



**Untersuchungen zu enzymatischen Halogenierungsreaktionen in  
der organischen Synthese**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Alexander Veljko Fejzagić**  
aus Mechernich

Laupheim, November 2023



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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Jörg Pietruszka

2. Prof. Dr. Vlada Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2023



## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in Fachzeitschriften publiziert und auf Konferenzen präsentiert.

## Publikationen

A. V. Fejzagić, J. Gebauer, N. Huwa, T. Classen, *Molecules* **2019**, *24*; 'Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow'

A. V. Fejzagić, S. Myllek, F. Hogenkamp, J. Greb, J. Pietruszka, T. Classen, *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 959-966; 'A Fluorescence-Based Assay System for the Determination of Haloperoxidase-Activity Using a Two-Dimensional Calibration Approach'

N. Porta, A. V. Fejzagić, K. Dumschott, B. Paschold, B. Usadel, J. Pietruszka, T. Classen, H. Gohlke, *Catalysts* **2022**, *12*, 1195; 'Identification and Characterization of the Haloperoxidase VPO-RR from *Rhodoplanes roseus* by Genome Mining and Structure-Based Catalytic Site Mapping'

## Konferenzbeiträge

J. Gebauer, A.V. Fejzagić, T. Classen, *69th Mosbacher Kolloquium* **2018** (Mosbach, DE): 'Flavin-dependent Halogenases for the Enzymatic Halogenation in Organic Synthesis.' ; Poster

A. V. Fejzagić, *CKB Symposium*, **2019** (Düsseldorf, DE): 'Resource Efficiency – Flow Chemistry; Vortrag

A. V. Fejzagić, S. Myllek, J. Greb, F. Hogenkamp, T. Classen, *BioTrans* **2019** (Groningen, NL); Poster: 'Haloperoxidases - Invention of an activity assay'

A.V. Fejzagić, T. Classen, J. Pietruszka, *BioTrans* **2021** (Graz, AU, virtual): 'Haloperoxidases: halogenating biocatalysts for chemoenzymatic cascade reactions'; Poster & Video pitch

A. V. Fejzagić, *CKB Symposium*, **2021** (Düsseldorf, DE): 'Catalysts in continuous Flow Chemistry'; Vortrag

A. V. Fejzagić, N. Porta, K. Dumschott, B. Paschold, B. Usadel, J. Pietruszka, T. Classen, H. Gohlke, *BioCat* **2022** (Hamburg, DE): 'Establishing Haloperoxidases as halogenating biocatalysts for modular cascade reactions'; Poster

## Abschlussarbeiten

Die vorliegende Arbeit beinhaltet Ergebnisse aus Abschlussarbeiten, die vom Autor betreut und deren Inhalte an den entsprechenden Stellen in dieser Arbeit namentlich gekennzeichnet wurden.

*Sebastian Myllek* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), **2019**; „Auf dem Weg zu sichereren Halogenierungen: Studien zur Chlorperoxidase“, Bachelorthesis

*Daira Mirel Oropeza Benitez* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), **2021**; „Die bakteriellen Vanadium-Haloperoxidasen – Studien zur Expression, Isolierung und Charakterisierung“, Bachelorthesis





## Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	VI
2	Zusammenfassung .....	VIII
3	Abstract.....	X
1	Einleitung .....	1
1.1	Anforderungen an die moderne Synthesechemie .....	1
1.1.1	Herausforderungen des 21. Jahrhunderts .....	1
1.1.2	Biotransformationen als „grüne“ Alternative zur klassischen Chemie? .....	2
1.1.3	Zielsetzung .....	3
2	Kenntnisstand .....	4
2.1	Chemie im Wandel .....	4
2.1.1	Natur- und Wirkstoffe .....	4
2.1.2	Halogene – Bausteine in der Wirkstoffentwicklung .....	5
2.2	Halogene – Eigenschaften und Anwendung.....	7
2.2.1	Stereoelektronische Eigenschaften von Halogenen.....	7
2.2.2	Die Rolle verschiedener Halogene in der Wirkstoffforschung .....	8
2.2.3	Nutzung von Halogenen in der Synthesechemie .....	10
2.2.4	Energie- und Ressourceneffizienz chemischer Halogenierungen.....	14
2.3	Halogenierende Enzyme als Biokatalysatoren .....	17
2.3.1	Biokatalyse – die biologische Revolution in der Chemie .....	17
2.3.2	Halogenierende Enzyme.....	18
2.3.3	Flavinabhängige Halogenasen.....	20
2.3.4	$\alpha$ -Ketoglutaratabhängige Halogenasen.....	24
2.3.5	SAM-abhängige Halogenasen .....	26
2.4	Haloperoxidasen.....	29
2.4.1	Häm-eisenabhängige Haloperoxidasen .....	29
2.4.2	Vanadiumabhängige Haloperoxidasen .....	31
2.4.3	Metallfreie Haloperoxidasen / Perhydrolasen .....	36
2.4.4	Nachweis von Haloperoxidasen.....	37
2.4.5	Anwendung von Haloperoxidasen als Biokatalysatoren .....	38
2.5	(Kontinuierliche) Durchflusschemie – <i>flow chemistry</i> .....	41
2.5.1	Prinzip der Durchflusschemie .....	41
2.5.2	Immobilisierung von (Bio-)Katalysatoren .....	42
2.5.3	Anwendung von Biokatalysatoren im Durchfluss .....	45
3	Ergebnisse und Diskussion.....	48
3.1	Homologe Produktion von CPO aus <i>Caldariomyces fumago</i> .....	48

3.1.1	Expression und Kultivierung .....	48
3.1.2	Isolation und Aktivitätsbestimmung .....	51
3.1.3	Temperatur- und Lösungsmittelstabilität .....	52
3.2	Etablierung eines Produktionsprotokolls für vanadiumabhängige Haloperoxidasen in <i>E. coli</i> .....	55
3.2.1	Expressionsanalyse .....	55
3.2.2	Optimierung der Löslichkeit der HPO-Enzyme .....	58
3.2.3	Isolation und Reinigung der Haloperoxidase aus <i>C. inaequalis</i> .....	62
3.3	Etablierung eines fluoreszenzbasierten Assaysystems für Haloperoxidasen ..	65
3.3.1	Evaluation des Dimedon-Assays .....	65
3.3.2	Etablierung eines kolorimetrischen Assays für Haloperoxidasen .....	67
3.3.3	Etablierung eines fluorimetrischen Assays für Haloperoxidasen .....	68
3.3.4	Evaluation des entwickelten MeDAC-Assays .....	77
3.4	Biochemische Charakterisierung der Haloperoxidase aus <i>C. inaequalis</i> .....	79
3.4.1	Aktivitätsbestimmung von $V_{Cl}PO-Ci$ .....	79
3.4.2	2D-Michaelis-Menten-Kinetik .....	80
3.4.3	Stabilität gegenüber Temperatur und Lösungsmitteln .....	84
3.4.4	Halogenidselektivität von $V_{Cl}PO-Ci$ .....	88
3.5	Identifizierung und Charakterisierung neuer Haloperoxidasen .....	89
3.5.1	Bioinformatische Suche nach neuen Haloperoxidase-Genen .....	89
3.5.2	Putative V-HPO aus <i>L. pratensis</i> .....	92
3.5.3	Putative V-HPO aus <i>R. roseus</i> .....	96
3.6	Etablierung eines Testreaktionssystems für HPOs .....	101
3.6.1	2,6-Dimethylphenol ( <b>51</b> ) als Testreaktionssystem .....	101
3.6.2	Thymol ( <b>56</b> ) als Testreaktionssystem .....	110
3.6.3	HPO-vermittelte O-Methylierung von Thymol .....	114
3.7	Modifikation der Regioselektivität von $V_{Cl}PO-Ci$ .....	121
3.7.1	Molekulare docking-Studie zur Suche nach Substratbindetaschen in $V_{Cl}PO-Ci$ .....	121
3.7.2	Mutagenese von $V_{Cl}PO-Ci$ zur Änderung der Regioselektivität .....	123
3.8	Vergleich der enzymatischen und chemischen Halogenierung .....	129
4	Ausblick .....	134
4.1	Schlussfolgerung .....	134
4.2	Selektivität von Haloperoxidasen .....	134
4.2.1	Rationales Design .....	134
4.2.2	Charakterisierung neuer Haloperoxidasen .....	136
4.2.3	$V_{Cl}PO-Ci$ als chassis für neue Redox-Enzyme .....	137

4.3	Haloperoxidasen als synthetische Werkzeuge .....	139
4.3.1	Halogenierungen im batch .....	139
4.3.2	Etablierung von Haloperoxidasen für die (kontinuierliche) Durchflusschemie .....	141
4.3.3	Immobilisierung von $V_{Cl}PO-Ci$ .....	141
4.3.4	Optimierung immobilisierter $V_{Cl}PO-Ci$ für die Durchflusschemie.....	147
4.3.5	Kombination von Haloperoxidasen mit weiteren Systemen im <i>flow</i> .....	150
5	Experimentalteil .....	155
5.1	Allgemeines .....	155
5.1.1	Geräte .....	155
5.1.2	Software .....	158
5.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	159
5.1.4	Chemikalien .....	159
5.1.5	Enzyme .....	159
5.1.6	Plasmide und Oligonukleotide.....	160
5.1.7	Mikroorganismen .....	162
5.2	Molekularbiologische Methoden .....	163
5.2.1	Primerdesign.....	163
5.2.2	Klassische PCR .....	163
5.2.3	Kolonie-PCR .....	164
5.2.4	Test-PCR .....	164
5.2.5	QuikChange <sup>®</sup> -PCR .....	164
5.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	165
5.2.7	Isolation von Plasmid-DNA .....	165
5.2.8	Restriktionsverdau und Ligation.....	165
5.2.9	Geleluatation und PCR-Reinigung .....	166
5.2.10	Gibson Assembly <sup>®</sup> .....	166
5.2.11	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	167
5.2.12	DNA-Sequenzierung .....	167
5.3	Mikrobiologische Methoden.....	168
5.3.1	Medien .....	168
5.3.2	Antibiotika- und weitere Stammlösungen zur Kultivierung .....	170
5.3.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	170
5.3.4	Hitzeschocktransformation kompetenter Zellen .....	171
5.3.5	Vorkulturen .....	171
5.3.6	Herstellung von Glycerinkulturen zur langfristigen Stammlagerung .....	171
5.3.7	Kultivierung für Expressionsanalysen .....	172

5.3.8	Kultivierung für Proteinisolation in <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3) .....	172
5.4	Proteinbiochemische Methoden.....	173
5.4.1	Zellaufschluss .....	173
5.4.2	Proteinisolation mittels IMAC .....	173
5.4.3	Entsalzung, Dialyse und Konzentration von Proteinlösungen .....	174
5.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	175
5.4.5	SDS-PAGE.....	175
5.4.6	Aktivitätsbestimmung von Haloperoxidasen.....	177
5.4.7	Michaelis-Menten-Kinetik .....	177
5.5	Bioinformatische Methoden .....	179
5.5.1	Sequenzalignment .....	179
5.5.2	Docking-Studien.....	179
5.5.3	In silico Mutagenese .....	180
5.6	Chemische Methoden.....	182
5.6.1	Lösungsmittel .....	182
5.6.2	Reaktionskontrollen und (präparative) Chromatographie.....	182
5.6.3	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....	182
5.6.4	NMR-Spektroskopie .....	183
5.6.5	HPLC-Messungen.....	183
5.6.6	Synthese von 3-Brom-4-methyl-7-diethylaminocumarin <b>50</b> .....	183
5.6.7	Synthese von bromierten und chlorierten Thymolderivaten .....	184
5.7	Spezieller Experimententeil .....	185
5.7.1	Fluoreszenzmessungen .....	185
5.7.2	Etablierung eines Konzentrationsrechners für MeDAC <b>49</b> und .....	
	BrMeDAC <b>50</b> .....	185
5.7.3	Bestimmung der Nachweisgrenzen des MeDAC-Assays.....	186
5.7.4	Kalibrierung von DMP ( <b>51</b> ) via GC-MS .....	187
5.7.5	Kalibrierung von Thymol ( <b>56</b> ) via GC-MS.....	188
5.7.6	Bestimmung des E <sup>+</sup> -Faktors.....	189
5.7.7	Experimente im kontinuierlichen Durchfluss/flow chemistry .....	190
5.7.8	Immobilisierung von V <sub>Cl</sub> PO- <i>Ci</i> .....	190
5.7.9	Design of Experiment.....	191
5.7.10	Kultivierung von <i>C. fumago</i> .....	192
5.7.11	Ethanol-fällung und Isolation von CPO- <i>Cf</i> .....	193
5.7.12	Expressionsstudien von Haloperoxidasen .....	194
5.7.13	Expressionsstudien von Haloperoxidasen als inclusion body Test .....	195
5.7.14	Aktivitätsbestimmung von Lysaten mit dem DAC-Assay .....	196
5.7.15	Resorufin als alternatives Assaysystem.....	197

5.7.16	Aktivitätsnachweis von VPO- <i>Lp</i> mit dem MeDAC-Assay .....	197
5.7.17	Aktivitätsnachweis neuer Haloperoxidasen mit dem MeDAC-Assay.....	198
5.7.18	Einfluss von CTAB in der HPO-vermittelten Umsetzung von..... Thymol ( <b>56</b> ).....	199
5.7.19	Kultivierung von Mutanten von V <sub>Cl</sub> PO- <i>Ci</i> .....	201
5.7.20	Dimedon-Assay.....	201
5.7.21	Kalibrierfunktionen für den MeDAC-Assay.....	202
5.7.22	Nachweis von Chlorierung im MeDAC-Assay .....	205
5.7.23	NMR-Spektrum der Umsetzung von Hydrozimtaldehyd ( <b>75</b> ) mit .....	
	V <sub>Cl</sub> PO- <i>Ci</i> .....	207
6	Anhang.....	208
6.1	Vektorkarten .....	208
6.2	Bioinformatische Suche nach neuen Haloperoxidasen .....	228
6.3	NMR-Spektren.....	229
6.4	GC-MS-Spektren .....	234
6.5	Eigenanteil an Publikationen .....	238
7	Literaturverzeichnis .....	240
8	Danksagung.....	261
9	Erklärung.....	264

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

+I-Effekt	Positiver induktiver Effekt	fw	<i>forward</i>
+M-Effekt	Mesomerer Effekt	GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
2xYT	2x konzentriertes <i>yeast extract</i> Medium	HP <sub>i</sub>	Phosphorsäure(puffer) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )
Abs.	Absorption	HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )
ADH	Alkoholdehydrogenase	HPO	Haloperoxidase
API	Pharmazeutisch aktive Verbindung (engl.: <i>active pharmaceutical ingredient</i> )	I	Intensität
APS	Ammoniumpersulfat	IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i> )
Äq.	Äquivalente (mol)	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ATP	Adenosintriphosphat	kDa	Kilo-Dalton
Bis-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)ethan	Konz.	Konzentriert
bp	Basenpaar	KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphat(puffer) Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie (engl.: <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i> )
BrMeDAC	3-Brom-4-methyl-7-diethylaminocoumarin	LC-MS	LC-MS
BTA	Bis-TRIS-Acetat	LOB	<i>limit of blank</i>
BTP	Bis-TRIS-Propionat	LOD	<i>limit of detection</i>
c	Konzentration	LOQ	<i>limit of quantification</i>
CatIB	Katalytisch aktiver Einschlusskörper (engl.: <i>catalytically active inclusion body</i> )	LV	Leervektor
CFE	Zellfreier Überstand (engl.: <i>cell-free extract</i> )	MCD	Monochlordimedon
CLEA	<i>cross-linked enzyme aggregates</i>	Me	Methyl-Rest
CPO-Cf	Chloroperoxidase aus <i>C. fumago</i>	MeCN	Acetonitril
DAC	7-Diethylaminocoumarin	MeDAC	4-Methyl-7-diethylaminocoumarin
DC	Dünnschichtchromatographie	MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
DCM	Dichlormethan	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
demin.	Demineralisiert	NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid	NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	NBS	N-Brom-succinimid
DPPH	Diphenyl-Pikryl-Hydrazyl	NCS	N-Chlor-succinimid
DTT	1,4-Dithio-D-threitol	NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i> )
DV	Diastereomerenverhältnis	NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthese
Engl.	Englisch	OD	Optische Dichte
EtOAc	Essigsäureethylester	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FAD	Flavin-adenindinukleotid	PBR	<i>packed bead reactor</i>
FAH	flavinabhängige Halogenasen	PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
Fe/α-KG	Eisen-α-Ketoglutaratabhängige Halogenase		
FMN	Flavin-mononukleotid		

PHB	Polyhydroxybutyrat	TF	Umsatzfrequenz (engl.: <i>turnover frequency</i> )
PDB	Protein Database	Tm	Schmelztemperatur
P <sub>i</sub>	Anorganisches Phosphat	TN	Umsatzzahl (engl.: <i>turnover number</i> )
PKS	Poliketidsynthase	TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
PTFE	Polytetrafluoräthylen	TTN	Gesamtumsatzzahl (engl.: <i>total turnover number</i> )
rcf	Zentrifugalbeschleunigung (engl.: <i>relative centrifugal force</i> )	v/v	Volumenprozent (engl.: <i>volume per volume</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )	V <sub>Br</sub> PO-Co	vanadiumabhängige Bromoperoxidase aus <i>C. officinalis</i>
RT	Raumtemperatur	V <sub>Cl</sub> PO-Ci	vanadiumabhängige Chloroperoxidase aus <i>C. inaequalis</i>
rv	<i>reverse</i>	V-HPO	vanadiumabhängige Haloperoxidase
SAM	S-Adenosylmethionin	VPO-Lp	vanadiumabhängige Haloperoxidase aus <i>L. pratensis</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>size-exclusion chromatography</i> )	VPO-Rr	vanadiumabhängige Haloperoxidase aus <i>R. roseus</i>
SET	<i>single electron transfer</i>	w/v	Gewichtsprozent (engl.: <i>weight per volume</i> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat	x g	Relative Zentrifugalkraft
STY	Raum-Zeit-Ausbeute (engl.: <i>space-time-yield</i> )		
TA	Transaminase		
TB	<i>terrific broth</i>		
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylen-diamin		
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl		

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Halogenierungen spielen eine wichtige Rolle in der Modifikation und Synthese von Natur- und Wirkstoffen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten halogenierende Enzyme als Biokatalysatoren für die Anwendung im *batch* und kontinuierlichen Durchfluss charakterisiert und etabliert werden. Der Fokus lag dabei auf der Enzymfamilie der Haloperoxidasen, die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Halogeniden Halogenierung aromatischer und elektronenreicher Substrate katalysieren.

Zu Beginn der Arbeit sollte die homologe Produktion der literaturbekannten Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* im Arbeitskreis etabliert werden. Dabei wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Sebastian Myllek Kultivierungs- und Isolierungsbedingungen identifiziert, mit denen ausreichend Enzym für Charakterisierungsexperimente bereitgestellt werden konnte. In ersten Versuchen konnte so eine moderate Temperatur- und Lösungsmittelstabilität des Enzyms gegenüber gängigen Lösungsmitteln wie Essigsäureethylester beobachtet werden.

Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Fokus auf vanadiumabhängige Haloperoxidasen gelenkt. Hier konnte ein heterologes Kultivierungsprotokoll in *Escherichia coli* etabliert werden, das mit Hilfe einer optimierten Isolationsstrategie lösliches Protein in Ausbeuten von etwa 10 mg pro Liter Zellkultur lieferte. Mit der so isolierten literaturbekannten Vanadium-Haloperoxidase aus *Curvularia inaequalis* wurde ein alternativer Fluoreszenz-basierter Aktivitätsassay entwickelt, der die simultane Abnahme des Startmaterials und Zunahme des Produkts dokumentiert und damit eine genaue Quantifizierung von Haloperoxidase-Aktivität erlaubt. Mit Hilfe dieses Systems konnte erstmalig eine zweidimensionale Fließgleichgewichtskinetik einer vanadiumabhängigen Haloperoxidase beschrieben werden. Das Enzym zeigte eine Umsatzzahl von etwa  $10\text{ s}^{-1}$  und eine Inhibition durch Bromid ab etwa 50 mM, während es für Wasserstoffperoxid kein Inhibitionsprofil zeigte.

Mit Hilfe des Assays wurde anschließend die Halogenidselektivität, Temperatur- und Lösungsmittelstabilität des Enzyms untersucht. Dabei betrug die Chlorierungsaktivität des Enzyms weniger als 10 % der Bromierungsaktivität. Das Enzym aus *C. inaequalis* verfügte über eine sehr hohe Temperaturstabilität (30 % Restaktivität bei 70 °C) und war gegenüber Lösungsmitteln wie Aceton und Ethanol bei bis zu 40 % (*v/v*) stabil.

Die etablierten Charakterisierungsmethoden wurden verwendet, um verschiedene putative Haloperoxidasen zu charakterisieren. In einem *genome-mining* Ansatz wurden geeignete Gene in Kooperation mit der AG Usadel (HHU Düsseldorf) sequenziert und zusammengetragen, von der AG Gohlke (HHU Düsseldorf) über *homology modelling* untersucht und anschließend im Labor mit Unterstützung von Daira Oropeza biochemisch charakterisiert. Dabei konnten zwei Haloperoxidasen bakteriellen Ursprungs aus *Luteitalea pratensis* und *Rhodoplanes roseus* als vanadiumabhängige Haloperoxidasen identifiziert werden. Nach kinetischen Untersuchungen konnte das Enzym aus *R. roseus* eine 100-fach höhere Umsatzzahl bei geringerer Inhibition durch Bromid aufweisen und zeigte eine ähnliche Stabilität wie das Homolog aus *C. inaequalis*.

Bioinformatik-gestützte Untersuchungen zeigten mögliche Bindungstaschen für Substrate für das Enzym aus *C. inaequalis* und wurden für anschließende Mutagenesestudien zur Selektivitätserhöhung verwendet, die allerdings erfolglos blieben. Untersuchungen zu alternativen Coenzymen zeigten eine Akzeptanz für andere Oxometallsäuren wie Tantalat und Niobat, wodurch sich vielversprechende, neue Ansätze, auch zur Veränderung der Chemo- und Regioselektivität, ergeben.

Um die Haloperoxidase-vermittelte Halogenierung synthesesauglich zu machen, wurden verschiedene Testsysteme etabliert, um geeignete Reaktionsbedingungen zu bestimmen. Dabei konnten die

Umsätze im Rahmen von *design of experiment*-Ansätzen schlussendlich auf über 90 % gesteigert werden. Es konnten ebenfalls Nebenreaktivitäten wie *O*-Methylierungen der literaturbekannten Haloperoxidase aus *C. inaequalis* erstmalig dokumentiert werden. Die so beschriebenen optimierten Reaktionsparameter wurden für erste Versuche im kontinuierlichen Durchfluss verwendet. Nach Etablierung einer geeigneten kovalenten Immobilisierungsmethode für Haloperoxidasen konnten erfolgreich erste Umsätze mit der Haloperoxidase aus *C. inaequalis* im Durchfluss dokumentiert und ein geeigneter Betriebsmodus etabliert werden.

Diese Arbeit konnte somit Grundlagen für die Nutzung von Haloperoxidasen in der Synthesechemie legen und bietet verschiedene Anknüpfungspunkte für weitere Forschungsarbeiten auf diesem vielversprechenden Gebiet.

### 3 ABSTRACT

Halogenations play an important role in the modification and synthesis of natural and active compounds. In this work, halogenating enzymes were to be characterized and established as biocatalysts for batch and continuous flow applications. The focus was on the enzyme family of haloperoxidases, which catalyze the halogenation of aromatic and electron-rich substrates in the presence of hydrogen peroxide and halides.

At the beginning of the work, the homologous production of the literature-known chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* was to be established in the working group. In the framework of Sebastian Myllek's bachelor thesis, cultivation and isolation conditions were identified that provided sufficient enzyme for characterization experiments. In first experiments, a moderate temperature and solvent stability of the enzyme towards common solvents like ethyl acetate could be observed.

For the further course of the work, the focus was directed to vanadium-dependent haloperoxidases. Here, a heterologous cultivation protocol was established in *Escherichia coli* that yielded soluble protein in yields of about 10 mg per liter of cell culture using an optimized isolation strategy. An alternative fluorescence-based activity assay was developed using the literature-derived vanadium haloperoxidase from *Curvularia inaequalis*, which documents the simultaneous decrease in starting material and increase in product, thus allowing accurate quantification of haloperoxidase activity. Using this system, two-dimensional steady-state kinetics of a vanadium-dependent haloperoxidase could be described for the first time. The enzyme showed a turnover number of about  $10 \text{ s}^{-1}$  and inhibition by bromide from about 50 mM, while it showed no inhibition profile for hydrogen peroxide.

The assay was then used to investigate the halide selectivity, temperature and solvent stability of the enzyme. Here, the chlorination activity of the enzyme was less than 10% of the bromination activity. The enzyme from *C. inaequalis* had very high temperature stability (30% residual activity at 70°C) and was stable to solvents such as acetone and ethanol at up to 40% (v/v).

The established characterization methods were used to analyze different putative haloperoxidases. In a genome-mining approach, suitable genes were sequenced and assembled in cooperation with AG Usadel (HHU Düsseldorf), investigated by AG Gohlke (HHU Düsseldorf) via homology modeling and subsequently biochemically characterized in the laboratory with support by Daira Oropeza. Two haloperoxidases of bacterial origin from *Luteitalea pratensis* and *Rhodoplanes roseus* were identified as vanadium-dependent haloperoxidases. According to kinetic studies, the enzyme from *R. roseus* exhibited a 100-fold higher turnover number with lower inhibition by bromide and showed similar stability to the homolog from *C. inaequalis*.

Bioinformatics-based studies revealed possible binding pockets for substrates for the enzyme from *C. inaequalis* and were used for subsequent mutagenesis studies to increase selectivity but were unsuccessful. Studies on alternative coenzymes showed acceptance of other oxometallic acids such as tantalate and niobate, providing promising new approaches, including modification of chemo- and regioselectivity.

In order to make haloperoxidase-mediated halogenation suitable for synthesis, various test systems were established to determine suitable reaction conditions. In the course of design-of-experiment approaches, the conversions could finally be increased to over 90%. In addition, side reactions such as O-methylation of the literature-known haloperoxidase from *C. inaequalis* were documented for the first

time. The optimized reaction parameters described in this way were used for initial experiments in continuous flow. After establishing a suitable covalent immobilization method for haloperoxidases, first turnovers with the haloperoxidase from *C. inaequalis* could be successfully documented in flow-through and a suitable operating mode could be established.

This work was thus able to lay the foundations for the use of haloperoxidases in synthetic chemistry and offers various starting points for further research in this promising field.

*Did I ever tell you what the definition of insanity is? Insanity is doing the exact same fucking thing over and over again, expecting shit to change.*

- Vaas Montenegro, *Far Cry 3* (nach dem Originalzitat von Albert Einstein)

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Anforderungen an die moderne Synthesechemie

### 1.1.1 Herausforderungen des 21. Jahrhunderts

Die chemische Industrie bildet einen der Eckpfeiler der deutschen Industrie. Viele deutsche Chemie- und Pharmafirmen wie Bayer, BASF, Henkel oder Boehringer Ingelheim gehören zum Kreis der weltweit größten Vertreter der jeweiligen Branche.<sup>[1]</sup> Über Jahrzehnte lieferten sie verschiedene Medikamente und Therapeutika, die mit steigenden Erkenntnissen aus der Biochemie und Molekularbiologie zunehmend an Komplexität gewannen. Die Medizinalchemie bildet dabei das Fundament für die Synthese dieser pharmazeutisch aktiven Verbindungen (engl. *active pharmaceutical ingredients*, API). Diese bedient sich häufig konvergenter, traditioneller Syntheserouten, die gut skalierbar und robust sind. Allerdings steht diese Sparte der Chemie, ebenso wie andere Industriebereiche, vor einem großen Umbruch. Die seit Jahrzehnten prognostizierten Folgen der anthropologischen Umweltschäden durch Ausbeutung von Ressourcen und unkontrolliertem Treibhausgasausstoß des letzten Jahrhunderts fordern bereits seit einigen Jahren ihre ersten Tribute. Hungersnöte durch wetterbedingte schlechtere Ernten, extreme Hitze- und Regenperioden sehen zunehmend die Umkehr dieses irreparablen Wegs der Erderwärmung als wichtigstes Ziel jetziger wie kommender Generationen.<sup>[2]</sup>

Die Anforderungen an chemische Prozesse im Sinne der Nachhaltigkeit wurden von *Anastas & Warner* klar definiert: Sie müssen kosteneffizient, robust, reproduzierbar und skalierbar sein und ein besonderes Augenmerk auf die Atomökonomie legen.<sup>[3]</sup> Die Atomökonomie ist dabei als relatives Maß der Atomeffizienz einer Reaktion zu sehen, bei der die Anzahl aller Atome auf der Eduktseite mit der Gesamtanzahl der Atome im gewünschten Produkt verrechnet wird. Eine gute Möglichkeit, diese Bedingungen zu erfüllen, liegt in der Nutzung von Katalysatoren. Mit diesen lassen sich Reaktionen unter Verwendung einer substöchiometrischen Verbindung über viele Katalysezyklen hinweg durchführen. In der organischen Chemie finden vor allem die Metall-, Organo- und Photokatalyse im industriellen Maßstab Anwendung.<sup>[4]</sup> Im Zuge der letzten Jahre fand allerdings auch eine weitere Art der Katalyse Einzug in industrielle Transformationen: Die Biokatalyse, also die Nutzung von Enzymen für die Transformation organischer Verbindungen.

Die Biokatalyse versucht Enzyme aus ihrem natürlichen Kontext heraus für die Synthese von Bausteinen für die API-Synthese oder Derivatisierung finaler Verbindungen (*late-stage modification*) nutzbar zu machen. Viele Biokatalysatoren zeichnen sich dabei durch ihre inhärente hohe Selektivität und milde Reaktionsbedingungen (wässriges Milieu, physiologische pH-Werte) aus.<sup>[5]</sup> Damit bieten sie wesentliche Vorteile gegenüber klassischen Chemokatalysatoren, die häufig zwar robust und skalierbar sind, aber im Hinblick auf die Selektivität der Reaktion häufig auch nur durchschnittliche Ergebnisse liefern.<sup>[6]</sup> Somit lässt sich das Spektrum traditioneller chemischer Transformationen um selektive oder unter klassischen Bedingungen schwer zu realisierende Umsetzungen unter milden Bedingungen mit Hilfe von Biokatalysatoren erweitern.

Neben der Suche und Charakterisierung neuer Enzyme aus unbekanntem Organismen zur Erweiterung der bisher möglichen Biotransformationen ist auch die Adaption bekannter Enzyme, das *enzyme engineering*, von großer Bedeutung. Dabei wird durch gezielte Änderung einzelner Aminosäuren oder künstlicher Evolutionsreihen im Labor eine Adaption der enzymatischen Reaktivität erreicht. Die Effekte reichen von der Erweiterung des Substratspektrums bis hin zur Änderung der Chemo-, Regio-

oder Enantioselektivität. Die Pionierarbeiten auf diesem Gebiet wurden 2018 anteilmäßig mit dem Nobelpreis für Chemie an *Frances H. Arnold* gewürdigt.<sup>[7-9]</sup>

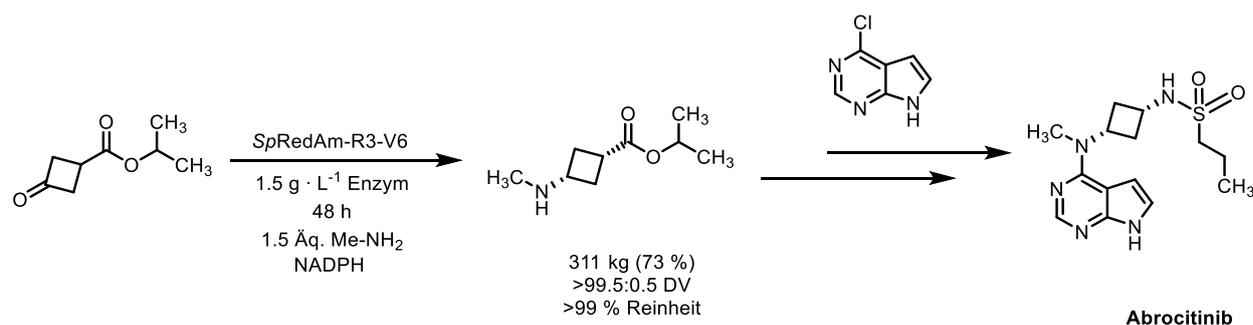
Trotz aller Vorteile, die die Biokatalyse bietet, muss auch sie sich mit den postulierten Bedingungen für eine nachhaltigere Chemie identifizieren können. Viele biokatalytische Umsetzungen im industriellen Maßstab leiden unter hohen Katalysatorproduktionskosten, die die Produktivität des Gesamtprozesses beeinträchtigen.<sup>[10]</sup> Enzyme können nicht einfach synthetisiert werden, sondern erfordern die Nutzung homologer oder heterologer Produktion in geeigneten Wirtsorganismen. Häufig erfordert der Biokatalysator auch eine Isolation aus der verwendeten Zelle, sodass besonders im Bereich des *downstream processing* neue Kosten anfallen. Einige Enzyme benötigen auch Cofaktoren, die kostenintensiv in der Anschaffung sind oder die Atomökonomie der Reaktion merklich verschlechtern. Daher reicht es nicht aus, eine Enzymfamilie oder ein bestimmtes Enzym für eine Transformation zu nutzen, sondern das Portfolio möglicher Transformationen und Reaktionswege zu erweitern.<sup>[11]</sup>

### 1.1.2 Biotransformationen als „grüne“ Alternative zur klassischen Chemie?

In klassischen Syntheseverfahren werden häufig Reagenzien verwendet, die eine gesonderte Entsorgung erfordern oder gesundheitsschädlich sind. Die Nutzung von organischen Lösungsmitteln in der Aufarbeitung erschwert die Maximierung der Atomökonomie und Wirtschaftlichkeit chemischer Prozesse zusätzlich. Für Reaktionen, die über klassische Methoden nur schwer realisierbar sind, werden bereits seit Jahrzehnten Biokatalysatoren als geeignetere Alternative verwendet.<sup>[12, 13]</sup> So verwenden die meisten Waschmittelhersteller Lipasen in ihren Produkten, um fetthaltige Verunreinigungen von Kleidungsstücken zu entfernen.<sup>[14]</sup> In der Kraftstoffindustrie werden Enzyme wie Cellulasen verwendet, um Lignocellulose, ein Verwertungsmaterial der Forstwirtschaft, in dessen Zuckerbausteine zu spalten und anschließend mittels Fermentation mit Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* zu Bioethanol umzuwandeln.<sup>[15]</sup>

Dennoch ist für die große Mehrheit pharmazeutischer Prozesse keine Biokatalyse implementiert, obwohl sich Gelegenheiten dafür bieten würden. Ein wichtiger Grund ist die schwierige Hochskalierung enzymatischer Reaktionen.<sup>[16]</sup> Da die Produktion von Enzymen im Labormaßstab zu geringe Mengen Katalysator für einen Prozess liefert, sind Fermentationen notwendig, um das nötige Kultivierungsvolumen für eine stabile Produktion zu ermöglichen. Da solche Prozesse selbst Optimierungen erfordern, rentieren sich in vielen Fällen biokatalytische Transformationen im industriellen Kontext erst, wenn das gewünschte Produkt anderweitig nicht synthetisierbar ist oder andere Anforderungen, wie ein sehr hoher Enantiomerenüberschuss (> 99 %), mit chemischen Methoden nicht zugänglich sind.

Dass solche Bedingungen nicht die einzige Voraussetzung sind, unter denen Biokatalyse in Betracht gezogen werden kann, konnten Kumar *et al.* eindrucksvoll demonstrieren.<sup>[17]</sup> Im Zuge der Synthese von Abrocitinib, eines Janus-Kinase-I-Inhibitors (JAK1), der für die Behandlung von atopischer Dermatitis verwendet werden kann, konnte eine junge Enzymfamilie, die reduktiven Aminasen (RedAms), Anwendung im industriellen Kontext finden.<sup>[17]</sup> Durch eine Kombination aus bioinformatischen Analysen zur Bindung und Katalyse des Enzyms und biochemischen *screening*-Verfahren konnte aus einer Wildtyp-Bibliothek von etwa 80 Enzymen über vier Runden gerichteter Evolution eine Variante der RedAm aus *Streptomyces purpureus* generiert werden, mit der die Synthese des Bausteins Isopropyl-(1*s*,3*s*)-3-(methylamino)cyclobutan-1-carboxylat aus der direkten reduktiven Aminierung des Vorläufer-Ketons gebildet werden kann (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Syntheseweg zum Wirkstoff Abrocitinib mit dem Schlüsselschritt der Vorstufensynthese von *cis*-Isopropyl-3-(methylamino)cyclobutan-1-carboxylat katalysiert durch die reduktive Aminase *SpRedAm-R3-V6* nach Kumar *et al.*<sup>[17]</sup>**

Das verwendete Enzym ist das Ergebnis einer komplementären bioinformatischen und biochemischen Optimierung basierend auf vier Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Enzym *SpRedAm* aus *Streptomyces purpureus*. Die finale Transformation erfolgte unter Prozessbedingungen unter Einsatz eines Glucose-Dehydrogenase-(GDH)-Recyclingsystems zur Regeneration des NADPH-Cosubstrats für das Enzym.

Dabei wurden nicht nur exzellente Diastereomerenverhältnisse von  $>99.5:0.5$ , Umsätze von 92.5 % und Ausbeuten von 73 % erzielt, sondern der gesamte Prozess auch im 230 kg-Maßstab in Pilotanlagen für die Massenproduktion etabliert. Durch die Verwendung eines Cofaktor-Recyclingsystems für NADPH (GDH-Recycling) und die Verwendung von zellfreiem Lysat konnten die Produktionskosten und Prozesskosten für die Verwendung des Enzyms als Biokatalysator minimiert werden.<sup>[17]</sup>

Für die Optimierung industrieller Prozesse wird in Zukunft nötig sein, verschiedene Katalysemethoden zu kombinieren, um die Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit chemischer Transformationen zu erhöhen. Hierfür ist es besonders wichtig, energieineffiziente oder besonders umweltschädliche Prozesse in der Synthese zu überdenken und an moderne Anforderungen anzupassen.<sup>[18]</sup>

### 1.1.3 Zielsetzung

Halogenierungen stellen eine wesentliche Modifikation in der Synthese und Derivatisierung von Wirkstoffen dar. Gängige Methoden der Halogenierung umfassen die Nutzung elementarer Halogene oder die Nutzung daraus abgeleiteter elektrophiler Spezies, wie *N*-Bromsuccinimid (NBS), *N*-Chlorsuccinimid (NCS) oder Hypohalogenite. Im Rahmen dieser Arbeit soll die enzymatische Halogenierung organischer Verbindungen untersucht werden. Hierzu soll die Familie der Haloperoxidasen im Arbeitskreis etabliert werden.

Nach der Etablierung eines Produktionsprotokolls für Haloperoxidasen in *Escherichia coli* soll eine geeignete Methode zur Bestimmung der Haloperoxidase-Aktivität entwickelt werden. Mit Hilfe dieser Methode sollen literaturbekannte wie neue Enzyme identifiziert und biochemisch charakterisiert werden. Geeignete Vertreter dieser Enzymfamilie sollen dann zur Halogenierung verschiedener Substrate eingesetzt werden. Hierbei soll die Halogenierungseffizienz der enzymatischen und chemischen Reaktion miteinander verglichen werden. Als Weiterführung der enzymatischen Reaktion im *batch* soll die Immobilisierung und Verwendung von Haloperoxidasen im kontinuierlichen Durchfluss (englisch *continuous flow*) untersucht werden. Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen sollen als Startpunkt für mögliche Reaktionssequenzen und –kaskaden mit Haloperoxidasen dienen.

## 2 KENNTNISSTAND

### 2.1 Chemie im Wandel

#### 2.1.1 Natur- und Wirkstoffe

Die Grundlage für die Artenvielfalt unseres Planeten liegt in der Fähigkeit, über Generationen hinweg Anpassungen zu evolvieren, mit denen künftige Generationen dieser Art gegen fordernde Umwelteinflüsse gewappnet sind. Dieser Zusammenhang ist auf die Beobachtungen Charles Darwins und Russel Wallaces zurückzuführen, die den Selektionsdruck als treibende Kraft der Evolution identifizierten.<sup>[19]</sup> Die Weiterentwicklung der Menschheit führte in den letzten Jahrtausenden dazu, dass sich die Art des Selektionsdrucks auf Menschen veränderte. Durch die Einführung, Verbreitung und Intensivierung der Landwirtschaft haben sich neue Lebensbedingungen ergeben.<sup>[20]</sup> Trotz einer Steigerung der Nahrungsmittelproduktion ist die Landwirtschaft aber auch mit einer weniger nährstoffreichen (und manchmal toxischen) Ernährung, einer sesshafteren und beengteren Lebensweise (mit einer erhöhten Exposition gegenüber Krankheitsüberträgern und einer höheren Rate an Infektionskrankheiten), einer beruflichen Spezialisierung (mit der Zunahme von repetitiven Belastungen und Verletzungen) und einer immobilen Konzentration von Ressourcen (wie Gebäuden und Bewässerungssystemen, die mit Verteidigung, Konflikten und gewaltsamen Verletzungen einhergehen), verbunden.<sup>[21]</sup> Durch diese Änderung der Lebensweise ergaben sich neue Anforderungen zur Erhaltung der Gesundheit. Die bessere medizinische Versorgung und Entwicklung im Bereich der Gesundheitsforschung trugen maßgeblich dazu bei, diesen neuen Lebensbedingungen entgegenzutreten. Doch die höhere Lebenserwartung wie auch die Entstehung gefährlicher Pathogene, schädlicher Umwelteinflüsse oder klimabedingter Notstände und Katastrophen stellt die Menschheit vor immer neue gesundheitliche und umweltbezogene Probleme. Aus dem Weltgesundheitsbericht der WHO aus dem Jahr 2019 geht hervor, dass Krankheiten für 91.6 % aller dokumentierten Todesfälle verantwortlich sind. Während der Anteil übertragbarer, maternaler, perinataler oder ernährungsbezogener Krankheiten im Vergleich zum Jahr 2000 um 12.3 % gesunken ist, stieg der Anteil nicht-übertragbarer Krankheiten wie Diabetes oder kardiovaskulärer Erkrankungen um 12.8 %.<sup>[22]</sup> Die Notwendigkeit neue Mittel zur Behandlung oder gar Heilung alter wie neuer Krankheitsbilder zu finden, treibt die Entwicklung der Pharmaindustrie weiter an.

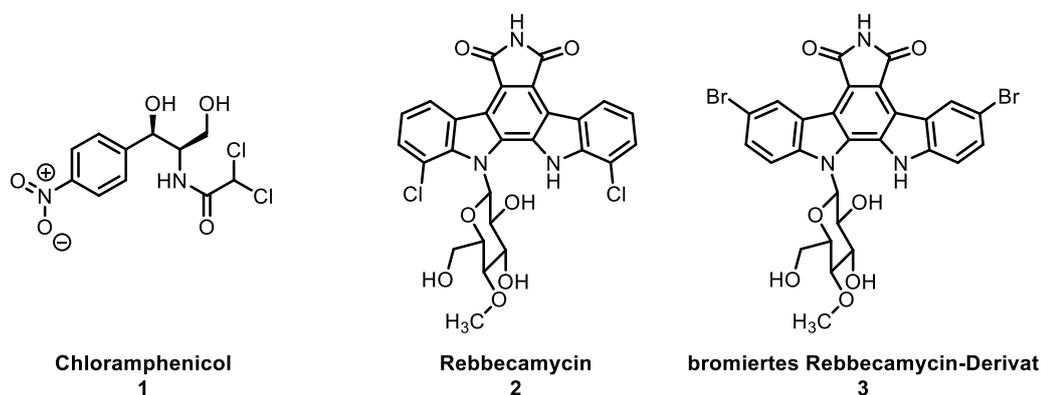
Viele heutzutage erhältliche Wirkstoffe sind meist das Produkt biomimetischer Ansätze. Bereits in der Antike war die heilende Wirkung bestimmter Pflanzenarten bekannt.<sup>[23-25]</sup> Im Zuge der modernen Forschung konnte die heilende Wirkung von Pflanzen und anderer Medikamente meist auf die Anwesenheit eines bestimmten Naturstoffs zurückgeführt werden. Naturstoffe sind meist Produkte des sogenannten Sekundärmetabolismus und bieten dem Wirtsorganismus meist einen direkten oder indirekten Selektionsvorteil gegenüber anderen Arten. Eine Vielzahl dieser Naturstoffe stammt dabei aus Pflanzen, da diese durch ihre sessile Lebensform abhängig von einer gut besetzten ökologischen Nische sind und somit über einen stark ausgeprägten Sekundärmetabolismus verfügen.<sup>[26, 27]</sup>

Die Wirkung von Naturstoffen ist nicht auf einen einzigen molekularen Mechanismus zurückzuführen. Sie können als Inhibitoren bestimmter Rezeptorproteine wie Schmerzrezeptoren dienen, Signalproteine stimulieren oder als Antibiotikum, Pestizid oder Herbizid dienen.<sup>[28, 29]</sup>

## 2.1.2 Halogene – Bausteine in der Wirkstoffentwicklung

Der Effekt eines Natur- oder Wirkstoffs ist meist auf spezifische Interaktionen mit einer Zielstruktur zurückzuführen. Die Grundlage dieser Interaktion ist vielfältig, kann aber in den meisten Fällen auf nicht-kovalente Bindungen zurückzuführen sein.<sup>[30]</sup> In der Wirkstoffoptimierung ist daher das Interesse groß, gezielt funktionelle Gruppen im Molekül einzusetzen, die bestimmte Interaktionen mit der molekularen Zielstruktur ermöglichen. Eine der vielseitigsten funktionellen Gruppen in der Synthese und Derivatisierung solcher Moleküle ist die Halogengruppe.<sup>[31]</sup> Obwohl die meisten Naturstoffe nicht halogeniert sind, finden sich Halogene in nahezu jeder Klasse der Sekundärmetabolite wieder.<sup>[32]</sup> Eines der bekanntesten Beispiele für einen halogenierten Naturstoff stellt Chloramphenicol (**1**) dar (siehe Abbildung 2).

Als Antibiotikum, das in einer kompetitiven Form die Peptidyltransferase-Aktivität bakterieller Ribosome inhibiert, findet es sowohl in medizinischen wie wissenschaftlichen Zwecken Anwendung.<sup>[33]</sup> Im Zuge der Charakterisierung dieses Stoffes wurde ersichtlich, dass die Dichloracetylgruppe eine entscheidende Rolle für dessen Bioaktivität spielt.<sup>[34]</sup> Ein weiteres Beispiel eines halogenierten Naturstoffs ist Rebecamycin (**2**). Die Chlorsubstituenten dieses Moleküls tragen ebenfalls zur schwachen Inhibierung der Topoisomerase I bei, weshalb der Stoff als Kandidat für die Behandlung von Tumoren untersucht wurde.<sup>[35]</sup> Eine Derivatisierung mit Bromsubstituenten **3** führte zur Identifizierung noch potenterer Strukturen für die Krebstherapie (siehe Abbildung 2).<sup>[36]</sup>



**Abbildung 2: Beispiele für halogenierte Naturstoffe mit relevanter biologischer Aktivität**

Chloramphenicol (**1**) besitzt zwei Chlorsubstituenten und konnte erstmals 1947 aus *Streptomyces venezuelae* gewonnen werden.<sup>[33]</sup> Rebecamycin (**2**) gehört zur Familie der Indolcarbazole und besitzt zwei Chlorsubstituenten in 7-Position des Indolrings.<sup>[35]</sup> Es wurde aus dem Organismus *Lechevaliera areocolonigenes* isoliert. Ein potentes Derivat stellt eine 5,5-dibromierte Variante **3** des Rebecamycins dar.<sup>[36]</sup>

Wie in einer Studie aus dem Jahr 2014 ersichtlich wurde, finden sich insgesamt etwa 35 % der Wirkstoffkandidaten in der Entdeckungsphase in einer halogenierten Form wieder, während 36 % der Kandidaten in der klinischen Phase II über mindestens einen Halogensubstituenten verfügen. In 26 % der auf dem Markt erhältlichen Wirkstoffe finden sich am Ende aller Testphasen Halogensubstituenten wieder.<sup>[37]</sup>

Neben der biologischen Aktivität, die Halogene vermitteln können, finden sie eine breite Anwendung in der organischen Chemie als Synthesewerkzeug. Durch die latente Polarisierung einer Kohlenstoff-Halogenbindung kann eine Vielzahl chemischer Transformationen durch Anwesenheit eines Halogens eingeleitet werden. Um die Rolle von Halogensubstituenten in organischen Verbindungen

## Kennnisstand

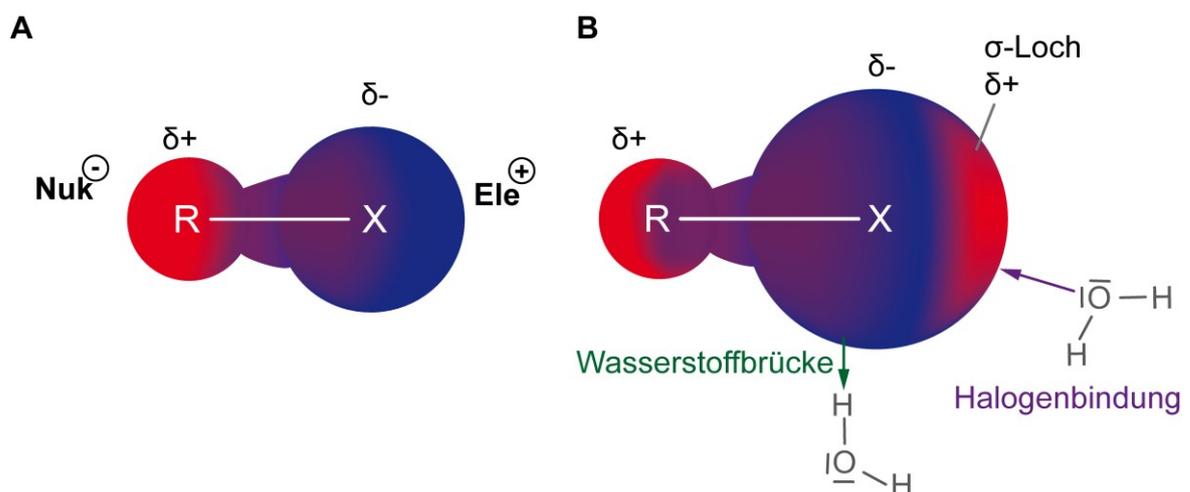
besser zu verstehen, sollen im folgenden Abschnitt die stereoelektronischen Effekte von Halogenen und deren Anwendung in der Wirkstoffsynthese näher beleuchtet werden.

## 2.2 Halogene – Eigenschaften und Anwendung

### 2.2.1 Stereoelektronische Eigenschaften von Halogenen

Halogene zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus: Ihre Größe kann relativ zum Kohlenstoff drastisch höher sein, je höher die Periode des betrachteten Halogens ist, und ihre tendenziell hohe Elektronegativität, die in den meisten Fällen zu einer negativen Partialladung am Halogen führt. In der Regel erhöht die Anwesenheit eines Halogens, ausgenommen von Fluor, die Sperrigkeit einer Verbindung. So können beispielsweise Taschen im aktiven Zentrum blockiert oder die Membrandurchlässigkeit erhöht werden, was bei der Absorption von Stoffen bei einer oralen Vergabe oder der Penetration der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung ist.<sup>[38]</sup>

Die Polarisierbarkeit der Kohlenstoff-Halogenbindung zeigt verschiedene Ausmaße, abhängig vom betrachteten Halogen. Fluor als elektronegativstes Element und kleinstes Halogen führt zu einer starken Polarisierung der Bindung, während größere Halogene wie Iod eine schwächere Polarisierung durch die relative Größe des Iods zur Folge haben. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass diese traditionell vermittelte Vorstellung von Halogenen in Kohlenwasserstoffbindungen aus elektronischer Sicht verfeinert werden muss (siehe Abbildung 3).<sup>[39]</sup>



**Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Kohlenstoff-Halogen-Bindung**

**A:** Der organische Rest **R** verfügt über eine geringere Elektronegativität als das Halogen **X**. Dadurch werden die Bindungselektronen verstärkt zum Halogen gezogen und die Bindung wird polarisiert. Es kommt zu einem Bereich geringerer Elektronendichte, symbolisiert durch rote Flächen, und einem Bereich hoher Elektronendichte, symbolisiert durch blaue Flächen. Dieser Elektronendichtegradient führt somit zu einer positiven Partialladung am Kohlenstoff **R**, symbolisiert durch  $\delta^+$ , und einer negativen Partialladung am Halogen **X**, symbolisiert durch  $\delta^-$ . Nukleophile (**Nuk**<sup>-</sup>) können somit am Kohlenstoff angreifen, während Elektrophile (**Ele**<sup>+</sup>) vom Halogen angegriffen werden können. **B:** Darstellung des Sigma-Lochs. Bei Halogenen höherer Periode entsteht durch die große Entfernung zwischen positivem Atomkern und negativ geladenen Bindungselektronen eine schwächer polarisierte Kohlenstoff-Halogen-Bindung. Neben der positiven Partialladung am Kohlenstoff bildet sich am Halogen selbst an der distalen Seite der Bindung ein Bereich des Elektronendichtemangels, der positiv partial geladen ist. Dieser Bereich wird Sigma-Loch genannt und erlaubt Wechselwirkungen mit nukleophilen Spezies wie Sauerstoff im Wassermolekül. Der Bereich hoher Elektronendichte kann mit Protonen anderer Verbindungen oder ähnlicher elektrophiler Spezies Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Die den Halogenen zugrundeliegenden p-Orbitale führen bei zunehmender Größe zu einer Abschwächung der Polarisierbarkeit, da die Elektronendichte aufgrund der größeren Orbitale mit steigender

Periode abnimmt. Im Vergleich zwischen Fluor und Iod wird dieser Unterschied am besten deutlich. Fluor hat bedingt durch seine Größe eine extrem hohe Elektronendichte, da der Atomkern eine starke Attraktion auf die relativ nahen Elektronen der äußeren Orbitale ausüben kann und damit Bindungselektronen zu sich zieht. Somit entsteht eine strikte Ladungstrennung zwischen Kohlenstoff und Fluor, wodurch der Kohlenstoff in der Bindung eine starke positive Teilladung erhält (siehe Abbildung 3 A). Im Vergleich dazu zeigt Iod eine schwächere Polarisierung der Kohlenstoff-Iod-Bindung. Durch den großen Atomradius ergibt sich eine relativ große Entfernung zwischen den Bindungselektronen der höchsten Orbitale und dem Atomkern. Diese Entfernung resultiert in einer geringeren Attraktion der Elektronen und damit einhergehend einer labileren Kohlenstoff-Halogen-Bindung.<sup>[38]</sup> Bedingt durch den großen Abstand der Protonen und Elektronen in Halogenen höherer Periode zeigt sich eine Besonderheit. Kohlenstoff übt in solchen Fällen eine stärkere Anziehung zu den Bindungselektronen des Iods aus, was zu einer verschobenen Elektronenverteilung am Iod führt. Neben einer ringförmigen Verteilung der Elektronen des Iods um den Atomkern bildet sich ein Gebiet eines Elektronenmangels an der distalen Seite gegenüberliegend zur Bindung. Dieser Bereich kann als eine Zone mit positiver Partillladung verstanden werden und erlaubt Interaktionen mit nukleophilen Verbindungen. Der Effekt wird Sigma-Loch (englisch *sigma-hole*) genannt und tritt mit zunehmender Periode des Halogens stärker auf (siehe Abbildung 3 B).<sup>[37]</sup> Die daraus resultierende Ambivalenz des Halogens als Bereich partiell negativer und positiver Ladung führt zu einer besonderen Interaktion, der Ausbildung sogenannter Halogenbindungen (englisch *halogen bonds*). Diese stehen in direkter Konkurrenz zu Wasserstoffbrückenbindungen, da sie in der Lage sind den partiell negativ geladenen Sauerstoff von Wassermolekülen und anderen hydroxylierten Verbindungen wie Serin anzuziehen und damit die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Wasserstoffen und negativ partiell geladenen Verbindungen behindern.<sup>[40]</sup> Neben Sauerstoff können auch Stickstoff- und Schwefelhaltige Verbindungen von dieser Bindung beeinflusst werden.<sup>[41]</sup> Auf diesen Effekt werden viele pharmakologische Eigenschaften von Halogenen zurückgeführt, da Wasserstoffbrückenbindungen eine wesentliche Rolle in der Faltung und Interaktion von Aminosäuren in Proteinen mit Liganden oder anderen Bereichen des Proteins spielen.<sup>[42, 43]</sup> Neben pharmakologischen Effekten erlaubt der Effekt des Sigma-Lochs eine Substitution des Halogens mit anderen nukleophilen Verbindungen, da die Bindung großer Halogene und Kohlenstoffe weniger polarisiert und damit labiler ist ( $\Delta H$ : C-Cl = 339 kJ · mol<sup>-1</sup>; C-I = 218 kJ · mol<sup>-1</sup>).<sup>[44]</sup>

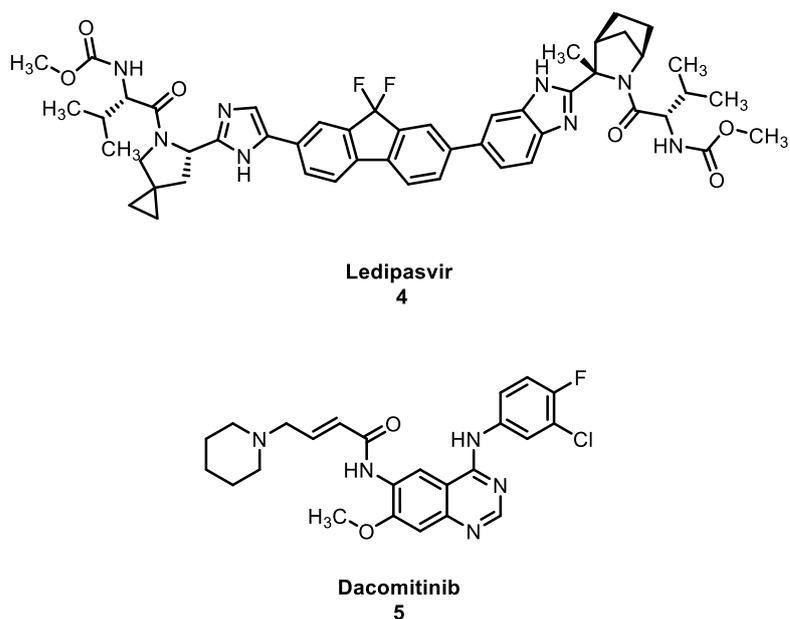
### 2.2.2 Die Rolle verschiedener Halogene in der Wirkstoffforschung

Die meisten halogenierten Naturstoffe sind marinen Ursprungs, wobei einige Vertreter auch aus Pflanzen und Insekten isoliert werden konnten.<sup>[45]</sup> Obwohl Chlor in größerer Menge im Meerwasser vorkommt als Brom, sind bromierte Verbindungen die häufigsten Naturstoffe.<sup>[38]</sup> Der Grund für diesen scheinbaren Widerspruch ist das geringere Oxidationspotenzial des Broms im Vergleich zum Chlor (1.098 V vs. 1.396 V Standardpotenzial).<sup>[46]</sup> Halogene kommen unabhängig von der Form in 40 % aller Arzneimittel vor, die in klinischen Studien getestet werden.<sup>[39, 47, 48]</sup> Abgesehen davon, dass Halogenierungen ein wichtiges Strukturmotiv in Naturstoffen und damit auch in den daraus resultierenden Wirkstoffen sind, spielen sie auch bei der Synthese vieler Wirkstoffe eine wichtige Rolle.

Entscheidend für die Eigenschaften eines halogenhaltigen Moleküls ist die Art des Halogens. Fluor stellt mit 57 % Anteil aller halogenierten Wirkstoffe das prominenteste Halogen dar.<sup>[48]</sup> Aufgrund seiner ähnlichen Größe im Vergleich zu Wasserstoff (Atomradius H: 25 pm; F: 50 pm) und der extremen Elektronegativität sind C-F-Bindungen in besonderer Weise polarisiert und machen Fluor zu einem

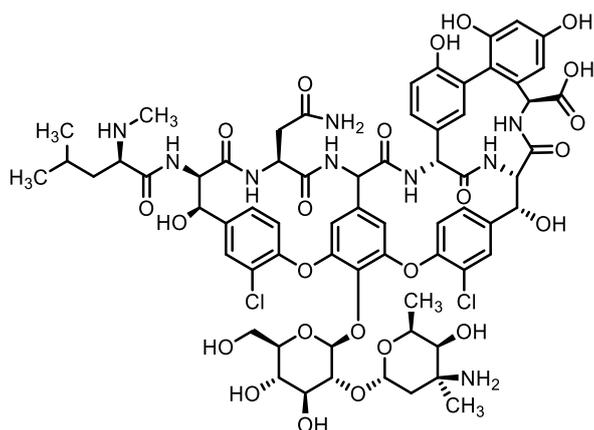
schwachen Halogenbindungsakzeptor und guten Wasserstoffbindungsakzeptor.<sup>[49, 50]</sup> Die kovalente Fluorbindung ist sehr stark ( $456 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  für  $\text{CF}_4$ ), so dass diese Bindungen im Körper, wenn überhaupt, nur unter extremen und kostspieligen Bedingungen gespalten werden können.<sup>[51]</sup> Dies erhöht die Halbwertszeit von Wirkstoffen im Körper (und in der Umwelt) im Vergleich zu ihren nicht-fluorierten Pendanten.

Abgesehen von der Veränderung der molekularen Eigenschaften von Molekülen wird  $^{18}\text{F}$  als gängige radioaktive Isotopenmarkierung für die *in vivo* Untersuchung von Proteinfunktionen und Enzymkatalyse verwendet.<sup>[52]</sup> Von allen halogenierten Wirkstoffen ist Ledipasvir (**4**) eines der meistverkauften Medikamente, das zur Behandlung von Hepatitis C verabreicht wird.<sup>[53]</sup> Ein weiterer wichtiger Wirkstoff ist Dacomitinib (**5**), ein einfach-fluoriertes Medikament, das sich in klinischen Studien zur Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs befindet (siehe Abbildung 4).<sup>[54]</sup>



**Abbildung 4: Chemische Struktur von Ledipasvir (4) und Dacomitinib (5) als Beispiele für fluorierte Wirkstoffe**

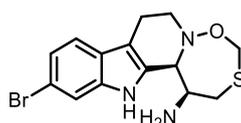
Chlor ist mit 38 % das zweithäufigste Halogen in halogenierten Arzneimitteln.<sup>[48]</sup> Aufgrund seiner Größe ist es ein mäßiger Halogenbindungsakzeptor, bleibt dabei aber innerhalb einer Bindung mit Kohlenstoff stabil, wenn es als Bindungspartner eingeführt wird ( $327 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  für  $\text{CCl}_4$ ).<sup>[51]</sup> Chlor verändert Volumen und Form einer Verbindung und ermöglicht die Positionierung in tiefen Hohlräumen in Proteinen.<sup>[55]</sup> Diese Eigenschaften machen Chlor zu einer interessanten Option für die Funktionalisierung von Heterozyklen. Eine der bekanntesten natürlichen Verbindungen auf Chlorbasis ist Rebeccamycin (**2**) (siehe Abbildung 2), ein schwacher Topoisomerase-I-Inhibitor, der hohe Antitumoreigenschaften aufweist.<sup>[35]</sup> Vancomycin (**6**), ein zweifach-chloriertes Antibiotikum, zeigte ähnlich wie Chloramphenicol (**1**) einen 30-50 %-igen Verlust der biologischen Aktivität bei fehlender Chlorierung (siehe Abbildung 5).



**Vancomycin**  
6

**Abbildung 5: Chemische Struktur des Antibiotikums Vancomycin (6)**

Bromierte Verbindungen sind in Arzneimitteln mit 4 % aller halogenierten Verbindungen selten zu finden.<sup>[48]</sup> Dies scheint auf den ersten Blick widersprüchlich, da die meisten halogenierten Naturstoffe bromiert sind. Aufgrund der geringeren Polarisierung der Kohlenstoff-Brom-Bindung und der größeren Masse bildet Brom in der Regel längere und damit labilere Bindungen, die für die meisten Wirkstoffkandidaten nicht für eine angemessene Hemmung geeignet sind ( $272 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  für  $\text{CBr}_4$ ).<sup>[51]</sup> Diese Eigenschaften erlauben jedoch eine leichtere Oxidation von Brom und folglich einen leichteren Einbau in Moleküle als bei Chlor ( $1.098 \text{ V}$  vs.  $1.396 \text{ V}$  Standardpotenzial).<sup>[46]</sup> Obwohl es in der Pharmakologie überwiegend chlorierte und fluorierte Wirkstoffe gibt, sind einige bromierte Verbindungen bekannt, die eine relevante Bioaktivität aufweisen, wie z.B. Eudistomin K (7), das für die Behandlung von Polio und Herpes geeignet ist (siehe Abbildung 6).<sup>[56]</sup>



**Eudistomin K**  
7

**Abbildung 6: Chemische Struktur des Wirkstoffes Eudistomin K (7)**

Iod ist das am seltensten vertretene Halogen (1 %) innerhalb der Wirkstoffe.<sup>[48]</sup> Aufgrund seiner relativen Größe zu Kohlenstoff und geringeren Elektronegativität als andere Halogene sind seine mit den Kohlenstoffatomen gebildeten Bindungen labiler als die des Broms, da sie durch die geringere Polarisierung und große Bindungslängen leicht abgespalten werden können.<sup>[51]</sup> Aus diesem Grund findet Iod vorzugsweise Anwendung in der Synthese.

### 2.2.3 Nutzung von Halogenen in der Synthesechemie

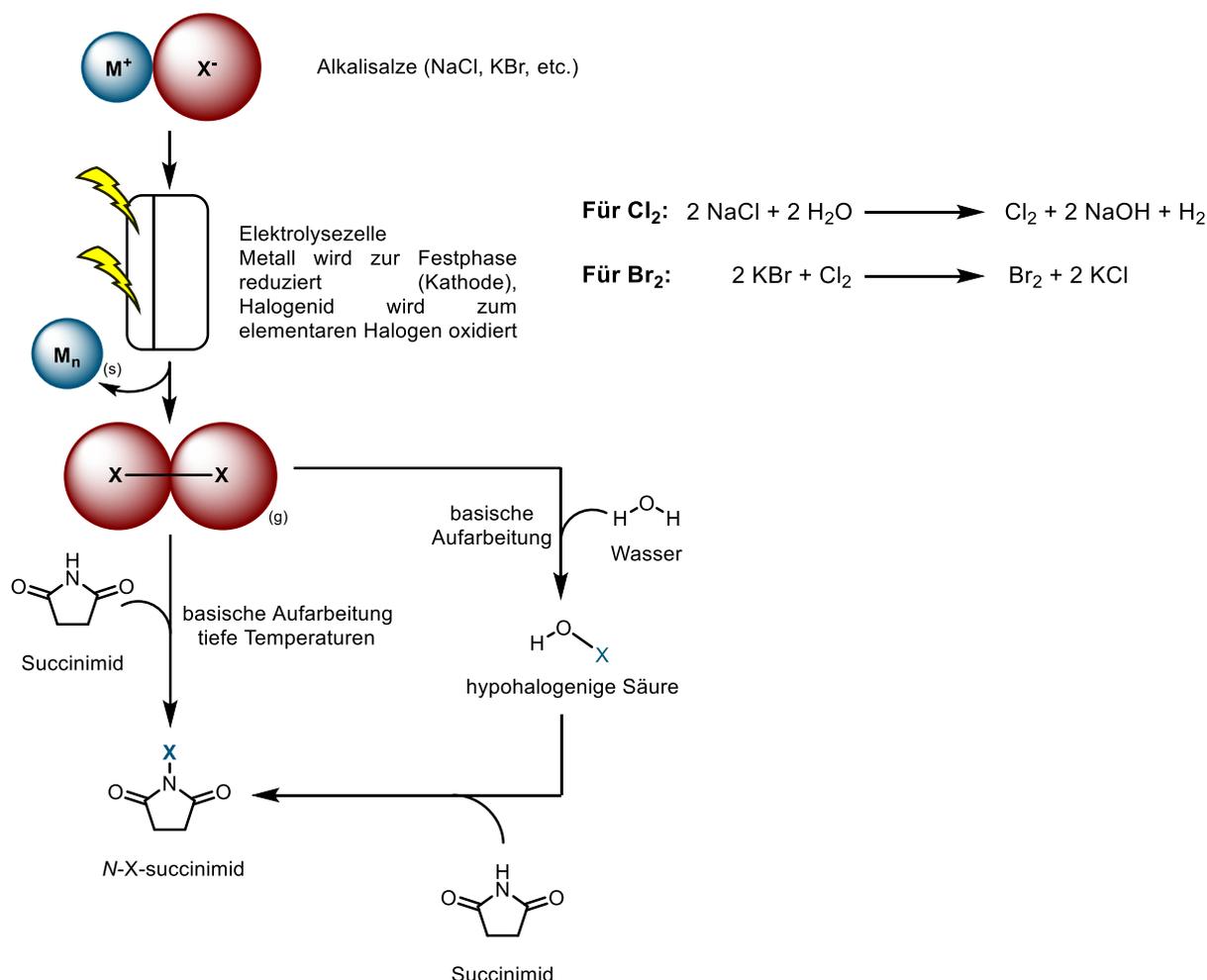
Sowohl Brom als auch Iod sind aufgrund ihrer labilen kovalenten Bindungen als funktionelle Bestandteile in Wirkstoffen selten. Es sind aber gerade diese Eigenschaften, welche die Halogene höherer Perioden als wertvolle Instrumente für die Wirkstoffsynthese auszeichnen.

Bereits im Jahr 1940 wurde ein Patent zur Herstellung von hypohalogenigen Säuren eingereicht, welches 1944 patentiert wurde. C. C. Crawford und T. W. Evans beschrieben ein Verfahren zur Herstellung halogenidfreier Lösungen von hypochloriger Säure. Diese Halogenierungsreagenzien wurden in der Industrie beispielsweise zur Herstellung von Halogenhydrinen aus ungesättigten organischen Verbindungen verwendet.<sup>[57]</sup> 1993 wurde ein weiteres Patent zur Herstellung konzentrierter Natriumhypochlorit-Aufschlammungen [35 % (*w/v*)] angenommen.<sup>[58]</sup> Das Patent beschrieb erstmalig ein Verfahren zur Herstellung hochreiner Hypochlorit-Aufschlammungen. Allen Verfahren ist die Nutzung der gleichen Ausgangsstoffe gemeinsam.

Der erste Schritt ist die Solvatisierung von molekularem Chlor in Wasser, um hypohalogenige Säure zu erhalten.<sup>[38]</sup> Alternativ kann die Lösung von Natriumhydroxid und Chlor in Wasser betrieben werden, um Natriumhypochlorit zu erhalten. Bei den meisten Verfahren, die im industriellen Maßstab durchgeführt werden, kommt es dabei jedoch zu Verunreinigungen mit Natriumchlorid- und Natriumhydroxidresten. Chlor selbst wird dabei durch das Chloralkaliverfahren gewonnen, bei dem durch die Elektrolyse von Natriumchlorid molekulares Chlorgas entsteht. Dieses Verfahren ist industriell großflächig ausgelegt und bildet den ersten Schritt in der Produktion anderer Halogenierungsreagenzien, darunter auch Brom. Hierfür wird das aus der Elektrolyse gewonnene Chlorgas für die Oxidation von Kaliumbromid in wässriger Lösung verwendet, wodurch elementares Brom und Kaliumchlorid gewonnen werden. Bromid kann dabei aus salzhaltigem Meerwasser und Tiefsee- bzw. Salzseewasser gewonnen werden, die für die Darstellung von Brom direkt eingesetzt werden.<sup>[59]</sup>

Ähnliche Verfahren werden für die Herstellung von Natriumbromat verwendet. Natriumbromat hat zwar den Nachteil, ein starkes Oxidationsmittel zu sein, kann deshalb aber für die Bromierung aromatischer Verbindungen verwendet werden.<sup>[60-62]</sup> Die Herstellung von stabiler hypobromiger Säure ist eher schwierig, da sie leicht zu Bromat oxidiert. Hier erfolgt die Herstellung ausgehend von hypochloriger Säure oder einem modifizierten Chlorit.<sup>[63]</sup>

Für viele Halogenierungen im Labormaßstab wurden elektrophile Spezies mit labilen Halogenbindungen synthetisiert. Diese sind in der Lage, als starke Elektrophile Reaktionen mit nukleophilen Molekülen einzugehen und diese zu halogenieren, ohne dabei mit den stark toxischen Halogengasen arbeiten zu müssen.<sup>[64]</sup> Die dafür am häufigsten verwendeten Halogenierungsmittel sind *N*-Bromsuccinimid (NBS) und *N*-Chlorsuccinimid (NCS). Beide Verbindungen werden ebenfalls aus molekularen Halogenen oder hypohalogenigen Säuren synthetisiert.<sup>[65]</sup> Generell haben nahezu alle Halogenierungsreagenzien ihren Ursprung in molekularen Halogengasen, die durch kostenintensive Verfahren wie die Halogenalkali-Elektrolyse aus Halogenidsalzen hergestellt werden (siehe Abbildung 7).



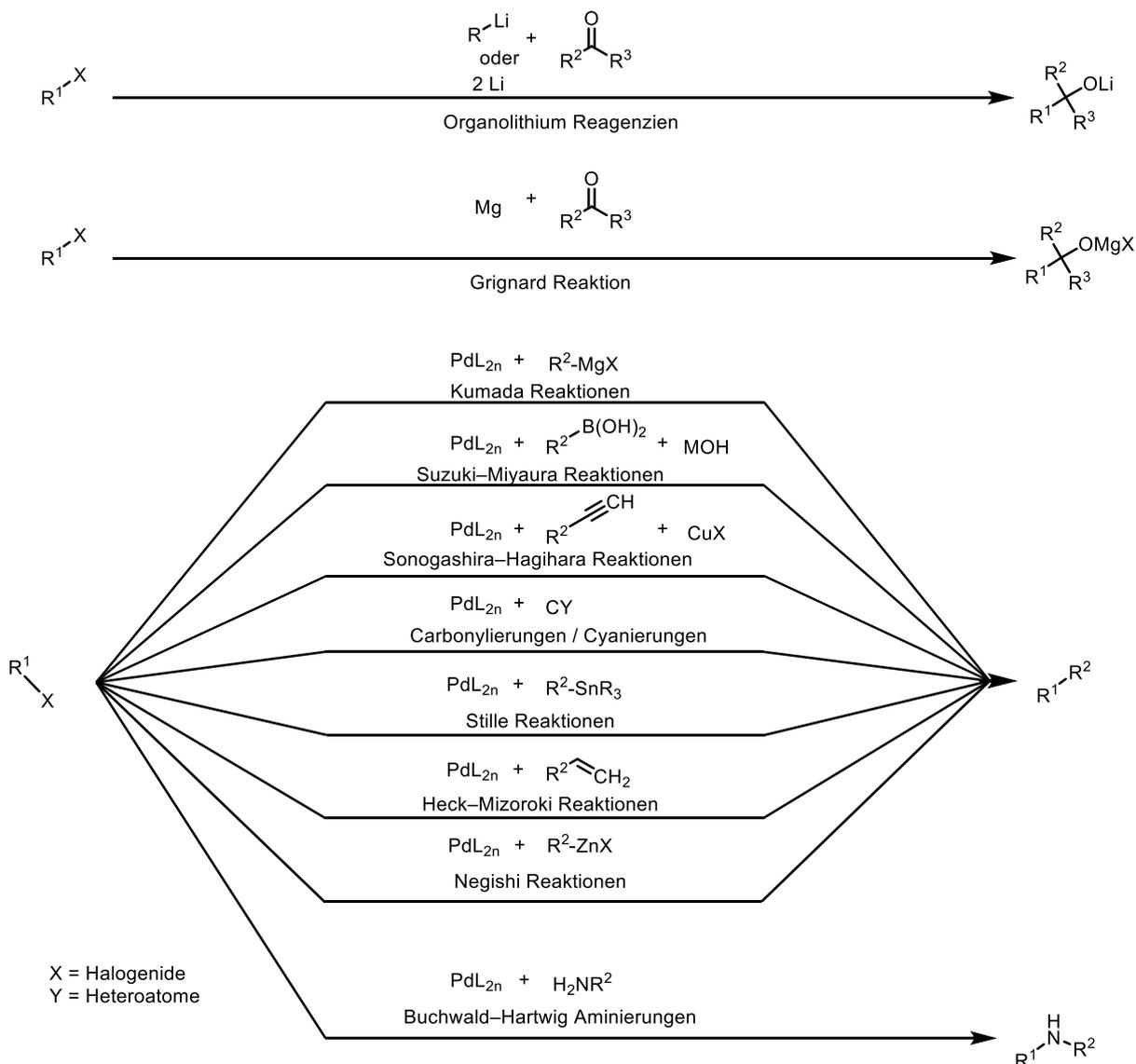
**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Halogen-Alkali-Prozesses zur Herstellung elementarer Halogene und Derivate**

Für alle Elektrolyse-Prozesse wird ein Alkalisalz des entsprechenden Halogens eingesetzt und mit Hilfe einer Elektrolysezelle in reduziertes Metall (an der Kathode) und oxidiertes Halogen (als molekulares Gas) gespalten. Anschließend kann die Derivatisierung des Halogens direkt oder bei Bedarf unter basischen Bedingungen und tiefen Temperaturen zu Succinimid-Derivaten (*N*-X-succinimid) oder bei basischem pH und Wasserzugabe zu hypohalogenigen Säuren erfolgen. Alle drei Arten von Reagenzien sind moderate bis starke Oxidationsmittel und können als Halogenierungsreagenz verwendet werden.

Diese halogenierenden Verbindungen können für die Synthese komplexer Wirkstoffe verwendet werden. Die meisten Halogenierungsreagenzien verfügen allerdings nur über beschränkte Regio- und nahezu keine Stereoselektivität, weshalb Halogenierungen selten in späten (diastereoselektiven) Syntheseschritten vorkommen, sondern eher früh in der Wirkstoffsynthese eingebaut werden müssen.<sup>[66-68]</sup>

Neben der Halogenierung als gezielte Funktionalisierung werden diese als vorbereitender Schritt für weitere Modifikationen eingesetzt. Sowohl im akademischen wie auch im industriellen Bereich der Synthesechemie ist die Halogenierung das synthetische Werkzeug der Wahl, um Kreuzkupplungsreaktionen, eine der häufigsten C-C- und C-Y-Bindungsbildungen (Y ist in diesem Fall N, O, S) zu ermöglichen. Durch den Einsatz verschiedener Übergangsmetalle, teilweise in Verbindung mit Aktivkohlekomponenten, lassen sich zahlreiche Bausteine und Vorstufen bioaktiver Naturstoffe und derer Derivate herstellen. Ein prominentes Beispiel ist die Verwendung von Palladium für die selektive Herstellung von Arenen und heterozyklischen Gerüsten mit unterschiedlichen Substitutionsmustern.<sup>[69]</sup> Im Laufe der Optimierung und Weiterentwicklung der Kreuzkupplungsreaktionen finden sich auch

unedlere Übergangsmetalle wie (das Halbedelmetall) Kupfer, Nickel und sogar Eisen als geeignete Metallkatalysatoren im Portfolio wieder.<sup>[70-75]</sup> Was diesen Reaktionstyp neben der hohen Chemoselektivität auszeichnet, ist eine ausgeprägte Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen. In der Industrie wurden Ansätze zur Herstellung von Pharmazeutika und Feinchemikalien im Kilogramm-Maßstab entwickelt, die mindestens eine oder eine Kombination mehrerer Kreuzkupplungsreaktionen darstellen.<sup>[76, 77]</sup> Die gängigsten metallkatalysierten Reaktionen unterscheiden sich in ihren reaktiven Anteilen für das Produkt und den entsprechenden Ausgangsstoffe leicht (siehe Abbildung 8).<sup>[69, 78-81]</sup>

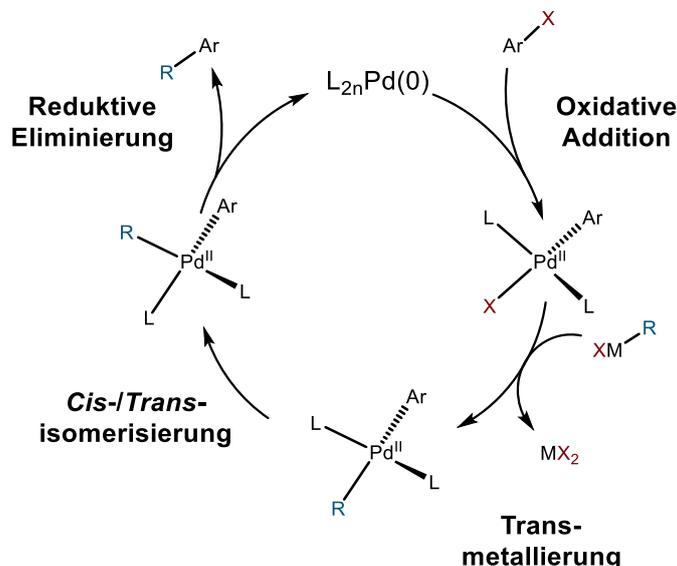


**Abbildung 8: Schematische Übersicht gängiger C-C-Bindungs- und Kreuzkupplungsreaktionen, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38]</sup>**

In den Reaktionsgleichungen sind sowohl die üblicherweise genutzten Reagenzien (Organolithium- und Grignard-) und Katalysatoren sowie die benötigten funktionellen Gruppen für die C-C-Knüpfung angegeben. X: Halogenide; Y: Heteroatome (wie z.B. O, N, S).

Wie aus dem Schema ersichtlich wird, benötigen alle C-C-Bindungsknüpfungen unter den angegebenen Bedingungen ein Halogen am Kohlenstoffatom der Ausgangsverbindung, an dem eine neue Kohlenstoffbindung generiert werden soll. Halogene sind damit für den Aufbau von Kohlenstoffgerüsten unabdingbar.

Trotz der verschiedenen Reagenzien und Ausgangsmoleküle ist der Reaktionsmechanismus und damit der katalytische Zyklus für alle genannten Reaktionen sehr ähnlich (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Katalytischer Zyklus der Palladium-katalysierten Kreuzkupplungsreaktion**

Der katalytische Zyklus ist in vier Teilschritte unterteilbar. Ausgehend von einer Palladium(0)-Spezies als Katalysator wird im ersten Schritt eine halogenierte Organospezies ( $Ar-X$ ) oxidativ an den Katalysator addiert. Das so gebildete Palladium-II-Intermediat kann dann in Anwesenheit eines halogenierten Liganden mit dem zu verbindenden organischen Rest **R** eine Transmetallierung durchlaufen, bei der durch Bindungsumlagerung das Halogen X mit dem organischen Rest **R** substituiert wird. Dabei wird der Rest des ursprünglichen Liganden als Metallhalogenid frei. Im nächsten Schritt erfolgt die *cis-/trans*-Isomerisierung des Restes **R** und eines der beiden Liganden L des Katalysators, bevor das neu verbundene Kohlenstoffskelett  $Ar-R$  im Zuge einer reduktiven Eliminierung vom Katalysator freigesetzt wird. Der Katalysator wird im Zuge dieses Prozesses von der Oxidationsstufe II auf eine die Oxidationsstufe von 0 reduziert und steht für den nächsten Zyklus wieder zur Verfügung.

Entscheidend für die Kreuzkupplung ist die Bereitstellung einer halogenierten Arylspezies und eines halogenierten organischen Restes **R**, damit die Addition beider organischer Reste, die verknüpft werden sollen, am Palladium-Katalysator erfolgen kann. Die Halogene dienen dabei als gute Fluchtgruppen und bilden stabile Metallhalogenide, um die Katalyse thermodynamisch voranzutreiben.

Neben den genannten Umsetzungen existieren noch weitere Reaktionen mit Halogenen, wie die Appel Reaktion und die Hell-Volhard-Zelinsky Reaktion, bei denen funktionelle Gruppen wie Alkohole in Halogenalkane oder Carbonsäuren umgewandelt werden, die zu Säurechloriden weiterreagieren können.<sup>[82, 83]</sup>

## 2.2.4 Energie- und Ressourceneffizienz chemischer Halogenierungen

Neben der erfolgreichen Synthese gewünschter Verbindungen in möglichst hohen Umsätzen und Produktausbeuten mit maximaler Reinheit muss auch die Ressourcenintensität des Prozesses in die Beurteilung einfließen. Lange Zeit wurde dafür als einziges Kriterium die Atomökonomie verwendet. Sie basiert auf der stöchiometrischen Gegenrechnung aller beteiligten Atome in der Reaktion gegenüber der Anzahl Atome im Endprodukt.<sup>[84]</sup> Die Atomökonomie ist eine theoretische Zahl, die lediglich die Reaktanden für die Berechnung mit einbezieht und dabei eine Ausbeute von 100 % annimmt.

Andere Komponenten wie Lösungsmittel oder Chemikalien für die Aufarbeitung werden nicht berücksichtigt. Dieser Wert bietet somit eine erste Orientierung für die Ressourceneffizienz eines Prozesses, erfordert aber einen tiefgehenden Blick in die übrigen Prozessparameter. Eine Alternative zur Atomökonomie bildet der E-Faktor, ein im Jahr 1992 postuliertes Konzept des Chemikers Roger Sheldon.<sup>[85]</sup> Für die Berechnung des Faktors wird üblicherweise die Masse aller Chemikalien im Prozess – also auch die von Lösungsmitteln, Chemikalien zur Aufarbeitung, Katalysatoren etc.- summiert und durch die Masse des Produktes geteilt. Die Angabe erfolgt daher üblicherweise in kg Abfall pro kg Produkt, wobei ein Wert von 0 den idealen E-Faktor widerspiegelt. Im Zuge erster Berechnungen für industrielle Prozesse konnte festgestellt werden, dass die Öl- und Bulk-Chemikalien-Industrie geringe E-Faktoren zeigten (<0.1 - 5), da nahezu alle Reagenzien in diesen Prozessen als Produkte weiterverwendet werden können. Die beiden Sparten der chemischen Industrie mit dem größten E-Faktor und damit der größten Ineffizienz waren die Feinchemikalien- (5 - 50) und die Pharmaindustrie (25 - <100).<sup>[86]</sup> Im Vergleich der umgesetzten Tonnen pro Jahr wird jedoch auch deutlich, dass auch geringe E-Faktoren problematisch sein können, wenn die Prozesse bis zu mehrere Millionen Tonnen Produkt pro Jahr generieren und damit auch Abfall im Megatonnenmaßstab anfallen kann. Eine neuere Alternative stellt die Lebenszyklusbewertung (engl. *life-cycle-assesment*) dar.<sup>[87]</sup> Bei dieser Methode werden verschiedenen Parameter wie die Ressourcenknappheit der verwendeten Materialien, der Beitrag zur Erderwärmung oder die Toxizität für Mensch und Umwelt für einen Prozess bestimmt und daraus die Nachhaltigkeit des gesamten Verfahrens von Vorbereitung der Synthese bis Entsorgung bestimmt.<sup>[88]</sup> Eine solche Analyse ist deutlich aufwändiger als die vorher beschriebenen und erfordert teilweise adaptierte Messungen im Labormaßstab.<sup>[87]</sup>

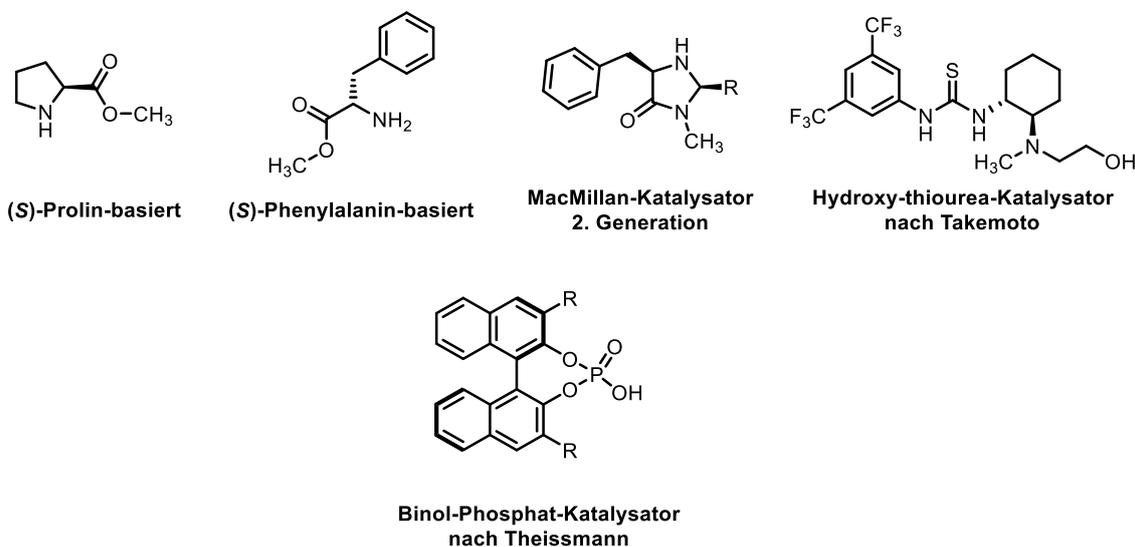
Schätzungsweise 55 % der chemischen und 85 % der pharmazeutischen Endprodukte wurden mit Schlüsselkomponenten verarbeitet, die aus dem Chloralkali-Elektrolyseverfahren stammen, darunter Salzsäure zur Einstellung des pH-Werts oder chlorierte Lösungsmittel als Teil der Synthese und der anschließenden Isolierung.<sup>[89, 90]</sup> Dies hat jedoch zur Folge, dass die Wirkstoffe unter gefährlichen Bedingungen hergestellt werden und die Kosten für die Entsorgung giftiger Abfälle hoch sind. Im Allgemeinen erfolgten die Herstellung und Weiterverarbeitung von Chlor meist in derselben geografischen Region oder Anlage, um den Transport von giftigen und gefährlichen Zwischenprodukten zu vermeiden. Dies wurde für deutsche Unternehmen berichtet und trifft vermutlich auch für andere Ländern zu. Die Schlüsselkomponente für die Halogenierung (Chlor) wird durch Elektrolyse hergestellt und ist einer der energieintensivsten Prozesse in der chemischen Industrie. Das Verfahren ist für etwa 2 % des Gesamtenergieverbrauchs bei der Herstellung von 5 Millionen Tonnen Chlor pro Jahr in Deutschland verantwortlich (Stand 2018).<sup>[90, 91]</sup> Die Senkung des Energieverbrauchs ist ein deklariertes Ziel der Chloralkaliindustrie, da 50 bis 60 % der Produktionskosten für elektrische Energie aufgewendet werden.<sup>[92]</sup>

Zur Senkung der Mengen anfallender toxischer Abfälle oder die Erhöhung der Ressourceneffizienz chemischer Prozesse wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Methoden als Alternativen zu konventionellen Synthese- und Aufarbeitungsrouten entwickelt. Die Nutzung „grüner“ Lösungsmittel oder der Umstieg auf Reaktionen im wässrigen Medium zeigten bereits vielversprechende potenzielle Verringerungen der Umweltbelastung chemischer Prozesse.<sup>[93, 94]</sup>

Neben der Optimierung von genutzten Reaktanden ist die Katalyse einer der vielversprechendsten Ansätze für die Optimierung chemischer Reaktionen. Da Katalysatoren per Definition unverändert aus der Reaktion gehen und somit mehrere Katalysezyklen durchlaufen können, müssen sie meist nur in substöchiometrischen Mengen eingesetzt werden und können dabei tausende Zyklen zum gewünschten Produkt durchlaufen. Eine der verbreitetsten Katalysearten in der Wirkstoffchemie ist die

## Kennnisstand

Nutzung von Organokatalysatoren. Diese Katalysatoren arbeiten metallfrei und nutzen meist Derivate der Aminosäure Prolin oder Phenylalanin als Grundgerüst. Mittlerweile stehen auch Thioureaderivate für Petasis-Reaktionen von Chinolinen oder Phosphat-Katalysatoren für Transferhydrierungen (siehe Abbildung 10).<sup>[95-97]</sup>



**Abbildung 10: Beispiel gängiger Organokatalysatoren in der Wirkstoffchemie**

Abhängig vom gewünschten Produkt können verschiedene Derivate der Katalysatoren verwendet werden, so beispielsweise auch Prolin und Phenylalanin selbst (freie Säuregruppen). R: Dimethyl- oder tert-butyl-Gruppe für Prolin; Arylgruppe für Binol-Phosphat

Die Nutzung von Organokatalysatoren hat zahlreiche neue Reaktionswege gebnet und dabei selektivere Transformationen als mit üblichen Reagenzien ermöglicht. Die Arbeiten auf diesem Gebiet wurden daher auch mit dem Nobelpreis der Chemie für Benjamin List und David MacMillan ausgezeichnet.<sup>[98]</sup> Als Alternative zur traditionellen Metall- oder Organokatalyse der letzten Jahrzehnte wurde die Nutzung von Enzymen als Katalysatoren in Form der Biokatalyse beschrieben und etabliert.

## 2.3 Halogenierende Enzyme als Biokatalysatoren

### 2.3.1 Biokatalyse – die biologische Revolution in der Chemie

Die Biokatalyse hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer ausgereiften und weit verbreiteten Technologie entwickelt.<sup>[11, 99-101]</sup> Sie beschreibt die Nutzung von Katalysatoren natürlicher Herkunft wie Proteine oder Nucleinsäuren in der Synthesechemie. Die gängigste Form der Biokatalyse ist die Nutzung von Enzymen, also katalytisch aktiver Proteine. Enzyme zeichnen sich häufig durch ihre exzellente Selektivität (Chemo-, Regio- und Enantioselektivität) sowie die Nutzung wässriger Milieus bei physiologischen pH-Werten und moderaten Temperaturen für die Katalyse aus. Von einigen wenigen Ausnahmen abgesehen, blieb die Biokatalyse in den frühen 2000er Jahren beschränkt auf Nischenanwendungen und konzentrierte sich auf die Synthese oder Trennung optisch aktiver Zwischenprodukte.<sup>[102-104]</sup> Seither hat sich die Biokatalyse mehr und mehr zu einem weit anwendbaren Werkzeug für die chemische Synthese und Herstellung entwickelt.

Wichtige treibende Kräfte sind die schnelle Entdeckung neuer Enzymvarianten durch die Werkzeuge der Bioinformatik und computergestütztes *enzyme engineering*.<sup>[101, 105-107]</sup> Bei sogenannten *screenings* werden dabei Gene für Enzyme unterschiedlicher Herkunft meist heterolog exprimiert und die produzierten Enzyme für Reaktionen unter den gewünschten Bedingungen eingesetzt. Varianten, die das gewünschte Produkt unter den vorgegebenen Parametern bilden, werden biochemisch charakterisiert und je nach Anwendung durch Mutagenese optimiert. Die so identifizierten Enzyme können dann als Biokatalysatoren für die tatsächliche Umsetzung der gewünschten Substrate eingesetzt werden.<sup>[7, 9]</sup> Die entscheidenden Parameter des Enzyms sind dabei die Wechselzahl  $k_{cat}$  und die Affinität des Substrats zum Enzym, beschrieben durch die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$ . Der Zusammenhang dieser Parameter wird größtenteils durch die von Michaelis und Menten hergeleitete Kinetik enzymatischer Reaktionen beschrieben (siehe Gleichung 1).<sup>[108]</sup>

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_M + [S]}$$

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]}$$

**Gleichung 1: Gleichungen für die enzymatische Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  und Wechselzahl  $k_{cat}$  nach Michaelis und Menten.**<sup>[108]</sup>

Die dargestellten Zusammenhänge gelten nur im Fließgleichgewicht (englisch *steady state*), d.h. wenn die Substratkonzentration  $[S]$  weit über der Enzymkonzentration  $[E]$  und die Produktkonzentration zu Beginn der Reaktion bei 0 liegt. Die Wechselzahl  $k_{cat}$  wird durch Division von  $v_{max}$  mit der eingesetzten Enzymkonzentration errechnet und beschreibt, wie viele Umsetzungen pro Sekunde von einem Teilchen Enzym katalysiert werden können.

Neben den kinetischen Parametern müssen auch Faktoren wie Stabilität gegenüber pH-Wert, Temperatur und Lösungsmitteln ermittelt werden, um eine Anwendung im chemischen Kontext möglich zu machen.

Während die katalytische Aktivität von Enzymen weithin anerkannt ist, werden ihre Stabilität und ihre Kosten oft als Hindernis für die tatsächliche Anwendung im industriellen Kontext angesehen.<sup>[12, 13]</sup> Häufig zeigen Enzyme eine geringe Substratazeptanz für nicht-natürliche Substrate oder verfügen über schmale pH- und Temperaturprofile oder geringe Toleranz gegenüber Lösungsmitteln. Durch

*enzyme engineering* können diese Limitationen überwunden werden. Hier wird in einem *screening* eine künstliche Evolution des Enzyms eingeleitet, bei der über mehrere Selektionsrunden zufällig alle Residuen des Enzyms mit den anderen kanonischen Aminosäuren getauscht werden. Dieser Prozess wird gerichtete Evolution (englisch *directed evolution*) genannt und ist häufig die Methode der Wahl, unbekannte oder kaum charakterisierte Enzyme zu optimieren.<sup>[109, 110]</sup> Während dieser Prozess sehr kosten- und zeitintensiv ist, werden beim rationalen Design (englisch *rational design*) gezielt katalytisch relevante oder stabilitätsbezogene Aminosäuren des Enzyms, häufig im aktiven Zentrum, mit definierten Aminosäuren ausgetauscht. Die Voraussetzung dafür ist fundiertes Wissen über den Mechanismus der enzymatisch katalysierten Reaktion, um so gezielt einzelne Schritte der Katalyse chemisch für andere Substrate oder Bedingungen anzupassen. Da diese Zusammenhänge sehr komplex sein können, findet das rationale Design trotz der geringeren Zeit- und Durchführungskosten seltener Anwendung. Die Bemühungen der letzten Jahrzehnte, Enzyme über gerichtete Evolution und rationales Proteindesign in ihrer Funktionalität anzupassen, wurde 2018 anteilig mit dem Nobelpreis in Chemie für die gerichtete Evolution von Enzymen an Frances H. Arnold verliehen.<sup>[8]</sup>

Durch Weiterentwicklungen im Bereich der Bioinformatik können heutzutage erste computergestützte Enzymdesigns verwendet werden, um kleinere Enzymbibliotheken nach geeigneten Varianten und Mutanten zu untersuchen, die schlussendlich Anwendung im industriellen Maßstab finden können.<sup>[17]</sup> In den meisten Fällen bleibt jedoch die Katalysatorproduktion und Stabilität der Enzyme ein wesentlicher Nachteil in der Nutzung von Biokatalysatoren.<sup>[12, 13]</sup>

Die Produktion erfolgt meist heterolog in speziellen Wirtsorganismen, die im Laufe des Prozesses durch Isolationsmethoden vom Katalysator getrennt werden müssen. Die geringe Stabilität mancher Enzyme unter Prozessbedingungen führt zu einer recht hohen Menge eingesetzten Katalysators, wodurch in beiden Fällen die Prozesskosten vor allem durch das potenzielle *downstream processing* für die Katalysatoraufbereitung stark ansteigen können.<sup>[10]</sup> Da manche Enzyme teure Cofaktoren wie NAD(P)H oder ATP benötigen, steigen Prozesskosten weiter. Als Lösungsansatz werden seit mehreren Jahren Methoden der Cofaktor-Regenerierung etabliert, bei dem der teure Cofaktor über eine sekundäre enzymatische Reaktion regeneriert oder mit billigeren Ausgangsmaterialien *in situ* produziert werden kann.<sup>[111]</sup> Durch die Nutzung bioinformatischer Werkzeuge können Optimierungen der Enzyme gerichteter und schneller durchgeführt werden, um viele der oben genannten Probleme zu minimieren.<sup>[112-115]</sup> Kürzlich konnte sogar mit Hilfe von *machine learning* Algorithmen eine Hydrolase für den Abbau von PET-Polymeren entwickelt werden, was teilweise völlig neue Herangehensweisen an das Feld des *enzyme engineering*s für die Zukunft ebnet.<sup>[116]</sup>

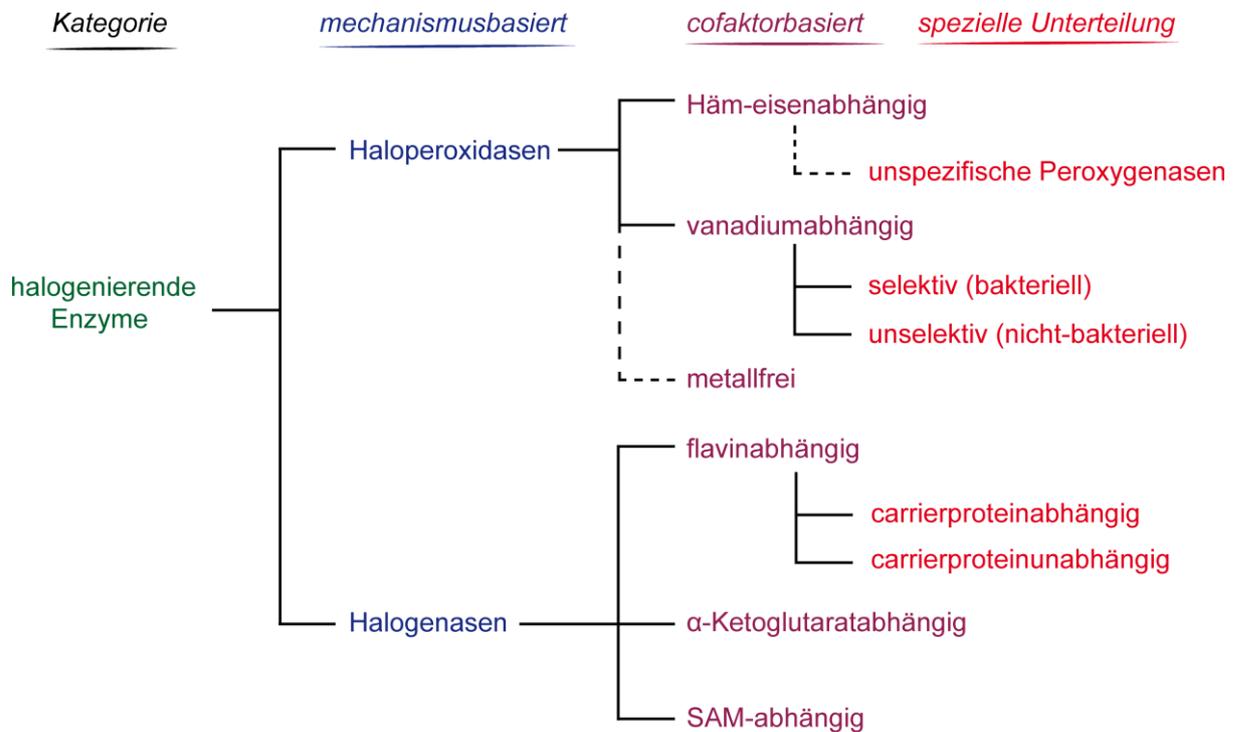
Für die erfolgreiche Etablierung der Biokatalyse im industriellen Maßstab ist jedoch die Nutzung interdisziplinärer Forschungsgruppen und die Kosten-Nutzen-Analyse zwischen klassischer chemischer und biokatalytischer Umsetzung erforderlich.<sup>[12, 13]</sup> Nicht jeder Prozess wird automatisch umweltfreundlicher oder effizienter, wenn Enzyme als Katalysatoren eingesetzt werden, teilweise ist sogar das Gegenteil der Fall.<sup>[117]</sup>

### 2.3.2 Halogenierende Enzyme

Chemisch gesehen ist eine Halogenierung ein anspruchsvoller Prozess, denn er erfordert ein starkes Oxidationsmittel oder eine nukleophile Stelle im Ausgangsmolekül. Besonders die selektive Halogenierung an bestimmten Positionen, beispielsweise in aromatischen Systemen, oder gar die stereoselektive Halogenierung sind chemisch durchaus anspruchsvoll.<sup>[67]</sup> Mit Blick auf die Natur scheint es aber Wege zu geben, Halogenierungen regioselektiv und teilweise auch stereoselektiv in komplexen Verbindungen durchzuführen. Obwohl halogenierte Naturstoffe selten sind und nur im Rahmen des

Sekundärstoffwechsels vorkommen, haben sich mindestens fünf Arten von halogenierenden Enzymen entwickelt. Viele von ihnen sind das Produkt weiterentwickelter Monooxygenasen, da die Oxohalogenensäuren das zentrale Zwischenprodukt der Katalyse dieser halogenierenden Enzyme sind.

Tendenziell ist die Klassifizierung der halogenierenden Enzyme nicht eindeutig, lässt sich aber anhand des Mechanismus und der verwendeten Cofaktoren in fünf bzw. sechs Gruppen unterteilen (siehe Abbildung 11).<sup>[38]</sup>



**Abbildung 11: Klassifizierung halogenierender Enzyme nach Fejzagić *et al.***<sup>[38]</sup>

Die Klassifizierung erfolgt nach Art des Mechanismus (wasserstoffperoxidabhängig oder nicht), gefolgt von der Cofaktorabhängigkeit und spezieller Unterteilungen für vanadiumabhängige Haloperoxidasen und flavinabhängige Halogenasen. Die Klasse der metallfreien Haloperoxidasen ist nicht eindeutig den Haloperoxidasen zuzuordnen, da sie mechanistisch zu den Hydrolasen gehören, weshalb diese Gruppe nur der Vollständigkeit halber genannt wird. Gleiches gilt für unspezifische Peroxygenasen, die als Häm-eisenabhängige Enzyme ebenfalls Halogenierungen katalysieren können, mittlerweile durch ihr breites Spektrum an katalysierten Oxyfunktionalisierungen aber als eigene Enzymfamilie geführt werden.<sup>[118]</sup>

Obwohl sie oft synonym verwendet werden, kann zwischen Haloperoxidasen und Halogenasen unterschieden werden. Die erste Gruppe bildet aus dem jeweiligen Halogenid und Wasserstoffperoxid über Häm-Eisen-, Vanadat-Coenzyme oder auch ohne jegliches Coenzym eine hypohalogenierte Säure. Bei den meisten Enzymen wird die hypohalogenierte Säure freigesetzt und die eigentliche Halogenierungsreaktion findet außerhalb des aktiven Zentrums statt. Im Gegensatz dazu erzeugen oder verwenden die Halogenasen Halogenierungsspezies ohne die Verwendung von Wasserstoffperoxid. Dabei kann die Spezies über drei völlig unterschiedliche Mechanismen (Halonium-Intermediat, radikalisch oder nukleophil) eingebaut werden, weshalb eine Unterteilung der Halogenasen in Flavin-,  $\alpha$ -Ketoglutarat- oder *S*-adenosyl-methionin (SAM-)abhängige Enzyme erfolgt.

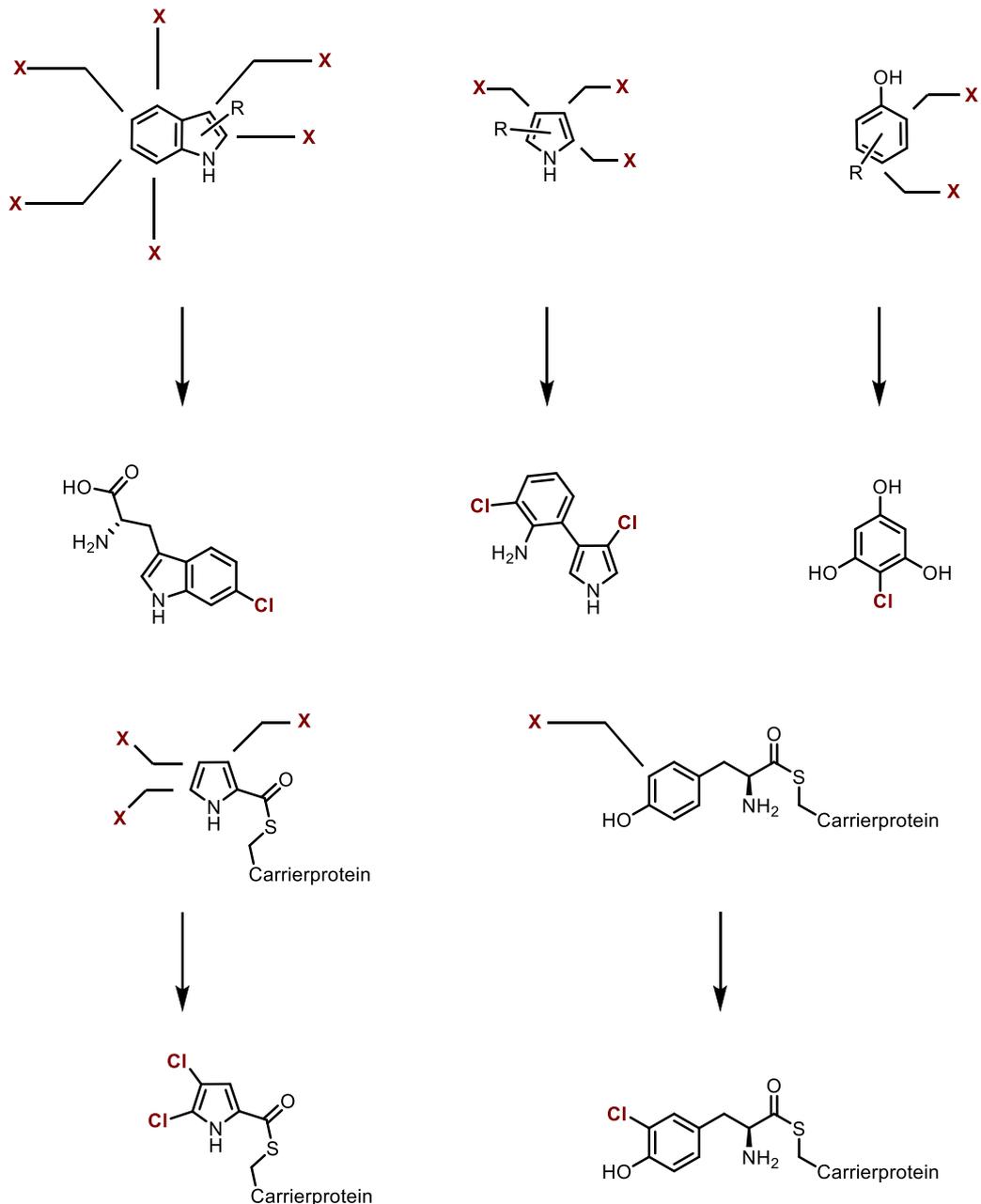
In den folgenden Abschnitten sollen die einzelnen Klassen halogenierender Enzyme näher beleuchtet werden.

### 2.3.3 Flavinabhängige Halogenasen

Flavinabhängige Halogenasen (FAHs), häufig abgekürzt mit FHals, Fl-Hals oder FAHs (englisch *flavin-dependent halogenases*, FDH), sollen sich aus Monooxygenasen entwickelt haben, die ebenfalls Flavin-Cofaktoren benötigen und daher zur Superfamilie der flavinabhängigen Monooxygenasen gehören.<sup>[119, 120]</sup>

Nach bisherigem Kenntnisstand gibt es drei Zielstrukturen, die von FAHs adressiert werden können. Die am besten untersuchte Gruppe sind die flavinabhängigen Tryptophan-Halogenasen. Im natürlichen Kontext ist es möglich, jede Position des Indolrings des Tryptophans zu halogenieren. Ähnlich strukturiert sind die Gruppen der flavinabhängigen Pyrrol-Halogenasen und der flavinabhängigen Phenol-Halogenasen.<sup>[121]</sup>

Die Tatsache, dass jede einzelne Position von einem individuellen Enzym angesprochen werden kann, zeigt, dass FAHs selektive Halogenierungskatalysatoren sind. Die Enzyme werden dabei nach der Zugänglichkeit ihrer Substrate unterschieden. Während viele dieser Halogenasen an Biosynthesclustern von Polyketiden in Form von Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomaler Proteinsynthese (NRPS) beteiligt sind, können einige, wie z.B. Tryptophan-Halogenasen, frei diffundierende Substrate umsetzen und sind dabei nicht von Trägerproteinen abhängig, die das Substrat aktivieren oder binden (siehe Abbildung 12).<sup>[122, 123]</sup>



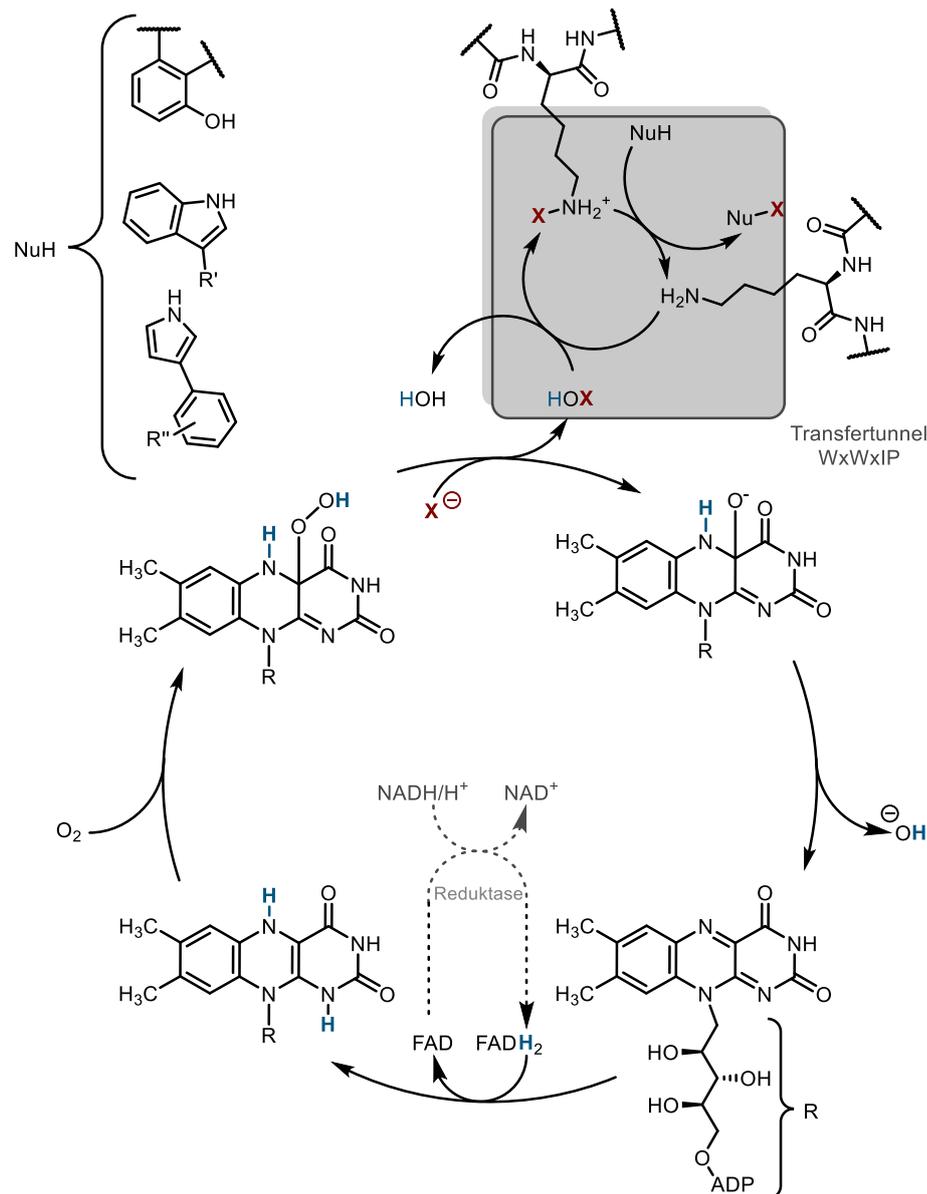
**Abbildung 12: Übersicht des Substratspektrums flavinabhängiger Halogenasen**

Für jede der Indol-, Pyrrol- und Phenol-Derivate sind Beispiele für halogenierte Produkte der FAHs bekannt.<sup>[124-127]</sup> Für Pyrrol und Phenol sind zudem carrierproteinabhängige Enzyme bekannt, die im gebundenen Zustand das entsprechende Substrat halogenieren.<sup>[33, 128]</sup> Die meisten halogenierten Strukturen werden anschließend als Vorläufermoleküle für den Aufbau komplexerer Naturstoffe verwendet.

Für die Anwendung dieser Enzymgruppe als Biokatalysatoren muss bedacht werden, dass sie mindestens eine Zweikomponenten-Elektronentransportkette benötigen und daher eine geeignete Flavin-Reduktase voraussetzen.<sup>[129-133]</sup> Neben den Reduktasen, die natürlicherweise zu den Biosyntheseclustern gehören, wie z.B. PrnF aus dem Pyrrolnitrin-Biosynthesecuster, sind auch Anwendungen mit anderen Reduktasen wie SsuE oder Fre aus *E. coli* bekannt.<sup>[125, 130, 133-137]</sup> Um die Notwendigkeit eines zweiten Enzyms - der Flavin-Reduktase - oder gar eines dritten Enzyms für das Cofaktor-Recycling zu vermeiden, stehen auch in diesem Bereich photochemische Ansätze im Mittelpunkt der aktuellen Forschung.<sup>[138]</sup>

## Kenntnisstand

Viele der carrierproteinabhängigen FAHs produzieren bekannte Sekundärmetabolite wie Rebeccamycin (**2**) und Vancomycin (**6**), aber auch eine Vielzahl weniger erforschter Biosynthesewege.<sup>[139]</sup> Der wichtigste Unterschied im Mechanismus zwischen flavinabhängigen Monooxygenasen und Halogenasen ist das konservierte Motiv von zwei Tryptophanen, einem Isoleucin und Prolin im aktiven Zentrum. Dieser daraus resultierende 10 Å lange Tunnel, der erstmals in PrnA gefunden wurde, dient der räumlichen Trennung des aktivierten Peroxyflavins FAD(C4 $\alpha$ )-OOH von der Substratbindestelle und verhindert so die Oxygenierung.<sup>[33, 120, 140, 141]</sup> Nach der Bildung des Hypohalogenids überträgt ein konserviertes Lysin das elektrophile Chlor als Chloramin vom ehemaligen Peroxyflavin auf das Substrat (siehe Abbildung 13).<sup>[142]</sup>



**Abbildung 13: Katalytischer Zyklus flavinabhängiger Halogenasen, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38, 136, 143]</sup>**

Die drei potenziellen Substratklassen, Phenol-, Tryptophan und Pyrrol-Derivate (NuH), dienen als Nucleophile für die elektrophile aromatische Substitution im System durch die Chloramingruppe des katalytischen Lysins. Die Chlorierung des Lysins an dessen terminaler Aminogruppe erfolgt durch die Bildung einer Peroxospezies am FAD (11 Uhr im Zyklus), die durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff gebildet wird (7 Uhr). Dieses Peroxyflavin wird in Anwesenheit eines Halogenids als Hypohalogenensäure frei, die das Lysin halogeniert. Das oxidierte FAD-Coenzym eliminiert anschließend ein Hydroxidion, bevor es durch NADH/H<sup>+</sup> in einer Reduktase-abhängigen Reaktion zum FADH<sub>2</sub> reduziert wird (6 Uhr).

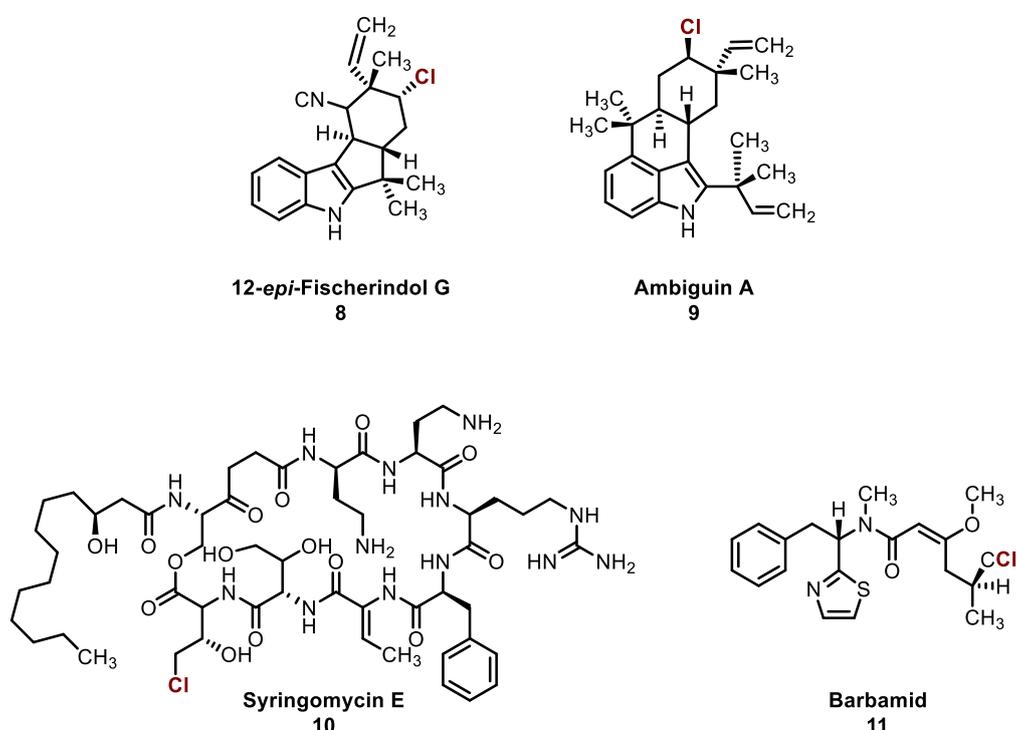
Für die Phenolhalogenasen wird ein leicht veränderter Mechanismus vorgeschlagen. Die phenolische Hydroxylgruppe wird durch ein Aspartat im aktiven Zentrum deprotoniert, was die Nucleophilie am ortho-ständigen Kohlenstoff erhöht.<sup>[144, 145]</sup>

Neben dem Vorteil der hohen Regioselektivität dieser Enzyme und der damit verhältnismäßig geringen Anzahl möglicher Nebenprodukte zeigt diese Enzymfamilie einige Nachteile bei der Verwendung als Biokatalysator. So sprechen die generell geringen Umsatzraten gegen eine großtechnische Anwendung.<sup>[38]</sup> Häufig treten auch Expressionsprobleme in der Katalysatorproduktion auf. Viele der in

*E. coli* BL21(DE3) produzierten Proteine befinden sich als Einschlusskörper (engl. *inclusion bodies*) in der unlöslichen Fraktion aufgeschlossener Zellen. Um diesem Problem zu begegnen, werden regelmäßig Stämme eingesetzt, die eine Coexpression von Chaperonen, sogenannten Faltungshelfern für Proteine, ermöglichen.<sup>[38]</sup> Die Gesamtstabilität dieser Proteine muss ebenfalls weiter optimiert werden, um in der Biokatalyse eingesetzt werden zu können. Als vielversprechendes Ergebnis konnten Kemker *et al.* die Tryptophan-Halogenasen in einem biokatalytischen Prozess erfolgreich hochskalieren, indem die Enzyme durch vernetzte Enzymaggregate (englisch *cross-linked enzyme aggregates*, CLEAs) immobilisiert wurden. Dadurch wurde L-7-Bromtryptophan im Gramm-Maßstab gewonnen.<sup>[146]</sup>

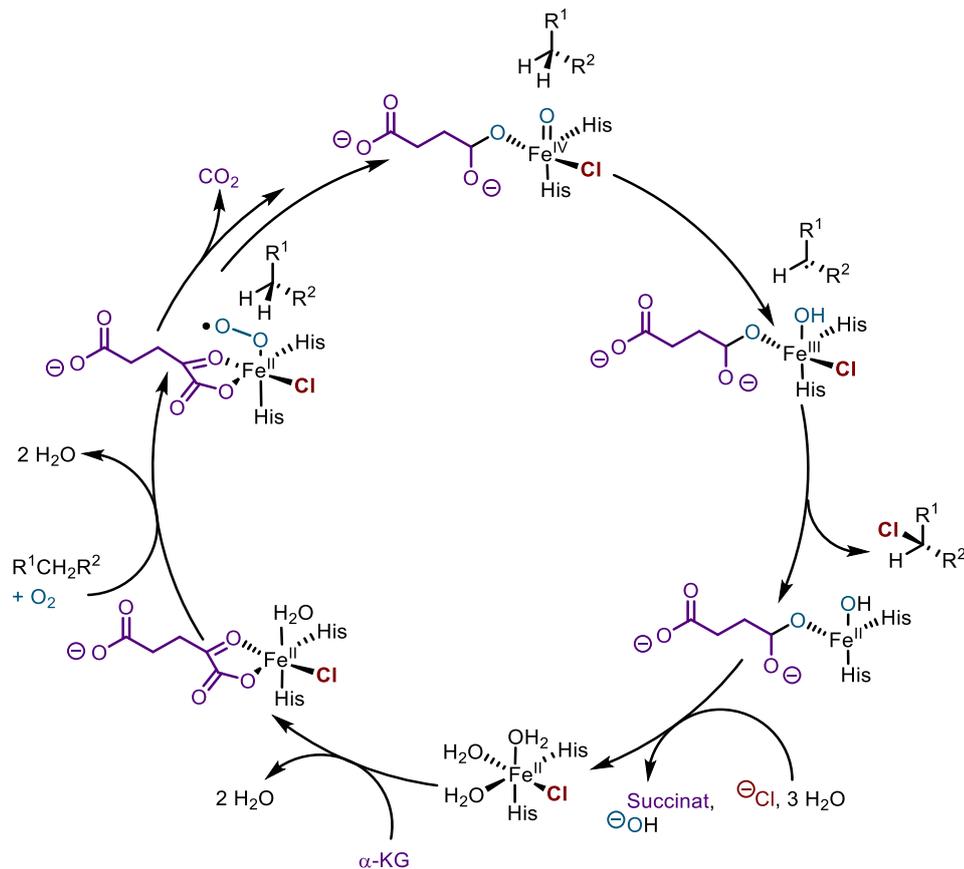
### 2.3.4 $\alpha$ -Ketoglutaratabhängige Halogenasen

Eisen(II)- $\alpha$ -ketoglutaratabhängige Halogenasen (Fe/ $\alpha$ -KG-Halogenasen) bestehen durch ein breites Portfolio an aliphatischen Naturstoffklassen, die sie halogenieren (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Halogenierte aliphatische Naturstoffe aus der Biosynthese mit Fe/ $\alpha$ -KG-abhängigen Halogenasen.**

Trotz der großen Vielfalt in den Produktstrukturen haben sie ein gemeinsames Merkmal, die Halogenierung an einem  $sp^3$ -Kohlenstoffzentrum.<sup>[38]</sup> Die Fe/ $\alpha$ -KG-Halogenasen sind nicht auf nukleophile Substrate beschränkt wie die zuvor beschriebenen FAHs. Sie gehören zur Superfamilie der Fe/ $\alpha$ -KG-abhängigen Oxygenasen. Die Superfamilie ist für viele oxidative Umwandlungen wie Hydroxylierungen, Halogenierungen und Ent sättigung bekannt und kann auch für die Produktion von Ethylen verwendet werden.<sup>[147-150]</sup> Allen gemeinsam ist ein strukturell konserviertes metallbindendes Motiv, das im Falle der Halogenase ein aktives Zentrum entwickelt hat, in dem ein Halogen binden kann.<sup>[148]</sup> Der postulierte katalytische Mechanismus der Fe/ $\alpha$ -KG-abhängigen Halogenasen ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Postulierter Mechanismus der Fe/α-KG-Halogenasen, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38]</sup>**

Die Halogenierung folgt einer radikalischen C-H-Funktionalisierung.<sup>[151]</sup> Das hochreaktive Fe(IV)-oxo (Haloferryl)-Zwischenprodukt wird durch Decarboxylierung von α-KG zu Succinat durch einen Sauerstoffangriff erzeugt. Die anschließende Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom Substrat führt zu einer energetisch günstigen Umlagerung zu Fe(III). Die Rückstoßreaktion mit Chlorid hängt dabei vom Abstand und der Orientierung des Substrats ab.<sup>[152]</sup> Der katalytische Zyklus wird durch das hexakoordinierte Fe(II) mit Wassermolekülen, Chlorid und Histidin wiederhergestellt.

Auf der Grundlage der vorgeschlagenen radikalischen C-H-Funktionalisierung wurden bisher zwei Gruppen von Enzymen identifiziert. Die erste derartige Fe/αKG-abhängige Halogenase ist die Tailoring-Domäne SyrB2 der multimodularen nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) von *Pseudomonas syringae* *pv.* *syringae* B301D.<sup>[153]</sup> Diese NRPS-assoziierten Halogenasen produzieren eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten, wie z.B. das chlorierte Biotensid Syringomycin E, das durch ein selektives monochloriertes Threonin in seiner Struktur gekennzeichnet ist.<sup>[148]</sup> Ein weiteres Beispiel ist die hochselektive Di- und Trichlorierung von nur einer der diastereotopen Methylgruppen von Leucin durch eine Kombination von BarB1 und BarB2, das als Vorläufer für die natürliche Verbindung Barbamid in dem marinen Cyanobakterium *Lynghya majuscula* dient.<sup>[154]</sup>

Vor einiger Zeit identifizierten Moosmann *et al.* verschiedene Fe/αKG-Halogenase-Homologe und ihre natürlichen Produkte, die über einen NRPS-Weg produziert werden. Die Halogenasen wurden durch *screening* der Genomsequenz des Cyanobakteriums *Fischerella* *sp.* PCC 9339 auf der Grundlage von Merkmalsvergleichen identifiziert. Mit diesem Ansatz konnten die Autoren zwischen einer Fe/αKG-Oxygenase und einer entsprechenden Halogenase unterscheiden.<sup>[155]</sup>

Große NRPS binden ihre Substrate typischerweise über ein aminoacetyliertes Peptidyl-Carrier-Protein und haben einen engen Substratbereich.<sup>[156]</sup> Darüber hinaus weisen sie im Allgemeinen eine niedrige Gesamtumsatzzahl auf, was auf die bekannte Autoxidation von Fe(II) zu Fe(III) und damit auf

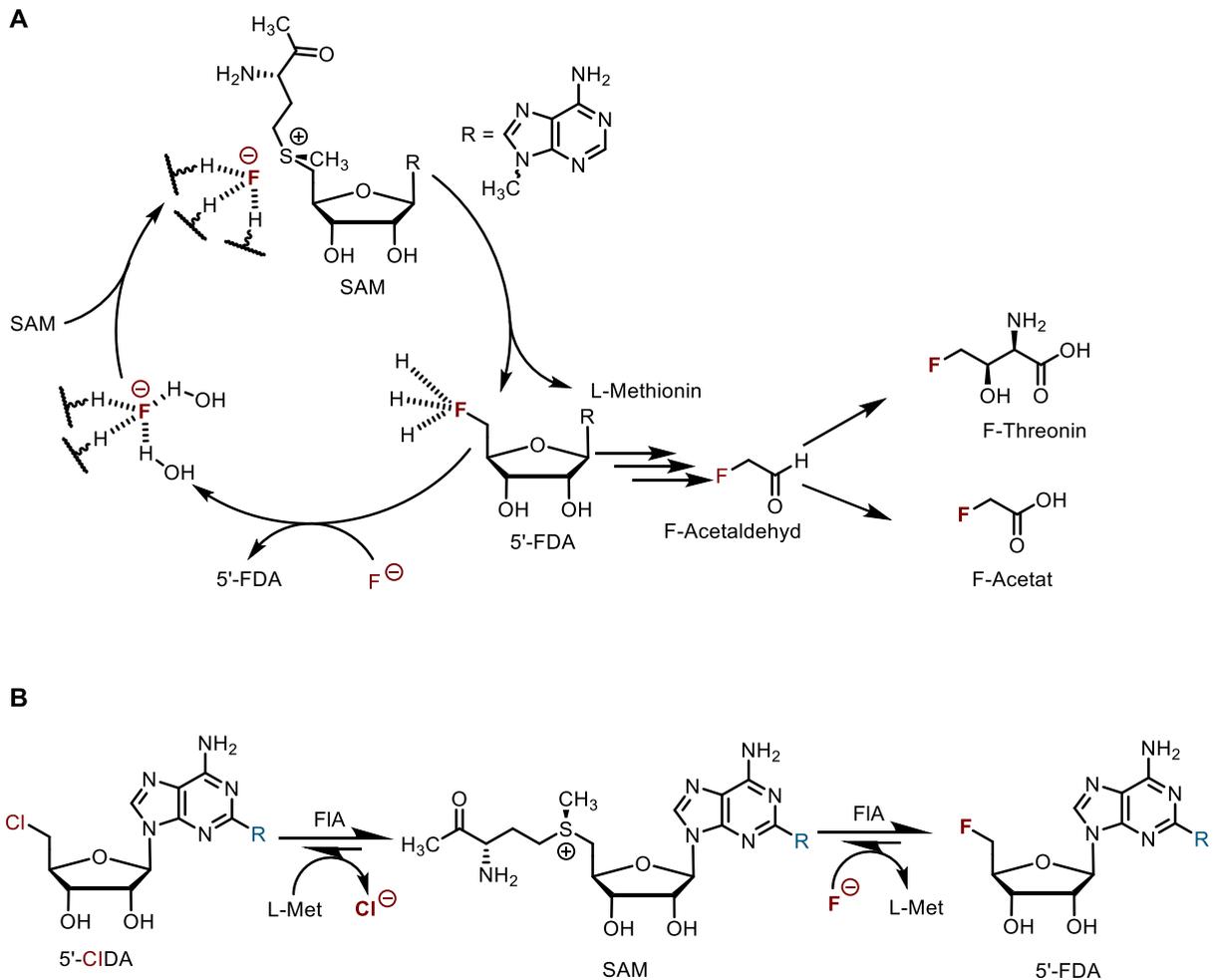
eine Autoinaktivierung des Enzyms zurückzuführen sein könnte.<sup>[157]</sup> Im Fall von SyrB2 wurden Gesamtumsätze von  $7 \pm 2$  Molekülen pro Sekunde beobachtet.<sup>[153]</sup> Dies schränkt die Möglichkeit ein, die Enzyme als Biokatalysatoren für verschiedene unnatürliche Substrate zu nutzen.

Mit der Entdeckung einer neuen Fe/ $\alpha$ KG-abhängigen Halogenase (WelO5) durch Hillwig & Liu war es möglich, die Klasse auf ungebundene Substrate zu erweitern. WelO5 ist in der Lage, verschiedene Isoprenoid-Indol-Alkaloide im Cyanobakterium *Hapalosiphon welwitschii* regio- und stereoselektiv zu halogenieren.<sup>[38, 158]</sup> WelO5 zeigte auch eine höhere Robustheit und katalysierte insgesamt etwa 75 Umsätze pro Enzymteilchen.<sup>[158]</sup> Durch Strategien wie die aufeinanderfolgende Zugabe der Cosubstrate oder die Zugabe von Antioxidantien wie Katalasen oder DTT konnte die Umsatzzahl erhöht werden. Der enge Substratbereich von WelO5 wurde angepasst, um einen größeren Substratbereich ähnlich wie das Homolog AmbO5 zu erhalten.<sup>[159, 160]</sup> Die meisten Modifikationen erfolgten an der äußeren Helix, die für das Schließen des Eingangs des aktiven Zentrums bei Bindung des Substrats verantwortlich ist. Die Helix könnte teilweise an der Substraterkennung und -selektivität beteiligt sein.<sup>[159, 160]</sup> In einer später erschienenen Veröffentlichung von Hayashi *et al.* wurde eine WelO5-Variante mit einem umgestalteten aktiven Zentrum gezeigt, die über bessere kinetische Parameter und ein erweitertes Substratspektrum verfügt. Das Substratspektrum konnte dabei über die nativen Substrate vom Typ der Indolalkaloide hinausgehen.<sup>[161, 162]</sup>

Die Möglichkeit Fe/ $\alpha$ KG-abhängige Halogenasen über *enzyme engineering* anzupassen besitzt allerdings den Nachteil die Hydroxylierung als kompetitive Nebenreaktion zu fördern.<sup>[156]</sup> Mitchell *et al.* haben diesen Ansatz umgekehrt und eine Monooxygenase, SadA, zu einer Halogenase modifiziert.<sup>[163]</sup> In diesem Ansatz wurde erstmalig bewiesen, dass mit zunehmendem Verständnis des Reaktionsmechanismus und der katalytisch beteiligten Aminosäuren Enzyme einer Superfamilie sogar in ihrer grundlegenden Chemospezifität gezielt verändert werden können. Trotz der vielen Ansätze für die Nutzung von Fe/ $\alpha$ KG-abhängigen Halogenasen ist die Oxidationsanfälligkeit des katalytischen Eisens ein maßgebliches Hindernis für die Anwendung in industriellen Prozessen.

### 2.3.5 SAM-abhängige Halogenasen

Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Enzymen stammt die Vielfalt der Naturstoffe von S-Adenosylmethionin-abhängigen (SAM) Halogenasen primär von einem bisher charakterisierten Enzym. Der erste charakterisierte Vertreter war 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin-Synthase (FlA) aus *Streptomyces cattleya*, die erste bekannte Fluorinase.<sup>[164]</sup> Die gesamte Familie dieser Enzyme ist neben der Fluorierung in der Lage, SAM zu chlorieren oder zu hydroxylieren.<sup>[165]</sup> Innerhalb des katalytischen Zyklus wirkt Fluorid als Nukleophil in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion, bei der es den 5'-Kohlenstoff der SAM-Ribose angreift (siehe Abbildung 16).<sup>[166]</sup>



**Abbildung 16: Mechanismus der Halogenierung durch SAM-abhängige Halogenasen, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38]</sup>**

**A:** Schematischer sequenzieller Mechanismus für die Bildung von F-C-Bindungen, katalysiert durch die Fluorinase aus *S. cattleya*, und einige Produkte der anschließenden Kaskadenreaktion. Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren im aktiven Zentrum oder Wasser dar. **B:** Reaktionsschema der Fluorinase-vermittelten *trans*-Halogenierung. Der Rest **R** markiert die Position der gängigen Derivatierungen, wie Methyl- und Aminogruppen.

Um als Nukleophil wirken zu können, muss Fluorid seine Solvationshülle verlieren. Dies wird durch eine zweistufige Desolvatisierung mit einer Kombination aus elektrostatischer Stabilisierung und Wasserstoffbrückenbindungen erreicht. Im ersten Schritt bindet Fluorid an das aktive Zentrum und tauscht Wassermoleküle seiner Hülle aus, um Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Enzym zu bilden. Nach der Bindung von SAM ist die Desolvatisierung von Fluorid abgeschlossen. Der elektropositive 5'-Kohlenstoff, der an die Schwefelgruppe des SAM gebunden ist, koordiniert mit dem Fluorid, diese elektrostatische Stabilisierung erleichtert den nukleophilen Angriff des Fluorids und die Bildung von C-F-Bindungen des reaktiven 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin (5'-FDA)-Zwischenprodukts.<sup>[167, 168]</sup> Anschließend wird 5'-FDA weiter metabolisiert, um eine Vielzahl von Verbindungen zu erzeugen (siehe Abbildung 17).<sup>[164]</sup>

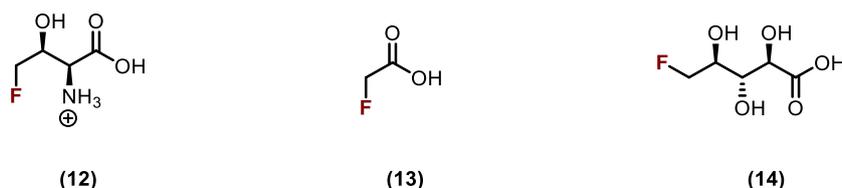


Abbildung 17: Fluorierte Produkte der SAM-abhängigen Halogenasen

Dies stellt jedoch auch ein großes Hindernis für die Anwendung dieser Enzyme auf unnatürliche kleine organische Moleküle dar, da die Produktbildung einer Kaskade von enzymatischen Schritten folgt. Eustáquio *et al.* versuchten, dieses Enzym für die Herstellung von Fluorosalinoporamid, einem unnatürlichen Analogon von Salinosporamid, zu verwenden, das eher fluoriert als chloriert ist; die Ausbeute war jedoch mäßig.<sup>[169]</sup> Dennoch wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um das Substratspektrum zu erweitern und das Enzym als flexibles Werkzeug für medizinische Anwendungen zu nutzen.<sup>[170, 171]</sup>

Neben der Fähigkeit, Verbindungen zu fluorieren, ist die Fluorinase auch in der Lage, ein Chlorid am 5'-Kohlenstoff des SAM-Riboserings durch ein Fluorid auszutauschen und 5'-FDA zu bilden (siehe Abbildung 16 B).<sup>[172, 173]</sup> Diese gesamte *trans*-Halogenierungsreaktion wurde für die späte Fluorierung zur Herstellung von radioaktiv markierten Bildungsreagenzien verwendet.<sup>[174]</sup> In den vergangenen Jahren wurden verschiedene *pre-targeting*-Strategien für die Behandlung und Bildung verschiedener Krankheiten entwickelt. Dazu gehören z.B. die Radiomarkierung des menschlichen A2A-Adenosinrezeptors, eines mit Prostatakrebs zusammenhängenden Membranproteins, oder die kombinierte Anwendung von Biotin- und Tetrazin-Konjugaten mit Antikörpern.<sup>[175-177]</sup>

In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Fluorinase (FLA) Substrate mit unterschiedlichen Resten am C-2 des Adeninrings akzeptiert. Bisher sind zwei Kristallstrukturen von Fluorinase-Homologen aus *S. cattleya* und *Streptomyces sp.* MA37 bekannt, die beide eine hohe Strukturkonformität aufweisen.<sup>[178]</sup> Im Allgemeinen weisen alle fünf bekannten Fluorinasen eine hohe Ähnlichkeit von über 80 % auf und zeigen ähnliche kinetische Profile.<sup>[179]</sup> Durch gerichtete Evolution von FLA1 wurden verschiedene entscheidende Aminosäuren für die Substratbindung und Halogenidbindung identifiziert, die somit maßgeblich für die Aktivität des Enzyms verantwortlich sind.<sup>[180, 181]</sup> Zusätzlich wurden diese Varianten mit verschiedenen unnatürlichen Substraten getestet.<sup>[182]</sup> Es zeigte sich, dass die Toleranz des Wildtyp-Enzyms auf C-2-modifizierte Substrate beschränkt ist. Die generierten Varianten von FLA1 zeigten jedoch auch eine Aktivität für ein unnatürliches Substrat, das an der C-6-Position des Adeninrings mit einer Chlorgruppe modifiziert war.<sup>[182]</sup> Trotz des engen Substratspektrums der Fluorinase scheint es somit möglich, verschiedene unnatürliche Substrate erfolgreich einzusetzen und eine Grundlage für die gerichtete Evolution des Enzyms zur Nutzung kleiner organischer Verbindungen als Substrate zu schaffen. Die Abhängigkeit von elektrophilen Substratstrukturen für den nukleophilen Angriff von Fluorid bleibt jedoch ein Nachteil.

Eine Kristallstruktur mit einem unnatürlichen Substrat (das Difluormethylgruppen enthält) bestätigte die Notwendigkeit einer definierten Geometrie zur Aktivierung des Fluoratoms für die Substitution.<sup>[183]</sup> Die Herausforderung in der Applikation solcher Fluorinasen zur Herstellung fluorierter pharmazeutischer Verbindungen liegt daher in der Entwicklung geeigneter Abgangsgruppen in Kombination mit der Erweiterung der Substrattoleranz dieser Enzyme durch *enzyme engineering*.

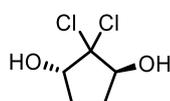
## 2.4 Haloperoxidasen

Haloperoxidasen waren die erste Gruppe von halogenierenden Enzymen, die in der Vergangenheit entdeckt wurde. Enzyme dieser Familie katalysieren die Oxidation eines Halogenidanions ( $X^-$ ) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zu einer oxidierten Halogenidform, bei der es sich in der Regel um die entsprechende hypohalogenierte Säure handelt. Diese Klasse besitzt somit Ähnlichkeiten mit den namensgebenden Peroxidasen, die für den Abbau von Wasserstoffperoxid oder anderen Peroxiden in der Zelle zuständig sind und damit eine Detoxifizierung der Zelle gewährleisten.

Die Klasse der Haloperoxidasen wird in drei weitere Unterklassen unterteilt: Die Häm-eisenabhängigen, die vanadiumabhängigen und die metallfreien Haloperoxidasen bzw. Perhydrolasen. Als eine Abwandlung der Häm-eisenabhängigen Haloperoxidasen existieren auch die unspezifischen Peroxygenasen.<sup>[184]</sup> Ursprünglich als Homologe identifiziert, zeigte diese Enzymfamilie neben Halogenierungen eine große Reihe unselektiver wie selektiver Oxyfunktionalisierungsreaktionen, weshalb sie eher mit der Klasse der P450-Monooxygenasen vergleichbar ist.<sup>[118]</sup> Aufgrund dieser breiten Chemoselektivität wird diese Enzymfamilie mittlerweile nicht mehr unter der Klasse der Haloperoxidasen geführt, obwohl viele Vertreter zu Halogenierungen im Stand sind.

### 2.4.1 Häm-eisenabhängige Haloperoxidasen

Die Häm-eisenabhängigen Haloperoxidasen waren die ersten und am intensivsten untersuchten Haloperoxidasen. Bereits in den 1960er Jahren wurde gezeigt, dass ein sekretiertes Enzym aus dem Pilz *Caldariomyces fumago* (*Leptoxypodium fumago*) für die Halogenierung von 1,3-Cyclopentadion zu der natürlichen Verbindung Caldariomycin **15** verantwortlich ist.<sup>[185]</sup>

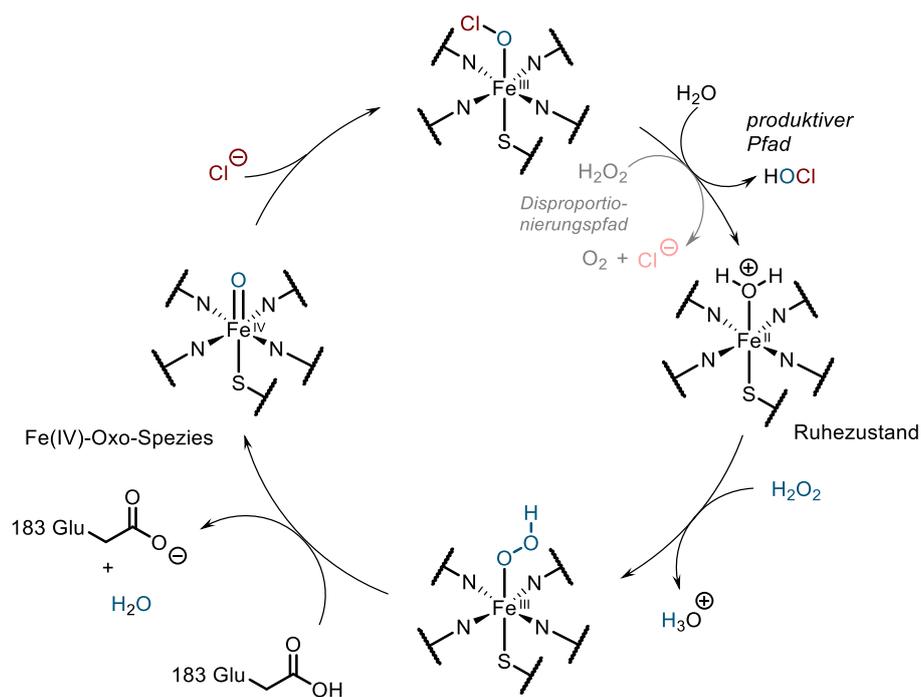


**Caldariomycin**  
**15**

**Abbildung 18: Strukturformel des Naturstoffs Caldariomycin 15, isoliert aus *C. fumago***

Bei weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es eine prosthetische Häm-Eisen-Gruppe enthält, die über einen distalen Cysteinliganden an das Enzym gebunden ist, vergleichbar mit P450-Monooxygenasen.<sup>[186]</sup>

Der postulierte katalytische Zyklus zeigt ein wichtiges Zwischenprodukt, die Fe(IV)-Oxo-Spezies zur Oxidation von Chlor zu Hypochlorit, das freigesetzt wird und von einem elektronenreichen Substrat, das als Elektrophil dient, angegriffen werden kann. In Gegenwart von überschüssigem Wasserstoffperoxid kann dieser Komplex alternativ zu molekularem Sauerstoff und Chlorid zerfallen (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19: Postulierter katalytischer Zyklus der Häm-eisenabhängigen Haloperoxidasen am Beispiel der Chlorperoxidase aus *C. fumago*, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38]</sup>**

Im Ruhezustand (3 Uhr) ist Wasser an das Häm-Eisen gebunden, das anschließend durch Wasserstoffperoxid ersetzt wird. Nach der Protonierung dieses Komplexes durch ein katalytisches Glutamat (Glu183) wird Wasser eliminiert, wodurch die eigentlich aktive Spezies, der Fe(IV)-Oxo-Komplex, entsteht. Ein Halogenid, in diesem Fall Chlorid, bindet an die Fe(IV)-Oxo-Spezies und wird als hypochlorige Säure freigesetzt, wodurch das Häm-Eisen durch Hydrolyse mit Wasser regeneriert wird. Alternativ kann auch ein zweites Molekül Wasserstoffperoxid angreifen, was zur Disproportionierung des Komplexes zu molekularem Sauerstoff, Wasser (gebunden am Eisen) und Chlorid führt.<sup>[186, 187]</sup>

Da das Enzym sowohl Merkmale von Peroxidasen als auch von Monooxygenasen aufweist, wurde es als Häm-eisenabhängige Haloperoxidase klassifiziert und aufgrund seiner Fähigkeit, alle Halogenide außer Fluor zu oxidieren, Chlorperoxidase (CPO-*Cf*) genannt. Diese Namensgebung wurde für alle anderen Haloperoxidasen verwendet, wobei das umgesetzte Halogenid mit dem höchsten Oxidationspotenzial namensgebend für die Haloperoxidase ist.

Vor einigen Jahren wurde festgestellt, dass im Genom von *C. fumago* zwei CPO-*Cf*-Gene existieren, die eine hohe Sequenzidentität aufweisen und beide im sekretierten Überstand des Wirts vorkommen.<sup>[188]</sup> Welche Rolle die jeweilige Isoform spielt, konnte allerdings nicht final geklärt werden. Seit seiner Entdeckung war das Enzym Ziel zahlreicher mechanistischer und biokatalytischer Studien. Entgegen ersten Vermutungen verlässt die gebildete hypohalogenierte Säure das aktive Zentrum nicht frei, sondern wird durch Aminosäuren im Halogenid-Eingangstunnel von CPO-*Cf* zurückgehalten, was bis zu einem gewissen Grad Regio- und Enantioselektivität ermöglicht, die hauptsächlich von der Art des Substrats abhängt.<sup>[189]</sup>

Der größte Nachteil des Enzyms ist die oxidative Inaktivierung, die charakteristisch für Häm-Eisenhaltige Proteine ist. Zudem weist CPO-*Cf* eine hohe Empfindlichkeit gegenüber hohen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen auf, was problematisch für die Skalierung von Reaktionsansätzen in präparative Maße ist. Da sich die genetische Veränderung des Pilzes als langwierig erweisen kann, scheint die Anwendung dieses Enzyms in der Biokatalyse begrenzt zu sein. Dank der Arbeit von Pickard *et al.*

sind jedoch Protokolle für eine ausreichende Produktion und Sekretion des Enzyms im homologen Wirt *C. fumago* verfügbar.<sup>[190]</sup>

Neben der Chloroperoxidase aus *C. fumago* sind nicht viele Mitglieder dieser Unterklasse untersucht worden. Die Bromoperoxidasen aus *Pseudomonas aureofaciens* und *Penicillium capitatus* sind weitere Beispiele für solche Häm-eisenabhängigen Enzyme.<sup>[191, 192]</sup> Neben klassischen Charakterisierungsexperimenten, die ähnliche Eigenschaften von CPO-*Cf* wie die hohe thermische Stabilität und Empfindlichkeit gegenüber hohen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen zeigten, wurden jedoch noch keine komplexen Biotransformationen mit diesen Enzymen untersucht.<sup>[193]</sup>

#### 2.4.2 Vanadiumabhängige Haloperoxidasen

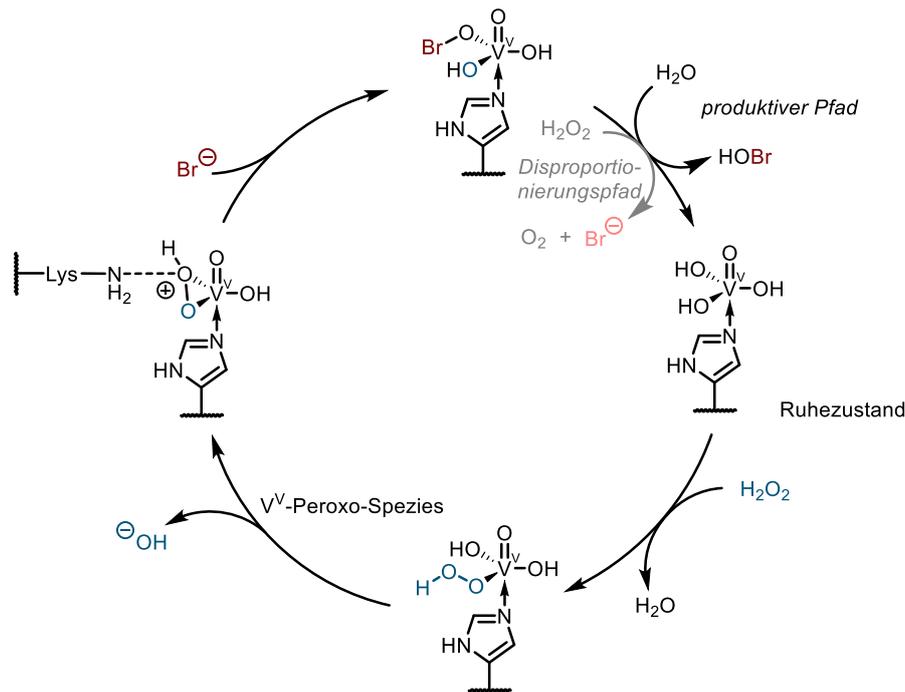
Mehrere Jahre nach der Entdeckung der Häm-eisenabhängigen Haloperoxidasen wurde angenommen, dass sie die einzigen Enzyme sind, die Halogenide für die anschließende Halogenierungsreaktion oxidieren können. 1993 entdeckten van Schijndel *et al.* im pilzlichen fakultativen Pflanzenpathogen *Curvularia inaequalis* eine neue Klasse halogenierender Enzyme, die den Cofaktor *ortho*-Vanadat für die Oxidation von Halogeniden verwenden.<sup>[194, 195]</sup> Für die Produktion und Funktionalität des Enzyms konnte Glucose als Inhibitor identifiziert werden.<sup>[196]</sup> Zwei Jahre später wurde ein Vanadatabhängiges Homolog aus *Corallina officinalis* kristallisiert.<sup>[197]</sup> Diese vanadiumabhängigen Haloperoxidasen (V-HPOs) wurden zu einem beliebten Forschungsziel, da sie nachweislich hohe Umsatzzahlen aufweisen, ohne eine oxidative Inaktivierung zu erleiden, und eine höhere Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid zeigen als die Häm-eisenabhängigen HPOs.<sup>[198]</sup>

Im Gegensatz zu den Häm-eisenabhängigen Enzymen halten sie jedoch die gebildete hypohalogenige Säure in der Regel nicht im aktiven Zentrum zurück, was zu einem frei diffundierenden starken Oxidationsmittel führt. Infolge dieses mechanistischen Aspekts kommt es zu zufälligen Halogenierungen, sogar im Protein selbst, was zu seiner Destabilisierung und Inaktivierung führen kann. Aufgrund dieser freien halogenhaltigen Spezies ist die Selektivität der Halogenierungsreaktionen nicht abhängig vom Enzym, sondern von den elektronischen Eigenschaften des Substrats.

Die meisten vanadiumabhängigen Haloperoxidasen stammen aus marinen Pilzen und marinen Makroalgen (Seegräs).<sup>[199]</sup> Die physiologische Rolle dieser Proteine konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden, da nicht immer halogenierte Naturstoffe aus den untersuchten Organismen isoliert werden konnten. Eine gängige Hypothese zur physiologischen Rolle ist die Teilnahme der Enzyme an der Penetration der pflanzlichen Wirtszellwand durch die freigesetzte hypohalogenige Säure.<sup>[200]</sup>

Neben diesen Organismus-spezifischen Eigenschaften wurden Hypothesen aufgestellt, nach denen V-HPOs eine ökologische Rolle spielen, wie etwa die Beteiligung an der antimikrobiellen Abwehr des Wirtes, dem exogenen Abbau von Molekülen oder der Iod(gas)erzeugung als Antwort auf oxidativen Stress.<sup>[201]</sup> Zudem konnte die Bildung von flüchtigen Haloformen wie Chloroform und Bromoform beobachtet werden, deren Einfluss auf die Umwelt nicht vollständig verstanden ist.<sup>[202]</sup>

Der katalytische Zyklus bildet vermutlich eine V(V)-Peroxo-Spezies als Schlüsselintermediat, an die das Halogenid addiert und anschließend zu hypohalogenierter Säure hydrolysiert wird (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20: Postulierter katalytischer Zyklus von vanadiumabhängigen Haloperoxidasen, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38]</sup>**

In seinem Ruhezustand (3 Uhr) enthält Vanadium vier Sauerstoffliganden, während die freie Koordinationsstelle durch einen Histidinrest besetzt ist, was zu einer dativen Bindung führt. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid wird eine Hydroxylgruppe als Wasser frei und durch Peroxid ersetzt. Nach Abspaltung eines Hydroxidions entsteht eine Zykl-Peroxo-Spezies, die durch einen katalytischen Lysinrest (Lys) stabilisiert wird. Dieses zyklische Zwischenprodukt wird durch Zugabe eines Halogenids, in diesem Fall Bromid, geöffnet, das dann durch Wasser hydrolysiert werden kann. Dies führt zur Freisetzung von hypobromiger Säure, oder hat alternativ in Gegenwart eines weiteren Wasserstoffperoxidmoleküls eine Disproportionierungsreaktion zu molekularem Sauerstoff und Bromid zur Folge. Während der Katalyse ändert das Vanadium seine Oxidationsstufe (V) nicht.<sup>[187]</sup>

Die genaue Hydrolyse der Oxohalo-Spezies ist final nicht geklärt. Mehrere computergestützte Studien zeigten einen detaillierteren Katalysezyklus, bei dem beispielsweise ein weiteres Histidin in der Nähe des Vanadat-Cofaktors das Halogen nukleophil angreifen könnte.<sup>[203, 204]</sup> Die so gebildete Halohistidin-Spezies könnte dann von Wasser angegriffen und als hypohalogenierte Säure freigesetzt werden. Experimentelle Befunde aus Kristallisationsexperimenten oder biochemischen Mutagenesestudien existieren dazu allerdings noch nicht. Ähnlich wie bei den Häm-eisenabhängigen Haloperoxidasen kann die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu einem Missverhältnis zwischen Singulett-Sauerstoff und dem Halogenid führen.<sup>[187]</sup> Dies hat die Disproportionierung des halogenierten Vanadiumkomplexes zu Sauerstoff und freiem Halogenid zur Folge.

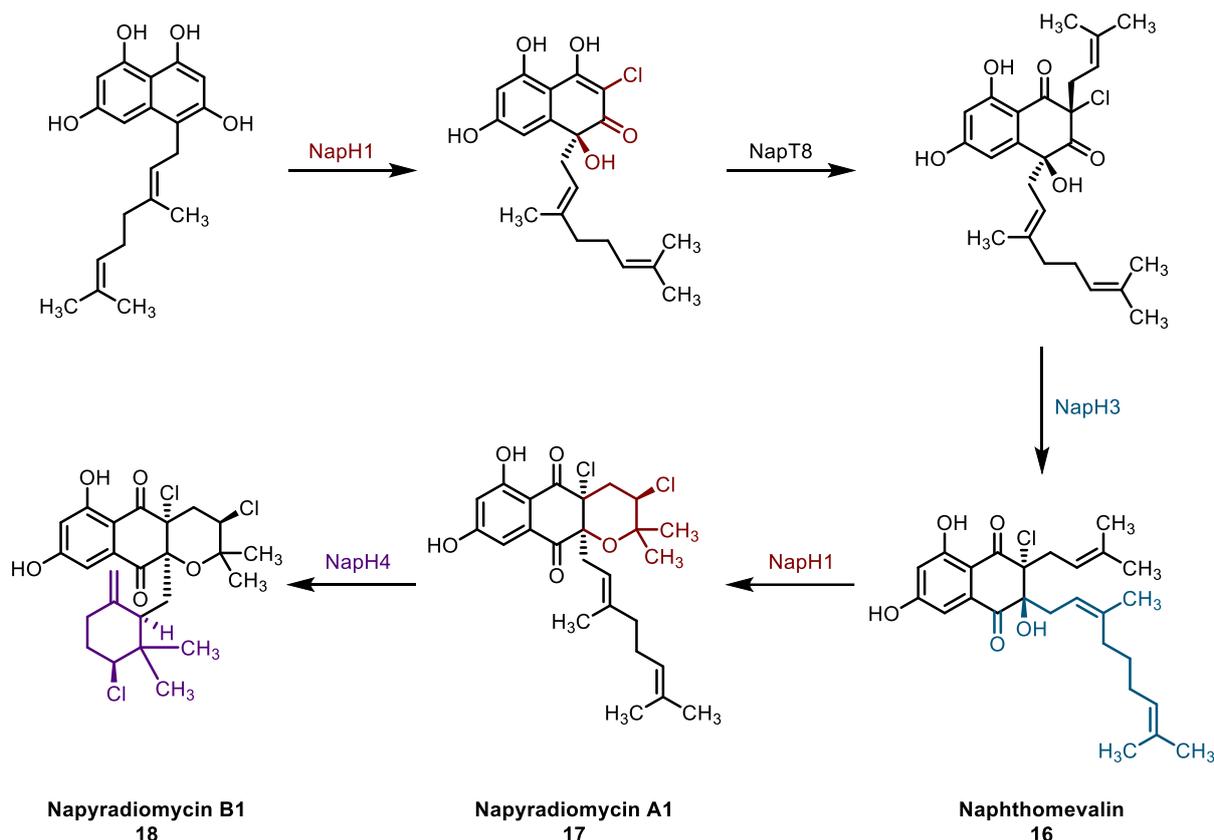
Einer der am besten untersuchten Vertreter dieser Enzymfamilie ist die eingangs erwähnte vanadiumabhängige Chloroperoxidase aus dem phytopathogenen Pilz *Curvularia inaequalis* ( $V_{Cl}PO-C$ ).<sup>[194, 195, 205-207]</sup> Selbst in Abwesenheit des Vanadat-Kofaktors ist das Enzym in seiner *apo*-Form stabil und kann durch externe Zugabe von *ortho*-Vanadat leicht in die *holo*-Form umgewandelt werden.<sup>[194]</sup> Obwohl das Gen in *E. coli* heterolog exprimiert und mit Vanadat aktiviert werden kann, wurde berichtet, dass die erhaltene Enzymmenge sehr gering ist. Als Alternative wurde *Saccharomyces cerevisiae* als Wirt verwendet, der 100 mg · L<sup>-1</sup> *apo*-Enzym lieferte.<sup>[205]</sup> Kinetische Experimente ergaben einen apparenten  $k_{cat} \cdot K_M^{-1}$  -

Wert von  $2.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für Wasserstoffperoxid und  $5.1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  für Bromid bei einem pH-Wert von 4.2, dem optimalen pH-Wert für Bromoperoxidase-Aktivität.<sup>[205]</sup>

Bei hohen Temperaturen, die einen Schmelzpunkt  $T_M$  von über  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  offenbarten, zeigte das Enzym eine hohe Stabilität. Zudem konnte eine ausgeprägte Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol und Propan-2-ol (bis zu 40 % (v/v)) beschrieben werden.<sup>[195]</sup>

Interessanterweise ist die Auswahl weiterer vanadiumabhängiger Chloroperoxidasen vergleichsweise gering. Stattdessen wurden viele Vertreter der vanadiumabhängigen Bromoperoxidasen erforscht. Einer der prominentesten Vertreter dieser Gruppe ist die  $V_{Br}PO$  aus *Corralina officinalis*, einer marinen Rotalge. Ähnlich wie das Homolog aus *C. inaequalis* zeichnet es sich durch ausgeprägte Stabilität gegenüber hohen Temperaturen bis  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  aus und zeigt in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Propanol und Aceton [bis zu 40 % (v/v)] ähnliche Resistenzen.<sup>[197]</sup> Die rekombinante Expression des Gens in *E. coli* BL21(DE3) erwies sich jedoch ebenfalls als schwierig, da die Menge des gebildeten dodekameren Proteins hoch, aber unlöslich ist. Coupe *et al.* konnten durch ein Rückfaltungs-Verfahren  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  aktives Enzym nach Produktion und Isolierung gewinnen.<sup>[208]</sup>

Neben Haloperoxidasen aus Pilzen und (Makro-)Algen konnten vor einiger Zeit Vertreter dieser Enzymfamilie in Bakterien nachgewiesen werden. Im Organismus *Streptomyces* sp. CNQ-525 konnte Napradiomycin A1 **17** identifiziert werden, ein terpenoider Naturstoff, der zwei Chlorsubstituenten enthält.<sup>[209]</sup> Nähere Untersuchungen zeigten, dass ein Haloperoxidase-Homolog, NapH1, für die stereoselektive Chlorierung des Vorläufermoleküls Naphthomevalin **16** verantwortlich ist (siehe Abbildung 21).



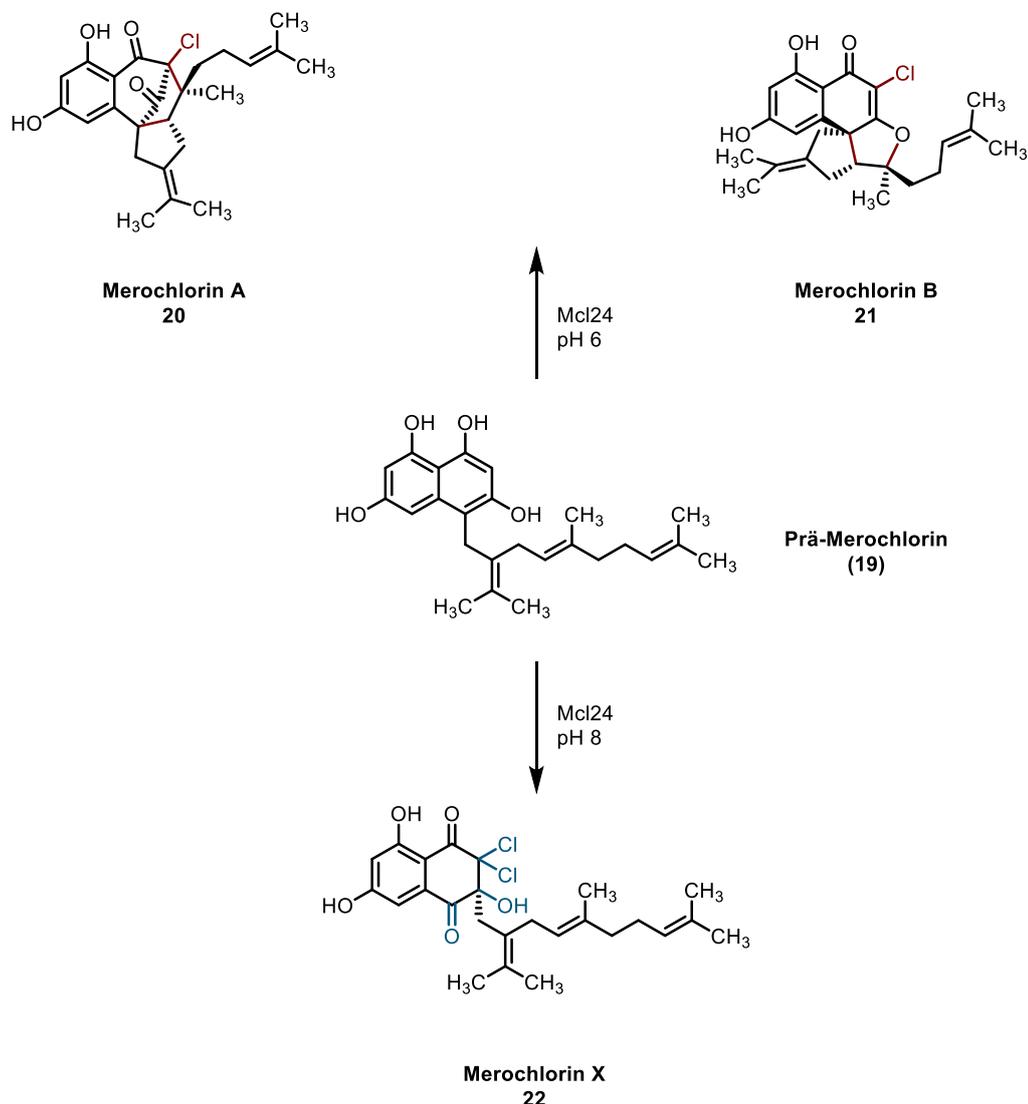
**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Biosynthese von Napyradiomycin A1 (17) und B1 (18)**

Dargestellt ist der Ausschnitt der Biosynthese, an dem die drei V-HPO-Homologe NapH1, NapH3 und NapH4 beteiligt sind. Die transformierten Atome sind farblich für jedes Enzym hervorgehoben. Das Vorläufermolekül 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin wird von NapH1 dearomatisiert und stereoselektiv chloriert. Nach Übertragung einer weiteren Isopreneinheit am chlorierten Kohlenstoff durch NapT8 wird eine Umlagerung der  $\alpha$ -Hydroxyketongruppe durch NapH3 katalysiert. Anschließend chloriert NapH1 erneut stereoselektiv das gebildete Naphthomevalin (16) und induziert dabei die Zyklisierung des Isoprenylrestes. Das gebildete Napyradiomycin A1 (17) kann abschließend von NapH4 stereoselektiv am Geranylrest chloriert und anschließend analog zyklisiert werden, es entsteht Napyradiomycin B1 (18).<sup>[210]</sup>

*In vitro* Experimente zeigten die stereospezifische Chloronium-induzierte Zyklisierung der Prenyl-Einheit, um ein 7-methyliertes Napyradiomycin A Derivat zu erhalten. NapH4, ein weiteres Enzym desselben Biosynthesecusters, katalysiert die stereoselektive Chloronium-vermittelte Zyklisierung einer Geranyl-Einheit.<sup>[210]</sup> Obwohl Kristallstrukturen mit und ohne Cofaktor publiziert sind und erste Mutagenesestudien die katalytisch relevanten Aminosäuren identifizieren konnten, ist der genaue Modus der stereoselektiven Chlorierung mittels Chloronium nicht geklärt.<sup>[211, 212]</sup> Beide Vertreter zeigten zudem nur eine sehr geringe Akzeptanz für andere, nicht-natürliche Substrate.

Ein Homolog im gleichen Organismus, NapH3, zeigte trotz hoher Sequenzidentität und charakteristischer V-HPO-Sequenzmotive keine HPO-Aktivität. Stattdessen katalysierte es die  $\alpha$ -Hydroxyketon-Umlagerung des Geranyl-Restes des Prenaphthomevalins zum Naphthomevalin.<sup>[211]</sup> Die Reaktion war unabhängig von Vanadat oder anderen Cofaktoren. Computergestützte Berechnung zeigten, dass die Reaktion zwar energetisch bevorzugt wird, in Anwesenheit von NapH3 die Rate der Umlagerung allerdings drastisch erhöht ist. In Anwesenheit eines racemischen Gemischs von Prenaphthomevalin konnte sogar eine Enantioselektivität der Umlagerung festgestellt werden.<sup>[213]</sup>

Mit Mcl24 konnte eine weitere V-HPO bakteriellen Ursprungs identifiziert werden. Das Enzym ist an der Biosynthese von Merochlorin beteiligt und zeigt die eingangs beschriebenen Eigenschaften aller bakteriellen V-HPOs in einem Enzym (siehe Abbildung 22).<sup>[214-217]</sup>



**Abbildung 22: Schematische Darstellung der katalysierten Reaktionen der V-HPO Mcl24**

Abhängig vom pH-Wert kann Mcl24 drei verschiedene Produkte aus Prä-Merochlorin (19) bilden. Im leicht sauren Milieu (pH 6) erfolgt nach Dichlorierung des Prä-Merochlorins (19) eine α-Hydroxyketon-Umlagerung zum Merochlorin X 22. Im leicht basischen (pH 8) erfolgt nach Dichlorierung des Prä-Merochlorins (19) eine Terpen-Zyklisierung, die zu Merochlorin A 20 oder B 21 führen kann. Für beide Reaktionswege wird ein benzylicches Kation als Zwischenstufe postuliert, das sich durch oxidative Dearomatisierung bilden soll, wenn am O-chlorierten Intermediat Chlor eliminiert wird.<sup>[211]</sup> Die neu geknüpften Bindungen sind jeweils farblich hervorgehoben.

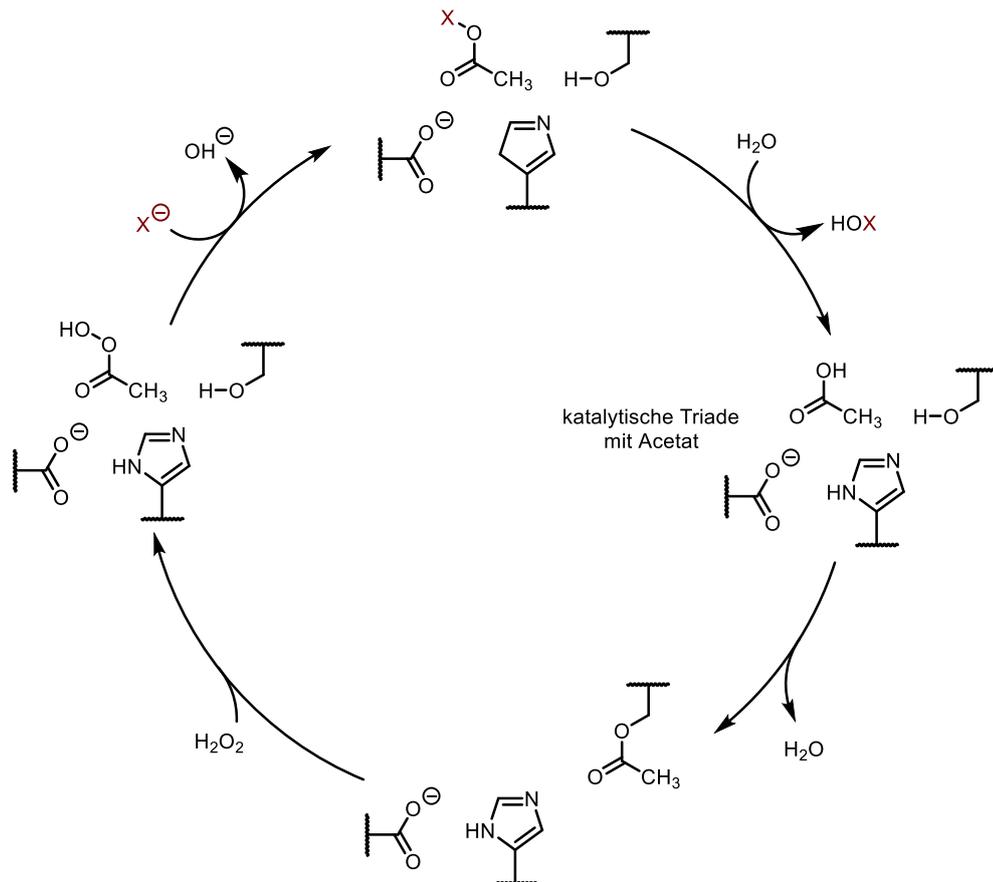
Abhängig vom pH-Wert konnte so die Halogenierung, oxidative Dearomatisierung und Terpenzyklisierung des Prämerochlorins (19) zu zwei monochlorierten Merochlorin-Strukturen, A 20 und B 21, beobachtet werden.<sup>[214, 216]</sup> Während diese Reaktionen bei leicht sauren Bedingungen (pH 6) durchgeführt wurden, die typisch für Haloperoxidase-Aktivität sind, wurde unter leicht basischen Bedingungen (pH 8) überwiegend Merochlorin X 22 erhalten.<sup>[213]</sup>

Die Vielseitigkeit dieser Haloperoxidasen und insbesondere die unübliche Enantioselektivität dieser Enzyme begründet einen neuen Fokus auf der Suche nach V-HPOs bakteriellen Ursprungs, die selektive Halogenierungen mit hohen Umsätzen ermöglichen könnten.<sup>[211]</sup> Durch die gleichzeitige Anwesenheit weiterer Reaktivitäten wie der stereoselektiven Zyklisierungsvermittlung verschiedener Terpenbausteine sind bakterielle V-HPOs das Ziel neuer Biotransformationen mit komplexen Zielstrukturen. Aus diesem Grund wird mittlerweile zwischen zwei Arten der V-HPOs unterschieden, den nicht-stereoselektiven Enzymen aus Pilzen und Algen und den regio- und stereoselektiven V-HPOs aus *Streptomyceten* und anderen Bakterien.

### 2.4.3 Metallfreie Haloperoxidasen / Perhydrolasen

Obwohl oxidative Halogenierungsreaktionen in der Natur von der Katalyse durch (Übergangs-)Metalle dominiert werden, wurde eine Gruppe von Enzymen identifiziert, die Halogenierung ohne jeglichen Metall-Cofaktor katalysieren. Diese metallfreien Haloperoxidasen oder Perhydrolasen benötigen ebenfalls Wasserstoffperoxid und Halogenide und bilden Percarbonsäuren aus Carbonsäuren unter Verwendung einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat<sup>[218,219]</sup>. Ihre auffällige Ähnlichkeit zu Lipasen hat eine allgemeine Debatte über die Natur dieser Enzyme ausgelöst, da ihre Eigenschaften vermehrt an Hydrolasen mit halogenierender Nebenreaktivität erinnern. Deshalb steht es zur Debatte, metallfreie Haloperoxidasen als eine Art degenerierter Lipasen zu bezeichnen oder sie als eigenständiges Mitglied der Haloperoxidasen zu klassifizieren. Tatsächlich wurden mehrere Lipasen trotz niedriger Umsatzzahlen positiv auf Haloperoxidase-Aktivität getestet.<sup>[220]</sup>

Der Schlüsselschritt bei der Katalyse ist die Bildung einer Peroxosäure aus einer Carbonsäure durch Wasserstoffperoxid, das anschließend ein Acylhypohalogenid bildet, das als Halogenierungsmittel fungiert (siehe Abbildung 23).<sup>[221]</sup>

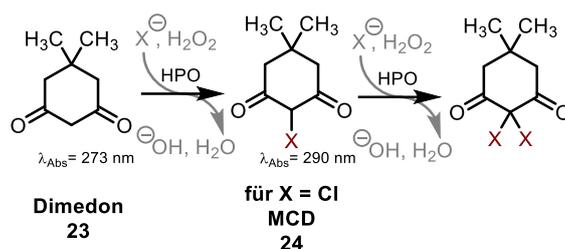


**Abbildung 23: Postulierter Mechanismus von metallfreien Haloperoxidasen bzw. Perhydrolasen, adaptiert nach Fejzagić *et al.*<sup>[38]</sup>**

Dieser Mechanismus wurde aus mehreren Quellen zusammengetragen: Der katalytische Zyklus wurde von der üblichen Hydrolasekatalyse übernommen, wie sie z.B. bei Lipasen und Esterasen vorkommt. In Anwesenheit einer Carbonsäure, in diesem Fall Essigsäure, wird mit dem katalytischen Serinrest unter Abspaltung von Wasser ein Ester gebildet (3 Uhr). In Gegenwart von Wasserstoffperoxid wird der Ester unter Bildung einer Peroxosäure gespalten. Im folgenden Schritt bindet ein Halogenid an die Peroxosäure, die zur hypohalogenierten Säure hydrolysiert wird, während die charakteristische Ser-His-Asp-Triade regeneriert wird.<sup>[219, 220]</sup>

#### 2.4.4 Nachweis von Haloperoxidasen

Die Bestimmung von Haloperoxidase-Aktivität erfolgte erstmals im Zuge der Charakterisierung von CPO-*Cf* im Jahr 1966. Die Grundlage für den Assay war Monochlordimedon (**24**) (MCD), eine an das natürliche Substrat Caldariomycin (**15**) angelehnte Diketonstruktur. Die Halogenierung kann dabei elektronisch bedingt an der 2-Position erfolgen. Durch konsekutive Halogenierung zum Dihalodimedon kann photometrisch die Abnahme der Absorption bei 290 nm verfolgt werden (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Reaktionsschema des Dimedon (23) - bzw. Monochlordimedon (24)-Assays**

5,5-Dimethyl-1,3-cyclohexandion (Dimedon (23)) kann in einer HPO-vermittelten Reaktion an der 2-Position des Dimedons ein Halogen elektrophil addieren. In einem zweiten Schritt oder alternativ mit einer Monohalodimedon-Spezies als Startmaterial kann erneut an der 2-Position halogeniert werden. Beide Reaktionen sind photometrisch bei 273 bzw. 290 nm verfolgbar.<sup>[201]</sup> Üblicherweise wird als Substrat für den Assay 2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3-cyclohexandion (Monochlordimedon (24)) verwendet. **X**: Chlor oder Brom

Seit der Etablierung ist der Assay bis heute der Standard zur Identifizierung und Quantifizierung von Haloperoxidase-Aktivität. In den vergangenen Jahren zog der Assay allerdings zunehmend Kritik auf sich. Berichte über falsch-positive HPO-Aktivität ermittelt über den Dimedon-Assay verdeutlichen die Problematik der Messung von Eduktabnahmen über Photometrie.<sup>[222]</sup> China *et al.* konnten im MCD-Assay zudem zahlreiche Nebenprodukte einer Dehalolaktonisierungs-Reaktion ermitteln, die weitere Fragen über die Zuverlässigkeit des Assays aufwarf.<sup>[223]</sup>

Neben dem MCD-Assay sind weitere weniger verbreitete Nachweise bekannt. Die Bromierung des Farbstoffs Phenolrot zu Bromphenolblau erlaubt durch die markanten Farbwechsel eine qualitative Detektion von HPO-Aktivität. Zudem existieren verschiedene Assays mit denen Wasserstoffperoxid oder hypohalogenige Säuren nachgewiesen werden können.<sup>[224-226]</sup> Häufig interferieren allerdings hohe Wasserstoffperoxid-Konzentrationen mit der Detektion der Fluorophore.<sup>[227]</sup> Eine kürzlich publizierte Alternative stellt der Nachweis von Halogeniden über Fluorescein dar. Ursprünglich als Dehalogenase-Assay konzipiert, nutzt er  $\text{V}_{\text{Cl}}\text{PO-CI}$  als Zwischenreaktion, um hypohalogenige Säure zu generieren, die die Spaltung der Aminophenylgruppe vom Fluorescein verursacht und somit ein Fluoreszenzsignal durch das freie Fluorescein generiert.<sup>[228]</sup> Der Nachteil des Assays ist das kostspielige Substrat Aminophenylfluorescein.

Für FAHs wurde ein fluoreszenzbasierter Hochdurchsatz-Assay entwickelt, bei dem bromiertes Tryptophan als Substrat für eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung fluorimetrisch nachgewiesen werden kann. Ähnliche Ansätze wären dabei auch für HPOs möglich.<sup>[229, 230]</sup>

#### 2.4.5 Anwendung von Haloperoxidasen als Biokatalysatoren

Die hohen Umsatzraten und die ausgeprägte Stabilität vieler Haloperoxidasen machte sie zum Ziel zahlreicher biokatalytischer Anwendungen. CPO-Cf konnte sich in der Vergangenheit als recht robust erweisen und ermöglicht eine Vielzahl verschiedener organischer Umwandlungen, wobei einige nicht immer an einen Halogenierungsschritt gebunden sind. Das Enzym kann in Kaskadenreaktionen mit Oxidasen eingesetzt werden, die zu Halozyklisierungs-Reaktionen von Allenen führen, und sogar für die Nutzung in (semi-)kontinuierliche Bioreaktoren immobilisiert werden.<sup>[231-233]</sup> Es wurde für die Halogenierung von phenolischen Monoterpenen wie Thymol und Carvacrol verwendet und zeichnete sich im Vergleich zu chemischen Alternativen wie der Cu(II)-Katalyse durch drastisch niedrigere Katalysatorbeladungen aus (um bis zu fünf Größenordnungen).<sup>[231]</sup> Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass CPO-*Cf* in der Lage ist, *trans*-Zimtsäure und andere ungesättigte Carbonsäuren zu halogenieren sowie die enantioselektive Epoxidierung von Alkenen zu katalysieren.<sup>[234, 235]</sup>

Ein genereller Engpass bei vielen Anwendungen war allerdings die geringe Substratbeladung (u.a. wegen der Anfälligkeit für Wasserstoffperoxid), die eine mögliche präparative Anwendbarkeit beeinträchtigt.

V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* wurde als Hypohalogenit-Katalysator für die Halogenierung von Phenolen wie Thymol verwendet, wobei es eine ausgezeichnete Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid und organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Ethylacetat aufweist.<sup>[206]</sup> Außerdem wurde es für die Vermittlung von (*Aza*)-*Achmatowicz*-Reaktionen in Kombination mit Kaskaden und Halofunktionalisierungs-Reaktionen von aromatischen und aliphatischen Alkenen wie Styrol (**25**) und Hexanol verwendet.<sup>[207, 236]</sup> Kürzlich konnte V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* als Katalysator für die Synthese intermolekularer Haloether in einem chemoenzymatischen Ansatz verwendet werden.<sup>[237]</sup> Auch Bromozyklisierungs-Reaktionen von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Allenolen konnten mit dem Enzym erfolgreich beschrieben werden.<sup>[238]</sup> Die Kombination mit elektrochemischen Verfahren zur Bereitstellung von Wasserstoffperoxid konnte ebenfalls erfolgreich am Beispiel der Synthese von Bromlaktone (**31**) gezeigt werden.<sup>[239]</sup> Die Bioprozessabteilung von Merck konnte mit Bromperoxidase/Dehydrogenase-Präparaten aus *Curvularia*-Stämmen die Synthese des HIV-1-Proteasemmers Crixivan (Indinavir) durch Oxyfunktionalisierung von Inden realisieren.<sup>[240]</sup> Eine Übersicht von Biotransformationen die durch V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* katalysiert wurden ist nachfolgend gegeben (siehe Abbildung 25).

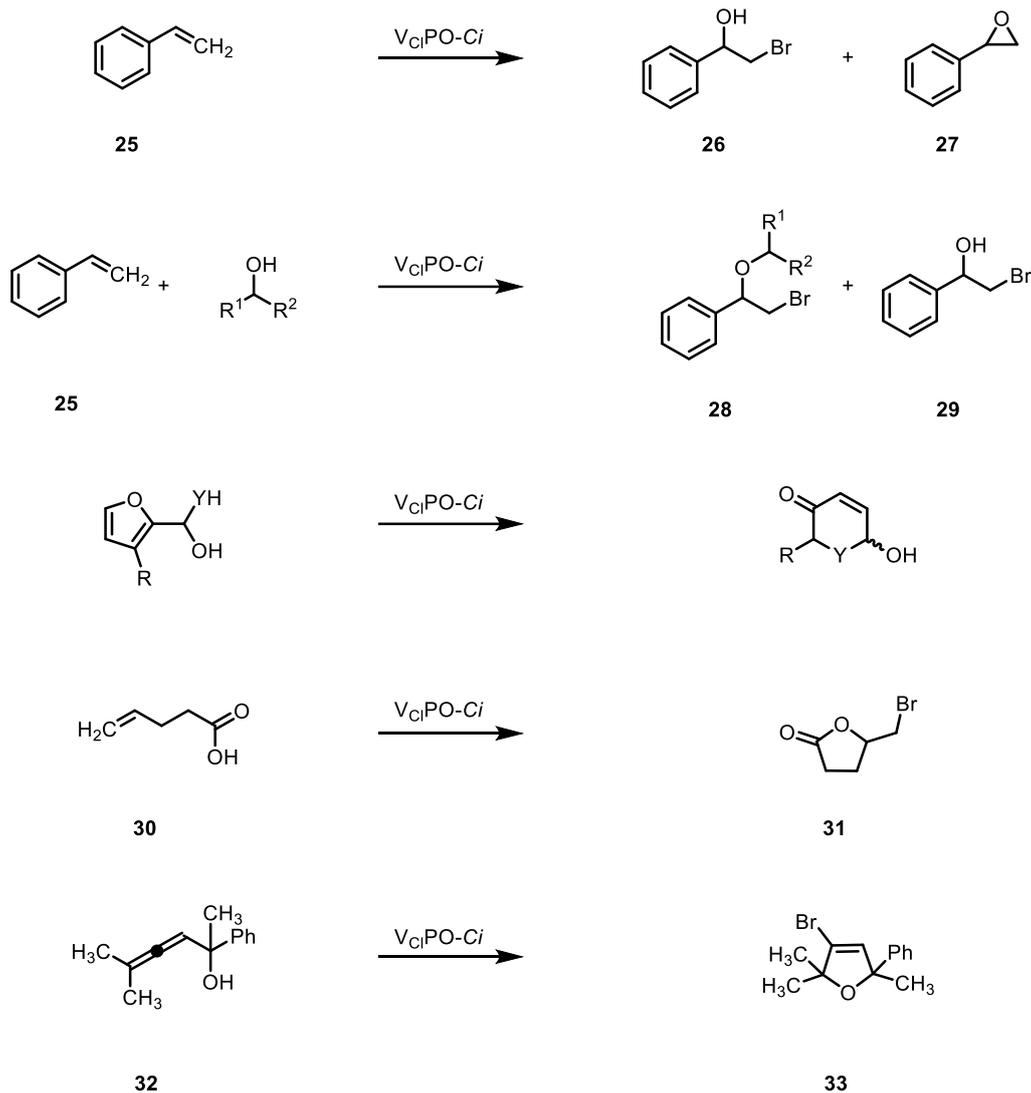


Abbildung 25: Übersicht einiger Biotransformationen, die durch  $V_{Cl}PO-Ci$  katalysiert werden

Neben  $V_{Cl}PO-Ci$  konnte auch die Haloperoxidase  $V_{Br}PO-An$  aus *Ascophyllum nodosum* erfolgreich als Biokatalysator eingesetzt werden. Eine Vielzahl von Substraten wie stickstoffhaltige Heterozyklen, zyklische  $\beta$ -Diketone, Phenol, *O*-Hydroxybenzylalkohole, Anisol, 1-Methoxynaphthalin und Thio-phen konnten ebenso umgesetzt werden wie Alken-Halogenierungen an Styrol, Cyclohexen und anderen Verbindungen, um verschiedene Bromhydrine zu bilden.<sup>[220]</sup> In den meisten Fällen konnte keine Diastereoselektivität für die Bromhydrinbildung beobachtet werden, mit Ausnahme der Bildung von Bromhydrin aus (*E*)-4-Phenyl-buten-2-ol.<sup>[241]</sup> Neben Bromierungs-Reaktionen sind Haloperoxidasen wie die  $V_{Br}PO-Co$  auch in der Lage, Sulfoxidationen mit 2,3-Dihydrobenzothiopen zu katalysieren.<sup>[242]</sup>

Viele Beispiele für metallfreie HPOs in Biotransformationen sind nicht bekannt. Die meisten Untersuchungen zu dieser Enzymfamilie konzentrierten sich auf die Bestimmung und Erweiterung der Toleranz dieser Enzyme gegenüber organischen Lösungsmitteln und Temperaturen. Ein aktuelles Beispiel für eine bioorganische Anwendung war die Halogenierung von Nucleobasen und Analoga, sowie die Bromierung von Olefinen und Terpenen, wie Cyclohexen, Inden und Nerol.<sup>[243, 244]</sup> Dabei erwies sich Propionsäure als verstärkender Cofaktor für Perhydrolase-Aktivität.

Generell haben sich Haloperoxidasen als nützliche Biokatalysatoren für verschiedene Transformationen erwiesen. Die Anwendung beschränkt sich bisher aber eher auf vereinzelt spezifischen

Reaktionen, die HPOs als Hypohalogenit-Donoren einsetzen und meist eine spontane Reaktion wie etwa die Halogen-vermittelte Zyklisierung anschließen.

## 2.5 (Kontinuierliche) Durchflusschemie – *flow chemistry*

### 2.5.1 Prinzip der Durchflusschemie

In der Arzneimittelentwicklung werden Wirkstoffkandidaten in Mengen von mehreren Kilogramm benötigt, die von etwa 10 kg für Phase-2-Studien in der klinischen Analyse bis hin zu Produktionschargen, die Hunderte von Kilogramm wiegen können, reichen. Chargenverfahren, die in der pharmazeutischen und feinchemischen Industrie routinemäßig eingesetzt werden, sind nicht immer leicht zu skalieren.<sup>[245]</sup> Erste Probleme können im Labor auftreten, wenn sich die Produktausbeute oder -qualität ändert, wenn die Mischgeschwindigkeit, die Zugabe (portionsweise oder kontinuierlich, schnell oder langsam), die Position eines Zufuhrstroms, das Scale-up auf ein Gefäß mit anderer Geometrie oder die Haltezeit vor der Aufarbeitung geändert wird. In solchen Fällen sind Mikromischung, schlechte Wärmeübertragung oder die Stabilität von Zwischenprodukten häufig die Ursache.<sup>[246]</sup> Diese Probleme können bereits in einem frühen Stadium der Laborentwicklung durch Sondierungsversuche in kleinem Maßstab erkannt und nach der Überwachung des Prozesses verworfen werden. Auch wenn es für viele Probleme in diesem sogenannten klassischen *batch*-Verfahren Lösungsansätze gibt, sind diese häufig aufwendig und fordern Kompromisse in der Skalierung. Die Alternative bietet die kontinuierliche Durchführung von Reaktionen im Durchfluss (englisch *flow*).<sup>[247]</sup>

Bei kontinuierlichen Verfahren oder Fließverfahren fließen die Reaktanden aus Reservoirs mit definierter Flussrate durch Reaktoren, in denen die eigentliche Reaktion stattfindet und dabei Vermischung, Temperatur und andere Parameter genau kontrolliert werden können. Kontinuierliche Verfahren können energieeffizient betrieben werden und Reaktionen mit weniger Abfall ermöglichen. Dieser Verarbeitungsansatz wird daher häufig als Prozessintensivierung bezeichnet.<sup>[248]</sup> Die verwendeten Reaktoren variieren stark in ihrer Größe, können aber bereits mit kleiner Stellfläche betrieben werden. Seit Jahrzehnten werden kontinuierliche Verfahren eingesetzt, um Verbindungen im Tonnenbereich in Sektoren wie der Petrochemie und der Lebensmittelindustrie, wie z.B. Saccharose, industriell herzustellen.<sup>[247]</sup> Zu den großvolumigen kontinuierlichen Verfahren in der chemischen Industrie gehören die Herstellung von 1,2-Propanediol aus Glycerol, die Herstellung von (*S*)-3-Hydroxy- $\gamma$ -butyrolacton aus (*S*)-Äpfelsäure, und die Herstellung von Cyclopropylamin und Solketal.<sup>[247, 249, 250]</sup> Die pharmazeutische Industrie setzt bereits seit 1962 kontinuierliche Verfahren ein, und die Verwendung kontinuierlicher Verfahren zur Rationalisierung der Herstellung von Arzneimitteln hat zugenommen.<sup>[247, 251]</sup> Die häufigsten Probleme im *batch* und die entsprechenden Vorteile von Flussprozessen sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Übersicht der häufigsten Probleme in *batch*-Prozessen und entsprechender Lösungen im Durchfluss<sup>[247]</sup>**

<b>Problemstellung im <i>batch</i></b>	<b>Lösungsansatz im Durchfluss</b>
Nebenprodukte durch schlechte Mischung und Temperaturschwankungen	Effizientes Mischen der Lösung durch Mischeinheiten, stetige Kontrolle der Reaktionstemperatur durch Temperaturmessung in der Lösung
Teure Hochtemperaturverfahren oder kryogene Verfahren	Bessere Wärmeübertragung durch Schläuche und Rohre, weniger Unfallpotenzial durch Separation
Reaktive Spezies	Kontinuierliche Abtrennung der Spezies, effizienteres Mischen
Reaktionsgeschwindigkeit	Erzwungener Kontakt in Reaktor mit Reaktand oder immobilisiertem Katalysator
Toxizität	Vollständiger Verbrauch toxischer Reagenzien durch geringere lokale Mengen im Reaktor, keine Ansammlung toxischer Produkte über längere Zeit

Insbesondere die Nutzung von Katalysatoren in immobilisierter Form auf Trägermaterial erlaubt die wiederholte Nutzung derselben Katalysatorcharge ohne Rückgewinnungsverfahren oder andere Aufarbeitungsmethoden wie in *batch*-Prozessen üblich. Somit lassen sich die katalytischen Parameter des Katalysators nahezu vollständig ausreizen und erhöhen damit die Prozessintensität.

### 2.5.2 Immobilisierung von (Bio-)Katalysatoren

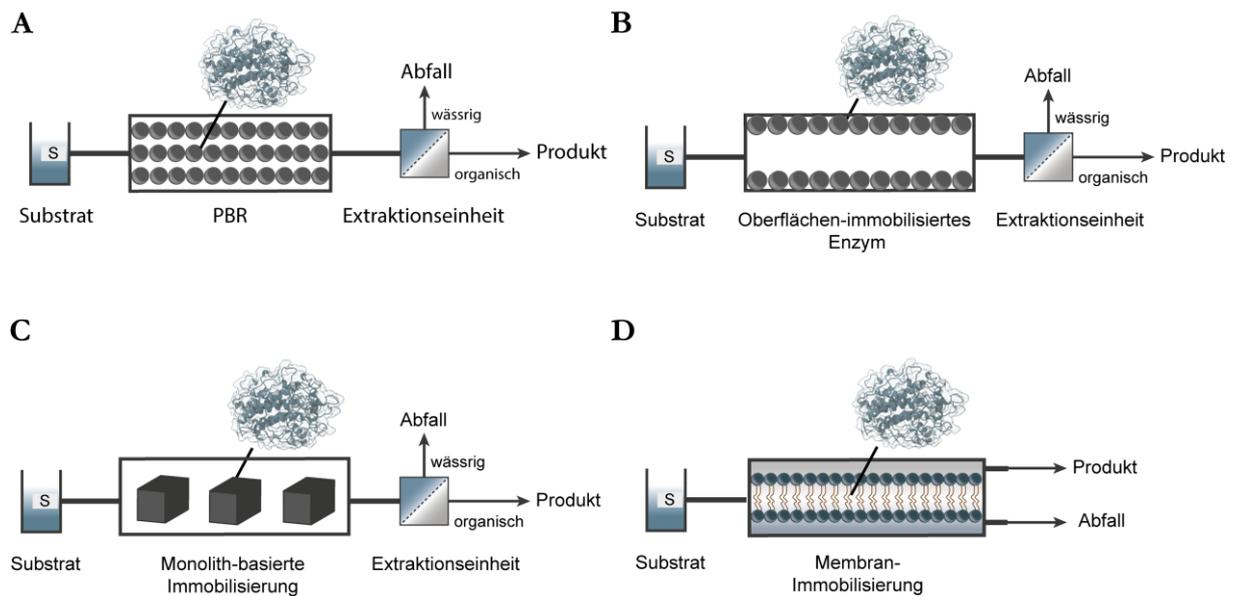
Ein allgemeines Problem bei der Verwendung eines Biokatalysators ist seine Lebensdauer. Die Stabilität eines Enzyms wird in der Regel durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie Temperatur, pH-Wert, Tenside usw., die die strukturellen Wechselwirkungen innerhalb des Katalysators stören können. Die Immobilisierung wird häufig eingesetzt, um die Stabilität des Enzyms zu erhöhen: Sie begrenzt den Wärme- und Stoffaustausch und minimiert den Zugang destabilisierender Stoffe zum Enzym.<sup>[252]</sup> Darüber hinaus führt die Immobilisierung auf einer Oberfläche zu zusätzlichen Wechselwirkungen, die die Tertiärstruktur des Enzyms stabilisieren. Wird ein immobilisiertes Enzym verwendet, kann der Biokatalysator in einem *batch*-Betrieb zurückgewonnen und wiederverwendet werden. Falls erforderlich, kann frischer Biokatalysator zugesetzt werden, wobei die Reaktionszeit angepasst werden kann, um die Produktqualität zu erhalten. Allerdings ist die Menge der immobilisierten Biokatalysatoren, die ein *batch*-Reaktor verarbeiten kann, begrenzt. Die Einstellung der Reaktionszeit kann sich auf nachgeschaltete Prozesse auswirken.<sup>[253]</sup>

In einem Durchflussreaktor mit immobilisierten Enzymen im Dauerbetrieb kann das Temperaturprofil schrittweise erhöht werden, um die Deaktivierung der Enzyme bei erhöhter Reaktivität auszugleichen. Eine bessere Alternative stellt die Anpassung der Durchflussrate an das Profil der Enzymdeaktivierung dar. Dabei kann gewährleistet werden, dass die Qualität der Produktkonzentration konstant bleibt.<sup>[253, 254]</sup>

Zur Bewertung des effektiven Einsatzes von immobilisierten Biokatalysatoren wurde ein Betriebsfenster vorgeschlagen, das auf Grundlage der Umsatzzahl (englisch *turnover number*, TN), die Menge des gebildeten Produkts pro eingesetzter Katalysatormenge berechnet.<sup>[255, 256]</sup> Die Arbeitsgruppe um Janssen postulierte, dass die Immobilisierung eines Katalysators unwirtschaftlich sei, wenn die TN zu gering ist.<sup>[255]</sup> Im Gegensatz dazu kann die TN hoch sein oder die Produkte können einen hohen Mehrwert haben, so dass die Katalysatorkosten unter 0.05 % des Mehrwerts liegen. In diesem Fall ist das Katalysatorrecycling im Allgemeinen nicht zu rechtfertigen. Liegt der Wert für die TN jedoch innerhalb dieser Grenzen, dann ist die Enzymimmobilisierung angemessen. Zusätzlich kann der Einfluss der Katalysatorkosten auf die Produktkosten neben der TN auch anhand der Gesamtumsatzzahl (englisch *total turnover number*, TTN) abgeschätzt werden, die als Mol gebildetes Produkt (oder umgewandeltes Substrat) pro Mol eingesetztem Katalysator definiert ist. Dementsprechend sollte die TTN bei hochwertigen Verbindungen, die in kleinem Maßstab hergestellt werden, über 1000 und bei Massenprodukten über 50 000 liegen.<sup>[256]</sup>

Die Halbwertszeit des Biokatalysators, also die Zeit, die erforderlich ist, damit sich die Aktivität auf 50 % reduziert, ist ein Schlüsselparameter und kann unter Betriebsbedingungen bestimmt werden.<sup>[256]</sup> Auch hier gibt es keinen Goldstandard für die Halbwertszeit von Enzymen; sie wird in die Kosten des Prozesses miteinbezogen.

Als Biokatalysatoren können im Durchfluss entweder zellfreie Enzyme oder ganze Zellen verwendet werden. Immobilisierte Enzym-Reaktoren (häufig als IMER bezeichnet) und freie Enzymreaktoren (häufig als FER abgekürzt) sind am weitesten verbreitet, da zellfreie Systeme gegenüber dem Ganzzell-Ansatz Vorteile bieten, wie z.B. einen tendenziell schnelleren Fluss, und dabei die Nachteile der Ganzzellkatalyse wie zusätzliche Barrieren zwischen dem Substrat und dem Katalysator, die Möglichkeit von Nebenreaktionen und die Notwendigkeit, die Integrität der Zellwand zu erhalten, vermeiden.<sup>[257]</sup> Ganzzell-Biotransformationen sind besonders vorteilhaft für cofaktorabhängige Enzyme, da das Vorhandensein von nativen Stoffwechselwegen sowie endogenen Cofaktoren gegeben sind. Ganze Zellen können in einem Röhrenreaktor (oder in einem Back-Mix-Reaktor) verwendet werden. Zur Vermeidung von Auswaschung der Zellen während des kontinuierlichen Betriebs und der Vereinfachung des Zellrecyclings und der nachgeschalteten Verarbeitung können sie in sogenannten Ganzzellenreaktoren immobilisiert werden (häufig als IWCR bezeichnet).<sup>[253, 258]</sup> Immobilisierte Reaktoren können in verschiedenen Varianten verwendet werden (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: Übersicht über einige gängige Reaktortypen mit immobilisierten Biokatalysatoren, adaptiert nach Tamborini *et al.* und De Santis *et al.*<sup>[253, 257]</sup>**

**A:** *packed-bed-reactor* (PBR): Das Enzym wird auf Trägermaterial immobilisiert und dieses Material wird dann in den Reaktor gefüllt und betrieben; **B:** Reaktor mit immobilisiertem Enzym an der Reaktorwand: Hier erfolgt die Immobilisierung an Trägermaterial lediglich an der Oberfläche des Reaktors, sodass die Mitte frei bleibt. In diesem Reaktor ist weniger Enzym immobilisiert, kann dafür bei höheren Drücken und damit höheren Flussraten betrieben werden; **C:** Reaktor mit Monolith-basierter Immobilisierung: Das Enzym wird auf sog. Monolithen im Reaktor immobilisiert, sodass die Reaktion nicht überall im Reaktor, sondern in definierten Abständen stattfindet; **D:** Reaktor mit Membran-Immobilisierung: Das Enzym wird innerhalb einer Membran immobilisiert, sodass Produkt von Abfall konstant über die Membran separiert bleiben kann

Der Biokatalysator kann immobilisiert auf Perlen (engl. *beads*), die im Reaktor verpackt sind, aufgetragen werden, was eine hohe Enzymbeladung ermöglicht. Dieser Reaktortyp ist der gängigste und wird *packed bed reactor* (PBR) genannt (siehe Abbildung 26 A). Allerdings ist dieser Reaktortyp anfälliger für übermäßigen Gegendruck.<sup>[259]</sup> Alternativ kann der Biokatalysator auf der inneren Oberfläche der Kanäle oder Reaktorwände immobilisiert werden (beschichteter Wandreaktor) (Abbildung 26 B).<sup>[260]</sup> Eine weitere Möglichkeit ist die Immobilisation auf einem im Mikrokanal enthaltenen Monolithen (siehe Abbildung 26 C).<sup>[261]</sup> Dabei können die Einschränkungen der vorherigen Konfigurationen minimiert werden. Eine neuere Methode beschreibt einen Biokatalysator, der auf einer Membran immobilisiert ist (siehe Abbildung 26 D).<sup>[262, 263]</sup> Neben den genannten Methoden gibt es auch eine Reihe von Immobilisierungstechniken, bei denen entweder verpackte immobilisierten Biokatalysatoren, darunter auch in Kombination mit magnetischen Nanopartikeln, verwendet werden können. Alternativ können Tags für die Markierung von Enzymen verwendet werden, um diese direkt auf die Reaktoroberfläche anzubringen.<sup>[252, 264-267]</sup>

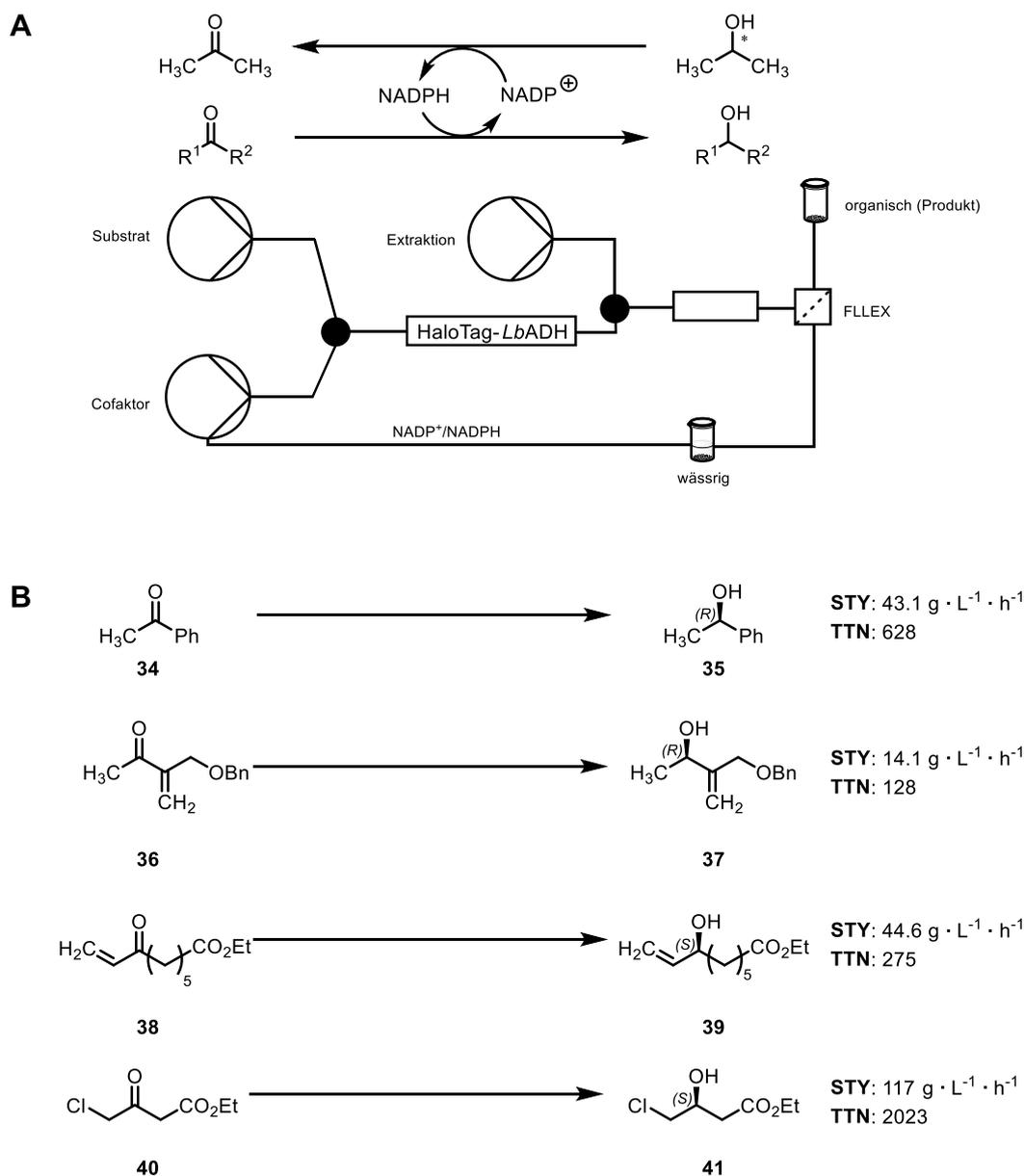
Die Immobilisierung innerhalb des Reaktors ermöglicht die Lokalisierung des Enzyms in einer mikrofluidischen Umgebung und erlaubt es, multienzymatische Reaktionen durchzuführen, bei denen die sequenzielle Verteilung der einzelnen Enzyme im Reaktor die Kaskadenreaktionen steuerbar macht. Für die Immobilisierung selbst stehen mittlerweile eine Reihe an Methoden zur Verfügung, die von Affinitäts-basierten Methoden, wie die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (engl. *immobilized metal (ion) affinity chromatography*, IMAC) oder spezifischen Tags wie HaloTag, über kovalenten Methoden, wie die Schiff-Basen-Bindungsknüpfung oder Epoxid-Immobilisierung reichen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Verwendung biogener, komplexerer Strukturen zur

Immobilisierung von Enzymen, wie z.B. die Ausbildung vernetzter Enzym-Aggregate, die durch kovalente Bindungen zusammengehalten werden, oder die Nutzung biopolymerer Trägermaterialien, z.B. Polyhydroxyalkanoat (PHA) oder -butyrat (PHB) Granula, bei denen die Immobilisierung *in vivo* und *in vitro* durch bestimmte Oberflächenproteine als Anker-moleküle erfolgen kann.<sup>[268-272]</sup>

### 2.5.3 Anwendung von Biokatalysatoren im Durchfluss

In den letzten Jahren konnte eine steigende Anzahl biokatalytischer Verfahren im Durchfluss beobachtet werden. Die meisten zeigen eine Alternative zu einer traditionellen Transformation, die durch die Durchführung im kontinuierlichen Fluss wirtschaftlicher oder effizienter in Bezug auf Umsätze und Ausbeuten gemacht werden konnte. Eine wichtige Größe ist dabei die Raum-Zeit-Ausbeute (englisch *space-time-yield*, STY). Sie definiert, wie viel Produkt pro Reaktionsvolumen und pro Zeiteinheit mit dem System generiert werden können und ist somit ein maßgebliches Bewertungskriterium für die Effizienz von Durchflusssystemen. Neben der STY wird häufig auch die Produktivität des Systems angegeben, definiert als die Menge Produkt die pro Katalysator gebildet wird ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

Die Verwendung von Biokatalysatoren im großen Maßstab wird häufig limitiert durch die Verwendung teurer oder reaktiver Cofaktoren, wie bspw. NAD(P)H als Reduktionssäquivalente zur Synthese chiraler Alkohole und Amine ausgehend von prochiralen Ketonen oder Wasserstoffperoxid als Oxidationsquelle für Peroxidasen. Recyclingsysteme stellen dabei eine kostengünstige Alternative zur Verwendung solcher Enzyme dar, da sie eine *in situ* Regeneration dieser Cofaktoren erlauben. Die Implementierung solcher Systeme in Durchflussreaktionen stellt daher eine wichtige Erweiterung der verwendbaren Biokatalysatorpalette dar. So konnten Baumer *et al.* ein quasi-stationäres Recyclingsystem für NADP(H) unter Verwendung von immobilisierter HaloTag Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (HaloTag-LbADH) etablieren.<sup>[111]</sup> Das geschlossene Cofaktor-Regenerationssystem ermöglichte sowohl eine kontinuierliche Produktion als auch einen schnellen Substratwechsel. Somit könnte das entwickelte System als Blaupause für eine allgemeine Cofaktor-Regenerationseinheit für kontinuierliche biokatalytische Geräte dienen, die (Co-)Substrate verwenden, die in organischen Lösungsmitteln mischbar sind. Die asymmetrische Reduktion von Acetophenon als Modellreaktion ergab (*R*)-Phenylethan-1-ol als Produkt mit einer Umwandlung von 92 % unter Verwendung von  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  Substrat und 10 % (*v/v*) 2-Propanol mit Flussraten bis zu  $65 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  im vereinfachten offenen System. Das geschlossene System lieferte vergleichbare Ergebnisse bei einer kombinierten Flussrate von ca.  $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  mit etwa 96 % Umsatz. Dabei wurde im geschlossenen Kreislauf die Menge NADP(H) auf katalytische Mengen verringert (0.1 mol-% bezogen auf das Substrat). Das Reaktionssystem wurde auf die Reduktion von drei weiteren Substraten erweitert, wobei mäßige bis hohe STYs ( $14 - 117 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und hohe bis sehr hohe TTNs mit exzellenten Enantioselektivitäten (>99 %) erzielt wurden (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Übersicht des NADPH-Recyclingsystems am Beispiel der ADH aus *L. brevis*, adaptiert nach Baumer et al.<sup>[111]</sup>

**A:** Das allgemeine Reaktionsschema ist oben dargestellt. HaloTag-*LbADH* katalysiert die stereoselektive Reduktion eines Ketons zum entsprechenden Alkohol. Das dabei verbrauchte NADPH-Molekül liegt als NADP<sup>+</sup> in der Lösung vor und kann vom selben Enzym wieder zu NADPH reduziert werden, indem Isopropanol zu Aceton oxidiert wird. Durch die Flüchtigkeit von Aceton wird das thermodynamische Gleichgewicht weiter Richtung NADPH-Regeneration getrieben. Die Reaktionen erfolgten in einem PBR bei 22 °C. Die Produkte wurden über eine FLLEX-Einheit kontinuierlich mit EtOAc aus dem Reaktionsgemisch extrahiert, während die wässrige Phase mit NADP<sup>+</sup> zur Regenerierung von NADPH in das System zurückgespült wurde.

**B:** Umsetzungen verschiedener Ketone mit dem NADPH-Recyclingsystem

Die Flexibilität des Systems wurde außerdem durch den erfolgreichen Einsatz von drei verschiedenen Extraktionslösungsmitteln bewiesen. Darüber hinaus bestätigte das System seine Zuverlässigkeit durch kontinuierlichen Betrieb über 32 Stunden ohne Leistungsverlust und lieferte 1.36 g (*S*)-4-Chlor-3-hydroxy-butansäureethylester (**41**) mit einer STY von 117 g · L<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> (96 %). Dieser Umsatz wurde auch über 123 Stunden ohne Leistungsverlust aufrechterhalten.<sup>[111]</sup> Das System konnte

kürzlich für die Nutzung von Enzymen als *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) adaptiert werden.<sup>[273]</sup> Für Wasserstoffperoxid konnten elektro- und photokatalytische Plattformen für die *in situ* Generierung des Oxidationsmittels etabliert werden.<sup>[239, 274, 275]</sup>

Weitere Beispiele für die Nutzung von Biokatalysatoren ist die Nutzung von Transaminasen zur Darstellung chiraler Amine aus Ketonen, Lipasen für Veresterungen oder kinetische Racematspaltungen von Esterverbindungen und Oxidasen zur Bildung von Ketonen aus Alkoholen. In den meisten Fällen konnte eine vielfach höhere STY mit diesen kontinuierlichen Verfahren im Fluss erzielt werden (bis zu 224-fach).<sup>[276-279]</sup>

Die Nutzung von Biokatalysatoren im kontinuierlichen Durchfluss bietet somit die Möglichkeit, Transformationen, die sich im *batch*-Betrieb als wenig effizient oder problematisch herausstellen, zu optimieren. Insbesondere die Immobilisierung der Enzyme ermöglicht somit auch Stabilitätsprobleme zu überwinden und die Regenerierung des Katalysators zu vereinfachen, während mehrstufige Reaktionen kompartimentiert ablaufen können.

### 3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Chemische Halogenierungen zeichnen sich häufig durch Ressourcen-intensive und Energie-ineffiziente Prozesse aus (siehe 2.2.4). Aus diesem Grund ist die Suche nach alternativen Möglichkeiten der Halogenierung in der Synthesechemie von Interesse. Zu diesem Zweck sollte im Rahmen dieser Arbeit die Klasse der Haloperoxidasen als Alternative zu konventionellen Halogenierungsagenzien untersucht werden. Hierzu sollten verschiedene Vertreter der Häm-eisenabhängigen und vanadiumabhängigen Haloperoxidasen identifiziert, charakterisiert und für die Anwendung in synthetischen Applikationen nutzbar gemacht werden.

#### 3.1 Homologe Produktion von CPO aus *Caldariomyces fumago*

##### 3.1.1 Expression und Kultivierung

Die erste Haloperoxidase, die jemals identifiziert wurde, ist die eisenabhängige Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* (*Leptomyces fumago*). Nach langjährigen Charakterisierungsexperimenten wurde sie in konkreten Anwendungsbeispielen als Biokatalysator in Kaskadenreaktionen und chemischen Prozessen eingesetzt.<sup>[231, 232]</sup> Da die heterologe Expression des Gens in *E. coli* und anderen weit verbreiteten Wirtsorganismen durch verschiedene Veröffentlichungen als nicht profitabel deklariert wurde oder Organismen verwendete, die in der Arbeitsgruppe nicht etabliert waren, sollte im Rahmen dieser Arbeit die homologe Produktion der CPO-Cf in *C. fumago* erfolgen.<sup>[280]</sup> Diese Arbeiten wurden maßgeblich im Rahmen der Bachelorarbeit von Sebastian Myllek durchgeführt.<sup>[281]</sup>

Für diese Arbeiten wurde der Stamm 1256 von *C. fumago* (zur Verfügung gestellt von der DSMZ) genutzt. Ausgehend von dieser auf Agar-Nährboden wachsenden Kultur wurde eine Flüssigkultur in Kartoffel-Glucose-Medium angesetzt und am nächsten Tag auf eine Kartoffel-Glucose-Agarplatte ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 3 Wochen wurden vereinzelte Kolonien sichtbar, die für Kultivierungen im größeren Maßstab verwendet wurden.

Die Kultivierung erfolgte in 3 L Fernbach-Kolben mit 300 mL Fructose-Salz-Medium und einer sterilen Metallspirale, um das Wachstum des Pilzes zu erleichtern. Im Laufe der Kultivierung bildeten sich schwarze, filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von 1 mm, die über den Verlauf der Kultivierung auf 5 mm anwuchsen (siehe Abbildung 28).

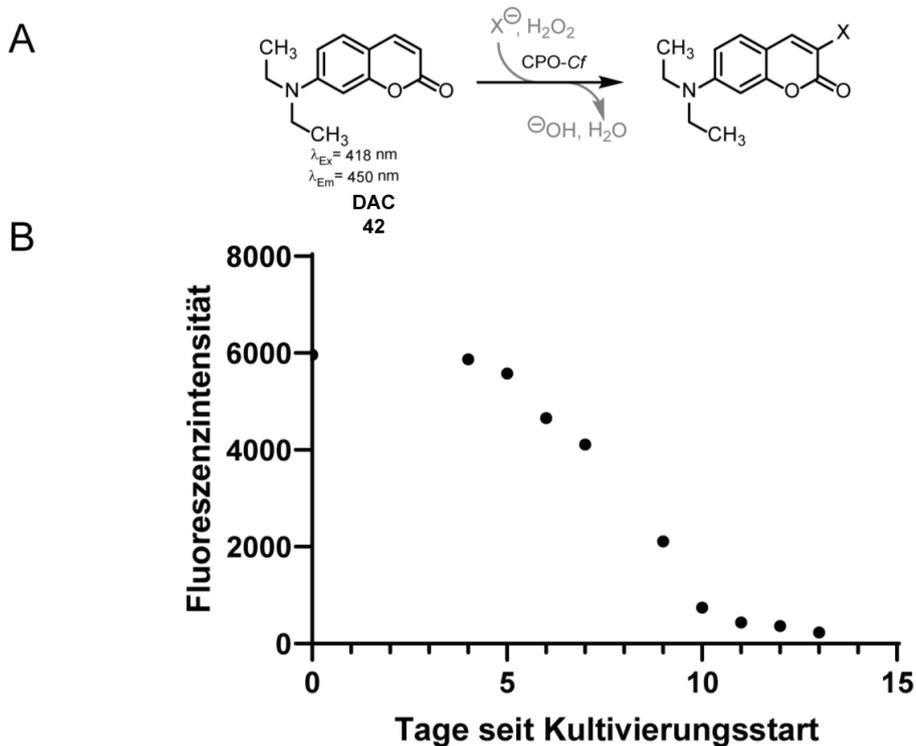


**Abbildung 28: Flüssigkultur von *C. fumago* zur homologen Produktion von CPO-*Cf* nach 13 Tagen**

Für die homologe Produktion von CPO-*Cf* wurden zur *C. fumago* in Fructose-Sals-Medium bei 19 °C unter aeroben Bedingungen (120 rpm) kultiviert. Diese Abbildung zeigt die Flüssigkultur nach einer Kultivierungszeit von 13 Tagen, wobei dunkle Strukturen sichtbar sind. Das Medium verfärbte sich im Laufe der Kultivierung gelblich.

Zudem wies die Kultur eine zunehmend gelbliche Färbung auf und wies einen leichten Chlor-artigen Geruch auf. Nach 13 Tagen Inkubation bei 19 °C wurden 50 mL entnommen und über drei Tage lyophilisiert. Über den Verlauf der Kultivierung wurden Proben entnommen und auf Chloroperoxidase-Aktivität getestet. Hierzu wurde die Fluoreszenzabnahme des Testsubstrats, 7-Diethylaminocoumarin **42** (DAC), in Anwesenheit von Kaliumchlorid und Wasserstoffperoxid gemessen (siehe Abbildung 29). Hierbei handelte es sich um ein potenzielles Assaysubstrat, welches im weiteren Verlauf dieser Arbeit für das an 4-Position methylierte Derivat getauscht wurde. Daher wurde keine vollständige spektroskopische Charakterisierung dieser Verbindung sowie kein Aktivitätsassay für Haloperoxidasen etabliert (vergleiche Kapitel 3.3).

Durch Verwendung von DAC **42** als Fluoreszenzreporter ist es möglich, die Fluoreszenzabnahme des Substrats mittels konsekutiver Halogenierung durch CPO-*Cf* mit der Haloperoxidase-Aktivität der Probe zu korrelieren. Die Assay-Zusammensetzung ist in Kapitel 5.7.11 beschrieben. Ab Kultivierungstag 4 wurden so Proben aus der Kultur entnommen, zentrifugiert und der Überstand vermessen. Die Messungen wurden bis zur Beendigung der Kultivierung miteinander verglichen (siehe Abbildung 29).



**Abbildung 29 DAC-Assay zur Untersuchung einer CPO-*Cf*-vermittelten Aktivität im Kulturüberstand von *C. fumago***

**A:** Schematische Darstellung des Fluoreszenz-basierten DAC-Assays. Der Fluorophor, DAC **42**, kann bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm fluorimetrisch verfolgt werden, da er im Laufe der Reaktion durch CPO-*Cf* vorzugsweise an der 3-Position halogeniert wird. Die Halogenierung führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzspektrums und damit zu einer sukzessiven Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 450 nm. Die Nullwertprobe ergab eine Fluoreszenzintensität von ca. 6000. X= Halogen, hier: Chlor; Da im späteren Verlauf dieser Arbeit ein alternatives Fluorophor verwendet wurde, fand hier keine vollständige spektroskopische Charakterisierung statt. Das Fluorophor wurde als indirekter Nachweis der HPO-Aktivität verwendet **B:** DAC-basierte fluorimetrische Bestimmung des Kulturüberstands während der Kultivierung von *C. fumago*, adaptiert von S. Myllek.<sup>[281]</sup> Zur Bestimmung der Chlorperoxidase-Aktivität im Kulturüberstand von *C. fumago*-Kulturen wurde der DAC-Assay verwendet. Die Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{Ex}} = 385 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ ) erfolgte über einen Zeitraum von 2 min als Endpunktbestimmung mit 4  $\mu\text{L}$  Kulturüberstand in 2 mL Gesamtvolumen im Assay.

Im Verlauf der Kultivierungsperiode ist eine stetige Abnahme der Fluoreszenzintensität sichtbar, die an Tag 13 mit ca. 4 % der Nullwertprobe (ca. 6000) ihr Minimum erreicht hatte. Da eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 450 nm für eine Reaktion von DAC **42** spricht, kann von einer Zunahme der CPO-Aktivität im Medium und damit von einer Anreicherung eines solchen Enzyms ausgegangen werden. Diese erreichte nach 11 Tagen Kultivierung ihr scheinbares Maximum. Die homologe Produktion von CPO-*Cf* scheint somit erfolgreich zu sein. Für weitere Experimente wurde angestrebt, CPO-*Cf* in reiner Form für Charakterisierungsexperimente zu isolieren.

### 3.1.2 Isolation und Aktivitätsbestimmung

Da die in dieser Forschung verwendete CPO-*Cf* über keinerlei Tags oder Fusionsproteine zur Isolation verfügt, wurde eine Ethanol-fällung mit dem Enzym durchgeführt.<sup>[234]</sup> Dabei wird das Enzym von einem schwarzen Pigment, das cosekretiert wird, in zwei Stufen getrennt. Durch wiederholte Fällung mit Ethanol und Filtration sollte CPO-*Cf* in einer gereinigten Form einer ersten Aktivitätsmessung unterzogen werden. Hierzu wurde nach jedem Fällungsschritt die Aktivität im DAC-Assay (hier:  $\lambda_{\text{Ex}} = 385 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ ) bestimmt (siehe Tabelle 2).

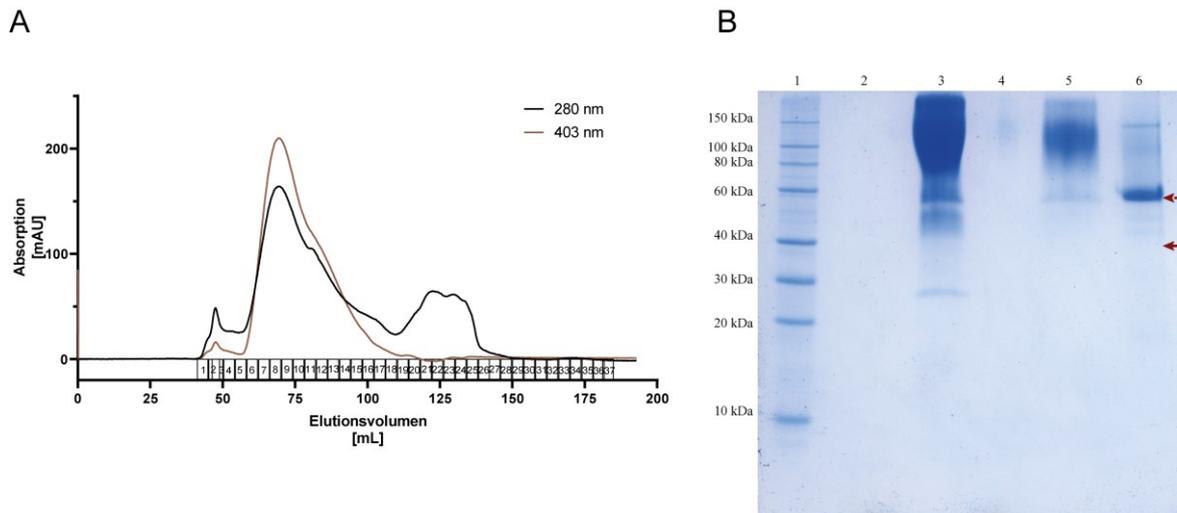
#### Tabelle 2: Aktivität der CPO-*Cf*-Proben aus der Kultivierung in *C. fumago* nach jedem Fällungsschritt

Die Steigung der Fluoreszenzkurven wurde für den linearen Bereich der Kurven mit der größten Anzahl Datenpunkte bei höchstem  $R^2$ -Wert bestimmt. Für die Probe des Präzipitats nach Ethanol-fällung wurde die Steigung über 2 min bestimmt, für alle anderen über 4 min. Unter Verrechnung des Verdünnungsfaktors wurde so der Reinigungsfaktor jedes Schritts bestimmt.

Probe	Steigung [RFU · min <sup>-1</sup> ]	unverdünnt [RFU · min <sup>-1</sup> ]	Reinigungsfaktor
Überstand vor Fällung	-343	-343	1
Überstand nach Fällung	-75	-75	0.219
Präzipitat nach Fällung	-1285	-257000	750

Die Fällung zeigte eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität für DAC (42). Das Präzipitat nach der Ethanol-fällung wies dabei eine Steigerung um das 750-fache auf, während im Überstand eine geringe Fluoreszenzanahme und damit ein Reinigungsfaktor unter 1 bestimmt werden konnte. Daher wurde angenommen, dass in dieser Fraktion der größte Anteil CPO-*Cf* lokalisiert ist. Bedingt durch das Einengen des Volumens im Verlauf der Ethanol-fällung um den Faktor 1000, lag die Ausbeute der Fällung bei 75 %. Im Vergleich zur Literaturreferenz mit 73 % stimmte diese somit gut überein.<sup>[234]</sup>

Im Anschluss an die erfolgreiche Ethanol-fällung sollte die Reinheit der Probe durch Größenausschlusschromatographie (englisch *size-exclusion chromatography*, SEC) gesteigert werden. Vorbereitend wurde mit kommerziell erhältlichen Größenstandards eine Kalibrierung durchgeführt, um die Größe des isolierten Proteins in der jeweiligen Fraktion abschätzen zu können. Zudem wurde neben der allgemeinen Proteinabsorption bei 280 nm auch die Häm-in-spezifische Wellenlänge 403 nm aufgezeichnet, die charakteristisch für Häm-Eisen-Proteine ist. Zur Analyse aller Reinigungsproben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Da CPO-*Cf* in glykosylierter Form vorliegt, wurde eine Deglykosylierung des Proteins versucht. Diese erwies sich allerdings nicht als erfolgreich, weshalb die glykosylierte Form für die SDS-PAGE-Analyse verwendet wurde, wodurch sich breitere und unschärfere Banden ergeben können (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 30: SEC-Chromatogramm und SDS-PAGE der Reinigung von CPO-Cf**

Das SEC-Chromatogramm (A) zeigt die allgemeine Proteinabsorption bei 280 nm (schwarz) und die Absorption bei 403 nm (rot) für Häm-eisenhaltige Proteine. B: SDS-PAGE verschiedener Fraktionen der Reinigung von CPO-Cf

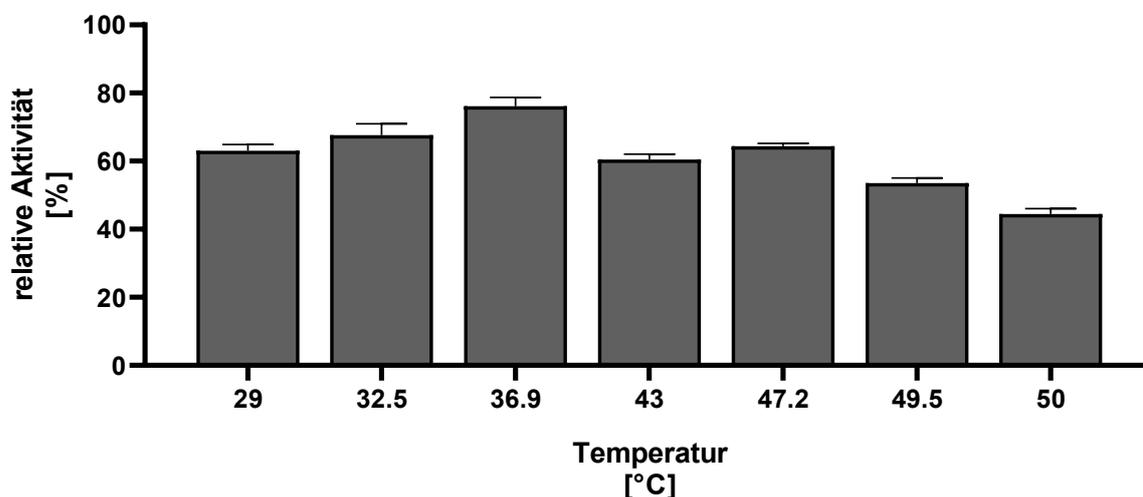
1: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker, 2: Kulturmedium nach Filtration, 3: zweites (weißes) Präzipitat Ethanol-fällung, 4: Zentrat Ethanol-fällung, 5: Vereinte, konzentrierte Fraktionen 1-18 nach SEC, 6: kommerzielle CPO-Cf (Sigma Aldrich, Lyophilisat); Das theoretische Molekulargewicht liegt bei 40 kDa (ohne Glykosylierung, siehe roter Pfeil), die Bande des kommerziellen Lyophilisats bei 60 kDa (gestrichelter Pfeil).

Die SEC offenbarte mehrere Signale über 22 Fraktionen verteilt. Für zwei Fraktionen (Fraktion 1 und 8) zeigte sich für beide verwendeten Wellenlängen (280 und 405 nm) ein Absorptionsmaximum. Diese Korrelation ist ein Indiz für die Anwesenheit eines Häm-eisenabhängigen Enzyms, da bei 403 nm das Häm in solcher Proteine angeregt wird. Ein Aktivitätsassay bestätigte CPO-Cf-Anwesenheit in diesen Fraktionen, weshalb Fraktionen 1 bis 18 vereint und konzentriert wurden. Das Signal um Fraktion 22 zeigte keine korrelierenden Absorptionsspektren und keine CPO-Cf-Aktivität und wurde daher verworfen. Die beiden sichtbaren Fraktionen der CPO-Cf in der SEC sind auf mögliche Oligomerenbildung zurückzuführen. Da die SDS-PAGE unter reduktiven Bedingungen stattfindet, werden solche Oligomere häufig aufgelöst, falls sie auf Cystein-bedingte Disulfidbrücken zurückzuführen sind. Die SDS-PAGE zeigte für alle Proben verschmierte Bandenmuster, die ihre Ursache in der Glykosylierung der Proteine haben. Als Kontrolle wurde ein kommerziell erhältliches Lyophilisat der CPO-Cf verwendet (siehe Bande 6, Abbildung 30), die eine deutliche Bande bei etwa 60 kDa aufwies (theoretische Größe ohne Glykosylierung: 40 kDa, Uniprot-ID P04963). Diese Bande ist ebenfalls für das zweite Präzipitat der Fällung und die vereinten Fraktionen erkennbar. Somit scheint tatsächlich CPO-Cf mit der hier beschriebenen Methode der Fällung und chromatographischen Reinigung isolierbar zu sein. Der Reinigungseffekt der SEC wird durch das Verschwinden der Bande bei 30 kDa zwischen Fällung und SEC deutlich (vergleiche Bande 3 und 5, Abbildung 30).

### 3.1.3 Temperatur- und Lösungsmittelstabilität

Im Zuge der geplanten biokatalytischen Umsetzungen mit CPO-Cf bilden die Temperatur- und Lösungsmittelstabilität wichtige Randparameter für den Einsatz des Enzyms. Aus diesem Grund wurden beide Eigenschaften mittels Aktivitätsbestimmung nach Inkubation bei entsprechenden Temperaturen bzw. Anwesenheit entsprechender Lösungsmittel mit dem isolierten Enzym getestet.

Für das Temperaturscreening wurde eine Kontrollprobe von CPO-*Cf* bei 22 °C als Normierungswert für Proben von CPO-*Cf* bei höheren Temperaturen verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei der jeweiligen Temperatur, wonach der zentrifugierte Überstand der Lösung im Rahmen einer Aktivitätsmessung mit Hilfe des DAC-Assays über 2 min gemessen wurde [wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 3.1.2)]. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 zusammengefasst.

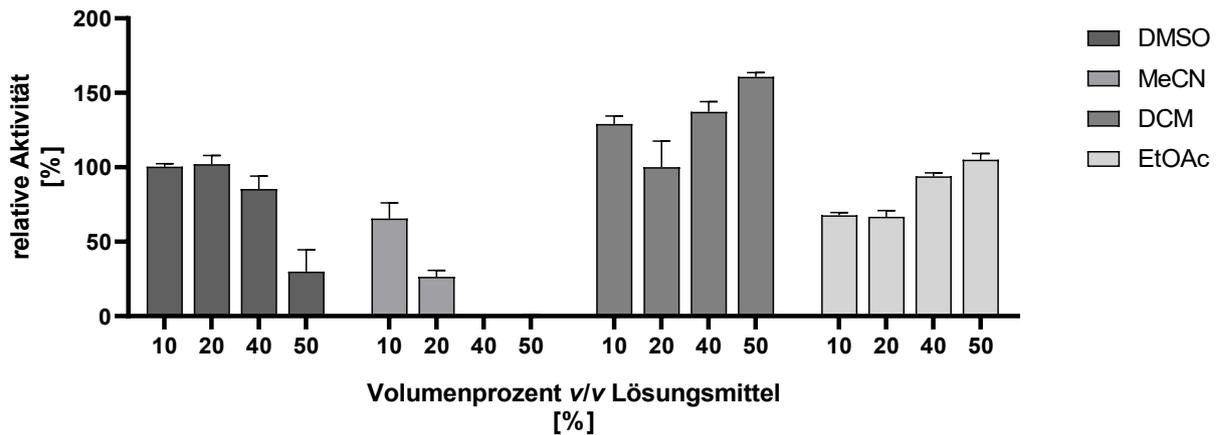


**Abbildung 31: Temperaturstabilität von CPO-*Cf* bei ausgewählten Temperaturen**

Alle Proben wurden als Triplikate gemessen und anhand einer Kontrollprobe bei 22 °C auf die relative Enzymaktivität normiert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte über einen Zeitraum von 2 min mittels DAC-Assay.

Tendenziell ist eine Verringerung der Aktivität für Temperaturen über 22 °C um ca. 30 bis 50 % erkennbar. Die Steigerung der Aktivität bei 36.9 °C im Vergleich zu vorherigen Inkubationsproben ist dabei auf Messschwankungen zurückzuführen. Über den hier betrachteten Temperaturbereich scheint CPO-*Cf* keine deutlichen Aktivitätsverluste aufzuweisen. Das Enzym scheint über eine Temperaturstabilität bei Temperaturen bis 50 °C zu verfügen. Über die Stabilität bei sehr hohen Temperaturen konnte keine Aussage getroffen werden.

Die Lösungsmittelstabilität des Enzyms sollte durch Inkubation bei 700 rpm in einem Schüttler für 30 min in Anwesenheit verschiedener Lösungsmittel erfolgen, um einen stetigen Kontakt des Enzyms mit dem Lösungsmittel zu gewährleisten. Für den Versuch wurden verschiedene Mischverhältnisse zwischen Puffer und Lösungsmittel bis zu 50 % (*v/v*) getestet. Als Lösungsmittel wurden die gängigen Verbindungen DMSO, Acetonitril, Dichlormethan und Essigsäureethylester getestet (siehe Abbildung 32). Wie zuvor wurde die Aktivität fluoreszenzbasiert mittels DAC-Assay gemessen.



**Abbildung 32: Lösungsmittelstabilität von CPO-*Cf* für ausgewählte Lösungsmittel bei Mischverhältnissen von 10 bis 50 % (v/v)**

MeCN: Acetonitril, DCM: Dichlormethan; EtOAc: Essigsäureethylester; alle Proben wurden normiert auf eine Probe ohne Lösungsmittel. Die Aktivitätsmessung erfolgte über einen Zeitraum von 2 min mittels DAC-Assay in Form biologischer Triplikate, dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Im Lösungsmittelscreening wurden zwei mit Wasser mischbare und zwei unmischbare Lösungsmittel verwendet. Zu ersterer Gruppe gehören DMSO und Acetonitril, die beide zu einem Aktivitätsverlust in CPO-*Cf* führen. Während für DMSO der Verlust erst ab 40 % (v/v) sichtbar wird, zeigt sich diese Tendenz für Acetonitril bereits bei 10 % (v/v). Im Gegensatz dazu zeigen Dichlormethan sowie Essigsäureethylester tendenziell keine Verringerung, sondern teilweise eine Erhöhung der relativen Aktivität. Diese Beobachtung könnte auf Effekte der Lösungsmittel bei der Fluoreszenzmessung zurückzuführen sein. Generell eignen sich Acetonitril und DMSO nicht für eine Anwendung mit CPO-*Cf*. DMSO wäre lediglich bei geringen prozentualen Anteilen als Cosolvens im Reaktionsansatz denkbar. Für Zwei-Phasen-Reaktionen scheinen sich Essigsäureethylester und Dichlormethan zu eignen, da dabei selbst bei Durchmischungen die Aktivität von CPO-*Cf* scheinbar nicht beeinträchtigt wird.

CPO-*Cf* scheint somit ein robuster Biokatalysator zu sein, der sich innerhalb von zwei Wochen Kultivierungsdauer als sekretiertes Enzym im homologen Wirt *C. fumago* durch Ethanol fällung und SEC im Labormaßstab isolieren lässt.

Für spätere Immobilisierungsexperimente und kinetische Charakterisierung des Enzyms ist eine hohe Reinheit des Enzyms erforderlich. Die genetische Modifizierung des Gens bspw. durch Peptidtags spielt dabei ebenso eine wichtige Rolle. Für den homologen Wirt *C. fumago* sind solche molekularbiologischen Werkzeuge schwer zugänglich.<sup>[188]</sup> Da die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit dem *cpo-cf*-Gen in einem Vektor ebenfalls nicht erfolgreich war, blieb die genetische Modifikation des Gens im Rahmen dieser Arbeit aus. Andere bekannte heterologe Expressionswirte wie *Aspergillus niger* sind im Arbeitskreis nicht etabliert und würden tiefere Kenntnisse über die Mikrobiologie dieser Organismen und angepasste Verfahren zur Kultivierung und Modifikation erfordern. Unter Betrachtung der ebenfalls bekannten Limitationen des Enzyms in Bezug auf hohe Wasserstoffperoxid-Konzentrationen sowie die oxidative Inaktivierung (siehe Kapitel 2.4.1), wurde die Chloroperoxidase aus *C. fumago* im Rahmen dieser Arbeit nicht intensiver untersucht. Der Fokus wurde auf die Identifizierung und Charakterisierung vanadiumabhängiger Haloperoxidasen verschoben.

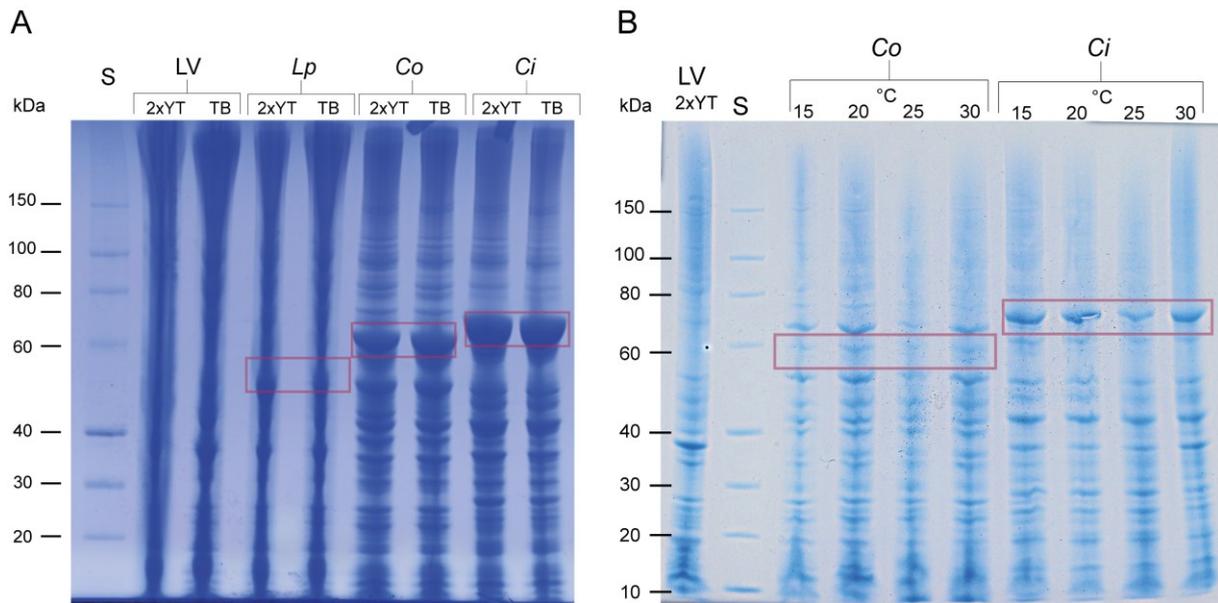
## 3.2 Etablierung eines Produktionsprotokolls für vanadiumabhängige Haloperoxidasen in *E. coli*

Neben den oxidationsanfälligen Häm-eisenabhängigen Haloperoxidasen existiert noch eine zweite, weit verbreitete Gruppe innerhalb dieser Enzymfamilie. Diese Enzyme sind vanadiumabhängig und konnten außerordentlich hohe Stabilität im katalytischen Zyklus gegenüber Wasserstoffperoxid sowie gegenüber Parametern wie Temperatur und Lösungsmittel bei hohen Umsatzzahlen aufzeigen (siehe Kapitel 2.4.2).<sup>[201]</sup> Wie zuvor erwähnt, wurde der Fokus dieser Arbeit für weitere Studien auf die Familie der vanadiumabhängigen Haloperoxidasen (V-HPOs) als Biokatalysatoren gelegt. Als heterologe Expressionssysteme für sämtliche Haloperoxidasegene sollten *E. coli* BL21 (DE3)-basierte Systeme/Wirte mit pET21a-Plasmid als Expressionsvektor verwendet werden, um eine effiziente heterologe Proteinproduktion zu ermöglichen.

### 3.2.1 Expressionsanalyse

Die heterologe Produktion von Proteinen kann mitunter von verschiedenen Faktoren abhängen, die in der Summe häufig zu geringen Proteinausbeuten oder sogar inaktivem Enzym führen. Viele dieser Probleme lassen sich auf die Löslichkeit des Proteins unter den Wirtsbedingungen oder der Translation des Gens unter den gegebenen Bedingungen zurückführen. Aus diesem Grund wurde mit drei HPO-Genen aus *Curvularia inaequalis*, *Corallina officinalis* und *Luteitalea pratensis* eine Expressionsstudie in *E. coli* BL21 (DE3) durchgeführt. Das entsprechende Gen befindet sich dabei unter Kontrolle eines induzierbaren T7-Promotors in dem Expressionsvektor pET21a.

Hierfür wurden entsprechende Zellen mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und anschließend unter gängigen Bedingungen (120 rpm, 20 h) bei verschiedenen Temperaturen (15 bis 30 °C) und in zwei verschiedenen, reichhaltigen Nährmedien (TB und 2xYT) kultiviert (siehe Kapitel 5.3.7). In allen Expressionsansätzen wurde durch Zugabe von 100 µM IPTG die Genexpression mit der T7-Polymerase induziert. Zudem wurde 100 µM Natriumorthovanadat als Coenzym zugesetzt. Nach entsprechender Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Pellets wurden per Ultraschallaufschluss lysiert (in KP<sub>1</sub> Puffer) und von den erhaltenen Zellrohextrakten Proben für eine SDS-Gelelektrophorese aufbereitet (siehe Kapitel 5.4.1), um anhand dieser Methode den Einfluss der getesteten Parameter auf die Expression bzw. Proteinproduktion der V-HPOs zu analysieren (siehe Abbildung 33 A&B). Dabei wurden die verschiedenen Konstrukte miteinander verglichen sowie ein Leervektoransatz, der parallel zu den anderen Proben kultiviert wurde, als Referenz verwendet. Neben den hier gezeigten Übersichtsgelen befinden sich weitere Gele im Experimenterteil (siehe Kapitel 5.7.12).



**Abbildung 33: Untersuchung des Einflusses von Nährmedien und Kultivierungstemperatur auf die Proteinproduktion von V-HPOs in *E. coli* BL21 (DE3)**

**A:** Nährmedien-Abhängigkeit der Proteinproduktion der drei V-HPOs in *E. coli* BL21 (DE3). SDS-Gel der Testexpression der drei V-HPO-Gene in *E. coli* BL21 (DE3) bei 15 °C in verschiedenen reichhaltigen Nährmedien (TB und 2xYT). S: ROTI®Mark 10-150 kDa Protein Marker; LV: Leervektor-Probe; *Lp*: V-HPO-Gen aus *L. pratensis*; *Co*: V-HPO-Gen aus *C. officinalis*; *Ci*: V-HPO-Gen aus *C. inaequalis*. Das theoretische Molekulargewicht des jeweiligen Proteins ist durch einen Rahmen symbolisiert.

**B:** Temperatur-Abhängigkeit der Proteinproduktion von V-HPOs in *E. coli* BL21 (DE3). SDS-Gel der Testexpression der V-HPO-Gene aus *C. officinalis* und *C. inaequalis* in *E. coli* BL21 (DE3) in 2xYT-Medium bei verschiedenen Temperaturen (15, 20, 25 und 30 °C). S: ROTI®Mark 10-150 kDa Protein Marker; LV: Leervektor-Probe; *Co*: V-HPO-Gen aus *C. officinalis*; *Ci*: V-HPO-Gen aus *C. inaequalis*. Das theoretische Molekulargewicht des jeweiligen Proteins ist durch einen Rahmen symbolisiert.

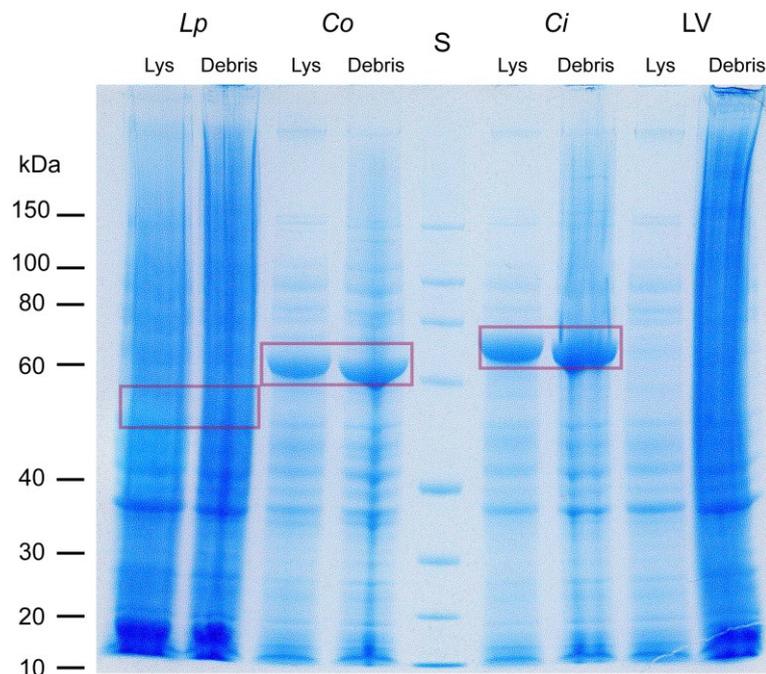
Zur Darstellung des Einflusses der Nährmedien wurde eine Kultivierung bei 20 °C ausgewählt. Bei dieser Temperatur wird das Wachstum von *E. coli* konstant gehalten und die Expression der Gene durch die T7-Polymerase vorangetrieben. So zeigte sich eine Überexpression für die V-HPO-Gene aus *C. officinalis* und *C. inaequalis* und damit eine deutliche Proteinbande bei ca. 60 kDa (*C. officinalis*) und ca. 70 kDa (*C. inaequalis*) unabhängig vom verwendeten Nährmedium. Für die V-HPO aus *L. pratensis* konnte dagegen keine nennenswerte Proteinbande beobachtet werden. Da sich kein deutlicher Einfluss der beiden getesteten Medien ergab und es sich in beiden Fällen um reichhaltige Nährmedien, geeignet für Proteinpräparationen in *E. coli*, handelt, wurde im Weiteren lediglich das 2xYT Medium verwendet und hierbei der Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die heterologe Produktion der V-HPOs aus *C. officinalis* und *C. inaequalis* untersucht (siehe Abbildung 33 B). 2xYT-Medium stellt im Gegensatz zu TB-Medium keine zusätzliche Kohlenstoffquelle für *E. coli* zur Verfügung und kann so zu effizienteren Expressionsraten heterologer Gene führen.

Bei Untersuchung der Temperatur-Abhängigkeit zeigt sich eine Bevorzugung für geringere Temperaturen (15 und 20 °C), die vor allem beim V-HPO-Gen aus *C. inaequalis* deutlich werden. Für dieses Gen wurde bisher für eine homologe Produktion in *C. inaequalis* eine optimale Kultivierungstemperatur von 25 °C verwendet, für eine heterologe Produktion in *E. coli* liegt diese somit niedriger.<sup>[201]</sup>

Für zwei der ausgewählten V-HPOs (V<sub>Br</sub>PO-*Co* und V<sub>Ci</sub>PO-*Ci*) konnten anhand der durchgeführten Expressionsstudie Kultivierungsbedingungen ermittelt werden, bei denen eine Proteinproduktion in *E. coli* BL21 (DE3) mittels SDS-PAGE Analyse sichtbar war. Somit lieferte eine Kultivierung bei

20 °C in 2xYT Medium die besten Resultate. Da es sich bei den Proben, die für die SDS-PAGE Analyse verwendet wurden, um Rohzelleextrakte handelt, kann zu diesem Zeitpunkt noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei den sichtbaren Zielbanden um lösliches Protein handelt. Dies wurde im Nachfolgenden weiter untersucht.

Die Löslichkeit der produzierten Proteine wurde mit dem sogenannten *inclusion body test* untersucht und zudem die Aktivität der löslichen Fraktion mit dem literaturbekannten Dimedon-Assay für Haloperoxidasen bestimmt (siehe Kapitel 5.7.13).<sup>[222, 282]</sup> Für den *inclusion body test* wird das Zellpellet im Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wird der nach Aufschluss erhaltene Zellrohextrakt mit dem Überstand, der nur lösliche Proteine enthält, oder alternativ mit einer Probe der durch Zentrifugation sedimentierten Zelltrümmer (im Nachfolgenden auch als Debris bezeichnet) verglichen. Hierbei kann dann mit Hilfe einer SDS-PAGE Analyse festgestellt werden, ob sich das Zielprotein in der löslichen Fraktion befindet oder als unlöslicher *inclusion body*-Komplex vorliegt (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34:** *inclusion body*-Test der drei V-HPO-Gene für eine heterologe Produktion in *E. coli* BL21 (DE3)

Zur Bestimmung der Löslichkeit der V-HPOs in *E. coli* BL21 (DE3) wurden die Proteine unter den zuvor bestimmten Kultivierungsbedingungen (20 °C; 2xYT Medium) produziert und der Zellrohextrakt (Lys) mit der unlöslichen Zelltrümmerfraktion (nach Zellaufschluss) (Debris) verglichen. S: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker; *Lp*: V-HPO-Gen aus *L. pratensis*; *Co*: V-HPO-Gen aus *C. officinalis*; *Ci*: V-HPO-Gen aus *C. inaequalis*; LV: Leervektorprobe. Das theoretische Molekulargewicht des jeweiligen Proteins ist durch einen Rahmen symbolisiert.

Wie der *inclusion body*-Test verdeutlicht, zeigen die beiden erfolgreich überexprimierten Konstrukte aus *C. inaequalis* und *C. officinalis* in beiden Fraktionen deutliche Banden. In diesem Fall scheint nahezu sämtliches Protein aus der gesammelten Lysatprobe nach Zentrifugation in der unlöslichen Fraktion zu landen. Für das Gen aus *L. pratensis* ist erneut keine klare Überexpressionsbande sichtbar. Die Proben des zellfreien Überstandes (lösliche Fraktion) zeigten in einer anderen Analyse keine Banden (siehe Kapitel 5.7.13). Somit ist davon auszugehen, dass eine heterologe Produktion dieser V-HPOs

in *E. coli* unter den gewählten Bedingungen trotz Überexpression der Gene zu fehlgefaltetem, unlöslichem Protein führt.

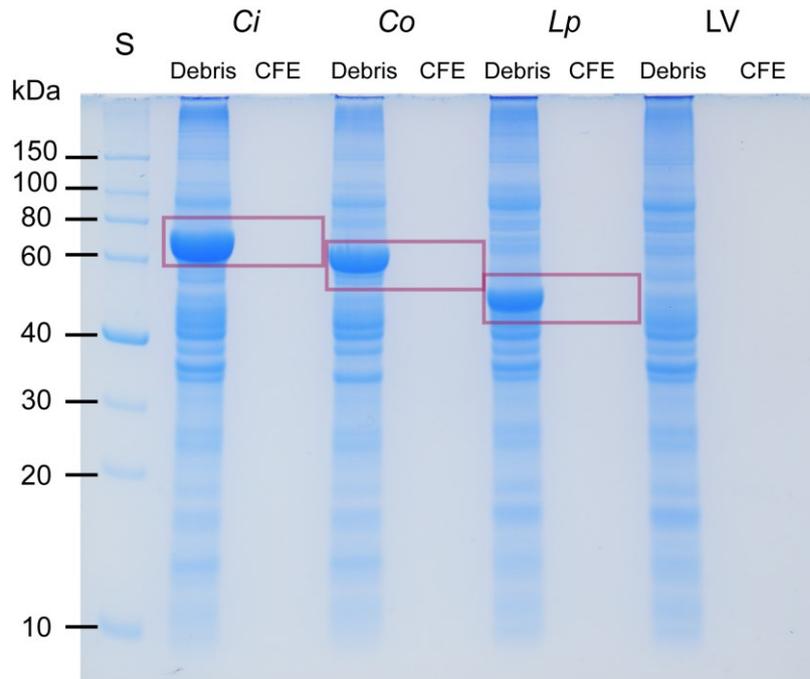
Als zusätzlicher Nachweis wurden die Überstände der löslichen Fraktion auf eine Haloperoxidase-Aktivität mit dem DAC-Assay untersucht (siehe Kapitel 3.1.2). Hierbei konnte allerdings keine signifikante Änderung während der Fluoreszenzmessungen beobachtet werden (siehe Kapitel 5.7.14), wodurch dargelegt ist, dass keine HPO-Aktivität in den getesteten Fraktionen vorhanden ist. Dies belegt zusätzlich, dass die vorliegenden Produktionsbedingungen für die V-HPOs nicht zu löslichem aktiven Enzym führen und diese durch weitere Expressionsstudien angepasst werden müssen.

### 3.2.2 Optimierung der Löslichkeit der HPO-Enzyme

Der Löslichkeit von Proteinen liegt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren zu Grunde. Neben der Konstitution des jeweiligen Proteins spielen auch die Bedingungen im Zellmilieu sowie Faltungsgeschwindigkeit und Anwesenheit bestimmter Ionen wie Natrium, Kalium oder Chlorid eine entscheidende Rolle.<sup>[283]</sup> Die Faltungsgeschwindigkeit hat hier eine besondere Bedeutung, weil eine zu hohe Translationsgeschwindigkeit am Ribosom Fehlfaltungen im Protein hervorruft, da sich notwendige Bindungen wie Wasserstoffbrückenbindungen nicht oder zwischen falschen Aminosäuren ausbilden.<sup>[284]</sup> Das resultierende Protein nimmt durch diese falschen Faltungen eine Konformation ein, wodurch die Löslichkeit des Proteins zu gering für das wässrige Milieu ist. Wird die Faltungsgeschwindigkeit während der Translation reduziert, kann genug Zeit für die Ausbildung produktiver Bindungen zwischen den Aminosäuren des Proteins bereitgestellt werden. Alternativ können Faltungshelfer wie Chaperone ungefaltete Proteine so orientieren, dass sich bevorzugt produktive Konformationen ausbilden können.

Wie Thomas *et al.* zeigen konnten, induziert Ethanol die Produktion *E. coli*-eigener Chaperone und erhöht damit den Anteil löslicher, heterolog produzierter Proteine.<sup>[285]</sup> Zu diesem Zweck wurde Ethanol [2 % (*v/v*)] zu Kulturen mit allen drei V-HPO-Konstrukten und einer Leervektorkontrolle bei einer Temperatur von 20 °C nach Induktion mit IPTG gegeben.

Wie zuvor beschrieben wurden die Zellpellets nach Zellernte resuspendiert, per Ultraschall aufgeschlossen und anschließend zellfreier Überstand (englisch *cell-free extract*, CFE) mit der unlöslichen Fraktion (Debris) per SDS-PAGE Analyse verglichen (siehe Abbildung 35).

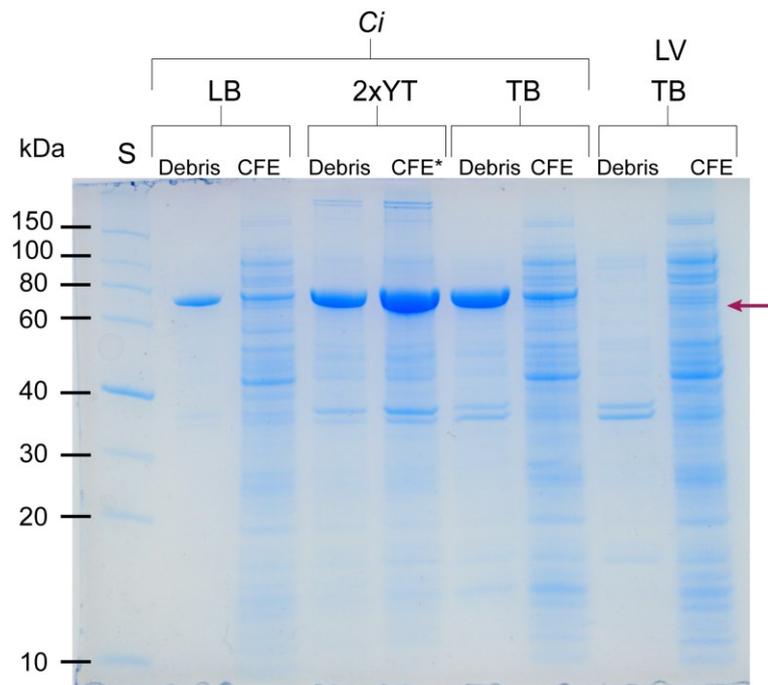


**Abbildung 35: SDS-PAGE Analyse zur Untersuchung des Einflusses der Ethanol-Zugabe auf die Produktion der drei V-HPOs**

Zur Untersuchung der Auswirkung der Ethanol-Zugabe auf die Löslichkeit der in *E. coli* produzierten V-HPOs wurde erneut ein *inclusion body*-Test durchgeführt. Die V-HPOs wurden dabei in *E. coli* BL21 (DE3) in 2xYT Medium bei 20 °C produziert. Zusätzlich zum Induktor IPTG wurden die Kulturen mit 2 % (*v/v*) Ethanol versetzt. S: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker; CI: V-HPO-Gen aus *C. inaequalis*, CO: V-HPO-Gen aus *C. officinalis*, LP: V-HPO-Gen aus *L. pratensis*; LV: Leervektorprobe. CFE: zellfreie Lysatprobe nach Zentrifugation (lösliche Fraktion); Debris: Zelltrümmer nach Zentrifugation (unlösliche Fraktion). Das theoretische Molekulargewicht des jeweiligen Proteins ist durch einen Rahmen symbolisiert.

Die Proben des zellfreien Überstands zeigen keine Banden und deuten auf einen Verdünnungsfehler hin und eine Konzentrierung war nicht erfolgreich. Jedoch ist für alle drei V-HPO-Konstrukte eine intensive Zielbande in der unlöslichen Fraktion sichtbar. Dies deutet auf eine weiterhin schlechte Löslichkeit der Proteine hin und die Ethanol-Zugabe scheint unter den getesteten Bedingungen keinen eindeutigen Einfluss zu haben. Auffällig war jedoch, dass unter diesen Bedingungen zum ersten Mal eine Zielbande für V-HPO-*Lp* (erwartet ca. 55 kDa über ExPasy *translate tool*) sichtbar war. Für dieses Protein hatte die Ethanol-Zugabe somit schon einen positiven Effekt.

Um die Faltungsgeschwindigkeit als Ursache zu identifizieren, wurden zwei verschiedene Parameter verändert. Die punktuelle Zugabe von IPTG als Induktor sorgt für eine hohe lokale Konzentration IPTG, die eine hohe Genexpressionsrate zur Folge hat. Daher wird die Translationsgeschwindigkeit der Ribosomen maximal. Eine Alternative zur IPTG-Induktion ist eine graduelle Induktion mit Autoinduktionsmedium (AI-Medium), bei der Glucose, definiert durch die eingestellte Konzentration (siehe Kapitel 5.3.7), reprimierend auf das T7 Operon wirkt bis diese verstoffwechselt wurde.<sup>[286]</sup> Nachdem die Glucose verstoffwechselt wurde, wird die zweite Komponente des Mediums, Laktose, zu einer graduellen Induktion der Genexpression verwendet. Zu diesem Zweck wurden Expressionsstudien mit Autoinduktionsmedien basierend auf den drei verschiedenen Basismedien LB-, 2xYT- und TB-Medium untersucht. Die Untersuchungen wurden mit dem V-HPO-*Ci*-Konstrukt in *E. coli* BL21 (DE3) bei einer Kultivierungstemperatur von 20 °C durchgeführt (siehe Abbildung 36).

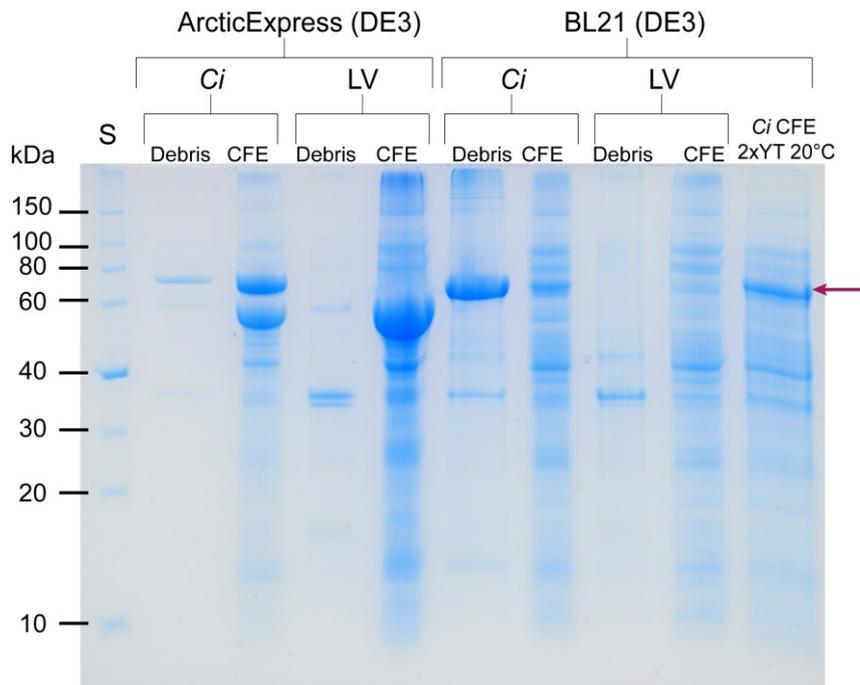


**Abbildung 36: Einfluss von AI-Medien auf die lösliche Produktion von  $V_{CI}PO-Ci$  in *E. coli* BL21 (DE3)**

Zur Optimierung der Löslichkeit der V-HPOs in *E. coli* wurden verschiedene AI-Medien (basierend auf LB-, 2xYT- und TB-Medium) getestet. Als Beispielprotein wurde  $V_{CI}PO-Ci$  aufgrund des hohen Expressionslevels des Gens verwendet. Dieses Protein wurde in *E. coli* BL21 (DE3) bei 20 °C produziert und die Löslichkeit anhand des *inclusion body*-Test mittels SDS-PAGE Analyse untersucht. S: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker; *Ci*: Proben des Konstrukts  $V_{CI}PO-Ci$ ; LV: Leervektor; LB: LB-Medium; 2xYT: 2xYT-Medium; TB: TB-Medium; CFE: zellfreie Lysatprobe nach Zentrifugation (lösliche Fraktion); Debris: Zelltrümmer nach Zentrifugation (unlösliche Fraktion); \*CFE symbolisiert eine Probe, bei der es zu einer potenziellen Vermischung mit der Debris-Probe während der Probenauftragung gekommen ist. Das theoretische Molekulargewicht von  $V_{CI}PO-Ci$  ist durch einen Pfeil markiert.

Innerhalb der getesteten AI-Medien sind deutliche Unterschiede in der Proteinproduktion erkennbar. Während im LB-Medium der Proteingehalt für das Zielprotein generell gering ausfällt, zeigt sich im 2xYT- und TB-Medium ein hoher Gehalt in der unlöslichen Fraktion (Debris). In der löslichen Fraktion (CFE) dieser beiden Medien scheinen sich geringe Mengen des Zielproteins zu befinden, wobei es bei der 2xYT CFE-Probe zu einer Durchmischung mit der Debris-Probe gekommen ist. In beiden Fällen ist der Gehalt löslichen Proteins allerdings weiterhin recht gering, die überwiegende Mehrheit des Zielproteins verbleibt unlöslich.

In einem weiteren Versuch wurde eine Kombination aus Verwendung des TB-basierten AI-Mediums, Ethanol-Zugabe und Kälteschock der Zellen verwendet, um die Produktion von Chaperonen zu fördern und gleichzeitig die Faltungsgeschwindigkeit zu reduzieren. Auch hier wurde beispielhaft mit dem Protein  $V_{CI}PO-Ci$  aus *C. inaequalis* gearbeitet. Neben dem bisher verwendeten Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) wurde ein für unlösliche Proteine adaptierter Stamm, *E. coli* ArcticExpress (DE3) der Firma Agilent, unter gleichen Bedingungen getestet. Dieser zeichnet sich durch eine konstitutive Produktion zusätzlicher Kälteschock-Chaperone aus, weswegen die Inkubation hier bei 13 °C erfolgt (siehe Kapitel 5.3.8). Für beide Konstrukte wurden die Zellen nach Kultivierung aufgeschlossen und die Proben der löslichen und unlöslichen Fraktionen miteinander via SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37: SDS-PAGE Analyse zur Überprüfung der löslichen Proteinproduktion von V-HPO-*Ci* in *E. coli* ArcticExpress (DE3) und *E. coli* BL21 (DE3)**

Zur weiteren Steigerung des Anteils an löslichem Protein wurde das TB-basierte AI-Medium in Kombination mit Ethanol-Zugabe und Kälteschock verwendet (siehe Kapitel 5.3.8). Zusätzlich wurde nicht nur der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3), sondern auch der für unlösliche Proteine adaptierter Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) verwendet (bei 13 °C). Die Optimierung der Proteinproduktion wurde hier beispielhaft an dem Protein V-HPO-*Ci* untersucht. S: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker; *Ci*: Proben des Konstrukts V-HPO-*Ci*; LV: Leervektorproben; CFE: zellfreie Lysatprobe nach Zentrifugation (lösliche Fraktion); Debris: Zelltrümmer nach Zentrifugation (unlösliche Fraktion).

Im Vergleich zwischen beiden Expressionsstämmen zeigt der *E. coli* ArcticExpress (DE3)-Stamm eine deutliche Zielbande (ca. 70 kDa) des V-HPO-*Ci*-Proteins in der löslichen Fraktion (CFE). Die Bande bei ca. 60 kDa ist dem integrierten Chaperon unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors zuzuordnen, weshalb sie auch in der Leervektorkontrolle sichtbar ist. Für *E. coli* BL21 (DE3) zeigt sich eine marginale Bande in der löslichen Fraktion, der größte Anteil des Proteins scheint weiterhin als unlösliche *inclusion bodies* vorzuliegen.

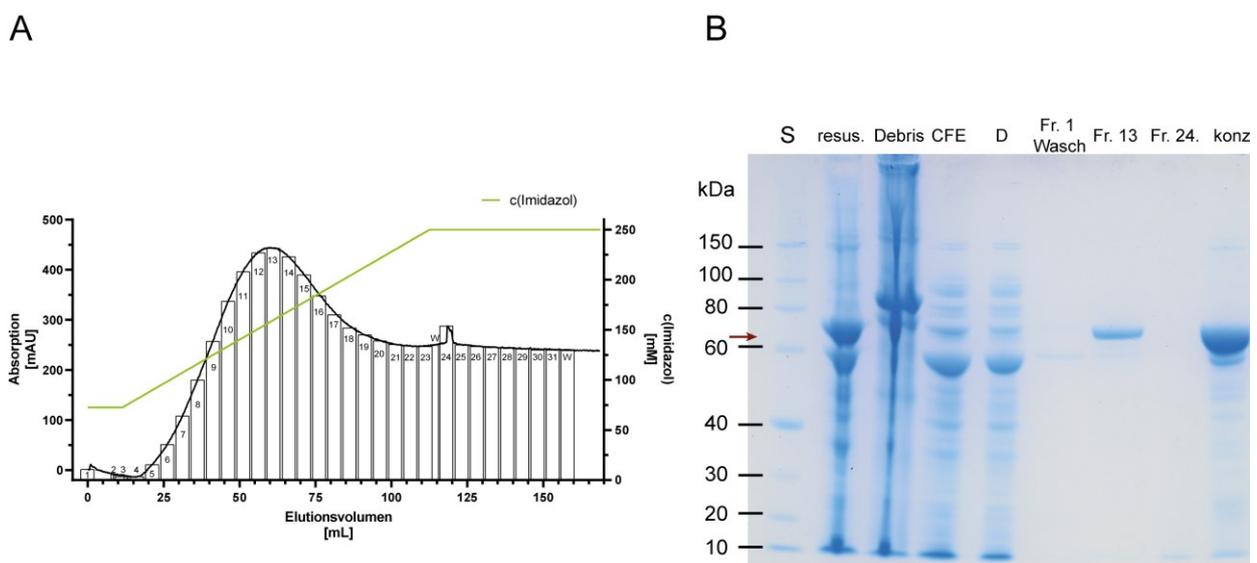
Aufgrund der Befunde im Zuge der Produktionsoptimierung der drei vanadiumabhängigen Haloperoxidasen in *E. coli* kann zusammengefasst werden, dass alle Proteine über eine sehr geringe Löslichkeit im *E. coli* Zellmilieu verfügen. Erst unter Zuhilfenahme mehrerer Hilfsmittel und Additive, sowie durch mehrerer Optimierungsrunden war eine erfolgreiche Überproduktion löslicher V-HPOs möglich. Diese Schwierigkeiten lassen sich auf die unterschiedlichen Lebensbedingungen der Ursprungsorganismen zurückführen, da es sich bei den Organismen *C. inaequalis* und *C. officinalis* um marine Algen bzw. Pilze handelt. Das terrestrische Bakterium *L. pratensis* sollte an vergleichbarere Bedingungen adaptiert sein wie *E. coli*, allerdings zeigte das daraus stammende Protein in der heterologen Produktion die größten Schwierigkeiten. Im Laufe weiterer Experimente wurde auf den Kälteschock nach Ethanol-Zugabe für alle Haloperoxidasen verzichtet, da sich dieser Schritt als überflüssig erwies (siehe Kapitel 3.5.2). Aufgrund der höheren Endzelldichte nach Kultivierung im TB-Medium im Vergleich zum 2xYT-Medium ( $OD_{600}$  von ca. 9 gegenüber 20), wurde TB-basierte AI-Medium als Medium zur Kultivierung für alle folgenden Experimente genutzt. Um die weiteren Produktionsschritte wie Isolationsmethoden zu etablieren, wurden die folgenden Experimente mit dem monomeren

Protein  $V_{Cl}PO-Ci$  aus *C. inaequalis* durchgeführt. Die literaturbekannte  $V_{Br}PO-Co$  aus *C. officinalis* bildet ein Dodecamer und erschwert damit zusätzlich zur geringen Löslichkeit die Handhabung für weitere Experimente.<sup>[287]</sup> Dieses Protein wurde daher im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

### 3.2.3 Isolation und Reinigung der Haloperoxidase aus *C. inaequalis*

Für die angestrebten biokatalytischen Anwendungen müssen die Haloperoxidasen in reiner Form vorliegen. Nachdem diese durch Expressionsoptimierungen als lösliches Protein vorliegen, sollte für diese Proteine ein Isolationsprotokoll etabliert werden. Zur direkten Isolation der  $V_{Cl}PO-Ci$  wurde diese mit einem N-terminalen 6xHis-StrepII-Tag versehen. Damit kann neben einer Affinitätschromatographie mit einem Polyhistidinrest am N-Terminus auch zusätzlich bei Bedarf eine orthogonale Affinitätschromatographie über Strep-Tactin-Säulen erfolgen.

Um genügend Protein für Charakterisierungsexperimente zu erhalten, wurde die Kultivierung auf 500 mL pro Kultur erhöht, die restlichen Bedingungen aus der Expressionsoptimierung wurden beibehalten (siehe Kapitel 5.3.8). Nach der Zellernte wurden die Pellets per Ultraschallaufschluss lysiert, zentrifugiert und der Überstand auf eine 5 mL Ni-Säule geladen (siehe Kapitel 5.4.2). Da das Elutionsverhalten von Proteinen bei der IMAC abhängig von der Zugänglichkeit des Histidin-Tags am jeweiligen Terminus ist, wurde in einem ersten Experiment ein linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol als finale Konzentration verwendet. Die verschiedenen Elutionssignale wurden mit je einer der Hauptfraktionen exemplarisch auf die Anwesenheit des Zielproteins  $V_{Cl}PO-Ci$  per SDS-PAGE untersucht (siehe Abbildung 38).

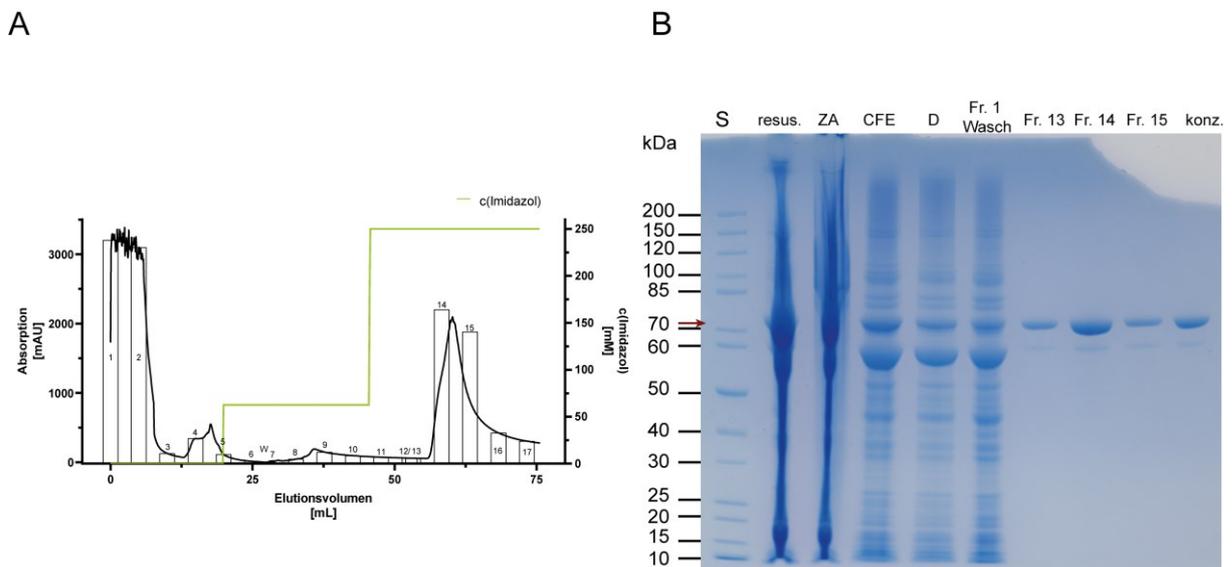


**Abbildung 38: UV/VIS-Chromatogramm und SDS-PAGE der Isolation von  $V_{Cl}PO-Ci$  mit einem linearen Elutionsgradienten**

Im Chromatogramm der Proteinisolation via ÄKTA (A) ist die Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen der jeweiligen Fraktionen (als Säulen nummeriert) aufgetragen. Die Konzentration von Imidazol bei den entsprechenden Elutionsvolumina ist als grüne Kurve dargestellt. Die dazugehörige SDS-PAGE (B) zeigt auf eine Zelldichte von 1 normierte Proben nach jedem Reinigungsschritt. Die Höhe der zu erwartenden Proteinbande (hier ca. 70 kDa) ist als Pfeil hervorgehoben. S: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker; resus: resuspendiertes Zellpellet; Debris: Zelltrümmer nach Ultraschallaufschluss (unlösliche Fraktion); CFE: zellfreier Überstand (lösliche Fraktion); D: Durchfluss nach Säulenauftragung; konz: Proteinprobe aus Fr. 13 nach Dialyse und Konzentration.

Anhand der Banden im Gel kann die Anwesenheit der Haloperoxidase in den Fraktionen 11-15 bestätigt werden. Die Elution des Zielproteins beginnt somit bei etwa 87 mM Imidazol und zeigt wenig Verunreinigung mit Fremdproteinen. In Fraktion 24 konnte trotz eines leichten Signals im Chromatogramm keine Proteinbande bis auf ein schwaches Signal bei 10 kDa detektiert werden.

Anhand der Prozentigkeit des imidazolhaltigen Puffers B konnte aus dem linearen Programm ein Stufengradient definiert werden, mit dem gezielt  $V_{Cl}PO-Ci$  als zweite Elutionsfraktion nach ungebundenen Proteinen in einem Lauf isoliert werden konnte (siehe Abbildung 39). Für die anschließende Beladung des Enzyms wurde eine Dialyse mit dem später verwendeten Assaypuffer (BTA 100 mM, pH 6) durchgeführt, da Vanadat potenzielle Wechselwirkungen mit Wasserstoffperoxid in größeren Mengen hervorrufen könnte. Das Protein konnte anschließend erfolgreich konzentriert und für weitere Experimente verwendet werden.



**Abbildung 39: UV/VIS-Chromatogramm und SDS-PAGE der Isolation von  $V_{Cl}PO-Ci$  mit einem optimierten stufenweisen Elutionsgradienten**

Im Chromatogramm der Proteinisolation via ÄKTA (A) ist die Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen der jeweiligen Fraktionen (als Säulen nummeriert) aufgetragen. Die Konzentration Imidazol bei den entsprechenden Elutionsvolumen ist als grüne Kurve dargestellt. Die dazugehörige SDS-PAGE (B) zeigt auf eine Zelldichte von 1 normierte Proben nach jedem Reinigungsschritt. Die Höhe der zu erwartenden Proteinbande (hier ca. 70 kDa) ist als Pfeil hervorgehoben. S: PageRuler™ ungefärbter Protein Marker; resus.: resuspendiertes Zellpellet; ZA: Zellysat nach Ultraschallaufschluss; CFE: zellfreier Überstand; D: Durchfluss nach Säulenauftragung; konz.: Proteinprobe aus Fr. 13-15 nach Dialyse und Konzentration

Die finalen Proteinausbeuten mit der hier etablierten Kultivierungs- und Isolationsstrategie sind in Tabelle 3 beispielhaft zusammengefasst.

**Tabelle 3: Übersicht der Zell- und Proteinausbeuten für V<sub>Cl</sub>PO-Ci mit dem in dieser Arbeit etablierten Expressions- und Isolationsprotokoll**

Die angegebenen Werte wurden aus drei repräsentativen Kultivierungs- und Isolationsansätzen (biologisches Triplikat) bestimmt und gemittelt.

Zellmenge pro Liter Kultur [g · L <sup>-1</sup> ]	Zielproteinmenge nach Isolation [mg]	Zielproteinmenge pro Liter Zellkultur [mg · L <sup>-1</sup> ]	Zielproteinmenge pro Gramm Zellen [mg · g <sup>-1</sup> ]
13.9 ± 4.33	6.66 ± 3.65	7.37 ± 3.66	0.518 ± 0.178

Die durchschnittlich erhaltene Menge Zielprotein liegt mit ca. 7 mg Protein pro Liter Zellkultur in guter Übereinstimmung mit einem vergleichbaren Expressionssystem in *E. coli* TOP10 unter Verwendung eines Arabinose-Promotors (ca. 10 mg · L<sup>-1</sup> Zellkultur).<sup>[288]</sup> Die Schwankungen ergeben sich vermutlich über die unterschiedlichen Effizienzen beim Aufschluss und der Beladung der Ni-NTA-Säule für die IMAC-Isolation. Im Vergleich zu etablierten Isolationsprotokollen anderer Enzyme bleibt die Gesamtausbeute des Zielproteins mit Haloperoxidasen aber weiterhin gering.<sup>[289]</sup> *E. coli*-basierte Expressionssysteme scheinen bedingt durch die geringe Löslichkeit der meisten Haloperoxidasen ein vergleichsweise schlechtes System zu bleiben. Ansätze mit *Aspergillus niger* oder *Pichia pastoris* würden hier vermutlich wesentlich vielversprechender sein, wie erste Versuche zeigen konnten. Da in diesen Fällen aber eine Fermentation der Kulturen unabdingbar ist, eignet sich die hier etablierte Kultivierungsmethode für kleine Ansätze im Labormaßstab gut.

Um mit der Charakterisierung des Enzyms für biokatalytische Ansätze fortzufahren, sollte nun die Aktivität des Enzyms bestimmt werden. Hierfür wurden verschiedene Assaysysteme getestet.

### 3.3 Etablierung eines fluoreszenzbasierten Assaysystems für Haloperoxidasen

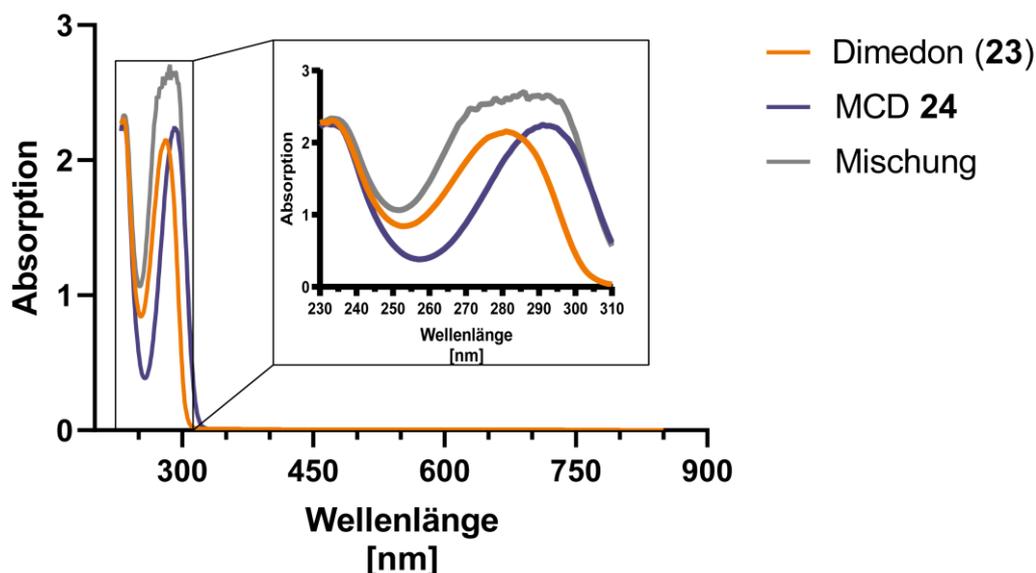
#### 3.3.1 Evaluation des Dimedon-Assays

Um einen Biokatalysator auf dessen katalytische Eigenschaften zu untersuchen, werden sogenannte Assays verwendet. In diesen werden Modellsubstrate vom (Bio-)Katalysator umgesetzt und erzeugen bei der Umsetzung ein oder mehrere (Neben-)Produkte, die abhängig von der verwendeten Messmethode dann direkt oder indirekt ein messbares Signal erzeugen. Für die meisten Enzym-Assays werden photometrische Messungen bevorzugt, da hier über den Vergleich der Absorptionswerte bei einer bestimmten Wellenlänge ein Anstieg des Produktes oder Verringerung des Eduktes sichtbar gemacht werden kann. Das bekannteste Beispiel bildet hier der NADH-Nachweis, der für NADH-abhängige Enzyme bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch verfolgt werden kann.<sup>[290]</sup>

Für Haloperoxidasen wird seit Jahrzehnten der Dimedon-Assay verwendet (siehe Kapitel 2.4.4). Hierbei wird Dimedon (**23**) oder Monochlordimedon **24** (MCD) mit einer Haloperoxidase halogeniert, wobei eine Absorptionsänderung bei 290 nm beobachtet werden kann. Trotz der weit verbreiteten Anwendung dieses Assays wurden in den letzten Jahren zunehmend Probleme mit dem eindeutigen Nachweis von HPO-Aktivität festgestellt (siehe Kapitel 2.4.4).<sup>[222, 223]</sup> Aus diesem Grund sollte der Dimedon-Assay im Rahmen dieser Arbeit genauer evaluiert werden.

Zur Auswertung der Zuverlässigkeit wurde die Häm-eisenabhängige Haloperoxidase aus *C. fumago* (CPO-*Cf*) als kommerziell erhältliches Enzympräparat (zellfreies Lysat) verwendet. Als Substrat wurde Dimedon (**23**) eingesetzt, das entweder einmal oder zweimal zum entsprechenden Produkt halogeniert werden kann (siehe Abbildung 24). Parallel zur Absorptionsmessung wurden Proben der Reaktion auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte) aufgetragen und mit den Ergebnissen der Absorptionsmessung verglichen.

Im Zuge dieser Experimente wurde mehrfach eine Absorptionsänderung beobachtet, die aber auf der DC-Platte nicht bestätigt werden konnte. Auch mit weiteren Anpassungen und der Angleichung der Assay-Bedingungen an literaturbekannte Bedingungen konnte die Diskrepanz zwischen beiden Methoden nicht überwunden werden. Um ein Problem in der Absorptionsmessung auszuschließen, wurden Absorptionsspektren von Dimedon (**23**), Monochlorodimedon **24** und einer 1:1-Mischung beider Substanzen aufgenommen (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40: Absorptionsspektrum von Dimedon (23), Monochlordimedon 24 (MCD) und einer 1:1-Mischung beider Verbindungen**

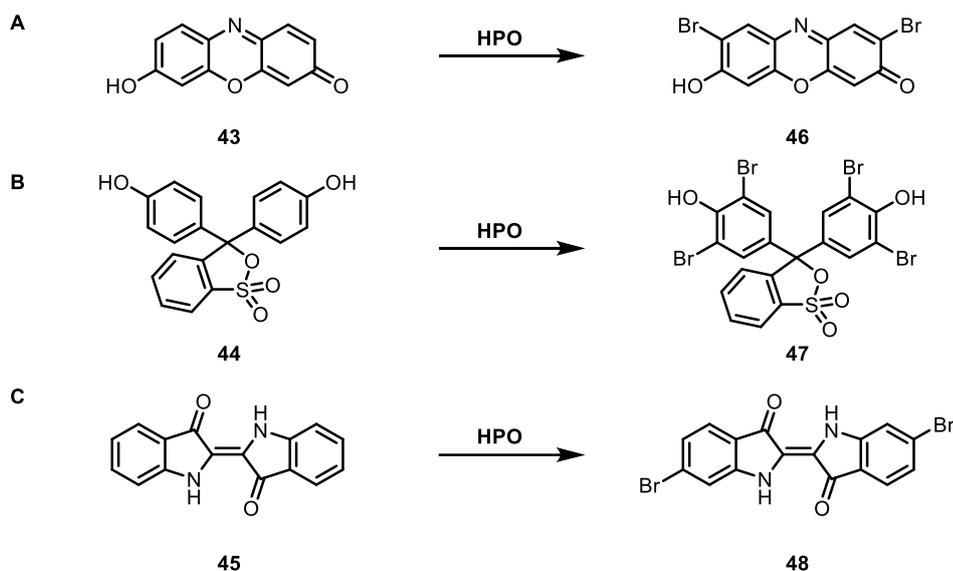
Die finale Konzentration beider Verbindungen, auch in der Mischung, lag bei 100  $\mu\text{M}$  in Assaypuffer adaptiert für ideale Bedingungen für CPO-*Cf* (HP<sub>i</sub> 100 mM, pH 3). Die Messung erfolgte in einer Quarzglasküvette, um Streueffekte bei Wellenlängen unter 300 nm bei Plastikkuvetten zu unterbinden. Orange: Dimedon (23); Blau: Monochlordimedon 24 (MCD); Grau: 1:1-Mischung

Aus dem Vergleich der Spektren wird ersichtlich, dass die Überlappung der Absorptionsspektren für beide Moleküle sehr groß ist. Wird das Differenzspektrum gebildet, ergibt sich eine Wellenlänge von 296 nm mit einer Absorptionsdifferenz von 0.409 als optimale Mess-Wellenlänge. Zudem wird die Absorptionseigenschaft aromatischer Aminosäuren in Proteinen ebenfalls bei Wellenlängen um 280 nm angesprochen, wodurch es auch hier zu störenden Effekten bei der Aktivitätsmessung kommen kann.

In Anbetracht der hier dargestellten Probleme und der literaturbekannten Fehleranfälligkeit und Kreuzreaktivität des Dimedon-Assays sollte ein alternativer Assay zur Quantifizierung von HPO-Aktivitäten etabliert werden.

### 3.3.2 Etablierung eines kolorimetrischen Assays für Haloperoxidasen

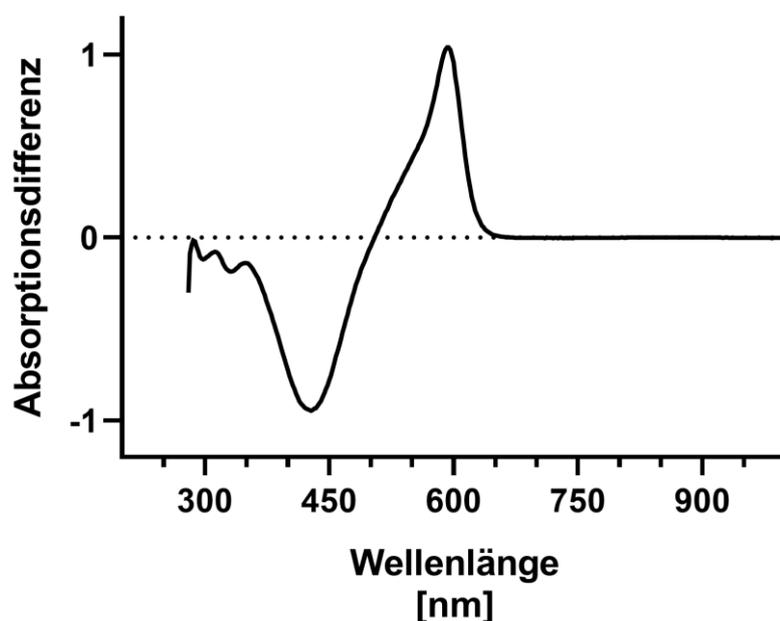
Da Absorptionmessungen durch ihre simple Durchführung eine unkomplizierte Methode zur Bestimmung von Enzymaktivität darstellen, wurden verschiedene Chromophore auf ihre Eigenschaft als Halogenierungsindikatoren getestet (siehe Abbildung 41). Grundlage hierfür sollte eine Verschiebung des Absorptionsspektrums eines halogenierten Moleküls im Vergleich zu seinem nicht-halogenierten Pendant sein, die mit den elektronenziehenden Effekten von Halogenen in aromatischen Systemen häufig einhergeht.<sup>[291]</sup>



**Abbildung 41: Chromophore und deren potenzielle Produkte als Grundlage für einen HPO-Aktivitätsassay**

**A:** postulierte Reaktion von Resorufin (43) mit einer Haloperoxidase unter Verwendung von Bromid-Ionen und Wasserstoffperoxid zu Bromresorufin 46. **B:** postulierte Reaktion von Phenolrot (44) mit einer Haloperoxidase unter Verwendung von Bromid-Ionen und Wasserstoffperoxid zu Tetrabromphenolrot (47) (Bromphenolblau). **C:** postulierte Reaktion von Indigo (45) mit einer Haloperoxidase unter Verwendung von Bromid-Ionen und Wasserstoffperoxid zu Dibromindigo (48) (Purpur).

Für Phenolrot (44) und Indigo (45) sind halogenierte Produkte in Form der Tetrabrom- bzw. Dibromderivate bekannt und werden auch als pH-Indikatoren verwendet.<sup>[292]</sup> Für alle drei Moleküle wurden Absorptionsspektren aufgenommen und Reaktionen mit der kommerziellen CPO-*Cf* durchgeführt. Der Vergleich der Spektren vor und nach der Reaktion zeigte allerdings im Fall von Resorufin (43) und Indigo (45) keinen deutlichen Unterschied (siehe Kapitel 5.7.15). Zudem war die Löslichkeit beider Ausgangsmoleküle im wässrigen Puffer außerordentlich gering. Für Phenolrot (44) wurde dagegen ein deutlicher Unterschied im Absorptionsspektrum im Vergleich zum Produkt beobachtet (siehe Abbildung 42).



**Abbildung 42: Differenzspektrum von Bromphenolblau (47) und Phenolrot (44)**

Die Messung erfolgte in  $\text{HP}_i$ -Puffer mit einer finalen Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  Phenolrot (44) bzw. Bromphenolblau (47). Die erhaltenen Absorptionswerte für Phenolrot wurden anschließend von den Werten des Bromphenolblau subtrahiert.

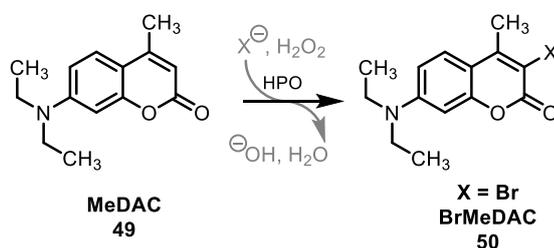
Im Zuge der Reaktion mit CPO-*Cf* konnte eine Steigerung der Absorption im Laufe der Reaktion bei  $598 \text{ nm}$  beobachtet werden, allerdings muss für die erfolgreiche Detektion eine vierfache Bromierung des Phenolrot (44) erfolgen. Für die tatsächliche enzymatische Aktivität müssten die Werte dann auf eine Halogenierung normiert, also alles mit dem Faktor vier geteilt werden. Da allerdings nicht gewährleistet werden kann, dass konsekutive Halogenierungen mit derselben Ratenkonstante enzymatisch erfolgen, entspräche diese Methode lediglich einer Annäherung unter idealen Bedingungen im katalytischen Zyklus. Da eine ordentliche Quantifizierung somit nur sehr schwer zu realisieren wäre, wurde dieser Assay ebenfalls nicht weiterverfolgt. Vielmehr kann der Phenolrot-Assay für Haloperoxidasen als qualitativer Assay, beispielsweise als Agarplattennachweis, für eine schnelle Musterung, verwendet werden.<sup>[201]</sup>

Da sich Absorptionsmessungen mit den meisten Substanzen nur sehr schwach nach einfacher Halogenierung voneinander unterscheiden, wurde der Fokus für einen Quantifizierungsassay von HPOs auf Fluorophore gerichtet.

### 3.3.3 Etablierung eines fluorimetrischen Assays für Haloperoxidasen

Fluorimetrische Assays für die Quantifizierung enzymatischer Aktivität sind seltener verbreitet, allerdings für verschiedene Enzymfamilien beschrieben.<sup>[293]</sup> Wesentlicher Unterschied sind hier die deutlich höhere Sensitivität von Fluorophoren im Vergleich zu Chromophoren, die eine Detektion selbst geringer Mengen des Fluorophors möglich machen. Die Fluoreszenzmessungen werden hierbei aber durch sogenannte *quenching*-Effekte erschwert. Bei diesen kann der angeregte  $S_1$ -Zustand der Elektronen im Fluorophor über andere Fluorophor- oder Lösungsmittelmoleküle relaxiert werden und dabei die Fluoreszenz löschen. Um zudem die gewünschte Einzelhalogenierung des Substrats zu ermöglichen, wurde ein Substrat ausgewählt, das über sterische und elektronische Effekte eine bevorzugte

nukleophile Position für den Angriff an das Hypohalogenit besitzt. In diesem Fall wurde das Coumarin 7-Diethylamino-4-methylcoumarin **49** (MeDAC) als Modellsubstrat gewählt (siehe Abbildung 43).



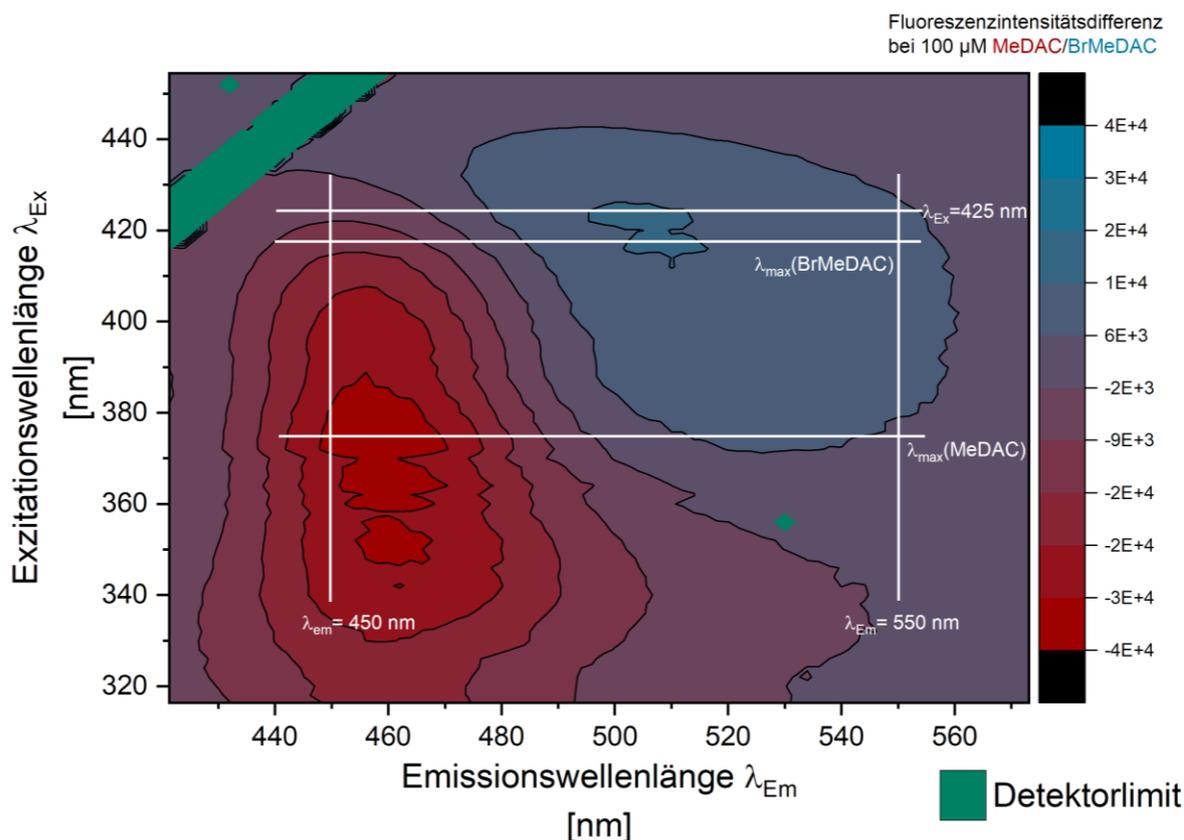
**Abbildung 43: Reaktionsschema des MeDAC-Assays**

Durch den ausgeprägten +M-Effekt der Laktone-Gruppe im aromatischen System wird die Nukleophilie an 3-Position stark erhöht. Die von der Haloperoxidase generierte elektrophile Halogenierungsspezies (bspw. Hypohalogenensäure HO-X) kann eine elektrophile aromatische Substitution an dieser Position forcieren. Die Diethylaminogruppe blockiert durch ihre Rotationsfreiheit und Größe die anderen nukleophilen Stellen des aromatischen Systems, wodurch die Regioselektivität für die 3-Position weiter erhöht wird.

Da es sich bei MeDAC **49** um ein kommerziell erhältliches Coumarin handelt, konnte die entsprechende Referenz in einem Schritt hergestellt werden. Als Grundlage für den Assay sollte hier die Bromierung zu 3-Brom-7-diethylamino-4-methylcoumarin **50** (BrMeDAC) im Fokus stehen.

In einem ersten Schritt wurde die Synthese von BrMeDAC **50** mit NBS nach einer literaturbekannten Prozedur durchgeführt. Durch das Auftreten mehrerer Halogenierungsprodukte wurde säulenchromatographisch gearbeitet und dabei das gewünschte Produkt BrMeDAC **50** in NMR-reiner Form erhalten (siehe Kapitel 5.6.6).

Das erhaltene Produkt wies eine grün-gelbliche Färbung auf und lag als Feststoff vor. Da Nebenprodukte ebenso chemisch wie enzymatisch auftreten können, sollte das spektrale Verhalten der Reinstoffen **49** und **50** untersucht werden. Dafür wurden Stammlösungen in DMSO beider Substanzen angesetzt (je 10 mM) und mit einer finalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ein dreidimensionales Anregungs-Emissionswellenlängen-Spektrum aufgenommen, um die geeignetsten Wellenlängenpaare für Anregung und Emission des jeweiligen Fluorophors zu bestimmen. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden dann voneinander subtrahiert, um ein Differenzspektrum zu erhalten (siehe Abbildung 44).



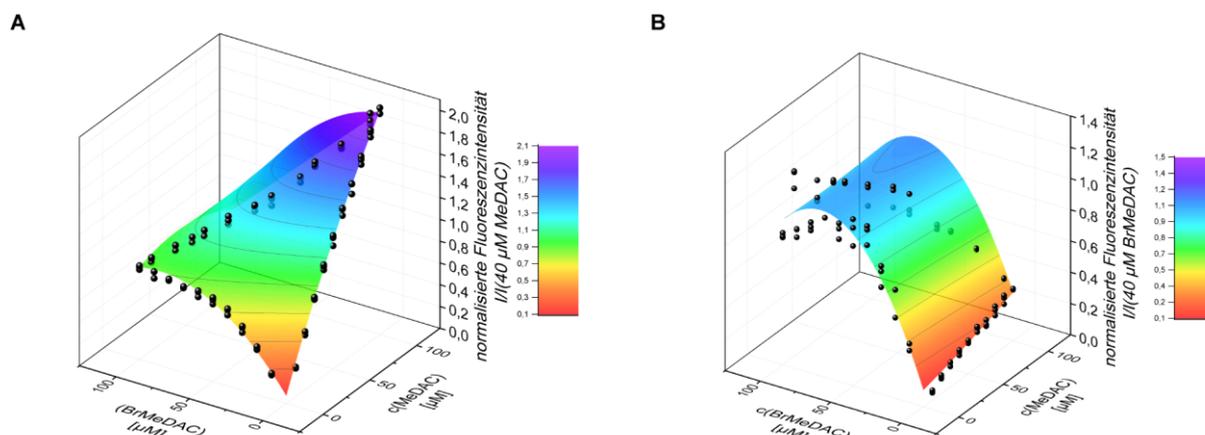
**Abbildung 44: 3D-Differenzspektrum der Anregungs- und Emissionsintensität von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 in Abhängigkeit von der Wellenlänge**

Rot: MeDAC-Überschussintensität; blau: BrMeDAC-Überschussintensität; Bereiche mit intensiver Färbung deuten auf einen besonders hohen Unterschied im Fluoreszenzsignal relativ zum Gegenmolekül hin. Die eingezeichneten Geraden stellen Schnittpunkte im Spektrum dar, an denen bei fester Anregungswellenlänge eine maximale Differenz im Emissionsspektrum erhalten wurde (hier:  $\lambda_{\text{Ex}}=425 \text{ nm}$ ). Die dabei erhaltenen Emissionswellenlängen für MeDAC 49 (450 nm) und BrMeDAC 50 (550 nm) wurden als jeweiliges Paar für weitere Messungen verwendet.

Da bei der Umsetzung von MeDAC 49 zu BrMeDAC 50 eine Verschiebung im Fluoreszenzspektrum erwartet wird, wurden die beiden Spektren miteinander verglichen. Um eine Verzerrung der Fluoreszenzintensitäten bei Messungen zu vermeiden, wurde eine Anregungswellenlänge gesucht, bei der es für beide Moleküle zwei verschiedene Emissionswellenlängen gibt, die einen signifikanten Fluoreszenzintensitätsunterschied aufweisen. Durch diesen Unterschied kann gewährleistet werden, dass bei der Messung der Fluoreszenzabnahme bzw. -zunahme nur die gewünschte Verbindung einen wesentlichen Beitrag zum Fluoreszenzsignal leistet und der Hintergrund minimal bleibt. In dem gewählten Puffer [100 mM BTA, pH 6, 4 % (v/v) DMSO] ergab sich für eine Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}}$  von 425 nm eine optimale Emission  $\lambda_{\text{Em}}$  bei 450 nm für MeDAC 49 und 550 nm für BrMeDAC. Die feste Anregungswellenlänge für beide Fluorophore wurde gewählt, um bei der folgenden Kalibrierung beider Moleküle das mathematische Gleichungssystem zu vereinfachen.

Für die Kalibrierung beider Moleküle wurden verschiedene Konzentrationen von MeDAC 49 bzw. BrMeDAC 50 bis zu 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Zusätzlich wurden verschiedene Mischverhältnisse gemessen, um potenzielle *quenching*-Effekte zwischen beiden Molekülen ebenfalls zu berücksichtigen. Da bei der enzymatischen Umsetzung beide Moleküle in der Lösung vorliegen können und einen Einfluss auf die Gesamtfluoreszenz der Lösung haben, wurde eine dreidimensionale Kalibrierung durchgeführt

(siehe Abbildung 45). Um die Unterschiede in absoluten Fluoreszenzeinheiten zwischen verschiedenen Messungen und Geräten zu kompensieren, wurden relative Fluoreszenzwerte für die Kalibrierung berechnet. Referenzwert war hierbei die Fluoreszenz von MeDAC **49** bzw. BrMeDAC **50** im Assaypuffer bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  ohne Anwesenheit des jeweils anderen Moleküls. Die Kalibrierung wurde für das Wellenlängenpaar für MeDAC **49** ( $\lambda_{\text{Ex}} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$ ) und BrMeDAC **50** ( $\lambda_{\text{Ex}} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} = 550 \text{ nm}$ ) simultan durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden mit einer 2D-Polynom-Funktion zweiten Grades gefittet.



**Abbildung 45: Dreidimensionale Kalibrierung der Fluoreszenzintensität von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 abhängig von der Konzentration des jeweiligen Fluorophors in der Lösung**

Die Funktionsterme sind in Kapitel 5.7.21 aufgeführt. Die Messung erfolgte in 100 mM BTA, pH 6. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf das Fluoreszenzsignal bei 40  $\mu\text{M}$  MeDAC bzw. BrMeDAC normalisiert. **A:** Kalibrierung für das Wellenlängenpaar für MeDAC **49** bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} = 450 \text{ nm}$  mit einem *least-square*-fit,  $R^2 = 0.99$ ; **B:** Kalibrierung für das Wellenlängenpaar für BrMeDAC **50** bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} = 550 \text{ nm}$  mit einem *least-square*-fit,  $R^2 = 0.96$

Wie die Abbildung verdeutlicht, ist eine Abnahme der Fluoreszenz für BrMeDAC **50** ab ca. 50  $\mu\text{M}$  sichtbar. Dieser Effekt ist vermutlich auf *quenching* zurückzuführen. Daher wurde die Kalibrierung für beide Fluorophore nur bis zu einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  verwendet und die Funktionen angepasst (siehe Kapitel 5.7.21). Durch die hohe Übereinstimmung der Fitfunktionen mit den Messwerten ( $R^2 > 0.95$ ) können somit beide Funktionen zur Berechnung der Konzentration der Fluorophore in einer unbekanntem Lösung verwendet werden. Hierbei erfolgt die Messung einer Probe bei einer Anregungswellenlänge und zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen, die auf das jeweilige Fluorophor abgestimmt sind (450 nm für MeDAC **49**, 550 nm für BrMeDAC **50**).

Für die Berechnung der Konzentration muss nun die Gleichung beider Fitfunktionen nach der Konzentration des jeweiligen Fluorophors aufgelöst werden. Um das so erhaltene Gleichungssystem zu vereinfachen, wurden die beiden Funktionen nach der Konzentration von MeDAC **49** aufgelöst. Daraus ergaben sich vier Gleichungen mit der zweiten Variable, der BrMeDAC-Konzentration und der gemessenen Fluoreszenzintensität  $I$  (siehe Gleichung 2 und Gleichung 3). Die vollständigen Zahlenwerte sind der Vollständigkeit halber aufgeführt, wobei die entscheidenden Variablen hervorgehoben sind.

**Intensität I (425 Ex, 450 Em)**

$$= 0.01 + 0.03 * c(\mathbf{MeDAC})[\mu\text{M}] + 0.03 * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}] + 1.74 * 10^{-5} * c(\mathbf{MeDAC})^2[\mu\text{M}]^2 - 1.83 * 10^{-4} * c(\mathbf{BrMeDAC})^2[\mu\text{M}]^2 - 3.07 * 10^{-5} * c(\mathbf{MeDAC})[\mu\text{M}] * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}]$$

$$\Leftrightarrow c(\mathbf{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em}})[\mu\text{M}] =$$

$$\frac{153539 * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}] \pm \sqrt{1740540000000000 * I_{425\text{Ex},450\text{Em}} + 341388125821 * c(\mathbf{BrMeDAC})^2[\mu\text{M}]^2 - 85657169400000 * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}] + 17810971300800000 - 133500000}}{174054}$$

**Gleichung 2: Kalibrierfunktion der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm in Abhängigkeit von der Konzentration von MeDAC 49 und BrMeDAC 50**

Die Gleichung wurde nach der Konzentration von MeDAC 49 bei dem gegebenen Wellenlängenpaar aufgelöst. Das hier betrachtete Wellenlängenpaar liefert besonders starke Fluoreszenzsignale, hauptsächlich durch MeDAC-Moleküle generiert. Die Variablen in der Gleichung sind fett hervorgehoben.

**Intensität I (425 Ex, 550 Em)**

$$= 3.64 * 10^{-4} + 4.34 * 10^{-4} * c(\mathbf{MeDAC})[\mu\text{M}] + 0.04 * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}] - 2.85 * 10^{-5} * c(\mathbf{MeDAC})^2[\mu\text{M}]^2 - 3.32 * 10^{-4} * c(\mathbf{BrMeDAC})^2[\mu\text{M}]^2 + 8.6 * 10^{-5} * c(\mathbf{MeDAC})[\mu\text{M}] * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}]$$

$$\Leftrightarrow c(\mathbf{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em}})[\mu\text{M}] =$$

$$\frac{860157 * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}] \pm \sqrt{11387840000000000 * I_{425\text{Ex},550\text{Em}} - 3038512756791 * c(\mathbf{BrMeDAC})^2[\mu\text{M}]^2 + 526758875600000 * c(\mathbf{BrMeDAC})[\mu\text{M}] + 1887707029977920 + 43400000}}{569392}$$

**Gleichung 3: Kalibrierfunktion der Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm und einer Emissionswellenlänge von 550 nm in Abhängigkeit von der Konzentration von MeDAC 49 und BrMeDAC 50**

Die Gleichung wurde nach der Konzentration von MeDAC 49 bei dem gegebenen Wellenlängenpaar aufgelöst. Das hier betrachtete Wellenlängenpaar liefert besonders starke Fluoreszenzsignale, hauptsächlich durch MeDAC-Moleküle generiert. Die Variablen in der Gleichung sind fett hervorgehoben.

Pro Wellenlängenpaar ergaben sich damit zwei Lösungen für die Gleichung, eine mit dem Wurzelterm als Summanden und eine mit dem Wurzelterm als Subtrahenden. Unter der Annahme, dass die Konzentration von MeDAC 49 für beide Emissionswellenlängen gleich sein muss, da für beide Emissionswellenlängen mit MeDAC 49 kalibriert wurde, muss auch die Differenz dieser beiden Funktionsterme minimal werden (bzw. im besten Fall Null ergeben). Da je zwei Gleichungen pro Emissionswellenlänge vorhanden sind, muss somit ein Gleichungssystem mit vier Gleichungen aufgestellt werden. In jeder Gleichung muss eine Differenz aus dem Funktionsterm der Konzentration von MeDAC 49 bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm und einem Term bei einer Emissionswellenlänge von 550 nm gebildet werden, die möglichst nah am Wert Null sein muss (siehe Gleichung 4).

$$I: c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},1}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},1}) = 0$$

$$II: c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},1}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},2}) = 0$$

$$III: c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},2}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},1}) = 0$$

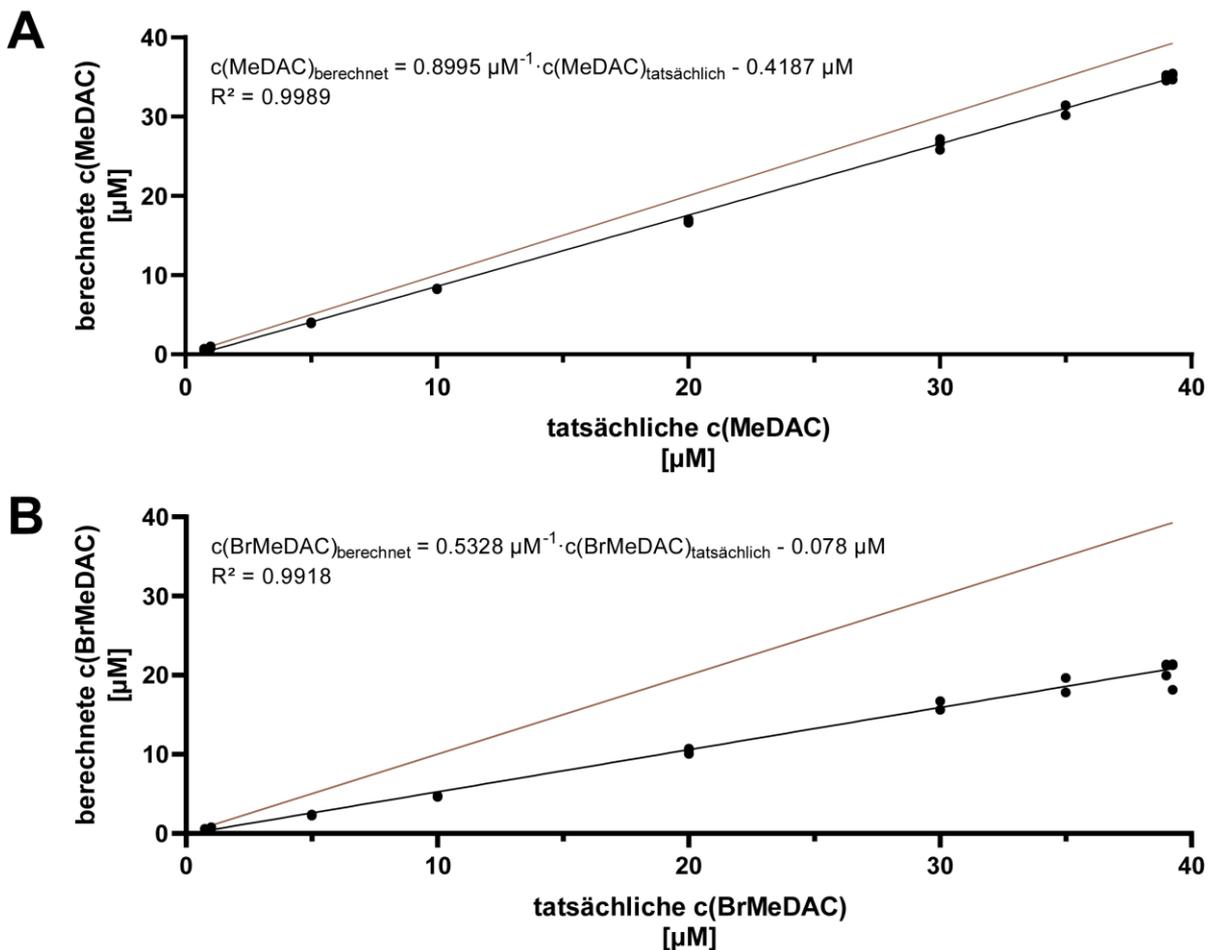
$$IV: c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},2}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},2}) = 0$$

#### Gleichung 4: Gleichungssystem für die Lösung der Konzentration von MeDAC 49

Für jeden Funktionsterm der Konzentration von MeDAC 49 bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm und Emissionswellenlänge von 450 nm,  $c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em}})$ , muss es mindestens einen Term geben, der bei gleicher Anregungswellenlänge und Emission bei 550 nm,  $c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em}})$ , denselben Wert für die Konzentration von MeDAC 49 ergibt. Wird eine Differenz in diesem Fall aus beiden Termen gebildet, wird der Wert minimal bzw. im Idealfall Null ergeben. In den jeweiligen Gleichungen I-IV steht die im Index befindliche Ziffer für die Art des Terms für das jeweilige Wellenlängenpaar. 1: die Wurzelfunktion liegt als Summand vor; 2: die Wurzelfunktion liegt als Subtrahend vor. Die rot hervorgehobene Gleichung lieferte in der empirischen Auswertung die geringsten Werte nach Differenzbildung und wurde deshalb als Lösungsfunktion für die Konzentrationen beider Fluorophore im nächsten Schritt verwendet.

Das dargestellte Gleichungssystem lässt sich analytisch nicht lösen, weshalb eine numerische Lösung der Gleichungssysteme angestrebt wurde. Aufgrund der vier mathematisch möglichen Lösungen für das Gleichungssystem ergeben sich zwei Lösungen, die negative Konzentrationen vorschlagen. Da diese physikalisch unsinnig sind, wurden sie für die Auswertung nicht weiter beachtet. Die übrigen zwei Gleichungen ergeben positive Werte für die Konzentration, allerdings wird ein Wert im Messbereich liegen, während der andere bei hohen Werten, die außerhalb des Messbereichs liegen, eine Lösung finden wird. Im Zuge der Rechnungen wurde die in Gleichung 4 hervorgehobene Teilgleichung III als gewünschte numerische Lösung identifiziert. Hierbei wurde der kleinstmögliche Wert für die gebildete Differenz aller vier Gleichungen gesucht, wobei die Konzentration von BrMeDAC 50 numerisch festgelegt wurde. Sobald ein Minimum erreicht wurde, wurden die Werte für MeDAC 49 und BrMeDAC 50 als gesuchte Konzentrationen festgelegt.

Zur Validierung der etablierten Methode wurden Mischungen von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 bis zu einer aufsummierten Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  angesetzt und entsprechend der vorherigen Schilderung gemessen und ausgewertet. Die so erhaltenen Konzentrationen wurden mit den tatsächlich eingesetzten Mengen jedes Fluorophors verglichen (siehe Abbildung 46).

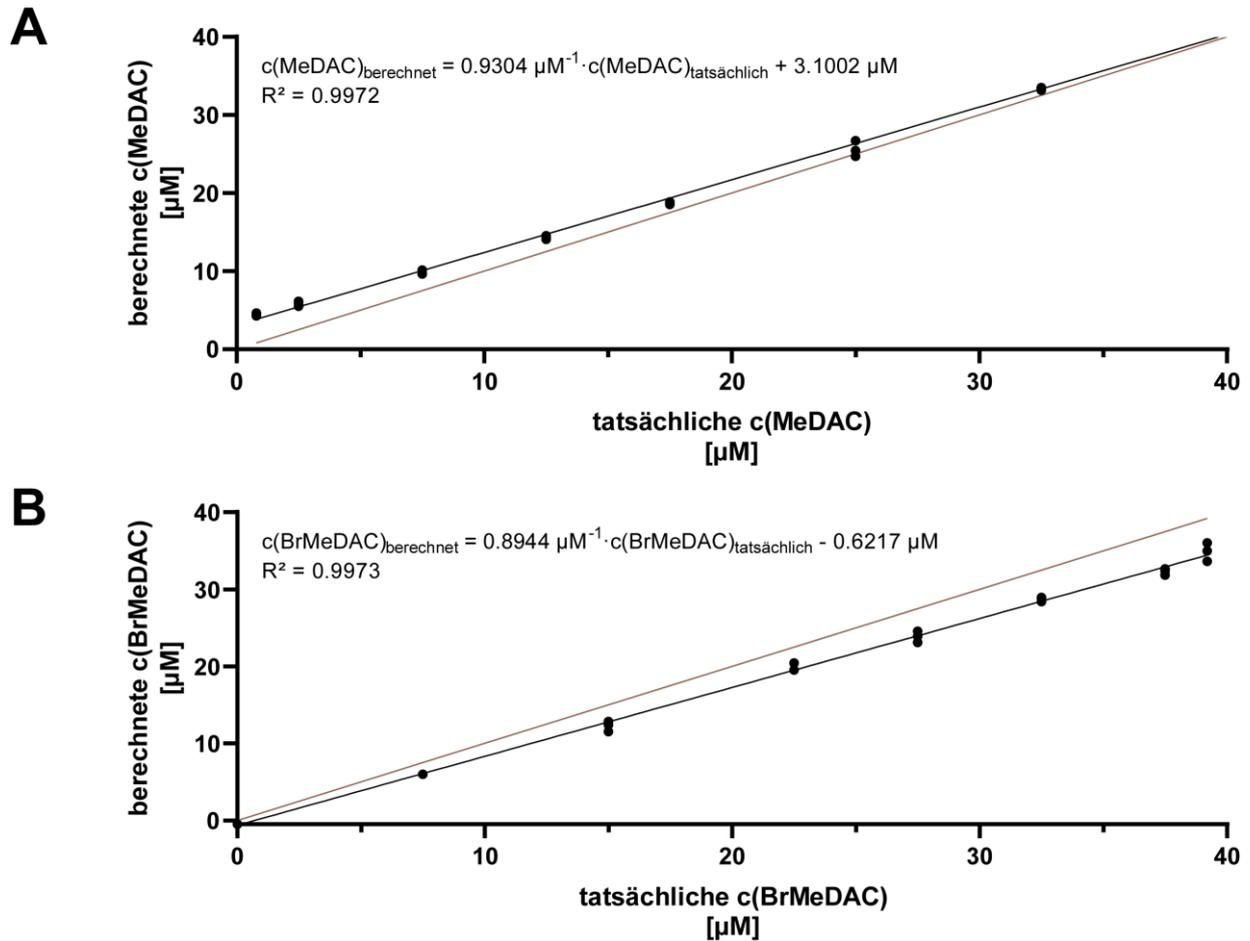


**Abbildung 46: Vergleich der berechneten Konzentrationen von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 in Abhängigkeit der tatsächlichen Konzentrationen beider Fluorophore**

Die Punkte markieren die Werte der jeweiligen Konzentrationsmessung in Dreifachbestimmung. Die rote Gerade stellt den Idealfall dar, bei dem eine ideale Korrelation (d.h. eine Steigung von 1 im Geradenterm) zwischen berechneten und tatsächlichen Werten erreicht wird. Die schwarze Gerade stellt die tatsächlich erreichte Korrelationsfunktion dar. **A:** Vergleich der errechneten und eingesetzten Konzentrationswerte für MeDAC 49. **B:** Vergleich der errechneten und eingesetzten Konzentrationswerte für BrMeDAC 50.

Läge eine ideale Korrelation zwischen experimentell bestimmten und tatsächlich vorliegenden Konzentrationen vor, würde der Zusammenhang beider Werte als lineare Funktion mit einer Steigung von 1 beschrieben werden können (siehe rote Gerade, Abbildung 46). Je näher somit die experimentell bestimmte Gerade mit ihrer Steigung an dem Wert 1 ist, desto höher wäre die Übereinstimmung. Im Fall von MeDAC 49 ist diese Übereinstimmung sehr groß, da die Steigung bei einem Wert von 0.9 liegt (siehe Abbildung 46 A). Die Berechnung der Konzentration von MeDAC 49 erfolgt mit dieser Methode also in zufriedenstellender Akkuratess. Im Fall von BrMeDAC 50 ist allerdings eine systematische Abweichung für höhere Konzentrationen sichtbar; die erhaltene Geradenfunktion liegt mit einer Steigung von etwa 0.5 um die Hälfte geringer als erwünscht, allerdings ist die Funktion mit einem  $R^2$ -Wert von 0.99 qualitativ konsistent (siehe Abbildung 46 B). Da die systematische Abweichung der hier erhaltenen Werte für BrMeDAC 50 so deutlich in ihrer Tendenz ist, wurden die hier erhaltenen Funktionsterme als Korrekturfaktoren für die Kalibrierung verwendet. Nach Errechnung der Konzentrationen beider Fluorophore einer Probe wurden die Werte mit der jeweiligen Geradengleichung des Fluorophors aus Abbildung 46 umgerechnet (Term aus A für MeDAC 49, B für BrMeDAC 50).

In einem neuen Experiment wurde nun erneut die Vergleichbarkeit der errechneten und tatsächlichen Werte untersucht (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Vergleich der berechneten Konzentrationen von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 nach Korrektur mit den Korrekturtermen aus Abbildung 46 in Abhängigkeit der tatsächlichen Konzentrationen beider Fluorophore

Die Punkte markieren die Werte der jeweiligen Konzentrationsmessung in Dreifachbestimmung. Die rote Gerade stellt den Idealfall dar, bei dem eine ideale Korrelation (d.h. eine Steigung von 1 im Geradenterm) zwischen berechneten und tatsächlichen Werten erreicht wird. Die schwarze Gerade stellt die tatsächlich erreichte Korrelationsfunktion dar. **A:** Vergleich der errechneten und eingesetzten Konzentrationswerte für MeDAC 49. **B:** Vergleich der errechneten und eingesetzten Konzentrationswerte für BrMeDAC 50.

Im Vergleich zu den unkorrigierten Geradengleichungen fällt auf, dass sich die Akkuratessse für MeDAC 49 marginal geändert hat (Steigung von 0.93 statt 0.89). Für den Fall des bromierten Fluorophors ergibt sich nun allerdings ein Wert von 0.894 im Vergleich zum unkorrigierten Steigungswert von 0.532. Da auch hier beide Geradenfunktionen einen  $R^2$ -Wert von über 0.99 haben, ist die gewünschte Akkuratessse mit diesem Assay gegeben. Unter Verwendung der geschilderten Kalibrierfunktionen und mathematischen Operationen kann unter Zuhilfenahme von Korrekturtermen in einer unbekanntem Lösung die Konzentration zweier Fluorophore in einer Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Zur finalen Validierung der Qualität dieses neu entwickelten Assays wurden die sogenannten *limit of detection* (LOD) und *limit of quantification* (LOQ) unter Verwendung der *limit of blank*-Methode bestimmt (siehe Tabelle 4, Kapitel 5.7.3).<sup>[294]</sup>

**Tabelle 4: Bestimmung der Nachweisgrenzen für den MeDAC-Assay**

Die Nachweisgrenzen wurden über die Methode *limit of blank* für beide Verbindungen bestimmt. Aufgrund der mathematischen Transformation ergeben sich in der Berechnung der Nachweisgrenzen für BrMeDAC **50** negative Werte. Die Präzision wurde anhand des Vertrauensintervalls  $t = 90\%$  berechnet.

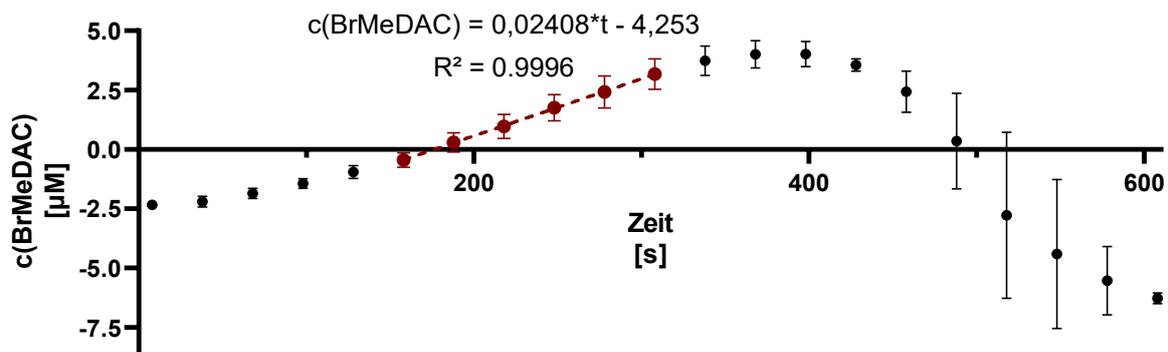
	<b>MeDAC 49</b>	<b>BrMeDAC 50</b>
<b>Limit of Blank</b> [ $\mu\text{M}$ ]	4.00	-6.50
<b>LoD</b> [ $\mu\text{M}$ ]	4.11	-6.09
<b>LoQ</b> [ $\mu\text{M}$ ]	5.64	2.99
<b>Präzision</b> [%]	5.53	7.64

Dabei wurde die Präzision des Assays auf über 90 % geschätzt, mit einem LOD von 4  $\mu\text{M}$  und einem LOQ von 6  $\mu\text{M}$ . Der in dieser Arbeit etablierte MeDAC-Assay besitzt somit die notwendigen Qualitätsanforderungen, um als Haloperoxidaseassay für die Quantifizierung der Moleküle MeDAC **49** und BrMeDAC **50** genutzt werden zu können.

Um die Anwendbarkeit des Assays für die Charakterisierung von Haloperoxidasen zu beweisen, wurde die literaturbekannte HPO aus *C. inaequalis*,  $V_{Cl}PO-Ci$ , als Katalysator untersucht.

### 3.3.4 Evaluation des entwickelten MeDAC-Assays

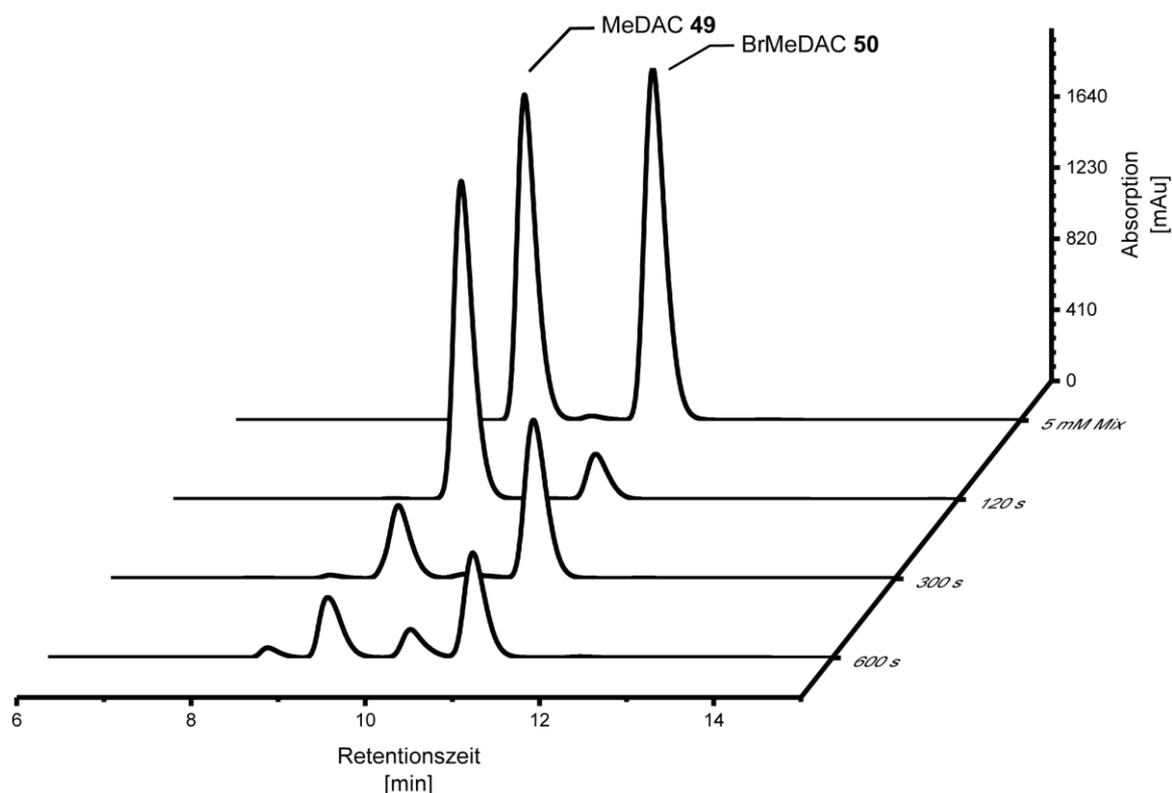
Zur Evaluation und Untersuchung der Anwendbarkeit des MeDAC-Assays wurde die Aktivität der literaturbekannten und zuvor isolierten (siehe 3.2.3)  $V_{Cl}PO-Ci$  bestimmt und analog zur Definition im vorherigen Abschnitt festgelegt. Aufgrund sehr schneller Umsatzraten mussten Proben der  $V_{Cl}PO-Ci$  um den Faktor 40 verdünnt werden, um genügend Datenpunkte zur Bestimmung der Aktivität zu erhalten (siehe Abbildung 48).



**Abbildung 48: Beispielhafte Aktivitätsbestimmung für  $V_{Cl}PO-Ci$  mit dem MeDAC-Assay**

Für Aktivitätsmessungen wurde primär die Fluoreszenzänderung für BrMeDAC betrachtet. Bedingt durch die mathematische Lösung der Konzentrationswerte starten alle Messungen im negativen Konzentrationsbereich, da hier nur wenige BrMeDAC-Moleküle in der Lösung vorliegen. Da für die Aktivitätsbestimmung die Konzentrationsänderungsrate der Reaktion, also die Geradensteigung im linearen Bereich der Messung (rot hervorgehobene Punkte), benötigt wird, wurden Messungen stets so angepasst, dass im linearen Bereich der Funktion ein maximal hoher  $R^2$ -Wert ( $>0.95$ ) bei mehr als drei Datenpunkten erreicht wurde. Der so erhaltene Steigungswert wurde unter Berücksichtigung sämtlicher Verdünnungsfaktoren und der Proteinlösung in eine enzymatische Aktivität ( $U \cdot mL^{-1}$ ) umgerechnet. Dargestellt ist die Messung biologischer Triplikate als Mittelwerte inklusive Standardabweichungen.

Bei Betrachtung der erhaltenen Datenpunkte fällt auf, dass die Konzentration an BrMeDAC **50** ein Maximum nach dem linearen Bereich der Funktion erreicht und danach rapide sinkt. Dieser Verlauf deutet auf eine konsekutive Reaktion des BrMeDACs **50** hin. Bedingt durch die zusätzlichen nucleophilen Positionen im Molekül, die für eine elektrophile aromatische Substitution weniger stark bevorzugt werden, ist eine zweite Bromierung des Moleküls dennoch denkbar. Diese Doppelbromierung könnte eine Löschung des Fluoreszenzsignals oder eine weitere Verschiebung des Emissionsmaximums und damit eine Abnahme der BrMeDAC-Konzentration zur Folge haben. Die Aktivitätsmessung wurde deshalb bei Beibehaltung der Konzentrationen im größeren Maßstab wiederholt und das Reaktionsgemisch zu drei verschiedenen Zeitpunkten über HPLC analysiert (siehe Abbildung 49). Als Referenz dienten die Reinsubstanzen MeDAC **49** und BrMeDAC **50**. Nach erfolgtem Lauf wurden die Signale den entsprechenden Substanzen zugeordnet (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 49: HPLC-Analyse der enzymatischen Umsetzung von MeDAC 49 zu BrMeDAC 50 mit  $V_{Cl}PO-Ci$**

Die Reaktion erfolgte gemäß Standardbedingungen für den MeDAC-Assay (siehe Kapitel 5.4.6), im 15 mL-Maßstab. Die Reaktion wurde unter Beibehaltung der Assay-Konzentrationen zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgebrochen (120, 300 und 600 s), mit EtOAc extrahiert, eingedampft, in 150  $\mu$ L einer 1:1 *n*-Heptan-Isopropanol-Mischung gelöst und anschließend im HPLC-System vermessen. Als Referenz diente eine 5 mM Mischung von MeDAC 49 und BrMeDAC 50.  $R_t(\text{MeDAC})=9.3$  min;  $R_t(\text{BrMeDAC})=10.7$  min.

Ein Vergleich der Chromatogramme zeigt eine kontinuierliche Abnahme des Signals bei ca. 9.6 min, das dem MeDAC-Molekül zugeordnet werden konnte. Das Signal bei ca. 11.2 min entspricht BrMeDAC 50, das im Laufe der Reaktion erst zunimmt (von 120 zu 300 s) und dann abnimmt (300 zu 600 s). Dabei werden zwei neue Signale bei etwa 9.8 und 10.5 min sichtbar, die auf mehrfach-halogenierte MeDAC-Moleküle zurückzuführen sind. Unter den gegebenen Bedingungen kann somit bestätigt werden, dass nach einer gewissen Zeit, abhängig von der Menge und Aktivität des Enzyms, eine Überhalogenierung von MeDAC 49 stattfinden kann, die zu einer Fluoreszenzlöschung führt. Aus diesem Grund wurden für sämtliche Auswertungsschritte nur die Fluoreszenzwerte in den ersten Minuten der Messung berücksichtigt. Sobald das Signal sinkt, ist nicht mehr von einer reinen Anwesenheit von BrMeDAC 50 auszugehen, weshalb diese Werte nicht in die Bestimmung von Aktivitätswerten eingeflossen sind. Der in dieser Arbeit etablierte MeDAC-Assay ist in der Lage, Haloperoxidase-Aktivitäten erfolgreich zu quantifizieren und konnte im Nachfolgenden für die biochemische Charakterisierung dieser Enzyme eingesetzt werden. Zusätzlich wurde dieser neu entwickelte MeDAC-Assay 2020 in *ChemistryOpen* veröffentlicht.<sup>[295]</sup>

### 3.4 Biochemische Charakterisierung der Haloperoxidase aus *C. inaequalis*

Die biochemische Charakterisierung von Enzymen und die daraus resultierenden Informationen über deren Aktivitäten, Affinitäten zu Substraten, Reaktionsgeschwindigkeiten sowie Toleranzen bzw. Stabilitäten gegenüber Lösungsmitteln oder hohen Temperaturen sind wichtige Parameter für biokatalytische Anwendungen. Eine derartige Charakterisierung offenbart nicht nur vielversprechende Eigenschaften der untersuchten Enzyme auf, sondern kann auch mögliche Limitierungen aufzeigen, die als wichtige Informationen für spätere Anwendungen und experimentelle Durchführungen dienen.

Nach der Entwicklung des MeDAC-Assays und der ersten Anwendung auf Haloperoxidasen, sollte *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* biochemisch unter Verwendung dieses Assays charakterisiert und die Ergebnisse mit bereits bekannten Daten verglichen werden, um so die Anwendbarkeit der neu etablierten Methode zu demonstrieren.

#### 3.4.1 Aktivitätsbestimmung von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci*

Für Enzyme und enzymatische Anwendungen ist neben der Menge an Katalysator nach Produktion und Isolation auch dessen Aktivität wichtig. Hierfür wird nach der Reinigung üblicherweise die Aktivität in Form der volumetrischen oder spezifischen Aktivität bestimmt und für die jeweilige Charge angegeben. Die Definition der Aktivität variiert hierbei von Enzymfamilie zu Enzymfamilie oder auch zwischen verschiedenen Assay-Systemen. Üblicherweise gibt die Aktivität einer enzymatischen Probe die Menge Enzym an, die in der Lage ist, eine definierte Stoffmenge des Substrats (angegeben in  $\mu\text{mol}$ ) pro Minute umzusetzen.

Mit den zuvor festgelegten Kriterien für die Durchführung und Auswertung des MeDAC-Assays sollte die isolierte Enzyme-Charge von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* in Form enzymatischer Aktivität quantifiziert werden. Die Aktivitätswerte nach mehreren Isolationsprozessen aus dem *E. coli* ArcticExpress (DE3)-System sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Übersicht der Aktivität für *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* nach erfolgreicher Isolation mittels IMAC**

Aktivitätsmessungen erfolgten in Form von biologischen Triplikaten. Die so erhaltenen gemittelten Aktivitätswerte wurden für drei verschiedene Isolationsversuche final gemittelt

Volumetrische Aktivität $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	Spezifische Aktivität $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	Gesamtaktivität pro g Zellen $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
$15.1 \pm 1.86$	$5.29 \pm 1.46$	$2.41 \pm 0.213$

Für *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* wurde nach IMAC-Isolation eine volumetrische Aktivität von  $15.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  im Mittel erhalten. Dabei lag die spezifische Aktivität der Probe bei durchschnittlich  $5.29 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Somit können mit der etablierten Isolationsmethode  $2.41 \text{ U}$  pro Gramm aufgeschlossener Zellen erhalten werden. Die Aktivität des Enzyms ist trotz geringer Proteinausbeute nach Isolation ( $6.66 \text{ mg}$ , siehe Tabelle 3) ausreichend für weitere Charakterisierungsexperimente.

### 3.4.2 2D-Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Charakterisierung von Katalysatoren, insbesondere Biokatalysatoren, ist die Quantifizierung kinetischer Parameter von Bedeutung. Damit lassen sich Werte für die Affinität des Enzyms zum entsprechenden Substrat oder die maximale Umsatzzahl des Enzyms definieren. Diese Werte geben eine Aussage über die Art und Qualität des Biokatalysators an und können im Zuge biosynthetischer Ansätze zur Anpassung der Reaktionsbedingungen genutzt werden, um Umsatzraten zu maximieren.

Haloperoxidasen benötigen aus mechanistischer Sicht für die Generierung eines Mols halogenierender Spezies je 1 Äquivalent Wasserstoffperoxid und Halogenid. Die eigentliche Halogenierung des Zielmoleküls erfolgt dann in einem nicht-geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, da diese Spezies äußerst reaktiv ist (siehe Kapitel 2.4.2).<sup>[296, 297]</sup> Zur kinetischen Analyse von HPOs ist also die Interaktion des Enzyms mit beiden Substraten relevant. Da im Fall von Enzymen mit mehreren Substraten üblicherweise nur die Konzentration eines Substrats bei konstant gehaltener Konzentration des zweiten Substrats (und *vice versa*) variiert wird, werden in solchen kinetischen Experimenten nach Michaelis und Menten apparente Werte erhalten. Diese Werte sind zwar nicht falsch, spiegeln jedoch nur einen Teil der Interaktion aller drei Komponenten wider und zeigen damit nicht zwangsläufig die absoluten Werte für die Affinität der Substrate ( $K_M$ ) oder die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ), aus der sich die Wechselzahl ( $k_{cat}$ ) berechnen lässt (siehe Gleichung 1). Aus diesem Grund sollte für  $V_{Cl}PO-Ci$ , für die eine Vielzahl kinetischer Analysen in der Literatur beschrieben wurde, die erste literaturbekannte zweidimensionale Michaelis-Menten-Kinetik aufgenommen werden. Hierbei wurde eine Kinetik gemessen, indem die Konzentration beider Substrate, Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid, gleichzeitig variiert wurde. Diese Mischungen wurden mit gereinigter  $V_{Cl}PO-Ci$  mit dem MeDAC-Assay gemessen und in Aktivitätswerte umgerechnet (siehe Kapitel 3.2.3). Zur Analyse der Aktivitätswerte wurde im Programm OriginPro eine Funktion für eine zweidimensionale Michaelis-Menten-Kinetik erstellt, die nachfolgender Gleichung entsprach (siehe Gleichung 5).

$$v_0 = \frac{v_{max}}{\prod_{n=1}^i \left(1 + \frac{K_M(n)}{c(n)} + \frac{c(n)}{K_i(n)}\right)}$$

für  $n = 2$  mit Substrat A und B:

$$v = \frac{v_{max} * [A] * [B]}{K_{M,A} * K_{M,B} + K_{M,B} * [A] + K_{M,A} * [B] + [A] * [B]}$$

#### Gleichung 5: Michaelis-Menten-Gleichung für Enzyme mit mehreren Substraten

Für den Fall, dass das Enzym zwei verschiedene Substrate während der Katalyse umsetzt, wird für  $n$  der Wert 2 gewählt. In diesem Fall wird das eine Substrat zu Molekül „A“, das andere zu Molekül „B“.

Da für HPOs in der Literatur häufiger Inhibitionseffekte beobachtet wurden, die mit einer Substratüberschussinhibition beschrieben werden konnten, wurde die Gleichung von Murray zur Beschreibung der Kinetik von Esterasen verwendet (siehe Gleichung 6).<sup>[201, 298]</sup>

$$v = \frac{v_{max} * [A]}{K_M + \left(1 + \frac{[A]}{K_i}\right) * [A]} = \frac{v_{max}}{1 + \frac{K_M}{[A]} + \frac{[A]}{K_i}}$$

**Gleichung 6: Michaelis-Menten-Gleichung für ein Enzym mit Substratüberschussinhibition, definiert nach Murray<sup>[298]</sup>**

Zusätzlich zu den gängigen Affinitätsgrößen  $K_M$  und der Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  wird hier die Affinität des Substrats als inhibierende Spezies zum Enzym mit dem Parameter  $K_i$  beschrieben.

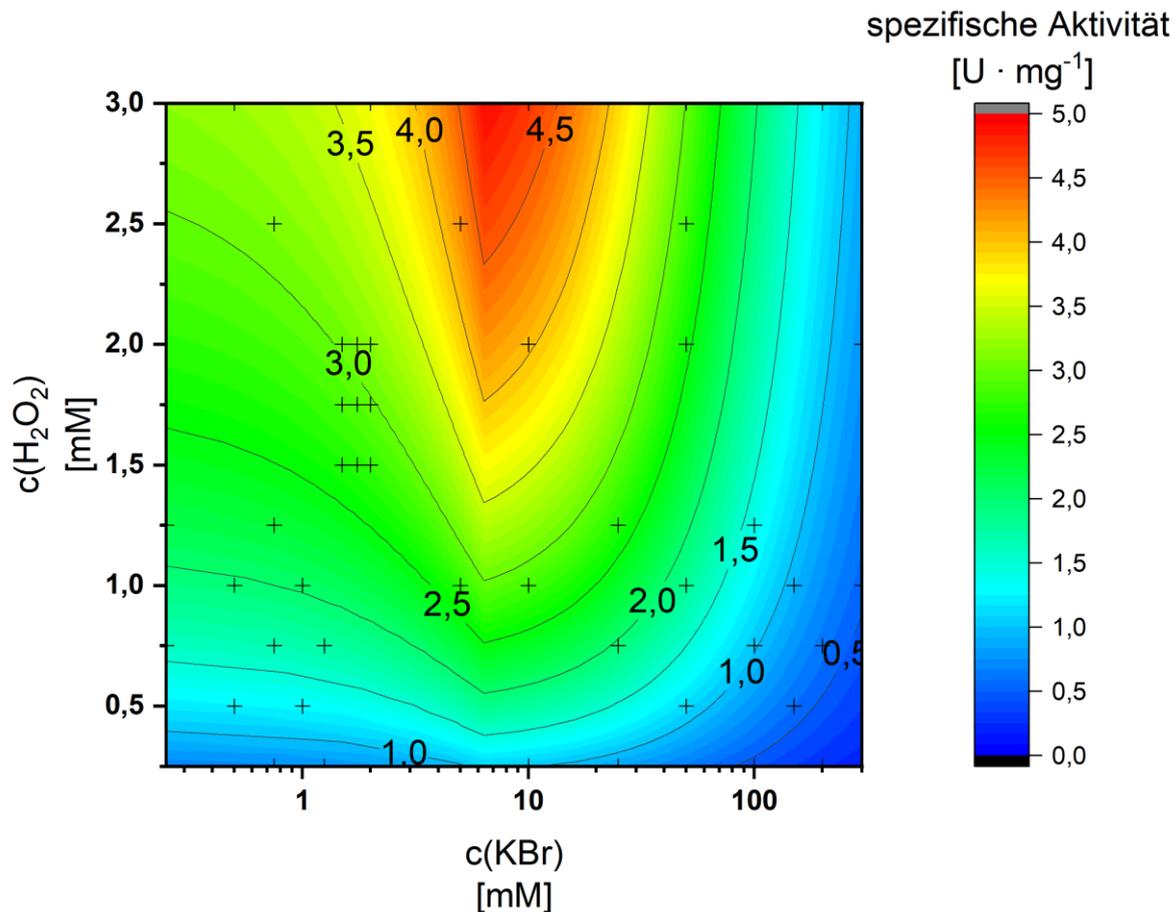
Die Gleichung zur Beschreibung einer Substratüberschussinhibition wurde in die Michaelis-Menten-Gleichung für zwei Substrate inkorporiert und als Fitfunktion in Origin eingetragen (siehe Gleichung 7).

$$v = \frac{v_{max}}{\left(1 + \frac{K_{M,A}}{[A]} + \frac{[A]}{K_{i,A}}\right) + \left(1 + \frac{K_{M,B}}{[B]} + \frac{[B]}{K_{i,B}}\right)}$$

**Gleichung 7: Zweidimensionale Michaelis-Menten-Gleichung mit Substratüberschussinhibitionsterm zur Analyse von Enzymen mit zwei Substraten**

Die Funktion liefert nach erfolgter Analyse für beide Substrate einen eigenständigen Wert für die Affinität als Substrat ( $K_M$ ) und als Inhibitor ( $K_i$ ). Liegt keine Substratüberschussinhibition vor, wird der Wert für  $K_i$  gegen unendlich streben und die Teilfunktion auf eine zweidimensionale Michaelis-Menten-Funktion zurückfallen lassen.

Die erhaltene Fitfunktion wurde zur Beschreibung der Kinetik-Datensätze für  $V_{ClPO-Ci}$  verwendet (siehe Abbildung 50).



**Abbildung 50: Zweidimensionale Michaelis-Menten-Kinetik der  $V_{Cl}PO-Ci$  mit Substratüberschussinhibitionsterm nach Gleichung 7 ( $R^2 = 0,88$ )**

Dargestellt ist die spezifische Aktivität des Enzyms in  $U \cdot mg^{-1}$  in Abhängigkeit der Konzentration von Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid in mM. Die Kreuze in der Abbildung markieren Datenpunkte, die als biologische Triplikate gemessen wurden. Areale mit roter Färbung symbolisieren besonders hohe Aktivitätswerte, während eine Blaufärbung Areale mit geringer Aktivität repräsentiert.

Die erhaltene Fitfunktion zeigt ein globales Maximum der Aktivität (ca.  $5 U \cdot mg^{-1}$ ) bei ca. 10 mM Kaliumbromid und 3 mM Wasserstoffperoxid. Im Hinblick auf den Verlauf der Aktivität entlang der einzelnen Konzentrationsachsen für beide Substrate zeigt sich für Wasserstoffperoxid ein Verlauf nach Michaelis-Menten (blau zu gelb bzw. rot, Abbildung 50), d.h. die Aktivität steigt mit zunehmender Konzentration des Substrats bis zu einem Grenzwert. Für Kaliumbromid steigt die Aktivität entlang der Konzentrationsachse zwar auch bis etwa 10 mM, allerdings fällt sie dann auf Werte herunter, die teilweise geringer sind als bei den anfänglichen Konzentrationen. In diesem Fall liegt eine Inhibition vor, bei der das Substrat Kaliumbromid im Überschuss das Enzym  $V_{Cl}PO-Ci$  inhibiert. Dabei wird die Inhibition besonders bei hohen Konzentrationen Kaliumbromid deutlich (100 mM und größer).  $V_{Cl}PO-Ci$  wird somit von Kaliumbromid in einer Substratüberschussinhibition bei hohen Konzentrationen inhibiert, während Wasserstoffperoxid keine Inhibition mit dem Enzym zeigt. Diese Beobachtungen decken sich mit bereits publizierten kinetischen Untersuchungen des Enzyms. Da bei diesen Experimenten aber je eine Substratkonzentration fix gehalten wurde, konnte kein absoluter Inhibitionswert ermittelt werden. Auch die übrigen Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{max}$  und die Affinitäten der Substrate zum Enzym,  $K_M$ , sind in der Literatur als apparente Werte zu interpretieren, da hier lokale Maxima der Reaktionsgeschwindigkeit als  $v_{max}$  definiert wurden. Die

erhaltenen Werte aus dem Fit in dieser Arbeit ergeben sich dagegen aus einem globalen Geschwindigkeitsmaximum und sind damit präziser. Die hier erhaltenen Werte sind mit publizierten Werten verglichen worden (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Vergleich der kinetischen Parameter aus der zweidimensionalen Michaelis-Menten-Kinetik der  $V_{Ci}PO-Ci$  mit Werten aus früheren Veröffentlichungen**

Die Werte aus dieser Arbeit (mittels MeDAC-Assay analysiert) wurden bei einem pH-Wert von pH 6 durchgeführt und ergeben sich aus der erhaltenen Fitfunktion mit Origin. Für den Vergleich des apparenten  $k_{cat}$ -Wertes mit publizierten Daten wurde eine Konzentration von 10 mM für beide Substrate gemäß den angegebenen Informationen in den jeweiligen Publikationen angenommen.<sup>[201, 299]</sup> Diese Werte wurden in die Michaelis-Menten-Funktion eingesetzt und der resultierende  $v_{max}$ -Wert in die apparente Wechselzahl  $k_{cat}$  umgerechnet. Die Standardfehler wurden gemäß klassischer Fehlerfortpflanzungsregeln berechnet. n.a.: nicht angegeben; Für Wasserstoffperoxid lag die Inhibitionskonstante bei  $2 \cdot 10^{22}$  mM und wurde daher mit „-“ markiert

Kinetischer Parameter	2D-Kinetik mit MeDAC-Assay	MCD-Assay von Referenz <sup>[201]</sup>	MCD-Assay von Referenz <sup>[299]</sup>
$K_M(Br^-)$	$0.19 \pm 0.04$ [mM]	0.12 [mM] 0.007 [mM]	0.026 [mM]
$K_M(H_2O_2)$	$1.48 \pm 0.23$ [mM]	<0.005 [mM]	0.003 [mM]
$K_i(Br^-)$	$56.80 \pm 6.97$ [mM]	n.a.	n.a.
$K_i(H_2O_2)$	-	n.a.	n.a.
Effektiver $k_{cat}$	$9.80 \pm 0.73$ [s <sup>-1</sup> ]	n.a.	n.a.
Apparenter $k_{cat}$	$7.0 \pm 8.9$ (Br <sup>-</sup> ) [s <sup>-1</sup> ] $8.5 \pm 0.8$ (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) [s <sup>-1</sup> ]	37 (Br <sup>-</sup> ) [s <sup>-1</sup> ] 33 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) [s <sup>-1</sup> ]	21.3 (Br <sup>-</sup> ) [s <sup>-1</sup> ] 15.2 (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) [s <sup>-1</sup> ]

Die Michaelis-Menten-Konstante für Bromid  $K_M(Br^-)$  wurde über die zweidimensionale Kinetik mit 190  $\mu$ M bestimmt. Wasserstoffperoxid zeigte dagegen eine Konzentration von 1.48 mM als Affinitätskonstante  $K_M(H_2O_2)$ . Während für Wasserstoffperoxid für die Inhibitionskonstante  $K_i(H_2O_2)$  eine Konzentration im mehrstelligen Bereich festgestellt wurde, lag dieser Wert für Bromid  $K_i(Br^-)$  bei 56,8 mM. Für beide Konstanten gilt ein reziproker Zusammenhang, d.h. je höher der Wert, desto geringer die Affinität als Substrat bzw. Inhibitor. Für Bromid zeigte sich somit eine höhere Affinität zum Enzym als für Wasserstoffperoxid (ca. 10-facher Unterschied). Die hohe Inhibitionskonstante für Wasserstoffperoxid strebt gegen unendlich und deutet damit eine fehlende Inhibitionswirkung für dieses Substrat an. Für Bromid wurde dagegen ein Wert innerhalb des Konzentrationsbereichs bestimmt. Somit liegt für Bromid eine Substratüberschussinhibition vor, die ab ca. 60 mM die maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf 50 % sinken lässt. Im Vergleich mit Literaturdaten fällt eine große Diskrepanz zwischen den Konstanten, auch innerhalb der Veröffentlichungen selbst, auf. Generell liegen sämtliche Werte im mikromolaren Konzentrationsbereich. Die Ausnahme bildet die Michaelis-Menten-Konstante für Wasserstoffperoxid  $K_M(H_2O_2)$ , die um das 1000-fache höher liegt als in der Literatur beschrieben (1.48 vs. 0.005 mM). Dieser Unterschied kann auf andere Reaktionsbedingungen wie verschiedene pH-Werte in den Puffern zurückzuführen sein. Tendenziell ist Wasserstoffperoxid eine instabile Substanz, die in Anwesenheit von Übergangsmetallen zu molekularem Sauerstoff und Wasser disproportionieren kann. Da in den meisten Veröffentlichungen *ortho*-Vanadat in die Lösung gegeben wird, könnte dies die tatsächlich verfügbare Menge Wasserstoffperoxid für die enzymatische Umsetzung vermindern. Auch die mit dem MCD-Assay bestimmten geringen Werte sollten mit dem

Detektionslimit des Assays verglichen werden. Aufgrund fehlender experimenteller Informationen gestaltet sich der direkte Vergleich der Parameter allerdings schwierig.

Für die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  wurde ein effektiver Wert für die gesamte Kinetik von  $9.80 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Da für sämtliche Parameter globale Werte bestimmt wurden, ist der direkte Vergleich auch hier mit Literaturdaten schwierig. Um den Vergleich dennoch zu ermöglichen, wurden die (insofern angegebenen) verwendeten Konzentrationen der Literaturquellen in die 2D-Michaelis-Menten-Funktion mit den erhaltenen Parametern für  $K_M$ ,  $K_i$  und  $v_{\text{max}}$  eingesetzt und die daraus erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten in apparente Wechselzahlen  $k_{\text{cat}}'$  umgerechnet. Hierbei zeigte sich neben Unterschieden in den Literaturwerten dennoch eine gute Übereinstimmung (ca.  $8 \text{ s}^{-1}$  vs. ca.  $35 \text{ s}^{-1}$ ). Die Wechselzahl des Enzyms *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* liegt damit im niederen  $\text{s}^{-1}$ -Bereich.<sup>[201, 299]</sup>

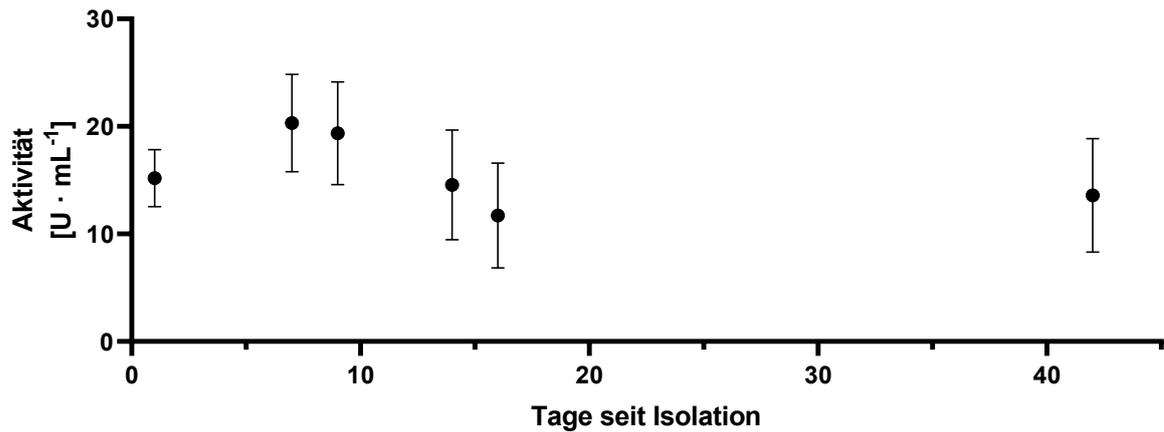
Mit der verwendeten zweidimensionalen Interpretation der kinetischen Daten von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* nach Michaelis-Menten konnte die postulierte Substratüberschussinhibition durch Halogenide bestätigt werden. Erstmals konnte dieser Wert als effektive Inhibitionskonstante für Bromid auf  $57 \text{ mM}$  quantifiziert werden. Für Wasserstoffperoxid wurde keine Inhibition beobachtet. Das Enzym verfügt über eine höhere Affinität zu Bromid als zum Wasserstoffperoxid. Mit einer Wechselzahl von ca.  $10 \text{ s}^{-1}$  handelt es sich bei *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* um ein verhältnismäßig langsames Enzym, das im Bereich humaner Aldolasen wie der Aldolase B einzuordnen ist.<sup>[300]</sup> Um eine Inhibition des Enzyms zu vermeiden ist es notwendig, die Konzentration des Halogenids im niedrigen millimolaren Bereich zu halten.

Die hier etablierte zweidimensionale Auswertung einer Michaelis-Menten-Kinetik lieferte so effektive kinetische Parameter für *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* und erlaubte es in Zusammenarbeit mit dem MeDAC-Assay reproduzierbare Daten für Haloperoxidase-Kinetiken zu erhalten.

### 3.4.3 Stabilität gegenüber Temperatur und Lösungsmitteln

Um Haloperoxidasen für synthetische Applikationen nutzbar zu machen, ist deren Stabilität von entscheidender Bedeutung. Für *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* wurden solche Stabilitätsuntersuchungen bereits durchgeführt.<sup>[206]</sup> Das Enzym zeichnete sich dabei durch eine hohe Stabilität gegenüber Wasserstoffperoxid, organischen Lösungsmitteln und hohen Temperaturen aus. Um die Verträglichkeit des Enzyms mit konkreten Anwendungen zu gewährleisten, wurde die Lager-, Temperatur- und Lösungsmittelstabilität bestimmt.

Zur Testung der Lagerstabilität wurde ein Aliquot des Enzyms im Kühlschrank aufbewahrt und in regelmäßigen Abständen einem Aktivitätstest mit dem MeDAC-Assay unterzogen. Die Daten wurden für den Zeitraum als zusammengefasster Datensatz visualisiert (siehe Abbildung 51).

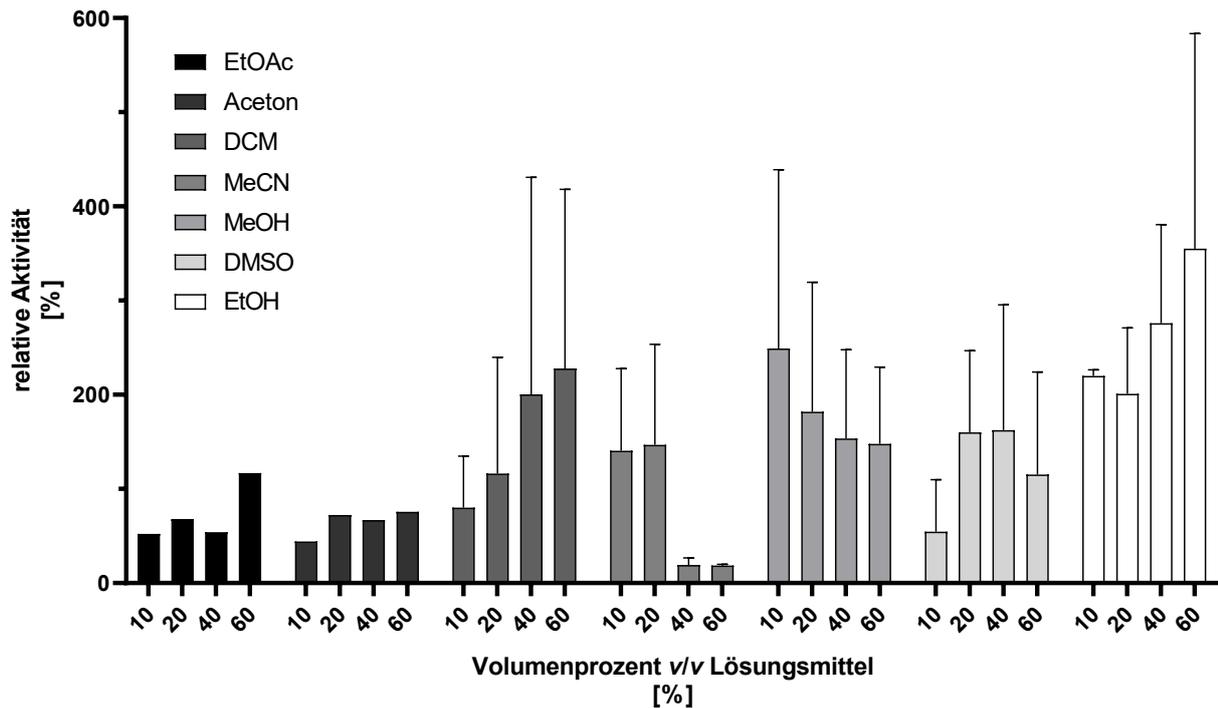


**Abbildung 51: Lagerstabilität von  $V_{Cl}PO-Ci$  bei 4 °C über einen Zeitraum von 42 Tagen**

Für die Analyse wurden sechs biologische Replikate mit dem MeDAC-Assay untersucht, die Enzyme wurden nach der Isolation in Assay-Puffer bei 4 °C gelagert. Nachdem die Aliquots zentrifugiert wurden, wurde eine Probe des Überstands zum Aktivitätsnachweis verwendet. Die Proteinkonzentration betrug  $223 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  in den jeweils verwendeten Proben.

Das Enzym zeigte im Verlauf von über 40 Tagen eine hohe Retention der Aktivität. Nach 42 Tagen lag der Aktivitätsverlust bei ca. 16 % relativ zum ersten Tag nach Isolation des Enzyms.

Im nächsten Schritt wurde die Lösungsmitteltoleranz des Enzyms untersucht. Hierfür wurde das Enzym für 2 h bei 25 °C in verschiedenen Mischungsverhältnissen von Assaypuffer und Lösungsmittel in geschlossenen Mikroreaktionsgefäßen inkubiert und anschließend die Aktivität bestimmt. Als Referenz diente eine Probe ohne Lösungsmittel, die zeitgleich inkubiert wurde. Neben den in Kapitel 3.1.3 bereits ausgewählten Lösungsmitteln (DMSO, MeCN, EtOAc und DCM) wurde die Lösungsmitteltoleranz hier zusätzlich auch für Aceton, Methanol und Ethanol untersucht.



**Abbildung 52: Lösungsmittelstabilität von  $V_{Cl}PO-Ci$  bei verschiedenen Lösungsmitteln und Volumenverhältnissen in Assaypuffer**

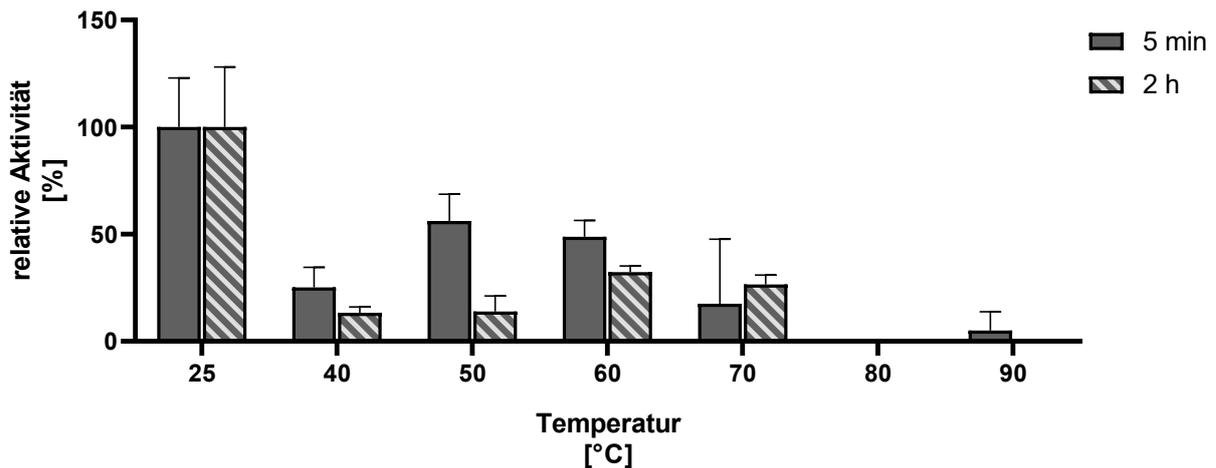
Das Enzym wurde im angegebenen Verhältnis mit den korrespondierenden Lösungsmitteln für 2 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde, sofern möglich, die wässrige Phase zur Aktivitätsbestimmung im MeDAC-Assay verwendet. Alle Werte wurden auf die Aktivität einer Positivkontrolle ohne Lösungsmittel normiert. Für jedes mit Wasser mischbare Lösungsmittel wurde eine Leerprobe als Vergleich mit MeDAC **49** gemessen, um solvatochromatische Effekte auszuschließen. Dargestellt sind biologische Triplikate als Mittelwerte inklusive Standardabweichungen. EtOAc: Ethylacetat; DCM: Dichlormethan; MeCN: Acetonitril; MeOH: Methanol; EtOH: Ethanol

Für EtOAc, Aceton, Dichlormethan und Ethanol wurde eine Steigerung der Aktivität bei zunehmendem Anteil Lösungsmittel beobachtet. Dabei lag die relative Aktivität in nahezu allen Fällen über 100 %. Für Acetonitril (MeCN), Methanol und DMSO sinkt die Aktivität bei höheren Lösungsmitteleanteilen. Dieser Effekt ist besonders stark im Falle von Acetonitril.

Da für keines der Lösungsmittel außer Acetonitril die Aktivität bei hohen Lösungsmitteleanteilen unter 50 % bleibt, konnte anhand dieses Experiments gezeigt werden, dass  $V_{Cl}PO-Ci$  eine hohe Toleranz gegen viele verschiedene Lösungsmittel besitzt. Acetonitril zeigt dagegen eine deutliche Inaktivierung des Enzyms bei Anteilen über 20 Volumenprozent. Der generelle Anstieg der relativen Aktivität lässt sich auf eine verbesserte Solubilisierung des Assaysubstrats oder partielle Entfaltung des Enzyms zurückführen. Im letzteren Fall würde das aktive Zentrum für die Cosubstrate leichter zugänglich gemacht werden, wodurch die Halogenierung insgesamt effizienter erfolgen kann. Die hohen Standardabweichungen bei einigen Lösungsmitteln sind auf Verdampfung der Lösungsmittel zurückzuführen. Bei den geringen Volumina, die verwendet wurden, sind insbesondere flüchtige Lösungsmittel wie Dichlormethan, aber auch Alkohole fehleranfällig und können so zu Schwankungen bei der Aktivitätsmessung führen. Generell scheint das Enzym gegenüber geringen Mengen von Methanol und DMSO sowie Ethanol die größte Stabilität aufzuweisen.

Neben der Untersuchung der Lösungsmitteltoleranz wurde  $V_{Cl}PO-Ci$  ebenfalls hinsichtlich seiner Stabilität gegenüber hohen Inkubationstemperaturen charakterisiert. Die Temperaturstabilität wurde

in der Literatur mit Werten bis zu 90 °C erfolgreich nachgewiesen. Hierbei ist jedoch festzuhalten, dass die Inkubation für fünf Minuten erfolgte. Gängige Umsetzungen für Halogenierung laufen meist mehrere Stunden. Aus diesem Grund wurde die Temperaturstabilität der  $V_{Cl}PO-Ci$  bei verschiedenen Temperaturen für 2 h bestimmt. Dafür wurden analog zur Lösungsmittelstabilität Aliquots des Enzyms bei der angegebenen Temperatur inkubiert, zentrifugiert und die Restaktivität abschließend mit Hilfe des MeDAC-Assay quantifiziert. Anschließend wurde die relative Aktivität bezogen auf eine Positivkontrolle bei 25 °C bei verschiedenen Temperaturen verglichen (siehe Abbildung 53).



**Abbildung 53: Temperaturstabilität von  $V_{Cl}PO-Ci$ .** Dargestellt ist die relative Aktivität der  $V_{Cl}PO-Ci$  für verschiedene Temperaturen, bezogen auf drei Proben, die für 5 min bzw. 2 h bei 25 °C inkubiert wurden

Die Aktivität wurde mit Hilfe des MeDAC-Assays bestimmt. Alle Proben wurden als biologische Triplikate behandelt. Gefüllte Säulen: Aktivität nach Inkubation für 5 min; Schraffierte Säulen: Aktivität nach Inkubation für 2 h.

Für beide Zeiträume konnte bei Temperaturen über 70 °C keine eindeutige Aktivität bestimmt werden. Einzige Ausnahme stellte hier die Probe bei 90 °C nach 5 min dar, die allerdings unter 10 % relativer Aktivität lag. Tendenziell zeigte sich ein stärkerer Abfall der relativen Aktivität nach 2 h Inkubation als nach 5 min. Die größte Aktivitätsverringerng konnte außerhalb der hohen Temperaturbereiche bei 40 °C beobachtet werden, bei dem die Aktivität um 70 % nach 5 min bzw. um ca. 80 % nach 2 h gesunken ist. Die Proben bei 50 und 60 °C zeigten keinen so starken Abfall.

Die eingangs aus der Literatur beobachtete Thermostabilität von  $V_{Cl}PO-Ci$  konnte mit diesem Experiment bestätigt werden, allerdings ist der Grad der Stabilität stark abhängig von der Inkubationsdauer. Bei kurzen Inkubationsphasen, die für biokatalytische Umsetzung eher unwahrscheinlich sind, zeigt sich eine bessere Verträglichkeit, die in bisherigen publizierten Analysen nicht näher untersucht wurde.<sup>[195]</sup> Die postulierte Stabilität bei 90 °C konnte allerdings für keine der Inkubationsdauern bestätigt werden.  $V_{Cl}PO-Ci$  ist somit ein Enzym mit moderater, jedoch nicht außerordentlicher Temperaturstabilität.

### 3.4.4 Halogenidselektivität von $V_{Cl}PO-Ci$

Abhängig vom Oxidationspotenzial des Enzyms und des notwendigen Oxidationspotential des Halogenids kann eine HPO verschiedene Halogenide oxidieren. Abhängig vom Halogenid mit dem höchsten Oxidationspotenzial wird das Enzym entsprechend als Chlor-, Brom- oder Iodperoxidase bezeichnet. Die HPO aus *C. inaequalis* wurde bereits als Chlorperoxidase charakterisiert und kann somit Chlorid, aber auch Bromid und Iodid aufgrund der geringeren Oxidationspotenziale umsetzen, allerdings unterscheidet sich die Reaktivität zwischen den Halogeniden.<sup>[299]</sup> Um die Selektivität des Enzyms zu vergleichen, wurde die Aktivität des Enzyms in Anwesenheit gleicher Mengen Bromid und Chlorid mit dem MeDAC-Assay bestimmt. Die Chlorierung kann dabei mit den nicht-optimierten Wellenlängen des ursprünglichen MeDAC-Assays ebenfalls nachvollzogen werden (siehe Kapitel 5.7.22).<sup>[301]</sup>

**Tabelle 7: Halogenidselektivität von  $V_{Cl}PO-Ci$**

Die Aktivität für alle Halogenide wurde mit demselben Enzymaliquot mit dem MeDAC-Assay in Triplikaten bestimmt. Mit der Bromierungsaktivität als Referenzwert wurde die Aktivität in Form des Selektivitätsfaktors berechnet. Das Reduktionspotenzial bezieht sich auf die Reduktion des elementaren Halogens zum Halogenid bezogen auf die Wasserstoffhalbzelle.

Halogenid	Bromid	Chlorid
Reduktionspotenzial [V] <sup>[46]</sup>	1.07	1.36
Vol. Aktivität [U mL <sup>-1</sup> ]	16.6 ± 4.24	1.14 ± 0.208
Selektivitätsfaktor	1	0.069

Im Vergleich der Selektivität zeigt sich eine höhere Aktivität für Bromid als Chlorid, wobei die Aktivität auf unter 10 % der Bromidaktivität fällt. Die geringere Umsatzrate für Chlorid ist auf das höhere Oxidationspotenzial des Chlorid-Anions zurückzuführen (Unterschied von 0.29 V). Im Vergleich zu Literaturwerten scheint der Selektivitätsfaktor geringer zu sein (0.343).<sup>[299]</sup> Diese Abweichungen könnten allerdings durch den höheren pH-Wert von 6.3 verursacht werden, der von Tanaka *et al.* für die Aktivitätsbestimmung verwendet wurde.

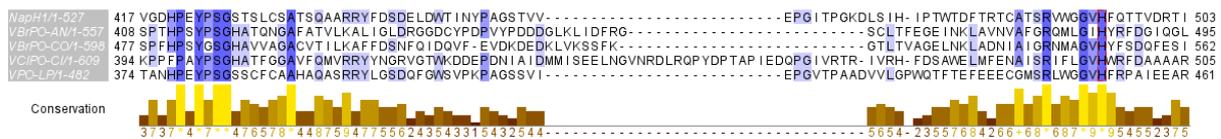
Insgesamt konnte die Robustheit von  $V_{Cl}PO-Ci$  wie in der Literatur angegeben bestätigt werden. Das Enzym setzt Bromid schneller um als Chlorid und verfügt über ausgeprägte Temperatur- und Lösungsmittelstabilität. Allerdings treffen diese Befunde nicht für längere Inkubationszeiträume bei hohen Temperaturen und Lösungsmittel wie DMSO und Acetonitril zu. Mit den etablierten Methoden zur biochemischen Charakterisierung von Haloperoxidasen, die anhand des literaturbekannten Enzyms  $V_{Cl}PO-Ci$  beschrieben wurden, sollten im Folgenden bisher unbekannte HPO-Kandidaten identifiziert und charakterisiert werden.

### 3.5 Identifizierung und Charakterisierung neuer Haloperoxidasen

#### 3.5.1 Bioinformatische Suche nach neuen Haloperoxidase-Genen

Die überwiegende Anzahl Haloperoxidasen stammt aus marinen Pilzen und Algen und zeichnet sich durch geringe Löslichkeit in Standardexpressionswirten wie *E. coli* und geringer Regioselektivität aus. Eine der wenigen Ausnahmen ist die Haloperoxidase NapH1 aus *Streptomyces* sp. CNQ-525 (siehe Kapitel 2.4.2). Durch die Identifikation von Haloperoxidasegenen in Bakterien, die sich durch eine hohe Regioselektivität auszeichnen sollten, sollten Homologe dieses Gens durch eine genetische Analyse der Sequenzen identifiziert werden.<sup>[209-211]</sup> Dabei könnten neben neuer bisher unbeschriebener Aktivität für verschiedene Substrate auch die Produktionsprobleme durch ähnliche Produktionswirte mutmaßlich leichter umgangen werden.

Für die Identifikation neuer Gene wurde die Gensequenz von NapH1 (Uniprot-ID A7KH27) als Referenz einer BLAST (*basic local alignment search tool*)-Suche unterzogen.<sup>[302]</sup> Hierbei wurde die Suche auf Organismen bakteriellen Ursprungs limitiert und ein besonderes Augenmerk auf die konservierten Aminosäuren der bisher bekannten Haloperoxidasen gelegt. Das beste Ergebnis wurde für eine Gensequenz aus dem terrestrischen Bakterium *Luteitalea pratensis* erhalten, einem Bakterium aus der Abteilung der Acidobakterien. Erste Expressionsstudien zu diesem Gen wurden im Kapitel 3.2.1 beschrieben. Im Zuge dieser Analyse wurde die Gensequenz von *v<sub>CPo</sub>-Ci* und *v<sub>BpO</sub>-Co* als Vergleich herangezogen (siehe Abbildung 54).



**Abbildung 54: Ausschnitt aus dem Sequenzalignment der putativen Vanadium-Haloperoxidase aus *L. pratensis* mit literaturbekannten V-HPOs**

Das Alignment wurde mit dem Clustal Omega-Algorithmus durchgeführt und mit dem Programm *Jalview* visualisiert.<sup>[303, 304]</sup> Dunkelblau: Aminosäuren (AS) des aktiven Zentrums, rot: katalytisches Histidin, das eine koordinative Bindung zum Vanadat-Cofaktor ausbildet. Bereiche mit hoher Sequenzidentität sind blau hinterlegt.

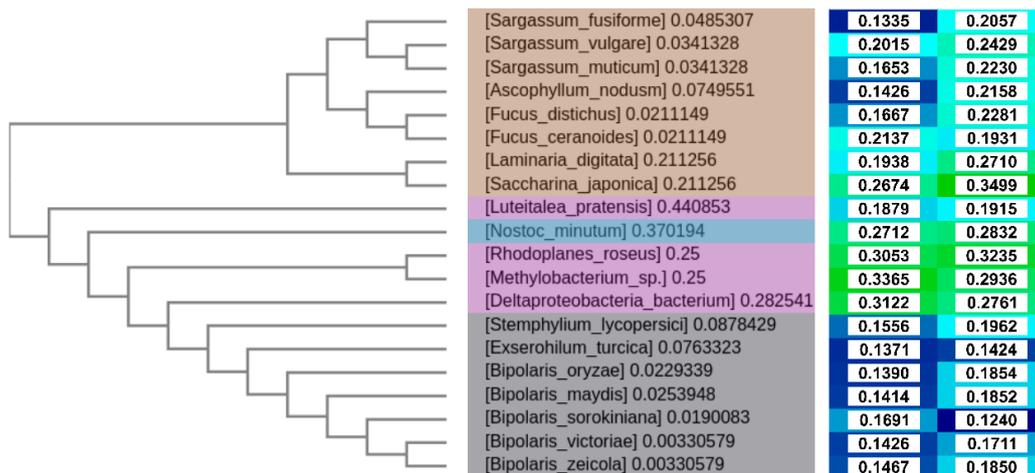
Das Alignment zeigte für die ausgewählten Aminosäuren (AS) des aktiven Zentrums eine sehr hohe Übereinstimmung für die Sequenz aus *L. pratensis* mit literaturbekannten Vertretern. Im Falle des Histidins, das nicht für die Koordination des Cofaktors zuständig ist, liegt für VPO-*Lp* und NapH1 ein Serin vor. Da NapH1 trotz hoher Sequenzidentität mit HPOs nicht-bakteriellen Ursprungs deutlich andere Selektivitäten aufweist, könnte diese Aminosäure eine essenzielle Rolle in der Diskriminierung der Halogenierungsposition spielen. Aufgrund der hohen Übereinstimmung der katalytisch relevanten Aminosäuren wurde VPO-*Lp* als Startsequenz für die Generierung eines Homologie-Modells verwendet.

Neben dieser Sequenz wurden über einen ähnlichen Ansatz in Kooperation mit der AG Usadel (Institut für Biological Data Science, HHU Düsseldorf) weitere Sequenzen teilweise unbekannter Organismen in einem *genome mining*-Ansatz rekonstruiert und bioinformatisch untersucht.<sup>[301]</sup> Dabei wurden Sequenzen *a priori* gesammelt und einer Qualitätsprüfung unterzogen, um ferner verwandte Haloperoxidase-Sequenzen literaturbekannter Enzyme zu identifizieren. Aus dieser Sequenzbibliothek sollten anschließend *in silico* Modelle über Strukturvorhersage und einen *structure feature check* generiert

## Ergebnisse und Diskussion

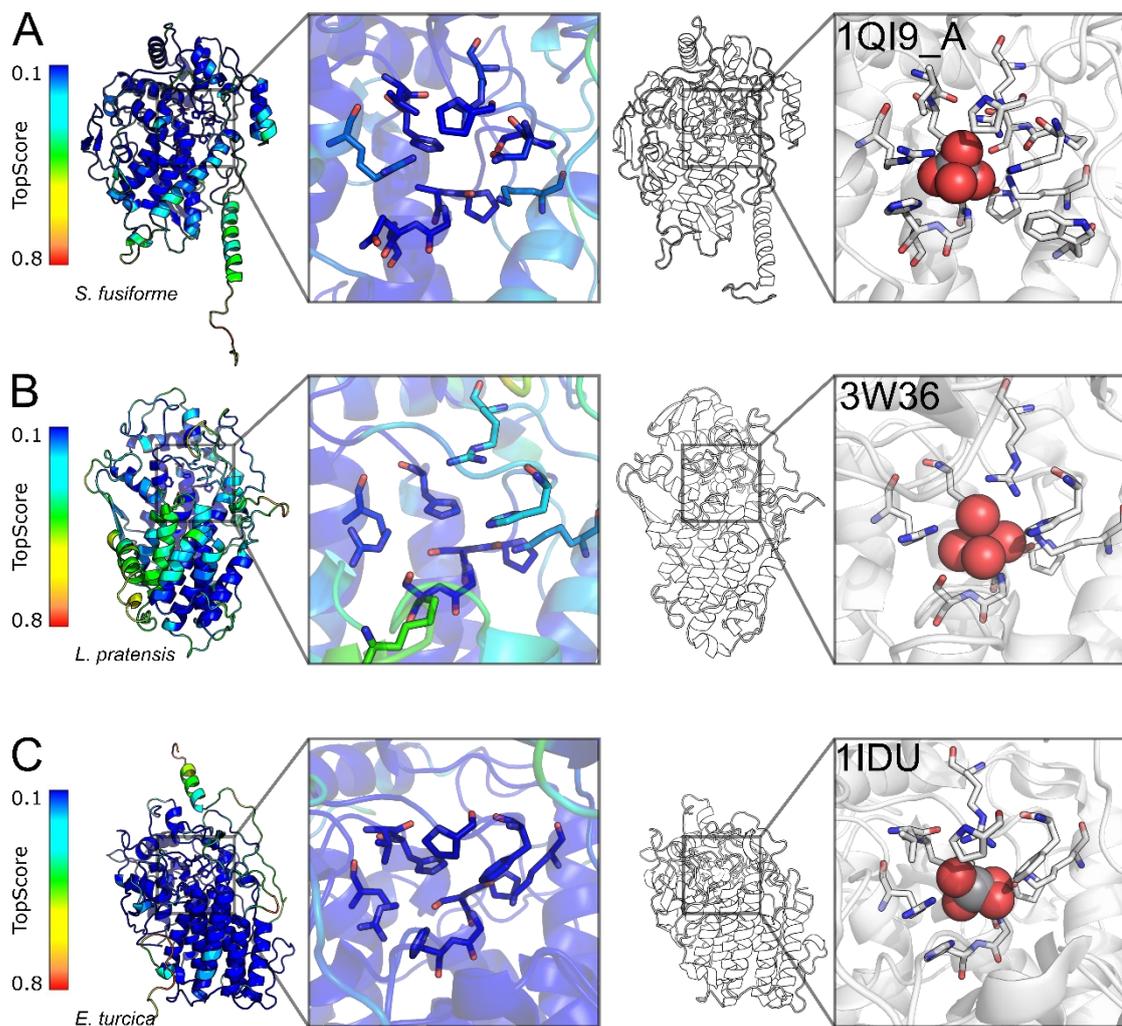
werden, um die Anwesenheit katalytisch relevanter Aminosäuren sicherzustellen und dabei gleichzeitig nach nennenswerten strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum im Vergleich zu literaturbekannten HPOs zu suchen.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurden Homologie-Modelle in Kooperation mit der AG Gohlke (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, HHU Düsseldorf) anhand der Gensequenzen mit der TopModel-Software erstellt.<sup>[305]</sup> Neben der Sequenzidentität wurde der TopScore als Bewertungskriterium für die Qualität der Homologie-Modelle verwendet (siehe Abbildung 55 und Abbildung 56).



**Abbildung 55: Vergleich der Sequenzen und Modellqualität neu identifizierter HPOs, entnommen aus Porta & Fejzagić *et al.*<sup>[301]</sup>**

**Links:** Cladogramm ausgewählter Haloperoxidasegene. Die Sequenzen sind entsprechend der Taxonomie (**Mitte**) farblich kodiert: Algen in Braun, Bakterien in Magenta, Cyanobakterien in Cyan und Pilze in Grau. Der Baum wurde auf der Grundlage der Abstandsmatrix berechnet, die aus den paarweisen Bewertungen (Zahlen in der mittleren Spalte) erstellt wird. Die Qualität der Strukturmodelle wird durch TopScore- (zweite rechte Spalte) und TopScoreSingle-Werte (rechte Spalte) ausgedrückt, wobei geringere Werte und blaue Farbe eine bessere Qualität anzeigen.<sup>[305]</sup>



**Abbildung 56: Beispiele für Strukturmodelle von Haloperoxidasen mit hoher Qualität, entnommen aus Porta & Fejzagić *et al.*<sup>[301]</sup>**

Für jede taxonomische Gruppe wurde ein Beispiel dargestellt: *Sargassum fusiforme* für Algen (A), *Luteitalea pratensis* für Bakterien (B) und *Exserohilum turcica* für Pilze (C). Die lokale Qualität der Modelle wird mit TopScore, bewertet, wobei eine dunklere blaue Farbe eine bessere Qualität anzeigt (links).<sup>[305]</sup> Die beste Vorlage, die für jedes Beispiel ausgewählt wurde, wird zum Vergleich auch als weiß gefärbte Struktur angezeigt (rechts). Der Vanadium-Cofaktor ist als Kugel dargestellt, und die  $\leq 5$  Å davon entfernten Reste sind als Stäbchen angegeben.

Für Sequenzen aus Algen zeigte sich tendenziell eine geringe Sequenzidentität von 55 bis 65 % zu Zielsequenzen. Ausnahmen bildeten hier die Sequenzen aus *Fucus ceranoides* und *Ascophyllum nodosum* mit 85 und 100 %. Der ideale Wert für *A. nodosum* ist auf eine vorhandene Zielstruktur mit identischer Sequenz zurückzuführen. Da die Modellierungsvorlagen für Algen aus multimeren Komplexen bestehen, könnte dies die geringen Identitäten für Sequenzen aus Algen erklären. Die Modellierungen zeigten dabei auch potenzielle Dimerisierungsbereiche an den N-Termini, die ebenfalls darauf hindeuten können.

Modelle für Sequenzen aus Pilzen zeigten eine generell hohe Übereinstimmung von ca. 85 %. Auffällig in den Strukturen ist ein konserviertes Bündel Helices in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum sowie eine  $\beta$ -Haarnadel Faltung, die als möglicher Deckel dienen könnte. Auffällig für diese

Deckelstruktur ist der hohe TopScore-Wert von  $>0.5$ , der auf eine gute Modellierungsqualität für diese Bereiche hindeutet.<sup>[305]</sup>

Eine ähnliche Struktur konnte für Sequenzen bakteriellen Ursprungs erhalten werden, die einen ähnlichen Aufbau im aktiven Zentrum zeigten. Im Vergleich zu den Varianten aus Algen war hier eine weniger zugängliche katalytische Tasche sichtbar. Da am Beispiel von NapH1 bakterielle HPOs mit hohen Selektivitäten identifiziert werden konnten, könnte dieser Unterschied im Aufbau des aktiven Zentrums ein Selektivitätsfaktor sein.<sup>[209]</sup> Insbesondere die Anwesenheit eines potenziellen Deckels könnte ein Erklärungsansatz für höhere Substratselektivitäten sein.

Im Vergleich der katalytischen Zentren konnten mehrere Untergruppen identifiziert werden, die sich Organismen-übergreifend anhand ihrer Ähnlichkeit zusammenfassen lassen. Aus diesen Gruppen wurde jeweils ein Vertreter für biochemische Untersuchungen gewählt. Zusätzlich wurde die HPO aus *L. pratensis* untersucht, da hierbei die größten Unterschiede im Homologie-Modell zu allen anderen Modellen beobachtet werden konnten. Die finale Auswahl der putativen HPO-Sequenzen wurde in Tabelle 8 zusammengefasst (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8: Übersicht der putativen HPO-Sequenzen und ihrer Ähnlichkeiten auf Sequenz- und Strukturebene**

Um potenziell neue Selektivitäten in HPOs zu identifizieren, wurden bevorzugt Sequenzen aus Algen und Bakterien untersucht. Je geringer der Wert für die normierte Distanz im Cluster ist, desto näher verwandt sind die Sequenzen untereinander. Der TopScore-Wert gibt die Qualität des Homologie-Modells für die entsprechende Sequenz wieder, wobei geringe Werte eine hohe Qualität des Homologie-Modells widerspiegeln.

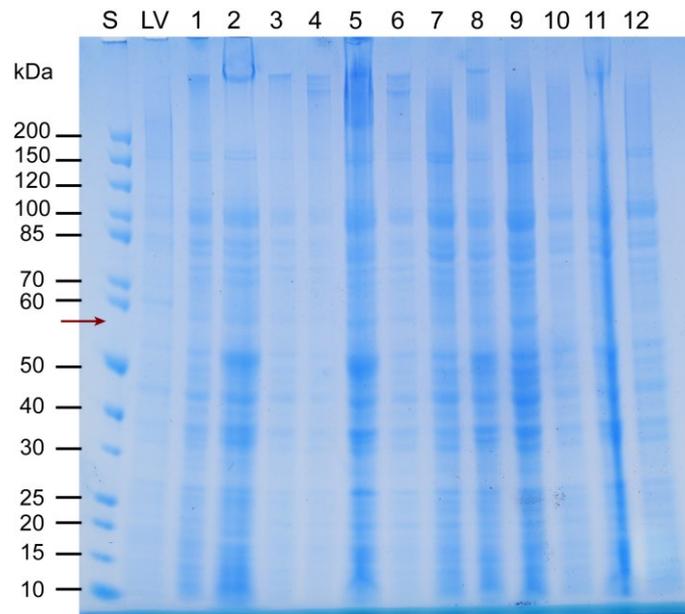
Organismus	Taxa	Normierte Distanz im Cluster	TopScore
<i>L. pratensis</i>	Bakterium	0.69	0.188
<i>A. nodosum</i>	Alge	0.36	0.143
<i>R. roseus</i>	Bakterium	0.57	0.305
<i>F. ceranoides</i>	Alge	0.36	0.214
<i>S. fusiforme</i>	Alge	0.39	0.134

Die Sequenzen wurden mit den zuvor etablierten Produktions- und Isolationsmethoden für V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* gewonnen und anschließend mit Hilfe des MeDAC-Assays auf eine Haloperoxidase-Aktivität untersucht und wenn möglich biochemisch charakterisiert.

### 3.5.2 Putative V-HPO aus *L. pratensis*

Die ausgewählten HPO-Sequenzen wurden in dem gleichen Expressionsvektor wie das Gen für das Enzym aus *C. inaequalis* synthetisiert. Zunächst wurde das Enzym aus *L. pratensis* näher untersucht. Vorarbeiten wurden hierbei von Daira Mirel Oropeza Benitez durchgeführt und im Rahmen ihrer Bachelorarbeit zusammengefasst.<sup>[306]</sup> Abbildungen und sonstige Daten aus dieser Arbeit werden nachfolgend gesondert erwähnt.

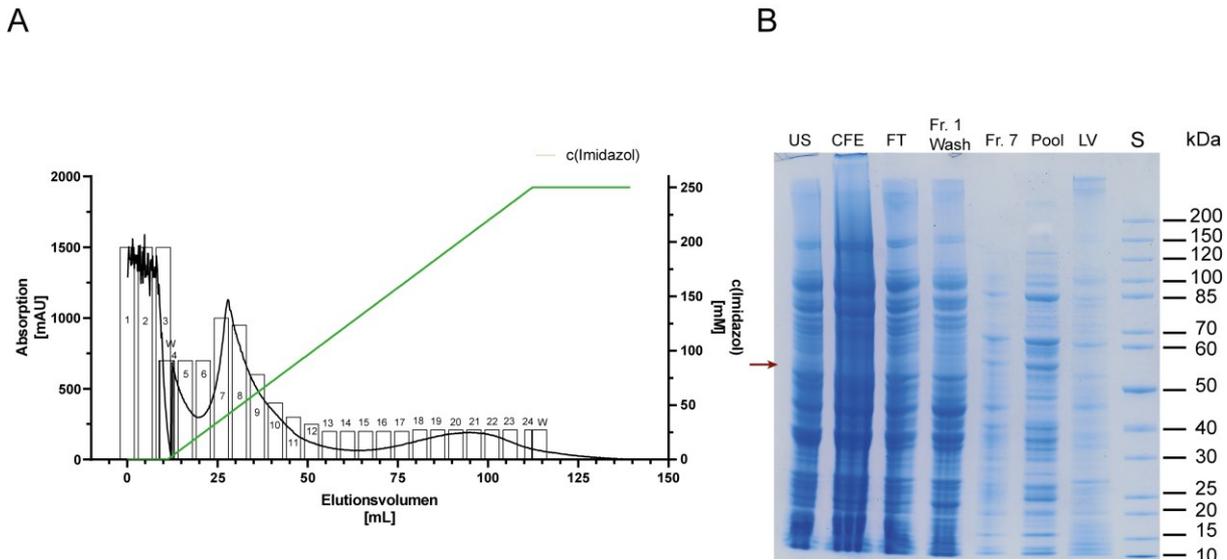
In ersten Experimenten zur Identifikation geeigneter Expressionsbedingungen konnte festgestellt werden, dass mit dem etablierten Produktionsprotokoll in *E. coli* Arctic Express (DE3) in TB-basierendem AI-Medium eine geringe Menge löslichen Proteins gebildet wird. Aus diesem Grund wurde ein detaillierteres Screening angesetzt, um die Proteinausbeute bei der Kultivierung zu erhöhen (siehe Abbildung 57).



**Abbildung 57: Expressionsscreening für das putative HPO-Gen aus *L. pratensis* in *E. coli* ArcticExpress (DE3) in TB-AI-Medium**

Daten erhoben von D. Oropeza.<sup>[506]</sup> Alle Proben wurden auf eine apparente  $OD_{600}$  von 1 normiert und zu gleichen Mengen aufgetragen. Ethanol wurde vor Beginn der Induktion mit 2 % (*v/v*) als Induktor für Chaperon-Produktion in der Hälfte der Proben dazugesetzt. Die Höhe der erwarteten Zielbande ist als roter Pfeil markiert. S: Standard; LV: Leervektorprobe; 1: zellfreier Überstand, 48 h, 18 °C; 2: Lysat, EtOH-Zugabe, 48 h, 18 °C; 3: zellfreier Überstand, EtOH-Zugabe, 48 h, 18 °C; 4: zellfreier Überstand, 72 h, 18 °C; 5: Lysat, EtOH-Zugabe, 72 h, 18 °C; 6: zellfreier Überstand, EtOH-Zugabe, 72 h, 18 °C; 7: zellfreier Überstand, 48 h, 13 °C; 8: Lysat, EtOH-Zugabe, 48 h, 13 °C; 9: zellfreier Überstand, EtOH-Zugabe, 48 h, 13 °C; 10: zellfreier Überstand, 72 h, 13 °C; 11: Lysat, EtOH-Zugabe, 72 h, 13 °C; 12: zellfreier Überstand, EtOH-Zugabe, 72 h, 13 °C.

Im Vergleich der Banden zeigt sich eine generell geringe Bandenintensität für das Zielprotein (ca. 55 kDa, roter Pfeil). Die höchste Intensität in der löslichen Fraktion war dabei bei einer Kultivierungstemperatur von 13 °C für 48 h sichtbar (siehe Abbildung 57, Bande 9). Bei identischer Temperatur wurde nach 72 h keine Bande entdeckt (siehe Abbildung 57, Bande 12). Möglicherweise ist das Zielprotein über längere Zeiträume nicht stabil, weshalb der Expressionszeitraum genauer reguliert werden müsste. Die besten Bedingungen (13 °C, 48 h, mit Ethanolzugabe) wurden für die Anzucht in größerem Maßstab verwendet und das Zielprotein mittels IMAC isoliert (siehe Abbildung 58).

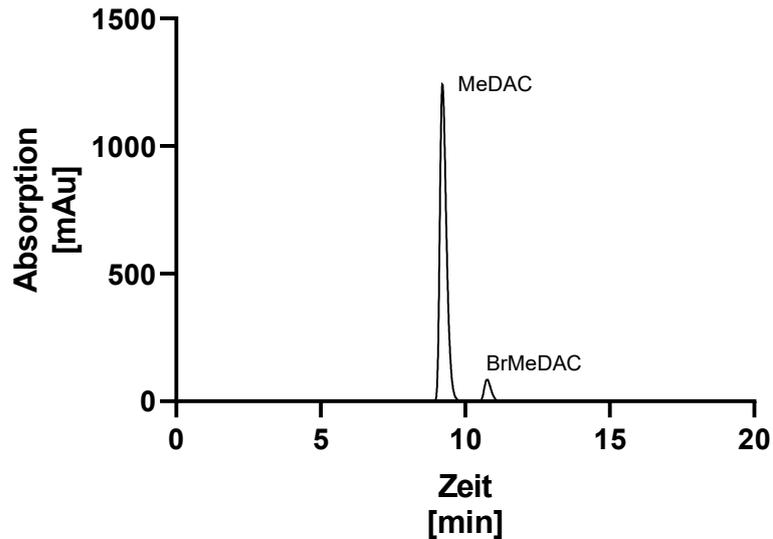


**Abbildung 58: UV/VIS-Chromatogramm und SDS-PAGE der Isolation von VPO-*Lp* mit einem linearen Elutionsgradienten**

Daten erhoben von D. Oropeza.<sup>[306]</sup> Im Chromatogramm der Proteinisolation via ÄKTA (A) ist die Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen der jeweiligen Fraktionen (als Säulen nummeriert) aufgetragen. Die Konzentration von Imidazol bei den entsprechenden Elutionsvolumen ist als grüne Kurve dargestellt. Die dazugehörige SDS-PAGE (B) zeigt normierte Proben nach jedem Reinigungsschritt. Die Höhe der zu erwartenden Proteinbande (hier ca. 55 kDa) ist als Pfeil hervorgehoben. S: Standard; US: Lysat nach Ultraschallaufschluss; CFE: zellfreier Überstand; FT: Durchfluss nach Säulenauftragung; Pool: Fr. 6-12 Als Vergleich diente die Leervektor-Probe (LV). Für die Fraktionen 18-22 konnte weder eine Proteinkonzentration noch Haloperoxidase-Aktivität nachgewiesen werden. In den vereinten Fraktionen waren ebenfalls keine Bande im SDS-Gel sichtbar.

Die SDS-PAGE offenbarte einen hohen Grad an Verunreinigungen in der Elutionsprobe, sowie einen insgesamt geringen Anteil des Zielproteins am Gesamtproteingehalt der Zellen. Neben dem deutlichen Peak bei Fraktion 10 konnte eine minimale Schulter um Fraktion 20 beobachtet werden. Trotz Auftragung einer konzentrierten Probe konnte keine Zielbande detektiert werden. Der Nachweis von Haloperoxidase-Aktivität sowie eine Proteinkonzentrationsbestimmung für Fraktionen 18-22 blieben ebenfalls erfolglos.

Auch nach Optimierung der IMAC mit Stufengradienten (siehe Kapitel 5.4.2) konnte im Eluat nur wenig Zielprotein mit Verunreinigungen erhalten werden. Aktivitätstest mit dem MeDAC-Assay und den Elutionsproben zeigten zwar eine Abnahme des Startmaterials aber keine lineare Zunahme des bromierten Produkts (siehe Kapitel 5.7.16). Aus diesem Grund wurde eine HPLC-Probe des Eluats während einer Aktivitätsmessung vorbereitet und auf BrMeDAC-Signale untersucht (siehe Abbildung 59).



**Abbildung 59: HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von MeDAC zu BrMeDAC durch eine Probe isolierter VPO-*Lp* nach 120 s Reaktionszeit**

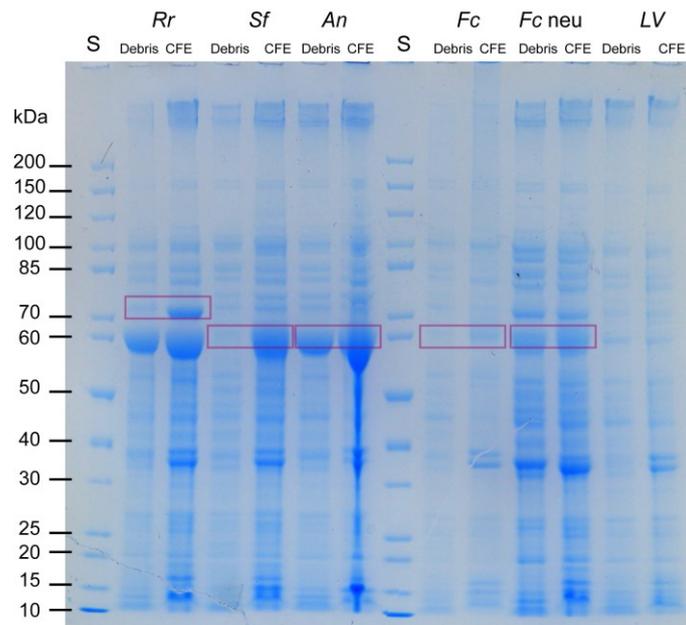
Die Reaktion erfolgte gemäß Standardbedingungen für den MeDAC-Assay (siehe Kapitel 5.4.6), im 15 mL-Maßstab. Nach 120 s wurde die Probe vollständig mit EtOAc extrahiert, eingedampft und in 150  $\mu$ L einer 1:1 *n*-Heptan-Isopropanol-Mischung gelöst (siehe Kapitel 5.6.5). Die beiden sichtbaren Signale sind MeDAC bzw. BrMeDAC zuzuordnen ( $R_t(\text{MeDAC})=9.3$  min;  $R_t(\text{BrMeDAC})=10.7$  min, siehe Abbildung 49).

Bei der HPLC-Analyse konnte das Signal für das monobromierte Coumarin bei etwa 10.7 min detektiert werden. Bei dem vorliegenden Protein scheint es sich also tatsächlich um eine Haloperoxidase bakteriellen Ursprungs zu handeln. Die Probleme in der Aktivitätsbestimmung könnten ihren Ursprung in der Anwesenheit anderer *E. coli*-eigener Proteine haben, die das Coumarin womöglich oxidieren und damit die Fluoreszenzmessung beeinträchtigen.

Weitere Optimierungsversuche der Reinigung zur biochemischen Charakterisierung erwiesen sich als fruchtlos. Aus diesem Grund wurde der Fokus der Suche nach neuen Haloperoxidasen auf die anderen vier ausgewählten Vertreter gerichtet.

### 3.5.3 Putative V-HPO aus *R. roseus*

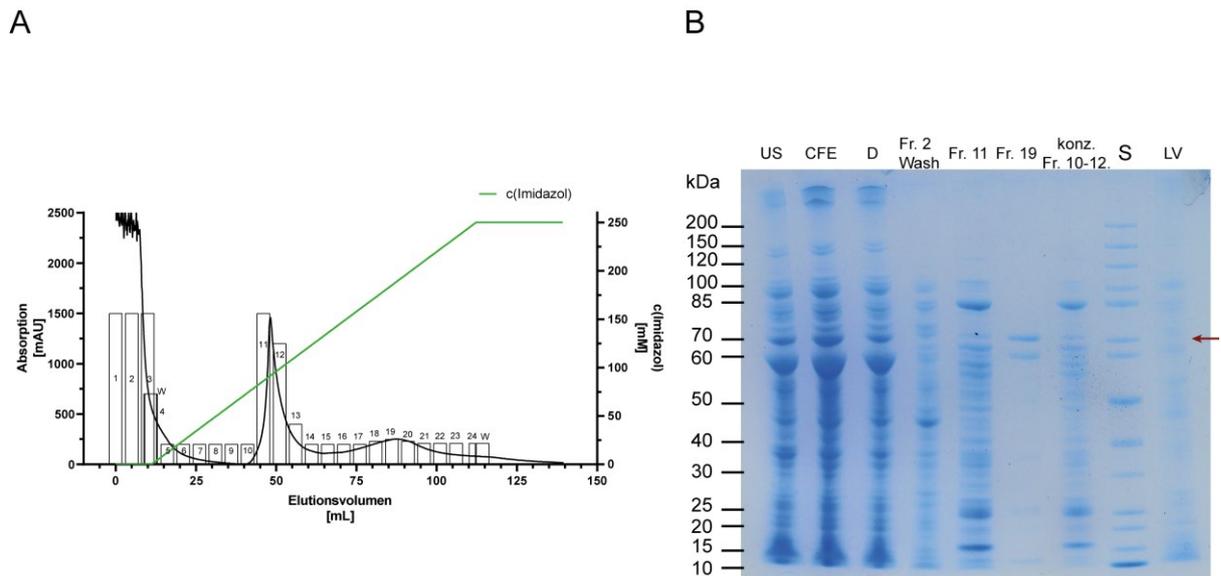
Zur Untersuchung der vier weiteren putativen V-HPO-Gene wurde ebenfalls ein initiales Expressionsscreening mit den finalen Bedingungen für die Produktion der literaturbekannten V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* aus *C. inaequalis* durchgeführt. Über den Vergleich der löslichen mit der unlöslichen Fraktion sollte ein besonderes Augenmerk auf der Produktion löslicher Proteine liegen. Die Ergebnisse für die vier Konstrukte aus *R. roseus*, *F. ceranoides*, *A. nodosum* und *S. fusiforme* sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Abbildung 60).



**Abbildung 60: Vergleich der löslichen und unlöslichen Fraktionen nach Zellaufschluss der vier putativen Haloperoxidase-Gene mittels SDS-PAGE**

Alle Proben wurden auf eine apparente OD<sub>600</sub> von 1 normiert. Aufgrund eines Fehlers in der Probenauftragung wurde für die *F. ceranoides*-Probe eine neue Probe zusätzlich aufgetragen. S: Standard, *Rr*: putative V-HPO aus *R. roseus*; *Sf*: putative V-HPO aus *S. fusiforme*; *An*: putative V-HPO aus *A. nodosum*; *Fc*: putative V-HPO aus *F. ceranoides*; LV: Leervektorkontrolle. Das theoretische Molekulargewicht des jeweiligen Proteins ist durch einen Rahmen symbolisiert.

Im Vergleich der vier Gene konnte eine signifikante Proteinbande für VPO-*Rr* in der löslichen Fraktion beobachtet werden (ca. 70 kDa). Für die anderen Konstrukte liegt die Molekularmasse des Zielproteins bei ca. 60 kDa und überlagert damit mit den coproduzierten Chaperonen des *E. coli* ArcticExpress (DE3) Stamms. Im Vergleich mit dem Leervektor zeigt sich allerdings nur eine sehr schwache Bande bei 60 kDa. Ob die Menge produzierter Chaperone von der Anwesenheit eines induzierbaren Zielgens abhängt oder in den vorliegenden Konstrukten ein hoher Zielproteinanteil enthalten ist, lässt sich nicht genauer differenzieren. Aus diesem Grund wurde ein Aktivitätstest mit den zellfreien Lysaten der Proben durchgeführt. Dabei zeigte lediglich VPO-*Rr* Aktivität (siehe Kapitel 5.7.17), für welches die Isolation und Reinigung dieses Proteins optimiert wurde (siehe Abbildung 61).

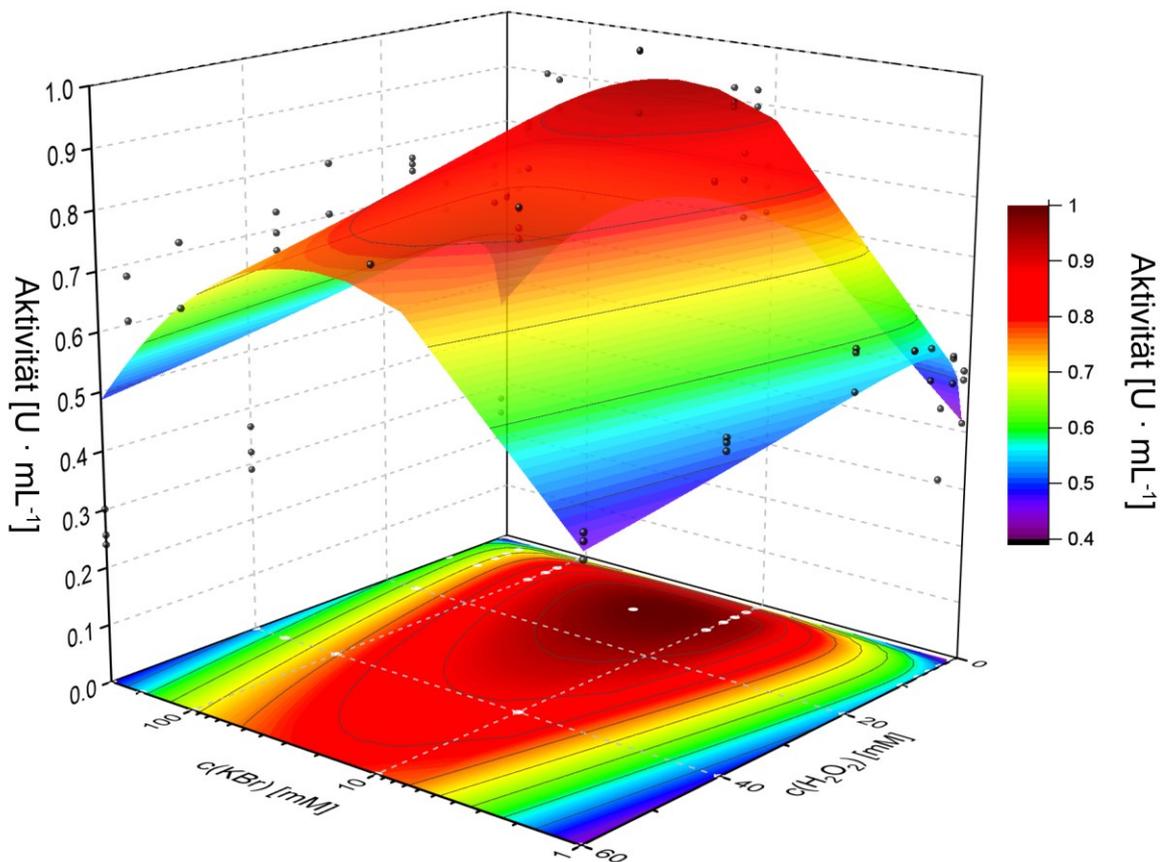


**Abbildung 61: UV/VIS-Chromatogramm und SDS-PAGE der Isolation von VPO-*Rr* mit einem linearen Elutionsgradienten**

Im Chromatogramm der Proteinisolation via ÄKTA (links) ist die Absorption bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen der jeweiligen Fraktionen (als Säulen nummeriert) aufgetragen. Die Konzentration von Imidazol bei den entsprechenden Elutionsvolumen ist als grüne Kurve dargestellt. Die dazugehörige SDS-PAGE (rechts) zeigt normierte Proben nach jedem Reinigungsschritt. Die Höhe der zu erwartenden Proteinbande (hier ca. 70 kDa) ist als Pfeil hervorgehoben. S: Standard; US: Lysat nach Ultraschallaufschluss; CFE: zellfreier Überstand; D: Durchfluss nach Säulenauftragung; LV: Leervektorprobe.

Die Fraktion 19 zeigte ähnlich wie für die literaturbekannte  $V_{Cl}PO-Ci$  eine Elution bei einer Imidazol-Konzentration von etwa 60 mM. Fraktionen dieses Elutionspeaks wurden konzentriert und für die Bestimmung der kinetischen Parameter des Enzyms sowie weiterer biochemischer Charakterisierungsexperimente verwendet.

Für die kinetische Betrachtung des Enzyms wurde erneut eine 2D-Michaelis-Menten-Funktion mit Substratüberschussinhibitionsterm zur Auswertung verwendet (siehe 3.4.2). Das Ergebnis dieser kinetischen Analyse ist in Abbildung 62 zusammengefasst (siehe Abbildung 62).



**Abbildung 62: Zweidimensionale Michaelis-Menten-Kinetik (siehe Kapitel 3.4.2) der VPO-Rr mit Substratüberschussinhibitionsterm nach Gleichung 7 ( $R^2= 0.8$ ), adaptiert nach Porta & Fejzagić *et al.*<sup>[301]</sup>**

Dargestellt ist die volumetrische Aktivität des Enzyms in  $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$  in Abhängigkeit der Konzentration von Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid in mM. Die Punkte in der Abbildung markieren Datenpunkte, die als biologische Triplikate gemessen wurden. Areale mit roter Färbung symbolisieren besonders hohe Aktivitätswerte, während eine Blaufärbung Areale mit geringer Aktivität repräsentiert.

Die Fitfunktion für die Kinetik zeigte mit einem  $R^2$ -Wert von ca. 0.8 eine ausreichend hohe Korrelation zu den Messwerten, um eine Bestimmung der kinetischen Parameter zu erlauben. Die erhaltenen Werte wurden tabellarisch mit denen der  $V_{\text{ClPO-Ci}}$  verglichen (siehe Tabelle 9).

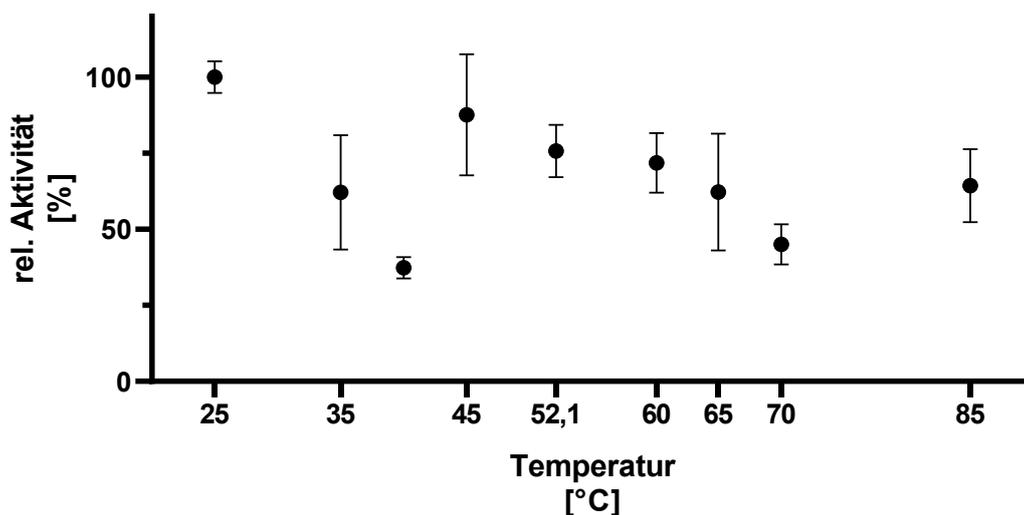
**Tabelle 9: Vergleich der kinetischen Parameter von VPO-Rr mit  $V_{\text{ClPO-Ci}}$**

Die Werte für  $v_{\text{max}}$ ,  $K_M$  und  $K_i$  wurden nach erfolgreichem Fit mit der zweidimensionalen Michaelis-Menten-Gleichung mit Substratüberschussinhibition erhalten. Der Wert für die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  wurde aus dem globalen  $v_{\text{max}}$ -Wert der Funktion und der eingesetzten Masse des Proteins sowie dem Molekulargewicht des Proteins (ca. 70 kDa) errechnet.

Enzym	$v_{\text{max}}$ [U mL <sup>-1</sup> ]	$K_M(\text{Br})$ [mM]	$K_i(\text{Br})$ [mM]	$K_M(\text{H}_2\text{O}_2)$ [mM]	$K_i(\text{H}_2\text{O}_2)$ [mM]	$k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]
VPO-Rr	$1.14 \pm 0.051$	$0.872 \pm 0.112$	$405 \pm 55.1$	$0.433 \pm 0.116$	$178 \pm 46.6$	$1304 \pm 58.33$
$V_{\text{ClPO-Ci}}$	$0.003 \pm 0.0002$	$0.19 \pm 0.046$	$56.8 \pm 6.97$	$1.48 \pm 0.238$	-	$9.8 \pm 0.778$

Für VPO-*Rr* konnten erfolgreich globale kinetische Parameter bestimmt werden. Diese lagen im Falle der Affinitätskonstante  $K_M$  für Kaliumbromid [ $K_M(\text{Br}^-)$ ] mit 0.872 mM um das Vierfache höher als beim Homologen Enzym  $V_{Cl}PO\text{-}Ci$ . Für die Michalis-Menten-Konstante für Wasserstoffperoxid [ $K_M(\text{H}_2\text{O}_2)$ ] konnte dagegen ein geringerer Wert für das Enzym aus *R. roseus* bestimmt werden (0.433 mM). Im Vergleich zum Referenzenzym war dieser somit ca. dreifach geringer (1.48 mM). Da ein höherer Wert für die Affinitätskonstante einhergeht mit einer geringeren Affinität des Substrats zum Enzym und damit eine schwächere Wechselwirkung aufzeigt, besitzt VPO-*Rr* eine geringere Affinität für das Halogenid als  $V_{Cl}PO\text{-}Ci$ , dafür aber eine höhere Affinität zu Wasserstoffperoxid. Während für  $V_{Cl}PO\text{-}Ci$  keine Inhibition durch Wasserstoffperoxid festgestellt werden konnte, zeigte VPO-*Rr* eine Inhibitionskonstante  $K_i(\text{H}_2\text{O}_2)$  von 178 mM auf, wodurch das Enzym bei dieser Konzentration nur noch eine halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit aufweisen könnte. Ob diese Inhibition auf einen molekularen Mechanismus oder eine geringe Toleranz des Enzyms gegen das starke Oxidationsmittel zurückzuführen ist, kann innerhalb dieses Experiments nicht differenziert werden. Für das Halogenid konnte für beide Enzyme eine Inhibitionskonstante [ $K_i(\text{Br}^-)$ ] bestimmt werden. Diese lag für VPO-*Rr* mit 405 mM um etwa das Siebenfache höher als für  $V_{Cl}PO\text{-}Ci$  (56.8 mM). Somit wird VPO-*Rr* weniger stark durch Kaliumbromid in einer Substratüberschussinhibition inaktiviert. Der größte Unterschied in den Parametern wird bei der Wechselzahl  $k_{cat}$  deutlich. Hier zeigt VPO-*Rr* mit  $1304\text{ s}^{-1}$  einen ca. hundertfach höheren Wert als die literaturbekannte  $V_{Cl}PO\text{-}Ci$ .

Im direkten Vergleich der Enzyme als Katalysatoren fällt auf, dass die in dieser Arbeit erstmalig charakterisierte vanadiumabhängige Haloperoxidase aus *R. roseus* weniger starke Substratüberschussinhibition als literaturbekannte Enzyme aufweist und mit einem hundertfach höheren  $k_{cat}$ -Wert vielversprechende Eigenschaften zur Nutzung in synthetischen Applikationen bietet. Der Inhibitionseffekt des Wasserstoffperoxids lässt jedoch Fragen zur Stabilität des Enzyms offen. Zur genaueren Einordnung der Stabilität sollte exemplarisch ein wichtiger Faktor bei Synthesen, die Thermostabilität, des Enzyms untersucht werden (siehe Abbildung 63).



**Abbildung 63: Temperaturstabilität der VPO-*Rr***

Nach einer Inkubation von 2 h bei den angegebenen Temperaturen wurde 1  $\mu\text{L}$  der Enzymlösung nach Zentrifugation mit Hilfe des MeDAC-Assay auf HPO-Aktivität untersucht. Die so erhaltenen Aktivitäten wurden auf die Aktivität einer Probe aus derselben Enzym-Charge, inkubiert bei 25 °C für 2 h, normiert. Die Messungen erfolgten als biologische Triplikate

Für VPO-*Rr* konnte eine konstante Beibehaltung der Aktivität bis zu einer Inkubationstemperatur von 85 °C beobachtet werden. Hierbei sank die Aktivität um etwa 25 bis 50 %. Auffällig sind allerdings einzelne Aktivitätswerte im Bereich um die 40 °C. Hierbei wurde bei mehrfacher Wiederholung der Messungen und Inkubationen ein starker Aktivitätsverlust bei 40 °C beobachtet werden, der für die Proben bei 45 °C nicht so stark ausfiel (ca. 60 % Verlust im Vergleich zu ca. 10 % Verlust). Ein ähnlicher, wenn auch nicht so stark ausgeprägter Effekt ist bei 70 und 85 °C sichtbar. Auch wenn die Standardabweichungen für diese Werte etwas höher liegen, scheint hier eine systematische Abweichung vorzuliegen. Eine mögliche Erklärung könnte eine besondere Fehlfaltung des Proteins in diesem Temperaturbereich sein. Bei einer Temperatur um 40 °C könnte das Protein eine Konformation einnehmen, die irreversibel zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms führt, beispielsweise durch eingeschränkte Flexibilität des aktiven Zentrums. Bei höheren Temperaturen (ab 45 °C) könnte diese Fehlfaltung energetisch so ungünstig sein, dass sie seltener auftritt und somit weniger Aktivitätsverlust beobachtet werden kann. Generell konnte für das Enzym aber eine hohe Temperaturstabilität gezeigt werden, die vergleichbar mit der des literaturbekannten Enzyms, V<sub>Cl</sub>PO-*Ci*, ist (siehe Abbildung 53).

Abschließend sollte die Halogenidselektivität des Enzyms untersucht werden. Hierzu wurde Kaliumchlorid und Kaliumbromid als Halogenidquelle im MeDAC-Assay als Substrat eingesetzt und die Aktivitäten miteinander verglichen. Hierbei konnte jedoch keinerlei Aktivität für die Chlorierungsreaktion detektiert werden, unabhängig von Enzym- oder Halogenidmenge (siehe Kapitel 5.7.22). Somit kann vorerst für VPO-*Rr* nur von einer Bromoperoxidase gesprochen und diese im Nachfolgenden als V<sub>Br</sub>PO-*Rr* bezeichnet werden.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse konnten im Rahmen einer Publikation zusammengestellt werden.<sup>[501]</sup>

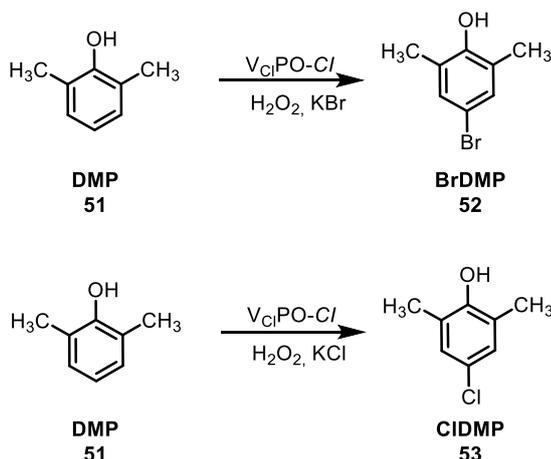
Im Laufe weiterer Untersuchungen stellte sich heraus, dass das Enzym aus *R. roseus* trotz hoher Temperaturstabilität eine geringe Lagerstabilität aufwies. Sowohl bei 4 °C als auch bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) konnte bereits nach 2 Tagen keinerlei Aktivität mehr für das entsprechende Aliquot nachgewiesen werden. Hierbei wurde auch nach Zentrifugation der Proben Präzipitität in der Lösung sichtbar, das vermutlich auf aggregiertes Protein zurückzuführen ist. Daher wurde für die Etablierung von Testreaktionen mit der literaturbekannten V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* weitergearbeitet.

## 3.6 Etablierung eines Testreaktionssystems für HPOs

### 3.6.1 2,6-Dimethylphenol (51) als Testreaktionssystem

Auch wenn die biochemischen Eigenschaften eines Enzyms unter isolierten Bedingungen vielversprechend klingen, können diese aber stark von anderen Prozessparametern beeinflusst werden. Insbesondere im Hinblick auf komplexere Synthesen ist es notwendig, den Katalysator unter realitätsnahen Prozessbedingungen zu betrachten und potenzielle Probleme im Prozess zu identifizieren. Aus diesem Grund sollte ein Testreaktionssystem etabliert werden, um die Effizienz von Haloperoxidasen als Biokatalysatoren zu evaluieren.

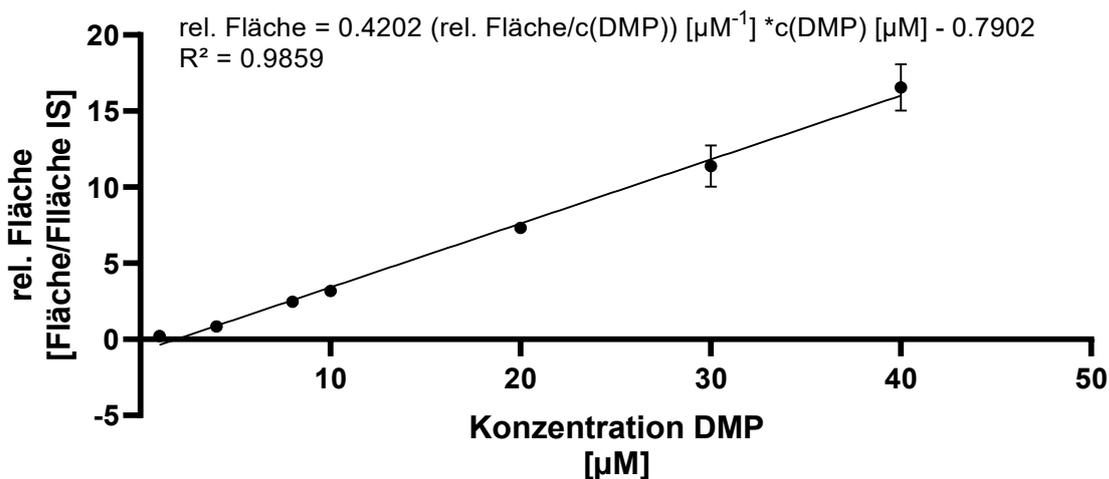
Da Haloperoxidasen meist keine Regioselektivität in der Halogenierung aufzeigen, ist die Ermittlung der Halogenierungseffizienz des Katalysators schwierig, da auch mehrfache Substitutionsreaktionen stattfinden können. Aus diesem Grund wurde ein Molekül ausgesucht, das aufgrund seiner elektronischen Eigenschaften nur eine aktivierte nucleophile Position für die elektrophile aromatische Substitution aufweist. Bei diesem Molekül handelt es sich um das kommerziell erhältliche 2,6-Dimethylphenol (51) (DMP, siehe Abbildung 64).



**Abbildung 64: Reaktionsschema des DMP-Testsystems**

2,6-Dimethylphenol (51) (DMP) kann bei einer elektrophilen aromatischen Substitution lediglich in para-Stellung ein Halogenid substituieren, da die ortho-Positionen durch die Methylgruppen nicht zur Verfügung stehen und die meta-Position desaktivierend wirkt. Abhängig vom eingesetzten Halogenid kann so 4-Brom-2,6-dimethylphenol (BrDMP) 52 oder 4-Chlor-2,6-dimethylphenol (CIDMP) 53 erhalten werden.

Im Zuge der Reaktion mit einer HPO kann DMP (51) durch Bromierung oder Chlorierung zu BrDMP 52 bzw. CIDMP 53 umgesetzt werden. Da das Substrat nur einmal halogeniert werden kann, lässt sich somit die Halogenierungseffizienz des Enzyms unter Prozessparametern bestimmen. Um den Umsatz der Reaktion zu bestimmen, wurde die Reaktionslösung mit organischem Lösungsmittel (Essigsäureethylester) extrahiert und mit einem internen Standard (*m*-Chlortoluol) an einer GC-MS vermessen (siehe Abbildung 65 und Kapitel 5.7.4). Um den Umsatz der Reaktion zu bestimmen, wurden die Referenzsubstanzen bestellt und für die Reaktionsbedingungen kalibriert.

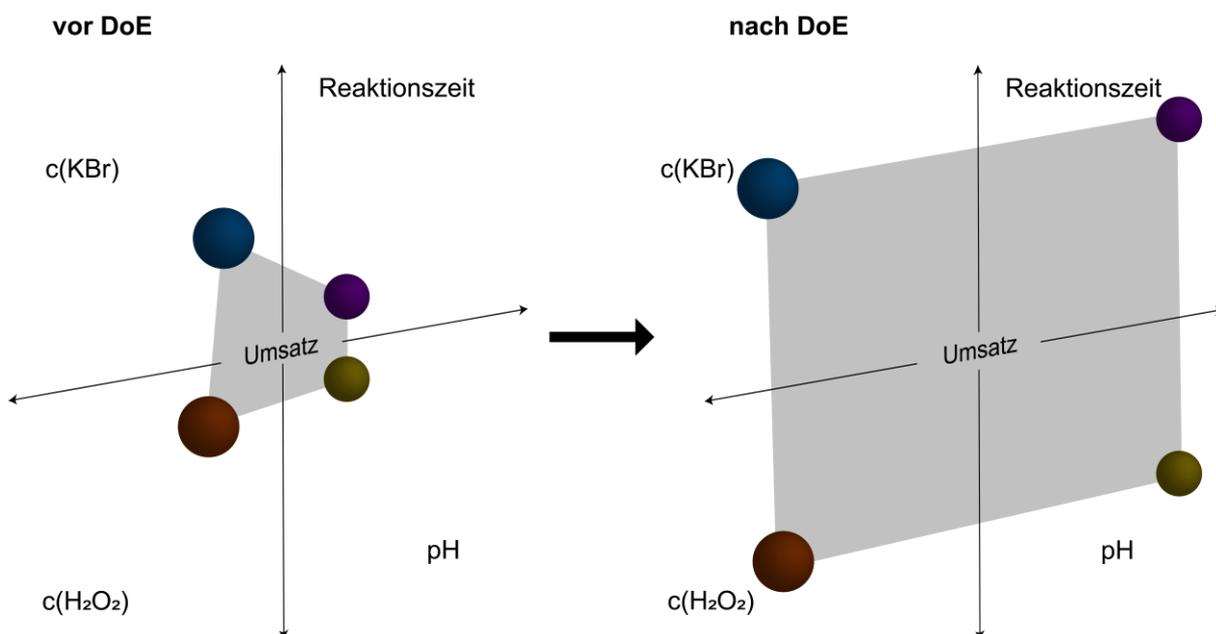


**Abbildung 65: Kalibrierung verschiedener Stoffkonzentrationen an der GC-MS, hier am Beispiel von DMP (51)**

Für jede Konzentration wurde ein Duplikat am Gerät unter identischen Bedingungen gemessen. Die Signalfläche des DMP-Signals wurde auf die Signalfläche des 5 mM internen Standards (IS) normiert und gegen die eingesetzte Konzentration DMP (51) aufgetragen. Die Datenpunkte wurden anschließend mit einer linearen Funktion gefittet ( $R^2=0.99$ ). Die Messungen erfolgten als biologische Triplikate mit zugehörigen Standardabweichungen.

Die erhaltene Kalibrierfunktion zeigte eine sehr gute Übereinstimmung um den angestrebten Konzentrationsbereich von 10 mM und zeigte Abweichungen für Konzentrationen über 30 mM. Die erhaltene Funktion wurde mit den restlichen Kalibrierfunktionen für BrDMP 52 bzw. CIDMP 53 verwendet, um die Konzentrationen und damit die Umsätze der jeweiligen Reaktion zu quantifizieren.

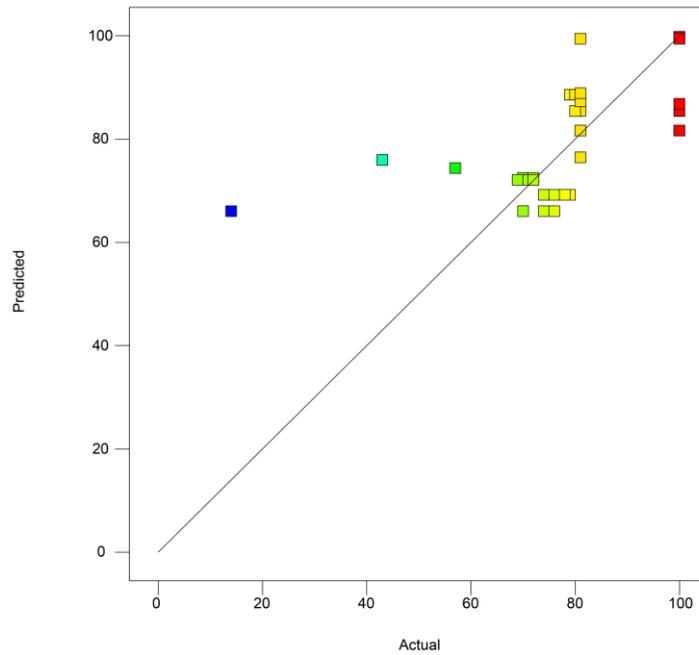
Da der Umsatz der Reaktion von verschiedenen Parametern abhängig ist, die zum Teil auch selbst in Abhängigkeit zueinanderstehen können, wurde ein systematischer Ansatz verfolgt, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Hierfür wurde ein *design of experiment* (DoE) etabliert, um den Einfluss der vier Reaktionsparameter (Konzentration der beiden Substrate, pH-Wert und Reaktionszeit) zu charakterisieren. Der generelle Ablauf des DoE-Ansatzes ist schematisch zusammengefasst (siehe Abbildung 66).



**Abbildung 66: Schematische Übersicht zum DoE-Ansatz zur Reaktionsoptimierung**

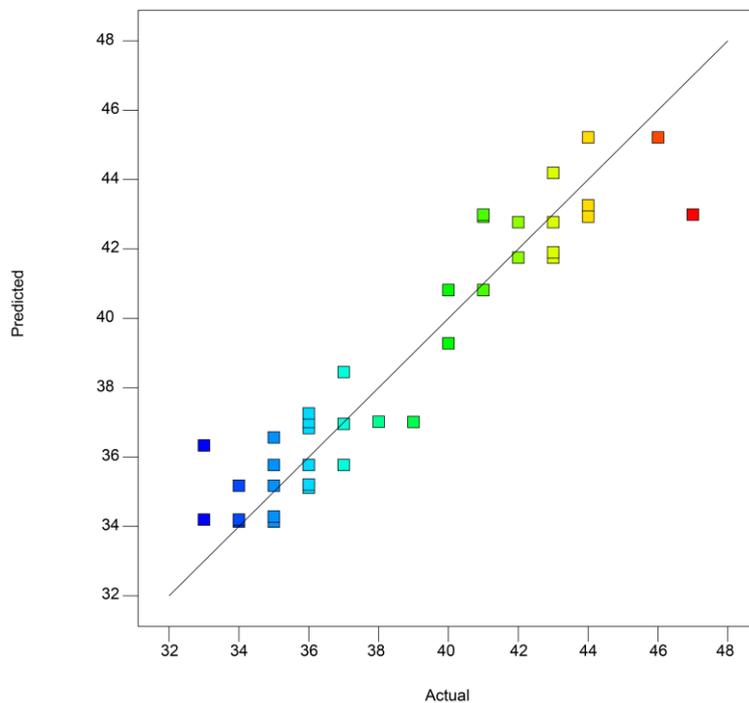
Die vier Reaktionsparameter (Konzentration der beiden Substrate, pH-Wert und Reaktionszeit), symbolisiert durch die einzelnen Kugeln, spannen eine Ebene, die den Umsatz der Reaktion widerspiegelt (grau). Nach Durchführung der notwendigen Experimente für das DoE kann diese Ebene im Idealfall durch die Identifizierung besserer Parameter für die Reaktion bis zum maximalen Wert getrieben werden.

Für die Analyse wurde ein *surface-response*-Ansatz gewählt, wobei die vier gewählten Parameter beliebig kombiniert werden sollten. Für den pH-Bereich wurden Werte zwischen 4 und 6.5 getestet, um die Aktivität des Enzyms zu gewährleisten (siehe Kapitel 5.7.9). Die eingesetzte Konzentration des Substrats DMP (**51**) entsprach 10 mM (0.01 mmol). Die Versuche erfolgten in einem Maßstab von 1 mL und wurden analog zu den Kalibrierproben extrahiert. Die anschließend ermittelten Umsätze wurden in die Software DesignExpert12 eingetragen und daraus Fitfunktionen für den Umsatz von DMP (**51**) sowie den Umsatz zum bromierten Produkt BrDMP **52** erhalten (siehe Abbildung 67 und Abbildung 68).



**Abbildung 67: Predicted vs. Actual Plot des DoE-Ansatzes für DMP (51)**

Die erhaltene Fitfunktion (Diagonale) ist aufgetragen gegen die tatsächlich gemessenen Umsätze aus den 46 Experimenten, inklusive Mehrfachbestimmungen. Im Idealfall sollten alle Messpunkte gleichmäßig entlang der Diagonale verteilt sein. Die Werte wurden einem quadratischen Fit unterzogen. Werte über den vorhergesagten Werten der Funktion sind, relativ zur Differenz, blau, Werte darunter rot dargestellt.  $R^2 = 0.41$

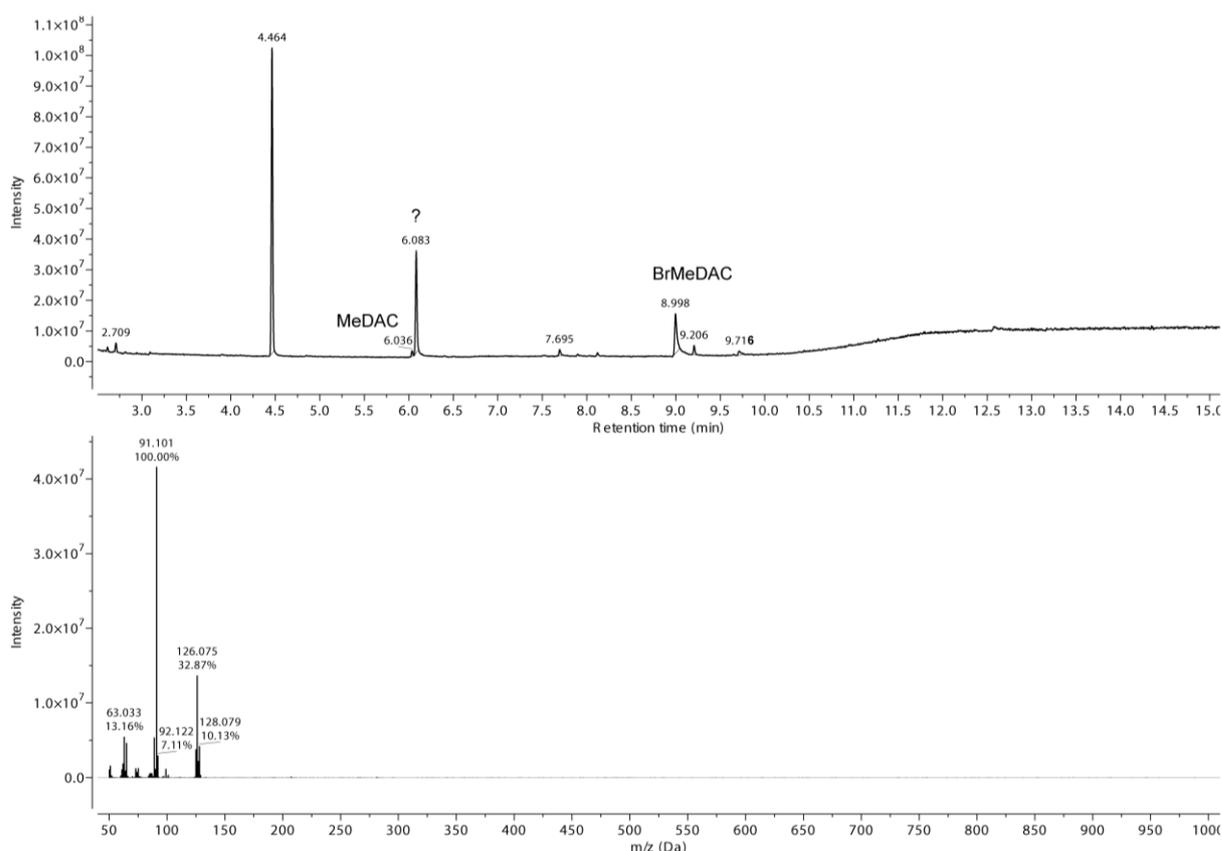


**Abbildung 68: Predicted vs. Actual Plot des DoE-Ansatzes für BrDMP 52**

Die erhaltene Fitfunktion (Diagonale) ist aufgetragen gegen die tatsächlich gemessenen Umsätze aus den 46 Experimenten, inklusive Mehrfachbestimmungen. Im Idealfall sollten alle Messpunkte gleichmäßig entlang der Diagonale verteilt sein. Die Werte wurden einem quadratischen Fit unterzogen. Werte über den vorhergesagten Werten der Funktion sind, relativ zur Differenz, blau, Werte darunter rot dargestellt.  $R^2 = 0.85$

Im Vergleich beider Fitfunktionen fällt eine systematische Abweichung für DMP (**51**) auf. Hier zeigten sich große Diskrepanzen zwischen vorhergesagten Umsätzen des Fits und tatsächlich ermittelten. Tendenziell lag der Umsatz für nahezu alle Versuchsreihen recht hoch, konnte aber nicht in Einklang mit dem Umsatz zum BrDMP **52** gebracht werden. Hier wurde ein Fit mit guter Qualität erhalten ( $R^2 = 0.85$ ), allerdings lagen die Umsätze bei etwa 50 % bei nahezu allen Bedingungen. Somit scheint ein Parameter nicht betrachtet worden zu sein, der den Umsatz zu BrDMP **52** maßgeblich beeinflusst.

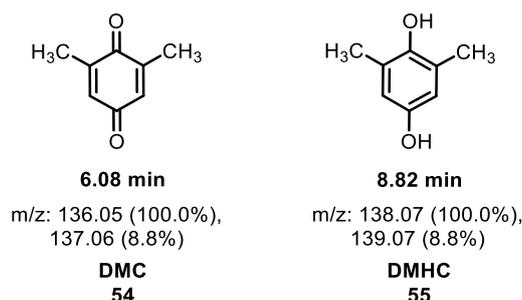
Bei der Analyse der Chromatogramme fiel auf, dass sich ein minimal verschobenes Signal neben dem Edukt signal von DMP (**51**) im Laufe der Reaktionen bildete (siehe Abbildung 69). Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis dieses Signals konnte weder dem Edukt noch dem Produkt zugeordnet werden.



**Abbildung 69: GC-MS-Chromatogramm einer Messung der DoE-Versuchsreihe**

Dargestellt ist die Messung mit 16 mM KBr, 55 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei einem pH-Wert von 5.5 nach einer Stunde Reaktionszeit. Oben: Chromatogramm der extrahierten Probe nach GC-Lauf. Unten: Massenspektrum des Signals bei einer Retentionszeit von 6.08 min.

Für das Signal bei etwa 6.08 min konnte ein Molekülpeak von 138 m/z beobachtet werden. Im Vergleich zum Startmaterial und möglichen Produkten wurde eine Hypothese aufgestellt, um welche Nebenprodukte es sich generell hierbei handeln könnte (siehe Abbildung 70).



**Abbildung 70: Vermutete Strukturen für die Nebenproduktsignale mit Retentionszeiten bei ca. 6.08 min und 8.82 min**

Bei den beiden vorgeschlagenen Strukturen handelt es sich um 2,6-Dimethyl-1,4-chinon (**54**) (DMC) und 2,6-Dimethyl-hydrochinon **55** (DMHC).

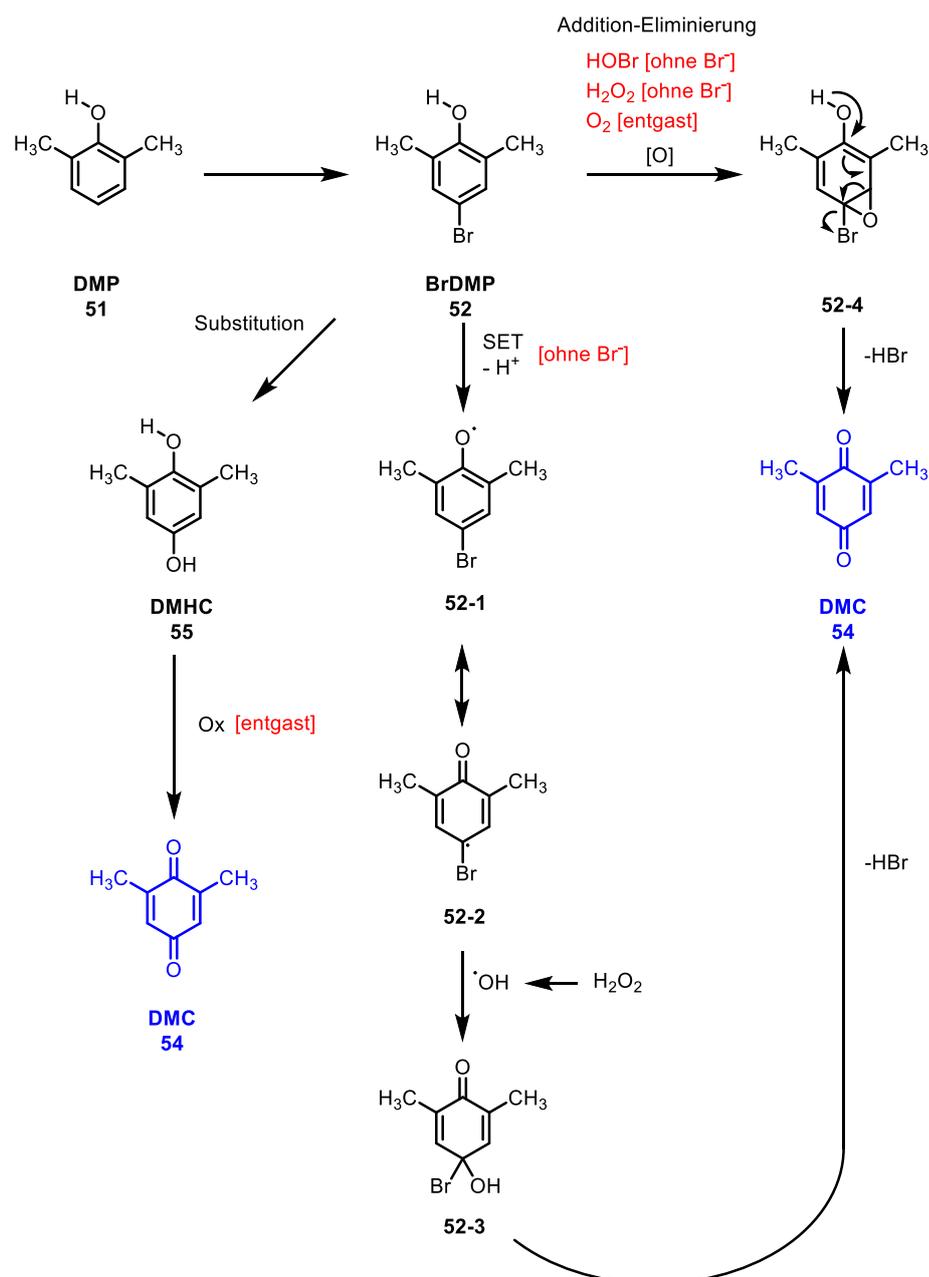
Um die Identität der Strukturen zu bestätigen, wurden die Referenzsubstanzen an der GC-MS gemessen und mit den Retentionssignalen sowie Massenspektren einer enzymatischen Umsetzung von DMP (**51**) in Anwesenheit von Kaliumbromid verglichen (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Vergleich der Retentionszeiten von DMP (**51**), BrDMP **52**, DMC (**54**) und DMHC **55** mit den erhaltenen Signalen der enzymatischen Bromierung von DMP (**51**) mit  $V_{Cl}PO-Gi$**

Die Referenzen wurden unter gleichen Bedingungen gemessen wie die enzymatische Probe.

Probe	Retentionszeit [min]	m/z
DMP-Referenz	6.021	122.1
BrDMP-Referenz	9.010	200.01 202.01
DMC-Referenz	6.075	136.06
DMHC-Referenz	8.824	138.1
Enzymatische Umsetzung	6.034	122.0
	6.070	136.08
	8.981	200.01 202.01

Im Vergleich der Signale lassen sich alle Signale der enzymatischen Bromierung von DMP (**51**) den entsprechenden Referenzsubstanzen zuordnen. Lediglich das Signal für DMHC **55** taucht in der enzymatischen Umsetzung nicht auf. Somit scheint es sich bei den Nebenprodukten um DMC(**54**), das sich womöglich aus DMHC **55** bilden kann, zu handeln. Der Mechanismus der dahinterliegenden Oxidation von DMP (**51**) ist allerdings unklar. Für diese Konzentration könnte entweder die Anwesenheit von Wasserstoffperoxid selbst reichen oder in einer Enzym-abhängigen Reaktion stattfinden. Um den Mechanismus der Nebenproduktbildung zu untersuchen, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Hierbei lag ein Augenmerk auf der Identifizierung der Oxidationsquelle (molekularer Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid) und der Bedeutung des Enzyms für die Bildung (enzymabhängig oder -unabhängig). Hierbei wurde nicht auf Umsätze, sondern auf die Anwesenheit der Signale für DMC (**54**) und DMHC **55** geachtet. Die mechanistische Studie ist in einem Reaktionsschema zusammengefasst (siehe Abbildung 71).



**Abbildung 71: Mechanistische Vorschläge zur Bildung von DMC (54) (blau) aus DMP (51)**

Zur Bildung von DMC (54) (blau) konnten drei mechanistische Routen formuliert werden. Nach Bromierung von DMP (51) ergeben sich drei mögliche Reaktionswege: In einer Substitutionsreaktion könnte Brom durch eine Hydroxylgruppe substituiert werden, um DMHC 55 zu bilden. Durch anschließende Oxidation durch molekularen Sauerstoff kann DMC (54) gebildet werden. Alternativ kann über einen (enzymabhängigen) *single electron transfer* (SET) ein DMP-Radikal 52-1 am Sauerstoff gebildet werden. Nach Radikalwanderung über eine mesomere Grenzstruktur zum *para*-Kohlenstoff 52-2 könnte mit Wasserstoffperoxid ein OH-Radikal addiert werden 52-3, wodurch nach Abspaltung von Bromwasserstoff DMC (54) gebildet wird. Als letzte Alternative könnte eine oxidative Addition von Sauerstoff an BrDMP 52 stattfinden. Hierbei könnte die enzymatisch gebildete hypobromige Säure, Wasserstoffperoxid oder molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel und Sauerstoffdonor dienen. Durch anschließende Eliminierung von Brom an 52-4 wird Bromwasserstoff und DMC (54) gebildet. Zur Identifizierung des möglichen Mechanismus sind Kontrollexperimente nötig, um das Oxidationsmittel oder die Art der Oxidation zu bestimmen. Für diese Experimente wurden die entscheidenden Moleküle und Bedingungen (bspw. entgaster Puffer, kein Bromid) rot hervorgehoben.

Für alle postulierten Mechanismen muss BrDMP **52** gebildet werden, da kein DMC-Signal mit DMP (**51**) detektiert werden konnte. Die Bildung von DMC (**54**) kann daher im gezeigten Vorschlag entweder durch eine Substitutionsreaktion zwischen Brom und Wasserstoffperoxid, einem *single electron transfer*- (SET) Radikalmechanismus oder einer oxidativen Addition von Sauerstoff an den Aromaten stattfinden (siehe Abbildung 71, von links nach rechts). Die hervorgehobenen Experimente wurden durch vollständige Entgasung des Puffers und Flutung mit Argon sowie Auslassen von Kaliumbromid, Wasserstoffperoxid oder Enzym durchgeführt. Dabei wurden die Bedingungen aus vorherigen Experimenten gleichgehalten (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11: Mechanistische Studie zur Bildung von DMC (**54**) aus DMP (**51**)**

Abhängig vom Mechanismus wurden mit verschiedenen Startmaterialien bestimmte Komponenten geändert, um deren Einfluss auf die Bildung von DMC(**54**) zu bestimmen. Die mechanistischen Vorschläge sind in Abbildung 71 dargestellt.

Mechanismus	Startmaterial	Komponente	DMC-Signal
Enzym-abhängig	DMP ( <b>51</b> )	ohne Enzym	nein
Substitution	BrDMP <b>52</b>	ohne Enzym	nein
	DMHC <b>55</b>	entgaster Puffer	ja
Radikalisch	BrDMP <b>52</b>	ohne Bromid	nein
	BrDMP <b>52</b>	ohne Wasserstoffperoxid	nein
Addition-Eliminierung	BrDMP <b>52</b>	ohne Bromid, entgaster Puffer	ja
	BrDMP <b>52</b>	entgaster Puffer	ja

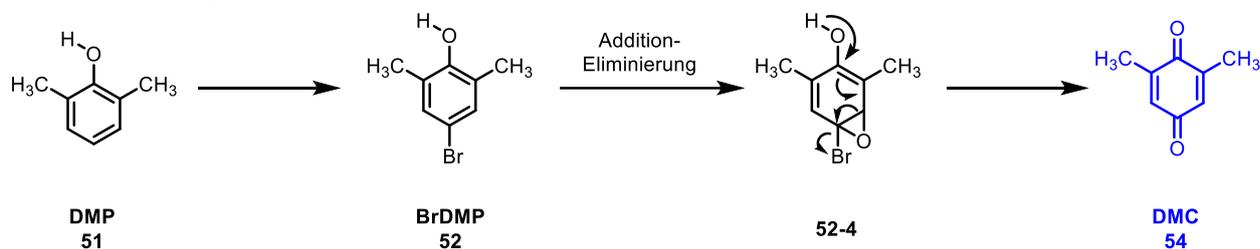
Um die Rolle des Enzyms bei der Bildung von DMC (**54**) zu klären, wurde unter den gleichen Bedingungen ein Ansatz mit DMP (**51**) ohne Enzym angesetzt. Hierbei konnte kein DMC-Signal detektiert werden. Die Nebenproduktbildung ist somit Enzym-abhängig. Für die Substitutionsreaktion müsste eine Oxidation des DMHC **55**, das sich aus BrDMP **52** bildet, mit molekularem Sauerstoff stattfinden. Da kein DMC-Signal detektiert wurde, sobald kein Enzym in der Lösung vorhanden ist, kann die Substitution nicht enzymabhängig stattfinden. DMHC zeigte jedoch auch ein DMC-Signal mit entgastem Puffer und würde für diesen finalen Teilschritt sprechen. Da in einer Kontrollprobe mit reinem DMHC aber bereits DMC (**54**) sichtbar ist, scheint die Oxidation mit Luftsauerstoff besonders schnell stattzufinden, wodurch das Signal in dem mechanistischen Kontrollexperiment auf Oxidation während der Einwaage zurückführbar sein könnte.

Im Falle eines radikalischen Mechanismus müsste ein SET stattfinden, der enzymabhängig abläuft. In diesem Fall würde ein Hydroxyl-Radikal, gebildet aus Wasserstoffperoxid, addiert (siehe Struktur **52-3**) und nach Eliminierung von Bromwasserstoff zu DMC (**54**) oxidiert werden. Da sowohl in Abwesenheit von Kaliumbromid als auch Wasserstoffperoxid kein Signal detektiert werden konnte, ist dieser radikalische, enzymabhängige Mechanismus ausgeschlossen.

Für den Additions-Eliminierungs-Mechanismus müsste enzymvermittelt ein Sauerstoffatom an BrDMP **52** addiert werden. Das gebildete Epoxid **52-4** würde durch eine intramolekulare Ringöffnung in der Eliminierung von Bromwasserstoff und Bildung von DMC (**54**) resultieren. In diesem Fall würde der Sauerstoff von Wasserstoffperoxid kommen und enzymabhängig addiert werden. Durch eine Abwesenheit von Bromid und die Nutzung von entgastem Puffer wäre somit die Quelle des Sauerstoffs am wahrscheinlichsten auf Wasserstoffperoxid zurückzuführen. Da in diesem Fall ein Signal detektiert wurde, scheint der Additions-Eliminierungs-Mechanismus die plausibelste Erklärung für die enzymabhängige Bildung von DMC (**54**) zu sein. Phenole wie DMP (**51**) können somit von

Haloperoxidasen zu Chinonen weiter oxidiert werden. Inwiefern der Vanadat-Cofaktor die Übertragung eines Sauerstoffs vom Wasserstoffperoxid zum Zielmolekül dirigiert, konnte allerdings nicht final bewiesen werden. Hierfür bieten sich detailliertere Studien wie EPR-Analysen oder Kristallisationsexperimente zur Konstitution des Vanadats im aktiven Zentrum in Anwesenheit von Substraten wie DMP (**51**) an. Vanadium-Katalysatoren sind zumindest für allylische Systeme sowie Olefine als Epoxidierungskatalysatoren weitgehend bekannt und könnten diese Art der Haloperoxidase-Nebenaktivität erklären.<sup>[307-309]</sup>

Im weiteren Verlauf der Versuche mit Kaliumchlorid als Halogenierungsquelle konnte ebenfalls die Bildung von DMC (**54**) beobachtet werden. Die beobachteten Diskrepanzen zwischen Umsatz von DMP (**51**) und Umsätzen zu BrDMP **52** bzw. CIDMP **53** lassen sich mit dem stöchiometrischen Verbrauch des Halogenierungsprodukts für die Bildung von DMC (**54**) erläutern. In einer DoE-Analyse wurden gute Übereinstimmungen zum Fit erhalten, die ebenfalls auf einen linearen Zusammenhang hindeuteten. Der anhand der Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit postulierte Mechanismus ist nachfolgend dargestellt (siehe Abbildung 72).

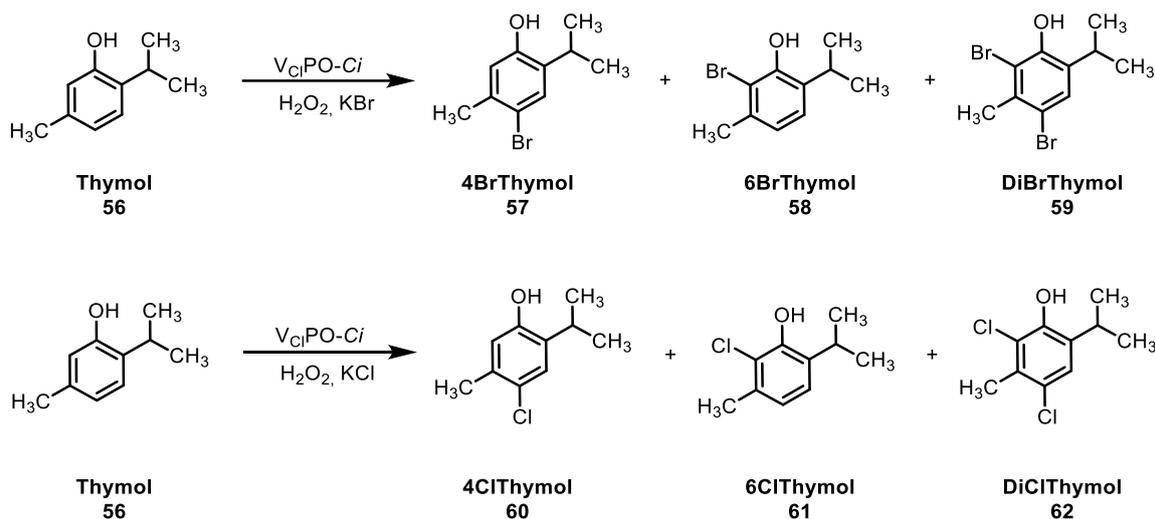


**Abbildung 72: Postulierter Additions-Eliminierungs-Mechanismus zur enzymvermittelten Bildung von DMC (**54**) aus DMP (**51**)**

Da die Bestimmung und Optimierung der Halogenierungseffizienz durch diese Nebenproduktbildungen aber wesentlich erschwert werden, wurde das DMP-System als Haloperoxidase-Testsystem verworfen. Stattdessen wurde eine literaturbekannte Alternative gesucht, um die Haloperoxidase-Reaktion zu optimieren.

### 3.6.2 Thymol (56) als Testreaktionssystem

Wie Fernandez-Fueyo *et al.* zeigen konnten, ist die Haloperoxidase aus *C. inaequalis* in der Lage Thymol (56), ein weiteres Phenolderivat, zu verschiedenen Produkten zu bromieren und chlorieren.<sup>[206]</sup> Im Rahmen jener Arbeit konnten semi-präparative sowie präparative Umsetzungen erreicht werden. Da die Verbindungen chromatographisch ebenfalls gut unterscheidbar sind, wurde analog zum DMP-System eine Testreaktion mit Thymol (56) etabliert, deren Umsätze über GC-MS quantifiziert werden sollten (siehe Abbildung 73 und Kapitel 5.7.5).



**Abbildung 73: Reaktionsschema des Thymol-Testsystems**

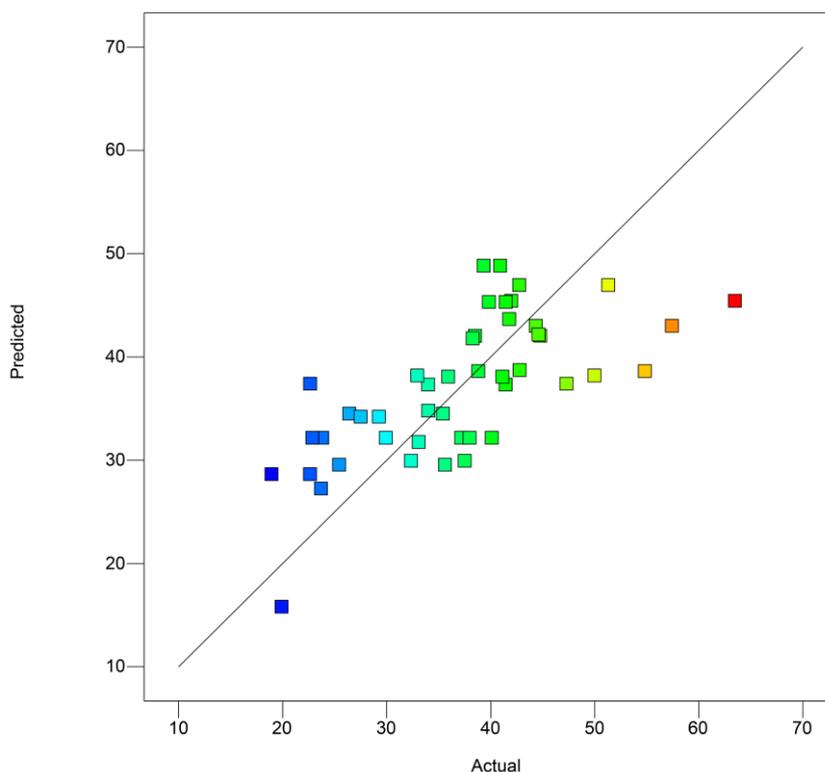
2-Isopropyl-5-methyl-phenol (56) (Thymol) kann bei einer elektrophilen aromatischen Substitution in *para*- und *ortho*-Stellung ein Halogenid substituieren, wodurch drei Produkte gebildet werden können: *para*-Halo-Thymol, *ortho*-Halo-Thymol oder Dihalothymol. Abhängig vom eingesetzten Halogenid kann so 4-Bromo-2-isopropyl-5-methyl-phenol (4BrThymol 57), 6-Bromo-2-isopropyl-5-methyl-phenol (6BrThymol 58) oder 4,6-Bromo-2-isopropyl-5-methyl-phenol (DiBrThymol 59) erhalten werden (und analog dazu die chlorierten Varianten, 4ClThymol 60, 6ClThymol 61 und DiClThymol 62).

Aufgrund der höheren Bromierungsrate des Enzyms  $V_{Cl}PO-Ci$  wurde die Bromierung primär für die Etablierung des Testsystems mit Thymol (56) betrachtet. Hierfür wurden kommerziell erhältliche Referenzen von Thymol und 4BrThymol 57 an der GC-MS kalibriert (siehe Kapitel 5.7.5).

Aufgrund der geringen Löslichkeit von 4BrThymol 57 zeigte die Kalibrierfunktion bei ersten Versuchen bei der Quantifizierung erhebliche Abweichungen im geringen Konzentrationsbereich, wodurch die ermittelten Umsätze nicht mit denen des eingesetzten Substrats, Thymol (56), in Einklang zu bringen waren. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente lediglich der Umsatz von Thymol (56) bestimmt und auf die Anwesenheit der Signale von 4BrThymol 57, 6BrThymol 58 und DiBrThymol 59 geachtet.

Nach ersten Ansätzen lag der Umsatz der Reaktion ebenfalls bei etwa 50 %. Analog zum DMP-System wurde daher ein DoE-Ansatz zur Charakterisierung der Parameter und Optimierung der Reaktionsbedingungen durchgeführt. Auch hier wurde ein *surface response fit* und die durch die erhaltene Fitfunktion vorhergesagten Werte des Thymolumsatzes mit den tatsächlich experimentell erhaltenen Werten verglichen (siehe Abbildung 74 und

Tabelle 44).

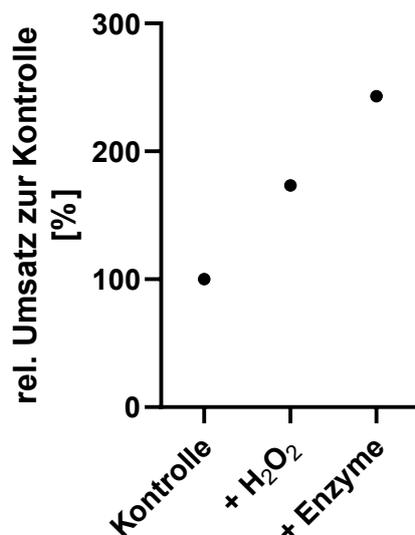


**Abbildung 74: Predicted vs. Actual Plot des DoE-Ansatzes für Thymol (56)**

Die erhaltene Fitfunktion (Diagonale) ist aufgetragen gegen die tatsächlich gemessenen Umsätze aus 46 Experimenten, inklusive Mehrfachbestimmungen. Im Idealfall sollten alle Messpunkte gleichmäßig entlang der Diagonale verteilt sein. Die Werte wurden einem quadratischen Fit unterzogen. Werte über den vorhergesagten Werten der Funktion sind, relativ zur Differenz, blau, Werte darunter rot dargestellt.  $R^2 = 0.235$ .

Der Vergleich der vorhergesagten und tatsächlich ermittelten Umsätze für Thymol bestätigt die vorhergegangene Beobachtung. Für geringe und hohe Umsätze zeigen sich größere Abweichungen zwischen Fitfunktion und ermittelten Daten, der Umsatz bleibt in etwa im Bereich von 50 % meist limitiert. Da im Gegensatz zu DMP keine neuen Signale beobachtet werden konnten, wurde nicht von einer Nebenproduktbildung ausgegangen. Stattdessen deuteten die Diskrepanzen auf eine systematische Limitation im Reaktionsansatz hin. Zwei mögliche Faktoren wurden für diese Hypothese identifiziert. Zum einen könnte die Stabilität des Wasserstoffperoxids während der Reaktion problematisch werden, da eine Disproportionierung die enzymatische Bildung der halogenierenden Spezies beeinträchtigen würde. Zum anderen könnte das Enzym selbst, trotz hoher Stabilität unter isolierten Bedingungen, unter diesen Reaktionsbedingungen inaktiviert werden.<sup>[195, 201, 206]</sup>

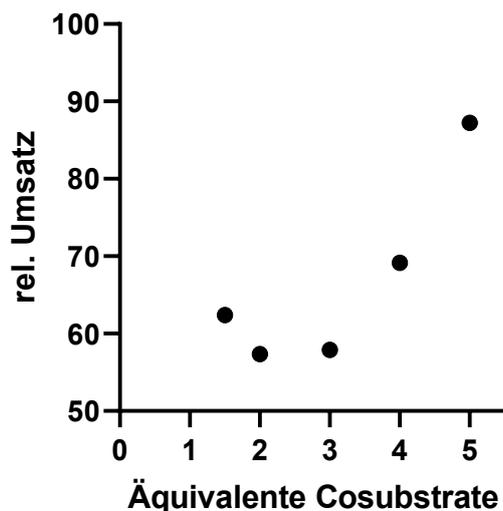
Zur Identifikation der vorliegenden Limitierung wurde ein Ansatz unter Standardbedingungen mit einem Ansatz, dem zusätzlich Wasserstoffperoxid bzw. Enzym in gleicher Menge nach der Hälfte der angestrebten Reaktionszeit zugesetzt wurde, verglichen. Die erhaltenen Umsätze wurden auf den Umsatz der Probe unter Standardbedingungen (15 mM Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid, 0.05 U  $V_{ClPO-Ci}$ , 10 mM Thymol (56) in BTA-Puffer 100 mM pH 6 für 3h 20 min) normiert (siehe Abbildung 75).



**Abbildung 75: Untersuchung der limitierenden Faktoren für den Umsatz von Thymol (56) mit V<sub>Cl</sub>PO-Ci**

Der Umsatz einer Kontrollprobe wurde als Referenzwert auf 100 % gesetzt und als Normierungsfaktor für die Probe mit zusätzlichem Wasserstoffperoxid (+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Enzym (+ Enzym) verwendet. Die Proben wurden mit 15 mM Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid, 0.05 U V<sub>Cl</sub>PO-Ci, 10 mM Thymol (56) in BTA-Puffer 100 mM pH 6 angesetzt und für 3 h 20 min bei 25 °C und 700 rpm inkubiert. Für die Zugabe von Wasserstoffperoxid oder Enzym wurde nach der Hälfte der Reaktionszeit, also 1 h 40 min, dieselbe Menge dazugegeben und weiter inkubiert. Die Bestimmung der Umsätze erfolgte per Auswertung der Signalflächen im GC-MS-Chromatogramm für Thymol (56) relativ zum verwendeten 5 mM Standard, *m*-Chlortoluol.

Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid und Enzym nach der Hälfte der angestrebten Reaktionszeit konnte in beiden Fällen eine signifikante Zunahme des Umsatzes von Thymol (56) beobachtet werden. Im Falle von Wasserstoffperoxid wurde der Umsatz etwa verdoppelt, während bei der Probe mit zusätzlichem Enzym eine 2.5-fache Steigerung erreicht wurde. Beide Faktoren scheinen somit limitierend auf den Gesamtumsatz der Reaktion zu wirken, wobei der Effekt der Enzymzugabe besonders auffällig ist. Da das Enzym in dieser Arbeit wie auch in anderen publizierten Daten eine hohe Stabilität gegenüber harschen Bedingungen aufweist, scheint dies nicht unter Prozessbedingungen zu gelten. Das als Wasserstoffperoxid-resistent bezeichnete Enzym V<sub>Cl</sub>PO-Ci könnte unter realen Bedingungen womöglich selbst halogeniert werden und dadurch einen Aktivitätsverlust erleiden. Aus diesem Grund wurde die Menge des Enzyms von 0.05 U pro Reaktion (0.004 mol-%) auf 1 U erhöht (0.072 mol-%). Um die ideale Konzentration der Cosubstrate zu identifizieren, wurde ein *screening* mit verschiedenen Äquivalenten Cosubstrate durchgeführt (siehe Abbildung 76).



**Abbildung 76: Screening** verschiedener Äquivalente der Cosubstrate Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid zur enzymatischen Umsetzung von Thymol (**56**) mit  $V_{Cl}PO-Ci$

Alle Messungen wurden mit einer Enzymmenge von 1 U (0.072 mol-%) und 10 mM Thymol (**56**) in 100 mM BTA-Puffer pH 6 durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h 20 min bei 25 °C und 700 rpm inkubiert. Die Bestimmung der Umsätze erfolgte per Auswertung der Signalflächen im GC-MS-Chromatogramm für Thymol (**56**) relativ zum verwendeten 5 mM Standard, *m*-Chlortoluol.

Für eine Menge von bis zu 3 Stoffmengenäquivalenten Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid lagen die Umsätze bei ca. 60 %. Ab vier Äquivalenten wurde ein Umsatz von etwa 70, für fünf Äquivalente ein Umsatz von etwa 90 % erreicht. Somit konnte durch eine Optimierung der Cosubstrat- und Enzymbelastung in der Reaktionslösung der Umsatz auf 90 % gesteigert werden.

Mit diesen optimierten Bedingungen wurde die Bromierung von Thymol (**56**) mit der Chlorierung verglichen, um den Zugang zu chlorierten Derivaten zu ermöglichen. Für die Auswertung der Chlorierungsreaktionen wurde analog zur Bromierung der Umsatz von Thymol (**56**) mit Hilfe der eingangs gezeigten Kalibrierfunktion bestimmt. Der Umsatz der enzymatischen Chlorierung von Thymol (**56**) wurde mit einer Bromierungsprobe verglichen (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Vergleich der enzymatischen Bromierung und Chlorierung von Thymol (**56**) mit  $V_{Cl}PO-Ci$**

Alle Messungen wurden mit einer Enzymmenge von 1 U (0.072 mol%) und 10 mM Thymol (**56**) in 100 mM BTA-Puffer pH 6 durchgeführt. Die Proben wurden für 3 h 20 min bei 25 °C und 700 rpm inkubiert. Die Bestimmung der Umsätze erfolgte per Auswertung der Signalflächen im GC-MS-Chromatogramm für Thymol (**56**) relativ zum verwendeten 5 mM Standard, *m*-Chlortoluol. Für Umsätze, die jenseits von 87 % liegen liefert die Kalibrierfunktion keine zuverlässigen Werte, weshalb solche Werte als „>90 %“ angegeben wurden.

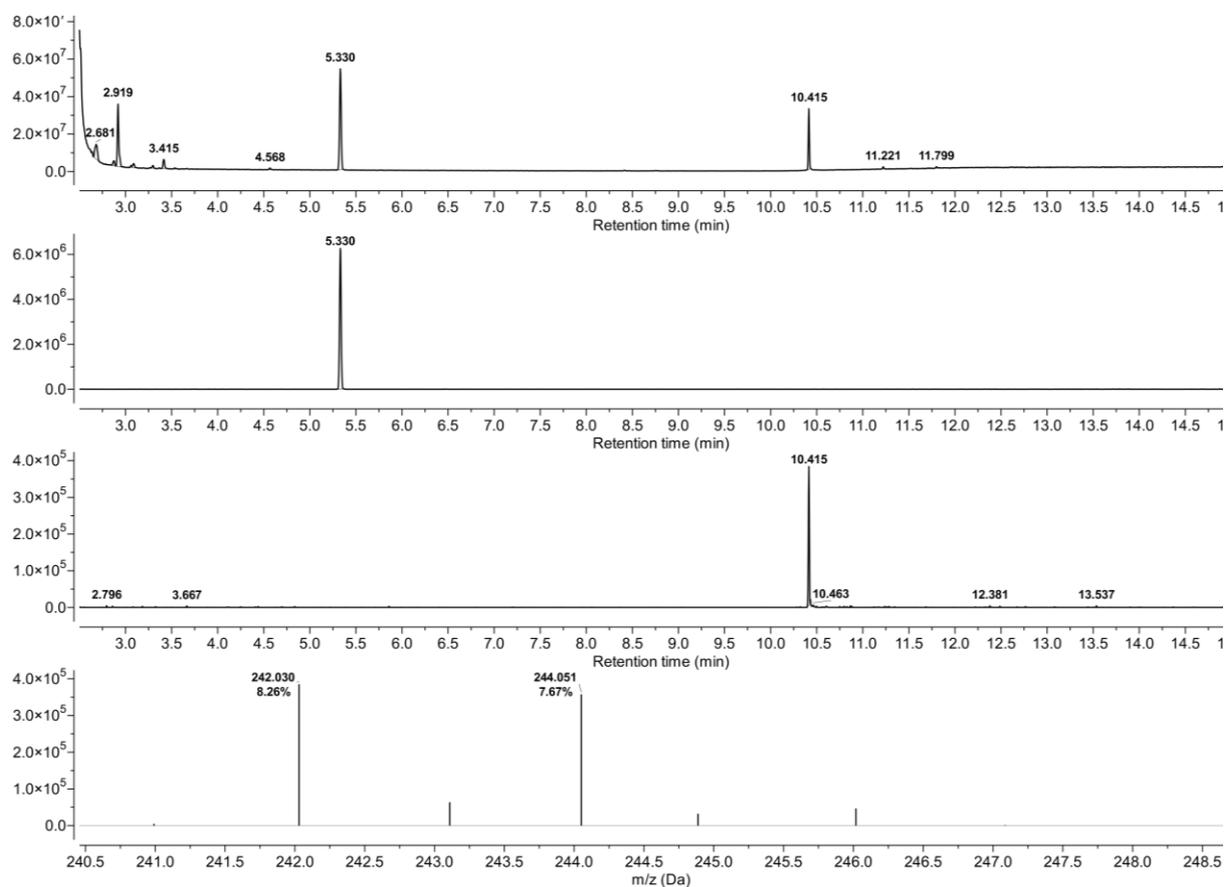
	Bromierung	Chlorierung
Umsatz Thymol [%]	>90	80

Die Chlorierung von Thymol (**56**) in Anwesenheit von Kaliumchlorid zeigte ebenfalls die Bildung der drei erwarteten Chlorierungsprodukte. Mit 80 % lag diese aber unter dem Umsatz der enzymatischen Bromierungsreaktion (>90 %). Auffällig war zudem die identische Regioselektivität zwischen beiden Halogenierungen. Die bevorzugten Produkte waren die 4-Halo-Thymole **57** und **60**, gefolgt von den

6-Halo-Thymolen **58** und **61** und Di-Halo-Thymolen **59** und **62**. Bei längeren Inkubationszeiten wurde auch die vermehrte Bildung der Di-Halo-Thymole **59** und **62** beobachtet. Damit scheint die Halogenierung mit Haloperoxidasen den Regeln der chemischen Halogenierung mit elektrophilen Spezies wie NBS/NCS zu folgen. Dies steht in Einklang zu dem postulierten Mechanismus der Bildung elektrophiler Halogenierungsagenzien wie hypohalogeniger Säure durch die Enzyme, welche die eigentliche Halogenierung des aromatischen Substrats durchführen (siehe Kapitel 2.4.2).

### 3.6.3 HPO-vermittelte O-Methylierung von Thymol

Zur weiteren Optimierung der Reaktivität von HPOs wurde der Einsatz von Detergenzien untersucht. Hier konnte von Naapuri *et al.* gezeigt werden, dass der Einsatz des Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) als Phasentransferkatalysator zu hohen Ausbeuten aufgrund der Löslichkeitserhöhung der eher wasserunlöslichen Substrate führt.<sup>[238]</sup> Aus diesem Grund wurde der Umsatz von Thymol (**56**) in Anwesenheit des Detergens CTAB untersucht. Unter Beibehaltung der optimierten Reaktionsbedingungen (siehe Kapitel 3.6.2) wurde dabei ein neues Signal im GC-MS Chromatogramm beobachtet (siehe Abbildung 77).

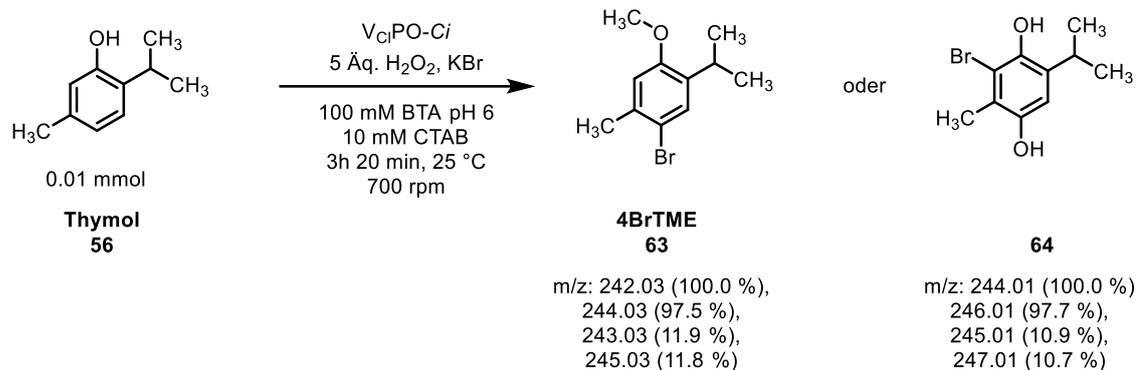


**Abbildung 77: GC-MS-Chromatogramm der  $V_{Ci}PO$ - $C_i$ -katalysierten Umsetzung von Thymol (**56**) in Anwesenheit von 10 mM CTAB**

Von oben nach unten: Roh-Chromatogramm; isoliertes Chromatogramm des IS; isoliertes Chromatogramm der unbekannten Verbindung mit einer Masse von 242.03; Massenspur des Signals bei 10.415 min.

Das Massenspektrum des beobachteten Signals bei 10.4 min warf dabei Fragen bezüglich des Ursprungs dieses Signals auf. Für die detektierte Molekülmasse von 242.03 m/z konnten ausgehend von Thymol (**56**) zwei potenzielle Strukturen formuliert werden. Mithilfe der m/z-Vorhersage in

ChemDraw (PerkinElmer Informatics) wurden die Massensignale mit den experimentell bestimmten verglichen (siehe Abbildung 78).



### Abbildung 78: Potenzielle Moleküle, die dem GC-MS-Signal bei 10.4 min zugrunde liegen können

Die vorhergesagten m/z-Signale wurden mit Hilfe des integrierten Werkzeugs in ChemDraw (PerkinElmer Informatics) bestimmt. Die detektierte Masse von 242 m/z korrespondiert mit dem monobromierten Produkt 4-Br-Thymol **63** und einer zusätzlichen Methylgruppe, die als Methoxygruppe vorliegen könnte, oder mit dem 6-Br-Thymol **64**, das an der 4-Position hydroxyliert wurde.

Die erhaltene Masse von 242 m/z kann prinzipiell für die Anwesenheit eines O-methylierten und einfach bromierten Produktes oder eines doppelt hydroxylierten monobromierten Produktes sprechen. Im Vergleich der vorhergesagten m/z-Signale mit den experimentell bestimmten wird deutlich, dass das vorhergesagte Intensitätsmuster des O-methylierten Produktes nahezu vollständig mit dem experimentellen Datensatz übereinstimmt. Nach Messung der kommerziellen Referenz dieses 4-Bromthymolmethylether (4BrTME **63**) konnte die Identität des Moleküls per GC-MS und  $^1H$ -NMR-Analyse bestätigt werden (siehe Kapitel 5.7.18). Somit scheint unter den gegebenen Bedingungen eine O-Methylierung von 4BrThymol **57** zu erfolgen. Bisher gibt es allerdings keine Erkenntnisse dafür, dass Haloperoxidasen Methylierungsreaktionen vermitteln können. Aus diesem Grund wurden Kontrollexperimente in An- und Abwesenheit des Enzyms mit CTAB als Detergens durchgeführt. Lediglich in Anwesenheit des Enzyms  $V_{ClPO-Ci}$  konnte die Bildung von 4BrTME **63** beobachtet werden.

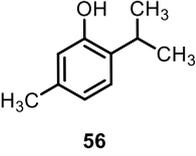
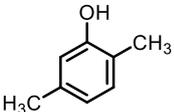
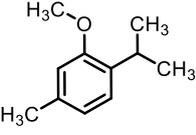
Mechanistisch betrachtet könnte die Bildung von 4BrTME **63** über zwei Wege ablaufen: Ein zweites Thymol-Molekül könnte in einer Umlagerungsreaktion eine der Methylgruppen der Isopropyleinheit wandern lassen und den Übertrag auf die OH-Gruppe des 4BrThymol **57** vermitteln. Dabei würde der apparente Umsatz des Thymols in der Reaktion steigen, da pro Molekül 4BrTME **63** zwei Thymol-Moleküle benötigt würden. Die Alternative wäre eine Methylgruppenübertragung durch Essigsäure, die als Gegenion im BTA-Puffer verwendet wird. Durch die hohe Abundanz des Moleküls wäre hier keine Limitation für die Methylierung gegeben. Ein Vergleich mit publizierten Synthesen für die Generierung von 4BrTME **63** aus 4BrThymol **57** offenbarte die Nutzung von elementarem Brom, Essigsäure und Natriummethylat oder die Nutzung von *meta*-Vanadat, Wasserstoffperoxid, Kaliumbromid und Perchlorsäure.<sup>[310, 311]</sup> Für beide Synthesen zeigen sich gleiche oder ähnliche Reagenzien wie die für die biokatalytische Halogenierung verwendeten.

Zur Untersuchung des Mechanismus sollte der Ursprung der Methylgruppe identifiziert werden. Hierfür wurden verschiedene Puffer bei verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Substraten in An- und Abwesenheit von CTAB getestet. Neben Thymol (**56**) sollte 2,5-Dimethylphenol **64** getestet werden, um den Ursprung der Methylgruppe auf die Isopropyleinheit des Thymols zurückzuführen. Als weiteres Substrat wurde der Thymolmethylether **65** (TME) verwendet, um eine Positivkontrolle einzuführen. Zur Validierung der Hypothese bezüglich der Rolle der Essigsäure als potenzieller

Methylgruppendonoren wurden MES-Puffer und Citratpuffer als Reaktionspuffer verwendet. Für die Auswertung der Versuche wurden die Reaktionsansätze (gemäß optimierter Bedingungen aus Kapitel 3.6.2) per GC-MS analysiert. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Detektion des 4BrTME **63**-Signals bei 10.4 min. Die Ergebnisse wurden in einer Übersicht zusammengefasst (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13: Übersicht der getesteten Bedingungen zur Identifizierung des Ursprungs der *O*-Methylierung für 4BrThymol **57****

Alle Reaktionen wurden in einem Milliliter mit 50 mM Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid mit 1 U  $V_{Cl}PO-Ci$  für 3h 20 min bei 700 rpm und 25 °C inkubiert. Die Extraktion erfolgte analog zu vorherigen Experimenten mit EtOAc in Anwesenheit des Kalibrierstandards *m*-Chlortoluol (5 mM). In den Chromatogrammen wurde nach dem Signal für 4BrTME **63** (10.4 min) bzw. dem analogen Signal für 2,5-DMP **64** gesucht und unabhängig von der Signalintensität notiert. Ausschlaggebend war ein Vergleich der Spektren mit der Probe bei pH 6 in BTA-Puffer ohne Zusatz von CTAB.

Substrat [10 mM]	Puffer [100 mM]	pH	CTAB [mM]	<i>O</i> -Methylierung am bromierten Produkt
<b>Thymol (56)</b>  <b>56</b>	Citrat	5	-	Nein
	Citrat	5	10	Ja
	BTA	5	-	Nein
	BTA	5	10	Ja
	BTA	6	-	Ja
	BTA	6	10	Ja
	MES	6	-	Nein
	MES	6	10	Ja
<b>2,5-DMP 64</b>  <b>64</b>	BTA	6	-	Ja
	BTA	6	10	Ja
	MES	6	-	Ja
	MES	6	10	Ja
<b>TME 65</b>  <b>65</b>	BTA	6	-	Ja
	BTA	6	10	Ja

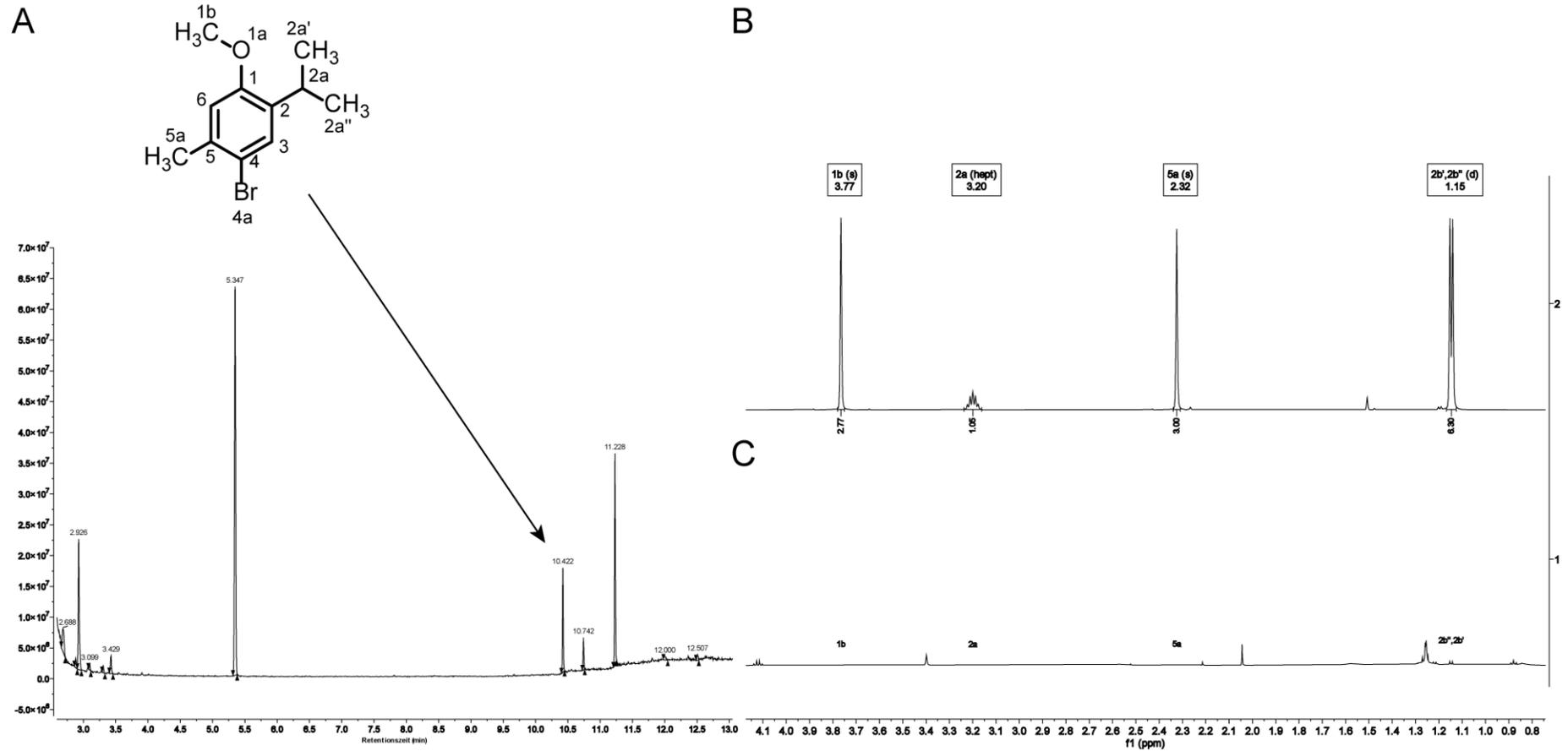
Für einige Ansätze zeigte sich eine Abhängigkeit von CTAB für die Bildung von 4BrTME **63**. Ausnahmen bildeten die Umsetzung in BTA (pH 6) bei Thymol (**56**) und 2,5-DMP **64** als Substrat, bei denen ein Signal für das *O*-methylierte Produkt in Abwesenheit von CTAB detektiert wurde. Neben Thymol (**56**) zeigte damit auch 2,5-DMP **64** das entsprechende *O*-methylierte Nebenprodukt der Bromierungsreaktion durch  $V_{Cl}PO-Ci$ , während für TME **65** als Substrat 4BrTME **63** nachgewiesen werden konnte. Somit scheint die Methylgruppe nicht von einem weiteren Thymol-Molekül zu stammen, sondern einen anderen Ursprung zu besitzen. Im Vergleich der Puffersysteme konnte sowohl in MES als auch in Citrat ebenfalls die Bildung von 4BrTME **63** beobachtet werden. Somit schien Essigsäure nicht als Methylgruppendonor relevant zu sein. Da das Enzym jedoch in Assaypuffer gelagert wurde, ist in jedem der hier gezeigten Ansätze Essigsäure vorhanden. Im Rahmen dieses Experimentes kann daher die Rolle der Essigsäure nicht eindeutig geklärt werden. Die Rolle von CTAB scheint sich aber

mit der Hypothese als Löslichkeitshelfer zu bestätigen. Auch wenn es nicht zwingend notwendig ist, um 4BrTME **63** zu bilden, wurde das Nebenprodukt mehrheitlich in Ansätzen mit CTAB beobachtet, und diesen Fällen meist auch als stärkeres Signal im Vergleich zu Proben ohne Detergens (siehe Kapitel 5.7.18).

Um die Rolle der Essigsäure für die Reaktion eindeutig zu klären, wurde ein Deuterierungsexperiment mit vollständig deuterierter Essigsäure (d6-Essigsäure) durchgeführt. Über einen Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren sollte so der Ursprung der Methylgruppe bestimmt werden. Falls diese von Essigsäure stammt, würde im Vergleich der Spektren des deuterierten und nicht-deuterierten Ansatzes das Signal der Methoxygruppe nicht bzw. kaum sichtbar sein.

Es wurde vollständig deuterierter BTA-Puffer ( $\text{D}_2\text{O}$  und d6-Essigsäure), inklusive aller Stammlösungen, in einem Ansatz mit nicht-deuteriertem BTA-Puffer verwendet und analog zu vorherigen Läufen analysiert. Trotz Verwendung gleicher Ausgangslösungen konnte lediglich für den nicht-deuterierten Ansatz ein Signal für 4BrTME **63** detektiert werden. Eine Analyse per GC-MS zeigte, dass der deuterierte Ansatz mit Thymol (**56**) zu keinem messbaren Umsatz führte. Erst bei Inkubationen über 6 h konnten minimale Signale für die Bromierungsprodukte 4BrThymol **57** und 6BrThymol **58** detektiert werden, jedoch nicht für 4BrTME **63**. Die Nutzung deuterierter Puffer scheint somit die Aktivität von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* massiv zu beeinflussen. Nach Einsatz der dreifachen Enzymmenge (3 U, 0.216 mol%) unter Beibehaltung aller sonstigen Parameter konnte ein Signal für 4BrTME **63** detektiert werden. Nach Aufbereitung der Probe für eine NMR-Analyse zeigte sich kein Signal für die Methylgruppe der Methoxygruppe (siehe Abbildung 79, vergleiche mit NR-Daten aus Kapitel 5.7.18).

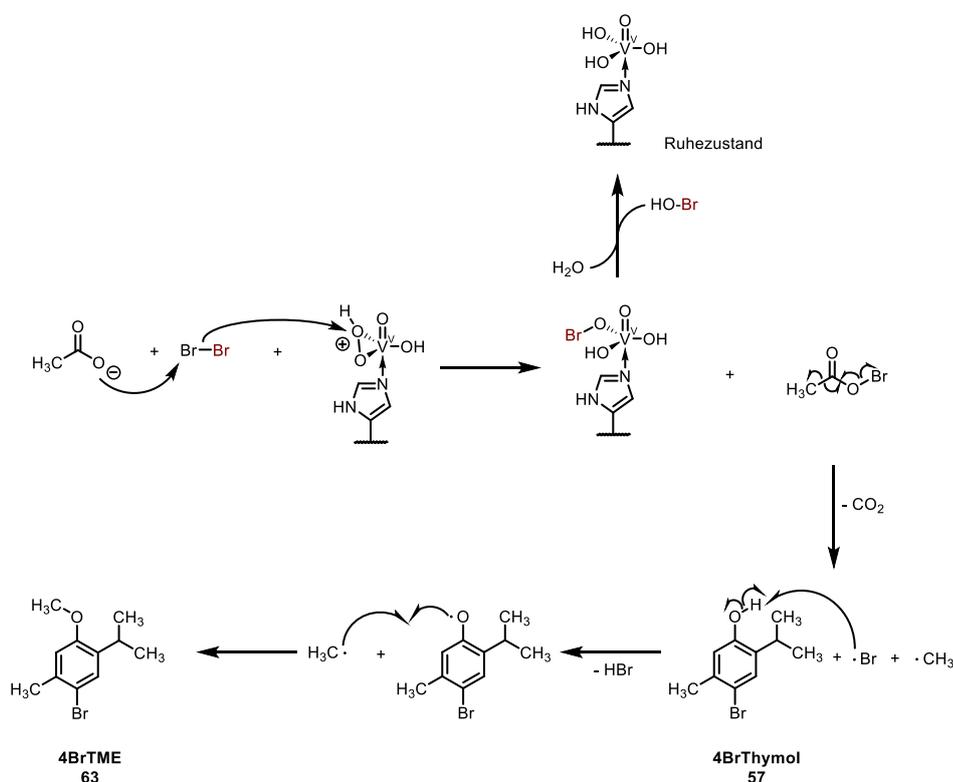
## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 79: Deuterierungsversuch zur Identifikation des Methylgruppendonors von 4BrTME 63**

**A:** GC-MS-Chromatogramm der Umsetzung von Thymol (**56**) mit  $V_{Cl}PO-Ci$  in Anwesenheit von CTAB in deuteriertem BTA-Puffer. **B:**  $^1H$ -NMR-Spektrum der kommerziellen Referenz für 4BrTME **63**. **C:**  $^1H$ -NMR-Spektrum des deuterierten Ansatzes aus A. Die Kohlenstoffatome wurden durchnummeriert und für die Zuweisung der  $^1H$ -NMR-Signale verwendet.

Durch die Anwesenheit der anderen Produkte, 4BrThymol **57** und DiBrThymol **59**, sind die nicht-deuterierten Gruppen wie 2a' und 2a'' nur knapp über dem Hintergrundsignal sichtbar, da die Signalintensität der beiden reinen Halogenierungsprodukte zu dominieren scheint. Dennoch sind die Signale der Isopropylgruppe im  $^1\text{H}$ -Spektrum sichtbar, während das Signal der Methoxygruppe zu fehlen scheint. Das  $^{13}\text{C}$ -Spektrum des Ansatzes zeigte aufgrund der geringen Mengen und fehlenden Isolation des Produktes keine klaren Signale (siehe Kapitel 5.7.18, Abbildung 111). Allerdings stimmte das Massenspektrum für die deuterierte Methoxygruppe des 4BrTME **63** mit der Vorhersage überein (siehe Kapitel 5.7.18, Abbildung 110). Somit scheint die Methylgruppe von der Essigsäure übertragen zu werden. Da die gängigsten Methylierungsreaktionen über radikalische Mechanismen verlaufen, wurde ein möglicher Mechanismus, basierend auf einer radikalischen Reaktion, für die HPO-vermittelte *O*-Methylierung von 4BrThymol **57** postuliert (siehe Abbildung 80).



**Abbildung 80: Mechanistischer Vorschlag für die Haloperoxidase-vermittelte *O*-Methylierung von 4BrThymol **57****

Der Mechanismus verläuft in diesem Beispiel radikalisch und ist an die Hunsdieker- bzw. Kochi-Reaktion angelehnt.<sup>[312]</sup> Im ersten Schritt findet eine heterolytische Spaltung von elementarem Brom statt. Das Brom stammt dabei von der Haloperoxidase, die neben hypohalogenigen Säuren in geringen Mengen auch elementare Halogene erzeugen kann.<sup>[234, 296]</sup> Das Bromidion addiert wie üblich an das Cycloperoxo-Intermediat des Vanadats im aktiven Zentrum der Haloperoxidase und führt zur bekannten Oxidation des Bromids zu hypobromiger Säure (siehe Kapitel 2.4.2). Das positiv geladene Bromonium wird nukleophil von deprotonierter Essigsäure angegriffen, sodass Bromessigsäure entsteht. Diese kann dann durch eine Radikalisierung, vermittelt durch das Enzym oder Licht, zu Kohlenstoffdioxid und je einem Brom- und Methylradikal zerfallen. Das Bromradikal könnte in einem Folgeschritt die freie OH-Gruppe des 4BrThymol **57** angreifen und dabei ein Sauerstoffradikal erzeugen, während Bromwasserstoff gebildet wird. Im letzten Schritt würde das Methylradikal mit dem Sauerstoffradikal kombiniert und zum beobachteten Endprodukt, 4BrTME **63**, umgesetzt werden.

Der Methylgruppentransfer könnte dabei über die Bildung von Bromessigsäure laufen, die dann in einer radikalischen Reaktion decarboxyliert wird und 4BrThymol **57** zu 4BrTME **63** und

Bromwasserstoff umsetzt. Der hier vorgeschlagene Mechanismus lässt dennoch einige Fragen offen. Zentraler Schritt wäre in diesem Fall die Radikalbildung der Bromessigsäure, die hier enzymabhängig eventuell durch das Vanadat oder lichtabhängig stattfinden könnte. Da die Reaktionen zwar innerhalb eines Reaktionsgefäßschüttlers lichtgeschützt inkubiert wurden, aber für die Pipettierschritte mit Licht in Kontakt kommen, kann Lichtenergie als Radikalstarter nicht ausgeschlossen werden. Für Vanadium sind bisher lediglich Radikalmechanismen bekannt, bei denen freie OH-Radikale gebildet werden können.<sup>[313]</sup> Für vanadiumabhängige Haloperoxidasen konnte eine Radikalbildung mit  $V_{Cl}PO-Ci$  für 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) beobachtet werden.<sup>[314]</sup> Diese Indizien zeigen, dass die Bildung von 4BrTME **63** tatsächlich eine radikalische Nebenreaktion des Vanadat-Coenzym sein könnten. Falls zutreffend, könnte hier auch ein OH-Radikal Bromessigsäure zu Kohlenstoffdioxid, hypobromiger Säure und einem Methylradikal zerfallen lassen. Für beide Fälle würde aber eine strikte Konzentrationsabhängigkeit der Radikalrekombination gelten, die über entsprechende Konzentrationsvariationen innerhalb einer Reaktionskinetik nachweisbar sein sollten.

Eine Alternative zum radikalischen Mechanismus stellt die Generierung eines Methylkations dar. Methylkationen lassen sich allerdings nur unter Verwendung stark polarisierter Verbindungen wie SAM generieren und scheinen im Rahmen dieser Reaktionszusammensetzung besonders unwahrscheinlich. Eine ähnliche Reaktion mit einem solchem Mechanismus ist für  $V_{Cl}PO-Ci$  beschrieben. Dabei wurden jedoch Zimtsäure und Derivate einer decarboxylierenden Bromierung in einer Hunsdiecker-ähnlichen Reaktion unterzogen.<sup>[315]</sup> Da im Fall von Thymol (**56**) keine  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Bindung vorliegt, kann dieser Mechanismus nicht berücksichtigt werden. Vielmehr sprechen die Arbeiten von Li *et al.* für die Generierung der intermediären Bromessigsäure, die dann eine Decarboxylierung erfährt und zu den postulierten Radikalen zerfällt.

Im hier gezeigten mechanistischen Vorschlag wäre die eingesetzte Säure austauschbar, da die Methylierung über das entsprechende Radikal nach der Decarboxylierung erfolgen würde.

Als zusätzliches Experiment wurde deshalb statt Essigsäure Propionsäure als Säure im Bis-TRIS-Puffer verwendet (BTP). Bei diesem Versuch konnte allerdings kein entsprechendes ethyliertes (oder methyliertes) BrThymol-Signal detektiert werden. Ob der Transfer von Kohlenwasserstoffgruppen nur auf Methylgruppen beschränkt ist oder Propionsäure im Gegensatz zu Essigsäure keine radikalische Reaktion unter diesen Bedingungen eingehen kann, bleibt unklar. Vorerst kann die O-Methylierungsaktivität von  $V_{Cl}PO-Ci$  lediglich auf Essigsäure zurückgeführt werden.

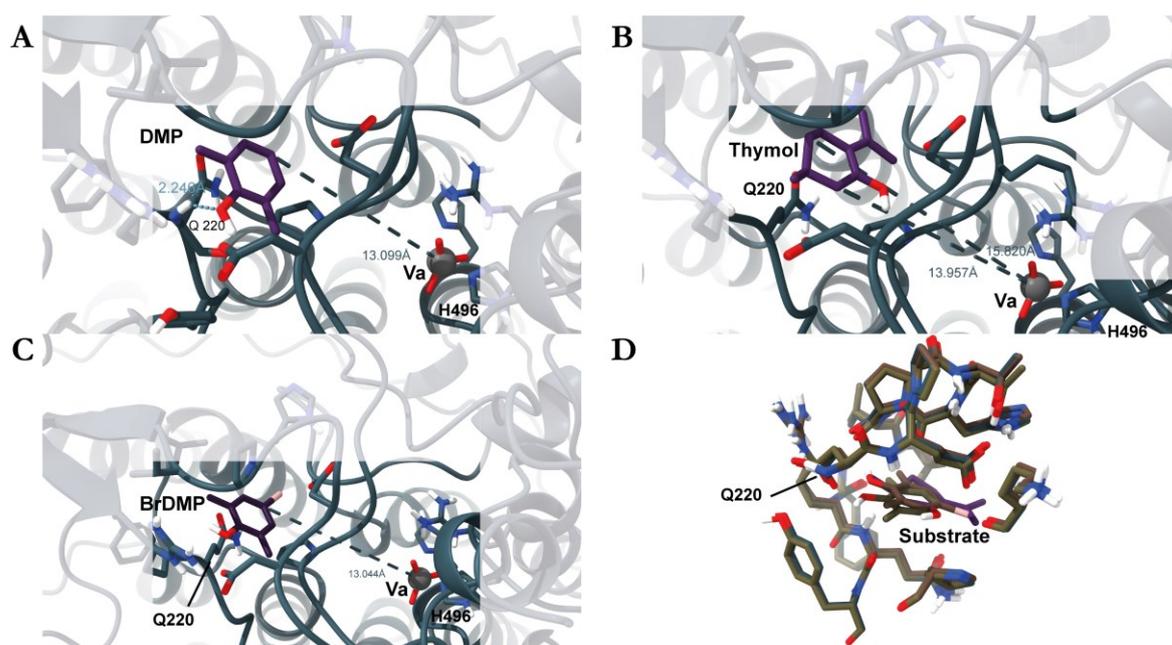
Bei der Suche nach geeigneten Testreaktionssystemen für vanadatabhängige Haloperoxidasen konnte ein Thymol-basiertes System für  $V_{Cl}PO-Ci$  adaptiert und optimiert werden. Zusätzlich konnten durch Untersuchung verschiedener Testreaktionssysteme (basierend auf DMP (**51**) oder Thymol (**56**)) verschiedene Nebenaktivitäten von  $V_{Cl}PO-Ci$  beobachtet werden. Durch systematische, experimentelle Studien konnten die zugrundeliegenden Mechanismen der beobachteten Oxidations- bzw. O-Methylierungsreaktionen postuliert werden.

### 3.7 Modifikation der Regioselektivität von V<sub>Cl</sub>PO-Ci

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte keine Regioselektivität der Halogenierung abseits der chemischen Vorhersage durch V<sub>Cl</sub>PO-Ci festgestellt werden. Da die Regioselektivität der Halogenierung fixiert zu sein scheint, wurden zwei Hypothesen untersucht, mit denen die Regioselektivität des Enzyms adaptiert werden sollte. Diese Methoden umfassen ein rationales Design des aktiven Zentrums der V<sub>Cl</sub>PO-Ci und die Verwendung alternativer Übergangsmetalle als Coenzyme. Hierfür wurde zuerst eine mögliche Substratbindetasche in V<sub>Cl</sub>PO-Ci mittels *docking*-Studien gesucht.

#### 3.7.1 Molekulare *docking*-Studie zur Suche nach Substratbindetaschen in V<sub>Cl</sub>PO-Ci

*Docking* beschreibt die bioinformatische Analyse möglicher Bindungsstellen eines Liganden an eine Zielstruktur, in den meisten Fällen an ein Protein. Mit Hilfe dieser Analysen kann die Wirksamkeit eines Wirkstoffs oder die Affinität eines Substrats zum Enzym abgeschätzt und für detailliertere Anpassungen verwendet werden.<sup>[316, 317]</sup> Als Grundlage für ein mögliches Design einer regioselektiven HPO wurde eine *docking*-Studie mit dem HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*)-Webserver durchgeführt.<sup>[318, 319]</sup> Dafür wurden verschiedene Modellsubstrate verwendet, die an beliebigen Positionen im Enzym gebunden werden sollten. Die besten Ergebnisse des jeweiligen *dockings* wurden zwischen allen Substraten verglichen (siehe Abbildung 81).



**Abbildung 81: Ergebnisse des molekularen *dockings* von DMP (51), Thymol (56) und BrDMP 52 mit HADDOCK**

Das *docking* wurde mit Hilfe des Webserver der *docking*-Software HADDOCK durchgeführt.<sup>[318, 320]</sup> Hierbei wurden Parameter zur Bindung niedermolekularer Liganden an Proteinstrukturen verwendet (siehe Kapitel 5.5.2). Als Vorlage für die Proteinstruktur diente die Kristallstruktur der V<sub>Cl</sub>PO-Ci (PDB-Code: 1VNC) mit Vanadat-Cofaktor (Kugelmodell). Die erhaltenen Strukturen mit Substrat wurden anhand ihres Z- und HADDOCK-scores gewertet. Für die Substrate DMP (51) (A), Thymol (56) (B) und BrDMP 52 (C) wurde das Cluster mit dem jeweiligen besten Wert als Vergleichsstruktur verwendet. Alle drei Substrate wurden in einer überlagerten Ansicht (D) innerhalb der putativen Bindungstasche dargestellt.

Um falsch-positive Ergebnisse im *docking* zu identifizieren, wurden zwei im Vergleich größere Verbindungen, der Indolalkaloid-Naturstoff Physostigmin und das Tripyrrol-Alkaloid Prodigiosin, die im Arbeitskreis Ziel verschiedener chemischer und enzymatischer Umsetzungen sind, als Kontrollsubstrate verwendet. Im Vergleich zeigte sich die Bindung kleinerer Substrate wie DMP (**51**) und Thymol (**56**) an derselben Stelle im Enzym, während die Bindung großer Substrate wie Physostigmin oder Prodigiosin außerhalb des Enzyminneren erfolgte. Die Bindung an die Außenseite des Enzyms sollte hierbei eher als Signal für eine schlechte oder keine Bindung an das Enzym zu deuten sein. Die Bindung für DMP (**51**), Thymol (**56**) und BrDMP **52** erfolgte in allen Fällen in einer *loop*-Region (D195-V201, R219-Y221, P395-P396), bei der alle Substrate in etwa einen Abstand von 14 bis 16 Å zum aktiven Zentrum des Enzyms besitzen. Auffällig war hierbei die unterschiedliche Orientierung der OH-Gruppe von DMP und BrDMP **52** im Vergleich zu Thymol. Während für Thymol (**56**) die OH-Gruppe in Richtung des Vanadat-Ions zeigt, liegt sie auf der gegenüberliegenden Seite für DMP (**51**) und BrDMP **52**. Mit Hilfe von ChimeraX wurden Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücke) und van der Waals (vdW)-Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym mit Hilfe der integrierten Werkzeuge untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Übersicht der ermittelten *docking*-Parameter und Wechselwirkungen zwischen den Substraten DMP (**51**), BrDMP **52** und Thymol (**56**) und  $V_{Cl}PO-Ci$  aus dem molekularen *docking* mit HADDOCK**

Der HADDOCK-*score* ist ein grobes Maß für die Qualität des *dockings*, wobei negative Werte für ein gutes Ergebnis sprechen. Wasserstoffbrückenbindungen und vdW-Kontakte wurden mit den integrierten Algorithmen unter Standardbedingungen von ChimeraX identifiziert.

Substrat	HADDOCK-score	H-Brücke	vdW-Kontakte
DMP	-22.6	Q220-NH und OH-DMP	91
BrDMP 52	-25.7	keine	95
Thymol	-24.1	keine	113

Der HADDOCK-*score* korreliert dabei mit der freien Bindungsenergie  $\Delta G$  und kann somit eine grobe Einordnung über die potenzielle Bindungsaffinität zwischen Protein und Ligand liefern.<sup>[321]</sup> Mit Werten im Bereich von -20 deuten diese Ergebnisse auf eine eher schwächere Bindungsaffinität hin. Obwohl alle Substrate in derselben Bindungstasche liegen, wurde nur eine schwache Wasserstoffbrückenbindung für DMP (**51**) gefunden. Diese wird zwischen dem Amidproton von Q220 und dem Hydroxylsauerstoff von DMP (**51**) ausgebildet und hat einen Abstand von etwa 2.25 Å. Damit ist diese Bindung in die Gruppe der schwächeren Wasserstoffbrückenbindungen einzuordnen. Für BrDMP **52** und Thymol konnten keine potenziellen H-Brücken ermittelt werden. Bei der Anzahl der vdW-Kontakte lagen DMP (**51**) und BrDMP **52** ungefähr gleich (91 bzw. 95), während Thymol (**56**) mit 113 potenziellen Kontakten deutlich mehr Wechselwirkungen aufwies.

Die ermittelten Vorhersagen deuten auf eine entscheidende Rolle von vdW-Wechselwirkungen bei der möglichen Substratbindung an  $V_{Cl}PO-Ci$  hin. Da diese bei der Bindung großer Substrate zu größeren Abstoßungen und damit einer stärkeren konformationellen Änderung des Enzyms führen können, binden deshalb auch Substrate wie Physostigmin und Prodigiosin nicht in dieser putativen Tasche, sondern lediglich an der Außenseite des Enzyms. Mit einem Abstand von 13 Å der möglichen Halogenierungsstelle für DMP (**51**) und ca. 14 und 16 Å für die Halogenierungsstellen für Thymol (**56**) liegen die Substrate allerdings weit entfernt vom aktiven Zentrum, um mögliche Selektivitäten zu beobachten. Hier wäre die Rotationsfreiheit der Substrate innerhalb der Bindungstasche entscheidend,

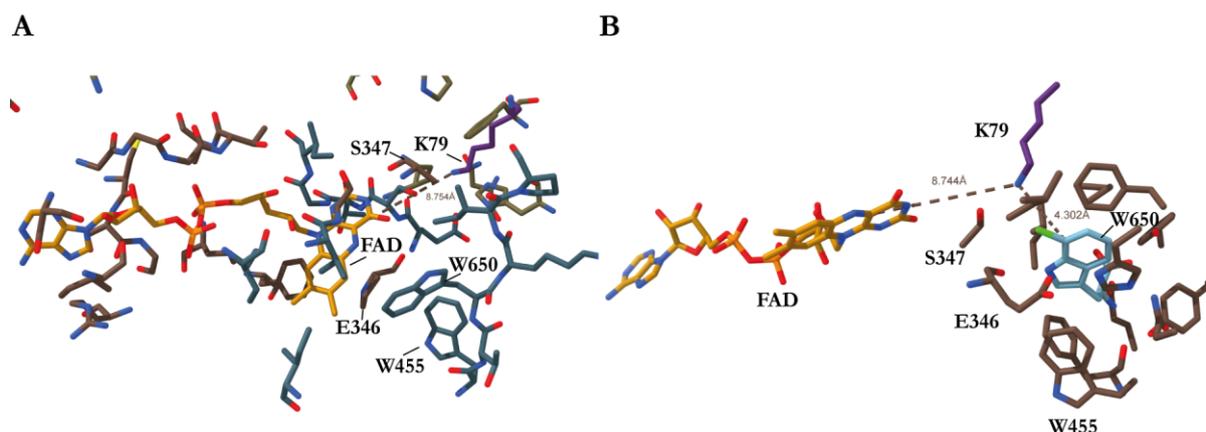
da eine Arretierung des Substrats eine Regioselektivität herbeiführen könnte. Da im Fall von Thymol allerdings keine ausgeprägten Regioselektivitäten beobachtet werden konnten, scheint die mögliche Bindung der Substrate lediglich auf einer leichten Interaktion zu beruhen. Für BrDMP **52**, das eine enzyspezifische Nebenproduktbildung erfahren kann, wurden ähnliche Bindungen beobachtet wie bei DMP. Dies könnte die Ursache für die beobachtete Oxidation zu DMC (**54**) sein. Da für die *docking*-Studie der Vanadat-Cofaktor aus der Analyse ausgeschlossen werden musste, wäre eine Studie zur Bindung der Substrate direkt an Vanadat aufschlussreich. Erste Versuche mit dem Peroxo-Intermediat von V<sub>Cl</sub>PO-Ci (PDB-Code 1IDQ) zeigten mögliche Bindungen direkt am Cofaktor, wiesen allerdings auch Kollisionen auf, die mit angepassten *docking*-Parametern überwunden werden könnten. Diese detaillierteren *docking*-Studien wurden in Zusammenarbeit mit Nicola Porta (AG Gohlke, HHU Düsseldorf) begonnen.

Die putative Bindetasche für kleinere Substrate wie Phenolderivate (DMP (**51**), Thymol (**56**)) erlaubt ein rationales Design des Enzyms, um regioselektive Halogenierungen zu ermöglichen. Hierfür wurden zwei verschiedene Hypothesen aufgestellt und experimentell überprüft.

### 3.7.2 Mutagenese von V<sub>Cl</sub>PO-Ci zur Änderung der Regioselektivität

Ein wesentlicher Vorteil in der Halogenierung von Molekülen mit Haloperoxidasen könnte die Regioselektivität des Enzyms sein. Die meisten HPOs pilzlicher oder maritimer Herkunft weisen allerdings keine Regioselektivitäten auf, die über die elektrophiler Halogenierungsagenzien wie NCS/NBS hinausgehen. Eine Ausnahme scheinen wie eingangs beschrieben einige HPOs bakteriellen Ursprungs zu bilden (2.4.2). Mit Hilfe eines rationalen Proteindesigns sollte eine bestehende V-HPO mit fehlender ausgeprägter Regioselektivität kreiert werden. Hierfür wurde V<sub>Cl</sub>PO-Ci als molekulare Vorlage verwendet. Andere halogenierende Enzyme mit ausgeprägter Regioselektivität sind die flavinabhängigen Halogenasen (FAHs). Diese FMN/FAD-abhängigen Enzyme besitzen neben einer Bindestelle für das Coenzym eine weitere designierte Bindestelle für das Zielsubstrat (siehe Kapitel 2.3.3). Als entscheidender Faktor für die Regioselektivität wurde ein katalytisches Lysin identifiziert, das zwischen beiden Bindungsstellen liegt und als Halogenierungsagens dient.<sup>[120]</sup> Dabei wird hypohalogenige Säure vom FMN/FAD auf die terminale Aminogruppe des Lysins übertragen. Dieses halogenierte Lysin kann dann wiederum regioselektiv aromatische Systeme wie Tryptophane halogenieren (siehe Kapitel 2.3.3).

In einem ersten Schritt wurden die aktiven Zentren von V<sub>Cl</sub>PO-Ci und PrnA, einer FAD-abhängigen Halogenase, verglichen. Als Hauptkriterium wurde der Abstand des Lysins zum FAD-Cofaktor und Substrat in ChimeraX bestimmt (siehe Abbildung 82).



**Abbildung 82:** Darstellung des aktiven Zentrums der FAD-abhängigen Halogenase PrnA aus *Pseudomonas fluorescens*

FAD (orange) oxidiert während der Katalyse ein Chloridion mit molekularem Sauerstoff zu hypochloriger Säure. Diese wird vom katalytischen Lysin 79 (lila) abstrahiert, um Chlor-Lysin zu formen, welches im Anschluss regioselektiv Tryptophan 650 (türkis) an der 7-Position chloriert. **A:** Übersicht des aktiven Zentrums von PrnA (PDB-Code: 2AR8). **B:** Aktives Zentrum von PrnA nach Chlorierung von Tryptophan. Braun: Aminosäuren der Substratbindetasche. Der Abstand vom katalytischen Lysin 79 zur reaktiven Stelle von FAD beträgt 8.7 Å, und für die 7-Position von Tryptophan 650 4.3 Å.

Der Abstand zwischen der reaktiven Stelle des FAD und der terminalen Aminogruppe des Lysin79 beträgt etwa 8.7 Å. Für die 7-Position des Tryptophans 650 wurde eine Distanz von etwa 4.3 Å zur Aminogruppe des Lysins ermittelt.

Anschließend wurden Alanine in  $V_{Cl}PO-Ci$  ausgesucht, die in etwa diesen Abstand zum Vanadat-Cofaktor und zur putativen Bindungstasche besitzen. Hierbei lag der Fokus auf Alanin, da diese Aminosäure häufig keine katalytische Relevanz besitzt und nur wenig strukturelle Wechselwirkung mit anderen Residuen eingeht. Mit Hilfe des Werkzeugs *HotSpot Wizard* wurden alle Alanine in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum der  $V_{Cl}PO-Ci$  untersucht.<sup>[322]</sup> Dabei wurde keine vorhergesagte Änderung in der Katalyse festgestellt. Zur Identifikation geeigneter Positionen wurden mehrere Alanine in der Nähe zum Vanadat-Cofaktor zu Lysinen mit Hilfe von *ChimeraX in silico* mutiert.<sup>[323, 324]</sup> Dabei wurden Rotamere des Lysins gewählt, die wenige Kollisionen mit umliegenden Aminosäuren aufweisen und in etwa den gewünschten Abstand zum Vanadat-Cofaktor aufzeigen. Hierbei wurden Alanin51 und Alanin383 als potenzielle Mutagenese-Kandidaten identifiziert. Nach der Auswahl geeigneter Lysin-Rotamere wurden alle Kollisionen mit anderen Aminosäuren bestimmt und anschließend mit dem *minimize*-Werkzeug auf ein Minimum reduziert (siehe Kapitel 5.5.3). Ziel war hierbei die Anzahl der Kollisionen auf 0 zu reduzieren, um zu prüfen, dass die Mutante nicht zu einem vollständigen Aktivitätsverlust durch strukturelle Fehlfaltung des Enzyms führt. Die Ergebnisse dieser *in silico*-Mutagenese sind in Tabelle 15 zusammengefasst (siehe Tabelle 15).

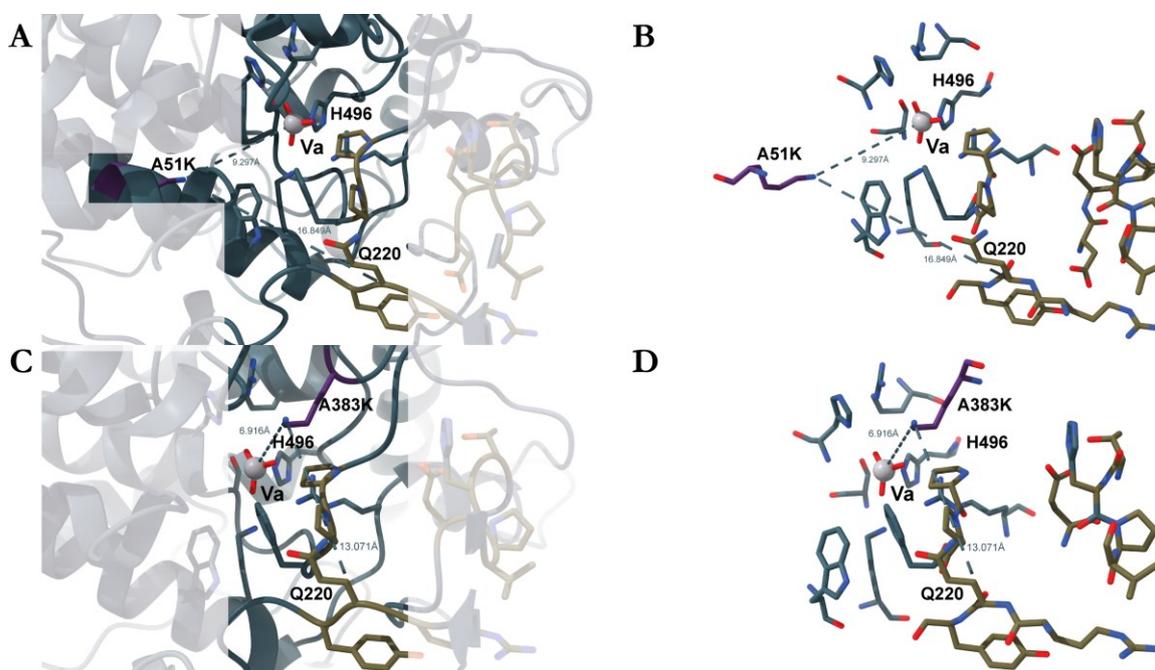
**Tabelle 15: Übersicht der relevanten Parameter bei der *in silico*-Mutagenese von Alanin51 und Alanin383 zu Lysin**

Alle Schritte wurden mit den implementierten Chimera-Werkzeugen „Rotamers“, „Contacts & Clashes“, „Distances“ und „Minimize“ durchgeführt. Ausführliche Beschreibungen zur Durchführung sind dem Experimentaltel zu entnehmen (siehe Kapitel 5.5.3). Für die Mutagenese wurde die Kristallstruktur 1VNC für V<sub>Ci</sub>PO-Ci und 2ARD und 2AR8 für PrnA ohne und mit Chlortryptophan verwendet.

Mutante	Rotamer [Winkel Chi 1-4 in °]	Kollisionen vor Energie- minimierung	Benötigte Mi- nimierungs- schritte	Distanz zum Vanadat [Å]	Distanz zur putativen Substratbindestelle* [Å]
A51K	67.0 175.9 70.7 173.4	14	100	9.3	16.8
A383K	-64.1 176.1 77.6 -73.6	10	40	6.9	13.1

\*siehe Kapitel 3.7.1

Zusätzlich wurden die finalen Strukturen mit ChimeraX visualisiert und miteinander verglichen (siehe Abbildung 83).



**Abbildung 83: Darstellung der generierten Mutanten A51K (A & B) und A383K (C & D) von V<sub>Ci</sub>PO-Ci**

Die Strukturen wurden als PDB-Datei nach der Optimierung der Struktur durch das „*minimize*“-Werkzeug von ChimeraX generiert. Lila: mutiertes Lysin. Braun: putative Substratbindestasche. **A & C:** Darstellung der Tertiärstruktur des Proteins in der Cartoon-Darstellung. **B & D:** relevante Aminosäuren für die Katalyse und putative Bindung des Substrats. Der Abstand zur Substratbindestasche wurde anhand des C- $\alpha$ -Atoms von Q220 bestimmt.

Für die Mutante A51K konnte ein Abstand von ca. 9,3 Å zum Vanadat-Cofaktor festgestellt werden. Für A383K lag dieser bei etwa 6,9 Å. Für beide Mutanten konnte eine Struktur nach Energieminimierung des Gesamtproteins erhalten werden, in dem keine Kollisionen ermittelt werden konnten. Im Vergleich zu PrnA mit einem Abstand von 8,7 Å zwischen den katalytisch aktiven Resten liegt die Mutante A51K nur um 0,6 Å weiter entfernt, während bei K383 die Reste 1,8 Å näher zusammen liegen. Für die putative Bindestasche in V<sub>Ci</sub>PO-Ci liegen beide Mutanten mit etwa 17 und 13 Å weit über dem Abstand von K79 und Tryptophan in PrnA (4,3 Å). Inwieweit eine konformationelle Änderung von V<sub>Ci</sub>PO-Ci während der Katalyse diesen Abstand verringern kann, bleibt mit diesen

Untersuchungen ungeklärt. Beide Mutanten weisen aber keine grundlegenden Probleme hinsichtlich der Konformation des Proteins im Vergleich zur Wildtyp-Struktur auf, sodass die Mutagenese experimentell durchgeführt wurde.

Hierfür wurde eine *QuickChange*-artige PCR als zielgerichtete Mutagenesestrategie verwendet.<sup>[325]</sup> Dabei wurde die gewünschte Mutation in das Zentrum der verwendeten Primer eingesetzt und mit einer definierten Anzahl flankierender Basen ausgestattet (siehe Kapitel 5.2.5). Das jeweilige Konstrukt wurde verwendet, um *E. coli* DH5 $\alpha$  zu transformieren. Zur Überprüfung der neuen Konstrukte wurden zehn Klone pro Mutante als Flüssigkulturen angezogen und die daraus isolierten Plasmide sequenziert und auf die gewünschte Mutante untersucht. Hierbei wurde für beide Mutanten eine Erfolgsrate von 30 % bestimmt. Die erfolgreich getesteten Konstrukte wurden analog zum Wildtyp-Enzym im größeren Maßstab (500 mL) kultiviert und das Protein isoliert. Aus den isolierten Proben wurden die Proteinkonzentration und HPO-Aktivität bestimmt, nachdem eine Inkubation mit Natrium-*ortho*-Vanadat erfolgte. Nach der Aktivitätsbestimmung wurde die Bromierung von Thymol (**56**) unter angepassten Bedingungen (3.6.2) vergleichend zwischen Wildtyp, K51 (K70 im finalen Konstrukt, bedingt durch 6xHis-Strep-II-Tag) und K383 (K402 im finalen Konstrukt, bedingt durch 6xHis-Strep-II-Tag) durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Signalverteilung der einzelnen Bromierungsprodukte. Die Bromierung von DMP wurde aufgrund der Nebenproduktbildungen vernachlässigt (siehe Kapitel 3.6.1). Die Werte sind nachfolgend im Vergleich aufgezeigt (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: Vergleich der spezifischen Aktivität, des Umsatzes von Thymol (**56**) und Regioselektivität der Bromierung von V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* und der beiden Mutanten A51K und A383K**

	Wildtyp	A51K	A383K
<b>Spezifische Aktivität</b> [U · mg <sup>-1</sup> ]	6.30	0.08	0.18
<b>Umsatz Thymol</b> [%]	45.5	52.5	47.7
<b>Regioselektivität</b>	keine	keine	keine

Im Zuge der Aktivitätsbestimmungen konnte ein deutlicher Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp-Enzym festgestellt werden (Faktor 30 bis 100). Auch die Proteinausbeute lag für beide Mutanten weit unter den gewöhnlichen Ausbeuten für Wildtyp V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* (siehe Kapitel 5.7.19). Im Zuge der Isolation und weiteren Lagerung konnte zudem eine starke Präzipitation des Proteins beobachtet werden. Die Mutanten scheinen die Stabilität des Enzyms maßgeblich beeinflusst zu haben. Für die Bromierung von Thymol (**56**) wurden annähernd gleiche Umsätze detektiert, allerdings zeigte sich keine Änderung in der Regioselektivität des Enzyms, alle drei Bromierungsprodukte wurden in etwa gleichen Verhältnissen gebildet wie zuvor beobachtet. Inwieweit die eingeführten Lysine zu einer Störung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes innerhalb des Proteins führen, müsste mit einer ausführlichen Analyse der Interaktionspartner untersucht werden. Eine Erklärung für den Aktivitätsverlust könnte auch eine Ladungsverschiebung in der Nähe zum Vanadat-Cofaktor geben. Da Lysin mit dessen terminaler Aminogruppe unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung im Protein einführt, könnte eine Repulsion oder veränderte Ladungsverschiebung am aktiven Zentrum die Katalyse behindern. Alternativ könnte auch die Größe des Lysins bei der Katalyse hinderlich sein, da mit Chlorid und Bromid recht große Ionen ihren Weg zum Vanadat im aktiven Zentrum des Enzyms finden müssen. Eine weitere sperrigere Aminosäure könnte die Bindung des Halogenids oder sogar des Cofaktors selbst während der Beladung behindern.

Ein rationales Design einer regioselektiven HPO war somit nicht erfolgreich. Hier würde sich eine intensivere Mutagenesestudie anbieten, die für bestimmte Positionen im Enzym bereits publiziert wurde.<sup>[205]</sup> Ein rationales Design einer regioselektiven HPO war somit nicht erfolgreich. Hier würde sich eine intensivere Mutagenesestudie anbieten, die für bestimmte Positionen im Enzym bereits publiziert wurde.<sup>[205]</sup>

### Verwendung alternativer Coenzyme für V<sub>Cl</sub>PO-Ci

Neben der zielgerichteten Mutagenese des Enzyms sollten zur Steigerung der Regioselektivität alternativ auch andere Oxometallsäurespezies als Cofaktoren getestet werden. Hierfür wurden die Elemente innerhalb der gleichen Nebengruppe des Vanadiums, Niob und Tantal, ausgewählt. Diese wurden im Zuge einer Computer-gestützten Berechnung der Energiebarrieren während der Katalyse von V<sub>Cl</sub>PO-Ci als mögliche Coenzyme mit höherer Umsatzzahl identifiziert.<sup>[203]</sup>

Proben unbeladener V<sub>Cl</sub>PO-Ci wurden mit einer Spatelspitze Niobat und Tantalat aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit über Nacht inkubiert und mit einer gleichartigen Enzymprobe mit Vanadat verglichen. Auch hier diente die Bromierung von Thymol (**56**) als Referenzreaktion (siehe Tabelle 17).

**Tabelle 17: Vergleich der drei Oxometallsäuren Vanadat, Niobat und Tantalat als Cofaktoren für V<sub>Cl</sub>PO-Ci**

Drei Aliquots unbeladener V<sub>Cl</sub>PO-Ci wurden mit je einer Spatelspitze des jeweiligen Cofaktors über Nacht inkubiert. Der zentrifugierte Überstand wurde dann für eine Aktivitätsbestimmung sowie Umsetzung von Thymol (**56**) in Anwesenheit von Bromid verwendet. Zur Bestimmung der Regioselektivität wurden die Flächen der jeweiligen Produktsignale miteinander verglichen.

Metall	Vol. Aktivität [U mL <sup>-1</sup> ]	Umsatz Thymol (1 U V <sub>Cl</sub> PO-Ci) [%]	Umsatz Thymol (0.1 U V <sub>Cl</sub> PO-Ci) [%]	Regioselektivität
V	50.0	>90	56.2	keine
Nb	35.8	>90	70.7	keine
Ta	31.1	>90	60.1	keine

Für alle drei inkubierten Proben konnte eine HPO-Aktivität detektiert werden. Dabei lag die volumetrische Aktivität der Probe mit Vanadat mit 50 U · mL<sup>-1</sup> am höchsten, gefolgt von der Niobat- und Tantalat-inkubierten Proben. Für alle drei Cofaktoren wurde bei einer eingesetzten Menge von 1 U pro Ansatz ein nahezu vollständiger Umsatz von Thymol (**56**) beobachtet. Leerproben mit der jeweiligen Oxometallsäure ohne Enzym zeigten weder Aktivität im Assay noch detektierbare Umsätze für Thymol (**56**). Bei einer Menge von 0.1 U Enzym pro Ansatz wies die Niobat-haltige Probe den höchsten Umsatz mit 71 % auf, gefolgt von Tantalat mit 60 und Vanadat mit 56 %. In beiden Ansätzen konnte kein verändertes Produkt-Muster und damit keine Steigerung der Regioselektivität festgestellt werden.

V<sub>Cl</sub>PO-Ci scheint somit auch in Anwesenheit anderer Cofaktoren als Vanadat HPO-Aktivität zu besitzen. Das aktive Zentrum des Enzyms scheint somit nicht so selektiv für Vanadat zu sein, um keine anderen Metallspezies koordinieren zu können. Die höhere Umsatzrate bei geringen Enzymmengen für Niobat und Tantalat könnte auf andere Oxidationspotenziale der Metalle zurückzuführen sein.<sup>[46]</sup> Bei der Aktivitätsbestimmung im MeDAC-Assay wird vermutlich die Löslichkeit der Cofaktoren eine entscheidende Rolle gespielt haben. Da das eingesetzte Natrium-*ortho*-Vanadat eine sehr gute Löslichkeit im Wasser besitzt, erfolgt hier vermutlich eine wesentlich effizientere Beladung des Enzyms als bei den schwerlöslichen Lithium-Salzen des Niobats und Tantalats.

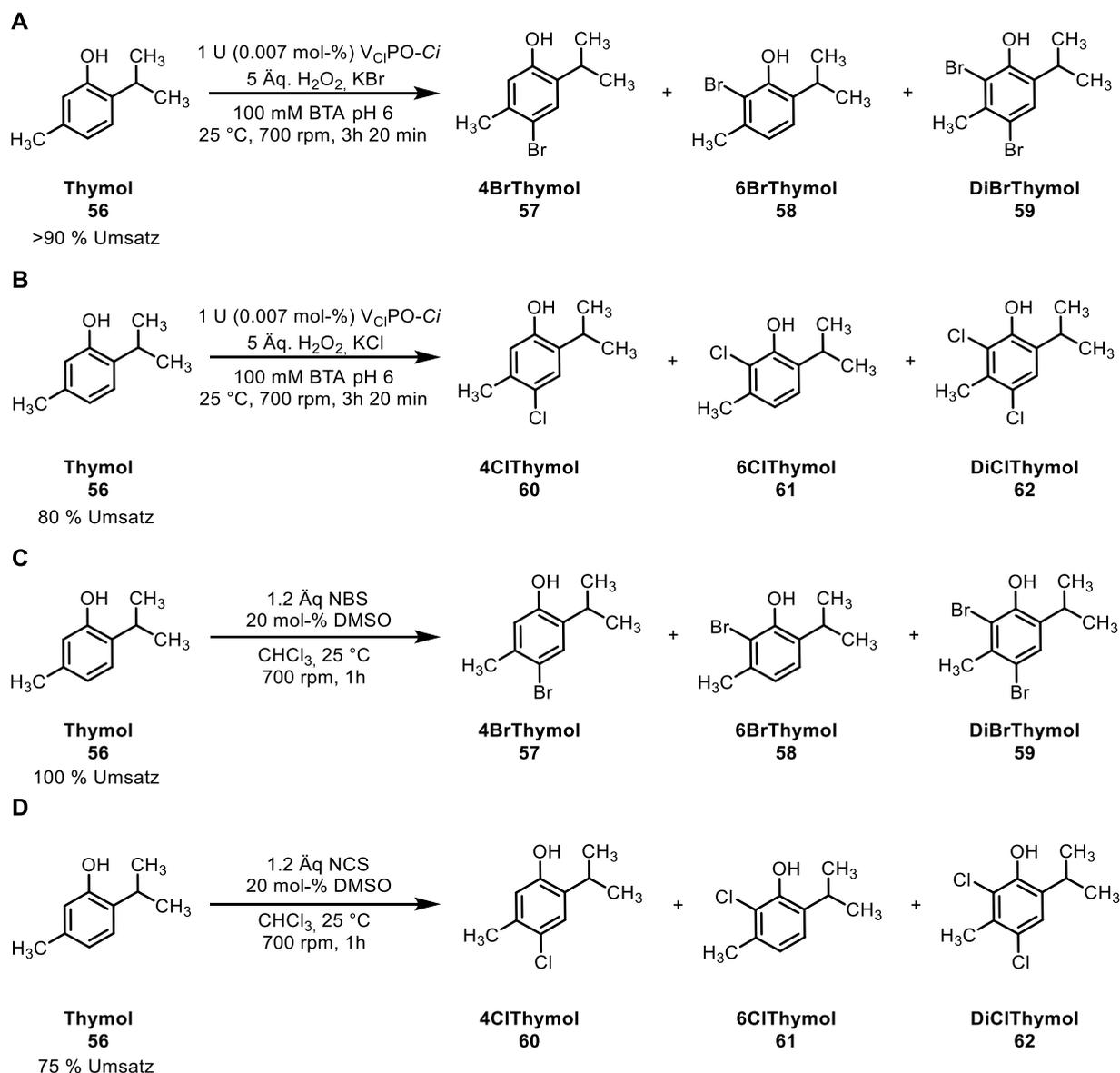
## Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend konnte die Regioselektivität der HPO aus *C. inaequalis* weder durch Mutagenesstudien noch durch Verwendung anderer Cofaktoren verändert werden. Die Erkenntnisse aus der Mutagenese des Enzyms lassen aber Möglichkeiten offen, über eine gerichtete Evolution nach möglichen Selektivitätsfaktoren zu mustern. Die Akzeptanz des Enzyms gegenüber alternativen Cofaktoren eröffnet zudem Möglichkeiten, *V<sub>G</sub>PO-Ci* als Chassis zu verwenden, um eventuell auch die Chemoselektivität des Enzyms zu verändern.

### 3.8 Vergleich der enzymatischen und chemischen Halogenierung

Die Optimierung der *batch*-Bedingungen für die enzymatische Halogenierung von Thymol lieferte nahezu vollständige Umsätze von Thymol (**56**) innerhalb von 3 h 20 min unter Verwendung von 5 Äquivalenten Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid. Die Regioselektivität des Enzyms stimmte dabei mit den erwarteten Selektivitätsmustern einer klassischen chemischen Halogenierung mit elektrophilen Spezies überein (siehe 3.6.2). Das Enzym  $V_{Cl}PO-Ci$  verfügt somit über keine ausgeprägte Regioselektivität, diese wird stattdessen mehrheitlich über die Nukleophilie des Substrats und die Zugänglichkeit der aromatischen Substitutionspositionen diktiert. Ein wichtiger Faktor für die Anwendbarkeit der Haloperoxidasen im synthetischen Kontext ist jedoch die Effizienz im Vergleich zur chemischen Halogenierung. Da Halogenierungsagenzien wie Chlorgas oder NCS/NBS günstig und weit verbreitet sind, können so die Negativargumente wie Toxizität und energieintensive Produktion kompensiert werden (siehe Kapitel 2.2.4). Aus diesem Grund sollte in diesem Versuchsteil abschließend die Halogenierungseffizienz von Thymol mit  $V_{Cl}PO-Ci$  und NBS bzw. NCS vergleichend untersucht werden.

Hierfür wurde unter Beibehaltung der optimierten Bedingungen des enzymatischen Ansatzes die Bromierung und Chlorierung von Thymol (**56**) enzymatisch und chemisch durchgeführt. Für die chemische Halogenierung wurden übliche Bedingungen gewählt, dabei aber sowohl das Reaktionsvolumen als auch die eingesetzte Stoffmenge Thymol (**56**) beibehalten, um einen direkten Vergleich der beiden Halogenierungsmethoden zu ermöglichen. Aufgrund der geringen Mengen wurde auf eine Aufarbeitung und Isolation der einzelnen Produkte verzichtet und stattdessen der Umsatz der Reaktion bestimmt, da die Verhältnisse der chemischen Halogenierung (*ortho*- vs. *para*- vs. *di*-) mit denen der enzymatischen übereinstimmen. Die Synthesen sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (siehe Abbildung 84).



**Abbildung 84: Reaktionsschemata der enzymatischen und chemischen Halogenierung von Thymol (56)**

**A:** enzymatische Bromierung von Thymol (56) mit  $V_{Cl}PO-Ci$ ; **B:** enzymatische Chlorierung von Thymol (56) mit  $V_{Cl}PO-Ci$ ; **C:** chemische Bromierung von Thymol (56) mit NBS; **D:** chemische Chlorierung von Thymol mit NCS. Alle Reaktionen wurden in einem Maßstab von 1 mL durchgeführt. Die Extraktion der Proben erfolgte wie eingangs beschrieben mit Essigsäureethylester (mit 5 mM *m*-Chlortoluol als internem Standard).

Für alle Reaktionen wurde nach Extraktion mit Essigsäureethylester (inklusive 5 mM *m*-Chlortoluol als internem Standard) der Umsatz des Startmaterials Thymol (56) per GC-MS gemäß Kapitel 3.6.2 bestimmt. Neben dem Umsatz sollte zudem ein wirtschaftlicher Faktor betrachtet werden, um die Halogenierungseffizienz der beiden Methoden besser vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurde der sogenannte  $E^+$ -Faktor berechnet (siehe Gleichung 8).

$$E^+ = \frac{\sum m(\text{Abfälle}) \left[ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \right]}{m(\text{Produkte}) \left[ \frac{\text{kg}}{\text{kg}} \right]} + \frac{W \cdot CI}{m(\text{Produkte})} \left[ \frac{\text{kWh} \cdot \frac{\text{kg}(\text{CO}_2)}{\text{kWh}}}{\text{kg}} \right]$$

**Gleichung 8: Formel zur Berechnung des E<sup>+</sup>-Faktors nach Tieves *et al.*<sup>[326]</sup>**

Für die Berechnung werden die Massen aller Abfall- bzw. unerwünschter Nebenprodukte summiert und durch die Masse des gewünschten Produktes (oder Produkte) geteilt. Dieser E-Faktor wird dann um das Produkt der elektrischen Arbeit *W* und der Kohlendioxidintensität *CI*, geteilt durch die Masse des gewünschten Produktes (oder der Produkte), erweitert. Die Kohlendioxidintensität ist ein Referenzwert für den durchschnittlichen CO<sub>2</sub>-Ausstoß pro generierter elektrischer Arbeit *W* des lokalen Stromnetzes. Für die in dieser Arbeit gezeigten Werte wurde ein Wert von 0.366 kg CO<sub>2</sub> kWh<sup>-1</sup> verwendet.<sup>[327]</sup> Die elektrische Arbeit *W* stellt die Summe der elektrischen Arbeit der verwendeten elektrischen Geräte dar, die für die jeweilige Synthese verwendet wurden. Die detaillierten Werte sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Kapitel 5.7.6).

Der mit dieser Formel erhaltene Wert ist dimensionslos und soll die Effizienz und den Energiebedarf einer Reaktion im Kontext der CO<sub>2</sub>-Belastung der Umwelt vergleichbar machen. Für den Vergleich der chemischen und enzymatischen Halogenierung wurde zuerst der E<sup>+</sup>-Faktor der Katalysatorproduktion von V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* berechnet. Hierfür wurden alle Schritte ab Kultivierung der entsprechenden Zellen miteinbezogen. Anschließend wurde für die Umsetzung von Thymol (**56**) mit dem Enzym der E<sup>+</sup>-Faktor der Katalysatorproduktion anteilig an der eingesetzten Menge Enzym als Summand in die Berechnung des E<sup>+</sup>-Faktors des gesamten Prozesses mit einbezogen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch die E<sup>+</sup>-Faktoren der Reaktion selbst gesondert gelistet. Für die chemische Halogenierung konnte lediglich der E<sup>+</sup>-Faktor der Reaktion berechnet werden. Da die Herstellung der elektrophilen Halogenierungsagenzien NBS und NCS mit der industriellen Chloralkalielektrolyse gekoppelt ist, konnten hier nur Annäherungen bestimmt werden, weshalb die E<sup>+</sup>-Faktoren der NBS/NCS-Produktion hier ausgelassen wurden. Die erhaltenen E<sup>+</sup>-Faktoren wurden tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: E<sup>+</sup>-Faktor-Analyse der enzymatischen und chemischen Halogenierung von Thymol (**56**)**

Die einzelnen Beiträge zu den jeweiligen E<sup>+</sup>-Faktoren sind Kapitel 5.7.6 zu entnehmen. TON: *turnover number*, Umsatzzahl der Reaktion; TF: *turnover frequency*, Umsatzfrequenz; - : nicht definiert

Reaktionstyp	Umsatz Thymol [%]	E <sup>+</sup> -Faktor Katalysatorproduktion [ $\cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	E <sup>+</sup> -Faktor Reaktion [ $\cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	TON [ $\text{mol}_{\text{Produkt}} \cdot \text{mol}_{\text{Katalysator}}^{-1}$ ]	TF [TON $\cdot \text{h}^{-1}$ ]
Enzymatische Bromierung	> 90	4207	117	12557	3771
Chemische Bromierung	100	-	132	-	-
Enzymatische Chlorierung	80.3	4207	130	11204	3362
Chemische Chlorierung	74.7	-	210	-	-

Für alle dargestellten Reaktionen konnten hohe Umsätze erreicht werden. Bei der Bromierung zeigte NBS einen vollständigen Reaktionsumsatz von Thymol (**56**) und wies einen E<sup>+</sup>-Faktor von 132 auf. Die enzymatische Bromierung erreichte einen Umsatz von über 90 % und konnte mit einem E<sup>+</sup>-Faktor von 117 eine geringfügig bessere Energiebilanz vorweisen. Bei der Chlorierung von Thymol (**56**)

wurde im enzymatischen Ansatz ein Umsatz von 80.3 % erreicht, während die äquivalente Reaktion mit NCS einen Umsatz von etwa 74.7 % lieferte. Der  $E^+$ -Faktor der HPO-vermittelten Chlorierung lag mit 130 dabei wesentlich geringer als das chemische Pendant mit 210. Für beide Halogenierungsreaktionen konnte somit eine bessere Energiebilanz und damit Halogenierungseffizienz unter Verwendung des Biokatalysators erzielt werden. Im Hinblick auf die isolierte Reaktion steht die biokatalytische Halogenierung der traditionellen chemischen somit in nichts nach. Allerdings muss für eine präparative Anwendung von Haloperoxidasen die Produktisolation in die Kalkulierung miteinbezogen werden, da sich diese aufgrund der Anwesenheit des Enzyms oder möglicher Zellreste bei Verwendung von Lysaten oder Ganzzellkatalysatoren drastisch unterscheiden können.<sup>[10, 16]</sup> Diese Isolationsbeiträge zum  $E^+$ -Faktor wurden im Rahmen dieses Versuchs aufgrund der eingesetzten analytischen Mengen von Thymol nicht berücksichtigt.

Die bessere Energiebilanz ändert sich allerdings drastisch, wenn der  $E^+$ -Faktor der Katalysatorproduktion miteinbezogen wird. Hierbei wird ein Wert von 4207 erzielt, der beide enzymatischen Halogenierungsreaktionen als weitaus ineffizientere Syntheserouten charakterisiert. An dieser Stelle erweist sich der direkte Vergleich der Halogenierungsarten als schwierig, da NBS bzw. NCS als Halogenierungsagenzien nahezu äquimolar eingesetzt werden müssen, um die Halogenierung von Thymol (**56**) zu ermöglichen.  $V_{Cl}PO-Ci$  als Katalysator kann dagegen mehrfach für eine Halogenierung eingesetzt werden, ohne verbraucht zu werden. Die berechneten Werte für die TON mit 12557 für die Bromierung und 11204 für die Chlorierung, sowie die TF von 3771  $h^{-1}$  für die Bromierung und 3362  $h^{-1}$  für die Chlorierung, verdeutlichen diesen Sachverhalt. Allerdings wird in dem hier gezeigten *modus operandi* der Katalysator nicht als solcher eingesetzt. Im Rahmen der *batch*-Reaktion kann der Katalysator nicht neu isoliert werden, sondern geht als Abfallprodukt in die Gegenrechnung des  $E^+$ -Faktors. Chemisch gesehen handelt es sich bei NBS und NCS allerdings auch um gängige Produkte der Chlor-Alkali-Elektrolyse, die in großen Mengen kommerziell erhältlich sind. Eine Recherche der dafür aufzuwendenden Produktionskosten ergab keine detaillierten Kostenaufstellungen, sondern lediglich verschiedene Gesamtprozessbilanzen, die eine adäquate Berechnung des  $E^+$ -Faktors für den hier gezeigten chemischen Prozess unmöglich machen. Da zudem die Produktion sowie Isolation und Lieferung dieser Halogenierungsreagenzien (inklusive Succinimidgewinnung) bereits mehrere Jahrzehnte etabliert ist, ist auch für den Fall einer enzymatisch überlegenen Halogenierung die chemische Variante bezogen auf den Gesamtprozess wahrscheinlich ökonomischer und ökologischer. Die ermittelten Werte für Umsatzzahl und Umsatzfrequenz von  $V_{Cl}PO-Ci$  könnten allerdings als Indiz dienen, dass der Einfluss der Katalysatorproduktion auf die Gesamtbilanz der Reaktion durch Wiederverwendung des Katalysators kompensiert werden könnte. Für diesen Fall könnte ein kompetitiverer Halogenierungsprozess im größeren Maßstab formuliert werden.

Da zudem im Laufe der Optimierungen der enzymatischen Halogenierung mit  $V_{Cl}PO-Ci$  und  $VPO-Rr$  Stabilitätsprobleme festgestellt wurden, könnte die Immobilisierung der Haloperoxidasen einen wichtigen Schritt in der Optimierung der Energiebilanz der enzymatischen Halogenierung liefern.

Die Verwendung von Haloperoxidasen als Biokatalysatoren konnte durch die in dieser Arbeit geschilderten Ergebnisse gezeigt werden. Die Nutzung dieser Enzymfamilie ist jedoch mit einigen technischen wie wissenschaftlichen Problemen verbunden, die für eine sinnvollere Nutzung als Halogenierungsquelle erst behoben werden müssen. Durch die Implementierung dieser Enzymklasse im Rahmen der kontinuierlichen Durchflusschemie als immobilisierte Biokatalysatoren, der Identifizierung neuer Enzyme mit ausgeprägter Selektivität oder intensiverer Mutagenesestudien zur Adaption der Reaktivität und Selektivität könnten Haloperoxidasen in komplexeren Systemen Anwendung finden

und damit eine energieeffizientere Alternative zu klassischen Halogenierungsreagenzien bieten. Einige dieser Aspekte sollen abschließend im nächsten Kapitel diskutiert werden.

## 4 AUSBLICK

### 4.1 Schlussfolgerung

Die Halogenierung organischer Verbindungen stellt eine wesentliche Modifikation von Stoffen in der Wirkstoffsynthese dar. Sie ermöglicht gezielte Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor aufzubauen oder zu behindern und öffnet die Tür für eine Fülle an C-C-Bindungsknüpfungsreaktionen in der Synthese von Bausteinen und Vorläufermolekülen. Die hohen Prozesskosten in der Herstellung halogenierender Reagenzien und deren Toxizität und schwierige Aufarbeitung wecken den Bedarf an alternativen, umwelt- wie kostenfreundlicheren Prozessen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit Haloperoxidasen als halogenierende Biokatalysatoren untersucht.

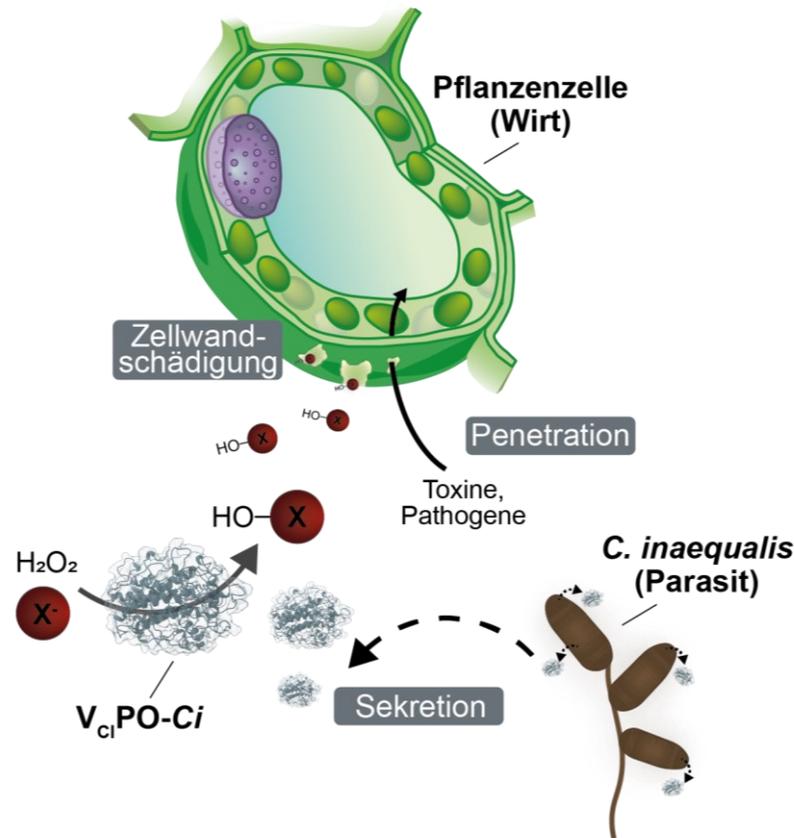
Zu Beginn der Arbeit standen generelle Etablierungsprozesse im Vordergrund, wie etwa die Kultivierung entsprechender Produktionswirte und die Isolierung der Enzyme selbst. Anschließend wurden Methoden und Abläufe entwickelt, mit denen bekannte wie unbekannte Enzyme biochemisch charakterisiert werden sollten. Anknüpfend an die Charakterisierung stand die Etablierung von Haloperoxidasen als synthetische Werkzeuge im Vordergrund. Aus diesem Anlass wurden Analysen durchgeführt, um die Limitationen und Parameter Haloperoxidase-vermittelter Halogenierungen kennen zu lernen und die Enzymfamilie prozesstauglich zu machen. Diese Arbeit umfasste neben Reaktionen im *batch* auch Reaktionen im kontinuierlichen Durchfluss, sowie das rationale Design und die Erweiterung der Reaktivität von Haloperoxidasen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine Optimierung des Reaktionsumsatzes im *batch* auf über 90 % erreicht werden, die nicht auf Versuche im Durchfluss übertragbar war. Mit ähnlichen  $E^+$ -Faktoren war damit die Halogenierung mit  $V_{Cl}PO-Ci$  im *batch* auf Augenhöhe mit der chemischen Halogenierung mit NBS und NCS. Die Katalysatorkosten stellten sich allerdings als maßgebliches Problem für eine industrielle Nutzung heraus. Die Überwindung der Katalysatorkosten durch wiederholte Nutzung und Immobilisierung wurde gezeigt, erfordert aber intensivere Optimierungsansätze, um die Enzymfamilie der Haloperoxidasen wirtschaftlich wie umwelttechnisch nutzbar zu machen.

In den folgenden Abschnitten sollen mögliche Anknüpfungspunkte sowie Perspektiven für Haloperoxidasen als Biokatalysatoren zu den jeweiligen Befunden aus dieser Arbeit im Detail diskutiert werden.

### 4.2 Selektivität von Haloperoxidasen

#### 4.2.1 Rationales Design

Von allen halogenierenden Enzymen sind Haloperoxidasen diejenigen mit der höchsten Umsatzzahl (siehe Kapitel 2.4). Der größte Kritikpunkt an dieser Klasse bleibt jedoch die fehlende Selektivität der Enzyme für Halogenierungen. Die bekanntesten Vertreter der vanadiumabhängigen Haloperoxidasen weisen nur in seltenen Fällen gewisse Selektivitäten vor. Die physiologische Rolle dieser Enzyme und damit verbunden der Ursprung der geringen Selektivität bleibt bisher ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem die geringe Stabilität der Enzyme während der Katalyse nachgewiesen werden, was auf eine geringe Toleranz der gebildeten Halogenierungsreagenzien wie etwa hypobromiger Säure schließen lassen kann (siehe Kapitel 3.6.2). Im physiologischen Kontext könnten damit Schäden am Wirtsorganismus über längere Zeiträume vermieden werden. Bei dieser Hypothese könnte die Selbstinaktivierung des Enzyms dabei dann kein Zufall sein, sondern einer Art Schutzmechanismus entsprechen (siehe Abbildung 85).



**Abbildung 85: Hypothese zur biologischen Rolle nicht-bakterieller Haloperoxidasen am Beispiel von *C. inaequalis***

Für *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* wurde die Teilnahme am pathogenen Befall des pflanzlichen Wirts vermutet. Dabei soll die sekretierte *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* hypohalogenige Säuren produzieren, die die Zellwand des Wirtes beschädigen und so anderen Pathogenitätsfaktoren die Penetration der Zellwand ermöglichen. Um Schäden am Pilz zu vermeiden, könnte *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* selbst durch überschüssige hypohalogenige Säuren sukzessive deaktiviert werden.

Im Rahmen des 3.7.2 wurde das rationale Design der Haloperoxidase *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* beschrieben. Grundlage für dieses Experiment sollte die Hypothese sein, dass durch das Einbringen eines Lysins, in Anlehnung an FAHs, die halogenierende Spezies, wie hypohalogenige Säuren, abgefangen werden und Lysin als intermediäres Halogenierungsmittel dient. Lysin könnte dabei durch mögliche Bindungstaschen im Enzym eine regioselektive Halogenierung durchführen. Die Suche nach möglichen Bindungstaschen wurde in Kapitel 3.7.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Mutagenese zweier Alanin-Residuen offenbarten einen deutlichen Aktivitätsverlust von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* ohne messbare Zunahme der Regioselektivität. Da Lysin katalytisch relevant aufgrund der Koordination des *ortho*-Vanadat-Coenzym ist, könnte ein weiteres Lysin in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum für unvorhergesehene Wechselwirkungen sorgen. Da bekannt ist, dass Vanadat in der *apo*-Form des Enzyms ebenfalls im Enzym binden kann, ist auch eine Diffusion des Vanadats nach längeren Zeiträumen nicht ausgeschlossen.<sup>[195, 201]</sup> Ein weiteres Lysin könnte hier die Ausbildung der koordinativen Bindung im aktiven Zentrum behindern und somit die geringe Aktivität der beiden Mutanten erklären. Ein Ansatzpunkt für weitere Mutagenesestudien stellt eine tiefere bioinformatische Analyse der Bindungen und konformationellen Änderungen während der Katalyse von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* dar. Kristallstrukturen der Peroxo-Spezies wie des Enzyms im Ruhezustand sind vorhanden und könnten durch Verwendung entsprechender Werkzeuge wie *Caver* oder *molecular operating environment* (MOE) untersucht werden.<sup>[328, 329]</sup> Prakinee *et al.*

konnten für die flavinabhängige Halogenase Thal zeigen, dass über die Analyse möglicher Tunnel zum aktiven Zentrum des Enzyms und Verständnis des Reaktionsmechanismus durch eine Punktmutation (Valin zu Isoleucin) die katalytische Effizienz und Stabilität des Enzyms massiv gesteigert werden kann (Steigerung um den Faktor 4).<sup>[330]</sup> Kumar *et al.* zeigten ebenfalls einen semi-rationalen Ansatz, mit dem die Effizienz einer reduktiven Aminase über bioinformatische Analysen in einem *directed evolution* Ansatz optimiert werden konnte, ohne ein klassisches *screening* jeder Aminosäureinheit durchführen zu müssen.<sup>[17]</sup> Vorarbeiten zu V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* konnten von Nicola Porta (AG Gohlke, HHU Düsseldorf) bereits auf bioinformatischer Seite gestartet werden und zeigten mögliche Bindungen von kleinen Substraten wie Thymol (**56**) und DMP (**51**) am aktiven Zentrum. Kristallisationsexperimente wie beispielsweise *soaking* mit den entsprechenden Substraten könnte zu Kristallstrukturen führen, die mehr Aufschluss über einen potenziellen Bindungsmodus liefern. Die Kombination aus Bindung von Substraten wie bei FAHs und Katalyse wie bei HPOs könnte zu potenten chimären Enzymen führen, die die jeweiligen Vorteile beider Klassen miteinander kombinieren.

#### 4.2.2 Charakterisierung neuer Haloperoxidasen

Neben Haloperoxidasen aus (marinen) Algen und Pilzen, die überwiegend keine Selektivität zeigen, wurden im letzten Jahrzehnt Haloperoxidasen bakteriellen Ursprungs mit sehr hohen Selektivitäten und Nebenreaktivitäten identifiziert (siehe Kapitel 2.4.2). Die meisten sind Teil komplexer Biosynthesecuster in NRPS- oder PKS-Wegen und deshalb bisher nicht für biokatalytische Anwendung außerhalb des natürlichen Kontextes beschrieben. Die hohen Selektivitäten und der bakterielle Ursprung waren Grundlage für die Hypothese in dieser Arbeit, neue bakterielle HPOs zu identifizieren, um zwei der größten Schwachpunkte dieser Enzymfamilie in Angriff zu nehmen. Die eingangs beschriebene mangelnde Selektivität wird häufig von schlechten Produktionsraten in gängigen heterologen Wirtsorganismen wie *E. coli*, *S. cerevisiae* oder *P. pastoris* begleitet. Dieser Umstand könnte auf den teilweise deutlichen Unterschied nativer Bedingungen in den entsprechenden homologen Wirten zurückzuführen sein, da diese meist marinen Ursprungs sind. Mit bakteriellen Enzymen sollten die Expressionsbedingungen ähnlich genug sein, um hohe Proteintiter in heterologen Wirten wie *E. coli* zu erreichen. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene aus *L. pratensis* und *R. roseus* konnten diese Hypothese allerdings nicht bestätigen. Die Haloperoxidasen aus beiden Organismen zeigten wie die literaturbekannte V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* geringe Löslichkeiten und schlechte Proteinausbeuten. Mit der in dieser Arbeit etablierten Kultivierungs- und Expressionsmethode konnte der Titer zwar für Labormaßstäbe maximiert werden, grenzt die Anwendung in präparativen Umsetzungen allerdings massiv ein. Dem gegenüber steht allerdings die im Vergleich sehr hohe Wechselzahl von VPO-*Rr*, die damit die geringen Ausbeuten des Proteins nach Kultivierung teilweise abfedern könnte. Da weitere Experimente zeigten, dass das Enzym aber unter Stabilitätsproblemen leidet, ist eine Anwendung im *batch* wenig erfolgsversprechend. Hier würde die Immobilisierung der VPO-*Rr* zwei Vorteile kombinieren: Die Stabilität des Enzyms könnte erhöht werden, wobei die Aktivität durch die hohe native Wechselzahl immer noch zu hohen Umsatzraten in immobilisierter Form führen sollte, und durch Wiederverwendung des Katalysators im Rahmen der Durchflusschemie könnte der Verbrauch des Katalysators minimiert werden, um häufige Kultivierungen zu vermeiden. Das in dieser Arbeit etablierte Immobilisationsprotokoll liefert eine für V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* aufgezeigte robuste und schnelle Methode der Immobilisierung, die auch für Reaktionen in einem *flow chemistry* Apparat fähig ist (siehe Kapitel 4.3.3).

VPO-*Lp* konnte über einen HPLC-Nachweis als Haloperoxidase identifiziert werden, jedoch gestaltete sich die Isolation des Enzyms genauso schwierig wie die Pendanten aus *F. ceranoides*, *S. fusiforme* und *A. nodosum*. Trotz verschiedener Adaptionen des etablierten Isolationsprozesses konnte das

Protein entweder nicht in reiner Form oder lediglich als Präzipitat nach Dialyse gewonnen werden. Eine Alternative zur halogenidfreien Reinigung ist der Zusatz von Natriumchlorid in den Lyse- und Elutionspuffern. Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Reinigungsschritte wurden mit Absicht Halogenid-frei gehalten, um spätere Nebenreaktionen in Biokatalyse-Ansätzen zu unterbinden. Durch eine intensive Dialyse nach Isolation oder Anpassung der Konzentrationen bzw. Reaktionsbedingungen kann die Isolation aber mit Natriumchlorid adaptiert werden. Sollten diese Versuche ebenfalls nicht erfolgreich sein, kann auch eine Anwendung als *catalytically active inclusion bodies* (CatIBs) denkbar sein. Hier konnten Gruppen wie Krauss und Mitarbeiter bereits erfolgreiche Anwendung in biokatalytischen Kontexten aufzeigen.<sup>[272, 331, 332]</sup> Die Methode bietet dabei den Vorteil, Carrier-freie Immobilisationen zu ermöglichen, wobei die verwendeten Enzyme nicht in löslicher, sondern unlöslicher Form eingesetzt werden. Die beobachtete Unlöslichkeit der meisten Haloperoxidasen scheint somit ein ideales Ziel für diese Art der Biokatalysator-Aufbereitung zu sein. Zudem konnte die Anwendung im kontinuierlichen Durchfluss ebenfalls gezeigt werden und würde eine direkte Verbindung beider thematischer Aspekte dieser Arbeit aufgreifen.<sup>[273]</sup>

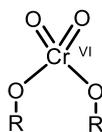
Neben klassischen Haloperoxidasen konnten unspezifische Peroxygenasen in den letzten Jahren als halogenierende Enzyme identifiziert werden (siehe Kapitel 2.4). Die Enzymfamilie konnte besonders in den vergangenen Jahren an Bedeutung für eine Vielzahl selektiver und unselektiver Oxygenierungsreaktionen gewinnen und das immer breiter werdende Portfolio an UPOs wird mittlerweile auch als kommerzielles Kit angeboten.<sup>[184, 333-335]</sup> Eine große Hürde bleibt die heterologe Produktion dieser meist pilzlichen Enzyme, weshalb gängiger Weise der Expressionswirt *Pichia pastoris* für Fermentationen verwendet wird.<sup>[118]</sup> Auch die Erweiterung der Reaktivität und Stabilität dieser Enzyme durch Mutagenese ist zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit ein beliebtes Ziel verschiedener Forschungsprojekte.<sup>[336]</sup> Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das Gen der bekanntesten UPO aus *Agroclybe aegerita* in dem *P. pastoris*-kompatiblen pPICZ-B-Vektor als synthetisches Gen bestellt und steht für mögliche Untersuchungen in der Arbeitsgruppe bereit.

### 4.2.3 *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* als chassis für neue Redox-Enzyme

In Kapitel 0 wurde die Beladung von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* mit alternativen Oxometallsäure-Spezies, wie Tantalat und Niobat, beschrieben. Ziel dieser Untersuchungen war, die Hypothese zu verifizieren, dass durch andere Coenzyme die Regioselektivität des Enzyms verändert werden kann. Obwohl die Ergebnisse diese Hypothese falsifiziert haben, konnte in diesem Experiment die Fähigkeit von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* erstmals beschrieben werden, andere Coenzyme zu binden und für katalytische Zyklen zu nutzen. Bisherige Befunde haben sich auf die inhibierende Wirkung von Phosphaten als Alternative zu Vanadaten beschränkt. Mit dieser Fähigkeit ist eine andere Anwendung von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* denkbar. Das Enzym besitzt markante Stabilität und Resistenz gegenüber vielen organischen Lösungsmitteln, Oxidationsmitteln und Temperaturen. Diese Eigenschaften sind vermutlich der Gesamtheit der Proteinstruktur und nicht allein des aktiven Zentrums geschuldet. Durch Einsatz anderer Übergangsmetalle kann das Enzym womöglich als *chassis* verwendet werden, um andere Redoxreaktionen zu katalysieren. Eine Generierung artifizieller Metalloenzyme *de novo* konnte in Kombination mit Lanthanoiden und anderen Metallen gezeigt werden.<sup>[337]</sup>

Für die Etablierung eines solchen *chassis* müssten genauere Studien zur Bindung und zum Mechanismus von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* durchgeführt werden. Auch wenn die Mechanismen für Haloperoxidasen seit Jahrzehnten postuliert sind, fehlt es immer noch an experimentellen Belegen für einige Schlüsselschritte der Katalyse. Computer-gestützte Berechnungen zeigten so beispielsweise die Möglichkeit einer intermediären Halogenierung eines Histidins in der Nähe zum Vanadat-Coenzym.<sup>[203, 204]</sup> Im

Rahmen dieser Publikationen wurden auch die so getesteten Oxometallate von Niob und Tantal als mögliche Surrogate postuliert und im Rahmen dieser Arbeit getestet. Durch Kristallisationsstudien mit den entsprechenden alternativen Coenzymen könnte hier der Bindungsmodus des Coenzym besser verstanden werden und daraus womöglich geeignete Mutationen zur Inkorporation anderer Metalle deduziert werden. Ein solches Metall könnte beispielsweise Chrom darstellen. Chrom(VI) wird als zentraler Teil des Phillips-Katalysators **66** für die Synthese von Polyethylen eingesetzt, und deckt dabei schätzungsweise die Hälfte des weltweiten Bedarfs.<sup>[338]</sup> Die Implementierung einer solchen Chrom-Spezies, auch unter Verwendung solcher mit geringerer Oxidationsstufe, könnte Zugang zu weiteren enzymatischen Halogenierungsreaktionen oder einem gänzlich neuen Metalloenzym für verschiedene Oxidationsreaktionen liefern, die bisher nur mit hochtoxischen oder schwer zugänglichen Chromverbindungen möglich sind (siehe Abbildung 86).<sup>[339-341]</sup>



66

**Abbildung 86: Vorgeschlagene Struktur des Phillips-Katalysators 66 mit der reaktiven Chrom(VI)-Spezies**

Aufgrund der hohen Toxizität von Chrom(VI) ist die Handhabung und Entsorgung chromhaltiger Substanzen problematisch, weshalb Syntheserouten häufig umgestaltet werden, um die Verwendung von Chromaten zu vermeiden.<sup>[342]</sup> Die Generierung eines Chrom(VI)-abhängigen Enzyms, das entsprechende Oxidationen katalysieren kann, würde somit eine leichter handhabbare Alternative zu Chromaten und Chromat-haltigen Katalysatoren darstellen, da Proteine durch verschiedene Methoden aus Reaktionslösungen entfernt werden können, wie Dialyse, Ausfällung, Immobilisierung etc. Zudem könnten womöglich selektive Redoxreaktionen mit so einem Katalysator verwirklicht werden.

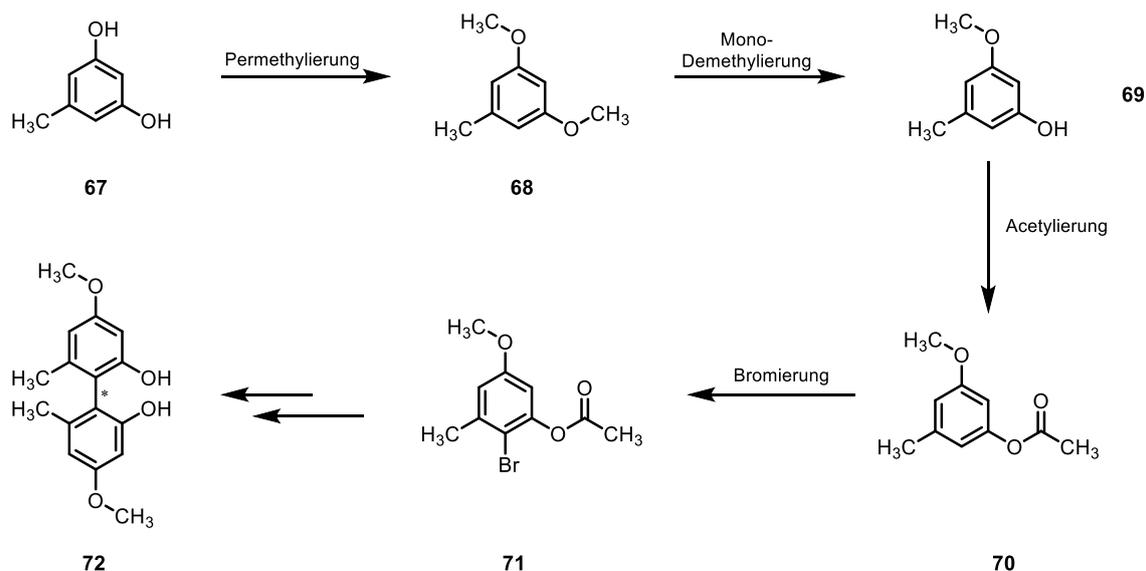
Die Verwendung eines solchen *chassis* wie  $V_{Cr}PO-Cr$  könnte daher einen einfacheren Zugang zu artifiziellen Metalloproteinen liefern, die bereits über ausgeprägte Stabilität gegenüber harschen Bedingungen verfügen. Ein vollständiges *de novo*-Design eines Biokatalysators könnte so umgangen werden.

## 4.3 Haloperoxidasen als synthetische Werkzeuge

### 4.3.1 Halogenierungen im batch

Haloperoxidasen katalysieren formal die Oxidation von Halogeniden zu entsprechenden Hypohalogeniten oder Halogenen. Nicht-bakterielle HPOs treten daher häufig nicht in direkten Kontakt mit dem eigentlichen Ziel der Halogenierung. Dieser Umstand führt in den meisten Fällen zur freien Diffusion eines sehr reaktiven halogenierenden Agens. Da es sich bei den generierten Verbindungen um starke Elektrophile handelt, kann in den meisten Fällen eine elektrophile aromatische Substitution stattfinden. Analog zu NBS bzw. NCS wird die Regioselektivität dieser Reaktion ausschließlich durch die Nukleophilie des Substrats gesteuert. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren HPOs vermehrt zur Bereitstellung dieser elektrophilen Spezies verwendet. In den meisten Fällen folgte eine spontane Reaktion, wie etwa eine Zyklisierung, zur finalen Verbindung. In dieser Form bilden HPOs lediglich die gleiche Art der Halogenierung wie gängige Reagenzien an. Ein möglicher Vorteil gegenüber der Verwendung klassischer Verbindungen wie NBS und NCS liegt in der Dosierbarkeit. Als Vorbereitung für Kreuzkupplungsreaktionen ist die selektive Halogenierung entscheidend. Ein Überschuss an halogenierendem Agens führt häufig zu ungewünschten Nebenprodukten, die die Kreuzkupplungsreaktion behindern können. Statt solche Lösung über längere Perioden tropfenweise zuzugeben könnte die Verwendung von HPOs durch stetige Generierung kleiner Mengen hypohalogeniger Säuren zu besseren Ausbeuten führen.

Insbesondere im Hinblick auf die beobachtete *O*-Methylierungsaktivität aus Kapitel 3.6.3 könnten HPOs Halogenierung und Schützung von Hydroxygruppen in einem Schritt katalysieren. Ein Beispiel für ein solches Substrat stellt Orcinol (**67**) dar. Als mögliches Ausgangsmaterial für die Synthese des axial-chiralen Biaryls 4,4'-Dimethoxy-6,6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (**72**) werden beide OH-Gruppen methyliert. Anschließend erfolgt eine Monodemethylierung, an die eine Acetylierung und eine Bromierung in 4-Position schließt (siehe Abbildung 87).



**Abbildung 87: Vereinfachte Syntheseroute von Orcinol (67) zu 4,4'-Dimethoxy-6,6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (72)**

Ausgehend von Orcinol (67) wird eine Permethylierung beider OH-Gruppen durchgeführt, da diese nicht selektiv erfolgen kann. Nach der Entschützung einer OH-Gruppe durch Demethylierung wird diese acetyliert, bevor eine selektive Bromierung in 4-Position relativ zur Methoxygruppe erfolgen soll. In den nächsten Reaktionsschritten wird sukzessive die Kreuzkupplung in Form einer Myra-Suzuki-Reaktion durchgeführt, um 4,4'-Dimethoxy-6,6'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-2,2'-diol (72) zu erhalten.

Das so erhaltene axial-chirale Diol dient als wichtiges Strukturmotiv in zahlreichen Naturstoffen wie Gonytolid A. Die erforderliche Per- und Demethylierung in Kombination mit der Bromierung des Orcinols könnten bspw. durch  $V_{Cl}PO-Ci$  zusammengefasst werden. Grundlage hierfür wäre ein tiefergehendes Verständnis der *O*-Methylierung, die bei Thymol (56) beobachtet werden konnte. Im Falle eines Radikalmechanismus könnten Elektron-Paramagnetische-Resonanz (EPR)-Untersuchungen oder Radikalfallen wie 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO) und Diphenyl-Pikryl-Hydrazyl (DPPH) Aufschluss über den Mechanismus geben und so eine Optimierung bezüglich einer kombinierten Halogenierung und *O*-Methylierung ermöglichen.<sup>[343]</sup>

Erste Umsetzungen mit  $V_{Cl}PO-Ci$  und Orcinolmonomethylether und der acetylierten Variante wurden im Rahmen dieser Arbeit getestet und zeigten Umsätze zu den drei möglichen Bromierungsprodukten (4-, 6- und 4,6-Dibromorcinolmonomethylether). Dabei schienen die relativen Signalintensitäten der Bromierungsprodukte denen der klassischen Bromierung mit NBS zu entsprechen (4-Position bevorzugt).

Neben dem Einsatz in der direkten Halogenierung von Natur- bzw. Wirkstoffen und deren Vorläufern ist auch eine unterstützende Rolle in der Synthese denkbar. So sind Oxidationsreaktionen mit TEMPO als besonders selektiv für primäre Alkohole beschrieben worden und auch für die Vorbereitung von Cellulose-Nanofibrillen eingesetzt worden. Ein wesentliches Problem dieser Reaktionen ist die Rückgewinnung des TEMPO, da es durch die hohen Anschaffungskosten einen wesentlichen Beitrag zur Effizienz solcher Reaktionen leistet. Eine gängige Methode der Oxidation mit TEMPO ist die Verwendung von Natriumhypochlorit (NaOCl), welche durch die hohen Kosten des Hypochlorits die Prozesskosten weiter erhöht.<sup>[344]</sup> Hier könnte ein Ansatzpunkt für Haloperoxidasen gegeben sein, die aus billigen Startmaterialien wie Wasserstoffperoxid und Chlorid *in situ* hypochlorige Säure bzw. Hypochlorit erzeugen können. Die Kombination aus HPO-vermittelter Hypochlorit-Generierung und TEMPO-Oxidation könnte verschiedene Oxidationsprozesse kostengünstiger und

energieeffizienter gestalten. Der Ansatz könnte womöglich auch als Kaskade mit einem etablierten Laccase-TEMPO-System zur Regeneration beider Komponenten kombinierbar sein.<sup>[345]</sup>

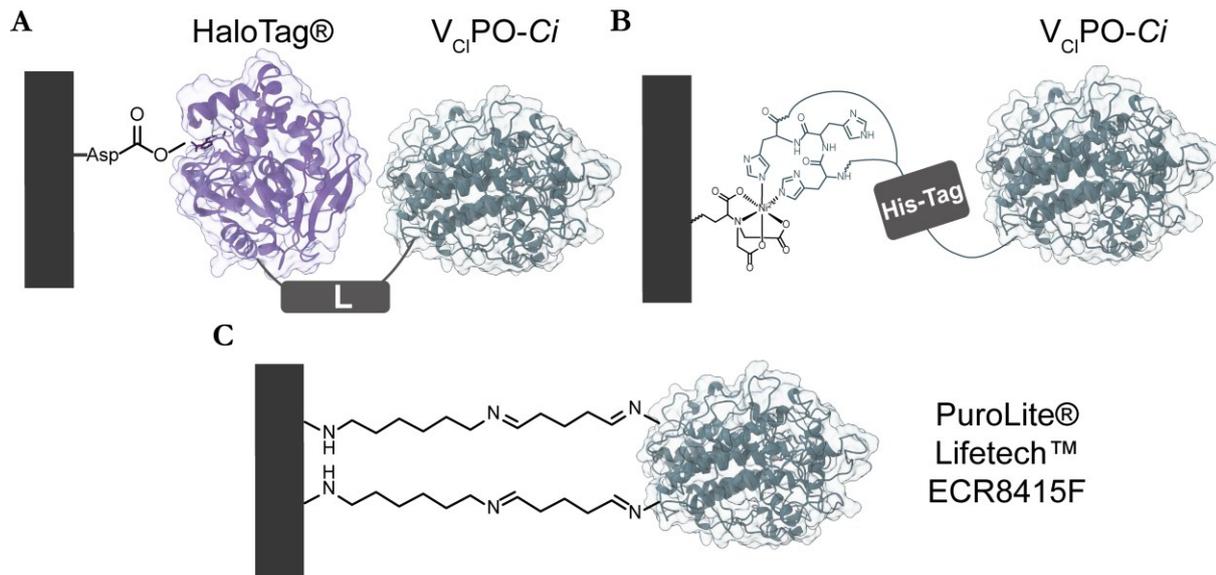
#### 4.3.2 Etablierung von Haloperoxidasen für die (kontinuierliche) Durchflusschemie

Chemische Synthesen werden üblicherweise im *batch* durchgeführt und haben meist komplexe Isolations- und Extraktionsschritte zur Folge, in denen Katalysatorreste und andere Verunreinigungen aus dem gesamten Reaktionsansatz getrennt werden müssen. Die Reaktion kann dabei nur in grobem Maß überwacht werden. Im kontinuierlichen Durchfluss können verschiedene Reaktionsparameter wie Druck, Flussrate und Temperatur konstant zu jedem Zeitpunkt der Reaktion reguliert werden und erlauben die Trennung der einzelnen Reaktionsbestandteile durch Verwendung verschiedener Kompartimente. So ist eine Durchmischung aller Substanzen erst zum gewünschten Beginn der Reaktion möglich und verhindert mögliche Nebenreaktionen. Katalysatoren können dabei in immobilisierter Form nach Beendigung der Reaktion konstant von der Reaktionslösung isoliert bleiben und erleichtern somit häufig die Aufarbeitung.

#### 4.3.3 Immobilisierung von V<sub>Cl</sub>PO-Ci

Für die wiederholte Nutzung von Katalysatoren zur Maximierung der Umsatzzahl muss ein Katalysator wiedergewonnen werden können. Da die Aufarbeitung von Reaktionslösungen für die Isolation von Biokatalysatoren häufig zu einer Inaktivierung des Enzyms führt oder nicht erfolgreich ist, stellt die Immobilisierung des Katalysators eine praktikable Alternative dar. Hierbei wird der Katalysator über eine bestimmte Form der Bindung an eine inerte Matrix gebunden und kann so häufig bspw. durch Zentrifugation wiedergewonnen werden. Im Rahmen der kontinuierlichen Durchflusschemie (*flow chemistry*) werden Katalysatoren meist in eine Säule gepackt und als eigenständiges Reaktionsgefäß behandelt. Über Pumpsysteme kann dabei die Reaktionslösung über diesen Reaktor befördert werden, ohne dass der Katalysator in der Reaktionslösung landet. Durch diese räumliche Trennung des Katalysators vom Rest des Reaktionsansatzes können so modulare Systeme sowie zyklische Reaktionen betrieben werden (siehe Kapitel 2.5.2).

Für die Nutzung von Haloperoxidasen im Durchfluss sollte zuerst eine geeignete Immobilisierungsmethode identifiziert werden. Hierfür standen im Rahmen dieser Arbeit drei Methoden zur Auswahl, die schematisch dargestellt sind (siehe Abbildung 88).

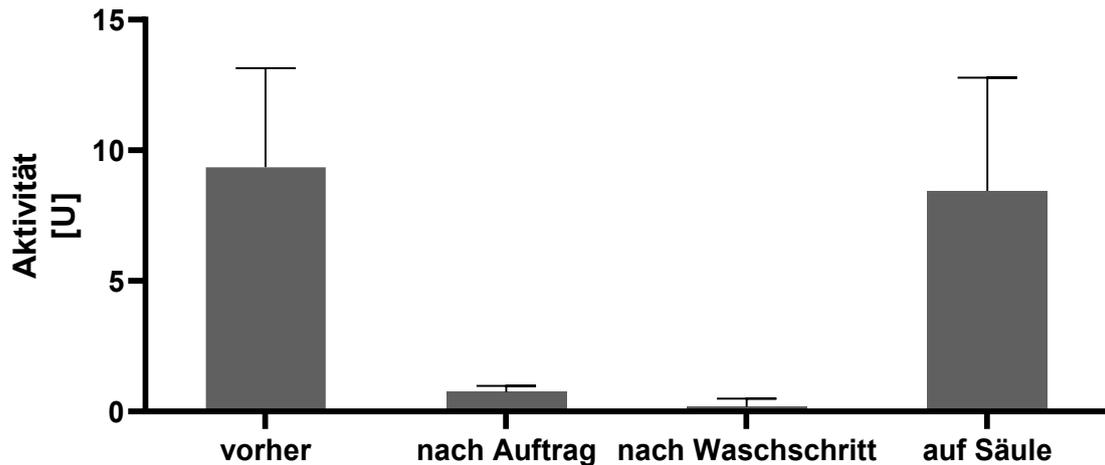


**Abbildung 88:** Übersicht der verwendeten Immobilisierungsmethoden für  $V_{Cl}PO-Ci$  im Rahmen dieser Arbeit

**A:** Immobilisation über N-terminal fusioniertes HaloTag-Protein. Das HaloTag-Protein bindet über eine kovalente Bindung zu einem immobilisierten Linker mit einem Aspartatrest und hält das Zielprotein, hier  $V_{Cl}PO-Ci$ , an der Matrix immobilisiert. Die kovalente Bindung wird dabei durch den nukleophilen Angriff des Aspartats an die C-Cl-Bindung des terminalen Chloratoms der HaloLink-Resin erzielt, was eine Dechlorierung zur Folge hat. **B:** Immobilisation über IMAC mittels N-terminalem 6xHis-Tag von  $V_{Cl}PO-Ci$ . Die Immobilisation wird hier über die Affinität des komplexierten Nickel-II-Ions und je zweier Histidinreste des His-Tags gewährleistet. **C:** Immobilisation mit Hilfe der kommerziell erhältlichen PuroLite® Lifetech™ ECR8415F-Matrix. Die Immobilisation wird durch eine Voraktivierung der Matrix mit Glutaraldehyd gewährleistet, wodurch sich eine Schiff'sche-Base zwischen dem Aminrest der Matrix und exponierten Lysinresten an der Oberfläche bzw. der N-terminalen Aminogruppe des Proteins ausbilden kann. Alternativ ist auch eine Michael-Addition freier Amine des Enzyms an die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Bindung von Glutaraldehyd denkbar, die zum gewünschten kovalenten Produkt in Form eines sekundären Amins führen kann. [346]

Die verwendeten Methoden umfassen eine Immobilisierung auf kovalenter Basis über die Generierung eines Fusionsproteins bestehend aus HaloTag und  $V_{Cl}PO-Ci$ , einer Affinitäts-basierten Immobilisierung mittels IMAC und einer kovalenten Immobilisation mit der kommerziell erhältlichen Matrix ECR8415F (PuroLite® Lifetech™, siehe Kapitel 5.7.8). [270, 347]

Die gängigste Methode der Proteinimmobilisation stellt die bereits für Proteinchromatografie bekannte Affinitätschromatographie mit zweiwertigen Übergangsmetallionen wie Nickel(II) dar. Hierbei wird ein N- oder C-terminaler His-Tag (meist 6x oder 10x) an das gewünschte Gen kloniert, sodass die im fertigen Protein vorhandenen Polyhistidinreste mit der Matrix interagieren können (siehe Abbildung 88 B). Da das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Konstrukt für  $V_{Cl}PO-Ci$  bereits über einen solchen N-terminalen 6xHis-Tag verfügt, wurde diese Immobilisierungsmethode zuerst untersucht. Hierfür wurde bereits isoliertes Enzym einer erneuten Bindung an eine für die Durchflusschemie geeignete Säule (siehe Kapitel 5.7.8) mit IMAC-Matrix (Nickel(II), Sepharose-Matrix) unterzogen. Nach einer zyklischen Auftragung bei einer Flussrate von 250  $\mu\text{L}$  wurde eine Probe des Durchflusses genommen. Anschließend wurde die Säule mit Assaypuffer gespült (5 CV) und von diesem Durchfluss ebenfalls eine Probe entnommen. Die beiden Durchflussproben wurden gemeinsam mit einer Probe der Enzymlösung vor Auftragung auf die Säule im Rahmen des MeDAC-Assays als Triplikat vermessen, um die Menge immobilisierten Enzyms auf der Säule zu bestimmen (siehe Abbildung 89).



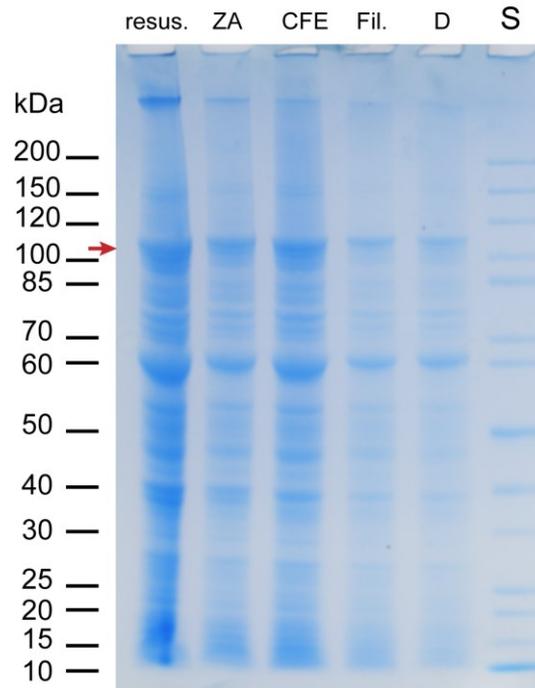
**Abbildung 89: Immobilisierungseffizienz von  $V_{Cl}PO-Ci$  über Ni-Affinitätschromatographie**

Die Aktivität der Proteinlösungen vor Auftrag, nach Auftrag und Waschen wurden in Dreifachbestimmung bestimmt. Die Menge des Enzyms auf der Säule wurde über die Differenz der Aktivität vorher und der Summe aller Aktivitäten der Waschschriffe ermittelt.

Über die Bildung der Differenz zwischen der Aktivität vor Auftrag und der summierten Aktivität aller Durchflussproben wurde die Aktivität und damit verbunden die Menge des Enzyms auf der Säule bestimmt. Dabei konnte ein minimaler Verlust des Enzyms im Laufe der Immobilisierung beobachtet werden. Auf der Säule konnte eine Menge von 32.1 U Enzym immobilisiert werden, was zu einer volumetrischen Aktivität der Säule von  $81.6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  führte.

Für erste Versuche wurde eine Umsetzung mit DMP (**51**) und Thymol (**56**) im Durchfluss versucht. Obwohl Signale für die entsprechenden Halogenierungsprodukte über GC-MS ermittelt werden konnten, führten alle Versuche zu einer starken Blasenbildung während der Läufe. Dabei wurde häufig der eingestellte maximal erlaubte Druck des Pumpsystems überschritten. Zudem wurde nach mehr als drei Läufen bei der Extraktion des Durchflusses präzipitiertes Protein beobachtet. Untersuchungen mit proteinlosen Säulen zeigten, dass die verwendete Nickel-Matrix mit dem Wasserstoffperoxid interagiert und vermutlich zu einer Disproportionierung von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff führt. Somit wurde die Immobilisierung von  $V_{Cl}PO-Ci$  über IMAC als ungeeignet für Haloperoxidasen in der Durchflusschemie identifiziert.

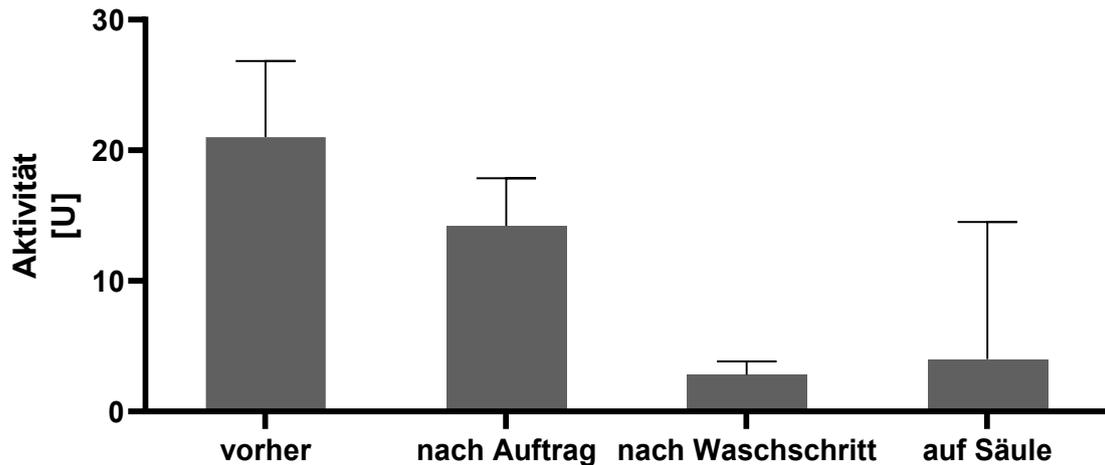
Im weiteren Verlauf der Immobilisierungsversuche wurde die HaloTag-Immobilisation durchgeführt. Hierfür wurde der HaloTag über ein Gibson-Assembly an das *vcpo*-Gen fusioniert. Nach Amplifikation über PCR und Sequenzierung der isolierten Plasmide wurde das korrekte Plasmid zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  und *E. coli* ArcticExpress (DE3) verwendet. Für die Kultivierung des Expressionsstamms wurden Standardbedingungen verwendet (siehe Kapitel 5.3.8). Das Enzym wurde danach durch Ultraschallbehandlung und Zentrifugation vom restlichen Zellmaterial getrennt, und vor Auftragung auf die Säulenmatrix zweifach steril filtriert (siehe Abbildung 90).



**Abbildung 90: Isolation von N-HaloTag-  $V_{ci}PO-Ci$  für die Immobilisierung**

Alle Proben wurden auf eine apparente Zelldichte von 1 normiert. S: PageRuler unstained 10–200 kDa Protein Marker; resus: resuspendiertes Zellpellet; ZA: Lysat nach Ultraschallaufschluss; CFE: zellfreier Überstand (lösliche Fraktion); Fil: Filtrat nach zweifacher Sterilfiltration; D: Durchfluss nach Auftragung auf Säule mit Halo-Link-Trägermaterial

Im Vergleich zu Isolationen der isolierten  $V_{ci}PO-Ci$  per His-Tag war hier bei gleicher Probenkonzentration eine deutlich schwächere Intensität auf der SDS-PAGE erkennbar (ca. 100 kDa). Nach Filtration und Inkubation mit dem Cofaktor konnten dabei nahezu keine weiteren Verunreinigungen erkannt werden, allerdings nahm die Intensität der Fusionsproteinbande auch deutlich ab. Einer der Vorteile der HaloTag-Immobilisation ist die direkte Nutzung des zellfreien Überstandes. In diesem Fall wurde der CFE mit Vanadat für 4 h inkubiert, bevor dieser bei einer Flussgeschwindigkeit von  $40 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  auf die Säulenmatrix zyklisch aufgetragen wurde (siehe Kapitel 5.7.8). Analog zur His-Tag Immobilisation wurden Proben vor Auftrag und nach jedem Waschschrift entnommen, um die Aktivität der Säule zu bestimmen (siehe Abbildung 91).



**Abbildung 91: Immobilisierungseffizienz von  $V_{Cl}PO-Ci$  über HaloTag-Affinitätschromatographie**

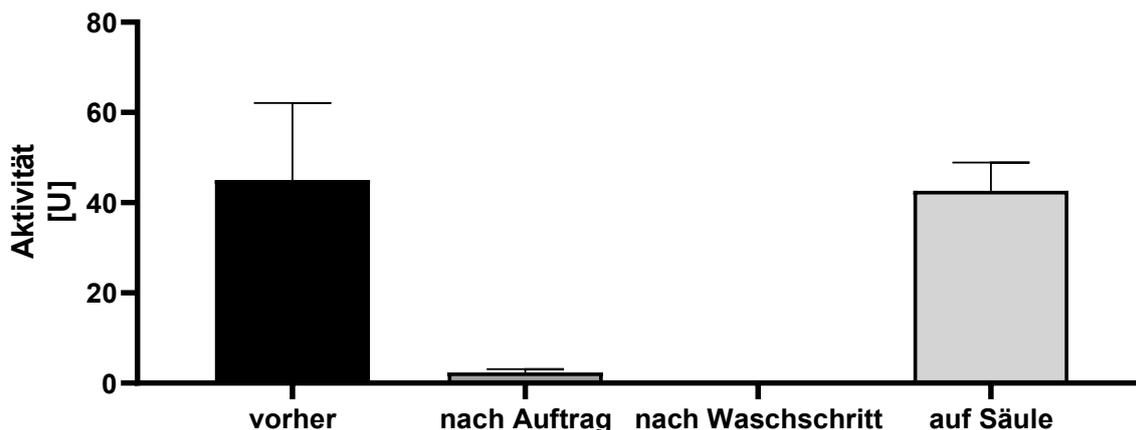
Die Aktivität der Proben vor Auftrag, nach Auftrag und Waschen wurden in Dreifachbestimmung bestimmt. Die Menge des Enzyms auf der Säule wurde über die Differenz der Aktivität vorher und der Summe aller Aktivitäten der Waschschriffe ermittelt.

Bei der Bestimmung der Aktivität mussten die Verdünnungen der einzelnen Proben genauer angepasst werden, da die Proben des zellfreien Überstands eine höhere Hintergrundaktivität im MeDAC-Assay aufwiesen. Hier könnten Oxidoreduktasen wie FAD/FMN-abhängige Enzyme für eine Verfälschung der Messdaten sorgen. Nach Optimierung der Messungen mit Lysatproben konnte final eine Gesamtaktivität von 176 U auf der Säule ermittelt werden, die zu einer volumetrischen Aktivität von etwa  $65.5 \text{ U ml}^{-1}$  auf der verwendeten Säule führte. Wie aus dem Verlauf der Immobilisierung mittels HaloTag ersichtlich ist, liegt der relative Anteil immobilisierten Enzyms weit unter der eingesetzten Menge (ca. 20 %).

Trotz einer guten Ausgangsaktivität des Fusionsproteins konnte in folgenden Experimenten allerdings nahezu kaum Umsatz für DMP (**51**) oder Thymol (**56**) detektiert werden. Das Enzym  $V_{Cl}PO-Ci$  schien nach Immobilisierung teilweise bis vollständig inaktiv zu sein. Dieser Umstand konnte bereits für andere Enzymfamilien beobachtet werden und könnte auf einen Effekt des HaloTags selbst oder des großen Molekulargewichts des Fusionsproteins zurückzuführen sein.<sup>[348]</sup> Aufgrund der geringen Aktivität sowie der großen Verluste während der Immobilisierung wurde auch die HaloTag-Immobilisation als ungeeignet für Versuche im Durchfluss deklariert.

Als dritte Variante der Immobilisierung sollte eine kovalente Immobilisierung getestet werden. Hierfür wurde die kommerziell erhältliche Matrix Lifetech ECR8415F der Firma PuroLite (siehe Kapitel 5.7.8) verwendet. Die Matrix, ausgestattet mit C6-Methacrylate-Einheiten, verfügt über terminale Aminogruppen, die nach Aktivierung mit Glutaraldehyd Schiff'sche Basen mit den terminalen Aminogruppen exponierter Lysine auf der Oberfläche des Zielproteins ausbilden können. Für diese Experimente wurde das Standardkonstrukt von  $V_{Cl}PO-Ci$  in isolierter Form verwendet (siehe Kapitel 3.2.3).

Analog zu den vorherigen Experimenten wurde die Immobilisierungseffizienz über Aktivitätsmessungen während jedes Immobilisierungsschrittes bestimmt (siehe Abbildung 92).



**Abbildung 92: Immobilisierungseffizienz von  $V_{Cl}PO-Ci$  über kovalente Immobilisation mit PuroLite® Lifetech™ ECR8415F-Matrix**

Die Aktivität der Proben nach Auftrag und Waschen wurden in Dreifachbestimmung bestimmt. Die Menge des Enzyms auf der Säule wurde über die Differenz der Aktivität vorher und der Summe aller Aktivitäten der Waschschrte ermittelt.

Die Immobilisierungseffizienz der kovalenten Methode war dabei vergleichbar mit der Affinitätsimmobilisierung über Nickel-IMAC. Dabei konnte eine Immobilisierungseffizienz von ca. 95 % erreicht werden. Auf der Säule waren 42.6 U  $V_{Cl}PO-Ci$  immobilisiert. Über die Menge eingesetzter Matrix und Proteinkonzentration konnten somit die genauen Mengen Protein bestimmt werden (siehe Tabelle 19).

**Tabelle 19: Daten zur kovalenten Immobilisation von  $V_{Cl}PO-Ci$  mittels PuroLite® Lifetech™ ECR8415F-Matrix**

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte in technischen Replikaten. Die Gesamtaktivität und Einwaage des Proteins wurden für die nachfolgenden Berechnungen verwendet. Für dieses Beispiel wurden 500 mg Matrix zur Immobilisierung verwendet.

Aktivität auf Säule [U]	Menge Protein [mg]	Volumetrische Aktivität auf Säule [ $U \cdot mL^{-1}$ ]	Aktivität pro Gramm Immobilisat [ $U \cdot g^{-1}$ ]
42.6	2.7	95.1	85.3

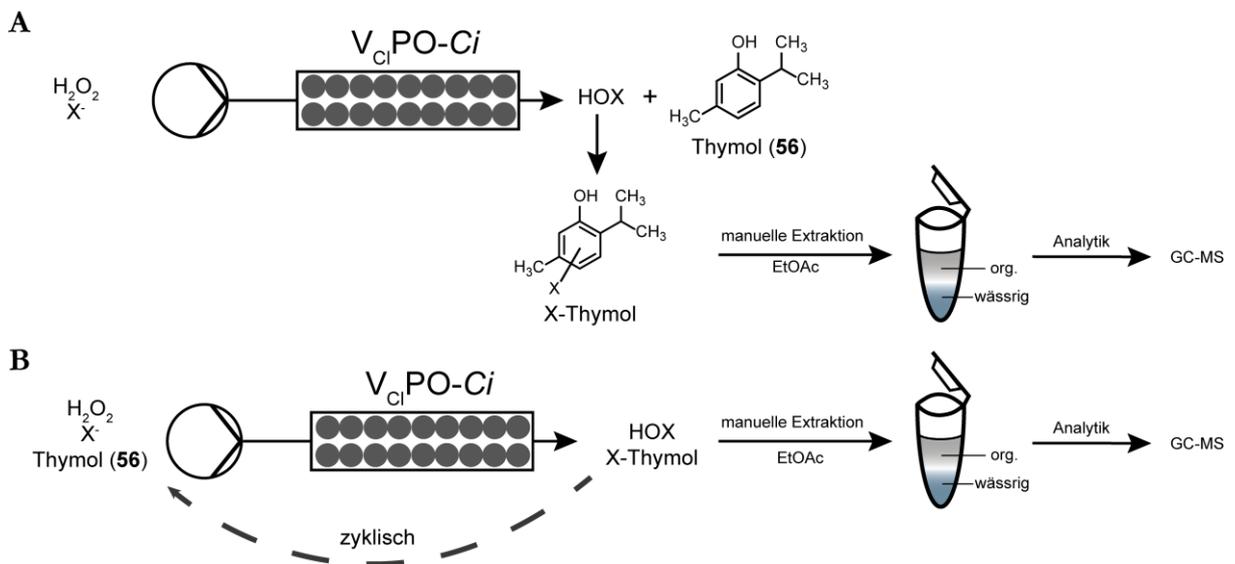
Die kovalente Methode zeichnete sich durch herausragende Immobilisierungseffizienzen aus und erlaubte eine hohe Aktivitätsdichte auf der Matrix ( $85.3 U \cdot g^{-1}$ ).

Im Vergleich zu den vorherigen Methoden konnte in ersten Vortests mit Thymol (56) unter Batchbedingungen auch keine Inaktivierung oder Inkompatibilität mit den verwendeten Reagenzien festgestellt werden (siehe nachfolgendes Kapitel). Aus diesem Grund wurde die kovalente Immobilisierung als Methode der Wahl für die Verwendung von Haloperoxidasen in der Durchflusschemie identifiziert. Mit der etablierten Methode sollten anschließend erste Umsetzungen im kontinuierlichen Fluss etabliert und optimiert werden.

#### 4.3.4 Optimierung immobilisierter $V_{Cl}PO-Ci$ für die Durchfluschemie

Die Nutzung von Katalysatoren in der Durchfluschemie erlaubt eine Kompartimentierung der Reaktion. So erfolgt in den meisten Fällen eine Transformation separat von der nächsten innerhalb einer Reaktionssequenz oder der Aufarbeitung der Reaktionslösung. Um diese Kompartimentierung effizient auszunutzen, muss für jeden verwendeten Katalysator der *modus operandi* definiert werden.

Da Haloperoxidasen eine indirekte Halogenierung des Substrats zur Folge haben, wurden zwei verschiedene Betriebsarten für diese Versuche betrachtet (siehe Abbildung 93).



**Abbildung 93:** Schematische Darstellung der zwei Betriebsarten des Durchfluss-Apparats mit immobilisierter  $V_{Cl}PO-Ci$

**A:** *Feed-Modus:* Die Cosubstrate, Wasserstoffperoxid und Halogenid X, werden ausgehend von einer Substratlösung in Assaypuffer als Mischung über den PBR mit immobilisierter  $V_{Cl}PO-Ci$  gespült. Dabei wird durch die HPO hypohalogenige Säure generiert, die in einem Auffanggefäß mündet. Dort ist in wenig Puffer das eigentliche Substrat, hier Thymol (**56**), vorgelegt, das durch die hypohalogenige Säure halogeniert werden kann. Nach Beendigung des Laufs wird die Lösung manuell mit EtOAc extrahiert und per GC-MS vermessen.

**B:** *Mix-Modus:* Die Cosubstrate sowie Thymol (**56**) werden als Gesamtmischung über den PBR gespült. Dabei kommt es zu einer direkten Halogenierung des Thymols (**56**) innerhalb des PBR durch  $V_{Cl}PO-Ci$ . Die halogenierten Produkte werden mitsamt nicht-umgesetzten Thymol (**56**) in ein Auffanggefäß gespült und können anschließend manuell mit EtOAc extrahiert und an der GC-MS vermessen werden. Alternativ kann die Lösung aus dem PBR direkt zurück in die Substratlösung gespeist werden, um so einen zyklischen Betrieb zu ermöglichen, sodass der Anteil nicht-halogenierten Thymols minimiert wird.

Im *feed-Modus* wird der Haloperoxidase eine Lösung bereitgestellt, die lediglich die beiden Cosubstrate, Wasserstoffperoxid und Halogenid, im Reaktionspuffer (hier Assaypuffer) enthält. In der Säule selbst findet die Bildung hypohalogeniger Säure statt, die mit Hilfe des Pumpsystems in einen Auffangkolben geleitet wird, in dem das Substrat vorgelegt ist. Die eigentliche Halogenierung könnte so erst nach der Säule erfolgen und würde einen modularen Aufbau von HPOs in Kombination mit weiteren Katalysatoren im Durchfluss vereinfachen. Das entscheidende Kriterium für diesen Modus ist die Halbwertszeit der gebildeten Halogenierungsspezies durch das Enzym.

Alternativ kann im *mix-Modus* das Substrat samt Cosubstraten als vorgemischte oder separate Lösung gleichzeitig über die Säule geführt werden, die Halogenierung fände hier primär auf der Säule

selbst statt. Dieser Modus ist technisch einfacher durchzuführen, kann aber zu Problemen durch geringe Löslichkeit der (aromatischen) Substrate in wässrigem Milieu führen.

Die Analyse beider Modi erfolgte mit zwei Säulen mit kovalent immobilisierter  $V_{Cl}PO-Ci$  (siehe Kapitel 5.7.8). Für beide Modi wurde eine geringere Flussrate ( $100 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) und eine höhere ( $250 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) mit einem Gesamtvolumen von 300 mL (0.01 mmol Thymol **56**, 1500 Äq.  $\text{H}_2\text{O}_2$  & KBr, BTA 100 mM pH 6) verglichen. Zusätzlich wurde für den *mix*-Modus ein zyklischer Betrieb getestet, bei dem eine 50 mL-Lösung mit allen Substraten in einer Schleife für 16 h über die Säule gegeben wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 20).

**Tabelle 20: Vergleich verschiedener Betriebsmodi für  $V_{Cl}PO-Ci$  im kontinuierlichen Durchfluss**

Die Reaktionslösungen wurden nach Beendigung des Laufs mit 50 mL EtOAc mit IS extrahiert und an die Dimensionen der Kalibrierung angepasst. Für die *feed*-Experimente wurde eine Säule mit einer Katalysatorbeladung von 0.129 mol-% (14.2 U), für die *mix*-Experimente eine Säule mit 0.386 mol-% (42.6 U) verwendet. Für die cyclische Nutzung wurde eine 50 mL-Lösung mit gleichen Konzentrationen verwendet. Die Kontaktzeit wurde anhand des Totvolumens des Systems und der Flussrate rechnerisch ermittelt (siehe Kapitel 5.7.7).

Modus	Flussrate [ $\mu\text{L} \text{min}^{-1}$ ]	Kontaktzeit [min]	Umsatz Thymol [%]
<i>feed</i>	100	3.93	79.4
<i>mix</i>	100	3.93	<10
<i>feed</i>	250	1.57	60.2
<i>mix</i>	250	1.57	45.0
<i>mix</i> zyklisch	250	1.57	-

Die für diese Experimente verwendeten Volumina von 300 mL wurden gewählt, um eine ausreichend hohe Cosubstratbeladung und Reaktionsdauer zu gewährleisten. Die Konzentrationen wurden dabei an die Ergebnisse der *batch*-Umsetzungen (siehe Kapitel 3.6.2) angepasst, um einen direkten Vergleich zwischen *batch*- und Durchflussreaktion zu ermöglichen. Im Vergleich wurden höhere Umsätze für den *feed*-Modus beobachtet als für den *mix*-Modus. Bei geringeren Flussraten und damit geringeren Kontaktzeiten mit dem Katalysator zeigte sich eine Verringerung des Unterschieds (60,2 gegenüber 45 %) zwischen beiden Modi, allerdings blieb der *feed*-Modus kontinuierlich über dem *mix*-Modus. Im Falle der zyklischen Auftragung konnten keine Signale im GC-MS-Chromatogramm festgestellt werden. Für alle Proben des *mix*-Modus gab es zudem wiederholte Druckprobleme während der Läufe, bei denen teilweise auch Undichtigkeiten im System festgestellt wurden. Intensive Spülungen mit Puffer zeigten, dass Thymol (**56**) und Produkte teilweise auf der Säule präzipitieren und deshalb nur stark verzögert eluieren.

Daher wurde der *feed*-Modus als Standard für alle weiteren Durchflusseperimente verwendet. Zur gezielten Optimierung der Umsätze von Thymol (**56**) sollte der Einfluss einzelner Parameter mithilfe eines DoE-Ansatzes untersucht werden. Die Reaktionsvolumina wurden so herunterskaliert, dass in jedem Ansatz 1.2 Äquivalente beider Cosubstrate generiert werden. Untersucht wurde der Einfluss der Konzentration von Wasserstoffperoxid und Kaliumbromid sowie die Flussrate, die inhärent mit der Kontaktzeit der Cosubstrate mit dem Enzym auf der Säule zusammenhängt. Als vierter Parameter wurde die Katalysatorbeladung getestet, indem alle Ansätze mit zwei unterschiedlich hoch beladenen Säulen (6.17 U und 3.60 U) mit  $V_{Cl}PO-Ci$  getestet wurden. In diesem Fall wurde der Parameter kategorisch behandelt. Um die Menge der eingesetzten Reagenzien und die Reaktionsdauer zu minimieren, wurden alle Ansätze auf etwa einen Milliliter skaliert.

Trotz gleicher Durchführung im Vergleich zu den ersten Durchflussversuchen konnte für nahezu keinen der Läufe Umsatz von Thymol (**56**) festgestellt werden. Auch nach Nutzung frisch gepackter und neu immobilisierter Säulen V<sub>Cl</sub>PO-*Cl* konnte im Rahmen des DoE-Ansatzes kein messbarer Umsatz festgestellt werden. Um ein systematisches Problem auszuschließen, wurden mehrere Ansätze auf höhere Volumina skaliert und der Umsatz der Reaktion für verschiedene Kontaktzeiten bestimmt (siehe Tabelle 21).

**Tabelle 21: Vergleich des Einflusses verschiedener Kontaktzeiten und Cosubstratmengen auf den Umsatz von 0.01 mmol Thymol (**56**) im Durchfluss**

Für alle Experimente wurde die Reaktionslösung gemäß vorherigen Angaben mit EtOAc extrahiert und mittels IS an der GC-MS vermessen. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit Assaypuffer gespült, bevor ein weiterer Lauf begonnen wurde. Für Umsätze unter 10 % konnte mit der verwendeten Kalibrierfunktion für Thymol keine akkurate Bestimmung gewährleistet werden.

Reaktionsvolumen [mL]	Äquivalente Cosubstrate	Flussrate [ $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ]	Kontaktzeiten [min]	Umsatz Thymol [%]
40	200	250	1.57	23.6
300	1500	250	1.57	69.1
40	400	100	3.93	53.2
288	1500	50	7.86	48.9
40	200	10	39.3	< 10
50	250	10	39.3	< 10

Die beobachteten Umsätze und Signale für Thymol (**56**) zeigen, dass Versuche im kontinuierlichen Fluss nicht skalierbar zu sein scheinen. Geringere Kontaktzeiten scheinen einen höheren Umsatz zu erzielen, wobei hier der Einfluss der Konzentration der einzelnen Cosubstrate vernachlässigt wird. Die Optimierung der Haloperoxidase-vermittelten Halogenierung im Durchfluss muss daher unter Berücksichtigung längerer Reaktionszeiten und komplexerer Wechselwirkungen zwischen Cosubstratmenge und Kontaktzeiten optimiert werden. In vielen Versuchen wurde mit dem verwendeten System (siehe 5.7.7) zudem massive Dichtigkeitsprobleme beobachtet, die teilweise zu einer Beschädigung der Pumpsysteme führten (siehe Abbildung 94).



**Abbildung 94: Verwendete Pumpe für Durchflussreaktionen mit  $V_{Cl}PO-Ci$  nach einer Nutzung von 5 Tagen**

Bei den silbrig-grauen Partikeln schien es sich um abgelöste Bestandteile der Pumpenhalterungen (rot) zu handeln, die durch undichte Stellen der Spitzenkolben in Kontakt mit der Reaktionslösung kamen. Welcher Bestandteil der Reaktionslösung dafür verantwortlich ist, konnte nicht bestimmt werden.

Trotz einer vom Hersteller ausgewiesenen Resistenz des Systems gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln und Verbindungen schienen Teile der Reaktionslösung das verwendete Metall für die Pumpenhalterungen durch ungeklärte undichte Stellen in verschiedenen Spritzenkolben aufzulösen. Mit dem hier verwendeten System aus *Syrris Asia* Pumpeinheit und Omnifit-Säulen kann somit keine HPO-katalysierte Reaktion im kontinuierlichen Durchfluss für längere Zeiträume stattfinden.

Die Verwendung von Haloperoxidasen als Biokatalysatoren in der kontinuierlichen Durchflusschemie konnte somit im Prinzip aufgezeigt werden. Die Nutzung dieser Enzymfamilie ist jedoch mit einigen technischen wie wissenschaftlichen Problemen verbunden, die für eine sinnvollere Nutzung erst behoben werden müssen. Durch die Identifikation eines geeigneten Betriebsmodus für diese Enzymfamilie ist aber der Grundstein für die Kombination dieser Enzymfamilie mit weiteren Katalysatoren oder Nutzung in komplexeren Systemen gelegt.

#### 4.3.5 Kombination von Haloperoxidasen mit weiteren Systemen im flow

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erste Schritte für die Anwendung von Haloperoxidasen im Durchfluss erarbeitet. Hierzu wurde eine geeignete kovalente Immobilisierungsmethode für  $V_{Cl}PO-Ci$  etabliert (siehe Kapitel 4.3.3). Erste Versuche mit dem Testsubstrat Thymol (**56**) zeigten erfolgreiche Umsätze, die jedoch deutlich an Effizienz mangeln (siehe 4.3.4). Die bisherigen Optimierungsversuche zeigten eine problembehaftete Skalierbarkeit der Reaktion. Lediglich bei Erhöhung des Reaktionsvolumens mit geringeren Kontaktzeiten konnten Umsätze über 50 % erhalten werden. Eine mögliche Stellschraube ist die Katalysatorbeladung auf der verwendeten Säule. Diese könnte einen maßgeblichen Einfluss auf die Umsatzraten haben und könnte bei höherer Packungsdichte zu gleichen oder besseren Umsätzen bei geringeren Reaktionsvolumina führen.

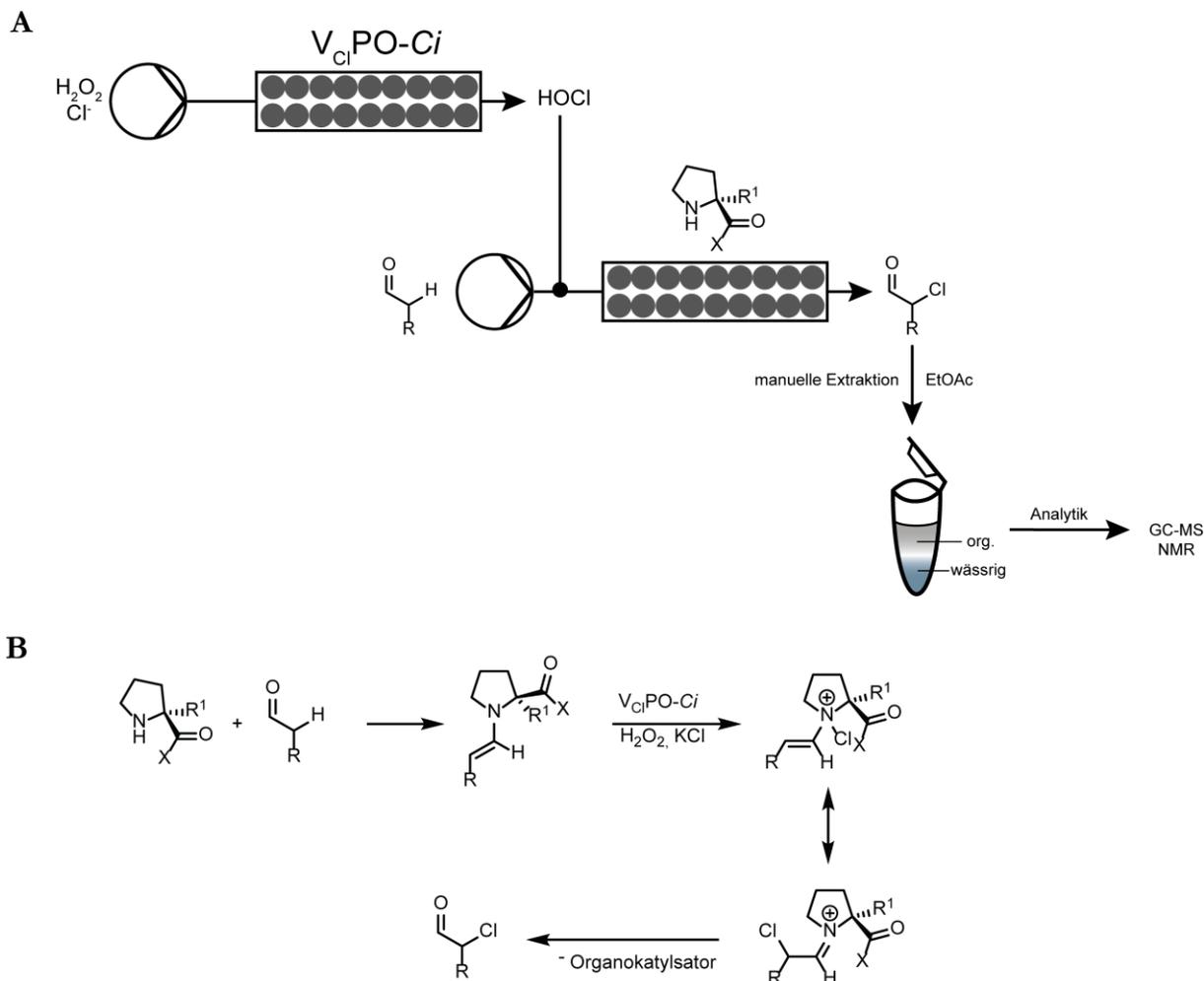
Neben den Problemen in der Skalierbarkeit litt das System auch an Dichtigkeitsproblemen und damit Unverträglichkeiten zwischen dem Pumpsystem und der Reaktionslösung. Obwohl die

verwendeten Polytetrafluorethylen (PTFE) und Materialien inert gegenüber den verwendeten Bedingungen sein sollten, könnten angepasste Systeme für stark oxidative Bedingungen geeigneter sein. Ein Beispiel könnten Carbon- oder Graphit-Schläuche sein, wobei auch hier oxidativer Abbau der Schläuche nicht ausgeschlossen werden kann.<sup>[349]</sup>

In Kombination mit den Erkenntnissen aus der Charakterisierung neuer Haloperoxidasen (siehe Kapitel 3.5) wäre die Immobilisierung und Nutzung der beiden HPOs aus *R. roseus* und *L. pratensis* von Interesse. Im Fall von VPO-*Lp* könnte die Nutzung als CatIB, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, eine direkte Anwendung im Durchfluss erlauben (siehe Kapitel 4.2.2). Für VPO-*Rr* ist besonders die ermittelte hohe Umsatzzahl von über 1000 s<sup>-1</sup> von Relevanz. Wie Berechnungen für V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* in Kapitel 3.8 zeigen konnten, besitzen Haloperoxidasen theoretisch hohe TON und TF. Durch die Nutzung als immobilisiertes Enzym innerhalb eines Reaktors könnten diese Werte, insbesondere bei nativ hohen Umsatzraten, zu besonders leistungsfähigen Biokatalysatoren im Durchfluss führen. Je nach Selektivität könnten so auch komplementäre Haloperoxidasen abhängig vom umzusetzenden Substrat eingesetzt werden und würden so zu einem Haloperoxidase-Portfolio im Durchfluss beitragen.

Der eigentliche Vorteil der Nutzung von Biokatalysatoren im Durchfluss zeigt sich am besten bei der Nutzung modularer Systeme für Reaktionskaskaden. In diesem Umfeld finden einzelne Reaktionsschritte im jeweiligen Reaktor statt und ermöglichen die Synthese komplexer bzw. hochfunktionalisierter Verbindungen innerhalb eines Aufbaus, teilweise ohne manuelle Aufarbeitungsschritte.<sup>[254]</sup> Somit ist auch die Nutzung verschiedener Katalysatortypen wie Organo- und Biokatalysatoren in einem Prozess möglich.<sup>[350]</sup>

Eine Möglichkeit für Kaskadenreaktionen mit Haloperoxidasen wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet. Enantiomeren-angereicherte  $\alpha$ -chlorierte Aldehyde stellen wichtige chirale Bausteine in der Wirkstoffsynthese dar.<sup>[351-354]</sup> Die stereoselektive  $\alpha$ -Chlorierung von Aldehyden mit NCS konnte von MacMillan und Jørgensen etabliert und später u.a. von Hutchinson *et al.* und Ponath *et al.* fortgeführt werden.<sup>[355, 356]</sup> Dabei wurden exzellente Enantiomerenverhältnisse (mind. 97:3 bis zu 99:1) bei moderaten bis sehr guten Ausbeuten für verschiedene aromatische und aliphatische Aldehyde erzielt.<sup>[355, 356]</sup> Schlüsselschritt bei der mechanistischen Betrachtung dieser Reaktion ist die Chlorierung des Organokatalysators, in diesem Fall ein Jørgensen-Hayashi artiger Katalysator (**73**), die langsam erfolgen muss. Der Katalysator selbst kann anschließend die Chlorierung in  $\alpha$ -Position zum Aldehyden katalysieren. Als Alternative zur langsamen Bereitstellung von NCS wurde V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* im Durchfluss verwendet. Gemeinsam mit einem immobilisierten Jørgensen-Hayashi-Katalysator, der freundlicherweise von Teresa Friedrichs (AG Pietruszka, HHU Düsseldorf) innerhalb der Arbeitsgruppe bereitgestellt wurde, wurde eine chemo-enzymatische Chlorierung von Aldehyden im Durchfluss versucht. In einem ersten Experiment erfolgte die Umsetzung von Hydrozimaldehyd (**75**) in einem Testaufbau (siehe Abbildung 95).

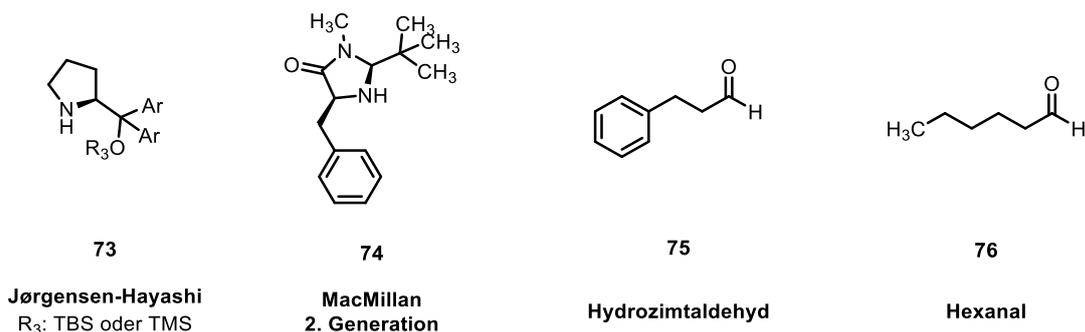


**Abbildung 95: Schematischer Aufbau des getesteten Kaskadenaufbaus von  $V_{Cl}PO-Ci$  und Organokatalysator im Durchfluss**

**A:** Analog zu den Durchflussversuchen mit Thymol (**56**) wird von  $V_{Cl}PO-Ci$  in Anwesenheit von Chlorid und Wasserstoffperoxid hypochlorige Säure generiert. Diese ist als Surrogat für NCS in der Lage, den in einem zweiten Reaktor immobilisierten Organokatalysator, wie etwa Jørgensen-Hayashi- oder MacMillan-artig, zu chlorieren. Zu diesem zweiten Reaktor wird aus einem separaten Reservoir der Aldehyd in organischem Lösungsmittel wie MeCN oder DCM gepumpt. Der chlorierte Organokatalysator ist damit in der Lage, die stereoselektive Chlorierung des Aldehyds in  $\alpha$ -Position zu katalysieren. Das BTA-Puffer-Lösungsmittelgemisch landet in einem Auffanggefäß und kann danach eingengt und analysiert werden. **B:** Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der Organokatalysator-vermittelten  $\alpha$ -Chlorierung von Aldehyden, adaptiert nach Ponath *et al.*<sup>[355, 356]</sup> Im ersten Schritt addiert der Aldehyd am Imidazolidin-Stickstoff. Darauf kann im nächsten Schritt formal eine Chloronium-Spezies, hier in Form hypochloriger Säure statt NCS, ebenfalls addieren. Der positiv-geladene Komplex kann nun durch eine Umlagerungsreaktion in die Imin-Form überführt werden, wobei Chlor an die  $\alpha$ -Position des Aldehyds wandert. Durch eine Hydrolyse wird der chlorierte Aldehyd in Enantiomeren-reiner Form freigegeben und der Organokatalysator regeneriert.

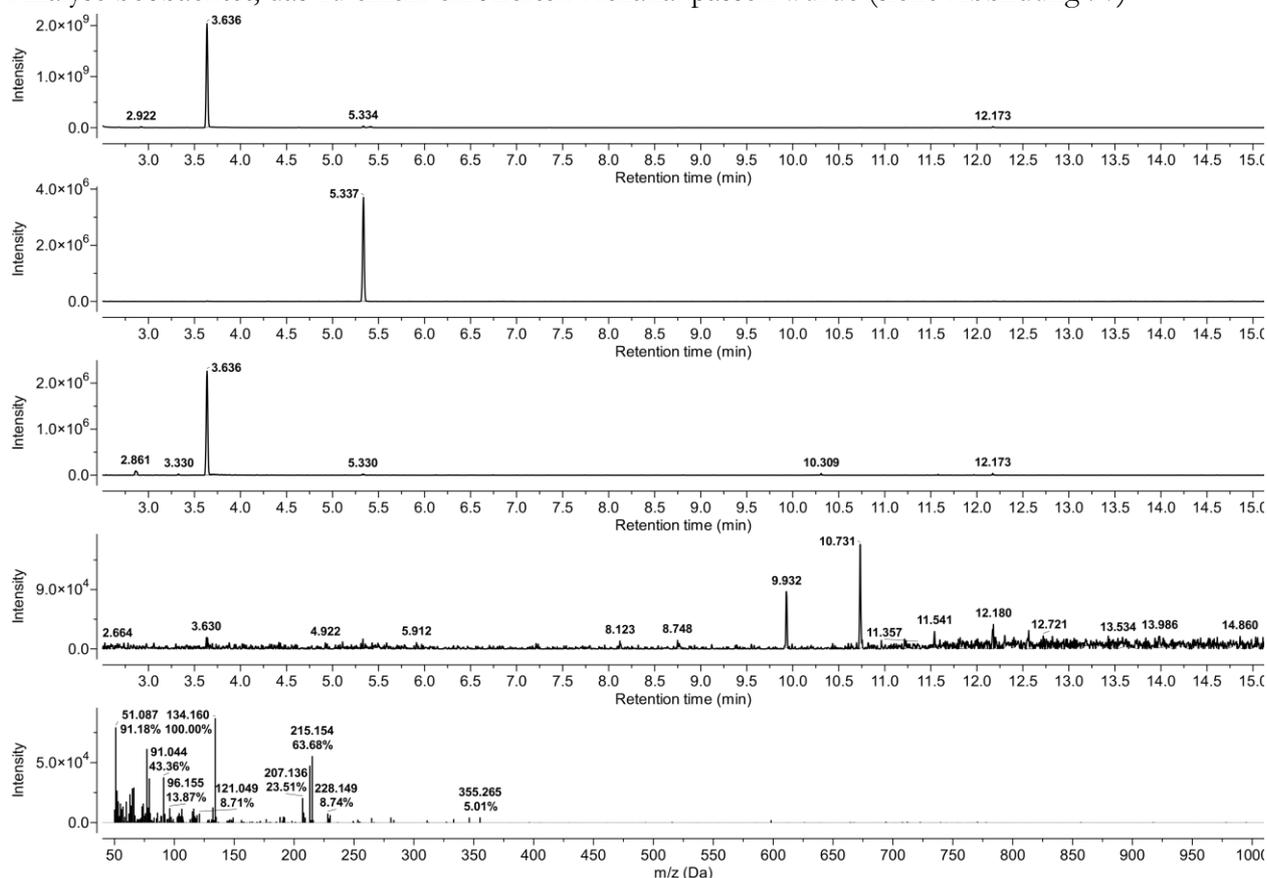
Bedingt durch technische Ausfälle konnte keine detaillierte Analyse der Umsetzung von Hydrozimtaldehyd (**75**) erfolgen.  $^1H$ -NMR-Spektren der Rohprodukte zeigten allerdings die Bildung von Zimtaldehyd (**77**) (siehe Kapitel 5.7.23). Dieser Umstand könnte auf eine Eliminierungsreaktion hindeuten, bei der Chlor die Reduktion der Einfachbindung des Hydrozimtaldehyds (**75**) forciert (siehe Abbildung 117 für die detaillierte Hypothese und den Nachweis). In einem alternativen Ansatz wurde

Hexanal (**76**) als Modellaldehyd ausgewählt und mit dem nicht-immobilisierten *MacMillan*-Katalysator der zweiten Generation (**74**) in gleichartiger Weise im Durchfluss umgesetzt (siehe Abbildung 96).



**Abbildung 96:** Übersicht der verwendeten Organokatalysatoren (links) und der Modellaldehyde (rechts) für Versuche im kontinuierlichen Durchfluss

Bei diesen Versuchen wurde neben dem Signal von Hexanal (**76**) auch ein Signal in der GC-MS-Analyse beobachtet, das zu einem chlorierten Hexanal passen würde (siehe Abbildung 97).



**Abbildung 97:** GC-MS-Chromatogramm der Umsetzung von Hexanal im kontinuierlichen Durchfluss mit  $V_{Cl}PO-Ci$  und vorgelegten *MacMillan*-Katalysator nach 96 h

Dargestellt sind das Rohchromatogramm (oben), die extrahierten Massenspektren für 126 m/z für den internen Standard *m*-Chlortoluol, 100 m/z (entspricht der molekularen Masse von Hexanal (**76**)), 134 m/z (entspricht der molekularen Masse von Cl-Hexanal) und das Massenspektrum des Signals bei 9.93 min.

Ob es sich dabei um ein Enantiomeren-angereichertes oder racemisches Gemisch handelt, konnte aufgrund einer fehlenden Referenz bisher nicht bestimmt werden. Die bisherigen Ergebnisse dieser chemo-enzymatischen Kaskade sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabelle 22).

**Tabelle 22: Ergebnisse der ersten Versuche zur MacMillan-Haloperoxidase-Kaskade mit Hexanal**

Die Katalysatorbeladungen wurden anhand der Menge immobilisierter  $V_{Cl}PO-Ci$  auf der Säule relativ zur Stoffmenge Hexanal (**76**) bzw. der Menge des vorgelegten MacMillan-Katalysators (**74**) im Auffangkolben relativ zu Hexanal (**76**) berechnet. Die relativen Signalfächen wurden anhand der isolierten Massespuren für Cl-Hexanal bezogen auf die isolierte Massespur von Hexanal normiert.

Reaktionszeit [h]	Katalysatorbeladung $V_{Cl}PO-Ci$ [%]	Katalysatorbeladung ( <i>batch</i> ) MacMillan [%]	Flussrate [ $\mu L \cdot min^{-1}$ ]	Signal Cl-Hexanal [rel. Fläche zu Hexanal in %]
24	0.013	20	50	-
24	0.039	20	50	-
96	0.013	20	50 (26 h)	1.25
			20 (70 h)	
96	0.039	20	50 (26 h)	1.18
			20 (70 h)	

Auch im Rahmen dieses Versuchs zeigt sich erst ein Umsatz bei größeren Mengen an Cosubstraten für die  $V_{Cl}PO-Ci$ -vermittelte Generierung von hypochloriger Säure. Die hier gezeigten Ergebnisse stellen aufgrund der geringen Datenlage lediglich ein Indiz für die Hypothese der Kaskadenreaktion mit Organokatalysator und Haloperoxidase dar, können aber als Startpunkt für weitere Versuche dienen. Neben Hexanal bieten sich auch Phenylethanal und weitere synthetisch nutzbare Aldehyde zur weiteren Etablierung und Optimierung des Systems an. Die so möglichen Umsetzungen könnten den Weg zur einfacheren Nutzung von Haloperoxidasen in Multi-Komponenten-Reaktionen wie komplexeren Kaskaden ebnen und diese Enzymfamilie für die Nutzung in der Durchfluschemie etablieren.

## 5 EXPERIMENTALTEIL

### 5.1 Allgemeines

#### 5.1.1 Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Geräte für die Durchführung molekularbiologischer, biochemischer und chemischer Experimente und Analysen verwendet. Diese sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (siehe Tabelle 23).

**Tabelle 23: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Geräte**

Gerätetyp	Name bzw. Beschreibung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	300 V Netzgerät	<i>VWR International</i> GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Agarosegelkammern	<i>peqLab Biotechnologie</i> GmbH, Erlangen, Deutschland
Chromatographiesystem (Proteine)	ÄKTA™ Purifier	<i>GE Healthcare</i> , München, Deutschland
Chromatographiesystem (HPLC)	Agilent1100	<i>Agilent Technologies</i> , Santa Clara, USA
	Dionex UltiMate 3000	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
Chromatographiesystem (GC-MS)	Trace 1310 (GC)	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
	ISQ™ QD Single Quadrupole Massenspektrometer	
Fotoapparat	<i>Canon</i> EOS 1000D, digitale Spiegelreflexkamera mit EF-S 60 mm f/2.8 USM	<i>Canon Deutschland</i> GmbH, Krefeld, Deutschland
	Makroobjektiv	<i>Canon Deutschland</i> GmbH, Krefeld, Deutschland
	<i>Canon</i> EOS 6D Mark II, digitale Spiegelreflexkamera mit <i>Canon</i> EF 24–105 mm f/4L IS USM Objektiv	
Gelelektrophorese für SDS-PAGE	Gelelektrophoresesystem für Invitrogen <i>precast SDS-PAGE-gels (XCell Sure-Lock™ Mini-Cell Electrophoresis System)</i>	<i>Invitrogen</i> GmbH, Darmstadt, Deutschland
	<i>Bio-Rad</i> Mini-Protean® Tetra System	<i>Bio-Rad Laboratories</i> GmbH, München, Deutschland
Heizschrank	Jouan Innovens 234 EU1	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
NMR	600 MHz NMR	<i>Bruker, Billerica, USA</i>

## Experimentalteil

Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph MR 3001 K, kombiniert mit EKT HeiCon Kontaktthermometer	<i>Heidolph Instruments GmbH &amp; Co. KG, Schwabach, Deutschland</i>
PCR-Cycler	VWR Doppio Biometra TProfessional Basic Gradient	<i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> <i>Analytik Jena AG, Jena, Deutschland</i>
pH-Meter	Mikroprozessor-pH-Meter 764	<i>Knick Elektronische Messgeräte GmbH &amp; Co. KG, Berlin, Deutschland</i>
pH-Elektrode	NORDANTEC pH-Elektrode IJ44C	<i>NORDANTEC GmbH, Bremerhaven, Deutschland</i>
Photometer	NanoDrop 2000c, Kleinvolumenphotometer Tecan Infinite® M1000 PRO, Mikrotiterplatten	<i>Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA</i> <i>Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz</i>
Pipetten	Eppendorf Research, 0.1–2.5 µL Eppendorf Research, 1–10 µL Eppendorf Research, 10–100 µL Eppendorf Research, 100–1 000 µL	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i> <i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i> <i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i> <i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i>
Pumpen	Eppendorf Research, 0.5–5 mL Vaccubrand RZ 6 Drehschieberpumpe DIVAC 1.2L Membranpumpe	<i>Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland</i> <i>Vaccubrand GmbH &amp; Co. KG, Wertheim, Deutschland</i> <i>Leybold GmbH, Köln, Deutschland</i>
Rotationsverdampfer	Büchi Rotavapor® R-210 Rotationsverdampfer mit Büchi B-491 Heizbad und Büchi V-700 Membranpumpe Büchi Rotavapor® R-114 Rotationsverdampfer mit Büchi B-480 Heizbad und Büchi V-700 Membranpumpe	<i>Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland</i> <i>Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland</i>
Schüttler und Inkubatoren	BioCote Stuart rotator SB2, Rotorschüttler in 37 °C Konstantraum für Kulturröhrchen Edmund Bühler TiMix, Schüttler mit	<i>BioCote Ltd, Wolverhampton, UK</i> <i>Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland</i>

	Inkubationshaube für Reaktionsplatten Eppendorf MixMate PCB-11, Schüttelblock für Reaktionsplatten Eppendorf Thermomixer compact, beheizter Schüttelblock für 1.5–2 mL Reaktionsgefäße <i>Heidolph Unimax 1010</i> , Plattformschüttler für Flüssigkulturen; mit <i>Heidolph Inkubator 1000</i> , Inkubationshaube <i>Hettich Benelux MKR23</i> , beheizter/gekühlter Schüttelblock für 1.5–50 mL Reaktionsgefäße <i>New Brunswick™ Innova® 42R</i>	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland  <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland  <i>Heidolph Instruments</i> , GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland  <i>Hettich Benelux B.V.</i> , Geldermalsen, Niederlande
Ultraschallbad	<i>Sonorex RK 100H</i>	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland  <i>Bandelin electronic GmbH &amp; Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
UV-Lampe	<i>Prinz UV-Testlampe</i> für Netzbetrieb <i>Sartorius MC1</i> , Laborwaage	<i>PRINZ Verlag GmbH</i> , Passau, Deutschland  <i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Waagen	<i>Sartorius LA1200S</i> , Feinwaage <i>Sartorius 2004MP</i> , Ultrafeinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland  <i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Zellaufschluss	<i>Sonopuls HD2070</i> , verschiedene Horngrößen (1.5–50 mL) <i>Beckman Coulter Optima L-80 XP</i> , Ultrazentrifuge <i>Beckman Coulter</i> <i>Type 50.2 Ti Rotor</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Bandelin electronic GmbH &amp; Co. KG</i> , Berlin, Deutschland  <i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA  <i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA
Zentrifugen	<i>Eppendorf Centrifuge 5242R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL) <i>Eppendorf Centrifuge 5810R</i> , gekühlte Zentrifuge mit	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland  <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland

Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL) <i>Eppendorf Concentrator</i> 5301, Vakuumpzentrifuge	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
<i>Sorvall</i> F10S-4x1000, Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sorvall</i> F9S, Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sorvall</i> RC6+, gekühlte Standzentrifuge	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA

### 5.1.2 Software

Für die Dokumentation, Auswertung und Darstellung von Daten wurden verschiedene kostenpflichtige wie kostenlose Programme verwendet, die mit dem jeweiligen Einsatzgebiet nachfolgend zusammengefasst sind (siehe Tabelle 24).

**Tabelle 24: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Programme und deren Einsatzgebiet**

Software	Verwendung	Hersteller
ChemBioDraw 16.0 & 18.0	Zeichnen von Strukturformeln	<i>PerkinElmer Informatics</i>
CloneManager 9.4 Professional	Planung von Klonierungsstrategien	<i>Scientific &amp; Educational Software</i>
Snappene 6.1	Planung von Klonierungsstrategien	
Adobe Illustrator CC	Erstellung von Vektorgrafiken	<i>Adobe Systems</i>
Endnote X9.3 und 20	Literaturverwaltung	<i>Clarivate™</i>
Adobe Acrobat Pro	Erstellung und Bearbeitung von PDF-Dokumenten	<i>Adobe Systems</i>
Adobe Photoshop CC schiebo	Verarbeitung von Kamera-Rohdaten Cloud-Speicher für wissenschaftliche Daten	<i>Adobe Systems</i> <i>ownCloud GmbH über Hochschulcloud NRW</i>
Design Expert 11 & 12	Experimentaldesign für <i>design of experiment</i> und Auswertung	<i>StatEase, Inc.</i>
ensochemLab 7.0.5	Elektronisches Laborjournal	<i>enso Software GmbH</i>
ImageJ	Densitometrie	<i>Freeware</i>
Jalview		<i>Freeware</i>
Graphpad Prism 8	Wissenschaftliche Darstellung von Daten	
MestReNova 10.0	Analyse von NMR- und GC-MS Daten	<i>Mestrelab Research S.L.</i>
Microsoft Excel 2010, 2016 & 365	Auswertung von Datensätzen	<i>Microsoft Corp.</i>
Microsoft PowerPoint 2010, 2016 & 365	Erstellung von Präsentationen	<i>Microsoft Corp.</i>
Microsoft Word 2010, 2016 & 365	Erstellung von Textdokumenten	<i>Microsoft Corp.</i>

OriginPro 9.0G, 2018 & 2021b	Lineare und nicht-lineare Anpassung und Auswertung von Daten	OriginLab Corp.
UCSF Chimera 1.16	Visualisierung und Analyse von Proteinstrukturen	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, CA, USA
UCSF ChimeraX 1.4	Visualisierung und Analyse von Proteinstrukturen	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, CA, USA

### 5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen für Luftpolsterpipetten (0.1-1 000  $\mu\text{L}$ ), Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL), Petrischalen (92  $\times$  16 mm) und Semimikroküvetten (Polystyrol) wurden von *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Sterile Einwegspritzen der Injekt®-Serie (Polypropylen/Polyethylen) wurden von der *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Deutschland) bezogen, während sterile Spritzenfilter (0.20  $\mu\text{m}$ , Celluloseacetatmembran) und Spritzenfilter mit regenerierter Cellulose (Sartorius Minisart RC4, 0.45  $\mu\text{m}$ ) von der *VWR International GmbH* (Darmstadt, Deutschland) verwendet wurden. Sterile Flaschenaufsatzfilter für die Sterilfiltration größerer Mengen Flüssigkeit (0.2  $\mu\text{m}$ , 250 mL, Polyethersulfon) wurden von der *Sarstedt AG & Co. KG* (Nümbrecht, Deutschland) erworben. Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten mit Kieselgel 60 ([Polygram®SIL G/UV254; spezifische Oberfläche (BET)  $\approx$  500  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , mittlere Porengröße 60  $\text{\AA}$ , spezifisches Porenvolumen 0.75  $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , Partikelgröße 5-17  $\mu\text{m}$ ]) und DC-Platten mit Aluminiumoxid [Polygram®Alox N/UV254; spezifische Oberfläche (BET)  $\approx$  200  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , mittlere Porengröße 60  $\text{\AA}$ ] wurden von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) erworben. Ansätze, die über präparative Säulenchromatographie isoliert wurden, verwendeten Kieselgel 60 (Partikelgröße 40 – 63  $\mu\text{m}$ ). Durchsichtige und schwarze Mikrotiterplatten für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen (Nunclon® und Greiner96 Flat, Polystyrol, flacher Boden, Kaminform) wurden von *Nunc™ Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) und *Greiner Bio-One GmbH* (Frickenhausen, Deutschland) erworben.

### 5.1.4 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von *Carl Roth GmbH & Co KG* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma-Aldrich/Fluka* (Steinheim, Deutschland), *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, Deutschland), *TCI Europe* (Zwijndrecht, Belgien), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland) und *VWR International* (Radnor, PA, USA) oder *BLD Pharma* (Kaiserslautern, Deutschland) erworben. Verwendete organische Lösungsmittel wurden, falls nicht für die Synthese verwendet, kommerziell erworben und in einer destillierten, stabilisatorfreien Form verwendet.

### 5.1.5 Enzyme

Gängige molekularbiologisch relevante Enzyme und Materialien, wie etwa die *Phusion Hot Start II DNA-Polymerase* (2 U/ $\mu\text{L}$ ), *Phire Hot Start II DNA-Polymerase*, *T4 DNA-Ligase*,

## Experimentarteil

DpnI (10 U/ $\mu$ L), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, jeweils 10 mM) und alle Restriktionsendonukleasen wurden bei *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) erworben. Kommerzielle CPO-*Cf* und *V<sub>Br</sub>PO-Co* wurde von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) erworben.

### 5.1.6 Plasmide und Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in Form eines Lyophilisats von *Sigma Aldrich* (Steinheim, Deutschland) erworben und vor Nutzung mit *dest.* H<sub>2</sub>O gelöst, sodass eine 100 mM Stammlösung erhalten wurde. Die verwendeten Oligonukleotide sind nachfolgend gelistet (siehe Tabelle 25).

#### Tabelle 25: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für Klonierungen

Die Bezeichnungen beziehen sich auf die Dateinamen der jeweiligen Sequenzen, die Nummerierung (#) erfolgte innerhalb der Katalogisierung des jeweiligen Experiments. Alle Sequenzen werden in 5'→3'-Richtung angegeben. Die Suffixe „\_fw“ und „\_rv“ beziehen sich auf die Orientierung der Primer bei Bindung an den *sense*- bzw. *antisense*-Strang. Durch Primer eingeführte Mutationen der Sequenz sind fett dargestellt. Unterstrichene Sequenzen symbolisieren überlappende Sequenzen mit dem Zielgen. Die Methode, die mit diesem Primer verwendet wurde, ist mit GA (*Gibson Assembly*<sup>®</sup>) und QC (*QuikChange*) angegeben.

Bezeichnung	#	5'→3'-Sequenz	Klonierungsmethode
AFE001_V003_MWA001_V442_pET21a_NHaloVector_fw	AFE001_V003_1	<u>AGGAGGCGCCGGATCCT-</u> GACTCGAGCACCACCAC	GA
AFE001_V003_MWA001_V442_pET21a_NHaloVector_rv	AFE001_V003_2	<u>ATGGGTGTAACGGACCCCAT-</u> <u>GCTAGCCATTTTCGCCGC</u>	GA
AFE001_V003_pET21a_VclPO_NHalo_Fragment_fw	AFE001_V003_3	CAGCGCGAAAAAT <u>GGCTAGCAT-</u> <u>GGGGTCCGTT</u>	GA
AFE001_V003_pET21a_VclPO_NHalo_Fragment_rv	AFE001_V003_4	TGGTGGTGGTGGTGCTCGAGT <u>CAG-</u> <u>GATCCCGG</u>	GA
AFE001_V012_A383_K_rv	AFE001_V012_4	GGAATGTCGTTGGTGTTAG- TAGCTGG <b>CTT</b> ACCGAGAGT- GAGCCAGAAAGG CTGGCTCACTCTCGG-	QC
AFE001_V012_A383_K_fw	AFE001_V012_3	<b>TAAGCCAGCTACTAACACCA-</b> ACGACATTC CCTGACGGGACCAC-	QC
AFE001_V012_A_to_K_70_fw	AFE001_V012_1	CTCTCTCT <b>AAG</b> AGGGCTCTGGGTATGC	QC
AFE001_V012_A_to_K_70_rv	AFE001_V012_2	GCATACCCAGAGCCCT <b>CTT</b> AG- AGAGAGGTGGTCCCCTCAGG	QC

Für die Synthese von Genen wurde die Firma Genscript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA) beauftragt. Sämtliche Gene wurden, mit Ausnahme des Gens UPO-Aa im pPICZB-Plasmid, im Plasmid pET21a(+) erstellt und mit einem 6xHis-StrepII-Tag versehen. Die verwendeten Gene sind nachfolgend gelistet (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht über die verwendeten oder erstellten Plasmide in dieser Arbeit

Plasmidbezeichnung	Genotyp	Herkunft
pET21a(+)	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori	Novagen
AFE001_V002_pET21a_V <sub>B<sub>r</sub></sub> PO- <i>Co</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, V <sub>B<sub>r</sub></sub> PO- <i>Co</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V003_pET21a_V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V003_pET21a_V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> _NHalo	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> (N-Halo-Tag)	Diese Arbeit
AFE001_V004_pET21a_CPO- <i>Cf</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, CPO- <i>Cf</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V005_pET21a_VPO- <i>Lp</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, VPO- <i>Lp</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V007_pPICZB_UPO- <i>Aa</i>	<i>FLD1</i> promotor, $\alpha$ -Faktor Sekretionssignal, V5 Epitop, AOX1 termination region, TEF1 promotor, Zeo <sup>r</sup> , CCYC1 transcription termination, pUC origin, UPO- <i>Aa</i> (C-His <sub>6</sub> )	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V008_pET21a_VPO- <i>An</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, VPO- <i>An</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V009_pET21a_VPO- <i>Fc</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, VPO- <i>Fc</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V010_pET21a_VPO- <i>Sf</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, VPO- <i>Sf</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V011_pET21a_VPO- <i>Rr</i>	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, VPO- <i>Rr</i> (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Genscript USA Inc. Diese Arbeit
AFE001_V012_pET21a_V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> _A70K	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> A70K (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Diese Arbeit
AFE001_V012_pET21a_V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> _A402K	<i>lacI</i> , Amp <sup>r</sup> , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori, pBR322 ori, V <sub>C<sub>i</sub></sub> PO- <i>Ci</i> A402K (N-His <sub>6</sub> -StrepII)	Diese Arbeit

### 5.1.7 Mikroorganismen

Für die Klonierung und Produktion von Proteinen wurden unterschiedliche Wirtsorganismen verwendet, die nachfolgend zusammengefasst wurden (siehe Tabelle 27).

**Tabelle 27: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen**

<b>Mikroorganismus</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verwendung</b>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) phoA supE44 $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1	Sigma	Klonierung
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon</i> <i>hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB <sup>+</sup> ]K <sup>-</sup> 12( $\lambda$ S)	Sigma	Proteinproduktion
<i>E. coli ArcticExpress</i> (DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) <i>endA</i> Hte [ <i>cpn10 cpn60</i> Gent <sup>r</sup> ]	Agilent	Proteinproduktion
<i>C. fumago</i> 1256	Wildtyp Stamm 1256	DSMZ (DS-No.: 1256)	Proteinproduktion (CPO- <i>Cf</i> )

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Primerdesign

Das Ziel von Primern ist die Amplifikation eines gewünschten Gens bzw. Genabschnitts über PCR. Primer dienen dabei als Bindungsstelle für die DNA-Polymerase, die an doppelsträngiger DNA bindet und die Amplifikation des Einzelstrangs durchführt. Primer wurden mit Hilfe der implementierten Primerdesign-Werkzeuge in *Snapgene* erstellt und abhängig von der geplanten PCR-Methode optimiert. Für klassische PCR wurden Schmelzpunkte bei 50 – 60 °C bei einer Basenlänge von etwa 20 und minimalem GC-Gehalt angestrebt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte mit Hilfe der Vorhersage bei *Snapgene* und des Online-Programms *Oligocalc* mit dem *nearest neighbour* Algorithmus. Für *Gibson Assembly*<sup>®</sup> Ansätze wurden entsprechende Primer mit dem *assembly cloning* Werkzeug in *Snapgene* erstellt und dabei überlappende Teile des Vektors am 5'-Ende und des Zielfragments am 3'-Ende in den Primer inkorporiert. Die Größe der Primer wurde dabei auf unter 100 Basen mit Schmelzpunkten zwischen 55 – 80 °C und GC-Gehalten von 10 – 90 % gehalten. Vor jedem PCR-Experiment wurde der Erfolg der Reaktion über die entsprechende *in silico* Klonierung bestätigt und als eigene Datei hinterlegt.

### 5.2.2 Klassische PCR

Für die Amplifikation von Genen bzw. Genabschnitten wurden PCR-Reaktionen mit der *Phire Hot Start II* DNA Polymerase durchgeführt. Alle notwendigen Komponenten für die PCR wurden als Stammlösung angesetzt und auf die entsprechenden Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zu Ansätzen mit DNA-Abschnitten mit hohem GC-Gehalt wurde DMSO hinzugegeben, um die Bindung der Primer an den entsprechenden DNA-Strang zu erleichtern. Die Zusammensetzung der Stammlösung sowie das verwendete Temperaturprogramm sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen (siehe Tabelle 28).

**Tabelle 28: Allgemeine Zusammensetzung klassischer PCR-Ansätze mit zugehörigem Temperaturprogramm**

Bestandteil	Stammkonzentration	Volumen	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
DNA-Templat	20-50 ng · µL <sup>-1</sup>	1 µL	Initiale Denaturierung	98	30 s
Forward Primer	10 µM	1 µL	Denaturierung	98	10 s
Reverse Primer	10 µM	1 µL	Anlagerung	50 – 80	30 s
dNTP-Mix	10 mM	0.4 µL	Elongation	72	15 s · kb <sup>-1</sup>
Puffer	5x	4 µL	Finale Elongation	72	10 min
Polymerase		0.4 µL	Lagerung	10	∞
DMSO		1 µL			
ad. dest. H <sub>2</sub> O		20 µL			

### 5.2.3 Kolonie-PCR

Nach Durchführung einer Transformation eines ausgewählten Stammes mit dem gewünschten Plasmid wurde auf die Anwesenheit korrekter Plasmide in den Transformanten getestet. Einzelne Kolonien wurden dabei von Agarplatten gepickt und in entsprechende PCR-Reaktionsgefäße mit dem REDTaq® ReadyMix™ (Sigma) gegeben. Die PCR wurde analog zu klassischen PCR-Experimenten durchgeführt (siehe Tabelle 28 rechts).

### 5.2.4 Test-PCR

Um die Identität eines Plasmids zu bestätigen, wurde eine Test-PCR mit isoliertem Plasmid durchgeführt. Die entsprechenden Primer sollten zur Amplifikation des Zielgens beitragen und so ein Signal in der Agarose-Gelelektrophorese generieren. Die PCR wurde analog zu klassischen PCR-Experimenten durchgeführt (siehe Tabelle 28 rechts).

### 5.2.5 QuikChange®-PCR

QuikChange-PCR beschreibt eine Methode zur gezielten Inkorporation von Mutationen in einem DNA-Abschnitt.<sup>[325]</sup> Ausgehend von einer DNA-Sequenz mit der zu mutierenden Position wird ein Primer erstellt, der die gewünschte Mutation mittig zur gesamten Primer-Sequenz enthält. Um zu gewährleisten, dass die Bindung des Primers an die Zielsequenz stark genug ist, wurden etwa 15 Basen in 3' und 5'-Richtung an der Mutation als Flankierung angesetzt. Die so erhaltenen Primer wurden in Snapgene durch eine *in silico*-Mutagenese auf Erfolg getestet und anschließend als Oligonukleotid bestellt. Die Amplifikation selbst erfolgte nach dem Prinzip der QuikChange® mit der PrimeStar GXL DNA-Polymerase (TaKaRa Bio). Nach Vorlage des *forward*-Primers wurde die PCR für fünf Zyklen betrieben, bevor der *reverse*-Primer dazu gegeben wurde und weitere 30 Zyklen durchgeführt wurden (siehe Tabelle 29). Anschließend wurde mit *DpnI* die parentale DNA verdaut und für die Transformation von *E. coli* DH5α verwendet.

**Tabelle 29: Allgemeine Zusammensetzung QuikChange®-artiger PCR-Ansätze mit zugehörigem Temperaturprogramm**

Bestandteil	Stammkonzentration	Volumen	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
DNA-Templat	20-50 ng · μL <sup>-1</sup>	1 μL	Initiale Denaturierung	98	30 s
Forward Primer	10 μM	1 μL	Denaturierung	98	10 s
Reverse Primer	10 μM	1 μL	Anlagerung	50 – 80	30 s
dNTP-Mix	10 mM	0.4 μL	Elongation	72	15 s · kb <sup>-1</sup>
Puffer	5x	4 μL	Finale Elongation	72	10 min
Polymerase		0.4 μL	Lagerung	10	∞
DMSO		1 μL			
ad. dest. H <sub>2</sub> O		20 μL			

### 5.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Klonierungsexperimenten wie PCR, DNA-Restriktion oder Assembly-Methoden wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. 0,8 % (*w/v*) Agarose wurde in 1x TAE-Puffer zum Sieden gebracht, sodass sich sämtliche Agarosemoleküle lösen können. Der leicht abgekühlten Lösung wurde 0,1 % (*v/v*) Gel Red™ (*Bioticum Inc.*, Hayward, CA, USA) als Farbstoff zugesetzt. Dabei interkaliert der Farbstoff mit der DNA, was eine Visualisierung von DNA-Fragmenten unter UV-Licht ermöglicht. Die Agaroselösung wurde als Stammlösung bei 60 °C gelagert und bei Verwendung in entsprechende Kammern (*VWR*) gegossen. Nach 20 bis 30 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen und das Gel wurde in die Elektrophoresekammer transferiert und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Proben zur Analyse wurden mit DNA-Puffer (Endkonzentration 1x) versetzt und vorsichtig in entsprechende Taschen im Gel pipettiert. Als Größenstandard wurden 1,5 µL der 1 kb DNA Ladder (*New England Biolabs GmbH*, Frankfurt am Main, Deutschland) eingesetzt. Die Gel-Elektrophorese erfolgte bei 180 V konstanter Spannung für 28 min. Die Gele wurden mit einem *INTAS Science Imaging* Aufnahmegerät (Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

### 5.2.7 Isolation von Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Kits *innuPREP Plasmid-Mini Kit* (*Analytik Jena AG Life Science*, Jena, Deutschland) durchgeführt. 5 – 10 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde gemäß der Angaben des Herstellers behandelt. Die Plasmid-DNA wurde im finalen Schritt zweimal mit je 20 µL 55 °C warmen *dest.* H<sub>2</sub>O eluiert.

### 5.2.8 Restriktionsverdau und Ligation

Zur Generierung linearer Plasmid-DNA oder Restriktionsklonierung wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Mengen und Konzentrationen wurden dabei mit Hilfe der Herstellerangaben der Enzyme bzw. Angaben für die jeweilige Klonierungsmethode im Anschluss ausgewählt. Alle Restriktionsenzyme wurden als *FastDigest*-Variante verwendet (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA). Ligationen erfolgten in ausgewählten Fällen mit der T4-DNA-Ligase für 16 h bei 16 °C mit nachfolgenden Bedingungen (siehe Tabelle 30). Der gesamte Ansatz wurde anschließend für Transformationen verwendet.

**Tabelle 30: Zusammensetzung von Ligationsansätzen für Transformationen**

Bestandteil	Volumen
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	2 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
PCR-Produkt	(5× Menge Vektor)
geschnittener Vektor	25 ng
dest. H <sub>2</sub> O Vektor	ad. 20 µL

### 5.2.9 Geleluatun und PCR-Reinigung

Für Ligatunen wurden geschnittene Vektoren über Geleluatun aus Agarosegeleu geschnitten bzw. PCR-Fragmente mit *clean-up* Protokollen isoliert (innuPREP DOUBLEpure Kit, *AnalytikJena AG*, Jena, Deutschland). Die DNA wurde in beiden Fällen im finalen Schritt zweimal mit je 20 µL 55 °C warmen *dest.* H<sub>2</sub>O eluiert.

### 5.2.10 Gibson Assembly®

Bei einer *assembly*-Methode werden Gene in linearisierte Vektoren inseriert. Dabei werden keine kompatiblen Restriktionsschnittstellen benötigt und ermöglichen so die Insertion mehrerer Gene im selben Vektor in einem Schritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *Gibson Assembly*® verwendet.<sup>[357]</sup> Zielgen und Plasmidrückgrat werden dabei mit überlappenden Primern in zwei Ansätzen amplifiziert und dann über eine isothermale Reaktion assembliert. Dabei baut eine T5-Exonuklease das 5'-Ende der DNA-Stränge teilweise ab und generiert *sticky ends*, die zur Anlagerung homologer Sequenzen führen. Die entstandenen Lücken werden dann durch eine Polymerase aufgefüllt und mit einer Ligsae geschlossen. Gibson-Primer wurden mit Hilfe des *assembly cloning* Werkzeugs in Snapgene erstellt und die Reaktion *in silico* durchgeführt. Für die experimentelle Durchführung des *Gibson Assembly*® wurde ein Mastermix verwendet. Die einzelnen Komponenten sind nachfolgend aufgelistet (siehe Tabelle 31).

**Tabelle 31: Zusammensetzung des *Gibson Assembly*® Mastermix und des darin enthaltenen 5xISO-Puffers**

<i>Gibson Assembly</i> ® Mastermix		5x ISO-Puffer	
Bestandteil	Volumen	Bestandteil	Menge
ISO-Puffer (5x)	60 µL	TRIS-HCl (1 M, pH 7.5)	500 µL
T5-Exonuklease (100 U · mL <sup>-1</sup> )	24 µL	MgCl <sub>2</sub> (2 M)	25 µL
Phusion HotStart II DNA-Polymerase (0.4 U · mL <sup>-1</sup> )	18 µL	dGTP (100 mM)	10 µL
Taq DNA-Ligase (8000 U · mL <sup>-1</sup> )	39 µL	dCTP (100 mM)	10 µL
<i>dest.</i> H <sub>2</sub> O	309 µL	dATP (100 mM)	10 µL
		dTTP (100 mM)	10 µL
		1,4-Dithio-D-threitol (DTT, 1 M)	50 µL
		Polyethylenglykol (PEG)-8000	0.25 g
		NAD <sup>+</sup> (100 mM)	50 µL

Nach Amplifikation des Zielgens und des Plasmids mit den entsprechenden Gibson-Primern wurden die Proben auf präparative Agarosegele aufgetragen und aus dem Gel geschnitten und eluiert. Für den Einsatz in der *assembly* wurde mit Hilfe des TaKaRa Infusion Tool die benötigte Menge Zielgen und Plasmid berechnet. Dabei wird ein Verhältnis von *insert* zu Vektor von 2 zu 1 unter Berücksichtigung der Größe der jeweiligen Fragmente in bp als ideales Verhältnis angesehen. Die Gibson-Ansätze wurden für eine Stunde bei 50 °C inkubiert und vollständig für die Transformation von *E. coli* DH5α verwendet.

### 5.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Menge und Reinheit isolierter DNA wurde diese photometrisch quantifiziert. Dabei wurde die Absorption bei 260 nm an einem NanoDrop2000 (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) gemessen. Als Leerprobe dienten 1.5 µL Wasser, für die Messung der eigentlichen Probe wurde das Volumen beibehalten. Zur Reinheitsbestimmung der DNA wurde ebenfalls die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient aus der Absorption von 260 und 280 nm bestimmt.

### 5.2.12 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung von Klonierungsschritten und finalen Konstrukten wurde stets eine Sequenzierung des Plasmids im Zielbereich durchgeführt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma *Eurofins Scientific* (Luxemburg, Luxemburg) nach der Methode der Didesoxysequenzierung nach Sanger durchgeführt.<sup>[358]</sup> Als Sequenzierprimer wurden der Standard-T7-Promoter-Primer und der Standard-T7-Terminator-Primer (*reverse*) verwendet.

## 5.3 Mikrobiologische Methoden

### 5.3.1 Medien

Für die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Medien wurden Komplexmedien verwendet. Diese wurden entweder einzeln angesetzt oder als Fertigmischung in Wasser gelöst. Alle Medien und Stammlösungen wurden vor Verwendung autoklaviert bzw. steril filtriert und ab diesem Zeitpunkt nur noch mit sterilen *dest.* H<sub>2</sub>O verarbeitet. Für Nährbodenplatten wurde LB-Medium bzw. Kartoffel-Glucose-Medium (für *C. fumago*) verwendet, dem 1.5 % (*w/v*) Agar-Agar zugesetzt wurde. Um Degradierungen oder Komplexbildungen durch die hohen Temperaturen beim Autoklavieren zu vermeiden, wurden Salze und Puffer separat autoklaviert bzw. steril filtriert und vor Nutzung des Mediums als hochkonzentrierte Stocklösung zugegeben. Eine Übersicht der verwendeten Medien findet sich in Tabelle 32.

Tabelle 32: Übersicht der verwendeten Medien und Zusammensetzungen für entsprechende Anwendungen

Medium	Komponente	Menge	Verwendung
LB-Medium	Trypton	10.0 g · L <sup>-1</sup>	Kultivierung von <i>E. coli</i> in 5 ml Übernachtskulturen, Expressionsstudien
	Hefeextrakt	5.00 g · L <sup>-1</sup>	
	NaCl	10.0 g · L <sup>-1</sup>	
TB-Medium	Casein (enzym. verdaut)	10.0 g · L <sup>-1</sup>	Kultivierung von <i>E. coli</i> im Großmaßstab, Expressi- onsstudien
	Hefeextrakt	24.0 g · L <sup>-1</sup>	
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.5 g · L <sup>-1</sup>	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.31 g · L <sup>-1</sup>	
	Glycerin	4.00 mL · L <sup>-1</sup>	
SOC-Medium	Trypton	20.0 g · L <sup>-1</sup>	Transformation von <i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)
	Hefeextrakt	5.00 g · L <sup>-1</sup>	
	NaCl	0.60 g · L <sup>-1</sup>	
	KCl	0.200 g · L <sup>-1</sup>	
	MgCl <sub>2</sub>	0.950 g · L <sup>-1</sup>	
	MgSO <sub>4</sub>	1.21 g · L <sup>-1</sup>	
	Glucose	3.60 g · L <sup>-1</sup>	
	Fructose	40.0 g · L <sup>-1</sup>	
Fructose-Salz-Medium	NaNO <sub>3</sub>	2.00 g · L <sup>-1</sup>	Kultivierung von <i>C. fumago</i>
	KCl	2.00 g · L <sup>-1</sup>	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.00 g · L <sup>-1</sup>	
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1.00 g · L <sup>-1</sup>	
	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.02 g · L <sup>-1</sup>	
	Casein	12 g · L <sup>-1</sup>	
	Hefeextrakt	24 g · L <sup>-1</sup>	
	TB-Medium (Fertigmischung)		
TB-Medium (Fertigmischung)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.54 g · L <sup>-1</sup>	Kultivierung von <i>E. coli</i> im Großmaßstab, Expressi- onsstudien
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.31 g · L <sup>-1</sup>	
	Glycerin	4 mL · L <sup>-1</sup>	
		∑ 50.8 g auf 1 L	
	TB-Fertigmedium		
TB-AI-Medium	Glycerin	50.8 g · L <sup>-1</sup>	Kultivierung von <i>E. coli</i> Ar- cticExpress (DE3) im Großmaßstab, Expressi- onsstudien
	Glucose-Stamm (20 % w/v)	4 mL · L <sup>-1</sup> 0.2 %	
	Lactose-Stamm (10 % w/v)	0.05 %	
2xYT-Medium (Fer- tigmischung)	Trypton	16.0 g · L <sup>-1</sup>	Kultivierung von <i>E. coli</i> im Großmaßstab, Expressi- onsstudien
	Hefeextrakt	10.0 g · L <sup>-1</sup>	
	NaCl	5.00 g · L <sup>-1</sup>	
2xYT-AI-Medium		∑ 31.0 g auf 1 L	Kultivierung von <i>E. coli</i> Ar- cticExpress (DE3) im Großmaßstab, Expressi- onsstudien
	2xYT-Fertigmedium	31.0 g · L	
	Glucose-Stamm (1000x)	0.2 %	
	Lactose-Stamm (1000x)	0.05 %	

<b>Kartoffel-Glucose-Medium (Fertigmischung)</b>	Kartoffel-Infus	6.50 g · L <sup>-1</sup>	Agarplatten für <i>C. fumago</i>
	Glucose	20.0 g · L <sup>-1</sup>	
		∑ 26.5 g auf 1 L	

### 5.3.2 Antibiotika- und weitere Stammlösungen zur Kultivierung

Tabelle 33: Verwendeten Antibiotika und weitere Stammlösungen zur Kultivierung

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
<b>Ampicillin (Amp, 1000x)</b>	100 mg · mL <sup>-1</sup>	dest. H <sub>2</sub> O
<b>Chloramphenicol (Cm, 1000x)</b>	34.0 mg · mL <sup>-1</sup>	EtOH
<b>Kanamycin (Kann, 1000x)</b>	50.0 mg · mL <sup>-1</sup>	dest. H <sub>2</sub> O
<b>IPTG (1000x)</b>	1.00 M	dest. H <sub>2</sub> O
<b>Lactose (10 % w/v)</b>	10 g · mL <sup>-1</sup>	dest. H <sub>2</sub> O
<b>Glucose (20 % w/v)</b>	20 g · mL <sup>-1</sup>	dest. H <sub>2</sub> O
<b>Natrium-σ-Vanadat (2000x)</b>	200 mM	dest. H <sub>2</sub> O

### 5.3.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für Transformationen wurden Zellen chemisch kompetent gemacht. Hierfür wurden folgende Lösungen sterilfiltriert verwendet (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34: Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Lösung	Bestandteil	Konzentration
<b>A</b>	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
<b>B</b>	CaCl <sub>2</sub>	100 mM
	Glycerin	15 % (w/v)

*E. coli*-Zellen wurden in 400 mL LB-Medium in einem 3 L Fernbachkolben mit Schikane mit 2 mL Vorkultur des gewünschten Stamms versetzt. Bei 37 °C und 120 rpm wurde die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4 – 0.6 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 1230 · g und 4 °C geerntet und anschließend vorsichtig in 10 mL Lösung A auf Eis resuspendiert. Nach 20 bis 30 Minuten auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert, wonach der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde vorsichtig in 2 mL vorgekühlter Lösung B auf Eis resuspendiert. Die nun chemisch kompetenten Zellen wurden in 50 µL-Aliquots portioniert und innerhalb der 1.5 mL-Reaktionsgefäße mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

Zum Nachweis der Qualität der chemisch kompetenten Zellen wurde ein Antibiotogramm mit allen gängigen Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol) in Form von Vorkulturen mit entsprechendem Antibiotikum in LB-Medium durchgeführt. Wuchs in einer dieser Vorkulturen Zellmaterial an, wurde die gesamte Charge verworfen und ein neuer Ansatz chemisch kompetent gemacht, da diese Zellen eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum aufwiesen. Fiel das gesamte Antibiotogramm negativ aus wurde zusätzlich die Transformationseffizienz der Zellen bestimmt. Dazu wurde eine Hitzeschock-Transformation mit einem pET22a(+)-Leervektor als Positiv- und sterilem H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle durchgeführt. Nach erfolgter Transformation wurden beide Ansätze jeweils auf eine LB-Agarplatte gestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Falls keine Kolonien auf der Platte der Negativkontrolle sichtbar waren, wurden die Kolonien auf der Platte der

Positivkontrolle durchgezählt. Diese Zahl, auch *colony forming unit* (CFU), genannt, wird wie folgt für die Berechnung der Transformationseffizienz verwendet (siehe Gleichung 9).

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{CFU}}{\mu\text{g ausplattierter DNA}}$$

#### Gleichung 9: Formel zur Berechnung der Transformationseffizienz

Für *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde dabei eine Transformationseffizienz im Bereich von  $10^6$ , für *E. coli* BL21 (DE3) und Derivaten eine Transformationseffizienz von  $10^5$  angestrebt. Lagen die bestimmten Transformationseffizienzen weit unter diesen Grenzwerten, wurden die Chargen ebenfalls verworfen und neu angesetzt.

### 5.3.4 Hitzeschocktransformation kompetenter Zellen

Zur Insertion eines Plasmids in einen bakteriellen Wirt wurde im Fall von *E. coli* die Hitzeschock-Methode verwendet. Chemisch kompetente Zellen wurden dabei 10 min auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu\text{L}$  des gewünschten Plasmids (bzw. bei verdünnteren Proben mit 100 ng Plasmid) versehen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen bei 42 °C für 90 s einem Hitzeschock unterzogen. Gemäß der Herstellerangaben erfolgte der Hitzeschock für *E. coli* ArcticExpress (DE3)-Zellen lediglich für 20 s, da sonst keine Transformanden erhalten wurden. Dabei wird die Zellmembran permeabel für die Plasmid-DNA und kann so ins Zellinnere gelangen. Anschließend wurde für 2 min auf Eis gekühlt, bevor 700  $\mu\text{L}$  LB-Medium (für ArcticExpress SOC-Medium) zugegeben wurde. Die phänische Expression erfolgte anschließend für 1 h bei 37 °C. Abhängig vom Ansatz wurden 100  $\mu\text{L}$  der Kultur auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum verteilt oder die Zellen zentrifugiert (2 min, 10000  $\cdot$  g), der Überstand bis auf 100  $\mu\text{L}$  verworfen und 100  $\mu\text{L}$  des resuspendierten Pellets auf der Platte verteilt.

### 5.3.5 Vorkulturen

Zur Inokulation von Expressionskulturen oder DNA-Isolierungen wurden Vorkulturen angelegt. Dabei wurden 5 bis 20 mL einer Kultur in 2xYT-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (in den meisten Fällen Ampicillin) angesetzt. Zur Inokulation wurde ein steriler Zahnstocher oder eine sterile Pipettenspitze mit Zellmaterial von einer Agarplatte gepickt und in ein steriles Reagenzglas bzw. einen sterilen 100 mL-Kolben mit Schikane gegeben. Alternativ wurde eine Glycerinkultur als Inokulationsmaterial verwendet. Die Kultur wurde anschließend für 16 h bei 37 °C inkubiert. Das 2xYT-Medium sorgte dabei für höhere Zelldichten von bis zu einer OD<sub>600</sub> von 8.

### 5.3.6 Herstellung von Glycerinkulturen zur langfristigen Stammlagerung

Zur längerfristigen Lagerung von Stämmen und direkten Verwendung für Expressionskulturen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dabei wurden 500  $\mu\text{L}$  einer Vorkultur mit 500  $\mu\text{L}$  steriler 50 %-iger Glycerinlösung vermischt und in einem sterilen Cryogefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 5.3.7 Kultivierung für Expressionsanalysen

Für die Analyse der heterologen Genexpression im kleinen Maßstab wurden 50 mL Kulturen in 2xYT oder TB-Medium mit einer Zellmenge beimpft, die einer Anfangs-OD<sub>600</sub> von 0.05 in 250-mL-Kolben entspricht. Für Ansätze mit Autoinduktionsmedium wurden 0.05 % Glukose und 0.2 % Laktose wurden zugesetzt, sonst 100 µM IPTG. Als Antibiotikum wurden 100 µg · mL Ampicillin zu jeder Kultur gegeben. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei 37 °C und 120 rpm, die zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 1 führte, wurden abhängig vom Ansatz IPTG bzw. 2 % Ethanol (*v/v*) zugegeben. Für die ersten Temperaturscreenings wurde diese auf 10 bis 30 °C gesenkt. Die Kultivierung wurde für 24 bis 72 Stunden lang bei 120 rpm fortgesetzt, bevor die Zellen bei 5000 x *g* und 4 °C zentrifugiert und die trockenen Pellets bei -20 °C gelagert wurden.

### 5.3.8 Kultivierung für Proteinisolation in *E. coli ArcticExpress* (DE3)

Für die Proteinisolation wurden Kulturen mit optimierten Expressionsparametern für Haloperoxidasegene im 500 mL-Maßstab mit *E. coli ArcticExpress* (DE3) angesetzt. Hierbei wurden Fernbach-Kolben mit einem Fassungsvermögen von 3 L mit Schikane verwendet, zu denen 500 mL TB-AI-Medium mit 100 µg · mL<sup>-1</sup> Ampicillin zugesetzt wurde. Das Medium wurde mit einer Menge Vorkultur inokuliert, die einer Anfangs-OD<sub>600</sub> von 0.05 entspricht. Nach Inkubation bei 37 °C und 120 rpm bei 2.5 cm Schütteldurchmesser für ca. 3 h wurde die OD<sub>600</sub> überprüft. Lag diese zwischen 0.7 und 1, wurde 2 % Ethanol (*v/v*) zugegeben und die Kultur für 72 h (48 h für VPO-*Lp*) bei 13 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur bei 5000 x *g* und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde aus Zentrifugationsbechern mit 0.9 % NaCl-Lösung resuspendiert, in 50 mL Reaktionsgefäße gefüllt und erneut bei 5000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, um sie bei -20 °C dauerhaft bis zur weiteren Verwendung zu lagern.

## 5.4 Proteinbiochemische Methoden

### 5.4.1 Zellaufschluss

Für die Analyse von Proteinen via SDS-PAGE oder der Isolation von Proteinen nach heterologer Proteinproduktion wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Abhängig von der verwendeten Zellmenge wurde ein Ultraschallaufschluss mit entsprechenden Sonotroden für kleine und große Volumina (bis 60 mL) verwendet. Eingefrorene Pellets bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden 10 – 20 min auf Eis aufgetaut, bevor sie in Lysepuffer resuspendiert wurden (100 mM BTA, 12.5 mM Imidazol, pH 7). Die Menge Puffer wurde dabei an das Nassgewicht Pellet abgestimmt, sodass das 5-fache Volumen (*w/v*) erreicht wurde (d.h. bei 5 g Zellen wurden 25 mL Puffer verwendet). Um bei größeren Mengen sämtliche Zellklumpen vollständig zu lösen, wurde eine EDTA-freie Proteaseinhibitortablette (cOmplete Tablet, Mini, EASYpack, Roche) dazugegeben und das resuspendierte Pellet für 30 min auf Eis mit einem Magnetrührfisch langsam weiter gelöst. Anschließend wurde der Rührfisch entfernt und das resuspendierte Pellet auf Eis mit einem SONOPULS Ultraschall Homogenisator (Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland) mit entsprechender Sonotrode verbunden. Der Aufschluss erfolgte bei einer Leistung von ca. 37 % mit 5x10 % Zyklen für 10 min, bevor eine Pause von 10 min auf Eis eingelegt wurde. Dabei sollte eine Überhitzung und damit verbundene Denaturierung der Zielproteine vermieden werden. Anschließend wurde der Aufschluss wiederholt.

Für *inclusion body* Tests sowie Proteinisolationen wurde das Zellysate einer Zentrifugation unterzogen (10000 x *g*, 60 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Der zellfreie Überstand (CFE) wurde abgenommen und weiterverwendet, während die pelletierte Zelltrümmerfraktion (*cell debris*) in gleicher Menge Puffer erneut resuspendiert und für SDS-PAGE Analysen verwendet wurde oder im Fall von Proteinisolationen verworfen wurde.

### 5.4.2 Proteinisolation mittels IMAC

Für die Charakterisierung und biokatalytische Verwendung von Enzymen ist eine hohe Reinheit des gewünschten Proteins unabdingbar. Aus diesem Grund wurden alle V-HPO-Konstrukte in dieser Arbeit mit einem N-terminalen 6xPolyhistidin-Tag in Kombination mit einem Strep-II-Tag versehen. Die Ausnahme bildeten die vier putativen Gene aus *F. ceranooides*, *S. fusiforme*, *R. roseus* und *A. nodosum*, die alle lediglich über einen C-terminalen 6xHis-Tag verfügten. Die Isolation des Proteins erfolgte über immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) mit einem ÄKTA™ Purifier-System (GE Healthcare, München, Deutschland). Für den notwendigen Zellaufschluss (siehe Abschnitt 5.4.1) wurden mindestens 5 g Zellen verwendet. Der zellfreie Überstand wurde über eine Peristaltikpumpe erst linear, dann zyklisch, bei einer Flussgeschwindigkeit von  $3\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  auf eine 5 mL Nickel(II)-Nitriolotriessigsäure (Ni-NTA) Säule (Superflow Cartridge, Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgetragen, die vorher mit Lysepuffer äquilibriert wurde. Nach 30 min Auftragszeit wurde die Säule an das ÄKTA-System angeschlossen und bei erstmaliger Isolation mit einem linearen Reinigungsprogramm eluiert. Für optimierte Reinigungen wurde ein Programm mit stufenweiser Elution verwendet. Die verwendeten Volumina für die einzelnen Schritte werden in Säulenvolumen (*column volumes*, CV; hier 5 mL) angegeben. Die Fraktionierung während der Elution erfolgte stets mit 5 mL-Fractionen. Als Messsignal diente die allgemeine Proteinabsorption bei 280 nm. Zur Elution wurde ein imidazolhaltiger Puffer (Puffer B) verwendet, der im Gegensatz zum imidazolfreiem Puffer (100 mM BTA, pH 6; Puffer A) 250 mM Imidazol enthält. Durch direkte Mischung der beiden Puffer in verschiedenen

## Experimententeil

Anteilen im System konnte so ein Elutionsgradient erzeugt werden. Mit steigendem Anteil Imidazol konkurrieren diese Moleküle mit den Polyhistidinresten der Zielproteine und Histidinresten *E. coli*-eigener Proteine und führen so zu einer Verdrängung von der Säulenmatrix. Die verwendeten Programme sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 35).

**Tabelle 35: Definierte Programme für die Proteinisolation von V-HPOs in dieser Arbeit**

Die Angabe CV bezieht sich auf das eingesetzte Säulenvolumen, hier also 5 mL. Die entsprechenden Werte sind also mit dem Faktor 5 zu multiplizieren, um die eingesetzten Volumina zu bestimmen. Die Flussrate wurde für sämtliche Schritte an der ÄKTA™ konstant gehalten.

Programm		Waschschritt	Elutionsschritt	finale Elution	Flussrate [mL · min <sup>-1</sup> ]
Linear	CV	2	20	5	3
	c(Imidazol) [mM]	0	0-250	250	
stufenweise	CV	4	5	6	3
	c(Imidazol) [mM]	0	62.5	250	

Alle Fraktionen, die während eines Isolationslaufs ein Signal bei 280 nm im Absorptionsspektrum Absorptionsspektrum zeigten, wurden im Rahmen einer SDS-PAGE-Analyse auf Anwesenheit des Zielproteins untersucht. Alle für die Proteinisolation verwendeten Puffer sind nachfolgend gelistet (siehe Tabelle 36).

**Tabelle 36: Puffer zur Proteinisolation und deren Zusammensetzung**

Puffer	Zusammensetzung	pH-Wert
Lysepuffer	100 mM BTA, 12.5 mM Imidazol	pH 7
Waschpuffer (Puffer A)	100 mM BTA	pH 7
Elutionspuffer (Puffer B)	100 mM BTA, 250 mM Imidazol	pH7
Dialysepuffer/ Assaypuffer	100 mM BTA	pH 6

### 5.4.3 Entsalzung, Dialyse und Konzentration von Proteinlösungen

Um Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen, wurden Fraktionen mit Zielprotein vereint und in einen Dialyseschlauch (Spectrum™ Labs 0.1 - 0.5 kD Biotech CE Dialysis Kits, Zellulosemembran) gefüllt. Zusätzlich wurde eine Menge des *ortho*-Vanadat-Stamms zugegeben, der einer finalen Menge von 100 µM im Schlauch entsprach. Der Schlauch wurde mit Plastikklammern abgeklemmt und je nach Volumen der vereinten Fraktionen in 1 bis 5 L Assaypuffer (BTA 100 mM, pH 6) getaucht. Über Nacht wurde die Lösung gegen den Puffer dialysiert, um so Imidazol und überschüssiges Vanadat, das nicht am Enzym gebunden hat, aus der Proteinlösung zu entfernen. Am nächsten Tag wurde die Lösung in Zentrifugalkonzentratoren (*Pall*, NY, USA PALL) gefüllt und bei 4000 x g zentrifugiert. Frischer Assaypuffer (100 mM BTA, pH 6) wurde in die obere Hälfte des Konzentrators gefüllt und

erneut zentrifugiert. Diese Schritte wurden insgesamt dreimal durchgeführt, bevor die Lösung final auf etwa 2 mL konzentriert wurde. Aus dieser Lösung wurden 300  $\mu\text{L}$ -Aliquots erstellt, die in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Zu bestimmten Ansätzen wurde 20 % ( $v/v$ ) Glycerol gegeben, um Proteindenaturierung beim Auftauen zu vermeiden.

Alternativ zur Dialyse wurden für Proteinlösungen mit geringem Volumen auch Entsalzungen über PD10-Säulen (Sephadex G-25, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde in einem ersten Schritt Imidazol aus der Lösung gewaschen und im zweiten Schritt auf den Assaypuffer umgepuffert. Es wurden für einen Durchgang 2.5 mL der Proteinlösung auf die Säule aufgetragen, nachdem diese mit drei Säulenvolumina Assaypuffer gewaschen wurde. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 3.5 mL des Assaypuffers. Die Säulen wurden für die nächste Verwendung mit drei Säulenvolumina *demin.*  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 20 % Ethanol ( $v/v$ ) bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 5.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die spezifische Absorption des Zielproteins mit Hilfe eines *NanoDrop2000* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) gemessen. Hierzu wurde für jedes Protein der molekulare Extinktionskoeffizient unter oxidativen Bedingungen mit Hilfe von expasy bestimmt. Die Messung erfolgte unter Angabe des Extinktionskoeffizienten und der molekularen Masse des Proteins bei 280 nm in Dreifachbestimmung. Die so erhaltenen Werte wurden für die Bestimmung von spezifischen Aktivitäten, Enzymbeladungen und SDS-Proben verwendet.

#### 5.4.5 SDS-PAGE

Um die Anwesenheit eines Proteins in einer Probe zu bestätigen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine aufgrund ihrer Größe, die mit dem molekularen Gewicht zusammenhängt, getrennt. Die Methode ist vergleichbar mit der Agarose-Gelelektrophorese für DNA-Moleküle. Neben Tricin-SDS-PAGEs wurden auch kommerzielle Gele in Form der NuPAGE™ 4-12 % Bis-TRIS Protein Gele verwendet (*Thermo Fischer*, Waltham, Massachusetts, USA).

Für Tricin-Gele wurde das *Mini-Protean® Tetra Cell Casting Stand System* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) zum Gießen der Gele verwendet. In einem ersten Schritt wurde das Trenngel (12 %) gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Sammelgel (4.5 %) darüber geschichtet und je nach Anforderung mit einem 10- oder 15-Probenkamm versehen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele bis zur weiteren Verwendung in feuchten Tüchern bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Vorbereitung einer SDS-PAGE-Analyse wurden SDS-Proben angelegt. Für Zellproben wurde die  $\text{OD}_{600}$  der Kultur gemessen und eine Probe vorbereitet, deren  $\text{OD}_{600}$  einem Wert von 1 entspricht. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Intensität der Banden auf einem SDS-Gel vergleichbar bleibt, um qualitative Aussagen über die Anwesenheit von Proteinen mit höherer Sicherheit treffen zu können. Für zellfreie Proben, wie etwa nach einer Isolation via ÄKTA™, wurden 20  $\mu\text{L}$  der Proteinfraktion für eine SDS-Probe verwendet. Das Gesamtvolumen der Proben wurde auf 50  $\mu\text{L}$  gesetzt. Da eine vollständige Denaturierung der Proteine Grundlage für eine SDS-PAGE-Analyse ist, wurde ein SDS-Probenpuffer verwendet. Dieser wurde aus einem 5x-Stamm zu einem 1x-Puffer verdünnt und in entsprechender Menge für die jeweilige Probe verwendet. Nach Mischung der Proben mit Probenpuffer und vor jedem Auftrag wurden die Proben für 10 min bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgeköcht, um eine

## Experimentaltteil

vollständige Entfaltung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 10000 x *g* zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile der Probe zu sedimentieren.

Für Tricin-Gele wurden die Gele in die entsprechende Elektrophorese-Kammer gespannt und die innere Kammer mit Kathodenpuffer, die äußere Kammer mit Anodenpuffer befüllt. Der Kamm wurde aus den Gelen entfernt und die Taschen mehrfach mit einer Pipette oder Spritze gut durchgespült. Aus den vorbereiteten Proben wurden 10 µL des Überstands vorsichtig in die jeweiligen Taschen pipettiert und gemeinsam mit 3 µL eines Protein-Molekulargewichtsmarkers (ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker, *Carl Roth GmbH & Co KG*, Karlsruhe Deutschland; später PageRuler™ ungefärbter Protein Marker, *Thermo Fischer Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) in einer separaten Tasche aufgetragen. Das Gel wurde an die Stromquelle angeschlossen und erst bei 60 V für 10 min, dann bei 190 V für 50 min betrieben. Für das kommerzielle NuPAGE™-System wurden entsprechende Fertiggele in die vorgesehene Kammer gegeben, ebenfalls mit Proben beladen und im dafür vorgesehenen MOPS-Puffer bei 200 V für 40 min (oder bis die Laufront das untere Ende des Gels erreichte) betrieben. Die Gele wurden anschließend dreimal in *demin.* H<sub>2</sub>O gewaschen bevor sie mit kolloidaler Coomassie G250-Lösung über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Gele erneut mit *demin.* H<sub>2</sub>O gewaschen und mit einer digitalen EOS 1000D Spiegelreflexkamera mit einem EF-S 60 mm Objektiv (*Canon Deutschland GmbH*, Krefeld, Deutschland) auf einem Weißlicht-Tisch (*Edvotek Inc.*, Washington, DC, USA) bei definierten Bedingungen (ISO 400, Belichtungszeit 1/250 s, Blende F/8.0) dokumentiert. Bei Nachbearbeitungen wurde der Kontrast und die Helligkeit der Gele einheitlich für alle Bildpixel optimiert, um Verfälschung der Daten zu vermeiden. Die für SDS-PAGE verwendeten Puffer und Lösungen sind nachfolgend gelistet (siehe Tabelle 37).

**Tabelle 37: Übersicht über die verwendeten Lösungen und Puffer für SDS-PAGE-Analysen**

Lösung	Zusammensetzung
<b>Tricin-SDS-PAGE</b>	
Trenngel	10 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, 37.5 : 1; Carl Roth), 10 mL Gelpuffer (3x), 7 mL <i>demin.</i> H <sub>2</sub> O, 3 g Glycerin, 100 µL APS (10 % ( <i>w/v</i> )), 10 µL TEMED
Sammelgel	1.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, 37.5 : 1; Carl Roth), 3 mL Gelpuffer (3x), 7.4 mL <i>demin.</i> H <sub>2</sub> O, 100 µL APS (10 % ( <i>w/v</i> )), 10 µL TEMED
3x-Gelpuffer	3 M TRIS, 1 M HCl, 0.3 % ( <i>w/v</i> ) SDS, pH 8.45
10x Anodenpuffer	1 M TRIS, 0.225 m HCl, pH 8.9
10x Kathodenpuffer	1 M TRIS, 1 M Tricin, 1 % ( <i>w/v</i> ) SDS, pH 8.25
<b>NuPAGE™ 4-12 % Bis-TRIS Protein Gele</b>	
20x MOPS-Puffer	50 mM MOPS, 50 mM TRIS, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7
<b>Allgemeine Lösungen</b>	
5x SDS-Ladepuffer	10 % ( <i>w/v</i> ) SDS, 30 % ( <i>w/v</i> ) Glycerol, 0.1 % ( <i>w/v</i> ) Bromphenolblau, 0.5 M TRIS/HCl, pH 6.8, 50 mM DTT
Kolloidales Coomassie G-250	2 % ( <i>w/v</i> ) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 10 % ( <i>v/v</i> ) Ethanol, 5 % ( <i>w/v</i> ) Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , 0.02 % ( <i>w/v</i> ) Coomassie Brilliant blue G-250

#### 5.4.6 Aktivitätsbestimmung von Haloperoxidasen

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität verschiedener Haloperoxidasen wurde der in dieser Arbeit etablierte MeDAC-Assay verwendet. Als Standardbedingungen wurden 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 5 mM Kaliumbromid oder -chlorid in Assaypuffer (100 mM BTA, PH 6) mit 30 μM MeDAC und 0.4 % DMSO (*v/v*) verwendet, die mit 1 μL der Enzymlösung auf ein Gesamtvolumen von 250 μL pro *well* in einer 96-well-Platte (*Greiner Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gemischt wurden. Die Enzymlösung wurde dabei um den Faktor 20 oder 40 verdünnt, falls kein linearer Bereich während der Fluoreszenzmessung am Tecan Infinite M1000Pro Plattenlesegerät (*Tecan Trading AG*, Männedorf, Schweiz) bei 25 °C über mehr als drei Messpunkte definiert werden konnte. Der lineare Bereich wurde verwendet, um die Steigung zu definieren, die über die eingesetzte Menge Enzym in eine volumetrische Aktivität (U · mL<sup>-1</sup>) umgerechnet wurde. Für die Umrechnung wurden ein Konzentrationsrechner im Rahmen eines Microsoft Excel-Makrosheets verwendet, der öffentlich zugänglich ist.<sup>[295]</sup> Alle Aktivitätsbestimmungen erfolgten im Rahmen von biologischen Triplikaten.<sup>[295]</sup>

#### 5.4.7 Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Evaluation eines Enzyms als Katalysator wird die Kinetik nach Michaelis und Menten verwendet. In dieser wird eine enzymatisch katalysierte Reaktion unter sogenannten *steady-state* Bedingungen betrachtet, die es ermöglichen, verschiedene kinetische Parameter des Enzyms wie Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  und Affinität  $K_M$  des Enzyms zum entsprechenden Substrat unter den gegebenen Bedingungen zu bestimmen. Da es sich bei Haloperoxidasen um Enzyme handelt, die von zwei Substraten, Halogenid und Wasserstoffperoxid, abhängen, wurden zweidimensionale Kinetiken betrachtet. Um potenzielle Inhibitionseffekte zu berücksichtigen, wurde ein zweidimensionaler Michaelis-Menten-Fit mit dem Substrat-Inhibitions-Term von Murray als Fit-Funktion in OriginPro 2018 kombiniert.<sup>[298]</sup> Is Grundlage für die Kinetik diente der in dieser Arbeit etablierte MeDAC-Assay. Zu je 25 μL vordefinierter Konzentrationen von Kaliumbromid und Wasserstoffperoxid in 100 mM BTA-Puffer pH 6 wurden 200 μL einer Stammlösung von 30 μM MeDAC in 100 mM BTA-Puffer pH 6, 0,3 % (*v/v*) DMSO und rekombinant hergestellter und per His-Tag isolierter Haloperoxidase bis zu einem Gesamtvolumen von 250 μL pro *well* in einer 96-well-Platte (*Greiner Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) hinzugefügt, um die Reaktion zu starten. Die Lösung wurde dabei durch Einzelversuche vorher mit der entsprechenden Enzymcharge so angesetzt, dass sich bei allen Konzentrationen mindestens drei Messwerte im linearen Bereich befanden. Die Kinetik wurde 10 Minuten an einem Tecan Infinite M1000Pro Plattenlesegerät (*Tecan Trading AG*, Männedorf, Schweiz) bei 25 °C gemessen. Die gemessenen Intensitäten wurden normalisiert, in Konzentrationen umgerechnet, mit dem entsprechenden Term korrigiert und dann gegen die Zeit aufgetragen (Siehe Kapitel 3.3 und Kapitel 3.4.2). Von jeder erhaltenen Kurve wurde dann der lineare Teil verwendet, um die Steigung zu bestimmen, die der Geschwindigkeit des Enzyms entspricht, und dann durch die verwendete Enzymkonzentration bzw. -menge geteilt, um die spezifische bzw. volumetrische Enzymaktivität zu erhalten. Diese Werte wurden dann gegen die Konzentration von Kaliumbromid und Wasserstoffperoxid aufgetragen und mit der 2D-Michaelis-Menten-Murray-Funktion angepasst. Die dabei ermittelten kinetischen Parameter  $v_{\text{max}}$ ,  $K_M$  und  $K_i$  wurden verwendet, um die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  zu ermitteln. Hierfür wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  durch die eingesetzte Enzymkonzentration in der Kinetik (in mol · L<sup>-1</sup>) geteilt. Dabei wurde die theoretische molekulare Masse des Proteins und die eingesetzte Menge über die vorher bestimmte Proteinkonzentration der Probe verwendet. Für V<sub>ClPO-Ci</sub> wurde

## Experimentalteil

$v_{\max}$ , angegeben als spezifische Aktivität in  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , mit der eingesetzten Enzymkonzentration von  $0.0003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  multipliziert, um die volumetrische Aktivität zu erhalten (siehe Kapitel 3.4.2).

## 5.5 Bioinformatische Methoden

### 5.5.1 Sequenzalignment

Zur Identifikation putativer Haloperoxidasegene wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Suche nach neuen Genen auf bakterielle Organismen begrenzt, ausgeschlossen Sequenzen aus Organismen in direkter Verwandtschaft zum Vorlage-Gen. Als Vorlage diente die Gensequenz der Haloperoxidase NapH1 aus *Streptomyces sp.* CNQ-525. Potenzielle Sequenzen wurden mit dem *ExPasy*-Werkzeug in Aminosäuresequenzen translatiert und ein Alignment mit Initialparametern via *ClustalOmega* durchgeführt, um Konsensbereiche zwischen den Sequenzen zu identifizieren.<sup>[359]</sup> Besonderes Augenmerk lag dabei auf den katalytischen Aminosäuren des aktiven Zentrums von Haloperoxidasen, insbesondere des koordinierenden Histidins, mit aufgeklärter 3D-Struktur wie V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* oder V<sub>Br</sub>PO-*Co*.

**Tabelle 38: Übersicht der für Sequenzalignments verwendeten Haloperoxidasesequenzen mit UniProt-ID**

HPO	Organismus	Uniprot-ID
NapH1	<i>Streptomyces sp.</i> CNQ-525	A7KH27
V <sub>Cl</sub> PO- <i>Ci</i>	<i>C. inaequalis</i>	P49053
V <sub>Br</sub> PO- <i>Co</i>	<i>C. officinalis</i>	Q8LLW7
V <sub>Br</sub> PO- <i>An</i>	<i>A. nodosum</i>	P81701

### 5.5.2 Docking-Studien

Docking-Studien wurden mit Hilfe des Webservers HADDOCK durchgeführt.<sup>[318, 319]</sup> Die Verwendung erfolgte gemäß der Anleitung für das Modul „*small ligand docking*“. Im ersten Schritt wurde die Kristallstruktur von V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* (PDB-Code: 1VNC) für das *docking* vorbereitet. Dafür wurden sämtliche Wassermoleküle und nicht-proteinogenen Bestandteile, inklusive des Vanadat-Cofaktors, aus der Struktur entfernt (HADDOCK pdb tool: *pdb\_splitchain #1; pdb\_delhetatm #2; pdb\_delelem#3; pdb\_merge#4*). Für den Liganden wurde anhand der chemischen Struktur eine Strukturdatei erstellt, die die korrekte Orientierung und Kraftfelder für einzelne Substituenten im Raum mit Hilfe des PRODRGR-Servers enthielt.<sup>[360]</sup> Die beiden optimierten Strukturdateien wurden auf den Webserver geladen und mit folgenden veränderten Parametern für ein *docking* eingestellt (siehe Tabelle 39).

Tabelle 39: Übersicht der angepassten Parameter für HADDOCK-*docking* gemäß der Anleitung „*small ligand docking*“

Parameter	run.cms Bezeichnung	Standardwert	angepasster Wert
<i>Clustering method</i>	clust_meth	FCC	RMSD
<i>Cutoff for clustering</i>	clust_cutoff	0.6	2.5
<i>Dielectric constant for it0</i>	dielec_0	rdie	cdie
<i>Dielectric constant for it1</i>	dielec_1	rdie	cdie
<i>Epsilon constant for the electrostatic energy term in it1</i>	epsilon_1	1.0	10.0
<i>Number of MD steps for rigid body high temperature TAD</i>	initiosteps	500	0
<i>Number of MD steps during first rigid body cooling stage</i>	cool1_steps	500	0
<i>Initial temperature for second TAD cooling step with flexible side-chain at the interface</i>	tadinit2_t	1000	500
<i>Initial temperature for third TAD cooling step with fully flexible interface</i>	tadinit3_t	1000	300
<i>Evdw 1</i>	w_vdw_0	0.01	1.0
<i>Eelec 3</i>	w_elec_2	0.2	0.1

Die so erhaltenen Strukturensamples wurden anhand ihres HADDOCK-scores nach Qualität sortiert. Die besten Ergebnisse wurden manuell in Chimera visualisiert und der Bindungsmodus analysiert. Hierfür wurden neben Wasserstoffbrücken auch van-der-Waals-Wechselwirkungen und potenzielle Kollisionen zwischen Ligand und Protein gesucht (tools/structure analysis/FindHBond und tools/structure analysis/findclashes/contacts).

### 5.5.3 *In silico* Mutagenese

Die Identifikation geeigneter Aminosäuren zur rationalen Mutagenese von V<sub>Cl</sub>PO-*Ci* erfolgte mit Hilfe von Chimera. Die Kristallstruktur 1VNC wurde als Vorlage verwendet, um Alanine in der Nähe des aktiven Zentrums jeweils einer Mutation zu Lysin zu unterziehen. Als wesentliches Kriterium diente neben der Entfernung des Alanins zum *o*-Vanadat-Coenzym auch die Orientierung des entsprechenden Lysinrests. Es wurden nur Alanine ausgesucht, die in einer *HotSpot*-Analyse mit *HotSpot-Wizard* 3.0 als nicht-katalytisch-relevant identifiziert wurden.<sup>[322]</sup> Grundlage für die Entfernung war die Ausmessung der Abstände zwischen reaktiver FAD-Position, katalytischem Lysin und reaktiver Stelle des Substrats innerhalb der Substratbindetasche der flavinabhängigen Halogenase PrnA (tools/structure analysis/distances). Die Mutation der Alanine erfolgte mit dem Rotamertool (tools/structure editing/rotamers) unter Auswahl von Lysin anhand der „Dunbrack 2010“ Rotamerbibliothek. Hierbei wurde neben der Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Rotamers die Orientierung relativ zum Coenzym als Auswahlkriterium verwendet. Anschließend wurde eine Minimierung der Strukturenergie (tools/structure editing/minimize structure) durchgeführt, bis keine Kollisionen mit dem Rotamer

detektiert werden konnten. Die Energieminimierung wurde dabei mit folgenden Parametern durchgeführt (siehe Tabelle 40).

**Tabelle 40: Parameter der Energieminimierung der Proteinstruktur in Chimera**

Schritt	Wert
<i>Steepest descent steps</i>	100
<i>Steepest descent step size (Å)</i>	0.02
<i>Conjugate gradient steps</i>	10
<i>Conjugate gradient step size (Å)</i>	0.02
<i>Update interval</i>	10
<i>Fixed atoms</i>	Alle unbeteiligten Atome an Kollisionen

## 5.6 Chemische Methoden

### 5.6.1 Lösungsmittel

Lösungsmittel wie Petrolether (PE), Essigsäureethylester (EtOAc), Diethylether, Aceton und Dichlormethan wurden vor Gebrauch mit Rotationsverdampfern destilliert, um Stabilisatoren oder andere Verunreinigungen der technischen Lösungen zu entfernen. Absolute Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Diethylether und Toluol wurden je nach Anforderung in trockener Form durch eine Lösungsmitteltrocknungsanlage (MB-SPS-800; M. Braun Inertgas-Systeme GmbH, Garching, Deutschland) bereitgestellt. Für die Nutzung von Messgeräten wie GC-MS, NMR, LC-MS und HPLC wurden die Lösungsmittel in entsprechender Reinheit (HPLC-Grade, GC-Grade, >99.5 %) verwendet.

### 5.6.2 Reaktionskontrollen und (präparative) Chromatographie

Zur Kontrolle von Reaktionen wurden dünn-schicht-chromatographische Analysen mit DC-Folien (Kieselgel 60 oder Aluminiumoxid) verwendet. Nach Probenauftragung mit Glaskapillaren wurden entsprechende Banden über UV-Licht sichtbar gemacht und anschließend durch Anfärben in  $\text{KMnO}_4$ -Lösung (1.5 g  $\text{KMnO}_4$ , 10 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 1.25 mL 10 % (v/v) NaOH, 200 mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) weiter behandelt. Die Folie wurde mit einem Heißluftgebläse entwickelt. Reste organischer Lösungsmittel wurden mit Rotationsverdampfern bei einer Badtemperatur von 40 °C entfernt, bevor das Rohprodukt in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und auf eine präparative Glassäule mit Kieselgel 60 säulenchromatographisch isoliert wurde. Die Elution erfolgte abhängig von der Verbindung mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Polarität.

### 5.6.3 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Gaschromatographische Messungen mit gekoppelter Massenspektrometrie wurden an einem Trace 1310 Gaschromatographie-System (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) mit gekoppeltem ISQ™ QD Single Quadrupole Massenspektrometer (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die chromatographische Trennung erfolgte an einer Optima 5MS Säule (30 m · 0.25 mm, 0.25 µm; *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland). Die Detektion von Molekülfragmenten erfolgte über Elektronenionisation (EI). Als Lösungsmittel wurde Essigsäureethylester verwendet. Zur Bestimmung von Umsätzen wurden Kalibrierfunktionen mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Analyten erstellt, wobei *m*-Chlortoluol als interner Standard diente. Das verwendete Temperaturprogramm und die Parameter für die Massenspektrometrie sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 41).

Tabelle 41: Einstellungen des für GC-MS-Analysen verwendeten Programms

Schritt	Einstellungen
<b>Gaschromatographie</b>	
Injektion	5 Füllschritte, 1 $\mu\text{L}$ Luftvolumen
Heizen	Temperatur am Injektor 250 $^{\circ}\text{C}$
	Temperaturgradient: 1 min 60 $^{\circ}\text{C}$ 8.33 min bis 185 $^{\circ}\text{C}$ (15.0 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 1 min bis 280 $^{\circ}\text{C}$ (120 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 5 min 280 $^{\circ}\text{C}$
<b>Massenspektrometrie</b>	
Temperatur	Transfertemperatur 280 $^{\circ}\text{C}$ Ionisierungstemperatur 230 $^{\circ}\text{C}$
Scan	Elektronenionisation bei 70 eV, 2.50 min, Massenspektrum 50-1000, 0.2 s Scanzeit

#### 5.6.4 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden zur Reaktionskontrolle und Identitätsbestimmung von Verbindungen verwendet. Die Messungen erfolgten dabei an einem *Advance/DRX 600* NMR Spektrometer (*Bruker Corporation*, Billerica, MA, USA). Dabei erfolgten Messungen bei einer Temperatur von 297 K in deuteriertem Chloroform, DMSO oder Methanol bei einer Frequenz von 600 MHz (151 MHz für  $^{13}\text{C}$ ). Chemische Verschiebungen sind als relative Werte zu charakteristischen Lösungsmittelsignalen ( $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$  ppm und  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.2$  ppm; Methanol- $d_4$ :  $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.31$  ppm und  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.2$  ppm; TMS [ $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{TMS}) = 0.00$  ppm und  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{TMS}) = 0.0$  ppm]) angegeben. Zusätzlich zu  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden weitere, zweidimensionale Spektren aufgenommen. Dazu zählen DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarization transfer*)-135 $^{\circ}$  Puls-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (engl. *correlation spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*). Diese wurden zur exakten Zuordnung von Positionen funktioneller Gruppen verwendet. In sämtlichen NMR-Spektren wurden Multiplizitäten von Signalen als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Multiplett (m) bezeichnet. Die Kopplungskonstanten (J) wurden in Hz angegeben.

#### 5.6.5 HPLC-Messungen

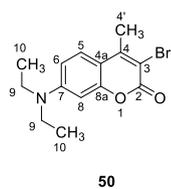
HPLC-Messungen wurden bei 25  $^{\circ}\text{C}$  mit einer Lux-Amylose-1-Säule (250  $\cdot$  4.6 mm, Fa. Phenomex) an einem *Dionex UltiMate 3000* (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einem *n*-Heptan:Isopropanol-Gemisch im Verhältnis 60:40 bei einer Flussrate von 0.5  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

#### 5.6.6 Synthese von 3-Brom-4-methyl-7-diethylaminocumarin 50

Die Synthese der Referenzverbindung 3-Brom-4-methyl-7-diethylaminocumarin (BrMeDAC) **50** erfolgte nach Gordeeva *et al.*<sup>[361]</sup>. Zu einer Lösung von 0.86 mmol (204 mg) 7-Diethylamino-4-

## Experimentaltteil

methylcumarin (MeDAC) **49**, gelöst in 50 mL Acetonitril, wurden 1.06 Äquivalente (0.92 mmol, 174 mg) N-Bromsuccinimid, gelöst in 20 mL Acetonitril, unter Rühren tropfenweise über 60 min bei 25 °C zugegeben. Das Lösungsmittel wurde mit einem Rotationsverdampfer evaporiert und das Rohprodukt der Reaktion auf einer Kieselgelsäule mit Toluol-Aceton als Lösungsmittel im Verhältnis 40:1 präparativ isoliert. Fraktionen, die einen einzige Bande auf der DC-Platte enthielten, wurden vereint, bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft und mittels NMR analysiert (siehe Abschnitt 5.6.4). Das Produkt **50** wurde in 97 % (258 mg, 0.83 mmol) Ausbeute erhalten.<sup>[361]</sup>



**<sup>1</sup>H NMR** (600 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 7.45 (d,  $^3J_{5,6} = 9.0$  Hz, 1H, 5-*H*), 6.71 (s, 1H, 6-*H*), 6.57 (s, 1H, 8-*H*), 3.42 (q,  $^3J_{9,10} = 7.1$  Hz, 4H, 9-*H*), 2.54 (s, 3H, 4'-*H*), 1.22 (t,  $^3J_{10,9} = 7.1$  Hz, 6H, 10-*H*).

**<sup>13</sup>C NMR** (151 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  [ppm] = 12.78 (s, 2C, 10-*C*), 19.47 (s, 1C, 4'-*C*), 45.15 (s, 2C, 9-*C*), 97.69 (s, 1C, 8-*C*), 106.06 (s, 1C, 4a-*C*), 109.34 (s, 1C, 6-*C*), 126.42 (s, 1C, 5-*C*), 151.00 (s, 1C, 3-*C*), 151.84 (s, 1C, 7-*C*), 154.85 (s, 1C, 8a-*C*), 158.53 (s, 1C, 2-*C*).

### 5.6.7 Synthese von bromierten und chlorierten Thymolderivaten

0.01 mmol Thymol (**56**) (10  $\mu$ L einer 1 M Lösung in Chloroform) wurden in einem Schnappdeckelgefäß mit 1.2 Äquivalenten NBS oder NCS bzw. Palau-Chlor<sup>®</sup> (0.012 mmol, 100  $\mu$ L) in Form einer 10-fachen Stammlösung in Chloroform gemischt. Für Chlorierungsansätze wurde zusätzlich 5 mol-% DMSO als Katalysator zugegeben und das Volumen auf 1 mL mit Chloroform (inklusive 5 mM *m*-Chlortoluol als internen Standard) aufgefüllt. Das Gefäß wurde mit einem Magnetrührfisch versehen, verschlossen und in einem Sandbad bei 25 °C und 700 rpm kontinuierlich gerührt. Nach 1 h wurde die Reaktionslösung mit *demin.* H<sub>2</sub>O gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und mit EtOAc als verdünnte Probe (100-fach) über GC-MS gemessen. Die Retentionszeiten wurden mit Referenzproben verglichen und der Umsatz von Thymol (**56**) in jedem Ansatz unter Verwendung der GC-MS-Kalibrierfunktion (siehe 5.7.5) relativ bestimmt.

## 5.7 Spezieller Experimentalteil

### 5.7.1 Fluoreszenzmessungen

Fluoreszenzmessungen wurden mit einem TECAN Infinite M1000 Pro Plate Reader (*Tecan Trading AG*, Männedorf, Schweiz) durchgeführt. Es wurden schwarze 96-Well-Flachboden-Kaminplatten von Greiner mit einem Arbeitsvolumen von 250  $\mu\text{L}$  verwendet. 2D-Anregungs-Emissionsspektren wurden bei Anregungswellenlängen von 300 nm bis 850 nm und Emissionswellenlängen von 320 nm bis 850 nm gemessen, wobei für beide Wellenlängen eine Schrittweite von 2 nm verwendet wurde. Die Intensität wurde mit einer Verstärkung von 100 und 25 Blitzen bei einer Blitzfrequenz von 400 Hz, einer Integrationszeit von 20  $\mu\text{s}$ , einer Verzögerungszeit von 0  $\mu\text{s}$  und einer Einschwingzeit von 0 ms mit Anregungs- und Emissionsbandbreiten von 5 nm gemessen. Die Einzelpunkt- und kinetischen Messungen wurden mit einer Anregungswellenlänge von 425 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm für den bevorzugten Nachweis von MeDAC **49** und 550 nm für BrMeDAC **50** durchgeführt, da die Fluoreszenzintensitäten für die Zielverbindung jeweils mindestens dreifach höher waren. Die Intensität wurde mit einer Verstärkung von 100 und 10 Blitzen bei einer Blitzfrequenz von 400 Hz, einer Integrationszeit von 20  $\mu\text{s}$ , einer Verzögerungszeit von 0  $\mu\text{s}$  und einer Einschwingzeit von 0 ms mit Anregungs- und Emissionsbandbreiten von 5 nm gemessen.

### 5.7.2 Etablierung eines Konzentrationsrechners für MeDAC **49** und BrMeDAC **50**

Für die Anpassung der 3D-Kalibrierungen für beide Emissionswellenlängen wurde die "Poly-2D"-Fit-Funktion in OriginPro 2018 verwendet ( $z = z_0 + a \cdot x + b \cdot y + c \cdot x^2 + d \cdot y^2 + f \cdot x \cdot y$ ). Die sich daraus ergebenden Gleichungssysteme wurden für die Konzentration von MeDAC **49** - immer noch in Abhängigkeit von  $c(\text{BrMeDAC})$  - mit dem Analysewerkzeug von GeoGebra (<https://www.geogebra.org/>) gelöst. Die vier Lösungen wurden numerisch für die Konzentrationen von BrMeDAC **50** mit Hilfe der Funktion "Zielvorgabe" in Microsoft Excel (2016) gelöst, die einen Simplex-Algorithmus verwenden. Zwei der vier Gleichungen sagen für ein Paar von  $c(\text{BrMeDAC})$  und  $c(\text{MeDAC})$  genau dieselben gemessenen Fluoreszenzintensitäten voraus, so dass die Differenz Null sein sollte. Für diese Bedingung wurde eine BrMeDAC-Konzentration numerisch gelöst. Als Normierung für die relativen Intensitäten wurde die gemessene Intensität bei den gegebenen Bedingungen von MeDAC **49** und BrMeDAC **50** bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  gewählt.

Intensität  $I$  (425 Ex, 450 Em)

$$= 0.01 + 0.03 * c(\text{MeDAC}) + 0.03 * c(\text{BrMeDAC}) + 1.74 * 10^{-5} * c(\text{MeDAC})^2 - 1.83 * 10^{-4} * c(\text{BrMeDAC})^2 - 3.07 * 10^{-5} * c(\text{MeDAC}) * c(\text{BrMeDAC})$$

Intensität  $I$  (425 Ex, 550 Em)

$$= 3.64 * 10^{-4} + 4.34 * 10^{-4} * c(\text{MeDAC}) + 0.04 * c(\text{BrMeDAC}) - 2.85 * 10^{-5} * c(\text{MeDAC})^2 - 3.32 * 10^{-4} * c(\text{BrMeDAC})^2 + 8.6 * 10^{-5} * c(\text{MeDAC}) * c(\text{BrMeDAC})$$

$$\begin{aligned} c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em}}) &= \frac{153539 * c(\text{BrMeDAC}) \pm \sqrt{1740540000000000 * I_{425\text{Ex},450\text{Em}} + 341388125821 * c(\text{BrMeDAC})^2 - 85657169400000 * c(\text{BrMeDAC}) + 17810971300800000 - 133500000}}{174054} \\ c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em}}) &= \frac{860157 * c(\text{BrMeDAC}) \pm \sqrt{1138784000000000 * I_{425\text{Ex},550\text{Em}} - 3038512756791 * c(\text{BrMeDAC})^2 + 526758875600000 * c(\text{BrMeDAC}) + 1887707029977920 + 43400000}}{569392} \end{aligned}$$

### Gleichung 10: Kalibrierfunktion für Fluoreszenzmessungen von MeDAC 49 und BrMeDAC 50

Die gemessene Intensität bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm für MeDAC 49 bzw. 550 nm für BrMeDAC 50 steht in Abhängigkeit von der Konzentration beider Moleküle. Die Gleichungen wurden nach der Konzentration MeDAC 49 bei beiden Wellenlängenpaaren aufgelöst.

Die Gleichung mit der Quadratwurzel als Summand wird als 1 betrachtet, die mit dem Minuend als 2. Es wurden vier verschiedene Gleichungssysteme für die Bedingung  $I_{425\text{Ex},450\text{Em}} - I_{425\text{Ex},550\text{Em}} = 0$  erhalten:

$$\begin{aligned} I: & c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},1}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},1}) = 0 \\ II: & c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},1}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},2}) = 0 \\ III: & c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},2}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},1}) = 0 \\ IV: & c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},450\text{Em},2}) - c(\text{MeDAC}_{425\text{Ex},550\text{Em},2}) = 0 \end{aligned}$$

### Gleichung 11: Gleichungssysteme zur Bestimmung der Konzentration von BrMeDAC 50

Die Gleichungssysteme wurden nach der kleinsten Konzentrationsdifferenz, 0, aufgelöst. Dafür wurden die zwei Gleichungen, aufgelöst nach der Konzentration MeDAC 49, aus Gleichung 10 verwendet. Die rot hervorgehobene Gleichung III stellt die Lösung im korrekten Werteraum der Funktion dar.

Das hervorgehobene Gleichungssystem lieferte positive Werte für die Konzentration mit dem Wert, der von allen vier am nächsten bei Null lag, und wurde daher für die Berechnung von BrMeDAC 50 und die Neuberechnung der MeDAC-Konzentration verwendet. Für den finalen Konzentrationsrechner wurde ein Excel-Makro generiert, das nach Eingabe der Fluoreszenzwerte in einer Tabelle automatisch die Lösungen für Gleichung III sucht und die erhaltenen Werte mit den entsprechenden Korrekturtermen (siehe Kapitel 3.3.3) verrechnet.

### 5.7.3 Bestimmung der Nachweisgrenzen des MeDAC-Assays

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen wurde die *limit of blank* Methode verwendet. Die dafür verwendeten Formeln sind nachfolgend aufgeführt (siehe Gleichung 12).<sup>[294]</sup>

$$\begin{aligned} \text{Limit of Blank (LoB)} &= \bar{c} + 1,645 * SD \\ \text{Limit of Detection (LoD)} &= \text{LoB} + 1,645 * SD_{\text{LoD}} \\ \text{Limit of Quantification (LoQ)} &= \text{LoD} + 10 * SD_{\text{LoQ}} \\ \text{Präzision} \leq 10\% &= \frac{SD_{\text{LoQ}}}{c(\geq \text{LoQ})} \end{aligned}$$

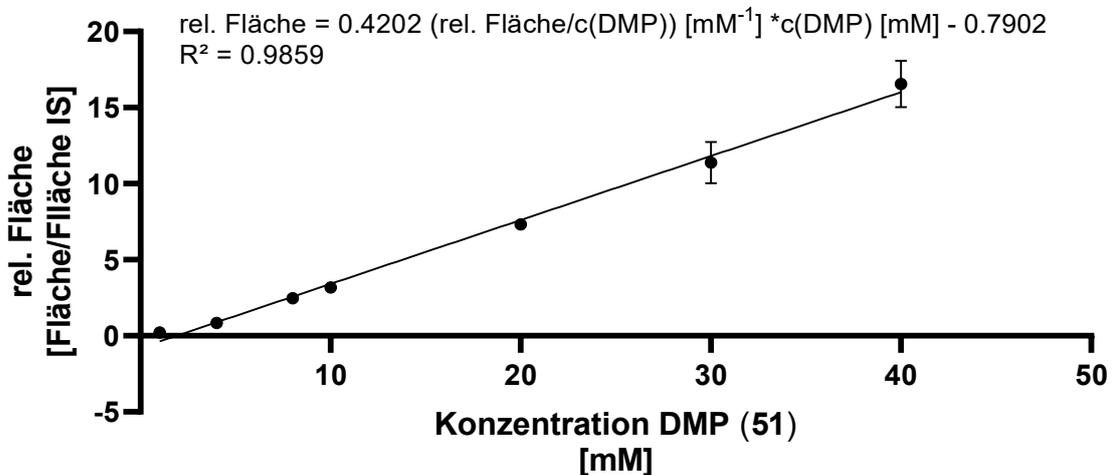
**Gleichung 12: Gleichungen zur Berechnung der Nachweisgrenzen mit der *limit of blank* Methode**

SD: Standardabweichung; c: Konzentration des Analyten;  $\bar{c}$ : Mittelwert der Konzentration des Analyten

Für die Bestimmung jedes Grenzwerts muss eine neue Konzentration des Analyten gewählt werden, die über dem zuvor bestimmten Grenzwert liegt oder ihm zumindest entspricht. Die erforderliche Präzision basiert auf dem Wert des Vertrauensintervalls ( $t = 90\%$ ). Für alle Bestimmungen wurde jede Konzentration mindestens 10 Mal gemessen, um die entsprechenden Standardabweichungen zu berechnen.

Aufgrund der negativen Werte für *limit of blank* für BrMeDAC **50**, die auf die mathematische Kalibrierungsfunktion zurückzuführen sind, bei der negative Konzentrationen bei niedrigen Konzentrationen von BrMeDAC **50** ohne MeDAC **49** in der Probe bestimmt werden, wurden die Werte der *limits* für beide Verbindungen auf die für MeDAC **49** ermittelten Grenzwerte bezogen.

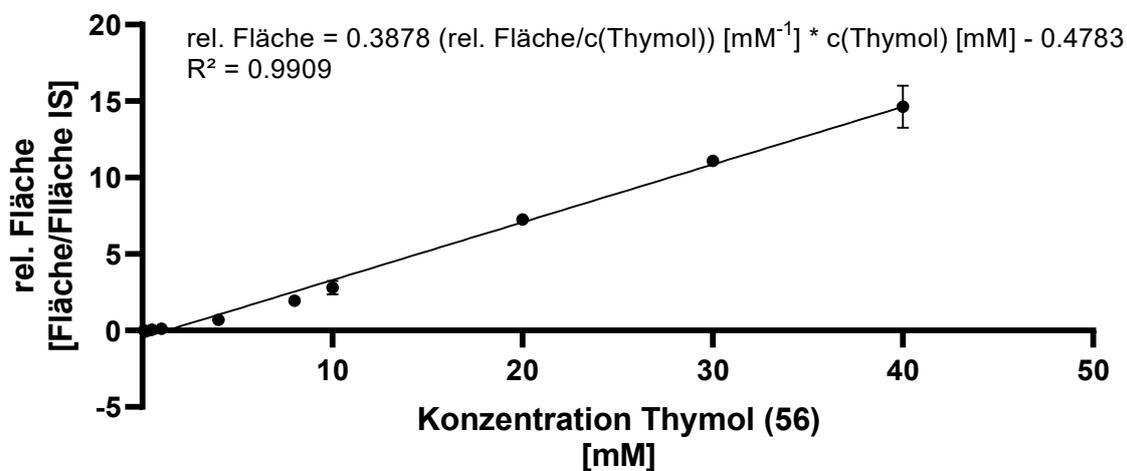
#### 5.7.4 Kalibrierung von DMP (51) via GC-MS



**Abbildung 98: Kalibriergerade zur Bestimmung der DMP-Konzentration über GC-MS-Analyse**

Für die Analyse wurden Ansätze in 1 mL BTA-Puffer mit vordefinierten Konzentrationen DMP (**51**) in Methanol angesetzt, mit 500  $\mu\text{L}$  EtOAc mit 5 mM *m*-Chlortoluol als internem Standard (IS) extrahiert, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und zentrifugiert und in einer Verdünnung von 1:100 in EtOAc in GC-Vials überführt. Die erhaltenen relativen Flächen des DMP-Signals wurden durch die Fläche des IS geteilt und gegen die eingesetzte DMP-Konzentration aufgetragen. Die Messungen erfolgten als unabhängige Duplikate.

### 5.7.5 Kalibrierung von Thymol (56) via GC-MS



**Abbildung 99: Kalibriergerade zur Bestimmung der Thymol-Konzentration über GC-MS-Analyse**

Für die Analyse wurden Ansätze in 1 mL BTA-Puffer mit vordefinierten Konzentrationen Thymol (56) in Methanol angesetzt, mit 500 µL EtOAc mit 5 mM *m*-Chlortoluol als internem Standard (IS) extrahiert, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und zentrifugiert und in einer Verdünnung von 1:100 in EtOAc in GC-Vials überführt. Die erhaltenen relativen Flächen des DMP-Signals wurden durch die Fläche des IS geteilt und gegen die eingesetzte Thymol-Konzentration aufgetragen. Die Messungen erfolgten als unabhängige Duplikate.

5.7.6 Bestimmung des E<sup>+</sup>-Faktors

Zur Berechnung des E<sup>+</sup>-Faktors wurde Gleichung 8 verwendet. Der Beitrag einzelner Komponenten zum finalen E<sup>+</sup>-Faktor ist nachfolgend aufgelistet (siehe Tabelle 42).

**Tabelle 42:** Übersicht der einzelnen Beiträge zur Berechnung des E<sup>+</sup>-Faktors für die Halogenierung von Thymol (56)

Alle Reaktionen wurden im Maßstab von 1 mL durchgeführt. Die Berechnungen beziehen sich auf g Nebenprodukte bzw. Abfall pro g Produkt. Als Produkte wurden sämtliche Halogenierungsprodukte von Thymol (56) gezählt. Da die Extraktion zwischen allen Ansätzen gleich durchgeführt wurde, wurde diese nicht in die Berechnung des E<sup>+</sup>-Faktors miteinbezogen. Als Durchschnittswert der CO<sub>2</sub>-Emissionen pro produzierter kWh wurden 366 g · kWh<sup>-1</sup> verwendet.<sup>[327]</sup> Die angegebenen Werte des Stromverbrauchs beziehen sich auf die Angaben zur Stromleistung an dem jeweiligen Gerät (siehe Geräteliste, 5.1.1)

Schritt	Gerät	Verbrauch [W·h]	Komponente	Menge [g]
<b>Katalysatorproduktion V<sub>Ci</sub>PO-Ci</b>				
Kultivierung	Inkubator	108000	Medium	1051
	ÄKTA	900		
Isolation	Zentrifuge groß	7470	Puffer	1200
	Zentrifuge klein	1650		
Summe		118020		2250
E <sup>+</sup> -Faktor [ · 10 <sup>-3</sup> ]			4208	
<b>Biokatalytische Bromierung von Thymol (56)</b>				
Reaktion	Schüttler	660	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.39 · 10 <sup>-3</sup>
			KBr	4.88 · 10 <sup>-3</sup>
			Thymol (56)	0.150 · 10 <sup>-3</sup>
			V <sub>Ci</sub> PO-Ci	0.050 · 10 <sup>-3</sup>
			Puffer	1.02
Summe		660		1.03
E <sup>+</sup> -Faktor [ · 10 <sup>-3</sup> ]			117	
<b>Biokatalytische Chlorierung von Thymol (56)</b>				
Reaktion	Schüttler	660	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.43 · 10 <sup>-3</sup>
			KCl	3.12 · 10 <sup>-3</sup>
			Thymol (56)	0.296 · 10 <sup>-3</sup>
			V <sub>Ci</sub> PO-Ci	0.050 · 10 <sup>-3</sup>
			Puffer	1.02
Summe		660		1.03
E <sup>+</sup> -Faktor [ · 10 <sup>-3</sup> ]			130	
<b>Chemische Bromierung von Thymol (56)</b>				
Reaktion	Rührplatte	825	DMSO	16.2 · 10 <sup>-3</sup>
			Succinimid	0.991 · 10 <sup>-3</sup>
			Thymol (56)	0
			NBS	0.3(56) · 10 <sup>-3</sup>
			Chloroform	1.49 · 10 <sup>-3</sup>
Summe		825		1.51
E <sup>+</sup> -Faktor [ · 10 <sup>-3</sup> ]			132	
<b>Chemische Chlorierung von Thymol (56)</b>				
Reaktion	Rührplatte	825	DMSO	16.2 · 10 <sup>-3</sup>
			Succinimid	0.740 · 10 <sup>-3</sup>
			Thymol (56)	0.380 · 10 <sup>-3</sup>
			NCS	0.806 · 10 <sup>-3</sup>
			Chloroform	1.49
Summe		825		1.51
E <sup>+</sup> -Faktor [ · 10 <sup>-3</sup> ]			210	

### 5.7.7 Experimente im kontinuierlichen Durchfluss/flow chemistry

Sämtliche Experimente im Durchfluss wurden mit Hilfe einer *Syrris Asia Flow Syringe Pump* unter Verwendung gelber Einbauspritzen (50.0  $\mu\text{L}$ /100  $\mu\text{L}$ ) durchgeführt. Als Schläuche dienten manuell zugeschnittene PTFE-Schläuche mit entsprechenden Adaptern für die Pumpe und Säule. Als Säulen für die Immobilisation von  $V_{\text{Cl}}\text{PO-Ci}$  wurden Omnifit-Glassäulen (3 mm · 50 mm) bzw. Omnifit-EZ-Glassäulen (5 mm · 50 mm) verwendet. Die Pumpen wurden manuell mit Hilfe des integrierten Menüs betrieben. Als Auffanggefäße dienten 50 mL-Reaktionsgefäße oder Glasflaschen mit Schraubdeckeln mit entsprechender Windung für die Pumpenschläuche eingesetzt. Der Aufbau der Anlage ist nachfolgend abgebildet (siehe



**Abbildung 100: Aufbau der Durchfluss-Anlage im Rahmen dieser Arbeit**

Die *Syrris Asia Flow Syringe Pump* (hinten) zieht die Lösung aus der 500 mL-Flasche (links) über die Säule mit immobilisiertem Enzym (Mitte rechts) und pumpt die Lösung weiter in das Zielgefäße, das mit Aluminiumfolie umwickelt ist. Bei Bedarf können Verbindungsstücke (rechts unten) dazugeschaltet werden, um mehrere Lösungen über die Pumpe auf eine oder zwei Säulen zu verteilen.

### 5.7.8 Immobilisierung von $V_{\text{Cl}}\text{PO-Ci}$

Für die Immobilisierung von  $V_{\text{Cl}}\text{PO-Ci}$  wurden drei verschiedene Methoden verwendet. Im Fall der IMAC-Immobilisierung wurde Sepharose-Matrix mit Nickelchlorid beladen und auf die entsprechende Omnifit-Säule gegeben. Nach vollständiger Packung wurde eine Lösung bereits isolierter  $V_{\text{Cl}}\text{PO-Ci}$  zyklisch für 30 min bei einer Flussrate von 100  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  aufgetragen. Die Säule wurde für die Lagerung bei 4 °C mit Endstücken zugelegt und in Assaypuffer gelagert.

Für Immobilisierungsexperimente mit HaloTag- $V_{\text{Cl}}\text{PO-Ci}$  wurde HaloLink®-Resin (Promega GmbH, Walldorf, Germany) als Trägermaterial verwendet. Hierfür wurden Pellets nach Kultivierung resuspendiert, per Ultraschallaufschluss aufgeschlossen und nach zweifacher Filtration mit einem Sterilfilter bei 40  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  auf die Säule für 3 h oder über Nacht aufgetragen. Anschließend wurde die Säule für 30 min mit Assaypuffer gespült.

Die Immobilisierung mit PuroLite Lifetech ECR8415F erfolgte gemäß Herstellerangaben mit IMAC-isolierter  $V_{\text{Cl}}\text{PO-Ci}$ . Zu einer definierten Einwaage des Materials wurde zweimal mit

Immobilisierungspuffer (50 mM BTA, pH 6) gewaschen, bevor eine 1 %-ige Glutaraldehydlösung in Immobilisierungspuffer zugegeben wurde. Nach Inkubation unter konstantem Schütteln für 1 h wurde das nun bräunliche Material erneut gewaschen und die Enzymlösung in entsprechender Verdünnung über Nacht mit dem Trägermaterial inkubiert. Am nächsten Tag wurde nicht-gebundenes Protein mit Waschpuffer ausgewaschen und das Material über eine Spritze mit Filter bis zur Trockenheit filtriert. Das trockene Immobilisat wurde anschließend in entsprechende Säulen gewogen und anhand der Gewichts Differenz die Beladungsmenge berechnet. Das restliche Material wurde bei 4 °C trocken gelagert.

Für alle Immobilisierungsexperimente wurde nach jedem Schritt eine Probe der Enzymlösung genommen und mit Hilfe des MeDAC-Assays auf HPO-Aktivität untersucht. Aus den gemessenen Aktivitäten wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungen die finale immobilisierte Enzymmenge und Immobilisierungseffizienz bestimmt. Für alle drei Methoden konnte nach Lagerung von einem Monat keine Aktivität im Immobilisat und damit auch kein Umsatz mehr detektiert werden.

### 5.7.9 Design of Experiment

Zur systematischen Analyse des Einflusses von Reaktionsparametern auf den Umsatz entsprechender Substrate wurde ein DoE mit der Software DesignExpert12 (*StatEase, Inc.*) entworfen. Für alle Experimente wurde eine *response surface*-Analyse unter Verwendung eines randomisierten *central composite*-Designs verwendet. Als Parameter wurden für die Testreaktionssysteme (siehe Kapitel 3.6) Reaktionszeit, Konzentration Kaliumbromid und Wasserstoffperoxid (in mM) und der pH-Wert verwendet. Für die Analyse wurden 46 Experimente angestrebt und mit dem Modell beschrieben, das die höchste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, dargestellt durch den R<sup>2</sup>-Wert, besaß. Die Fitparameter der einzelnen Funktionen sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabelle 43 und Tabelle 44).

#### Tabelle 43: Übersicht der Fitparameter für DoE-Ansätze

Die statistische Auswertung der Fits erfolgte automatisch während des Fits. Sequenzielle p-Werte müssen unter 0.05 liegen, um das verwendete Modell als signifikant einzustufen. Für den Fit wurden die Modelle des höchsten Polynoms gewählt, bei denen zusätzliche Terme signifikant sind und das Modell nicht verzerrt (engl. *aliased*) wird. 2FI: *two-factor interaction*

Experiment	Fitmodell	Sequenzieller p-Wert	Angepasster R <sup>2</sup> -Wert
Thymol (56)	Quadratisch	0.046	0.235
4BrThymol 57	2FI	0.0009	0.559
DMP 51	Quadratisch	0.0585	0.414
BrDMP 52	Quadratisch	< 0.0001	0.845

**Tabelle 44: Fitfunktionen für DMP 51, BrDMP 52, Thymol (56) und 4BrThymol 57 nach DoE-Analyse**  
 Unter der Spalte ‚Werte‘ sind die Vorfaktoren der einzelnen Parameter gelistet, die in der Summe die finale Fitfunktion ergeben.

Fitfunktion für Umsatz	Wert	Parameter	Fitfunktion für Umsatz	Wert	Parameter
<b>DMP 51</b>	66.9	-	<b>Thymol (56)</b>	-271	-
	+3.20	· c(KBr)		-5.34	· Zeit
	-1.18	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		-1.32	· c(KBr)
	-0.106	· pH-Wert		-0.282	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
	-0.508	· c(KBr) · pH-Wert		+118	· pH-Wert
	+0.244	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) · pH-Wert		-0.031	· Zeit · c(KBr)
<b>BrDMP 52</b>	42.9	-	-0.007	· Zeit · c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
	-1.07	· Zeit	+0.391	· Zeit · pH-Wert	
	-0.750	· c(KBr)	+0.003	· c(KBr) · c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
	0.132	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	+0.026	· c(KBr) · pH-Wert	
	1.23	· pH-Wert	+0.033	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) · pH-Wert	
	0.003	· Zeit · c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	+0.299	· Zeit <sup>2</sup>	
	-0.001	· c(KBr) · c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	+0.041	· c(KBr) <sup>2</sup>	
	0.129	· c(KBr) · pH-Wert	+0.001	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	
	-0.07	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) · pH-Wert	-10.6	· pH-Wert <sup>2</sup>	
	0.055	· Zeit <sup>2</sup>	<b>4BrThymol 57</b>	4.59	-
	0.002	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>		3.44	· Zeit
		-2.30		· c(KBr)	
		0.190		· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
		5.18		· pH-Wert	
		0.051	· Zeit · c(KBr)		
		-0.005	· Zeit · c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
		-0.608	· Zeit · pH-Wert		
		0.002	· c(KBr) · c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		
		0.289	· c(KBr) · pH-Wert		
		-0.029	· c(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) · pH-Wert		

Für DoE-Versuche im Durchfluss wurde die Reaktionszeit durch die Kontaktzeit, berechnet anhand des experimentell ermittelten Totvolumens des verwendeten Pumpsystems inklusive Schläuche, ersetzt. Anstelle des pH-Werts wurden hier die Enzymbeladung der Säule als kategorischer Parameter getestet. Die Beladung lag bei 3.60 U für Säule 1 und 6.17 U für Säule 2. Da diese Experimente zu keinen messbaren Umsätzen führten, konnte keine DoE-Analyse durchgeführt werden.

### 5.7.10 Kultivierung von *C. fumago*

Eine Schrägagarkultur von *C. fumago* 1256, erworben bei der DSMZ, wurde auf eine Kartoffelextrakt-Agarplatte überstrichen und für 13 Tage bei 19 °C inkubiert. Von den sichtbaren, dunklen Kolonien wurde etwas Zellmaterial mit Hilfe einer sterilen Impfhöhle abgenommen und für die Anzucht einer

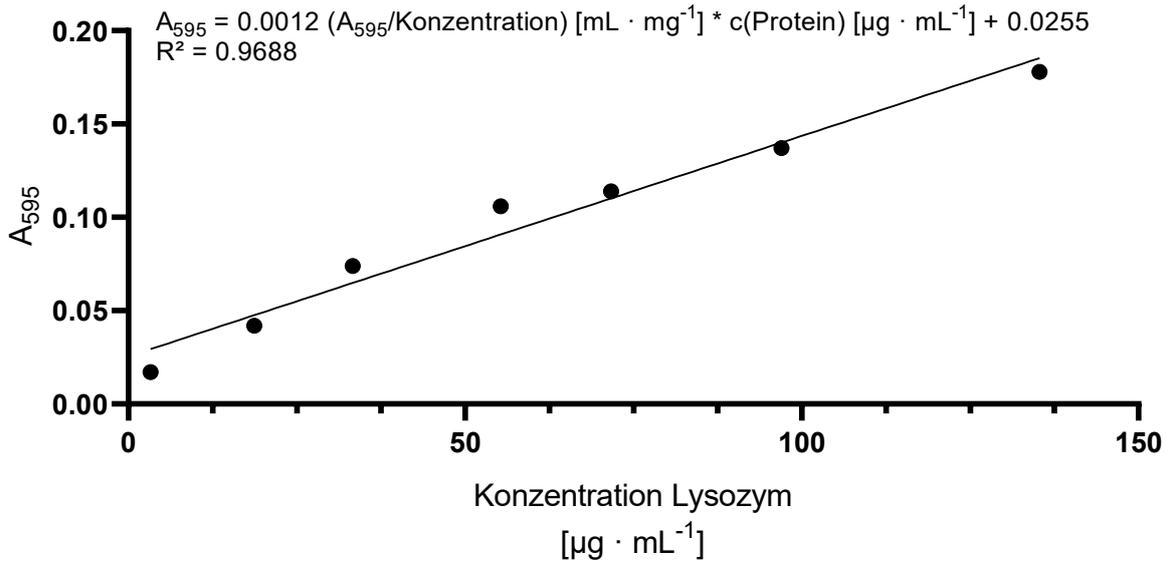
Flüssigkultur in 1 L Fructose-Minimalmedium verwendet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 19 °C für 13 Tage unter Schütteln bei 110 rpm. Zur Bestimmung der CPO-*Cf*-Aktivität wurden täglich 1 mL-Proben entnommen und mit Hilfe des DAC-Assays bestimmt. Am letzten Tag der Inkubation wurde das Medium vom Pilz über Watte filtriert und in 500 mL-Portionen in 1 L-Rundkolben überführt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Das so schockgefrorene Kulturmedium wurde über 2 Tage lyophilisiert und das lyophilisierte Pulver in Schnappdeckelgläsern bei 4 °C gelagert.

### 5.7.11 Ethanolfällung und Isolation von CPO-*Cf*

Die Ethanolfällung von CPO-*Cf* wurde als erster Isolationsschritt nach dem Protokoll von Yamada et al. durchgeführt.<sup>[234]</sup> Nach der Filtration des Kulturmediums durch Watte wurde es im Eisbad gekühlt und anschließend kaltes Ethanol (-20 °C) bis zu einer Konzentration von 45 % *v/v* zugegeben. Das Gemisch wurde nach 30 min Inkubation auf Eis zentrifugiert (4 °C, 6500 x *g*), der Überstand dekantiert und kaltes Ethanol (-20 °C) bis zu einer finalen Konzentration von 65 % *v/v* beigegeben. Nach 2h Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut zentrifugiert (4 °C, 6500 x *g*, 30 min), der Überstand abgenommen und das Präzipitat in 4 ml kaltem Phosphorsäurepuffer (100 mM  $\text{HP}_i$ , pH 3, 4 °C) aufgeschlämmt. Nach Lagerung über Nacht bei 4 °C wurde die Suspension zentrifugiert (4 °C, 1700 x *g*, 10 min) und mit Zentrifugalkonzentratoren (10 kDa MWCO) bei 4000 x *g* und 4 °C auf etwa 2 mL eingengt.

Zur weiteren Reinigung wurde eine SEC durchgeführt. Dafür wurden 2 – 10 mg Protein in einem Volumen von 1 mL über eine Spritze in den ÄKTA-Probenschlauch injiziert. Die Auftragung auf die Säule erfolgte mit  $\text{HP}_i$ -Puffer (300 mM, pH 3) bei einer Flussrate von 1 mL · min<sup>-1</sup>. Für die Fraktionierung wurde die Absorption bei 280 und 403 nm gemessen und 4 mL pro Fraktion gesammelt. Fraktionen mit gleichen Absorptionsmustern wurden vereint. Die Kalibrierung der SEC erfolgte unter gleichen Bedingungen. Für die beiden Größenstandardmischungen wurde je 1 mg in 1 mL  $\text{HP}_i$ -Puffer gelöst. Lediglich für Tryptophan wurden ca. 0.2 mg eingesetzt.

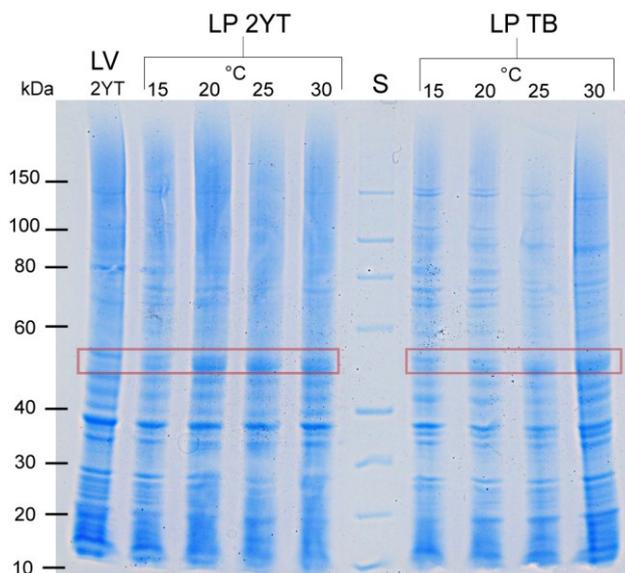
Die finale Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte über den Bradfordassay mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von Lysozym. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen Lysozym als 100 µL Standardlösung erstellt und mit 100 µL Bradfordreagenz (100 mg Coomassie Blue G250 in 50 mL 95 %-igem Ethanol, anschließend 100 mL 85%ige Phosphorsäure, *ad 1 L aqua demin.*) vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.<sup>[362]</sup> Anschließend wurde die Absorption für jede Lösung bei 280 nm gemessen und daraus eine Kalibriereihe erstellt. Die erhaltene Fitfunktion wurde zur Berechnung der CPO-*Cf*-Konzentration verwendet (siehe Abbildung 101).



**Abbildung 101: Kalibriergerade des Bradfordassays zur Proteinquantifizierung**

Daten erhoben von S. Myllek.<sup>[281]</sup> Definierte Mengen Lysozym (*chicken white egg powder*, Sigma) wurden abgewogen und in Wasser gelöst. 100  $\mu\text{L}$  der Lösung wurden anschließend mit 900  $\mu\text{L}$  Bradfordreagenz vermischt und die Lösung photometrisch bei 595 nm gemessen. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden anschließend gegen die eingesetzte Lysozymkonzentration aufgetragen und eine lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt. Die Funktion wurde zur Quantifizierung des Proteingehalts von CPO-Cf-Proben verwendet.

### 5.7.12 Expressionsstudien von Haloperoxidasen

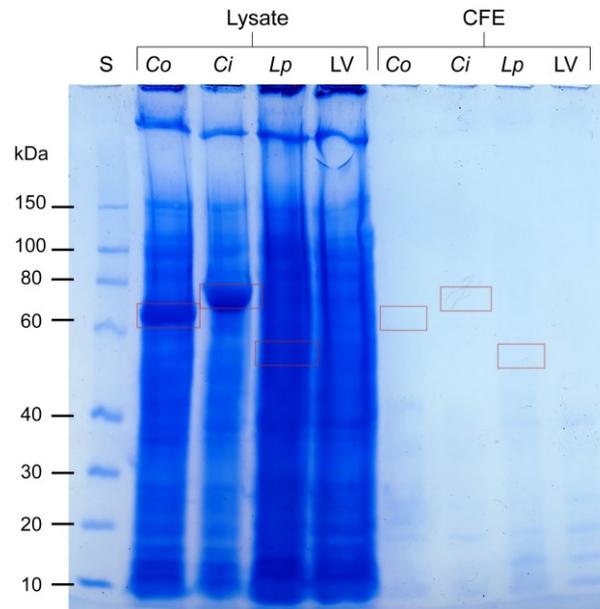


**Abbildung 102 Untersuchung des Einflusses von Nährmedien und Kultivierungstemperatur auf die Proteinproduktion von VPO-Lp in *E. coli* BL21 (DE3)**

SDS-Gel der Testexpression von VPO-Lp in *E. coli* BL21 (DE3) bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen in verschiedenen reichhaltigen Nährmedien (TB und 2xYT). S: ROTI®Mark 10-150 kDa Protein Marker; LV: Leervektor-Probe; Lp: V-HPO-Gen aus *L. pratensis*. Das theoretische Molekulargewicht des Enzyms (55 kDa) ist durch einen Rahmen symbolisiert.

### 5.7.13 Expressionsstudien von Haloperoxidasen als inclusion body Test

Zur Analyse der Löslichkeit von Haloperoxidasen nach heterologer Produktion in *E. coli* wurde ein sogenannter inclusion body Test durchgeführt. Dafür wurde nach Zellaufschluss das Lysat für 1 h bei 10000 x *g* zentrifugiert und eine SDS-Probe des zellfreien Überstands mit der des Lysats verglichen (siehe Abbildung 103). Dabei konnten keine Banden für den Überstand detektiert werden, was auf eine fehlerhafte Probenverdünnung zurückzuführen ist.



**Abbildung 103: inclusion body Test der heterologen Produktion von HPOs in *E. coli***

Alle Proben wurden auf einen OD<sub>600</sub>-Wert von 1 normiert. **S**: ROTI®Mark 10–150 kDa Protein Marker; **LV**: Leervektor-Probe; **Lp**: V-HPO-Gen aus *L. pratensis*; **Co**: V-HPO-Gen aus *C. officinalis*; **Ci**: V-HPO-Gen aus *C. inaequalis*. Das theoretische Molekulargewicht des jeweiligen Proteins ist durch einen Rahmen symbolisiert.

5.7.14 Aktivitätsbestimmung von Lysaten mit dem DAC-Assay

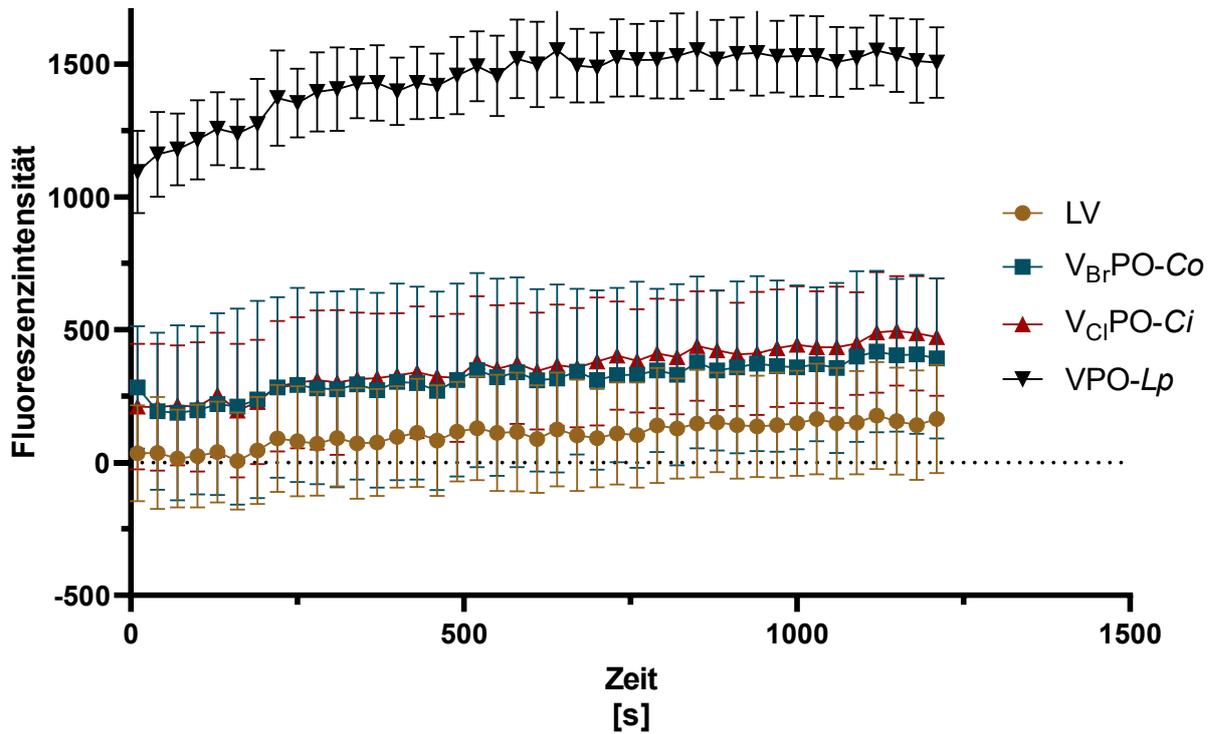


Abbildung 104: Aktivitätsnachweis der *E. coli* Lysate mit dem DAC-Assay

Pellets von 50 mL Kulturen der drei Haloperoxidasen und eines Leervektorstammes wurden mit 4 mL 100 mM Formiatpuffer, pH 3 resuspendiert, aufgeschossen und abschließend zentrifugiert. 40  $\mu$ L des CFE wurde in Dreifachbestimmung in einem Endvolumen von 250  $\mu$ L mit 100  $\mu$ M DAC ( $\lambda_{\text{Ex}} = 385$  nm,  $\lambda_{\text{Em}} = 450$  nm) für 10 min gemessen. Die Probe für VPO-*Lp* wurde dabei um den Faktor 100 vorverdünnt.

## 5.7.15 Resorufin als alternatives Assaysystem

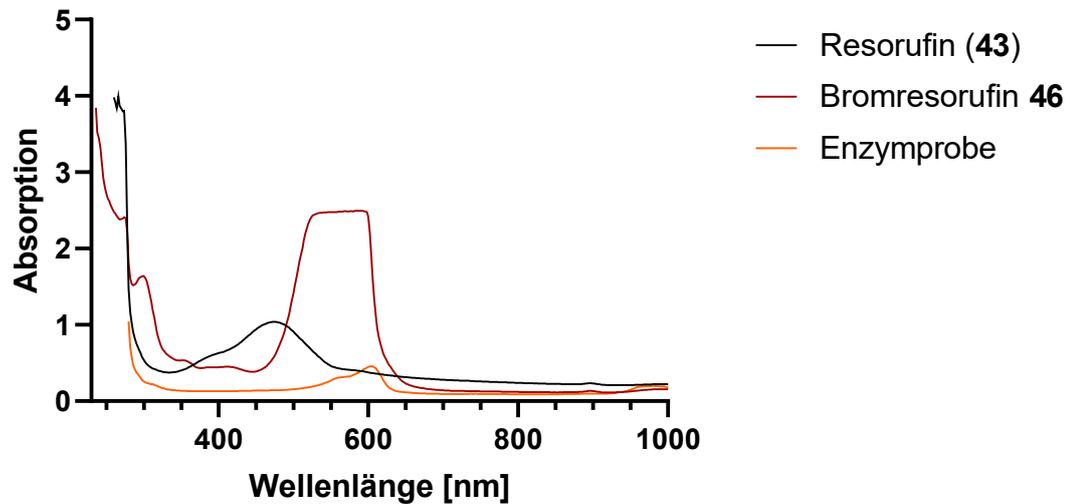


Abbildung 105: Absorptionsspektren von Resorufin (43) (schwarz), Bromresorufin 46 (rot) und einer Enzymprobe mit Resorufin (43) (orange) in Assaypuffer

Die Konzentration des Analyten betrug in jeder Probe 100  $\mu\text{M}$ . Die Messung erfolgte in MTP-Format in 250  $\mu\text{L}$ .

## 5.7.16 Aktivitätsnachweis von VPO-Lp mit dem MeDAC-Assay

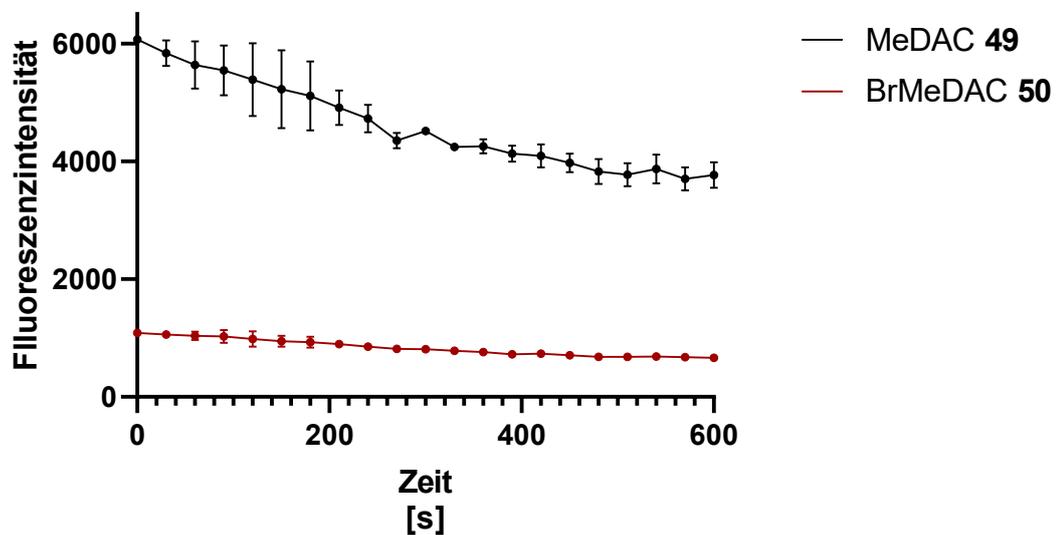


Abbildung 106: Aktivität der Elutionsfraktion von VPO-Lp nach säulenchromatographischer Isolation

Die Messung erfolgte unter Standard-Assaybedingungen (siehe Kapitel 5.4.6).

5.7.17 Aktivitätsnachweis neuer Haloperoxidasen mit dem MeDAC-Assay

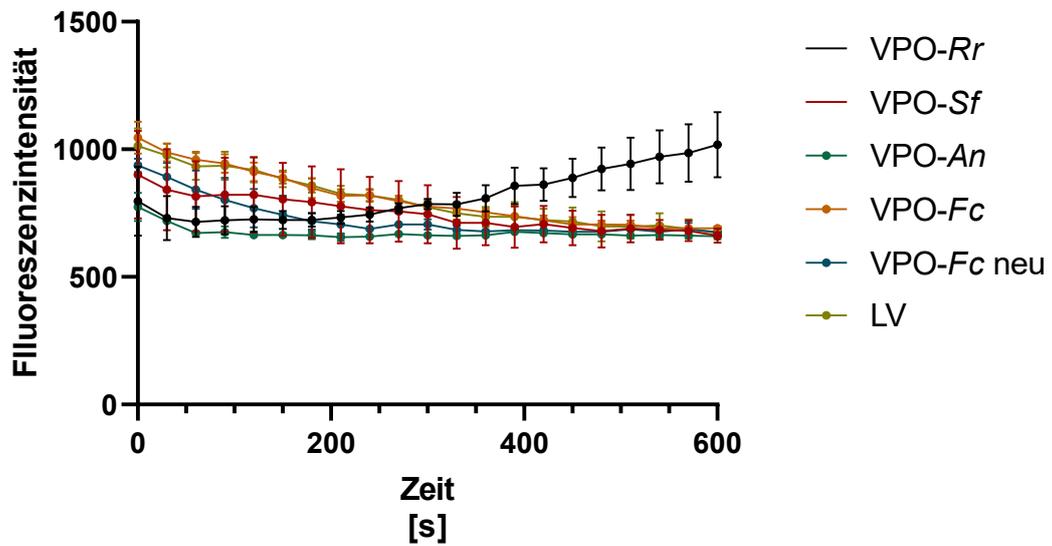


Abbildung 107: Aktivitätsnachweis zellfreier Lysate verschiedener putativer Haloperoxidasen mit dem MeDAC-Assay

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von BrMeDAC 50 über einen Zeitraum von 10 min. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte unter Standardbedingungen mit 10  $\mu$ L CFE.

## 5.7.18 Einfluss von CTAB in der HPO-vermittelten Umsetzung von Thymol (56)

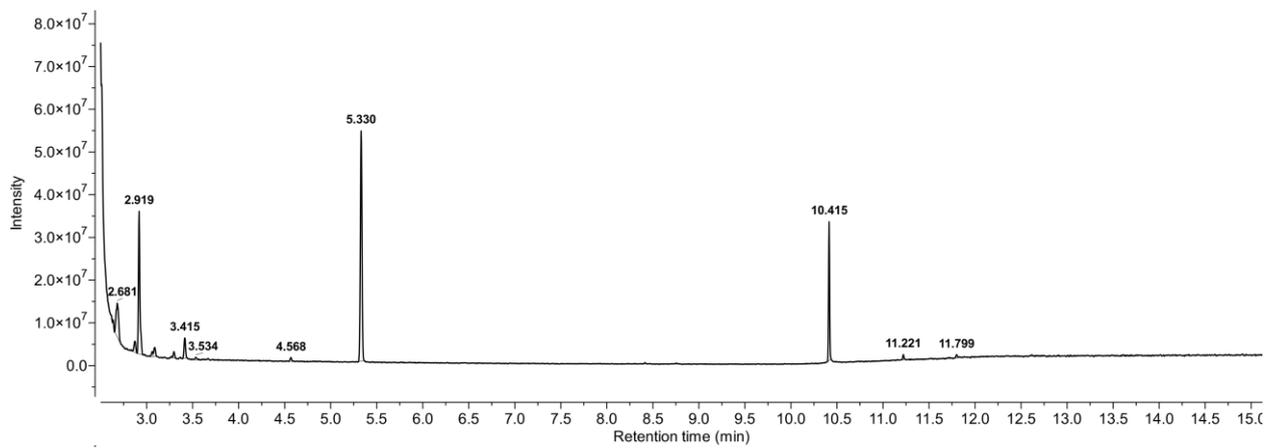


Abbildung 108: Beispielchromatogramm der Umsetzung von Thymol (56) in Anwesenheit von CTAB

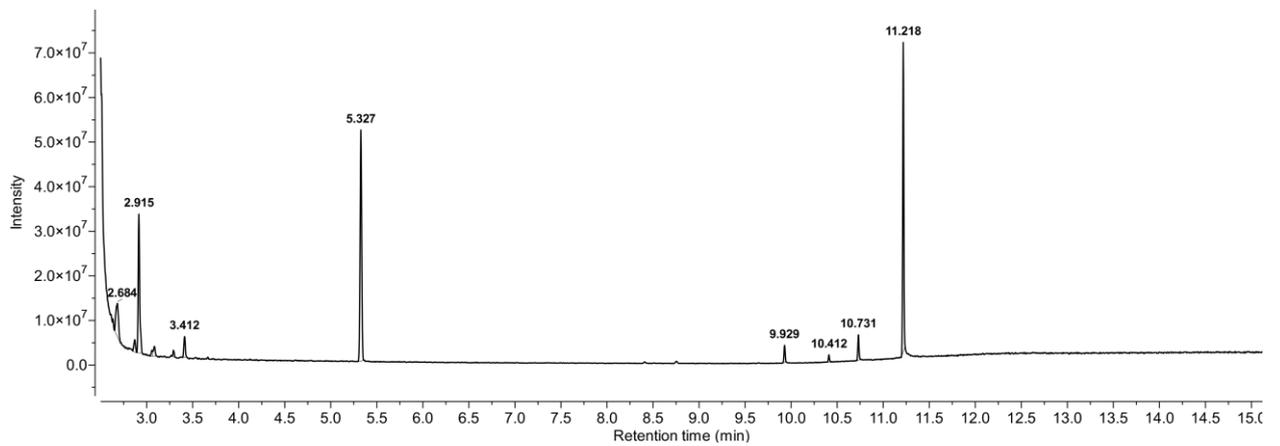
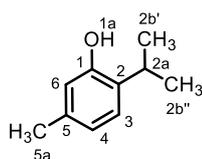


Abbildung 109: Beispielchromatogramm der Umsetzung von Thymol (56) in Abwesenheit von CTAB

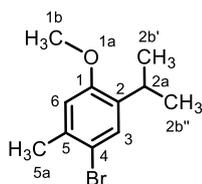
$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum für Thymol (56) und 4BrTME 63 (kommerzielle Substanzen, Sigma-Aldrich):

## Experimentalteil



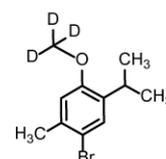
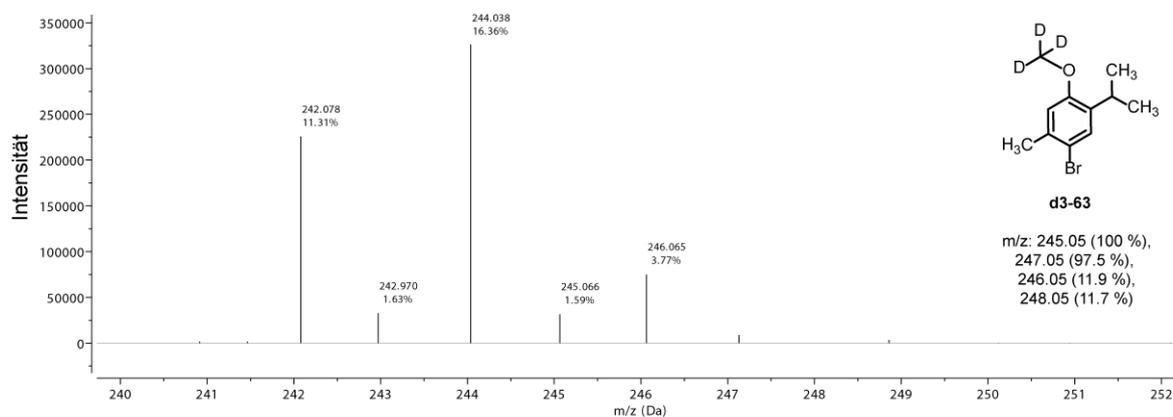
56

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Chloroform-d) δ [ppm] = 7.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub>=7.8, 1H, 3-C), 6.74 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub>=7.8, 1.7, 1H, 4-C), 6.59 – 6.56 (m, 1H, 6-C), 4.61 (d, <sup>3</sup>J<sub>1a,6</sub>=1.7, 1H, 1a-C), 3.16 (hept, <sup>3</sup>J<sub>2a, 2b'/2b''</sub>=6.9, 1H, 2a-C), 2.28 (s, 3H, 5a), 1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>2b'/2b'',2a</sub> = 6.9, 6H, 2b'-C, 2b''-C).



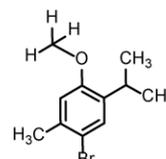
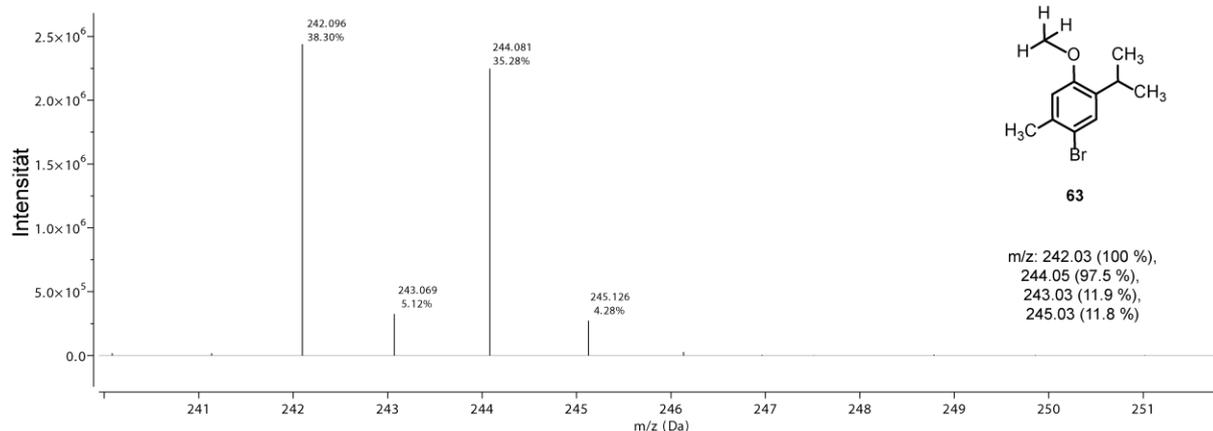
63

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Chloroform-d) δ [ppm] = 7.23 (s, 0H, 3-C), 6.67 (s, 1H, 6-C), 3.77 (s, 3H, 1b-C), 3.20 (hept, <sup>3</sup>J<sub>2a, 2b'/2b''</sub>=6.9, 1H, 2a-C), 2.32 (s, 3H, 5a-C), 1.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>2b'/2b'',2a</sub> = 6.9, 6H, 2b'-C, 2b''-C).



d3-63

m/z: 245.05 (100 %),  
247.05 (97.5 %),  
246.05 (11.9 %),  
248.05 (11.7 %)



63

m/z: 242.03 (100 %),  
244.05 (97.5 %),  
243.03 (11.9 %),  
245.03 (11.8 %)

Abbildung 110: MS-Spektrum der Umsetzung von Thymol (56) mit deuterierter Essigsäure (oben) und nicht-deuterierter Essigsäure (unten)

Dargestellt ist der Bereich von 240-252 m/z des Retentionssignals bei 10.4 min (4BrTME 63) mit der vorhergesagten Molekülmasse mit allen gängigen Isotopen (rechts) für die deuterierte und nicht-deuterierte Verbindung.

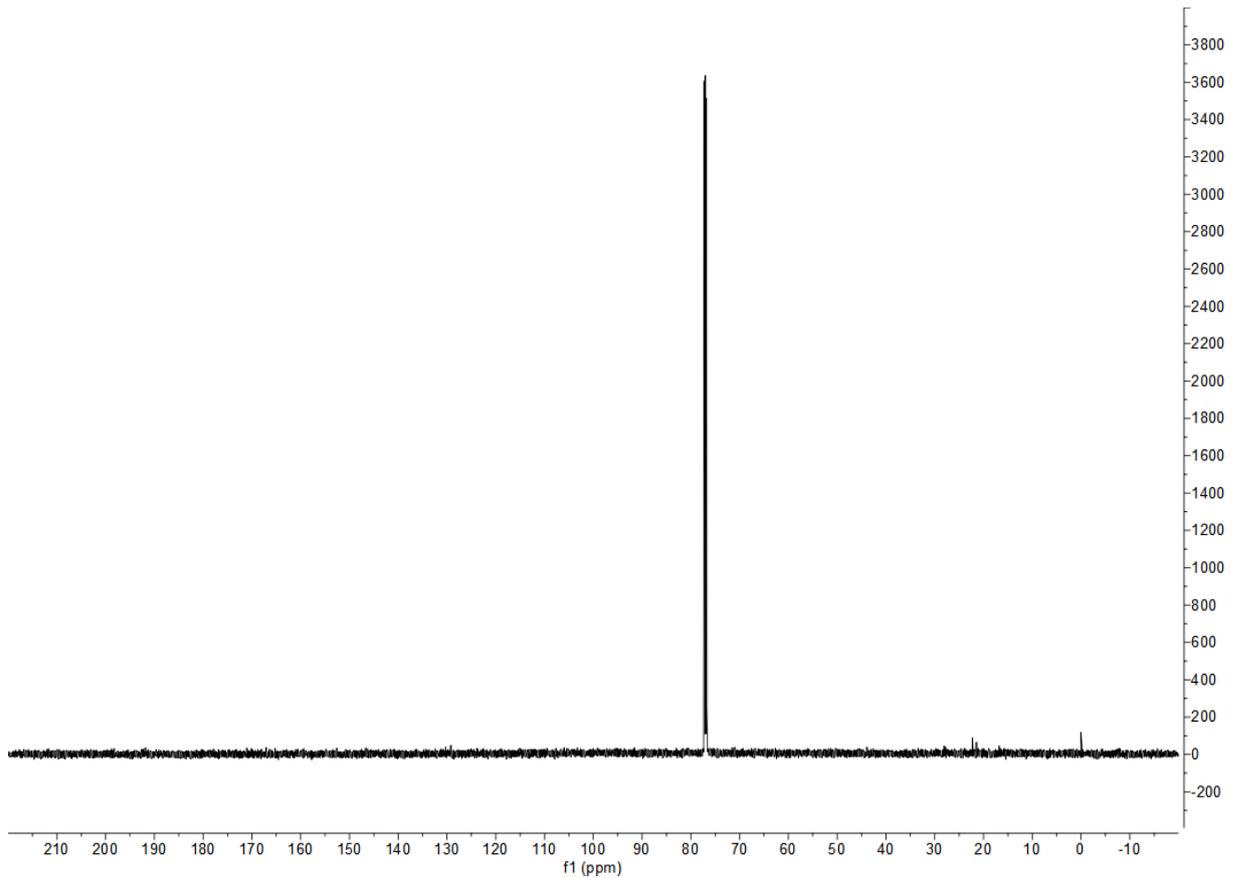


Abbildung 111:  $^{13}\text{C}$ -Spektrum in  $\text{CDCl}_3$  des deuterierten enzymatischen Ansatzes zur Umsetzung von Thymol (**56**) zu 4BrTME **63**

### 5.7.19 Kultivierung von Mutanten von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci*

Die Kultivierung und Reinigung der Mutanten A70K und A402K von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* erfolgte nach Standardbedingungen (siehe Abschnitt 5.3.8 und 5.4.2). Die erzielten Ausbeuten und Aktivitäten sind nachfolgend zusammengefasst (siehe Tabelle 45).

Tabelle 45: Übersicht der erzielten Proteinausbeuten und Aktivitäten der Mutanten A70K und A402K von *V<sub>Cl</sub>PO-Ci* aus 500 mL Zellkultur

Variante	Proteinmenge [mg]	Spezifische Aktivität [U · mg <sup>-1</sup> ]	Aktivität pro g Zellen [U · g <sup>-1</sup> ]
Wildtyp	5.27	6.30	2.44
A70K	0.792	0.077	0.008
A402K	0.956	0.181	0.022

### 5.7.20 Dimedon-Assay

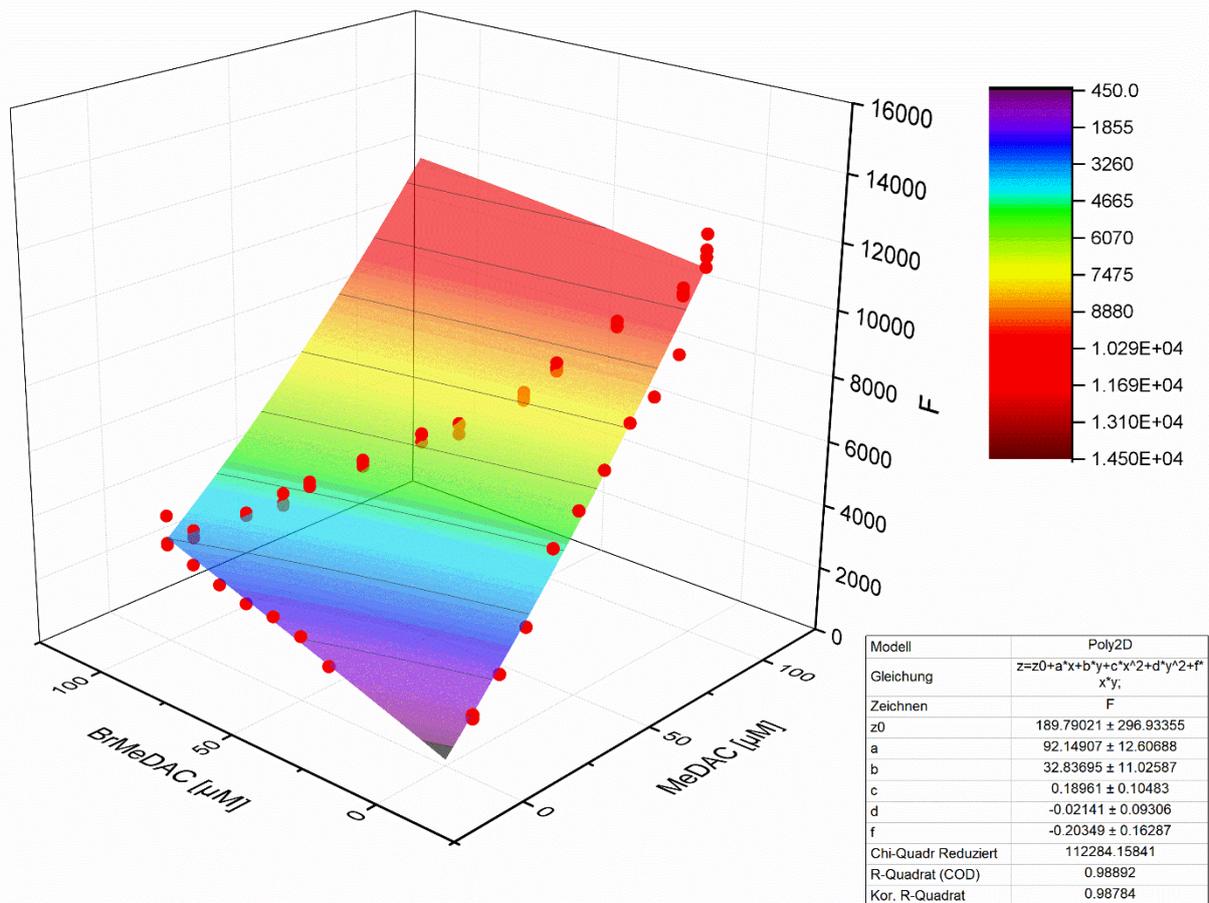
Für erste HPO-Nachweise wurde der Dimedon-Assay nach Literaturangaben verwendet.<sup>[201]</sup> Hierfür wurde kommerzielle CPO-*C<sub>f</sub>*-Lösung (Endkonzentration 5 U) oder Lysate mit HPOs eigener Herstellung in HP<sub>i</sub>- bzw. Assaypuffer mit 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 mM NaCl und 2 mM Dimedon (**23**) (als DMSO-Stocklösung) für 10 min bei 290 nm photometrisch gemessen. Als Leerprobe diente ein Ansatz ohne

## Experimentaltteil

Enzym. Die Absorptionsänderungsrate für kommerzielle CPO-Cf betrug  $-0.006 \text{ min}^{-1}$ , zeigte aber bei einer Tüpfelprobe auf einer DC-Platte kein Signal für Cl-Dimедon **24**. Für die Lysate eigener Herstellung konnte keine Absorptionsänderungsrate detektiert werden.

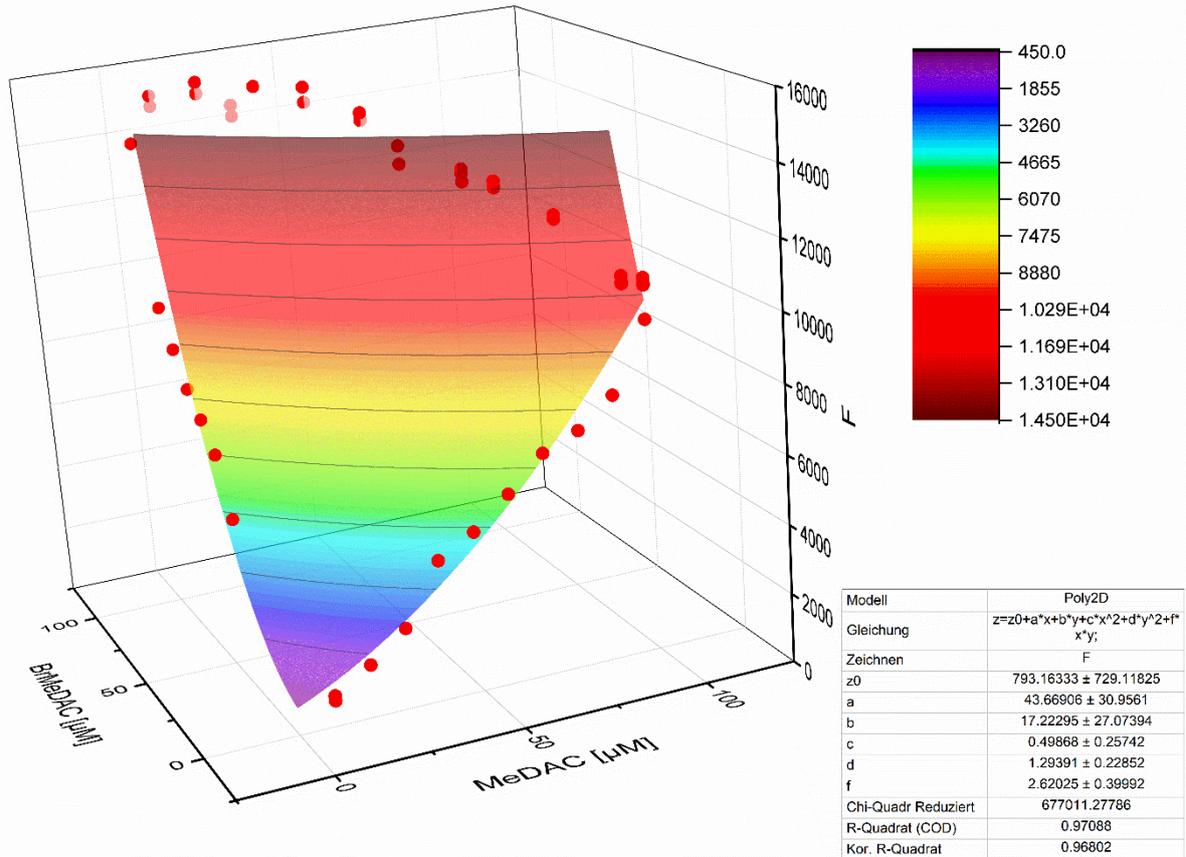
### 5.7.21 Kalibrierfunktionen für den MeDAC-Assay

Nachfolgend sind alle Fits inklusive Kalibrierfunktionen dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit für den MeDAC-Assay aufgestellt wurden.



**Abbildung 112: Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Konzentration von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 in 100 mM HPI-Puffer (pH 3) bei bevorzugter Emission von MeDAC 49**

$\lambda_{ex}^{all} = 385 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}^{MeDAC} = 450 \text{ nm}$ . Die Werte wurden mit einem Polynom zweiten Grades unter Verwendung eines *least-square*-Fits beschrieben. Die Werte der Kalibrierfunktion sind im Kasten mit den jeweiligen Faktoren aufgelistet.  $R^2=0.99$



**Abbildung 113: Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Konzentration von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 in 100 mM HPI-Puffer (pH 3) bei bevorzugter Emission von BrMeDAC 50**

$\lambda_{ex}^{all} = 385 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}^{MeDAC} = 500 \text{ nm}$ . Die Werte wurden mit einem Polynom zweiten Grades unter Verwendung eines *least-square*-Fits beschrieben. Die Werte der Kalibrierfunktion sind im Kasten mit den jeweiligen Faktoren aufgelistet.  $R^2=0.97$

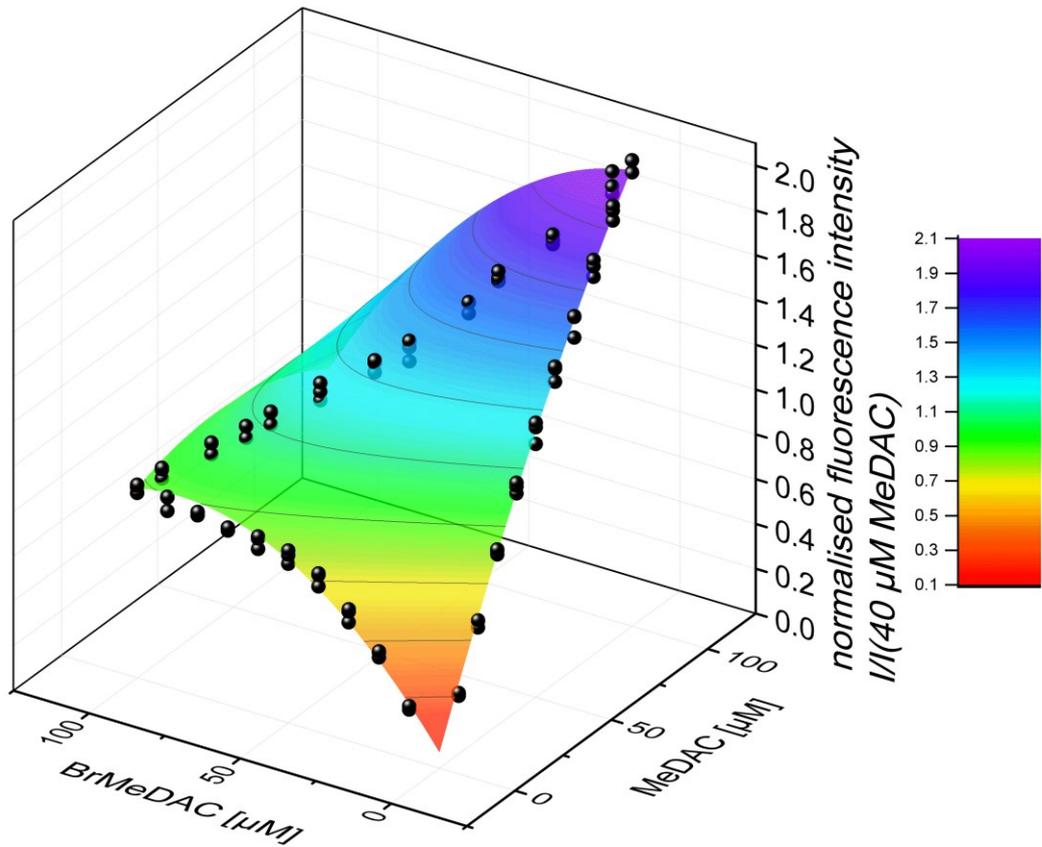
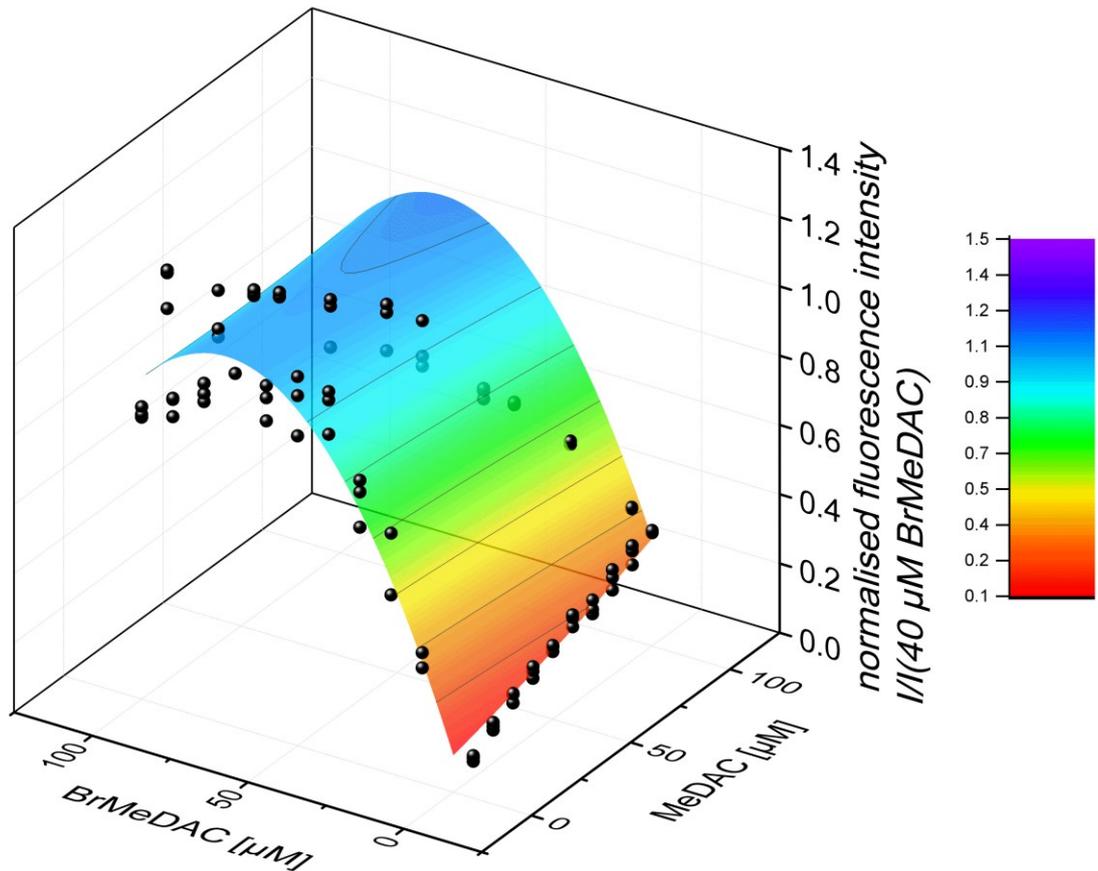


Abbildung 114: Normalisierte Fluoreszenzintensitäten (auf Fluoreszenz einer Lösung mit 40  $\mu\text{M}$  MeDAC) in Abhängigkeit der Konzentration von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 in 100 mM BTA-Puffer (pH 6) bei bevorzugter Emission von MeDAC 49

$\lambda_{ex}^{all} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}^{MeDAC} = 450 \text{ nm}$ . Die Werte wurden mit einem Polynom zweiten Grades unter Verwendung eines *least-square*-Fits beschrieben.  $R^2=0.99$

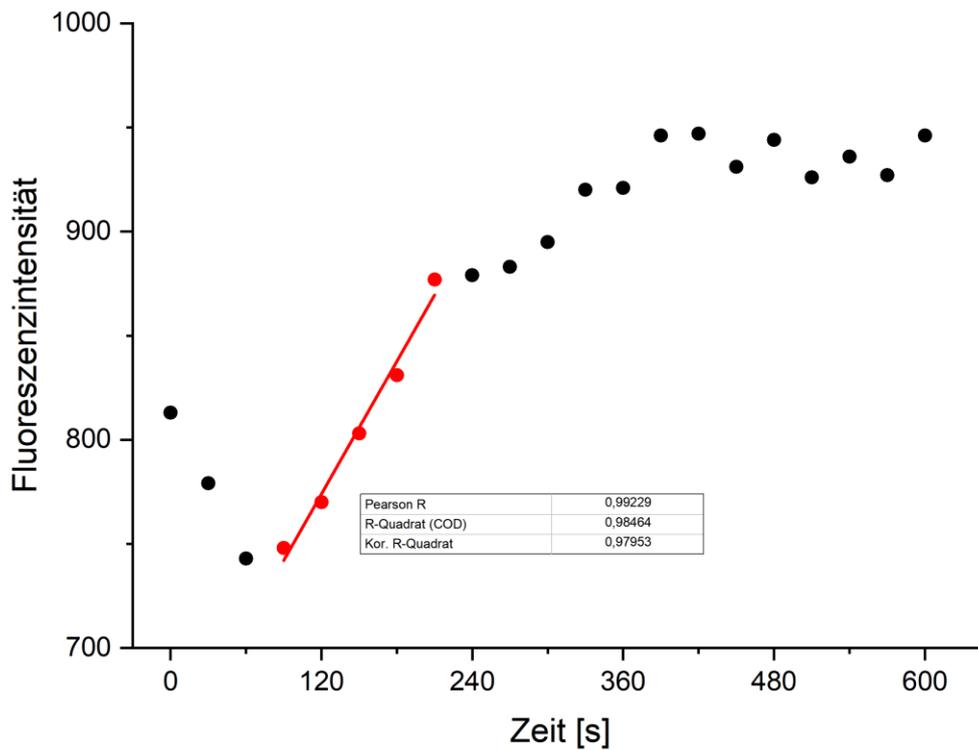


**Abbildung 115: Normalisierte Fluoreszenzintensitäten (auf Fluoreszenz einer Lösung mit 40  $\mu\text{M}$  BrMeDAC) in Abhängigkeit der Konzentration von MeDAC 49 und BrMeDAC 50 in 100 mM BTA-Puffer (pH 6) bei bevorzugter Emission von BrMeDAC 50**

$\lambda_{ex}^{all} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}^{MeDAC} = 550 \text{ nm}$ . Die Werte wurden mit einem Polynom zweiten Grades unter Verwendung eines *least-square*-Fits beschrieben.  $R^2=0.96$

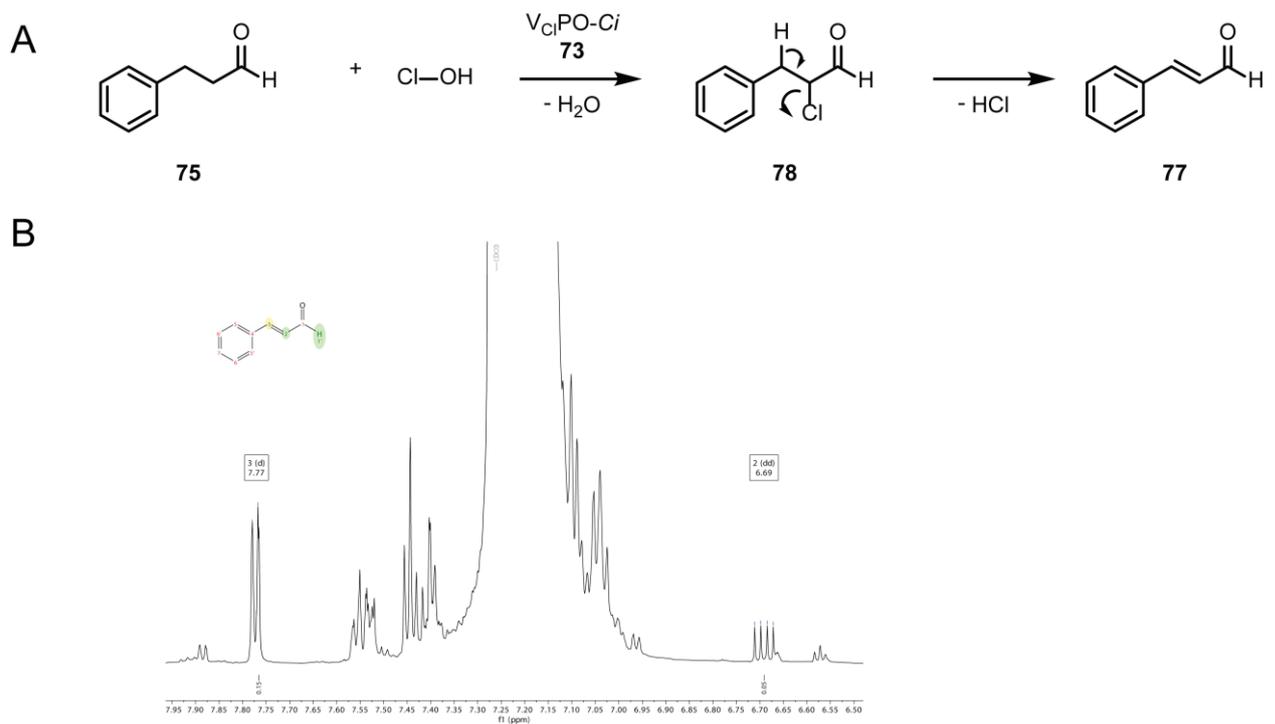
### 5.7.22 Nachweis von Chlorierung im MeDAC-Assay

Der Nachweis einer Chlorierung von MeDAC 49 konnte durch die Synthese chemischer Referenzen nicht überprüft werden, da die Isolation des Produkts aufgrund verschiedener Halogenierungsprodukte nicht erfolgreich war. Stattdessen wurde  $V_{Cl}PO-Ci$  in einem Ansatz mit Kaliumchlorid unter Assaybedingungen (siehe Kapitel 5.4.6) bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm und einer Emission von 450 nm für MeDAC 49 und 550 nm für ClMeDAC gemessen und die Aktivität analog zu BrMeDAC 50 bestimmt (siehe Abbildung 116).



**Abbildung 116: Beispielkurve der Aktivitätsmessung von  $V_{Cl}PO-Ci$  in Anwesenheit von  $KCl$  im MeDAC-Assay**

Die rot hervorgehobenen Werte zeigen den linearen Bereich der Kurve, dessen Steigung für die Berechnung der enzymatischen Aktivität verwendet wurde. Die Verringerung der Fluoreszenzintensität zu Beginn der Reaktion ist auf die geringe Löslichkeit von MeDAC **49** und halogenierter Derivate im wässrigen Medium zurückzuführen.  $\lambda_{ex}^{all} = 425 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}^{MeDAC} = 450 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em}^{ClMeDAC} = 550 \text{ nm}$

5.7.23 NMR-Spektrum der Umsetzung von Hydrozimaldehyd (75) mit  $V_{Cl}PO-Ci$ 

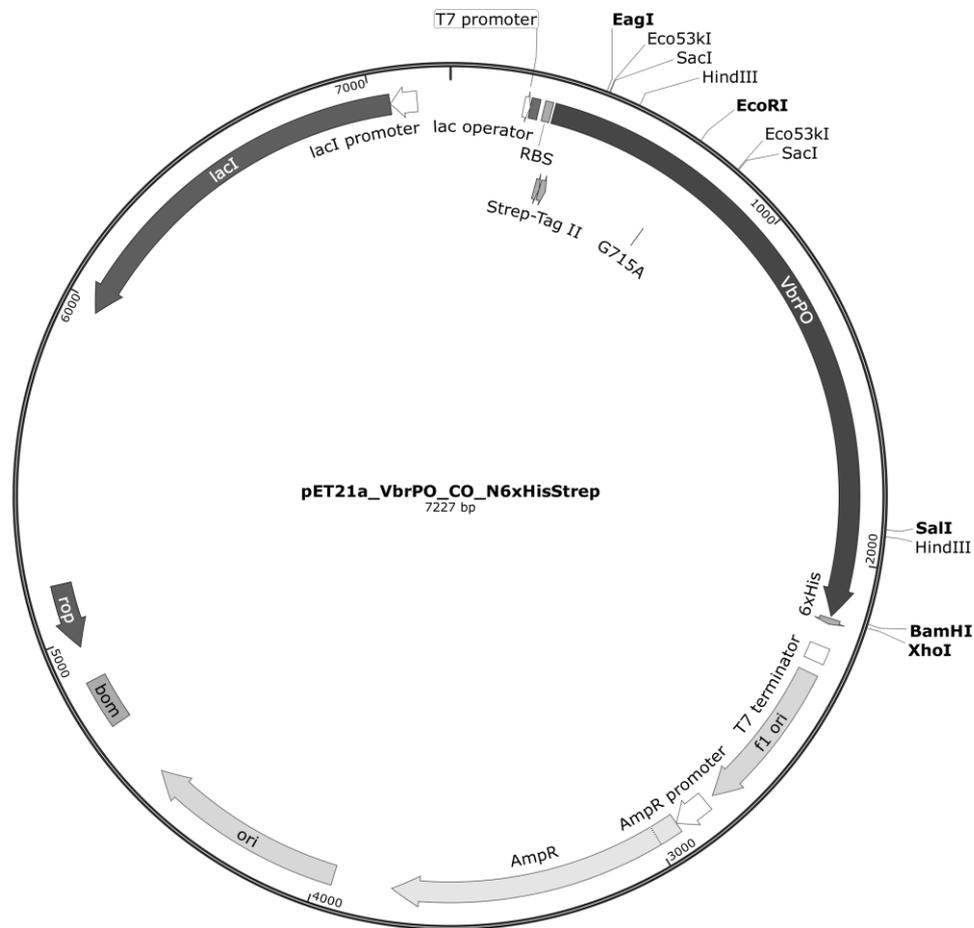
**Abbildung 117: Hypothese zur Bildung von Zimtaldehyd (77) (A) und  $^1H$ -NMR-Spektrum der Umsetzung von Hydrozimaldehyd (75) in Anwesenheit von  $V_{Cl}PO-Ci$  im kontinuierlichen Durchfluss (B)**

**A:** Vermittelt durch  $V_{Cl}PO-Ci$  wird hypochlorige Säure  $HOCl$  gebildet, die durch den Jørgensen-Hayashi-Katalysator (73) Hydrozimaldehyd (75) selektiv in  $\alpha$ -Position chlorieren kann. Der so gebildete Chlorhydrozimaldehyd 78 kann in der hier dargestellten Hypothese spontan Chlor eliminieren, wodurch sich eine ungesättigte Bindung zwischen C-2 und C-3-Atom bildet und Zimtaldehyd (77) entsteht.

**B:** Dargestellt ist ein Auszug aus dem  $^1H$ -Spektrum der Probe im Bereich von 6.5 – 7.95 ppm (siehe Kapitel 4.3.5). Die charakteristischen Signale für die Protonen an der Doppelbindung von Zimtaldehyd (77) (an C2 und C3) sind im Spektrum hervorgehoben (siehe Strukturformel im Spektrum). Da Zimtaldehyd (77) nur als Nebenprodukt entsteht, ist die Signalintensität dieser Protonen deutlich geringer als die der Protonen von Hydrozimaldehyd (75).

## 6 ANHANG

### 6.1 Vektorkarten



**Abbildung A 1: Vektorkarte von pET21a(+):V<sub>Br</sub>PO-Co**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

#### Nukleotidsequenz von *v<sub>br</sub>po-co*:

```

ATGCATCACCACCATCATCACTGGTCACATCCTCAGTT-
CGAGAAATCTGCGGCTAGCATGGG-
TATTCAGCTGACAACCTCCAAAGTCGCGCCAAGGCTTCATTCGATACGCGTGTATCT
GCGGCCGAGCTCGCACTCGCCCGCGGAGTTGTGCCATCGCTTGCAAATGGAGAG-
GAGCTT-
CTCTACCGCAACCCTGACCCTGAGAACGGAGATCCAAGCTTCATCGTTAGCTTCACAA
AGGGTCTTCCGCATGACGACAATGGCGCTATTATTGACCCCGACGACTTCTT-
GGCCTTCGTT-
CGTGCGATCAATAGTGGAGATGAGAAGGAGATCGCCGACCTCACATTGGGGCCAGC
TCGCGACCCGGACACTGGCTTACCAATCTGGCGCTCGGATTGGCGAATT-
CTCTCGAACTCGAAGTGCGAGGATGGGAAAACAGCTCTGCCGGTCTCACCTTCGACC

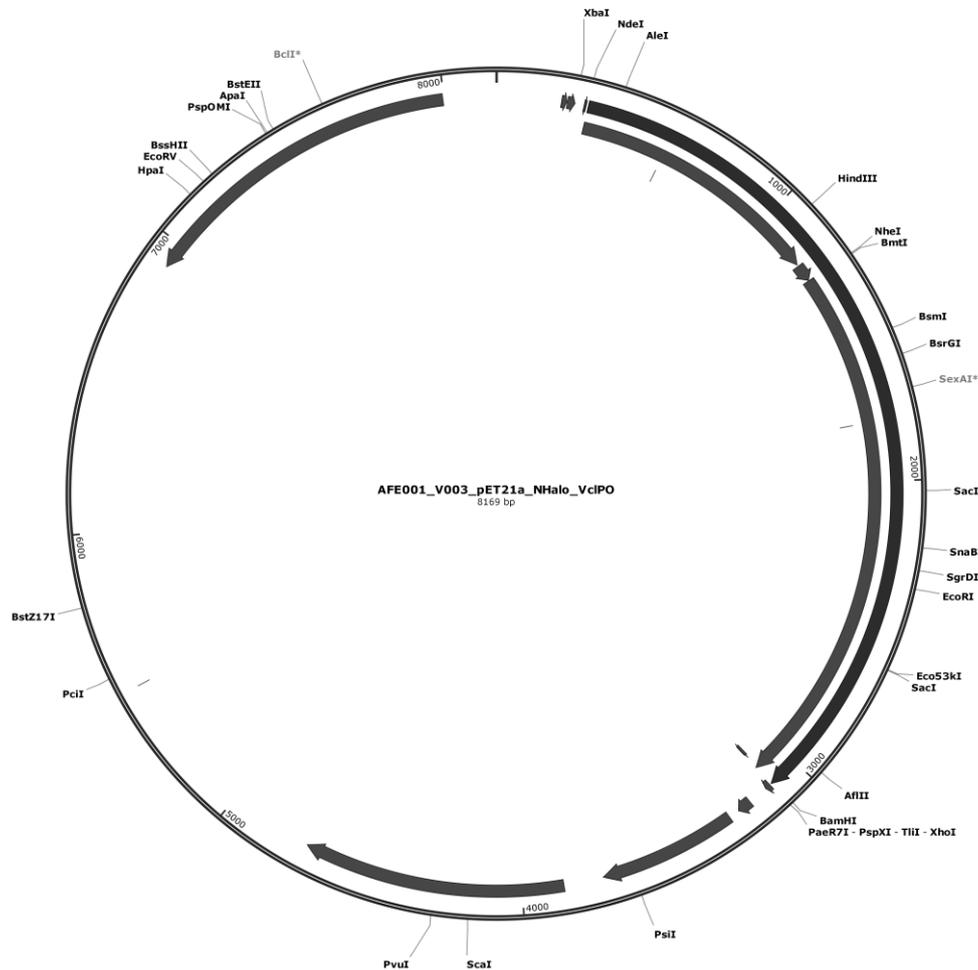
```

TGGAGGGCCCCGGACGCGCAGTCGATTGCCATGCCACCGGCGCCTGTGCTCA-  
 CGAGCCCT-  
 GAGCTCATCGCCGAGATAGCAGAACTGTACCTGATGGCGCTTGGACGCGAAATCGA  
 GTTATAGCGAGTTTGATTCCCCAAAGAACGCAGAGTATATTCAGTTTGCTATTGATCA-  
 GCTTAACGGGCTAGAGTGGTTCAACACGCCGGCAATGCTCGGAGATCCGCCTGCGG  
 AAATCCGTCGCCGTCGCGGTGAGGTGACTGTTCGAAACTTGTTCGCGGTATTCTT-  
 CCAGGCTCTGAGGTTCGGCCCGTATCTCAGCCAGTACATCATCGTTGGTAGCAAGCAG  
 ATTGGCTCCGCGACGGGTGGCAACAAAACCTCTCGTGAGCCCCAATGCCGCTGAT-  
 GAGTTT-  
 GATGGTGAAATCGCCTACGGAAGCATCACCAATTAGCCAGCGGGTGCGTATCGCCACG  
 CCTGGGCGCGACTTTATGACCGACTTGAAGGTATTCTTGACGTCCAGGACGCTGCG-  
 GACTT-  
 CCGAGGCTTTGAGTCGTATGAGCCGGGAGCACGCCTCATCCGGACGATCCGCGATCT  
 TGCGACGTGGGTGCACITTGACGCACTGTACGAGGCCCTACCTCAATGCGTGCCT-  
 GATT-  
 CTGTTGGCGAACC GCGTGCCGTTTCGATCCCAACATTCGTTCCAGCAGGAGGACAAG  
 CTCGATAACCAGGACGTGTTTGTGAACTTCGGAGACGCACACGTGCTGAGTCTGGT-  
 GACT-  
 GAGGTGGCTACGCGCGCGTTGAAGGCGGTACGGTACCAGAAGTTTAACATTCATCG  
 TCGCCTGCGGCCCTGAGGCTACCGGTGGTCTGATTAGCGTGAACAAAATCGCAGCG-  
 GAGAAGGGCGAGAGCGTTTCCCTGAGGTTGACCTTGCTGTTGAAGAGCTTGAAGA  
 TATCTGGAGAAAGCTGAAATTAGCAATAGGAAACAGAACATTTGCTGACGGA-  
 GATCCTGAC-  
 CCTGATCCTTCATTCCTGTTGCCGCAGGCATTCGCCGAGGGCAGCCCATTCCATCCGT  
 CCTACGGAAGCGGCCACGCTGTGGTTGCTGGCGCATGTGTGACGATCCTCA-  
 AGGCGTTCTT-  
 CGACTCCAACITCCAGATCGATCAGGTGTTTCGAGGTCGACAAAGATGAGGACAAGCT  
 TGTAAGTTCGTCTTTCAAGGGAACCTCTACTGTTGCCGGTGAGCT-  
 GAACAAGCTCGCCGACAATATTGCGATCGGGCGGAACATGGCAGGTGTTCACTACTT  
 CTCTGACCAGTTCGAGTCAATTCTGCTTGGTGAGCAGGTTGCGATTGGAATCTTG-  
 GAAGAGCAGAGTCTGACGTATGGCGAGAACTTCTTCTTCAACTTGCCGAAGTTTGAT  
 GGAACTACAATCCAGATCGGATCCTGA

**Aminosäuresequenz von V<sub>Br</sub>PO-Co:**

MHHHHHHWSHPQFEKSAASMGPADNLQSRKASFDTRVSAELALARGVVPSELANGE-  
 EL-  
 LYRNPDPENGDPSFIVSFTKGLPHDDNGAIIDPDDFLAFVRAINSGDEKEIADLTLGPAR  
 DPDTGLPIWRSDLANSLELEVRGWENSSAGLTFDLEGPDAQSIAMPPAPVLTSPELIAEIA-  
 ELYLMALGREIEFSEFDSPKNAEYIQAIDQLNGLEWFNTPAMLGDPPEIRRRRGEVTV  
 GNLFRGILPGSEVGPYLSQYIIVGSKQIGSATGGNKTLVSP-  
 NAADEFDGEIAYGSITISQRVRIATPGRDFMTDLKVFLDVQDAADFRGFESYEPGARLIRT  
 IRDLATWVHFDALYEAYLNAACLILLANRVPFDPNIPFQQEDKLDNQDVFNFGDAH-  
 VLSLV-  
 TEVATRALKAVRYQKFNHRRRLRPEATGGLISVNKIAAEKGESVFPEVDLAVEELEDILE

KAEISNRKQNIADGDPDPDPSPFLLPQAF AEGSPFHPSYGS GHAVVAGACVTIL-  
 KAFFDSNFQIDQVFEVDKDEDKLVKSSFKGTLTVAGELNKLADNIAIGRN MAGVHYFS  
 DQFESILLGEQVAIGILEEQSLTYGENFFFNLPKFDGTTIQIGS



**Abbildung A 2: Vektorkarte von pET21a(+):NHalo-V<sub>Cl</sub>PO-Ci**

Der Vektor wurde per Gibson-Assembly aus dem institutseigenen Vektor MWA001V442 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Martin Wäscher) assembliert. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

**Nukleotidsequenz von NHalo-*v<sub>Cl</sub>po-ci*:**

ATGGCAGAAATTGGTACGGGATTTCGGTTTGACCCGCATTATGTGGAGGTT-  
 CTGGGT-  
 GAACGCATGCACTACGTGGATGTTGGTCCGCGCGATGGCACACCGGTGCTGTTTCTG  
 CATGGTAATCCGACCTCCAGCTATGTTTGCGCAACATTATTCGCAT-  
 GTCGCCCCAACGCATCGCTGTATTGCCCCAGATCTCATTGGCATGGGCAAAGCGAC  
 AAACCGGATTTGGGCTACTTCTTCGACGATCACGTACGGTTTATGGACGCCTT-  
 TATCGAGGCTCTGGGACTGGAGGAAGTAGTGCTGGTTATTTCATGACTGGGGCTCTG  
 CATTAGGCTTTCACTGGGCTAAACGGAACCCAGAACGCGTCAAGGGGATTGCCCTCA-  
 TG-  
 GAGTTCATCCGTCCGATTCCGACCTGGGATGAATGGCCCGAATTGCCCCGTGAAACC

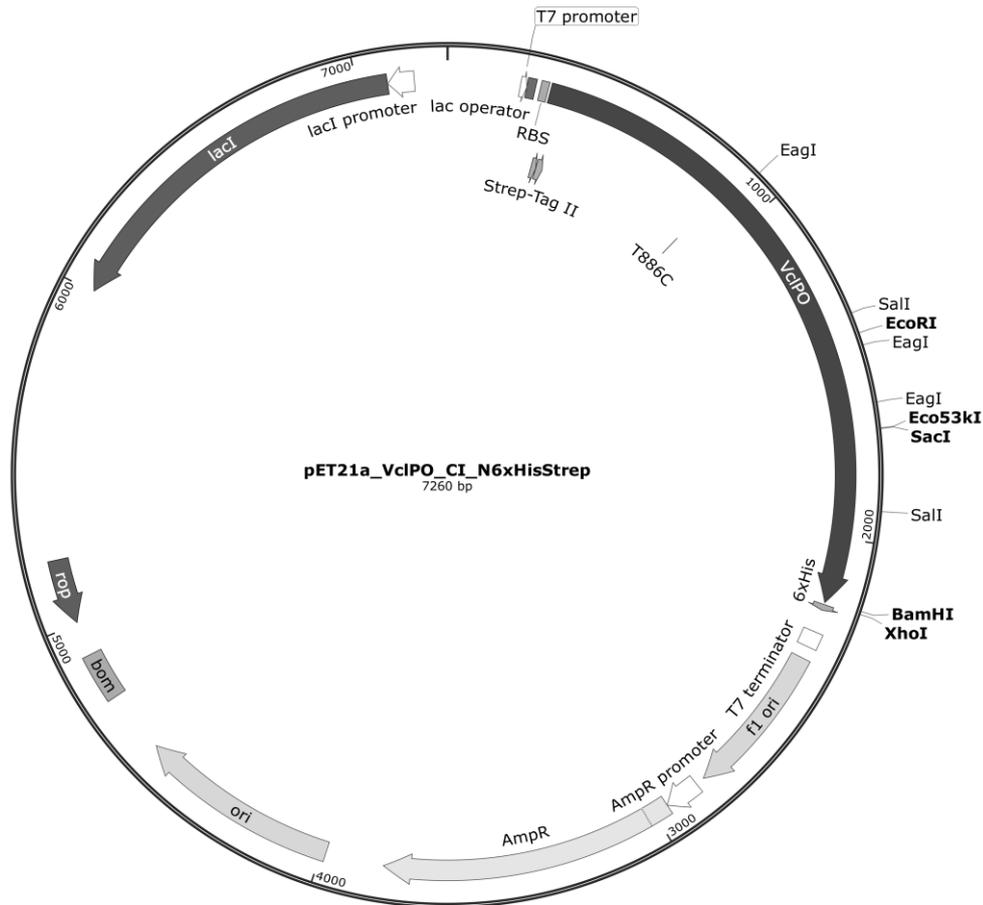
TTTCAGGCGTTTCGTACCACGGATGTTGGCCGTAAGCTCATCATCGACCA-  
 AACGTGTTCA-  
 TTGAGGGCACTCTTCCCATGGGAGTAGTGCGTCTTTAACCGAAGTCGAGATGGACC  
 ACTATCGCGAACCCCTTCCCTGAATCCGGTTGATCGCGAACCGCTGTGGCGCTT-  
 CCCGAAT-  
 GAGCTGCCTATTGCTGGTGAACCGGCCGAATATCGTGGCACTTGTGGAAGAATACATG  
 GATTGGCTGCATCAGAGTCCAGTCCCTAAGCTGTTGTTTGGGGTACAC-  
 CTGGCGTGTT-  
 GATCCGCCTGCAGAAGCTGCTCGCTTAGCGAAAAGCTTGCCCAACTGCAAAGCGGT  
 CGATATTGGGCCAGGTCTGAACCTGTTACAGGAGGATAACCCGGATCTGATCGG-  
 GAGT-  
 GAAATCGCGCGTTGGCTGTCAACTCTGGAAATCTCGGGTCTTGCAGAAGCAGCGGCC  
 AAAGAAGCTGCGGCCAAAGAGGCAGCCGCGAAAGAAGCAGCGGCGAAAAT-  
 GGCTAGCAT-  
 GGGGTCCGTTACACCCATCCCCTCCCTAAGATCGATGAACCCGAAGAGTACAACACC  
 AACTACATACTATTCTGGAACCATGTCGGTTTGGAACTCAACCGCGTAACTCA-  
 CACTGTTG-  
 GAGGCCCCCTGACGGGACCACCTCTCTGCCAGGGCTCTGGGTATGCTGCACTTGG  
 CTATTCACGACGCCCTACTTTTCTATCTGCCCTCCGACCGACTTCACCACCTTCCCTCTCA-  
 CCT-  
 GATACTGAGAATGCCGCGTACCGTCTACCTAGCCCTAATGGTGCAAATGATGCTCGC  
 CAAGCAGTCGCTGGAGCTGCCCTCAAGATGCTGTCTTCACTGTACAT-  
 GAAGCCCGTCGAGCAGCCTAACCCTAACCCCGGCGCCAACATCTCCGACAACGCTTAT  
 GCTCAGCTTGGCTTGGTCTCGACCGATCAGTCTGAGGACCTGGTGGCGTG-  
 GAC-  
 CGAGAGTCAGCCAGTTTCATGTTTGGTGAGGATGTAGCCGATGTCTTCTTCGCACTC  
 CTCAACGATCCCCGAGGTGCTTCGCAGGAGGGCTACCACCCTACAC-  
 CCGGCCGCTATAAATT-  
 TGACGATGAACCTACTCACCCCTGTCGTCTCATTCCAGTAGACCCCAACAACCCTAATG  
 GTCCCAAGATGCCTTTCCGTCAGTACCACGCCCCATTCTACGGCAAGACCA-  
 CGAAGCGTTT-  
 GCTACGCAGAGCGAGCACTTCCCTGGCCGACCCACCGGGCCTGCGTTCTAATGCGGAC  
 GAGACCGCGGAGTATGACGACGCCGTCCGCGTCGCTATCGCCATGGGTGGTGCTCA-  
 GGCTCT-  
 CAACTCCACCAAGCGTAGCCCATGGCAGACAGCACAGGGCCTATACTGGGCCTACGA  
 TGGGTCAAACCTCATTTGGCACACCACCTCGCTTTTACAACCAGATCG-  
 TACGTTCGCATCGCAGTTACGTACAAGAAGGAAGAGGACCTTGCCAACAGCGAAGTCA  
 ACAATGCGGATTCGCCCGCCCTTCGCCCTCGTCGACGTCGCTT-  
 GCACAGACGCTGG-  
 TATCTTTTCCCTGGAAGGAGAAAATGGGAGTTCGAATTCGGCGCCCACTATCTGGTGT  
 GCGAGACGACGGCCGTCCAGACCATGGAGATCCTTCTGGCTCA-  
 CTCTCGGTGCCCCAGCTACTAACACCAACGACATTCATTTCAAGCCTCCTTCCCAGCT  
 TACCCATCTGGTCACGCGACCTTTGGCGGTGCTGTGTTCCAAAT-  
 GGTGCGTCGATACTACAACGGCCGCGTAGGTACATGGAAGGACGACGAACCCGACA  
 ACATTTGCCATCGATATGATGATCTCGGAGGAGCTCAACGGCGTGAACCGCGAC-  
 CTACGCCAGCCTTATGACCCACGGCCCCAATCGAAGACCAACCCGGTATCGTGCGCA

## Anhang

CCCGCATTGTTTCGCCACTTCGACTCGGCCTGGGAACTCATGTTTCGAAAACGCCATTT-  
CGCGCATCTTCCCTCGGTGTCCACTGGCGTTCGATGCCGCCGCCGCCGCGACATTCT  
CATTCCCACGACGACAAAAGGACGTCTACGCTGTCGACAACAATGGCGCCACCGTGTT-  
CCAGAACGTAGAGGACATTAGGTACACAACCAGGGGTACGCGTGAGGACCCCGAGG  
GCCTCTTCCCTATCGGTGGTGTGCCACTGGGTATCGAGATTGCGGATGAGATTTT-  
TAATAAT-  
GGACTTAAGCCTACGCCCCCGGAGATCCAGCCTATGCCGCAGGAGACACCGGTGCAG  
AAGCCGGTGGGACAGCAGCCGGTTAAGGGCATGTGGGAG-  
GAAGAGCAGGCGCCGGTAGTCAAGGAGGCGCCGGGATCCTGA

### **Aminosäuresequenz von NHalo-V<sub>ci</sub>PO-Ci:**

MAEIGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPDRDGTPLVFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPT-  
HR-  
CIAPDLIGMGKSDKPDLYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKR  
NPERVKGIAFMFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRT-  
TDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGE  
PANIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAAARLAKSLPNCKAVDIG-  
PGLNLLQEDNPDIGSEIARWLSTLEISGLAEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKMASMGSVTP  
IPLPKIDEPEEYNTNYILFWNHVGLLELNRVTHTVGGPLTGPPLSARALGMLHLAIHDAYF-  
SICPPTDFTTFLSPDTENAAYRLPSPNGANDARQAVAGAALKMLSSLYMKPVEQPNPNPG  
ANISDNAYAQLGLVLD RSVLEAPGGVDRESASF MFGEDVADVFFALLNDPR-  
GASQEGYHPTP-  
GRYKFDDEPTHPVVLIPVDPNNPNP GPKMPFRQYHAPFYGKTTKRFATQSEHFLADPPGL  
RSNADETA EYDDAVRVAIAMGGAQALNSTKRSPWQTAQGLYWAYDGSN-  
LIGTPPRFYNQIV-  
RRIA VTYKKEEDLANSEVNNAD FARLFALVDVACTDAGIFSWKEKWEFEFWRPLSGVRD  
DGRPDHGD PFWLTLGAPATNTNDIPFKPPFPAYPSGHATFGGAVFQMVR-  
RYYNGRVTWKD-  
DEPDNIAIDMMISEELNGVNRDLRQPYDPTAPIEDQPGIVRTRIVRHFDSAWELMFENAI  
S RIFLGVHWRFDAAAARDILIPTTKDVYAVDNNGATVFQNVEDIRYTTRGTREDPEGLF-  
PIGGVPLGIEIADEIFNNGLKPTPEIQMPQETPVQKPVGQQPVKGMWEEEQAPVVKE  
APGS



**Abbildung A 3: Vektorkarte von pET21a(+):V<sub>ci</sub>PO-Ci**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

#### Nukleotidsequenz von *v<sub>ci</sub>po-ci*:

```

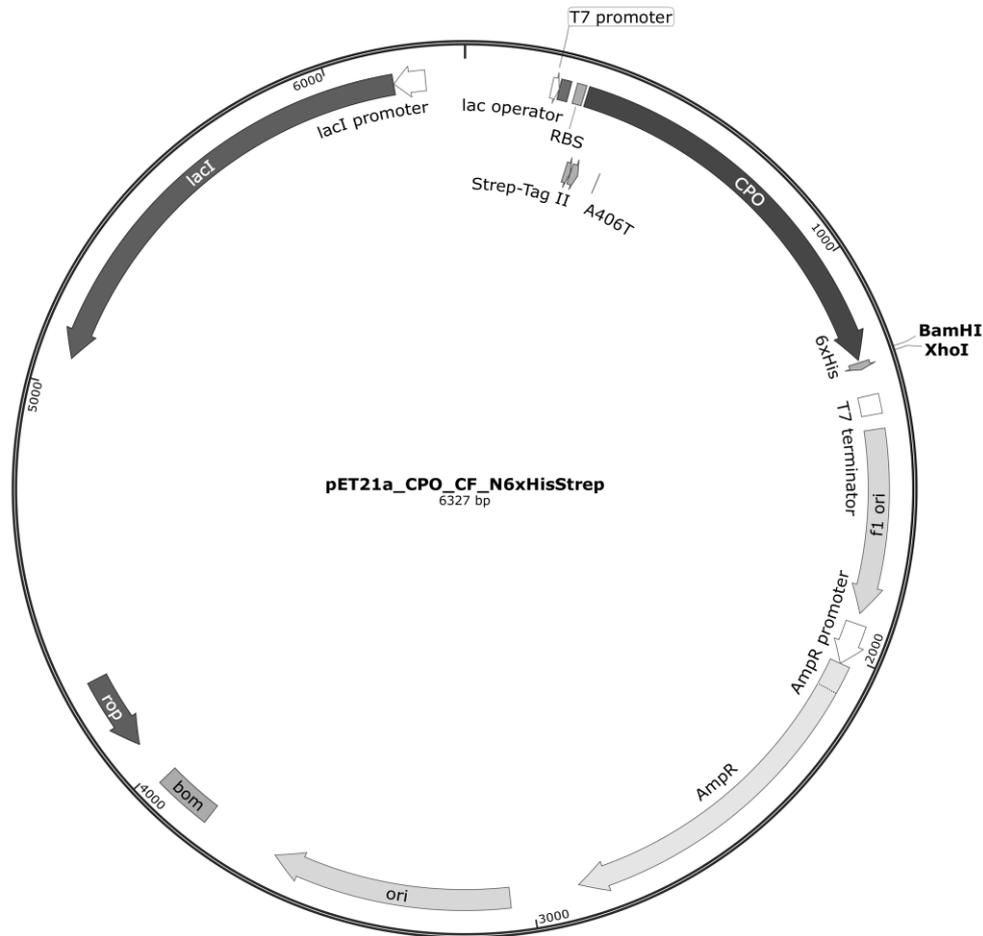
ATGCATCACCACCATCATCACTGGTCACATCCTCAGTT-
CGAGAAATCTGCGGCTAGCAT-
GGGGTCCGTTACACCCATCCCACCTCCCTAAGATCGATGAACCCGAAGAGTACAACACC
AACTACATACTATTCTGGAACCATGTCGGTTTGGAACTCAACCGCGTAACTCA-
CACTGTTG-
GAGGCCCCCTGACGGGACCACCTCTCTCTGCCAGGGCTCTGGGTATGCTGCACTTGG
CTATTCACGACGCTACTTTTCTATCTGCCCTCCGACCGACTTCACCACCTTCTCTCA-
CCT-
GATACTGAGAATGCCGCGTACCGTCTACCTAGCCCTAATGGTGCAAATGATGCTCGC
CAAGCAGTCGCTGGAGCTGCCCTCAAGATGCTGTCTTCACTGTACAT-
GAAGCCCGTCGAGCAGCCTAACCCTAACCCCGGCGCCAACATCTCCGACAACGCTTAT
GCTCAGCTTGGCTTGGTTCTCGACCGATCAGTTCTGGAGGCACCTGGTGGCGTG-
GAC-
CGAGAGTCAGCCAGTTTTCATGTTTGGTGAGGATGTAGCCGATGTCTTCTTCGCACTC
CTCAACGATCCCCGAGGTGCTTCGCAGGAGGGCTACCACCCTACAC-
CCGGCCGCTATAAATT-
TGACGATGAACCTACTCACCCGTGTCGTCCTCATTCAGTAGACCCCAACAACCCTAATG

```

GTCCCAAGATGCCTTTCCGTCAGTACCACGCCCATTTCTACGGCAAGACCA-  
CGAAGCGTTTT-  
GCTACGCAGAGCGAGCACTTCCTGGCCGACCCACCGGGCCTGCGTTCTAATGCGGAC  
GAGACCGCGGAGTATGACGACGCCGTCCGCGTCGCTATCGCCATGGGTGGTGCTCA-  
GGCTCT-  
CAACTCCACCAAGCGTAGCCCATGGCAGACAGCACAGGGCCTATACTGGGCCTACGA  
TGGGTCAAACCTCATTGGCACACCACCTCGCTTTTACAACCAGATCG-  
TACGTGCGATCGCAGTTACGTACAAGAAGGAAGAGGACCTTGCCAACAGCGAAGTCA  
ACAATGCGGATTTCCGCCCGCCTCTTCGCCCTCGTCGACGTCGCTT-  
GCACAGACGCTGG-  
TATCTTTTCCCTGGAAGGAGAAATGGGAGTTCGAATTTCTGGCGCCCACTATCTGGTGT  
GCGAGACGACGGCCGTCCAGACCATGGAGATCCITTTCTGGCTCA-  
CTCTCGGTGCCCCAGCTACTAACACCAACGACATTCATTCAGCCTCCTTTCCCAGCT  
TACCCATCTGGTCACGCGACCTTTGGCGGTGCTGTGTTCCAAAT-  
GGTGCCTCGATACTACAACGGCCGCGTAGGTACATGGAAGGACGACGAACCCGACA  
ACATTGCCATCGATATGATGATCTCGGAGGAGCTCAACGGCGTGAACCGCGAC-  
CTACGCCAGCCTTATGACCCACGGCCCAATCGAAGACCAACCCGGTATCGTGCGCA  
CCCGCATTGTTCCGCACTTCGACTCGGCCTGGGAATCATGTTTCGAAAACGCCATTT-  
CGCGCATCTTCCCTCGGTGTCCACTGGCGTTTCGATGCCGCCGCCGCCCGCGACATTCT  
CATTTCCACGACGACAAAGGACGTCTACGCTGTCGACAACAATGGCGCCACCGTGT-  
CCAGAACGTAGAGGACATTAGGTACACAACCAGGGGTACGCGTGAGGACCCCGAGG  
GCCTCTTCCCTATCGGTGGTGTGCCACTGGGTATCGAGATTGCGGATGAGATTTT-  
TAATAAT-  
GGACTTAAGCCTACGCCCCGGAGATCCAGCCTATGCCGCAGGAGACACCGGTGCAG  
AAGCCGGTGGGACAGCAGCCGGTTAAGGGCATGTGGGAG-  
GAAGAGCAGGCGCCGGTAGTCAAGGAGGCGCCGGGATCCTGA

**Aminosäuresequenz von V<sub>cl</sub>PO-C<sub>i</sub>**

MHHHHHHWHPQFEKSAASMGSVTPIPLPKIDEPEEYNTNYILFWNHVGLLELNRVTHT-  
VGG-  
PLTGPPLSARALGMLHLAIHDAYFSICPPTDFTTFLSPDTENAAAYRLPSPNGANDARQAVA  
GAALKMLSSLYMKPVEQPNPNPGANISDNAYAQLGLVLDERSVLEAPGGVDRESAS-  
FMFGEDVADVFFALLNDPRGASQEGYHPTPGRYKFDDEPTHPVVLIPVDPNNPNGPKM  
PFRQYHAPFYGKTTKRFATQSEHFLADPPGLRSNADETAEYDDAVRVAIAMG-  
GAQALNST-  
KRSPWQTAQGLYWAYDGSNLIGTPPRFYNQIVRRIAVTYKKEEDLANSEVNNADFARLF  
ALVDVACTDAGIFSWKEKWEFEFWRPLSGVRDDGRPDHGDPFWLTLGAPATNTNDIPF-  
KPPF-  
PAYPSGHATFGGAVFQMVERRYYNGRVGTWKDDEPDNIAIDMMISEELNGVNRDLRQPY  
DPTAPIEDQPGIVRTRIVRHFDSAWELMFENAI SRIFLGVHWRFDAAAARDILIPTTT-  
KDVYAVDNNGATVFQNVEDIRYTTRGTREDPEGLFPIGGVPLGIEIADEIFNGLKPTPP  
EIQPMPQETPVQKPVGQQPVKGMWEEEQAPVVKEAPGS



**Abbildung A 4: Vektorkarte von pET21a(+):CPO-Cf**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

#### Nukleotidsequenz von *cpo-cf*

```

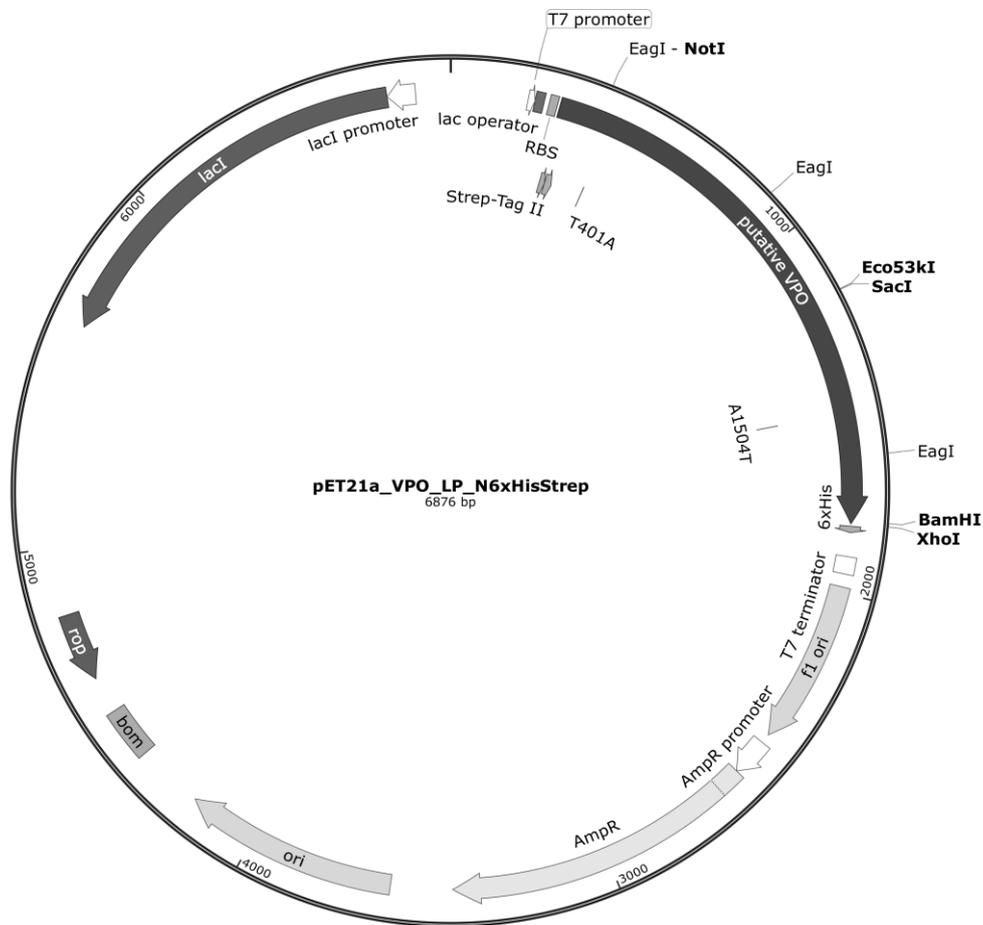
ATGCATCACCACCATCATCACTGGTCACATCCTCAGTT-
CGAGAAATCTGCGGCTAGCGAGCCTGGCTCCGGCATTGGCTACCCATACGACAACAA
CACCTTGCCTTATGTTCGCCCCAGGTCCTACCGACTCTCGTGCTCCTTGCCCAGCTCT-
GAACGCTCTTGCCAACCACGGTTACATTCCTCACGATGGCCGTGCCATCAGCAGGGA
GACCCTCCAGAACGCTTTCCTCAACCACATGGGTATTGCCAACTCCGTCATTGAGCTT-
GCTCTGACCAACGCCTTCGTCGTCTGCGAGTACGTTACTGGCTCCGACTGTGGTGAC
AGCCTTGTCAACCTGACTCTGCTCGCCGAGCCCCACGCTTTCGAGCAGACCA-
CTCCTT-
CTCCCGCAAGGATTACAAGCAGGGTGTGCGCCAACTCCAACGACTTCATCGACAACAG
GAACTTCGATGCCGAGACCTTCCAGACCTCTCTGGATGTTCGTTGCAGGCAAGAC-
CCACTT-
CGACTATGCCGACATGAACGAGATCCGCCTTCAGCGCGAGTCCCTCTCCAACGAGCTT
GACTTCCCCGGTTGGTTCACCGAGTCCAAGCCAATCCAGAACGTCGAGTCTGGCTT-
CATCTT-
CGCCCTTGTCTCTGACTTCAACCTGCCCCGACAACGATGAGAACCCTCTGGTTCGCATT
GACTGGTGGAAGTACTGGTTCACCAACGAGTCCTTCCCATAACCACCTCGGCTGGCAC-
CCCCGTCTCCAGCCAGGGAGATCGAGTTCGTCACCTCCGCCTCCTCCGCTGTCTCTGG

```

CTGCCTCTGTCACCTCTACTCCATCTTCCCTT-  
 CCATCCGGTGCCATCGGCCAGGTGCCGAGGCTGCCCTCTCTCCTTTCGCCTCCACCA  
 TGACCCCATTCCTCCTCGCCACCAATGCTCCTTACTACGCCCAGGAC-  
 CCAACTCTCGGTCCTAATGACGGATCCTGA

**Aminosäuresequenz von CPO-Cf**

MHHHHHHWHPQFEKSAASEPGSGIGYPYDNNLTPYVAPGPTDSRAPCPALNALAN-  
 HGYIPHDGRAISRETLQNAFLNHMGIANSVIELALTNAFVVCEYVTGSDCGDSLVLNLTLL  
 AEPHAFEHDHSFSRKDYKQGVANSNDFIDNRNFD AETFQTSLDVVAGKTHFDYAD-  
 MNEIRLQRESLSNELDFPGWFTESKPIQNVESGFIFALVSDFNLPDNDENPLVRIDWWKY  
 WFTNESFPYHLGWHPSPAREIEFVTSASSAVLAASVTSTPSSLPSGAIGPGA EAVPLS-  
 FASTMTPFLLATNAPYYAQDPTLGPNDGS



**Abbildung A 5: Vektorkarte von pET21a(+):VPO-Lp**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

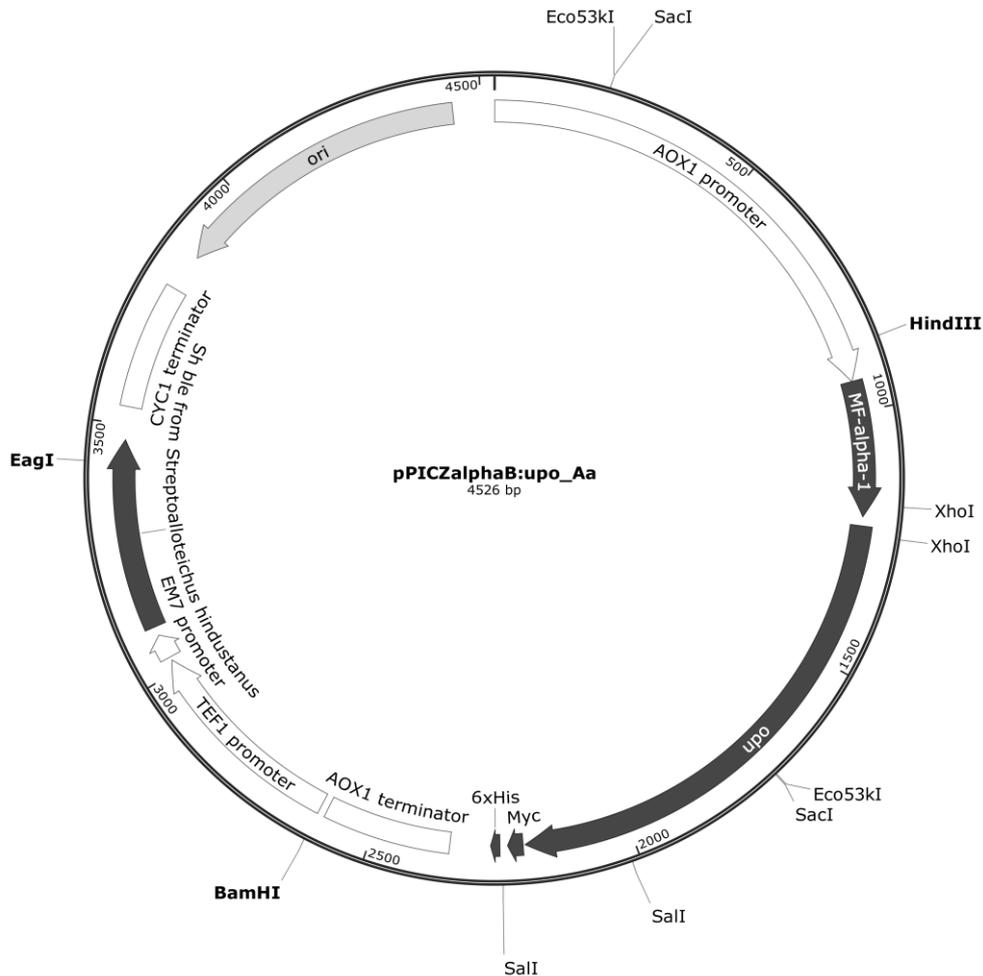
**Nukleotidsequenz von vpo-lp:**

ATGCATCACCACCATCATCACTGGTCACATCCTCAGTT-  
 CGAGAAATCTGCGGCTAGCTGTCGTGTAATCCCAGGATCGCATTCTGTACGGCAGC  
 GCTCGTGCTCATGCCCCGCGCGGCCGAGGCTCAGGCTCCCCCGTTCGACTTCTCA-  
 AGCGGCAACATCGGCATCGAGGTGATCATCCCCGCCGTGATTCCGGCGTTGTTCCAG

ACGACGTCACCCAACGACGCGCCGATCATCCTGCGTCACACCACGCTCATCACCAAT-  
 GCGTGGTTTCGACGCGATCGCCCCCTACCATCCCACCGCGAAGGGCGTCTACACGCGG  
 CTGGAGAATCGCCCGCCTGCCGAGGCCACCACCAGGAACAAGAACATCGCGAT-  
 GGCG-  
 TACGCGACATAACCGCCTGCTCAACCGTCTCATGCCGCGGTTTCGCGGGCGGACTGGCGG  
 CAGATGCTCGTGTTCGGTTCGGCCTCGATCCAGACGATGCGAGCGTTGATGTGAG-  
 GACGCCGATCGGCATCGGGAACGTCGCCGGCAGCGCCGTGGCCGTGGCGCGCGAG  
 CGTGACGGCATGAACCAGCTCGGT-  
 GACGAGGGCGGGCGCGTCTACGATCTGCGGGCCGTAT-  
 GCCGACTACACCGGCTACATGCCGGTCAACACGCCGTGGAAGCTGTGGAATCCTTCG  
 CGATGGCAGCCGCTCTTCACGACACCGGGCAACGGGACGTTTCTGGGTTCAGCAGTT-  
 CGCCACGCCGAATGGGGCGCGACCACGCCGTACTCCTACGGCAATCCGGCAGCGTT  
 CGGCACTCCCCCGCCATCGACAGCAACCATCACCGGCGACAGGCCTAT-  
 GAGGCACAAGCCGACGAGGTCATGGACGCGCAGGCGACTCTCACCGATTACCAGAA  
 GATGGTTCGCGGAGCTCTTCGACAACAAGATCACGGGCCCTCGGTTT-  
 CGCGGCGCTCTTCA-  
 TCGCGCAGTCCCGCAACATGTCACTCGACGAGTTCGTGCACTACGACTTCCTCACGAA  
 CGTCGCCGCCTTCGACGGCGGGATCACTACGTGGAGGGACAAGTACCTG-  
 TACGACGCCGTGCGGCCCGTACCGCCATTCGCTACCTGAATCGCGGACGGACGATC  
 ACCGGATGGGCGGGCCCTGGACGCGGCATCGTCAACGACCTT-  
 CCCGCCAACGAGTGGCGTT-  
 CGTACCTGAACACCGCGAACCACCCGGAGTATCCCTCGGGTTTCTCGTGCTTCTGCGC  
 AGCGCACGCCAGGCGAGCCGGCGCTATCTCGGCTCCGATCAGTTTGGTTGGTCA-  
 GTCCCGAAGCCCGCCGGATCGTCGGTGATCGAGCCTGGCGTACGCCGGCCGCCGA  
 CGTCGTGCTGGGGCCGTGGCAGACCTTCACCGAGTTCGAGGAGGAATGCGGTAT-  
 GAGTCGCCTCTGGGGCGGCGTGCATTTACAGCCCCGCGATCGAGGAGGCGCGGAACT  
 CGTGTCGGCAGGTGGGCGACAAGGCGTTCGAGTTCCTGCAGCG-  
 GAAGCTGGCCCGCCAGGGATCCTGA

**Aminosäuresequenz von VPO-Lp:**

MHHHHHHWHPQFEKSAASCRVIPRIAFCTAALVLMPPARPQAQAPPFDSSGNIGIEVII-  
 PA-  
 VIPALFQT'TSPNDAPILRHT'TLIT'NAWFDALAPYHPTAKGVYTRLENRPPAEAT'TRNKNIA  
 MAYATYRLNRLMPRFAADWRQMLVSVGLDPDDASVDVRTPIGIGNVAGSAVAVARER-  
 D-  
 GMNQLGDEGGRVYDLRPYADYTGYMPVNT'PWKLSNPSRWQPLFT'TPGNGTFLGQQFA  
 TPQWGAT'TPYSYGNPAAF'GTPPPIDSNHRRQAYEAQADEVMDAQATLTDYQKMVA-  
 ELFDN-  
 KITGLGFAALFIAQSRNMSLDEFVHYDFLT'NVAAFDGGIT'TWRDKYLYDAVRPVT'AI RYL  
 NRGRTT'TGWAGPGRGIVNDLPANEWRSYLN'TANHPEYPSGSSCFCAAHAQASRRYLGS-  
 DQFGWSVPKPAGSSVIEPGVTPAADVVLGPWQ'TFTEFEEECGMSRLWGGVHFRPAIEEA  
 RNSCRQVGDKAFFELQRKLAGQGS



**Abbildung A 6: Vektorkarte von pPICZ $\alpha$ B::UPO-Aa**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

**Nukleotidsequenz von upo-aa:**

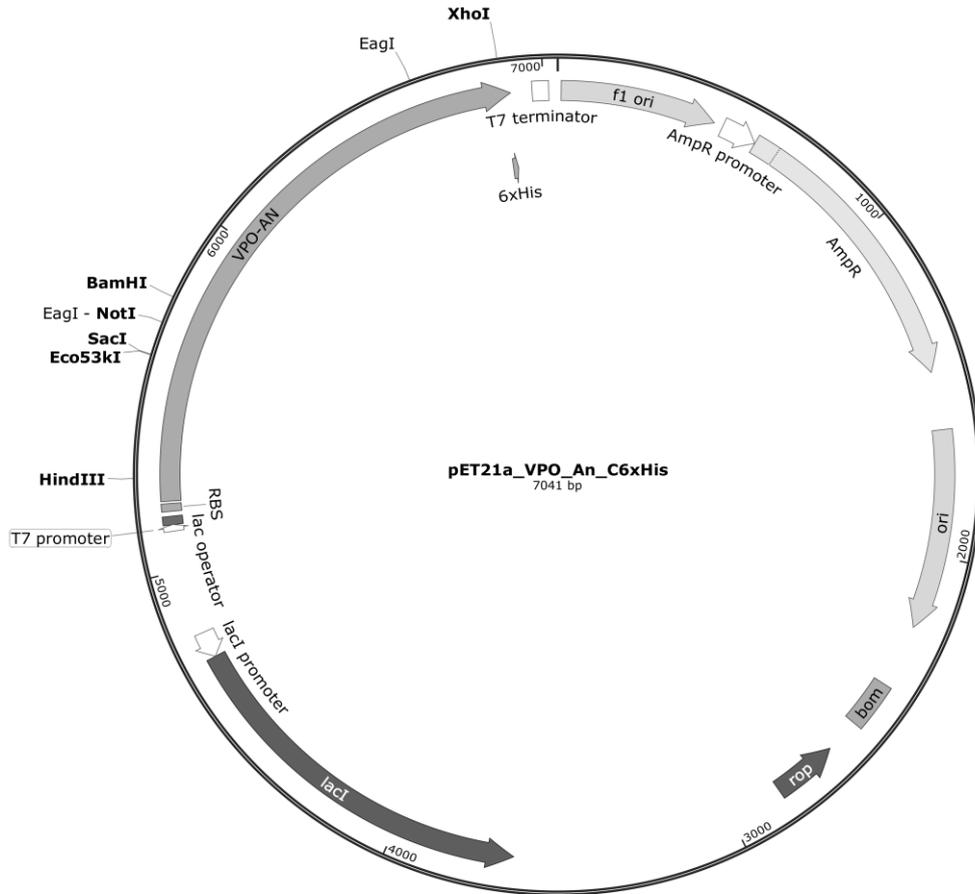
```

ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCAT-
TAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAG
CTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTGGCCATTTT-
CCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGC
TAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGCAGGTCATAT-
GGCTAGCT-
TACCTCCTGGTCTCTCGAGAATAGCTCTGCAAAGTTGGTGAACGACGAGGCTCACC
CATGGAAGCCGCTTCGACCTGGCGATATTTCGTGGACCTTGCCCTGGTCTCA-
ATACTCTGGCATCTCACGGGTACCTCCCGAGAAATGGCGTTGCAACCCCGGTGCAAA
TAATAAACGCGGTTTCAGGAAGGACTCAATTTTCGACAATCAAGCCGCAGTCTT-
CGCCACATAT-
GCGGCCACCTTGTGGACGGCAATCTCATTACGGACTTGCTGAGCATCGGACGCAAG
ACGCGGCTCACTGGGCCTGATCCACCACCCCGCTTCCGTTGGTGGACTCAAT-
GAGCAT-
GGCACCTTCGAAGGCGACGCCAGTATGACCCGAGGTGACGCATTCTTTGGCAACAAC
    
```

CACGATTTCAATGAGACGCTCTTCGAACAGTTGGTTGACTACAGCAACCGATTTG-  
GAGGAG-  
GAAAATACAATCTTACCGTCGCGGGGGAGCTCCGTTTCAAGCGCATTCAAGACTCCA  
TTGCGACCAACCCCAATTTCTCCTTTGTGACTTTAGGTTCTTTACTGCTTA-  
CGGCGAGAC-  
CACCTTCCCCGCGAATCTTTTTGTGGATGGGCGCAGGGACGACGGCCAGCTAGATAT  
GGATGCTGCACGGAGTTTTTCCAATTCAGCCGTATGCCTGACGATTTCTT-  
CCGCGCAC-  
CCAGCCCGAGAAGTGGCACAGGAGTCGAGGTAGTTATACAGGCTCATCCTATGCAGC  
CCGGAAGAAATGTCGGCAAGATCAACAGCTACACCGTCGACCCAACATCCTCT-  
GACTTTT-  
CCACCCCTGCTTGATGTACGAGAAATTCGTCAACATAACGGTCAAGTCACTCTACCC  
GAATCCGACGGTGCAGCTTCGCAAAGCCCTTAATACGAATCTCGATTTCTTCTT-  
CCAGG-  
GAGTCGCCGCTGGATGTACCCAGGTCTTCCCATACGGGCGAGATTGATCTAGAACAA  
AAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCA-  
TTGA

**Aminosäuresequenz von upo-aa:**

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNN-  
GLLFINTTIASIAAKEEGVSLEKREAEAAGHMASLPPGPLENSSAKLVNDEAHPWKPLRP  
GDIRGPCPGLNFLASHGYLPRNGVATPVQIINAVQEGLNFDNQA AVFATYAAHLVDGN-  
LIT-  
DLSIGRKTRLTGPDPPPPASVGGLNEHGTFEGDASMTRGD AFFGNNHDFNETLFEQLV  
DYSNRFGGGKYNLTVAGELRFKRIQDSIATNP NFSFVDFRFFTAYGETTFPANLFVD-  
GRRDDGQLDMAARSFFQFSRMPD DFFRAPS PRSGTGVEVVIQAHPMQPGRNVGKINSY  
TVDPTSSDFSTPCLMYEKFNITVKS LYPNPTVQLRKALNTNLD-  
FFFQGVAAAGCTQVFPYGRD



**Abbildung A 7: Vektorkarte von pET21a(+):VPO-An**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

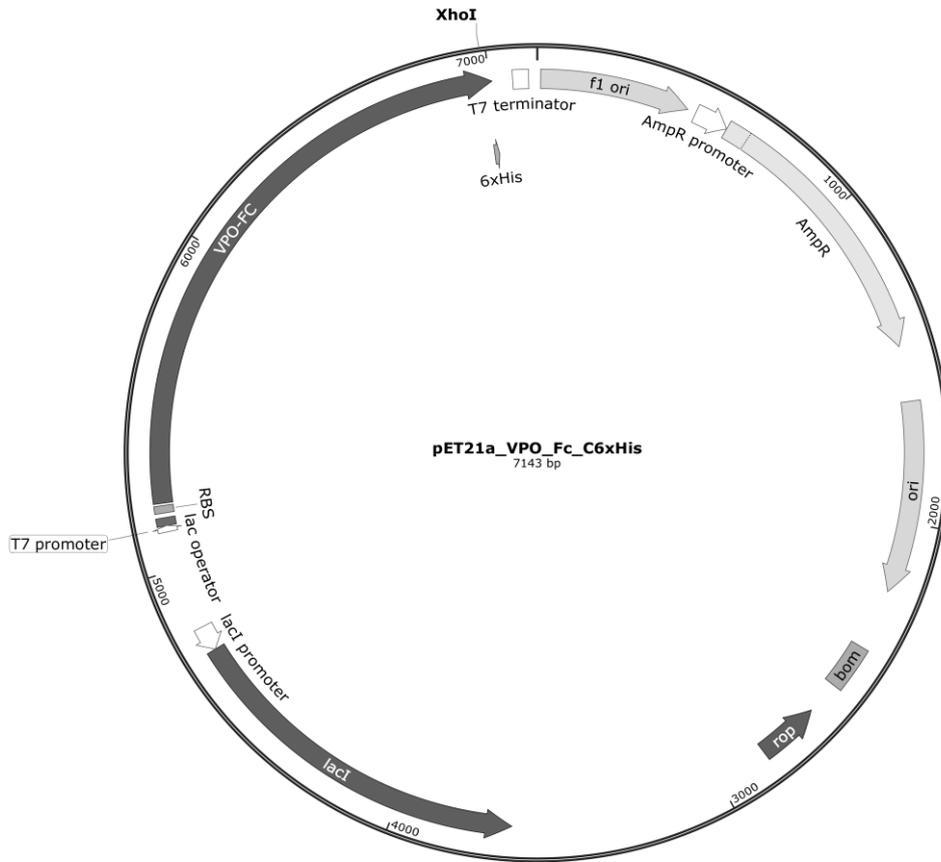
**Nukleotidsequenz von *vpo-an*:**

ATGCAAACATGTAGTACTTCAGATGACGCTGATGACCCGACAC-  
 CGCCCAACGAGCGCGACGACGAAGCTTTCGCCAGCCGTGTTCAGCGGCCAAAAGA  
 GAATTGGAGGGCACCAGTACCGTTTGTTCAGATTAACAACGGTGAAACCGATTT-  
 GGCAGCGAAGTTTCATAAATCCTTACCGCACGATGACTTGGGTTCAGGTTCAGTGCAGA  
 CGCTTTCGCGGCTTTGGGAAGATTGCATTTCTGAATGGT-  
 GATCTGTTCGATCTGCGAAGACGTGCCGGTTGGTAATTCTGAAGGTGATCCGGTTGG  
 CCGCTGGTTAACCCGACCGCTGCGTTCGCGATCGATATTTCCGGTCCGGCATTCAC-  
 GCGCGACCACCATTCGCCAGTGCCGACGCTGCCGAGCCCAGAGCTCGCCGCGCAAC  
 TGGCGGAGGTTTACTGGATGGCACTGGCGCGTGATGTACCATTTATGCAGTAT-  
 GGCAT-  
 GACGACATCACCGTACGGCGGCCGCTAATCTGGCGGGCATGGAAGGTTTCCCGAAC  
 CTCGACGCGGTCTCCATCGGTTCCGATGGCACTGTGGATCCACTGAGCCAGCTGTTT-  
 CGTGCAACCTTCGTTGGTGTGAGACGGGTCCGTTTATCTCCCAACTGCTTGTGAACA  
 GTTTTACCATCGACAGCATTACCGTGGAGCCGAAACAGGAGACCTTCGCTCCG-  
 GACGTCA-  
 ACTATATGGTGGACTTCGATGAGTGGCTGAACATCCAAAATGGCGGTCCGCCTGCGG

GTCCGGAGTTGCTGGACGACGAGCTGCGTTTTGTGCGTAAT-  
 GCTCGCGATCTGGCTCGTGT-  
 TACCTTCACCGATAACATCAACACCGAAGCGTATCGTGGCGCGCTGATCCTGCTGGG  
 CCTGGACGCCTTCAATCGTGCTGGCGTTAATGGTCCGTTTCATCGACATCGACCGTCA-  
 GGCAGGTTTCGTGAACTTTGGCATAAGCCACTACTTCCGCCTGATTGGTGCGGCGGA  
 ACTGGCCCAACGTAGCAGCTGGTACCAGAAATGGCAGGTCCATCGTTTT-  
 GCTCGCCCT-  
 GAAGCGCTGGGAGGCACCCTACACCTGACGATTAAGGGTGAGCTGAACGCCGATTT  
 TGACTTGTCGTTGCTGGAAAATGCTGAACTCCTTAAGCGCGTGGCAGCGATCA-  
 ACGCGGCT-  
 CAAAACCCGAATAACGAAGTGACCTATCTGCTGCCGCAGGCAATTCAAGAAGGTAGC  
 CCGACGCATCCGTCTTATCCGTCTGGTCATGCAACCCAGAACGGCGCGTTTCGCCAC-  
 CGTACT-  
 GAAGGCGCTGATTGGCTTGGATCGCGGTGGCGACTGCTACCCGGACCCGGTGTACC  
 CGGATGACGACGGCTTAAAGCTGATCGATTTTAGAGGTTTCATGTCTGACCTTT-  
 GAAGGGGA-  
 GATTAATAAACTGGCGGTGAACGTGGCTTTCGGCCGTCAAATGCTGGGTATCCACTA  
 CCGGTTTCGACGGCATTCAAGGTTTGTGCTCGGCGAGACGATCACCGTTAG-  
 AACACTGCAC-  
 CAGGAATTAATGACCTTCGCAGAGGAGAGCACCTTCGAATTTTCGTCTGTTTACCGGC  
 GAGGTGATTAAACTGTTCCAAGATGGCACTTTTACGATGACGGTTT-  
 TAAGTGCCCGGGTCTGGTTTACACCGGTGTTCGAGAACTGCGTTAGCCTCGAGCACCA  
 CCACCACCACCACTGA

**Aminosäuresequenz von VPO-A $\alpha$ :**

MQTCSTSDDADDPTPPNERDDEAFASRVAAAKRELEGTGTVCQINNGETD-  
 LAAKFHKSLPHDDLQVDADAFAALEDLNGDLSICEDVPVGNSEGDVPVGRVLVNPTAA  
 FAIDISGPAFSATITIPPVPTLPSPELAAQLAEVYWMALARDVPMQYGTDDITVTAAN-  
 LAG-  
 MEGFPNLDVAVSIGSDGTVDPLSQLFRATFVGVETGPFISQLLVNSFTIDSITVEPKQETFAP  
 DVNYMVDFFDEWLNIQNGGPPAGPELLDDELRFVRNARDLARVTFTDNINTEAYRGALI-  
 LL-  
 GLDAFNRAVNGPFIDIDRQAGFVNFGISHYFRLIGAAELAQRSSWYQKWQVHRFARPE  
 ALGGTLHLTIKSELNADFDLSLENAELLKRVAAINAAQNPNEVTYLLPQAIQEGSPT-  
 HPSYPSGHATQNGAFATVLKALIGLDRGGDCYPDPVYPDDDGLKLIDFRGSCLTFEGEI  
 NKLAVNVAFGRQMLGIHYRFDGIQGLLGETTTVRTLHQELMTFAEESTFEFRLFTGE-  
 VIKLFQDGTFTIDGFKCPGLVYTGVENCVSLEHHHHHH



**Abbildung A 8: Vektorkarte von pET21a(+):VPO-Fc**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

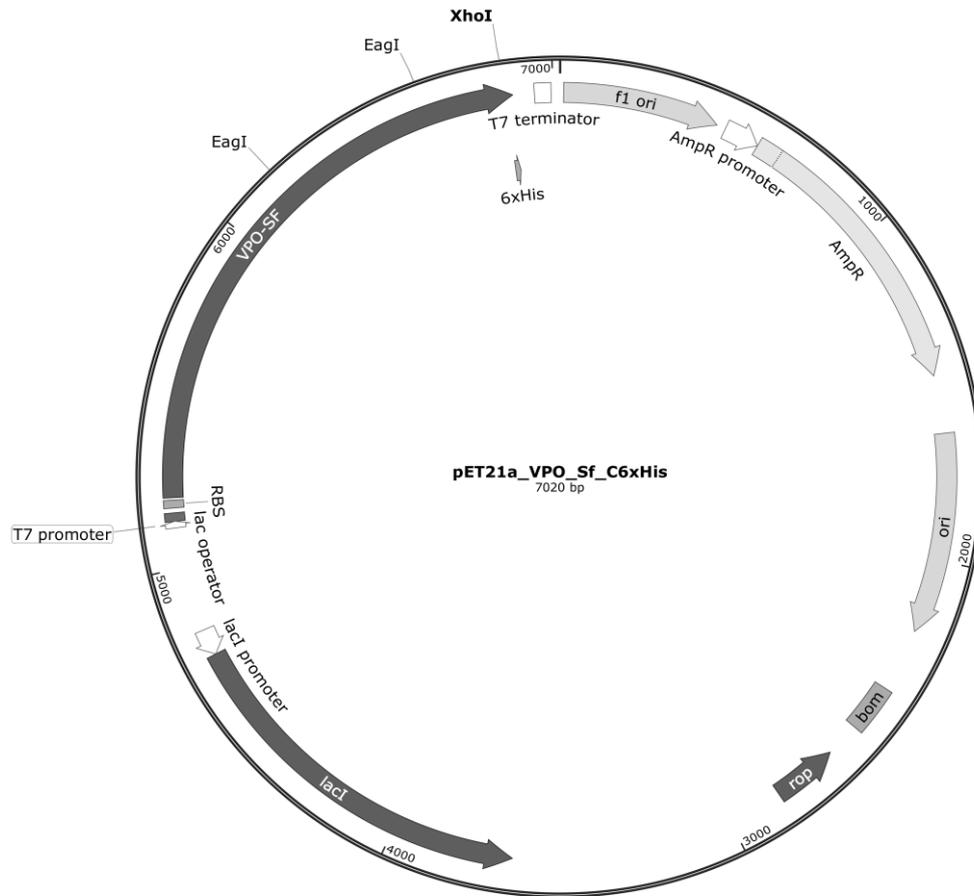
**Nukleotidsequenz von *vpo-fc*:**

ATGGCTAGAGTAAGGATAGCGACAGCACTAGCTGTTGTTCTGGCGGGCGCCAAAC-  
 CTGGCTTT-  
 CGACGAGGTTACGGCCTCCGGCGTGTTTCCGGAAGAGCACAAGCACGCTGTGGAAG  
 GACGTCATCTGCAGACCTGCACCAACAGCGATGACGCGCTGGAC-  
 CCGACTGCTCCGAAC-  
 CGTCGTGATAATGAAGCCTTCGCGTCCCGCCGCGATGCAGCCCAGAGAACGTGAC  
 GGCACCGGCACCGTCTGTTCAGATTACCAACGGTGAAACCGATCTGGCGACCATGTTT-  
 CA-  
 CAAAAGCCTGCCGCATGATGAATTAGGTCAGGTGGCCGCGGATGATTTTCGCAATTCT  
 GGAAGATTGTATTTTGAACGGGGATTTCTCGATCTGCGAAGGCGTCCCAGCGGGT-  
 GAC-  
 CCGGCGGGCCGTCTGGTCAACCCGACCGCAGCGTTTGGCGATCGATATTTCTGGTCCT  
 GCGTTCAGCGCGACTACGATCCCGCCGGTTCCGACCCTGTCCAGCCCG-  
 GAGCTGGCCGCCAACTGGCTGAGCTTTATTTGGATGGCGCTGGCGCGTGATGTTCC  
 GTTTATGCAGTATGGTACGAACGAGATCACCACCACGGCTGCTGCTAATT-  
 TAGCGGGCAT-  
 GGGTGGTTTTCCGAATCTGGACGCTGTTAGCATTGGCAGCGACGGTACAGTTGATCC  
 GGTGTCGCAACTGTTCCGCGCGACCTTTGTTGGCATCGAAACGGGTCCGTTTCGTTT-  
 CCAACTCCTAGTTAATTCATTTACCATTGACGCGATTACCGTGGAGCCGCGTCAAGA

GACATTTGCTCCGGATTTGAATTATATGGTTGATTTTCGACGAGTGGCTGAATATTC-  
 AAACGGTGGTCCGCCAGCAGGCCCGGAAGAGCTGGACGAAGAATTACGTTTCATTC  
 GTAATGTGCGCGACCTGGCGCGCGTTAGCTTCGTGGACAACATCAACAC-  
 CGAGGCATACAGAGGTGCGCTCATCTTGCTGGAGTTGGGTGCATTCTCTCGTCCTGG  
 TATTAACGGCCCGTTTATCGACAGCGATCGTCAGGCAGGCTTCGTGAACTTTGGTAC-  
 CA-  
 GCCATTACTTTTCGTCTGATCGGTGCGGGCGGAATTGGCCCAACGTGCAAGCTGGTATC  
 AGAAATGGCAGGTGCATCGTTTTGCGCGTCCGGAAGCACTCGGCGGTAC-  
 CCTGCACAACAC-  
 CATTACGGGTGATTTGGACGCCGATTTTCGACATCAGCCTGCTGGAGAATGATGAGTT  
 GCTTAAGCGCGTGGCGGAGATTAATGCCGCGCAAACCCGAATGGCGAGGTTACG-  
 TAC-  
 CTGCTGCCGCAAGCGAGCCGCGTAGGTTCCCCGACCCATCCGAGCTACCCGTCCGGC  
 CACGCAACCCAGAACGGCGCCTTCGCGACGGTCTGAAGGCACCTTATCGGCCCTG-  
 GAC-  
 CGCGGTGGTGAAGTCTTTCCGAACCCAGTTTTCGGTCTGACGACGGCCTGGAAGT  
 GTGGACTTCGAGGGCGCCTGCCTGACCTACGAAGGTGAAATCAACAAATTTGGCGGT-  
 CA-  
 ACGTGGCCTTCGGTCGTCAGATGCTGGGCATCCACTACCGCTTCGACGGTATTCAAG  
 GTCTGCTTCTCGGTGAAACCATCACCGTTCGGACTCTGCACCAGGAGCTGATGAC-  
 CTTCGCG-  
 GAAGAGGCGACCTTTGAATTTTCGTCTGTTCACTGGTGAAGTGATCGAGTTGTTTCAG  
 GATGGTACATTCAGTATTGATGGATCTATCTGCCCCGGGTGAGGTGTATAC-  
 CGGCGTGCCTTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**Aminosäuresequenz von VPO-*fc*:**

MARVRIATALAVVLAAPNLAFFDEVTASGVFPPEEHKHAVEGRHLQ'TCTNSDDALD-  
 PTAPNRRD-  
 NEAFASRRDAARRERDGTGTVCQITNGETDLATMFHKSLPHDELGQVAADDFAILEDCL  
 LNGDFSICEGVPAAGDPAGRLVNPTAAFAIDISGPAFSAT'TIPPVPTLSSPELAAQLAELY-  
 WMALARDVPMQYGTNEITTTAAANLAGMGGFPNLDAVSIGSDGTVPVSQLFRATFV  
 GIETGPFVSQLLVNSFTIDATVEPRQET'FAPDLNYMVDVDFDEWLNIQNG-  
 GPPAGPEELDEEL-  
 RFIRNVRDLARVSFVDNINTEAYRGALILLELGAFSRPGINGPFIDSDRQAGFVNFGTSHY  
 FRLIGAAELAQRASWYQKWQVHRFARPEALGGTLHNTTGDLDADFDISLLENDELLKR-  
 VAEINAAQNPNGEVTYLLPQASRVGSP'HTPSYPSGHATQNGAFATVLKALIGLDRGGEC  
 FPNPVFPSDDGLELVDFEGACLTYE'GEINKLAVNVA'FGRQMLGIHYRFDGIQGLLLGE-  
 TTT-  
 VRTLHQELMTFAEEAT'FEFRLFT'GEVIELFQDGTFSIDGSICPGEVYTGVRLEHHHHHH



**Abbildung A 9: Vektorkarte von pET21a(+):VPO-Sf**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

**Nukleotidsequenz von *vpo-sf*:**

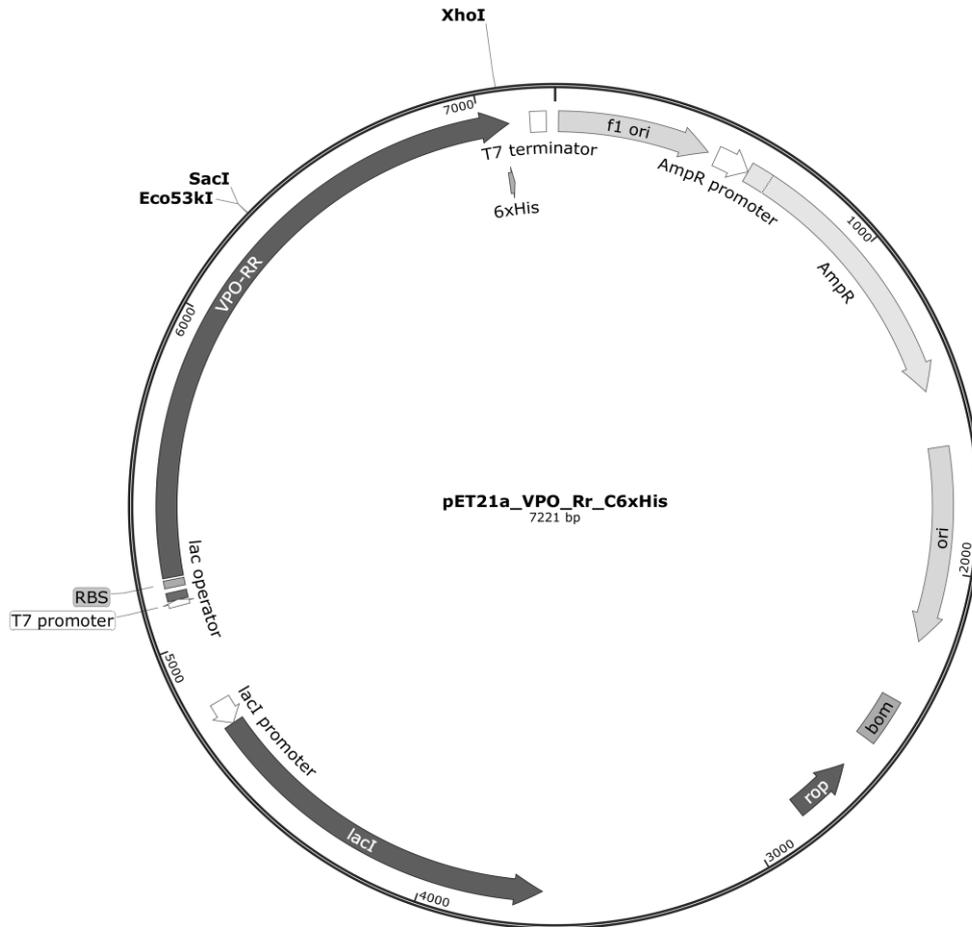
```

ATGTCTAGCTGTAGTAATTTCAGATGACGCTCTAGACCCGACCCGTCCGTCTCGTCGT-
GAT-
GATGTTGTTTCCACGCACGTATCGACGCCGCGAACGTGAAAAAAGCGGCACCCGGC
CTGGTGTGCCAAATTAACAACGGTGATACCAATCGCGCAATCAAGTTCCACAAAAC-
CTTAC-
CGCATGATGAGCTGGGTCAGGTAGACGAGGATGCTTTTACCGCTCTGGAAGAGTGC
ATTGCATTTGGCGACTTCGATGTGTGCGAAGACGTGCCGGCAGGGCAGACTGCGAC-
CTTAC-
CAACCCGATTGGCGCGTTCGCCGTGGACATGGCGGGTCCAGCTTCCAACGCCTTGGC
GATCCCCCTGCCCGACCCTGGACAGCGCAGAATTGGCTGCCCAACTCGCG-
GAGGTTTA-
CTGGATGGCGCTGGCGCGCGACGTCCCGTTTAGCCAATATGGCACCAACGAGATTAC
CACGACCGCCGCGGCTAATCTGGCGGGTATGGAAGGTCATTCCGAGATGTTT-
GGTGT-
TAGCATGAATGGCGACGGTAGCGTTGATCCGCTGTCCCAACTGTTCCGCGCTAATTT
TACGGGTGTTGAAACCGGTCCGATGATTAGCCAGCTGCTGGTGAACGAATTTACCTT-
CGACAGCATCACCAATTACCCCGATGCACACCGTCTTTGCTCCAGGTGTGAATTATCTG
    
```

ACCGAGTACGATGAATGGCTGCGCATCCAGAACGGCGGTGCGACGGAAGGGACT-  
 GAGGAT-  
 GTTGATTCCAGCACCCGTTTATCCGCAATGCAAGAGACCTGGCGACCCTCGTGGCG  
 CGTGGTACGATCTACAGCGAAGCGTTTAGAGGGCGCGCTGGTTCTGATG-  
 GAACAGGGTGCTAT-  
 CAGCAAGTCGGGCTTCAACGGTCCGTATGCAGAGAGCACCCGTCAGAACGGCTTTGT  
 GACCTACGGCGTGTGCAACCTGATGCGTTTGTGGGTGCGGCCGAGCT-  
 TAGCCAACG-  
 TAGCTGTTGGTATCAGAAGTGGCAGGTGCATAATTTTCGTTTCGTCGGAAGCGCTGG  
 GCGGTACGGTGCACAACACCCTGCTGGGCCTGTTGAAT-  
 GAGCCGATCCATCCGTCCTGCTG-  
 GAAAACAGCGAGCTGCTCGACTTAGTTGCGGGCGTCTAACGCAGCGCAGAACTTCGAT  
 GGTTCAGAGACTTACCTGCTGTCTCAAGCGTACATGGCGGGTAGCCCGCGTAAC-  
 CCGAGTTA-  
 CCCGGCTGGCCAAGCGGTTCAACAACGGCGCGTTTCGCCGCGGTCCTTAAGGCGTTCGT  
 TGGTTTGGACCGTGGTGAGTTATGCTTTGAAAATCCAGTGTACCCGTCCGACAAT-  
 GCCTG-  
 GAGTTGTTAGATTATACCGGTGATTGTCTGACGTTTGAAGGCGAGATCAACAAACTG  
 GCAACCAACGTCGCTATCGGCCGCCAGATGTCTGGTGTGCACIATCATTIT-  
 GACTCGAC-  
 CGAGGGCCTAGTCTTCGGTGAGATTATCGGTATTCGCTTATTCACCAAGAAGTTCAT  
 GAGCTACCCGGAAGAAAACACCTTCAAATTTTCGTCTGTTACGGGGCGAGACAATT-  
 GAGTT-  
 GTTTTATGATGGTACTTTCGCAATTGATGGTGAGATGTGCTCTGGTGAGGTCTACGA  
 AGGGGTGGCTGCCTGTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**Aminosäuresequenz von VPO-Sf**

MSSCSNSDDALDPTRPSRRDDVVFHARIDAAEREKSGTGLVCQINNGDTNRAIKFHKT-  
 LPHDELGQVDEDAFTAEECIAFGDFDVCEDVPAGDTATFTNPIGAFVDMAGPASNAL  
 AIPPAPTLDSAELAAQLAEVYWMALARDVPFSQYGTNEITTTAAANLAGMEG-  
 HSEMFGVSMNGDGSVDPLSQLFRANFTGVETGPMISQLLVNEFTFDSITTTMHTVFPAG  
 VNYLTEYDEWLRIQNGGATEGTEDVDSSTRFIRNARDLATLVARGTIYSEAFRGAL-  
 VLMEQGAISKSGFNOPYAESTRQNGFVYGVSNLMRLLGAAELSQRSCWYQKWQVHNF  
 VRPEALGGTVHNTLLGLLNEPIHPSLLENSELDDLVAAS-  
 NAAQNFDGSETYLLSQAYMAGSPRNPSYPAGQAVHNGAFAAVLKAFVGLDRGELCFEN  
 PVYPSDNGLELLDYTGDCCLTFEGEINKLATNVAIGRQMSGVHYHFDSTEGLVFGEI-  
 IGIRLL-  
 HQELMSYPEENTFKFRLFTGETIELFYDGTFAIDGEMCSGEVYEGVAACLEHHHHHH



**Abbildung A 10: Vektorkarte von pET21a(+):VPO-Rr**

Der Vektor wurde als synthetisches Gen erhalten. Die verbliebenen Restriktionsschnittstellen der *multiple cloning site* sind markiert. Stille Mutationen sind gesondert in der Vektorkarte aufgeführt.

**Nukleotidsequenz von *vpo-rr*:**

```

ATGCCCATGCTACCAAAAGTAGAAGAAGAGGCTGGTTTGAATGCGTAC-
CCGGTCCTGTACTG-
GAATCATGTCGCCTTGGAGATGAATCGTATCACCCACAGCCTGGGCGGTCCGCAGAC
CGGGCCAACGATGAGCAGCCGCGCACTGGGTTTGTCTGCATCTGGCCATGCACGAT-
GCG-
TACTTCATCGCCTTGGGCCACAACCAAACCTCAAATCCGCCGACCTATCTGGCTACGA
CCGATGTTACCTCCGTGCTGGATCGTACAAGCAAGAACTACACCGGTCACCGT-
GACGGCCCGTCGAACCCGGTTGTACCGGGTAATCTGGCAAACGCCAACCTAGCGTTG
ACCGGTGCGGCTGTCACTATCCTAGATCTGTTGTACGGTTCGTACAGTCCCCGAACAT-
CA-
GCGTGGTGGCCAGCGATAACCCTGCGAAGCGCGCTGCGCCGGATGATTGGAGACCAC
GGCCCGTATATTGACACCTTACATCCGGCGCATGGCCTAGGTGTGAC-
CGTGGCGCGTGC GGTTTTTGTATCTGTTGGGCGTGAAGCCGGATGAGCCGGGCGCCG
ACCAAGGTAGATATGAACCGCGCCAGGGTTCGTTACTGCTTTCGTGACGAGCCGGT-
TA-
CTCCGGTGC GCCCAGCGCCGATAGACCCGAATGATCCGTCAAGAGGCACCACTGCGG
    
```

CCCGCATCTATCATGGTCCCTTCTATGGCTCCACGGTGAAGCGCTTT-  
 GCCGTGCACGATGAT-  
 GCGGGCCACCGTCTTGAGAAAGTGGCCTGAGCCAGCCGCACCGGGTGCGCCAGGCCGA  
 GTATCAGAATGCCCTGCAAGAAGTTGTTTAC-  
 CTCGGTGGCGCTCCGGGCCTGCCGAAAAC-  
 CCATCGTGACCCGGACCAGACCGTTGCGGCGTACTATTGGGCATACGATGGTGCTAA  
 CCTGATCGGCACCTCCGCCACGTCTGTACAATCAAATTATCCGTACCAATTGCGTG-  
 GAGCAAGAAACTGCCGGACGGCGATGAGCTGGCACGTACCTCCGACTTCGTGCGCCT  
 GTTTGCACTTGCGAACACGGCAATGGCAGACGCTGGTAAATACGCGTGGCTG-  
 GAAAAATA-  
 TCGTTTCGAGCTCTGGCGTCCGCTGAGCGGTATTCGTGAACACGATCCGTCCACCGG  
 CCCAGATGCCGTAGCAGGCACCGGCCCGAGCCGATCGCCGAACCGCACCT-  
 GAGCGCAGAAGGTGCCGATCCGTTCTGGTACGCGCTGGGGGCGCCGGAAACCAACA  
 CCGATAAGGTGTCTTTAAACCACCGTTCCCGGCCTACCCGTCGCGCCACGCTACCTT-  
 T-  
 GGTGCGGCTGCGTTTCAGATGGTTCGCTTATACTATAGGCAGCGTGCTGGTTCGCTG  
 CCTTCGGACCCGGCGGACTGGCAGGCACCGGACGACATTACCTTCACCTTCGT-  
 GAGCGAAGAAGTGAACGGTATCTCCCGTGACTTGCGTCAGCCGTACGACCCGAGCAA  
 GCCGATTGAAGATCAACAAGGTGTTGTCCGCACCCGTGTTTCGCCGTGCTTCGTCA-  
 GCCTGTGGAACGCGATTTCGAGAACGCGTTATCTCGCATCTATTGGGCGTTCATT  
 GCGCTTCGACCGCGTACTATGGTGACATGACGAACGGCTCCGGTGGT-  
 TATAAATCCCGTCTGATATGCGTTTAGCCACGTGTGGACTGGTCCGCGTGGTCCG  
 CAAGCGAAATACCCGACTGGTGGCATTCGCGTGGGGTTAGGTATCGCGAACGATA-  
 TTTTCA-  
 TAACGGTATGAAAAGCCCGCATGGTCAAATGACCGCGGACCGCATCGCGACGTCTA  
 GCAGCGCGGCAGGTTCTGCTAAGATGACCAATACGAACATCCGTCTCGAGCACCAC-  
 CACCACCACCACTGA

#### **Aminosäuresequenz von VPO-Rr**

MPMLPKVEEEAGLNAYPVLYWNHVALEMNRITHSLGGPQTGPTMSSRALGLLHLAMH-  
 DAYFI-  
 ALGHNQTSNPPTYLATTDVTSVLDRTSKNYTGHRDGPSNPVVPGNLANANLALTGAAV  
 TILDLLYGRQSPNISVVASDTLRSALRRMIGDHGPHYDITLHPAHGLGVTVARAVFDLL-  
 GVKPDEPGADQGRYEPRQGRYCFRDEPVTVPVPAPIDPNDPSRGTAAARIYHGPFYGSTV  
 KRFAVHDDAGHRLEKWPEPAAPGAPGEYQNALQEVVHLGGAPGLPKTHRD-  
 PDQTVAAAYYWAYDGANLIGTPPRLYNQIIRTIAWSKCLPDGDELARTSDFVRLFALANTA  
 MADAGKYAWLEKYRFELWRPLSGIREHDPSTGPDAVAGTGPEPIAEPHLSAEGADPF-  
 WYALGAPETNTDKVSFKPPFPAYPSGHATFGAAAFQMVRLYYRQRAGSLSPDPADWQAP  
 DDITFTFVSEELNGISRDLRQPYDPSKPIEDQQGVVTRVRRRRFVSLWNAIFEN-  
 ALSRIYLGVHWRFDAADYGDMTNGSGGYKSPSDMRFSHVWTGPRGPQAKYPTGGIPLG  
 LGIANDIFHNGMKSPHGEMTADRIATSSSAAGSAKMTNTNIRLEHHHHHH

## 6.2 Bioinformatische Suche nach neuen Haloperoxidasen

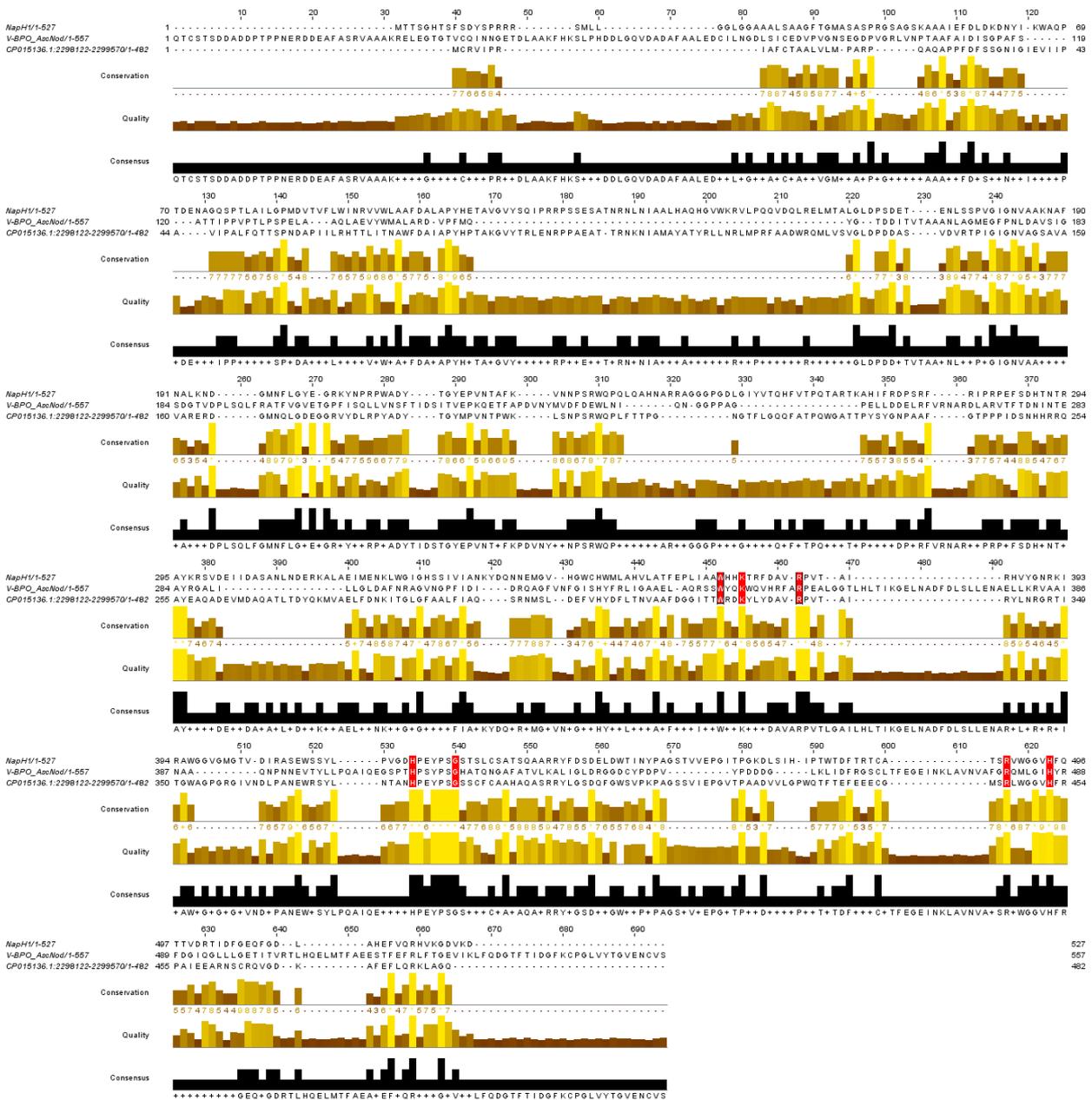


Abbildung A 11: Sequenzvergleich der bakteriellen Haloperoxidase NapH1, V<sub>Br</sub>PO-An und der putativen Sequenz aus *L. pratensis*

### 6.3 NMR-Spektren

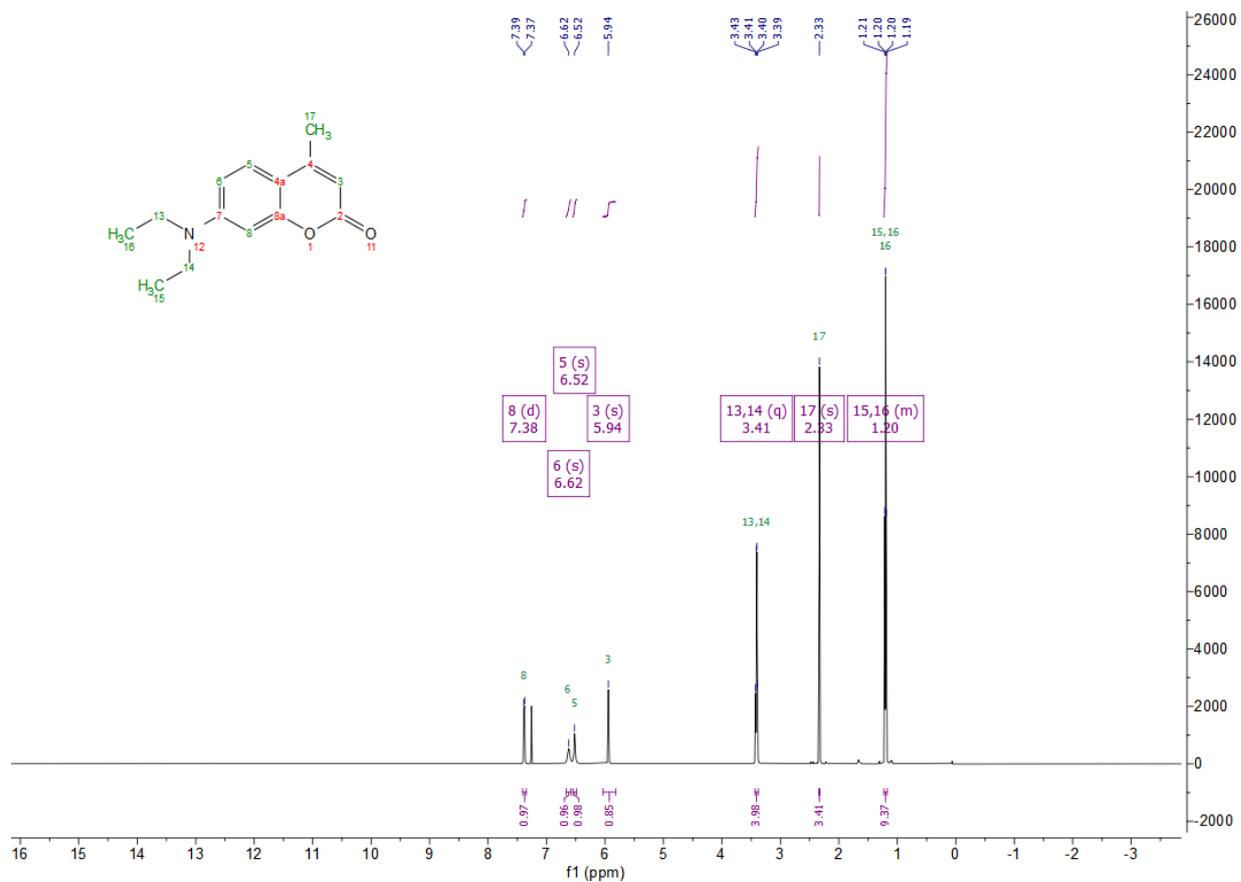


Abbildung A 12: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von MeDAC 49

# Anhang

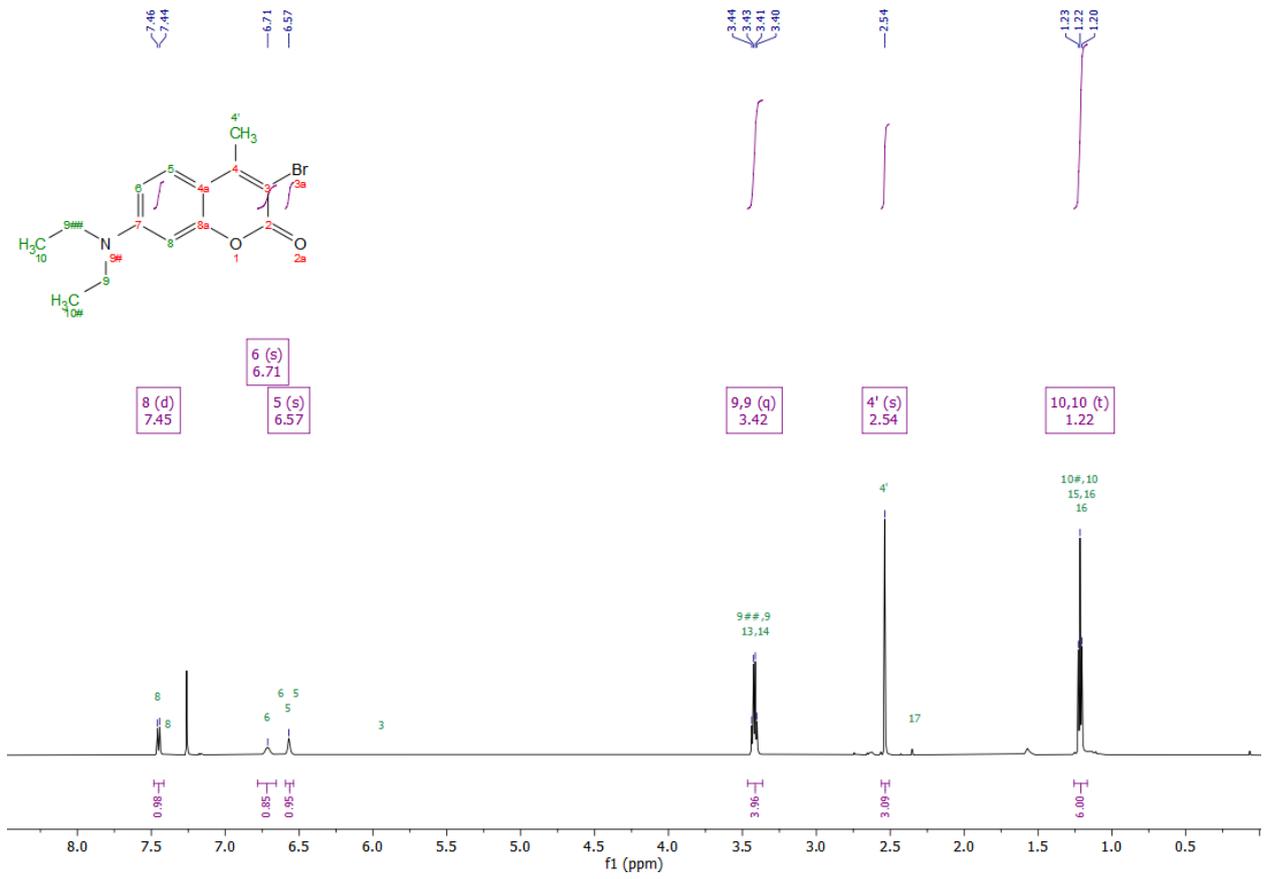


Abbildung A 13: <sup>1</sup>H-Spektrum von BrMeDAC 50

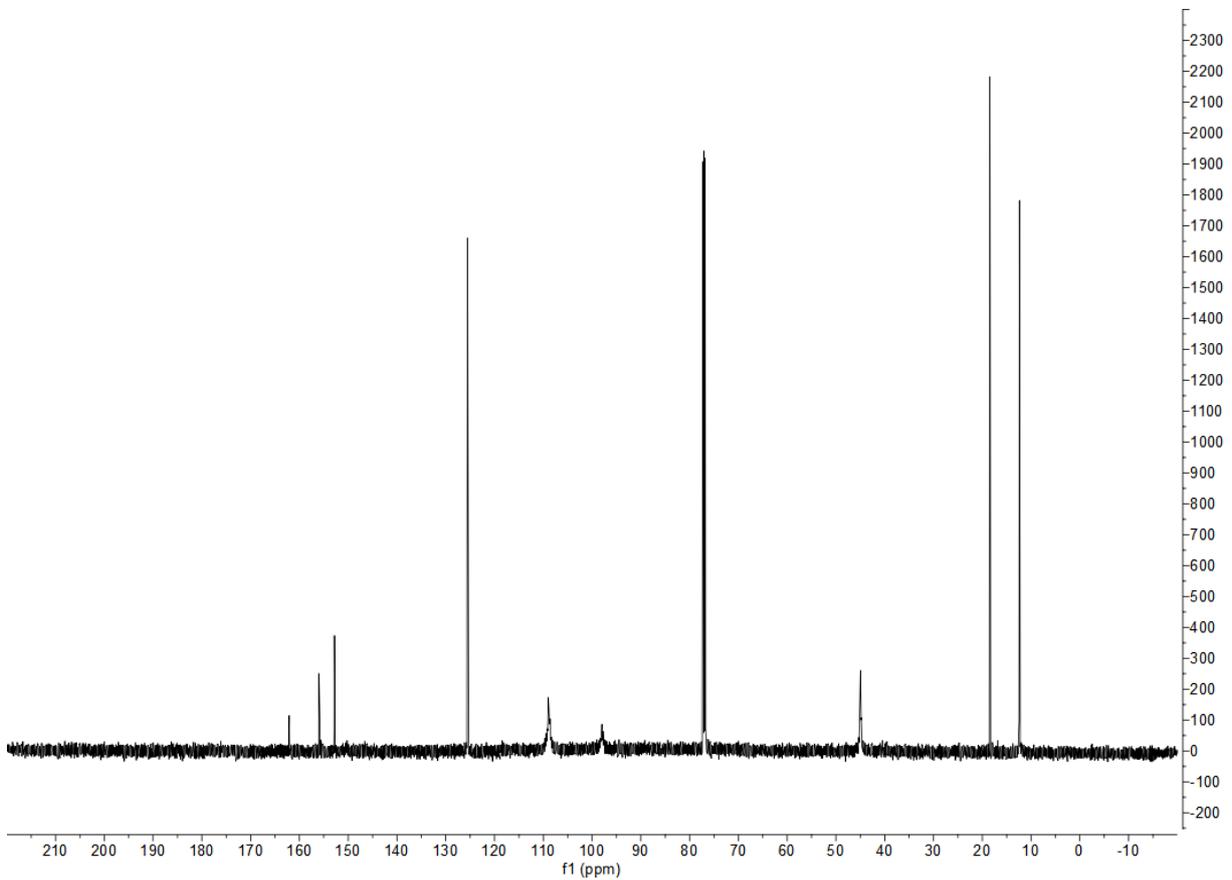


Abbildung A 14: <sup>13</sup>C-Spektrum von BrMeDAC 50

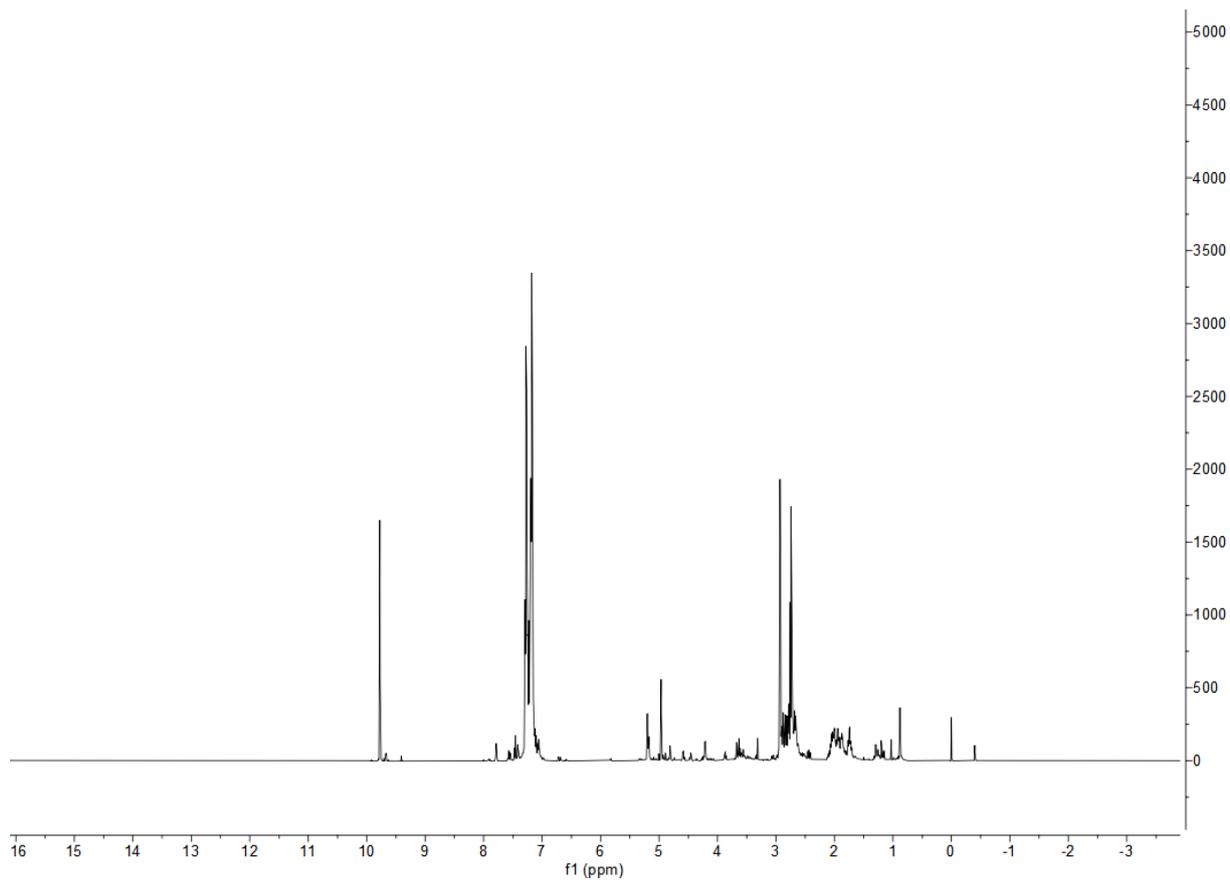


Abbildung A 15:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Umsetzung von Hydrozimaldehyd (75) mit  $\text{VCl}_4\text{PO-Ci}$  und Jørgensen-Hayashi-Katalysator im Durchfluss

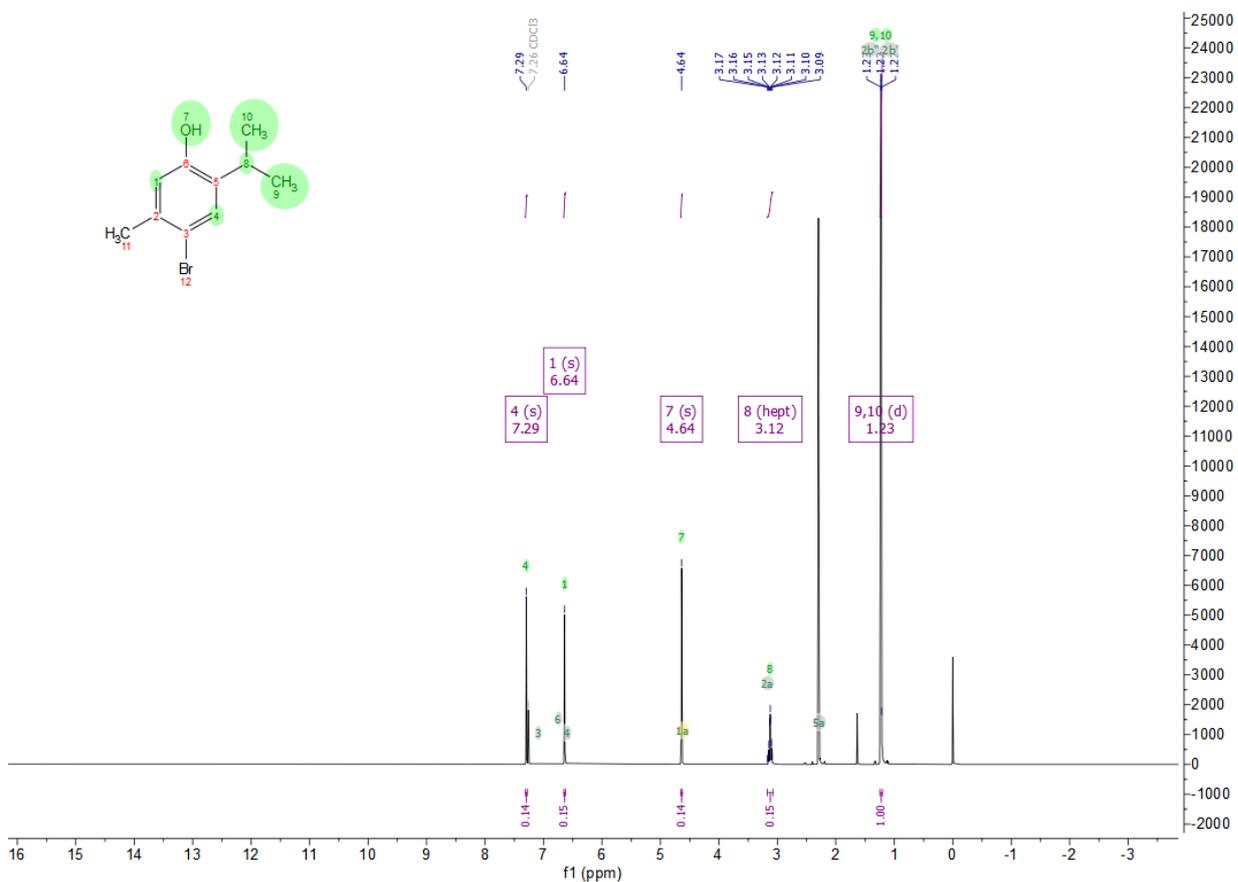


Abbildung A 16:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4BrThymol 57

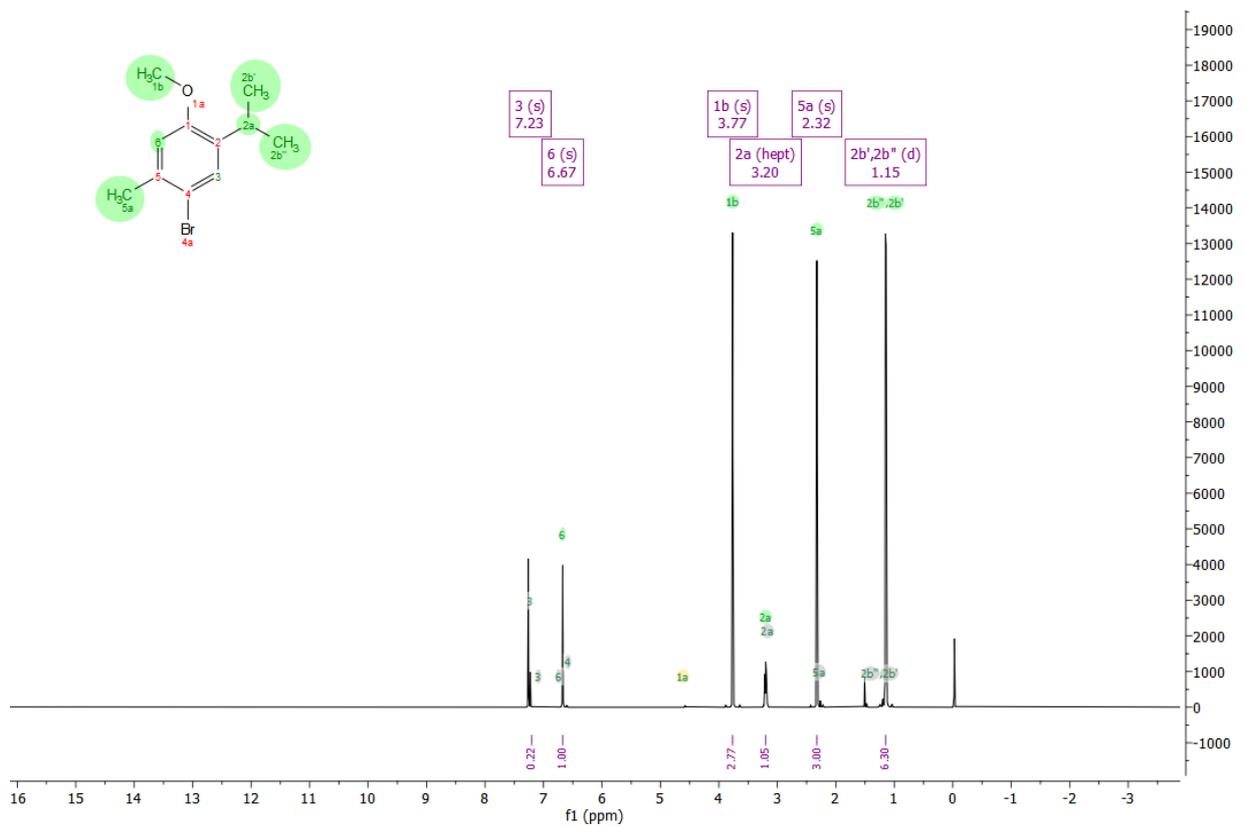


Abbildung A 17:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4BrTME 63

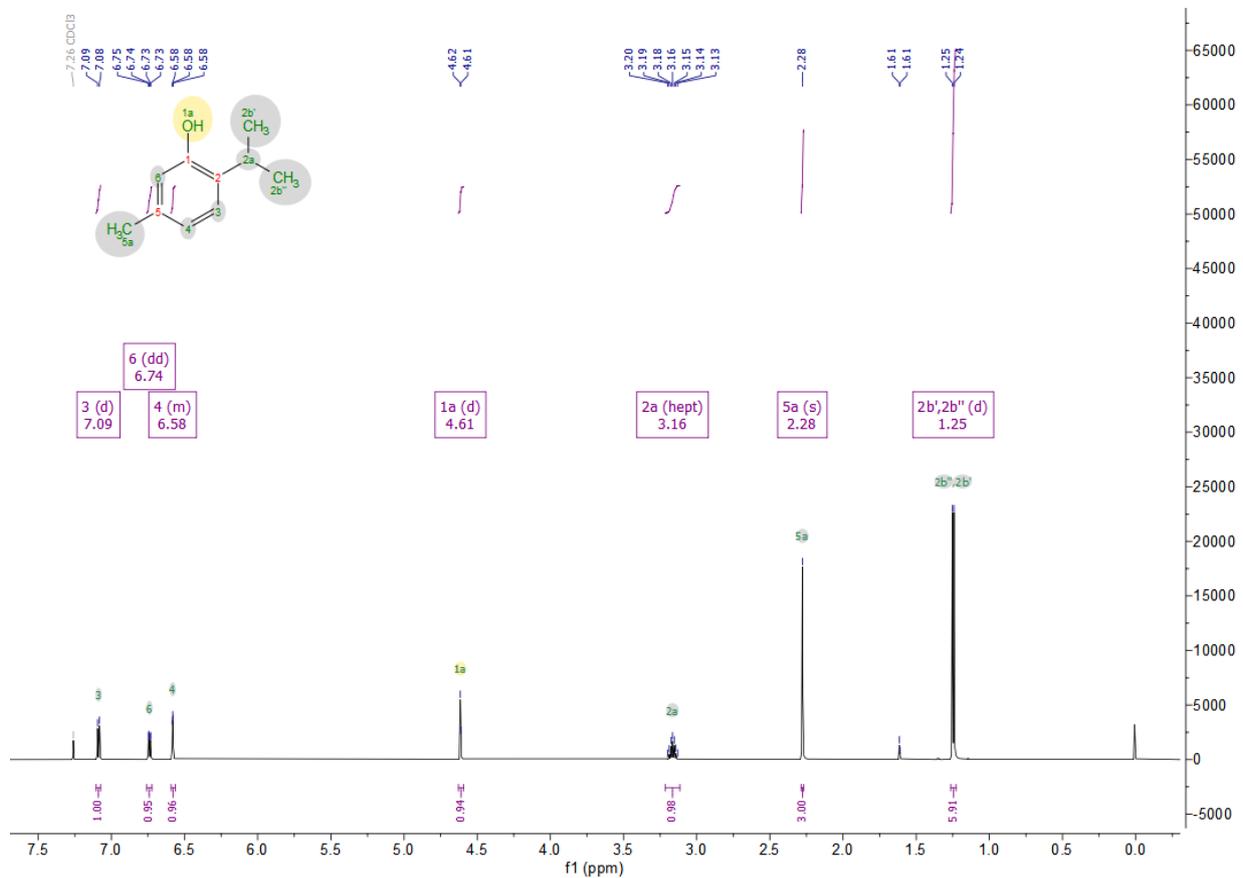


Abbildung A 18: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Thymol (56)

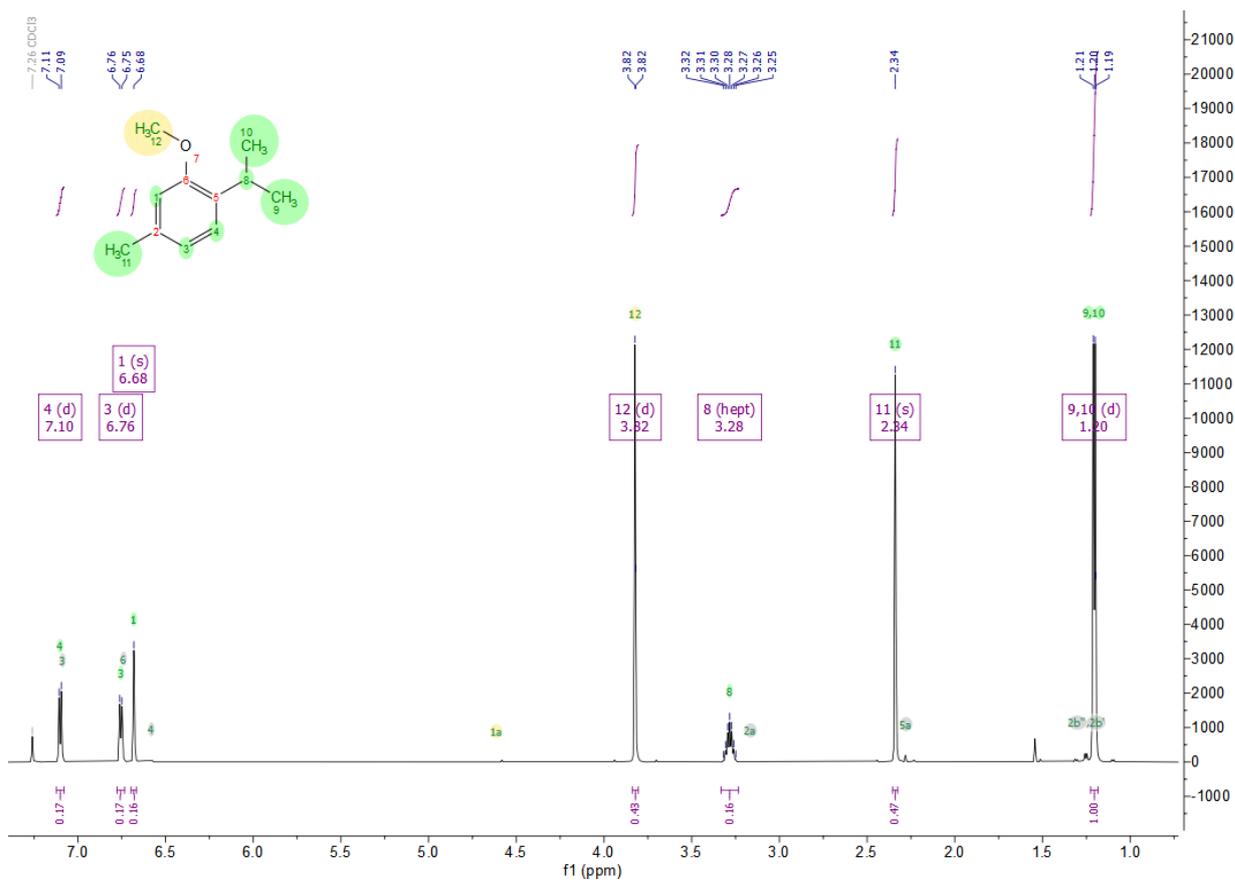
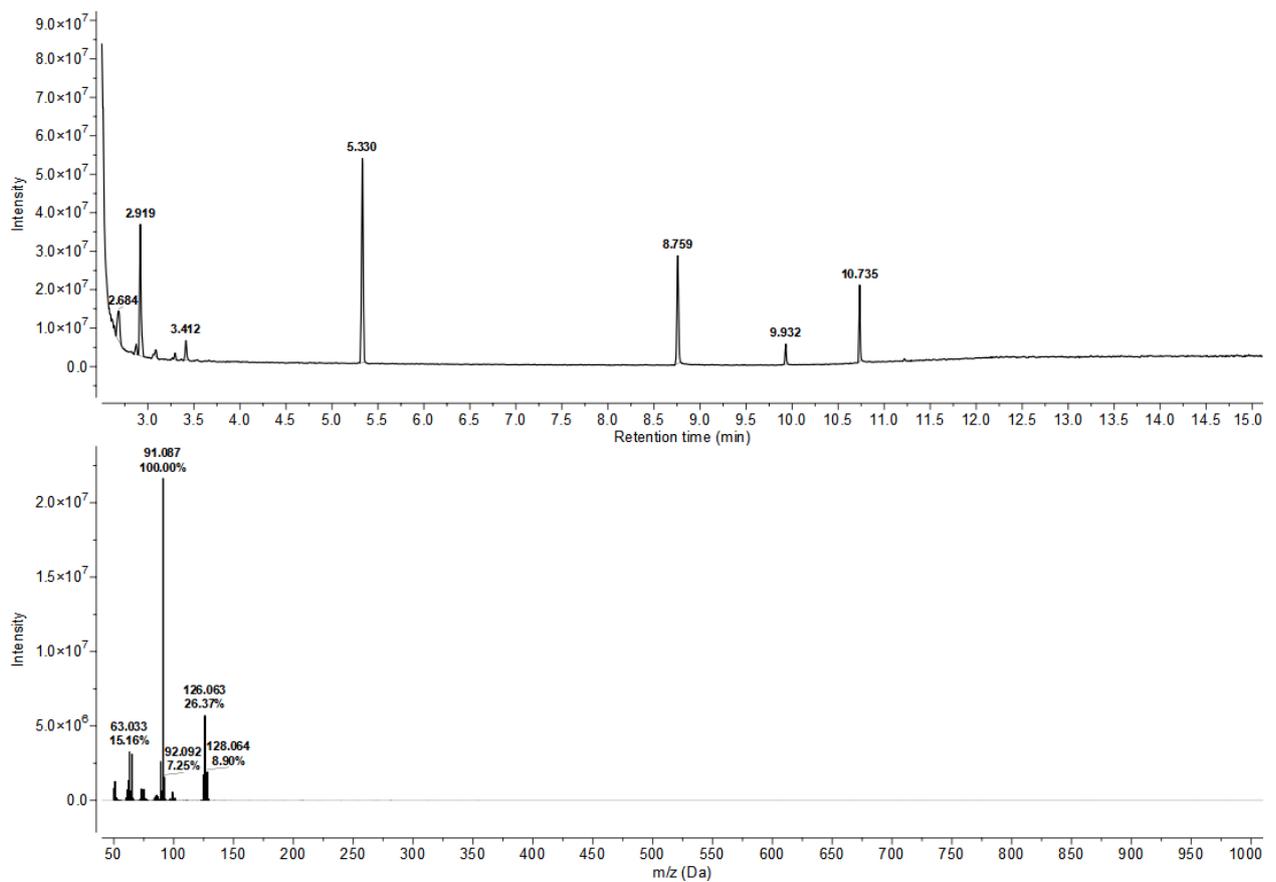


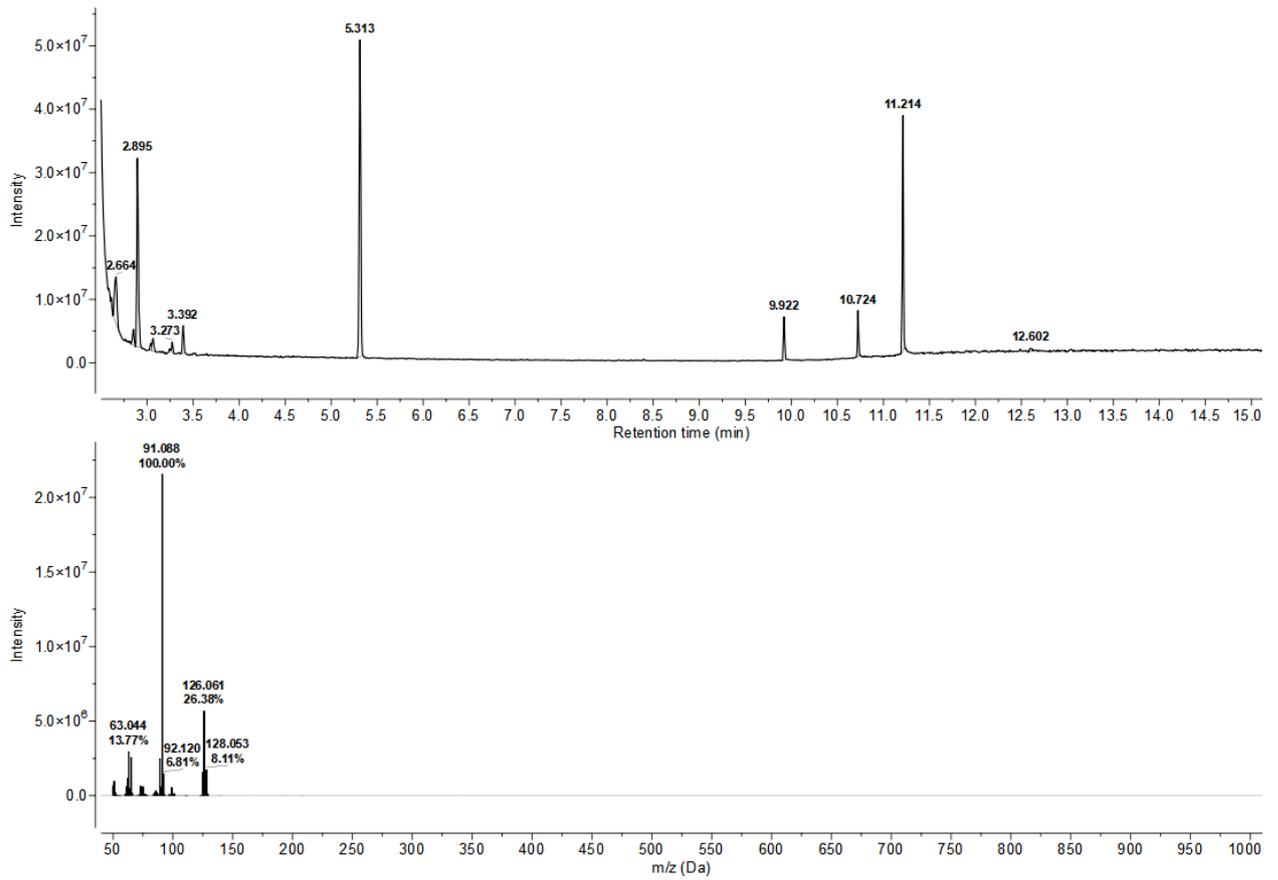
Abbildung A 19: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von TME 65

## 6.4 GC-MS-Spektren



**Abbildung A 20: GC-MS-Spektrum der Umsetzung von Thymol (56) in Abwesenheit von CTAB als Negativkontrolle bei pH 5**

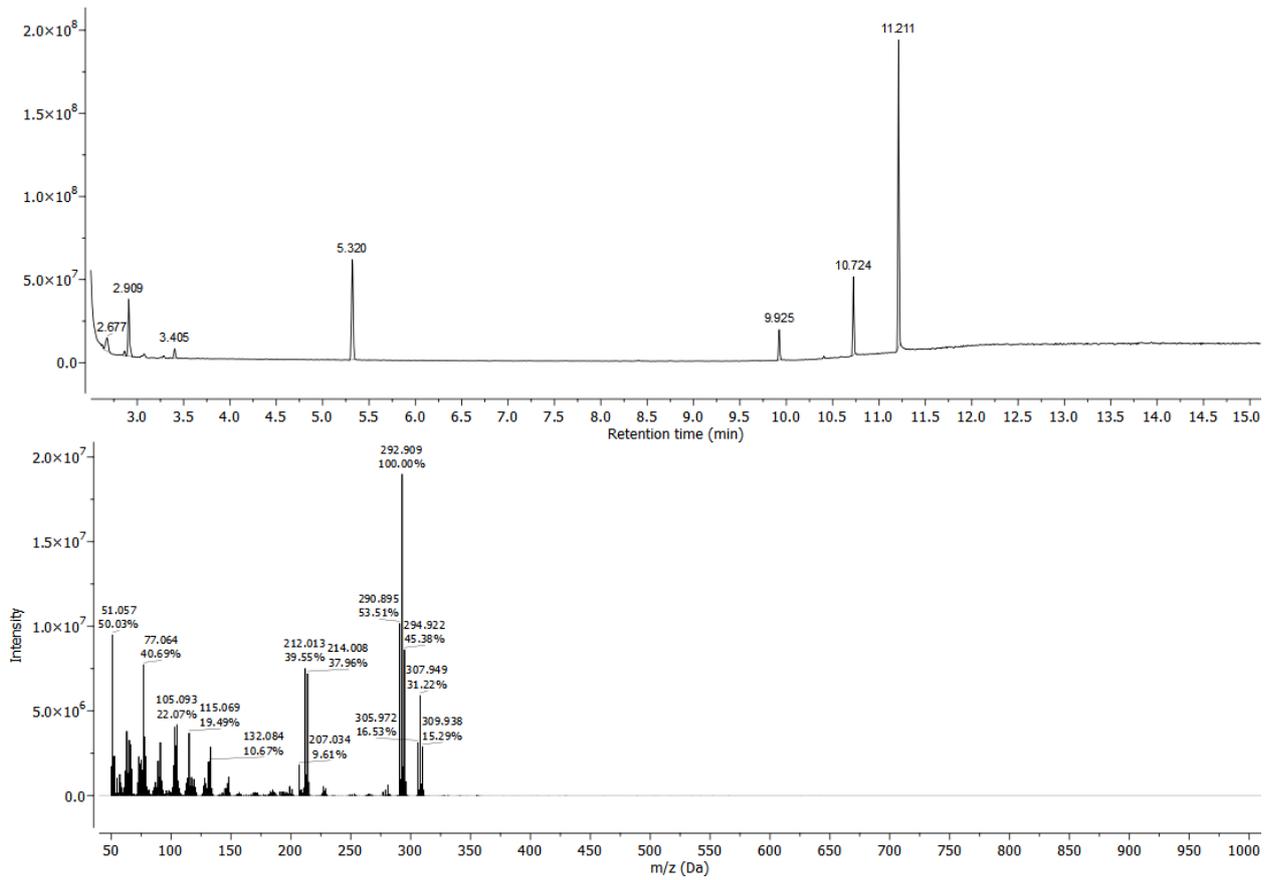
Das Massenspektrum zeigt die Massen des Signals bei 5.32 min.



**Abbildung A 21: GC-MS-Spektrum der Umsetzung von Thymol (56) in Abwesenheit von CTAB als Negativkontrolle bei pH 6**

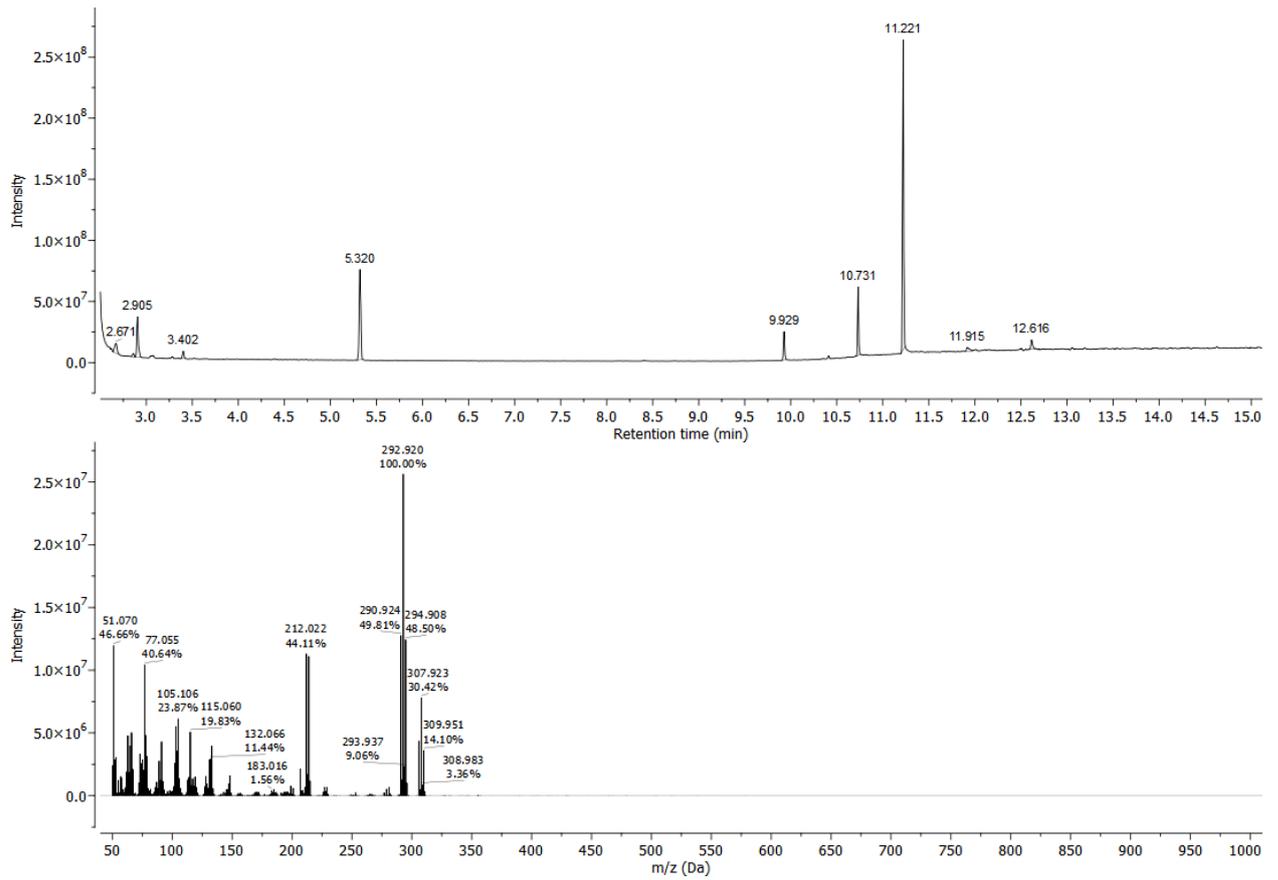
Das Massenspektrum zeigt die Massen des Signals bei 5.32 min.

## Anhang



**Abbildung A 22: GC-MS-Spektrum der Umsetzung von Thymol (56) durch  $V_{Cl}PO-Ci$  in Anwesenheit von Tantalat**

Das Massenspektrum zeigt die Massen des Signals bei 11.2 min.



**Abbildung A 23: GC-MS-Spektrum der Umsetzung von Thymol durch  $V_{Cl}PO-Ci$  in Anwesenheit von Niobat**

Das Massenspektrum zeigt die Massen des Signals bei 11.2 min.

## 6.5 Eigenanteil an Publikationen

A. V. Fejzagic, J. Gebauer, N. Huwa, T. Classen, *Molecules* **2019**, *24*; 'Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow'

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Konzeptionalisierung, Literaturrecherche, Illustration und Schreiben der Abschnitte „Eigenschaften von Halogenen“ und „Haloperoxidasen“

A. V. Fejzagic, S. Myllek, F. Hogenkamp, J. Greb, J. Pietruszka, T. Classen, *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 959-966; 'A Fluorescence-Based Assay System for the Determination of Haloperoxidase-Activity Using a Two-Dimensional Calibration Approach'

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Konzeptionalisierung, Synthese & Charakterisierung von MeDAC **49** und BrMedAC **50**, Isolation und kinetische Charakterisierung von V<sub>C1</sub>PO-C<sub>i</sub>, Illustration und Schreiben des Artikels

N. Porta, A. V. Fejzagic, K. Dumschott, B. Paschold, B. Usadel, J. Pietruszka, T. Classen, H. Gohlke, *Catalysts* **2022**, *12*, 1195; 'Identification and Characterization of the Haloperoxidase VPO-RR from *Rhodoplanes roseus* by Genome Mining and Structure-Based Catalytic Site Mapping'

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: bioinformatische Identifizierung von VPO-L<sub>p</sub> als putative HPO, Expressionsstudien zu neuen Haloperoxidasen, Isolation und kinetische Charakterisierung von VPO-R<sub>r</sub>, biochemische Charakterisierung von VPO-R<sub>r</sub>, Illustration und Schreiben der Abschnitte zur biochemischen Charakterisierung der neuen Haloperoxidasen



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] A. Schuhmacher, L. Wilisch, M. Kuss, A. Kandelbauer, M. Hinder, O. Gassmann, *Drug. Discov. Today* **2021**, *26*, 1784-1789; 'R&D efficiency of leading pharmaceutical companies – A 20-year analysis'.
- [2] Q. He, B. R. Silliman, *Current Biology* **2019**, *29*, 1021-1035; 'Climate Change, Human Impacts, and Coastal Ecosystems in the Anthropocene'.
- [3] P. Anastas, J. Warner, *Green chemistry: theory and practice*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.
- [4] J. Hagen, *Industrial catalysis: a practical approach*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [5] R. M. Phelan, M. J. Abrahamson, J. T. C. Brown, R. K. Zhang, C. R. Zwick, *Org. Process Res. Dev.* **2022**; 'Development of Scalable Processes with Underutilized Biocatalyst Classes'.
- [6] F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12-22; 'Opportunities and challenges for combining chemo- and biocatalysis'.
- [7] F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 14420-14426; 'Innovation by evolution: bringing new chemistry to life (Nobel Lecture)'.
- [8] 'The Nobel Prize in Chemistry 2018', <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>, **2018**, 30.06.2022
- [9] F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 14558-14565; 'Innovation durch Evolution: Wie man neue Chemie zum Leben erweckt (Nobel-Vortrag)'.
- [10] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 266-274; 'Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes'.
- [11] R. A. Sheldon, D. Brady, M. L. Bode, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2587-2605; 'The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis'.
- [12] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88-119; 'Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications'.
- [13] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 89-123; 'Biokatalyse: Enzymatische Synthese für industrielle Anwendungen'.
- [14] F. Hasan, A. A. Shah, S. Javed, A. Hameed, *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 4836-4844; 'Enzymes used in detergents: lipases'.
- [15] J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu, *Catalysts* **2018**, *8*, 238; 'Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks'.
- [16] P. Tufvesson, W. Fu, J. S. Jensen, J. M. Woodley, *Food and Bioprocess Processing* **2010**, *88*, 3-11; 'Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis'.
- [17] R. Kumar, M. J. Karmilowicz, D. Burke, M. P. Burns, L. A. Clark, C. G. Connor, E. Cordi, N. M. Do, K. M. Doyle, S. Hoagland, C. A. Lewis, D. Mangan, C. A. Martinez, E. L. McInturff, K. Meldrum, R. Pearson, J. Steflík, A. Rane, J. Weaver, *Nat. Catal.* **2021**, *4*, 775-782; 'Biocatalytic reductive amination from discovery to commercial manufacturing applied to abrocitinib JAK1 inhibitor'.
- [18] R. A. Sheldon, I. Arends, U. Hanefeld, *Green chemistry and catalysis*, John Wiley & Sons, **2007**.
- [19] P. B. Rainey, P. Remigi, A. D. Farr, P. A. Lind, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2017**, *47*, 102-109; 'Darwin was right: where now for experimental evolution?'.

- [20] F. A. Reed, C. F. Aquadro, *Trends in Genetics* **2006**, *22*, 479-484; 'Mutation, selection and the future of human evolution'.
- [21] C. S. Larsen, *Annu. Rev. Anthropol.* **1995**, 185-213; 'Biological changes in human populations with agriculture'.
- [22] W. H. Organization, in *Geneva: World Health Organization*, **2020**.
- [23] H. Choudhury, B. Gorain, M. Pandey, L. A. Chatterjee, P. Sengupta, A. Das, N. Molugulu, P. Kesharwani, *J. Pharm. Sci.* **2017**, *106*, 1736-1751; 'Recent update on nanoemulgel as topical drug delivery system'.
- [24] S. Ehrlich, *Herbal Medicine*, University of Maryland Medical Center, **2013**.
- [25] B. B. Petrovska, *Pharmacogn Rev* **2012**, *6*, 1-5; 'Historical review of medicinal plants' usage'.
- [26] J. R. Hanson, *Natural products: the secondary metabolites*, Vol. 17, Royal Society of Chemistry, **2003**.
- [27] A. Staniek, H. Bouwmeester, P. D. Fraser, O. Kayser, S. Martens, A. Tissier, S. van der Krol, L. Wessjohann, H. Warzecha, *Biotechnol. J.* **2014**, *9*, 326-336; 'Natural products – learning chemistry from plants'.
- [28] S. O. Duke, J. G. Romagni, F. E. Dayan, *Crop Protection* **2000**, *19*, 583-589; 'Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action'.
- [29] A. M. Clark, *Pharmaceutical Research* **1996**, *13*, 1133-1141; 'Natural Products as a Resource for New Drugs'.
- [30] W. J. Pichler, *Allergy* **2022**, *77*, 404-415; 'The important role of non-covalent drug-protein interactions in drug hypersensitivity reactions'.
- [31] D. Benedetto Tiz, L. Bagnoli, O. Rosati, F. Marini, L. Sancineto, C. Santi, *Molecules* **2022**, *27*, 1643; 'New Halogen-Containing Drugs Approved by FDA in 2021: An Overview on Their Syntheses and Pharmaceutical Use'.
- [32] G. W. Gribble, *Chemosphere* **2003**, *52*, 289-297; 'The diversity of naturally produced organohalogens'.
- [33] K. Podzelinska, R. Latimer, A. Bhattacharya, L. C. Vining, D. L. Zechel, Z. Jia, *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 316-331; 'Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin–aspartate bond'.
- [34] T. Suzuki, H. Honda, R. Katsumata, *Agricultural and Biological Chemistry* **1972**, *36*, 2223-2228; 'Production of Antibacterial Compounds Analogous to Chloramphenicol by a *n*-Paraffin-grown Bacterium'.
- [35] J. A. Bush, B. H. Long, J. J. Catino, W. T. Bradner, K. Tomita, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 668-678; 'Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent'.
- [36] P. Moreau, F. Anizon, M. Sancelme, M. Prudhomme, D. Severe, J.-F. Riou, J.-F. Goossens, J.-P. Hénichart, C. Bailly, E. Labourier, J. Tazzi, D. Fabbro, T. Meyer, A. M. Aubertin, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1816-1822; 'Synthesis, Mode of Action, and Biological Activities of Rebeccamycin Bromo Derivatives'.
- [37] Z. Xu, Z. Yang, Y. Liu, Y. Lu, K. Chen, W. Zhu, *Journal of Chemical Information and Modelling* **2014**, *54*, 69-78; 'Halogen bond: its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development'.
- [38] A. V. Fejzagic, J. Gebauer, N. Huwa, T. Classen, *Molecules* **2019**, *24*; 'Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow'.
- [39] S. Jiang, L. Zhang, D. Cui, Z. Yao, B. Gao, J. Lin, D. Wei, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34750; 'The Important Role of Halogen Bond in Substrate Selectivity of Enzymatic Catalysis'.

- [40] P. Metrangolo, H. Neukirch, T. Pilati, G. Resnati, *Accords of Chemical Research* **2005**, *38*, 386-395; 'Halogen bonding based recognition processes: a world parallel to hydrogen bonding'.
- [41] Y. Lu, Y. Wang, W. Zhu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4543-4551; 'Nonbonding interactions of organic halogens in biological systems: implications for drug discovery and biomolecular design'.
- [42] S. Sirimulla, J. B. Bailey, R. Vegesna, M. Narayan, *Journal of chemical information modeling* **2013**, *53*, 2781-2791; 'Halogen interactions in protein–ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design'.
- [43] Y. Lu, Y. Liu, Z. Xu, H. Li, H. Liu, W. Zhu, *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7*, 375-383; 'Halogen bonding for rational drug design and new drug discovery'.
- [44] F. Neufingerl, O. Urban, M. Viehhauser, *Chemie: allgemeine und anorganische Chemie; organische Chemie*, Jugend & Volk, **2006**.
- [45] G. W. Gribble, *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 1441-1449; 'Natural Organohalogens: A New Frontier for Medicinal Agents?'.
- [46] J. A. Broekaert, *Daniel C. Harris: Quantitative chemical analysis*, Springer, **2015**.
- [47] F. Chast, in *The Practice of Medicinal Chemistry*, Elsevier, **2008**, pp. 1-62.
- [48] M. Z. Hernandez, S. M. T. Cavalcanti, D. R. M. Moreira, W. F. de Azevedo Junior, A. C. L. Leite, *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 303-314; 'Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design'.
- [49] M. Schlosser, D. Michel, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 99-108; 'About the “physiological size” of fluorine substituents: comparison of sensorially active compounds with fluorine and methyl substituted analogues'.
- [50] L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Current Opinions in Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 23-49; 'Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design'.
- [51] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Elsevier, **2012**.
- [52] D. B. Berkowitz, K. R. Karukurichi, R. de la Salud-Bea, D. L. Nelson, C. D. McCune, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 731-742; 'Use of fluorinated functionality in enzyme inhibitor development: Mechanistic and analytical advantages'.
- [53] G. M. Keating, *Drugs* **2015**, *75*, 675-685; 'Ledipasvir/Sofosbuvir: a review of its use in chronic hepatitis C'.
- [54] S. S. Ramalingam, F. Blackhall, M. Krzakowski, C. H. Barrios, K. Park, I. Bover, D. S. Heo, R. Rosell, D. C. Talbot, R. Frank, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3337; 'Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan–human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non–small-cell lung cancer'.
- [55] Z. Xu, Z. Liu, T. Chen, T. Chen, Z. Wang, G. Tian, J. Shi, X. Wang, Y. Lu, X. Yan, G. Wang, H. Jiang, K. Chen, S. Wang, Y. Xu, J. Shen, W. Zhu, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5607-5611; 'Utilization of halogen bond in lead optimization: a case study of rational design of potent phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors'.
- [56] R. J. Lake, M. M. Brennan, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, L. K. Pannell, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2255-2256; 'Eudistomin K sulfoxide - an antiviral sulfoxide from the New Zealand ascidian *Ritterella sigillinoides*'.
- [57] C. C. Crawford, T. W. Evans, 1944, Production of hypohalous acid solutions, USA, Google Patents,
- [58] B. L. Duncan, R. C. Ness, 1993, Process for the production of highly pure concentrated slurries of sodium hypochlorite, USA, Google Patents, 5,194,238.
- [59] O. B. Works, 'Process operations at Octel Amlwch', <https://www.octelamlwch.co.uk/>, **2022**, 29.06.2022

- [60] J. N. Howarth, A. Dadgar, R. H. Sergent, 1995, Recovery of bromine and preparation of hypobromous acid from bromide solution, Google Patents,
- [61] M. Kesner, *Bromine and Bromine Compounds From the Dead Sea, Israel Products in the Service of People*, The Weizmann Institute of Science, Israel, **1999**.
- [62] A. Groweiss, *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 30-33; 'Use of Sodium Bromate for Aromatic Bromination: Research and Development'.
- [63] Z. Nishi, K. Kudoh, N. Okamoto, 2010, Method of forming hypobromous acid in aqueous system, Google Patents,
- [64] W. B. Deichmann, H. W. Gerarde, **1969**; 'Toxicology of drugs and chemicals'.
- [65] K. Ziegler, A. Späth, E. Schaaf, W. Schumann, E. Winkelmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1942**, *551*, 80-119; 'Die halogenierung ungesättigter Substanzen in der Allylstellung'.
- [66] E. Romero, B. S. Jones, B. N. Hogg, A. Rué Casamajo, M. A. Hayes, S. L. Flitsch, N. J. Turner, C. Schnepel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 16824-16855; 'Enzymatic Late-Stage Modifications: Better Late Than Never'.
- [67] A. Jitäreanu, I. C. Caba, L. Agoroaei, *Curr. Ana. Biotechnol* **2019**, *2*, 11-25; 'Halogenation—A Versatile Tool For Drug Synthesis-The Importance Of Developing Effective And Eco-Friendly Reaction Protocols'.
- [68] E. Romero, B. S. Jones, B. N. Hogg, A. Rué Casamajo, M. A. Hayes, S. L. Flitsch, N. J. Turner, C. Schnepel, *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 16962-16993; 'Enzymkatalysierte späte Modifizierungen: Besser spät als nie'.
- [69] C. Torborg, M. Beller, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 3027-3043; 'Recent applications of palladium-catalyzed coupling reactions in the pharmaceutical, agrochemical, and fine chemical industries'.
- [70] I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 2337-2364; 'Copper in cross-coupling reactions: The post-Ullmann chemistry'.
- [71] Z. Xi, B. Liu, W. Chen, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3954-3957; 'Room-temperature Kumada cross-coupling of unactivated aryl chlorides catalyzed by *N*-heterocyclic carbene-based nickel (II) complexes'.
- [72] F. Gomes, P. G. Echeverria, A. Fürstner, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 16814-16822; 'Iron-or Palladium-Catalyzed Reaction Cascades Merging Cycloisomerization and Cross-Coupling Chemistry'.
- [73] A. Piontek, E. Bisz, M. Szostak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11116-11128; 'Iron-Catalyzed Cross-Couplings in the Synthesis of Pharmaceuticals: In Pursuit of Sustainability'.
- [74] G. r. Cahiez, G. Lefèvre, A. Moyeux, O. Guerret, E. Gayon, L. Guillonneau, N. Lefèvre, Q. Gu, E. Zhou, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2679-2683; 'Gram-Scale, Cheap, and Eco-Friendly Iron-Catalyzed Cross-Coupling between Alkyl Grignard Reagents and Alkenyl or Aryl Halides'.
- [75] A. Piontek, E. Bisz, M. Szostak, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 11284-11297; 'Eisenkatalysierte Kreuzkupplungen in der Synthese von Pharmazeutika: Streben nach Nachhaltigkeit'.
- [76] J. W. Cooke, R. Bright, M. J. Coleman, K. P. Jenkins, *Org. Process Res. Dev.* **2001**, *5*, 383-386; 'Process research and development of a dihydropyrimidine dehydrogenase inactivator: Large-scale preparation of eniluracil using a Sonogashira coupling'.
- [77] M. D. Wallace, M. A. McGuire, M. S. Yu, L. Goldfinger, L. Liu, W. Dai, S. Shilcrat, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 738-743; 'Multi-kiloscale enantioselective synthesis of a vitronectin receptor antagonist'.

- [78] R. A. Benkeser, M. P. Siklosi, E. C. Mozdzen, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2134-2139; 'Reversible Grignard and organolithium reactions'.
- [79] D. Milstein, J. Stille, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3636-3638; 'A general, selective, and facile method for ketone synthesis from acid chlorides and organotin compounds catalyzed by palladium'.
- [80] A. O. King, N. Okukado, E. Negishi, *Chem. Commun.* **1977**, 683-684; 'Highly general stereo-, regio-, and chemo-selective synthesis of terminal and internal conjugated enynes by the Pd-catalysed reaction of alkynylzinc reagents with alkenyl halides'.
- [81] R. Corriu, J. Masse, *Chem. Commun.* **1972**, 144a-144a; 'Activation of Grignard reagents by transition-metal complexes. A new and simple synthesis of trans-stilbenes and polyphenyls'.
- [82] H. A. Van Kalker, F. L. Van Delft, F. P. Rutjes, *Pure Appl. Chem.* **2012**, *85*, 817-828; 'Catalytic Appel reactions'.
- [83] J. J. Li, in *Name Reactions*, Springer, **2014**, pp. 310-311.
- [84] B. M. Trost, *Science* **1991**, *254*, 1471-1477; 'The atom economy—a search for synthetic efficiency'.
- [85] R. A. Sheldon, *Chemistry and Industry* **1992**, 903-906; 'Organic synthesis—past, present and future'.
- [86] R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2017**, *19*, 18-43; 'The E-factor 25 years on: the rise of green chemistry and sustainability'.
- [87] M. Becker, A. Zieminska-Stolarska, D. Markowska, S. Lutz, K. Rosenthal, *ChemSusChem* **2023**, *16*, e202201629; 'Comparative Life Cycle Assessment of Chemical and Biocatalytic 2'3'-Cyclic GMP-AMP Synthesis'.
- [88] I. O. f. Standardization, *Environmental management: life cycle assessment; requirements and guidelines, Vol. 14044*, ISO Geneva, Switzerland, **2006**.
- [89] 'Global Chlorine Market Set for Rapid Growth to Reach around USD 38.4 Billion in 2021', <https://www.zionmarketresearch.com/news/global-chlorine-market>, **2016**, 23.08.2019
- [90] F. Ausfelder, *Flexibilitätsoptionen in der Grundstoffindustrie: Methodik, Potenziale, Hemmnisse: Bericht des AP V. 6" Flexibilitätsoptionen und Perspektiven in der Grundstoffindustrie" im Kopernikus-Projekt" SynErgie-synchronisierte und energieadaptive Produktionstechnik zur flexiblen Ausrichtung von Industrieprozessen auf eine fluktuierende Energieversorgung*", DECHEMA Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie eV, **2018**.
- [91] Euro Chlor and VinylPlus, **2017**.
- [92] Euro Chlor, a Sector Group of Cefic, **2018**.
- [93] B. H. Lipshutz, S. Ghorai, *Green Chem.* **2014**, *16*, 3660-3679; 'Transitioning organic synthesis from organic solvents to water. What's your E-Factor?'.
- [94] R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2005**, *7*, 267-278; 'Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art'.
- [95] Y. Yamaoka, H. Miyabe, Y. Takemoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6686-6687; 'Catalytic Enantioselective Petasis-Type Reaction of Quinolines Catalyzed by a Newly Designed Thiourea Catalyst'.
- [96] M. Rueping, A. P. Antonchick, T. Theissmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3683-3686; 'A Highly Enantioselective Brønsted Acid Catalyzed Cascade Reaction: Organocatalytic Transfer Hydrogenation of Quinolines and their Application in the Synthesis of Alkaloids'.
- [97] M. Rueping, A. P. Antonchick, T. Theissmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3765-3768; 'Eine hoch enantioselektive Brønsted-Säure-katalysierte

- Kaskadenreaktion: organokatalytische Transferhydrierung von Chinolinen und deren Anwendung in der Synthese von Alkaloiden'.
- [98] 'The Nobel Prize in Chemistry 2021', <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2021/summary/>, **2021**, 30.06.2022
- [99] R. A. Sheldon, D. Brady, *ChemSusChem* **2019**, *12*, 2859-2881; 'Broadening the scope of biocatalysis in sustainable organic synthesis'.
- [100] A. Fryszkowska, P. N. Devine, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 151-160; 'Biocatalysis in drug discovery and development'.
- [101] U. T. Bornscheuer, G. Huisman, R. Kazlauskas, S. Lutz, J. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; 'Engineering the third wave of biocatalysis'.
- [102] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824; 'Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates'.
- [103] A. Schmid, J. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268; 'Industrial biocatalysis today and tomorrow'.
- [104] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806-843; 'Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten'.
- [105] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351-3367; 'Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution'.
- [106] S. Galanie, D. Entwistle, J. Lalonde, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1122-1143; 'Engineering biosynthetic enzymes for industrial natural product synthesis'.
- [107] H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 3408-3426; 'Ausdehnung des Enzym-Universums: Zugang zu nicht-natürlichen Reaktionen durch mechanismusgeleitete, gerichtete Evolution'.
- [108] L. M. Michaelis, M. L., *Biochem. Z.* **1913**, 333-369; 'Die Kinetik der Invertinwirkung'.
- [109] U. T. Bornscheuer, B. Hauer, K. E. Jaeger, U. Schwaneberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 36-40; 'Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals'.
- [110] U. T. Bornscheuer, B. Hauer, K. E. Jaeger, U. Schwaneberg, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 36-41; 'Gerichtete Evolution ermöglicht das Design von maßgeschneiderten Proteinen zur nachhaltigen Produktion von Chemikalien und Pharmazeutika'.
- [111] B. Baumer, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 2894-2901; 'Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [NADP(H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis'.
- [112] M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138-174; 'Laboratory evolution of stereoselective enzymes: a prolific source of catalysts for asymmetric reactions'.
- [113] G. Qu, A. Li, C. G. Acevedo-Rocha, Z. Sun, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 13204-13231; 'The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes'.
- [114] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144-182; 'Gerichtete Evolution stereoselektiver Enzyme: Eine ergiebige Katalysator-Quelle für asymmetrische Reaktionen'.
- [115] G. Qu, A. Li, C. G. Acevedo-Rocha, Z. Sun, M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 13304-13333; 'Die zentrale Rolle der Methodenentwicklung in der gerichteten Evolution selektiver Enzyme'.

- [116] H. Lu, D. J. Diaz, N. J. Czarnecki, C. Zhu, W. Kim, R. Shroff, D. J. Acosta, B. R. Alexander, H. O. Cole, Y. Zhang, *Nature* **2022**, *604*, 662-667; 'Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization'.
- [117] F. Sabuzi, E. Churakova, P. Galloni, R. Wever, F. Hollmann, B. Floris, V. Conte, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 3519-3525; 'Thymol Bromination - A Comparison between Enzymatic and Chemical Catalysis'.
- [118] M. Hobisch, D. Holtmann, P. Gomez de Santos, M. Alcalde, F. Hollmann, S. Kara, *Biotech. Adv.* **2020**, 107615; 'Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations'.
- [119] M. L. Mascotti, M. J. Ayub, N. Furnham, J. M. Thornton, R. A. Laskowski, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3131-3146; 'Chopping and changing: the evolution of the flavin-dependent monooxygenases'.
- [120] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. Van Pee, J. H. Naismith, *Science* **2005**, *309*, 2216-2219; 'Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination'.
- [121] J. Latham, E. Brandenburger, S. A. Shepherd, B. R. K. Menon, J. Micklefield, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 232-269; 'Development of Halogenase Enzymes for Use in Synthesis'.
- [122] V. Weichold, D. Milbredt, K. H. van Pee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6374-6389; 'Specific Enzymatic Halogenation-From the Discovery of Halogenated Enzymes to Their Applications *In Vitro* and *In Vivo*'.
- [123] V. Weichold, D. Milbredt, K. H. van Pée, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 6482-6498; 'Die spezifische enzymatische Halogenierung–von der Entdeckung halogenierender Enzyme bis zu deren Anwendung *in vitro* und *in vivo*'.
- [124] C. Seibold, H. Schnerr, J. Rumpf, A. Kunzendorf, C. Hatscher, T. Wage, A. J. Ernyei, C. Dong, J. H. Naismith, K.-H. Van Pée, *Biocatal. Biotransfor.* **2006**, *24*, 401-408; 'A flavin-dependent tryptophan 6-halogenase and its use in modification of pyrrolnitrin biosynthesis'.
- [125] J. K. Lee, H. Zhao, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8556-8563; 'Identification and characterization of the flavin:NADH reductase (PrnF) involved in a novel two-component arylamine oxygenase'.
- [126] S. Kirner, P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K.-H. van Pée, J. M. Ligon, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1939-1943; 'Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*'.
- [127] Q. Yan, B. Philmus, J. H. Chang, J. E. Loper, *eLife* **2017**, *6*; 'Novel mechanism of metabolic co-regulation coordinates the biosynthesis of secondary metabolites in *Pseudomonas protegens*'.
- [128] P. C. Dorrestein, E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13843-13848; 'Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH<sub>2</sub>-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis'.
- [129] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K. H. Van Pée, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2102-2104; 'NADH-abhängige Halogenasen sind wahrscheinlich eher an der Biosynthese von Halogenmetaboliten beteiligt als Haloperoxidasen'.
- [130] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K. H. van Pée, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2380-2382; 'Purification and Partial Characterization of Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*'.
- [131] E. Yeh, S. Garneau, C. T. Walsh, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 3960-3965; 'Robust *in vitro* activity of RebF and RebH, a two-component

- reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis'.
- [132] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K. H. van Pée, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2012-2013; 'NADH-Dependent Halogenases Are More Likely To Be Involved in Halometabolite Biosynthesis Than Haloperoxidases'.
- [133] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Hölzer, E. Eichhorn, K. H. van Pée, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2380-2382; 'Reinigung und teilweise Charakterisierung der Tryptophan-7-Halogenase (PrnA) aus *Pseudomonas fluorescens*'.
- [134] M. Eschenbrenner, J. Covès, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20550-20555; 'The flavin reductase activity of the flavoprotein component of sulfite reductase from *Escherichia coli* a new model for the protein structure'.
- [135] J. R. Heemstra Jr, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14024-14025; 'Tandem action of the O<sub>2</sub>-and FADH<sub>2</sub>-dependent halogenases KtzQ and KtzR produce 6, 7-dichlorotryptophan for kutzneride assembly'.
- [136] S. A. Shepherd, C. Karthikeyan, J. Latham, A.-W. Struck, M. L. Thompson, B. R. Menon, M. Q. Styles, C. Levy, D. Leys, J. Micklefield, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3454-3460; 'Extending the biocatalytic scope of regiocomplementary flavin-dependent halogenase enzymes'.
- [137] S. Unversucht, F. Hollmann, A. Schmid, K. H. van Pée, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1163-1167; 'FADH<sub>2</sub>-dependence of tryptophan 7-halogenase'.
- [138] L. Schroeder, M. Frese, C. Müller, N. Sewald, T. Kottke, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 3336-3341; 'Photochemically Driven Biocatalysis of Halogenases for the Green Production of Chlorinated Compounds'.
- [139] C. Wagner, M. El Omari, G. M. König, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 540-553; 'Biohalogenation: nature's way to synthesize halogenated metabolites'.
- [140] S. Zehner, A. Kotzsch, B. Bister, R. D. Süssmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Pée, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445-452; 'A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005'.
- [141] P. R. Neubauer, C. Widmann, D. Wibberg, L. Schröder, M. Frese, T. Kottke, J. Kalinowski, H. H. Niemann, N. Sewald, *PLoS one* **2018**, *13*, e0196797; 'A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination'.
- [142] E. Yeh, L. C. Blasiak, A. Koglin, C. L. Drennan, C. T. Walsh, *Biochem.* **2007**, *46*, 1284-1292; 'Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases'.
- [143] M. Ismail, M. Frese, T. Patschkowski, V. Ortseifen, K. Niehaus, N. Sewald, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 1-13; 'Flavin-Dependent Halogenases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 Prefer Bromination over Chlorination'.
- [144] B. R. K. Menon, E. Brandenburger, H. H. Sharif, U. Klemstein, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11841-11845; 'RadH: A Versatile Halogenase for Integration into Synthetic Pathways'.
- [145] B. R. Menon, E. Brandenburger, H. H. Sharif, U. Klemstein, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12003-12007; 'RadH: A versatile halogenase for integration into synthetic pathways'.
- [146] I. Kemker, C. Schnepel, D. C. C. Schröder, A. Marion, N. Sewald, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 7417-7430; 'Cyclization of RGD peptides by Suzuki-Miyaura cross-coupling'.

- [147] M. Mantri, T. Krojer, E. A. Bagg, C. J. Webby, D. S. Butler, G. Kochan, K. L. Kavanagh, U. Oppermann, M. A. McDonough, C. J. Schofield, *J. Mol. Biol.* **2010**, *401*, 211-222; 'Crystal structure of the 2-oxoglutarate-and Fe(II)-dependent lysyl hydroxylase JMJD6'.
- [148] L. C. Blasiak, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, C. L. Drennan, *Nature* **2006**, *440*, 368; 'Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis'.
- [149] Z. Zhang, J.-s. Ren, K. Harlos, C. H. McKinnon, I. J. Clifton, C. J. Schofield, *FEBS Lett.* **2002**, *517*, 7-12; 'Crystal structure of a clavamate synthase–Fe(II)–2-oxoglutarate–substrate–NO complex: evidence for metal centred rearrangements'.
- [150] S. Martinez, M. Fellner, C. Q. Herr, A. Ritchie, J. Hu, R. P. Hausinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11980-11988; 'Structures and mechanisms of the non-heme Fe (II)-and 2-oxoglutarate-dependent ethylene-forming enzyme: substrate binding creates a twist'.
- [151] S. D. Wong, M. Srnec, M. L. Matthews, L. V. Liu, Y. Kwak, K. Park, C. B. Bell III, E. E. Alp, J. Zhao, Y. Yoda, *Nature* **2013**, *499*, 320; 'Elucidation of the Fe (IV)= O intermediate in the catalytic cycle of the halogenase SyrB2'.
- [152] M. L. Matthews, C. S. Neumann, L. A. Miles, T. L. Grove, S. J. Booker, C. Krebs, C. T. Walsh, J. M. Bollinger, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 17723-17728; 'Substrate positioning controls the partition between halogenation and hydroxylation in the aliphatic halogenase, SyrB2'.
- [153] F. H. Vaillancourt, J. Yin, C. T. Walsh, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 10111-10116; 'SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII  $\alpha$ -ketoglutarate- and O<sub>2</sub>-dependent halogenase'.
- [154] P. M. Flatt, S. J. O'Connell, K. L. McPhail, G. Zeller, C. L. Willis, D. H. Sherman, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 938-944; 'Characterization of the initial enzymatic steps of barbamide biosynthesis'.
- [155] P. Moosmann, R. Ueoka, M. Gugger, J. r. Piel, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5238-5241; 'Aranazoles: Extensively Chlorinated Nonribosomal Peptide–Polyketide Hybrids from the Cyanobacterium *Fischerella* sp. PCC 9339'.
- [156] M. L. Matthews, C. M. Krest, E. W. Barr, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, M. T. Green, C. Krebs, J. M. Bollinger Jr, *Biochem.* **2009**, *48*, 4331-4343; 'Substrate-triggered formation and remarkable stability of the C– H bond-cleaving chloroferryl intermediate in the aliphatic halogenase, SyrB2'.
- [157] K. D. Welch, T. Z. Davis, S. D. Aust, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *397*, 360-369; 'Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators'.
- [158] M. L. Hillwig, X. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 921; 'A new family of iron-dependent halogenases acts on freestanding substrates'.
- [159] M. L. Hillwig, Q. Zhu, K. Ittiamornkul, X. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5780-5784; 'Discovery of a Promiscuous Non-Heme Iron Halogenase in Ambiguine Alkaloid Biogenesis: Implication for an Evolvable Enzyme Family for Late-Stage Halogenation of Aliphatic Carbons in Small Molecules'.
- [160] M. L. Hillwig, Q. Zhu, K. Ittiamornkul, X. Liu, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5874-5878; 'Discovery of a promiscuous non-heme iron halogenase in ambiguine alkaloid biogenesis: implication for an evolvable enzyme family for late-stage halogenation of aliphatic carbons in small molecules'.
- [161] T. Hayashi, M. Ligibel, E. Sager, M. Voss, J. Hunziker, K. Schroer, R. Snajdrova, R. Buller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 18535-18539; 'Evolved Aliphatic

- Halogenases Enable Regiocomplementary C-H Functionalization of an Added-Value Chemical'.
- [162] T. Hayashi, M. Ligibel, E. Sager, M. Voss, J. Hunziker, K. Schroer, R. Snajdrova, R. Buller, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 18706-18711; 'Evolvierte aliphatische Halogenasen ermöglichen die regiokomplementäre C-H-Funktionalisierung einer hochwertigen Chemikalie'.
- [163] A. J. Mitchell, N. P. Dunham, J. A. Bergman, B. Wang, Q. Zhu, W.-C. Chang, X. Liu, A. K. Boal, *Biochem.* **2017**, *56*, 441-444; 'Structure-guided reprogramming of a hydroxylase to halogenate its small molecule substrate'.
- [164] C. Schaffrath, H. Deng, D. O'Hagan, *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 111-114; 'Isolation and characterisation of 5'-fluorodeoxyadenosine synthase, a fluorination enzyme from *Streptomyces cattleya*'.
- [165] D. O'Hagan, H. Deng, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 634-649; 'Enzymatic fluorination and biotechnological developments of the fluorinase'.
- [166] C. D. Cadicamo, J. Courtieu, H. Deng, A. Meddour, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 685-690; 'Enzymatic fluorination in *Streptomyces cattleya* takes place with an inversion of configuration consistent with an S<sub>N</sub>2 reaction mechanism'.
- [167] C. Dong, F. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J. B. Spencer, D. O'Hagan, J. H. Naismith, *Nature* **2004**, *427*, 561; 'Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme'.
- [168] D. C. Lohman, D. R. Edwards, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14473-14475; 'Catalysis by desolvation: the catalytic prowess of SAM-dependent halide-alkylating enzymes'.
- [169] A. S. Eustáquio, D. O'Hagan, B. S. Moore, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 378-382; 'Engineering fluorometabolite production: fluorinase expression in *Salinispora tropica* yields fluorosalinosporamide'.
- [170] S. Thompson, M. Onega, S. Ashworth, I. N. Fleming, J. Passchier, D. O'Hagan, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13542-13545; 'A two-step fluorinase enzyme mediated 18 F labelling of an RGD peptide for positron emission tomography'.
- [171] M. C. Walker, B. W. Thuronyi, L. K. Charkoudian, B. Lowry, C. Khosla, M. C. Chang, *Science* **2013**, *341*, 1089-1094; 'Expanding the fluorine chemistry of living systems using engineered polyketide synthase pathways'.
- [172] H. Deng, S. L. Cobb, A. R. McEwan, R. P. McGlinchey, J. H. Naismith, D. O'Hagan, D. A. Robinson, J. B. Spencer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 759-762; 'The fluorinase from *Streptomyces cattleya* is also a chlorinase'.
- [173] H. Deng, S. L. Cobb, A. R. McEwan, R. P. McGlinchey, J. H. Naismith, D. O'Hagan, D. A. Robinson, J. B. Spencer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *118*, 773-776; 'The fluorinase from *Streptomyces cattleya* is also a chlorinase'.
- [174] H. Sun, H. Zhao, E. Ang, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9458-9461; 'A coupled chlorinase-fluorinase system with a high efficiency of trans-halogenation and a shared substrate tolerance'.
- [175] P. T. Lowe, S. Dall'Angelo, T. Mulder-Krieger, A. P. IJzerman, M. Zanda, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2156-2164; 'A New Class of Fluorinated A2A Adenosine Receptor Agonist with Application to Last-Step Enzymatic [<sup>18</sup>F] Fluorination for PET Imaging'.
- [176] P. T. Lowe, S. Dall'Angelo, I. N. Fleming, M. Piras, M. Zanda, D. O'Hagan, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1480-1486; 'Enzymatic radiosynthesis of a <sup>18</sup>F-Glu-Ureido-Lys ligand for the prostate-specific membrane antigen (PSMA)'.
- [177] P. T. Lowe, S. Dall'Angelo, A. Devine, M. Zanda, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1969-1978; 'Enzymatic Fluorination of Biotin and Tetrazine Conjugates for Pretargeting Approaches to Positron Emission Tomography Imaging'.

- [178] H. Deng, L. Ma, N. Bandaranayaka, Z. Qin, G. Mann, K. Kyeremeh, Y. Yu, T. Shepherd, J. H. Naismith, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 364-368; 'Identification of fluorinases from *Streptomyces* sp MA37, *Nocardia brasiliensis*, and *Actinoplanes* sp N902-109 by Genome Mining'.
- [179] L. Ma, Y. Li, L. Meng, H. Deng, Y. Li, Q. Zhang, A. Diao, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 27047-27051; 'Biological fluorination from the sea: discovery of a SAM-dependent nucleophilic fluorinating enzyme from the marine-derived bacterium *Streptomyces xinghaiensis* NRRL B24674'.
- [180] H. Sun, W. L. Yeo, Y. H. Lim, X. Chew, D. J. Smith, B. Xue, K. P. Chan, R. C. Robinson, E. G. Robins, H. Zhao, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 14489-14492; 'Directed Evolution of a Fluorinase for Improved Fluorination Efficiency with a Non-native Substrate'.
- [181] H. Sun, W. L. Yeo, Y. H. Lim, X. Chew, D. J. Smith, B. Xue, K. P. Chan, R. C. Robinson, E. G. Robins, H. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14277-14280; 'Directed evolution of a fluorinase for improved fluorination efficiency with a non-native substrate'.
- [182] W. Yeo, X. Chew, D. Smith, K. Chan, H. Sun, H. Zhao, Y. Lim, E. Ang, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2559-2562; 'Probing the molecular determinants of fluorinase specificity'.
- [183] S. Thompson, S. A. McMahon, J. H. Naismith, D. O'Hagan, *Bioorg. Chem.* **2016**, *64*, 37-41; 'Exploration of a potential difluoromethyl-nucleoside substrate with the fluorinase enzyme'.
- [184] R. Ullrich, M. Hofrichter, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6247-6250; 'The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene'.
- [185] D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1763-1768; 'Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein'.
- [186] K. Kuhnle, W. Blankenfeldt, J. Terner, I. Schlichting, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23990-23998; 'Crystal structures of chloroperoxidase with its bound substrates and complexed with formate, acetate, and nitrate'.
- [187] A. Butler, M. Sandy, *Nature* **2009**, *460*, 848-854; 'Mechanistic considerations of halogenating enzymes'.
- [188] M. Buchhaupt, S. Huttmann, C. C. Sachs, S. Bormann, A. Hannappel, J. Schrader, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 237-243; '*Caldariomyces fumago* DSM1256 Contains Two Chloroperoxidase Genes, Both Encoding Secreted and Active Enzymes'.
- [189] C. M. Reddy, L. Xu, N. J. Drenzek, N. C. Sturchio, L. J. Heraty, C. Kimblin, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14526-14527; 'A chlorine isotope effect for enzyme-catalyzed chlorination'.
- [190] M. A. Pickard, *Can. J. Microbiol.* **1981**, *27*, 1298-1305; 'A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by *Caldariomyces fumago*'.
- [191] J. A. Manthey, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11232-11238; 'Purification and properties of bromoperoxidase from *Penicillium capitatus*'.
- [192] K. H. van Pée, F. Lingens, **1985**, *161*, 1171-1175; 'Purification of bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*'.
- [193] D. G. Baden, M. D. Corbett, *The Biochemical Journal* **1980**, *187*, 205-211; 'Bromoperoxidases from *Penicillium capitatus*, *Penicillium lamourouxii* and *Rhizocephalus phoenix*'.
- [194] J. W. van Schijndel, E. G. Vollenbroek, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1161*, 249-256; 'The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme'.

- [195] J. W. P. M. Van Schijndel, P. Barnett, J. Roelse, E. G. M. Vollenbroek, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 151-157; 'The Stability and Steady-State Kinetics of Vanadium Chloroperoxidase from the Fungus *Curvularia Inaequalis*'.
- [196] P. Barnett, D. L. Kruitbosch, W. Hemrika, H. L. Dekker, R. Wever, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1997**, *1352*, 73-84; 'The regulation of the vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*'.
- [197] C. Rush, A. Willetts, G. Davies, Z. Dauter, H. Watson, J. Littlechild, *FEBS Lett.* **1995**, *359*, 244-246; 'Purification, crystallisation and preliminary X-ray analysis of the vanadium-dependent haloperoxidase from *Corallina officinalis*'.
- [198] R. Wever, *In Vanadium: Biochemical and Molecular Biological Approaches*, Springer: New York, **2012**.
- [199] C. Leblanc, H. Vilter, J. B. Fournier, L. Delage, P. Potin, E. Rebuffet, G. Michel, P. L. Solari, M. C. Feiters, M. Czjzek, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301-302*, 134-146; 'Vanadium haloperoxidases: From the discovery 30 years ago to X-ray crystallographic and V K-edge absorption spectroscopic studies'.
- [200] A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 392-396; 'X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*'.
- [201] R. Wever, B. E. Krenn, R. Renirie, *Methods Enzymol.* **2018**, *605*, 141-201; 'Marine Vanadium-Dependent Haloperoxidases, Their Isolation, Characterization, and Application'.
- [202] H. R. Thapa, V. Agarwal, *J. Phycol.* **2021**, *57*, 1131-1139; 'Obligate brominating enzymes underlie bromoform production by marine cyanobacteria'.
- [203] G. Anderson, R. N. Behera, R. Gomatam, **2021**; 'Evidence for an *N*-halohistidyl Intermediate in the Catalytic Cycle of Vanadium Chloroperoxidase (VCPO) and an Artificial Enzyme derived from VCPO: A Computational Investigation'.
- [204] M. Q. E. Mubarak, E. F. Gérard, C. F. Blanford, S. Hay, S. P. de Visser, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 14067-14079; 'How Do Vanadium Chloroperoxidases Generate Hypochlorite from Hydrogen Peroxide and Chloride? A Computational Study'.
- [205] W. Hemrika, R. Renirie, S. Macedo-Ribeiro, A. Messerschmidt, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23820-23827; 'Heterologous Expression of the Vanadium-containing Chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* in *Saccharomyces cerevisiae* and Site-directed Mutagenesis of the Active Site Residues His496, Lys353, Arg360, and Arg490'.
- [206] E. Fernandez-Fueyo, M. van Wingerden, R. Renirie, R. Wever, Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4035-4038; 'Chemoenzymatic Halogenation of Phenols by using the Haloperoxidase from *Curvularia inaequalis*'.
- [207] J. J. Dong, E. Fernández-Fueyo, J. Li, Z. Guo, R. Renirie, R. Wever, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6207-6210; 'Halofunctionalization of alkenes by vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*'.
- [208] E. E. Coupe, M. G. Smyth, A. P. Fosberry, R. M. Hall, J. A. Littlechild, *Protein Expres. Purif.* **2007**, *52*, 265-272; 'The dodecameric vanadium-dependent haloperoxidase from the marine algae *Corallina officinalis*: Cloning, expression, and refolding of the recombinant enzyme'.
- [209] P. Bernhardt, T. Okino, J. M. Winter, A. Miyana, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4268-4270; 'A stereoselective vanadium-dependent chloroperoxidase in bacterial antibiotic biosynthesis'.
- [210] S. M. K. McKinnie, Z. D. Miles, P. A. Jordan, T. Awakawa, H. P. Pepper, L. A. M. Murray, J. H. George, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 17840-17845; 'Total Enzyme Syntheses of Napyradiomycins A1 and B1'.

- [211] S. M. K. McKinnie, Z. D. Miles, B. S. Moore, *Methods Enzymol.* **2018**, *604*, 405-424; 'Characterization and Biochemical Assays of Streptomyces Vanadium-Dependent Chloroperoxidases'.
- [212] B. S. Moore, *Synlett* **2018**, *29*, 401-409; 'Asymmetric Alkene and Arene Halofunctionalization Reactions in Meroterpenoid Biosynthesis'.
- [213] Z. D. Miles, S. Diethelm, H. P. Pepper, D. M. Huang, J. H. George, B. S. Moore, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 1235-1242; 'A unifying paradigm for naphthoquinone-based meroterpenoid (bio)synthesis'.
- [214] R. Teufel, L. Kaysser, M. T. Villaume, S. Diethelm, M. K. Carbullido, P. S. Baran, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11019-11022; 'One-Pot Enzymatic Synthesis of Merochlorin A and B'.
- [215] S. Diethelm, R. Teufel, L. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11023-11026; 'A Multitasking Vanadium-Dependent Chloroperoxidase as an Inspiration for the Chemical Synthesis of the Merochlorins'.
- [216] R. Teufel, L. Kaysser, M. T. Villaume, S. Diethelm, M. K. Carbullido, P. S. Baran, B. S. Moore, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11199-11202; 'One-Pot Enzymatic Synthesis of Merochlorin A and B'.
- [217] S. Diethelm, R. Teufel, L. Kaysser, B. S. Moore, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11203-11206; 'A Multitasking Vanadium-Dependent Chloroperoxidase as an Inspiration for the Chemical Synthesis of the Merochlorins'.
- [218] K.-H. Van Peè, *Arch. Microbiol.* **2001**, *175*, 250-258; 'Microbial biosynthesis of halometabolites'.
- [219] B. Hofmann, S. Tolzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K. H. van Pee, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 889-900; 'Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases'.
- [220] J. Littlechild, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 28-34; 'Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions'.
- [221] K. H. van Peè, C. Dong, S. Flecks, J. Naismith, E. P. Patallo, T. Wage, *Advances in Applied Microbiology* **2006**, *59*, 127-157; 'Biological halogenation has moved far beyond haloperoxidases'.
- [222] C. Wagner, I. M. Molitor, G. M. König, *Phytochem.* **2008**, *69*, 323-332; 'Critical view on the monochlorodimedone assay utilized to detect haloperoxidase activity'.
- [223] H. China, Y. Okada, T. Dohi, *Asian J. Org. Chem.* **2015**, *4*, 1065-1074; 'The Multiple Reactions in the Monochlorodimedone Assay: Discovery of Unique Dehalolactonizations under Mild Conditions'.
- [224] A. Frey, B. Meckelein, D. Externest, M. A. Schmidt, *J. Immunol. Methods* **2000**, *233*, 47-56; 'A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays'.
- [225] A. J. Kettle, A. M. Albrett, A. L. Chapman, N. Dickerhof, L. V. Forbes, I. Khalilova, R. Turner, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 781-793; 'Measuring chlorine bleach in biology and medicine'.
- [226] B. Bekdeşer, G. Zeytünlü, M. Özyürek, M. R. Apak, *Turk. J. Chem.* **2018**, *42*, 429-438; 'A novel hypobromous acid scavenging activity assay using *p*-cresol as a spectrofluorometric probe'.
- [227] K. Zamojc, M. Zdrowowicz, D. Jacewicz, D. Wyrzykowski, L. Chmurzynski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46*, 171-200; 'Fluorescent Probes Used for Detection of Hydrogen Peroxide under Biological Conditions'.
- [228] A. S. Aslan-Üzel, A. Beier, D. Kovář, C. Cziegler, S. K. Padhi, E. D. Schuiten, M. Dörr, D. Böttcher, F. Hollmann, F. Rudroff, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2032-2039;

- 'An Ultrasensitive Fluorescence Assay for the Detection of Halides and Enzymatic Dehalogenation'.
- [229] C. Schnepel, H. Minges, M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14159-14163; 'A High-Throughput Fluorescence Assay to Determine the Activity of Tryptophan Halogenases'.
- [230] C. Schnepel, H. Minges, M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 14365-14369; 'Ein Hochdurchsatz-Fluoreszenz-Assay zur Bestimmung der Aktivität von Tryptophan-Halogenasen'.
- [231] L. Getrey, T. Krieg, F. Hollmann, J. Schrader, D. Holtmann, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1104-1108; 'Enzymatic halogenation of the phenolic monoterpenes thymol and carvacrol with chloroperoxidase'.
- [232] J. Naapuri, J. D. Rolfes, J. Keil, C. Manzuna Sapu, J. Deska, *Green Chem.* **2017**, *19*, 447-452; 'Enzymatic halocyclization of allenic alcohols and carboxylates: a biocatalytic entry to functionalized O-heterocycles'.
- [233] S. R. Blanke, S. Yi, L. P. Hager, *Biotechnol. Lett.* **1989**, *11*, 769-774; 'Development of Semi-Continuous and Continuous-Flow Bioreactors for the High-Level Production of Chloroperoxidase'.
- [234] H. Yamada, N. Itoh, Y. Izumi, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 11962-11969; 'Chloroperoxidase-catalyzed halogenation of *trans*-cinnamic acid and its derivatives'.
- [235] E. J. Allain, L. P. Hager, L. Deng, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4415-4416; 'Highly Enantioselective Epoxidation of Disubstituted Alkenes with Hydrogen-Peroxide Catalyzed by Chloroperoxidase'.
- [236] A. But, A. van Noord, F. Poletto, J. P. M. Sanders, M. C. R. Franssen, E. L. Scott, *Mol. Catal.* **2017**, *443*, 92-100; 'Enzymatic halogenation and oxidation using an alcohol oxidase-vanadium chloroperoxidase cascade'.
- [237] S. H. Chen, J. A. Zhang, Z. G. Zeng, Z. J. Dai, Q. H. Wang, R. Wever, F. Hollmann, W. Y. Zhang, *Mol. Catal.* **2022**, *517*, 112061; 'Chemoenzymatic intermolecular haloether synthesis'.
- [238] J. M. Naapuri, P. K. Wagner, F. Hollmann, J. Deska, *ChemistryOpen* **2022**, *11*, e202100236; 'Enzymatic Bromocyclization of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Allenols by Chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*'.
- [239] D. Holtmann, S. Bormann, M. van Schie, T. P. De Almeida, W. Zhang, M. Stockl, R. Ulber, F. Hollmann, *ChemSusChem* **2019**, *0*; 'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production at low overpotentials for electro-enzymatic halogenation reactions'.
- [240] J. Zhang, C. Roberge, J. Reddy, N. Connors, M. Chartrain, B. Buckland, R. Greasham, *Enz. Microbial Technol.* **1999**, *24*, 86-95; 'Bioconversion of indene to *trans*-2*S*,1*S*-bromoindanol and 1*S*,2*R*-indene oxide by a bromoperoxidase/dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400'.
- [241] P. Coughlin, S. Roberts, C. Rush, A. Willetts, *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 907-912; 'Biotransformation of Alkenes by Haloperoxidases - Regiospecific Bromohydrin Formation from Cinnamyl Substrates'.
- [242] M. Andersson, A. Willetts, S. Allenmark, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8455-8458; 'Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium-containing bromoperoxidase'.
- [243] R. Medici, J. I. Garaycochea, L. A. Dettorre, A. M. Iribarren, E. S. Lewkowicz, *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 1999-2003; 'Biocatalysed halogenation of nucleobase analogues'.
- [244] H. China, H. Ogino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *516*, 327-332; 'A useful propionate cofactor enhancing activity for organic solvent-tolerant

recombinant metal-free bromoperoxidase (perhydrolase) from *Streptomyces aureofaciens*'.

- [245] N. G. Anderson, *Practical process research and development: a guide for organic chemists*, Academic Press, **2012**.
- [246] J. H. Atherton, K. J. Carpenter, *Oxford Chemistry Primers* **1999**, 79, 1-88; 'Process Development: Physicochemical Concepts'.
- [247] N. G. Anderson, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, 16, 852-869; 'Using Continuous Processes to Increase Production'.
- [248] S. V. Luis, E. García-Verdugo, *Chemical reactions and processes under flow conditions*, Royal Society of Chemistry, **2010**.
- [249] W. Kleemiss, T. Kalz, Google Patents, **1998**.
- [250] J. S. Clarkson, A. J. Walker, M. A. Wood, *Org. Process Res. Dev.* **2001**, 5, 630-635; 'Continuous reactor technology for ketal formation: an improved synthesis of solketal'.
- [251] H.-H. Tung, E. L. Paul, M. Midler, J. A. McCauley, *Crystallization of organic compounds: an industrial perspective*, John Wiley & Sons, **2009**.
- [252] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6290-6307; 'Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization'.
- [253] L. Tamborini, P. Fernandes, F. Paradisi, F. Molinari, *Trends Biotechnol.* **2018**, 36, 73-88; 'Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification'.
- [254] A. I. Benítez-Mateos, M. L. Contente, D. Roura Padrosa, F. Paradisi, *React. Chem. Eng.* **2021**, 6, 599-611; 'Flow biocatalysis 101: design, development and applications'.
- [255] M. Janssen, C. Müller, D. Vogt, *Green Chem.* **2011**, 13, 2247-2257; 'Recent advances in the recycling of homogeneous catalysts using membrane separation'.
- [256] A. Liese, L. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6236-6249; 'Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications'.
- [257] P. De Santis, L.-E. Meyer, S. Kara, *React. Chem. Eng.* **2020**, 5, 2155-2184; 'The rise of continuous flow biocatalysis – fundamentals, very recent developments and future perspectives'.
- [258] J. Coloma, Y. Guiavarc'h, P.-L. Hagedoorn, U. Hanefeld, *Chem. Commun.* **2021**; 'Immobilisation and flow chemistry: tools for implementing biocatalysis'.
- [259] I. I. Junior, M. C. Flores, F. K. Sutili, S. G. F. Leite, L. S. de M. Miranda, I. C. R. Leal, R. O. M. A. de Souza, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, 16, 1098-1101; 'Lipase-Catalyzed Monostearin Synthesis under Continuous Flow Conditions'.
- [260] J. M. Bolivar, B. Nidetzky, *Chimica Oggi* **2013**, 31, 50-54; 'Smart enzyme immobilization in microstructured reactors'.
- [261] R. Wohlgemuth, I. Plazl, P. Žnidaršič-Plazl, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2015**, 33, 302-314; 'Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis'.
- [262] E. Laurenti, A. dos Santos Vianna Jr, *Biocatalysis* **2016**, 1, 148-165; 'Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives'.
- [263] L. Hajba, A. Guttman, *J. Flow Chem.* **2016**, 6, 8-12; 'Continuous-flow biochemical reactors: Biocatalysis, bioconversion, and bioanalytical applications utilizing immobilized microfluidic enzyme reactors'.
- [264] A. Šalić, K. Pindrić, G. Hojnik Podrepšek, N. Novosel, M. Leitgeb, B. Zelić, *J. Flow Chem.* **2016**, 6, 27-32; 'NADH oxidation in a microreactor with an oscillating magnetic field'.

- [265] M. V. Volokitina, A. V. Nikitina, T. B. Tennikova, E. G. Korzhikova-Vlakh, *Electrophoresis* **2017**, *38*, 2931-2939; 'Immobilized enzyme reactors based on monoliths: Effect of pore size and enzyme loading on biocatalytic process'.
- [266] D. Valikhani, J. M. Bolivar, M. Pfeiffer, B. Nidetzky, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 161-166; 'Multivalency Effects on the Immobilization of Sucrose Phosphorylase in Flow Microchannels and Their Use in the Development of a High-Performance Biocatalytic Microreactor'.
- [267] N. Miložič, M. Lubej, M. Lakner, P. Žnidaršič-Plazl, I. Plazl, *Chem. Eng. J.* **2017**, *313*, 374-381; 'Theoretical and experimental study of enzyme kinetics in a microreactor system with surface-immobilized biocatalyst'.
- [268] H. Nguyen Hoang, M. Kim, *Applied Science and Convergence Technology* **2017**, *26*, 157-163; 'An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization'.
- [269] S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, *3 Biotech* **2013**, *3*, 1-9; 'Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials'.
- [270] J. Dobber, M. Pohl, *J. Biotechnol.* **2017**, *241*, 170-174; 'HaloTag: Evaluation of a covalent one-step immobilization for biocatalysis'.
- [271] M. Romero-Fernández, F. Paradisi, in *Catalyst Immobilization*, **2020**, pp. 409-435.
- [272] G. Ölçücü, O. Klaus, K.-E. Jaeger, T. Drepper, U. Krauss, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2021**, *9*, 8919-8945; 'Emerging solutions for in vivo biocatalyst immobilization: tailor-made catalysts for industrial biocatalysis'.
- [273] G. Ölçücü, B. Baumer, K. Küsters, K. Möllenhoff, M. Oldiges, J. r. Pietruszka, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ACS Synth. Biol.* **2022**; 'Catalytically Active Inclusion Bodies— Benchmarking and Application in Flow Chemistry'.
- [274] C.-H. Yun, J. Kim, F. Hollmann, C. B. Park, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 12260-12279; 'Light-driven biocatalytic oxidation'.
- [275] H. L. Wapshott-Stehli, A. M. Grunden, *Enz. Microbial Technol.* **2021**, 109744; 'In situ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation methods in the context of enzyme biocatalysis'.
- [276] S. C. Cosgrove, A. P. Matthey, M. Riese, M. R. Chapman, W. R. Birmingham, A. J. Blacker, N. Kapur, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 11658-11662; 'Biocatalytic oxidation in continuous flow for the generation of carbohydrate dialdehydes'.
- [277] W. Böhmer, A. Volkov, K. Engelmark Cassimjee, F. G. Mutti, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1858-1867; 'Continuous Flow Bioamination of Ketones in Organic Solvents at Controlled Water Activity using Immobilized  $\omega$ -Transaminases'.
- [278] M. A. do Nascimento, L. E. Gotardo, R. A. Leão, A. M. de Castro, R. O. de Souza, I. Itabaiana Jr, *ACS Omega* **2019**, *4*, 860-869; 'Enhanced productivity in glycerol carbonate synthesis under continuous flow conditions: combination of immobilized lipases from Porcine Pancreas and *Candida antarctica* (CALB) on Epoxy Resins'.
- [279] M. Alotaibi, J. C. Manayil, G. M. Greenway, S. J. Haswell, S. M. Kelly, A. F. Lee, K. Wilson, G. Kyriakou, *React. Chem. Eng.* **2018**, *3*, 68-74; 'Lipase immobilised on silica monoliths as continuous-flow microreactors for triglyceride transesterification'.
- [280] A. Conesa, F. van de Velde, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, C. A. M. J. J. van den Hondel, P. J. Punt, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17635-17640; 'Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme'.
- [281] S. Myllek, Bachelorthesis thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2019**.
- [282] T. Classen, Dissertation thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2013**.

- [283] J. G. Thomas, A. Ayling, F. Baneyx, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *66*, 197-238; 'Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*'.
- [284] E. P. O'Brien, P. Ciryam, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1536-1544; 'Understanding the Influence of Codon Translation Rates on Cotranslational Protein Folding'.
- [285] J. G. Thomas, F. Baneyx, *Protein Express. Purif.* **1997**, *11*, 289-296; 'Divergent Effects of Chaperone Overexpression and Ethanol Supplementation on Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli*'.
- [286] F. W. Studier, *Protein Express. Purif.* **2005**, *41*, 207-234; 'Protein production by auto-induction in high density shaking cultures'.
- [287] J. N. Carter, K. E. Beatty, M. T. Simpson, A. Butler, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 59-69; 'Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*'.
- [288] Z. Hasan, R. Renirie, R. Kerkman, H. J. Ruijssenaars, A. F. Hartog, R. Wever, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9738-9744; 'Laboratory-evolved vanadium chloroperoxidase exhibits 100-fold higher halogenating activity at alkaline pH: catalytic effects from first and second coordination sphere mutations'.
- [289] W. Peti, R. Page, *Protein Express. Purif.* **2007**, *51*, 1-10; 'Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost'.
- [290] L. M. Hinman, J. P. Blass, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 6583-6586; 'An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates'.
- [291] W. Lohmann, *Zeitschrift für Naturforschung C* **1974**, *29*, 493-495; 'Halogen-Substitution Effect on the Optical Absorption Bands of Uracil\*'
- [292] D. Mazia, P. A. Brewer, M. Alfert, *The Biological Bulletin* **1953**, *104*, 57-67; 'The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue'.
- [293] J.-P. Goddard, J.-L. Reymond, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 314-322; 'Enzyme assays for high-throughput screening'.
- [294] D. A. Armbruster, T. Pry, *Clinical Biochemistry Reviews* **2008**, *29*, 49-52; 'Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation'.
- [295] A. V. Fejzagic, S. Myllek, F. Hogenkamp, J. Greb, J. Pietruszka, T. Classen, *ChemistryOpen* **2020**, *9*, 959-966; 'A Fluorescence-Based Assay System for the Determination of Haloperoxidase-Activity Using a Two-Dimensional Calibration Approach'.
- [296] A. Butler, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *187*, 17-35; 'Mechanistic considerations of the vanadium haloperoxidases'.
- [297] G. J. Colpas, B. J. Hamstra, J. W. Kampf, V. L. Pecoraro, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3469-3478; 'Functional models for vanadium haloperoxidase: reactivity and mechanism of halide oxidation'.
- [298] D. R. Murray, *The Biochemical Journal* **1930**, *24*, 1890-1896; 'The inhibition of esterases by excess substrate'.
- [299] N. Tanaka, Z. Hasan, R. Wever, *Inorganica Chimica Acta* **2003**, *356*, 288-296; 'Kinetic characterization of active site mutants Ser402Ala and Phe397His of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*'.
- [300] T. Kusakabe, K. Motoki, K. Hori, *The Journal of Biochemistry* **1994**, *115*, 1172-1177; 'Human aldolase C: characterization of the recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli*'.
- [301] N. Porta, A. V. Fejzagić, K. Dumschott, B. Paschold, B. Usadel, J. Pietruszka, T. Classen, H. Gohlke, *Catalysts* **2022**, *12*, 1195; 'Identification and

- Characterization of the Haloperoxidase VPO-RR from *Rhodoplanes roseus* by Genome Mining and Structure-Based Catalytic Site Mapping'.
- [302] T. U. Consortium, *Nucleic Acids. Res.* **2020**, *49*, D480-D489; 'UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021'.
- [303] F. Madeira, M. Pearce, A. R. N. Tivey, P. Basutkar, J. Lee, O. Edbali, N. Madhusoodanan, A. Kolesnikov, R. Lopez, *Nucleic Acids. Res.* **2022**, gkac240; 'Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022'.
- [304] A. Waterhouse, J. Procter, D. Martin, M. Clamp, G. Barton, *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1189-1681; 'Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench'.
- [305] D. Mulnaes, N. Porta, R. Clemens, I. Apanasenko, J. Reiners, L. Gremer, P. Neudecker, S. H. Smits, H. Gohlke, *Journal of chemical theory and computation* **2020**, *16*, 1953-1967; 'TopModel: template-based protein structure prediction at low sequence identity using top-down consensus and deep neural networks'.
- [306] D. M. Oropeza Benitez, Bachelorthesis thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2021**.
- [307] G. Licini, V. Conte, A. Coletti, M. Mba, C. Zonta, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2345-2357; 'Recent Advances in Vanadium Catalyzed Oxygen Transfer Reactions'.
- [308] T. Itoh, K. Jitsukawa, K. Kaneda, S. Teranishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 159-169; 'Vanadium-catalyzed epoxidation of cyclic allylic alcohols. Stereoselectivity and stereocontrol mechanism'.
- [309] A. Chong, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1587-1590; 'Mechanism of the molybdenum and vanadium catalyzed epoxidation of olefins by alkyl hydroperoxides'.
- [310] G. B. Courtot, *Annales de Chimie* **1915**, *9*, 47; 'Bulletin de la Société Chimique de France'.
- [311] C. Piombino, H. Lange, F. Sabuzi, P. Galloni, V. Conte, C. Crestini, *Molecules* **2020**, *25*, 866; 'Lignosulfonate microcapsules for delivery and controlled release of thymol and derivatives'.
- [312] J. J. Li, in *Name Reactions*, Springer, **2003**, pp. 202-202.
- [313] X. Shi, H. Jiang, Y. Mao, J. Ye, U. Saffiotti, *Toxicology* **1996**, *106*, 27-38; 'Vanadium(IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage'.
- [314] H. B. ten Brink, H. L. Dekker, H. E. Schoemaker, R. Wever, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 91-98; 'Oxidation reactions catalyzed by vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*'.
- [315] H. Li, S. H. H. Younes, S. Chen, P. Duan, C. Cui, R. Wever, W. Zhang, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 4554-4559; 'Chemoenzymatic Hunsdiecker-Type Decarboxylative Bromination of Cinnamic Acids'.
- [316] S. Saikia, M. Bordoloi, *Curr. Drug Targets* **2019**, *20*, 501-521; 'Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective'.
- [317] A. A. Naqvi, T. Mohammad, G. M. Hasan, M. Hassan, *Current topics in medicinal chemistry* **2018**, *18*, 1755-1768; 'Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships'.
- [318] G. C. P. van Zundert, J. P. G. L. M. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. L. Kastritis, E. Karaca, A. S. J. Melquiond, M. van Dijk, S. J. de Vries, A. M. J. J. Bonvin, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 720-725; 'The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes'.

- [319] C. Dominguez, R. Boelens, A. M. J. J. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1731-1737; 'HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information'.
- [320] R. V. Honorato, P. I. Koukos, B. Jiménez-García, A. Tsaregorodtsev, M. Verlato, A. Giachetti, A. Rosato, A. M. J. J. Bonvin, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, *8*; 'Structural Biology in the Clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem'.
- [321] D. Spiliotopoulos, P. L. Kastritis, A. S. J. Melquiond, A. M. J. J. Bonvin, G. Musco, W. Rocchia, A. Spitaleri, *Frontiers in Molecular Biosciences* **2016**, *3*; 'dMM-PBSA: A New HADDOCK Scoring Function for Protein-Peptide Docking'.
- [322] L. Sumbalova, J. Stourac, T. Martinek, D. Bednar, J. Damborsky, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W356-W362; 'HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information'.
- [323] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, E. C. Meng, G. S. Couch, T. I. Croll, J. H. Morris, T. E. Ferrin, *Tools for Protein Science* **2021**, *30*, 70-82; 'UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers'.
- [324] T. D. Goddard, C. C. Huang, E. C. Meng, E. F. Pettersen, G. S. Couch, J. H. Morris, T. E. Ferrin, *Protein Sci.* **2018**, *27*, 14-25; 'UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis'.
- [325] H. Liu, J. H. Naismith, *BMC Biotechnology* **2008**, *8*, 91; 'An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol'.
- [326] F. Tieves, F. Tonin, E. Fernandez-Fueyo, J. M. Robbins, B. Bommarius, A. S. Bommarius, M. Alcalde, F. Hollmann, *Tetrahedron* **2019**, *75*, 1311-1314; 'Energising the E-factor: The E<sup>+</sup>-factor'.
- [327] Umweltbundesamt, 'Entwicklung des CO<sub>2</sub>-Emissionsfaktors für den Strommix in Deutschland in den Jahren 1990 bis 2021', <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/38897/umfrage/co2-emissionsfaktor-fuer-den-strommix-in-deutschland-seit-1990/>, **2022**,
- [328] E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek, *PLOS Comput. Biol.* **2012**, *10*; 'CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures'.
- [329] 'Molecular operating environment (MOE)', <https://www.chemcomp.com/index.htm>, **2022**,
- [330] K. Prakinee, A. Phintha, S. Visitsatthawong, N. Lawan, J. Sucharitakul, C. Kantiwiriyanitch, J. Damborsky, P. Chitnumsub, K.-H. van Pée, P. Chaiyen, *Nat. Catal.* **2022**, *5*, 534-544; 'Mechanism-guided tunnel engineering to increase the efficiency of a flavin-dependent halogenase'.
- [331] V. D. Jäger, R. Lamm, K. Küsters, G. Ölçücü, M. Oldiges, K.-E. Jaeger, J. Büchs, U. Krauss, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 7313-7329; 'Catalytically-active inclusion bodies for biotechnology—general concepts, optimization, and application'.
- [332] U. Krauss, V. D. Jäger, 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'.
- [333] M. Hofrichter, R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers, T. Lundell, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 871-897; 'New and classic families of secreted fungal heme peroxidases'.
- [334] R. Ullrich, J. Nüske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microb.* **2004**, *70*, 4575-4581; 'Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* Oxidizes Aryl Alcohols and Aldehydes'.

- [335] Aminoverse, 'UPO Enzyme Panel', <https://www.aminoverse.com/upo/>, **2021**, 22.07.2022
- [336] P. Molina-Espeja, E. Garcia-Ruiz, D. Gonzalez-Perez, R. Ullrich, M. Hofrichter, M. Alcalde, *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80*, 3496-3507; 'Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*'.
- [337] A. S. Klein, C. Zeymer, *Protein Engineering, Design and Selection* **2021**, *34*; 'Design and engineering of artificial metalloproteins: from *de novo* metal coordination to catalysis'.
- [338] M. P. McDaniel, in *Adv. Catal., Vol. 53* (Eds.: B. C. Gates, H. Knözinger), Academic Press, **2010**, pp. 123-606.
- [339] P. Kofstad, K. Lillerud, *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 2410; 'On high temperature oxidation of chromium: II. Properties of and the oxidation mechanism of chromium'.
- [340] S. Dey, V. V. P. Kumar, *Environ. Challenges* **2021**, *3*, 100061; 'Supported and un-supported zinc and chromium oxide catalysts for lower temperature CO oxidation: A review'.
- [341] X. Cong, X. Zeng, *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 2014-2026; 'Mechanistic Diversity of Low-Valent Chromium Catalysis: Cross-Coupling and Hydrofunctionalization'.
- [342] A. D. Dayan, A. J. Paine, *Human & Experimental Toxicology* **2001**, *20*, 439-451; 'Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000'.
- [343] M. Sawamoto, M. Kamigaito, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.* **1997**, *34*, 1803-1814; 'Metal complex-mediated living radical polymerization: features, scope, and precision polymer synthesis'.
- [344] L. Kuutti, H. Pajari, S. Rovio, J. Kokkonen, M. Nuopponen, *Bioresources* **2016**, *11*, 6050-6061; 'Chemical Recovery in TEMPO Oxidation'.
- [345] A. S. Klein, A. C. Albrecht, J. Pietruszka, *Catalysts* **2021**, *11*, 1389; 'Chemoenzymatic One-Pot Process for the Synthesis of Tetrahydroisoquinolines'.
- [346] P. Zucca, E. Sanjust, *Molecules* **2014**, *19*, 14139-14194; 'Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms'.
- [347] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373-382; 'HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis'.
- [348] J. Hindges née Bramski, J. Döbber, M. R. Hayes, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2022**, *14*, e202200390; 'Covalently Immobilized 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase (DERA) for Biocatalysis in Flow: Utilization of the 3-Hydroxyaldehyde Intermediate in Reaction Cascades'.
- [349] J. Russier, C. Ménard-Moyon, E. Venturelli, E. Gravel, G. Marcolongo, M. Meneghetti, E. Doris, A. Bianco, *Nanoscale* **2011**, *3*, 893-896; 'Oxidative biodegradation of single- and multi-walled carbon nanotubes'.
- [350] E. Farkas, M. r. Oláh, A. Földi, J. n. Kóti, J. n. Éles, J. z. Nagy, C. A. Gal, C. Paizs, G. b. Hornyánszky, L. s. Poppe, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 8052-8056; 'Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of amines in fully continuous-flow mode'.
- [351] N. Halland, A. Braunton, S. Bachmann, M. Marigo, K. A. Jørgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4790-4791; 'Direct Organocatalytic Asymmetric  $\alpha$ -Chlorination of Aldehydes'.

- [352] M. Amatore, T. D. Beeson, S. P. Brown, D. W. C. MacMillan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5121-5124; 'Enantioselective Linchpin Catalysis by SOMO Catalysis: An Approach to the Asymmetric  $\alpha$ -Chlorination of Aldehydes and Terminal Epoxide Formation'.
- [353] M. P. Brochu, S. P. Brown, D. W. C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4108-4109; 'Direct and Enantioselective Organocatalytic  $\alpha$ -Chlorination of Aldehydes'.
- [354] M. Amatore, T. D. Beeson, S. P. Brown, D. W. MacMillan, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5223-5226; 'Enantioselective Linchpin Catalysis by SOMO Catalysis: An Approach to the Asymmetric  $\alpha$ -Chlorination of Aldehydes and Terminal Epoxide Formation'.
- [355] S. Ponath, M. Menger, L. Grothues, M. Weber, D. Lentz, C. Strohmann, M. Christmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 11683-11687; 'Mechanistic Studies on the Organocatalytic  $\alpha$ -Chlorination of Aldehydes: The Role and Nature of Off-Cycle Intermediates'.
- [356] S. Ponath, M. Menger, L. Grothues, M. Weber, D. Lentz, C. Strohmann, M. Christmann, *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 11857-11861; 'Mechanistic Studies on the Organocatalytic  $\alpha$ -Chlorination of Aldehydes: The Role and Nature of Off-Cycle Intermediates'.
- [357] D. G. Gibson, in *Methods Enzymol.*, Vol. 498 (Ed.: C. Voigt), Academic Press, **2011**, pp. 349-361.
- [358] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 5463-5467; 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors'.
- [359] S. Duvaud, C. Gabella, F. Lisacek, H. Stockinger, V. Ioannidis, C. Durinx, *Nucleic Acids. Res.* **2021**, *49*, W216-W227; 'Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users'.
- [360] A. W. Schüttelkopf, D. M. Van Aalten, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2004**, *60*, 1355-1363; 'PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein–ligand complexes'.
- [361] N. A. Gordeeva, M. A. Kirpichnok, N. S. Patalakha, I. I. Grandberg, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1990**, *26*, 1329-1337; 'Synthesis, spectral-luminescence, and acid-base properties of 3-halo-7-aminocoumarins'.
- [362] N. J. Kruger, in *The Protein Protocols Handbook* (Ed.: J. M. Walker), Humana Press, Totowa, NJ, **2009**, pp. 17-24.

## 8 DANKSAGUNG

Taktisch klug ans Ende gesetzt, damit die neugierigen Augen direkt das spannendste Kapitel finden können – wer fühlt sich jetzt ertappt?

Spaß beiseite, nach den vielen Seiten voller Abbildungen, Spektren, Tabellen und intensiven Diskussionen bin ich froh, auch mal etwas nicht-wissenschaftliches Schreiben zu dürfen. Bitte setzt die Reihenfolge meiner Nennungen in diesem Kapitel nicht gleich mit der Wichtigkeit der jeweiligen Person, das korreliert nicht immer!

Frau Prof. Vlada Urlacher möchte ich für die Zeit als Mentorin sowie die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich danken. Ich hoffe, die Arbeit kann unterhalten und stellenweise begeistern!

Meinen Kooperationspartnern in Form von Prof. Holger Gohlke, Nicola Porta, Prof. Björn Usadel und Kathryn Dumschott möchte ich für die fruchtbare Zusammenarbeit danken.

Die letzten knapp vier Jahre meines Lebens haben mich geprägt wie kaum ein anderer Abschnitt. Der Sprung in die Promotion verlief bei mir ohne nennenswerte Pausen, doch dafür wurde ich mit einem hochgradig spannenden und neuen Thema belohnt. Dafür muss ich mich zuallererst bei meinem Betreuer, Dr. Thomas Classen bedanken. Tom, wir kennen uns jetzt seit meinem Bachelor und es gibt vermutlich keine Person auf dieser Welt, die mich wissenschaftlich so geprägt hat wie Du. Auch wenn unsere Zeit häufig durch anderweitige Lehrverpflichtungen deinerseits begrenzt war, möchte ich Dir nicht nur für die Wahl meines Promotionsthemas danken. Ich möchte Dir von Herzen dafür danken, dass Du Dein teilweise beängstigendes Fach- und Allgemeinwissen mit mir geteilt hast, mich angetrieben hast, tiefer in Themen einzudringen, kritischer über Experimente und Hypothesen nachzudenken, mich selbst als Mensch und Wissenschaftler weiterzuentwickeln, die Freude an der Lehre nicht zu verlieren und immer den Blick über den Tellerrand zu wagen. Du bist in meinen Augen einer der talentiertesten und genialsten Biochemiker, die ich kenne. Ohne Dich wäre ich nicht zu dem Wissenschaftler geworden, der ich jetzt bin – danke dafür!

Neben Tom gibt es, wie in jeder modernen Doktorandenfamilie üblich, natürlich noch einen zweiten väterlichen Teil, den ich nennen muss - und zwar Prof. Jörg Pietruszka. Jörg, danke, dass ich mich nie wie ein Doktorand zweiter Klasse fühlen musste, nur weil ich formal zur Gruppe von Tom gehörte. Egal um was es ging – karriererelevante oder fachrelevante oder persönliche Themen- du hast immer ein offenes Ohr für mich gehabt, hast mich zum Nachdenken und Schmunzeln gebracht und warst spontan in der Lage, einzuspringen, wenn Tom verhindert war. Danke für Deine konstruktive Kritik, die vielen kleinen Hilfestellungen und Perspektiven, die du mir gezeigt hast. Auch wenn wir im Rahmen der Laborleiterrunde häufiger über andere Verhältnisse und Probleme als unsere eigenen geredet haben, habe ich unsere Gespräche immens genossen. Sei es das Neuste aus der NBA, deinen letzten Urlaub im eiskalten Norden oder die Pläne für die nächste Feier – ich vermisse unsere Gespräche jetzt schon – und hoffe, dass das nicht schlimmer wird. Danke für alles und bleib so wie Du bist – das IBOC wäre sonst nicht dasselbe!

Ohne meine Laborbesetzung hätte ich die langen Tage im Labor nicht überstanden. Danke an meine Studenten, Daira und Sebastian, für eure tolle Arbeit im Labor und die tatkräftige Unterstützung – wie ihr seht, war es nicht umsonst! Benjamin, auch wenn wir nicht so lange in einem Labor waren, war es mir eine Freude, Dir die Fackeln von 205 und des Biolaborleiters zu übergeben – alles Gute Dir und denk daran: 205 ist der Ankerpunkt dieses Instituts – ich würde für die Psychotherapie aber echt überlegen, Geld zu nehmen!

Es gibt natürlich eine Person, mit der ich länger in einem Labor war als es manchmal gut für uns beide war (*cave!*), und vermutlich lacht diese Person gerade in diesem Moment schon los, wenn sie meine Zeilen hier liest. Ja, Jan, so gut kenne ich dich mittlerweile! Ich weiß gar nicht, wo ich mit dem Dank bei Dir anfangen sollte, deshalb mache ich es kurz: Ich bin froh, dein Mitstreiter im Labor gewesen zu sein und dich mit Fragen zu löchern (*sic!*) oder von der Arbeit abzuhalten (*vice versa* natürlich). Ich habe in Dir einen Freund fürs Leben gefunden und merke, seitdem du weg bist, wie langweilig der Laboralltag sein kann. Bleib wie Du bist, ich freue mich auf die nächste Gelegenheit, unangenehm mit Dir aufzufallen. Lieber Pascal, ohne Dich wäre unser Trio infernale natürlich um einen *markanten* Charakter ärmer gewesen. Danke für die tolle Zeit, das offene Ohr und die schönen Momente während der Promotion. Zeit, dass wir die Industrie aufmischen; Schränke und Fässer müssen die anderen jetzt schleppen!

Krisztian, auch Dich möchte ich erwähnen, denn auch wenn du so plötzlich kamst wie du gingst, hat mir Deine Anwesenheit und Freundschaft im Institut viel bedeutet. Mit wem soll ich denn jetzt über die neusten Entwicklungen im Fußball oder der Formel 1 reden? Ich hoffe, wir halten den Kontakt, ich wünsche Dir und Lilla viel Erfolg und alles Gute weiterhin. Ich hoffe, der LH44-Sticker hat es auf deinen Silberpfeil geschafft!

Auch den anderen Mitgliedern des IBOCs vielen Dank für Eure Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit. Ich habe viel gelernt, viel gelacht, viel geflucht aber die Zeit möchte ich rückblickend nicht missen. Cindy, danke für die interessanten Gespräche während unserer Enzymtech II-Zeit und darüber hinaus – es tat gut, jemanden außerhalb des eigenen Umfelds zu haben, um den eigenen Blickwinkel auf Dinge zu ändern. Die Podcasts im Auto werden noch lange im Gedächtnis bleiben! Moritz K., danke für die witzigen Meme-Momente in der Küche und die gemeinsame Faszination für Magic, Yugioh und Prequelmeme/Kinski-Zitate- endlich war ich nicht mehr der einzige Clown im Institut!

Frederike und Irene, Euch möchte ich für das offene Ohr und die Hilfe bei der Schreibblockaden-Überwindung oder allgemeiner Ablenkung von der Dissertation danken. Es tat gut, die letzten Schritte mit Euch zu gehen. Ich hoffe, wir bleiben in Kontakt! An Irene geht zudem ein besonderer Dank für das tolle Cover für die Buchversion meiner Dissertation – danke für deine Kreativität und Hilfsbereitschaft!

Ein großer Dank auch an die Mitglieder der „Fahrgemeinschaft“, Dr. Fabienne Knapp née Hilgers, Dr. Andreas Knapp, Luzie Kruse, Dr. Patrick Lenz, Dr. Oliver Klaus, Dr. Robin Weihmann und Dr. Andrea Weiler. Ohne Euch wäre es im Institut nur halb so lustig gewesen.

Mein besonderer Dank gilt auch den Festangestellten, die mir erst so einen reibungslosen Laboralltag ermöglicht haben. Danke Rainer, Vera, Moni, Birgit und Bea. Ihr hattet immer ein offenes Ohr und habt uns alle so gut es ging unterstützt und dabei auch die Extrameile in Kauf genommen. Vielen Dank dafür! Bea, Dir ein gesonderter Dank für die Hilfe im Labor auf den letzten Metern – bleib wie Du bist und lass Dich nicht unterkriegen! Vielen Dank an das Team Flow, Martin, Benedikt, Teresa, Julia, Benjamin und Christina, für Eure technische Unterstützung und die Ideen, wenn ich mal wieder an den Geräten verzweifelt bin.

An alle anderen aus dem Team IBOC, die ich nicht genannt habe – sorry, aber es wären einfach zu viele! Daher an alle, die sich bisher nicht angesprochen gefühlt haben, danke für Eure Unterstützung, die lustigen Momente und die Zusammenarbeit über die letzten Jahre. Ich wünsche Euch allen viel Erfolg für die Zukunft.

## Danksagung

Bevor ich zum Ende dieser schon viel zu langen Danksagung komme, möchte ich Personen aus meinem privaten Umfeld noch nennen. Danke an meine Freunde für die mentale Unterstützung und die Gelegenheiten, abzuschalten und die Zeit einfach zu genießen – besonders an unsere „Hollandgruppe“, Martin und Kevin.

Meiner Familie, danke, dass ihr immer für mich da seid, egal worum es geht, egal wie weit weg wir voneinander sind. Ihr seid das, was mich täglich antreibt, den nächsten Schritt zu gehen. Ohne Euch, Mama und Papa, hätte ich es niemals so weit geschafft, dafür kann ich Euch nie genug danken. Ich liebe Euch!

Zu guter Letzt bleibt noch eine Person, die genannt werden muss, ohne die ich niemals durch die Promotion oder das Studium gekommen wäre (und die jetzt schon vermutlich rot angelaufen ist, wenn sie das liest). Nora, mit deiner selbstlosen Art, deiner Liebe und Hingabe für die vielen Kleinigkeiten im Alltag machst Du mich zu einem besseren Menschen und zu einem besseren Mann. Mein Erfolg muss zu großen Teilen auch Dir zugeschrieben werden. Diese Reise an Bord des Promotionschiffs auf dem *Meer des Wissens* beenden wir jetzt zusammen – mal schauen, in welchem Hafen wir anlegen... Ich liebe Dich!

Falls ich jemanden vergessen haben sollte, bitte ich, das zu entschuldigen, es war keine (klare) Absicht dahinter! In diesem Sinne, vielen Dank fürs Lesen und bis bald,

Alex

## 9 ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde 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. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

---

Alexander Fejzagic