
% (w/v)	Massenanteil am Volumen

## 7 Formelregister

Im Folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen mit der Nummerierung aus dem Text aufgeführt. Zusätzlich wurde die Laborbuchnummer des zugehörigen Experimentes zugeordnet.

 <b>26</b>	 <b>(S)-26</b>	 <b>(R)-26</b>
AT_03/DD_54	DD_43/DD_48	DD_49
 <b>27</b>	 <b>11</b>	 <b>28</b>
AT_04	DD_01	AT_05
 <b>29</b>	 <b>30</b>	 <b>17</b>
AT_06	AT_07	DD_27
 <b>18</b>	 <b>19</b>	 <b>20</b>
DD_28	DD_29	DD_32
 <b>21</b>	 <b>(3S,4S)-12</b>	 <b>31</b>
DD_33	DD_34/DD_06 ( <i>syn</i> )	DD_38

Formelregister

 <p><b>32</b></p>	 <p><b>(S)-68</b></p>	 <p><b>(R)-68</b></p>	
DD_39	DD_52	DD_56	
 <p><b>(4S,6E,9S)-69</b></p>		 <p><b>(4R,6E,9R)-69</b></p>	
DD_57		DD_58	
 <p><b>(4S,6E,9R)-70</b></p>		 <p><b>(4S,6E,9S)-70</b></p>	
DD_60		DD_59	
 <p><b>(5S,6E,9R)-37</b></p>		 <p><b>(5S,6E,9S)-37</b></p>	
DD_61		DD_62	



# Anhang

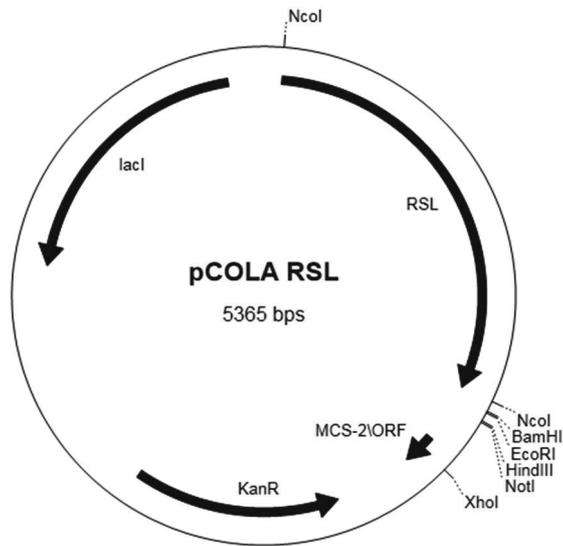
Query	694	ACCTACGAAATCCCTTTGCACGACCAAACAGGCACCATGTG	GTACGTTG-ATCCCTCCCC	752	
Sbjct	713	ACATACGAGATCCCCTGCACGACCAAACGGGA	ACTATGTG	GTGCGTTGGATTTCTCTG-	771
Query	753	GAGGCAGATAGCC--AGCAGCTTAGTATTACATTCGAACCGATAG	GTACCATGCACACTT	810	
Sbjct	772	--GGCGTATAAACTAAACAACCTTAGTGCTGAAATCAATACATCAG	GTATCACGCCATCT	829	
Query	811	GGCAAGCCA	GTAAGTCACAGTAAATTAAACTCGATTTATCTAAACTAACCGATCCATAAG	870	
Sbjct	830	TGCAAGTCA	-----	838	
Query	871	ATATGTTCGACGGACTCCGCGGCCAC	GTGAGTAATCAAATTGA--GA-----GATATTGA	923	
Sbjct	839	ATATGTGGATGGATTGCGGGGACCTT	GTAAGTAATTAATTTGATTGATCGTTCGATCTTCA	898	
Query	924	TTGATGATGCTGATGCGCGCG-----ATAG	TGGTTATATACG	GTATGCTCGATTTTCATC	977
Sbjct	899	TTGAGGGTCTGATCCATTCGTCTTGATAG	TGGTCATATATG	GTACGCTCGATTTGATC	958
Query	978	ATCGAGGGTGGATTATATCCACGGTCGCTAACCCAGACAAATTATAG	ATCCCAACGACCC	1037	
Sbjct	959	CTAAATAATGGATTATATCCACGATTGCTGACCAA-ACA-----TAG	ACCCCAATGATCC	1012	
Query	1038	ACACAAGCACTTTACGATGTGGATGATAAAGACACAGTTGTTATGCTTGAGGACTG	GTA	1097	
Sbjct	1013	ACACAAGTCACTTACGATGTGGACGATGCTAGCACCGTGGTTATGCTCGAAGACTG	GTA	1072	
Query	1098	CGATACTTTATCGCTG--TGCGAACCAATGACGCTGACTAGATAAACTCATTAG	GTATCA	1155	
Sbjct	1073	CGGTATTTTATTGATCCATGCGAACCAAGGGTGCTAACTAATCCGACTTTTTTAG	GTATCA	1132	
Query	1156	TACCCCGCGCCGGTTCTAGAACACCAGATGTTCTC-AGTCGATAAACTGCAC	TGCTCT	1214	
Sbjct	1133	CACTCCGGCACCCACTCTAGAACACCAAATGTTCTCGACTAGC-AATACCGCCTTACTCT		1191	
Query	1215	CTCC	GTGCGTACATACTCGAACAGC---TCTTCTTTTGGTATACTGACCCTTTATCCTAT	1271	
Sbjct	1192	CTCC	GTATGT---TTCT--AACAGGAAGTTTTCTCTGGTATATTGACACTCT--CCTAT	1244	
Query	1272	CAGT	TGTTCCGGATTCCGGTCTTATCAACGGCAAAGGGCGCTATGTGGGCGGACCTCAAGT	1331	
Sbjct	1245	-AG	GGTTCGGACTCGGGTCTTATCAATGGAAAAGGTCGCTACGTGGGCGGACCCCAAGT	1303	
Query	1332	CCCCCGGT	CAGTGATCAACGTGACTCGTGGGAAACGATACCGCTTGCGTGTCAACGC	1391	
Sbjct	1304	CCCCCGGT	CGGTAATCAACGTGACTCGCGGAAACGATATCGCTTGCGCGTGATCAATGC	1363	
Query	1392	CTCGGCTATCGGCTCGTTACCTTTTCGATCGAAGGGCACCGTTT	GACTGTGATT	GTATG	1451
Sbjct	1364	TTCTGCCATTGGTTCATTCAC	TTTTTCGATCGAGGGACATCGCTTGACTGTCATT	GTACG	1423
Query	1452	GTATTGTCC-TCCCTGGAGATTTTCATGGTCTGACACAACGATTC----	AACAGGAGGCC	1506	
Sbjct	1424	ATCGTTTCCCTTGCTTGTGGTTCCCT--TCTAACTCTCAGATTACTCTAATAG	GAGGCC	1481	
Query	1507	GATGGAATCCCGCATGAACCTTTGGTAGTCGACAGCTTCCAAATCTACGCTGGACAACGC		1566	
Sbjct	1482	GATGGAATCCACATGAGCCTTTGGTCGTCGATAGTTCCAGATCTATGCCGGTCAACGC		1541	
Query	1567	TACTCCGTAAT	GTAAGTTATATCATGACTTTCTTTTTTCATATATGA-CTAACCATGGT	1625	
Sbjct	1542	TATTCTGTCAT	TGATGCGCTCTAAT-----CTTTTTT-ATACATCAACTAGGC-TAAC	1593	
Query	1626	GCATATACCCAG	GTTGAAACCAACCAAACCTGCGGCCAACTACTGGATCCGTGCGCCAATG	1685	
Sbjct	1594	GAATATTACTAG	TGCAAGCCAACCAGACCGCTGCTAACTACTGGGTACGCGCTCCAATG	1653	



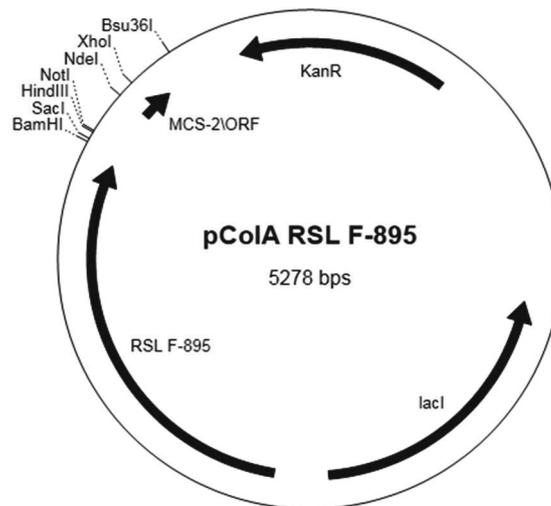


## 8.1 Vektorkarten und Sequenzen

### 8.1.1 Vektorkarten

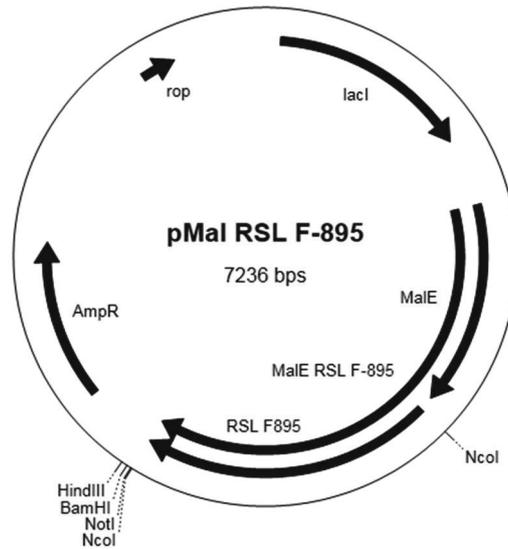


**Abbildung 86:** Vektor für die heterologe Expression der putativen Laccase aus *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP (RSL) in *Escherichia coli*. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden markiert. Der Vektor basiert auf dem kommerziell erhältlichen Vektor pCOLADuet-1 von Genscript®.

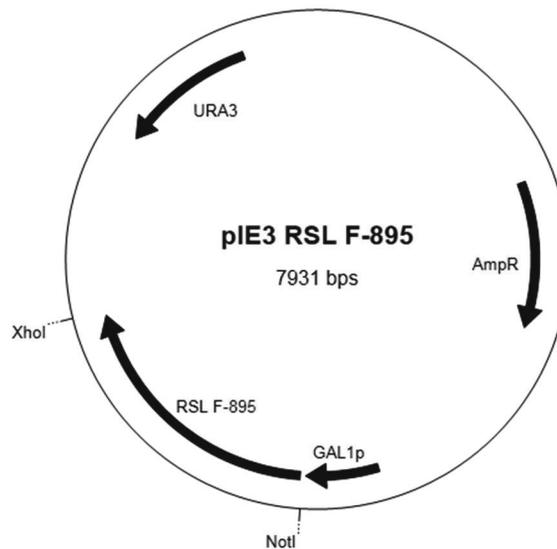


**Abbildung 87:** Vektor für die heterologe Expression der putativen Laccase aus *Rhizoctonia solani* F-895 (RSL F-895), in *Escherichia coli*. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden markiert.

## Anhang

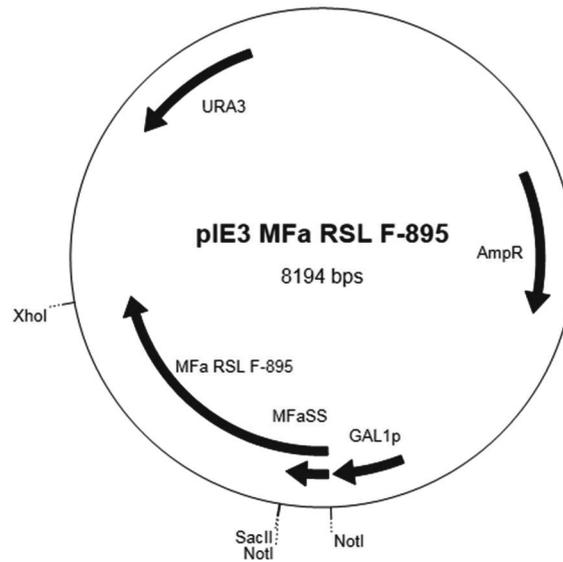


**Abbildung 88:** Vektor für die heterologe Expression eines Fusionsproteins aus dem Maltosebindeprotein aus *Escherichia coli* und der Laccase aus *Rhizoctonia solani* F-895 (MalE-RSL F-895), in *Escherichia coli*. Der Vektor basiert auf dem kommerziell erhältlichen pMal-c5x Vektor von *New England Biolabs*. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden markiert.

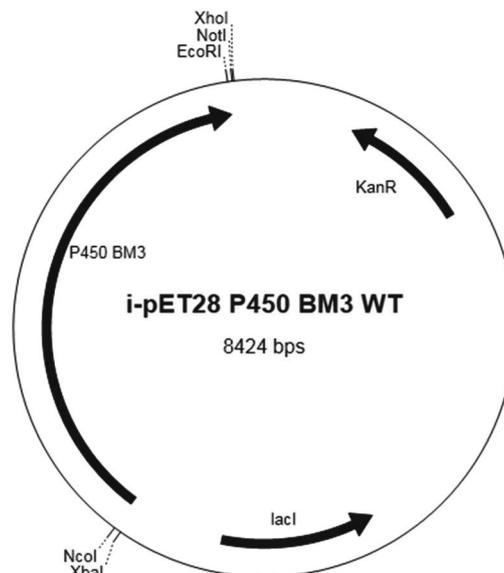


**Abbildung 89:** Vektor für die heterologe Expression der Laccase aus *Rhizoctonia solani* F-895 (RSL F-895) in *S. cerevisiae*. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden markiert.

## Anhang

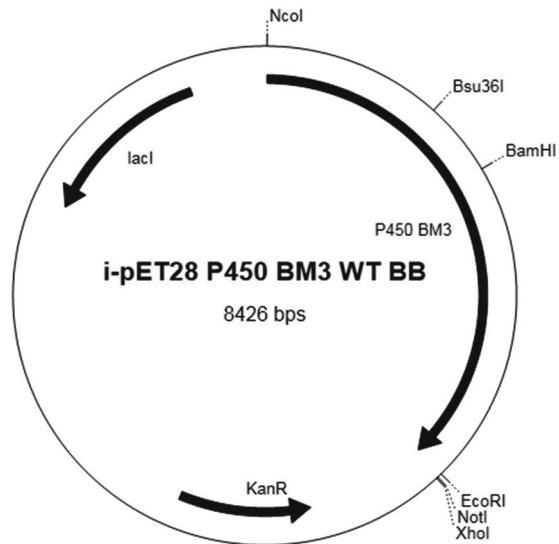


**Abbildung 90:** Vektor für die heterologe Expression und Sekretion der Laccase aus *Rhizoctonia solani* F-895 (RSL F-895) in *S. cerevisiae*. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden markiert. Der Vektor diente zusätzlich als Ausgangsvektor für molekularbiologische Arbeiten in *E. coli*, für die Erzeugung der Variante mit einer alternativen Linkersequenz zwischen Sekretionssignal und Laccase (RSL F-895 Linker) und der Variante mit *Strep*-Tag (RSL F-895 LinkStrep).

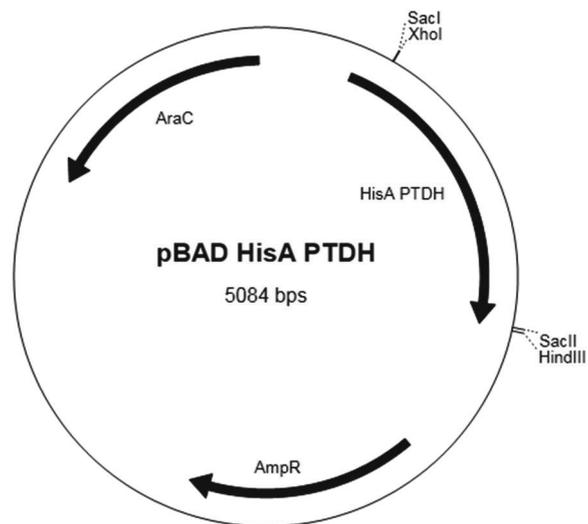


**Abbildung 91:** Ausgangsvektor für alle molekularbiologischen Arbeiten mit P450 BM3, auf Basis des kommerziell erhältlichen pET28(+) Vektors von Novagen®. Der Ausgangsvektor mit dem Gen für das Zielenzym P450 BM3 wurde von Claudia Holec (IBOC, Heinrich-Heine Universität) zur Verfügung gestellt. Eine Auswahl relevanter Restriktionsschnittstellen für molekularbiologische Arbeiten wurde eingefügt.

## Anhang



**Abbildung 92:** Ausgangsvektor für alle im Rahmen der Arbeit erzeugten Varianten von P450 BM3, mit den zwei zusätzlichen Restriktionsschnittstellen für die *Bsu36I*- und *BamHI*-Restriktionsenzyme.



**Abbildung 93:** Vektor für die Expression der Phosphit-Dehydrogenase aus *Pseudomonas stutzeri* (PTDH) in *Escherichia coli*, mit einem Polyhistidin-Affinitätstag (HisA PTDH) für chromatografische Aufreinigungen. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden markiert. Der Vektor basiert auf dem kommerziell erhältlichen Vektor pBADHisA von *ThermoFisher*.

## 8.1.2 Sequenzen

```

      NcoI
1  aaggagatat accatgggca tgacaattaa agaaatgcct cagccaaaaa cgtttgaga gcttaaaat ttaccgttat
   ttcctctata tggtagccgt actgttaatt tctttacgga gtcggttttt gcaaacctct cgaattttta aatggcaata
   rbs                               Start
      >>.....P450 BM3.....>
      m g m t i k e m p q p k t f g e l k n l p l

81  taaacacaga taaaccgggt caagctttga tgaaaattgc ggatgaatta ggagaaatct ttaaattoga agcgctgggt
   atttgtgtct atttggccaa gttcgaaact acttttaacg cctacttaat cctctttaga aatttaagct tgcgggacca
                                       Stille Mutation
   >.....P450 BM3.....>
   l n t d k p v q a l m k i a d e l g e i f k f e a p g

161  cgtgtaacgc gctacttata aagtcagcgt ctaattaaag aggcctgcga tgaatcacgc tttgataaaa acttaagtca
   gcacattgcg cgatgaatag ttcagtcgca gattaatttc tccggacgct acttagtgcg aaactatfff tgaattcagt
   R47      Y51      Stille MutationStille Mutation
   >.....P450 BM3.....>
   r v t r y l s s q r l i k e a c d e s r f d k n l s

241  agcgcttaaa tttgtacgtg attttgcagg agacggggtta tttacaagct ggacgcata aaaaaattgg aaaaaagcgc
   tccgcaattt aaacatgcac taaaacgtcc tctgcccatt aaatgttcga cctgcgtact ttttttaacc ttttttcgcg
   A74      F87
   >.....P450 BM3.....>
   q a l k f v r d f a g d g l f t s w t h e k n w k k a

321  ataatatctt acttccaagc ttcagtcagc aggcaatgaa aggctatcat gogatgatgg tcgatatcgc cgtgcagctt
   tattatagaa tgaaggttcg aagtcagtcg tccgttactt tccgatagta cgctactacc agctatagcg gcacgtcgaa
   >.....P450 BM3.....>
   h n i l l p s f s q q a m k g y h a m m v d i a v q l

401  gttcaaaagt gggagcgtct aaatgcagat gagcatattg aagtaccgga agacatgaca cgtttaacgc ttgatataat
   caagttttca ccctcgcaga tttacgtcta ctcgataaac ttcattggcct tctgtactgt gcaaattgcg aactatgtta
   >.....P450 BM3.....>
   v q k w e r l n a d e h i e v p e d m t r l t l d t

481  tggctcttgc ggctttaact atcgctttaa cagcttttac cgagatcagc ctcatccatt tattacaagt atggctccgtg
   accagaaacg ccgaaattga tagcgaatt gtcgaaaatg gctctagtcg gagtaggtaa ataattgtca taccaggcac
   >.....P450 BM3.....>
   i g l c g f n y r f n s f y r d q p h p f i t s m v r

561  cactggatga agcaatgaac aagctgcagc gagcaaatcc agacgaccga gcgtacgatg aaaacaagcg ccagtttcaa
   gtgacctact tcgttacttg ttcgacgtcg ctcgtttagg tctgctgggt cgcattgctac ttttgttcgc ggtcaaaagt
                                       L188
   >.....P450 BM3.....>
   a l d e a m n k l q r a n p d d p a y d e n k r q f q

641  gaagatatca aggtgatgaa cgacctagta gataaaatta ttgcagatcg caaagcaagc ggtgaacaaa gcgatgattt
   cttctatagt tccactactt gctggatcat ctattttaat aacgtctagc gtttcgttcg ccactgtttt cgctactaaa
   >.....P450 BM3.....>
   e d i k v m n d l v d k i i a d r k a s g e q s d d

721  attaacgcat atgctaaacg gaaaagatcc agaaacgggt gagccgcttg atgacgagaa cattcgttat caaattatta
   taattgcgta tacgatttgc cttttctagc tctttgccc a ctcggcgaac tactgctctt gtaagcgata gtttaataat
   >.....P450 BM3.....>
   l l t h m l n g k d p e t g e p l d d e n i r y q i i

```

**Abbildung 94:** Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 WT. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

801 cattcttaat tgcgggacac gaaacaacaa gtggctcttt atcatttgcg ctgtatttct tagtgaaaaa tccacatgta
gtaagaatta acgccctgtg ctttgttggt caccagaaaa tagtaaacgc gacataaaga atcacttttt aggtgtacat
      I263           T268
>.....P450 BM3.....>
t f l i a g h e t t s g l l s f a l y f l v k n p h v

881 ttacaaaaag cagcagaaga agcagcacga gttctagtag atcctgttcc aagctacaaa caagtcaaac agcttaaata
aatgtttttc gtcgtcttct tcgctcgtct caagatcatc taggacaagg ttcgatggtt gttcagtttg tcgaatttat
>.....P450 BM3.....>
l q k a a e e a a r v l v d p v p s y k q v k q l k

      Bsu36I
961 tgtcggcatg gtcttaaacg aagcctgag gttatggcca actgctcctg cgttttcctt atatgcaaaa gaagatacgg
acagccgtac cagaatttgc ttcgggactc caataccggt tgacgaggac gcaaaagga tatacgtttt ctctatgcc
      Bsu36I           A328
>.....P450 BM3.....>
y v g m v l n e a l r l w p t a p a f s l y a k e d t

1041 tgcttgagg agaatacct ttagaaaaag gcgacgaact aatggttctg attcctcagc ttcaccgtga taaaacaatt
acgaacctcc tcttatagga aatctttttc cgctgcttga ttaccaagac taaggagtcg aagtggcact atttgttaa
>.....P450 BM3.....>
v l g g e y p l e k g d e l m v l i p q l h r d k t i

1121 tggggagacg atgtggaaga gttccgtcca gagcgttttg aaaatccaag tgcgattccg cagcatgctt ttaaaccgtt
accctctgct tacaccttct caaggcaggt ctcgcaaac ttttaggttc acgctaaggc gtcgtacgca aattggcaa
>.....P450 BM3.....>
w g d d v e e f r p e r f e n p s a i p q h a f k p

1201 tgaaaacggt cagcgtcgtg gtatcggcca gcagttcgtt cttcatgaag caacgctggt acttggtatg atgctaaaac
acctttgcca gtcgcacgca catagccagt cgtcaagcga gaagtacttc gttgcgacca tgaaccatac tacgattttg
>.....P450 BM3.....>
f g n g q r a c i g q q f a l h e a t l v l g m m l k

1281 actttgactt tgaagatcat aaaaactacg agctcgatat taaagaaact ttaacgttaa aacctgaagg ctttgtggtg
tgaaactgaa acttctagta tgtttgatgc tcgagctata atttcttga aattgcaatt ttggacttcc gaaacaccat
      T438
>.....P450 BM3.....>
h f d f e d h t n y e l d i k e t l t l k p e g f v v

      BamHI
1361 aaagcaaat cgaaaaaaat tccgcttggc gggatccctt cacctagcac tgaacagtct gctaaaaaag tacgcaaaaa
tttcgtttta gcttttttta aggcgaaccg ccctagggaa gtggatcgtg acttgtcaga cgattttttc atgcgttttt
      BamHI
>.....P450 BM3.....>
k a k s k k i p l g g i p s p s t e q s a k k v r k

1441 ggcagaaaac gctcataata cgccgctgct tgtgtatac ggttcaaata tgggaacagc tgaaggaacg ggcgctgatt
ccgtcttttg cgagtattat gcggcgacga acacgatatg ccaagtttat acccttgctg acttcttgc cgcgactaa
>.....P450 BM3.....>
k a e n a h n t p l l v l y g s n m g t a e g t a r d

1521 tagcagatat tgcaatgagc aaaggatttg caccgcaggt cgcaacgctt gattcacacg ccggaatctt tccgcgcgaa
atcgtctata acgttactcg ttcctaaac gtggcgtcca gcggttgcgaa ctaagtgtgc ggcctttaga aggcgcgctt
>.....P450 BM3.....>
l a d i a m s k g f a p q v a t l d s h a g n l p r e

```

**Abbildung 95:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 WT. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

1601 ggagctgtat taattgtaac ggcgtcttat aacggtcac cgcctgataa cgcaaagcaa tttgtcgact ggtagacca
cctcgacata attaacattg ccgcagaata ttgccagtag gcggactatt gcgtttcggt aaacagctga ccaatctggt
>.....P450 BM3.....>
  g a v l i v t a s y n g h p p d n a k q f v d w l d

1681 agcgtctgct gatgaagtaa aaggcgttcg ctactccgta tttggatgcg gcgataaaaa ctgggctact acgtatcaaa
tcgcagacga ctacttcatt ttccgcaagc gatgaggcat aaacctacgc cgctattttt gaccogatga tgcatagttt
>.....P450 BM3.....>
  q a s a d e v k g v r y s v f g c g d k n w a t t y q

1761 aagtgcctgc ttttatcgtat gaaacgcttg ccgctaaagg ggcagaaaac atcgcctgacc gcggtgaagc agatgcaagc
ttcacggaag aaaatagcta ctttgcgaac ggcgatttcc ccgtcttttg tagcgactgg cgccacttcg tctacgttcg
>.....P450 BM3.....>
  k v p a f i d e t l a a k g a e n i a d r g e a d a s

1841 gacgactttg aaggcacata tgaagaatgg cgtgaacata tgtggagtga cgtagcagcc tactttaacc tcgacattga
ctgctgaaac ttccgtgtat acttcttacc gcacttgtat acacctcact gcctcgtcgg atgaaattgg agctgtaact
>.....P450 BM3.....>
  d d f e g t y e e w r e h m w s d v a a y f n l d i

1921 aaacagtga gataataaat ctactctttc acttcaattt gtcgacagcg ccgcggatat gccgcttgcg aaaatgcagc
tttgcactt ctattattta gatgagaaa gaaagttaaa cagctgtcgc ggcgctata cggcgaacgc ttttacgtgc
>.....P450 BM3.....>
  e n s e d n k s t l s l q f v d s a a d m p l a k m h

2001 gtgcgttttc aacgaacgtc gtagcaagca aagaacttca acagccagcg agtgacagaa gcacgcgaca tcttgaaat
cacgaaaag ttgcttgcaag catcgttcgt ttcttgaagt tgcggtccg tcacgtgctt cgtgcgctgt agaactttaa
>.....P450 BM3.....>
  g a f s t n v v a s k e l q q p g s a r s t r h l e i

2081 gaacttccaa aagaagcttc ttatcaagaa ggagatcatt taggtgttat tctcgcgaac tatgaaggaa tagtaaaccg
cttgaaggtt ttcttcgaag aatagttctt cctctagtaa atccacaata aggagcgttg atacttcctt atcatttggc
>.....P450 BM3.....>
  e l p k e a s y q e g d h l g v i p r n y e g i v n

2161 tgtaacagca aggttcggcc tagatgcac acagcaaatc cgtctggaag cagaagaaga aaaattagct catttgccac
acattgtcgt tccaagccgg atctacgtag tgcgttttag gcagacctc gtcttcttct ttttaatcga gtaaaccggtg
>.....P450 BM3.....>
  r v t a r f g l d a s q q i r l e a e e e k l a h l p

2241 tcgctaaaac agtatccgta gaagagcttc tgcaatacgt ggagcttcaa gatcctgtta cgcgcagcga gcttcgcgca
agcgattttg tcataggcat cttctcgaag acgttatgca cctcgaagtt ctaggacaat gcgcgtgcgt cgaagcgcgt
>.....P450 BM3.....>
  l a k t v s v e e l l q y v e l q d p v t r t q l r a

2321 atggctgcta aaacggctcg ccgcgccat aaagtagagc ttgaagcctt gcttgaaaag caagcctaca aagaacaagt
taccgacgat tttgccagac gggcggcgta tttcatctcg aacttcggaa cgaacttttc gttcggatgt ttcttgttca
>.....P450 BM3.....>
  m a a k t v c p p h k v e l e a l l e k q a y k e q

2401 gctggcaaaa cgtttaacaa tgcttgaact gcttgaaaa tacccggcgt gtgaaatgaa attcagcgaa tttatcgccc
cgaccgtttt gcaaatgtt acgaacttga cgaacttttt atgggcccga cactttactt taagtcgctt aaatagcggg
>.....P450 BM3.....>
  v l a k r l t m l e l l e k y p a c e m k f s e f i a

```

**Abbildung 96:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 WT. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

2481 ttctgccaag catacgcccg cgctattact cgattttctc atcacctcgt gtcgatgaaa aacaagcaag catcacggtc
aagacggttc gtatgcgggc gcgataatga gctaaagaag tagtggagca cagctacttt ttgttcggtc gtagtgccag
>.....P450 BM3.....>
  l l p s i r p r y y s i s s s p r v d e k q a s i t v

2561 agcgttgctt caggagaagc gtggagcgga tatggagaat ataaaggaat tgcgtcgaac tatcttgccg agctgcaaga
tcgcaacaga gtcctcttcg cacctcgcct atacctctta tatttcctta acgcagcttg atagaacggc tcgacgttct
>.....P450 BM3.....>
  s v v s g e a w s g y g e y k g i a s n y l a e l q

2641 aggagatacg attacgtgct ttatttccac accgcagtc gaatttacgc tgccaaaaga cctgaaacg cgccttatca
tcctctatgc taatgcacga aataaagggtg tggcgtcagt cttaaatgag acggttttct gggactttgc ggcgaatagt
>.....P450 BM3.....>
  e g d t i t c f i s t p q s e f t l p k d p e t p l i

2721 tggtcggacc gggaacaggc gtcgcgccgt ttagaggctt tgtgcaggcg cgcaaacagc taaaagaaca aggacagtc
accagcctgg cccttgccg cagcgcggca aatctccgaa acacgtccgc gcgtttgtcg atttcttctg tcctgtcagt
>.....P450 BM3.....>
  m v g p g t g v a p f r g f v q a r k q l k e q g q s

2801 cttggagaag cacatttata cttcggctgc cgttcacctc atgaagacta tctgtatcaa gaagagcttg aaaacgcca
gaacctctc gtgtaaatat gaagccgacg gcaagtggag tacttctgat agacatagtt cttctcgaac tttgcggggt
>.....P450 BM3.....>
  l g e a h l y f g c r s p h e d y l y q e e l e n a

2881 aagcgaagcg atcattacgc ttcataccgc tttttctcgc atgccaaatc agccgaaaac atacgttcag cacgtaatgg
ttcgcttccg tagtaatgcg aagtatggcg aaaaagagcg tacggtttag tcggcttttg tatgcaagtc gtgcattacc
>.....P450 BM3.....>
  q s e g i i t l h t a f s r m p n q p k t y v q h v m

2961 aacaagacgg caagaaattg attgaacttc ttgatcaagg agcgcacttc tatatttgcg gagacggaag ccaaatggca
ttgttctgcc gttctttaac taacttgaag aactagttcc tcgctggaag atataaacgc ctctgccttc ggtttacctg
>.....P450 BM3.....>
  e q d g k k l i e l l d q g a h f y i c g d g s q m a

3041 cctgcggttg aagcaacgct tatgaaaagc tatgctgacg ttcaccaagt gagtgaagca gacgctcgtc tatggctgca
ggacggcaac ttcgttgcca atacttttcg atacgactgc aagtggttca ctcacttcgt ctgagagcga ataccgactg
>.....P450 BM3.....>
  p a v e a t l m k s y a d v h q v s e a d a r l w l

3121 gcagctagaa gaaaaaggcc gatacgcaaa agacgtgtgg gctgggtaat EcoRI aagaattcga NotI gctccgtcga caagcttgcg
cgtcgatctt ctttttcgg ctatgcgttt tctgcacacc cgaccatta ttcttaagct cgaggcagct gttcgaacgc
>.....P450 BM3.....>>
  q q l e e k g r y a k d v w a g -

```

**Abbildung 97:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 WT BB. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

      NcoI
1  aaggagatat accatgggca tgacaattaa agaaatgcct cagccaaaaa cgtttgaga gcttaaaaat ttaccggtat
   ttcctctata tggtagccgt actgttaatt tctttacgga gtcggttttt gcaaacctct cgaattttta aatggcaata
   rbs                               Start
      >>.....P450 BM3.....>
      m g m t i k e m p q p k t f g e l k n l p l

      HindIII
81  taaacacaga taaaccggtt caagctttga tgaaaattgc ggatgaatta ggagaaatct ttaaattcga agcgcctggt
   atttgtgtct atttggccaa gttcgaaact acttttaacg cctacttaat cctctttaga aatttaagct tcgcggaacca
   Stille Mutation
   >.....P450 BM3.....>
   l n t d k p v q a l m k i a d e l g e i f k f e a p g

161  cgtgtaacgc gctacttadc aagtcagcgt ctaattaaag aggcctgcga tgaatcacgc tttgataaaa acttaagtca
   gcacattgcg cgatgaatag ttcagtcgca gattaatttc tccggagcct acttagtgcg aaactatfff tgaattcagt
   R47 Y51 Stille MutationStille Mutation
   >.....P450 BM3.....>
   r v t r y l s s q r l i k e a c d e s r f d k n l s

241  aggccttaaa tttgtacgtg attttgcagg agacgggtta tttacaagct ggacgcagta aaaaaattgg aaaaaagcgc
   tccggaattt aaacatgcac taaaacgtcc tctgcccatt aaatggttoga cctgcgtact ttttttaacc ttttttcgcg
   G74L75Stille Mutation F87
   >.....P450 BM3.....>
   q g l k f v r d f a g d g l f t s w t h e k n w k k a

      Eco57I
      HindIII
321  ataatatctt acttccaagc ttcagtcagc aggcaatgaa aggctatcat gcgatgatgg tcgatatcgc cgtgcagctt
   tattatagaa tgaaggttcg aagtcagtcg tccgttactt tccgatagta cgctactacc agctatagcg gcacgtcgaa
   >.....P450 BM3.....>
   h n i l l p s f s q q a m k g y h a m m v d i a v q l

      EcoRV
401  gttcaaaagt gggagcgtct aaatgcagat gagcatattg aagtaccgga agacatgaca cgtttaacgc ttgatacaat
   caagttttca cctcgcgaga tttacgtcta ctctgataac ttcatggcct tctgtactgt gcaaatgcg aactatgta
   >.....P450 BM3.....>
   v q k w e r l n a d e h i e v p e d m t r l t l d t

481  tggctcttgc ggctttaact atcgctttaa cagcttttac cgagatcagc ctcctccatt tattacaagt atggctcggg
   accagaaaac cggaaattga tagcgaattt gtcgaaaatg gctctagtcg gagtaggtaa ataattgcca taccaggcac
   >.....P450 BM3.....>
   i g l c g f n y r f n s f y r d q p h p f i t s m v r

      Pf23II
561  cactggatga agcaatgaac aagcagcagc gagcaaatcc agacgacca gcgtacgatg aaaacaagcg ccagtttcaa
   gtgacctact tcgttacttg ttcgtcgtcg ctctgttagg tctgctgggt cgcagctac tttgttcgc ggtcaaaagt
   L181 Q188
   >.....P450 BM3.....>
   a l d e a m n k q q r a n p d d p a y d e n k r q f q

      EcoRV
641  gaagatatca aggtgatgaa cgacctagta gataaaatta ttgcagatcg caaagcaagc ggtgaacaaa gcgatgatt
   cttctatagt tccactactt gctggatcat ctattttaat aacgtctagc gtttcggtcg ccacttggtt cgctactaaa
   >.....P450 BM3.....>
   e d i k v m n d l v d k i i a d r k a s g e q s d d

```

**Abbildung 98:** Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 A74G L188Q BB. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

      NdeI
721  attaacgcat atgctaaacg gaaaagatcc agaaacgggt gagccgcttg atgacgagaa cattcgctat caaattatta
    taattgcgta tacgatttgc cttttctagg tctttgccca ctcggcgaa c tactgctctt gtaagcgata gtttaataat
    >.....P450 BM3.....>
    l l t h m l n g k d p e t g e p l d d e n i r y q i i

      PciI
801  cattcttaat tgcgggacac gaaacaacaa gtggctcttt atcatttgcg ctgtatttct tagtgaaaaa tccacatgta
    gtaagaatta acgcccctgtg ctttgttgtt caccagaaaa tagtaaacgc gacataaaga atcacttttt aggtgtacat
    I263          T268
    >.....P450 BM3.....>
    t f l i a g h e t t s g l l s f a l y f l v k n p h v

      BssSI
881  ttacaaaaag cagcagaaga agcagcacga gttctagtag atcctgttcc aagctacaaa caagtcaaac agcttaataa
    aatgtttttc gtogtcttct togtcgtgct caagatcatc taggacaagg ttcgatgttt gttcagtttg tccaatttat
    >.....P450 BM3.....>
    l q k a a e e a a r v l v d p v p s y k q v k q l k

961  tgtcggcatg gtcttaaacg aagccctgag gttatggcca actgctcctg cgttttccct atatgcaaaa gaagatcggg
    acagccgtac cagaatttgc ttcgggactc caataccggg tgacgaggac gcaaaaggga tatacgtttt cttctatgcc
    Bsu36I          A328
    >.....P450 BM3.....>
    y v g m v l n e a l r l w p t a p a f s l y a k e d t

1041 tgcttgagg agaatacct ttagaaaaag gcgacgaact aatggttctg attcctcagc ttcaccgtga taaaacaatt
    acgaacctcc tcttatagga aatctttttc cgctgcttga ttaccaagac taaggagtcg aagtggcact attttgtaa
    >.....P450 BM3.....>
    v l g g e y p l e k g d e l m v l i p q l h r d k t i

      SphI
1121 tggggagacg atgtggaaga gttccgtcca gagcgTTTTg aaaatccaag tgcgattccg cagcatcgtg ttaaaccgtt
    acccctctgc tacaccttct caaggcaggt ctcgcaaaaac ttttaggttc acgctaaggc gtogtacgca aatttgcaa
    >.....P450 BM3.....>
    w g d d v e e f r p e r f e n p s a i p q h a f k p

      SapI
1201 tggaaaacgg cagcgtcgtg gtatcgggtc gcagttcgtc cttcatgaag caacgctggt acttggtatg atgctaaaac
    acctttgcca gtgcacgca catagccagt cgtcaagcga gaagtacttc gttgacacca tgaaccatac tacgattttg
    >.....P450 BM3.....>
    f g n g q r a c i g q q f a l h e a t l v l g m m l k

      Eco57I
1281 actttgactt tgaagatcat acaaactacg agctcgatat taaagaaact ttaacgtaa aacctgaagg ctttgggta
    tgaactgaa acttctagta tgtttgatgc tcgagctata atttcttga aattgcaatt ttggacttcc gaaacaccat
    T438
    >.....P450 BM3.....>
    h f d f e d h t n y e l d i k e t l t l k p e g f v v

      BamHI
1361 aaagcaaat cgaaaaaat tccgcttggc gggatccctt cacctagcac tgaacagtct gctaaaaaag tacgcaaaa
    tttcgtttta gcttttttta aggcgaaccg ccctagggaa gtggatcgtg acttgtcaga cgatttttcc atgcgtttt
    BamHI
    >.....P450 BM3.....>
    k a k s k k i p l g g i p s p s t e q s a k k v r k
  
```

**Abbildung 99:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 A74G L188Q BB. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

1441 ggcagaaaac gtcataata cgcgctgct tgtgctatac ggttcaaata tgggaacagc tgaaggaacg gcgctgatt
      ccgctctttg cgagtattat gcggcgaaga acacgatatg ccaagtttat acccttgctg acttccttgc cgcgactaa
      >.....P450 BM3.....>
      k a e n a h n t p l l v l y g s n m g t a e g t a r d
      Eco57I
1521 tagcagatat tgcaatgagc aaaggatttg caccgcaggt cgcaacgctt gattcacacg cggaaatct tccgcgcaa
      atcgtctata acgttactcg ttctctaaac gtggcgtcca gcgcttgcgaa ctaagtgtgc ggcttttaga aggcgcgctt
      >.....P450 BM3.....>
      l a d i a m s k g f a p q v a t l d s h a g n l p r e
      BstAPI
1601 ggagctgatat taattgtaac ggcgtcttat aacggctatc cgcctgataa cgcaaagcaa tttgtcgact ggtagacca
      cctcgacata attaacattg ccgcagaata ttgccagtag gcggactatt gcgcttctgt aaacagctga coaatctggt
      >.....P450 BM3.....>
      g a v l i v t a s y n g h p p d n a k q f v d w l d
      AseI PsII
1681 agcgtctgct gatgaagtaa aaggcgttcg ctactccgta tttggatgcg gcgataaaaa ctgggctact acgtatcaa
      tcgcagacga ctacttcatt ttccgcaagc gatgaggcat aaacctacgc cgctattttt gaccggatga tgcatagtt
      >.....P450 BM3.....>
      q a s a d e v k g v r y s v f g c g d k n w a t t y q
      ClaI SacII
1761 aagtgcctgc ttttatcgat gaaacgcttg cgcctaagg ggcagaaaac atcgtcgacc gcggtgaagc agatgcaagc
      ttcacggacg aaaatagcta ctttgcgaac ggcgatttcc cgtctctttg tagcgcactgg cgcacactcg tctacgttcg
      >.....P450 BM3.....>
      k v p a f i d e t l a a k g a e n i a d r g e a d a s
      NdeI NdeI
1841 gacgactttg aaggcacata tgaagaatgg cgtgaacata tgtggagtga cgtagcagcc tactttaacc tcgacattga
      ctgctgaaac ttccgtgtat acttcttacc gcacttgat acacctcact gcctcgtcgg atgaaattgg agctgtaact
      >.....P450 BM3.....>
      d d f e g t y e e w r e h m w s d v a a y f n l d i
      SacII
1921 aaacagtgaa gataataaat ctactctttc acttcaattt gtcgacagcg cgcgggatat gccgcttgcg aaaatgcacg
      tttgtcactt ctattattta gatgagaaag tgaagttaaa cagctgtcgc ggcgctata cggcgaacgc ttttacgtgc
      >.....P450 BM3.....>
      e n s e d n k s t l s l q f v d s a a d m p l a k m h
2001 gtgcgttttc aacgaacgtc gtagcaagca aagaacttca acagccagcc agtgcacgaa gcacgcgaca tttgaaatt
      cacgcaaaaag ttgcttgtag catcgcttctg ttcttgaagt tgtcgggtccg tcacgtgctt cgtgcgctgt agaactttaa
      >.....P450 BM3.....>
      g a f s t n v v a s k e l q q p g s a r s t r h l e i
      HindIII
2081 gaacttcaa aagaagcttc ttatcaagaa ggagatcatt taggtgttat tcctcgcaac tatgaaggaa tagtaaaccg
      cttgaaggtt ttcttcgaag aatagttcct cctctagtaa atccacaata aggagcgttg atacttcctt atcatttggc
      >.....P450 BM3.....>
      e l p k e a s y q e g d h l g v i p r n y e g i v n
2161 tgtaacagca aggttcggcc tagatgcac acagcaaatc cgtctggaag cagaagaaga aaaattagct catttggccac
      acattgtcgt tccaagccgg atctacgtag tgctgcttag gcagaccttc gtctctctct ttttaatcga gtaaaccggtg
      >.....P450 BM3.....>
      r v t a r f g l d a s q q i r l e a e e e k l a h l p

```

**Abbildung 100:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 A74G L188Q BB. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

                SapI
2241  tgcgtaaaac agtatccgta gaagagcttc tgcaatacgt ggagcttcaa gatcctgtta cgcgcacgca gcttcgcgca
agcgattttg tcataggcat cttctcgaag acgttatgca cctcgaagtt ctaggacaat gcgcgtgctg cgaagcgcgt
>.....P450 BM3.....>
  l a k t v s v e e l l q y v e l q d p v t r t q l r a

                BstAPI
2321  atggctgcta aaacggtctg cccgccgcat aaagtagagc ttgaagcctt gcttgaaaag caagcctaca aagaacaagt
taccgacgat tttgccagac gggcggcgta tttcatctcg aacttcggaa cgaacttttc gttcggatgt ttctgttca
>.....P450 BM3.....>
  m a a k t v c p p h k v e l e a l l e k q a y k e q

2401  gctggcaaaa cgtttaacaa tgcttgaact gcttgaaaaa taccggcgct gtgaaatgaa attcagcgaa ttatcgcgc
cgaccgtttt gcaaattggt acgaacttga cgaacttttt atgggccgca cactttactt taagtcgctt aaatagcggg
>.....P450 BM3.....>
  v l a k r l t m l e l l e k y p a c e m k f s e f i a

                DraIII
                BssSI
2481  ttctgccaag catacgcccg cgctattact cgatttcttc atcacctcgt gtcgatgaaa acaagcaag catcacggtc
aagacggttc gtatgcgggc gcgataatga gctaaagaag tagtgagca cagctacttt ttgttcgttc gtatgcgacg
>.....P450 BM3.....>
  l l p s i r p r y y s i s s s p r v d e k q a s i t v

2561  agcgttgtct caggagaagc gtggagcgga tatggagaat ataaaggaat tgcgtcgaac tatcttgcgc agctgcaaga
tcgcaacaga gtcctcttcg cacctcgcct atacctctta ttttctcta acgcagcttg atagaacggc tcgacgttct
>.....P450 BM3.....>
  s v v s g e a w s g y g e y k g i a s n y l a e l q

2641  aggagatacg attacgtgct ttatttcac accgcagtca gaatttacgc tgccaaaaga cctgaaaac ccgcttatca
tcctctatgc taatgcacga aataaagggt tggcgtcagt cttaaagcgc acggttttct gggactttgc ggcaatagt
>.....P450 BM3.....>
  e g d t i t c f i s t p q s e f t l p k d p e t p l i

                BssHII
2721  tggtcggacc gggaaacaggc gtcgcgccgt ttagaggctt tgtgcaggcg cgcaaacagc taaaagaaca aggacagtca
accagcctgg cccttgctcg cagcgcggca aatctcggaa acacgtccgc gcgtttgtcg atttcttctg tcctgtcagt
>.....P450 BM3.....>
  m v g p g t g v a p f r g f v q a r k q l k e q g q s

                SapI
2801  cttggagaag cacatttata ctctggctgc cgttcacctc atgaagacta tctgtatcaa gaagagcttg aaaacgcca
gaacctcttc gtgtaaatat gaagccgacg gcaagtggag tacttctgat agacatagtt cttctcgaac ttttgcgggt
>.....P450 BM3.....>
  l g e a h l y f g c r s p h e d y l y q e e l e n a

                SphI
2881  aagcgaagc atcattacgc ttcataccgc tttttctcgc atgccaaatc agccgaaaac atacgttcag cacgtaatgg
ttcgcttcgc tagtaatcgc aagtatggcg aaaaagagcg tacggtttag tcggcttttg tatgcaagtc gtgcattacc
>.....P450 BM3.....>
  q s e g i i t l h t a f s r m p n q p k t y v q h v m

```

**Abbildung 101:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 A74G L188Q BB. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

                BclI
2961 aacaagacgg caagaaattg attgaacttc ttgatcaagg agcgcacttc tatatattgcg gagacggaag ccaaattggca
    ttgttctgcc gttctttaac taacttgaag aactagttcc tcgCGTgaag atataaacgc ctctgccttc ggtttaccgt
>.....P450 BM3.....>
    e q d g k k l i e l l d q g a h f y i c g d g s q m a

                DraIII
3041 cctgccgttg aagcaacgct tatgaaaagc tatgctgacg ttcaccaagt gagtgaagca gacgctcgct tatggctgca
    ggacggcaac ttcgTTgcga atacttttCG atacgactgc aagtggttca ctcaactcgt ctgCGagcga ataccgacgt
>.....P450 BM3.....>
    p a v e a t l m k s y a d v h q v s e a d a r l w l

                EcoRI                HindIII                NotI
3121 gcagctagaa gaaaaaggcc gatacgcaaa agacgtgtgg gctgggtaat aagaattcga gtcCGtCGa caagcttgcg
    cgtCGatcctt ctttttccgg ctatcggttt tctgcacacc cgaccatta ttcttaagct cgaggcagct gttCGaacgc
>.....P450 BM3.....>
    q q l e e k g r y a k d v w a g -

```

**Abbildung 102:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von P450 BM3 A74G L188Q BB. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

321  ggggggttct catcatcatc atcatcatgg tatggctagc atgactggtg gacagcaaat gggtcgggat ctgtacgacg
cccccaaga gtagtagtag tagtagtacc ataccgatcg tactgaccac ctgtcgttta cccagccta gacatgctgc
His-Tag
>.....HisA PTDH.....>
m g g s h h h h h h g m a s m t g g q q m g r d l y d

          SacI
          XhoI
401  atgacgataa ggatcgatgg ggatccgagc tcgagatgct gccgaaactc gttataactc accgagtaca cgaagagatc
tactgctatt cctagctacc cctaggctcg agctctacga cggctttgag caatattgag tggctcatgt gcttctctag
Start D13E
>.....HisA PTDH.....>
d d d k d r w g s e l e m l p k l v i t h r v h e e i

481  ctgcaactgc tggcgccaca ttgcgagctg ataaccaacc agaccgacag cacgctgacg cgcgaggaaa ttctgcgccg
gacgttgacg accgcggtgt aacgctcgac tattggttg tctggctgtc gtgcgactgc gcgctccttt aagacgcgcc
M26I
>.....HisA PTDH.....>
l q l l a p h c e l i t n q t d s t l t r e e i l r

561  ctgtcgcgat gctcaggcga tgatggcgtt catgcccgat cgggtcgatg cagactttct tcaagcctgc cctgagctgc
gacagcgcta cgagtcgctt actaccgcaa gtacgggcta gccagactac gtctgaaaga agttcggacg ggactcgacg
>.....HisA PTDH.....>
r c r d a q a m m a f m p d r v d a d f l q a c p e l

641  gtgtaatcgg ctgcgcgctc aaggccttcg acaatttoga tgtggacgcc tgtactgcgc gcggggtctg gctgacctc
cacattagcc gacgcgcgag ttcccgaagc tgtaaagct acacctgcgg acatgacgcg cgccccagac cgactggaag
V71I
>.....HisA PTDH.....>
r v i g c a l k g f d n f d v d a c t a r g v w l t f

721  gtgcctgatc tgttgacggt cccgactgcc gagctggcga tcggactggc ggtggggctg gggcggcac tgcgggcagc
cacgactag acaactgcca gggctgacgg ctcgaccgct agcctgaccg ccaccccgac cccgcctgag acgcccgtcg
>.....HisA PTDH.....>
v p d l l t v p t a e l a i g l a v g l g r h l r a

801  agatgcgttc gtccgctctg gcaagttcaa gggctggcaa ccacatttct acggcacggg gctggataac tctacggtcg
tctacgcaag caggcgagac cgttcaagtt cccgaccggt ggtgtaaaga tgccgtgccc cgacctattg agatgccagc
E130K Q132K Q137H A146S
>.....HisA PTDH.....>
a d a f v r s g k f k g w q p h f y g t g l d n s t v

881  gcttccttgg catggcgccc atcggactgg ccatggctga tcgcttcag ggatggggcg cgaccctgca gtaccacgcg
cgaaggaacc gtaccgcggg tagcctgacc ggtaccgact agcgaacgtc cctaccccgc gctgggacgt catggtgcgc
I150F E175A
>.....HisA PTDH.....>
g f l g m g a i g l a m a d r l q g w g a t l q y h a

961  agggaaggctc tggatacaca aaccgagcaa cggctcggcc tgcgccaggt ggcgtgcagc gaactcttcg ccagctcgga
tccttccgag acctatgtgt ttggctcgtt gccgagccgg acgcggtcca ccgcacgctg cttgagaagc ggtcgagcct
A176R
>.....HisA PTDH.....>
r k a l d t q t e q r l g l r q v a c s e l f a s s

```

**Abbildung 103:** Gen- und Aminosäuresequenz von HisA PTDH. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

1041 cttcatcctg ctggcgcttc ccttgaatgc cgataccctg catctgggtca acgccgagct gcttgccttc gtacggccgg
    gaagtaggac gaccgcgaag ggaacttacg gctatgggac gttagaccagt tgcggctcga cgaacgggag catgcccggc
                                Q215L
    >.....HisA PTDH.....>
    d f i l l a l p l n a d t l h l v n a e l l a l v r p

1121 gcgctctgct tgtaaaccoc tgctgtggct cggtagtgga tgaagccgcc gtgctcgcgg cgcttgagcg aggccagctc
    cgcgagacga acatttgggg acagcaccga gccatcacct acttcggcgg caccgagcgc cgcgaactcg tccggtcggag
    >.....HisA PTDH.....>
    g a l l v n p c r g s v v d e a a v l a a l e r g q l

1201 ggcggggatg cggcggatgt attcgaatg gaagactggg ctgcgcggga ccggcgcctg tgcacatgac ctgcgctgct
    ccgccatcac gccgcctaca taagctttac cttctgacct gagcgcgcct gcccgggcag acgtagctag gacgcgacga
                                R275L L276C
    >.....HisA PTDH.....>
    g g y a a d v f e m e d w a r a d r p l c i d p a l

1281 cgcgcatccg aatagcgtgt tcaactccga catagggtcg gcagtgcccg cggtgccctt ggagattgaa cgttgtgcag
    gcgcttaggc ttatgcgaca agtgaggcgt gtatcccagc cgtcacgcgc gccacgcgga cctctaactt gcaacacgctc
    >.....HisA PTDH.....>
    l a h p n t l f t p h i g s a v r a v r l e i e r c a

1361 cgcagaacat cctccaggca ttggcaggtg agcgcccaat caacgctgtg aaccgtctgc ccaaggccaa tcctgcccgc
    gcgtcttgta ggaggtcctg aaccgtccac tcgcggggta gttcgcgacac ttggcagacg gttcccggtt aggcagggcg
                                I313L V315A A319E A325V E332N
    >.....HisA PTDH.....>
    a q n i l q a l a g e r p i n a v n r l p k a n p a a

    HindIII
1441 gactgaaaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa tcagaacgca gaagcggctc
    ctgactttcg aaccgacaaa accgcctact ctcttctaaa agtcggacta tgtctaattt agtcttgcgt cttcgcgaca
    C336D
    >...>> HisA PTDH
    d -
  
```

**Abbildung 104:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von HisA PTDH. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

      BglII                                     XbaI
4961  tcgagatctc gatcccgoga aattaatagc actcactata ggggaattgt gagcggataa caattcccct ctagaatgaa
      agctctagag ctagggcgct ttaattatgc tgagtgatat ccccttaaca ctgcctatt  gttaagggga gatcttactt
      T7 transcription start
      FDH >>..>
      m

      Tati
5041  gatcgtttta gtcttatatg atgctggtaa gcacgctgct gatgaagaaa aattatatgg ttgtactgaa aataaattag
      ctagcaaaat cagaatatac tacgaccatt cgtgcgacga ctacttcttt ttaatatacc aacatgactt ttatttaatc
      >.....FDH.....>
      k i v l v l y d a g k h a a d e e k l y g c t e n k l

5121  gtattgctaa ttggttaaaa gatcaaggtc atgaactaat tactacttct gataaagaag gtgaaacaag tgaattggat
      cataacgatt aaccaatctt ctagttccag tacttgatta atgatgaaga ctatttcttc cactttgttc acttaacctc
      >.....FDH.....>
      g i a n w l k d q g h e l i t t s d k e g e t s e l d

      AlwNI
5201  aaacatatcc cagatgctga tattatcatc accactcctt tccatcctgc ttatatcact aaggaaagac ttgacaaggc
      tttgtatagg gtctacgact ataatagtag tggtaggaa aggtaggacg aatatagtag ttcctttctg aactgttccg
      >.....FDH.....>
      k h i p d a d i i i t t p f h p a y i t k e r l d k

      BclI
5281  taagaactta aaattagtcg ttgtcgtggt tgttggttct gatcacattg atttagatta tattaatcaa acaggtgaaga
      attcttgaat ttaaatcagc aacagcgacc acaaccaaga ctagtgtaac taaatctaata ataattagtt tgtccattct
      >.....FDH.....>
      a k n l k l v v v a g v g s d h i d l d y i n q t g k

      AflIII                                     MslI                                     XcmI
5361  aaatctcagt cttggaagt acaggttcta atgttgcttc tgttgctgaa cacgttgctc tgaccatgct tgtcttgggt
      tttagagtca gaaccttcaa tgtccaagat tacaacagag acaacgactt gtgcaacagt actggtagca acagaaccaa
      >.....FDH.....>
      k i s v l e v t g s n v v s v a e h v v m t m l v l v

      Bpu10I                                     EcoRV
5441  agaaatctcg ttccagcaca tgaacaaatt attaaccacg attggggagt tgctgctatc gctaaggatg cttacgatat
      tctttaaagc aaggtcgtgt acttgtttaa taattggtgc taaccctcca acgacgatag cgattcctac gaatgctata
      >.....FDH.....>
      r n f v p a h e q i i n h d w e v a a i a k d a y d

5521  cgaaggtaaa actattgcta ccattggtgc tggtagaatt ggttacagag tcttggaag attactcctt ttaatccaa
      gcttccattt tgataacgat ggtaaccacg accatcttaa ccaatgtctc agaaccttc taatgagggga aaattagggt
      >.....FDH.....>
      i e g k t i a t i g a g r i g y r v l e r l l p f n p

      Eco57I                                     EarI
5601  aagaattatt atactaccag cgcaacgctt taccaaaaga agctgaagaa aaagttggtg ctagaagagt tgaaaatatt
      ttcttaataa tatgatggtc gcggtgcgaa atggttttct tcgacttctt tttaaccac gatcttctca acttttataa
      D195QY196RQ197N
      >.....FDH.....>
      k e l l y y q r n a l p k e a e e k v g a r r v e n i
  
```

**Abbildung 105:** Gen- und Aminosäuresequenz von FDH\*. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

      BpuEI      SmlI      EcoRV      BspMI      PacI
5681  gaagaattag ttgctcaagc tgatatcggt acagttaatg ctccattaca cgcaggtaca aaaggtttaa ttaataagga
      cttcttaatc aacgagttcg actatagcaa tgtcaattac gaggtaatgt gcgtccatgt ttccaaatt aattatcct
>.....FDH.....>
      e e l v a q a d i v t v n a p l h a g t k g l i n k

      BstAPI      Eco57I
5761  attattatct aaatttaaaa aagggtcctg gttagtcaat accgcaagag gtgctatttg tgttgctgaa gatgttgca
      taataataga tttaaatttt ttccacgaac caatcagtta tggcgttctc cacgataaac acaacgactt ctacaacgct
>.....FDH.....>
      e l l s k f k k g a w l v n t a r g a i c v a e d v a

      BtgI
      NcoI
      StyI
      TaqII
5841  cagctttaga atctggctcaa ttaagaggtt acgggtggta tgtttgggtc ccacaaccag ctccaaagga tcaccatgg
      gtcgaaatct tagaccagtt aattctccaa tgccaccact acaaaccaag ggtggttggtc gaggtttcct agtgggtacc
>.....FDH.....>
      a a l e s g q l r g y g g d v w f p q p a p k d h p w

      BseRI
5921  agagatatga gaaataaata tgggtcgtgg aatgccatga ctctcacta ctctgggtact actttagatg ctcaaaacag
      tctctatact ctttatttat accacgacca ttacgggtact gaggagtgat gagaccatga tgaatctac gagtttggtc
>.....FDH.....>
      r d m r n k y g a g n a m t p h y s g t t l d a q t

      Eco57I
6001  atacgctgaa ggtactaaaa atatcttgga atcattcttt actggtaaat ttgattacag accacaagat attatcttat
      tatgcgactt ccatgatttt tatagaacct tagtaagaaa tgaccattta aactaatgct tgggtgttcta taatagaata
>.....FDH.....>
      r y a e g t k n i l e s f f t g k f d y r p q d i i l

      SmlI
      XhoI
6081  taaatgggtg atacgttact aaagcttacg gtaaacacga taagaaactc gagcaccacc accaccacca ctgagatccg
      atttaccact tatgcaatga tttcgaatgc catttggtct attctttgag ctcggtggtgg tgggtggtggt gactctaggc
      His-Tag
>.....FDH.....>
      l n g e y v t k a y g k h d k k l e h h h h h h -

```

**Abbildung 106:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von FDH\*. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

1  ggggaattgt gagcggataa caattcccct gtagaaataa ttttgtttaa cttaaataag gagatatacc atggcgcaac
   ccccttaaca ctgccttatt gtaaagggga catctttatt aaaacaaatt gaaattattc ctctatatgg taccggttg
                                     >>.RSL...>
                                     m a q

81  gctcgtgattt tctgaagtat agcgtggcgc tggcgtggc gagcgcgctg ccgctgtgga gccgtgagg ttttgcggcg
   cagcactaaa agacttcata tcgcaccgcy accgcaccg ctgcgcgac ggcgacacct cggcaccgca aaaacgcyg
   TAT-leader
>.....RSL.....>
  r r d f l k y s v a l g v a s a l p l w s r a v f a a

161  gcggtgcgta actacggtct ggttattaag aacgtgaaag ttgcgcgga cggcttcgag cgtagcatcg tgagcgtaa
   cgccacgcat tgatgccaga ccaataattc ttgactttc aacgggcct gccgaagtc gcatcgtagc actcgcatt
>.....RSL.....>
  a v r n y g l v i k n v k v a p d g f e r s i v s v

241  cggtcagctg ccgggcaccc tgattaccg gaacaagggt gacaccctgc acatcaacgt gaccaaccag ctgaccgatc
   gccagtcgac ggcccgtggg actaatggcg cttgttcca ctgtgggacg tgtagttgca ctggttggtc gactggctag
>.....RSL.....>
  n g q l p g t l i t a n k g d t l h i n v t n q l t d

321  cgaccatgag tcgtgcgacc accattcact ggacgggtct gttccaagcg accaccggg atgaggatgg tccggcgttt
   gctggtagc agcacgctgg tggttaagta ccgtgccaga caaggctcgc tgggtggcgc tactcctacc aggccgcaa
>.....RSL.....>
  p t m r r a t t i h w h g l f q a t t a d e d g p a f

401  gttaccagtg gcccgattgc gcaaacctg agctacacct atgaaatccc gctgcacgac cagaccgta ccatgtgta
   caatgggtca cgggctaacg cgttttggac tcgatgtgga tactttaggg cgacgtgctg gtctggccat ggtacacat
>.....RSL.....>
  v t q c p i a q n l s y t y e i p l h d q t g t m w

481  ccacgcgcac ctggcgagcc aatatgtgga tggctcgcg gcccgcgctg ttatctaaga cccgaacgat ccgcacaagg
   ggtgcgcgctg gaccgctcgg ttatacacct accagacgca cggggcgacc aatagatgct gggcttgcta ggcgtgttc
>.....RSL.....>
  y h a h l a s q y v d g l r g p l v i y d p n d p h k

561  cgctgtatga cgtggacgat aaagataccg tggttatgct ggaggattgg tatcataccc cggcggcggg gctggaacac
   gcgacatact gcacctgcta tttctatggc accaatacga cctcctaacc atagtatggg gccgcggcca cgacctgtg
>.....RSL.....>
  a l y d v d d k d t v v m l e d w y h t p a p v l e h

641  cagatgttta gcgttgacaa caccgcgctg ctgagcccgg ttccggatag cggctctgatt aacggcaagg gccgttacgt
   gtctacaaat cgcaactggt gtggcgcgac gactcgggcc aaggcctatc gccagactaa ttgccgttcc cggcaatgca
>.....RSL.....>
  q m f s v d n t a l l s p v p d s g l i n g k g r y

721  ggggtgcccg caagtccgc gtagcgtgat caacgttacc cgtggcaaac gttatcgtct gcgtgtgatc aacgcgagcg
   cccaccgggc gttcaaggcg catcgcacta gttgcaatgg gaccggttg caatagcaga cgcacactag ttgcgctcgc
>.....RSL.....>
  v g g p q v p r s v i n v t r g k r y r l r v i n a s

```

**Abbildung 107:** Gen- und Aminosäuresequenz von RSL. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

801 cgattggtag cttcaccttt agcattgagg gccaccgtct gaccggtatc gaggcggacg gtattccgca cgaaccgctg
gctaaccatc gaagtggaaa tcgtaactcc cgggtggcaga ctggcaatag ctccgcctgc cataaggcgt gcttggcgac
>.....RSL.....>
a i g s f t f s i e g h r l t v i e a d g i p h e p l

881 gttgtggata gcttccagat ttacgcgggc caacgttata gcgtgatcgt tgaaccaac cagaccggc cgaactactg
caacacctat cgaaggctca aatgcgcccg gttgcaatat cgcactagca actttgggtg gtctggcgcc gcttggatgac
>.....RSL.....>
v v d s f q i y a g q r y s v i v e t n q t a a n y

961 gattcgtgcg ccgatgaccg tggcgggtgc gggtaaccaac gcgaacctgg acccgaccaa cgtgtttgcg gttctgcact
ctaagcacgc ggctactggc accgcccacg cccatggttg cgcttggacc tgggctggtt gcacaaacgc caagacgtga
>.....RSL.....>
w i r a p m t v a g a g t n a n l d p t n v f a v l h

1041 ataacgggtc gccgaacgcg gagccgacca ccgaacaagg tacccgcgatt gccaccgcgc tggttgagga aaacctgcac
tattgccacg cggcttgcgc ctccggctggt ggcttgttcc atggcgctaa ccgtggcgcg accaactcct tttggacgtg
>.....RSL.....>
y n g a p n a e p t t e q g t a i g t a l v e e n l h

1121 gcgctgatca acccgggtgc gccgggtggc agcgcgccgg cggacgtgag cctgaacctg gcgatcggtc gtagcaccgt
cgcgactagt tgggccacg cggcccacg tcgcgcggcc gcctgcactc ggacttggac cgtagccag catcgtggca
>.....RSL.....>
a l i n p g a p g g s a p a d v s l n l a i g r s t

1201 tgatggcatt ctgcgtttca cctttaacaa catcaagtac gaagcgccga gcctgccgac cctgctgaaa attctggcga
actaccgtaa gacgcaaagt ggaaattggt gtagtcatg ctccgcggtc cggacggctg ggacgacttt taagaccgct
>.....RSL.....>
v d g i l r f t f n n i k y e a p s l p t l l k i l a

1281 acaacgcgag caccaacgcg gacttcggta ccaacgagca caccctggtg ctgccgcaca acaagttat cgaactgaac
tgttgcgctc gtggttgcgc ctgaagccat ggttgctcgt gtgggaccac gacggcgtgt tgttccaata gcttgacttg
>.....RSL.....>
n n a s t n a d f g t n e h t l v l p h n k v i e l n

1361 attaccggtg gcgcggaaca cccgatccac ctgcacggtc atgtgtttga tgtggttaaa agcctgggtg gcaccccgaa
taatggccac cgcgcctggt gggctagggt gacgtgccag tacacaaact acaccaatth tcggaccac cgtggggctt
>.....RSL.....>
i t g g a d h p i h l h g h v f d v v k s l g g t p

1441 ctatgtgaac ccgccgcgtc gtgatgtggt tcgtgttggg ggcaccggtg tggttctgcg tttcaaaacc gacaaccgg
gatacacttg ggcggcgtag cactacacca agcacaacca ccgtggccac accaagacgc aaagtthtgg ctggtgggccc
>.....RSL.....>
n y v n p p r r d v v r v g g t g v v l r f k t d n p

1521 gcccggtggt tgtgcactgc cacatcgatt ggcacctgga agcgggtctg gcgctggtt ttgcgaggc gccgagcgaa
cgggcaccaa acacgtgacg gtgtagctaa ccgtggacct tcgccagac cgcgacaaa aacgcctccg cggctcgctt
>.....RSL.....>
g p w f v h c h i d w h l e a g l a l v f a e a p s e

1601 gtgcgtcagg gcacccaaag cgttcagccc aaccaagcgt gggaacagct gtgcccgaag tatcaggcgc tgccgaccga
cacgcagtcc cgtgggtttc gcaagtcggc ttggttcgca cccttgctga cacgggcttc atagtcgcg acggctggct
>.....RSL.....>
v r q g t q s v q p n q a w e q l c p k y q a l p t

1681 tctgcaatgg agccaccgc agtttgaaaa gtaaccatgg gcagcagcca tcaccatcat caccacagcc aggatccgaa
agacgttacc tcggtggcg tcaactttt cattggtacc cgtcgtcgtt agtggtagta gtggtgctcg tcctaggctt
Strep-Tag
>.....RSL.....>>
d l q w s h p q f e k -

```

**Abbildung 108:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von RSL. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

1521 atagattatg aaaatcgaag aaggtaact ggtaatctgg attaacggcg ataaaggcta taacggcttc gctgaagtcg
tatcctaatac ttttagcttc ttccatttga ccattagacc taattgccgc tatttccgat attgccagag cgacttcage
>>.....MalE.....>
m k i e e g k l v i w i n g d k g y n g l a e v
>>.....MalE RSL F-895.....>
m k i e e g k l v i w i n g d k g y n g l a e v

1601 gtaagaaatt cgagaaagat accggaatta aagtcaccgt tgagcatccg gataaactgg aagagaaatt cccacaggtt
cattctttaa gctctttcta tggccttaat ttcagtggca actcgtaggc ctatttgacc ttctctttaa ggggtgtccaa
>.....MalE.....>
g k k f e k d t g i k v t v e h p d k l e e k f p q v
>.....MalE RSL F-895.....>
g k k f e k d t g i k v t v e h p d k l e e k f p q v

1681 gcggaactg gcgatggccc tgacattatc ttctgggac acgacogctt tgggtggctac gctcaatctg gcctgttggc
cgccgttgac cgctaccggg actgtaatag aagaccogtg tgctggcgaa accaccgatg cgagttagac cggacaaccg
>.....MalE.....>
a a t g d g p d i i f w a h d r f g g y a q s g l l
>.....MalE RSL F-895.....>
a a t g d g p d i i f w a h d r f g g y a q s g l l

1761 tgaaatcacc ccggacaaag cgttccagga caagctgtat ccgtttacct gggatgccgt acgttacaac ggcaagctga
actttagtg ggctgtttc gcaaggtcct gttcgacata ggcaaatgga ccctacggca tgcaatgttg cgtttcgact
>.....MalE.....>
a e i t p d k a f q d k l y p f t w d a v r y n g k l
>.....MalE RSL F-895.....>
a e i t p d k a f q d k l y p f t w d a v r y n g k l

1841 ttgcttacc gatcgctgtt gaagcgttat cgctgattta taacaagat ctgctgccga acccgccaaa aacctgggaa
aacgaatggg ctagcgacaa cttcgcaata gcgactaaat attgtttcta gacgacggct tggcgggtt ttggaccctt
>.....MalE.....>
i a y p i a v e a l s l i y n k d l l p n p p k t w e
>.....MalE RSL F-895.....>
i a y p i a v e a l s l i y n k d l l p n p p k t w e

1921 gagatcccg cgctggataa agaactgaaa gcgaaaggta agagcgcgct gatgttcaac ctgcaagaac cgtaactcac
ctctagggcc gcgacctatt tcttgacttt cgctttccat tctcgcgcga ctacaagttg gacgttcttg gcatgaagtg
>.....MalE.....>
e i p a l d k e l k a k g k s a l m f n l q e p y f
>.....MalE RSL F-895.....>
e i p a l d k e l k a k g k s a l m f n l q e p y f

2001 ctggcgcgtg attgctgctg acgggggtta tgcgttcaag tatgaaaacg gcaagtacga cattaagac gtgggctggg
gaccggcgac taacgacgac tgccccaat acgcaagttc atacttttgc cgttcatgct gtaatttctg caccgcacc
>.....MalE.....>
t w p l i a a d g g y a f k y e n g k y d i k d v g v
>.....MalE RSL F-895.....>
t w p l i a a d g g y a f k y e n g k y d i k d v g v

2081 ataacgctgg cgcgaaagcg ggtctgacct tcttggttga cctgattaaa acaaacaca tgaatgcaga caccgattac
tattgcgacc gcgctttcgc ccagactgga aggaccaact ggactaattt ttgtttgtgt acttacgtct gtggctaag
>.....MalE.....>
d n a g a k a g l t f l v d l i k n k h m n a d t d y
>.....MalE RSL F-895.....>
d n a g a k a g l t f l v d l i k n k h m n a d t d y

```

**Abbildung 109:** Gen- und Aminosäuresequenz von MalE RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

2161 tccatcgag aagctgcctt taataaaggc gaaacagcga tgaccatcaa cggcccgctgg gcatgggtcca acatcgacac
aggtagcgtc ttcgacggaa attatttccg ctttgcgct actggtagtt gccgggcacc cgtaccaggt tgtagctgtg
>.....MalE.....>
s i a e a a f n k g e t a m t i n g p w a w s n i d
>.....MalE RSL F-895.....>
s i a e a a f n k g e t a m t i n g p w a w s n i d

2241 cagcaaagtg aattatgggtg taacggctact gccgaccttc aagggtcaac catccaaacc gttcgttggc gtgctgagcg
gtcgtttcac ttaataccac attgccatga cggctggaag ttoccatgtg gtaggtttgg caagcaaccg cagcactcgc
>.....MalE.....>
t s k v n y g v t v l p t f k g q p s k p f v g v l s
>.....MalE RSL F-895.....>
t s k v n y g v t v l p t f k g q p s k p f v g v l s

2321 caggtattaa cgccgccagt cgaacaaag agctggcaaa agagttcctc gaaaactatc tgctgactga tgaaggtctg
gtccataatt gccggcggtca ggcttgttc tcgaccgttt tctcaaggag cttttgatag acgactgact acttccagac
>.....MalE.....>
a g i n a a s p n k e l a k e f l e n y l l t d e g l
>.....MalE RSL F-895.....>
a g i n a a s p n k e l a k e f l e n y l l t d e g l

2401 gaagcgggta ataaagacaa accgctgggt gccgtagcgc tgaagtctta cgaggaagag ttggtgaaag atccgcgtat
cttcgccaat tatttctggt tggcgacca cggcatcgcg acttcagaat gtccttctc aaccacttc taggcgcata
>.....MalE.....>
e a v n k d k p l g a v a l k s y e e e l v k d p r
>.....MalE RSL F-895.....>
e a v n k d k p l g a v a l k s y e e e l v k d p r

2481 tgccgccact atgaaaaacg cccagaaagg tgaatcatg ccgaacatcc cgcagatgtc cgctttctggt tatgccgtgc
acggcgggtga taccttttgc gggctcttcc acttttagtac ggctttagg gcgtctacag gcgaaagacc atacggcacg
>.....MalE.....>
i a a t m e n a q k g e i m p n i p q m s a f w y a v
>.....MalE RSL F-895.....>
i a a t m e n a q k g e i m p n i p q m s a f w y a v

2561 gtactgcggt gatcaacgcc gccagcggtc gtcagactgt cgatgaagcc ctgaaagacg cgcgactaa ttcgagctcg
catgacgcca ctagtgcgg cggtcgccag cagtctgaca gctacttcgg gactttctgc gcgtctgatt aagctcgagc
male_primer
>.....MalE.....>
r t a v i n a a s g r q t v d e a l k d a q t
>.....MalE RSL F-895.....>
r t a v i n a a s g r q t v d e a l k d a q t n s s s

2641 aacaacaaca acaataacaa taacaacaac ctcgggatcg agggaaggat ttcacatag tccatggcgg tccgogacta
ttgtgtgtgt tgttattggt attgtgtgtg gagccctagc tcccttccta aagtgtatac aggtaccggc aggcgctgat
Spacer and factor alpha side
>.....MalE RSL F-895.....>
n n n n n n n n n n l g i e g r i s h m s m a v r d
>>...RSL F895....>
m a v r d

```

**Abbildung 110:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MalE RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```
2721 ccagttcatc atcaagaacg tcaataccgc tcccgatggc tttgagcgat ctattgtctc cgtaaatggc caggttcctg
ggtaagtag tagttcttgc agttatggcg agggctaccg aaactcgcta gataacagag gcagttaccg gtccaaggac
>.....MalE RSL F-895.....>
y q f i i k n v n t a p d g f e r s i v s v n g q v p
>.....RSL F895.....>
y q f i i k n v n t a p d g f e r s i v s v n g q v p

2801 ggacgttaat cacggctaac aagggtgata cgttgcatgt gaatgtcaca aatcttctca ctgatccaac gatgctgctg
cctgcaatta gtgccgattg ttcccactat gcaacgtaca cttacagtgt ttagaagagt gactaggttg ctacgcagca
>.....MalE RSL F-895.....>
g t l i t a n k g d t l h v n v t n l l t d p t m r r
>.....RSL F895.....>
g t l i t a n k g d t l h v n v t n l l t d p t m r r

2881 gctacaacaa ttcattggca cggattgttc caagctacta ctgctgatga ggatggctct gcctttgtca cgcaatgtcc
cgatgttgtt aagtaaccgt gcctaacaag gttcgtgatg gacgactact cctaccagga cggaacagct gcgttacagg
>.....MalE RSL F-895.....>
a t t i h w h g l f q a t t a d e d g p a f v t q c
>.....RSL F895.....>
a t t i h w h g l f q a t t a d e d g p a f v t q c

2961 cattgcacag aatttgtctt atacatacga gatcccactg caccgacaaa cgggaactat gtggtatcac gcccatcttg
gtaacgtgtc ttaaacagaa tatgtatgct ctagggtgac gtgctggttt gcccttgata caccatagtg cgggtagaac
>.....MalE RSL F-895.....>
p i a q n l s y t y e i p l h d q t g t m w y h a h l
>.....RSL F895.....>
p i a q n l s y t y e i p l h d q t g t m w y h a h l

3041 caagtcaata tgtggatgga ttgcccggac ctttggatcat atatgacccc aatgatccac acaagtcact ctacgatgtg
gttcagttat acacctacct aacgccctcg gaaaccagta tatactgggg ttactagggtg tgttcagtga gatgctacac
>.....MalE RSL F-895.....>
a s q y v d g l r g p l v i y d p n d p h k s l y d v
>.....RSL F895.....>
a s q y v d g l r g p l v i y d p n d p h k s l y d v

3121 gacgatgcta gcaccgtggt tatgctcgaa gactggtatc aactccggc acccactcta gaacacaaa tgttctcgac
ctgctacgat cgtggcacca atacgagctt ctgaccatag tgtgaggccg tgggtgagat cttgtggttt acaagagctg
>.....MalE RSL F-895.....>
d d a s t v v m l e d w y h t p a p t l e h q m f s
>.....RSL F895.....>
d d a s t v v m l e d w y h t p a p t l e h q m f s

3201 tagcaatacc gccttactct ctccggttcc ggactcgggt cttatcaatg gaaaaggctg ctacgtgggc ggaccccaag
atcgttatgg cggaatgaga gaggccaagg cctgagccca gaatagttac cttttccagc gatgcaccgc cctggggttc
>.....MalE RSL F-895.....>
t s n t a l l s p v p d s g l i n g k g r y v g g p q
>.....RSL F895.....>
t s n t a l l s p v p d s g l i n g k g r y v g g p q

3281 tccccggtc ggtaaatcaac gtgactcggg ggaacgata tcgcttggcg gtgatcaatg cttctgcat tggttcattc
agggggccag ccattagttg cactgagcgc cttttgctat agcgaacgcg cactagttac gaagacggta accaagtaag
>.....MalE RSL F-895.....>
v p r s v i n v t r g k r y r l r v i n a s a i g s f
>.....RSL F895.....>
v p r s v i n v t r g k r y r l r v i n a s a i g s f
```

**Abbildung 111:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MalE RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```
3361 actttttcga tcgagggaca tcgcttgact gtcattgagg ccgatggaat tccacatgag cctttggtcg tcgatagttt
tgaaaaagct agtcocctgt agcgaactga cagtaactcc ggctacctta aggtgtactc ggaaccagc agctatcaa
>.....Male RSL F-895.....>
t f s i e g h r l t v i e a d g i p h e p l v v d s
>.....RSL F895.....>
t f s i e g h r l t v i e a d g i p h e p l v v d s

3441 ccagatctat gccggtaac gctattctgt cattgtcgaa gccaacaga ccgctgctaa ctactgggta cgcgctcaa
ggcttagata cggccagttg cgataagaca gtaacagctt cggttggctt ggcgacgatt gatgacctat gcgcgaggtt
>.....Male RSL F-895.....>
f q i y a g q r y s v i v e a n q t a a n y w v r a p
>.....RSL F895.....>
f q i y a g q r y s v i v e a n q t a a n y w v r a p

3521 tgacagtgc aggggctggt accaatgcca accttgacc cactaatgct tttgccgtgc tgcattacga aggagcgccc
actgtcagcg tccccagca tggttacggt tggaaactgg gtgattacag aaacggcagc acgtaatgct tcctcgcggg
>.....Male RSL F-895.....>
m t v a g a g t n a n l d p t n v f a v l h y e g a p
>.....RSL F895.....>
m t v a g a g t n a n l d p t n v f a v l h y e g a p

3601 agcggcgagc ctacgactga gcaaggctact gcgattggta ctgctgtggt cgaagaaaac ctgcatgccc tgataaacc
tcgccgctcg gatgctgact cgttccatga cgtaaacat gacgcaacca gttcttttg gacgtacgcg actatttggg
>.....Male RSL F-895.....>
s g e p t t e q g t a i g t a l v e e n l h a l l i n
>.....RSL F895.....>
s g e p t t e q g t a i g t a l v e e n l h a l l i n

3681 cgggtctccg gccggttctg cccagcaga cgtagacctt aacctcgga taggacgttc tactgtgcac ggaattctta
gccacgagc cgcgaagac ggggtgctct gcaatcgga ttggagcgct atcctgcaag atgacagctg ccttaagaat
>.....Male RSL F-895.....>
p g a p g g s a p a d v s l n l a i g r s t v d g i l
>.....RSL F895.....>
p g a p g g s a p a d v s l n l a i g r s t v d g i l

3761 ggtttacctt caacaatc aagtatgagg ctccatcgct tccaacgctt cttaagatcc tatctaaccg agcttctaat
ccaaatggaa gttgttatag ttcatactcc gaggtagcga aggttgcgaa gaattctagg atagattgcc tcgaagatta
>.....Male RSL F-895.....>
r f t f n n i k y e a p s l p t l l k i l s n g a s n
>.....RSL F895.....>
r f t f n n i k y e a p s l p t l l k i l s n g a s n

3841 aatgctgatt ttgacgcaag tgaacacact atcgctactgc ccataataa agttattgaa ctcaacatta ctggaggtgc
ttacgactaa aactgcgttc acttggtgga tagcatgacg gggattatt tcaataactt gagttgtaat gacctccagc
>.....Male RSL F-895.....>
n a d f d a s e h t i v l p h n k v i e l n i t g g
>.....RSL F895.....>
n a d f d a s e h t i v l p h n k v i e l n i t g g

3921 agatcacct attcatctcc acggccagc atttgacgtc gtcaagtccc tcgggtgtac cccgaactat gtgaaccctc
tctagtggga taagtagagg tgccggtgca taaactcag cagttcaggg agccaccatg gggcttgata cacttgggag
>.....Male RSL F-895.....>
a d h p i h l h g h v f d v v k s l g g t p n y v n p
>.....RSL F895.....>
a d h p i h l h g h v f d v v k s l g g t p n y v n p
```

**Abbildung 112:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von Male RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```
4001 ctgcagggga tgcgttcgt gtgggaggca cgggtgtcgt ccttcgtttc aagaccgata accctgggcc ctggttcgtt
gagcgtccct acagcaagca caccctccgt gccacagca ggaagcaaag ttctggctat tgggaccagg gaccaagcaa
>.....MalE RSL F-895.....>
p r r d v v r v g g t g v v l r f k t d n p g p w f v
>.....RSL F895.....>
p r r d v v r v g g t g v v l r f k t d n p g p w f v

4081 cactgccaca ttgactggca cttggaagcc ggacttgcgt tagtctttgc cgaagctcct gacgaggttc gccaggggtc
gtgacggtgt aactgaccgt gaaccttcgg cctgaacgca atcagaaacg gcttcgagga ctgctccaag cggccccag
>.....MalE RSL F-895.....>
h c h i d w h l e a g l a l v f a e a p d e v r q g
>.....RSL F895.....>
h c h i d w h l e a g l a l v f a e a p d e v r q g

4161 ccagtctgtt cagcccagtg gttcctggaa ccaactctgc cccaagtatg cggctctccc tgccgagttg cagtggagcc
ggtcagacaa gtcgggtcac caaggacctt ggttgagacg gggttcatal gccgagaggg acggctcaac gtcacctcgg
>.....MalE RSL F-895.....>
s q s v q p s g s w n q l c p k y a a l p a e l q w s
>.....RSL F895.....>
s q s v q p s g s w n q l c p k y a a l p a e l q w s

                                     NcoI           NotI           BamHI           HindIII
4241 accgcagtt tgaaaagtaa ccatggggcg cgcgatatc gtcgacgat ccgaattccc tgcaggtaat taaataagct
tggcggtcaa acttttcatt ggtacccgcc ggcgctatag cagctgccta ggcttaaggg acgtccatta atttattcga
>..MalE RSL F-895..>
h p q f e k -
>.....RSL F895.....>
h p q f e k -
```

**Abbildung 113:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MalE RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```
2721 ggataacaat tcccctgtag aaataatfff gtttaacttt aataaggaga tataccatgg ccgtccgcga ctaccagttc
cctattgtta aggggacatc tttattaaaa caaattgaaa ttattcctct atatggtacc ggcaggcgct gatgggcaag
>>.....RSL F-895.....>
m a v r d y q f

2801 atcatcaaga acgtcaatac cgctcccgat ggctttgagc gatctattgt ctccgtcaat ggccagggtc ctgggacggt
tagtagttct tgcagttatg gcgagggcta ccgaaactcg ctagataaca gaggcagtta ccggtccaag gaccctgcaa
>.....RSL F-895.....>
i i k n v n t a p d g f e r s i v s v n g q v p g t

2881 aatcacggct aacaagggtg atacgttgca tgtgaatgac acaaacttcc tcaactgatcc aacgatgcgt cgtgctacaa
ttagtgccga ttgttcccac tatgcaacgt acacttacag tgtttagaag agtgactagg ttgctacgca gcacgatggt
>.....RSL F-895.....>
l i t a n k g d t l h v n v t n l l t d p t m r r a t

2961 caattcattg gcacggattg ttccaagcta ctactgctga tgaggatggt cctgcctttg tcacgcaatg tcccattgca
gttaagtaac cgtgcctaac aaggttcgtat gatgacgact actcctacca ggacggaaac agtgcggtac agggtaacgt
>.....RSL F-895.....>
t i h w h g l f q a t t a d e d g p a f v t q c p i a

3041 cagaatttgt cttatacata cgagatccca ctgcacgacc aaacgggaac tatgtggtat cacgccatc ttgcaagtca
gtcttaaaca gaatatgtat gctctagggg gacgtgctgg tttgcctttg ataccataa gtgcgggtag aacgttcagt
>.....RSL F-895.....>
q n l s y t y e i p l h d q t g t m w y h a h l a s

3121 atatgtggat ggattgctgg gacctttggt catatatgac cccaatgatc cacacaagtc actctacgat gtggacgatg
tatacaccta cctaacgccc ctggaaacca gtatatactg gggttactag gtgtgttcag tgagatgcta cacctgctac
>.....RSL F-895.....>
q y v d g l r g p l v i y d p n d p h k s l y d v d d

3201 ctacacacgt ggttatgctc gaagactggt atcacactcc ggcacccact ctagaacacc aatgtttctc gactagcaat
gatcgtggca ccaatacagag cttctgacca tagtgtgagg ccgtgggtga gatcttggg tttacaagag ctgatcgta
>.....RSL F-895.....>
a s t v v m l e d w y h t p a p t l e h q m f s t s n

3281 accgccttac tctctccggt tccggactcg ggtcttatca atggaaaagg tcgctacgtg ggcggacccc aagtcccccg
tgccggaatg agagaggcca aggcctgagc ccagaatagt taccttttcc agcagatcac ccgcctgggg ttcagggggg
>.....RSL F-895.....>
t a l l s p v p d s g l i n g k g r y v g g p q v p

3361 gtcggtaatc aacgtgactc gcgggaaaacg atatcgcttg cgcgtgatca atgcttctgc cattggttca ttcactttt
cagccattag ttgactgag cgcctttgct tatagcgaac gcgcactagt tacgaagacg gtaaccaagt aagtgaaaa
>.....RSL F-895.....>
r s v i n v t r g k r y r l r v i n a s a i g s f t f

3441 cgatcgaggg acatcgcttg actgtcattg aggcgatggt aattccacat gacgctttgg tcgctgatag tttccagatc
gtagctccc ttagcgaac tgacagtaac tccggctacc ttaaggtgta ctcgaaacc agcagctatc aaaggtctag
>.....RSL F-895.....>
s i e g h r l t v i e a d g i p h e p l v v d s f q i

3521 tatgcccgtc aacgctattc tgtcattgct gaagccaacc agaccgctgc taactactgg gtacgcgctc caatgacagt
atacggccag ttgcgataag acagtaacag cttcgggtgg tctggcgagc attgatgacc catgcccag gttactgtca
>.....RSL F-895.....>
y a g q r y s v i v e a n q t a a n y w v r a p m t
```

**Abbildung 114:** Gen- und Aminosäuresequenz von RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

3601  cgcaggggct ggtaccaatg ccaaccttga ccccaactaat gtctttgccc tgctgcatta cgaaggagcg cccagcggcg
gcgccccga ccatggttac ggttggaact ggggtgatta cagaacggc acgacgtaat gcttcctcgc gggtcgcccg
>.....RSL F-895.....>
v a g a g t n a n l d p t n v f a v l h y e g a p s g

3681  agcctacgac tgagcaaggt actgcgattg gtactgcggt ggctgaagaa aacctgcatg cgctgataaa ccccgtgtct
tcggatgctg actcgttcca tgacgctaac catgacgcaa ccagcttctt ttggacgtac gcgactattt ggggccacga
>.....RSL F-895.....>
e p t t e q g t a i g t a l v e e n l h a l i n p g a

3761  ccgggcggtt ctgccccagc agacgttagc cttaacctcg cgataggacg ttctactgtc gacggaattc ttaggtttac
ggcccccaa gacggggtcg tctgcaatcg gaattggagc gctatcctgc aagatgacag ctgccttaag aatccaaatg
>.....RSL F-895.....>
p g g s a p a d v s l n l a i g r s t v d g i l r f

3841  cttcaacaat atcaagtatg aggctccatc gcttccaacg cttcttaaga tcctatctaa cggagcttct aataatgctg
gaagttgtta tagttcatac tccgaggtag cgaaggttgc gaagaattct aggatagatt gcctcgaaga ttattacgac
>.....RSL F-895.....>
t f n n i k y e a p s l p t l l k i l s n g a s n n a

3921  attttgacgc aagtgaacac actatcgtac tgccccataa taaagttatt gaactcaaca ttactggagg tgcagatcac
taaaactcgc ttcacttctg tgatagcatg acggggttatt atttcaataa cttgagttgt aatgacctcc acgtctagtg
>.....RSL F-895.....>
d f d a s e h t i v l p h n k v i e l n i t g g a d h

4001  cctattcadc tccacggcca cgtatttgac gtcgtaaggt ccctcggctg taccccgaac tatgtgaacc ctccctcgcg
ggataagtag aggtgccggt gcataaactg cagcagttca gggagccacc atggggcttg atacacttgg gaggagcgtc
>.....RSL F-895.....>
p i h l h g h v f d v v k s l g g t p n y v n p p r

4081  ggatgtcgtt cgtgtgggag gcacgggtgt cgtccctcgt ttcaagaccg ataaccctgg tcctcggttc gttcactgcc
cctacagcaa gcacaccctc cgtgccaca gcaggaagca aagttctggc tattgggacc agggaccaag caagtgaagg
>.....RSL F-895.....>
r d v v r v g g t g v v l r f k t d n p g p w f v h c

4161  acattgactg gcaacttgaa gcgggacttg cgttagtctt tgcccgaagct cctgacgagg ttgcagggg gtcccagtct
tgtaactgac cgtgaacctt cggcctgaac gcaatcagaa acggcttcga ggactgtctc aagcgggtccc cagggtcaga
>.....RSL F-895.....>
h i d w h l e a g l a l v f a e a p d e v r q g s q s

4241  gttcagccca gtggttctcg gaaccaactc tgccccaaagt atgcggctct ccctgcccag ttgcagtgga gccaccgcga
caagtccggg caccaaggac cttggttgag acggggttca tacgccgaga gggacggctc aacgtcacct cggtgggcgt
>.....RSL F-895.....>
v q p s g s w n q l c p k y a a l p a e l q w s h p

4321  gtttgaaaag taacctggg cagcagccat caccatcadc accacagcca BamHI ggatccgaat SacI tcgagctcgg cgcgcctgca
caaacttttc attggtaccc gtcgtcggta gtggtagtag tgggtcgggt cctaggctta agctcgagcc gcggggacgt
>.RSL F-895.>>
q f e k -

```

**Abbildung 115:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

                                NotI
4001 cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaaa ccccggattc tagaaactag tgcgggcgcga tgagatttcc ttcaatTTTT
    ggagatatga aattgcagtt cctctTTTTT ggggcctaag atctttgatc acgcccggcgt actctaaagg aagttaaaaa
    Overlap
    >.....GAL1p.....>>
    y l y t l t s r r k n
    >>.....MFaSS.....>
    m r f p s i f
    >>...MFa RSL F-895...>
    m r f p s i f

4081 actgcagttt tattgcgagc atcctccgca tttagctgctc cagtcaaacac tacaacagaa gatgaaacgg cacaaattcc
    tgacgtcaaa ataagcgtcg taggaggcgt aatcgacgag gtcagttgtg atgttgtcct ctactttgcc gtgtttaagg
    >.....MFaSS.....>
    t a v l f a a s s a l a a p v n t t t e d e t a q i
    >.....MFa RSL F-895.....>
    t a v l f a a s s a l a a p v n t t t e d e t a q i

4161 ggctgaagct gtcacggtt actcagattt agaaggggat ttcgatgttg ctgttttgcc atttccaac agcacaataa
    ccgacttcca cagtagccaa tgagtctaaa tctccccta aagctacaac gacaaaacgg taaaagggtg tcgtgtttat
    >.....MFaSS.....>
    p a e a v i g y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n
    >.....MFa RSL F-895.....>
    p a e a v i g y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n

                                NotI
4241 acggtttatt gtttataaat actactattg ccagcattgc tgctaaagaa gaaggggtaa gcttgataa aagacgggcc
    tgccaataa caaatatta tgatgataac ggtcgtaacg acgatttctt cttcccatt cgaacctatt ttctcgccgg
    Linker
    >.....MFaSS.....>>
    n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v s l d k r
    >.....MFa RSL F-895.....>
    n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v s l d k r a a

SacII
4321 gcggacatgg ccgtccgcca ctaccagttc atcatcaaga acgtcaatac cgctcccgat ggctttgagc gatctattgt
    cgctgttacc ggcaggcgt gatggtcaag tagtagttct tgacgttatg gcgagggcta ccgaaactcg ctagataaca
    Linker
    >.....MFa RSL F-895.....>
    a d m a v r d y q f i i k n v n t a p d g f e r s i

4401 ctccgtcaat ggccaggttc ctgggacggt aatcacggct aacaagggtg atacgttgca tgtgaatgac acaaatcttc
    gaggcagtta ccggtccaag gaccctgcaa ttagtgcgca ttgttccac tatgcaactg acacttacag tgtttagaag
    >.....MFa RSL F-895.....>
    v s v n g q v p g t l i t a n k g d t l h v n v t n l

4481 tcaactgatcc aacgatgogt cgtgctacaa caattcattg gcacggattg ttccaagcta ctactgctga tgaggatggt
    agtgactagg ttgctacgca gcacgatgtt gttaagtaac cgtgcctaac aaggttcgat gatgacgact actcctacca
    >.....MFa RSL F-895.....>
    l t d p t m r r a t t i h w h g l f q a t t a d e d g

4561 cctgcctttg tcacgcaatg tcccattgca cagaatttgt ctatacata cgagatccca ctgcacgacc aaacgggaac
    ggacggaaac agtgcgttac agggtaacgt gtcttaaaaca gaatatgtat gctctagggt gacgtgctgg tttgccttg
    >.....MFa RSL F-895.....>
    p a f v t q c p i a q n l s y t y e i p l h d q t g

```

**Abbildung 116:** Gen- und Aminosäuresequenz von MFα RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```
4641 tatgtggtat cacgccatc ttgcaagtca atatgtggat ggattgctgg gacctttggt catatatgac cccaatgatc
atacaccata gtgcgggtag aacgttcagt tatacaccta cctaacgccc ctggaaacca gtatatactg gggttactag
>.....MFa RSL F-895.....>
t m w y h a h l a s q y v d g l r g p l v i y d p n d

4721 cacacaagtc actctacgat gtggacgatg ctgaccctgt ggattatgctc gaagactggt atcacactcc ggcacccact
gtgtgttcag tgagatgcta cacctgctac gatcgtggca ccaatacagag cttctgacca tagtgtgagg ccgtgggtga
>.....MFa RSL F-895.....>
p h k s l y d v d d a s t v v m l e d w y h t p a p t

4801 ctagaacacc aatgttctc gactagcaat accgccttac tctctccggt tccggactcg ggtcttatca atggaaaagg
gatcttgggg tttacaagag ctgatcgtaa tggcgggaat agagaggcca aggcctgagc ccagaatagt taccttttcc
>.....MFa RSL F-895.....>
l e h q m f s t s n t a l l s p v p d s g l i n g k

4881 tcgctactg ggcggacccc aagtccccg gtcgtaatc aacgtgactc ggcggaaaacg atatcgcttg cgcgtgatca
agcgatgcac ccgcctgggg ttcagggggc gaccattag ttgactgag cgcctttgc tatagcgaac ggcactagt
>.....MFa RSL F-895.....>
g r y v g g p q v p r s v i n v t r g k r y r l r v i

4961 atgcttctgc cattggttca ttcactttt cgatcgagg acatcgcttg actgtcattg aggcgatgg aattccacat
tacgaagacg gtaaccaagt aagtgaaaaa gtagctccc tgtagcgaac tgacagtaac tccggctacc ttaaggtgta
>.....MFa RSL F-895.....>
n a s a i g s f t f s i e g h r l t v i e a d g i p h

5041 gagccttgg tcgtcgatag tttccagatc tatgccggtc aacgtatc tgtcattgtc gaagccaacc agacogtgc
ctcggaaaacc agcagctatc aaaggtctag atacggccag ttgcgataag acagtaacag cttcggttg tctggcgagc
>.....MFa RSL F-895.....>
e p l v v d s f q i y a g q r y s v i v e a n q t a

5121 taactactg gtacgctc caatgacagt cgcaggggct ggtaccaatg ccaacctga cccactaat gtctttgccc
attgatgacc catgcgcgag gttactgtca gcgtccccga ccatggttac ggttgaact ggggtgatta cagaaacggc
>.....MFa RSL F-895.....>
a n y w v r a p m t v a g a g t n a n l d p t n v f a

5201 tgctgcatta cgaaggagcg cccagcgcg agcctacgac tgagcaaggt actgcgattg gtactgcgtt ggtcgaagaa
acgacgtaat gcttctcgc gggtcgccc tcggatgctg actcgttcca tgacgtaac catgacgcaa ccagcttctt
>.....MFa RSL F-895.....>
v l h y e g a p s g e p t t e q g t a i g t a l v e e

5281 aacctgcatt cgctgataaa ccccggtgct cggggcgggt ctgccccagc agacgtagc ctaacctcg cgataggacg
ttggacgtac ggcactattt ggggccacga ggcccgccaa gacggggtcg tctgcaatcg gaattggagc gctatcctgc
>.....MFa RSL F-895.....>
n l h a l i n p g a p g g s a p a d v s l n l a i g

5361 ttctactgtc gacggaatc ttaggtttac cttcaacaat atcaagtatg aggtccatc gcttccaacg cttcttaaga
aagatgacag ctgccttaag aatccaaatg gaagttgta tagttcatac tccgaggtag cgaaggtgca gaagaattct
>.....MFa RSL F-895.....>
r s t v d g i l r f t f n n i k y e a p s l p t l l k

5441 tcctatctaa cggagcttct aataatgctg attttgacgc aagtgaacac actatcgtac tgccccataa taaagttatt
aggatagatt gcctcgaaga ttattacgac taaaactgcg ttcactgtg tgatagcatg acgggttatt atttcaataa
>.....MFa RSL F-895.....>
i l s n g a s n n a d f d a s e h t i v l p h n k v i
```

**Abbildung 117:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MFa RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```
5521 gaactcaaca ttactggagg tgcagatcac cctattcadc tccacggcca cgtatttgac gtcgtcaagt ccctcggtag
cttgagttgt aatgacctcc acgtctagtg ggataagtag aggtgccggg gcataaactg cagcagttca gggagccacc
>.....MfA RSL F-895.....>
  e l n i t g g a d h p i h l h g h v f d v v k s l g

5601 taccocgaac tatgtgaacc ctctcgcag ggatgctgtt cgtgtgggag gcacgggtgt cgtccttcgt ttcaagaccg
atggggcttg atacacttgg gaggagcgtc cctacagcaa gcacaccctc cgtgccaca gcaggaagca aagttctggc
>.....MfA RSL F-895.....>
  g t p n y v n p p r r d v v r v g g t g v v l r f k t

5681 ataaccctgg tcctcgggtc gttcactgcc acattgactg gcacttgaa gccggacttg cgttagtctt tgccgaagct
tattgggacc agggaccaag caagtgcagg tgtaactgac cgtgaacctt cggcctgaac gcaatcagaa acggcttcga
>.....MfA RSL F-895.....>
  d n p g p w f v h c h i d w h l e a g l a l v f a e a

5761 cctgacgagg ttgcacaggg gtcccagtct gttcagccca gtgggtcctg gaaccaactc tgcccgaagt atggggctct
ggactgctcc aagcggctcc cagggtcaga caagtcgggt caccaaggac cttggttgag acggggttca tacgccgaga
>.....MfA RSL F-895.....>
  p d e v r q g s q s v q p s g s w n q l c p k y a a

5841 ccctgccgag ttgcagtga gccaccgcga gtttgaaaag taaccatggg cagcagccat caccatcata ctcgagtcac
gggacggctc aacgtcacct cggtgggcgt caaacctttc attgtaccc gtcgtcggta gtggtagtat gagctcagta
>.....MfA RSL F-895.....>
  l p a e l q w s h p q f e k -
```

**Abbildung 118:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MFa RSL F-895. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

                                XbaI       SpeI       NotI
4001  cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaaa ccccggttc tagaaactag tgcggccgca tgagatttcc tccaattttt
      ggagatatga aattgcagtt cctctttttt ggggcctaag atctttgatc acgcccgcgt actctaaagg aagttaaaaa
      Overlap
      >>.....MFaSS.....>
      m r f p s i f
      MFa_RSL_F895-SP_linker >>.....>
      m r f p s i f

                                BpmI
4081  actgcagttt tattgcagc atcctccgca ttagctgctc cagtcaacac tacaacagaa gatgaaacgg cacaaattcc
      tgacgtcaaa ataagcgtcg taggagggcg aatcgacgag gtcagttgtg atgttgtctt ctactttgcc gtgtttaagg
      >.....MFaSS.....>
      t a v l f a a s s a l a a p v n t t t e d e t a q i
      >.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
      t a v l f a a s s a l a a p v n t t t e d e t a q i

4161  ggctgaagct gtcacggtt actcagattt agaaggggat ttcgatgttg ctgttttgcc atttccaac agcaciaaata
      ccgacttoga cagtagcaa tgagtctaaa tcttccccta aagctacaac gacaaaacgg taaaagggtg tctgtttat
      >.....MFaSS.....>
      p a e a v i g y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n
      >.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
      p a e a v i g y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n

                                HindIII       NotI
                                BsrBI
4241  acgggttatt gttataaat actactattg ccagcattgc tgctaaagaa gaaggggtaa gcttgataa aagagcggcc
      tgccaataa caaatattta tgatgataac ggctgtaacg acgatttctt cttcccatt cgaacctatt ttctcgccgg
      >.....MFaSS.....>>
      n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v s l d k r
      >.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
      n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v s l d k r a a

                                SacII
                                BsrBI
4321  gcggaagctg aagctgccgt ccgcgactac cagttcatca tcaagaacgt caataccgct cccgatggct ttgagcgtc
      cgccttcgac ttcgacggca ggcgctgatg gtcaagtagt agttcttgca gttatggcga gggctaccga aactcgtag
      Linker
      >.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
      a e a e a a v r d y q f i i k n v n t a p d g f e r

                                BstXI
                                MslI
                                BstXI       NspI
4401  tattgtctcc gtcaatggcc aggttctctg gacgttaatc acggctaaca agggtgatac gttgcatgtg aatgtcacia
      ataacagagg cagttaccgg tccaaggacc ctgcaattag tgccgattgt tcccactatg caacgtacac ttacagttt
      >.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
      s i v s v n g q v p g t l i t a n k g d t l h v n v t

4481  atcttctcac tgatccaacg atgcgtctgt ctacaacaat tcattggcac ggattgttcc aagctactac tgctgatgag
      tagaagagtg actaggttgc tacgcagcac gatgttgta agtaaccgtg cctaacaagg ttcgatgatg acgactactc
      >.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
      n l l t d p t m r r a t t i h w h g l f q a t t a d e

```

**Abbildung 119:** Gen- und Aminosäuresequenz von MF $\alpha$  RSL F-895 Linker. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

4561 gatggctctg cctttgtcac gcaatgtccc attgcacaga atttgtctta tacatacagag atccccactgc acgaccaaac  
 ctaccaggac ggaacacagtg cgttacaggg taacgtgtct taacacagaat atgtatgctc taggggtgacg tgctgggttg  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 d g p a f v t q c p i a q n l s y t y e i p l h d q

4641 ggaactatg tggatcacg cccatcttgc aagtcaatat gtggatggat tgcggggacc tttggtcata tatgaccca  
 cccttgatac accatagtgc gggtagaacg ttcagttata cacctaccta acgcccctgg aaaccagtat atactggggt  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 t g t m w y h a h l a s q y v d g l r g p l v i y d p

4721 atgatccaca caagtcactc tacgatgtgg acgatgctag caccgtggtt atgctcgaag actggtatca cactccggca  
 tactaggtgt gttcagtgag atgctacacc tgctacgacg gtggcaccaa tacgagcttc tgaccatagt gtagggcctg  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 n d p h k s l y d v d d a s t v v m l e d w y h t p a

4801 cccactctag aacaccaaat gttctcgact agcaataccg cttactctc tccggttccg gactcgggtc ttatcaatgg  
 gggtagatc ttgtggttta caagagctga tcgttatggc ggaatgagag aggccaagcg ctgagcccag aatagttacc  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 p t l e h q m f s t s n t a l l s p v p d s g l i n

4881 aaaaggtcgc tacgtgggog gaccccaagt cccccggctg gtaatcaacg tgactcggcg gaaacgatat cgcttgcgcg  
 tttccagcg atgcaccgc ctggggttca gggggccagc cattagttgc actgagcgcc ctttgcata gcaacgcgc  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 g k g r y v g g p q v p r s v i n v t r g k r y r l r

4961 tgatcaatgc tctgccatt ggttcattca cttttcgtat cgaggacat cgcttgactg tcattgaggc cgatggaatt  
 actagttacg aagacgtaa ccaagtaagt gaaaaagcta gctcctgtg gcgaactgac agtaactccg gctacctaa  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 v i n a s a i g s f t f s i e g h r l t v i e a d g i

5041 ccacatgagc ctttggtcgt cgatagtttc cagatctatg ccggtcaacg ctattctgctc attgtcgaag ccaaccagac  
 ggtgtactcg gaaaccagca gctatcaaag gtctagatc gccagttgc gataagacag taacagcttc ggttggctcg  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 p h e p l v v d s f q i y a g q r y s v i v e a n q

5121 cgctgctaac tactgggtac gcgctccaat gacagtgcga gggctggta ccaatgcaa cttgacccc actaatgtct  
 gcgacgattg atgacccatg cgcgaggta ctgtcagcgt ccccgaccat ggttacggtt ggaactggg tgattacaga  
 >.....MFa\_RSL\_F895-SP\_linker.....>  
 t a a n y w v r a p m t v a g a g t n a n l d p t n v

**Abbildung 120:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MFa RSL F-895 Linker. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

                    HaeII
5201  ttgccgtgct gcattacgaa ggagcgccca gcggcgagcc tacgactgag caaggtactg cgattggtag tgcgttggtc
aaccggcacga cgtaatgctt cctcgcgggt gcgcgctcgg atgctgactc gttccatgac gctaaccatg acgcaaccag
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  f a v l h y e g a p s g e p t t e q g t a i g t a l v

                    NspI
                    SphI
                    BspMI
                    BsiHKAI
                    Bsp1286I
                    NruI
5281  gaagaaaacc tgcattgcgct gataaacccc ggtgctccgg gcggttctgc cccagcagac gttagcctta acctcggat
cttcttttg acgtacgcga ctatttggg ccacgaggcc cgccaagacg ggtcgtctg caatcggat tgtagccta
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  e e n l h a l i n p g a p g g s a p a d v s l n l a

                    AccI
                    SalI
                    EcoRI
5361  aggacgttct actgtcagc gaattcttag gtttaccttc aacaatatca agtatgagc tccatcgctt ccaacgcttc
tcctgcaaga tgacagctgc cttaagaatc caaatggaag ttggtatagt tcatactccg aggtagcga ggttgcgaag
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  i g r s t v d g i l r f t f n n i k y e a p s l p t l

                    AflII
                    SmlI
5441  ttaagatcct atctaacgga gtttctaata atgctgattt tgacgcaagt gaacacacta tcgtactgcc ccataataaa
aattctagga tagattgcct cgaagattat tacgactaaa actgcgttca cttgtgtgat agcatgacgg ggtattatt
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  l k i l s n g a s n n a d f d a s e h t i v l p h n k

                    AatII
                    Tth111I
                    ZraI
                    BsaHI
                    BpmI
                    BspI
5521  gttattgaac tcaacattac tggagtgca gatcaccta ttcattccca cggccacgta tttgacgtcg tcaagtcctc
caataacttg agttgtaatg acctccacgt ctagtgggat aagtagaggt gccggtgcat aaactgcagc agttcagggg
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  v i e l n i t g g a d h p i h l h g h v f d v v k s

                    KpnI
                    Acc65I
                    BseRI
5601  cggtggtacc ccgaactatg tgaaccctcc tcgcagggat gtcgctcgtg tgggaggcac ggtgtcgtc cttcgttca
gccaccatgg ggcttgatac acttgggagg agcgtcccta cagcaagcac acctccctg cccacagcag gaagcaaatg
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  l g g t p n y v n p p r r d v v r v g g t g v v l r f

                    TaqII
5681  agaccgataa cctcgttccc tggctcgtc actgccacat tgactggcac ttggaagccg gacttgcgtt agtctttgcc
ctcggctatt gggaccaggg accaagcaag tgacggtgta actgaccgtg aacctcggc ctgaacgcaa tcagaaaagg
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  k t d n p g p w f v h c h i d w h l e a g l a l v f a

                    EcoO109I
                    KfiI
                    PfoI
5761  gaagtcctg acgaggttcg ccaggggtcc cagtctgttc agcccagtgg ttcttggaa caactctgcc ccaagtatgc
cttcgaggac tgctccaagc ggtccccagg gtcagacaag tcgggtcacc aaggacctg gttgagacgg gttcctacg
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>
  e a p d e v r q g s q s v q p s g s w n q l c p k y

                    NmeAIII
                    NcoI
                    AvaI
                    SmlI
                    XhoI
5841  ggctctccct gccgagttgc agtgagcca cccgcagttt gaaaagtaac catgggcagc agccatcacc atcactcg
ccgagagggg cggctcaacg tcacctcggg gggcgtcaaa cttttcattg gtaccctcgc tcggtagtgg tagtatgagc
>.....MFa_RSL_F895-SP_linker.....>>
  a a l p a e l q w s h p q f e k -

```

**Abbildung 121:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von MFα RSL F-895 Linker. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

                                XbaI      SpeI      NotI
4001 cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaa ccccggttc tagaaactag tgcggccgca tgagatttcc ttcaattttt
    ggagatatga aattgcagtt cctctttttt ggggcctaag atctttgatc acgccggcgt actctaaagg aagttaaaaa
    Overlap
                                >>.....MFaSS.....>
                                m r f p s i f
    Mfa_RSL_F895-SP_Linker_StrepTag >>.....>
                                m r f p s i f

                                BpmI
4081 actgcagttt tattcgcagc atcctccgca ttagctgctc cagtcaacac tacaacagaa gatgaaacgg cacaaattcc
    tgacgtcaaa ataagcgtcg taggaggcgt aatcgacgag gtcagttgtg atgttgtctt ctactttgcc gtgtttaagg
    >.....MFaSS.....>
    t a v l f a a s s a l a a p v n t t t e d e t a q i
    >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linker_StrepTag.....>
    t a v l f a a s s a l a a p v n t t t e d e t a q i

4161 ggctgaagct gtcacggtt actcagattt agaaggggat ttcgatgttg ctgttttgcc atttccaac agcacaaata
    ccgacttcga cagtagccaa tgagtctaaa tcttccccta aagctacaac gacaaaacgg taaaaggttg tctgttttat
    >.....MFaSS.....>
    p a e a v i g y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n
    >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linker_StrepTag.....>
    p a e a v i g y s d l e g d f d v a v l p f s n s t n

                                HindIII      NotI
                                BsrBI
4241 acgggttatt gttataaat actactattg ccagcattgc tgctaagaa gaaggggtaa gcttgataa aagagcggcc
    tgccaataa caaatattta tgatgataac ggtcgtaacg acgatttctt cttcccatt cgaacctatt ttctcgccgg
    Linker'
    >.....MFaSS.....>>
    n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v s l d k r
    >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linker_StrepTag.....>
    n g l l f i n t t i a s i a a k e e g v s l d k r a a

    SacII                                BsrBI
4321 gcggaagctg aagctgccc cgcgactac cagttcatca tcaagaacgt caataccgct cccgatggct ttgagcgatc
    cgccttcgac ttcgacggca ggcgctgatg gtcaagtagt agttcttgca gttatggcga gggctaccga aactcgctag
    'Linker
    >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linker_StrepTag.....>
    a e a e a a v r d y q f i i k n v n t a p d g f e r
    >>.....'MFa-RSL_F895'.....>
    e a e a a v r d y q f i i k n v n t a p d g f e r

                                BstXI                                MslI
                                BalI                                NspI
4401 tattgtctcc gtcaatggcc aggttctctg gacgttaatc acggctaaca agggtgatac gttgcatgtg aatgtcacia
    ataacagagg cagttaccgg tccaaggacc ctgcaattag tgccgattgt tcccactatg caacgtacac ttacagtgtt
    >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linker_StrepTag.....>
    s i v s v n g q v p g t l i t a n k g d t l h v n v t
    >.....'MFa-RSL_F895'.....>
    s i v s v n g q v p g t l i t a n k g d t l h v n v t

```

**Abbildung 122:** Gen- und Aminosäuresequenz von MFa RSL F-895 LinkStrep. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

4481 atcttctcac tgatccaacg atgogtctgt ctacaacaat tcattggcac ggattgttcc aagctactac tgctgatgag
tagaagagtg actaggttgc tacgcagcac gatggtgta agtaaccgtg cctaacaagg ttcgatgatg acgactactc
>.....Mfa_RSL_F895-SP_LinkersTag.....>
n l l t d p t m r r a t t i h w h g l f q a t t a d e
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
n l l t d p t m r r a t t i h w h g l f q a t t a d e

                                     BspI
4561 gatggtcctg cctttgtcac gcaatgtccc attgcacaga atttgtotta tacatagcag atcccactgc acgaccaaac
ctaccaggac ggaaacagtg cgttacaggg taacgtgtct taaacagaat atgtatgctc taggggtgacg tgctgggttg
>.....Mfa_RSL_F895-SP_LinkersTag.....>
d g p a f v t q c p i a q n l s y t y e i p l h d q
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
d g p a f v t q c p i a q n l s y t y e i p l h d q

                                     AhdI
                                     EcoO109I
4641 gggaactatg tggtatcacg cccatcttgc aagtcaatat gtggatggat tgcggggacc ttgggtcata tatgacccca
cccttgatac accatagtgc ggttagaacg ttcagttata cacctaccta acgcccctgg aaaccagtat atactggggt
>.....Mfa_RSL_F895-SP_LinkersTag.....>
t g t m w y h a h l a s q y v d g l r g p l v i y d p
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
t g t m w y h a h l a s q y v d g l r g p l v i y d p

                                     BmtI
                                     NheI
                                     BbsI
4721 atgatccaca caagtcactc tacgatgtgg acgatgctag caccgtgggtt atgctogaag actggtatca cactccggca
tactaggtgt gttcagtgag atgctacacc tgctacgacg gtggcaccia tacgagcttc tgaccatagt gtgaggccgt
>.....Mfa_RSL_F895-SP_LinkersTag.....>
n d p h k s l y d v d d a s t v v m l e d w y h t p a
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
n d p h k s l y d v d d a s t v v m l e d w y h t p a

                                     PshAI
                                     AvaI
                                     XbaI
                                     BspEI
4801 cccactctag aacaccaaat gttctcgact agcaataccg ccttactctc tccggttccg gactcgggtc ttatcaatgg
gggtgagatc ttgtggttta caagagctga tcgttatggc ggaatgagag aggccaaggc ctgagcccag aatagttacc
>.....Mfa_RSL_F895-SP_LinkersTag.....>
p t l e h q m f s t s n t a l l s p v p d s g l i n
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
p t l e h q m f s t s n t a l l s p v p d s g l i n

                                     AhdI
                                     EciI
                                     EcoRV
4881 aaaaggtcgc tacgtggcgc gaccccaagt cccccggtcg gtaatcaacg tgactcggcg gaaacgatat cgcttgccg
tttccagcg atgcaccgc ctggggttca gggggccagc cattagttgc actgagcgc ctttgctata gogaacgcgc
>.....Mfa_RSL_F895-SP_LinkersTag.....>
g k g r y v g g p q v p r s v i n v t r g k r y r l r
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
g k g r y v g g p q v p r s v i n v t r g k r y r l r

```

**Abbildung 123:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von Mfa RSL F-895 LinkStrep. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

          BclI                               PvuI                               EcoRI
4961  tgatcaatgc ttctgccatt ggttcattca ctttttogat cgagggacat cgcttgactg tcattgaggg cgatggaatt
      actagttacg aagacggtaa ccaagtaagt gaaaaagcta gtcctctgta gccaactgac agtaactccg gctaccttaa
      >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
      v i n a s a i g s f t f s i e g h r l t v i e a d g i
      >.....'Mfa-RSL_F895'.....>
      v i n a s a i g s f t f s i e g h r l t v i e a d g i

          BglII                               BsrFI
5041  ccacatgagc ctttggtcgt cgatagtttc cagatctatg ccggtcaacg ctattctgtc attgtcgaag ccaaccagac
      ggtgtactcg gaaaccagca gctatcaaaag gtctagatac ggccagttgc gataagacag taacagcttc ggttggtcgt
      >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
      p h e p l v v d s f q i y a g q r y s v i v e a n q
      >.....'Mfa-RSL_F895'.....>
      p h e p l v v d s f q i y a g q r y s v i v e a n q

          KpnI
          Acc65I
          AlwNI
5121  cgctgctaac tactgggtac gcgctccaat gacagtcgca ggggctggta ccaatgcaa ccttgacccc actaatgtct
      gcgacgattg atgacccatg cgcgaggtta ctgtcagcgt ccccgacctt ggttacggtt ggaactgggg tgattacaga
      >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
      t a a n y w v r a p m t v a g a g t n a n l d p t n v
      >.....'Mfa-RSL_F895'.....>
      t a a n y w v r a p m t v a g a g t n a n l d p t n v

          HaeII
5201  ttgccgtgct gcattacgaa ggagcgccca gggcgagcc tacgactgag caaggtactg cgattgttac tgcgttggtc
      aacggcacga cgtaaatgctt cctcgcgggt gcgcgctcgg atgctgactc gttccatgac gctaaccatg acgcaaccag
      >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
      f a v l h y e g a p s g e p t t e q g t a i g t a l v
      >.....'Mfa-RSL_F895'.....>
      f a v l h y e g a p s g e p t t e q g t a i g t a l v

          NspI
          SphI
          BspMI
          BsiHKA1
          Bsp1286I
          NruI
5281  gaagaaaacc tgcattgcgt gataaacccc ggtgctccgg gcggttctgc ccagcagac gtagcctta acctcgcgat
      cttcttttgg acgtacgcga ctatttgggg ccacagggcc cgccaagacg gggtcgtctg caatcggat tggagcgcta
      >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
      e e n l h a l i n p g a p g g s a p a d v s l n l a
      >.....'Mfa-RSL_F895'.....>
      e e n l h a l i n p g a p g g s a p a d v s l n l a

          AccI
          Sall
          EcoRI
5361  aggacgttct actgtcgagc gaattcttag gtttaccttc aacaatatca agtatgaggc tccatcgctt ccaacgcttc
      tcctgcaaga tgacagctgc cttaagaatc caaatggaag ttgttatagt tcatactccg aggtagcga ggttgcaag
      >.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
      i g r s t v d g i l r f t f n n i k y e a p s l p t l
      >.....'Mfa-RSL_F895'.....>
      i g r s t v d g i l r f t f n n i k y e a p s l p t l
  
```

**Abbildung 124:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von Mfa RSL F-895 LinkStrep. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## Anhang

```

SmlI
5441 ttaagatcct atctaacgga gcttctaata atgctgattt tgacgcaagt gaacacacta tcgtactgcc ccataataaa
aattctagga tagattgcct cgaagattat tacgactaaa actgcgttca cttgtgtgat agcatgacgg ggtattattt
>.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
l k i l s n g a s n n a d f d a s e h t i v l p h n k
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
l k i l s n g a s n n a d f d a s e h t i v l p h n k

                                     AatII
                                     Th1111
                                     ZraI
                                     BsaHI
BpmI
5521 gttattgaac tcaacattac tggaggtgca gatcacccta ttcattctcca cgccacagta tttgacgtcg tcaagtcctt
caataacttg agttgtaatg acctccacgt ctagtgggat aagtagaggt gccggtgcat aaactgcagc agttcagggg
>.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
v i e l n i t g g a d h p i h l h g h v f d v v k s
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
v i e l n i t g g a d h p i h l h g h v f d v v k s

KpnI
Acc65I
BseRI
5601 cggtggtacc ccgaactatg tgaacctcc tcgcagggat gtcgttcgtg tgggaggcac ggtgtcgtc cttcgtttca
gccaccatgg ggcttgatac acttgggagg agcgtcccta cagcaagcac accctccgtg cccacagcag gaagcaaagt
>.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
l g g t p n y v n p p r r d v v r v g g t g v v l r f
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
l g g t p n y v n p p r r d v v r v g g t g v v l r f

TaqII
5681 agaccgataa ccttggtccc tggttcgttc actgccacat tgactggcac ttggaagccg gacttgcgtt agtctttgcc
ctggctatt gggaccaggg accaagcaag tgacgggtga actgaccgtg aaccttcggc ctgaacgcaa tcagaaacgg
>.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
k t d n p g p w f v h c h i d w h l e a g l a l v f a
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
k t d n p g p w f v h c h i d w h l e a g l a l v f a

                                     EcoO109I
                                     KfiI
                                     PfoI
5761 gaagctcctg acgaggttgc ccagggttcc cagtctgttc agcccagtgg ttcctggaac caactctgcc ccaagtatgc
cttcgaggac tgctccaagc ggtccccagg gtcagacaag tcgggtcacc aaggaccttg gttgagacgg ggtcatagc
>.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
e a p d e v r q g s q s v q p s g s w n q l c p k y
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
e a p d e v r q g s q s v q p s g s w n q l c p k y

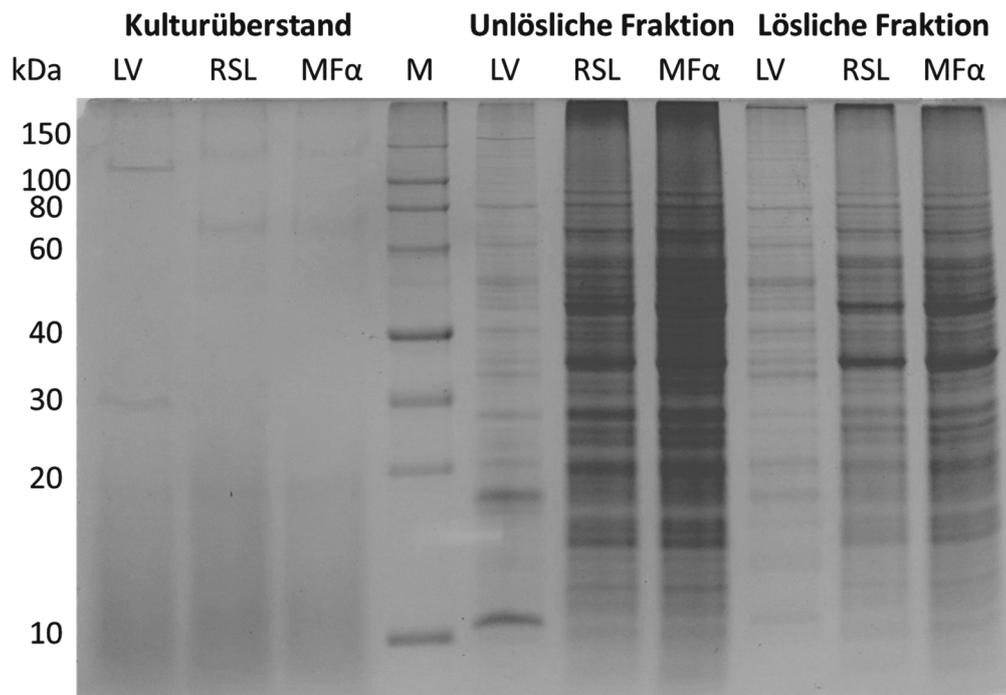
NmeAIII
5841 ggctctccct gccgagttgc agtgagcca cccgcagttt gaaaaggcag cagcatggtc tcatccacaa ttcgagaagt
ccgagagggg cggctcaacg tcacctcggg gggcgtcaaa cttttccgtc gtcgtaccag agtaggtgtt aagctcttca
>.....Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag.....>
a a l p a e l q w s h p q f e k a a a w s h p q f e k
>.....'Mfa-RSL_F895'.....>
a a l p a e l q w s h p q f e k

AvaI
SmlI
XhoI
BsrBI
5921 aactcgagtc atgtaattag ttatgtcagc cttacattca cgccctcccc ccacatccgc tctaaccgaa aaggaaggag
ttgagctcag tacattaatc aatacagtcg gaatgtaagt gcgggagggg ggtgtaggcg agattggcct ttccttctc
'Overlap
>> Mfa_RSL_F895-SP_Linkers-StrepTag

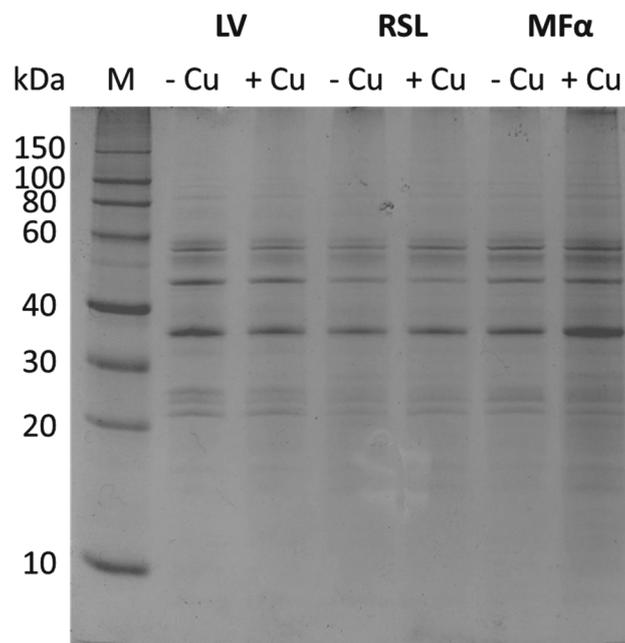
```

**Abbildung 125:** Fortsetzung der Gen- und Aminosäuresequenz von Mfa RSL F-895 LinkStrep. Relevante Sequenzabschnitte wurden rot hervorgehoben.

## 8.2 SDS-Gele

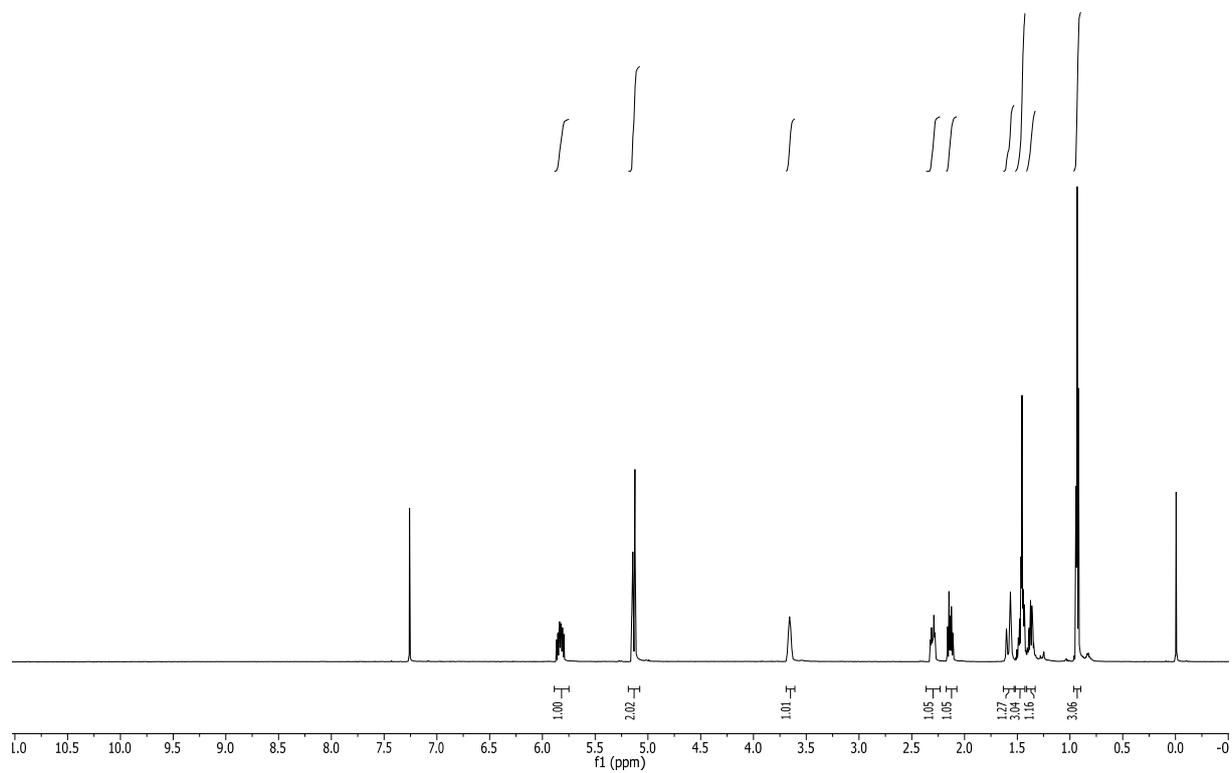
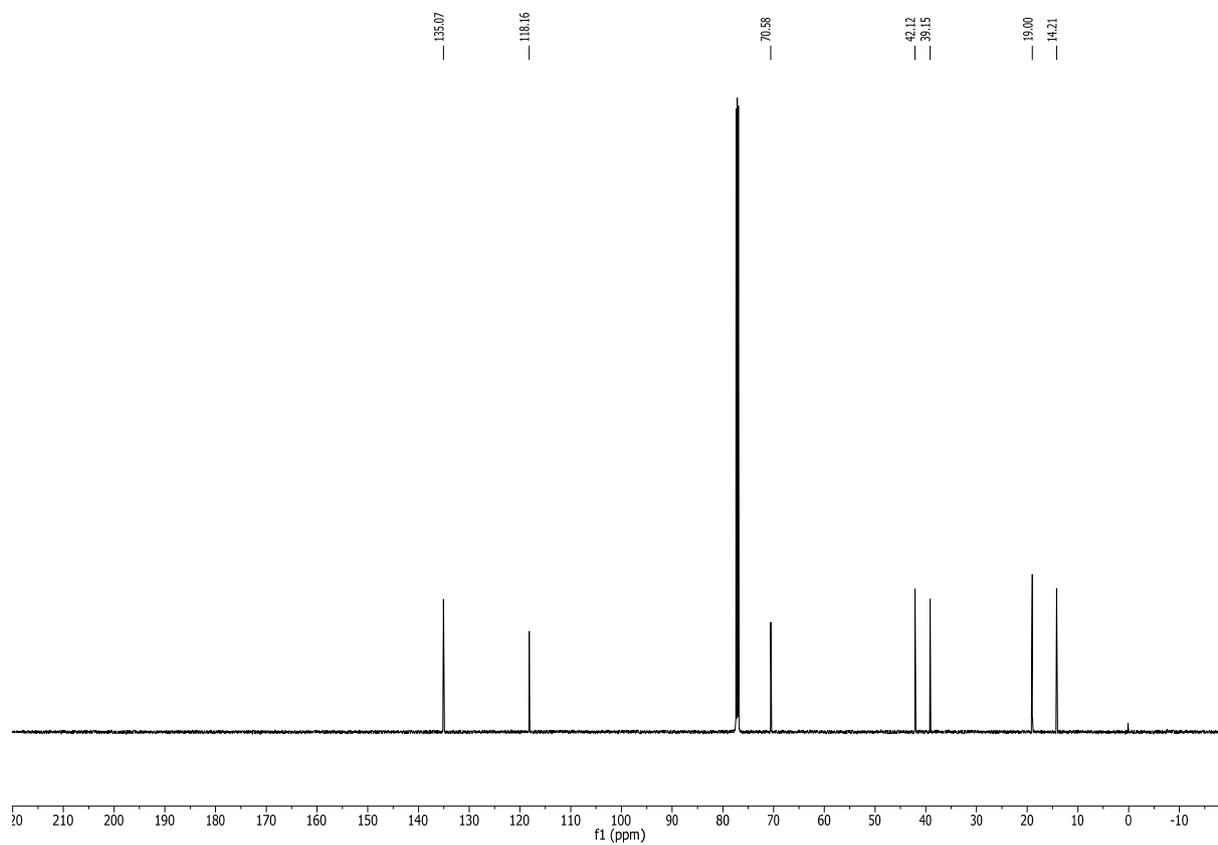


**Abbildung 126:** SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der heterologen Expression von RSL F-895 und MF $\alpha$  RSL F-895 in *S. cerevisiae*. Die Proben wurden im Anschluss an eine 24 stündige Kultivierung bei 30 °C, nach der Zellernte mittels Zentrifugation, entnommen. Die geernteten Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und die unlöslichen Zellbestandteile mittels Zentrifugation von der löslichen Fraktion getrennt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Lysate wurden die unterschiedlichen Kulturen vorab auf dieselbe OD<sub>600</sub> von 100 eingestellt. M= Roti-Mark 10-150, LV = Leervektorkontrolle, RSL = RSL F-895, MF $\alpha$  = MF $\alpha$  RSL F-895.



**Abbildung 127:** SDS-Gelelektrophoretische Untersuchung der heterologen Expression von RSL F-895 und MF $\alpha$  RSL F-895 in *S. cerevisiae*. Die Proben wurden im Anschluss an eine 24 stündige Kultivierung bei 30 °C, nach der Zellernte mittels Zentrifugation, entnommen. Die geernteten Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und das Zelllysate mittels Zentrifugation von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Lysate wurden die unterschiedlichen Kulturen vorab auf dieselbe OD<sub>600</sub> von 100 eingestellt. M= Roti-Mark 10-150, LV = Leervektorkontrolle, RSL = RSL F-895, MF $\alpha$  = MF $\alpha$  RSL F-895, + Cu = Expression mit 0,2  $\mu$ M Kupfersulfat.

## 8.3 NMR-Spektren

Abbildung 128:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **26** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.Abbildung 129:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **26** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

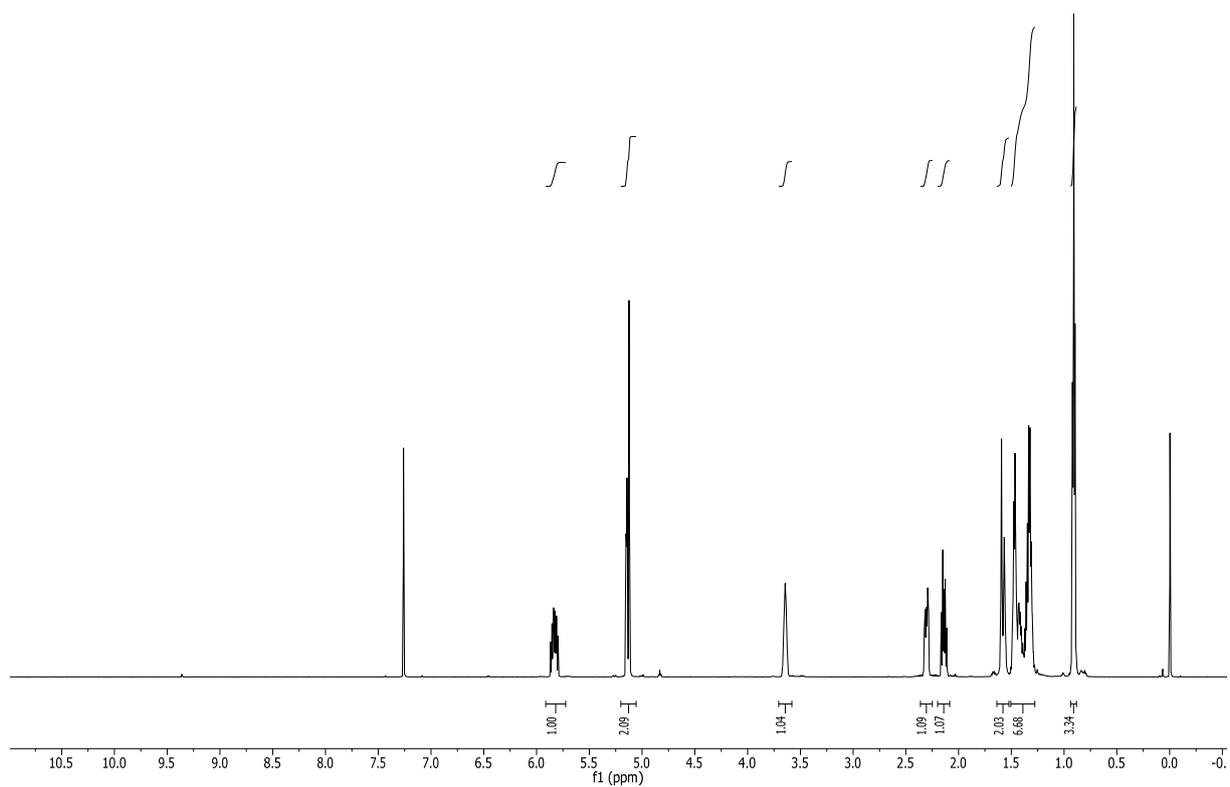


Abbildung 130:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **27** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

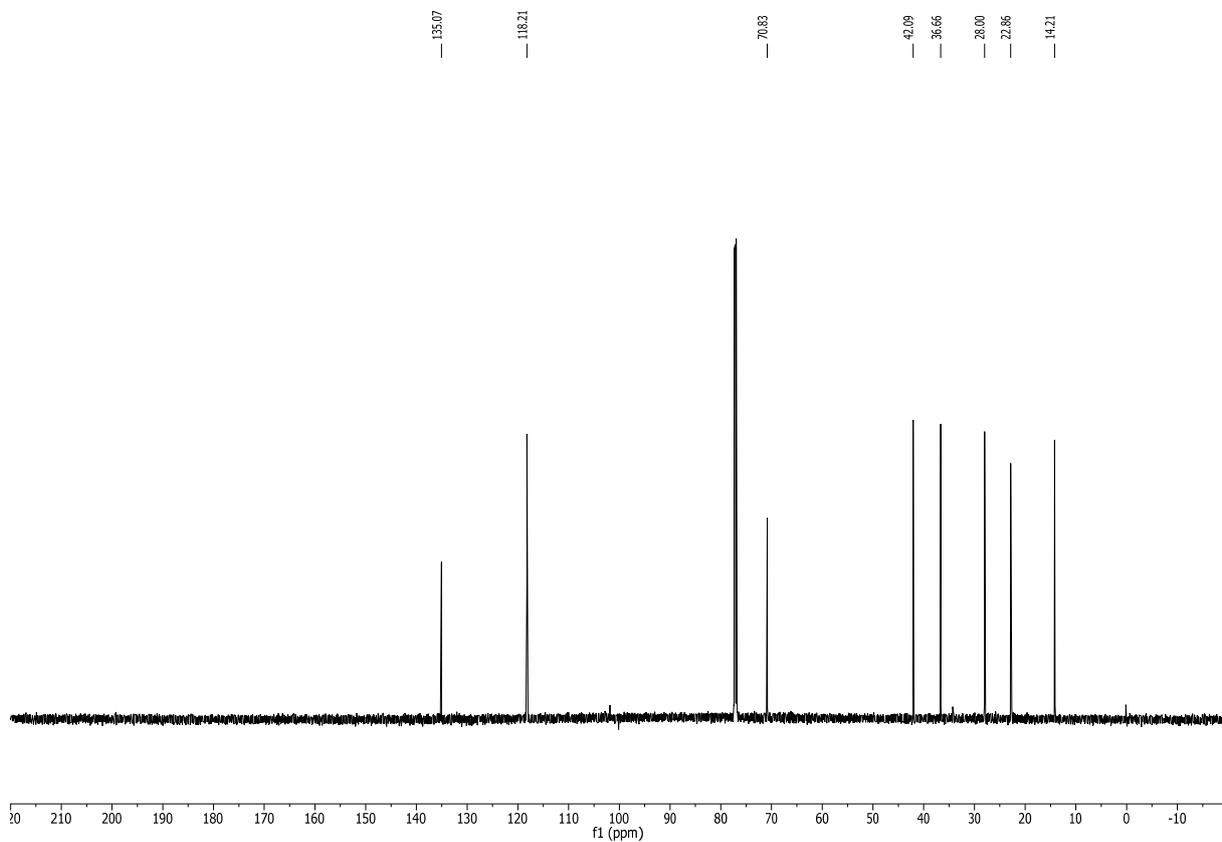


Abbildung 131:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **27** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

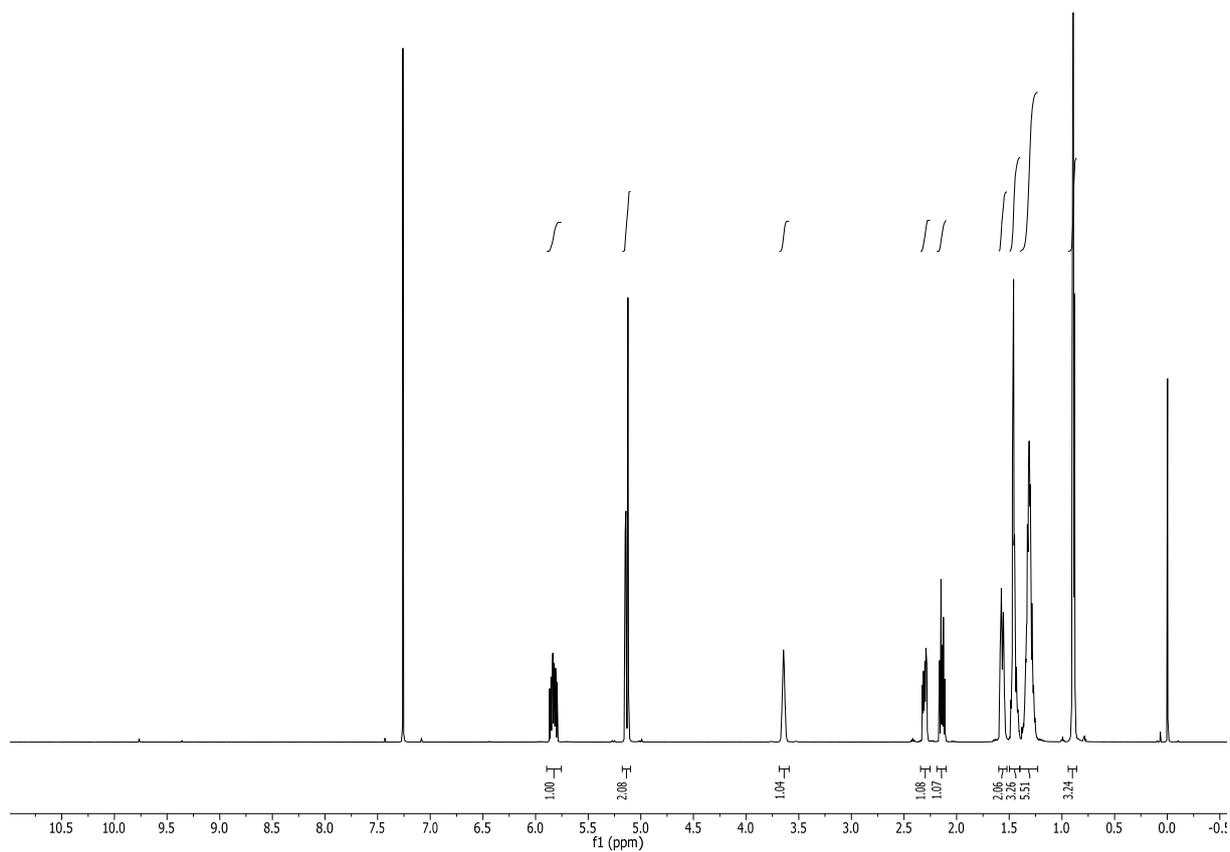


Abbildung 132:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **11** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

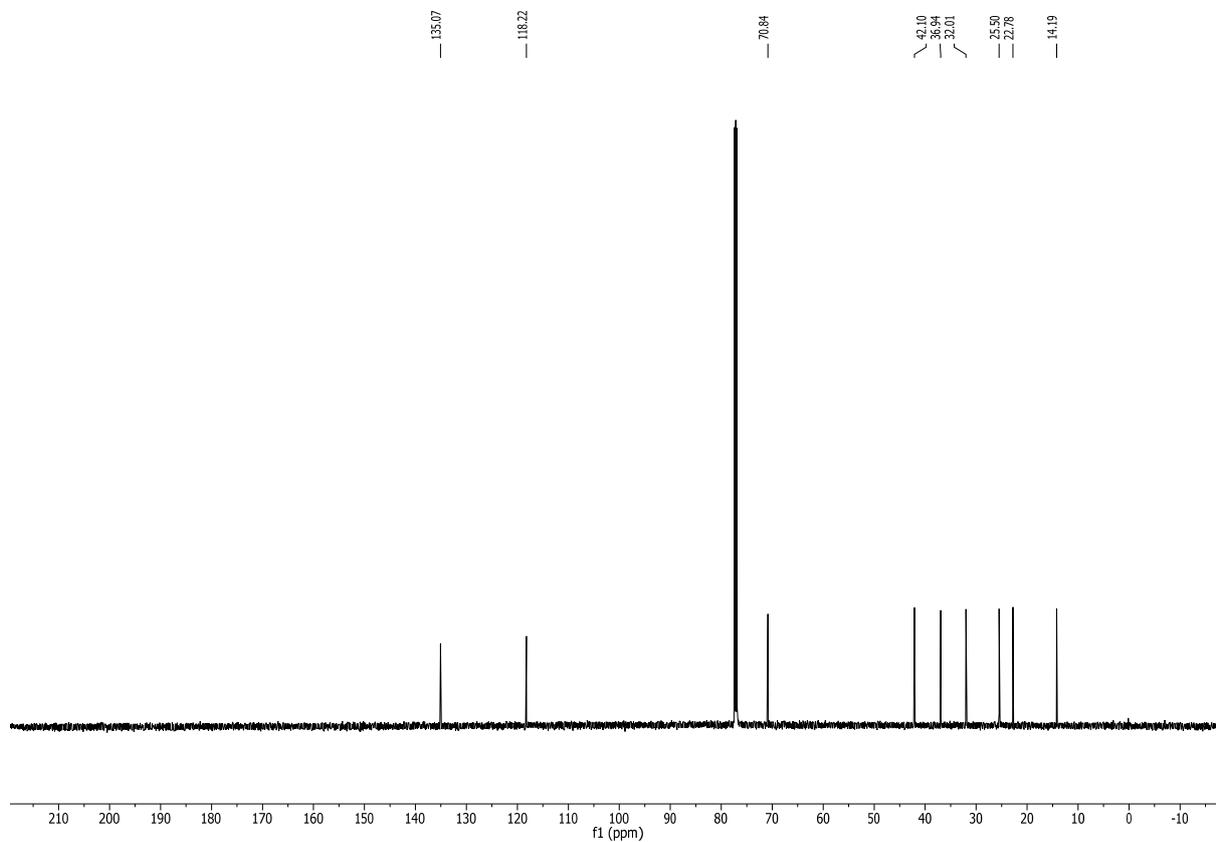


Abbildung 133:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **11** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

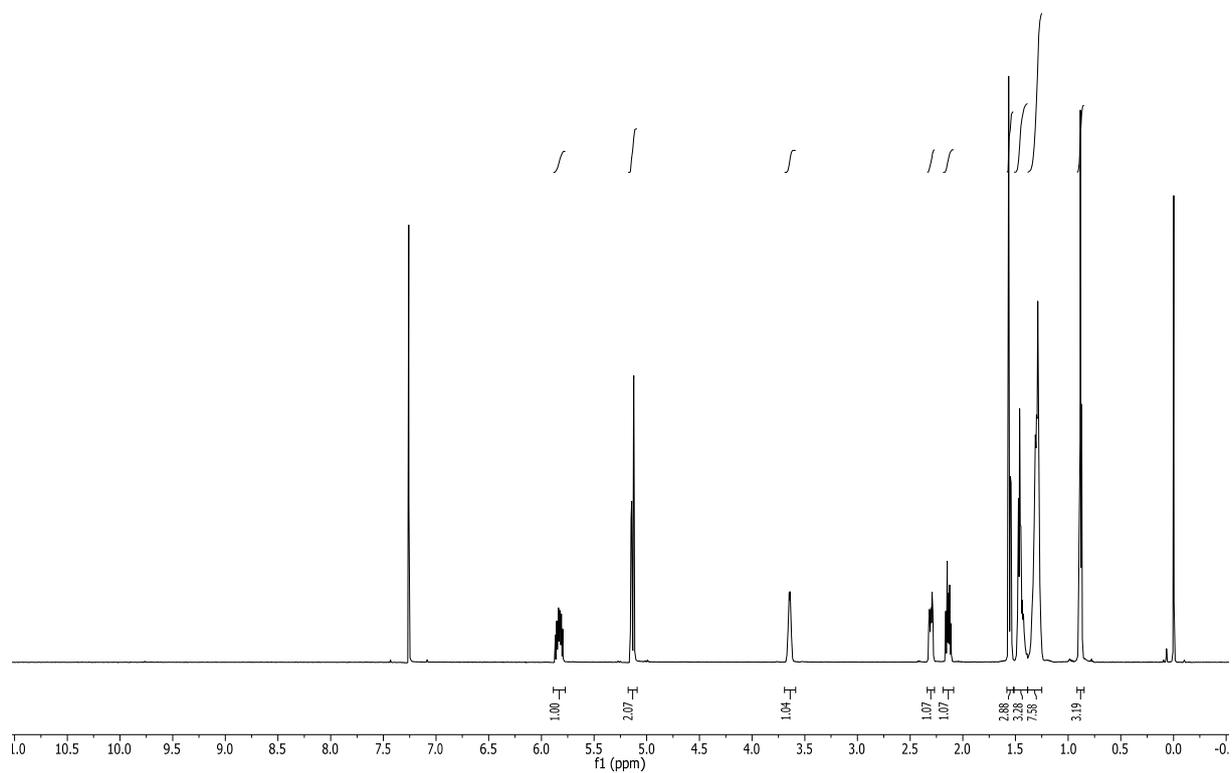


Abbildung 134:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **28** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

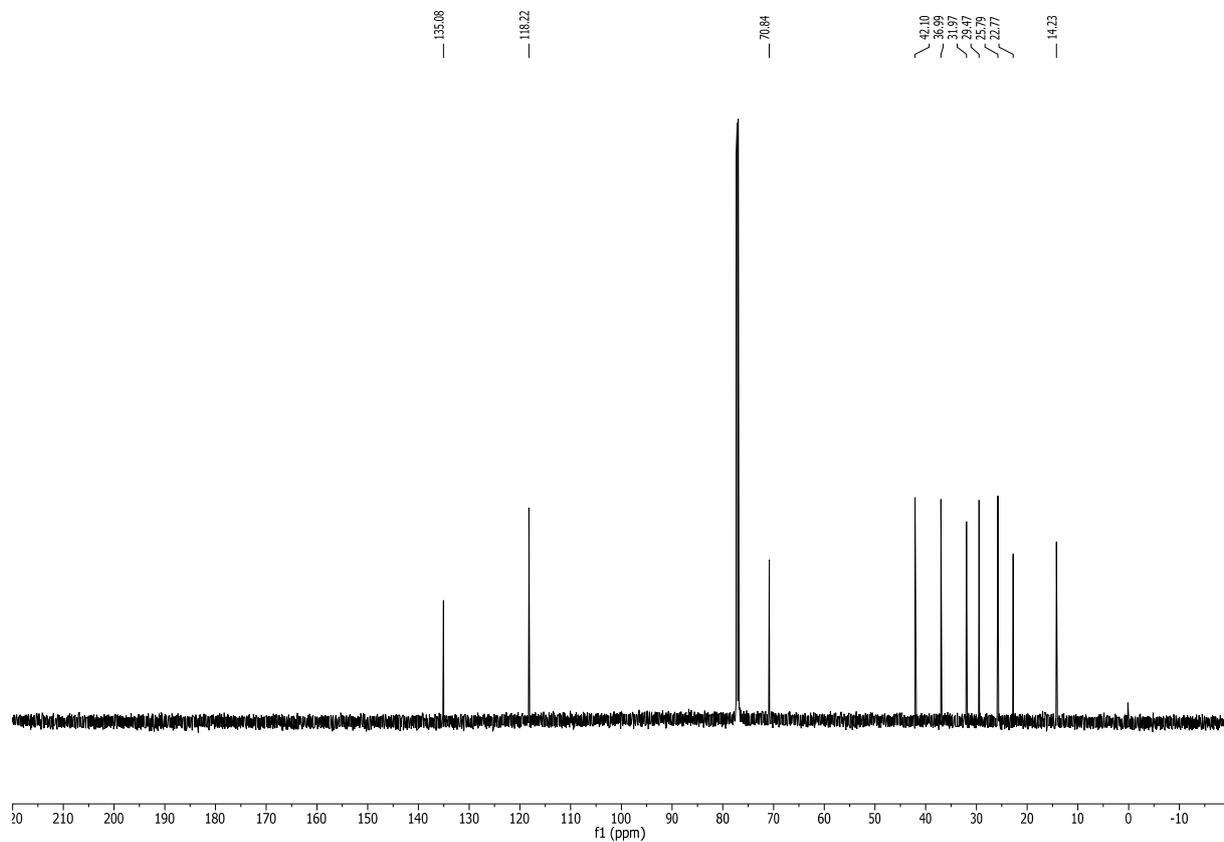


Abbildung 135:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **28** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

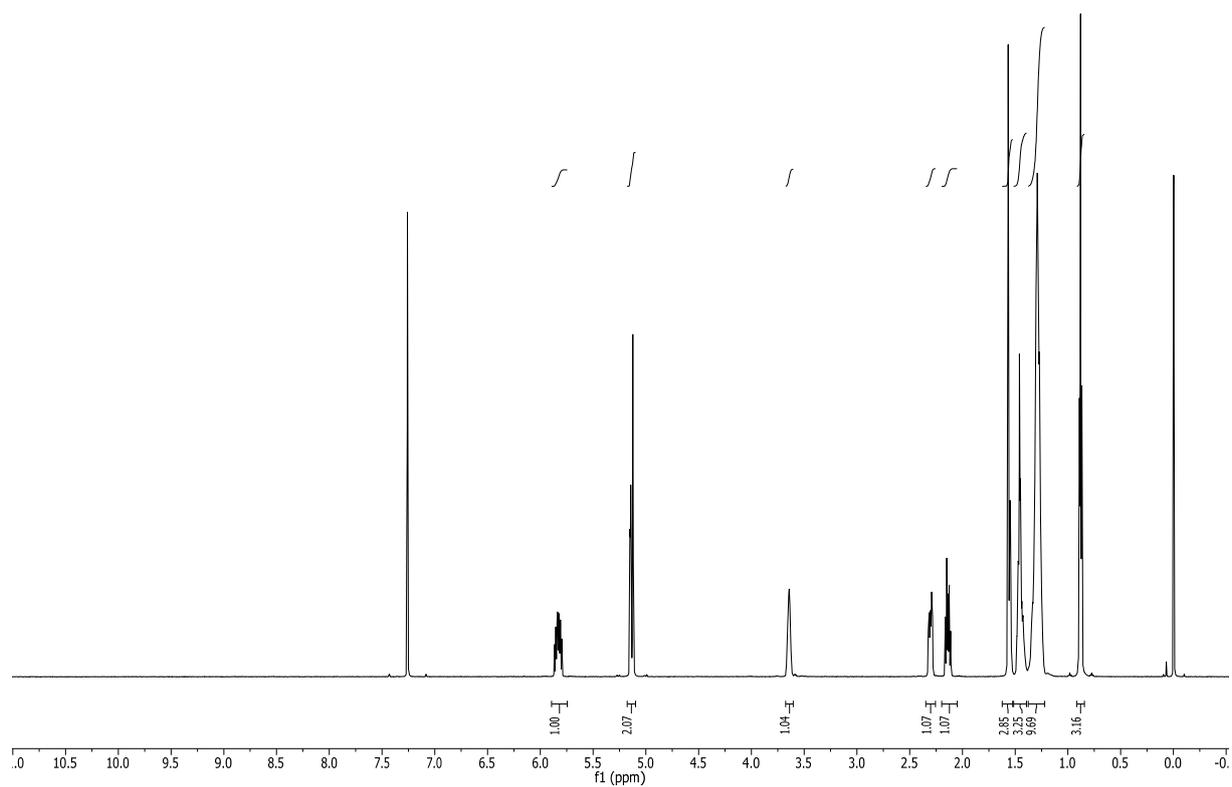


Abbildung 136: <sup>1</sup>H NMR-Spektrum von **29** in CDCl<sub>3</sub> bei 600 MHz.

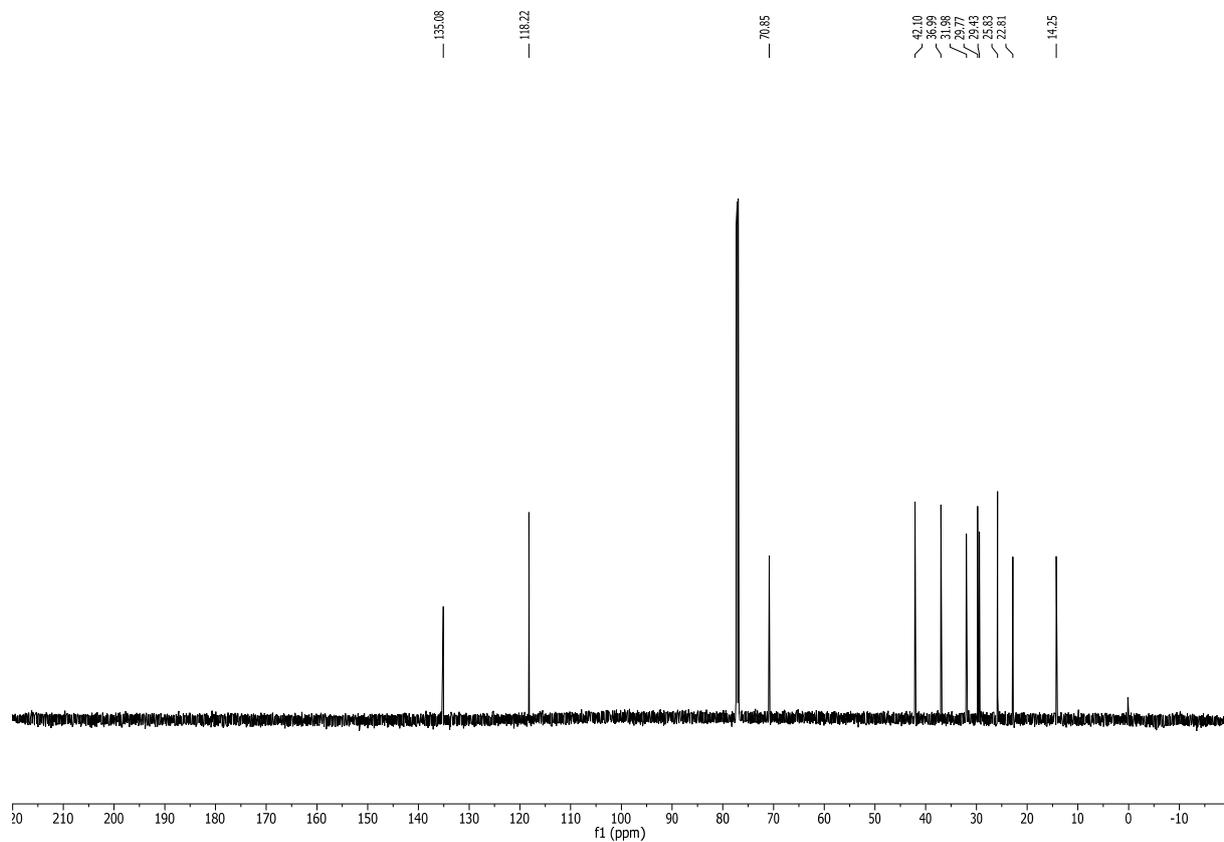


Abbildung 137: <sup>13</sup>C NMR-Spektrum von **29** in CDCl<sub>3</sub> bei 151 MHz.

# Anhang

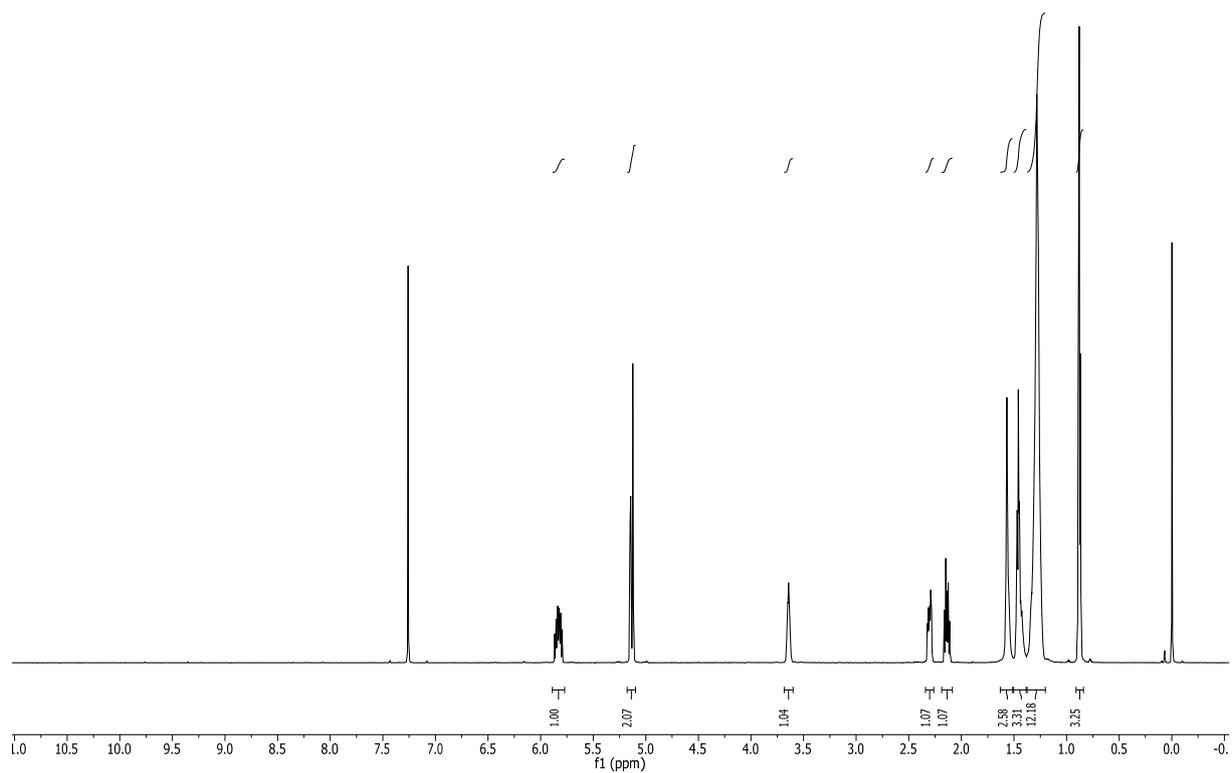


Abbildung 138:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **30** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

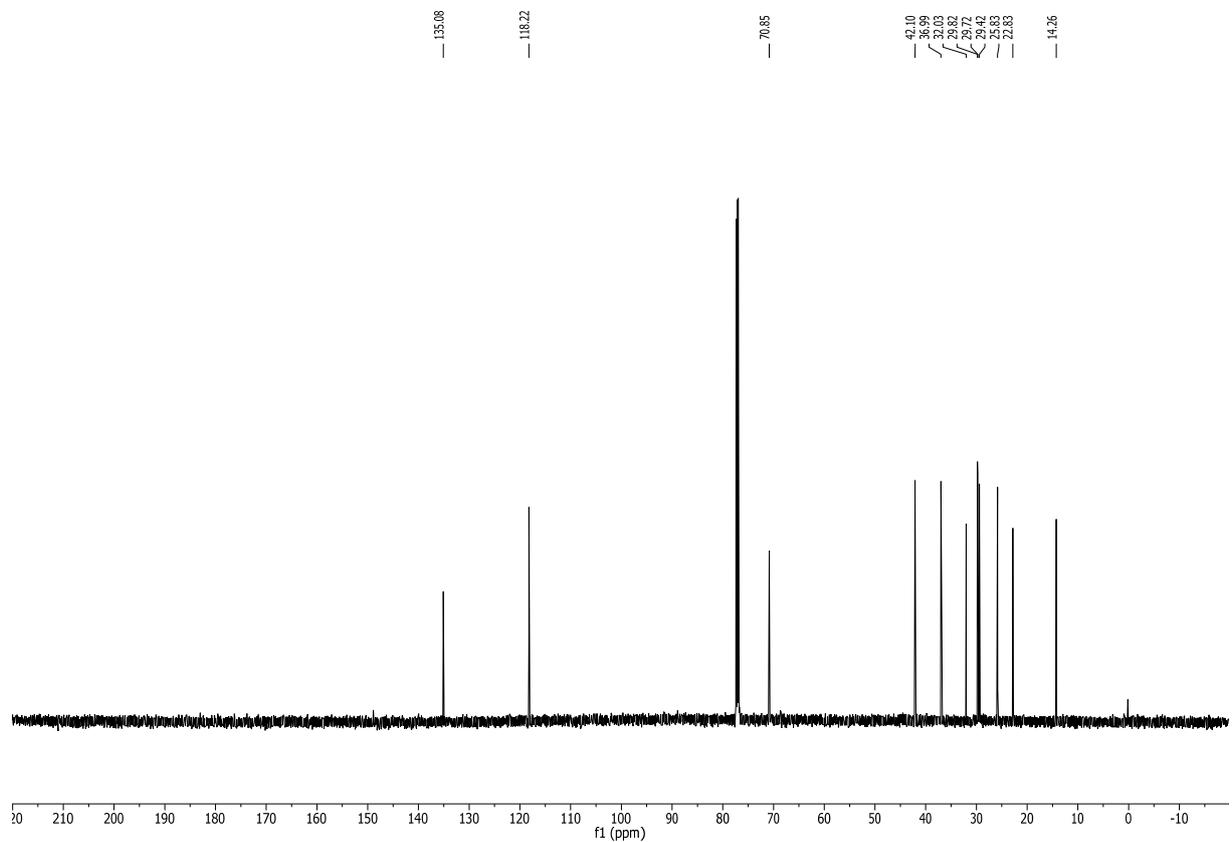


Abbildung 139:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **30** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

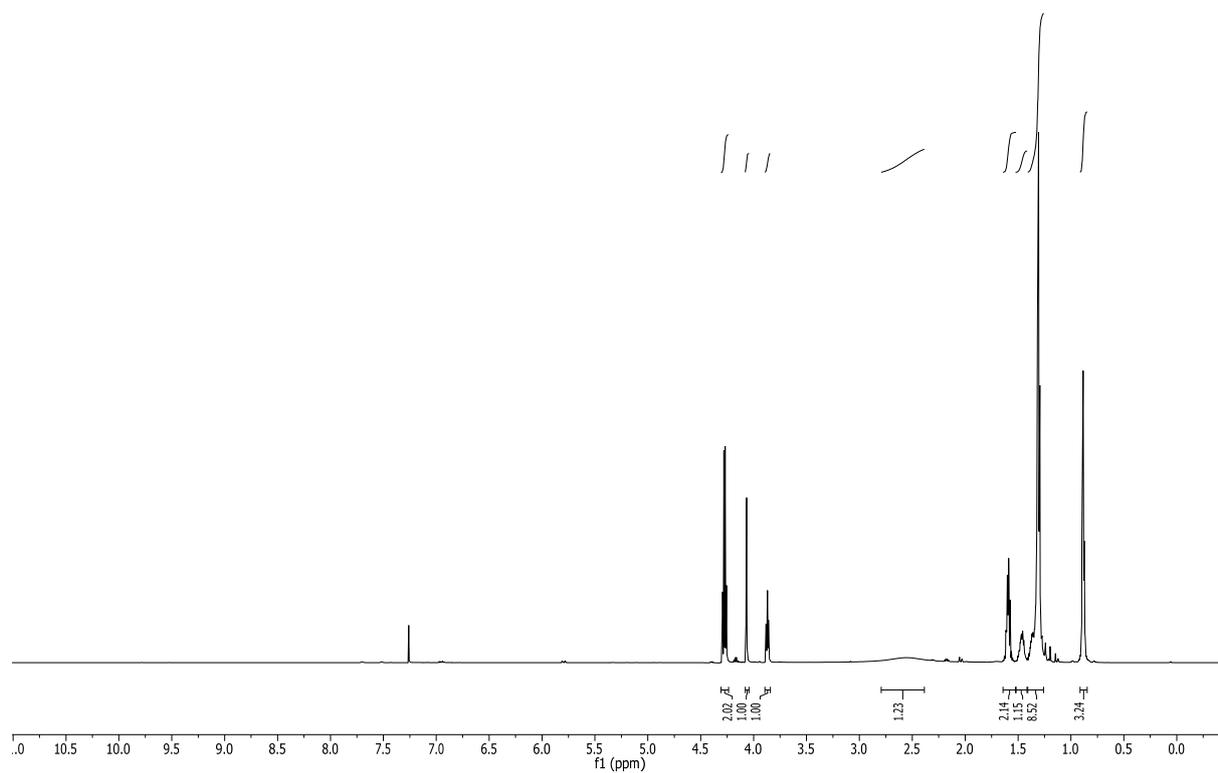


Abbildung 140  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **17** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

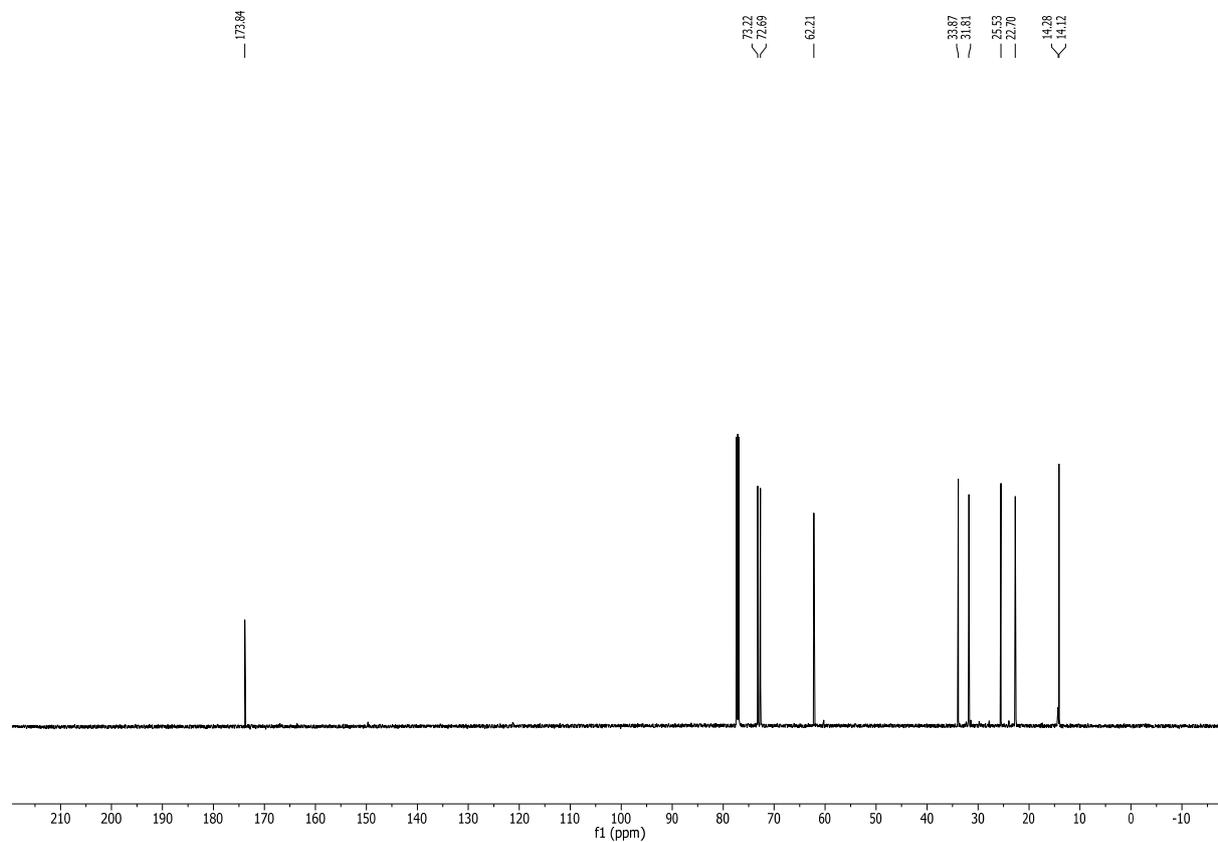


Abbildung 141:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **17** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

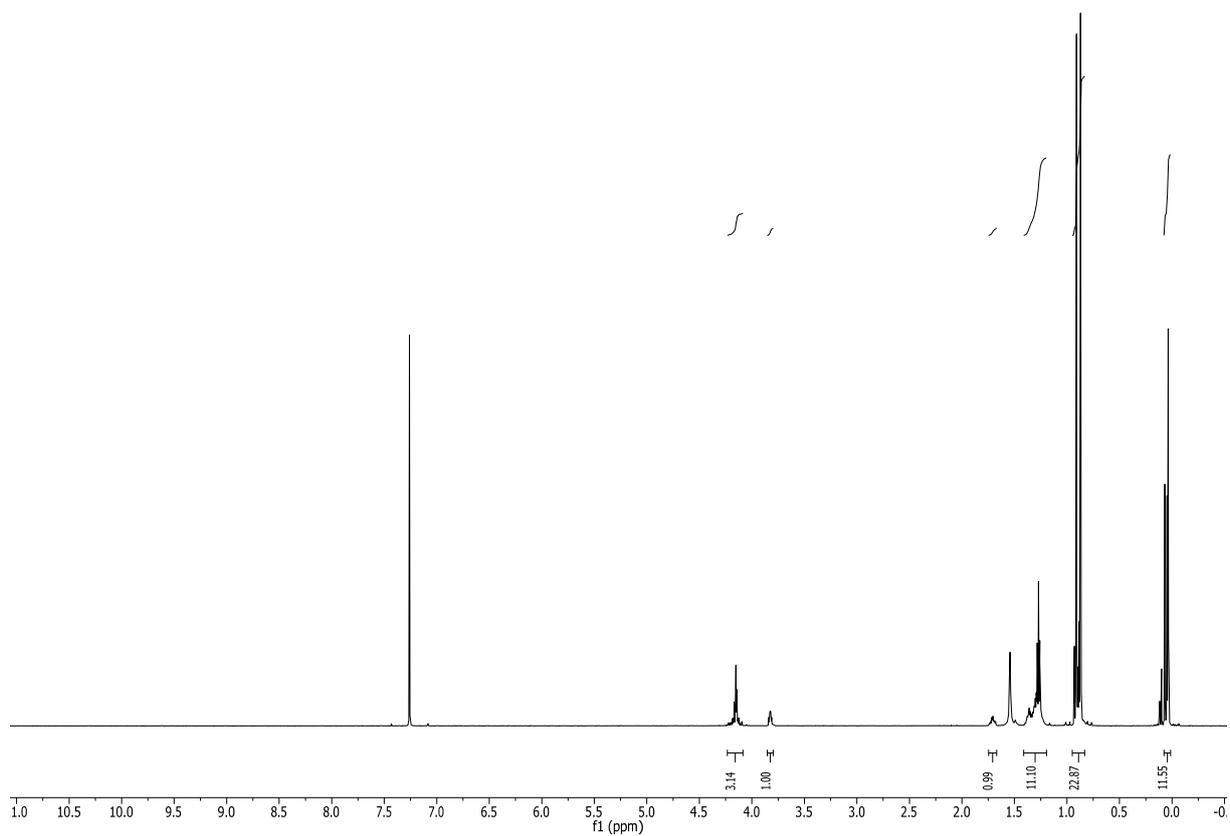


Abbildung 142:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **18** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

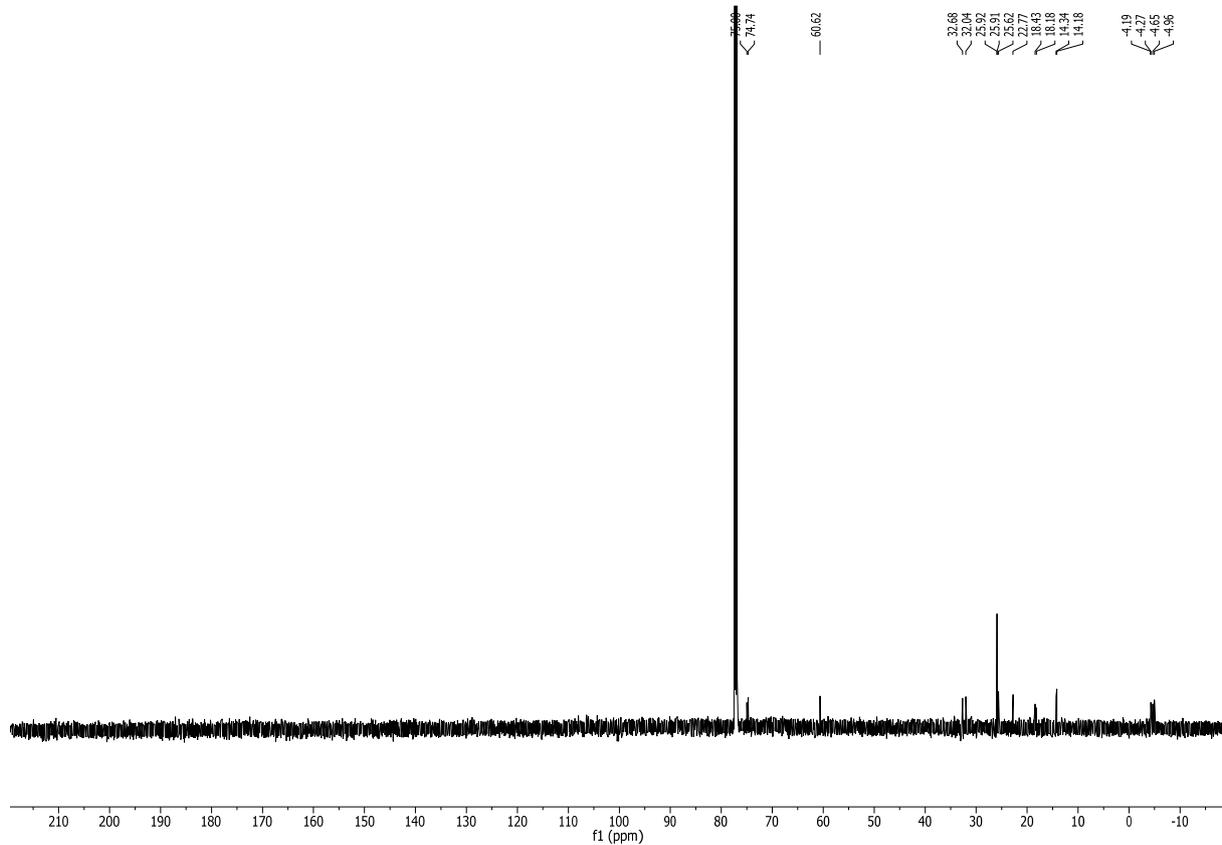


Abbildung 143:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **18** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

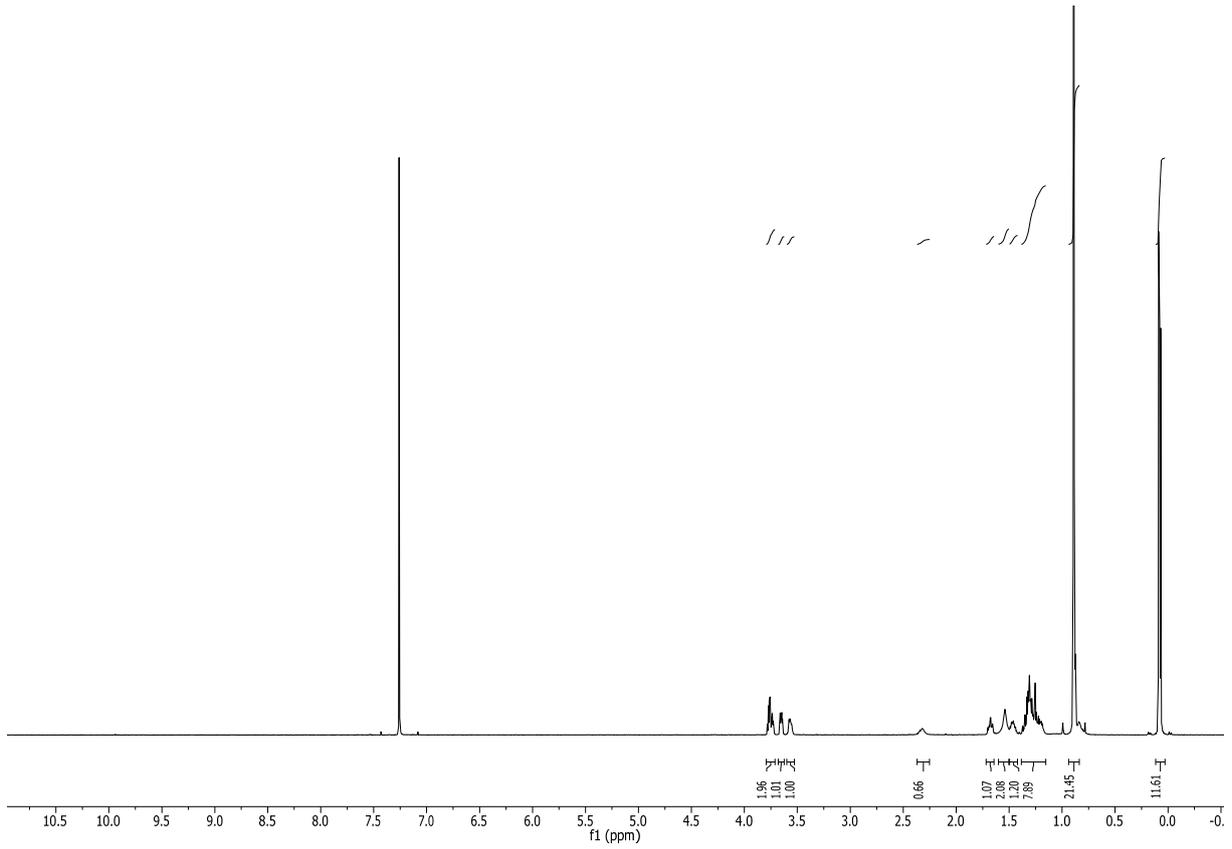


Abbildung 144: <sup>1</sup>H NMR-Spektrum von **19** in CDCl<sub>3</sub> bei 600 MHz.

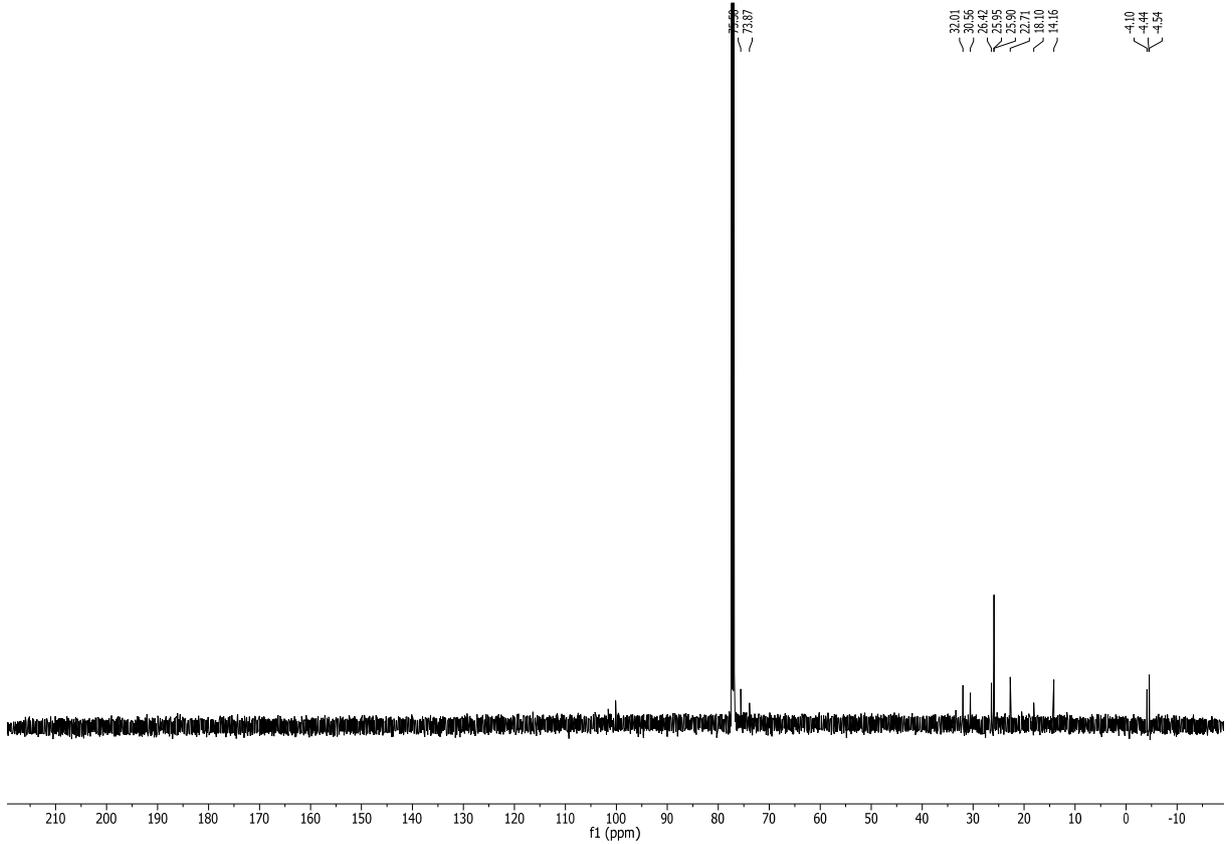


Abbildung 145: <sup>13</sup>C NMR-Spektrum von **19** in CDCl<sub>3</sub> bei 151 MHz.

# Anhang

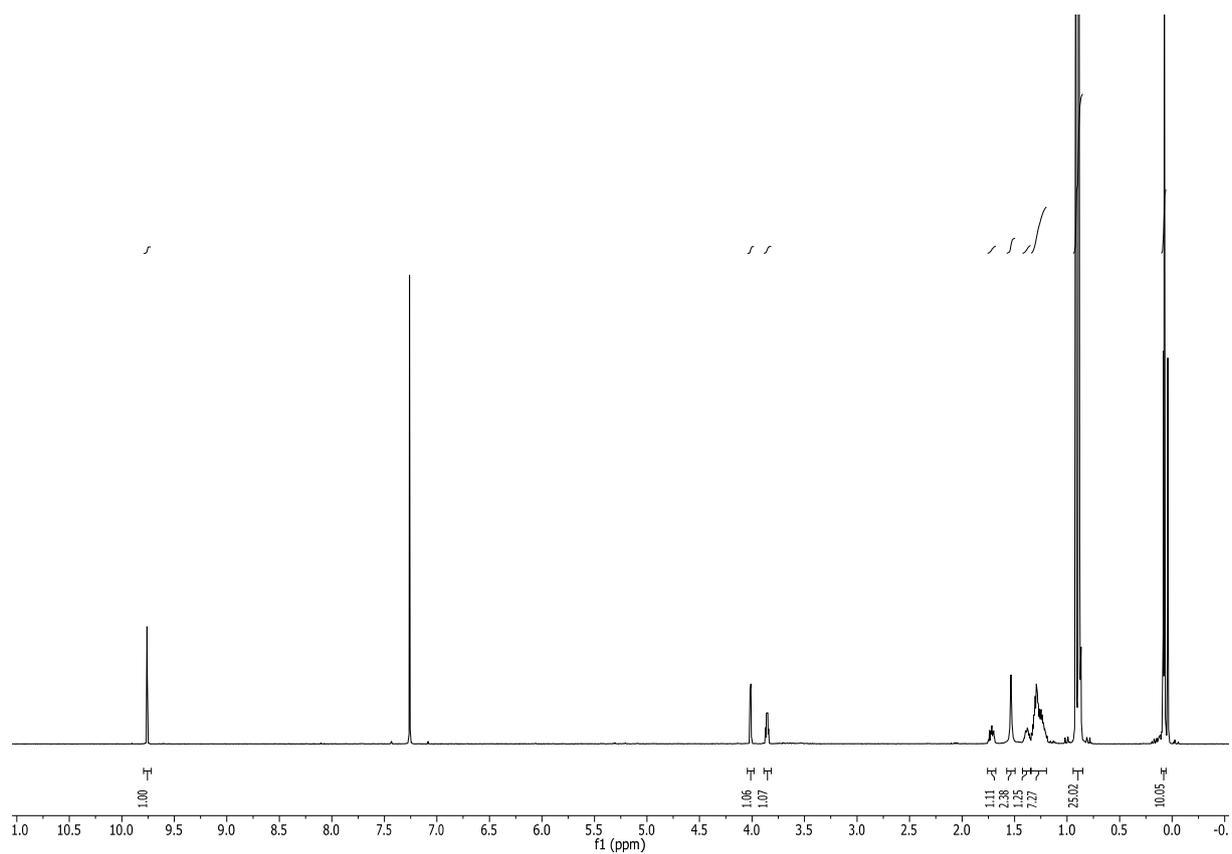


Abbildung 146:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **20** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

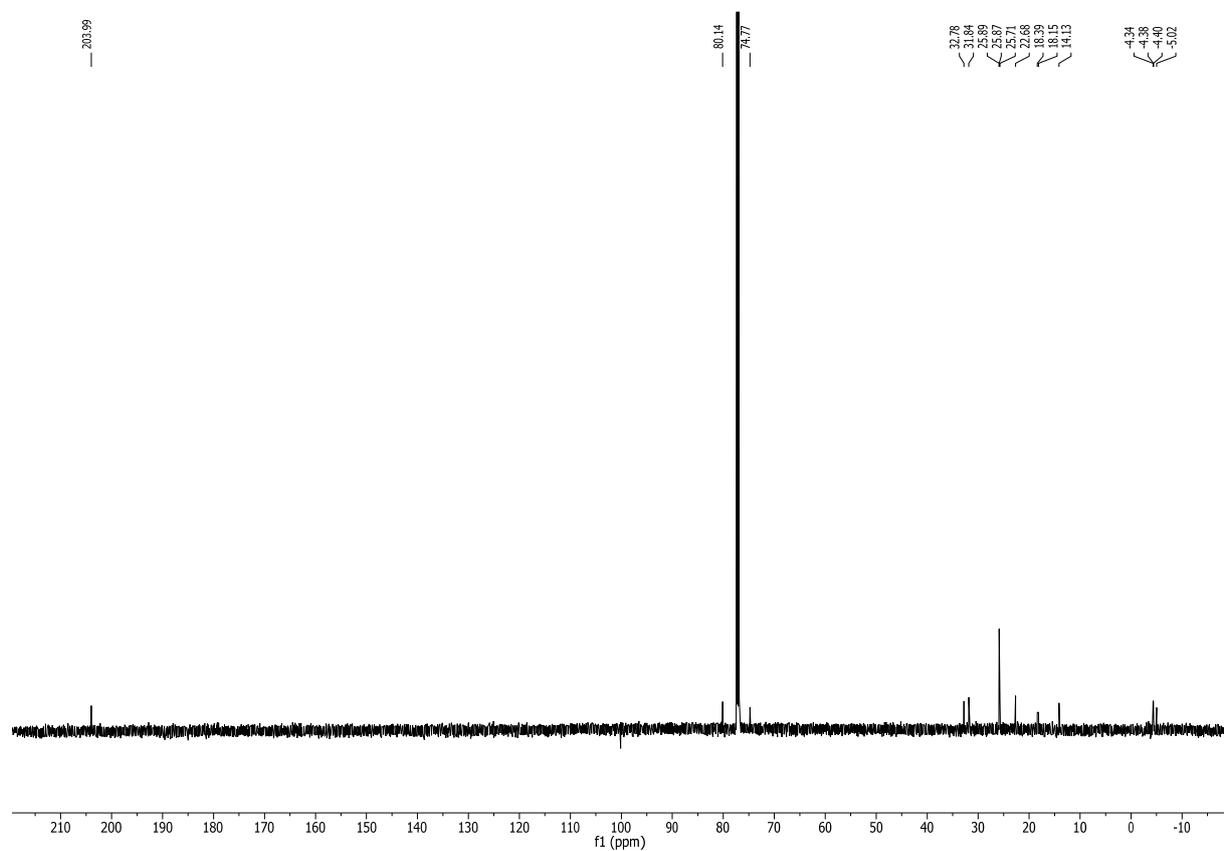


Abbildung 147:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **20** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

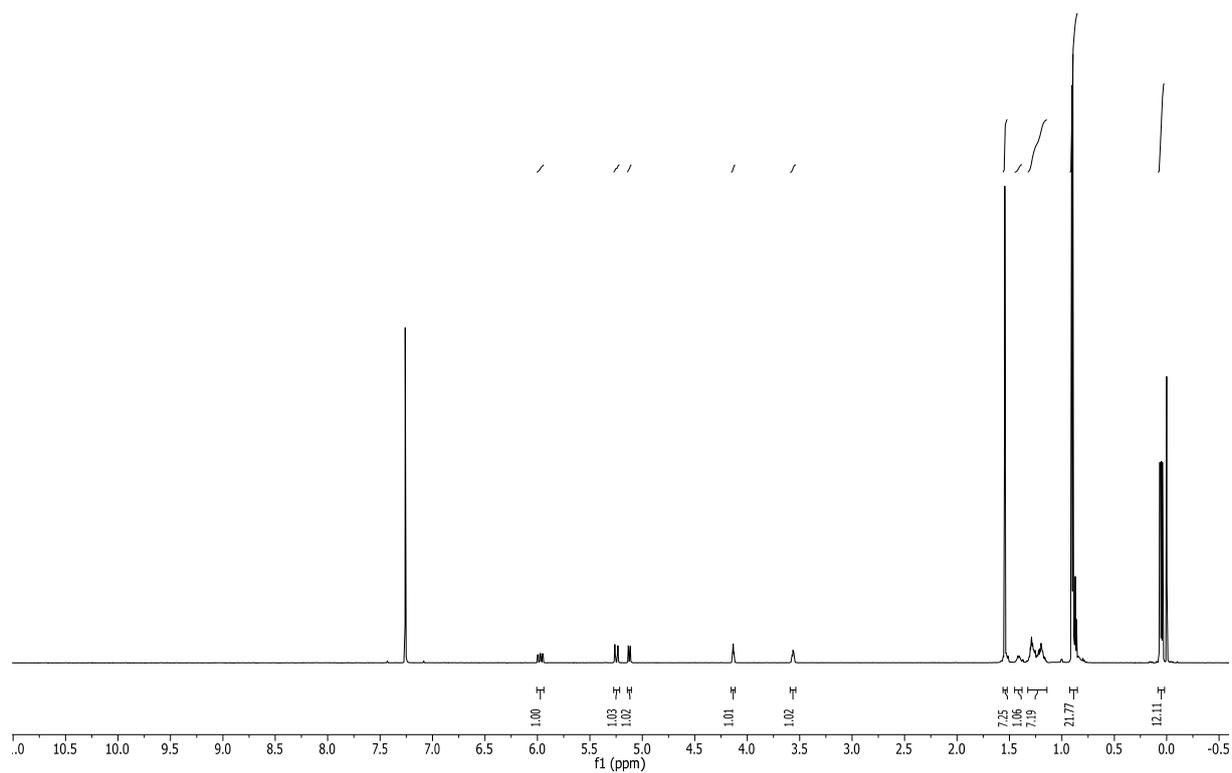


Abbildung 148:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **21** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

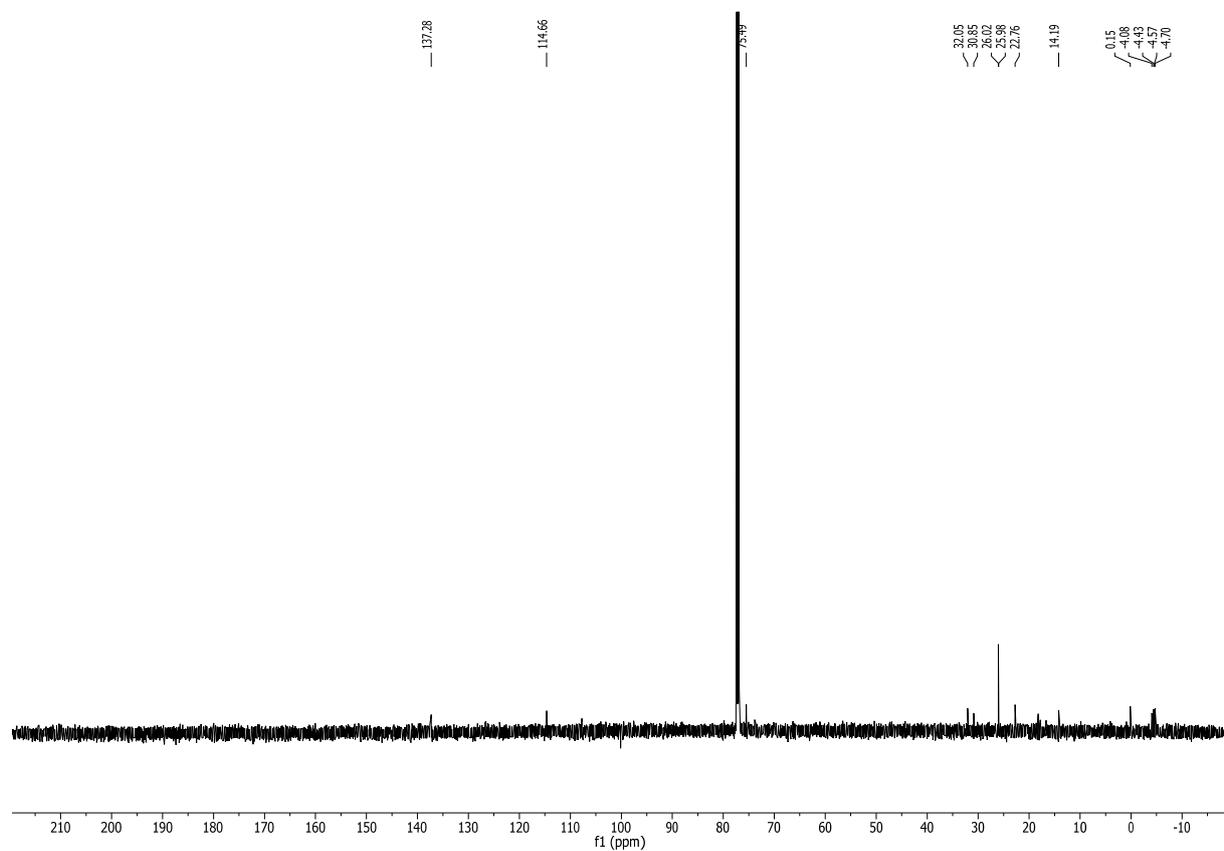


Abbildung 149:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **21** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

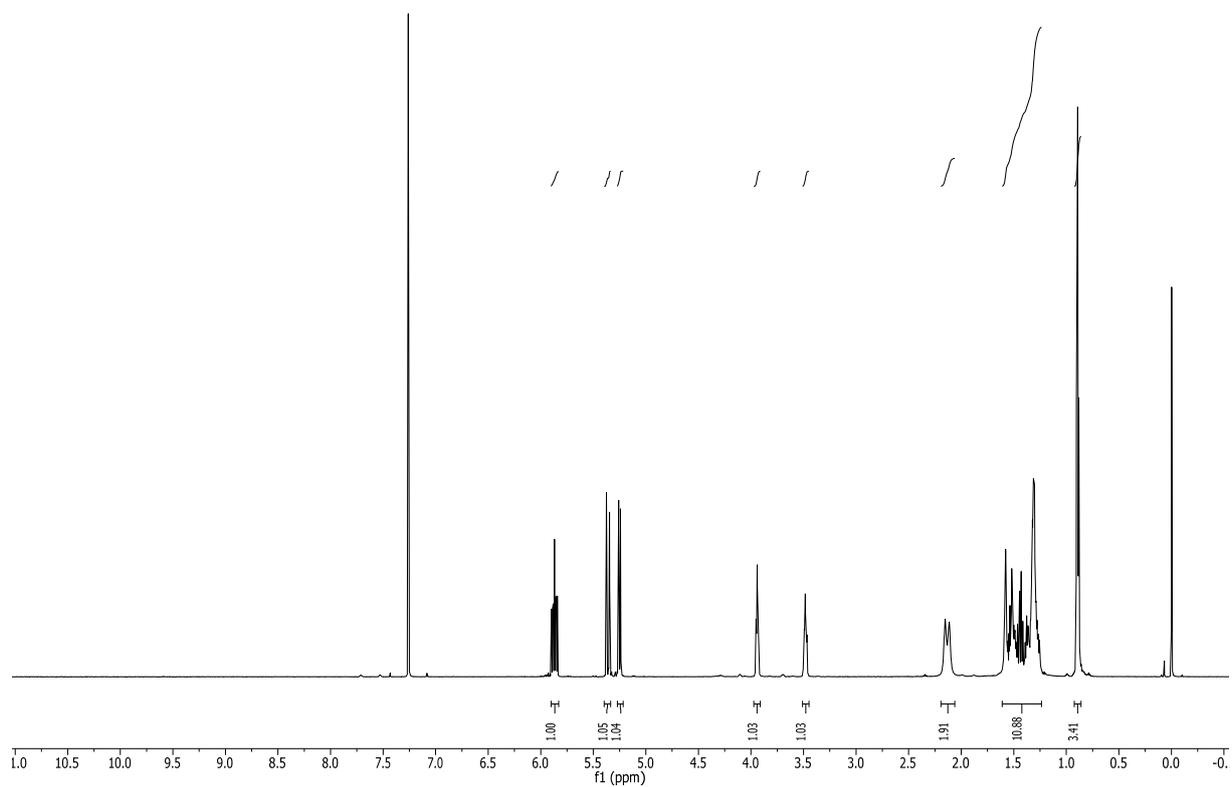


Abbildung 150:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von (3S,4S)-12 in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

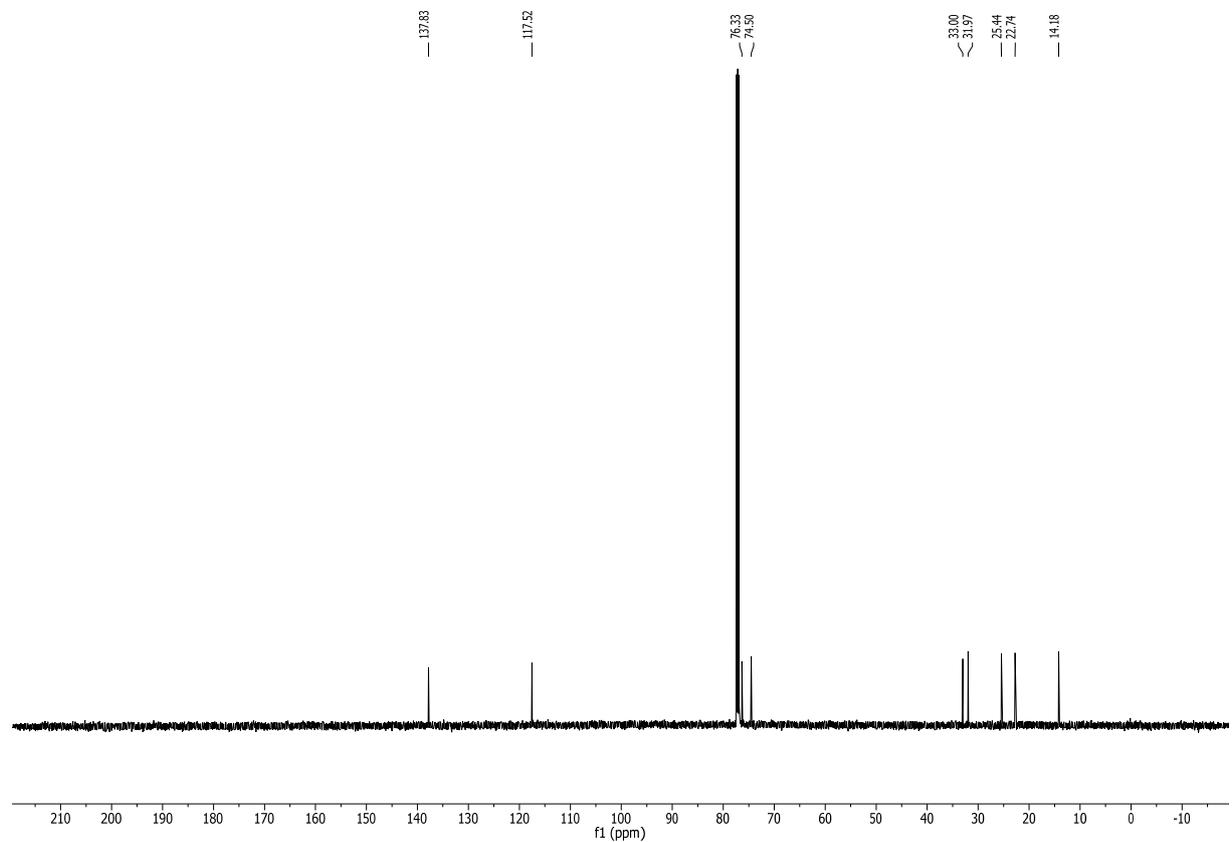


Abbildung 151:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von (3S,4S)-12 in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

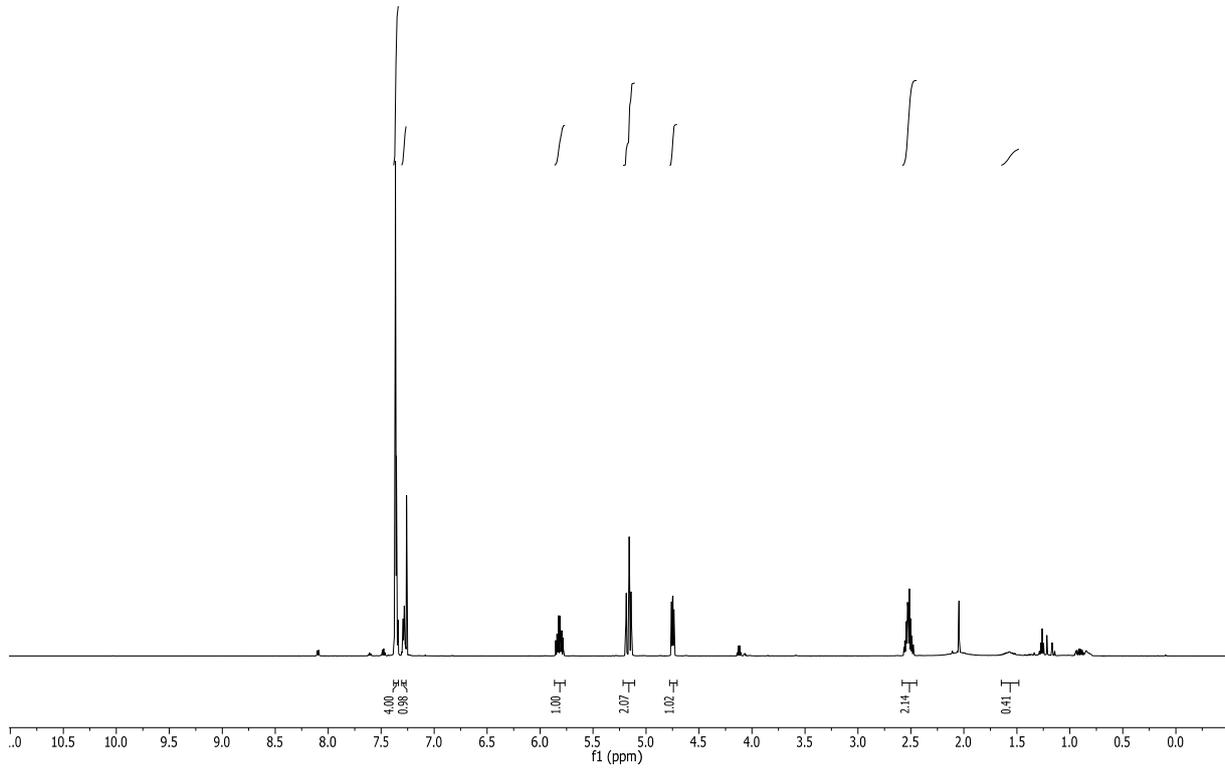


Abbildung 152:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **31** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

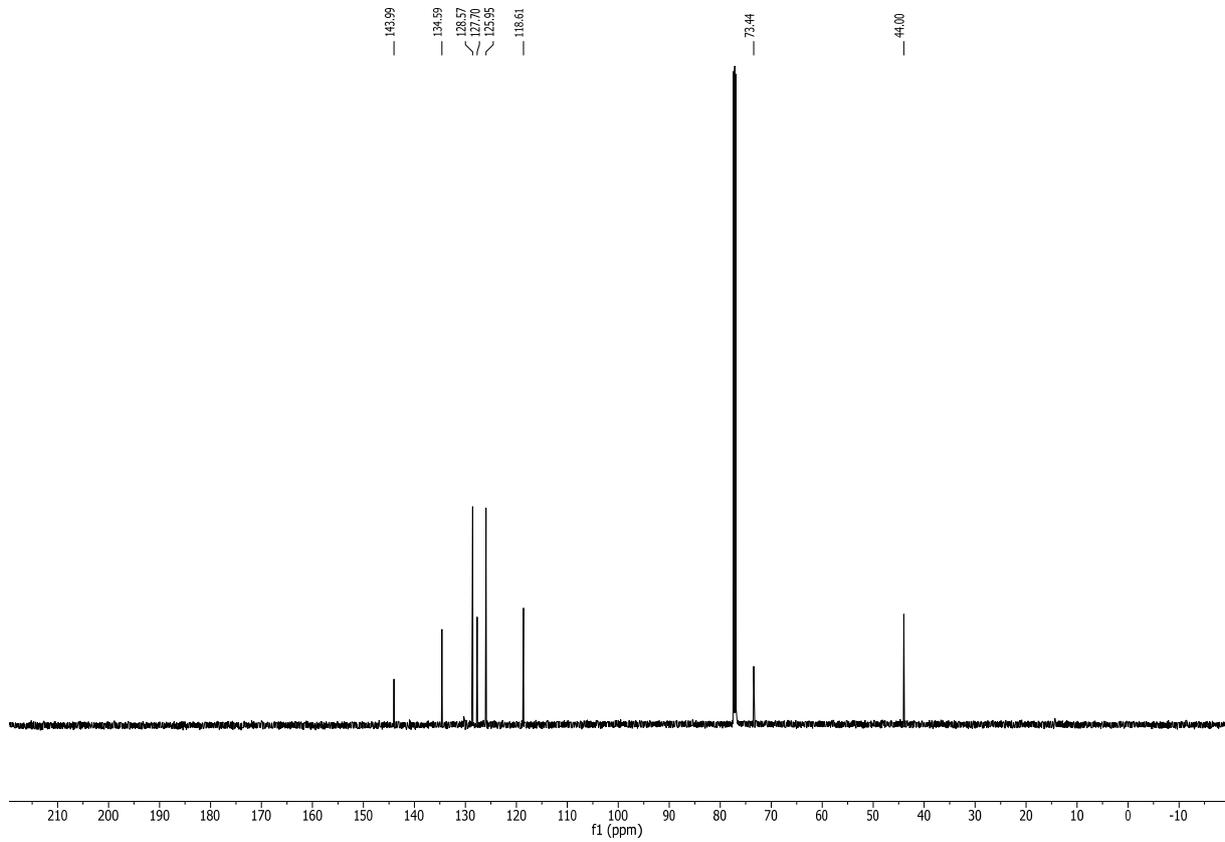


Abbildung 153:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **31** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz

# Anhang

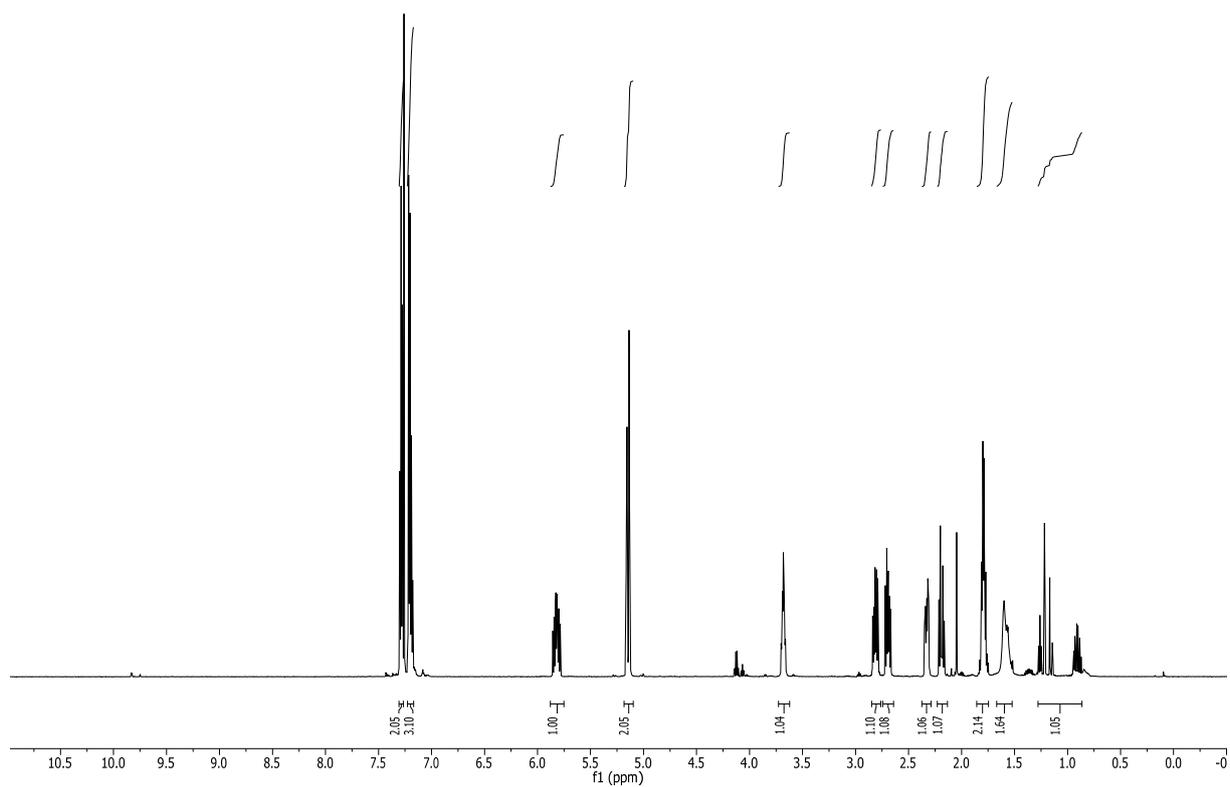


Abbildung 154:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **32** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

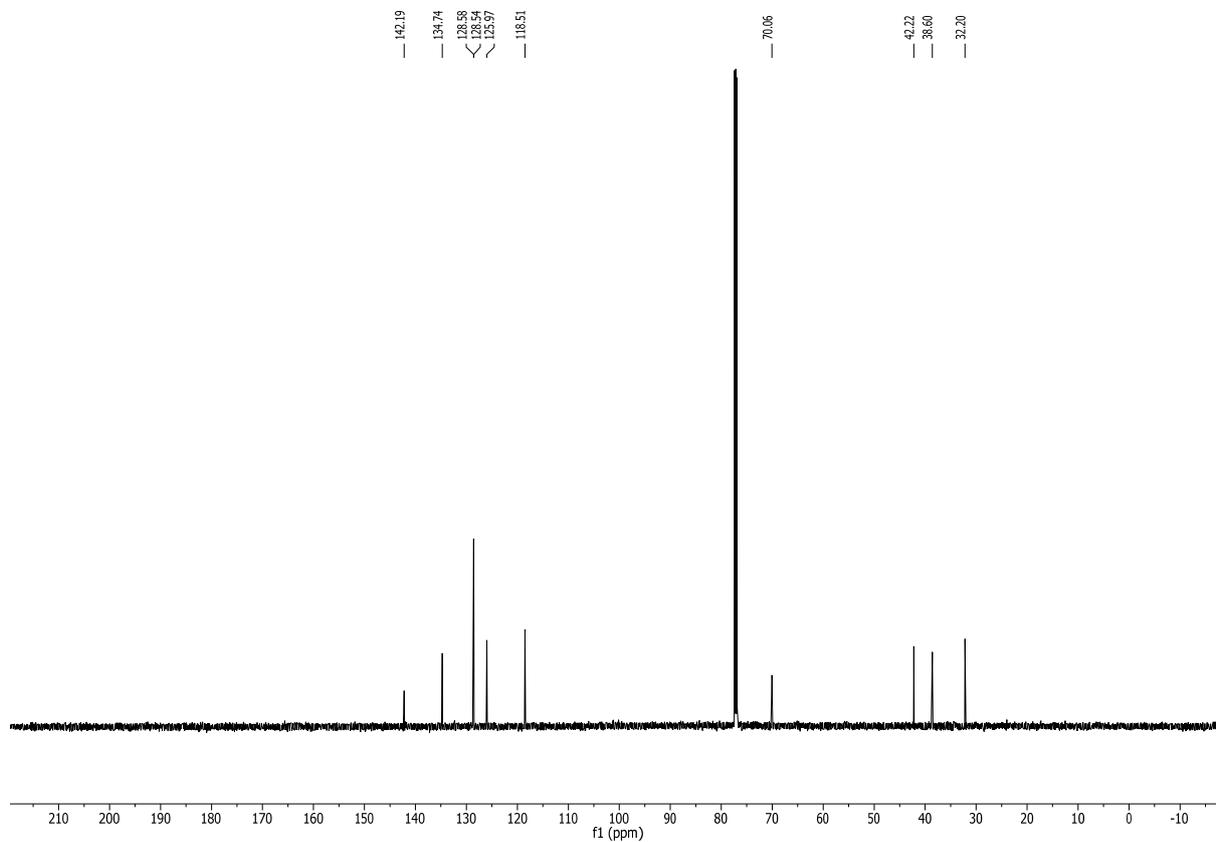


Abbildung 155:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **32** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

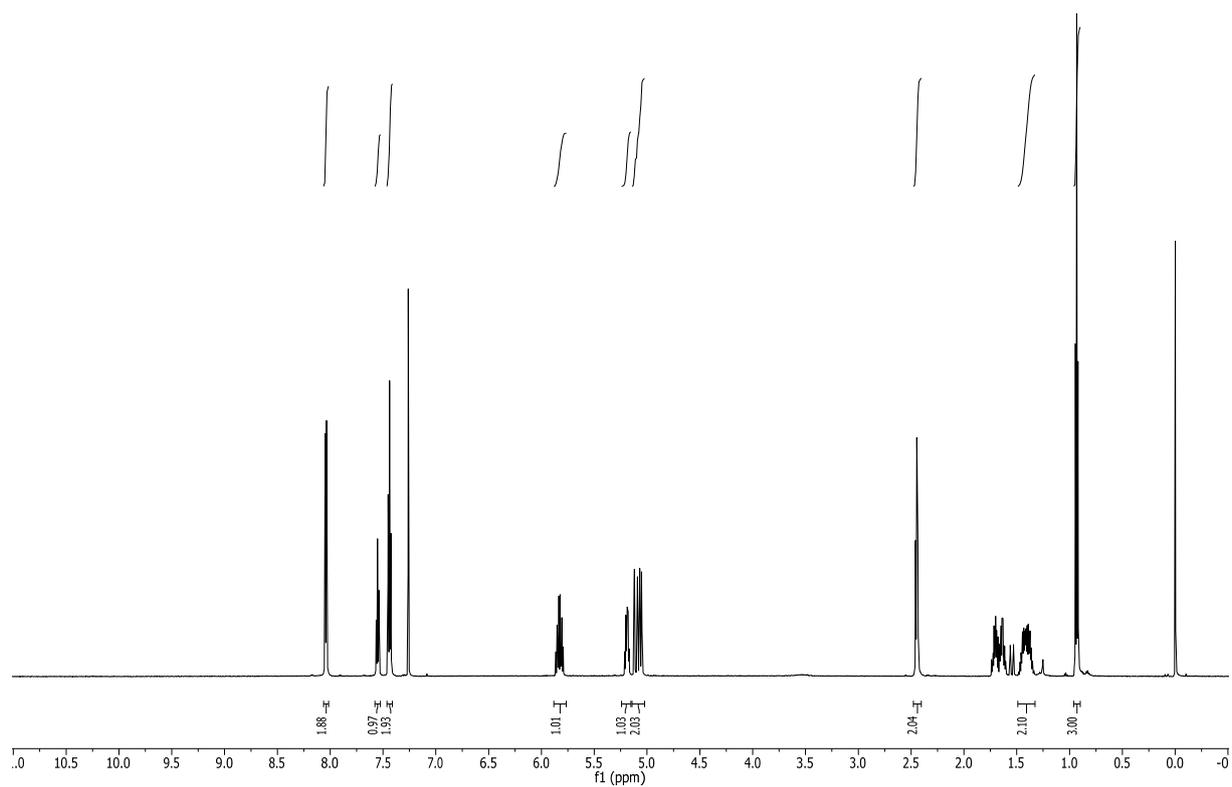


Abbildung 156:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **68** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

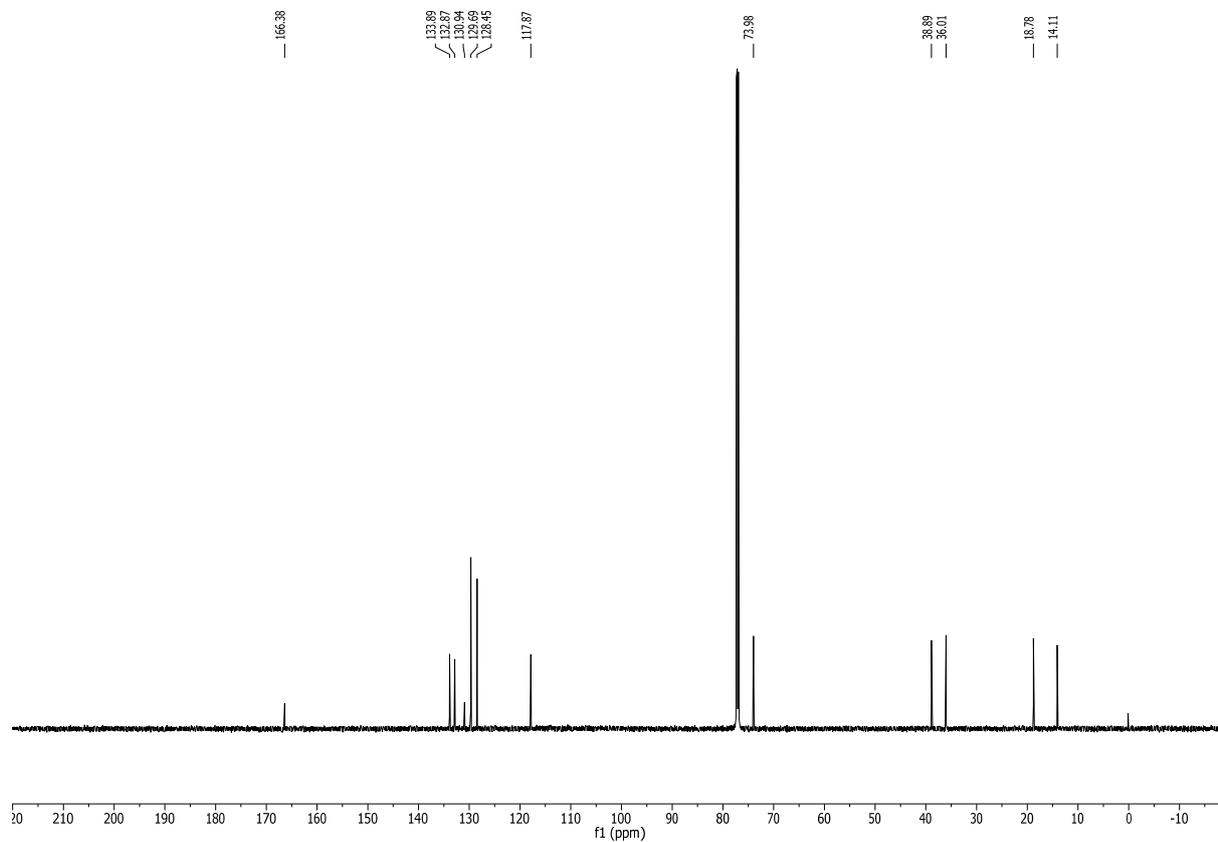


Abbildung 157:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **68** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

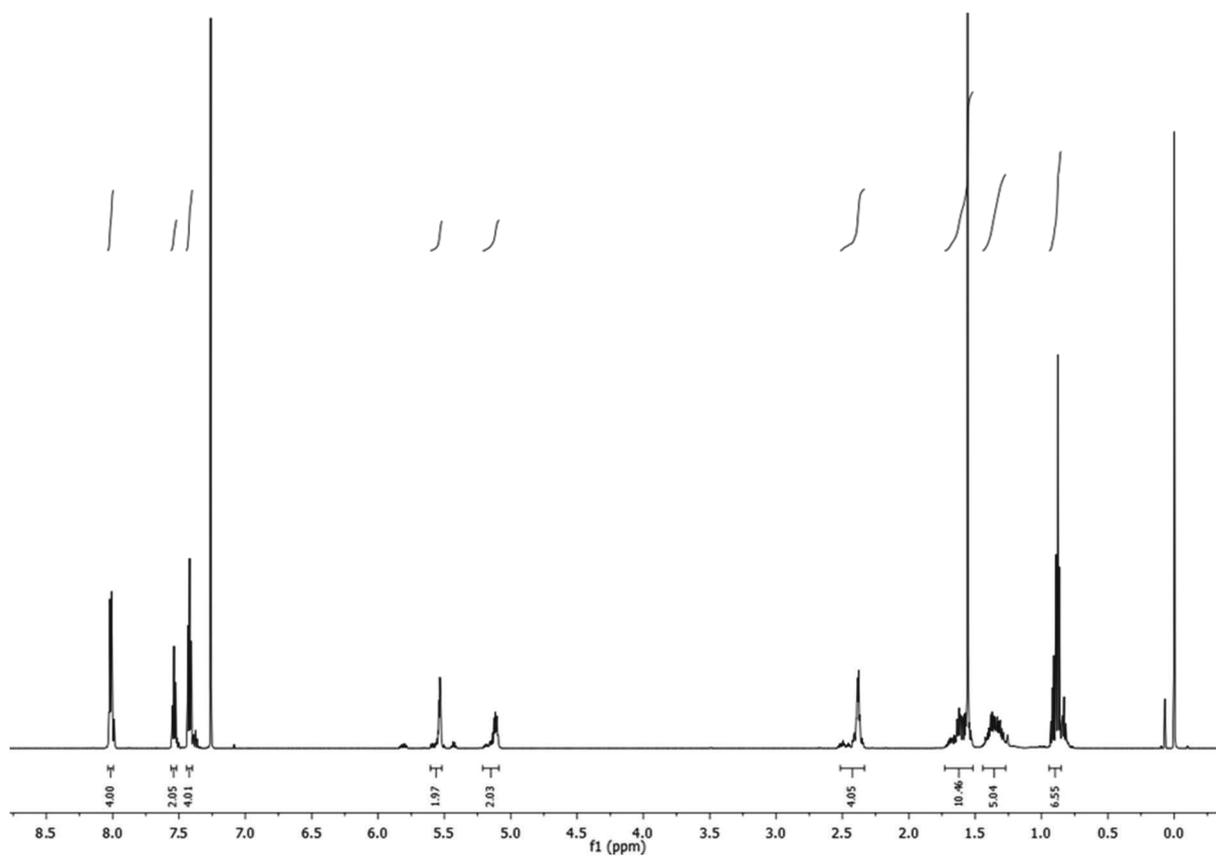


Abbildung 158:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von **69** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

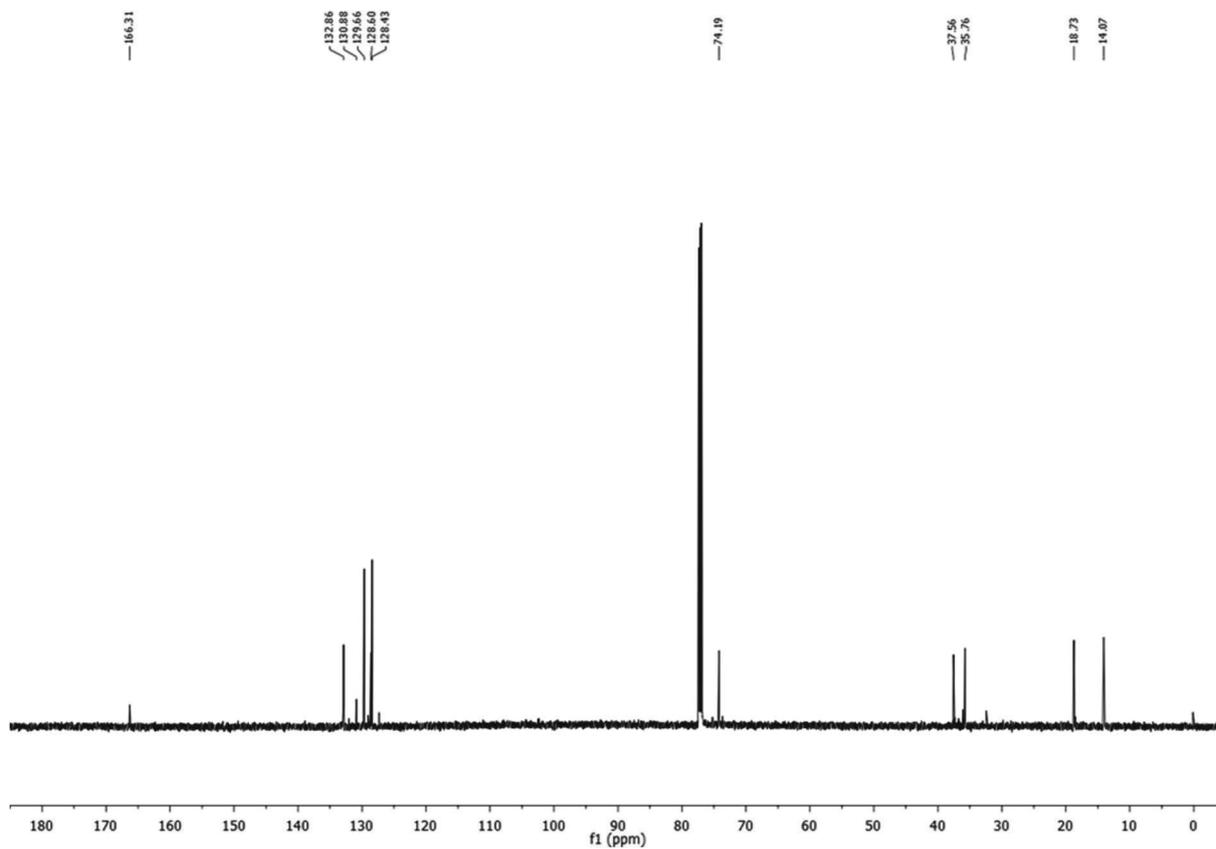


Abbildung 159:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von **69** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

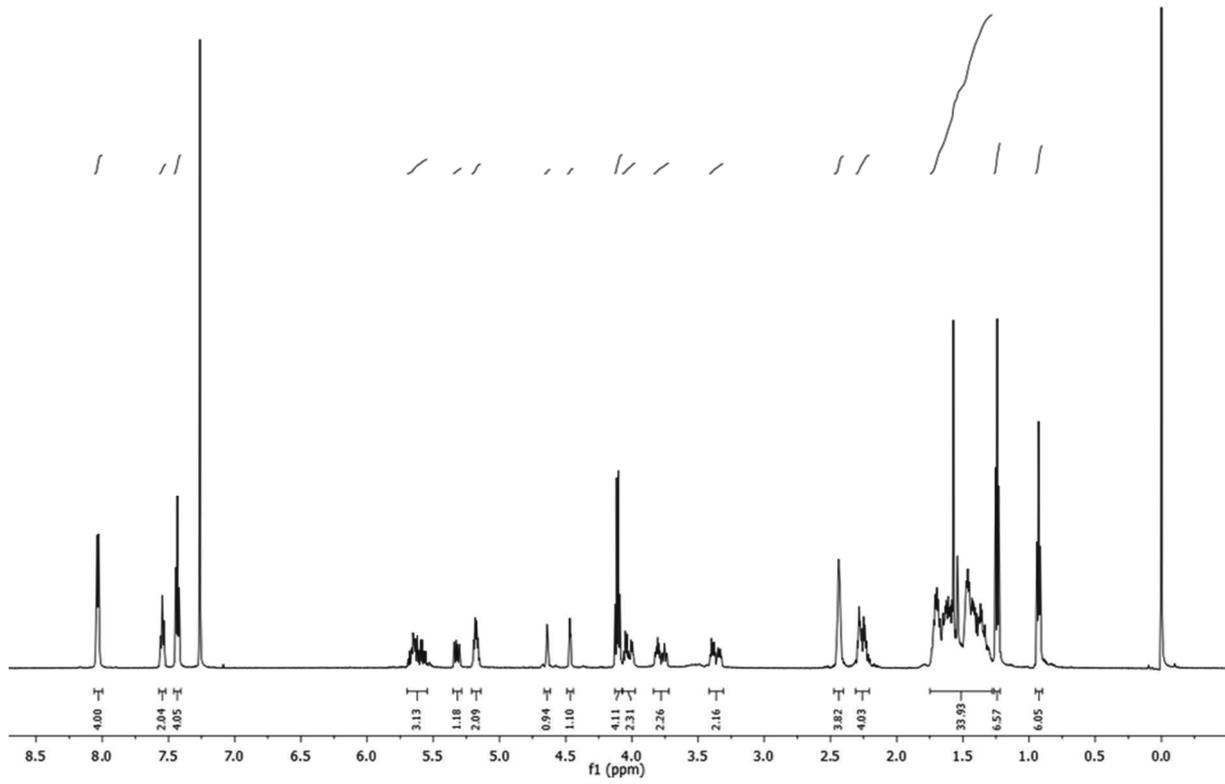


Abbildung 160:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von (5*S*,6*E*,9*R*)-**70** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

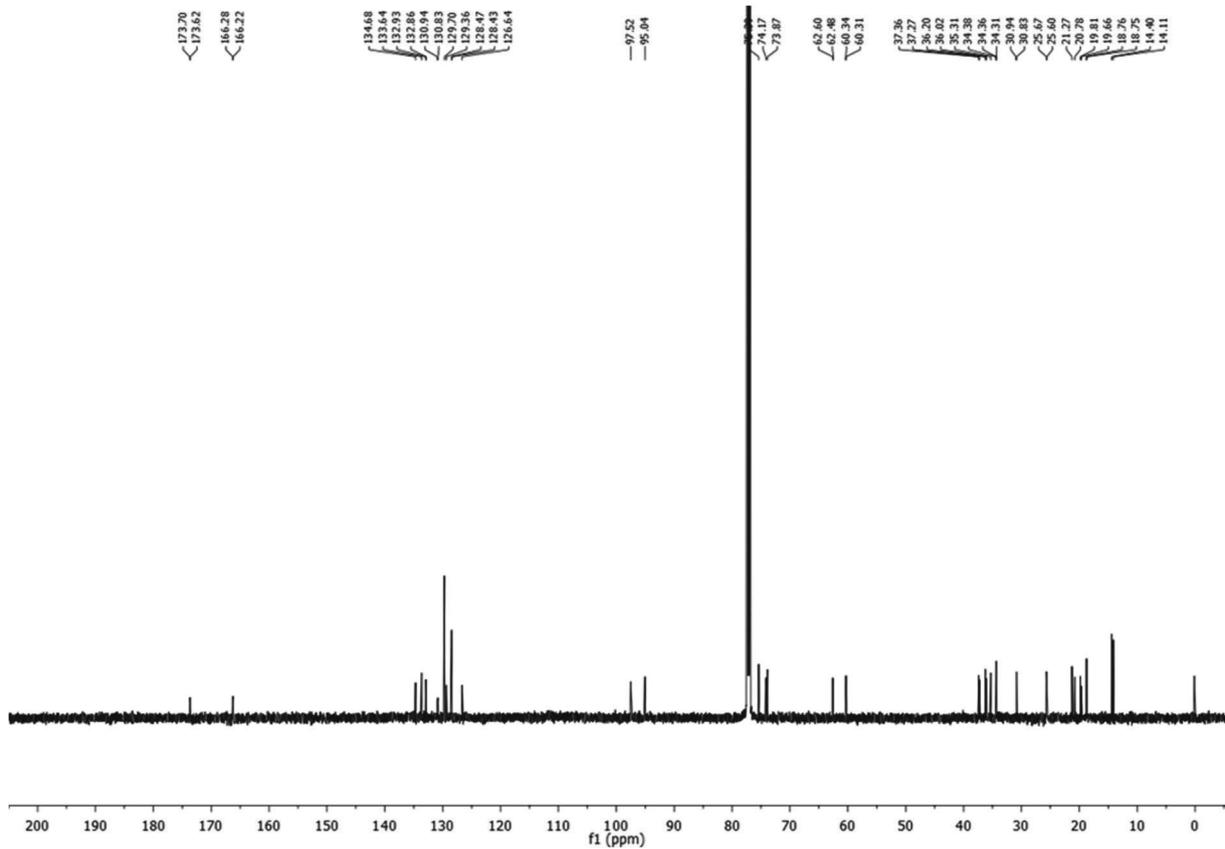


Abbildung 161:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von (5*S*,6*E*,9*R*)-**70** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

# Anhang

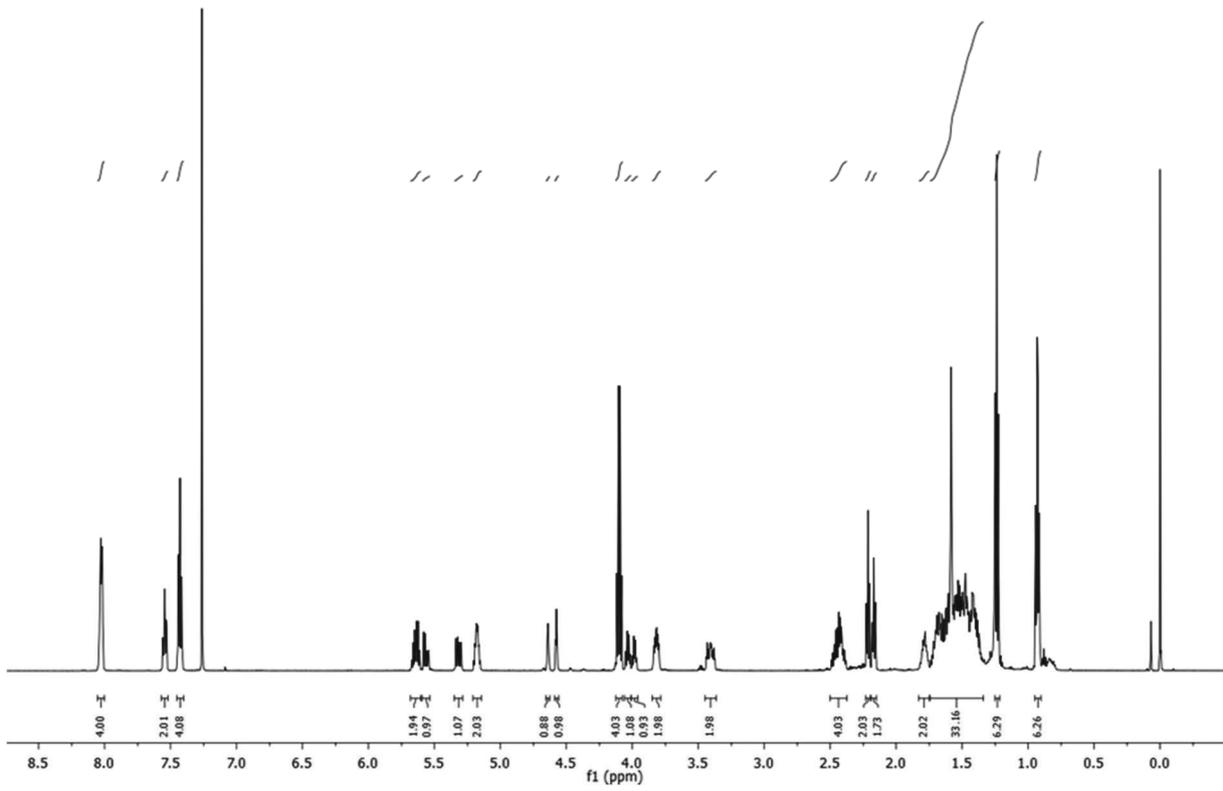


Abbildung 162:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von (5S,6E,9S)-70 in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

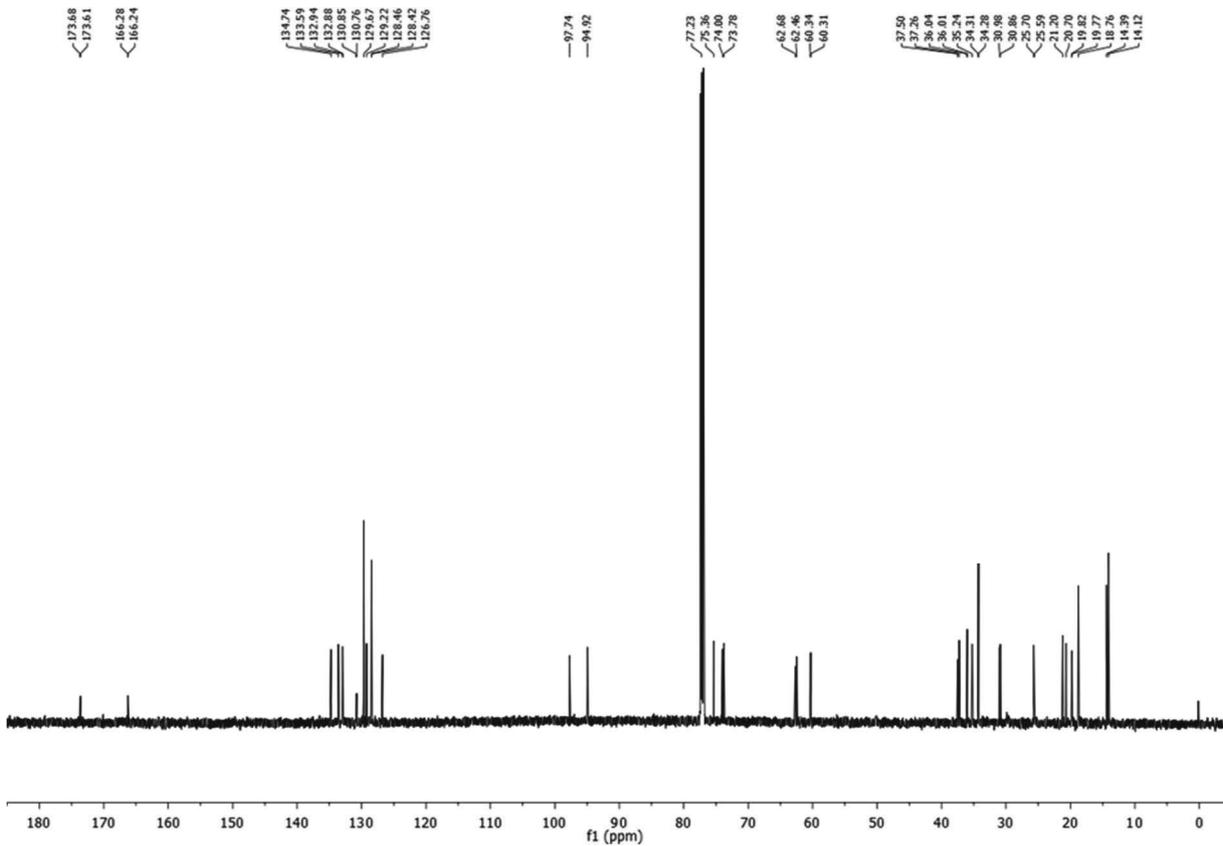


Abbildung 163:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von (5S,6E,9S)-70 in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

Anhang

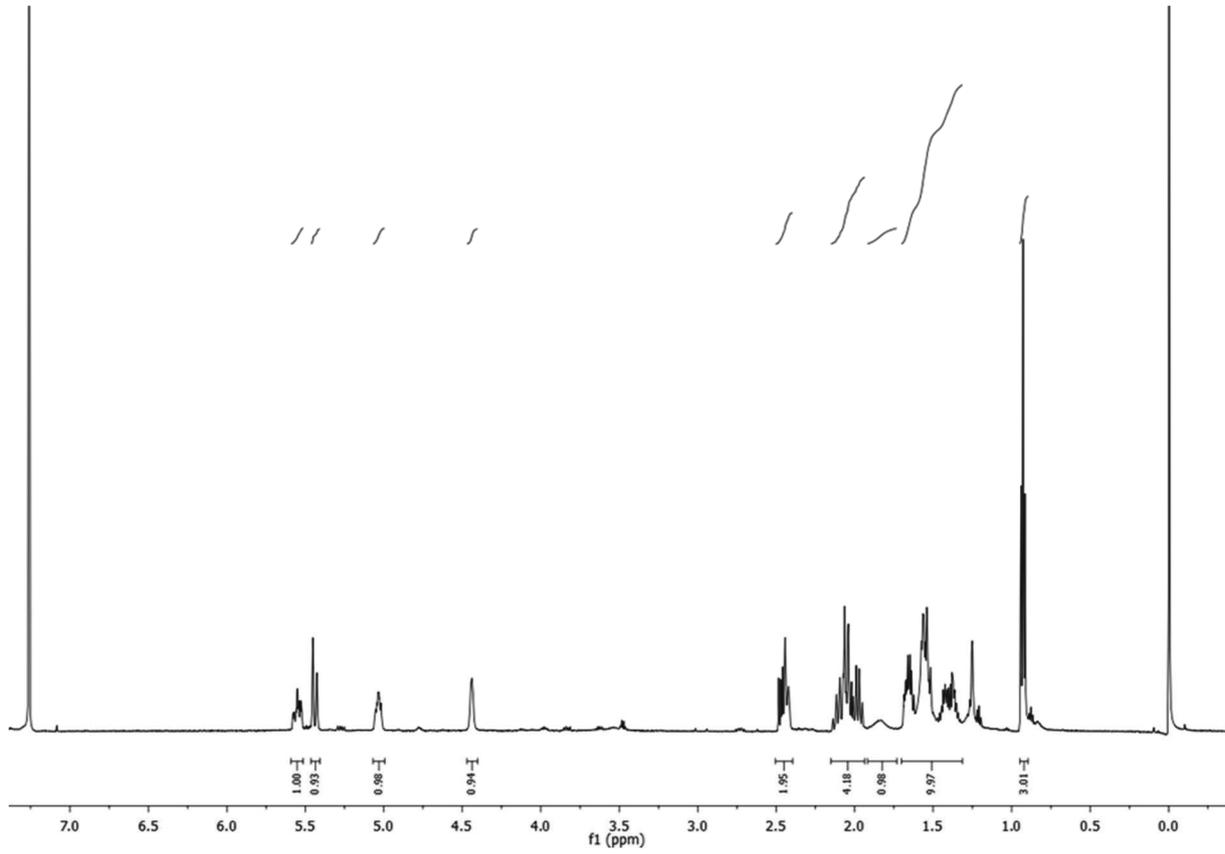


Abbildung 164: <sup>1</sup>H NMR-Spektrum von (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** in CDCl<sub>3</sub> bei 600 MHz.

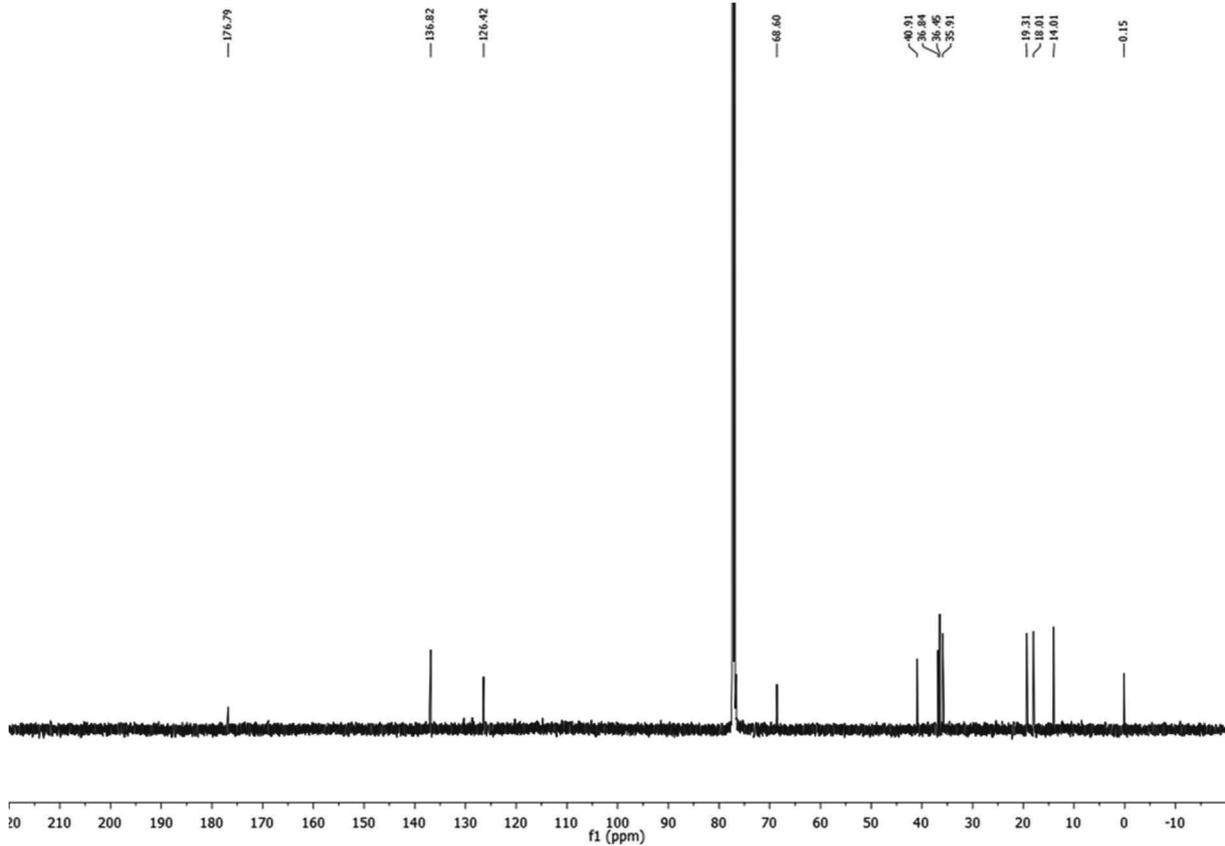


Abbildung 165: <sup>13</sup>C NMR-Spektrum von (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** in CDCl<sub>3</sub> bei 151 MHz.

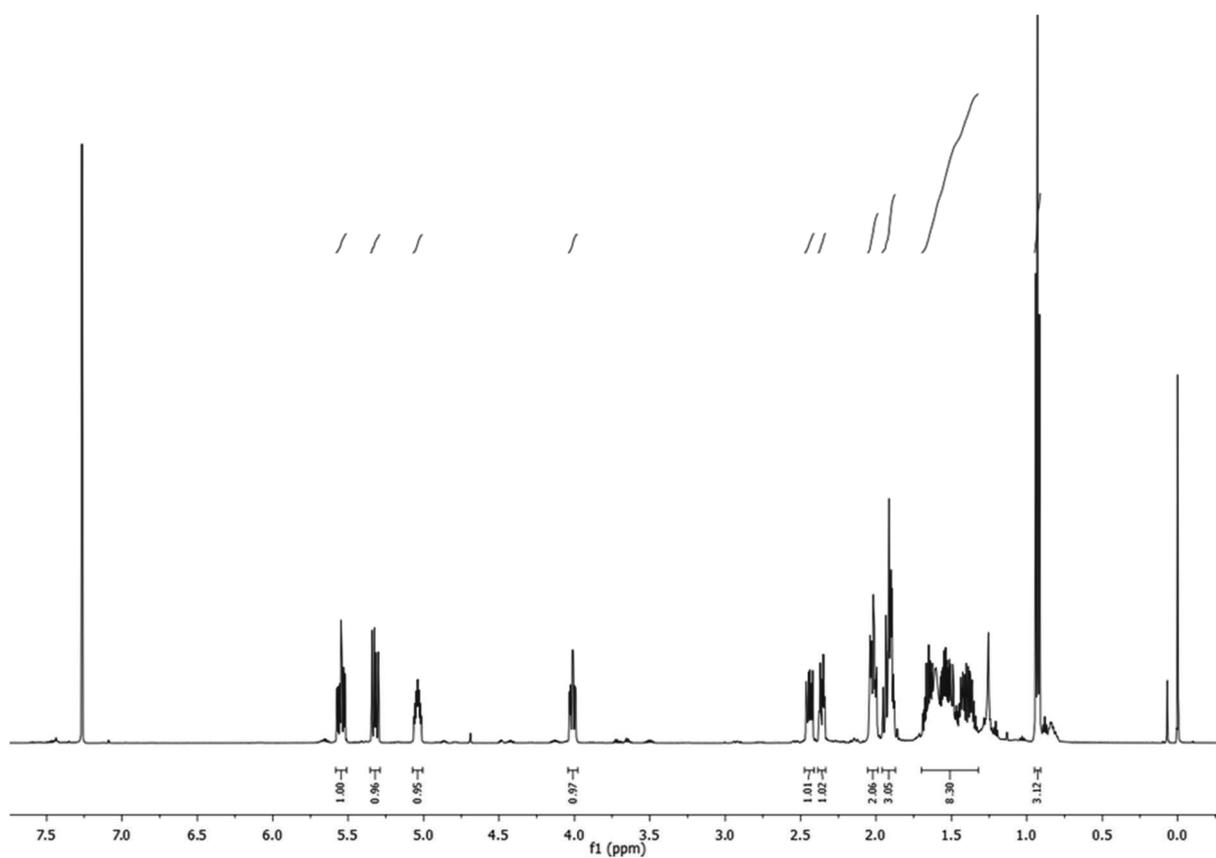


Abbildung 166:  $^1\text{H}$  NMR-Spektrum von (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** in  $\text{CDCl}_3$  bei 600 MHz.

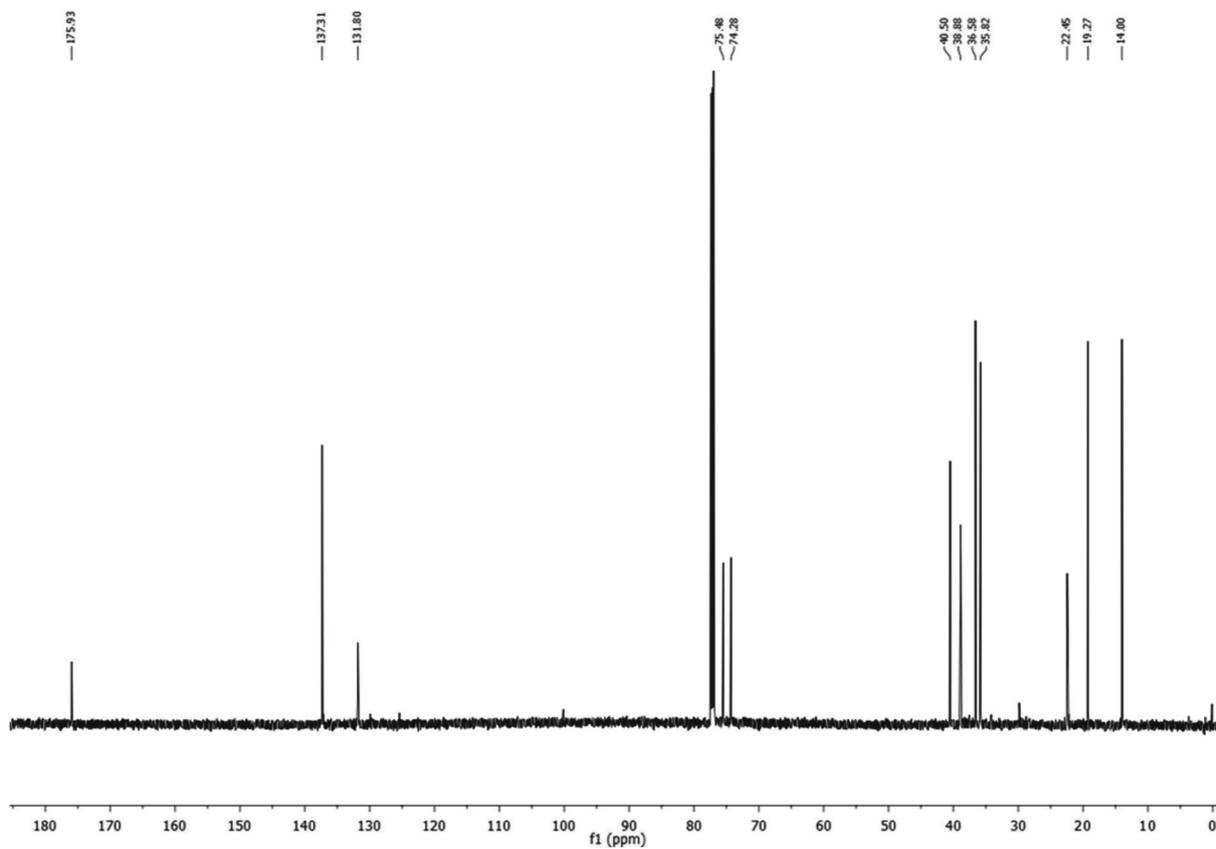
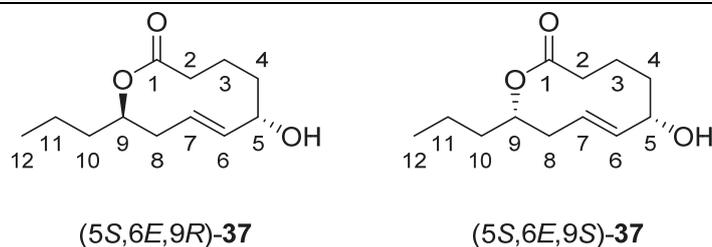


Abbildung 167:  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektrum von (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** in  $\text{CDCl}_3$  bei 151 MHz.

## 8.4 NMR-Vergleich publizierter Nonenolide

**Tabelle 34:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR Verschiebungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** und (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** mit jenen bereits isolierter und synthetisierter Nonenolide von **37**. Relevante Signale wurden farbig hervorgehoben (grün = passt zu (5*S*,6*E*,9*R*)-**37**, rot = passt zu (5*S*,6*E*,9*S*)-**37**).

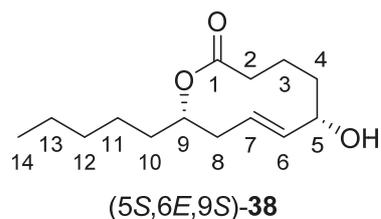
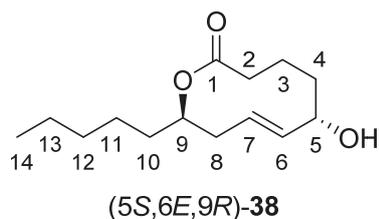
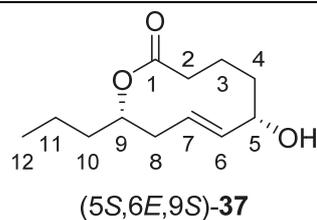
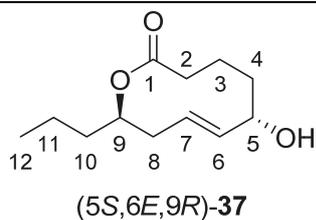


Verbindung	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )- <b>37</b>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )- <b>37</b>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )- <b>37</b>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )- <b>37</b>	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )- <b>37</b>
Autor	diese Arbeit	Evidente <sup>[264]</sup>	Sabitha <sup>[265]</sup>	Yadav <sup>[282],a</sup>	diese Arbeit
C-1	176.8	175.8	175.6	175.7	175.9
C-2	35.9	35.6	35.7	35.7	35.8
C-3	18.0	22.2	22.3	22.3	22.5
C-4	36.8	38.7	38.7	38.7	38.9
C-5	68.6	74.0	74.1	74.2	74.3
C-6	136.8	137.2	137.1	137.2	137.3
C-7	126.4	131.5	131.7	131.7	131.8
C-8	40.9	40.3	40.4	40.3	40.5
C-9	76.6	75.3	75.3	75.4	75.5
C-10	36.5	36.3	36.4	36.4	36.6
C-11	19.3	19.1	19.1	19.2	19.3
C-12	14	13.8	13.9	13.9	14.0

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  NMR Signale wurden in der Publikation nicht zugeteilt. Diese wurden deshalb anhand eines Abgleiches mit den Daten von Evidente *et al.* und Sabitha *et al.* eigenhändig zugeteilt.<sup>[264, 265]</sup>

## Anhang

**Tabelle 35:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR Verschiebungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen ( $(5S,6E,9R)$ -**37** und  $(5S,6E,9S)$ -**37** mit jenen bereits isolierter und synthetisierter Nonenolide von **38**. Relevante Signale wurden farbig hervorgehoben. Grün = passt zu  $(5S,6E,9R)$ -**37**, Rot = passt zu  $(5S,6E,9S)$ -**37**.



Verbindung	$(5S,6E,9R)$ - <b>37</b>	$(5S,6E,9S)$ - <b>37</b>	$(5S,6E,9R)$ - <b>38</b>	$(5S,6E,9S)$ - <b>38</b>	$(5S,6E,9?)$ - <b>38</b>
Autor	Diese Arbeit	Diese Arbeit	Bisterfeld <sup>[285]</sup>	Bisterfeld <sup>[285]</sup>	Evidente <sup>[266, 267]</sup>
C-1	176.8	175.9	176.7	176.0	172.5
C-2	35.9	35.8	35.7	35.7	32.6
C-3	18.0	22.5	17.8	21.9	23.2
C-4	36.8	38.9	36.6	38.8	34.3
C-5	68.6	74.3	68.4	74.1	71.5
C-6	136.8	137.3	136.6	137.1	135.5
C-7	126.4	131.8	126.3	131.7	130.0
C-8	40.9	40.5	40.8	40.4	39.0
C-9	76.6	75.5	76.8	75.7	73.1
C-10	36.5	36.6	34.2	34.3	37.2
C-11	19.3	19.3	25.6	25.6	24.0
C-12	14.0	14	31.6	31.6	30.0
C-13			22.7	22.7	18.8
C-14			14.1	14.1	13.9

## Anhang

**Tabelle 36:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR Verschiebungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen ( $(5S,6E,9R)$ -**37** und  $(5S,6E,9S)$ -**37** mit jenen bereits isolierter und synthetisierter Nonenolide von **39**. Relevante Signale wurden farbig hervorgehoben. Grün = passt zu  $(5S,6E,9R)$ -**37**, Rot = passt zu  $(5S,6E,9S)$ -**37**.

Verbindung	$(5S,6E,9R)$ - <b>37</b>	$(5S,6E,9S)$ - <b>37</b>	$(5S,6E,9R)$ - <b>39</b>
Autor	Diese Arbeit	Diese Arbeit	Götz <sup>[277]</sup>
C-1	176.8	175.9	176.6
C-2	35.9	35.8	35.9
C-3	18.0	22.5	18.0
C-4	36.8	38.9	36.8
C-5	68.6	74.3	68.6
C-6	136.8	137.3	136.8
C-7	126.4	131.8	126.5
C-8	40.9	40.5	40.9
C-9	76.6	75.5	76.9
C-10	36.5	36.6	34.4
C-11	19.3	19.3	26.1
C-12	14.0	14.0	29.5
C-13			29.3
C-14			31.9
C-15			22.8
C-16			14.2

## Anhang

**Tabelle 37:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR Verschiebungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen (5*S*,6*E*,9*R*)-**37** und (5*S*,6*E*,9*S*)-**37** mit jenen bereits isolierter und synthetisierter Nonenolide von **41**. Relevante Signale wurden farbig hervorgehoben. Grün = passt zu (5*S*,6*E*,9*R*)-**37**, Rot = passt zu (5*S*,6*E*,9*S*)-**37**.

Verbin- dung	(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )- <b>37</b>		(5 <i>S</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>S</i> )- <b>37</b>		(5 <i>R</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> )- <b>41</b>		
	Autor	Diese Arbeit	Diese Arbeit	Fuchser <sup>[269]</sup>	Chowdhury <sup>[275],a</sup>	Shelke <sup>[281],a</sup>	Sabitha [279],a
C-1		176.8	175.9	175.5	174.6	176.5	176.6
C-2		35.9	35.8	35.6	35.5	35.5	35.6
C-3		18.0	22.5	22.3	22.9	22.3	22.3
C-4		36.8	38.9	38.7	38.7	38.6	38.7
C-5		68.6	74.3	74.1	74.4	74.6	74.1
C-6		136.8	137.3	137.1	137.2	137.4	137.1
C-7		126.4	131.8	131.8	131.5	131.7	131.8
C-8		40.9	40.5	42.1	42.0	42.1	42.1
C-9		76.6	75.5	71.6	71.6	71.8	71.7
C-10		36.5	36.6	19.8	19.1	19.7	19.8
C-11		19.3	19.3				
C-12		14.0	14.0				

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  NMR Signale wurden in der Publikation nicht zugeteilt. Diese wurden deshalb anhand eines Abgleiches mit den Daten von Evidente *et al.* und Sabitha *et al.* eigenhändig zugeteilt.<sup>[264, 265]</sup>

## Anhang

**Tabelle 38:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$  NMR Verschiebungen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen ( $(5S,6E,9R)$ -**37** und  $(5S,6E,9S)$ -**37** mit jenen bereits isolierter und synthetisierter Nonenolide von **40**. Relevante Signale wurden farbig hervorgehoben. Grün = passt zu  $(5S,6E,9R)$ -**37**, Rot = passt zu  $(5S,6E,9S)$ -**37**.

Verbin- dung	$(5S,6E,9R)$ - <b>37</b>	$(5S,6E,9S)$ - <b>37</b>	$(5S,6E,9R)$ - <b>40</b>			
Autor	Diese Arbeit	Diese Arbeit	Evidente [272]	Shelke [281],a	Perepogu <sup>[276],a</sup>	Chinnababu <sup>[283],a</sup>
C-1	176.8	175.9	174.8	173.0	174.8	175.1
C-2	35.9	35.8	32.1	35.8	30.0	32.5
C-3	18.0	22.5	31.5	29.6	31.5	31.4
C-4	36.8	38.9	34.3	34.5	34.3	34.6
C-5	68.6	74.3	71.8	73.6	71.6	71.5
C-6	136.8	137.3	134.5	134.2	134.2	135.6
C-7	126.4	131.8	131.3	133.6	131.3	131.2
C-8	40.9	40.5	35.0	42.1	35.0	35.3
C-9	76.6	75.5	75.4	74.8	75.4	74.9
C-10	36.5	36.6	21.7	20.8	21.3	21.8
C-11	19.3	19.3				
C-12	14.0	14.0				

<sup>a</sup>  $^{13}\text{C}$  NMR Signale wurden in der Publikation nicht zugeteilt. Diese wurden deshalb anhand eines Abgleiches mit den Daten von Evidente *et al.* und Sabitha *et al.* eigenhändig zugeteilt.<sup>[264, 265]</sup>

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] R. A. Sheldon, P. C. Pereira, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678-2691; 'Biocatalysis engineering: the big picture'.
- [2] R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088-6104; 'The limits to biocatalysis: pushing the envelope'.
- [3] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185; 'Engineering the third wave of biocatalysis'.
- [4] D. A. Estell, T. P. Graycar, J. A. Wells, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 6518-6521; 'Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation'.
- [5] T. Nagasawa, T. Nakamura, H. Yamada, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *34*, 322-324; 'Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase'.
- [6] K. Chen, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5618-5622; 'Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide'.
- [7] F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125-131; 'Design by Directed Evolution'.
- [8] C. Zeymer, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 131-157; 'Directed Evolution of Protein Catalysts'.
- [9] M. T. Reetz, K.-E. Jaeger, *Chem.: Eur. J.* **2000**, *6*, 407-412; 'Enantioselective Enzymes for Organic Synthesis Created by Directed Evolution'.
- [10] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-143; 'Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design'.
- [11] T. S. Wong, D. Zhurina, U. Schwaneberg, *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **2006**, *9*, 271-288; 'The diversity challenge in directed protein evolution'.
- [12] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, R. Lohmer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1797-1804; 'Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution'.
- [13] M. T. Reetz, *Chem Rec* **2016**, *16*, 2449-2459; 'What are the Limitations of Enzymes in Synthetic Organic Chemistry?'.
- [14] A. Wells, H.-P. Meyer, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 918-920; 'Biocatalysis as a Strategic Green Technology for the Chemical Industry'.
- [15] P. S. Coelho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, *Science* **2013**, *339*, 307-310; 'Olefin Cyclopropanation via Carbene Transfer Catalyzed by Engineered Cytochrome P450 Enzymes'.
- [16] U. T. Bornscheuer, *Philos. Trans. Royal Soc. A* **2018**, *376*; 'The fourth wave of biocatalysis is approaching'.
- [17] E. C. Webb, *Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*, Academic Press, **1992**.
- [18] L. Sellés Vidal, C. L. Kelly, P. M. Mordaka, J. T. Heap, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2018**, *1866*, 327-347; 'Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application'.
- [19] G. Gygli, W. J.H. van Berkel, *Curr. Biotechnol.* **2015**, *4*, 100-110; 'Oxizymes for Biotechnology'.
- [20] J. Dong, E. Fernández-Fueyo, F. Hollmann, C. E. Paul, M. Pesic, S. Schmidt, Y. Wang, S. Younes, W. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 9238-9261; 'Biocatalytic Oxidation Reactions: A Chemist's Perspective'.
- [21] A. T. Martínez, F. J. Ruiz-Dueñas, S. Camarero, A. Serrano, D. Linde, H. Lund, J. Vind, M. Tovborg, O. M. Herold-Majumdar, M. Hofrichter, C. Liers, R. Ullrich, K. Scheibner, G. Sannia, A. Piscitelli, C. Pezzella, M. E. Sener, S. Kiliç, W. J. H. van Berkel, V. Guallar, M. F. Lucas, R. Zuhse, R. Ludwig, F. Hollmann, E. Fernández-Fueyo, E. Record, C. B. Faulds, M. Tortajada, I. Winkelmann, J.-A. Rasmussen, M. Gelo-Pujic, A. Gutiérrez, J. C. del Río, J. Rencoret, M. Alcalde, *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 815-831; 'Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations'.
- [22] P. Domínguez de María, F. Hollmann, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*; 'On the (Un)greenness of Biocatalysis: Some Challenging Figures and Some Promising Options'.

- [23] J. H. Clark, *Green Chem.* **1999**, *1*, 1-8; 'Green chemistry: challenges and opportunities'.
- [24] R. A. Sheldon, *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1233-1246; 'Atom efficiency and catalysis in organic synthesis'.
- [25] M. Hönig, P. Sondermann, N. J. Turner, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8942-8973; 'Enantioselective Chemo- and Biocatalysis: Partners in Retrosynthesis'.
- [26] R. Agudo, G.-D. Roiban, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1465-1473; 'Achieving Regio- and Enantioselectivity of P450-Catalyzed Oxidative CH Activation of Small Functionalized Molecules by Structure-Guided Directed Evolution'.
- [27] J. Basch, S.-J. Chiang, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *34*, 171-176; 'Cloning and expression of a cytochrome P450 hydroxylase gene from *Amycolatopsis orientalis*: hydroxylation of epothilone B for the production of epothilone F'.
- [28] M. Kolomytseva, N. Myasoedova, A. Samoilova, E. Podieablonskaia, A. Chernykh, T. Classen, J. Pietruszka, L. Golovleva, *Process Biochem.* **2017**, *62*, 174-183; 'Rapid identification of fungal laccases/oxidases with different pH-optimum'.
- [29] C. M. Rivera-Hoyos, E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Piñales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vázquez, J. M. Delgado-Boada, *Fungal Biol. Rev.* **2013**, *27*, 67-82; 'Fungal laccases'.
- [30] H. Claus, *Micron* **2004**, *35*, 93-96; 'Laccases: structure, reactions, distribution'.
- [31] P. Baldrian, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 215-242; 'Fungal laccases – occurrence and properties'.
- [32] S. Rodríguez Couto, J. L. Toca Herrera, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 500-513; 'Industrial and biotechnological applications of laccases: A review'.
- [33] Shraddha, R. Shekher, S. Sehgal, M. Kamthania, A. Kumar, *Enzyme Research* **2011**, *2011*, 11; 'Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications'.
- [34] S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226; 'Laccases: blue enzymes for green chemistry'.
- [35] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187-1209; 'Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry'.
- [36] M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 897-927; 'Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds'.
- [37] M. D. Cannatelli, A. J. Ragauskas, *Chem. Rec.* **2017**, *17*, 122-140; 'Two Decades of Laccases: Advancing Sustainability in the Chemical Industry'.
- [38] N. Hakulinen, J. Rouvinen, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 857-868; 'Three-dimensional structures of laccases'.
- [39] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37663-37669; 'Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers'.
- [40] M. Gunne, A. Höppner, P.-L. Hagedoorn, V. B. Urlacher, *The FEBS Journal* **2014**, *281*, 4307-4318; 'Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*'.
- [41] P. M. Colman, H. C. Freeman, J. M. Guss, M. Murata, V. A. Norris, J. A. M. Ramshaw, M. P. Venkatappa, *Nature* **1978**, *272*, 319; 'X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution'.
- [42] E. T. Adman, R. E. Stenkamp, L. C. Sieker, L. H. Jensen, *J. Mol. Biol.* **1978**, *123*, 35-47; 'A crystallographic model for azurin at 3 Å resolution'.
- [43] T. Skálová, J. Dohnálek, L. H. Østergaard, P. R. Østergaard, P. Kolenko, J. Dušková, A. Štěpánková, J. Hašek, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1165-1178; 'The Structure of the Small Laccase from *Streptomyces coelicolor* Reveals a Link between Laccases and Nitrite Reductases'.
- [44] H. Komori, K. Miyazaki, Y. Higuchi, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1189-1195; 'X-ray structure of a two-domain type laccase: A missing link in the evolution of multi-copper proteins'.
- [45] T. J. Lawton, L. A. Sayavedra-Soto, D. J. Arp, A. C. Rosenzweig, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10174-10180; 'Crystal Structure of a Two-domain Multicopper Oxidase: Implications for the evolution of multicopper blue proteins'.
- [46] M. Gunne, V. B. Urlacher, *PLoS One* **2012**, *7*, e52360; 'Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with unusual properties discovered by genome mining'.

- [47] K. Nakamura, T. Kawabata, K. Yura, N. Go, *FEBS Lett.* **2003**, *553*, 239-244; 'Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution'.
- [48] S. V. S. Kumar, P. S. Phale, S. Durani, P. P. Wangikar, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 386-394; 'Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family'.
- [49] P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 369-385; 'Laccases: a never-ending story'.
- [50] E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563-2606; 'Multicopper Oxidases and Oxygenases'.
- [51] P. Durão, I. Bento, A. T. Fernandes, E. P. Melo, P. F. Lindley, L. O. Martins, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 514; 'Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies'.
- [52] T. Bertrand, C. Jolival, P. Briozzo, E. Caminade, N. Joly, C. Madzak, C. Mougín, *Biochemistry* **2002**, *41*, 7325-7333; 'Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics'.
- [53] E. I. Solomon, A. J. Augustine, J. Yoon, *Dalton Trans.* **2008**, 3921-3932; 'O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases'.
- [54] F. Carunchio, C. Crescenzi, A. M. Girelli, A. Messina, A. M. Tarola, *Talanta* **2001**, *55*, 189-200; 'Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides'.
- [55] J.-Y. Pan, S.-L. Chen, M.-H. Yang, J. Wu, J. Sinkkonen, K. Zou, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1251-1292; 'An update on lignans: natural products and synthesis'.
- [56] J. M. Landete, *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 410-424; 'Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health'.
- [57] S. Tranchimand, T. Tron, C. Gaudin, G. Iacazio, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *42*, 27-31; 'Synthesis of bis-lactone lignans through laccase catalysis'.
- [58] R. D. Haworth, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1942**, 448-456; 'The chemistry of the lignan group of natural products'.
- [59] W. D. MacRae, G. H. N. Towers, *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1207-1220; 'Biological activities of lignans'.
- [60] M. Saleem, H. J. Kim, M. S. Ali, Y. S. Lee, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 696-716; 'An update on bioactive plant lignans'.
- [61] K. Lacki, Z. Duvnjak, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 694-703; 'Transformation of 3,5-dimethoxy,4-hydroxy cinnamic acid by polyphenol oxidase from the fungus *Trametes versicolor*: Product elucidation studies'.
- [62] L. P. Meagher, G. R. Beecher, V. P. Flanagan, B. W. Li, *J. Agric. Food. Chem.* **1999**, *47*, 3173-3180; 'Isolation and Characterization of the Lignans, Isolariciresinol and Pinoresinol, in Flaxseed Meal'.
- [63] D. Enders, M. Milovanovic, E. Voloshina, G. Raabe, J. Fleischhauer, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005*, 1984-1990; 'First Asymmetric Synthesis and Determination of the Absolute Configuration of a Lignan Isolated from *Virola sebifera*'.
- [64] A. K. F. Albertson, J.-P. Lumb, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2204-2208; 'A Bio-Inspired Total Synthesis of Tetrahydrofuran Lignans'.
- [65] E. Ricklefs, M. Girhard, K. Koschorreck, M. S. Smit, V. B. Urlacher, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1857-1864; 'Two-Step One-Pot Synthesis of Pinoresinol from Eugenol in an Enzymatic Cascade'.
- [66] F. Xu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 924-928; 'Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases'.
- [67] B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202-204; 'An Enantiocomplementary Dirigent Protein for the Enantioselective Laccase-Catalyzed Oxidative Coupling of Phenols'.
- [68] J. Aschenbrenner, P. Marx, J. Pietruszka, J. Marienhagen, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 949-954; 'Microbial Production of Natural and Unnatural Monolignols with *Escherichia coli*'.
- [69] D. M. Mate, M. Alcalde, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 25-40; 'Laccase engineering: From rational design to directed evolution'.

- [70] L. Lu, T.-N. Wang, T.-F. Xu, J.-Y. Wang, C.-L. Wang, M. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2013**, *134*, 81-86; 'Cloning and expression of thermo-alkali-stable laccase of *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris* and its characterization'.
- [71] 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'.
- [72] M. C. Machczynski, E. Vijgenboom, B. Samyn, G. W. Canters, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 2388-2397; 'Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity'.
- [73] K. N. Niladevi, N. Jacob, P. Prema, *Process Biochem.* **2008**, *43*, 654-660; 'Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: Purification and characterization'.
- [74] Q. Weihua, C. Hongzhang, *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5480-5484; 'An alkali-stable enzyme with laccase activity from entophytic fungus and the enzymatic modification of alkali lignin'.
- [75] L. Lu, M. Zhao, T.-N. Wang, L.-Y. Zhao, M.-H. Du, T.-L. Li, D.-B. Li, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 35-40; 'Characterization and dye decolorization ability of an alkaline resistant and organic solvents tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* LS04'.
- [76] P. Torres-Salas, D. M. Mate, I. Ghazi, F. J. Plou, A. O. Ballesteros, M. Alcalde, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 934-937; 'Widening the pH Activity Profile of a Fungal Laccase by Directed Evolution'.
- [77] D. Daâssi, H. Zouari-Mechichi, A. Prieto, M. J. Martínez, M. Nasri, T. Mechichi, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 2145-2155; 'Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes sp.* isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill waste water treatment'.
- [78] C.-Y. Chen, Y.-C. Huang, C.-M. Wei, M. Meng, W.-H. Liu, C.-H. Yang, *AMB Express* **2013**, *3*, 49; 'Properties of the newly isolated extracellular thermo-alkali-stable laccase from thermophilic actinomycetes, *Thermobifida fusca* and its application in dye intermediates oxidation'.
- [79] S. Brander, J. D. Mikkelsen, K. P. Kepp, *PLOS ONE* **2014**, *9*, e99402; 'Characterization of an Alkali- and Halide-Resistant Laccase Expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*'.
- [80] S. Scheiblbrandner, E. Breslmayr, F. Csarman, R. Paukner, J. Führer, P. L. Herzog, S. V. Shleev, E. M. Osipov, T. V. Tikhonova, V. O. Popov, D. Haltrich, R. Ludwig, R. Kittl, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13688; 'Evolving stability and pH-dependent activity of the high redox potential *Botrytis aclada* laccase for enzymatic fuel cells'.
- [81] U. L. Rosewich, R. E. Pettway, B. A. McDonald, H. Kistler, *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *28*, 148-159; 'High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas'.
- [82] A. Zheng, R. Lin, D. Zhang, P. Qin, L. Xu, P. Ai, L. Ding, Y. Wang, Y. Chen, Y. Liu, Z. Sun, H. Feng, X. Liang, R. Fu, C. Tang, Q. Li, J. Zhang, Z. Xie, Q. Deng, S. Li, S. Wang, J. Zhu, L. Wang, H. Liu, P. Li, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1424; 'The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen'.
- [83] D. Wibberg, L. Andersson, G. Tzelepis, O. Rupp, J. Blom, L. Jelonek, A. Pühler, J. Fogelqvist, M. Varrelmann, A. Schlüter, C. Dixelius, *BMC Genomics* **2016**, *17*, 245; 'Genome analysis of the sugar beet pathogen *Rhizoctonia solani* AG2-2IIIB revealed high numbers in secreted proteins and cell wall degrading enzymes'.
- [84] V. U. Patil, V. Girimalla, V. Sagar, V. Bhardwaj, S. K. Chakrabarti, *Am. J. Potato Res.* **2018**, *95*, 87-91; 'Draft Genome Sequencing of *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 3 (AG3- PT) Causing Stem Canker and Black Scurf of Potato'.
- [85] J. D. Crowe, S. Olsson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2088-2094; 'Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments'.
- [86] P. Bora, Dissertation thesis, Murdoch University **2003**, Production of laccase by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*.
- [87] J.-M. Bollag, R. D. Sjöblad, S.-Y. Liu, *Can. J. Microbiol.* **1979**, *25*, 229-233; 'Characterization of an enzyme from *Rhizoctonia praticola* which polymerizes phenolic compounds'.

- [88] J. A. Wahleithner, B. E. Christensen, P. Schneider, **1996**, Purified PH neutral *Rhizoctonia* laccases and nucleic acids encoding same, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark,
- [89] J. A. Wahleithner, F. Xu, K. M. Brown, S. H. Brown, E. J. Golightly, T. Halkier, S. Kauppinen, A. Pederson, P. Schneider, *Curr. Genet.* **1996**, *29*, 395-403; 'The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*'.
- [90] B. Branchi, C. Galli, P. Gentili, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2604-2614; 'Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox'.
- [91] L. G. Rydén, L. T. Hunt, *J. Mol. Evol.* **1993**, *36*, 41-66; 'Evolution of protein complexity: The blue copper-containing oxidases and related proteins'.
- [92] C. J. Rodgers, C. F. Blanford, S. R. Giddens, P. Skamnioti, F. A. Armstrong, S. J. Gurr, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 63-72; 'Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?'.
- [93] M. A. Cubeta, E. Thomas, R. A. Dean, S. Jabaji, S. M. Neate, S. Tavantzis, T. Toda, R. Vilgalys, N. Bharathan, N. Fedorova-Abrams, S. B. Pakala, S. M. Pakala, N. Zafar, V. Joardar, L. Losada, W. C. Nierman, *Genome Accounc.* **2014**, *2*, e01072-01014; 'Draft Genome Sequence of the Plant-Pathogenic Soil Fungus *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 3 Strain Rhs1AP'.
- [94] C. Robinson, A. Bolhuis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2004**, *1694*, 135-147; 'Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts'.
- [95] A. Piscitelli, C. Pezzella, P. Giardina, V. Faraco, G. Sannia, *Bioeng. Bugs* **2010**, *1*, 252-262; 'Heterologous laccase production and its role in industrial applications'.
- [96] Salony, N. Garg, R. Baranwal, M. Chhabra, S. Mishra, T. K. Chaudhuri, V. S. Bisaria, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2008**, *1784*, 259-268; 'Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*'.
- [97] K. Zelena, N. Eisele, R. G. Berger, *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1382-1395; '*Escherichia coli* as a production host for novel enzymes from basidiomycota'.
- [98] D. M. Francis, R. Page, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2010**, *61*, 5.24.21-25.24.29; 'Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*'.
- [99] G. Schmidt, U. Krings, M. Nimtz, R. G. Berger, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 1623-1632; 'A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*'.
- [100] C. Nicolini, D. Bruzzese, M. T. Cambria, N. L. Bragazzi, E. Pechkova, *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 599-605; 'Recombinant Laccase: I. Enzyme cloning and characterization'.
- [101] S. Ma, N. Liu, H. Jia, D. Dai, J. Zang, Z. Cao, J. Dong, *J. Basic Microbiol.* **2018**, *58*, 68-75; 'Expression, purification, and characterization of a novel laccase from *Setosphaeria turcica* in *Escherichia coli*'.
- [102] S. B. Needleman, C. D. Wunsch, *J. Mol. Biol.* **1970**, *48*, 443-453; 'A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins'.
- [103] C. Muñoz, F. Guillén, A. T. Martínez, M. J. Martínez, *Current Microbiology* **1997**, *34*, 1-5; 'Induction and Characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*'.
- [104] R. Tinoco, A. Acevedo, E. Galindo, L. Serrano-Carreón, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 531-540; 'Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction'.
- [105] K. Kashiwagi, Y. Isogai, K.-I. Nishiguchi, K. Shiba, *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 135-140; 'Frame shuffling: a novel method for in vitro protein evolution'.
- [106] C. H. Schein, *Bio/Technology* **1989**, *7*, 1141-1149; 'Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria'.
- [107] M. Ferrer, T. N. Chernikova, M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, K. N. Timmis, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1266; 'Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures'.
- [108] B. R. Glick, *Biotechnol. Adv.* **1995**, *13*, 247-261; 'Metabolic load and heterologous gene expression'.
- [109] C. Khosla, J. E. Bailey, *Nature* **1988**, *331*, 633-635; 'Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli*'.

- [110] L. Belval, A. Marquette, P. Mestre, M.-C. Piron, G. Demangeat, D. Merdinoglu, J.-F. Chich, *Protein Expr. Purif.* **2015**, *109*, 29-34; 'A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express'.
- [111] J. F. Kane, D. L. Hartley, *Trends Biotechnol.* **1988**, *6*, 95-101; 'Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*'.
- [112] J.-P. Arié, M. Miot, N. Sassoon, J.-M. Betton, *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 427-437; 'Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*'.
- [113] M. Diener, B. Kopka, M. Pohl, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 142-152; 'Fusion of a Coiled-Coil Domain Facilitates the High-Level Production of Catalytically Active Enzyme Inclusion Bodies'.
- [114] U. Krauss, V. D. Jager, M. Diener, M. Pohl, K. E. Jaeger, *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 136-147; 'Catalytically-active inclusion bodies-Carrier-free protein immobilizates for application in biotechnology and biomedicine'.
- [115] H. Yamaguchi, M. Miyazaki, *Biomolecules* **2014**, *4*, 235; 'Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies'.
- [116] K. Tsumoto, D. Ejima, I. Kumagai, T. Arakawa, *Protein Expr. Purif.* **2003**, *28*, 1-8; 'Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies'.
- [117] L. F. Vallejo, U. Rinas, *Microb. Cell Fact.* **2004**, *3*, 11; 'Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins'.
- [118] D. L. Wilkinson, R. G. Harrison, *Nat. Biotechnol.* **1991**, *9*, 443-448; 'Predicting the Solubility of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*'.
- [119] G. D. Davis, C. Elisee, D. M. Newham, R. G. Harrison, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 382-388; 'New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*'.
- [120] D. Esposito, D. K. Chatterjee, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 353-358; 'Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags'.
- [121] C. V. Maina, P. D. Riggs, A. G. Grandea, B. E. Slatko, L. S. Moran, J. A. Tagliamonte, L. A. McReynolds, d. G. Chu, *Gene* **1988**, *74*, 365-373; 'An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein'.
- [122] D. Sachdev, J. M. Chirgwin, *Protein Expr. Purif.* **1998**, *12*, 122-132; 'Solubility of Proteins Isolated from Inclusion Bodies Is Enhanced by Fusion to Maltose-Binding Protein or Thioredoxin'.
- [123] R. B. Kapust, D. S. Waugh, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1668-1674; '*Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused'.
- [124] S. Nallamsetty, D. S. Waugh, *Protein Expr. Purif.* **2006**, *45*, 175-182; 'Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners'.
- [125] S. Raran-Kurussi, D. S. Waugh, *PLOS ONE* **2012**, *7*, e49589; 'The Ability to Enhance the Solubility of Its Fusion Partners Is an Intrinsic Property of Maltose-Binding Protein but Their Folding Is Either Spontaneous or Chaperone-Mediated'.
- [126] K. Hahn, K. Neumeister, A. Mix, T. Kottke, H. Gröger, G. Fischer von Mollard, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 1-12; 'Recombinant expression and characterization of a l-amino acid oxidase from the fungus *Rhizoctonia solani*'.
- [127] A. Brunelle, Y.-A. Bi, J. Lin, B. Russell, L. Luy, C. Berkman, J. Cashman, *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25*, 1001-1007; 'Characterization of Two Human Flavin-Containing Monooxygenase (Form 3) Enzymes Expressed in *Escherichia coli* as Maltose Binding Protein Fusions'.
- [128] T. Ferenci, U. Klotz, *FEBS Lett.* **1978**, *94*, 213-217; 'Affinity chromatographic isolation of the periplasmic maltose binding protein of *Escherichia coli*'.
- [129] P. Riggs, *Mol. Biotechnol.* **2000**, *15*, 51-63; 'Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein'.
- [130] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27; 'Protein glycosylation'.
- [131] C. Baker Brachmann, A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, J. D. Boeke, *Yeast* **1998**, *14*, 115-132; 'Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications'.

- [132] G. A. Bitter, K. K. Chen, A. R. Banks, P. H. Lai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, *81*, 5330-5334; 'Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by alpha-factor gene fusions'.
- [133] A. J. Brake, J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela, P. J. Barr, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, *81*, 4642-4646; 'Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [134] A. Idiris, H. Tohda, H. Kumagai, K. Takegawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 403-417; 'Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production'.
- [135] R. A. Smith, M. J. Duncan, D. T. Moir, *Science* **1985**, *229*, 1219-1224; 'Heterologous Protein Secretion from Yeast'.
- [136] D. Tielker, I. Eichhof, K. E. Jaeger, J. F. Ernst, *Eukaryot. Cell* **2009**, *8*, 913; 'Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Protein as an Oxygen-Independent Reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [137] P. M. Kusen, G. Wandrey, C. Probst, A. Grünberger, M. Holz, S. Meyer zu Berstenhorst, D. Kohlheyer, J. Büchs, J. Pietruszka, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2915-2922; 'Optogenetic Regulation of Tunable Gene Expression in Yeast Using Photo-Labile Caged Methionine'.
- [138] D. Mumberg, R. Müller, M. Funk, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5767-5768; 'Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression'.
- [139] J. S. Flick, M. Johnston, *Mol. Cell Biol.* **1990**, *10*, 4757-4769; 'Two systems of glucose repression of the *GAL1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [140] H. Hoshida, T. Fujita, K. Murata, K. Kubo, R. Akada, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2005**, *69*, 1090-1097; 'Copper-Dependent Production of a *Pycnoporus coccineus* Extracellular Laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [141] T. Suzuki, K. Endo, M. Ito, H. Tsujibo, K. Miyamoto, Y. Inamori, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2003**, *67*, 2167-2175; 'A Thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression'.
- [142] P. Cassland, L. J. Jönsson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 393-400; 'Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature'.
- [143] M. Binder, M. Schanz, A. Hartig, *Eur J Cell Biol* **1991**, *54*, 305-312; 'Vector-mediated overexpression of catalase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induces inclusion body formation'.
- [144] D. Porro, M. Sauer, P. Branduardi, D. Mattanovich, *Mol. Biotechnol.* **2005**, *31*, 245-259; 'Recombinant protein production in yeasts'.
- [145] O. Seitz, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 214-246; 'Glycopeptide Synthesis and the Effects of Glycosylation on Protein Structure and Activity'.
- [146] Y. Iimura, T. Sonoki, H. Habe, *Protein Expr. Purif.* **2018**, *141*, 39-43; 'Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [147] C. Tanford, in *Adv. Protein Chem.*, Vol. 23 (Eds.: C. B. Anfinsen, M. L. Anson, J. T. Edsall, F. M. Richards), Academic Press, **1968**, pp. 121-282.
- [148] T. Bulter, M. Alcalde, V. Sieber, P. Meinhold, C. Schlachtbauer, F. H. Arnold, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 987-995; 'Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution'.
- [149] G. Bleve, C. Lezzi, G. Mita, P. Rampino, C. Perrotta, L. Villanova, F. Grieco, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 731; 'Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells'.
- [150] S. Chahal, P. Wei, P. Moua, S. P. J. Park, J. Kwon, A. Patel, A. T. Vu, J. A. Catolico, Y. F. T. Tsai, N. Shaheen, T. T. Chu, V. Tam, Z.-E. H. Khan, H. H. Joo, L. Xue, J. Lin-Cereghino, J. W. Tsai, G. P. Lin-Cereghino, *Gene* **2017**, *598*, 50-62; 'Structural characterization of the  $\alpha$ -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*'.

- [151] S. Caplan, R. Green, J. Rocco, J. Kurjan, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 627-635; 'Glycosylation and structure of the yeast MF alpha 1 alpha-factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway'.
- [152] T. Kjeldsen, M. Hach, P. Balschmidt, S. Havelund, A. F. Pettersson, J. Markussen, *Protein Expr. Purif.* **1998**, *14*, 309-316; 'Prepro-Leaders Lacking N-Linked Glycosylation for Secretory Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [153] G. P. Lin-Cereghino, C. M. Stark, D. Kim, J. Chang, N. Shaheen, H. Poerwanto, K. Agari, P. Moua, L. K. Low, N. Tran, A. D. Huang, M. Nattestad, K. T. Oshiro, J. W. Chang, A. Chavan, J. W. Tsai, J. Lin-Cereghino, *Gene* **2013**, *519*, 311-317; 'The effect of  $\alpha$ -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*'.
- [154] J. J. Lichty, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, S. Tan, *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41*, 98-105; 'Comparison of affinity tags for protein purification'.
- [155] T. G. M. Schmidt, J. Koepke, R. Frank, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 753-766; 'Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin'.
- [156] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 523-533; 'Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems'.
- [157] T. G. M. Schmidt, A. Skerra, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1528; 'The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins'.
- [158] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Anal. Biochem.* **1988**, *171*, 1-32; 'The avidin-biotin complex in bioanalytical applications'.
- [159] T. G. M. Schmidt, L. Batz, L. Bonet, U. Carl, G. Holzapfel, K. Kiem, K. Matulewicz, D. Niermeier, I. Schuchardt, K. Stanar, *Protein Expr. Purif.* **2013**, *92*, 54-61; 'Development of the Twin-Strep-tag<sup>®</sup> and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants'.
- [160] L.-L. Kiiskinen, M. Saloheimo, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 137-144; 'Molecular Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a Laccase Gene from the Ascomycete *Melanocarpus albomyces*'.
- [161] P. M. Rudd, H. C. Joao, E. Coghill, P. Fiten, M. R. Saunders, G. Opendakker, R. A. Dwek, *Biochemistry* **1994**, *33*, 17-22; 'Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme'.
- [162] O. Letourneur, G. Gervasi, S. Gaïa, J. Pagès, B. Watelet, M. Jolivet, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2001**, *33*, 35-45; 'Characterization of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) secreted from *Pichia pastoris* : evidence of hyper O-glycosylation'.
- [163] H. Suzuki, T. Imaeda, T. Kitagawa, K. Kohda, *J. Biotechnol.* **2012**, *157*, 64-70; 'Deglycosylation of cellulosomal enzyme enhances cellulosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [164] C. L. Young, Z. T. Britton, A. S. Robinson, *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 620-634; 'Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications'.
- [165] D. S. Waugh, *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 316-320; 'Making the most of affinity tags'.
- [166] J. Tamayo-Ramos, W. J. van Berkel, L. H. de Graaff, *Microb. Cell Fact.* **2012**, *11*, 165; 'Biocatalytic potential of laccase-like multicopper oxidases from *Aspergillus niger*'.
- [167] K. Sreekrishna, R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J.-T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam, L. A. Birkenberger, *Gene* **1997**, *190*, 55-62; 'Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*'.
- [168] L. M. Damasceno, C.-J. Huang, C. A. Batt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 31-39; 'Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production'.
- [169] P. Cornelis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 450-454; 'Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments'.
- [170] J. H. Choi, S. Y. Lee, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 625-635; 'Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*'.
- [171] F. J. M. Mergulhão, D. K. Summers, G. A. Monteiro, *Biotechnol. Adv.* **2005**, *23*, 177-202; 'Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*'.

- [172] K. Talmadge, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1982**, *79*, 1830-1833; 'Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*'.
- [173] G. Sapriel, C. Wandersman, P. Delepelaire, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 80-88; 'The SecB Chaperone Is Bifunctional in *Serratia marcescens*: SecB Is Involved in the Sec Pathway and Required for HasA Secretion by the ABC Transporter'.
- [174] M. Sandkvist, M. Bagdasarian, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 505-511; 'Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria'.
- [175] B. E. Power, N. Ivancic, V. R. Harley, R. G. Webster, A. A. Kortt, R. A. Irving, P. J. Hudson, *Gene* **1992**, *113*, 95-99; 'High-level temperature-induced synthesis of an antibody VH-domain in *Escherichia coli* using the PelB secretion signal'.
- [176] J. K. Dhillon, P. D. Drew, A. J. R. Porter, *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *28*, 350-354; 'Bacterial surface display of an anti-pollutant antibody fragment'.
- [177] R. Xu, P. Du, J.-J. Fan, Q. Zhang, T.-P. Li, R.-B. Gan, *Protein Expr. Purif.* **2002**, *24*, 453-459; 'High-Level Expression and Secretion of Recombinant Mouse Endostatin by *Escherichia coli*'.
- [178] P. Natale, T. Brüser, A. J. M. Driessen, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778*, 1735-1756; 'Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms'.
- [179] W. B. Snyder, T. J. Silhavy, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 953; 'Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*'.
- [180] H. Hu, J. Gao, J. He, B. Yu, P. Zheng, Z. Huang, X. Mao, J. Yu, G. Han, D. Chen, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e58393; 'Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of a Keratinase Gene in *Pichia pastoris*'.
- [181] C. Gustafsson, S. Govindarajan, J. Minshull, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 346-353; 'Codon bias and heterologous protein expression'.
- [182] A. M. Lanza, K. A. Curran, L. G. Rey, H. S. Alper, *BMC Systems Biology* **2014**, *8*, 33; 'A condition-specific codon optimization approach for improved heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*'.
- [183] H. G. Menzella, *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*, 15; 'Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*'.
- [184] O. L. Gurvich, P. V. Baranov, R. F. Gesteland, J. F. Atkins, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 4023; 'Expression Levels Influence Ribosomal Frameshifting at the Tandem Rare Arginine Codons AGG\_AGG and AGA\_AGA in *Escherichia coli*'.
- [185] A. Fuglsang, *Protein Expr. Purif.* **2003**, *31*, 247-249; 'Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization'.
- [186] J. Tian, Y. Yan, Q. Yue, X. Liu, X. Chu, N. Wu, Y. Fan, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9926; 'Predicting synonymous codon usage and optimizing the heterologous gene for expression in *E. coli*'.
- [187] S. T. Jung, R. Lauchli, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 809-817; 'Cytochrome P450: taming a wild type enzyme'.
- [188] W. J. H. van Berkel, N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670-689; 'Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts'.
- [189] T. Omura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *266*, 690-698; 'Forty years of cytochrome P450'.
- [190] D. R. Nelson, *Hum. genomics* **2009**, *4*, 59-65; 'The cytochrome p450 homepage'.
- [191] W.-C. Huang, A. C. Westlake, J.-D. Maréchal, M. G. Joyce, P. C. Moody, G. C. Roberts, *J. Mol. Biol.* **2007**, *373*, 633-651; 'Filling a hole in cytochrome P450 BM3 improves substrate binding and catalytic efficiency'.
- [192] R. Bernhardt, V. B. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6185-6203; 'Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations'.
- [193] R. Bernhardt, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128-145; 'Cytochromes P450 as versatile biocatalysts'.
- [194] T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2379-2385; 'The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes II'.

- [195] A. W. Munro, S. Daff, J. R. Coggins, J. G. Lindsay, S. K. Chapman, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 403-409; 'Probing Electron Transfer in Flavocytochrome P-450 BM3 and Its Component Domains'.
- [196] A. W. Munro, D. G. Leys, K. J. McLean, K. R. Marshall, T. W. B. Ost, S. Daff, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, C. C. Moser, C. C. Page, P. L. Dutton, *Trends Biochem. Sci* **2002**, *27*, 250-257; 'P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome'.
- [197] D. Dickmann, Master thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2015**, Auf dem Weg zur Pinellinsäure: Ein chemoenzymatischer Ansatz.
- [198] M. A. Noble, C. S. Miles, S. K. Chapman, D. A. Lysek, A. C. Mackay, G. A. Reid, R. P. Hanzlik, A. W. Munro, *Biochem. J* **1999**, *339*, 371-379; 'Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450 BM3'.
- [199] A. Warman, O. Roitel, R. Neeli, H. Girvan, H. Seward, S. Murray, K. McLean, M. Joyce, H. Toogood, R. Holt, *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 747-753; 'Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme'.
- [200] C. J. Whitehouse, S. G. Bell, L. L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1218-1260; 'P450(BM3) (CYP102A1): connecting the dots'.
- [201] L. O. Narhi, A. J. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*; 'Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*'.
- [202] H. Y. Li, K. Darwish, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11909-11914; 'Characterization of recombinant *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 and its two functional domains'.
- [203] A. W. Munro, J. G. Lindsay, J. R. Coggins, S. M. Kelly, N. C. Price, *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 70-74; 'Structural and enzymological analysis of the interaction of isolated domains of cytochrome P-450 BM3'.
- [204] K. G. Ravichandran, S. S. Boddupalli, C. Hasermann, J. A. Peterson, J. Deisenhofer, *Science* **1993**, *261*, 731-736; 'Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's'.
- [205] H. Li, T. L. Poulos, *Acta Crystallogr. Sect. D.* **1995**, *51*, 21-32; 'Modeling protein-substrate interactions in the heme domain of cytochrome P450BM-3'.
- [206] D. C. Haines, D. R. Tomchick, M. Machius, J. A. Peterson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13456-13465; 'Pivotal Role of Water in the Mechanism of P450BM-3'.
- [207] H. Li, T. L. Poulos, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1997**, *4*, 140-146; 'The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid'.
- [208] I. F. Sevrioukova, H. Li, H. Zhang, J. A. Peterson, T. L. Poulos, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1863-1868; 'Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex'.
- [209] H. Yeom, S. G. Sligar, H. Li, T. L. Poulos, A. J. Fulco, *Biochemistry* **1995**, *34*, 14733-14740; 'The role of Thr268 in oxygen activation of cytochrome P450BM-3'.
- [210] C. J. C. Whitehouse, W. Yang, J. A. Yorke, B. C. Rowlett, A. J. F. Strong, C. F. Blanford, S. G. Bell, M. Bartlam, L.-L. Wong, Z. Rao *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2549-2556; 'Structural Basis for the Properties of Two Single-Site Proline Mutants of CYP102A1 (P450BM3)'.
- [211] M. G. Joyce, I. S. Ekanem, O. Roitel, A. J. Dunford, R. Neeli, H. M. Girvan, G. J. Baker, R. A. Curtis, A. W. Munro, D. Leys, *The FEBS Journal* **2012**, *279*, 1694-1706; 'The crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of flavocytochrome P450 BM3'.
- [212] Y. Miura, A. J. Fulco, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *388*, 305-317; ' $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 Hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*'.
- [213] S. S. Boddupalli, B. C. Pramanik, C. A. Slaughter, R. W. Estabrook, J. A. Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *292*, 20-28; 'Fatty acid monooxygenation by P450BM-3: Product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions'.
- [214] T. W. B. Ost, C. S. Miles, J. Murdoch, Y.-F. Cheung, G. A. Reid, S. K. Chapman, A. W. Munro, *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 173-177; 'Rational re-design of the substrate binding site of flavocytochrome P450 BM3'.

- [215] O. Lentz, Q.-S. Li, U. Schwaneberg, S. Lutz-Wahl, P. Fischer, R. D. Schmid, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 123-133; 'Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450 BM-3 from *Bacillus megaterium* by directed evolution: a validated assay'.
- [216] R. Fasan, M. M. Chen, N. C. Crook, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8566-8570; 'Engineered Alkane-Hydroxylating Cytochrome P450BM3 Exhibiting Nativelike Catalytic Properties'.
- [217] R. Fasan, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 647-666; 'Tuning P450 Enzymes as Oxidation Catalysts'.
- [218] K. Neufeld, B. Henßen, J. Pietruszka, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13469-13473; 'Enantioselektive allylische Hydroxylierung von  $\omega$ -Alkensäuren und -estern mittels der P450-BM3-Monooxygenase'.
- [219] M. L. Klein, A. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7553-7561; 'Critical residues involved in FMN binding and catalytic activity in cytochrome P450BM-3'.
- [220] R. Neeli, H. M. Girvan, A. Lawrence, M. J. Warren, D. Leys, N. S. Scrutton, A. W. Munro, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5582-5588; 'The dimeric form of flavocytochrome P450 BM3 is catalytically functional as a fatty acid hydroxylase'.
- [221] H. Zhang, A. L. Yokom, S. Cheng, M. Su, P. F. Hollenberg, D. R. Southworth, Y. Osawa, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 7727-7736; 'The full-length cytochrome P450 enzyme CYP102A1 dimerizes at its reductase domains and has flexible heme domains for efficient catalysis'.
- [222] M. Newcomb, R. Zhang, R. E. P. Chandrasena, J. A. Halgrimson, J. H. Horner, T. M. Makris, S. G. Sligar, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4580-4581; 'Cytochrome P450 compound I'.
- [223] J. Rittle, M. T. Green, *Science* **2010**, *330*, 933-937; 'Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and CH bond activation kinetics'.
- [224] I. G. Denisov, T. M. Makris, S. G. Sligar, I. Schlichting, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253-2278; 'Structure and chemistry of cytochrome P450'.
- [225] A. B. McQuarters, M. W. Wolf, A. P. Hunt, N. Lehnert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4750-4752; '1958–2014: After 56 Years of Research, Cytochrome P450 Reactivity Is Finally Explained'.
- [226] I. I. Karuzina, A. I. Archakov, *Free Radical Biol. Med.* **1994**, *16*, 73-97; 'The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions'.
- [227] P. J. Loida, S. G. Sligar, *Biochemistry* **1993**, *32*, 11530-11538; 'Molecular recognition in cytochrome P-450: mechanism for the control of uncoupling reactions'.
- [228] A. B. Carmichael, L. L. Wong, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3117-3125; 'Protein engineering of *Bacillus megaterium* CYP102'.
- [229] A. Lumbroso, M. L. Cooke, B. Breit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1890-1932; 'Catalytic Asymmetric Synthesis of Allylic Alcohols and Derivatives and their Applications in Organic Synthesis'.
- [230] M. Nakada, A. Nakamura, *Synthesis* **2013**, *45*, 1421-1451; 'Allylic Oxidations in Natural Product Synthesis'.
- [231] K. Neufeld, Dissertation thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2014**, Etablierung von P450 BM3 Monooxygenasen als chemo- und stereoselektive Biokatalysatoren für die organische Synthese.
- [232] K. C. Nicolaou, H. Li, A. L. Nold, D. Pappo, A. Lenzen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10356-10357; 'Total Synthesis of Kinamycins C, F, and J'.
- [233] S. C. Maurer, K. Kuhnle, L. A. Kaysser, S. Eiben, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1090-1098; 'Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants'.
- [234] A. Miura, S. Kuwahara, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3364-3368; 'A concise synthesis of pinellic acid using a cross-metathesis approach'.
- [235] D. Wahler, J.-L. Reymond, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1229-1232; 'The Adrenaline Test for Enzymes'.
- [236] V. S. Fluxa, D. Wahler, J.-L. Reymond, *Nat. Protocols* **2008**, *3*, 1270-1277; 'Enzyme assay and activity fingerprinting of hydrolases with the red-chromogenic adrenaline test'.

- [237] C. Holec, U. Hartrampf, K. Neufeld, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 676-684; 'P450 BM3-Catalyzed Regio- and Stereoselective Hydroxylation Aiming at the Synthesis of Phthalides and Isocoumarins'.
- [238] P. A. Romero, F. H. Arnold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 866; 'Exploring protein fitness landscapes by directed evolution'.
- [239] J. Santos-Aberturas, M. Dörr, G. S. Waldo, U. T. Bornscheuer, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1406-1414; 'In-Depth High-Throughput Screening of Protein Engineering Libraries by Split-GFP Direct Crude Cell Extract Data Normalization'.
- [240] V. I. Tishkov, V. O. Popov, *Biomol. Eng* **2006**, *23*, 89-110; 'Protein engineering of formate dehydrogenase'.
- [241] W. Hummel, M.-R. Kula, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *184*, 1-13; 'Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds'.
- [242] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, M.-R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 791-804; 'Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration'.
- [243] K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, A. M. Egorov, C. Wandrey, U. Kragl, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1377-1380; 'A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase'.
- [244] A. Andreadeli, D. Platis, V. Tishkov, V. Popov, N. E. Labrou, *The FEBS Journal* **2008**, *275*, 3859-3869; 'Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP+'.
- [245] V. B. Urlacher, S. Schulz, in *Cascade Biocatalysis* (Eds.: S. Riva, W.-D. Fessner), **2014**.
- [246] A. Ricke, Bachelor thesis, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf **2015**, Etablierung eines FDH-Cofaktorrecycling-Systems für P450 BM3-katalysierte Hydroxylierungen.
- [247] J. C. Lewis, S. M. Mantovani, Y. Fu, C. D. Snow, R. S. Komor, C.-H. Wong, F. H. Arnold, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2502-2505; 'Combinatorial Alanine Substitution Enables Rapid Optimization of Cytochrome P450BM3 for Selective Hydroxylation of Large Substrates'.
- [248] A. Seifert, S. Vomund, K. Grohmann, S. Kriening, V. B. Urlacher, S. Laschat, J. Pleiss, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 853-861; 'Rational Design of a Minimal and Highly Enriched CYP102A1 Mutant Library with Improved Regio-, Stereo- and Chemoselectivity'.
- [249] Q.-S. Li, U. Schwaneberg, P. Fischer, R. D. Schmid, *Chem.: Eur. J.* **2000**, *6*, 1531-1536; 'Directed Evolution of the Fatty-Acid Hydroxylase P450 BM-3 into an Indole-Hydroxylating Catalyst'.
- [250] K. Neufeld, J. Marienhagen, U. Schwaneberg, J. Pietruszka, *Green Chem.* **2013**, *15*, 2408-2421; 'Benzylic hydroxylation of aromatic compounds by P450 BM3'.
- [251] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257-3259; 'Phosphite Dehydrogenase: A Versatile Cofactor-Regeneration Enzyme'.
- [252] T. W. Johannes, R. D. Woodyer, H. Zhao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5728-5734; 'Directed Evolution of a Thermostable Phosphite Dehydrogenase for NAD(P)H Regeneration'.
- [253] T. W. Johannes, R. D. Woodyer, H. Zhao, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 18-26; 'Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase'.
- [254] M. J. McLachlan, T. W. Johannes, H. Zhao, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 268-274; 'Further improvement of phosphite dehydrogenase thermostability by saturation mutagenesis'.
- [255] N. Beyer, J. K. Kulig, A. Bartsch, M. A. Hayes, D. B. Janssen, M. W. Fraaije, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 1-13; 'P450BM3 fused to phosphite dehydrogenase allows phosphite-driven selective oxidations'.
- [256] H. Liu, J. H. Naismith, *BMC Biotechnol.* **2008**, *8*, 91-91; 'An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol'.
- [257] A. Parikh, F. P. Guengerich, *BioTechniques* **1998**, *24*, 428-431; 'Random Mutagenesis by Whole-Plasmid PCR Amplification'.
- [258] W. Wang, B. A. Malcolm, *BioTechniques* **1999**, *26*, 680-682; 'Two-Stage PCR Protocol Allowing Introduction of Multiple Mutations, Deletions and Insertions Using *QuikChange*<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis'.

- [259] S. Kille, F. E. Zilly, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 738; 'Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution'.
- [260] S. Hoebenreich, M. Spinck, N. Nett, in *Microbial Steroids: Methods and Protocols* (Eds.: J.-L. Barredo, I. Herráiz), Springer New York, New York, NY, **2017**, pp. 239-257.
- [261] J.-b. Wang, G. Li, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3916-3928; 'Enzymatic site-selectivity enabled by structure-guided directed evolution'.
- [262] N. Beyer, J. K. Kulig, M. W. Fraaije, M. A. Hayes, D. B. Janssen, *Chembiochem* **2018**, *19*, 326-337; 'Exploring PTDH-P450BM3 Variants for the Synthesis of Drug Metabolites'.
- [263] C. Kumru, T. Classen, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 4917-4926; 'Enantioselective, Catalytic One-Pot Synthesis of  $\gamma$ -Butyrolactone-Based Fragrances'.
- [264] A. Evidente, R. Lanzetta, R. Capasso, A. Andolfi, A. Bottalico, M. Vurro, M. C. Zonno, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1637-1641; 'Putaminoxin, a phytotoxic nonenolide from *Phoma putaminum*'.
- [265] G. Sabitha, K. Yadagiri, R. Swapna, J. S. Yadav, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5417-5419; 'The first total synthesis of putaminoxin and determination of its absolute configuration'.
- [266] A. Evidente, R. Lanzetta, R. Capasso, A. Andolfi, M. Vurro, M. C. Zonno, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1041-1045; 'Putaminoxins B and C from *Phoma putaminum*'.
- [267] A. Evidente, R. Capasso, A. Andolfi, M. Vurro, M. C. Zonno, *Phytochemistry* **1998**, *48*, 941-945; 'Putaminoxins D and E from *Phoma putaminum*'.
- [268] A. Evidente, R. Capasso, A. Andolfi, M. Vurro, M. C. Zonno, *Nat. Toxins* **1998**, *6*, 183-188; 'Structure-activity relationship studies of putaminoxins and pinolidoxins: phytotoxic nonenolides produced by phytopathogenic *Phoma* and *Ascochyta* species'.
- [269] J. Fuchser, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Recl.* **1997**, 87-95; 'Secondary Metabolites by Chemical Screening, 34. – Aspinolides and Aspinonene/Aspyrone Co-Metabolites, New Pentaketides Produced by *Aspergillus ochraceus*'.
- [270] J. Fausto Rivero-Cruz, G. García-Aguirre, C. M. Cerda-García-Rojas, R. Mata, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5337-5344; 'Conformational Behavior and Absolute Stereostructure of Two Phytotoxic Nonenolides from the Fungus *Phoma herbarum*'.
- [271] O. Yuzikhin, G. Mitina, A. Berestetskiy, *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 7707-7711; 'Herbicidal Potential of Stagonolide, a New Phytotoxic Nonenolide from *Stagonospora cirsii*'.
- [272] A. Evidente, A. Cimmino, A. Berestetskiy, G. Mitina, A. Andolfi, A. Motta, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 31-34; 'Stagonolides B-F, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsii*, a Potential Mycoherbicide of *Cirsium arvense*'.
- [273] A. Evidente, A. Cimmino, A. Berestetskiy, A. Andolfi, A. Motta, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1897-1901; 'Stagonolides G-I and Modiolide A, Nonenolides Produced by *Stagonospora cirsii*, a Potential Mycoherbicide for *Cirsium arvense*'.
- [274] A. Fürstner, K. Radkowski, C. Wirtz, R. Goddard, C. W. Lehmann, R. Mynott, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7061-7069; 'Total Syntheses of the Phytotoxic Lactones Herbarumin I and II and a Synthesis-Based Solution of the Pinolidoxin Puzzle'.
- [275] P. S. Chowdhury, P. Gupta, P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7018-7020; 'First asymmetric total synthesis of aspinolide A'.
- [276] A. K. Perepogu, D. Raman, U. S. N. Murty, V. J. Rao, *Bioorg. Chem.* **2009**, *37*, 46-51; 'Concise synthesis of stagonolide-F by ring closing metathesis approach and its biological evaluation'.
- [277] K. Götz, J. C. Liermann, E. Thines, H. Anke, T. Opatz, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2123-2130; 'Structure elucidation of hypocreolide A by enantioselective total synthesis'.
- [278] A. Kamal, P. Venkat Reddy, M. Balakrishna, S. Prabhakar, *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 143-149; 'Novel Synthesis of Stagonolide-F, Putaminoxin and Aspinolide-A'.
- [279] G. Sabitha, T. R. Reddy, C. Srinivas, J. S. Yadav, *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 224-229; 'An Iterative Acetylene-Epoxy Coupling Strategy for the Total Synthesis of Aspinolide A'.
- [280] S. Chithaluri, R. P. Raghavendar, K. C. Ganesh, S. Pombala, D. Biswanath, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1253-1258; 'The First Stereoselective Total Synthesis of Putaminoxin E and Its Epimer and Evaluation of Their Biological Properties'.

- [281] A. M. Shelke, V. Rawat, G. Suryavanshi, A. Sudalai, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1534-1541; 'Asymmetric synthesis of (+)-stagonolide C and (–)-aspinolide A via organocatalysis'.
- [282] J. S. Yadav, A. Raju, K. Ravindar, B. V. S. Reddy, A. A. Khazim Al Ghamdi, *Synthesis* **2012**, *44*, 585-590; 'Stereoselective Total Synthesis of Putaminoxin'.
- [283] B. Chinnababu, S. P. Reddy, K. S. Babu, Y. Venkateswarlu, *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2886-2891; 'Asymmetric Total Synthesis of Stagonolide F'.
- [284] A. M. Shelke, G. Suryavanshi, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6207-6209; 'An efficient organocatalytic route for asymmetric total synthesis of Stagonolide F'.
- [285] C. Bisterfeld, C. Holec, D. Böse, P. Marx, J. Pietruszka, *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1563-1574; 'Chemoenzymatic Total Synthesis of the Proposed Structures of Putaminoxins B and D'.
- [286] G. C. Fu, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5426-5427; 'The application of catalytic ring-closing olefin metathesis to the synthesis of unsaturated oxygen heterocycles'.
- [287] R. H. Grubbs, S. J. Miller, G. C. Fu, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 446-452; 'Ring-Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis'.
- [288] A. Deiters, S. F. Martin, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2199-2238; 'Synthesis of Oxygen- and Nitrogen-Containing Heterocycles by Ring-Closing Metathesis'.
- [289] G. E. Keck, K. H. Tarbet, L. S. Geraci, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8467-8468; 'Catalytic asymmetric allylation of aldehydes'.
- [290] G. Sabitha, E. V. Reddy, K. Yadagiri, J. Yadav, *Synthesis* **2006**, *2006*, 3270-3274; 'Total synthesis of insect pheromones (R)-4-dodecanolide and (S)-5-hexadecanolide'.
- [291] S. Hashiguchi, A. Fujii, J. Takehara, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7562-7563; 'Asymmetric transfer hydrogenation of aromatic ketones catalyzed by chiral ruthenium (II) complexes'.
- [292] K.-J. Haack, S. Hashiguchi, A. Fujii, T. Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 285-288; 'The Catalyst Precursor, Catalyst, and Intermediate in the RuII-Promoted Asymmetric Hydrogen Transfer between Alcohols and Ketones'.
- [293] H. C. Brown, P. K. Jadhav, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2092-2093; 'Asymmetric carbon-carbon bond formation via. beta.-allyldiisopinocampheylborane. Simple synthesis of secondary homoallylic alcohols with excellent enantiomeric purities'.
- [294] K. Kubota, J. L. Leighton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 946-948; 'A Highly Practical and Enantioselective Reagent for the Allylation of Aldehydes'.
- [295] R. de Souza, L. S. M. Miranda, U. T. Bornscheuer, *Chemistry* **2017**, *23*, 12040-12063; 'A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis'.
- [296] T. Classen, J. Pietruszka, *Biorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1285-1303; 'Complex molecules, clever solutions – Enzymatic approaches towards natural product and active agent syntheses'.
- [297] M. Diekmann, Bachelor thesis, Heinrich-Heine Universität **2017**, Auf dem Weg zum Putaminoxin und seinen Analoga.
- [298] T. Fischer, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2521-2530; 'Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Synthesis of Enantiomerically Pure  $\delta$ -Lactones as Versatile Intermediates for Natural Product Synthesis'.
- [299] A. Weber, K. Döhl, J. Sachs, A. C. M. Nordschild, D. Schröder, A. Kulik, T. Fischer, L. Schmitt, N. Teusch, J. Pietruszka, *Biorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 6115-6125; 'Synthesis and cytotoxic activities of goniotalamins and derivatives'.
- [300] C. Holec, K. Neufeld, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1810-1819; 'P450 BM3 Monooxygenase as an Efficient NAD(P)H-Oxidase for Regeneration of Nicotinamide Cofactors in ADH-Catalysed Preparative Scale Biotransformations'.
- [301] O. Bogin, M. Peretz, Y. Burstein, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 450-458; 'Thermoanaerobacter brockii alcohol dehydrogenase: characterization of the active site metal and its ligand amino acids'.
- [302] E. Keinan, E. K. Hafeli, K. K. Seth, R. Lamed, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 162-169; 'Thermostable enzymes in organic synthesis. 2. Asymmetric reduction of ketones with alcohol dehydrogenase from Thermoanaerobium brockii'.

- [303] E. Keinan, K. K. Seth, R. Lamed, R. Ghirlando, S. P. Singh, *Biocatalysis* **1990**, *3*, 57-71; 'Thermostable Enzymes in Organic Synthesis, 4. Tbadh-Catalyzed Preparation of Bifunctional Chirons. Total Synthesis of S-(+)-Z-Tetradec-5-En-13-Olide'.
- [304] G. Bertani, *J. Bacteriol.* **1951**, *62*, 293-300; 'Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*'.
- [305] A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114-2120; 'Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data'.
- [306] D. Kim, B. Langmead, S. L. Salzberg, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 357; 'HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements'.
- [307] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, S. Genome Project Data Processing, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078-2079; 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools'.
- [308] M. Pertea, G. M. Pertea, C. M. Antonescu, T.-C. Chang, J. T. Mendell, S. L. Salzberg, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 290; 'StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads'.
- [309] R. D. Gietz, R. H. Schiestl, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 31; 'High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method'.
- [310] T. Classen, M. Korpak, M. Schölzel, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1321-1331; 'Stereoselective Enzyme Cascades: An Efficient Synthesis of Chiral  $\gamma$ -Butyrolactones'.
- [311] G. Palmieri, P. Giardina, C. Bianco, B. Fontanella, G. Sannia, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 920-924; 'Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*'.
- [312] J. Pahlke, H. Dostálová, J. Holátko, U. Degner, M. Bott, M. Pátek, T. Polen, *RNA Biology* **2016**, *13*, 848-860; 'The small 6C RNA of *Corynebacterium glutamicum* is involved in the SOS response'.
- [313] S. R. Wilson, M. E. Guazzaroni, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3087-3091; 'Synthesis of homoallylic alcohols in aqueous media'.
- [314] S. M. Wickel, C. A. Citron, J. S. Dickschat, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 2906-2913; '2H-Pyran-2-ones from *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum*'.
- [315] S.-K. Kang, D.-C. Park, H.-S. Rho, C.-M. Yu, J.-H. Hong, *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 203-214; 'Pd(0)-Catalyzed Hydrogenolysis of Allylic and Dienylic Cyclic Carbonates: Synthesis of Optically Active Homoallylic Alcohols and Allylic Alcohols'.
- [316] A. P. Davis, M. Jaspars, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1992**, 2111-2118; 'Super-acid catalysed addition of allylsilanes to carbonyl compounds; synthetic and mechanistic aspects'.
- [317] J. L. López-Martínez, I. Torres-García, I. Rodríguez-García, M. Muñoz-Dorado, M. Álvarez-Corral, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 806-816; 'Stereoselective Barbier-Type Allylations and Propargylations Mediated by CpTiCl<sub>3</sub>'.
- [318] N. Tan, T. Nie, C.-T. Au, D. Lan, S. Wu, B. Yi, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 2592-2595; 'An organoantimony complex with intramolecular N $\rightarrow$ Sb coordination as effective and recyclable catalyst for the allylation of aldehydes with tetraallyltin'.
- [319] C. Vilanova, M. Sánchez-Péris, S. Roldán, B. Dhotare, M. Carda, A. Chattopadhyay, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 6562-6567; 'A practical procedure of low valent tin mediated Barbier allylation of aldehydes in wet solvent'.
- [320] R. Tomifuji, S. Masuda, T. Kurahashi, S. Matsubara, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3834-3837; 'Cationic Cobalt Porphyrin-Catalyzed Allylation of Aldehydes with Allyltrimethylsilanes'.

### 10 Danksagung

Viel Wasser ist den Rhein hinuntergeflossen, seitdem ich angefangen habe Biochemie zu studieren. Es wurden ein paar Liter mehr, seitdem ich diese Arbeit hätte drucken sollen. In diesem Zeitraum habe ich viele neue Menschen kennengelernt, welche mir auf diesem Weg begegnet sind und mich geprägt haben. Auch wenn ich gelegentlich dazu neige über das Studium und die Doktorarbeit zu fluchen, bereue ich jedoch keine Sekunde diesen Weg eingeschlagen zu haben. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei denjenigen bedanken, welche mich durch diese Zeit begleitet haben.

Zuallererst gilt mein Dank dir Jörg. Danke, dass ich diese Arbeit in deinem Institut absolvieren durfte und die wissenschaftliche Freiheit, die ich währenddessen genossen habe. Von dem ursprünglichen Arbeiten mit der Monooxygenase und dem nebenher ein wenig auf dem Thema der russischen Laccasen aushelfen wurde zwar geringfügig abgewichen, aber das gehört ja irgendwie zum guten Ton einer Doktorarbeit im IBOC. Du hast Doktoranden wie mir zwar Ideen und Ziele mit auf den Weg gegeben, aber uns darüber hinaus auch das Vertrauen geschenkt selbstständig und unabhängig zu arbeiten, trotz aller damit einhergehenden Tücken. Du hast mir die Gelegenheit gegeben als Forscher und Mensch zu reifen und das in einem Umfeld, in dem ich stets viel Spaß an der Arbeit hatte.

Mein weiterer Dank geht an Prof. Constantin Czekelius für das Lesen und Evaluieren dieser Doktorarbeit als Zweitkorrektor.

Ein großer Dank geht selbstverständlich an all jene Laborkollegen, die mich täglich bei der Arbeit aushalten durften. Ich hatte immer sehr viel Spaß an den Diskussionen und Scherzen im Labor und in der Mittagspause, welche sich über alle Bereiche des alltäglichen Lebens erstreckt haben. Die Besetzung in Labor 212 und Labor 308 durfte davon sicherlich ganz viel genießen, weshalb ich mich im speziellen bei Caro, Marc, Andreas und Kevin bedanken möchte. Trotz aller wissenschaftlichen Tiefschläge während einer Doktorarbeit war die Arbeit im Labor immer unterhaltsam.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei den Festangestellten bedanken, die immer zur Stelle waren, wenn man Hilfe brauchte. Hervorheben muss ich an dieser Stelle Vera, Bea und Birgit im Besonderen. Du bist das Herz und die gute Seele der Arbeitsgruppe und ich werde die Gespräche im Chromatographieraum mit dir vermissen. Wer weiß, vielleicht werde ich dich irgendwann einfach ab, ich zahl dir auch mehr Geld als Jörg.

Arbeitskollegen, die ich ganz speziell hervorheben möchte, sind Fabian, Marvin, Julian und Patrick Marx. Mit euch habe ich nicht nur gute Kollegen, sondern gute Freunde gefunden. Ihr habt großen Anteil daran, dass ich die Zeit im IBOC für immer positiv in Erinnerung behalten werde. Ich hoffe wir schaffen es unsere kleine Tradition von Konsolenabenden fortzuführen. Es ist innerhalb des Berufslebens ja gar nicht mehr so einfach Termine zu finden.

Beim Rekapitulieren von Kollegen, die den üblichen Status weit überschritten haben, komme ich zwangsläufig zu dir Jamila. Während man das erste Jahr der Arbeit im Institut überwiegend

## Danksagung

nebeneinanderher gearbeitet hat, hatte ich das Vergnügen dich in unserem Lieblingsprojekt in Moskau näher kennenzulernen. Und siehe da, wenn man das erste Eis gebrochen hat kommt eine sehr unterhaltsame Person zum Vorschein, die mein Leben mit ihrer ganz speziellen Jamila-Art seitdem unglaublich bereichert. Ich kann behaupten niemals in meinem Leben so glücklich gewesen zu sein wie in der Beziehung mit dir. Egal ob Alltagsspäße beim Einkaufen oder daheim, ob im Urlaub auf Mallorca oder beim Herumlümmeln auf der Couch, mit dir macht alles im Leben mehr Spaß. Dabei hältst du auf wundersame Weise meine hin und wieder spezielle Art aus und gibst mir immer das Gefühl Zuhause zu sein.

Danke auch an all jene Freunde, die mich bereits seit über einem Jahrzehnt begleiten und mit denen ich bis heute Tränen lachen darf. Danke Stefan, Simon, Tobias, Daniel und Sebastian für all die Jahre Spaß beim Zocken und noch viel mehr bei den regelmäßigen Treffen. Ihr habt mein Leben seit der Pubertät geprägt und ich glaube, ich habe mit niemandem mehr Zeit verbracht als mit euch Jungs. Danke Daniel und Hendrik, für die Zeit auf dem Uni-Campus und danach. Mit euch durfte ich das klassische Studentenleben im Wohnheim genießen. Danke Daniel (von euch gibt es echt zu viele) und Christina, für all die schönen Jahre seit ich mit dem Studium begonnen habe. In euch habe ich Freunde fürs Leben gefunden und wer weiß, vielleicht arbeiten wir ja irgendwann wirklich in derselben Firma.

Zuallerletzt möchte ich meiner kleinen, aber feinen Familie danken. Danke Ela, danke Paul und am allermeisten, danke Vater. Ohne euch hätte ich niemals zu dem Menschen werden können der ich heute bin und ohne eure bedingungslose Unterstützung könnte ich meine Ziele niemals erreichen. Ihr seid der Rückhalt und die wichtigsten Menschen in meinem Leben. Danke auch an jene Familienmitglieder die den Abschluss meine Promotion leider nicht mehr erleben durften, danke Mutter und danke Oma. Ohne deine strenge Erziehung Mutter wäre ich definitiv weniger erfolgreich durchs Leben geschritten und deine weisen Worte Oma werden mir ganz besonders fehlen.

Insgesamt einfach danke an all jene Menschen die mein Leben seitjeher so bereichern. Ohne euch wäre das Leben nicht halb so schön und unterhaltsam wie es ist.

## **11 Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir eigenständig und ohne unzulässige Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf vorgelegt. Des Weiteren erkläre ich, dass bisher kein weiterer Promotionsversuch unternommen wurde.

---

David Dickmann