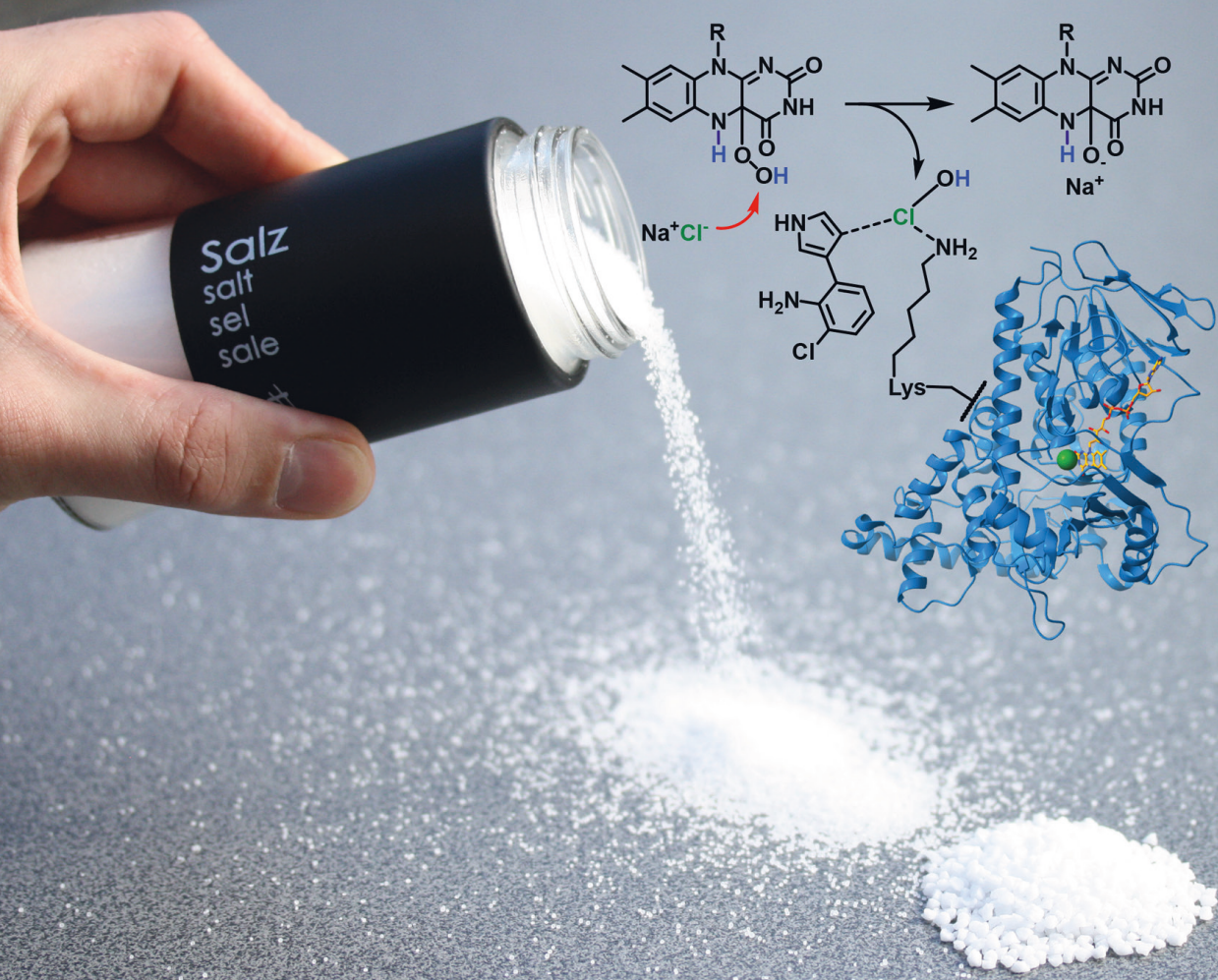


Flavin-abhängige Halogenasen zur Derivatisierung von Naturstoffen

Jan Gebauer



Flavin-abhängige Halogenasen zur Derivatisierung von Naturstoffen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jan Gebauer

aus Schwerin

Köln, Dezember 2024

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

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

Berichterstatter:

1. Univ.-Prof. Dr. Jörg Pietruszka
2. Apl.-Prof. Dr. Thomas Drepper

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2025

Flavin-abhängige Halogenasen zur Derivatisierung von Naturstoffen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jan Gebauer

aus Schwerin

Köln, Dezember 2024

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Korreferent: Apl.-Prof. Dr. Thomas Drepper

Tag der mdl. Prüfung: 08.07.2025

Herausgeber: Prof. Jörg Pietruszka

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2025

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich, Band 50

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2025)

ISBN 978-3-95806-850-6

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

Wenn an manchen Tagen alles so erschien, als gäbe es kein Ende und mich fast der Mut und das Durchhaltevermögen verließen, dann halfen mir folgende Liedtextzeilen immer wieder nicht aufzugeben.

*„Don't lose your way
With each passing day
You've come so far
Don't throw it away
Live believing
Dreams are for weaving
Wonders are waiting to start
Live your story
Faith, hope and glory
Hold to the truth in your heart
If we hold on together
I know our dreams will never die
Dreams see us through to forever
Where clouds roll by
For you and I“*

– Diana Ross (1988)

If We Hold on Together

aus dem Film „*The Land Before Time*“

Songwriters: James Horner & Will Jennings

*„Verlier‘ nicht deinen Weg
Mit jedem Tag, der vergeht
Du bist so weit gekommen
Wirf das nicht weg
Leb‘ den Glauben (daran)
Träume sind zum Weben
Wunder die warten auf dich
Leb‘ deine Geschichte
Vertrau‘n, Hoffnung und Glorie
Halt‘ fest an der Wahrheit in deinem Herzen
Wenn wir gemeinsam durchhalten
weiß ich, uns're Träume sterben nie
Träume begleiten uns bis in die Ewigkeit
Wo die Wolken vorbeiziehen
Für dich und mich“*

Frei übersetzt von Jan Gebauer

Teile dieser Arbeit wurden zuvor in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht oder auf wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt.

Publikationen mit Eigenanteilen

J. Gebauer, T. Classen, J. Pietruszka, *Frontiers in Catalysis* **2023**, 3, 1231765; 'Expression & Characterization of PrnC-A Flavin-dependent Halogenase from the Pyrrolnitrin Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas protegens* Pf-5'.

Diese Veröffentlichung enthält folgende Eigenanteile: Gemeinschaftliche Korrekturen und Überarbeitungen. Von mir wurden alle experimentellen Daten, Texte und Abbildungen und somit die gesamte Veröffentlichung erstellt. Als Ausnahme gilt die Abbildung 1 „statistischer Überblick“, welche von Dr. Classen erstellt wurde.

A. V. Fejzagić, J. Gebauer, N. Huwa, T. Classen, *Molecules* **2019**, 24, 4008; 'Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow'.

Diese Veröffentlichung enthält folgende Eigenanteile: Gemeinschaftliche Konzepterstellung und Literaturrecherche, sowie Korrekturen und Überarbeitungen. Die Kapitel und damit Texte und Abbildungen, die von mir stammen sind: „Halogene als synthetische Werkzeuge“ und „Flavin-abhängige Halogenasen“.

Konferenzteilnahmen und Vorträge

J. Gebauer, F. Garnebode, T. Classen, 14th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (BioTrans), 7th – 11th of July 2019 (Groningen, NL); poster: » Enzymatic Halo-Functionalization of Pyrrole-based Building Blocks «

J. Gebauer, T. Classen, 3rd European Conference on Natural Products, 2nd – 5th of September 2018 (Frankfurt, DE); poster: » Enzymatic Halogenation of Pyrrole-based Natural Products «

J. Gebauer, A. V. Fejzagić T. Classen, 69th Mosbacher Kolloquium – Synthetic Biology: Understanding and Application, 21th – 24th of March 2018 (Mosbach, DE); poster: » Flavin-dependent Halogenases for the Enzymatic Halogenation in Organic Synthesis «

Die Arbeit wurde im Rahmen des CombiCom-Projektes, einem BioSC Focus Lab, erstellt. Die wissenschaftlichen Aktivitäten des Bioeconomy Science Center wurden vom Ministerium für Kultur und Wissenschaft im Rahmen des NRW Strategieprojekts BioSC finanziell unterstützt. Durch die Lokalisierung der Büros und Labore auf dem Campus des Forschungszentrums Jülich, wurde teilweise auch diese Infrastruktur in Anspruch genommen.



Beiträge von Studierenden und Azubis

Nena Billen: Im Rahmen ihrer Bachelorarbeit an der *Howest - de Hogeschool West-Vlaanderen* zum Thema „Investigation of putative Flavin-dependent phenolic halogenases from *Pseudoalteromonas strains*“ klonierte und exprimierte Nena in unserem Institut die beiden Gene der putativen Halogenasen NH153 und NC201 auf Basis der kommerziell von GenScript erhaltenen Konstrukte. Zudem führte sie eine Expression von *radH* und *fre* durch.

Florian Garnebode: Im Rahmen der Ausbildung synthetisierte Florian unter meiner Anleitung verschiedene Pyrrol-Derivate des Pyrrolnitrins mit anschließender Aufarbeitung und Reinigung. Es handelte sich um Komponenten die schon zuvor von mir anhand der Literatur synthetisiert wurden.

Claire Page: Im Rahmen des RISE (Research Internships in Science and Engineering) Austauschprogramms des DAAD nahm Claire einige Silyl-Schützungen von Pyrrol unter meiner Aufsicht vor. Teilweise erfolgten eine anschließende Aufarbeitung und Reinigung. Es handelte sich um Komponenten die schon zuvor von mir anhand der Literatur synthetisiert wurden.

Alexander Veljko Fejzagić: Im Rahmen eines Praktikums erstellte Alexander verschiedene Plasmid-basierte Konstrukte. Neben *pltL* und *pltA* wurde auch das Gen *pmC* von Alexander aus dem Genom isoliert. Letzteres wurde in dieser Arbeit in Form seines Originalplasmides verwendet und ist entsprechend mit AFE gekennzeichnet.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Erklärung	XIII
2.	Verwendete Software und Bildrehtedeklaration	XIV
3.	Abkürzungsverzeichnis	XV
4.	Zusammenfassung	XIX
5.	Abstract	XXII
6.	Einleitung	1
6.1	Motivation	1
6.2	Zielsetzung der Arbeit.....	3
7.	Kenntnisstand	7
7.1	Halogene in Natur, Pharmazie und Chemie	7
7.2	Flavin-freie halogenierende Enzyme in der Natur	13
7.2.1	Häm-abhängige Haloperoxidasen (HPOs).....	14
7.2.2	Vanadium-abhängige Haloperoxidasen (V-HPOs).....	16
7.2.3	Metall-freie Haloperoxidasen	17
7.2.4	α -Ketoglutarat-abhängige Halogenasen	18
7.2.5	SAM-abhängige Fluorinase	19
7.3	Riboflavin – Vitamin in Farbe	21
7.3.1	Riboflavin und Derivate in der Lebensmittelindustrie	21
7.3.1	Flavine als Organokatalysatoren	22
7.3.2	Flavine als Cofaktoren in der Natur.....	23
7.4	Flavin-abhängige Halogenasen – Evolution und Charakteristika	27
7.4.1	Flavin-abhängige Monooxygenasen	27
7.4.2	Flavinreduktasen als Teil der Elektronen-Transportkette	30
7.4.2.1	Flavoprotein-Reduktasen.....	31
7.4.2.2	Flavinreduktasen	31
7.4.3	Regenerationsstrategien von Cofaktoren.....	36
7.4.3.1	Chemisches Cofaktor-Recycling.....	36
7.4.3.2	Physikochemisches Cofaktor-Recycling	37
7.4.3.3	Enzymatisches Cofaktor-Recycling.....	37
7.4.3.4	Cofaktor-Analoga.....	38
7.4.4	Flavin-abhängige Halogenasen	40
7.4.4.1	Tryptophan-Halogenasen	46
7.4.4.2	Phenol-Halogenasen	48
7.4.4.3	Aliphatische Halogenasen	50
7.4.4.4	Pyrrol-Halogenasen.....	50
		VII

7.5	PrnC als Halogenase der Pyrrolnitrin-Biosynthese	53
7.6	Konvergente Biosynthese von Naturstoffen.....	55
8.	Ergebnisse und Diskussion	59
8.1	Etablierung der Elektronen-Transportkette	60
8.1.1	Bereitstellung der bakteriellen Flavinreduktase SsuE	60
8.1.2	Bereitstellung der bakteriellen Flavinreduktase PrnF	69
8.1.3	Glucose-Dehydrogenase als Cofaktor-Recycling-System	72
8.2	Halogenase PrnC aus der Pyrrolnitrin-Biosynthese	74
8.2.1	Klonierung, Expression und biochemische Analyse	74
8.2.2	Synthese des natürlichen Substrats und Produkts von PrnC.....	80
8.2.3	Design of Experiment (DoE) zur Umsetzung mit PrnC	84
8.2.4	Kinetische Untersuchungen zu PrnC.....	88
8.2.5	Promiskuität der Halogenase PrnC	91
8.2.6	Chemische Halogenierung von geschütztem und freiem MDA	96
8.3	Heterologe Biosynthese von Pyrrolnitrin & Derivaten	98
8.3.1	PrnC für die Prodigiosin-Biosynthese	98
8.3.2	Biosynthese von Pyrrolnitrin und halogenierten Prodigininen	100
8.4	Charakterisierung putativer Halogenasen.....	107
8.4.1	BLAST search und AntiSMASH-Analyse.....	107
8.4.2	Biochemische Charakterisierung von NH153 und NC201	112
8.5	Rationales Design chimärer Halogenasen.....	116
8.6	Etablierung literaturbekannter Halogenasen.....	124
8.6.1	Tryptophan-Halogenase PrnA	124
8.6.2	Phenol-Halogenase RadH.....	125
8.6.3	Etablierung einer Analytik.....	125
9.	Ausblick	128
9.1	Cofaktor-Recycling-System (CRS):	128
9.2	Biokatalyse mit PrnC.....	129
9.3	Biosynthese mit PrnC, PltA und PRN	131
9.4	Putative Halogenasen	133
9.5	Chimäres Enzym NHprnC	133
9.6	PrnA und RadH.....	134
10.	Genereller Experimentalteil	135
10.1	Allgemeines	135
10.1.1	Geräte und Laborbedarf	135
10.1.2	Softwares und Applikationen	140
10.1.3	Chemikalien, Kits und Stammlösungen	140
10.1.4	Enzyme	143

10.1.5	Synthetische Gene, Vektoren und Oligonucleotide	143
10.1.6	Stämme	149
10.2	Molekularbiologische Methoden	151
10.2.1	Isolation genomischer DNA	151
10.2.2	Isolation von Plasmid DNA	151
10.2.3	Design von Oligonucleotiden zur PCR und Sequenzierung	151
10.2.4	PCR Methoden	152
10.2.4.1	Konventionelle PCR	152
10.2.4.2	Touchdown PCR (τ PCR)	154
10.2.4.1	QuikChange [®] -PCR ($_{QC}$ PCR)	155
10.2.4.1	Round-the-Horn-PCR ($_{RH}$ PCR)	156
10.2.4.2	Kolonie-PCR ($_{C}$ PCR)	157
10.2.4.3	Overlap Extension PCR ($_{OE}$ PCR)	157
10.2.5	Restriktion und Ligation	158
10.2.6	Gibson Assembly [®]	159
10.2.7	Agarosegelelektrophorese	160
10.2.8	Bestimmung der DNA-Konzentration	161
10.2.9	Sequenzierung	162
10.3	Mikrobielle Methoden	162
10.3.1	Anzucht und Lagerung	162
10.3.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	162
10.3.3	Hitzeschock-Transformation	163
10.3.4	Elektroporation	163
10.3.5	Genexpression	164
10.3.5.1	Genexpression in <i>E. coli</i>	164
10.3.5.2	Genexpression in <i>P. putida</i>	165
10.3.6	Zellaufschluss	165
10.4	Biochemische Methoden	166
10.4.1	Affinitätschromatographie	166
10.4.2	SDS-PAGE	167
10.4.3	MALDI-ToF	168
10.4.4	DLS-Messungen	169
10.4.5	Kristallisation von Proteinen	169
10.5	Analytische Methoden	170
10.5.1	GC-MS	170
10.5.2	HPLC	170
10.5.3	NMR-Spektroskopie	173
10.5.4	Aktivitäts-Assay GDH	173

10.5.5	Aktivitäts-Assay Reduktasen	174
11.	Spezieller Experimentalteil	175
11.1	Chemische Methoden	175
11.1.1	Synthese von Arylpyrrolen <i>via</i> Kreuzkupplungsreaktion	175
11.1.1.1	Synthese von 2-Brom-6-chlorbenzoesäure (39)	176
11.1.1.2	Schmidtreaktion zur Synthese von 2-Brom-6-chloranilin (40)	176
11.1.1.3	Synthese von 3-Iod- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26b)	177
11.1.1.4	Synthese von 3-Chlor- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26c)	178
11.1.1.5	Synthese von 3-Chlor-4-iod- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26d)	178
11.1.1.6	Synthese von 3-Chlor-4-BPin- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26e)	179
11.1.1.7	Synthese von <i>N</i> -(TIPS)-Aminopyrrolnitrin (<i>N</i> -TIPS-22b)	180
11.1.1.8	Synthese von Aminopyrrolnitrin (APRN) (22b)	181
11.1.1.9	Synthese von <i>N</i> -(TIPS)-Monodechloraminopyrrolnitrin (<i>N</i> -TIPS-22c)	182
11.1.1.10	Synthese von Monodechloraminopyrrolnitrin (MDA) (22c)	182
11.1.1.11	Synthese von 3-(<i>ortho</i> -Nitrophenyl)- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (<i>N</i> -TIPS-22i)	183
11.1.1.1	Synthese von 3-(<i>ortho</i> -Nitrophenyl)-1 <i>H</i> -pyrrol (3- <i>o</i> NPP) (22i)	184
11.1.1.2	Synthese von Monodechloraminofuralnitrin (MDAF) (44)	184
11.1.2	Synthese von Arylpyrrolen <i>via</i> van Leusen Reaktion	185
11.1.2.1	Synthese von 3-Phenyl-1 <i>H</i> -pyrrol (3-PP) (22j)	185
11.1.2.2	Synthese von 3-(<i>meta</i> -Chlorphenyl)-1 <i>H</i> -pyrrol (3- <i>m</i> CPP) (22k)	186
11.1.2.3	Synthese von 3-(<i>para</i> -Pyridinyl)-1 <i>H</i> -pyrrol (3- <i>p</i> PyP) (22l)	187
11.1.3	Chemische Halogenierung	188
11.1.3.1	Biomimetischer Ansatz zur chemischen Chlorierung von MDA	188
11.1.3.2	Chlorierung von MDA bei verschiedenen Temperaturen	189
11.1.4	Synthese von Nicotinamid-Derivaten	189
11.1.4.1	Synthese von <i>N</i> -Benzylnicotinamid (BNA) (21d)	190
11.1.4.2	Synthese von <i>N</i> -Benzyl-1,4-dihyronicotinamid (BNAH) (Dihydro-21d)	190
11.2	Biosynthese von Pyrrolnitrin & Halogen-Prodigininen	191
11.3	Untersuchung des Substratspektrums von PrnC	191
11.4	Michaelis-Menten-Kinetik	192
11.5	Design of Experiment	192
12.	Literaturverzeichnis	194
13.	Danksagung	219
14.	Anhang	221
14.1	Vektorkarten mit Gen- und Aminosäuresequenzen	221
14.2	Strukturen und Spektren	266
14.2.1	GC-MS Spektren	266
14.2.2	NMR-Spektren	283
14.2.2.1	2-Brom-6-chlorbenzoesäure (39):	283

14.2.2.2	2-Brom-6-chloranilin (40):	284
14.2.2.3	3-Iod- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26b):	285
14.2.2.4	3-Chlor- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26c):	286
14.2.2.5	3-Chlor-4-iod- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26d)	287
14.2.2.6	3-Chlor-4-BPin- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (26e):	288
14.2.2.7	<i>N</i> -(TIPS)-Aminopyrrolnitrin (<i>N</i> -TIPS-(22b)):	289
14.2.2.8	Aminopyrrolnitrin (APRN) (22b):	290
14.2.2.9	<i>N</i> -(TIPS)-Monodechloraminopyrrolnitrin (<i>N</i> -TIPS-(22c)):	292
14.2.2.10	Monodechloraminopyrrolnitrin (MDA) (22c):	293
14.2.2.11	3-(<i>o</i> -Nitrophenyl)- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol (<i>N</i> -TIPS-22i):	294
14.2.2.12	3-(<i>ortho</i> -Nitrophenyl)-1 <i>H</i> -pyrrol (3- <i>o</i> NPP) (22i):	295
14.2.2.13	3-(<i>meta</i> -Chlorphenyl)-1 <i>H</i> -pyrrol (3- <i>m</i> CPP) (22k)	296
14.2.2.14	3-Phenyl-1 <i>H</i> -pyrrol (3-PP) (22j):	297
14.2.2.15	3-(<i>para</i> -Pyridinyl)-1 <i>H</i> -pyrrol (3- <i>p</i> PyP) (22l)	298
14.2.2.16	Monodechloraminofuralnitrin (MDAF) (44)	299
14.2.2.17	1-Benzylnicotinamid (BNA) (21d).....	300
14.3	Proteinkristallisation:	301
14.4	Daten zum Design of Experiment und zur Michaelis-Menten-Kinetik	309
15.	Molekülverzeichnis	312

1. 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.

Jan Gebauer
Köln, den 15.12.2024

2. VERWENDETE SOFTWARE UND BILDRECHTEDEKLARATION

Bei den verwendeten Logos handelt es sich um öffentlich zugängliche Logos oder es sind die von den Institutionen bereitgestellten Logos. Die in dieser Arbeit bereitgestellten Bilder und Grafiken sind mit den entsprechenden Programmen, die im Experimententeil genannt werden, erstellt worden.

Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mittels UCSF ChimeraX erstellt. Das Programm wurde entwickelt von der Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics an der University of California, San Francisco, mit Unterstützung der National Institutes of Health R01-GM129325 und dem Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

Sofern keine Strukturen in der PDB vorhanden waren, erfolgte das Modelling mittels Phyre² (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0). Hintergrundinformationen finden sich in der Publikation „The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis Kelley LA *et al.* Nature Protocols 10, 845-858 (2015)“.^[1]

Die Analyse von Biosynthese-Clustern erfolgte mit antiSMASH. Nähere Informationen finden sich in der Publikation “antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures, and visualization Blin *et al.* Nucleic Acids Research (2023)“.^[2]

Sequenz-Vergleiche und Alignments wurden mittels Clustal Omega durchgeführt. Näheres zum Verfahren findet sich in der Publikation „Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022“.^[3]

Die Darstellung der Abbildungen zu PrnF (Abbildung 20) und VirX1 (Abbildung 29) erfolgte mit Erlaubnis und Lizenz der Journale (Copyright Clearance Center's RightsLink® Service Lizenz-Nummern: 5736470640813 und 5734091244475).

Für vereinzelte Formulierungen erfolgte die Zuhilfenahme von Online-Programmen. So wurden teilweise der Übersetzer der DeepL SE oder künstliche Intelligenz wie ChatGPT von OpenAI für den besseren Ausdruck verwendet. Die Nutzung dieser Programme hatte keinen Einfluss auf den Inhalt und diente nur als ästhetische Korrektur der vorliegenden Arbeit.

3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	deutsch	englisch
% (v/v)		<i>volume per volume</i>
% (w/v)		<i>weight per volume</i>
5'-FDA	5'-Fluor-5'-desoxyadenosin	
ACN, MeCN	Acetonitril, Methylcyanid	
ACN ^[4]		<i>anthranilate catabolism negative</i>
ACP		<i>acyl carrier protein</i>
ADP	Adenosindiphosphat	
αKG	alpha-Ketoglutarat	
AMP	Adenosinmonophosphat	
APPA	Aminophenylpyrrol-Alkaloide	
APS	Ammoniumpersulfat	
Äq.	Äquivalente	
Ar	Aryl	
ATCC		<i>American Type Culture Collection</i>
AU		<i>absorbance unit</i>
BBE		<i>berberine bridge enzyme</i>
BL914 ^[5]	Boden der "Texas Blackland Prairies" (Hill County/ "Houston black clay" Williamson County)	
BLAST		<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	bromierte marine Pyrrole/Phenole	
bp	Basenpaar	
BuLi	Butyllithium	
c		<i>concentration</i>
CATH		<i>Class Architecture Topology/Fold Homologous superfamily</i>
CDW		<i>Cell dry weight</i>
CFE		<i>Cell-free extract</i>
CoA	Coenzym A	
combiCLEAs		<i>combined cross-linked enzyme aggregates</i>
CPO	Chlorperoxidase	
CRS	Cofaktor-Recycling/Regenerations-System	
CuAAC	Kupfer(I)-katalysierte <i>azide-alkyne</i> (Huisgen) <i>cycloaddition</i> als Variante der Click-Chemie	

Abkürzung	deutsch	englisch
C-X	Kohlenstoff-Halogen-Bindung	
C-Y	Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung	
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase	
dest.	destilliert, demineralisiert	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat	
DoE		<i>design of experiment</i>
DIPA	Diisopropylamin	
DTT	Dithiothreitol	
EC		<i>enzyme class</i>
EFSA		<i>European Food Safety Authority</i>
EtOAc, EE	Ethylacetat, Essigsäureethylester	
F420	Faktor 420	
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid	
FAS	Fettsäuresynthase	
Fl-Hal	Flavin-abhängige Halogenasen	
Fl-MOG (FMO)	Flavin-abhängige Monooxygenasen	
FlRed/ Fl-R	Flavinreduktase	
FMN	Flavinmononucleotid	
FO	Faktor O	
FP-R	Falvoprotein-Reduktase	
fw		<i>forward</i>
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometer	
GR	Glutathionreduktase	
GTP	Guanosintriphosphat	
HB	Hydroxybenzoat	
HBB	Wasserstoffbrückenbindungen	
HOX	Hypohalogensäure	
HPAH	Hydroxyphenylacetat-Hydroxylase	
HPLC		<i>high performance liquid chromatography</i>
HPO	Haloperoxidasen	
IMAC	Immobilisierte Metall(ionen/chelat)-Affinitätschromatographie	
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	
IS	interner Standard	

Abkürzung	deutsch	englisch
K_{cat}	Wechselzahl	
K_M	Michaelis-Konstante	
KP_i	Kalium-Phosphat-Puffer	
KSAT	Ketosynthase-Acyltransferase	
-L	Ligand	
LB		<i>lysogeny broth</i>
LC		<i>liquid chromatography</i>
LV	Leervektor	
MAO	Monoamin-Oxidase	
MAP	2-Methyl-3-amylopyrrol	
MBC	4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd	
mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure	
MD		<i>molecular dynamics</i>
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure	
M-R	Metall-Kohlenstoff-Bindung	
mRNA		<i>messenger ribonucleic acid</i>
NAD(P)	(phosphoryliertes) Nicotin(säure)amid-Dinucleotid	
NCS ⁻	Isothiocyanat	
NHFe	nicht-Häm-Eisen	
NMR		<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase	
Nu(H)	(protoniertes) Nukleophil	
NXS	<i>N</i> -halogenierte (X) Succinimide (B = Brom, C = Chlor, I = Iod)	
OD	optische Dichte	
P450R/CPR	Cytochrom-P450-Reduktase	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
PAMO	Phenylacetone-Monooxygenase	
PCMH	<i>para</i> -Kresol-Methylhydroxylase	
PCP		<i>peptidyl carrier protein</i>
PCR		<i>polymerase chain reaction</i>
PDB		<i>Protein Data Bank</i>
PHBH	<i>para</i> -Hydroxybenzoat-Hydroxylase	
P_i		<i>inorganic phosphate</i>

Abkürzung	deutsch	englisch
PKS	Polyketidsynthase	
PP _i	Pyrophosphat	
PRN	Pyrolnitrin	
-R	organischer Rest	
R ²	Bestimmtheitsmaß, Determinationskoeffizient	
rcf		relative centrifugal force (x g)
Redox	Reduktion und Oxidation	
rpm		<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur	
rv		<i>reverse</i>
SAM ⁽⁺⁾	(kationisches) S-Adenosyl-L-Methionin	
SDS		<i>sodium dodecylsulfate</i>
SEC		<i>size-exclusion chromatography</i>
SiR	Sulfit-Reduktase	
SMO	Styrol-Monooxygenase	
S _N ²	nukleophile Substitution 2. Ordnung	
SNAc	N-Acetylcysteamin	
SSN		<i>sequence similarity network</i>
TB		<i>terrific broth</i>
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
THF	Tetrahydrofuran	
TIM	Triosephosphat-Isomerase	
TIPS	Triisopropylsilyl-Gruppe	
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
Trp	Tryptophan	
VAO	Vanillylalkohol-Oxidase	
V-HPO	Vanadium-abhängige Haloperoxidase	
δ	Ladungspole, Polarisierung entlang einer Sigma-Bindung	

4. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit lässt sich prinzipiell nach zwei Gesichtspunkten unterteilen. Einerseits die Etablierung von halogenierenden Enzymen und andererseits die Perspektive der Derivatisierung von Naturstoffen mit dem Fokus auf Prodigiosin. Doch welche Rolle spielen Halogene in chemischen Strukturen und warum ist die enzymatische Funktionalisierung eine Alternative?

Halogene kommen in etwa 8000 Naturstoffen vor und im Produktionsprozess von Medikamenten treten sie mit 40 % entweder in der Synthese oder dem finalen Produkt auf. Die Funktion in der finalen Struktur beinhaltet das Blocken von aktiven Zentren in Enzymen oder Abbaupositionen der Wirkstoffe bei der Oxidation in der Leber. Der Vorteil der enzymatischen Halogenierung liegt in der Verfügbarkeit des Halogensubstrats, der Umweltverträglichkeit, sowie der Selektivität. Im Vergleich zur chemischen Halogenierung stammen die reaktiven Spezies nicht aus der Bereitstellung von molekularem Brom oder Chlor über bspw. dem Chloralkali-Prozess, sondern sind natürlichen Ursprungs wie das Speise- bzw. Tafelsalz im Falle der Chlorierung. Die direkte Nutzung von Chlorid-Ionen umgeht energieintensive Prozesse und stellt durch seine Abundanz eine hohe Verfügbarkeit dar. In der Funktionalisierung von Aromaten als sehr elektronenreiche Moleküle gibt es häufig eine Konkurrenz verschiedener nukleophiler Positionen. Die Biokatalyse ermöglicht hierfür die stereoselektive Halogenierung und reduziert dadurch die Anzahl von Nebenprodukten.

Um all diese Vorteile zu nutzen, erfolgte in dieser Arbeit eine Auswahl von Flavin-abhängigen Halogenasen (Fl-Hal) für die Chlorierung von Pyrrol-Strukturmotiven. Hierzu wurden Flavinreduktasen zur Bereitstellung von reduziertem FADH₂ untersucht, sowie ein Cofaktor-Recycling-System (CRS) in Form der Glucose-Dehydrogenase (GDH) genutzt. Schwerpunkt der Arbeit ist die Halogenase PrnC aus der Biosynthese von Pyrrolnitrin (PRN). Zusätzlich wurde das ganze Biosynthese-Cluster im Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 bereitgestellt und die Halogenase PltA aus der Biosynthese von Pyoluteorin produziert. Für beide Enzyme ist das Ziel die Derivatisierung von Prodigininen. In einem weiteren Schritt erfolgte die Untersuchung der putativen Halogenasen aus den Stämmen *Pseudoalteromonas* sp. NC201 und *Pseudoalteromonas gelatinilytica* NH153, welche basierend auf einer BLAST search ausgewählt wurden. Im Zuge der Ergebnisse wurde ein chimäres Enzym durch die Fusion des N-terminalen Bereichs von NH153 und der C-terminalen Sequenz von PrnC konzipiert und als NHprnC produziert. Die Bereitstellung der literaturbekannten Tryptophan-Halogenase PrnA und Phenol-Halogenase RadH erweitern das Portfolio halogenierender Enzyme.

Für die Reduktion von FAD wurden die drei am häufigsten mit Fl-Hals in der Literatur genutzten Reduktasen untersucht. Während die Produktion der Reduktase Fre nicht erfolgreich war, konnte die Reduktase SsuE in *Escherichia coli* Tuner (DE3) als aktives

Enzym im Lysat mit einer volumetrischen Aktivität für FAD und NADH von 174 ± 34 $\mu\text{U}/\text{mL}$ bereitgestellt werden. Eine Reinigung zu aktivem Enzym blieb erfolglos. Die Reduktase PrnF aus dem Biosyntheseweg von PRN konnte in *E. coli* BL21 (DE3) löslich und aktiv produziert werden und lieferte etwa 155 mg Protein aus einem Liter Kultur. Mit einer volumetrischen Aktivität von 197 ± 21 $\mu\text{U}/\text{mL}$ bzw. spezifischen Aktivität von 71.4 ± 7.7 $\mu\text{U}/\text{mg}$ ergibt sich eine Wechselzahl k_{cat} von 25 ± 3 s^{-1} . Für die Bereitstellung eines Cofaktorrecyclingsystems (CRS) zur Regeneration von NADH wurde die Glukosedehydrogenase (GDH) aus *B. subtilis* mit einer volumetrischen Aktivität von 184.7 ± 4.8 $\mu\text{U}/\text{mL}$ eingesetzt.

Die Produktion von PrnC erfolgte analog zu anderen Halogenasen bei 15 $^{\circ}\text{C}$ im Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3), da PrnC wie bspw. auch PrnA bei höheren Temperaturen zur Bildung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) neigt. Mit einer durchschnittlichen Proteinausbeute von 15 mg Protein aus einem Liter Kultur ist die Expressions- bzw. Isolationsrate eher gering. Die Kristallisationsversuche waren nicht erfolgreich. Mit Hilfe der Synthese des natürlichen Substrats Monodechloraminopyrrolnitrin (MDA) und dem Produkt Aminopyrrolnitrin (APRN) wurden die kinetischen Parameter von PrnC bestimmt. In der GC-MS-basierten Analyse ergaben sich für die Reaktion bei 30 $^{\circ}\text{C}$ eine Michaelis-Konstante (K_M) von 14.4 ± 1.2 μM für MDA und, basierend auf der spezifischen Aktivität von 25.0 ± 0.3 $\mu\text{U}/\text{mg}$, eine Wechselzahl (k_{cat}) von 1.66 ± 0.02 min^{-1} . Bei der Untersuchung der Promiskuität von PrnC konnten wir zeigen, dass die Substitution des Aromaten am Pyrrol keinen besonderen Einfluss auf die Reaktivität hat, da alle getesteten Surrogate dieser Gruppe, wie 3-*ortho*-Nitrophenylpyrrol (3-oNPP), 3-*meta*-Chlorphenylpyrrol (3-mCPP) und 3-Phenylpyrrol (3-PP) analog zu MDA vollen Umsatz zeigten. Auch Heteroaromaten wie Pyridine werden als Aryl-Reste akzeptiert, jedoch zeigte PrnC für 3-*para*-Pyridinylpyrrol (3-pPyP) nur einen unvollständigen Umsatz in der betrachteten Zeit. Das Furan-basierte MDA-Analogon Monodechloraminofurylnitrin (MDAF) wurde nicht chloriert. Das Fehlen des Aryl-Restes in Kombination mit einer Elektronen-ziehenden Gruppe zeigte am Beispiel des Pyrrol-2-Carbaldehyds (2-CaP) ebenfalls keine Halogenierung. Mit Ausnahme der Doppelchlorierung von 3-PP zeigt PrnC eine regioselektive Chlorierung im Vergleich zur chemischen Halogenierung, die 2 – 5 Produkte lieferte, von denen das APRN nur einen geringen Prozentsatz ausmacht. Eine Verwendung der Halogenase PrnC für die Derivatisierung von Prodigininen ist anhand der gesammelten Ergebnisse nicht zu bewerten. Einerseits gibt es keine verlässliche Analytik für die Halogenierung von Prodigininen, weshalb auch keine Umsetzung von Prodigiosin mit PrnC in aussagekräftigen Ergebnissen erfolgt ist. Für die Produktion von Prodigininen mit Aryl-Substituenten am ursprünglichen Monopyrrol, zeigten Kondensationsversuche von PigC, TamQ und TreaP andererseits, dass Arylpyrrole am Beispiel von 3-mCPP nicht akzeptiert werden. Eine Kombination von PrnC oder gar dem ganzen Biosyntheseweg von PRN mit dem Bipyrrrol MBC ist daher solange nicht sinnvoll, wie kein kondensierendes Enzym arylierte Monopyrrole akzeptiert. Die Biosynthese von PRN selbst scheint erfolgreich gewesen zu sein. Eine Expression von

prnA im Shuttle-Vektor pBTBX-2 war deutlich erkennbar und auch die Produktion von PrnC und PrnD deutete sich durch eine Überexpression an. Für eine höhere Ausbeute und damit verlässliche Analyse müssen hier aber weitere Untersuchungen folgen. Gleiches gilt für die Halogenase PltA, welche im Stamm *P. putida* KT2440 sichtbar produziert werden konnte. Eine Verwendung für die Prodiginin-Produktion hat hierbei die gleiche Voraussetzung der Akzeptanz, wie es sich im Fall von PrnC zeigte. Nähere Untersuchungen müssen sich hier anschließen.

Die Untersuchungen der putativen Halogenasen von kurz genannt NC201 und NH153 führten zu teilweisen Erfolgen. Während NC201 nicht eindeutig produziert werden konnte, war die Produktion und Reinigung von NH153 mit ca. 54 mg pro Liter Kultur vergleichsweise hoch. Ähnlich wie für PltA beschrieben, zeigte auch NH153 eine gelbe Färbung auf Grund des mutmaßlich stark koordinierten FAD. Die Kristallisation von NH153 mit 6.3 mg/mL führte zu initialen Kristallen in der Reservoiirlösung (*JCSG Core II Suite*, Bedingung 07). Eine erneute Proteinproduktion und Kristallisation unter verfeinerten Bedingungen könnte eine weitere Proteinstruktur für die FI-Hal liefern. Der Transfer der Eigenschaften wie Proteinausbeute, Stabilität und Farbe blieb bei der Domänenfusion zur Produktion des chimären Enzyms NHprnC, entgegen der Erwartung, aus. NHprnC konnte ebenso nicht unter den Bedingungen der Expression von *prnC* löslich produziert und gereinigt werden. Eine erneute Fusion des N-terminalen Bereichs von NH153 nach der konservierten finalen Helix der „Box“-Domäne, mit der entsprechenden Fortsetzung des C-terminalen Bereichs von PrnC könnte die Expressionsprobleme beheben, da sich hierdurch die „Box“-Domäne von NH153 in Gänze konservieren ließe.

PrnA und RadH wurden in Produktionsstämmen von *E. coli* bereitgestellt und können für Biokatalysen verwendet werden. Eine Analytik wurde etabliert und eine Aktivität für RadH dokumentiert.

5. ABSTRACT

In principle, the aim of this work can be divided into two aspects. On the one hand, the establishment of halogenating enzymes and, on the other hand, the perspective of derivatizing natural products with a focus on prodigiosin. But what role do halogens play in chemical structures and why is enzymatic functionalization an alternative?

Halogens occur in about 8000 natural substances and in the production process of drugs they occur with 40% either in the synthesis or the final product. The function in the final structure includes the blocking of active sites in enzymes or degradation positions of the active ingredients in the oxidation process in the liver. The advantage of enzymatic halogenation lies in the availability of the halogen substrate, environmental compatibility and selectivity. In contrast to chemical halogenation, the reactive species do not originate from the supply of molecular bromine or chlorine *via* e.g. the chlor-alkali process, but are of natural origin, such as table salt in the case of chlorination. The direct use of chloride ions avoids energy-intensive processes and represents a high availability due to its abundance. In the functionalization of aromatic compounds as very electron-rich molecules, there is often competition between different nucleophilic positions. Biocatalysis enables stereoselective halogenation and thus reduces the number of by-products.

To take advantage of all these benefits, Flavin-dependent halogenases (Fl-Hal) were selected for the chlorination of pyrrolic structures. Flavin reductases for the provision of reduced FADH₂ were analyzed and a cofactor recycling system (CRS) in the form of glucose dehydrogenase (GDH) was used. The focus of this thesis is the halogenase PrnC from the biosynthesis of pyrrolnitrin (PRN). In addition, the entire biosynthesis cluster was provided in the strain *Pseudomonas putida* KT2440 and the halogenase PltA from the biosynthesis of pyoluteorin was produced. The overall aim of both enzymes is the derivatization of prodiginines. In a further step, the putative halogenases from the strains *Pseudoalteromonas* sp. NC201 and *Pseudoalteromonas gelatinilytica* NH153 were analyzed, which were selected based on a BLAST search. In the course of the results, a chimeric enzyme was designed by fusing the N-terminal region of NH153 to the C-terminal sequence of PrnC. The produced Protein was named NHprnC. The establishment of the tryptophan-halogenase PrnA and phenol-halogenase RadH, which are known to literature, expands the portfolio of halogenating enzymes.

For the reduction of FAD, the three reductases most frequently used with Fl-Hals in literature were analyzed. While the production of the reductase Fre was not successful, the reductase SsuE could be produced in *Escherichia coli* Tuner (DE3) as active enzyme in lysates with a volumetric activity for FAD and NADH of 174 ± 34 µM/mL. Purification to active enzyme was unsuccessful. The reductase PrnF from the biosynthetic pathway of PRN could be produced solubly and actively in *E. coli* BL21 (DE3) and yielded about 155 mg protein from one liter of culture. With a volumetric activity of 197 ± 21 U/mL and a

specific activity of 71.4 ± 7.7 U/mg, the turnover rate (k_{cat}) was determined to be 25 ± 3 s⁻¹. GDH from *B. subtilis* with a volumetric activity of 184.7 ± 4.8 U/mL was used to provide a CRS for the regeneration of NADH.

As with other halogenases like PrnA, PrnC was produced at 15°C in *E. coli* ArcticExpress (DE3), because these enzymes tend to form inclusion bodies at higher temperatures. With an average protein yield of 15 mg protein from one liter of culture, the expression and isolation rate was rather low. The crystallization experiments were not successful. The kinetic parameters of PrnC were determined by synthesizing the natural substrate monodechloraminopyrrolnitrin (MDA) and the product aminopyrrolnitrin (APRN). GC-MS-based analysis revealed a Michaelis-constant (K_M) of 14.4 ± 1.2 μM for MDA and, based on the specific activity of 25.0 ± 0.3 mu/mg, a turnover number (k_{cat}) of 1.66 ± 0.02 min⁻¹ for the reaction at 30°C. When investigating the promiscuity of PrnC, we were able to show that the substitution of the aromatic moiety on the pyrrole has no particular influence on the reactivity, as all tested surrogates of this group, such as 3-*ortho*-nitrophenylpyrrole (3-*o*NPP), 3-*meta*-chlorophenylpyrrole (3-*m*CPP) and 3-phenylpyrrole (3-PP), showed full conversion analogous to MDA. Heteroaromatic moieties such as pyridines are also accepted as aryl residues, but PrnC showed only incomplete conversion for 3-*para*-pyridinylpyrrole (3-*p*PyP) in the time under consideration. The furan-based MDA-analogue monodechloraminofurylnitrin (MDAF) was not chlorinated. The absence of the aryl residue in combination with an electron-withdrawing group also showed no halogenation in the case of 2-pyrrolecarbaldehyde (2-*Ca*P). With the exception of the double chlorination of 3-PP, PrnC shows regioselective chlorination compared to chemical halogenation, which yielded 2 – 5 products, of which the APRN accounts for only a small percentage. The use of the halogenase PrnC for the derivatization of prodiginines cannot be evaluated on the basis of the collected results. On the one hand, there are no reliable analytical methods for the halogenation of prodiginines, which is why no conversion of prodigiosin with PrnC yielded meaningful results. For the production of prodiginines with aryl substituents on the former monopyrrole, condensation experiments of PigC, TamQ and TreaP on the other hand showed that aryl pyrroles are not accepted using 3-*m*CPP as an example. A combination of PrnC or even the entire biosynthetic pathway of PRN with the bipyrrrole MBC therefore makes no sense as long as no condensing enzyme accepts arylated monopyrroles. The biosynthesis of PRN itself seems to have been successful. Expression of prnA in the shuttle vector pBTBX-2 was clearly recognisable and the production of PrnC and PrnD was also indicated by overexpression. However, for a higher yield and thus reliable analysis, further investigations must follow. The same applies to the halogenase PltA, which was visibly produced in the *P. putida* KT2440 strain. Use for prodiginin production has the same prerequisite of acceptance as was shown in the case of PrnC. Further investigations are necessary. The investigations of the putative halogenases, in short, NC201 and NH153 led to partial successes. While NC201 could not be produced clearly, the production and purification of NH153 was comparatively high at approx. 54 mg per

liter of culture. Similar to that described for PltA, NH153 also showed a yellow coloration due to the presumably strongly coordinated FAD. Crystallization of NH153 with 6.3 mg/mL resulted in initial crystals in the reservoir solution (JCSG Core II Suite, condition 07). Repeated protein production and crystallization under refined conditions could provide another protein structure for the FI-Hals. Contrary to expectations, the transfer of properties such as protein yield, stability and color did not occur during domain fusion for the production of the chimeric enzyme NHprnC. NHprnC could also not be solubilized and purified under the conditions of *prnC* expression. A new fusion of the N-terminal region of NH153 upstream the conserved final helix of the FAD domain, to the corresponding continuation of the C-terminal region of PrnC could solve the expression problems, as this would allow the FAD domain of NH153 to be conserved in its entirety. PrnA and RadH were provided in production strains of *E. coli* and can be used for biocatalysis. An analysis was established and an activity for RadH was documented.

6. EINLEITUNG

6.1 Motivation

In Zeiten von weltweiten Krisen, wie der sich beschleunigt anbahnenden Klimakatastrophe, aber auch der weltweiten Corona-Pandemie, die uns einige Jahre beschäftigt hat, sowie der seit Jahren in Deutschland bekannten Gefahr von multiresistenten Keimen, spielt die Forschung und deren Vertretende eine herausragende Rolle für die Erarbeitung neuer Lösungskonzepte zur Bewältigung dieser Herausforderungen. Um dieser Probleme Herr zu werden, sind neue Strategien notwendig, aber auch der breitere Einsatz von schon bekannten Konzepten. Dass Letzteres erfolgreich sein kann, hat die Bereitstellung von mRNA-Vakzinen gezeigt. Ein gut erforschtes Feld wurde in diesem Fall auf eine neue Anwendung übertragen. Die Etablierung neuer Strategien zeigen sich beim Erhalt einer stabilen Umwelt mit verträglichem Klima durch Schaffung von nachhaltigen Produktionslinien im Sinne einer Kreislaufwirtschaft. In diesem Zusammenhang ist auch die Energieeffizienz eine entscheidende Komponente der biotechnologischen Betrachtung für bspw. den Umstieg aus fossilen hin zu erneuerbaren Energien und damit energetischer Unabhängigkeit. Damit lässt sich auch der Bogen zurück zu pharmazeutischen Aspekten spannen. So versucht die weiße Biotechnologie ökologischere Produktionsverfahren als Ergänzung oder Ersatz zu klassisch, chemischen Produktionstechniken zu etablieren, um bspw. biomimetische Medikamente zu produzieren und dabei auf den Einsatz von toxischen Chemikalien oder energieintensiven Produktionsprozessen zu verzichten.

Allein das Land Nordrhein-Westfalen hat über verschiedene Strategie-Projekte wie dem Bioeconomy Science Center (BioSC), aber auch dem BioökonomieREVIER im Zuge des „Strukturwandels im Rheinischen Revier“ Möglichkeiten geschaffen, genau diesen Fragen der Innovation und Translation von universitärer Forschung in die Industrie ein finanzielles Gerüst zu geben. Den Aspekt der Energieeffizienz und damit Kostenersparnis aufgreifend, soll im Folgenden die Motivation dieser Arbeit zu enzymatischen Halogenierungsprozessen im Rahmen des BioSC erläutert werden. Zum einen befinden sich Halogenatome und davon abgeleitete funktionelle Gruppen unter anderem in vielen Pharmaka und Agrochemikalien und werden zum anderen häufig in Zwischenprodukten in der industriellen Chemie zur Weiterverarbeitung und Veränderung – der Derivatisierung – über Prozesse wie Kreuzkupplungen verwendet.^[6]

Um die Bedeutung der Halogenatome gerade auch in der medizinisch-pharmazeutischen Anwendung zu veranschaulichen, wird gerne das Beispiel des Vancomycins (**3**) bemüht. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines oder beider Chlor-Atome Einfluss auf die Stabilität und deren Bindeeigenschaften an die Zielstruktur zeigen. Die Konsequenz

war eine reduzierte antibiotische Wirkung von 30 % bzw. 50 %.^[7] Auch die geringen biologischen Abbauraten von halogenierten Verbindungen sind unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten ein Vorteil, da von dem halogenierten Medikament weniger verabreicht werden kann, weil es sich länger im Körper befindet.^[8]

Aber was hat das Beispiel Vancomycin mit Bioökonomie und Nachhaltigkeit zu tun? Einerseits bringen Enzyme generell häufig die Eigenschaft mit sich regioselektiv zu sein und können somit gezielt Reaktionen durchführen, bei denen die klassische Chemie durch fehlende Selektivität versagt.^[9] Eine Herstellung von Zielprodukten auf rein chemischem Wege kann somit also mit einer hohen Zahl von Nebenprodukten einhergehen, die einen Prozess ineffizient machen. Doch ein wesentlich wichtigerer Punkt ist relevant. Egal welche halogenierenden Reagenzien in der chemischen Industrie und Forschung betrachtet werden, sie alle sind selbst molekulare Halogene, oder wurden aus elementarem Brom oder Chlor generiert.^[10, 11] Allerdings hört die retrosynthetische Betrachtung dort nicht auf. Im großen Maßstab wird Chlorgas immer noch aus dem Chloralkali-Prozess gewonnen.^[12, 13] Bei diesem Prozess wird über Elektrolyse Natriumchlorid, allgemein besser bekannt als Kochsalz, in elementares Natrium und toxisches, sowie reaktives Chlor^[14] umgewandelt (Abbildung 1). Dieser Prozess ist sehr energieintensiv und macht in Deutschland etwa 2 % des Gesamtenergieverbrauchs aus.^[15] Dabei werden nach Angaben von Euro Chlor (Verband der Betreiber von Chloralkali-Anlagen in Europa) pro Jahr etwa 5.4 Mio Tonnen Chlorgas in Deutschland produziert, was einen Anteil von fast 50 % der europäischen Produktion ausmacht (Daten aus den Jahren 2017/2018 bzw. 2019/2020).^[16, 17] Hierbei befinden sich die Kosten für eine Tonne Chlorgas zwischen 141 – 505 €, wobei die Elektrizität zwischen 51 – 58 % ausmacht (Daten aus dem Jahr 2018).

Natürlich kann die enzymatische Halogenierung die klassische, industrielle Chlor-Gewinnung nicht ersetzen, aber sie kann in ausgewählten Fällen einen Beitrag zur Reduktion der aufwändig hergestellten Reagenzien leisten, indem die entsprechenden reaktiven Chlor-Spezies, nämlich hypochlorige Säure, direkt im Enzym aus Natriumchlorid hergestellt werden. Ziel kann es daher sein, in der Zukunft zu einem Teil der Produktion von Hypochloriger Säure und Chlorgas, sowie halogenierten Produkten auf biotechnologischem Wege beizutragen. Dass der vereinzelte Einsatz von Enzymen in chemischen Syntheserouten von Pharmaka einen positiven Effekt auf Prozesseffizienz und Produktionskosten haben kann, beschreiben *Junhua Tao* und *Jian-He Xu* in ihrer Publikation zur Rolle der Biokatalyse in pharmazeutischen Prozessen.^[18]

Exemplarisch werden auch in dieser Arbeit pharmazeutisch interessante Produkte beleuchtet, sowie eine Enzymklasse, die zur biologischen Produktion von halogenierenden Komponenten in der Lage ist.

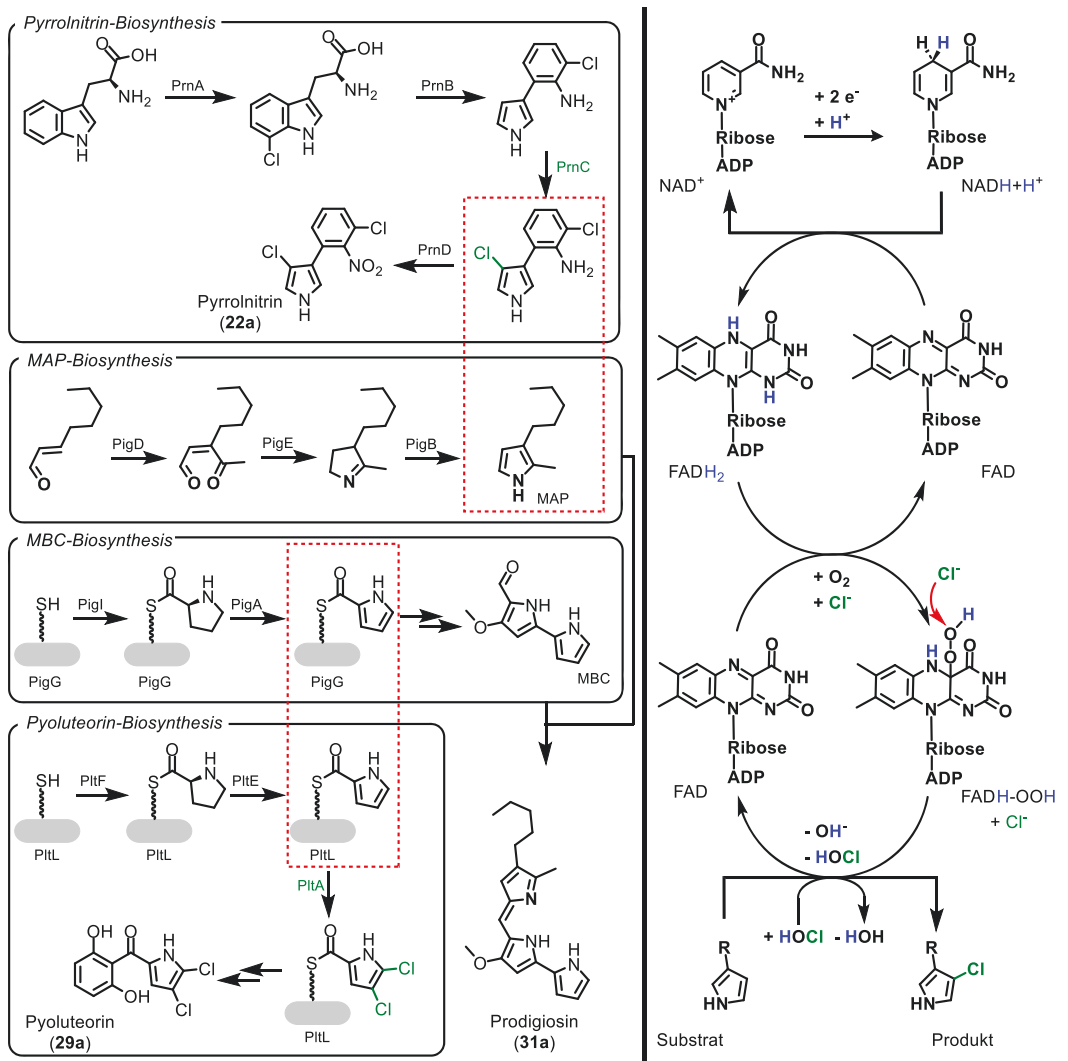
6.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Etablierung einer enzymatischen Halogenierungsplattform mit dem Fokus auf Flavin-abhängigen Halogenasen (Fl-Hal). Dafür war zunächst die Bereitstellung der Elektronen-Transportkette über Flavinreduktasen essentiell. In diesem Zusammenhang sollte die katalytische Kaskade durch ein gekoppeltes enzymbasiertes Cofaktorrezyklingsystem (CRS) erweitert werden, um einen hohen Einsatz von NAD(P)H als Reduktionsäquivalent zu vermeiden. Nach der Bereitstellung dieser Parameter sollten die verschiedenen Flavin-abhängigen Halogenasen adressiert werden.

Im Gegensatz zu anderen halogenierenden Enzymen, setzen Fl-Hals die reaktive Halogenspezies nicht frei, sondern dirigieren sie direkt zum Substrat im aktiven Zentrum, was zu einer Halogenierung an nicht begünstigten nukleophilen Positionen führen kann. Zudem sind die Substrate dieser Enzymgruppe in der Regel Aromaten, was sich mit der Zielstruktur **31a** dieser Arbeit deckt. Da es sich bei Prodigiosin (**31a**) um einen Pyrrol-basierten Naturstoff handelt, wurden auch Halogenasen ausgewählt, die pyrrolische Strukturen adressieren. Entsprechend der Charakterisierung von Halogenasen, die freie, oder Carrier-gebundene Substrate umsetzen, wurden initial zwei Enzyme untersucht, die jeweils einer dieser Gruppen zugewiesen werden können. Der Großteil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Charakterisierung der freien Substrate akzeptierenden Halogenase PrnC aus dem Biosyntheseweg von Pyrrolnitrin (**22a**). Dies beinhaltete, neben der Produktion löslichen Proteins und der Reinigung, die Suche nach optimierten Reaktionsbedingungen über den Ansatz des „*Design of Experiment*“, die Bestimmung kinetischer Parameter für die Umsetzung des natürlichen Substrats, sowie die Untersuchung der Substratspezifität des Enzyms. Neben diesem biokatalytischen Schwerpunkt, wurde auch die Biosynthese von PRN (**22a**) als Ganzes untersucht. In einem vektorbasierten Biosynthese-Cluster sollte das Pyrrolnitrin und dessen Intermediate unter die Kontrolle verschiedener Induktoren gestellt werden, um gezielt Derivate in ein und demselben Stamm über eine verkürzte Biosynthese produzieren zu können. Dies würde nicht nur eine mögliche *late-stage* Funktionalisierung von Prodigininen mittels PrnC ermöglichen, sondern sie auch einer kombinatorischen oder Mutasynthese zugänglich machen. Zusätzlich zu den in der Literatur bekannten Halogenasen, sollten außerdem weitere Gene putativer Flavin-abhängiger Halogenasen untersucht werden. Über einen BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*) sollten so anhand konservierter Motive bekannter Halogenasen uncharakterisierte Gene auffindig gemacht werden. Das Ziel ist hierbei Enzyme zu finden, die entweder ein anderes Substratspektrum zeigen, oder bessere Eigenschaften wie Stabilität und hohe Expressionslevel aufweisen. Im Erfolgsfall können diese Enzyme dann konventionelle Syntheserouten ergänzen oder ersetzen. Als Basis für die Halogenierung der verschiedenen Grundgerüste und zum Vergleich von Eigenschaften sollten einige in der Literatur gut untersuchten Halogenasen ebenfalls produziert werden. Dazu gehören die Tryptophan-Halogenase PrnA, ebenfalls aus dem Biosynthese-Cluster von

Pyrrolnitrin (**22a**), sowie RadH, welches phenolische Strukturen halogeniert. Abschließend sollte der Versuch unternommen werden, vorteilhafte Eigenschaften von Halogenasen zu kombinieren. Neben der Mutagenese der Gene stand vor allem die Fusion von Domänen im Vordergrund. Die so kreierte chimären Halogenasen sollten dann auf ihre neuen oder verbesserten Eigenschaften untersucht werden.

Die Basis der Arbeit teilt sich also in biosynthetische Betrachtungen und den Aspekt der Biokatalyse mit dem Einbeziehen von Proteinstrukturen. Entsprechend findet sich diese Zweiteilung im folgenden Schema 1 zur Biosynthese von Pyrrolnitrin (**22a**),



Schema 1: Übersicht zu den Biosynthesen von Pyrrolnitrin (**22a**), Pyoluteorin (**29a**) und Prodigiosin (**31a**) mit angestrebten Anknüpfungspunkten (rote Kästchen), sowie der Katalysezyklus von NADH über FAD der Reduktase zu FAD der Halogenase zum Produkt am Beispiel eines Pyrrols.

der gegabelten Biosynthese von Prodigiosin (**31a**) und der Biosynthese von Pyoluteorin (**29a**) auf der einen Seite und die Schritte der Enzymkaskade zur enzymatischen Halogenierung auf der anderen Seite. Eine intensivere Betrachtung dieser Aspekte findet in den entsprechenden Kapiteln statt.

7. KENNTNISSTAND

Mit den nun folgenden Kapiteln soll skizziert werden, auf welchen Annahmen die durchgeführten Untersuchungen basieren und welche Vielfalt die Natur für die Halogenierung von Naturstoffen bereitstellt.

7.1 Halogene in Natur, Pharmazie und Chemie

Für die Entdeckung und Bereitstellung neuer Wirkstoffe untersuchen Syntheschemiker in Zusammenarbeit mit Pharmazie und Medizin häufig Naturstoffe, um auf Basis der Erkenntnisse Grundstrukturen und Funktionalitäten für den Aufbau von Wirkstoffen ableiten zu können. Mit etwa 8000 natürlich vorkommenden, halogenierten organischen Verbindungen^[19] sind halogenierte Naturstoffe in allen Sekundärmetabolit-Gruppen vertreten.^[20] Während eine Großzahl von halogenierten Naturstoffen marinen Ursprungs ist, gibt es auch eine beachtliche Zahl an terrestrischen halogenhaltigen Naturstoffen, bspw. in Pflanzen und Insekten.^[19, 21] Die Bedeutung für den Menschen wird deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass Halogene auf die eine oder andere Weise in 40 % aller Arzneimittel vorkommen, welche in klinischen Studien getestet werden.^[22-24] Neben dem Grundgerüst in Natur- und Wirkstoffen mit wichtigen Strukturmotiven, ist also das Vorhandensein von Halogenen in vielen Syntheserouten elementar.

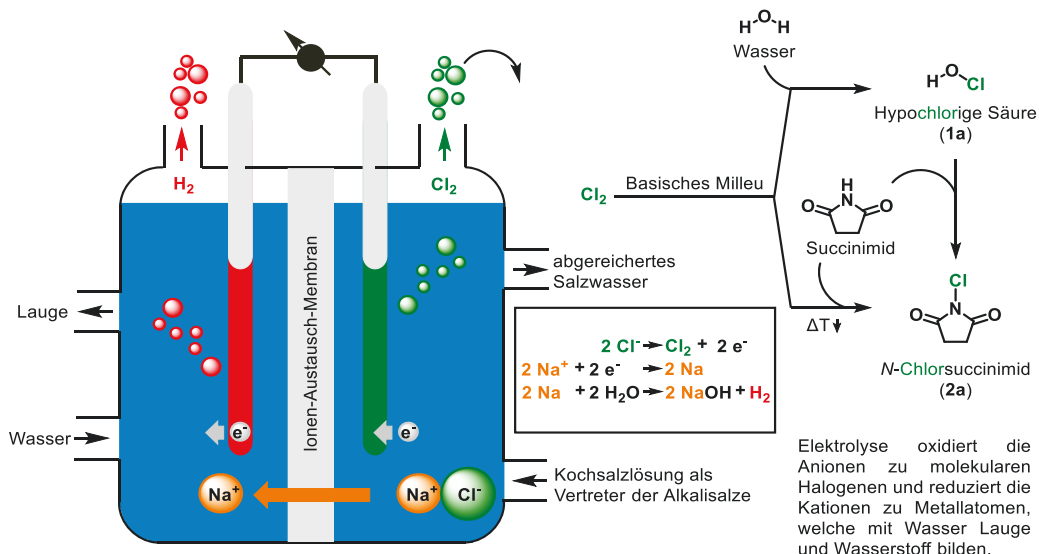


Abbildung 1: Arbeitsablauf für die Bereitstellung von Halogenierungsreagenzien aus Alkalisalzen am Beispiel von Natriumchlorid. Bei der Elektrolyse im Chloralkali-Prozess entstehen so molekulare Halogene wie Chlorgas (Cl_2), sowie in weiteren Schritten hypochlorige Säure (1a) und N-Chlorsuccinimid (2a).^[10, 15-17] Letztere benötigen bei der Herstellung eine Senkung der Temperatur. Prozess abgewandelt von Li et al.^[25]

Bei der Rekapitulation der Energiekosten für die Bereitstellung von halogenierenden Reagenzien, wie Hypohalogenensäuren **1**, oder *N*-Halogensuccinimiden (NXS) **2**, vor allem über den Chloralkali-Prozess (Abbildung 1), muss die Frage beantwortet werden, ob diese Halogene in den Wirkstoffen nötig sind.

Auch mit Blick auf die Toxizität der Intermediate wie bspw. dem Chlorgas, das bei der Herstellung von Hypochlorsäure (**1a**) und *N*-Chlorsuccinimid (NCS) (**2a**) ein Vorläufer ist, muss eine überzeugende Argumentation zur Funktion von Chlor-Substituenten dargelegt werden. Hierzu soll die Aufmerksamkeit sowohl auf die sterischen, als auch elektronischen Eigenschaften von Halogenverbindungen gelegt werden. Das Vorhandensein eines Halogens (Cl, Br, I) erhöht in der Regel die Größe und damit Sperrigkeit einer Verbindung, wodurch es z. B. Taschen im aktiven Zentrum blockiert. Der Einfluss des sterischen Anspruchs einer funktionellen Gruppe ist aber eine generelle Herausforderung in der Biokatalyse.^[26] Ein weiterer Effekt der Halogene ist die erhöhte Membrandurchlässigkeit von Molekülen.^[27] Dies ist unter anderem für die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke^[28] und die orale Absorption (auch Resorption genannt) relevant,^[29] kann jedoch nicht mit dem sterischen Anspruch begründet werden, sondern mit einer erhöhten Lipophilie. Neben diesen Eigenschaften haben Halogene auch Auswirkungen auf die Polarisierung einer Verbindung. Einerseits haben die Halogene der oberen Periode eine hohe Elektronegativität (F: 3.98; Cl: 3.16),^[30] was zu einer latenten Polarisierung der Kohlenstoff-Halogen-Bindung im Molekül (Abbildung 2 (I)) führt (Vergleich: H: 2.20; C: 2.55; O: 3.44). Andererseits erhöht sich die Polarisierbarkeit der Halogene mit zunehmender Periode durch einen größeren Atomradius (Br, I), sodass insbesondere Wechselwirkungen mit weichen Nucleophilen oder Elektrophilen gefördert werden.^[31, 32]

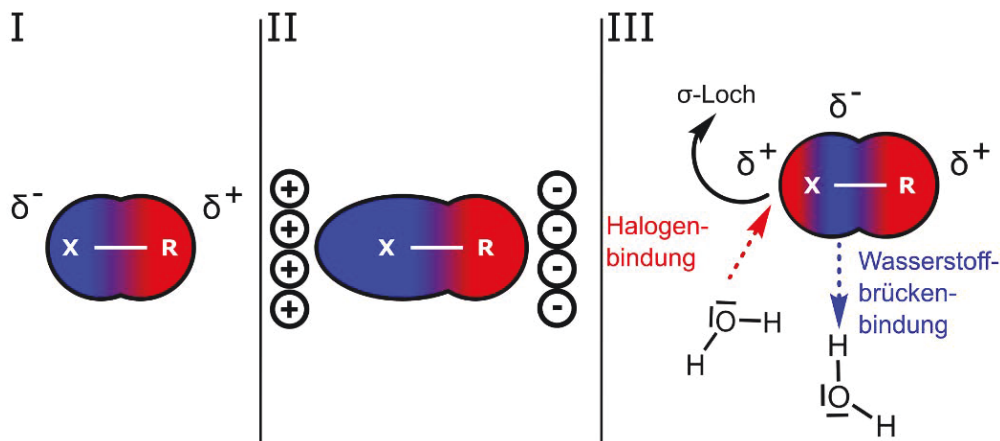


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Elektronenverteilung in Halogenen. I) Latente Polarisation einer Kohlenstoff-Halogen-Bindung (R = Kohlenstoff-Kette, X = F, Cl, Br, I). II) Polarisierbarkeit von großen Halogenen (X = Br, I), die an ein Kohlenstoff-Atom gebunden sind. Das äußere elektrische Feld, das z. B. durch ein näherndes Elektrophil oder Nukleophil verursacht wird, führt zur Verzerrung der Elektronendichte. III) Schematische Darstellung des "σ-Lochs". Die Elektronendichte wird zur Kohlenstoff-Halogen-Bindung gezogen, wobei die Stärke mit der Größe des Halogens allmählich zunimmt (I > Br > Cl >>> F). Diese anisotrope Verteilung der Elektronen in den äußeren Orbitalen des Halogens schafft einen Bereich mit höherer Elektronendichte um den Gürtel des Halogens, welcher eine Wechselwirkung mit Elektrophilen und Wasserstoffbindungen ermöglicht. Senkrecht zur Richtung der Bindung, am äußeren Ende des Halogens, befindet sich ein Bereich mit Elektronenmangel, wodurch ein teilweise positiv geladener Bereich im Halogen entsteht. Dieser, allgemein als "σ-Loch" bezeichnete, Bereich kann durch Nucleophile angegriffen werden oder diese koordinieren. Darstellung erfolgte in Anlehnung an Fejzagić et al.^[31]

Die latente Polarisation ist in Abbildung 2 (II) zwar als gleichverteilter Gradient dargestellt, jedoch entspricht dies nicht vollkommen der Realität. Durch die Form der p -Orbitale entsteht ein Loch in der Elektronendichte (Abbildung 2 (III)), das dem Bindungspartner des Halogens gegenüberliegt („σ-Loch“).

Durch das Vorhandensein dieses σ-Lochs ergibt sich die Möglichkeit, mit ebenfalls elektronegativen Heteroatomen wie Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel (O, N, S) über sogenannte Halogenbindungen in äquatoriale Richtung (waagrecht), als auch über Wasserstoffbrückenbindungen in axiale Richtung (senkrecht), zu interagieren.^[33, 34] Da es sich bei dieser besonderen Eigenschaft um eine alternative Wechselwirkung der nicht-kovalenten Art handelt, waren die Halogenbindung und ihre Interaktionspartner Fokus verschiedener pharmakologischer Untersuchungen.^[24, 33, 35-38] Unabhängig davon, ob es sterische, elektronische oder hydrophobe Wechselwirkungen sind, hat die Präsenz von Halogenen einen großen Einfluss auf die biologische Wirkung, wie das zuvor genannte Beispiel des Vancomycins (**3**) verdeutlichte.^[7]

Unter anderem aus diesem Grund sind bei der Entdeckung von neuen Arzneimitteln regelmäßig Halogensubstituenten in den jeweiligen Kandidatenstrukturen zu finden. Bezieht man sich bspw. auf die Daten aus dem Jahr 2014, so beinhalteten 35 % der potentiellen Medikamente in der Entdeckungsphase Halogenatome. In 36 % der Fälle trugen diese in der klinischen Phase II Halogene. Von den Medikamenten, die es durch die klinischen Phasen geschafft haben und vertrieben werden, sind es schließlich noch

26 %.^[37] Dieser Trend zeigt, dass Halogenen bei der Entwicklung und Entdeckung von Arzneimitteln eine besondere Rolle zukommt und in der Regel ihren Weg, in das für die Behandlung vorgesehene Endprodukt, finden. Das am häufigsten in Wirkstoffe eingebrachte Halogen ist Fluor mit 57 %.^[23] Die kovalente Fluorbindung ist äußerst stark und beträgt etwa 456 kJ/mol für CF_4 , so dass diese Bindungen im Körper in aller Regel nicht gespalten werden können. In einigen Ausnahmen ist dies unter hohem energetischen Aufwand möglich.^[39] Hinzu kommt, dass Aufgrund der extremen Polarisierung der C-F-Bindung und der zusätzlich ähnlichen Größe von Fluor-Substituenten zu Wasserstoff, eine besonders starke Polarisierung auftritt, während sich die Gesamtgröße des Moleküls nicht verändert, was bspw. Einfluss auf die Bindung in aktiven Zentren von Enzymen und Rezeptoren hat. Außerdem ist Fluor somit ein schwacher Halogenbindungs-, dafür aber ein guter Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor.^[40, 41] Hierdurch wird die Halbwertszeit der fluorierten Wirkstoffe in Umwelt und menschlichen Körpern vergleichsweise stark erhöht.^[42] Von allen halogenierten Wirkstoffen ist Ledipasvir (**4**) (Stand 2016) das weltweit am meisten unter dem Namen Harvoni verkaufte halogentragende Medikament (Top 10 Liste halogenierter und nicht halogenierter Medikamente: Platz 2).^[43] Es wird zur Behandlung von Hepatitis C eingesetzt. Ein weiterer wichtiger Wirkstoff ist das einfach fluoridierte Medikament Dacomitinib (**5**), welches in klinischen Studien zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungenkrebskrankungen getestet wird.^[44]

Iod ist das genaue Gegenteil zu Fluor und wird mit 1 % Anwendung am seltensten verwendet.^[45] Der Nutzen von Iod liegt eher auf der synthetischen Seite. Die Gründe sind der wesentlich größere Radius des Atoms und die geringere Elektronegativität. Letzteres macht die Bindungen mit Kohlenstoff-Atomen wesentlich labiler, als bspw. die des Broms und können daher leicht gespalten werden.

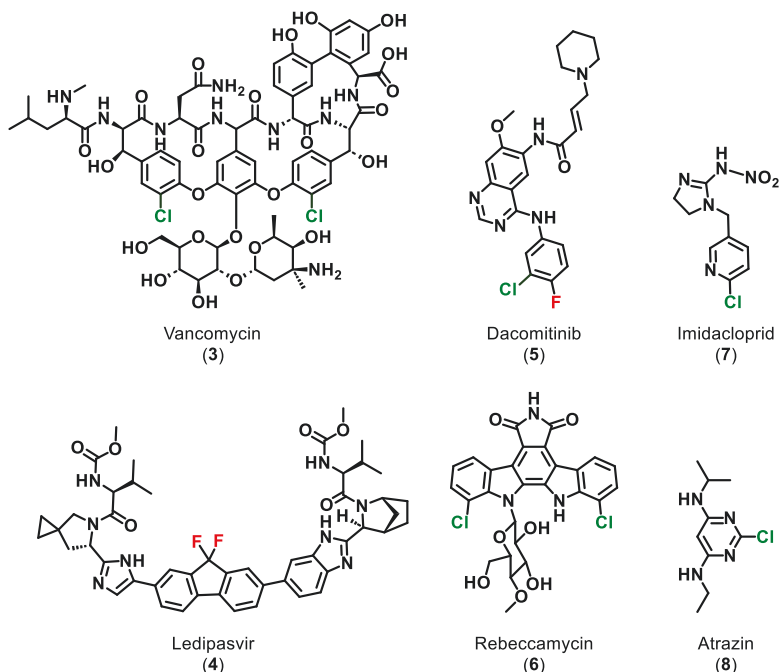


Abbildung 3: Ausgewählte Beispiele für halogenierte Natur- bzw. Wirkstoffe. Neben dem natürlichen Antibiotikum Vancomycin (3) aus dem Organismus *Streptomyces orientalis*^[7] und dem Topoisomerase-I-Inhibitor Rebeccamycin (6) aus *Lechevalieria aerocolonigenes*,^[46] finden sich hier auch synthetische Wirkstoffe wie das antivirale Ledipasvir (4),^[47] der Rezeptorinhibitor Dacomitinib (5), sowie das Insektizid Imidacloprid (7)^[48] und Herbizid Atrazin (8).^[49]

Bromierte Verbindungen sind in Arzneimitteln ebenfalls nur selten zu finden und machen nur etwa 4 % aller halogenierten Verbindungen aus. Auch hier sind die Gründe die geringere Polarisierung der Kohlenstoff-Brom-Bindung und der große Radius, weshalb auch Brom in der Regel längere und damit labilere Bindungen bildet (272 kJ/mol für CBr₄)^[39], welche für die meisten Arzneimittelkandidaten nicht für eine angemessene Hemmung ausreichen.^[39] Chlor ist mit 38 % das zweithäufigste Halogen in halogenierten Arzneimitteln. Aufgrund seines kleineren Radius^[50] ist es schon ein mäßig guter Halogenbindungsakzeptor und relativ stabil (327 kJ/mol für CCl₄).^[39] Chlor in einer Verbindung verändert dementsprechend das Volumen und die Form, sodass es tiefe Hohlräume in Proteinen adressieren kann. Diese Eigenschaften machen Chlor als Substituenten zu einer interessanten Option für die Funktionalisierung von Heterocyclen. Eine der bekanntesten natürlichen Verbindungen mit integriertem Chlor ist Rebeccamycin (6) (Abbildung 3), welches einen schwachen Topoisomerase-I-Inhibitor darstellt und damit gute Antitumoreigenschaften vermittelt.^[51] Halogenatome sind aber nicht nur in der Pharmazie relevant, sondern haben auch in der Landwirtschaft ihre Anwendung. Zwei Vertreter sind das Insektizid Imidacloprid (7)^[48] und das Herbizid Atrazin (8)^[49].

Neben der Funktion in den finalen Zielstrukturen, werden Halogene auch zur Herstellung von Derivaten von bestehenden Wirkstoffen genutzt. Nicht nur im akademischen Bereich, sondern auch in der Industrie, ist das synthetische Werkzeug der Kreuzkupplungsreaktion eine der häufigsten Methoden zur Bildung von C-C- und C-Y-Bindungen (Y steht in diesem Fall für N, O, S). Durch den Einsatz verschiedener Übergangsmetalle und aktivierten Kohlenstoff-Komponenten lassen sich zahlreiche bioaktive Naturstoffe und deren Derivate herstellen. Ein prominentes Beispiel ist die Verwendung von Palladium für die selektive Herstellung von Arenen und heterocyclischen Gerüsten, mit unterschiedlichen Substitutionsmustern.^[52] Aber auch weniger edle bis unedle Übergangsmetalle wie Kupfer^[53], Nickel^[54] und Eisen^[55-57] sind als geeignete Katalysatoren gängig. Neben der hohen Chemoselektivität ist eine ausgeprägte Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen ein wesentlicher Vorteil dieser Art von Reaktionen. So ist es nicht verwunderlich, dass die Industrie Kreuzkupplungen zur Herstellung von Pharmazeutika und Feinchemikalien im Multikilogramm-Maßstab entwickelt hat.^[58, 59] Da der Fokus dieser Arbeit nicht auf der Synthese liegt, soll in der folgenden Abbildung 4 nur der generelle Syntheszyklus gezeigt werden. Zu den häufigsten Kreuzkupplungsreaktionen in der Herstellung von Medikamenten^[60] gehören unter anderem die Kumada^[61]-, Suzuki-Miyaura^[62]-, Stille^[63]-, Negishi^[64]-, und Sonogashira-Hagihara-Kupplung^[65]. Außerdem finden oft die Mizoroki-Heck-Reaktion^[66, 67] und die Buchwald-Hartwig-Aminierung^[68, 69] ihre Anwendung.

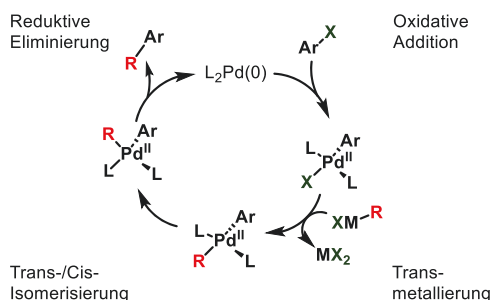


Abbildung 4: Generelle Schritte der Kreuzkupplungsreaktion. Nach der oxidativen Addition der halogenorganischen Spezies erfolgt die Transmetallierung. Die Liganden beginnen sich umzuordnen, bevor die reduktive Eliminierung zum Endprodukt erfolgt und der Katalysator regeneriert wird.

Mit diesem Portfolio an synthetischen Möglichkeiten können wir Menschen eine Großzahl an Strukturen aufbauen. Doch auch Organismen haben Strategien entwickelt, um solche Reaktionen durchzuführen. So soll im folgenden Abschnitt ein tieferer Einblick in die enzymatische Halogenierung gegeben werden.

7.2 Flavin-freie halogenierende Enzyme in der Natur

Obwohl halogenierte Naturstoffe nur im Rahmen des Sekundärstoffwechsels vorkommen^[70], haben sich mindestens sechs Arten von halogenierenden Enzymen entwickelt, viele von ihnen aus Monooxygenasen.

So vielfältig die Ursprünge der halogenierenden Enzyme sind, so unterschiedlich ist auch ihre Klassifizierung. Ein Überblick über die verschiedenen Gruppen der halogenierenden Enzyme findet sich in Abbildung 5. Obwohl sie oft synonym verwendet werden, kann zwischen Haloperoxidasen und Halogenasen eindeutig unterschieden werden.

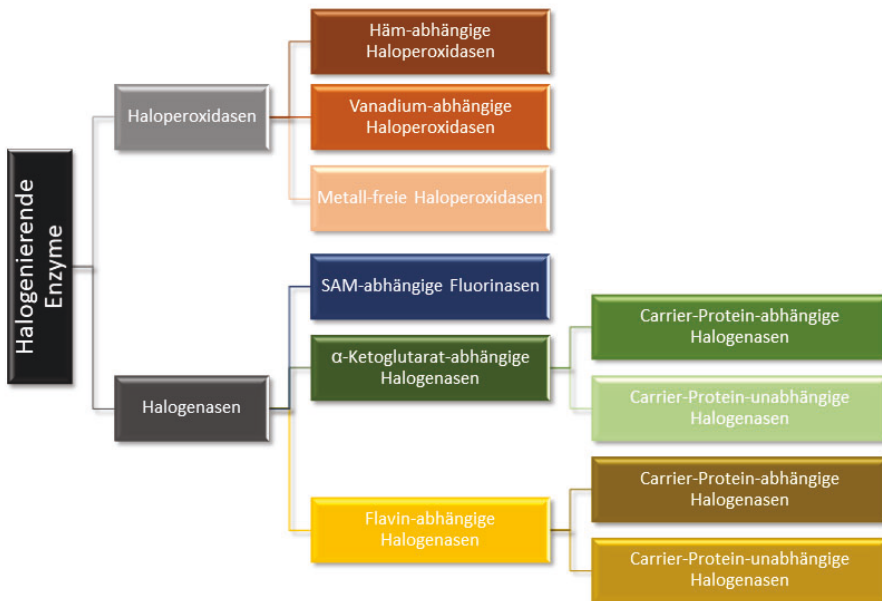


Abbildung 5: Überblick über die verschiedenen Klassen von halogenierenden Enzymen (schwarz) aufgeteilt nach Mechanismus (grau), Cofaktor und Substrat-Voraussetzungen.^[71, 72]

Erstere bilden aus dem jeweiligen Halogenanion X^- und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) über Häm-Eisen-, Vanadium-Coenzyme oder auch ganz ohne Coenzym eine hypohalogene Säure (HOX) **1**. Bei den meisten Enzymen wird die Hypohalogensäure ins Reaktionsmedium freigesetzt und die eigentliche Reaktion findet außerhalb des Enzyms statt. Dies bedeutet, dass die Regioselektivität nur durch die sterischen und elektronischen Eigenschaften des Substrats bestimmt werden. Im Gegensatz dazu verwenden die Halogenasen enzymgebundene Halonium-Spezies X^+ für die Halogenierung, welche mittels Sauerstoff (O_2) über den Zwischenschritt der Hypohalogensäure **1** entstehen.

Allerdings findet die Halogenierung der Zielstruktur im Enzym statt. Zudem können zusätzliche Elektronen-Transferproteine dafür nötig sein. Neben dieser Einteilung der halogenierenden Enzyme (Abbildung 5) gibt es auch die Klassifizierung nach Reaktionstyp, bei dem die Fluorinasen in einem nukleophilen Mechanismus das Halogenid X^- nutzen, Haloperoxidasen und Flavin-abhängige Halogenasen electrophile Halonium-Spezies X^+ verwenden und die α -Ketoglutarat-abhängigen Enzyme radikale Halogenyle X^\cdot produzieren.^[73] Was die verschiedenen Haloperoxidasen ausmacht und wie ihr katalytischer Zyklus mechanistisch abläuft, soll im Folgenden aufgeschlüsselt werden.

7.2.1 Häm-abhängige Haloperoxidasen (HPOs)

Die Häm-basierten Haloperoxidasen, kurz HPOs, waren die ersten untersuchten Haloperoxidasen und auch generell der halogenierenden Enzyme.^[31] Dieser Tatsache geschuldet handelt es sich hierbei auch um die am besten untersuchten Haloperoxidasen. Ähnlich wie im späteren Kapitel 7.4.1 für die Flavin-abhängigen Halogenasen, zeigt sich auch bei dieser Enzymgruppe eine direkte Linie der Evolution, unter anderem zu den Monooxygenasen. Häm-abhängige Haloperoxidasen tragen entsprechend der P450-Monooxygenasen eine Häm-Funktionalität als prosthetische Gruppe an einem distalen Cystein.^[74] Da diese Enzyme aber keinen Sauerstoff übertragen und daher eher den Peroxidasen ähneln, ergibt sich folglich ihr Name. Für die Entdeckung dieser Enzyme spielen das Caldariomycin (**9**) und der produzierende Pilz *Caldariomyces fumago* tragenden Rollen. Als an 2-Position dichloriertes Derivat (Abbildung 6) des 1,3-Cyclopentadions (**10**) legte **9** den Grundstein für die Suche nach Enzymen dieser Reaktivität.^[75]

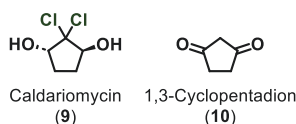


Abbildung 6: Strukturen von 1,3-Cyclopentadion (**10**) und dem darauf basierenden Naturstoff (1S,3S)-2,2-Dichlorcyclopentan-1,3-diol, besser bekannt als Caldariomycin (**9**).

Genomische Untersuchungen von *Caldariomyces fumago* legten offen, dass für diese Reaktion zwei Genprodukte mit hoher sequenzieller Übereinstimmung verantwortlich sind. Für die Namensgebung der Enzyme ist unter anderem ausschlaggebend, welche Halogene adressiert werden können. Hierbei gilt die sogenannte Regel der höchsten Elektronegativität bzw. Priorität.^[76]

Ist ein halogenierendes Enzym in der Lage Chlor-Atome einzubauen, so kann es prinzipiell auch Brom und Iod, wenn auch mit geringerer Affinität, in der Katalyse verwenden. Die zuvor genannten Enzyme aus *C. fumago* sind daher Chlorperoxidasen (CPOs).^[77] Anhand dieser Cf-CPO ist im Folgenden der katalytische Zyklus dargestellt (Abbildung 7).^[78] Ob die Hypochlorsäure (**1a**) tatsächlich freigesetzt wird und mit dem Substrat reagiert, ein Lysin eine dirigierende „Chloronium-Spezies“ ausbildet, oder das Substrat mit der Eisenoxychlorid-Spezies reagiert, ist nicht vollständig geklärt.^[79]

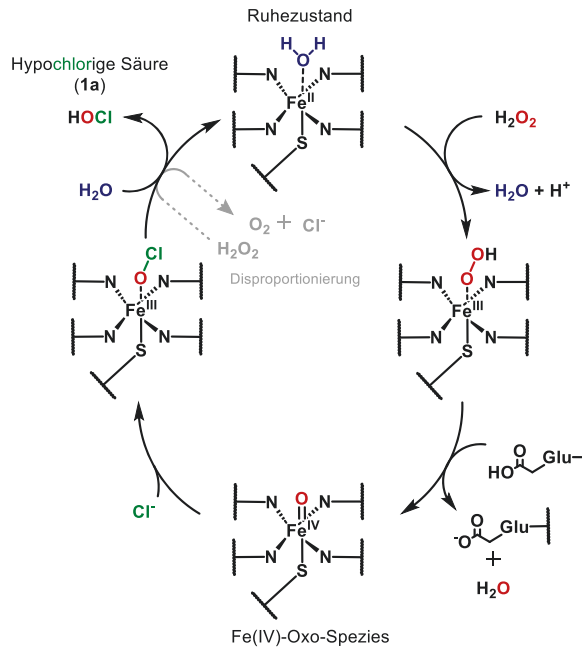


Abbildung 7: Beschriebener katalytischer Zyklus von Häm-abhängigen Haloperoxidasen am Beispiel der CPO aus *C. fumago*.^[78] Das im Ruhezustand koordinierte Wasser wird durch Wasserstoffperoxid ersetzt. Nach Protonierung des Komplexes und hieraus folgender Wasserfreisetzung kann die aktive Spezies – der Fe(IV)-Oxo-Komplex – entstehen. Nach Angriff des Chlorids entsteht eine Eisenoxychlorid-Spezies, welche unter Regeneration des Häms Hypochlorsäure (**1a**) freisetzt. Als Entkopplungsreaktion kann hierbei auch durch das Cosubstrat Wasserstoffperoxid unter Disproportionierung des Komplexes molekularer Sauerstoff freigesetzt werden, wobei das Chlorid unproduktiv regeneriert wird.

7.2.2 Vanadium-abhängige Haloperoxidasen (V-HPOs)

Entgegen der langjährigen Annahme, es gäbe nur Häm-abhängige Haloperoxidasen, wurde schließlich eine weitere Gruppe von Haloperoxidasen entdeckt. In den Genomen des saprophytischen Pilzes *Curvularia inaequalis*, sowie der Rotalge Korallenmoos (*Corallina officinalis*) und der Braunalge Knotentang (*Ascophyllum nodosum*) wurden fast zeitgleich Gene für Vanadium-abhängige Enzyme^[80] gefunden, die zur Halogenierung elektronenreicher Substrate fähig sind.^[81-83] Der Vorteil dieser Enzymgruppe, im Gegensatz zu Häm-abhängigen Haloperoxidasen, ist die höhere Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid, höhere Umsatzraten, sowie keine oxidative Inaktivierung durch Änderung des Oxidationszustandes im Metall.^[84] Allerdings führt die Freisetzung der HOX (1) ins Medium, durch das *ortho*-Vanadat, zur Reaktion mit dem Enzym selbst. Das kann eine Inaktivierung hervorrufen, sodass auch diese Enzymgruppe mit einer gewissen Instabilität behaftet ist. Analog zu den Häm- werden auch die Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen nach der Elektronegativität bzw. Priorität^[50] der Halogenide klassifiziert, die sie oxidieren können.^[85] Trotz anderer prosthetischer Gruppe lassen sich im katalytischen Mechanismus Ähnlichkeiten zu den Häm-abhängigen Haloperoxidasen finden. Der katalytische Zyklus (Abbildung 8) zeigt dies im Folgenden:^[86-88]

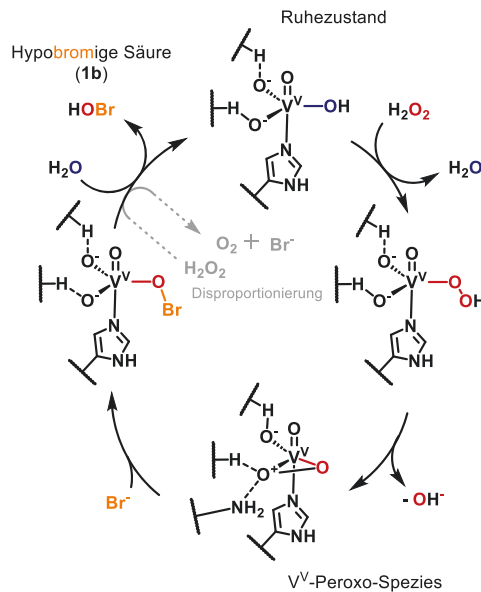


Abbildung 8: Beschriebener katalytischer Zyklus von Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen^[86-88] am Beispiel einer Bromoperoxidase. Das im Ruhezustand befindliche Vanadat (Vanadium koordiniert vier Sauerstoff-Atome) wird durch ein Histidin an der freien Koordinationsstelle besetzt. Nach Ersetzen einer Hydroxygruppe durch Wasserstoffperoxid und der Eliminierung eines Hydroxids bildet sich eine Zyloperoxo-Spezies (V^V-Peroxo-Komplex). Nach Angriff des Bromids unter Öffnung der Zyloperoxo-Gruppe entsteht eine Bromo-Vanadat-Spezies, welche unter Regeneration des Vanadats mittels Wasser Hypobromige Säure (1b) freisetzt. Als Entkopplungsreaktion kann hierbei auch durch das Cosubstrat Wasserstoffperoxid unter Disproportionierung des Komplexes molekularer Sauerstoff freigesetzt werden, wobei das Bromid unproduktiv regeneriert wird.

Für die Entscheidung, welche der beiden Enzymgruppen für eine Anwendung geeignet ist, sei vorangestellt, dass die gekoppelten Aktivitäts-Assays, die teilweise auch in unserem Institut entwickelt wurden, hypohalogene Säure für beide Enzymgruppen in der Reaktionslösung nachweisen.^[89, 90] Deshalb sollten eher Parameter, wie die Expressionsbedingungen betrachtet werden. Während sich die heterologe Expression von Häm-abhängigen Haloperoxidasen als herausfordernd darstellte, zeigten Vanadium-abhängige Haloperoxidasen bessere Ausbeuten und Flexibilität. Auch die Umsatzraten sind für letztere Gruppe höher.^[31] Für die Verwendung in der Biokatalyse sind zudem die hohe Temperaturstabilität und Lösemitteltoleranz der V-HPOs von Vorteil.^[82]

7.2.3 Metall-freie Haloperoxidasen

Zusätzlich stellt die Natur eine weitere Enzymgruppe der HPOs bereit. Die metallfreien – auch Perhydrolasen genannten – Haloperoxidasen zeichnen sich durch eine starke Ähnlichkeit zu Lipasen aus. Wegen dieser Abstammung wurden bekannte Lipasen auf halogenierende Aktivität untersucht.^[91] Als Cosubstrat findet auch hier Wasserstoffperoxid seine Anwendung und bildet mit Halid-Ionen und einer katalytischen Menge Carbonsäure über eine katalytische Triade aus Aspartat, Histidin und Serin eine Peroxycarbonsäure, welche die reaktive Spezies der O-halogenierten Carbonsäure (Acylhypohalid) ausbildet (Abbildung 9).^[92]

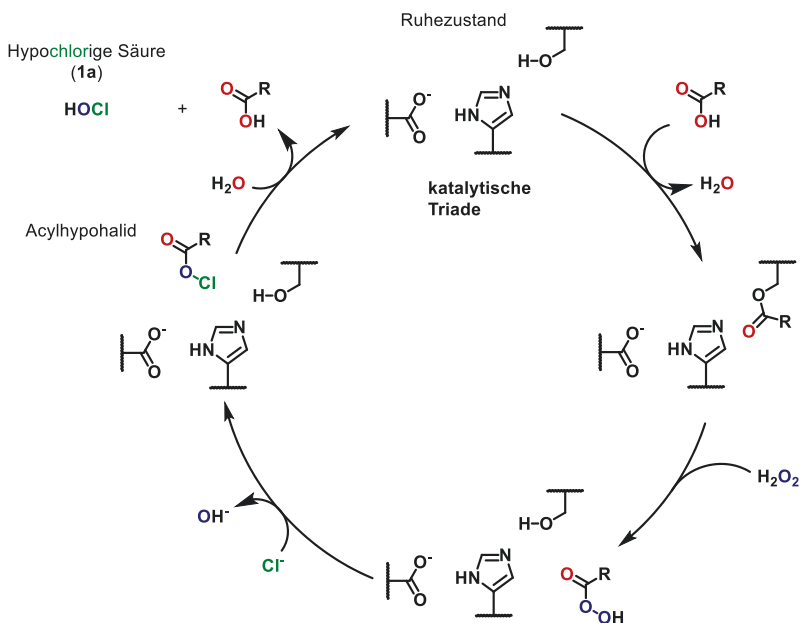


Abbildung 9: Katalytischer Zyklus von metallfreien Haloperoxidasen^[92] am Beispiel der Bereitstellung von hypochloriger Säure (1a).

Chemisch gesehen entspricht der Mechanismus^[31, 93] der Halogenierung, wie sie bspw. mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) durchgeführt wird.^[94] Diese Perhydroxidasen besitzen die Fähigkeit zur Halogenierung allerdings nur als Nebenaktivität, weshalb auch die Umsatzraten sehr gering sind.

7.2.4 α -Ketoglutarat-abhängige Halogenasen

Während die vorangegangenen drei Gruppen der Haloperoxidasen alle HOX (**1**) als aktives Halogenierungsreagenz generieren, zeigen die Eisen-(II)- α -Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen [(Fe/ α KG)-Halogenasen] eine direkte Halogenierung des Substrats am Eisenzentrum (Abbildung 10).

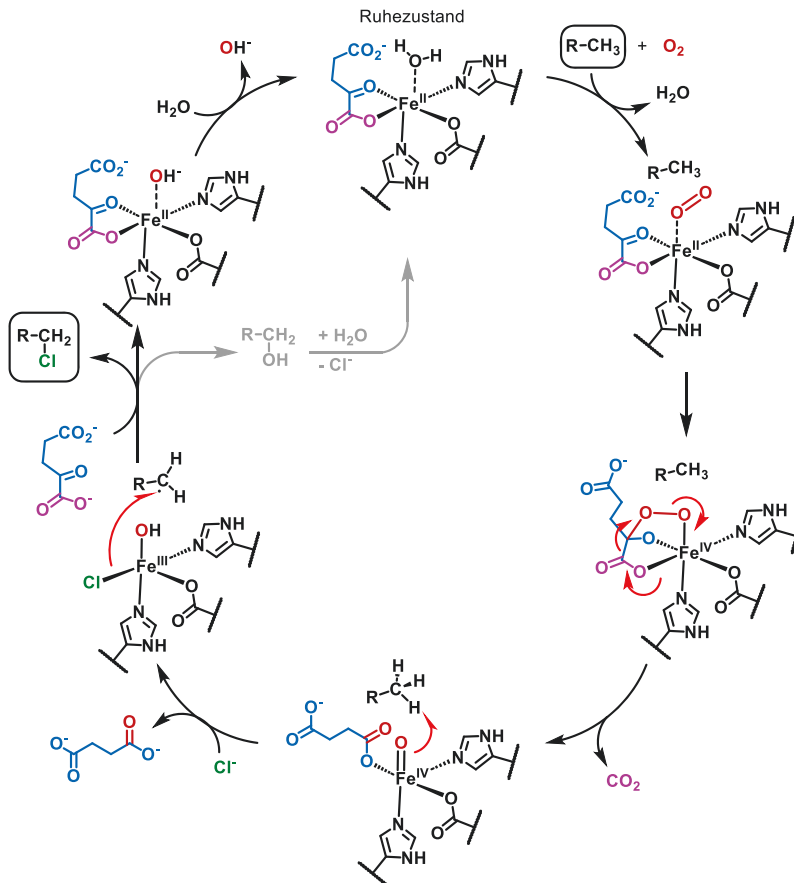


Abbildung 10: Katalytischer Zyklus von α -Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen^[95, 96] am Beispiel von Chlorid und dem Substrat ($R-CH_3$). Dargestellt ist die konstruktive Katalyse (schwarz) mit Halogenierung zum Produkt ($R-CH_2-Cl$). Im Schritt des radikalischen Angriffs mit Chlorid könnte auch die Hydroxylgruppe reagieren und unter Freisetzung des eingesetzten Chlorids in einer kompetitiven Katalyse einen Alkohol bilden (grau).

Über einen Radikalmechanismus können so nicht nur nukleophile Substrate mit entsprechend elektronenreichen Doppelbindungen adressiert werden, sondern auch aliphatische Kohlenwasserstoff-Bindungen, die eine sp^3 -Hybridisierung aufweisen.^[95, 96]

Die erste (Fe/ α KG)-Halogenase, die beschrieben wurde, war die SyrB2 (*Syringomycin Biosynthese Enzym 2*) aus dem Organismus *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* B301D. Hierbei handelt es sich um ein Nicht-Häm-Eisen [non-heme iron (NHFe)] Enzym aus dem Nicht-Ribosomalalen-Peptidsynthese-Cluster (NRPS) des Syringomycins. Dieses ist verantwortlich für die Chlorierung von L-Threonin zum 4-Cl-L-Threonin.^[97] Während zuvor Wasserstoffperoxid als Cosubstrat fungierte, wird das Eisen bei diesen Enzymen durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff aktiviert. Das eingesetzte α -Ketoglutarat (α KG) wird im Laufe des katalytischen Zyklus zu Succinat und CO_2 umgesetzt.^[95, 97, 98] Als häufigstes Nebenprodukt dieser Reaktion entsteht durch Konkurrenz zwischen gebundenem Halogen und Hydroxyl-Gruppe auch immer der analoge Alkohol unter Freisetzung des zuvor eingesetzten Halogenids.

Während sich die zuvor genannten halogenierenden Enzyme prinzipiell durch den Einbau von Iod, Brom oder Chlor auszeichneten, soll auch der enzymatische Einbau von Fluor betrachtet werden.

7.2.5 SAM-abhängige Fluorinase

Da diese Enzymgruppe unabhängig von Sauerstoff fungiert entstehen zwar keine unerwünschten Nebenprodukte, allerdings ist das Substratspektrum mit dem kationischen S-Adenosyl-L-Methionin (SAM^+) als einzigem Substrat stark limitiert. Ähnlich wie α KG als Cosubstrat bei den (Fe/ α KG)-Halogenasen, wird das SAM bei den Fluorinasen als Aminosäure-basiertes Substrat verbraucht. Im Zuge einer nukleophilen Substitution 2. Ordnung (S_N2) wird L-Methionin entfernt und 5'-Fluor-5'-Desoxyadenosin (5'-FDA) (**11**) freigesetzt (Abbildung 11). Letzteres kann in sukzessiven Schritten zu Fluoracetat oder 4-Fluorthreonin weiter umgesetzt werden. Die erste gefundene Fluorinase (FIA) aus dem Organismus *Streptomyces cattleya* wird auch als 5'-FDA-Synthase (EC 2.5.1.63) bezeichnet.^[99, 100]

Auf der Suche nach weiteren Fluorid-übertragenden Halogenasen fanden sich bis *dato* nur Homologe in anderen Organismen, womit die Fluorinase FIA bis heute einzigartig bleibt.^[101, 102] Neue Erkenntnisse soll ein aktueller Fund, die Chlorinase Sall, liefern., die den gleichen Mechanismus verwendet, allerdings kein Fluorid akzeptiert. Mutagenese-Experimente lassen auf Gründe wie Distanz (Größe des aktiven Zentrums) und unterschiedliche energetische Barrieren der Übergangszustände schließen.^[103]

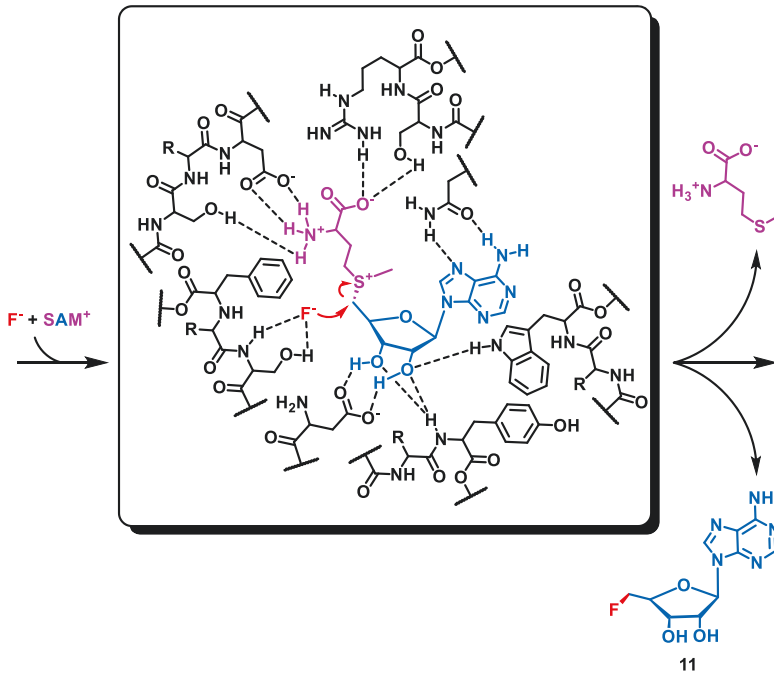


Abbildung 11: Katalytischer Mechanismus der nukleophilen Substitution 2. Ordnung (S_N2) für die Fluorinase aus *Streptomyces cattleya*.^[99, 100] Das zuvor mit Wasser gefüllte aktive Zentrum (schwarz) zeigt initial eine Bindung von Fluorid (rot) und dem kationischen *s*-Adenosyl-*L*-Methionin (SAM^+). Nach Angriff des Fluorids und dem heterolytischen Bindungsbruch im SAM^+ entstehen das *L*-Methionin (lila) und das in hellblau gezeigte 5'-Fluor-5'-Desoxyadenosin (**11**). Die gestrichelten Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen (HBB) an.

Bevor nun die letzte Klasse von Halogenasen – die der Flavin-abhängigen Halogenasen – betrachtet wird, sollen zunächst die Grundlagen zum entsprechenden Cofaktor gelegt werden.

7.3 Riboflavin – Vitamin in Farbe

7.3.1 Riboflavin und Derivate in der Lebensmittelindustrie

Flavine **12** sind gelb gefärbte Naturstoffe, die ein Isoalloxazin-Gerüst als reaktive Gruppe tragen (Abbildung 12).^[104] Dabei ist Riboflavin (**12a**), chemisch formuliert auch als 7,8-Dimethyl-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[*g*]pteridin-2,4-dion bezeichnet, die Vorstufe für alle weiteren Flavine.^[105] Es sind die wissenschaftlichen Bezeichnungen für das Vitamin B2^[106] (früher auch Vitamin G) und es kommt als Farbstoff E101 (auch das Monophosphat-Natriumsalz (**12b**)) in diversen Lebensmitteln vor. Vor knapp 10 Jahren fand daher durch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (*European Food Safety Authority* (EFSA), Parma, Italien) eine erneute Reevaluierung des Einsatzes von Verbindung **12a** statt.^[107] Obgleich die Metabolisierung von Verbindungen **12** nicht Fokus dieser Arbeit ist, so können diese Aspekte wie Stabilität,^[108] aber auch Informationen über industrielle Produktionsprozesse und häufige Degradationsprodukte^[109, 110] relevant für die Nutzung von Flavin-Cofaktoren in der Biokatalyse sein und werden in den folgenden beiden Abschnitten beleuchtet.

Bei der Befragung der EFSA verschiedener Produzenten (bspw.: *saqual* GmbH, Reinach, Schweiz) zur Herstellung von Flavinen **12**, wurde zwar die *state of the art* Syntheseroute erwähnt, jedoch wurde sie schon zu dem damaligen Zeitpunkt nicht mehr genutzt. Stattdessen erfolgte die Produktion rein biologisch und nur die finalen Phosphorylierung zu **12b** erfolgte noch chemisch als semisynthetischer Schritt.^[111] Ähnlich wie auch bei anderen relevanten biologischen Produkten – so unter anderem bei dem Beispiel Insulin^[112] – wird heute eine mikrobielle Produktion eingesetzt.^[113]

In Fermentationsprozessen und den anschließenden Filteranlagen werden dabei durch einen genetisch optimierten *Bacillus subtilis* Stamm große Mengen Vitamin B2 (**12a**) bereitgestellt. Ein alternativer Produktionsstamm ist hierbei der Pilz *Ashbya gossypii*. Erwähnt sei aus dem Bericht außerdem, dass Riboflavin (**12a**) und dessen Derivate, Riboflavin-5'-monophosphat (**12b**) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (**12c**), zwar hitzestabil sind, allerdings sehr anfällig für die Degradation bei Licht und Feuchtigkeit. Wird Vitamin B2 unter Lichteinfluss Sauerstoff ausgesetzt, so bilden sich schnell Abbauprodukte. Je nach pH-Wert bildet sich bspw. unter alkalischen Bedingungen das Lumiflavin (**12d**) oder in neutralen bis sauren Milieus Lumichrom (**12e**) (Abbildung 12). Weiteres Abbauprodukt kann das 8-Hydroxymethylriboflavin (**12f**) unter Freisetzung von 2,3-Butandion sein.^[109, 110, 114] Eine lichtgeschützte und vor allem trockene Lagerung ist daher dringend geboten.^[107]

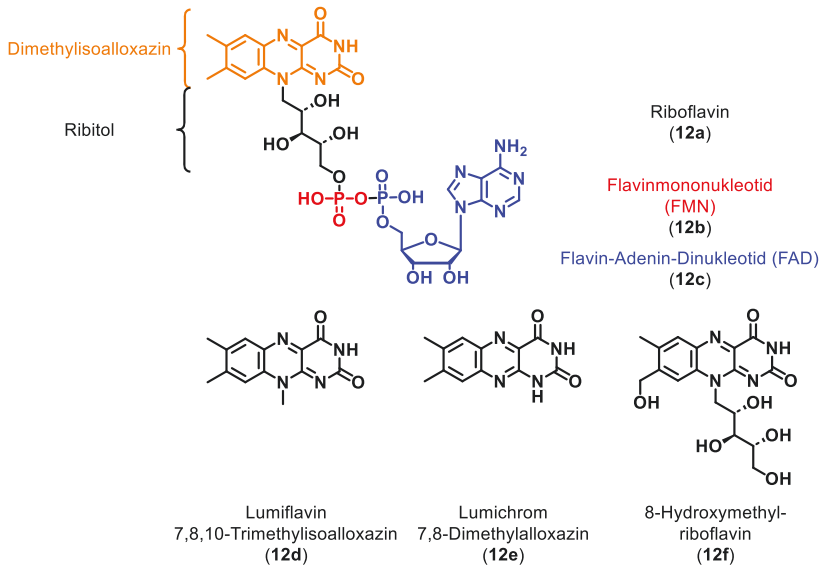


Abbildung 12: Strukturen von Vitamin B2 (12a) und den davon abgeleiteten Cofaktoren Riboflavin-5'-Monophosphat (12b) (rot) und Flavin-Adenin-Mononucleotid (12c) (blau), sowie drei Degradationsprodukte^[109, 110, 114]: Lumiflavin (12d), Lumichrom (12e) und 8-Hydroxymethyl-Riboflavin (12f).

7.3.1 Flavine als Organokatalysatoren

Begonnen hat alles mit der Entdeckung der Flavine **12** im Jahr 1879 und des ersten Flavin-abhängigen Proteins im Jahr 1930 durch Otto Warburg.^[115] Mit der im selben Jahr erfolgten Charakterisierung wurde der Grundstein für die Flavin-Forschung gelegt. Durch das Potential drei Redoxstufen zu stabilisieren – oxidiert, reduziert und radikalisch – sowie der Möglichkeit durch Licht-Anregung und dem Zusatz von Sauerstoff ein C_{4a}-(Hydro)peroxyflavin zu generieren, war die Voraussetzung für organokatalytische Anwendungen geschaffen. Erstes Interesse erlangten die bakteriell produzierten Flavin-Derivate (Abbildung 13) Roseoflavin (8-Dimethylamino-8-demethyl-D-riboflavin)^[116] (**12g**), sowie die Deazaflavine Faktor 420 (**12h**) (F₄₂₀, 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavin)^[117] und dessen Biosynthese-Intermediat Faktor FO (**12i**) (F_O, 8-Hydroxy-7-demethyl-5-deaza-riboflavin)^[118].

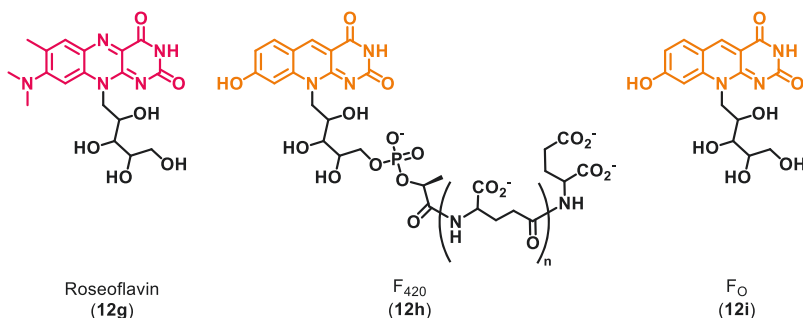


Abbildung 13: Darstellung dreier Analoga des Riboflavins (**12a**). Das rosa bis rote Roseoflavin (**12g**) aus *Streptomyces davawensis* ist das einzig bekannte Flavin-Derivat mit antibiotischer Wirkung.^[116] Das vorrangig in Bakterien und Archaeen vorkommende Deazaflavin Faktor F_{420} (**12h**) trägt seinen Namen durch eine starke Lichtabsorption bei der Wellenlänge 420 nm, was ihm eine gold-gelbene Farbe verleiht.^[117] Bei Faktor F_0 (**12i**) handelt es sich um eine Vorstufe in der Biosynthese von F_{420} (**12h**).^[118]

Für die Oxidation mit solchen Analoga erfolgt die Reduktion in einem ersten Schritt mittels Wasserstoffperoxid. Anschließend wird durch die Anlagerung von molekularem Sauerstoff die Bildung des C_{4a} -Hydroperoxyflavin (Abbildung 17 B) ermöglicht, um einen atomaren Sauerstoff-Transfer (Oxygenierung) unter Wasserabspaltung durchzuführen und den Katalysator zu regenerieren.^[119] Da die Flavine **12** und deren Derivate jedoch keinerlei Regioselektivität mit sich bringen, stellt die Biokatalyse eine attraktive Alternative für den Einsatz von Flavinen dar.

7.3.2 Flavine als Cofaktoren in der Natur

Die Biosynthese von Riboflavin (**12a**) erfolgt sowohl in Bakterien und Pilzen, als auch Archaeen und Pflanzen. Der Einfachheit halber soll im Folgenden die prokaryotische Biosynthese in Kürze skizziert werden (Abbildung 14). Startmolekül für die Biosynthese ist Guanosintriphosphat (GTP) (**13**). Im Zuge des ersten Schrittes erfolgt die Insertion von Sauerstoff am formalen Imidazolring durch die GTP-Cyclohydrolase II, was die Öffnung des Ringsystems zur Folge hat. Das so gebildete 2-Amino-5-formamid-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-triphosphat (**14**) wird unter Freisetzung von Formiat und Pyrophosphat zum 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3*H*)-pyrimidinon-5'-phosphat (**15**). Es folgt eine oxidative Desaminierung unter Ammoniak-Freisetzung zum 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion-5'-phosphat (**16**) – alternativ 5-Amino-6-(5-phospho-D-ribosylamino)uracil genannt – durch die Diamino-hydroxyphosphoribosylaminopyrimidin-Desaminase.^[120, 121]

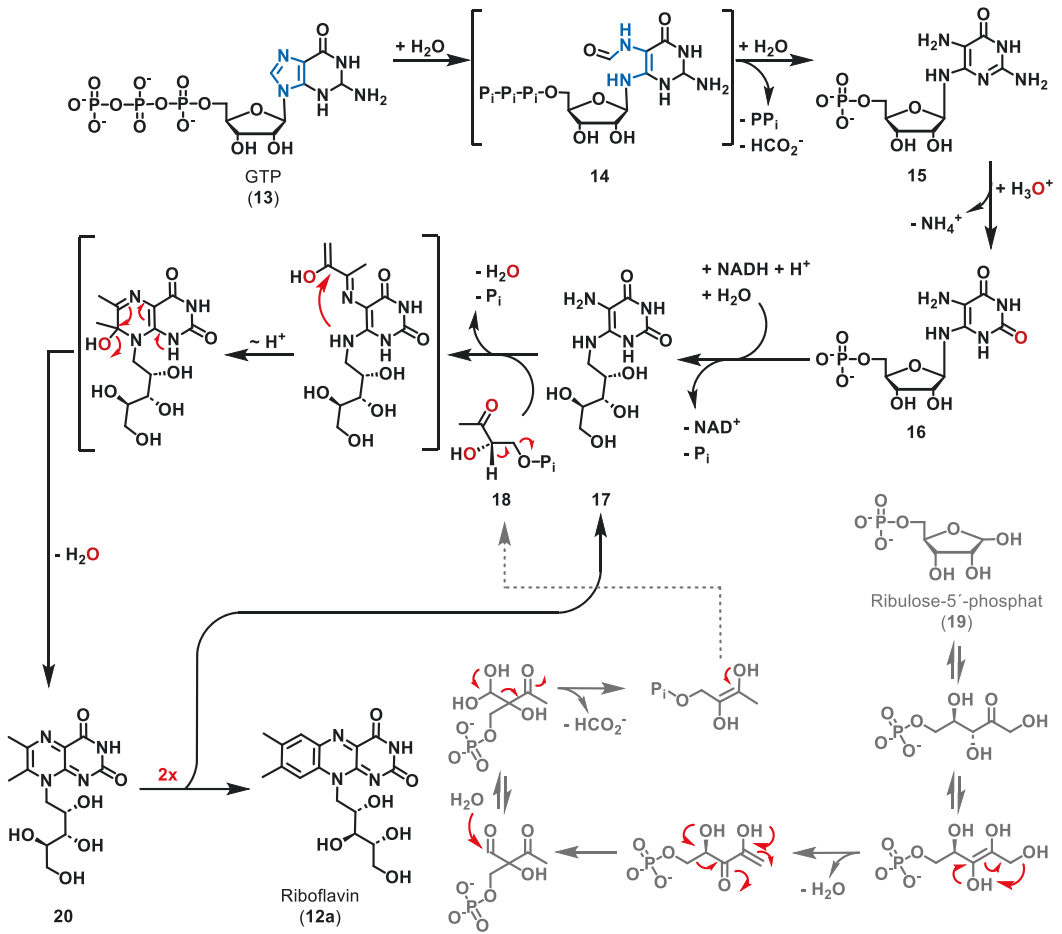


Abbildung 14: Darstellung der Biosynthese von Riboflavin (12a) am Beispiel von *Bacillus subtilis*. In zwei sukzessiven Hydrolyseschritten wird unter Freisetzung von Pyrophosphat und Formiat aus Guanosintriphosphat (GTP) (13) 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat (15) gebildet. Es folgt eine oxidative Desaminierung unter Ammoniak-Freisetzung zum 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (16). Nach Ringöffnung des Pyranosids zur Ribityl-Kette entsteht das noch phosphorylierte 5-Amino-6-(5-D-ribitylamino)uracil (17). Eine Phosphatase setzt die terminale Hydroxygruppe frei und ermöglicht die Fusion mit 1-Desoxy-L-glycero-tetrolose-4-phosphat (18). Letzteres entsteht aus der Formiat-Abspaltung von Ribulose-5-phosphat (19).^[122] Schließlich bildet sich das Vitamin B2 (12a) aus dem zuvor entstandenen 6,7-Dimethyl-8-ribityllum-azin (20). Hierbei werden zwei Moleküle 20 zu einem Riboflavin (12a) und einem 5-Amino-6-(5-D-ribitylamino)uracil (17) umgelagert.^[120, 121]

Nach Ringöffnung des Pyranosids zur Ribityl-Kette durch die 5-Amino-6-(5-phosphoribosylamino)-uracil-Reduktase entsteht in einer Reduktion das noch phosphorylierte 5-Amino-6-(5-D-ribitylamino)uracil (17). Die dazugehörige Phosphatase setzt die terminale Hydroxygruppe frei und ermöglicht über die 6,7-Dimethyl-8-ribityllum-azin-Synthase die Fusion mit 1-Desoxy-L-glycero-tetrolose-4-phosphat (18). Letzteres entsteht aus der Formiat-Abspaltung von Ribulose-5-phosphat (19) durch die 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase.^[122]

Zum Schluss bildet die Riboflavin-Synthase das Vitamin B2 (**12a**) aus dem zuvor entstandenen 6,7-Dimethyl-8-ribityllum-azin (**20**). Hierbei werden zwei dieser Moleküle zu einem Riboflavin (**12a**) und einem 5-Amino-6-(5-D-ribitylamino)uracil (**17**) umgelagert. Optional kann dann noch die Riboflavin-Kinase die terminale Phosphorylierung zum FMN (**12b**) durchführen und die FMN-Adenylyltransferase bildet das FAD (**12c**).^[120, 121]

Nachdem nun exemplarisch skizziert wurde, wie sich **12a** in den Organismen darstellt, soll nun die biologische Bedeutung und damit die Funktion im Kontext verschiedener Protein-Klassen beleuchtet werden. Die chemischen Eigenschaften der Flavine **12** spiegeln sich auch in der Biokatalyse wider, denn mehr als 90 % der Flavin-abhängigen Enzyme katalysieren Redox-Reaktionen und werden daher der Enzymklasse EC1 – Oxidoreduktasen – zugeordnet.^[123] Die generelle Häufigkeit kann hierbei zwischen den verschiedenen Organismen wie Bakterien, Pflanzen, Pilzen, Protozoen und Archaeen unterschiedlich sein. Die restlichen Enzyme, welche Flavine **12** als Cofaktoren nutzen, sind Transferasen mit 4.3 %, Lyasen mit 2.9 %, Isomerasen mit 1.4 %, sowie die Ligasen mit 0.4 % (Abbildung 15).^[124] Der Großteil dieser Enzyme (75 %) bindet dabei FAD als Cofaktor und nur 25 % nutzen FMN. Ebenfalls zu erwähnen sei, dass nur etwa 10 % dieser Enzyme die Flavine **12** kovalent binden.

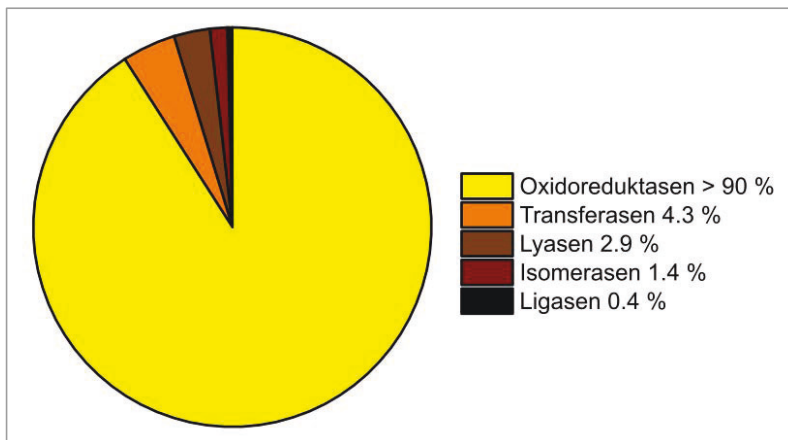


Abbildung 15: Prozentuale Verteilung von Flavin-anhängigen Enzymen auf die verschiedenen Enzymklassen.^[124]

Durch die große Anzahl an hochauflösenden Kristallstrukturen für Flavoproteine, lässt sich auch die Verteilung über Tertiärstrukturen bewerten.^[124] So kann für FAD-abhängige Enzyme eine Präferenz für die Rossmann-Falte (~50 %) festgestellt werden, wohingegen FMN-bindende Enzyme typischer Weise eine ($\beta\alpha$)₈-(TIM)-barrel-like oder flavodoxin-like Faltung der Domäne bevorzugen (Abbildung 16).

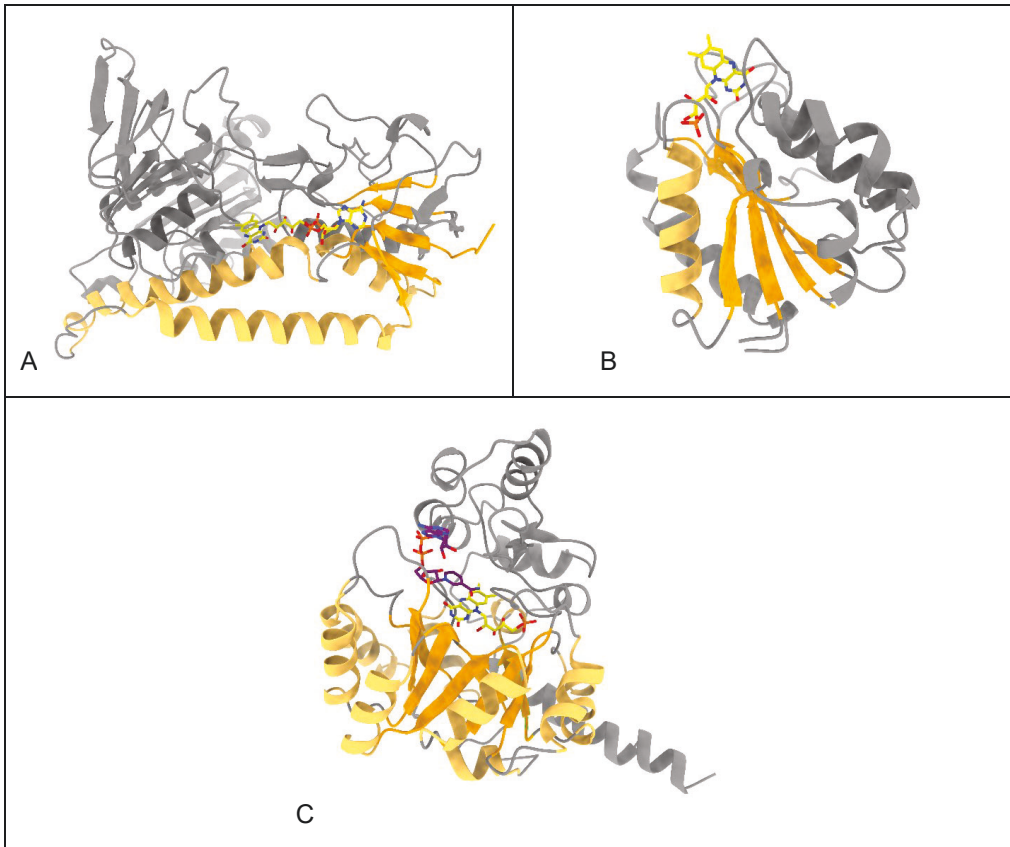


Abbildung 16: Darstellung der drei häufigsten Struktur motive (grau) für Flavin-abhängige Enzyme mit dem Flavin-Cofaktor (gelb mit Farben nach Heteroatomen). **A)** Gebundenes FAD (**10c**) mit dem typischen β -Faltblatt (orange) der Rossmann-Falte^[125] mit den begleitenden α -Helices (hellorange) in der Glutathionreduktase (PDB: 3GRS).^[126] **B)** Stabilisierung des Phosphats des FMN (**10b**) durch den Dipol einer der α -Helices (hellorange) mit parallel liegendem β -Faltblatt (orange) im Flavodoxin^[127] (PDB: 1CZN).^[128] **C)** Das $(\beta)\alpha$ -(TIM)-barrel^[129] der Flavin-abhängigen NADH-Chinon-Oxidoreduktase (PDB: 6E2A)^[130] mit alternierenden α -Helices (hellorange) und β -Strängen (orange). Zusätzlich gezeigt ist das NADH (**19a**) (violett mit Farben nach Heteroatomen).

Typische Reaktionen, die von diesen Oxidoreduktasen durchgeführt werden, sind unter anderem Monooxygenierungen, Halogenierungen und Dehydrogenierungen über Ein- und Zwei-Elektronen-Transfers, meistens durch Aktivierung von molekularem Sauerstoff. In einigen Fällen ist dafür der Einsatz von zusätzlichen, redoxaktiven Cofaktoren wie Eisen-Schwefel-Clustern, Häm-Gruppen, Molybdopterin oder Thiamin-Diphosphat nötig.^[124] Neben diesen Biokatalysen sei kurz auch die Flavin-Lagerung erwähnt, wofür Dodecin als Riboflavin-Bindeprotein (PDB: 4B2H) aus *Halobacterium salinarum* ein bekanntes Beispiel ist. Es findet bspw. in der Medizin in photo-regulierten „release approaches“ eine Anwendung, bei dem durch Lichtimpulse gezielt die gebundenen zwölf Flavine freigesetzt werden, welche pharmakologisch wirksame Substanzen gebunden haben.^[131]

7.4 Flavin-abhängige Halogenasen – Evolution und Charakteristika

Für ein besseres Verständnis der Flavin-abhängigen Halogenasen (FI-Hal) soll es im Folgenden zunächst um die Herkunft dieser Enzymgruppe gehen. Um alle Voraussetzungen für die Komplexität dieser Enzyme zu schaffen, wird als Überbrückung ein Einblick in Flavinreduktasen und das Cofaktorrecycling gegeben.

7.4.1 Flavin-abhängige Monoxygenasen

Eine Gruppe dieser Oxidoreduktasen, welche noch heute das Interesse von pharmazeutischen Industriezweigen und Produzenten von Feinchemikalien wecken, sind die Flavin-abhängigen Monoxygenasen (FI-MOG). Ausschlaggebend sind die Chemo-, Regio- und in manchen Fällen auch Enantioselektivität in ihren Oxygenierungsreaktionen.^[132, 133] Häufige Anwendungen dieser Enzyme sind im Katabolismus – also dem abbauenden Stoffwechsel – zu finden, sowie in der Detoxifikation von Xenobiotika.^[134] Während der Fokus hierbei auf der Degradation im Metabolismus liegt, sind auch dekorative Funktionalisierungen, bspw. zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten, weit verbreitet. Unterteilt werden FI-MOG in acht verschiedene Untergruppen. Die Unterscheidung basiert hierbei sowohl auf der Ebene der Proteinfaltung, als auch auf ihrer biologischen Funktion. Während die Gruppen A und B (EC 1.14.13) obligatorisch auf Nicotinamid-Nucleotide (**21**), als Reduktionsäquivalente, angewiesen sind, handelt es sich bei den vier Gruppen C-F (EC 1.14.14) um Zwei-Komponenten-Systeme. Entsprechend ist für die biokatalytische Funktion ein zweites Enzym – die Flavinreduktase (FI-Red)^[135] – für die Bereitstellung von Elektronen nötig. Die letzten beiden Gruppen G und H (EC 1.13.12) zeichnen sich durch ihre Unabhängigkeit von externen Reduktionsäquivalenten aus und verwenden bei der Katalyse nur Sauerstoff, da die benötigten Elektronen vom Substrat selbst bereitgestellt werden.^[134]

Der Katalyse-Zyklus ist für alle Flavin-abhängigen Oxidoreduktasen prinzipiell ähnlich. Zunächst erfolgt die Reduktion des Isoalloxazin-Rings der Flavine (**12**) mit Reduktionsäquivalenten. Diese sind das reduzierte Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) (**21a**) bzw. die an Kohlenstoff C-2' Phosphat-tragende Variante NADPH (**21b**) (Abbildung 17 A). Anschließend wird molekularer Sauerstoff an den Kohlenstoff „C_{4a}“ gebunden. Durch eine formale Reprotonierung bildet sich das **12-C_{4a}**-(Hydro)peroxid. Unter Freisetzung von Wasser wird im letzten Schritt ein Sauerstoff-Atom in das entsprechende Substrat inseriert und das Flavin (**12**) regeneriert (Abbildung 17 B).^[134]

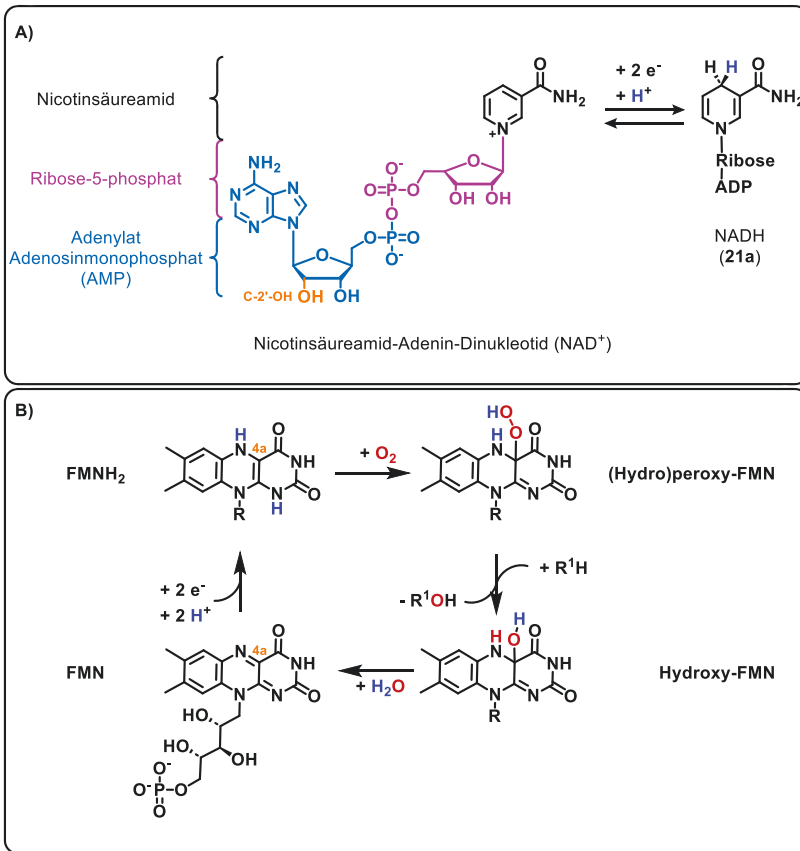


Abbildung 17: A) Chemischer Aufbau von NADH (**21a**), sowie die Hervorhebung der Phosphorylierungsstelle C-2'-OH (orange) für das Analogon NADPH (**21b**). Außerdem ist die Hydrid-Übertragung vom oxidierten Cofaktor NAD⁺ zum reduzierten Dinucleotid NADH (**21a**) gezeigt. **B)** Katalytischer Zyklus von Flavin-Cofaktoren **12** am Beispiel von FMN (**12b**) in einer Monoxygenierungsreaktion. Nach der Reduktion von FMN zu FMNH₂ erfolgt die Sauerstoff-Anlagerung am Kohlenstoff C_{4a} (orange) zum (Hydro)peroxy-**12b**. Im Zuge der Monoxygenierungsreaktion bildet sich Hydroxy-**12b**, bevor unter Abspaltung von Wasser FMN regeneriert wird.

An dieser Stelle sei hinzugefügt, dass kürzlich auch ein neuer Mechanismus für einige Flavoproteine^[123] beschrieben wurde, der den Sauerstoff nicht über das C_{4a}-Atom bindet, sondern über eines der Stickstoff-Atome, sodass sich eine Flavin-N₅-Peroxid-Spezies bildet. Ein Beispiel ist das Enzym EncM (PDB: 4XLO), ein *berberine bridge enzyme* (BBE)-like Enzym der Vanillylalkohol-Oxidase/*p*-Kresol-methylhydroxylase-(VAO/PCMH) Flavoprotein-Familie.^[136, 137] Typische Reaktionen, die von FI-MOG durchgeführt werden, sind die Hydroxylierung und Sulfoxidation, die Baeyer-Villiger-Oxidation und Heteroatom-Oxygenierung, *N*-Hydroxylierung und oxidative Decarboxylierung, Epoxidierung, die oxidative Denitrierung und die Halogenierung.

Bei der Dehalogenierung handelt es sich, als formale Hydroxylierungsreaktion, um einen Sonderfall.^[137] Die folgende Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Gruppen von FI-MOG, den genutzten Cofaktor, das Proteinfaltungsmotiv des Enzyms, Donatoren der Elektronen, sowie Beispielreaktionen der verschiedenen Gruppen.^[134]

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Flavin-abhängigen Monooxygenasen und ihrer Cofaktoren (**10b – c**), Elektronendonatoren (**19a – b**), sowie Proteinfaltungen. Die Faltungen werden anhand von Beispielen eingeordnet. Hierzu zählen GR für die Glutathionreduktase; FMO für Flavin-tragende Monooxygenase; sowie MAO für Monoaminoxidase. Aufgelistet sind zudem die katalysierten Reaktionen.

Gruppe	Cofaktor	Faltung	Elektronendonator	Reaktionen
A	FAD	Rossmann (GR-2)	NAD(P)H	Hydroxylierung, Sulfoxidation
B	FAD	Rossmann (FMO)	NAD(P)H	Baeyer-Villiger Oxidation, Oxigenierung von Heteroatomen, <i>N</i> -Hydroxylierung, oxidative Decarboxylierung
C	FMN	TIM-barrel (Luciferase)	FMNH ₂	Licht-Emission, Baeyer-Villiger Oxidation, Epoxidierung, Desulfurierung, Sulfoxidation, Hydroxylierung
D	FAD/FMN	Acyl-CoA-Dehydrogenase	FADH ₂ /FMNH ₂	(<i>N</i> -) Hydroxylierung
E	FAD	Rossmann (GR-2)	FADH ₂	Epoxidierung
F	FAD	Rossmann (GR-2)	FADH ₂	Halogenierung
G	FAD	Rossmann (MAO)	Substrat	oxidative Decarboxylierung
H	FMN	Tim-barrel (Glycolat-Oxidase)	Substrat	oxidative Decarboxylierung/Denitrierung

Während es sich bei der Gruppe A mit der *para*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH; EC 1.14.13.2) als Vertreter und der Gruppe B mit Phenylacetone-Monooxygenase (PAMO; EC 1.14.13.92) als Beispiel um Ein-Komponenten-Systeme handelt, also Monooxygenasen, die sowohl die Insertion des Sauerstoffs als auch die Reduktion des Flavins mittels NAD(P)H durchführen, benötigen die Gruppe C Alkanesulfonat-Monooxygenase (SsuD; EC 1.14.14.5), Gruppe D 4-Hydroxyphenylacetat-3-Hydroxylase (HPAH; EC 1.14.14.3), Gruppe E Styrol-Monooxygenase (SMO; EC 1.14.14.11) und Gruppe F der Halogenasen ein weiteres Enzym zur Bereitstellung der Elektronen. Folglich spricht man von Zwei-Komponenten-Systemen, wobei Gruppe C als einzige nur FMN akzeptiert, während Gruppen D, E und F auch oder nur FAD zur Sauerstoff-Aktivierung verwenden können. Da Gruppe G und Gruppe H Elektronen aus den Substraten beziehen, sollen sie bei dieser Betrachtung keine Rolle spielen.^[134, 138]

Im Falle von Ein-Komponenten-Systemen gibt es im aktiven Zentrum des Enzyms zwei Bindetaschen. Während eine Bindetasche den Flavin-Cofaktor bindet, zeigt die zweite Tasche eine größere Flexibilität, da sie – am Beispiel der Flavin-abhängigen Monooxygenase (FI-MOG) aus *Schizosaccharomyces pombe* – sowohl das Reduktionsmittel NADPH, als auch das Substrat bindet.^[139] Reguliert wird die Bindung über die Konformation des Enzyms mit „in“ (auch „closed“ genannt), „out“ und „open“ als Stadien. Während die Konformation „open“ den Zugang von Substrat und Produkt zum Lösemittel ermöglicht, kann in der Konformation „closed“ Sauerstoff das aktive Zentrum erreichen, um die Hydroxylierung zu gewährleisten. Voraussetzung die die vorangegangene Änderung der Konformation zu „out“, bei der das gebundene FAD Zugang zum Lösemittel bekommt, um die Reduktionsäquivalente des NAD(P)H aufzunehmen. Mechanistisch unterscheidet man daher bei den Konformationen „out“ und „closed“ zwischen der reduktiven und oxidativen Halbreaktion.^[140]

Als erster Vertreter der Zwei-Komponenten-Systeme ist die bakterielle Luciferase zu nennen, welche aus zwei Untereinheiten α und β einen Heterodimer bildet (*luxA* und *luxB*). Die FMNH⁻ bereitstellende Reduktase wird durch das Gen *luxG* codiert. Luciferase und Reduktase zeigten keine Komplexbildung, sodass von einer freien Diffusion des reduzierten Flavins als sogenanntem Elektronen-Mediator von Reduktase zu Luciferase ausgegangen wird.^[141] Es gibt allerdings auch Ausnahmen, bei denen von einer Mischung aus freier Diffusion und Komplexbildung ausgegangen wird, so bspw. bei der Hydroxylierung von 4-Hydroxyphenylacetat mittels HpaC (Reduktase) und HpaA (Hydroxylase) aus *Pseudomonas aeruginosa*.^[142] Für den häufigsten Fall der freien Diffusion, tritt jedoch ein Problem auf. Wie wird verhindert, dass das reduzierte Flavin bei der Diffusion von der Reduktase zur Monooxygenase nicht mit Sauerstoff autoxydiert? Untersuchungen zu Dissoziationskonstanten und Kinetiken zeigten, dass Reduktasen eine höhere Bindungsaffinität zu der oxidierten Form des Flavins haben, während die Oxygenasen das reduzierte Flavin bevorzugen. Unterstützt wird dies auch durch in der Regel wesentlich größere Konstanten der Bindungsraten von reduziertem Flavin an den Oxygenasen als Dissoziationsraten der Reduktasen.^[143]

7.4.2 Flavinreduktasen als Teil der Elektronen-Transportkette

Wie zuvor beschrieben, benötigen FI-MOG der Zwei-Komponenten-Systeme eine separate Reduktase zum Transfer von Elektronen. Prinzipiell wird zwischen Flavoprotein-Reduktasen (FP-R) und Flavinreduktasen (FI-R) unterschieden. Während erstere zusätzlich selbst ein Flavin fest als Cofaktor gebunden haben, reduzieren Flavinreduktasen Flavine als Substrat, können allerdings andere Cofaktoren tragen.^[144]

7.4.2.1 Flavoprotein-Reduktasen

Flavoprotein-(Oxido)reduktasen (FP-R) finden häufig ihre Anwendung in der sukzessiven Ein-Elektron-Übertragung, bei der das prosthetische Flavin **12** der Reduktase zunächst mit zwei Elektronen durch Nicotinamid-Nucleotide (**21**) reduziert wird, diese dann aber nacheinander an bis zu zwei Substrate oder Folgeproteine übertragen werden. Dafür sind Protein-Protein-Interaktionen die Regel. Auf diese Weise werden z.B. Ferredoxine durch Ferredoxinreduktasen reduziert.^[145, 146] Ein weiteres Beispiel ist das Zusammenspiel mit Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYPs), bei denen Cytochrom-P450-Reduktasen (P450R/CPR) als Mediatoren dienen. Diese gehören zur Gruppe der Diflavin-Reduktasen, da sie sowohl FMN, als auch FAD als prosthetische Gruppe tragen.^[147] Ein weiteres Beispiel für Diflavin-Reduktasen ist die oktamere Flavoprotein-Untereinheit der bakteriellen Sulfid-Reduktase (SiR), abgekürzt SiR-FP. Diese transferiert sechs Elektronen von drei NADPH sequentiell auf das Häm der SiR über Riboflavin, FMN oder FAD als Substrat.^[147, 148] SiR-FP konnte auch als P450R/CPR für die Cytochrom-P450c17 wirken, allerdings sind hier ebenfalls Proteininteraktionen nötig. Auf Grund des N-terminalen Ursprungs von SiR-FP ist diese Interaktion der von Ferredoxinen sehr ähnlich.^[149]

Für eine breite Anwendung reduzierter Flavine, können diese Interaktionen von Proteinen aber hinderlich sein, weshalb die Natur eine Alternative bietet.

7.4.2.2 Flavinreduktasen

NAD(P)H:Flavinoxidoreductase aus *E. coli*

Ein Beispiel für Flavinreduktasen aus den 1980er Jahren ist die NAD(P)H:Flavinoxidoreduktase aus *E. coli*. Die Reduktion eines Eisen(III)-Cofaktors („*ferric iron*“) der dazugehörigen Ribonukleotid-Reduktase-Untereinheit (Protein B2) zu Fe²⁺ ermöglicht die Bildung eines aktiven Tyrosyl-Radikals (Tyr-122) des Proteins. Für dieses Enzym wurde die Reduktion von Riboflavin und FMN durch NADH und NADPH, sowie von FAD mittels NADH beobachtet.^[150] Die Struktur (Abbildung 18 A) wurde im Jahr 1999 veröffentlicht und das 26 kDa Enzym Flavinreduktase Fre benannt.^[144] Dabei wurde eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den Flavoprotein-Reduktasen, wie der Flavodoxin-Reduktase^[151] (Abbildung 18 B), festgestellt, allerdings kaum Sequenzähnlichkeit, was die Ursache für das Fehlen des Cofaktors sein kann. Die Bindung erfolgt hierbei größtenteils über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Isoalloxazin-Ring. Der Mechanismus dieser monomeren FI-R wurde zuvor bestimmt^[152] und eine Inhibition durch das bevorzugte FAD festgestellt, da die ADP-Gruppe durch konformelle Änderungen zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen (HBB) ausbildet und

mit der ADP-Gruppe des NAD(P)H konkurriert. Daher besitzt Fre hohe K_M -Werte für NAD(P)H bei Nutzung von FAD.^[153] Anwendung fand Fre unter anderem häufiger mit Tryptophan-Halogenasen, wie RebH, PrnA und PyrH.^[154, 155]

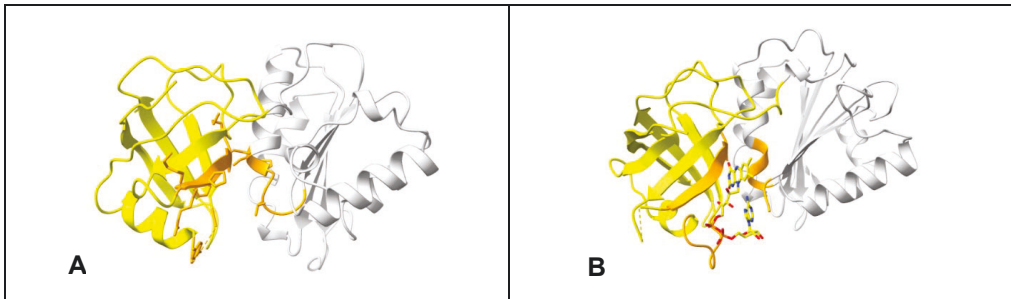


Abbildung 18: Kristallstrukturen der **A)** Flavin-Reduktase Fre^[144] (PDB: 1QFJ) und **B)** Flavodoxin-Reduktase^[151] (PDB: 1FDR) aus *E. coli*. In gelb und grau dargestellt sind die beiden Domänen der Proteine. In orange hervorgehoben sind die Bereiche, die die Flavin-Bindetasche flankieren. In der gelben Stäbchendarstellung mit Heteroatom-Farben ist Für das FAD (12c) zu sehen.

FMN-Reduktase SsuE aus *E. coli*

Eine weitere Flavinreduktase ist die NAD(P)H-abhängige FMN-Reduktase SsuE aus dem Zwei-Komponenten-System der Alkansulfonat-Monooxygenase SsuD. Im Gegensatz zu der Fre, bildet diese 21 kDa Reduktase in Lösung mindestens ein Homodimer (58 kDa) aus.^[156, 157] Bei der Aufklärung der Struktur (Abbildung 19) von SsuE wurde sogar ein Tetramer bei Abwesenheit von Flavin postuliert. Auffällig waren dort die vorhandenen zwei Bindestellen für Flavine, sodass ein prosthetisches FMN diskutiert wurde, was eher für Flavoprotein-Reduktasen typisch ist.^[158] Trotz der Bevorzugung von FMN über FAD und NADPH über NADH, wurde SsuE in der Literatur mit Halogenasen verwendet, wie bspw. mit PltA aus dem Pyoluteorin-Biosyntheseweg^[159-161] oder VhaA der Vancomycin-Biosynthese.^[162] Die Verwendung von SsuE fand in diesen Fällen immer mit Rohextrakten und NADH, sowie FAD statt.^[163]



Abbildung 19: Kristallstruktur der NAD(P)H-abhängigen FMN-Reduktase SsuE^[158] (PDB: 4PTZ) aus *E. coli*. In grau dargestellt ist die monomere Proteinstruktur. Das FMN (12b) ist als gelbe Stäbchendarstellung mit Heteroatom-Farben zu sehen.

Flavin:NADH-Reduktase PrnF aus *P. fluorescens* Pf-5

Da die Bevorzugung von NADH nicht häufig ist, zählt PrnF zu den Ausnahmen. Diese Reduktase des Zwei-Komponenten-Systems der Arylamin-*N*-Oxygenase PrnD stammt aus der Biosynthese des Arylpyrrols **22** mit dem Namen Pyrrolnitrin (**22a**)^[164] Das Monomer PrnF stellt FADH₂ im Zuge der Reaktion für die Rieske-Oxygenase bereit, welche dann die Anilinyll-Gruppe des Aminopyrrolnitrins (**22b**) bzw. Monodechlorryaminopyrrolnitrins (**22c**) in eine Nitrobenzyl-Gruppe umwandelt. Mechanistisch bindet zunächst das NADH, während FADH₂ als erstes Produkt das Enzym verlässt. Das entspricht einem Bi-Bi-Mechanismus. Als Basis dienen Homologie-Modelle (Abbildung 20), da keine Struktur für das 25 kDa Protein vorhanden ist.^[165]

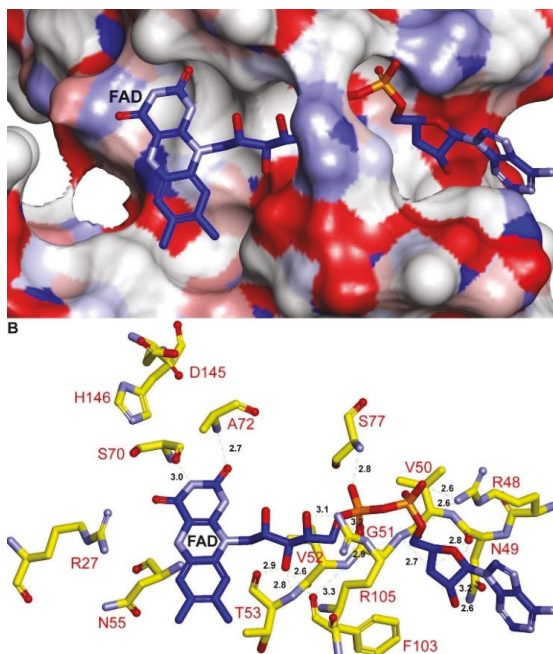


Abbildung 20: 3D-Struktur von PrnF basierend auf einem Homologie-Modell mittels MODELER in Discovery studio (DS) 3.1 (Accelrys Software Inc., San Diego, CA) (Abbildung S3) aus der Publikation von *Tiwari et al.*^[165] Als Basis dient die Struktur von PheA2 (PDB: 1RZ0) mit 34,1 % Sequenzidentität. **A)** Bindestelle von FAD (**12c**) in PrnF mit re-facialer Exposition des Isoalloxazin-Ringes zum Lösemittel. **B)** Potenzielles HBB zwischen PrnF und FAD (**12c**) (grün gestrichelte Linien) mit Distanz in Angström [Å]. Das Stäbchenmodell zeigt FAD (**12c**) in blau und Aminosäuren in gelben Kohlenstoff-Atomen. Information zur Lizenz finden sich unter Kapitel 2 Verwendete Software und Bildrechteklärung.

In der Literatur wurde PrnF bereits mit anderen Enzymen als PrnD verwendet. So wurden Chlorierungen am Indol-Ring **23** von Tryptophan (**23a**) durch RebH mit Hilfe von PrnF^[166] durchgeführt. Ansätze zur Bromierung von (**23a**) mittels combiCLEAs („combined cross-linked enzyme aggregates“ aus Alkoholdehydrogenase (ADH), PrnF und RebH) wurden sogar im Grammaßstab realisiert.^[167]

Abschließend soll die folgende Tabelle 2 einen Überblick über die kinetischen Parameter der in diesem Kapitel genannten Reduktasen geben. Dort finden sich hervorgehoben auch die Präferenzen für NAD(P)H, FMN und FAD der jeweiligen Enzyme. Dazu abweichende Zahlen publizierten *Menon et al.* bei definierter Temperatur von 30 °C.^[168]

Tabelle 2: Kinetische Parameter der Reduktasen Fre^[152], SsuE^[156] und PrnF^[164], sowie die daraus bestimmte katalytische Effizienz. Die günstigsten Bedingungen bzw. Kombinationen von Flavinen **12** und Reduktionsäquivalenten **21** sind leicht gelb hervorgehoben. Die Michaelis-Konstante K_M bezieht sich auf das Substrat 1.

Enzym	Substrat 1	Substrat 2	K_M	k_{cat}	K_{cat}/K_M
Fre	Riboflavin	NADPH	2.5 μM	3144 min^{-1}	1257 x 10 ⁶ $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
	Riboflavin	NADH	1.3 μM	1834 min^{-1}	1410 x 10 ⁶ $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
	FMN	NADPH	2.2 μM	161 min^{-1}	73 x 10 ⁶ $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
	FMN	NADH	1.5 μM	681 min^{-1}	454 x 10 ⁶ $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
	FAD	NADPH	-		
	FAD	NADH	1.5 μM	681 min^{-1}	454 x 10 ⁶ $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$
SsuE	FMN	NADH	0.054 μM	0.54 U mg^{-1}	474.1 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	FAD	NADH	2.7 μM	0.96 U mg^{-1}	16.9 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	NADPH	FMN	46.0 μM	32.4 U mg^{-1}	33.4 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	NADH	FMN	555.5 μM	1.3 U mg^{-1}	0.1 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
PrnF	FAD	NADH	3.2 ± 0.6 μM	65.0 ± 8.2 s^{-1}	20.3 ± 3.45 $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	FMN	NADH	28.6 ± 3.6 μM	72.4 ± 9.0 s^{-1}	2.53 ± 0.27 $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	Riboflavin	NADH	38.3 ± 5.4 μM	68.2 ± 7.7 s^{-1}	1.78 ± 0.25 $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	NADH	FAD	43.1 ± 5.7 μM	62.6 ± 7.6 s^{-1}	1.45 ± 0.19 $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
	NADPH	FAD	-	-	-

Im Zuge des katalytischen Zyklus der Flavin-Oxidoreduktion bleiben FMN oder FAD als aktive Spezies vorhanden, da die Änderung des Redox-Zustandes durch die Cosubstrate NAD(P)H gewährleistet wird. Dies macht die Flavine zu katalytischen Teilnehmern der

Reaktion, die nicht „verbraucht“ werden – zu sogenannten Coenzymen. Die Nikotinamid-Dinucleotide **21** hingegen werden verbraucht und müssen neu bereitgestellt werden. Dieser Prozess ist in Organismen energieintensiv.^[169] In der industriellen Anwendung ist die Bereitstellung stöchiometrischer Mengen an NAD(P)H für *Scale-Ups* aus dem gleichen Grund sehr teuer. Daher wurden verschiedene Strategien etabliert, um die Nicotinamid-Dinucleotide **21** auch *in situ* zu regenerieren, was die Einführung einer weiteren Komponente zur Folge hat. Dieser „*sacrificial donor*“ wird dann im Zuge der Reaktion verbraucht und ist für NADH in vielen Fällen Isopropanol und für NADPH häufig Glukose.^[170] Die Einführung dieser neuen Cosubstrate über meist weitere Enzyme nennt man Cofaktor-Regenerations/Recycling-Systeme (CRS). Diese und weitere Strategien sollen im Folgenden näher beleuchtet werden.

7.4.3 Regenerationsstrategien von Cofaktoren

Damit ein Biokatalyse-Prozess auch in einem größeren Maßstab rentabel ist, muss das CRS wiederholt über einen längeren Zeitraum funktionieren und stabil sein. Erst bei einem Umsatz von mehr als 90 % spricht man von einem effizienten CRS. Die Voraussetzung ist, dass die Zielreaktion nicht durch die Kinetik des CRS limitiert ist.^[171] Auf diese einzelnen Strategien (Abbildung 21) soll nun detaillierter eingegangen werden.

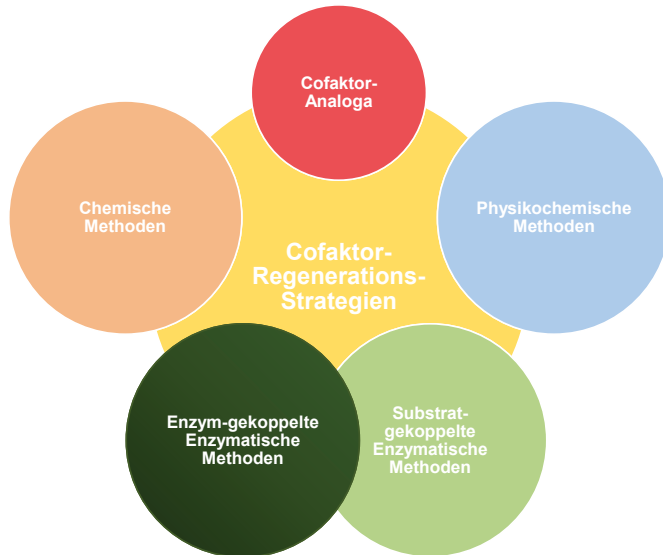


Abbildung 21: Cofaktor-Recycling-Strategien für die Biokatalyse. Grafik basiert auf *Bachosz et al.*^[171] und wurde weiterentwickelt. Da sich die beiden enzymatischen Methoden sehr ähneln und es auch Mischformen gibt, spricht ihnen die Grafik eine besondere Nähe zu. Die Bereitstellung von Cofaktor-Analoga ist im engeren Sinne keine Regeneration, weshalb der Überlapp gering gewählt wurde. Hervorgehoben ist das genutzte Enzym-gekoppelte Recycling dieser Arbeit.

7.4.3.1 Chemisches Cofaktor-Recycling

Bei der chemischen Cofaktor-Regeneration wird mindestens eine chemische Komponente dem System hinzugefügt, von der eine für die initiale Elektronen-Übertragung verantwortlich ist. Dabei müssen eine homogene Lösung und minimale Diffusionslimitationen gewährleistet sein und teilweise Chemokatalysatoren eingesetzt werden.^[171]

Beispielsweise konnten verschiedene Ruthenium-(II)-Komplexe NAD^+ durch Oxidation von Formiat zu CO_2 unter aeroben Bedingungen in Wasser reduzieren.^[172] Eine andere Möglichkeit ist die Reduktion zu NADH mit chemischen Reduktionsmitteln wie Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), allerdings sind die Umsätze gering und die Enzyme meistens instabil gegenüber hohen Konzentrationen.^[173, 174]

7.4.3.2 Physikochemisches Cofaktor-Recycling

Für die elektrochemischen Prozesse der physikalischen Cofaktor-Regeneration ist keine weitere Komponente nötig, dafür werden aber externe Energiequellen wie Strom genutzt. Einerseits können Elektroden die entsprechenden Elektronen bereitstellen, bei denen die Metall-Katalysatoren (bspw. Rhodium-Komplexe) als Mikropartikel immobilisiert sind.^[175] Weniger invasiv ist aber die Nutzung von Licht, das mit einer Wellenlänge von 455 nm direkt Flavine mittels EDTA reduzieren kann. Dies wurde für FI-Hal durchgeführt und ermöglichte die Vermeidung des zweiten Enzyms der FI-R.^[176]

7.4.3.3 Enzymatisches Cofaktor-Recycling

Bei der enzymatischen Cofaktor-Regeneration, die in dieser Arbeit verwendet wurde, unterscheidet man prinzipiell zwei Kategorien, das Enzym- und das Substrat-gekoppelte Recycling. Eine dritte Kategorie ist hierbei nur eine Sonderform der anderen.^[177]

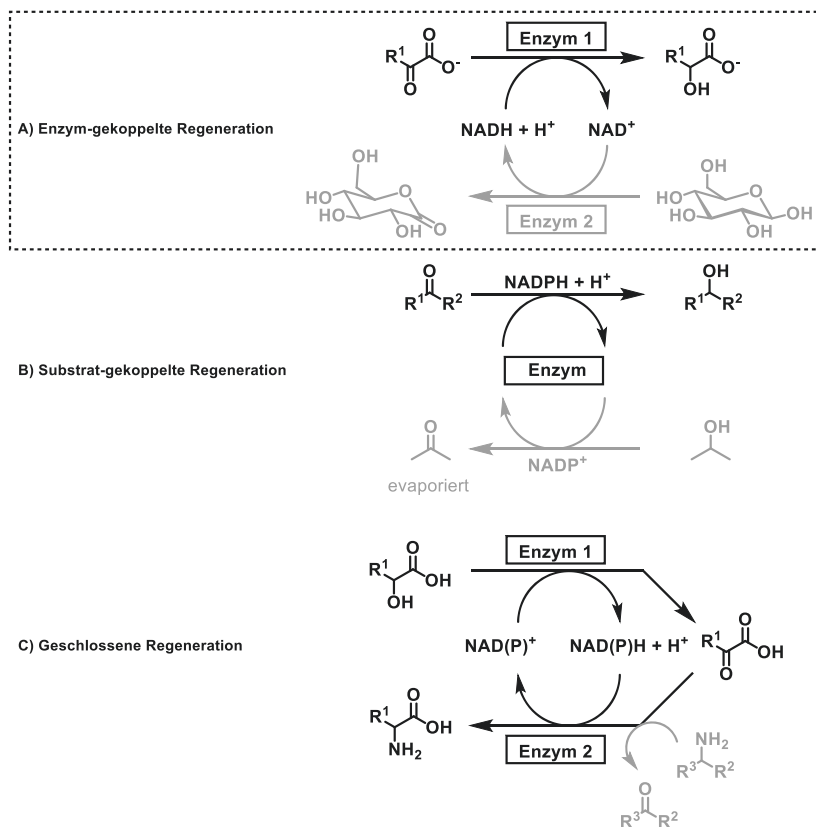


Abbildung 22: Beispiele der drei Kategorien des enzymatischen Cofaktor-Recyclings. Der gestrichelte Kasten betont das in dieser Arbeit verwendete Recycling.

Für die enzymgekoppelten Regenerationen wird ein weiteres Enzym eingeführt, das den gleichen Cofaktor nutzt wie das Zielenzym. Soll das Ziel-Enzym eine Reduktion durchführen, so wird das „CRS-Enzym“ in einer Oxidation eingesetzt. Ein Beispiel dafür sind Oxidationen von Alkoholen zu Aldehyden oder Ketonen, bei denen *vice versa* CRS-„Substrate“ (Aldehyde/Ketone) zu Alkoholen reduziert werden (Abbildung 22 A).

Beim substratgekoppelten Recycling kann das Zielenzym zwei verschiedene Substrate nutzen und sowohl Hin- wie auch Rückreaktion katalysieren. Die Steuerung zum Zielprodukt erfolgt bspw. durch das Verlassen des Systems von einem der Reaktionsteilnehmer. Dies beeinflusst das Gleichgewicht und führt zu einer asymmetrischen Keton-Reduktion. Wie in Abbildung 22 B dargestellt, können so die Reduktion des einen Ketons (Substrat 1) und die Oxidation des Isopropanols (Substrat 2) mittels des gleichen Enzyms durchgeführt werden. Die Fähigkeit zur Evaporation von Aceton verschiebt hierbei das Gleichgewicht. Für eine moderate Reaktionszeit muss hierfür das Co-Substrat Isopropanol im Überschuss eingesetzt werden.^[178]

Wichtig für beide gekoppelten Regenerationen ist eine Irreversibilität der Regenerationsreaktion.^[171] Dies kann anstelle der Entfernung des CRS-Produkts auch durch das natürliche Gleichgewicht bzw. der unterschiedlichen Reaktivitäten von Co-Substrat und -Produkt erfolgen. Die Oxidation von D-Glucose zu D-(+)-Glucono-1,5-lacton ist dafür ein Beispiel.^[179] Die erwähnte Sonderform besteht, wenn das Produkt der ersten Teilreaktion gleichzeitig das Substrat der zweiten Teilreaktion und damit ein Intermediat darstellt (Abbildung 22 C). Dann spricht man von einer geschlossenen Cofaktor Regeneration (closed loop).^[177]

7.4.3.4 Cofaktor-Analoga

Eignen sich die vorherigen Strategien nicht, so kann ein promiskuitives Enzym ein NAD(P)H-ähnliches Molekül umsetzen, das ebenfalls Nicotinamid (**21c**) als funktionelle Gruppe trägt (*NADH mimics*). Eines dieser Analoga ist 1-Benzyl-1,4-dihyronicotinamid (BNAH) (Dihydro-**21d**), welches in einer Zwei-Schritt-Synthese ohne säulenchromatografische Reinigung und daher kostengünstig dargestellt werden kann (Abbildung 23).^[180] Durch Reaktion von Nicotinamid (**21c**) mit Benzylbromid (**24**) entsteht zunächst die oxidierte Form 1-Benzylnicotinamid (BNA) (**21d**). Durch anschließende Reduktion unter Lichtausschluss wird BNAH gebildet. In einer enzymatischen Chlorierung von Tryptophan (**23a**) zu 7-Chlortryptophan (**23b**) mittels RebH, konnte BNAH (Dihydro-**21d**) das NAD(P)H und die Reduktase ersetzen, musste allerdings mit zehn Äquivalenten eingesetzt werden.^[181]

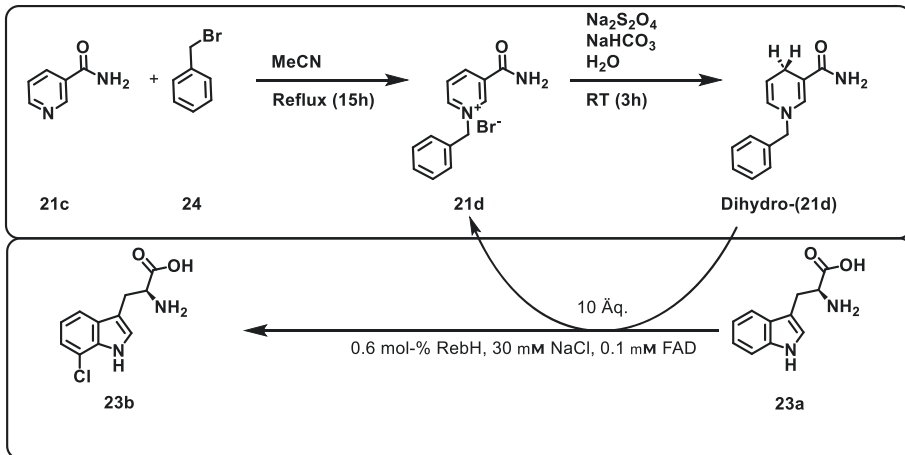


Abbildung 23: A) Synthese des NADH-Mimics für die FADH₂-Regeneration (oberer Kasten). In einer Zwei-Schritt-Synthese wird zunächst das *N*-Benzylnicotinamid (BNA) (**21d**) aus Nicotinamid (**21c**) und Benzylbromid (**24**) synthetisiert, das folglich zu 1-Benzyl-1,4-dihydropyridin-4-yl-1,1-dihydro-2,1,2-benzoxazine-3-carboxamid (BNAH) (Dihydro-**21c**) reduziert wird. **B)** Außerdem ist die FAD-Reduktion mit BNAH (Dihydro-**21c**) in einer enzymatischen Halogenierungsreaktion von Tryptophan (**23a**) zu 7-Chlortryptophan (**23b**) durch RebH dargestellt.

Mit der Bereitstellung einer gesicherten Elektronen-Transportkette, die für die Funktion der zuvor betrachteten Zwei-Komponenten-Systeme von FI-MOG essentiell ist, soll nun auf den Schwerpunkt der Arbeit – die Flavin-abhängigen Halogenasen – geblickt werden.

7.4.4 Flavin-abhängige Halogenasen

Wie zu Beginn des Kapitels 7.4 beschrieben, handelt es sich bei den Flavin-abhängigen Monoxygenasen (FI-MOG) der Gruppe F um die Halogenasen, mit denen sich diese Arbeit hauptsächlich beschäftigt. Strukturelle Vergleiche mithilfe der CATH (Class Architecture Topology/Fold Homologous superfamily) Datenbank zeigten eine klare Nähe der Gruppen A und F. Beide Gruppen stammen mutmaßlich von einem gemeinsamen Vorfahren ab.^[182] Hierbei haben die Gruppe-F-Enzyme jedoch die Fähigkeit verloren, NAD(P)H in der Substratbindetasche zu koordinieren, weshalb sie ein weiteres Enzym benötigen und daher als Zwei-Komponenten-Systeme gelten.

Mechanismus:

Prinzipiell gilt für alle FI-Hal der gleiche Mechanismus (Abbildung 24) und ist unabhängig vom Substrat. Mit der Kristallisation der ersten Halogenase dieser Art, der Tryptophan-7-Halogenase PrnA aus dem Pyrrolnitrin-Biosyntheseweg von unter anderem *Pseudomonas fluorescens* konnte so die Hypothese widerlegt werden, dass die (Hydro)peroxyflavin-Spezies der FI-Hals analog zu den FI-MOG direkt mit dem Substrat interagiert.^[183] Nach diesem Mechanismus hätte das Halid-Ion erst in einem Folgeschritt die Halogenierung durchgeführt. Jedoch zeigte die Proteinstruktur eine räumliche Trennung von Substratbindedomäne und Cofaktorbindedomäne. Ein etwa 10 Å langer Tunnel verhindert eine Interaktion durch ein konserviertes Muster von Aminosäuren – WxWxIP.^[183, 184] Als Grund für diese Trennung wird angenommen, dass durch die Distanz eine Nebenaktivität zur Monoxygenierung verhindert wird.

Anschließende mechanistische Studien zeigten basierend auf den Erkenntnissen der Struktur, dass sich die Hydroperoxyflavin-Spezies auch in Abwesenheit von Substrat bildet und sich im Laufe des katalytischen Zyklus eine langlebige Enzym-Chlor-Spezies ausbildet, welche das Chlor an einer konservierten Lysin-Seitenkette trägt (Chloramin).^[185] Ob diese Bindung tatsächlich kovalent ist, oder das Hypohalid (**1**) nur über eine Wasserstoffbrückenbindung (HBB) koordiniert wird, ist nicht abschließend entschieden.^[154, 186] MD- (*molecular dynamics*) Simulationen und DFT- (*density functional theory*) Berechnungen beider Mechanismen am Beispiel von PrnA deuten aber auf einen HBB-stabilisierten Transfer des HOCl hin, da die Barrieren der freien Energie zur Protonierung (Übergangszustand 1) signifikant unterschiedlich zu Gunsten der nicht kovalenten Bindung sind.^[187]

Diese elektrophile Chlorspezies wird letztlich vom nukleophilen Substrat angegriffen und bildet unter Deprotonierung – vermutlich durch ein konserviertes Glutamat – die neue Halogen-Kohlenstoff-Bindung aus. Neben dem spezifischen Motiv des Transfer-Tunnels ist auch die Flavinbindedomäne GxGxxG in der Rossmannfalte konserviert.^[6, 182]

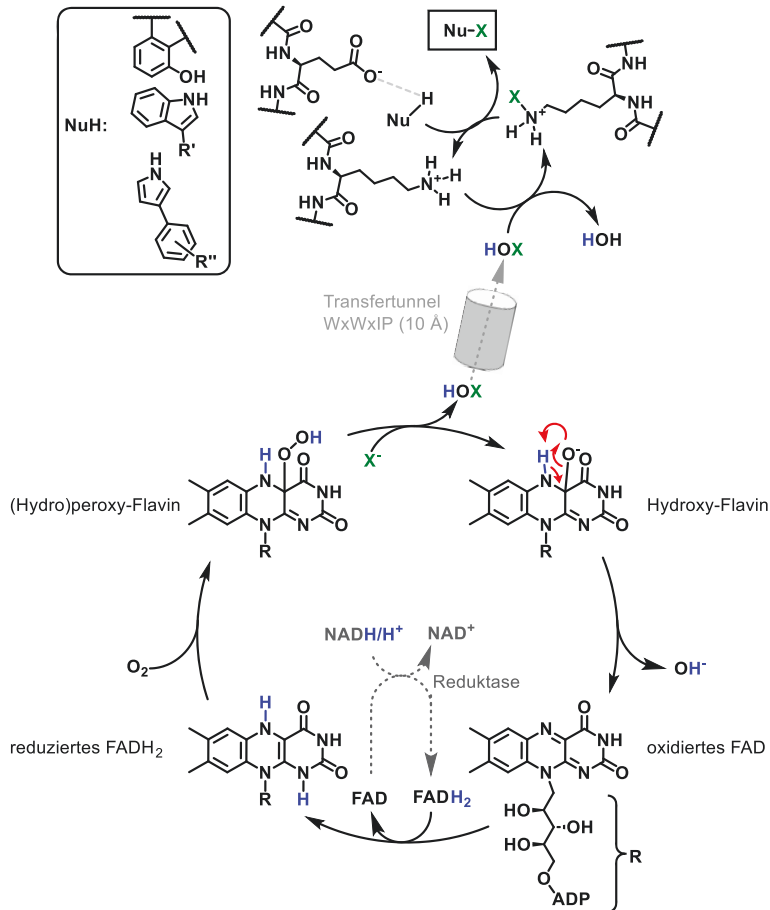


Abbildung 24: Mechanismus von Flavin-abhängigen Halogenasen am Beispiel der Cofaktoren NADH (**21a**), FAD (**12c**), der Halogenquelle Chlorid und verschiedenen protonierten Nucleophilen (**NuH**) als Substraten. Nach Generierung des (Hydro)peroxy-**12** erfolgt der nucleophile Angriff des Chlorids und bildet die Hypochlorsäure **1a**. Das konservierte Lysin koordiniert **1a** und leitet es zum Substrat weiter, welches unter Deprotonierung durch ein mutmaßlich konserviertes Glutamat aktiviert wird. Der Transfertunnel separiert dabei das Substrat vom Flavin-Cofaktor. ^[183, 184]

Struktur:

Neben dem Modell-Enzym PrnA wurde zeitnah auch die Halogenase RebH aus dem Biosyntheseweg von Rebeccamycin (**6**) sowohl kinetisch, als auch strukturell charakterisiert. Unterteilen lassen sich die Proteinstrukturen dieser Tryptophan-Halogenasen in zwei Unterdomänen, welche als „Box“ und „Pyramiden“-Domäne bezeichnet werden (Abbildung 25).

Hierbei trägt die „Box“-Domäne mit dem konservierten GxGxxG-Motiv das FAD (**12c**) und die nur schwach strukturell konservierte „pyramid“-Domäne kontrolliert die Substrat-Spezifität, da das Tryptophan zwischen beiden Domänen gebunden wird.

Dies ist für alle bekannten Strukturen der Tryptophan-Halogenasen gleich, unabhängig davon, ob eine Bindung von Verbindung **12c** und Substrat vorliegt oder nicht. Allerdings gibt es zwei Loops, die durch ihre Flexibilität eine wichtige Funktion in der FAD- und Substrat-Bindung einnehmen. Hierbei stellt der Loop der Substrat-Bindedomäne eine Art Deckel dar, um nach Bindung von Tryptophan das aktive Zentrum zu verschließen.^[188]

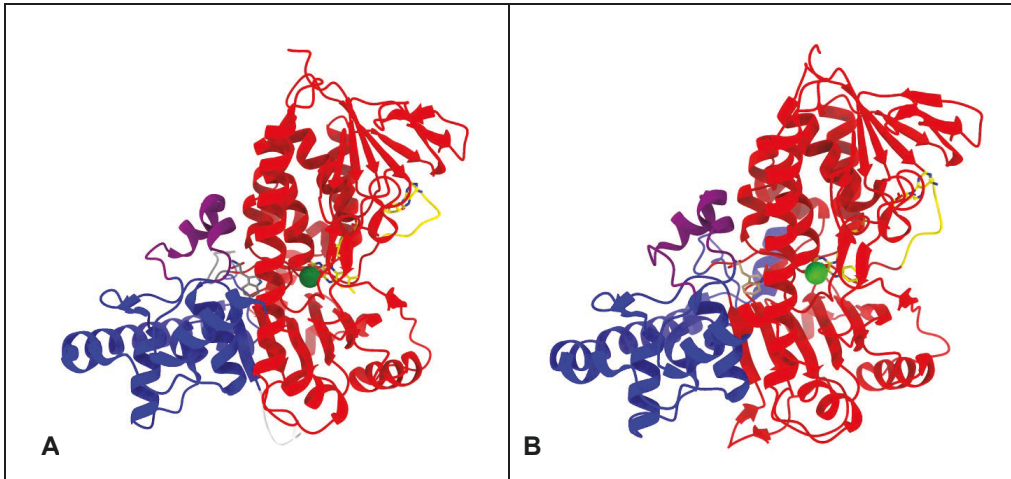


Abbildung 25: Strukturen der Tryptophan-Halogenasen **A)** PrnA (PDB: 2AQJ) und **B)** RebH (PDB: D 2OA1) in Anlehnung an *Dachwitz et al.*^[189] Gezeigt sind für beide Halogenasen die beiden Unterdomeänen „Box“ (rot) und „Pyramide“ (blau), sowie in Stäbchen FAD (**12c**) (Farbe nach Heteroatom, sowie Kohlenstoff gelb), Chlor als Kugel (grün) und das Substrat L-Tryptophan (**23a**) (Farbe nach Element, sowie Kohlenstoff grau). In der Struktur hervorgehoben sind außerdem der FAD-Loop (gelb) auf der rechten Seite und der Substrat-Loop (lila) in der Mitte.

Ähnlich erfolgt die Konformationsänderung für den FAD-Loop, denn bis auf eine Ausnahme (CmlS) erhalten alle Fl-Hals das reduzierte Flavin von einer Reduktase und haben selbst kein eigenes Flavin als festen Cofaktor gebunden. Teilweise kann auch der oligomere Zustand einen Einfluss auf die Substratbindung haben, wobei im Gegensatz zu den beiden genannten Dimeren die meisten Halogenasen als Monomer vorliegen und es sich daher um Ausnahmen handelt. VirX1 als einzig bekanntes Trimer^[189] wird später noch einmal unter dem Punkt Gruppierung aufgegriffen.

Auch andere Halogenasen wie bspw. PltM und PltA, sowie CndH zeigen die Konservierung der „Box“-Domäne, aber Flexibilität in der „Pyramid“-Domäne, die bei letzteren beiden nur noch eine Helix ausmacht, was mit der Carrier-Abhängigkeit zusammenhängen kann.^[189] Schematisch lässt sich diese Strukturinformation wie folgt darstellen (Abbildung 26).

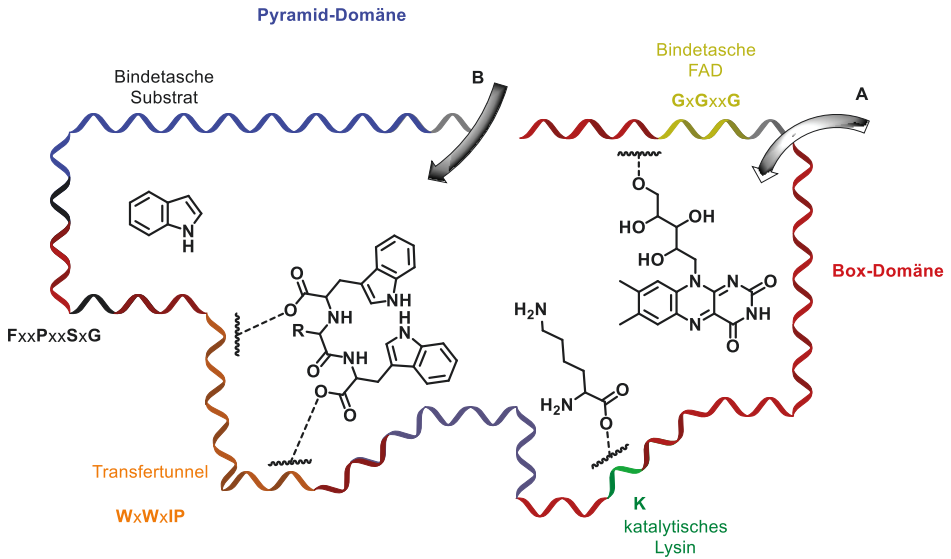


Abbildung 26: Schematische Darstellung der verschiedenen Bereiche, bzw. Domänen von Flavin-abhängigen Halogenasen. Die Pfeile A und B deuten verschiedene Einfuhrwege für FAD und Substrat an. Gezeigt sind außerdem die konservierten Motive für die FAD-Bindung (gelb), den Transfertunnel (orange) und das katalytische Lysin (grün), sowie konservierte Aminosäuresequenzen (schwarz) am Ende der Box-Domäne (rot), sowie der Anfang der Pyramid-Domäne (blau). Der Bereich zwischen Lysin und Tunnel (weißblau) ist ein Teil der Pyramid-Domäne. Als Beispielsubstrat wurde Indol (**21**) gewählt.

Auf PrnA bezogen soll dieses angewandte Schema noch einmal in der Struktur gezeigt werden (Abbildung 27).

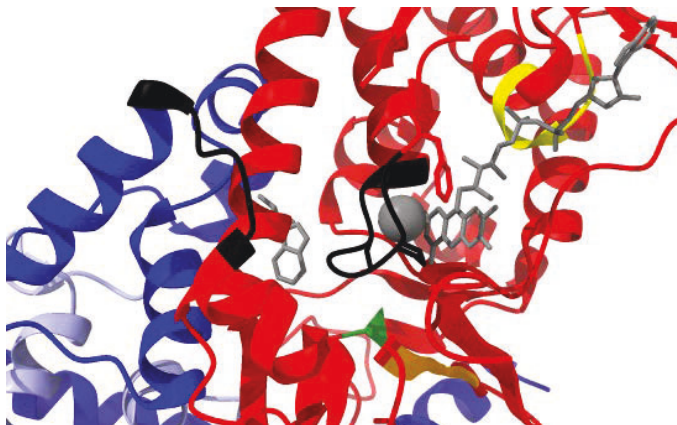


Abbildung 27: Ausschnitt der Struktur der Tryptophan-Halogenasen PrnA (PDB: 2AQJ) basierend auf der schematischen Darstellung der Abbildung 26. Hervorgehoben sind die Sequenzbereiche aa 1-349 (rot), die Flavin-Bindetasche GxGxxG (aa 12-17 in gelb), der Transfertunnel WxWxIP (aa 272-277 in orange), das konservierte Lysin K-79 (grün). Auch gezeigt ist der Bereich um die Bindetasche des Tryptophans (**21**) FxxPxxSxG (aa 341-349) und der Bereich nach der letzten Helix der „Box“-Domäne (aa 413-418) in schwarz, sowie der N-terminale Bereich aa 419-517 (blau).

Doch wie schon erwähnt, akzeptiert diese Gruppe von Enzymen nicht nur Tryptophan (**23a**). Welche Substrate noch akzeptiert werden und wie man die Enzyme aufteilt, soll unter dem Punkt Gruppierung erläutert werden. Auch die Erweiterung des Motivs WxWxIP auf WxWxI(P/R/G) spielt dabei eine Rolle.

Gruppierung:

Bei der Gruppierung wird vor allem auf die natürlichen Substrate, sofern bekannt, abgezielt, sowie auf den Ursprungsorganismus (bakteriell, pilzlich, etc.). Hierbei sei zunächst festgestellt, dass unter Einbezug aller bekannten Fl-Hals Chlorid als Halid bevorzugt wird. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass chlorierte in terrestrischen und bromierte Naturstoffe in marinen Organismen ihren Ursprung haben.^[6] Außerdem zeigten *Sequence-Similarity Network* (SSN) Analysen, basierend auf RebH, die Aufteilung in vorrangig drei große Subnetzwerke im sogenannten „Level 1“. Die Analyse beinhaltet mehr als 90 % aller bekannten Fl-Hal. Die Netzwerke sind einerseits das Indol bzw. Tryptophan-Subnetzwerk, sowie die Subnetzwerke für Phenole **25** und Pyrrole **26** (Abbildung 28).^[190]

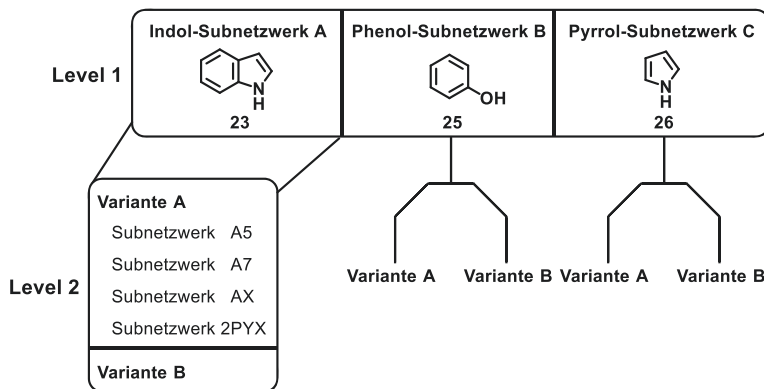


Abbildung 28: Einteilung der Flavin-abhängigen Halogenasen nach Zielstrukturen in die drei größten Subnetzwerke A, B und C auf Ebene des Level 1. Eine weitere Unterteilung erfolgt dann für **A** Indole (**23**) in die 4 Subnetzwerke **A5** für Tryptophan-5-Halogenasen, **A7** für Tryptophan-7-Halogenasen, **AX** für das bis *dato* keine ausreichende Charakterisierung erfolgt ist, aber BrvH als Vertreter gilt, sowie **2PYX**, welches nach dem PDB-Eintrag eines uncharakterisierten, aber kristallisierten Enzyms benannt wurde. Die Subnetzwerke für Phenole (**25**) (**B**) und Pyrrole (**26**) (**C**) unterteilen sich in die Varianten A und B, wobei **Variante A** für frei-diffundierbare Substrate steht und **Variante B** für Carrier-gebundene Substrate. Ebenso die Tryptophan-6-Halogenasen, da diese sich auf der Sequenz-Ebene etwa gleichverteilen auf die Subnetzwerke A5 und A7.^[190]

Das größte Subnetzwerk A mit 2270 Sequenzen besteht aus Fl-Hal die entweder Tryptophan als natürliches Substrat ausweisen, oder in der Literatur fähig waren Indole **23** zu halogenieren. Das zweitgrößte Subnetzwerk B mit 438 Sequenzen aus Bakterien und Pilzen halogenieren Phenole. Das dritte Subnetzwerk C mit 212 Sequenzen adressiert chlorierte Pyrrol-Naturstoffe.

Die Unterteilung wird dann auf „Level 2“ vertieft, in der bspw. Regioselektivitäten^[190] oder Voraussetzungen des Substrats wie Carrier-Abhängigkeit einbezogen werden. Wenn kein freies Substrat (Variante A) akzeptiert wird, dann bezeichnet man die Carrier-Abhängigen Halogenasen auch als Variante B.^[191, 192]

Zusätzlich gibt es noch eine kleine Gruppe von Enzymen, die auch aliphatische, sp³-hybridisierte Kohlenstoffe adressieren (Kapitel 7.4.4.3). Häufig sind hier aber Strukturen des Level 1 die Basis, oder es gibt eine Kombination mit einer anderen katalytischen Aktivität.^[6] Teilweise kann aber auch keine Zuordnung zu einem bestimmten Substrat erfolgen, wie bei den Brominasen BrvH^[193] und Xcc4156^[194] (zwei weitere entdeckt),^[195] oder der viralen Iodinase VirX1,^[196, 197] um nur einige Beispiele zu nennen. Eine Übersicht über gewählte Fl-Halogenasen zeigt die folgende Abbildung 29. [mit Erlaubnis entnommen aus *Gkotsi et al. (2019)*].^[196]

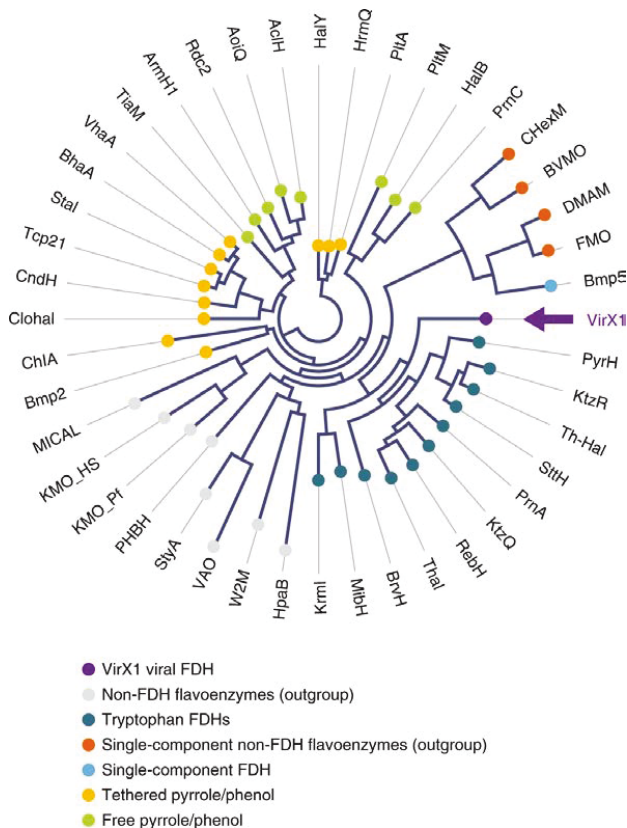


Abbildung 29: Phylogenetischer Stammbaum bekannter Flavin-abhängiger Halogenasen und anderen Flavoenzymen. Gezeigt sind die funktionellen Beziehungen, bekannte Substrate, sowie der Verzweigungsgrad innerhalb und zwischen den verschiedenen Gruppen. Abbildung mit Erlaubnis aus *Gkotsi et al. (2019)*.^[196] Informationen zur Lizenz unter Kapitel 2 Verwendete Software und Bildrechteerklärung.

7.4.4.1 Tryptophan-Halogenasen

Weil der traditionelle Name Tryptophan-Halogenase (Trp-Halogenase) ein sehr enges Substrat-Spektrum vermuten lässt, findet man in der aktuellen Literatur daher häufiger den Namen Indol-Halogenase. Alle bekannten Tryptophan-Halogenasen (Subnetzwerk A) befinden sich in zwei Unternetzwerken des Levels 2, welche sich in der Regioselektivität unterscheiden (Abbildung 30).

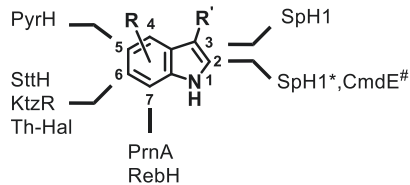


Abbildung 30: Indolgerüst (23) mit einer Auswahl von FI-Hal^[166, 183, 198-204] der verschiedenen Positionen, die halogeniert werden können. R und R' sind unterschiedliche Substituenten oder Wasserstoff. Das Asterisk (*) bedeutet, dass SpH1^[205] nur bevorzugt Position 2 halogeniert, wenn Position 3 blockiert ist. Die Raute (#) soll darauf aufmerksam machen, dass CmdE^[206] keine freien Substrate akzeptiert. Für Position C-4 ist nach unserem Wissen bis *dato* keine FI-Hal bekannt.

Das Subnetzwerk A5 beinhaltet alle Trp-5-Halogenasen wie PyrH^[198] (PDB: 2WET) und Subnetzwerk A7 beinhaltet alle Trp-7-Halogenasen wie PrnA^[183] (PDB: 2AQJ) und RebH^[166] (PDB: 2OA1). 6-Halogenasen wie SttH^[199] (PDB: 5HY5), Thal^[200-202] (PDB: 6SLT) und KtzR^[203, 204], sowie BorH^[207] (PDB: 8TTJ) werden keinem weiteren Subnetzwerk zugeordnet, da sie sequenziell nach SSN nahezu gleichverteilt in den anderen beiden Netzwerken vorkommen. Das größte Subnetzwerk AX beinhaltet die Halogenase BrvH, bei der das natürliche Substrat nicht bekannt ist, aber – wie zuvor erwähnt – teilweise eine Bromierung bevorzugt wird. Das zweitgrößte Subnetzwerk 2PYX basiert auf dem uncharakterisierten, aber kristallisierten Protein YP_750003.1 (PDB: 2PYX).^[190, 208] Für alle diese Enzyme gilt, dass sie frei-diffundierbare Substrate akzeptieren, weshalb sie auch als Variante A-Enzyme bezeichnet werden.

Auch die Positionen 2 und 3 (Abbildung 30) können mittels Indol-Halogenasen adressiert werden. Als Beispiele gelten unter anderem die BrvH-ähnliche terrestrische Brominase SpH1^[205] aus *Botryococcus braunii* und die Carrier-abhängige Chlorinase CmdE^[206] der Biosynthese von Chondramid aus *Chondromyces crocatus* Cm c5. CmdE ist Teil des Subnetzwerks von Variante B-Enzymen, also Tryptophan-Halogenasen, die Peptidyl-Tryptophan in nicht-ribosomalen Peptidsynthese-Systemen (NRPS) und Polyketid-synthese-Clustern (PKS) halogenieren. Dazu gehören bspw. auch MibH (PDB: 5UAO)^[209] und Krml.^[210]

Für die Bewertung einiger bekannter Variante A Halogenasen sollen folgend exemplarisch die kinetischen Parameter gezeigt werden (Tabelle 3). Diese wurden zum Vergleich bei der Charakterisierung der thermostabilen Th-Hal (PDB: 5LV9) unter gleichen Bedingungen bestimmt.^[168] Es zeigt sich, dass die Michaelis-Menten-Konstanten (K_M) alle im selben Bereich liegen, während sich die Wechselzahlen (k_{cat}) teilweise um den Faktor 10 unterscheiden.

Tabelle 3: Vergleich kinetischer Parameter der thermophilen Th-Hal und anderen Tryptophan-Halogenasen zur Chlorierung von Tryptophan bei 30°C. Assay-Bedingungen: 2.5 μ M Halogenase, 1 μ M Fre, 1 μ M FAD (12c), 2.5 mM NADH (21a), 10 mM $MgCl_2$, 0.5 mM Trp (23a) in 10 mM KP_i pH = 7.4. Reaktion wurde für 30 min unter Schütteln durchgeführt und anschließend durch Hitzedeaktivierung (5 min bei 95 °C) gestoppt.^[168]

Enzym	Position der Halogenierung	K_M	k_{cat}	k_{cat}/K_M
PyrH	Trp-5-Halogenase	15.2 \pm 4.2 μ M	2.4 \pm 0.4 min ⁻¹	0.16 \pm 0.050 μ M ⁻¹ min ⁻¹
PrnA	Trp-7-Halogenase	20.7 \pm 0.1 μ M	1.1 \pm 0.1 min ⁻¹	0.05 \pm 0.005 μ M ⁻¹ min ⁻¹
RebH	Trp-7-Halogenase	28.7 \pm 1.3 μ M	0.6 \pm 0.1 min ⁻¹	0.02 \pm 0.004 μ M ⁻¹ min ⁻¹
SttH	Trp-6-Halogenase	25.3 \pm 3.2 μ M	1.7 \pm 0.1 min ⁻¹	0.07 \pm 0.010 μ M ⁻¹ min ⁻¹
KtzR	Trp-6-Halogenase für 7-Cl-Trp	34.1 \pm 2.1 μ M	0.4 \pm 0.1 min ⁻¹	0.01 \pm 0.003 μ M ⁻¹ min ⁻¹
Th-Hal	Trp-6-Halogenase	12.2 \pm 1.8 μ M	4.3 \pm 0.5 min ⁻¹	0.35 \pm 0.070 μ M ⁻¹ min ⁻¹

Wie Tabelle 3 zeigt, hat die thermostabile Halogenase Th-Hal mit Abstand die beste katalytische Effizienz. Entsprechend gibt es viele Strategien, um die bereits bekannten und untersuchten Tryptophan-Halogenasen zu optimieren. Hierzu zählen die Erhöhung von Thermostabilität und Lösemittel-Toleranz^[211], aber auch die Untersuchung der Promiskuität^[212], Änderung der Substratspezifität und Regioselektivität^[213-216] durch gerichtete Evolution (directed evolution) oder rationalem Design.

Nach der intensiven Charakterisierung und Analyse von Trp-Halogenasen gab es die Bestrebung, diese Enzyme in eine breite Anwendung zu bringen. So gab es viele erfolgreiche Ansätze zum Up-Scaling dieser Halogenierung durch entweder mit Reduktase kombinierte *cross-linked enzyme aggregates* (combiCLEAs)^[167], oder Fusionierungen mit Reduktasen zum artifiziellen Ein-Komponenten-System.^[217] Auch Fermentationen mit einem für die Produktion von Tryptophan optimierten Stamm des *Corynebacterium glutamicum* zeigten Erfolg.^[218] Für den Aufbau größerer Strukturen konnten Eintopf-Kreuzkupplungen^[219] durchgeführt werden und darauf basierend Spätphasen-Modifizierungen ermöglicht^[220] bzw. Aktivitäts-Assays für die einfachere Suche nach neuen Halogenasen etabliert werden.^[221]

7.4.4.2 Phenol-Halogenasen

Für das zweitgrößte Subnetzwerk B, der Halogenasen zur Umsetzung von phenolischen Strukturen **25** sind wesentlich weniger Enzyme charakterisiert. Im Gegensatz zu den Trp-Halogenasen wird bei den Phenol-Halogenasen nicht nach Regioselektivität unterschieden, sondern direkt in Halogenasen, welche freie Substrate akzeptieren (Variante A) und Carrier-abhängige Enzyme (Variante B) eingeteilt.^[190] Andere Literaturquellen bezeichnen diese als Klasse A und Klasse B, da dort noch eine weitere Klasse C eingeführt wird, in der Enzyme neben der Halogenierung noch weitere Reaktionen durchführen.^[6]

Variante A-Enzyme zeichnen sich außerdem dadurch aus, dass sie alle eukaryotischen Ursprungs sind, während die Enzyme der Variante B aus Bakterien stammen.^[190] Zur Variante A gehören die erste entdeckte pilzliche FI-Hal Rdc2^[222] aus *Pochonia chlamyosporia*, sowie deren Homolog RadH^[223] (PDB: 8GU0) aus *Chaetonium chiversi*, welche beide aus dem Radicol (**25a**)-Biosyntheseweg kommen. Sie gelten als post-PKS-Enzyme.^[6] Ein weiteres Homolog, die GsfI^[224] aus *Penicillium aethiopicum* adressiert eine andere Struktur (Abbildung 31) und ist Teil der Griseofulvin (**25b**)-Biosynthese. Neben der Halogenierung des Monocillin II (**25c**)-Gerüsts (Position wie bei Verbindung **25a**), zeigten Rdc2 und RadH bereits ein breiteres Substratspektrum durch die Chlorierung von bicyclischen Heteroaromaten, wie Hydroxycoumarinen (**25d**) und Hydroxyisochinolin (**25e**).^[225]

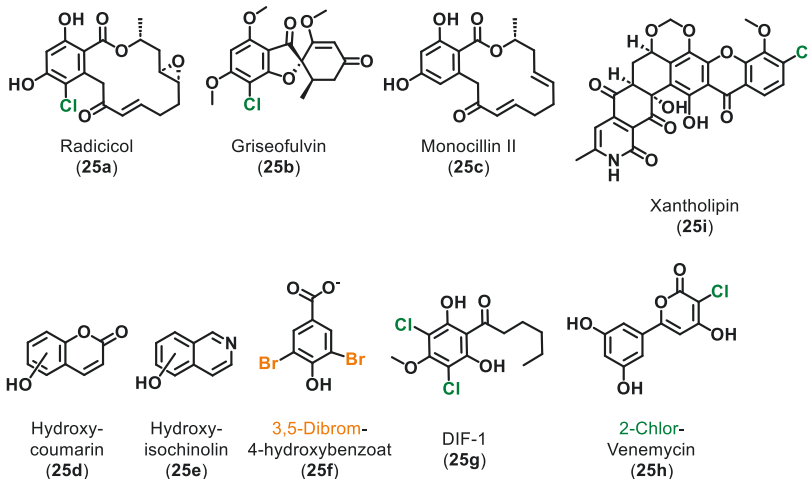


Abbildung 31: Naturstoffe, sowie deren Gerüste und Surrogatsubstrate der phenolischen FI-Hals.^[222-229]

Zwei weitere Enzyme sind BaaB und PltM. Während BaaB mutmaßlich an den Shikimat-Weg anschließt und 4-Hydroxybenzoat (4-HB) zum 3,5-Dibrom-4-HB (**25f**) halogeniert^[226], chloriert PltM 1,3,5-Trihydroxybenzol.^[230] Ähnlich erfolgt die Chlorierung mit ChIA, der Halogenase aus *Dictyostelium discoideum* bei Herstellung des „differentiation-inducing factor 1“ (DIF-1) (**25g**).^[227] Weitere Phenol-Halogenasen sind das Ein-Komponenten-System (Reduktase und Halogenase) VemK aus der Biosynthese von Venemycin (**25h**)^[228], sowie das aus der Xantholipin (**25i**)-Biosynthese stammende XanH (GenBank: ADE22292.1) von *Streptomyces flavogriseus*.^[229] Bei der Anwendung des Domänenschemas aus Abbildung 26 ergibt sich am Beispiel von RadH folgendes Farbmuster in der Struktur (Abbildung 32).

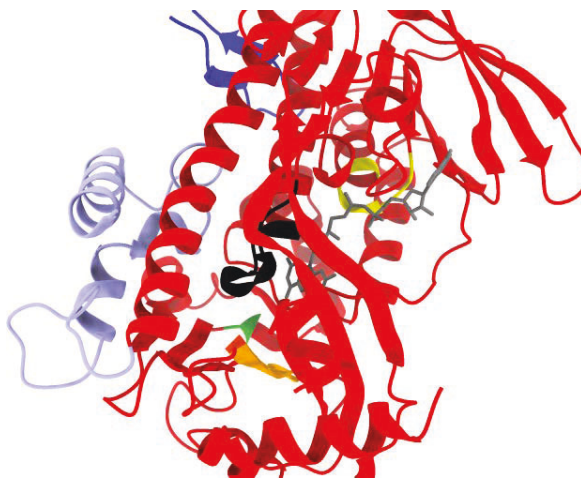


Abbildung 32: AlphaFold-vorhergesagte Struktur der phenolischen Halogenase RadH^[223] (PDB: 8GU0), basierend auf der schematischen Darstellung der Abbildung 26. Hervorgehoben sind die die Sequenzbereiche aa 1-406 (rot), die Flavin-Bindedomäne GxGxxG (aa 13-18 in gelb), der Transfertunnel WxWxIP (aa 234-239 in gold) und das konservierte Lysin K-74 (grün). Auch gezeigt ist der Bereich FxxPxxxxSG (aa 407-416) in schwarz im Vergleich zu den Trp-Halogenasen. Die Pyramiden-Domäne ist nicht dargestellt, da dieser Bereich nicht kristallisiert ist. Ansätze könnte die Helix-Region (aa 388-440 in weißblau) darstellen.

Variante B-Enzyme (Klasse B) sind in aller Regel NRPS- oder PKS-abhängig und halogenieren daher Tyrosyl-Gruppen in Carrier-gebundenen Peptiden oder Aromaten an Polyketid-Carriern.^[31] Dazu gehören bspw. die Vancomycin-Halogenase VhaA^[162], sowie die Chondrochloren-Halogenase CndH.^[231] Beispiele dieser strukturell kleineren Naturstoffe sind das Hierridin B und C^[232], sowie Xanthomonadin^[233], für das XanJ die Halogenierung durchführt.

Zur Klasse C gehören Enzyme wie die decarboxylierende Brominase Bmp5 aus *Pseudoalteromonas luteoviolacea*.^[6, 234] Ähnlich wie BaaB bromiert dieses Enzym 4-HB, jedoch besitzt es zusätzlich noch die Funktion der Decarboxylierung und bromiert ein zweites Mal an der decarboxylierten Stelle.

7.4.4.3 Aliphatische Halogenasen

Basierend auf phenolischen Strukturen, hat sich eine weitere Gruppe von Flavin-abhängigen Halogenasen gebildet. Eine dieser Halogenasen ist CmlS aus *Streptomyces venezuelae*, welches für die Chlorierung des Antibiotikums Chloramphenicol (**27**) verantwortlich ist (Abbildung 33).^[235] Dieses Enzym weist einige Besonderheiten auf, denn es trägt ein kovalent gebundenes FAD (**12c**) und besitzt eine einzigartige C-terminale Domäne mit einem Tunnel in T-Form, welcher zum aktiven Zentrum führt.^[236] Aufgrund der unpolaren Oberfläche von CmlS scheint ein Aktivator CmlK oder Carrier-gebundenes Substrat nötig, ähnlich wie bei CndH.^[231] CmlK zeigt Ähnlichkeit zu Acyl-CoA-Synthetasen, daher ist noch in der Untersuchung, ob das Substrat wirklich Carrier-gebunden sein muss oder freie Substrate akzeptiert werden und die Aktivierung auf andere Weise erfolgt.^[6]

Auch die Methyltransferase-Halogenase AoiQ^[237] aus *Aspergillus oryzae* RIB40 hat, wie der Name andeutet, zwei Funktionen. In der Biosynthese der Diaporthine (**28**) methyliert es die freie Hydroxygruppe am Grundgerüst des Orthosporin (**28a**)^[238] und chloriert zusätzlich terminal die Isopropanol-Gruppe. Dabei entsteht das Derivat des dichlorierten Diaporthins (**28b**), mutmaßlich über eine Enolat-Bildung.

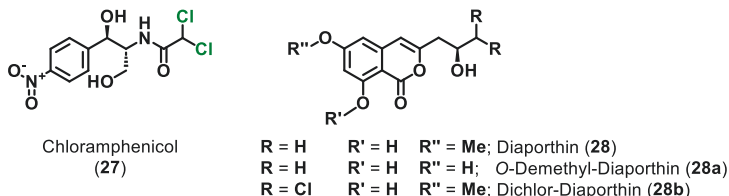


Abbildung 33: Halogenierte Naturstoffe und Substrate der aliphatischen Fl-Hals CmlS^[235] und AoiQ^[231]. Gezeigt sind das Antibiotikum Chloramphenicol (**27**), sowie Diaporthin (**28**), das demethylierte Diaporthin - Orthosporin^[238] (**28a**) und das halogenierte Dichlor-Diaporthin (**28b**).

7.4.4.4 Pyrrol-Halogenasen

Ähnlich wie die Phenol-Halogenasen unterteilen sich die Pyrrol-Halogenasen des Subnetzwerkes C in Enzyme der Variante A und B. Für Variante A sind insgesamt sechs Halogenasen bekannt, die alle im Durchschnitt paarweise 87 % Homologie zu der Pyrrolnitrin-Halogenase PrnC^[5, 239-241] aus *Pseudomonas sp.* aufweisen. Da PrnC damit nach unserem Wissen die einzige Pyrrol-Halogenase ist, die frei diffundierbare (freistehende) Pyrrole **26** als natürliches Substrat aufweist, soll ihr auch im Folgenden ein gesonderter Abschnitt gewidmet werden.

An dieser Stelle sei die Halogenase HalB aus *Actinoplanes sp.* ATCC 33002 erwähnt, welche auch freistehende Arylpyrrole **22** chloriert. In Rohextrakt-Experimenten konnte über Massenspektrometrie die Chlorierung von 2-(3,5-Dibromphenyl)pyrrol (**22d**) als Derivat des Pentachlorpseudilins (**22e**) detektiert werden, jedoch weder die Position, noch das natürliche Substrat bestimmt werden. Die Sequenzidentität von 44 % mit PrnC und 51 % mit der Phenol-Halogenase Cts4 aus dem Tetracyclin-Biosyntheseweg^[242] lassen hierbei keine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Gruppen zu.

Folglich gehören die anderen Enzyme dieses Netzwerks C der Variante B an. In der Literatur gilt hierfür als Modell die Pyrrol-Dichlorinase PltA^[159] (PDB: 5DBJ)^[243]. PltA und seine Homologen führen Dichlorierungen zur Biosynthese von Benzoylpyrrolen **29** durch, wie in der Struktur des Antimykotikums Pyoluteorin (**29a**)^[244] ersichtlich wird. Es handelt sich hierbei um den Typ II nicht-ribosomaler Peptid Synthetase Systeme (NRPS II), welche als eigenständige Enzym-Maschinerie häufig in hybriden Biosynthesewegen mit Fettsäuresynthasen (FAS), sowie Polyketidsynthasen (PKS) interagieren.^[190] Hierbei sind zwei konservierte Domänen bekannt, die einerseits für die Aktivierung des Substrats über eine Adenylierung zuständig sind und andererseits die Substratbeladung mithilfe eines Peptidyl-Carrier-Proteins (PCP) für NRPS und Acyl-Carrier-Proteins (ACP) für FAS und PKS durchführen (Abbildung 34 A).

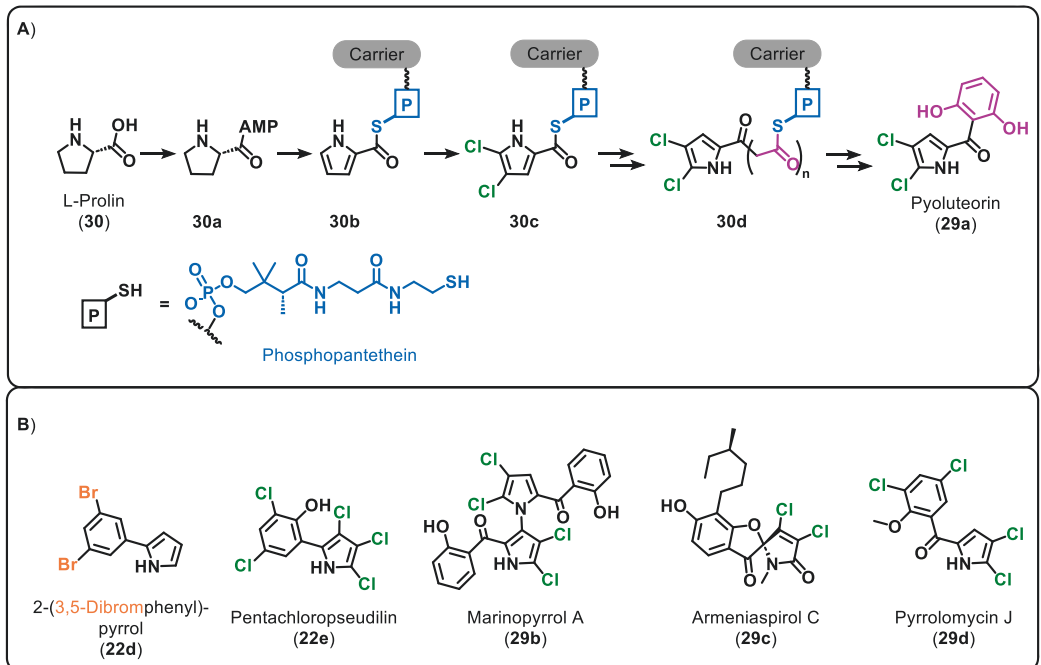


Abbildung 34: A) Schematische Biosynthese von halogenierten Pyrrol-basierten Naturstoffen auf Basis von Pyoluteorin^[244] (**28a**), sowie B) weitere Vertreter halogenerter Arylpyrrole (**22**) und Benzoylpyrrole (**29**).^[234, 242, 245, 246]

Neben der Untersuchung zur Regulation über Signalmoleküle,^[230, 244] Verwendung seltener Codons^[247] und protein-basierten Transkriptionsregulatoren^[159], wurden auch Homologe zu PltA in anderen Organismen gefunden. Außer *Pseudomonaden* produzieren auch *Streptomyceten* Pyoluteorin-Derivate (Abbildung 34 B). Mpy16 (PDB: 5BUK)^[234], als Enzym der Biosynthese von Marinopyrrol A (**29b**) des Stammes *Streptomyces sp.* CNQ-418, ist einer dieser Homologen. Bei der Herstellung der gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)^[248] wirkenden Marinopyrrole^[249], zeigte sich eine ähnliche Abfolge in der Biosynthese^[250], was auf einen generellen Ablauf zur Herstellung von Pyrrol-basierten Naturstoffen schließen ließ.^[251] Dabei wird L-Prolin (**30**) zunächst adenyliert (**30a**) und auf das Phosphopantetheinthiol des PCP übertragen. Das Pyrrolidin-Gerüst wird anschließend zum Pyrrol oxidiert und der PCP-gebundene Pyrrol-2-Carboxythioester (**30b**) erfährt die Dichlorierung am Pyrrolring (**30c**). Es folgt eine Elongation der ursprünglichen Carboxy-Gruppe entsprechend der Polyketidsynthese bis zur finalen Kettenlänge (**30d**), mit Reduktionen, Ringschluss und Hydrolyse des Thioesters (Abbildung 34 A). Ein weiteres Homolog ist Arm21 aus der Biosynthese von Armeniaspirol C (**29c**) aus *Streptomyces armeniacus*. In dieser Biosynthese wird jedoch von dem Muster der 4,5-Dichlorierung im finalen Naturstoff abgewichen.^[245] Auch marine Naturstoffe folgen dieser Biosynthese, wie Beispiele der bromierten, marinen Pyrrol-Phenole (BMP) zeigen^[252], die strukturell dem Arylpyrrol **22d** teilweise sehr ähnlich sind.^[234] Auch Erweiterungen des Pyoluteorin-Clusters sind in der Natur zu finden und bestehen in diesen Fällen aus Pyrrol- und Phenol-halogenasen, wie das Beispiel Pyrrolomycin J (**29d**) aus *Actinosporangium vitaminophilum* ATCC 31673 oder *Streptomyces sp.* UC 11065 zeigt.^[246] Während die Enzyme HalA (dox16/pyr16) und HalB (dox17/pyr17) mutmaßlich die Phenol-Struktur adressieren, ist Pyr29 das Homolog zu PltA.

Für die breitere Anwendung von PCP-abhängigen Halogenasen (Variante B) wurden einige Strategien entwickelt, die unter anderem im Kapitel 7.6 beschrieben werden. Trotz dieser Fortschritte bleibt die Biokatalyse mit Carrier-unabhängigen Enzymen die bevorzugte Variante, da so unter anderem viel weniger Enzyme in der Reaktionslösung benötigt werden. Deshalb soll es nun im Speziellen um PrnC als das Modell der Variante A-Enzyme für Pyrrole gehen.

7.5 PrnC als Halogenase der Pyrrolnitrin-Biosynthese

Pyrrolnitrin (**22a**) ist ein mikrobieller Pyrrol-basierter Halo-Metabolit, der sowohl für die Landwirtschaft, als auch Pharmazie und Industrie von Bedeutung ist.^[253] Isoliert wurde PRN (**22a**) aus verschiedenen Spezies wie rhizosphärischen *Pseudomonaden*, *Serratia*-, sowie *Burkholderia*-Stämmen und spielt im Pflanzenschutz gegen boden- und samenbürtige phytopathogene Pilze eine wichtige Rolle. Mit seinem potentiell breiten Wirkspektrum hat sich **22a** zum Leitmolekül industrieller Bedeutung entwickelt und deshalb zur kostengünstigen Entwicklung von Fermentationsprozessen geführt.^[253] Gleiches gilt für die Vorstufe Aminopyrrolnitrin (**22b**), welches eine starke antimykotische und antiparasitäre Wirkung hat.^[254] Fluoreszierende *Pseudomonaden*, die Gene für die Produktion von Antibiotika tragen, zeigen sich mit mehr als 1000 Isolaten als besonders reichhaltig. Einer dieser Vertreter ist *Pseudomonas protegens*^[255], welcher das Gencluster zur Biosynthese von Pyrrolnitrin (PRN) trägt (Abbildung 35).

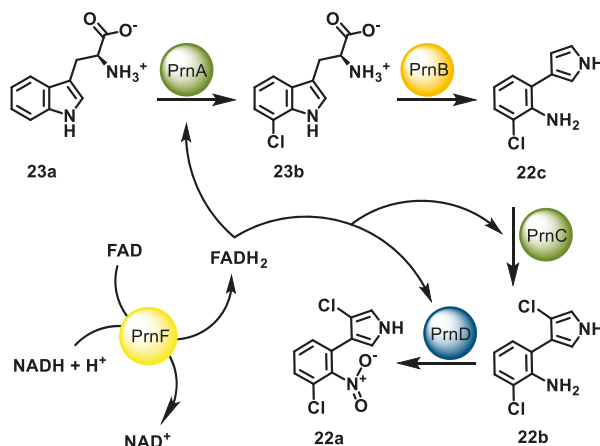


Abbildung 35: Biosynthese von Pyrrolnitrin (**22a**) ausgehend von L-Tryptophan (**23a**). Halogenierende Enzyme sind in grün dargestellt sowie die Verwendung von FADH₂ durch PrmA, PrnC und PrmD. Bereitgestellt wird das Reduktionsäquivalent von der Reduktase PrnF. Intermediate vom Tryptophan (**23a**) bis zum Pyrrolnitrin (**22a**) sind das 7-Chlortryptophan (**23b**), sowie das Monodechloraminopyrrolnitrin (**22c**) und das Aminopyrrolnitrin (**22b**). Abbildung ist der eigenen Publikation nachempfunden.^[256]

Im Folgenden soll ein historischer Abriss der Entdeckung von **22a** und seinem Biosynthese-Cluster skizziert werden. Schon im Jahre 1964 wurde PRN (**22a**) durch *Arima et al.* das erste Mal (aus einem *Pseudomonas*-Stamm) isoliert und benannt.^[257] 1970 publizierten *Hamill et al.* die Umsetzung von D-Tryptophan (**23a'**) zu PRN in *Pseudomonas aureofaciens*.^[258]

1981 zeigten *Chang et al.* über Isotopen-Experimente, dass die Nitro-Gruppe des PRN aus dem Indol-Strickstoff resultiert^[259] und *van Pée et al.* veröffentlichten eine Syntheseroute zum 7-Chlortryptophan (**23b**).

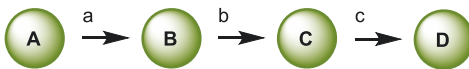
Ziel war hierbei zu untersuchen, ob die L-Tryptophan-2,3-dioxygenase auch das Chlor-Derivat akzeptiert.^[260] Dieses Enzym soll später als PrnB (PDB: 2X66) bezeichnet werden.^[261] Zwei Jahre später konnte gezeigt werden, dass auch bromierte Derivate von Pyrrolnitrin durch den mutierten Stamm *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926 ACN produziert werden, wenn entsprechende Vorläufer von PRN gefüttert werden.^[262] 1994 transferierten *Hill et al.* die Genregion von PRN aus dem Organismus *Pseudomonas fluorescens* (BL915) nach Deletionsexperimenten in die zwei Stämme BL914 und BL922, die selbst nicht zur Biosynthese von **22a** fähig sind. Nach dem Transfer konnte **22a** aus diesen Stämmen isoliert werden.^[5] Dies führte 1997 zur Erkenntnis, dass die halogenierenden Enzyme des PRN-Biosynthesewegs keine Haloperoxidasen sind, sondern NADH als Cosubstrat benötigen.^[241, 263] Im gleichen Jahr legten *Hammer et al.* die Annotationen der vier Gene *prnA*, *prnB*, *prnC* und *prnD* fest, die zu dieser Zeit als gesamtes Pyrrolnitrin-Cluster angesehen wurden.^[264] 1998 erfolgten die Funktionsbeschreibungen der vier Gene durch *Kirner et al.*^[240] Die erste Plasmid-basierte homologe Produktion und Reinigung des Proteins PrnA wurde kurz darauf im Jahr 2000 durch *Keller et al.* gezeigt^[265] und die Charakterisierung von PrnD als Rieske-N-Oxygenase erfolgte im Jahre 2005.^[266] Das vollständige Gen-Cluster war erst mit der Charakterisierung der Reduktase PrnF im Jahr 2007 annotiert.^[164]

Während PrnA eine intensive Charakterisierung erfahren hat, wurden für die Halogenase PrnC nach unserem Wissen keine detaillierten Untersuchungen publiziert. Hinweise auf die Inhibierung von PrnC durch Chlorid-Ionen und ein angenommenes pH-Optimum um pH = 7 finden sich aber in einem niederländischen Buchauszug von *Altmann et al.* aus dem Jahre 1997.^[239]

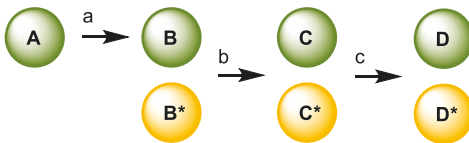
7.6 Konvergente Biosynthese von Naturstoffen

Aufgreifend was in der Betrachtung der PCP-abhängigen Pyrrol-Halogenasen (Variante B) erwähnt wurde, sollen nun artifizielle Varianten der natürlichen Biosynthesen betrachtet werden. Kombinierte Biosynthesen sind generell nicht ungewöhnlich,^[267] wie die Beschreibungen von Naturstoffen aus Teils NRPS und PKS gezeigt haben.^[268] Doch auch die Kombination aus verschiedenen Cluster-unabhängigen Naturstoff-Biosynthesen ist möglich, sowie die chemische Abwandlung durch Muta-, Semisynthesen und Fütterungsexperimente (Abbildung 36).^[269-271]

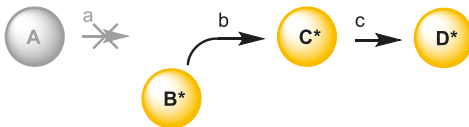
A) Biosynthese



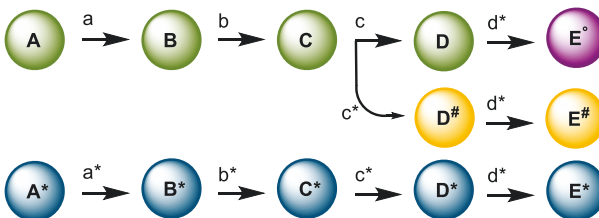
B) Fütterungs-Biosynthese



C) Mutasynthese



D) Kombinatorische oder hybride Biosynthese



E) Semisynthese



Abbildung 36: Biosynthetische Konzepte. Farbige Kreise stellen Substrat, Produkt, Intermediate, chemisch synthetisierte Vorläufer und chemisch abgewandelte Produkte dar und sind mit Großbuchstaben versehen. Kleinbuchstaben auf den Pfeilen stehen für Enzyme. Abgewandelt und ergänzt nach *Kirschning et al.*^[269, 270]

Als Beispiel sind im Zuge von fortgeschrittenen Strategien des „Metabolic Engineering“ chemisch synthetisierte Thioester in Mutasyntese-Ansätzen (Abbildung 36 C) eingesetzt worden. Hierfür werden die aktivierten Carboxy-Gruppen der natürlichen Substrate, bspw. über Säurechloride, oder über Katalysatoren, auf *N*-Acetylcysteamin (SNAc) übertragen. Dieser SNAc-Thioester kann dann in einer Umesterung mit dem PCP-Thiol eines NRPS reagieren (Abbildung 37 A).^[269, 272]

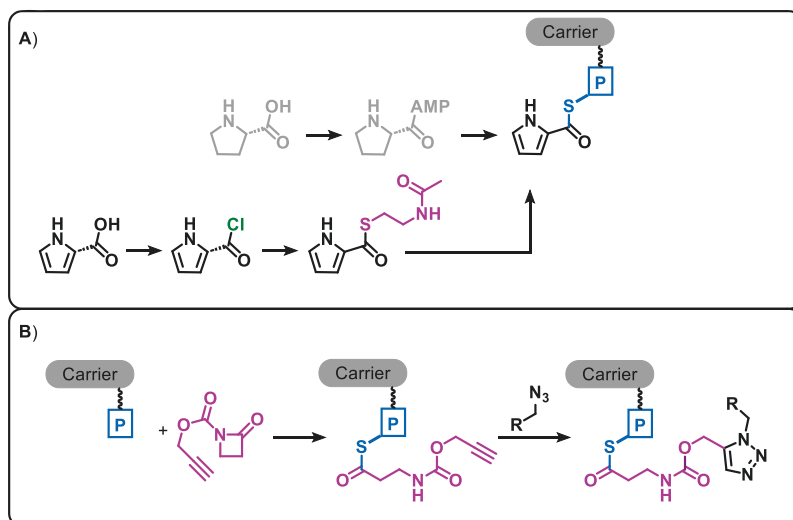


Abbildung 37: **A)** Hypothetisches Beispiel einer Mutasyntese im Biosyntheseweg von Benzoylpyrrolen (**29**), basierend auf *Anderle et al.* zur Clorobiocin-Biosynthese.^[272] In grau angedeutet ist die Biosynthese ausgehend von Prolin (**30**). Alternativ ist hier eine chemische Syntheseroute eines Pyrrrol-Derivats gezeigt, bei der die Umwandlung der Carboxy-Gruppe zum Säurechlorid erfolgt, sowie die Übertragung von *N*-Acetylcysteamin (SNAc, **lila**) zum Thioester.^[273] Final erfolgt die Umesterung des Carboxy-Pyrrrol-SNAc-Thioesters zum Carrier-Pantethein-Carboxy-Pyrrrol-Thioester (blau). **B)** Dargestellt ist die nukleophile Öffnung des *N*-aktivierten β -Lactams (**lila**) durch das Thiol des Carrier-gebundenen Pantetheins (blau) über eine Stunde bei Raumtemperatur. Eine anschließende Click-Reaktion am Alkin der Propargylalkohol-Gruppe mit einem Rhodamin-Azid generiert einen Carrier-gebundenen Fluorophor.^[274]

Andere Aktivierungsstrategien adressieren zunächst nicht das Substrat und deren Derivate, sondern das ACP von PKS-Cluster. Dafür wurden funktionelle Gruppen, wie bspw. Alkine von Propargylalkohol, durch Öffnung *N*-aktivierter β -Lactam-Linker, an die ACP-Thiolgruppe geknüpft (Abbildung 37 B).^[274] Über Click-Chemie (CuAAC) konnte dadurch ein Azid-tragender Rhodamin-Fluorophor gekoppelt werden. Das Ziel war hier zwar die Untersuchung des Substratspektrums von Ketosynthase-Acyltransferase-Domänen (KSAT), durch wiederum SNAc-verknüpfte Carbonsäure-Thioester^[275], es zeigt aber das Interesse an der Verknüpfung von artifiziellen Substraten durch verschiedene funktionelle Gruppen mit Carrier-Proteinen. Letztlich soll so die Produktion neuer Wirkstoffe, sowohl aus PKS-, als auch NRPS-Cluster, biologisch zugänglich sein.

Zwei Beispiele für den potentiellen Ansatz der kombinatorischen Biosynthesen (Abbildung 36 D) sind zum einen die Darstellung der sogenannten bakteriellen Aminophenylpyrrol-basierten Alkaloide (APPAs: „aminophenyl pyrrole-derived alkaloids“) am Beispiel des Marinochinolin A (**22f**) (marinoquinoline A^[276]).^[277] Hierbei stellt MarC ein Homolog zu PrnB dar und katalysiert die Umstrukturierung des Indols von **23a** zu einem Arylpyrrol. In Anwesenheit eines Aldehyds kann das 3-(*ortho*-Aminophenyl)-1*H*-pyrrol (**22g**) über eine spontane Pictet-Spengler-Zyklisierung das Chinolin (auch 1-Azanaphthalin oder Benzo[*b*]pyridin genannt) bilden (Abbildung 38). Weitere Modifikationen bspw. durch *N*-Methylierung sind mittels MarB möglich.^[277] So lassen sich die Biosynthese-Cluster von **22a** und **22f** kombinieren und bei Bedarf auch durch das Enzym Pictet-Spenglerase^[278] erweitern.

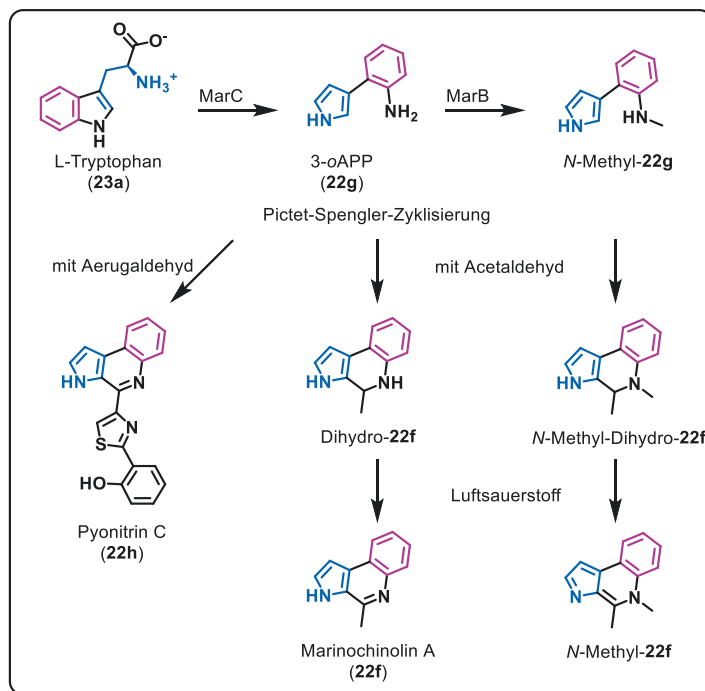


Abbildung 38: Übersicht der biologischen Herstellung von Marinochinolinen^[277] am Beispiel von Marinochinolin A^[276] (**22f**) ausgehend von L-Tryptophan (**23a**). Das 3-(*ortho*-Aminophenyl)-1*H*-pyrrol (**22g**) ist dafür das zentrale Intermediat, welches in einer spontanen Pictet-Spengler-Reaktion mit einem Aldehyd zum zyklischen Chinolin führt. Alternativ kann vor der Zyklisierung eine *N*-Methylierung der Anilinyll-Gruppe stattfinden und das *N*-Methyl-3-oAPP (*N*-Methyl-**22g**) entstehen lassen. Als weiteres Beispiel ist das Pyonitrin C (**22h**) dargestellt

Einen analogen Ansatz zeigten *Shingare et al.* in der Totalsynthese von unter anderem Pyonitrin C (**22h**).^[279] Zum anderen stellen die Prodiginine **31** als Pyrrol-basierte Naturstoffe^[280-283] eine Biosynthese mit natürlicher Bifurkation dar.

In Vorarbeiten wurden sowohl das Bipyrrol 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) (**32**), als auch das Monopyrrol 2-Methyl-3-amylypyrrol (MAP) (**33**) derivatisiert. *Zhao et al.* gingen noch einen Schritt weiter und ersetzten das Monopyrrol MAP (**33**) durch die Biosynthese von Tetramsäure (**34**). Durch Deprotonierung der aziden Protonen am Kohlenstoff von **34** wird eine Kondensation mithilfe von RedH zum Hybrubin **35** ermöglicht (Abbildung 39).^[284]

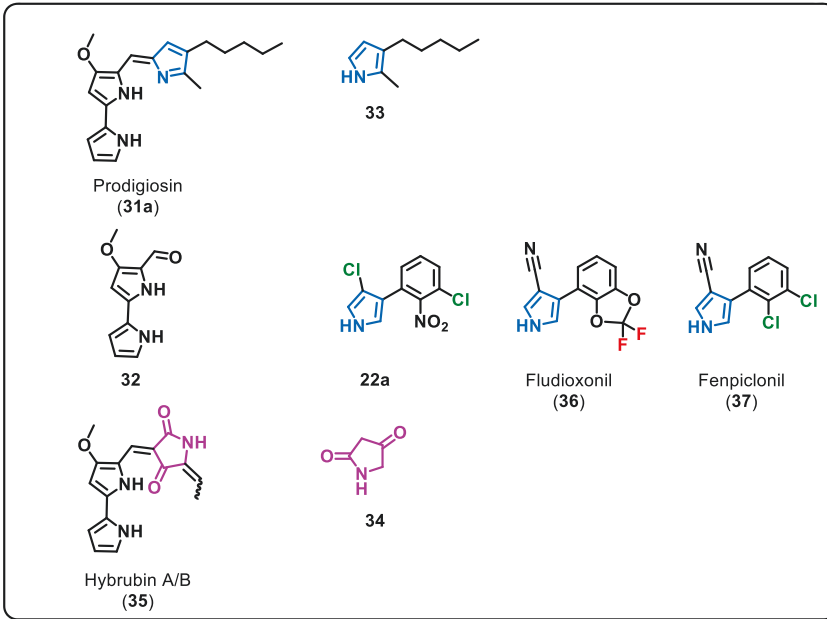


Abbildung 39: Darstellung weiterer Pyrrol-basierter Naturstoffe, deren Intermediate und Derivate. Hervorgehoben sind die Struktur motive des Monopyrrols (blau) und der Tetramsäure (lila) sowie Chlor- in grün und Fluorsubstituenten in rot.

Dass Derivatisierungen natürlicher Biosynthese-Produkte sinnvoll sind, zeigen die Pseudohalogenid-tragenden (CN⁻, N₃⁻, NCS⁻, etc.) Alternativen zu PRN (**22a**). So wurden (und werden teilweise noch heute) die Fungizide Fludioxonil (**36**)^[285, 286] oder Fenpiclonil (**37**)^[287] in der Landwirtschaft eingesetzt.

Voraussetzung für die in diesem Kapitel beschriebenen Variationen von Naturstoff-Biosynthesen ist eine ausgiebige Grundlagenforschung. Biosynthesen und deren Enzyme müssen verstanden werden, um auch davon isolierte Biokatalysen effektiv durchzuführen. Einen Beitrag soll diese Arbeit im Folgenden leisten.

8. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie in Kapitel 6.2 als Zielsetzung beschrieben, sollte eine Klasse von halogenierenden Enzymen etabliert werden, um pyrrolische Strukturen zu derivatisieren. Eine dieser Strukturen ist das tripyrrolische Gerüst der Prodiginine **31**. Entsprechend dieser Intention fiel die Wahl auf die Flavin-abhängigen Halogenasen (Fl-Hal) (Kapitel 7.4.4) der Biosynthesewege von Pyrrolnitrin (**22a**) und Pyoluteorin (**29a**) (Abbildung 40). Für eine Charakterisierung und Anwendung dieser isolierten Pyrrol-Halogenasen, die als Zwei-Komponenten-Systeme gelten, war die Bereitstellung von Flavin-Reduktasen (Fl-R) (Kapitel 7.4.2) eine obligatorische Vorbedingung. Für den Ansatz einer kombinatorischen Biosynthese (Kapitel 7.6) von Verbindung **31** war zusätzlich die Etablierung der Biosynthese-Cluster oder deren einzelne Enzyme im Produktionsstamm *P. putida* KT2440 notwendig. Neben diesen bekannten Fl-Hals wurden über konservierte Sequenzen zwei putative Halogenasen (NC201 und NH153) ausgewählt und sollten in Ansätzen charakterisiert werden. Mit der Strategie der Genfusion aus Teilen des Enzyms NH153 und der Pyrrol-Halogenase PrnC aus der Pyrrolnitrin-Biosynthese, sollten die positiven Eigenschaften von NH153 auf PrnC übertragen werden. Dieses chimäre Enzym bekam den Namen NHprnC. Um auch andere Struktur motive zu adressieren, wurden auch RadH als phenolische und PrnA als Tryptophan-Halogenase bereitgestellt. Diese sollen über Verbindung **31** hinaus auch Indolalkaloide wie Violacein^[288] (**48**), Physostigmin^[289] (**49**) oder Aurachine^[290, 291] **51** in Folgeprojekten derivatisieren.

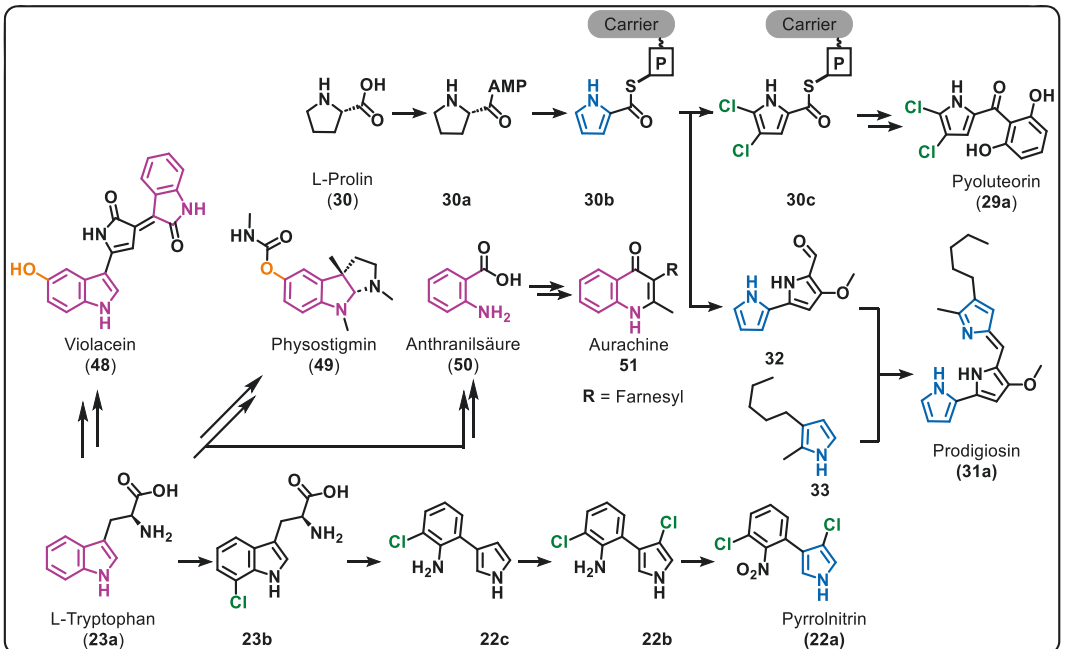


Abbildung 40: Übersicht der von Tryptophan (**23a**) und Prolin (**30**) ausgehenden Naturstoffe. Hervorgehoben sind die Struktur motive zur Halogenierung für Pyrrol- (blau), für Tryptophan- (lila) und Phenol-Halogenasen (orange).

8.1 Etablierung der Elektronen-Transportkette

Für die Bereitstellung dieses enzymatischen Halogenierungssystems ist es essentiell Flavinreduktasen zu etablieren. Im Kontext eines ökonomischen Blickwinkels ist es ferner auch sinnvoll ein kompatibles Cofaktor-Recycling-System (CRS) zu integrieren. Diese beiden Aspekte sollen in diesem Abschnitt beleuchtet werden. Ein zentraler Fokus ist dabei die Optimierung der Expression und Reinigung für die Bereitstellung von aktivem Enzym.

8.1.1 Bereitstellung der bakteriellen Flavinreduktase SsuE

Die Flavinreduktase SsuE ist ein *E. coli*-Protein und fand in der Literatur bereits mit Halogenasen Verwendung. Deshalb erfolgte zunächst die Etablierung dieser Reduktase für biokatalytische Anwendungen. Dafür wurde zunächst die chromosomale DNA isoliert. Hierfür wurde das Gen *ssuE* aus dem Genom des Stammes *E. coli* DH5 α durch PCR amplifiziert. Der Erfolg dieser Amplifikationen ist in der folgenden Abbildung 41 dargestellt.

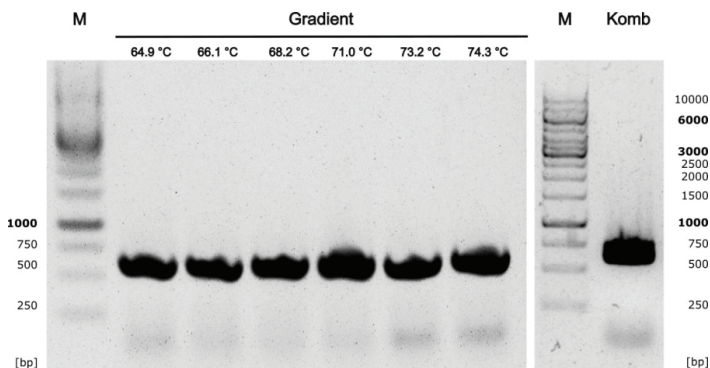


Abbildung 41: Analytisches Agarosegel zur PCR von *ssuE*-His₆ aus dem Genom von *E. coli* DH5 α . Als Primer wurden JGE0068_SsuE_fw und JGE0068_SsuE_His6_rv verwendet. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen sind auf dem linken Gel die PCR-Produkte der verschiedenen Temperaturen und rechts die kombinierten und entsalzten PCR-Produkte (Komb). Das PCR-Produkt *ssuE*-His₆ hat eine erwartete Größe von 612 bp.

Nach der Amplifikation des Reduktase-Gens *ssuE*-His₆ mit entsprechenden Überhängen (engl.: overlaps, OL) für den Zielvektor, erfolgte der Transfer *via* Gibson Assembly in den Vektor pGEB. Dieser ist ein modifizierter Vektor von pET28a(+), bei dem der Bereich von einschließlich *NcoI* bis exklusive *BamHI* entfernt wurde (Kapitel 14.1).

In einer Art homologen Überexpression wurde pGEB-ssuE-His₆ anfangs unter Standardbedingungen exprimiert. Hierfür wurde der resultierende Stamm *E. coli* BL21(DE3) pGEB-ssuE-His₆ in einer Übernachtskultur (ÜNK) angezogen und in je 1 L TB_{Kan}-Medium bei 37 °C und 140 rpm zur Expression überführt. Nach Induktion bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von ca. 0.6 erfolgte die Expression für 24 h bei 25 °C und 120 rpm. Nach der Zellernte wurden für die Reinigung Zellen aus 500 mL Kultur (ca. 7 g CDW) in 35 mL Äquilibrierungspuffer (50 mM KP_i-Puffer mit 5 mM Imidazol, pH = 7) resuspendiert und mittels Ultraschalls aufgeschlossen, das geklärte Lysat (cleared lysate cL) auf eine 5 mL-Ni-NTA-Säule aufgetragen und gereinigt. Der Prozess der Reinigung endete mit einem Pufferaustausch *via* Ultrafiltratoren Zentricons (COMW 10 kDa) bzw. der Entsalzung mit PD10-Säulen. Die folgende Abbildung 42 zeigt das Gel der SDS-PAGE zur Reinigung von SsuE-His₆. Am deutlichsten ist eine Überexpression in der Pellet-Fraktion P zwischen 20 kDa und 30 kDa erkennbar. Mit geringerer Intensität lässt sich diese Proteinbande auch angereichert in der Elutionsfraktion 2 (E2) erkennen.

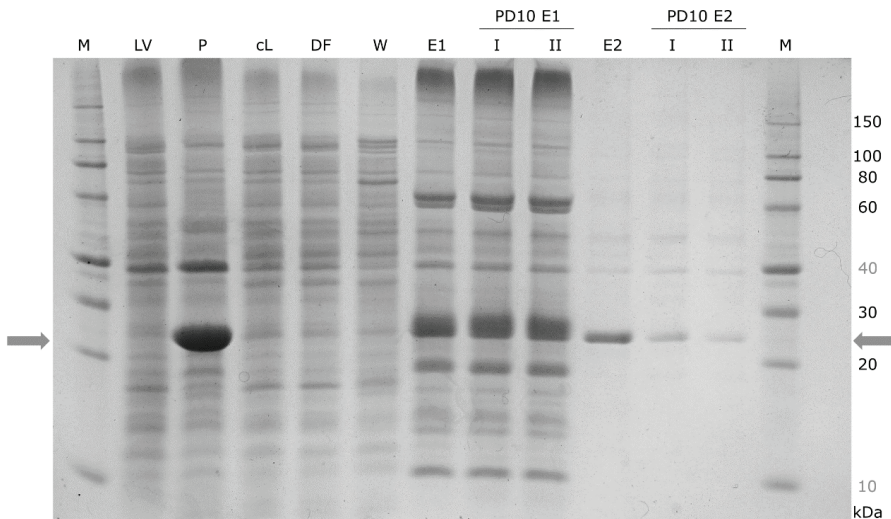


Abbildung 42: SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pGEB-ssuE-His₆ bei 25 °C mit 50 µM IPTG. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor-Kontrolle (*E. coli* BL21(DE3) pGEB), P für Zellpellet, cL für geklärtes Lysat, DF für Durchfluss der Säulenauftragung, W für Washfraktion mit 50 mM Imidazol, E1 für Elution mit 250 mM Imidazol, E2 für Elution mit 500 mM Imidazol und PD10 für die eingengteten und entsalzten Elutionsproben (50 mM KP_i-Puffer, pH = 7). Letztere sind hierbei in zwei Gefäßen á 1.25 mL aufgeteilt (I und II). SsuE-His₆ hat eine berechnete Größe von 22.3 kDa und ist mit einem Pfeil markiert.

Für die gereinigten und entsalzten Protein-Lösungen (PD10 E2) erfolgten anschließend Absorptionmessungen für den Nachweis von Flavinen. Ziel war dabei eine Möglichkeit der Nachverfolgung der Proteinelution in der Reinigung, sowie eine einfache Quantifizierung. Um festzustellen, ob die Flavine im genutzten Puffer Abweichungen zum in der Literatur genutzten Puffer zeigen, also verschobene Maxima oder andere Intensitätenverhältnisse im Absorptionsspektrum zeigen, wurde FMN im zuvor verwendeten Äquilibrierpuffer vermessen (Abbildung 43).

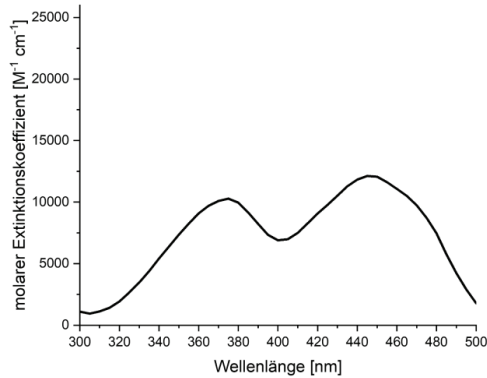


Abbildung 43: Absorptionsspektrum von FMN in Äquilierungspuffer (50 mM KPi-Puffer mit 5 mM Imidazol, pH = 7) bei 24 °C. Gemessen wurde von 260 nm bis 500 nm in einem Plattenlesegerät *Infinite M1000Pro* der Firma *Tecan*. Die Maxima befinden sich bei 375 nm mit $10286 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und bei 445 nm mit $12115 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Vergleichswerte finden sich bei *Aliverti et al.*^[292]

Die Proteinlösungen zeigten keine Absorption entsprechend dem Flavin-Muster. Da auch bei erneuter Reinigung keine Aktivität gemessen, noch Absorption bei entsprechender Wellenlänge detektieren konnte, wurde die Expressionstemperatur auf 20 °C gesenkt. Außerdem erfolgte die Untersuchung der Expression im zeitlichen Verlauf (Abbildung 44).

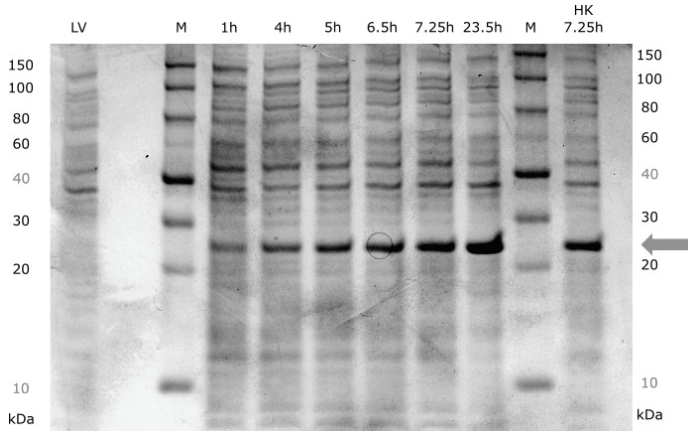


Abbildung 44: SDS-PAGE-Gel zum Expressionsprofil von *E. coli* BL21(DE3) pGEB-ssuE-His₆ mit 50 mL bei 20 °C und 120 rpm. Induktion erfolgte mit 200 µM IPTG bei OD₆₀₀ = 0.8. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor-Kontrolle (*E. coli* BL21(DE3) pGEB), und die Zeitpunkte der Probenentnahme nach Induktion in Stunden der Expression. Außerdem ist eine Vergleichsprobe der 500 mL Hauptkultur (HK) aufgetragen. SsuE-His₆ hat eine berechnete Größe von 22.3 kDa und wurde mit einem Pfeil versehen.

Auch unter dieser Bedingung lag das meiste Protein im Zellpellet als entsprechende Einschlusskörper (*inclusion bodies*, IBs) vor. Deshalb wurde die Strategie der Arginin-Resolubilisierung zur Entfaltung der Reduktase genutzt, um in einer anschließenden

Dialyse die Faltung zum aktiven Enzym zu ermöglichen. Hierzu wurde ein Arginin-Resolubilierungspuffer (50 mM TRIS-HCl mit 2 M Arginin, pH = 7.8) erstellt. Das in Aufschlusspuffer (50 mM TRIS-HCl, pH = 7.8) resuspendierte Zellpellet wurde in zwei Proben aufgeteilt. Eine Probe wurde zunächst weiter mit Aufschlusspuffer (Probe 1) und die andere Probe mit Arginin-Resolubilierungspuffer (Probe 2) verdünnt. Nach dem Zellaufschluss wurden Pellet- und Lysatfraktionen gesammelt. Für die Probe 1 (ohne Arginin) erfolgte nun anschließend der Versuch der Resolubilisierung mit Arginin aus dem Pellet. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 45 A dargestellt.

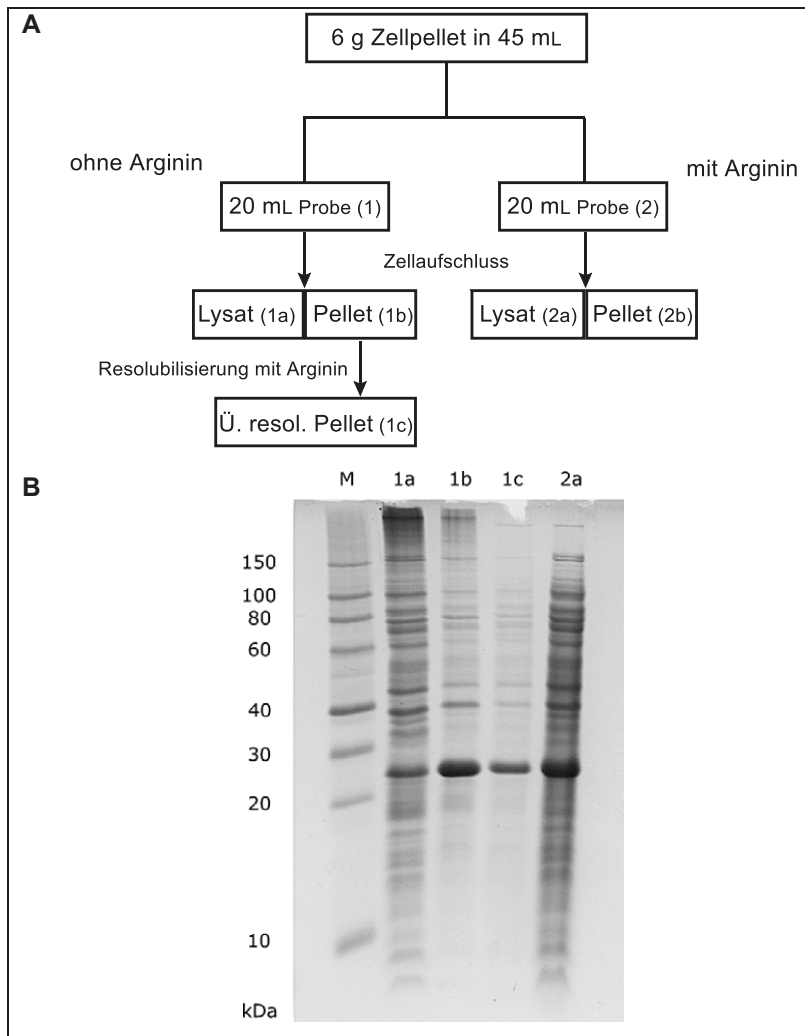


Abbildung 45: Resolubilisierung von SsuE-His₆ mit Arginin. A) Schematische Schritte zur Resolubilisierung mit Arginin. Als Basis dient der TRIS-HCl-Puffer (50 mM TRIS-HCl, pH = 7.8). Für die Resolubilisierung ist zusätzlich 2 M Arginin enthalten. B) SDS-PAGE Gel der Resolubilisierung mit M als Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), gekläartes Lysat ohne Arginin (1a), und Zellpellet ohne Arginin (1b), Überstand des resolubilisierten Zellpellets mit Arginin nach 1h Inkubation und anschließender Zentrifugation (1c), sowie direkt in Arginin-Puffer aufgeschlossene Zellen mit resultierendem Lysat (2a). Das Pellet aus dem Argininaufschluss (2b) ist nicht dargestellt.

Durch eine schlechte Löslichkeit des Arginins bei Raumtemperatur, das durch Absetzen am Boden sichtbar war, ist die Strategie 1 – Aufschluss ohne Arginin – zu bevorzugen. Mit der deutlich stärkeren Bande im Pellet (1b) im Vergleich zum Lysat (1a) zeigte sich noch einmal deutlich die Bildung von IBs (Abbildung 45 B). Diese konnten erfolgreich über Resolubilisierung in Lösung gebracht werden (1c). Auch die Menge der löslichen Reduktase im Argininaufschluss (2a) scheint im Vergleich zu 1a erhöht.

Um den Reduktaseanteil im Pellet weiter zu verringern wurde in einer neuen Expression die Temperatur auf 18 °C gesenkt und vor der Induktion mit 100 µM IPTG ein Kälteschock auf Eis durchgeführt. Danach erfolgte eine neue Reinigung nach Strategie 1, also Aufschluss zunächst ohne Arginin. Die Resolubilisierung aus dem Pellet erfolgte in diesem Fall für 1 h bei 10 °C unter Schwenken. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand auf eine 5 mL-Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Reinigung mit angepassten Imidazol-Konzentrationen erfolgte analog zu Abbildung 42 und ist in Abbildung 46 dargestellt.

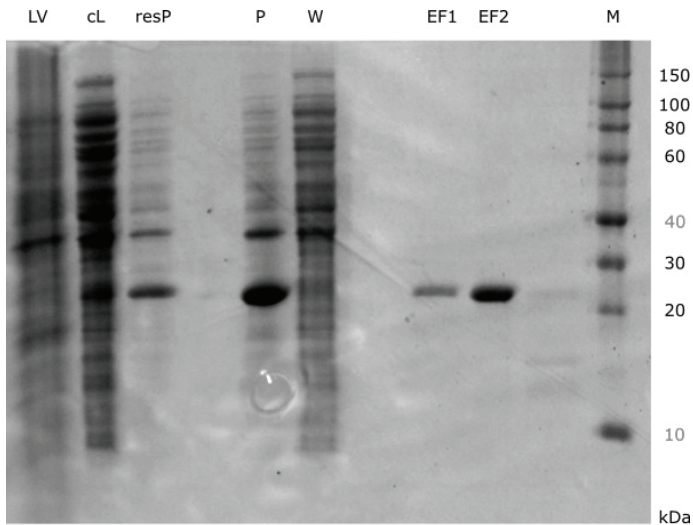


Abbildung 46: SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pGEB-ssuE-His₆ bei 18 °C. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROT1®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor-Kontrolle (*E. coli* BL21(DE3) pGEB), cL für geklärtetes Lysat, resP für Überstand der Zentrifugation nach Resolubilisierung des Zellpellets, P für übriges Pellet nach Resolubilisierung, W für Waschfraktion mit 100 mM Imidazol und EF für Elutionsfraktionen 1 und 2 mit 200 mM bzw. 300 mM Imidazol. Die aufgetragenen Volumina spiegeln nicht die gleichen Proteinkonzentrationen wider. SsuE-His₆ hat eine erwartete Größe von 22,3 kDa.

Bei der Analyse der Gelelektrophorese war zu beobachten, dass sich noch eine relativ große Menge an Zielprotein in der Pellet-Fraktion befand, sodass die Temperatursenkung nicht den gewünschten Effekt hatte. Der Teil des Zielproteins, der resolubilisiert wurde, konnte gereinigt werden, zeigte dennoch wieder keine Aktivität.

Parallel zu der Resolubilisierung und dem Kälteschock erfolgte ein Wechsel des Produktionsstammes. Hierfür wurden einerseits *E. coli* ArcticExpress (DE3) und andererseits *E. coli* Tuner (DE3) transformiert. *E. coli* ArcticExpress (DE3) zeigt eine Co-Expression von für tiefe Temperaturen geeigneten Chaperoninen, *Cpn10* und *Cpn60*, aus dem psychophilen Bakterium *Oleispira antarctica*. Diese GroEL- und GroES-ähnlichen Proteine zeigen eine hohe Neu- bzw. Umfaltungsrate (*refolding rate*) bei 4 – 12 °C. Der Stamm *E. coli* Tuner (DE3) zeichnet sich durch die Deletion der *lacY*-kodierte Permease aus. Die Folge ist eine nur über Diffusion mögliche IPTG-Aufnahme und daher langsamere und gleiche Verteilung. Diese Expressionskontrolle sollte den Anteil an fehlgefalteten Proteinen reduzieren. Die Expression in *E. coli* ArcticExpress (DE3) erfolgte für 48 h bei 10 – 13 °C und 120 rpm. Das Chromatogramm zur Reinigung mittels *immobilized metal (ion) affinity chromatography* (IMAC) ist in Abbildung 47 dargestellt. In den Elutionsfraktionen 10 – 12, sowie 16 – 18 war keine Aktivität messbar.

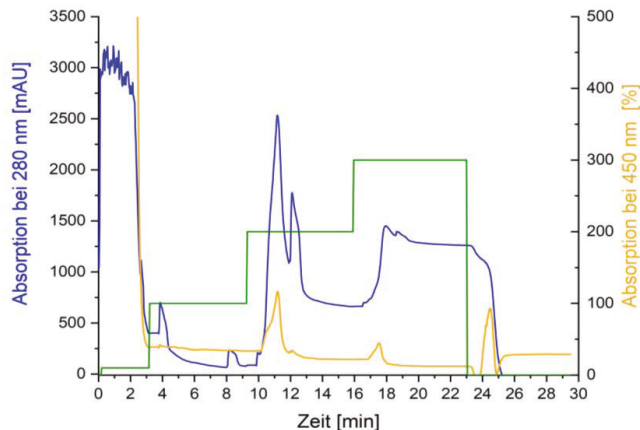


Abbildung 47: Chromatogramm der Reinigung von SsuE-His₆ nach der Expression in *E. coli* ArcticExpress (DE3). Dargestellt sind die Absorptionen bei 280 nm für Proteine und 450 nm für die Flavine in Abhängigkeit zur Reinigungszeit, sowie in grün der Stufengradient für den prozentualen Anteil von Puffer B (ohne Achse, Schritte: 1 %, 10 %, 20 % und 30 %). Ab Minute 3 wurde die Konzentration von Imidazol auf 100 mM erhöht (Waschschritt). Die Elution erfolgte dann ab Minute 9 mit 200 mM Imidazol, sowie ab Minute 15 mit 300 mM Imidazol.

Die Expression in *E. coli* Tuner (DE3) wurde bei 18 °C und 120 rpm durchgeführt. Nach Induktion bei OD₆₀₀ = 0.8 mit 100 µM IPTG wurde ein Ethanol-Schock^[293] mittels 4 % (v/v) Ethanol, sowie ein Kälteschock^[155] für 30 min bei 4 °C zur Chaperon(in)bildung durchgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen (3 g Zellen in 10 mL). Das geklärte Lysat wurde bei 4 °C in Lagerungspuffer [25 mM KPi, 300 mM NaCl, pH = 7.5 mit 10 % (v/v) Glycerin] gelagert. Bei der Vermessung zeigten die Reinigungsfractionen auch hier keine Aktivität, dafür war für das Lysat erstmals eine Absorptionsabnahme für NADH detektierbar. Exemplarisch sei die Berechnung hier einmal dargestellt:

$$\text{Volumetrische Aktivität} \left[\frac{U}{mL} \right] = \frac{\text{Steigung} \left[\frac{Abs}{min} \right] * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Schichtdicke} [cm] * \epsilon [mM^{-1} * cm^{-1}]} = \left[\frac{mM}{min} \right]$$

$$\frac{0,873 \left[\frac{Abs}{min} \right] * 10}{1 [cm] * 6,22 [mM^{-1} * cm^{-1}]} = 1,40 \left[\frac{mM}{min} \right] = 1,40 \frac{U}{mL}$$

In der Doppelbestimmung ergab sich die volumetrische Aktivität 1.378 ± 0.036 U/mL. Da die Reduktase nicht im Detail charakterisiert werden soll, wurde im Weiteren mit Lysaten gearbeitet. Zur Untersuchung des Einflusses der verschiedenen Cofaktoren wurden unter gleichen Bedingungen die Aktivitäten (Tabelle 4) von SsuE-Lysat mit jeweils NADPH und NADH, sowie FMN und FAD bestimmt (Abbildung 48).

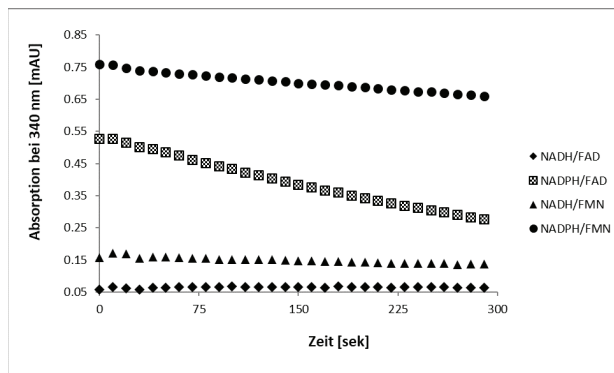


Abbildung 48: Aktivitätsbestimmung des geklärten Lysats von SsuE-His₆. Nach der Expression bei 18 °C in *E. coli* Tuner (DE3) und Zellaufschluss wurden 20 µL Lysat mit 200 µM NADH oder NADPH, sowie 30 µM FMN oder FAD und Reduktasepuffer (50 mM KPi, 100 mM NaCl, pH = 7) auf ein Gesamtvolumen von 200 µL verdünnt. Der Extinktionskoeffizient von NAD(P)H bei 340 nm beträgt 6.22 mM⁻¹cm⁻¹ und die Schichtdicke der Mikrotiterplatte 0.5 cm. Gezeigt sind die Absorptionsabnahmen von NADPH in der Reaktion mit FMN (Kreise), NADPH mit FAD (gepunktete Quadrate), NADH mit FMN (Dreiecke) und NADH mit FAD (Rauten).

Tabelle 4: Volumetrische Aktivitäten der Lysate von der Reduktase SsuE mit Kombinationen aus 200 µM NADPH, 30 µM FMN und 30 µM FAD. Die Parameter zur Messung im Plattenlesegerät *Infinite M1000Pro* der Firma *Tecan* waren Schichtdicke (1 cm), Verdünnungsfaktor 10 und Extinktionskoeffizient (6.22 mM⁻¹ cm⁻¹).

Enzym	Substrat 1	Substrat 2	Vol. Aktivität
SsuE	FMN	NADPH	67 ± 9 mU/mL
	FAD	NADPH	174 ± 34 mU/mL

Während für NADH keine Aktivität unter diesen Bedingungen gemessen werden konnte, zeigte sich eine höhere volumetrische Aktivität für FAD im Vergleich zu FMN bei der Nutzung von NADPH (Tabelle 4). Damit ist die Reduktion von FAD 2.6-mal schneller als die von FMN.

Für die Reduktase SsuE lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine lösliche Produktion von aktivem Enzym in *E. coli* BL21(DE3) weder bei 25 °C mit 50 µM IPTG, noch bei 20 °C mit 200 µM IPTG möglich war. Auch die Resolubilisierung mit Arginin führte zwar zu Protein in der löslichen Lysatfraktion, aber noch immer zu inaktivem Enzym. Das Gleiche gilt für den Wechsel des Expressionsstammes im Falle von *E. coli* ArcticExpress (DE3). Erst die Produktion in *E. coli* Tuner (DE3) führte zu löslichem Lysat mit aktivem Enzym. Die Aktivitätstests zeigten eine Präferenz für FAD in der Reduktion mit NADPH. Eine Reaktion mit NADH konnte nicht gezeigt werden.

Im Vergleich zur Literatur, in der zur Charakterisierung der (NADPH)-abhängigen FMN-Reduktase SsuE, entweder der Wildtyp oder eine Variante mit N-terminalem His-Tag untersucht wurden,^[156, 157, 266] befand sich der His-Tag im Konstrukt dieser Arbeit am C-Terminus. In beiden Fällen erfolgte auch dort die Bereitstellung des Gens *ssuE* durch PCR aus dem Genom eines *E. coli* K12-Stammes. Während eine Hypothese zur Bildung der *inclusion bodies* die geänderte Position des His-Tags sein könnte, zeigte sich doch auch bei *Eichhorn et al.* die Präzipitation von SsuE und His-SsuE für die Produktion in *E. coli* BL21(DE3) bei einer Expressionstemperatur von 30 °C.^[156] Entsprechend ist die Bildung von unlöslichem SsuE-His₆ bei 25 °C und 20 °C bei sonst ähnlichen Bedingungen wie Induktion mit 50 µM IPTG bei einer OD₆₀₀ von ca. 0.5–0.6 in Übereinstimmung mit der Literatur. Die Reduktion der Expressionstemperatur auf 16 °C bei einer Expressionsdauer von 6 h führte für *Eichhorn* zur Produktion von löslichem Protein. *Gao et al.* wichen bei der Produktion von SsuE teilweise von diesen Bedingungen ab, indem sie bei einer OD₆₀₀ von 0.8–0.9 mit 400 µM IPTG induzierten und die Temperatur während der Expression auf 18 °C senkten.^[157] Die Expressionszeit lag hier auch bei 6 h. Die Untersuchung der Expression über den Zeitraum von ca. 24 h zeigte in dieser Arbeit jedoch keinen Grund, die Expression nach 6 h abzubrechen, da die Proteinmenge basierend auf SDS-PAGE-Analyse weiter anzusteigen schien. Deshalb wurde zunächst ebenfalls die Expressionstemperatur auf 18 °C gesenkt. Im Gegensatz zur Literatur führte dies jedoch nicht zur Produktion von aktivem Enzym. Die Resolubilisierung mit Arginin basiert auf einer Unterdrückung der Aggregation und Stabilisierung als nicht-denaturierendes Agens, analog zu Guanidium Hydrochlorid, durch Begünstigung eines Faltungsintermediats.^[294] Während bei einem pH-Wert von 4.1 und einer Konzentration von 0.5 M Arginin eine Wiedergewinnung von 82 % Antikörper IgG₄ möglich war und bei pH = 4.4 mit 2 M Arginin die Resolubilisierungsrate 84 % betrug, zeigt sich, dass der Einfluss der Konzentration ab 0.5 M eher gering ist. Der pH-Wert hingegen hat einen stärkeren Einfluss, denn die Wiedergewinnungsrate von löslichem IgG₄ bei pH = 4.7 und 2 M Arginin lag nur noch bei 65 %.^[294] Deshalb ist das Verhältnis zwischen resolubilisierter SsuE mit 1 M Arginin in der Fraktion resP und der daraus gewonnenen Elutionsfraktion, sowie dem zurückbleibenden Pellet P bei pH = 7.8 nach qualitativer SDS-PAGE-Analyse ein nachvollziehbares Ergebnis. Obgleich dieser pH-Effekt für einen geringeren pH-Wert spricht, erfolgte der Aufschluss dennoch in pH 7.8, da *Lee et al.* nach der Proteinproduktion die Reinigung ebenfalls bei pH 7.9 durchführten.^[266] Da der Antikörper IgG₄ keine katalytische Aktivität hat, kann die fehlende Aktivität der SsuE nicht

anhand dieser Resolubilisierungs-Ergebnisse bewertet werden. Es ist bekannt, dass Harnstoff, Guanidiniumchlorid, sowie Arginin als Faltungshelfer bei hohen Konzentrationen Proteine denaturieren und bei geringer Konzentration die Aggregation verhindern können, die erhaltene oder wiedergewonnene Löslichkeit die Menge an aktiven, korrekt gefalteten Proteinen aber nicht erhöhen.^[295] Es zeigt sich, dass der Unterschied in der Konzentration zwischen 0.5 M und 1.5 M Arginin eher gering ist, aber die Dauer der Neufaltung essentiell ist. Im Fall von rhG-CSF zeigten *Chen et al.* die Arginin-gestützte Neufaltung nach 17 h Inkubation bei 4 °C.^[295] Entsprechend war die Phase der Resolubilisierung von SsuE-His₆ in dieser Arbeit mit 1 h sehr kurz. Um eine hohe Proteinausbeute bei geringer Temperatur beizubehalten, erfolgte die Produktion folgend in dem Stamm *E. coli* ArcticExpress(DE3). Hier konnte zwar Zielprotein ohne Resolubilisierung in höherer Menge isoliert werden, jedoch was SsuE nach wie vor inaktiv. *Eichhorn et al.* beschrieben, dass der Wildtyp der SsuE schon nach 2 – 3 h im Lysat und auf Eis seine Aktivität verliert und dass gereinigte SsuE zwar mehrere Tage aktiv bleibt, aber im Prozess der Reinigung stark an Aktivität verliert. Dies könnte eine schlüssige Begründung darstellen. Erst der Wechsel zum Stamm *E. coli* Tuner (DE3), sowie die Reduktion der Temperatur auf 18 °C in Kombination mit einem Kälte- und Ethanol-Schock, die die Stress-Antwort in *E. coli* auslösen und die Hitzeschock-Proteine DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL und GroES produzieren lassen,^[293, 296] ermöglichte die Bereitstellung von aktivem Lysat. Ein weiterer Unterschied ist, dass zuvor kein Natriumchlorid in den Puffern vorhanden war. Mit dem Wechsel zu *E. coli* Tuner (DE3) wurde auch 300 mM NaCl hinzugefügt. Sowohl *Eichhorn et al.* als auch *Gao et al.* nutzten 500 mM bzw. 100 mM NaCl in ihren Puffern. Vergleicht man die Aktivitäten der gereinigten Proteine SsuE bzw. His-SsuE mit den Lysaten dieser Arbeit, so ist eine nominelle Bewertung schwer, da keine volumetrischen Aktivitäten verglichen werden können. Was aber bestätigt werden konnte ist die Präferenz von SsuE für NADPH über NADH, welche in den unterschiedlichen K_M -Werten um den Faktor 12.1 deutlich wird [$K_M(\text{NADPH}) = 46.0 \mu\text{M}$; $K_M(\text{NADH}) = 555.5 \mu\text{M}$ aus Lit.^[156]]. So erklärt sich auch die nicht detektierbare Aktivität mit NADH beim Vergleich der Nicotinamid-Substrate. Der Aktivitätsunterschied von Faktor 2.6 für FAD und FMN deckt sich ebenfalls mit dem Unterschied in den spezifischen Aktivitäten um den Faktor 1.8 [$v_{\text{max}}(\text{FMN}) = 0.54 \text{ U/mg}$; $v_{\text{max}}(\text{FAD}) = 0.96 \mu\text{M}$].^[156] Einen Vergleich der Lysat-Aktivität ist jedoch mit der Doktorarbeit von Ina Wynands möglich. In der Dissertation wurden 3 μL SsuE-Lysat mit einer Aktivität von 0.55 mU genutzt.^[163] Diese 183 mU/mL liegen in der gleichen Größenordnung wie die volumetrische Aktivität von SsuE-His₆, die in dieser Arbeit für FAD und NADPH mit $174 \pm 34 \text{ mU/mL}$ detektiert werden konnten. Der neu postulierte Mechanismus von *Driggers et al.* über die Bindung zweier Moleküle FMN – eines fest gebunden und eines als Cosubstrat – ist für die Betrachtung von SsuE als Reduktase für Halogenierungen wichtig.^[158] Für diesen Biokatalyseinsatz ist daher FMN als Zusatz essentiell, allerdings besteht die Möglichkeit das FMN-Cosubstrat durch FAD zu substituieren, welches die Fl-Hal zur Halogenierung benötigen.

Da die Aktivitäten der SsuE sehr gering waren und nur Lysate verwendet werden konnten, sollten auch andere Flavinreduktasen genutzt werden. Das als Doppelkonstrukt mit Halogenase erhaltene synthetische Gen *fre* zeigte in initialen Versuchen keine Überexpression und wurde daher nicht weiter untersucht. Allerdings erfolgte die Klonierung des Reduktase-Gens *prnF* aus dem Biosyntheseweg von Pyrrolnitrin (**22a**).

8.1.2 Bereitstellung der bakteriellen Flavinreduktase PrnF

Für die Amplifikation des Gens der Reduktase PrnF (Abbildung 49) wurde das synthetische Pyrrolnitrin-Cluster [pUC57-Brick(+)-*prnABCD*F] verwendet. Die PCR-Ansätze wurden entsalzt und in einem Gibson Assembly mit geschnittenem pET28a(+)-Vektor verwendet. Nach Sequenzierung wurde das isolierte Plasmid zur Transformation von *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

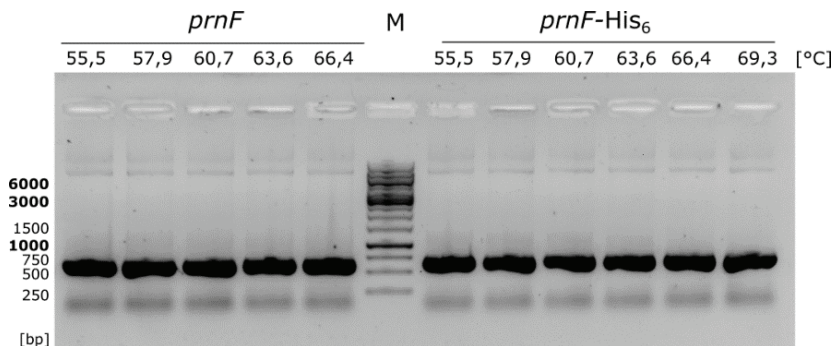


Abbildung 49: Analytisches Agarosegel zur PCR von *prnF* und *prnF*-His₆ mit pUC57-Brick(+)-*prnABCD*F als Templat. Als Primer wurden verwendet: JGE0209_PrnF OL pET28 fw, JGE0209_PrnF OL pET28 rv, sowie JGE0209_PrnF-His6 OL pET28 rv. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Die PCR-Produkte *prnF* und *prnF*-His₆ haben eine Größe von 585 bp bzw. 609 bp.

Die Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*prnF*-His₆ erfolgte in TB_{Kan}-Medium nach Induktion mit 100 μM IPTG (OD₆₀₀ = 0.6) bei 20 °C. Die Zellernte erfolgte nach 24 h. Für den Aufschluss wurden 5 g Zellen in 20 mL Äquilibrierungspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 7.5) resuspendiert. Nach dem Zellaufschluss *via* Ultraschall wurde das Lysat durch Zentrifugation gewonnen. Für die Reinigung wurde das Äkta-Programm der SsuE (Gradient: 10 mM, 100 mM, 200 mM und 300 mM Imidazol) aus dem Kapitel 10.4.1 gewählt (Abbildung 50). Die Elution wurde bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol durchgeführt und die Fraktionen 13 – 17 (Minute 9 – 14) vereinigt. Diese zeigten eine gelbe Farbe in den Auffangröhrchen.

Die kombinierten Fraktionen wurden *via* Centricons auf ein Volumen von 5 mL eingengt. Nach Entsalzung mit PD10-Säulen ergaben sich 14 mL Reduktase in Lagerungspuffer. Die Konzentration wurde auf 2.76 mg/mL berechnet [MW: 20.96 kDa; ϵ_{280} (Cystine oxidiert): 13075 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]. Dies ergibt etwa 155 mg Protein aus 1 L Kultur.

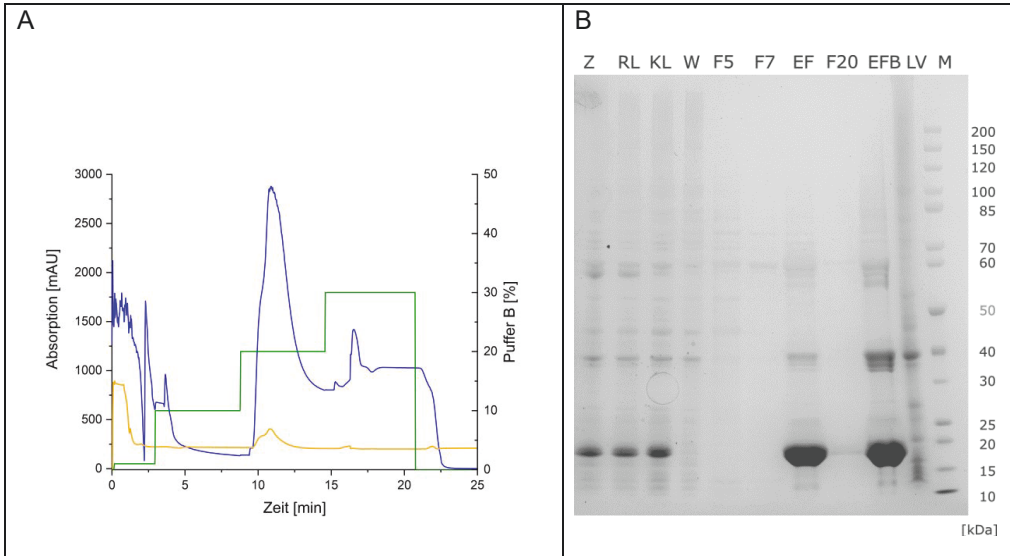


Abbildung 50: Reinigung von PrnF-His₆. A) Zeigt das Reinigungschromatogramm der *Äkta purifier* für die Reinigung von PrnF-His₆. Dargestellt sind die Absorptionen bei 280 nm (blau) und 450 nm (orange). Außerdem sind die Konzentrationsstufen von Puffer B (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH = 7,5) in Prozent gezeigt (grün). B) SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-prnF-His₆ bei 20 °C. Gezeigt sind die Spuren Z für Zellprobe nach Expression, Rohlysate nach Aufschluss (RL), geklärtetes Lysat nach Zentrifugation (KL), Waschfraktion mit 100 mM Imidazol (W), Reinigungsfractionen (F), die kombinierten Elutionsfraktionen 13 – 17 (200 mM Imidazol), Die entsalzten Elutionsfraktionen (EFB), LV für den Leervektor und M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von *Thermo Fisher Scientific Inc.*). PrnF-His₆ hat eine berechnete Größe von 21 kDa.

Die Aktivität von PrnF-His₆ wurde bei 30 °C bestimmt. Hierfür wurde die Abnahme der Absorption bei 340 nm für NADH (ϵ_{340} : 6.22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) gemessen. NADH und FAD wurden hier mit einer Konzentration von 200 μM bzw. 30 μM eingesetzt. PrnF-His₆ wurde mit einer Verdünnung des Faktors 25000 in Reduktase-Puffer (50 mM KP_i, 100 mM NaCl, pH = 7) vermessen. Für eine vergleichbare Bestimmung der Aktivitäten (Abbildung 51) von gereinigtem Enzym (orange Quadrate) und geklärtetem Lysat (schwarze Kreise), wurden die volumetrischen Aktivitäten bestimmt. In der Dreifachbestimmung ergaben sich die volumetrischen Aktivitäten für das Lysat von $186.30 \pm 12.04 \text{ U/mL}$ und für gereinigtes Enzym $197.18 \pm 21.22 \text{ U/mL}$. Da das gereinigte Enzym eine Konzentration von 2.76 mg/mL hat, ergibt sich die spezifische Aktivität von $71.44 \pm 7.69 \text{ U/mg}$.

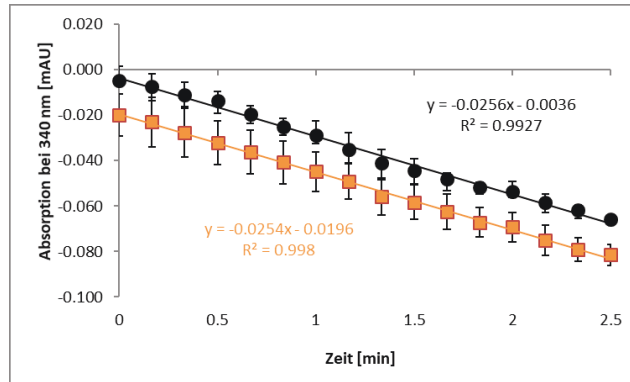


Abbildung 51: Aktivitätsbestimmung des geklärten Lysats und der gereinigten, entsalzten PrnF-His₆. Lysat und gereinigtes Enzym wurden mit einer Verdünnung von 25000 vermessen. Cofaktoren wurden mit 200 μM für NADH und 30 μM für FAD eingesetzt. Gemessen wurde bei 30 $^\circ\text{C}$ in Reduktasepuffer (50 mM KP_i, 100 mM NaCl, pH = 7) in einem Gesamtvolumen von 200 μL . Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt $6.22 \text{ mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und die Schichtdicke der Mikrotiterplatte 0.5 cm. Gezeigt sind die Absorptionsabnahmen von NADH in der Reaktion mit FAD für das Lysat (schwarze Kreise), und gereinigtes Enzym (orange Quadrate). Die Messwerte der Dreifachbestimmung wurden gemittelt und mit der Standardabweichung jedes Zeitpunktes angegeben.

In der Dreifachbestimmung ergaben sich die volumetrischen Aktivitäten für das Lysat von $186.30 \pm 12.04 \text{ U/mL}$ und für gereinigtes Enzym $197.18 \pm 21.22 \text{ U/mL}$. Da das gereinigte Enzym eine Konzentration von 2.76 mg/mL hat, ergibt sich die spezifische Aktivität von $71.44 \pm 7.69 \text{ U/mg}$. Unter Einbeziehen des Molekulargewichts von PrnF-His₆ entspricht dies unter den angegebenen Assaybedingungen einer Wechselzahl k von etwa $25 \pm 3 \text{ s}^{-1}$, die wie folgt berechnet wird:

$$\begin{aligned}
 k \left[\frac{1}{\text{s}} \right] &= \text{spez. Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] * \text{Molekulargewicht} [\text{Da}] = \left[\frac{\text{U} * \text{Da}}{\text{mg}} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol} * \text{g}}{\text{min} * \text{mg} * \text{mol}} \right] \\
 &= \left[\frac{\mu\text{mol} * \text{g}}{\text{min} * \text{mg} * \text{mol}} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mmol}} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol}}{60 \text{ s} * 1000 \mu\text{mol}} \right] = \left[\frac{1}{60000 \text{ s}} \right]
 \end{aligned}$$

Für die Bereitstellung der Reduktase PrnF-His₆ wurden aus 500 mL Kultur nach 24 h etwa 5 – 6 g Zellen gewonnen. *Lee et al.* sprechen für die Produktion von His-PrnF von 3 g CDW nach 6 h, wobei kein Kulturvolumen genannt wird.^[164] Im Gegensatz zu *Lee et al.* zeigte sich bei der Reinigung in dieser Arbeit eine Gelbfärbung der Elutionsfraktionen, welche allerdings beim Pufferaustausch verloren ging. Beschrieben wurde ein k_{cat} von 65 s^{-1} und Michaelis-Konstanten von $K_M(\text{FAD}) = 3.2 \mu\text{M}$ und $K_M(\text{NADH}) = 43.1 \mu\text{M}$. Aus den volumetrischen Aktivitäten dieser Arbeit mit $197.18 \pm 21.22 \text{ U/mL}$ und einer Proteinausbeute von 2.76 mg/mL kann die spezifische Aktivität von $71.44 \pm 7.69 \text{ U/mg}$ bestimmt werden. Die sich ergebende Wechselzahl k von etwa $25 \pm 3 \text{ s}^{-1}$ liegt damit in der gleichen Größenordnung. Da Zwischen 3 g CDW zur Reinigung und k von 65 s^{-1} keine weiteren Daten vorliegen, kann hier keine weitere Aussage zum Vergleich getroffen werden. Entsprechend der mechanistischen Untersuchungen von *Tiwari et al.* fanden die

Aktivitätsmessungen im pH-Optimum für PrnF bei pH = 7 statt. Eine annähernd gleichbleibende Wechselzahl findet sich im pH-Bereich von 7 – 7.5, wohingegen die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) sogar über einen Bereich von pH = 6.5 – 8.5 ähnlich ist.^[165] Für eine Anwendung mit Halogenasen zeigten *Ismail et al.*, dass eine volumetrische Aktivität von 2.5 U/mL für 1.2 mol-% Halogenase in combiCLEAS ausreicht. Die Expression erfolgte dort bei 30 °C in 1 L Kultur für 72 h.

Nachdem nun eine gereinigte und aktive Reduktase bereitgestellt wurde, die das günstigere NADH anstelle von NADPH als Substrat hat, sollte eine Regeneration des Cofaktors genutzt werden, um NADH in geringeren Mengen einsetzen zu können.

8.1.3 Glucose-Dehydrogenase als Cofaktor-Recycling-System

Die in dieser Arbeit verwendete GDH wurde über Fermentation durch das *Institut für molekulare Enzymtechnologie* (IMET) bereitgestellt.^[297] Nach der Übergabe von Zellpellets durch Holger Gieren erfolgte die weitere Aufarbeitung in unserem Institut. Hierfür stellte Beatrix Paschold Rohlysate bereit. Der Zellaufschluss erfolgte mit 25 % (w/v) in einem 100 mM Puffer TRIS-HCl mit einem pH = 8. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glycerol [50 % (v/v)]. Vor der jeweiligen Anwendung erfolgte die Bestimmung der volumetrischen Aktivität der GDH über die photometrische Detektion der NADH-Bildung. Exemplarisch sei in der folgenden Abbildung 52 der Anstieg der Absorption als Triplikat dargestellt.

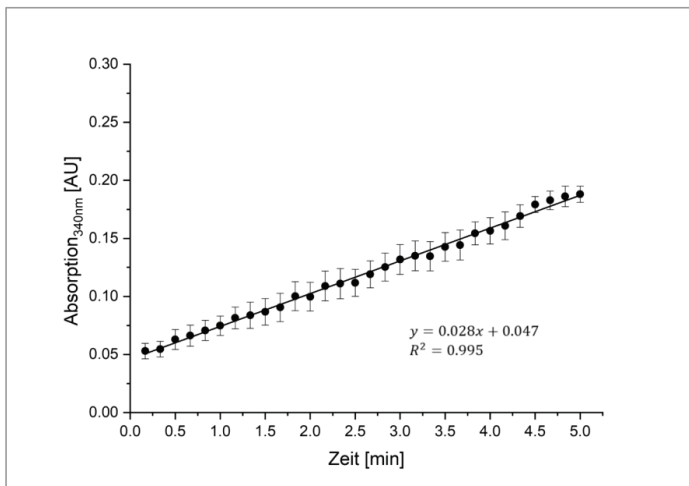


Abbildung 52: Aktivitätsbestimmung des Rohlysats der GDH. Lysate wurden mit einer Verdünnung von 20000 vermessen. Als Cofaktor wurde NAD^+ mit 10 mM eingesetzt. Gemessen wurde in Reaktionspufferpuffer (50 mM KPi , pH = 7.2), welcher das Substrat Glukose mit einer Konzentration von 40 mM enthält. Das Gesamtvolumen betrug 200 μl . Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt $6.22 \text{ mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und die Schichtdicke der Mikrotiterplatte 0.5 cm. Gezeigt sind die Absorptionszunahme von NADH.

Aus dem Anstieg und den in der Abbildungsunterschrift erfolgten Angaben zu Parametern und Zusammensetzung, lässt sich die volumetrische Aktivität analog zu den Reduktasen berechnen. In der Dreifachbestimmung ergaben sich die Steigungen 0.028 min^{-1} , 0.029 min^{-1} , 0.029 min^{-1} und damit die durchschnittliche volumetrische Aktivität von $184.72 \pm 4.82 \text{ U/mL}$. Mit etablierter Reduktase und einem möglichen CRS sollen nun die eigentlichen Halogenierungen betrachtet werden.

Die Aktivität der GDH wurde als 197 U/mL bzw. 19.9 U/mg im zellfreien Extrakt beschrieben.^[297] Diese ist nahezu deckungsgleich mit der in dieser Arbeit bestimmten volumetrischen Aktivität von $184.72 \pm 4.82 \text{ U/mL}$.

8.2 Halogenase PrnC aus der Pyrrolnitrin-Biosynthese

8.2.1 Klonierung, Expression und biochemische Analyse

Die Isolation des Gens *prnC* wurde durch die Bereitstellung des Stammes *Pseudomonas protegens* Pf-5 durch Katrin Rölln (IMET) ermöglicht. Die initiale Konstruktion durch Isolation aus dem Genom wurde durch Alexander Veljko Fejzagić im Zuge dieser Arbeit durchgeführt. In einer Touchdown PCR (Abbildung 53) entstand das Fragment *prnC*-His₉.

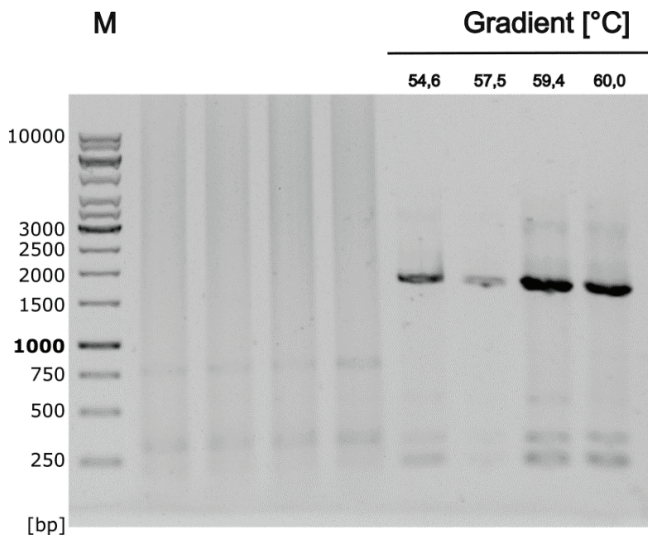


Abbildung 53: Analytisches Agarosegel zur PCR von *prnC*-His aus dem Genom von *Pseudomonas protegens* Pf-5. Als Primer wurden AFE005_V001_pET28a_prnC fw und AFE005_V001_pET28a_prnC rv verwendet. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen sind die PCR-Produkte der verschiedenen Temperaturen. Das PCR-Produkt *prnC*-His hat eine Größe von 1737 bp.

Nach der Amplifikation des Gens mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen (RE) für den Zielvektor wurden die Probenbanden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Anschließend konnte über eine Ligation mit geschnittenem Vektor pET28a(+) das Konstrukt pET28a(+)-*prnC*-His generiert werden. Es zeigte sich in der Sequenzierung einerseits ein verlängerter His₉-tag, sowie eine Punktmutation, welche in einer folgenden QuikChange-PCR eliminiert wurde. Der Aminosäureaustausch lautet E9G. Entsprechend ergab sich das finale Expressionskonstrukt pET28a(+)-*prnC*-His₉ (Kapitel 14.1). Als Standard-Expressionswirt wurde auch für PrnC zunächst *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Expression von PrnC-His₉ in *E. coli* BL21(DE3)

Für die Expression wurden 1 L TB_{Kan}-Medium in einem 3 L-Fernbrachkolben mit 0.5 % Vorkultur *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.8 wurde mit 100 µM IPTG induziert und die Temperatur der Wachstumsphase – in Anlehnung an die Expression in *P. fluorescens*^[5] – von 37 °C auf 28 °C gesenkt. Die Schüttelfrequenz von 140 rpm wurde beibehalten. Die Zellernte erfolgte nach 24 h. Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer (50 mM KPi, 500 mM NaCl pH = 7.5) aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte mit den drei Imidazol-Konzentrationen 50 mM für die Waschfraktionen, 100 mM für die 1. Elutions- und 500 mM für die 2. Elutionsfraktion (Abbildung 54 A).

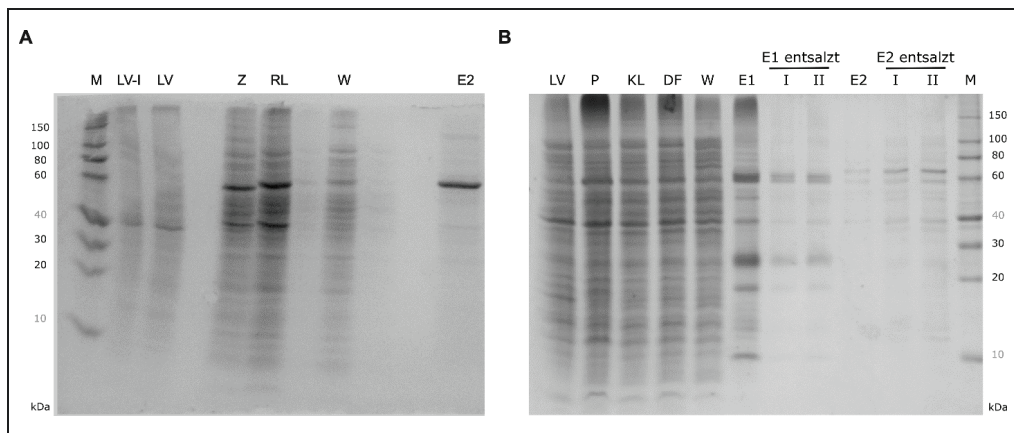


Abbildung 54: SDS-PAGE-Gele zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ bei A) 28 °C und B) 25 °C. A) Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV-I als induzierter Leervektor, LV für nicht induzierten Leervektor, Z für Zellprobe nach 24 h Expression, RL für Rohlysate, W für Waschfraktion mit 50 mM Imidazol und E2 für Elutionsfraktionen 2 mit 500 mM Imidazol. B) Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor, P für Zellpellet nach Aufschluss, KL für geklärtetes Lysat, DF für Durchfluss der Säulenbeladung, W für Waschfraktion mit 50 mM Imidazol, E1 für Elution mit 250 mM und E2 für Elution mit 500 mM Imidazol. I und II sind jeweils die Proteinlösungen nach PD10-Pufferaustausch. PrnC-His₉ hat eine berechnete Größe von 66.1 kDa.

Diese Überexpression konnte in Folgeexperimenten nicht mehr reproduziert werden. Daher wurden die Expressionsbedingungen verändert. Der Induktionszeitpunkt wurde auf OD₆₀₀ = 0.6 gesetzt und die Temperatur weiter abgesenkt. Expression wurde daher mit 50 µM IPTG bei 25 °C und 120 rpm gestartet. Der Elutionspuffer 1 wurde ebenfalls auf 250 mM Imidazol angepasst (Abbildung 54 B). Bei einer weiteren Reduktion der Expressionstemperatur konnte *prnC*-His₉ deutlich überexprimiert werden (Abbildung 55).

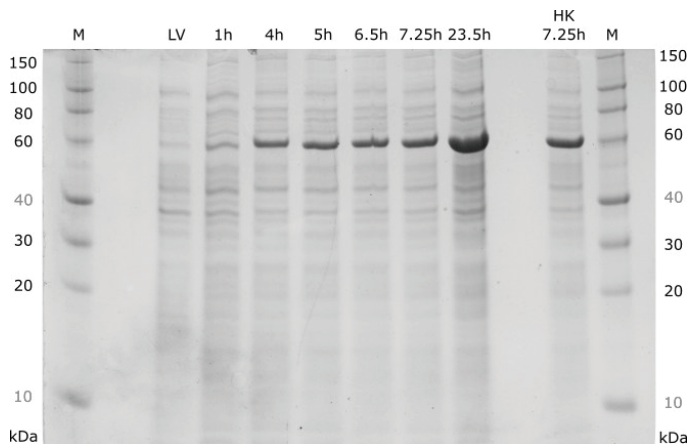


Abbildung 55: SDS-PAGE-Gel zum Expressionsprofil von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ in 50 mL bei 20 °C und 120 rpm. Induktion erfolgte mit 200 µM IPTG bei OD₆₀₀ = 0.6. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor-Kontrolle (*E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)) und die Zeitpunkte der Probenentnahme nach Induktion in Stunden der Expression. Außerdem ist eine Vergleichsprobe der 500 mL Hauptkultur (HK) aufgetragen. PrnC-His₉ hat eine berechnete Größe von 66.1 kDa.

Bei der Reinigung im Aufschlusspuffer (50 mM KP_i, 300 mM NaCl pH = 7.5) mit verschiedenen Imidazol-Konzentrationen zeigte sich jedoch, dass sich das gesamte Zielprotein in der Pellet-Fraktion befindet (Abbildung 56).

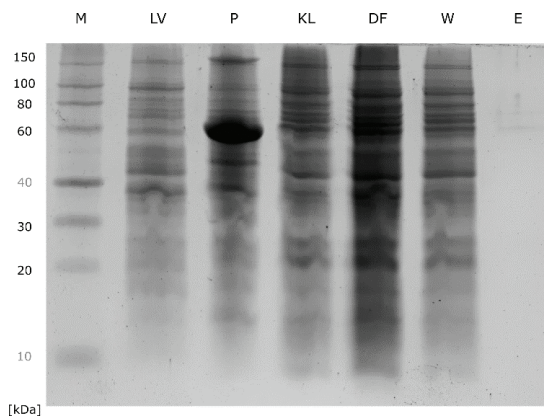


Abbildung 56: SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ bei 20 °C und 120 rpm. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor-Kontrolle, P für Zellpellet, KL für gekläartes Lysat, DF für Durchfluss der Säulenauftragung, W für Waschfraktion mit 100 mM Imidazol und E für Elution mit 500 mM Imidazol. PrnC-His₉ hat eine berechnete Größe von 66.1 kDa.

Analog zur Resolubilisierung von SsuE-His₆ wurde für PrnC-His₉ mit Arginin eine Neufaltung versucht, blieb allerdings erfolglos. Deshalb wurde für PrnC-His₉ der Expressionsstamm gewechselt.

Expression von PrnC-His₉ in *E. coli* ArcticExpress(DE3)

Nach der Transformation wurde der Stamm *E. coli* ArcticExpress(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ für die Expression genutzt. Nach dem Ethanol- und Kälteschock und der Induktion mit 100 μ M IPTG bei OD₆₀₀ = 0.5 erfolgte die Proteinproduktion bei 10 – 15 °C für 48 – 72 h. Für den Zellaufschluss wurden Zellpellet mit 20 % (w/v) in Äquilibrierungspuffer (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8) resuspendiert und aufgeschossen. Die Reinigung erfolgte durch Auftragung von geklärtem Lysat auf eine Ni-NTA *superflow cartridge* und wurde entweder mit einer Peristaltikpumpe oder dem automatisierten System des *Äkta purifier* durchgeführt (Abbildung 57). In der Regel ergaben sich nach der Reinigung Proteinausbeuten von 1 mg/g Zellen (15 mg/L Kultur). Bei hoher Proteinkonzentration (~ 4 mg/mL) zeigten die Elutionsfraktionen eine gelbe Färbung. Diese ging aber bei der Entsalzung verloren.

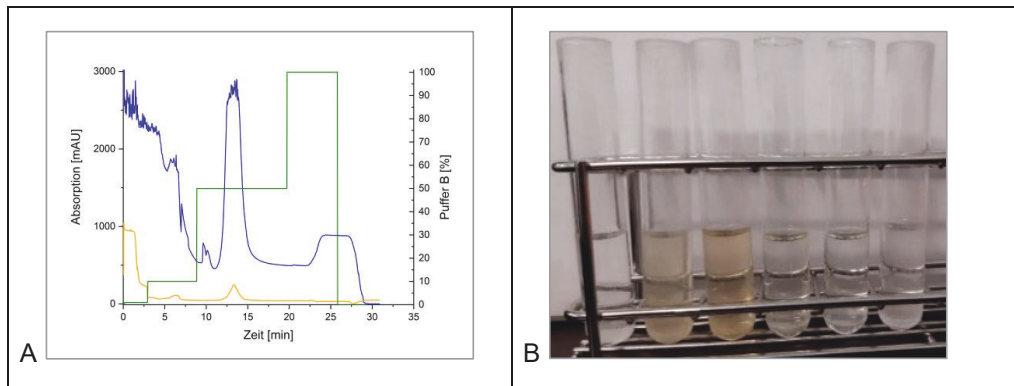


Abbildung 57: Reinigung der Expression von *E. coli* ArcticExpress(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ nach Expression bei 10 – 15 °C mittels *Äkta purifier*. A) Zeigt das Reinigungschromatogramm der *Äkta purifier* für die Reinigung von PrnC-His₉. Dargestellt sind die Absorptionen bei 280 nm (blau) und 450 nm (orange). Außerdem sind die Konzentrationsschritte von Puffer B (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, pH = 8) in Prozent gezeigt (grün). Nach der Auftragung des Lysats erfolgte der Waschschritt mit 7 Säulenvolumen (*column volumes*, CV) Waschpuffer (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH = 8). Die Elution wurde mit 8 CV Elutionspuffer (50 mM KP_i, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH = 8) durchgeführt. Die Lagerung von PrnC-His₉ erfolgte bei – 20 °C in Lagerungspuffer (25 mM KP_i, 300 mM NaCl, pH = 7.5 mit 10 % (v/v) Glycerin). B) Elutionsfraktionen der Reinigung von PrnC-His₉. Von Links nach rechts zu sehen sind die 5 mL Fraktionen 10 – 16 und entsprechen auch der Zeit zwischen 10 min und 16 min.

Für den Verlauf der Reinigung wurde auch eine Gelelektrophorese durchgeführt, welche Expressionsbanden in der erwarteten Größe zeigten (Abbildung 58). Als Nachweis, dass es sich bei dem isolierten Protein um PrnC-His₉ handelt, wurden zwei Proben aus den SDS-PAGE-Gelen ausgeschnitten. Einmal die im Pellet (P) verbliebene Bande bei 60 kDa der Expression aus BL21(DE3) als Positivkontrolle (Abbildung 56) und aus der Expression in ArcticExpress(DE3) die konzentrierte Elutionsprobe (kE) (Abbildung 58). Auszuschließen war die Isolierung der Chaperonine.

Ergebnisse und Diskussion

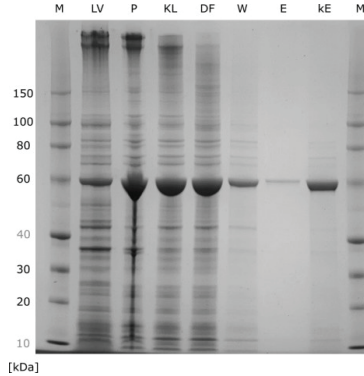


Abbildung 58: SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* ArcticExpress(DE3) pET28a(+)-*prnC*-His₉ bei 10 – 15 °C und 120 rpm. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (ROTI®Mark 10-150 PLUS), LV für Leervektor-Kontrolle, P für Zellpellet, KL für gekläartes Lysat, DF für Durchfluss der Säulenaufragung, W für Waschfraktion mit 100 mM Imidazol und E für Elution mit 500 mM Imidazol. Nach dem Entsalzen wird das Protein mit Centricons eingengt. Die konzentrierte Enzym-Lösung in Lagerungspuffer befindet sich in Spur KE. PrnC-His₉ hat eine berechnete Größe von 66.1 kDa.

Nach der Isolation und Trypsin-Verdau der Proteine wurden die Proben an die Kollegin Christina Mack am Institut für Bio- und Geowissenschaften IBG-1: Biotechnologie (Forschungszentrum Jülich) zur MALDI-ToF-Analyse überreicht. Ein Vergleich der beiden Proben mit *E. coli*-eigenen Proteinen bestätigte die Identität von PrnC-His₉ durch Massen der Aminosäure-Fragmente (Abbildung 59).

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Number of mass values searched: 56
 Number of mass values matched: 8
 Sequence Coverage: 14 %

1 MTQKSPANGH DSNHFDV IIL GSGMSGTQMG AILAKQQFRV **LIIIEQSSHPR** FTIGESSIPE TSLMNR IAD RDYDIPELGHI TSFYSTQRVY
 91 SSSTGIKRN F GFVFKPGQE HDPKFTQCV IPPELPWGPES HYRQDQVDAY LLQAAIKYGC TVRQKTSVTE YHADKDGVAV TTAEGERFTG
 181 RYIMDCGGPG APLATKFLGR **EEPCRFKTHS** RSLYTHMLGV KPFD DIFKVK QQRWRWHEGT LHHMFTGGWL WVIFNNHPR **STNNLVSVGL**
 271 **QLDPRV**YPKT DIPAQQEFDE FLAR**FPSIGA** **QFR**DAVPVRD WVKTDRLQFS SNACVGDRCY LMLHANGFID PLF**SRG**LENT **AVTIHALAAR**
 361 LIKALRDDD F SPERFEYIER LQQKLLDHND DfVSCCYTAF SDFR**LWDAFH** **RL**WAVGTILG QFRLVQAHAR FRASRDEGDL DHDLDNDPPYL
 451 GYLCADMEQY YQLFNDAKAE VEAVSAGHKS AEEAALR**IHA** **LIDER**DFAKP MEGFGYCITG DKPQLNNSKY SLIPAM**KLMY** **WTQTR**APAEV
 541 KKYFDYNPMF ALLKAYITTR IGLALKKHVV HHHHHHHH

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
40	- 50	1278.7301	1277.7228	1277.7092	11	0	R.VLIIEQSSHPR.F
201	- 211	1446.7220	1445.6834	1445.6834	22	2	R.EEPCRFKTHS.R.S
261	- 275	1612.7790	1611.7717	1611.8580	-54	0	R.STNNLVSVGLQLDPR.V
295	- 303	1022.5381	1021.5308	1021.5345	-4	0	R.FPSIGAQFR.D
346	- 360	1536.8574	1535.8502	1535.8420	5	0	R.GLENTAVTIHALAAR.L
405	- 411	944.4689	943.4616	943.4664	-5	0	R.LWDAFHR.L
488	- 495	966.5244	965.5171	965.5294	-13	0	R.IHALIDER.D
528	- 535	1098.4917	1097.4844	1097.5328	-44	0	R.LMY WTQTR.A

Abbildung 59: MALDI-ToF-Analyse von PrnC-His₉ nach einem Trypsin-Verdau. Gezeigt sind die detektierten Massen der Aminosäurefragmente, die mit der Sequenz übereinstimmen (rot). Die Hydrolyse erfolgte hauptsächlich nach Argininen (R) und einmal nach einem Lysin (L).

Mit den Hinweisen auf die korrekten Massen für Fragmente von PrnC-His₉ wurden Kristallisationsversuche mit Prof. Dr. Oliver H. Weiergräber (Institut für Biologische Informationsprozesse, IBI-7: Strukturbiochemie, Forschungszentrum Jülich), sowie DLS-Messungen durchgeführt. Die DLS-Messungen zeigten auf Grund der großen Radien eine Mischung oligomerer Strukturen ($n > 10$). Die Kristallisation war mit dieser nicht-monodispersen Proteinlösung nicht erfolgreich. Die Priorität der Kristallstruktur rückte damit zunächst nach hinten und der Nachweis der Aktivität wurde zum zentralen Fokus der weiteren Experimente. Hierfür mussten Substrat und Produkt synthetisiert werden, um einen Nachweis über analytische Methoden zu gewährleisten.

Zunächst stellte sich die Frage, ob der Einfluss des entstandenen His₉-tags bei der Klonierung von *prnC* (Kapitel 8.2.1) signifikant ist. Für die Affinitäts-Reinigung zeigten *Mohanty und Wiener*, dass für die Elution im Vergleich eine höhere Imidazol-Konzentration nötig war. Während die His₆-tag-Proteine mit 100 mM Imidazol eluiert wurden, waren für die His₁₀-tag-Variante 500 mM Imidazol nötig.^[298] Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen. Allerdings stellten sie sowohl eine geringere Proteinausbeute um den Faktor 4 fest, als auch einen Einfluss auf den oligomeren Zustand. Die geringere Ausbeute könnte an einer geringeren Affinität bei der Reinigung liegen, die *Knecht et al.* bei einer Untersuchung der Dissoziationskonstanten für His₂- bis His₁₀-Peptide untersucht haben. Hier zeigte sich ein Abfall in der Affinität zu Ni²⁺ ab einem Oligo-Histidin von His₇, bedingt durch höhere Freiheitsgrade und damit Flexibilität des Tags.^[299] Der längere His-Tag hat aber nicht zwangsläufig Einfluss auf die Enzymaktivität. *Yan et al.* verglichen die spezifischen Aktivitäten der D-Aminosäureoxidase (DAO) mit His₆- und His₉-Tag und fanden ähnliche Werte für beide Varianten.^[300] Für eine höhere Proteinausbeute und geringere Imidazol-Konzentrationen während der Reinigung kann eine Verkleinerung des Tags also sinnvoll sein, Einfluss auf die Aktivität muss es aber nicht zwangsläufig haben. Für die lösliche Proteinproduktion wurden auch für andere Halogenasen Strategien erforderlich, wie sie in dieser Arbeit für PrnC gezeigt wurden (Kapitel 8.2.1). Beispielsweise wurde nach unlöslicher Produktion von HalB in *E. coli* BL21(DE3) pLysS bei 30 °C der Produktionsstamm zu *Pseudomonas aureofaciens* ACN und *Pseudomonas fluorescens* BL915 gewechselt.^[242] Die Einkomponenten-Halogenase VemK wurde in BL21(DE3) pGro7 bei 16 °C produziert.^[228] Ebenso wurden die Halogenasen Xcc4156 und RebH im Chaperon-co-exprimierenden Stamm BL21(DE3) pGro7 bei 25 °C hergestellt^[194, 301] und *krmI* im *E. coli* BL21(DE3) pG-KJE8-Stamm bei ebenfalls 16 °C exprimiert, der ebenfalls Chaperone bereitstellt.^[210] Die Halogenase CmlS, welche FAD kovalent bindet, wurde ebenfalls bei 15 °C in *E. coli* BL21(DE3) produziert.^[302] Das in dieser Arbeit final angewandte Prozedere zur Expression von PrnC gleicht dem von PrnA und PyrH. Diese beiden Tryptophan-Halogenasen wurden bei *Shepherd et al.* ebenfalls in *E. coli* ArcticExpress(DE3) bei 15 °C mit vorangegangenem Kälteschock produziert.^[155] *Peh et al.* zeigten kürzlich, dass für die lösliche Produktion von PrnC ein elf Aminosäure-langer tag (NT11)^[303] hilfreich ist und die Ausbeute an löslichem PrnC von ca. 1 mg/L Kultur auf 9 mg/L Kultur erhöht.^[304] Diese wurden in dieser Arbeit allerdings auch ohne NT11 erreicht.

8.2.2 Synthese des natürlichen Substrats und Produkts von PrnC

Für die Synthese des Substrats von PrnC, dem Monodechloraminopyrrolnitrin (**22c**), sowie dem chlorierten Produkt Aminopyrrolnitrin (**22b**), wurde nach der Synthesestrategie von Morrison *et al.* verfahren (Abbildung 60).^[305] Bei der konvergenten Synthese wurde zunächst kommerzielles *N*-Triisopropylsilyl-1*H*-pyrrol (**26a**) mittels *N*-Iodsuccinimid (**2b**) iodiert. Das Rohprodukt 3-Iod-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26b**) wurde nach GC-MS-Analyse über einen Lithium-Halogen-Austausch zum chlorierten Derivat 3-Chlor-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26c**) umgesetzt. Im Anschluss an die Aufarbeitung und Reinigung folgte die erneute Iodierung mit NIS (**2b**) zum 3-Chlor-4-iod-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26d**).

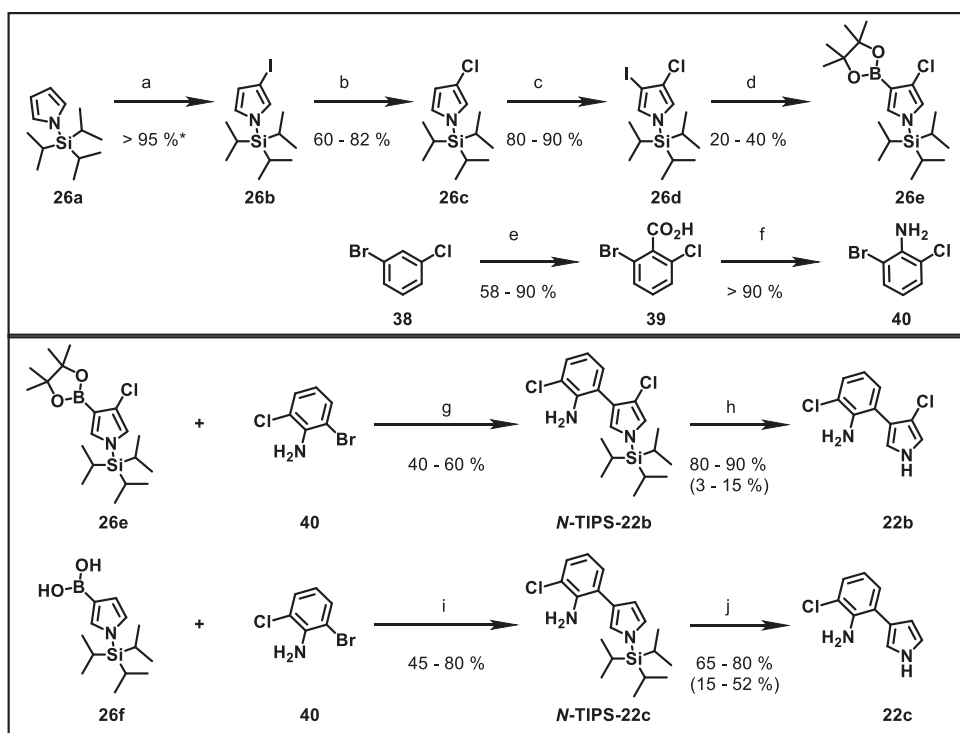


Abbildung 60: Synthese-Route von MDA (**22c**) und APRN (**22b**). Angegeben sind die Ausbeuten in Prozent. Das Produkt der ersten Iodierung wurde nicht isoliert und stellt nur die Umsetzung dar, welche mittels GC-MS bestimmt wurde (*). Die Ausbeuten in Klammern für **22b** und **22c** stellen die Gesamtausbeute über alle Syntheseschritte dar. a) Iodierung von 1.00 Äq. *N*-TIPS-1*H*-pyrrol (**26a**) mit 1.1 Äq. NIS (**2b**) in Aceton für 7 – 12 h bei RT. b) Lithium-Halogen-Austausch von 1.00 Äq. 3-Iod-*N*-TIPS-1*H*-pyrrol (**26b**) mit 2.05 Äq. BuLi und 2.00 Äq. Hexachlorethan in THF für zweimal 30 min bei – 78 °C. c) Iodierung von 1.00 Äq. 3-Chlor-*N*-TIPS-1*H*-pyrrol (**26c**) mit NIS (**2b**) in Aceton für 7 – 12 h bei RT. d) Palladium-katalysierte [PdCl₂(CH₃CN)₂, 0.03 Äq.] Borylierung von 1.00 Äq. 3-Chlor-4-Iod-*N*-TIPS-1*H*-pyrrol (**26d**) mit 1.30 Äq. HBPIn (**41**) und SPhos (0.09 Äq.) in 1,4-Dioxan für 12 h bei 95°C. e) Deprotonierung von 1.00 Äq. 1-Brom-3-chlorbenzol (**38**) mit 1.40 Äq. BuLi und 1.50 Äq. DIPA in THF für 15 min bei 0 °C mit anschließender Carboxylierung durch Trockeneis (CO_{2(g)}) für 1 h bei – 78 °C. f) Schmidt-Reaktion von 1.00 Äq. 1-Brom-6-chlorbenzoesäure (**39**) mit 1.00 Äq. Natriumazid in konzentrierter Schwefelsäure für 1.5 h bei 60 °C. g) und i) Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung von 1.20 Äq. borylierten *N*-TIPS-Pyrrolen (**26e** und **26f**) und 1.00 Äq. Anilin (**40**) mit 3.00 Äq. Kaliumphosphat und 0.05 Äq. Palladium-Katalysator in einem *n*-Butanol-Wasser-Gemisch mit für 12 h bei 35 °C. h) und j) TBAF-Entschützung (2.00 Äq.) von 1.00 Äq. *N*-TIPS-Pyrrolen (**22b** und **22c**) in THF für 1 h bei RT.

In einer Masuda-Borylierung^[306, 307] mit Pinacolboran (**41**) wurde die letzte Zwischenstufe dieses Syntheszweigs hergestellt, das 3-Chlor-4-BPin-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26e**). Der für die Kreuzkupplung benötigte Arylrest des zweiten Syntheszweigs wurde ausgehend von 1-Brom-3-chlorbenzol (**38**) über eine Carboxylierung mittels Trockeneis synthetisiert und lieferte im ersten Schritt die 2-Brom-6-chlorbenzoesäure (**39**). Eine anschließende Schmidreaktion^[308] ermöglichte die Bereitstellung von 2-Brom-6-chloranilin (**40**). Beide Syntheserouten wurden in der Suzuki-Miyaura-Reaktion^[52] zum geschützten *N*-Triisopropylsilyl-Aminopyrrolnitrin (**N-TIPS-22b**) zusammengeführt. Für die Synthese von MDA (**22c**) konnte für die Kreuzkupplung auf die kommerzielle Boronsäure **26f** zurückgegriffen werden. Für die Anwendung in der Biokatalyse wurde mit einer Fluorid-Quelle im letzten Schritt die TIPS-Schutzgruppe entfernt.

Während die erste Iodierung mit mehr als 95 % Umsatz quantitativ erfolgte, stellte der Lithium-Halogen-Austausch eine größere Herausforderung dar. Die Reinigung vom Nebenprodukt des Hexachlorethans führte zu Produktverlust. Dies äußert sich in der Ausbeute von 60 – 82 %. Die erneute Iodierung zeigte mit Umsatzraten von 80 – 90 % wieder einen sehr guten, durch GC-MS-Analyse verfolgten, Umsatz. Die moderate Ausbeute von 20 – 40 % der Borylierung markiert das *bottle neck* dieser Synthese. Die Kreuzkupplungen für MDA (**22c**) und APRN (**22b**) führten mit 45 – 80 % bzw. 40 – 60 % Ausbeute zu ausreichend Produkt für Analytik und biokatalytische Verwendung, da die Entschützungen mit 65 – 90 % keine Limitierung darstellten. Für beide Komponenten **22b** und **22c**, sowie für das kommerziell erworbene Pyrrolnitrin (**22a**) wurden GC-MS-Chromatogramme aufgenommen (Abbildung 61), um eine erste Analytik für Umsetzungen zu etablieren. Die dazugehörigen Massenspektren befinden sich im Anhang (Abbildung 116).

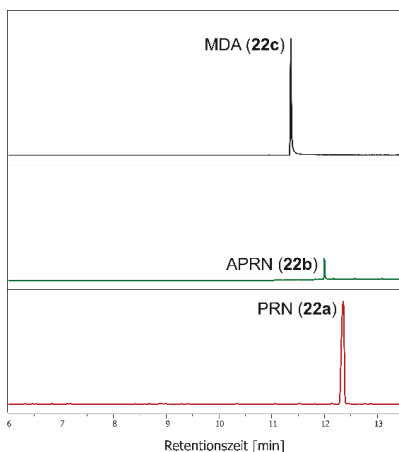


Abbildung 61: Extrahierte GC-MS-Chromatogramme von MDA (**22c**), APRN (**22b**) und PRN (**22a**). Hierbei zeigt MDA (schwarz) eine Retentionszeit von 11.36 min und die spezifischen Massen m/z : 192.098, 194.086 im Verhältnis 3:1. Für APRN (grün) ist eine Retentionszeit von 12.00 min detektiert wurde und das Isotopenmuster m/z : 226.014, 227.986, 230.009 im Verhältnis 9:6:1. PRN ist das unterste Chromatogramm (rot) mit der Retentionszeit 12.34 min und den Massen m/z : 255.945, 257.978, 259.037 im Verhältnis 9:6:1.

Zusätzlich zur Analyse mit GC-MS, erfolgte auch die Vermessung und präparative Isolation von APRN (**22b**) mittels RP-HPLC (Abbildung 62). In der Säulenchromatographie (*flash chromatography*) befanden sich in einigen Fällen der Synthese von APRN noch Verunreinigungen die so entfernt werden sollten. Durch Sammlung der Fraktionen von Minute 70 – 80 konnten die Verunreinigungen entfernt werden und es blieb nur das Signal von APRN (**22b**) sichtbar, wie im GC-MS-Chromatogramm der Abbildung 131 gezeigt. Auch das MDA wurde über die analytische HPLC vermessen (Abbildung 63).

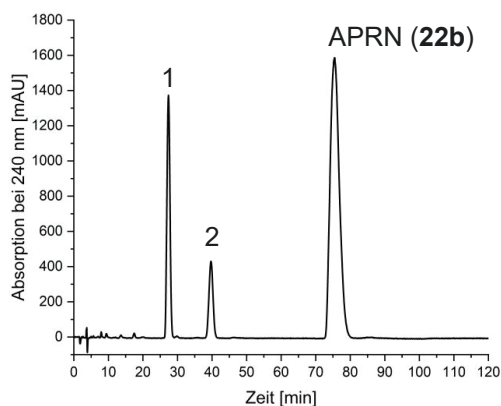


Abbildung 62: Chromatogramm der präparativen HPLC-Reinigung von APRN (**22b**). Trennung des chemisch synthetisierten und entschützten APRN von den in der Synthese entstandenen Verunreinigungen (Peak 1 und 2). Gezeigt ist das Chromatogramm der Detektionswellenlänge 224 nm. APRN (**22b**) zeigte eine Elution bei 72 – 80 min (75.4 min). Als Laufmittel wurde 35 % Acetonitril mit 0.1 % Formiat verwendet.

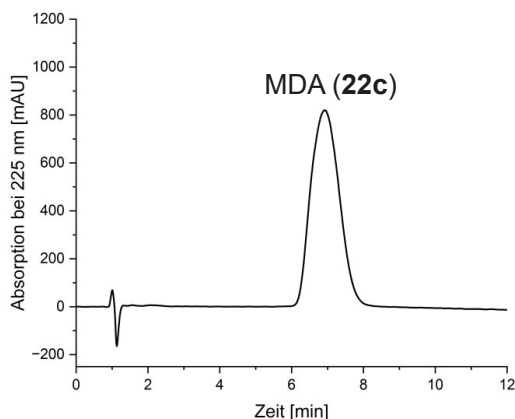


Abbildung 63: Chromatogramm der analytischen HPLC von MDA (**22c**). Analyse des chemisch synthetisierten MDA nach der Entschätzung. Gezeigt ist das Chromatogramm der Detektionswellenlänge 225 nm. MDA (**22c**) zeigte eine Elution bei 6.0 – 8.0 min (6.89 min). Als Laufmittel wurde 35 % Acetonitril mit 0.1 % Formiat verwendet.

Für die Untersuchung der Aktivität wurden zunächst das natürliche Substrat und Produkt synthetisiert (Kapitel 8.2.2). Für die Synthese des Biokatalyse-Produktes APRN (**22b**) war die Borylierung eine besondere Herausforderung. *Morrison et al.* wiesen bereits in ihrer Synthese darauf hin, dass die Reinigung über deaktiviertes Silica schnell erfolgen muss, da andernfalls die eine Protodeborylierung eintritt.^[305] Genau dies scheint in den Synthesen dieser Arbeit der Fall gewesen zu sein, was die geringen Ausbeuten von 20 – 40 % erklärt (Abbildung 60 und Kapitel 11.1.1). Zu Grunde liegt hier die Instabilität von verschiedenen aromatischen Boronsäuren bei verschiedenen pH-Werten.^[309, 310] Auch die Strategie der Miyaura-Borylierung^[311-313] wurde durchgeführt, führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Ausbeuten. Da der Zweck dieses Syntheseteils nur die Bereitstellung von natürlichem Substrat und Produkt für die Untersuchung der Halogenase PrnC ist, stützte sich die Analyse der Syntheseprodukte (Kapitel 11.1.1 und Kapitel 11.1.2) auf die NMR-Daten und -Spektren (Kapitel 14.2.2) in der Literatur.^[279, 305]

8.2.3 Design of Experiment (DoE) zur Umsetzung mit PrnC

Mit der etablierten Analytik für MDA und APRN in der GC-MS konnte die biochemische Charakterisierung von PrnC-His₉ bezogen auf kinetische Aspekte begonnen werden. Nach initialen Umsetzungen von MDA mit PrnC-His₉ bei den pH-Werten 6, 7 und 8, zeigte sich die höchste Umsatzrate bei pH = 7 mit der Tendenz zu pH = 8 (Abbildung 64).

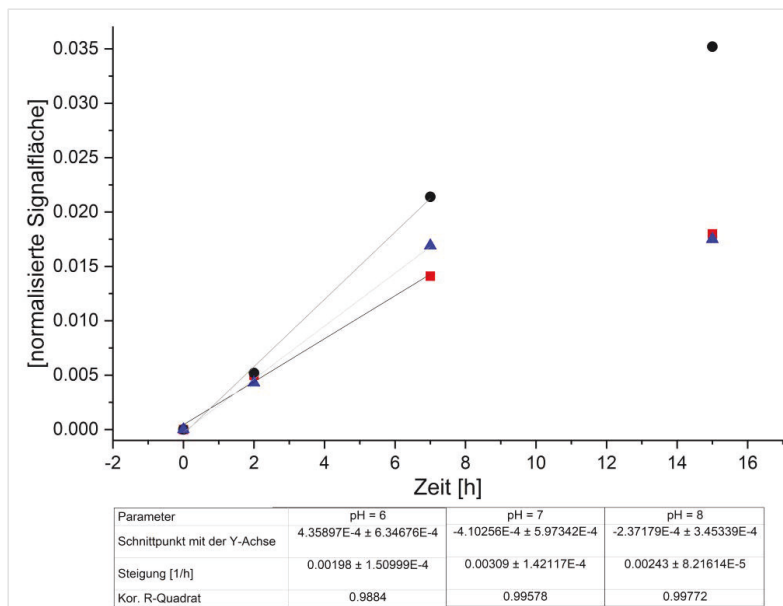


Abbildung 64: Umsetzung von MDA (**22c**) zu APRN (**22b**) mit PrnC-His₉ bei den pH-Werten pH = 6 (rote Quadrate), 7 (schwarze Kreise) und 8 (blaue Dreiecke). Gezeigt sind die Signalfächen des Produktes APRN (**22b**) normalisiert auf die Signalfäche des internen Standards (IS) von *m*-Chlortoluol. Die Umsatzrate anhand der Flächenquotienten wurde für die Reaktionszeit von 7 h bestimmt und beträgt für pH = 6 $m = 1.98 \cdot 10^{-3} \pm 1.51 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, für pH = 7 $m = 3.09 \cdot 10^{-3} \pm 1.42 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ und pH = 8 $m = 2.43 \cdot 10^{-3} \pm 8.22 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-1}$.

In dem Versuch war auch zu sehen, dass PrnC-His₉ bei pH = 7 eine höhere Stabilität zu zeigen scheint. Während bei pH = 6 und 8 nach 15 h keine deutlichen Produktzunahmen mehr sichtbar waren, zeigte pH = 7 eine nach wie vor ansteigende Produktzunahme. Da die Umsatzraten aber relativ gering waren und der Einfluss der Cofaktoren, Reduktase, Temperatur und Salzkonzentration ebenfalls untersucht werden sollten, wurde ein DoE-Experiment durchgeführt. In diesem als *factorial design* bezeichneten Versuchsaufbau, werden für jeden Parameter zwei Grenzwerte definiert. Bei Konzentrationen bspw. kleine und große Konzentration. Dieses *factorial design* wurde in Duplikaten durchgeführt (genaue Messwerte sind im Anhang Kapitel 14.4 dargestellt) und sollte in Abhängigkeit

der verschiedenen Parameter eine Präferenz verdeutlichen (Abbildung 65). Bei der Planung und Auswertung erfolgte die Unterstützung durch Dr. Thomas Classen.

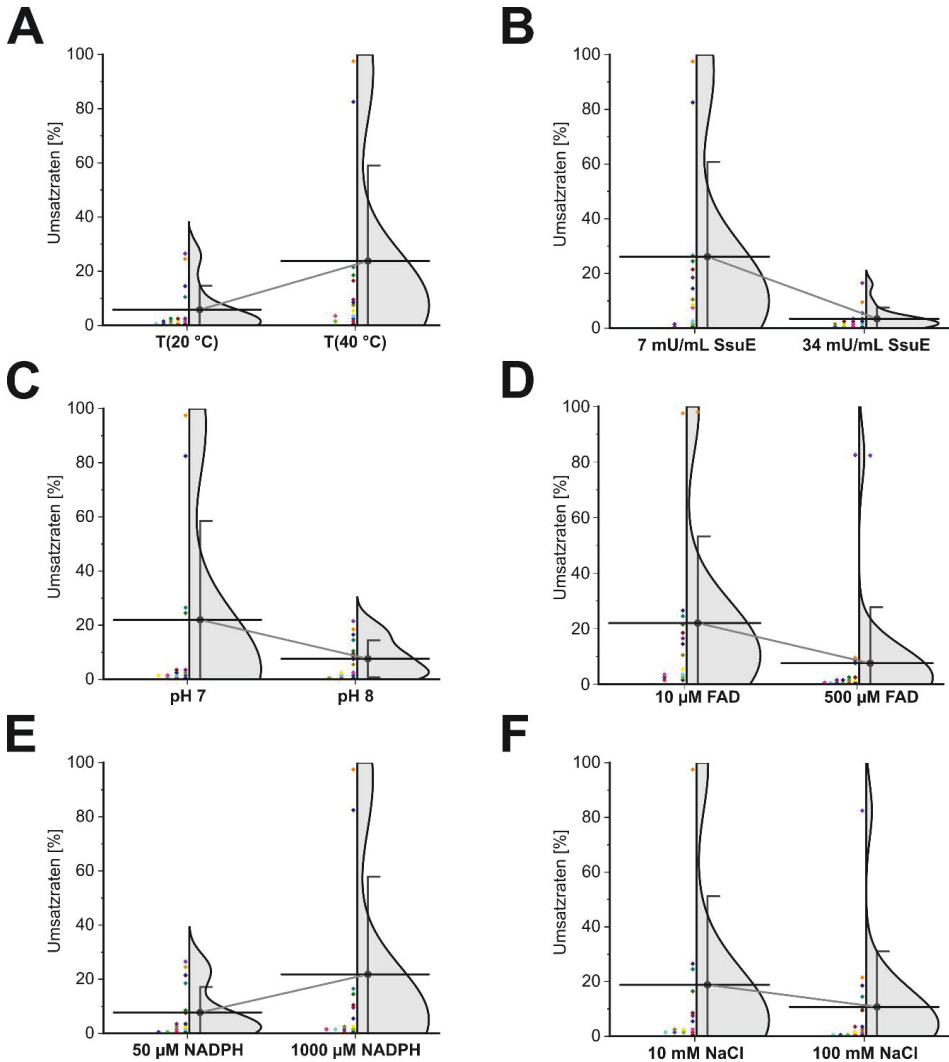


Abbildung 65: Darstellung der Statistik zum *factorial design* von PrnC-His₉. Gezeigt sind Daten zur Umsetzung von MDA (22c) zu APRN (22b) für eine Optimierung der Umsatzraten. Die Graphen stellen hierbei nur die Veränderung eines Parameters dar. Die detaillierten Ergebnisse befinden sich im Anhang (Kapitel 14.4). Die farbigen Rauten (♦) zeigen die einzelnen Messdaten der Umsetzungen, welche zu einem Mittelwert als zentraler Kreis (●) zusammengefasst wurden. Die daraus resultierende Standardabweichung ist mit entsprechenden Linien dargestellt. Zusätzlich wurde eine Kerndichteschätzung durchgeführt, die eine Wahrscheinlichkeitsverteilung darstellt (graue Fläche). Für die Veranschaulichung der begünstigten Tendenz, wurden die beiden Mittelwerte zur Untersuchung des jeweiligen Parameters verbunden. Die untersuchten Parameter sind die Temperatur (A) mit 20 °C und 40 °C, die Reduktase-Aktivität von SsuE-Lysat (B) mit 7 mU/mL und 35 mU/mL, die pH-Werte (C) von 7 und 8, die FAD-Konzentrationen (D) 10 µM und 500 µM, die NADPH-Konzentrationen (E) mit 50 µM und 1000 µM, sowie die Chlorid-Konzentration (F) mit 10 mM und 100 mM.

Der Arrhenius-Gleichung^[314] folgend zeigte sich so eine schnellere Umsetzung bei 40 °C im Vergleich zu 20 °C. Außerdem zeigte eine geringere Aktivität der Reduktase höhere Signalfächen, sowie erneut der pH-Wert von 7. Während der Cofaktor FAD mit geringerer Konzentration von 10 µM und NADPH mit höherer Konzentration von 1 mM mehr Produkt generierten, zeigte die geringere Konzentration des Cosubstrats NaCl mit 10 mM die besseren Ergebnisse. Einen wirklichen Aktivitätsschub bekam die Reaktion aber erst nach dem Wechsel der Reduktase. Nach der löslichen Expression von PrnF-His₆ konnte MDA (**22c**) zur vollen Umsetzung zu APRN (**22b**) gebracht werden.

Mit dem natürlichen Substrat und Produkt konnten die Bedingungen der Reaktion untersucht werden (Kapitel 8.2.3). *Altman et al.* deuteten in einem Beitrag in „*Verhandeligen Natuurkunde*“ für PrnC eine Bromierungs- und Chlorierungs-Aktivität an.^[239] Außerdem nannten sie ein pH-Optimum von pH 7 und eine optimale Konzentration an Chlorid von 20 – 50 mM. Eine höhere Konzentration von Chlorid über 75 mM soll eine Inhibierung der Halogenierungsreaktion zur Folge haben.^[239] Da es sich bei dieser Veröffentlichung um keine klassische Publikation mit Experimentalteil handelt, gibt es zu diesen Aussagen keine experimentellen Daten. Auch auf Nachfrage bei dem Co-Autor *van Pée* wurden keine konkreteren Informationen erhalten. Da nach unserem Wissen also keine belastbaren experimentellen Daten diese Hypothesen unterstützten, wurde nach optimalen Reaktionsbedingungen gesucht. Im DoE-Ansatz konnte gezeigt werden, dass die höchste Halogenierungsrate in der Tat bei pH = 7 vorlag (Abbildung 65). Auch im Vortest (Abbildung 64) wurde dies bestätigt und zeigte eine längere Reaktionsdauer. Dazu konnte ebenso die Bevorzugung einer geringeren Chlorid-Konzentration bestätigt werden, da die Produktzunahme bei 10 mM NaCl stärker war, als bei 100 mM (Abbildung 65). Die höhere Halogenierungsrate bei 1000 µM NADPH konnte zwar einfach an der Gleichgewichtsverschiebung liegen, allerdings deutete die Verdoppelung der relativen Umsatzraten (Abbildung 65 E) bei Verzwanzigfachung der Konzentration den Sättigungsbereich der SsuE an, da kein linearer Zuwachs der Umsatzraten erkennbar war. Mit einem K_M von 46 µM^[156] für NADPH lag die niedrige, eingesetzte Konzentration von 50 µM im DoE daher nah an der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit der SsuE. Bei Untersuchungen zur Reaktion der Alkansulfonat-Monooxygenase SsuD mit der SsuE zeigte sich auch die höchste Aktivität mit 500 µM NADPH und keine Inhibierung bei höheren Konzentrationen.^[156] Auch die Bevorzugung der geringeren Konzentration von FAD von 10 µM anstelle von 500 µM kann mit der Reduktase begründet werden, da die SsuE schon bei 100 µM eine Substratüberschussinhibierung zeigte^[156]. Hinzu kam die Feststellung, dass ein angleichendes Verhältnis zwischen hohem Elektronendonator (NADPH) und Elektronenakzeptor (FAD) zu keiner produktiven Halogenierung führte, sondern eine Entkopplungsreaktion zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu begünstigen scheint und damit sowohl Reduktionsäquivalente unproduktiv verbraucht werden, als auch zu Instabilität von Substrat und Enzymen führen.^[181] Die gestiegene Halogenierung bei 40 °C (Abbildung 65 A) ist nicht auf die Reduktase zurückzuführen, da die SsuE bei 45 °C eine Verringerung der Wechselzahl um den Faktor 4 im Vergleich zu 30 °C zeigt.^[168] Entsprechend wären eine höhere Diffusionsrate

von FADH₂ zum PrnC und eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Einklang mit der Arrhenius-Gleichung^[314] mögliche Begründungen. Für die höhere Halogenierungsrate bei geringerer Reduktase-Aktivität wurde keine passende Erklärung gefunden. Bei einer eingesetzten Konzentration von 0.3 mg/mL (4.5 µM; 0.9 mol-%) PrnC waren die volumetrischen Aktivitäten der SsuE-Lysate mit 7 mU/mL und 34 mU/mL (Abbildung 65 B) vergleichsweise gering. Für 1.2 mol-% (12 µM) RebH wurden bspw. 2.5 U/mL PrnF eingesetzt^[181], genauso wie für 8.9 mol-% (5 mg/mL) Xcc-Halogenase.^[195] Der Vergleich mit Fre war nicht möglich, da in Halogenierungsreaktionen reines Enzym (1 µM – 5 µM) ohne Angabe der Aktivität genutzt wurde^[155, 168, 223] und die Konzentration von SsuE in Lysaten dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnten. Genau wegen dieser Ungenauigkeit, der fehlenden Möglichkeit zur Reinigung der Reduktase und der noch immer bestehenden Notwendigkeit zur Reaktionsoptimierung, erschien der Wechsel der Reduktase für weitere Untersuchungen sinnvoll.

8.2.4 Kinetische Untersuchungen zu PrnC

Im Zuge dieser nun optimierten Reaktionsbedingungen sollten im Folgenden die kinetischen Parameter für die Chlorierung von MDA (**22c**) zum APRN (**22b**) bestimmt werden. Dafür wurde zunächst für die GC-MS-basierte Analyse eine Kalibrierung von APRN (**22b**) erstellt. Hierzu wurden die DMSO-Stammlösungen von **22b** mit Konzentrationen von 20 μM – 160 μM in Reaktionspuffer ohne PrnC um den Faktor 20 zu 1 mL verdünnt. Anschließend erfolgte die Extraktion mit 1 mL Essigsäureethylester, welches *m*-Chlortoluol als internen Standard mit einer Konzentration von 100 μM beinhaltete. Die Analyse der getrockneten Extraktionen sind in der Abbildung 66 dargestellt. Die einzelnen Chromatogramme befinden sich im Anhang (Kapitel 14.2.1).

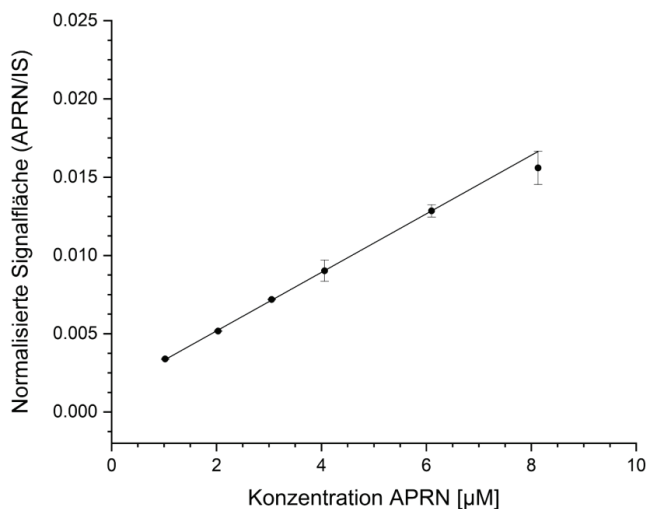


Abbildung 66: Kalibrierung von APRN (**22b**) mit Konzentrationen von 1 μM – 8 μM als Duplikat. Die Konzentration wurde aufgetragen gegen den Quotienten der Signalfäche von **22b** zur Signalfäche des IS *m*-Chlortoluol. Der lineare Fit ergab die Gleichung für die Regressionsgerade von $y = 0.0019x + 0.0014$ mit einem korrigierten Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.998$.

Darauf aufbauend wurde die Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik durchgeführt. Aus den Analysen der Reaktionsoptimierung ergaben sich die finalen Parameter der Reaktion zu 25 mM KPi (pH = 7.2), 30 mM NaCl, 20 mM Glukose für das CRS, 1 % Glycerin (aus dem Lagerungspuffer), 30 μM FAD, 2 U/mL PrnF, 2 U/mL GDH und 0.3 mg/mL PrnC-His₉ (~4.5 μM). Als Substratkonzentrationen wurden für MDA (**22c**) 20 μM – 2 mM verwendet. Die Temperatur betrug 30 °C. Die Tabelle 29 im Anhang gibt die Flächenquotienten für die Doppelbestimmung wieder. Mit den Berechnungen der Reaktionsgeschwindigkeiten [min^{-1}] aus den Umsatzraten [$\text{mL}/\text{mg min}^{-1}$], die im

Folgenden gezeigt sind, wurden die Wechselzahl k_{cat} und die Michaelis-Konstante K_M bestimmt (Abbildung 67).

Gleichung der Kalibrierung: $y = mx + n$

$$x = \frac{y - n}{m} = \frac{(\text{Normalisierte Fläche (APRN)} - y\text{-Achsenabschnitt})}{\frac{\Delta \text{ Normalisierte Fläche}}{\Delta c(\text{APRN})}} = c(\text{APRN})$$

$$\frac{\Delta c(\text{APRN})}{\Delta t * c(\text{Enzym})} = \text{spezifische Aktivität} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * L * \frac{\text{mg}}{\text{mL}} (\text{Enzym})} \right] = \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * g} \right] = \left[\frac{\text{mU}}{\text{mg}} \right]$$

$$k_{cat} = \text{spezifische Aktivität} * MW(\text{Enzym}) = \left[\frac{\mu\text{mol} * g}{\text{min} * g * \text{mol}} \right] = \left[\frac{10^{-6}}{\text{min}} \right]$$

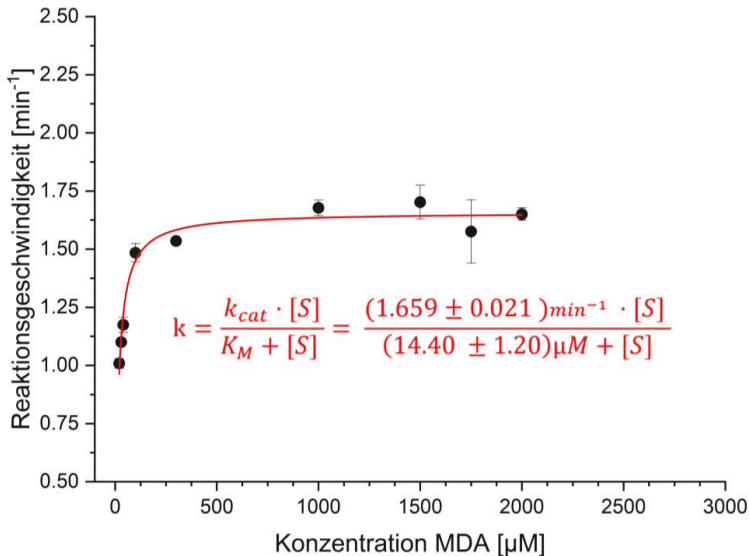


Abbildung 67: Michaelis-Menten-Kinetik für PrnC-His. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 mL EE mit internem Standard (100 µM) gestoppt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden durch die Produktzunahme pro Zeit bestimmt. Hierzu wurden die normalisierten Produktflächen genutzt. Die Vermessung erfolgte an der GC-MS. Der Michaelis-Menten-Fit (rot) ergab ein korrigiertes Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0.941$. Zusätzlich ist die Berechnung des Fits angegeben. Die Reaktionslösung setzte sich aus 25 mM KP_i (pH = 7.2), 30 mM NaCl, 20 mM Glucose, 1 % Glycerol (aus Lagerungspuffer), 30 µM FAD, 2 U/mL PrnF, 2 U/mL GDH und 0.3 mg/mL PrnC (~4.5 µM) zusammen. Diese wurde zu den DMSO-Lösungen von MDA hinzugefügt. Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet.

Es ergeben sich aus diesem Graphen die Michaelis-Konstante K_M mit $14.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ sowie über den Schritt der spezifischen Aktivität ($25.04 \pm 0.32 \text{ mU/mg}$) als v_{max} die Wechselzahl k_{cat} mit $1.66 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$. Mit den bekannten Bedingungen für eine Halogenierung sollte dann im nächsten Schritt die Promiskuität von PrnC bestimmt werden.

Die kinetischen Untersuchungen von PrnC (Kapitel 8.2.4) mit der gereinigten Reduktase PrnF ergaben bei 30 °C die Michaelis-Menten-Konstante K_M mit $14.4 \pm 1.2 \mu\text{M}$ sowie die Wechselzahl k_{cat} mit $1.66 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.12 \pm 0.01 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Abbildung 67). *Peh et al.* zeigten kürzlich für PrnC bei nahezu gleichem K_M von $15.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$ eine um Faktor 4 geringere katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_M = 0.029 \pm 0.002 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$), die folglich durch eine geringere Wechselzahl von $k_{\text{cat}} = 0.456 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ zu begründen war.^[304] Bei dieser Temperatur zeigten die Tryptophan-Halogenasen wie PrnA einen K_M von $20.7 \mu\text{M}$, RebH einen K_M von $28.7 \mu\text{M}$, PyrH einen $K_M = 15.2 \mu\text{M}$ und SstH einen $K_M = 25.3 \mu\text{M}$.^[168] Daher ist PrnC mit ähnlichen Substrataffinitäten einzuordnen. Bei den k_{cat} -Werten lag PrnC zwischen den Tryptophan-Halogenasen mit $k_{\text{cat}}(\text{RebH}) = 0.6 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}(\text{PyrH}) = 2.4 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$. Am nächsten kam die Wechselzahl von PrnC dem k_{cat} von SttH mit $1.7 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$ und lag damit leicht über der Wechselzahl von PrnA mit dem k_{cat} von $1.1 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$.^[168] Im Vergleich zur Phenol-Halogenase Rdc2, dem Homolog von RadH, war PrnC wesentlich effizienter. So ist Rdc2 bezüglich der kinetischen Parameter mit einem K_M von $281 \pm 20 \mu\text{M}$ und einem k_{cat} von $0.824 \pm 0.040 \text{ min}^{-1}$ bei 28 °C deutlich abweichend.^[315] Die daraus berechneten katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_M) sind in der folgenden Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Katalytische Effizienzen ausgewählter FI-Hals aus der Gruppe der Tryptophan-Halogenasen und Phenol-Halogenasen im Vergleich zu PrnC.^[168, 315] Rdc2 wurde abweichend bei 28 °C untersucht und für RadH wurde nicht das natürliche Substrat verwendet.^[223]

Enzym	$k_{\text{cat}}/K_M [\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}]$	Enzym	$k_{\text{cat}}/K_M [\text{min}^{-1} \text{ mM}^{-1}]$
Rdc2*	2.93 ^[315]	SttH	67.19 ^[168]
RadH*	11.55 ^[223]	PrnC	115.28
RebH	20.91 ^[168]	PyrH	157.89 ^[168]
PrnA	53.14 ^[168]		

RadH konnte mit Hydroxyisochinolin (**25e**) den k_{cat} bei nahezu gleichem K_M von $277 \pm 3 \mu\text{M}$ auf $3.2 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ erhöhen^[223] und erreichte mit dem nicht-natürlichen Substrat so also einen höheren k_{cat} -Wert als PrnC für das natürliche Substrat MDA. Dies ließe die Hypothese zu, dass die Umsatzraten für PrnC bei nicht-natürlichen Substraten noch gesteigert werden könnten. PrnC erreichte also vergleichsweise bei niedrigen Substratkonzentrationen die Maximalgeschwindigkeit und diese war ebenfalls vergleichsweise hoch. Dies könnte PrnC, bezogen auf die kinetischen Eigenschaften, zu einem vielversprechenden Biokatalysator machen.

8.2.5 Promiskuität der Halogenase PrnC

Die Untersuchung der Substratspezifität von PrnC sollte über eine rationale Auswahl von Surrogaten erfolgen. Hierbei waren drei Fragen Kern der Untersuchung. Welche Substituenten am Aryl-Rest sind wichtig? Ist der Arylrest essentiell? Muss es ein Pyrrol sein oder kann es auch ein anderes Heteroatom im Fünfring sein? Für die Frage der Substituenten war das biosynthetische Netz die Grundlage. Durch die Promiskuität der anderen Enzyme dieses Clusters (nähere Informationen im Kapitel 7.5), ergeben sich daher die folgenden, hypothetischen Biosynthese-Intermediate (Abbildung 68).

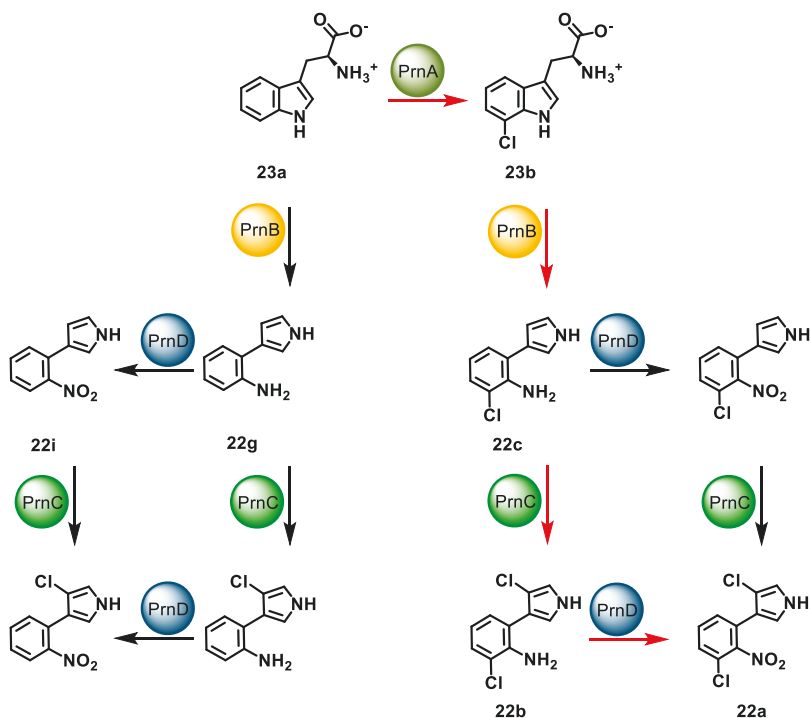


Abbildung 68: Schematisches, hypothetisches Biosynthese-Netz von PRN (**22a**) auf Grundlage der Promiskuität von PrnB und PrnD. Angenommene Promiskuität von PrnC. In roten Pfeilen ist die Standardreihenfolge der Biosynthese hervorgehoben.

Aus diesen Fragen ergaben sich die Screening-Substrate aus Abbildung 69, die teilweise durch die van-Leusen-Reaktion^[316] dargestellt wurden. Während das 3-(*ortho*-Nitrophenyl)-1*H*-pyrrol (3-*o*NPP) (**22i**) und das Monodechloraminofurylnitrin (MDAF) (**44**) ähnlich dem natürlichen Substrat MDA (**22c**) über eine Suzuki-Kreuzkupplungsreaktion hergestellt wurden, erwies sich für die restlichen Arylpyrrole **22** die van-Leusen-Reaktion als nützlich.

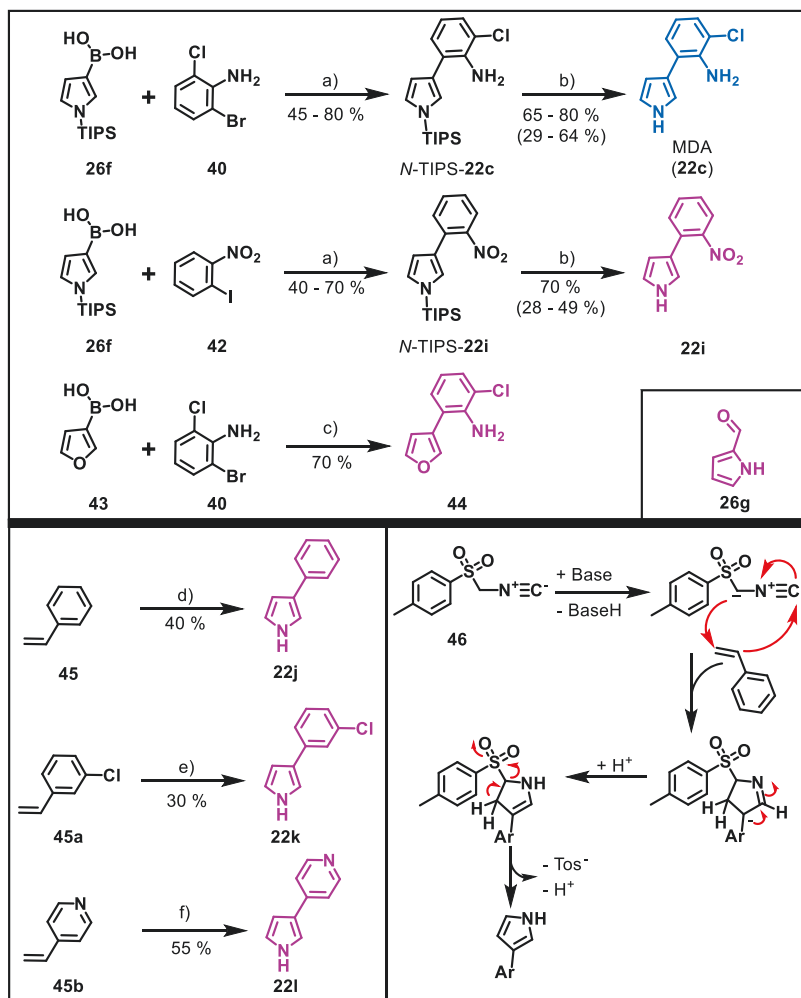


Abbildung 69: Surrogat-Substrate (lila) und damit Derivate von in blau dargestelltem MDA (**22c**) für die Testung der Promiskuität von PrnC, sowie der vereinfachte Mechanismus der van-Leusen-Reaktion für Arylpyrrole. a) 1.00 Äq. 2-Brom-6-chloranilin (**40**) oder 1-Iod-2-nitrobenzol (**42**), 1.20 Äq. Pyrrolboronsäure **26f**, 0.05 Äq. Pd(dppf)₂Cl₂, 3.00 Äq. K₃PO₄ in *n*-Butanol/Wasser (2:1), 12 h bei 35 °C. b) 1.00 Äq. *N*-TIPS-**22c**, 2.00 Äq. TBAF (1 M in THF) in THF 1 h bei RT. c) 1.00 Äq. 3-Furylboronsäure (**43**), 0.85 Äq. 2-Brom-6-chloranilin (**40**), 0.10 Äq. SPhos Pd G4, 0.20 Äq. SPhos, 3.00 Äq. K₂CO₃ in 96 % Ethanol 16 h bei 85 °C. d) 1.00 Äq. Styrol (**45**), 1.30 Äq. TosMIC (**46**), 2.00 Äq. NaOtBu in DMSO 18 h bei 50 °C. e) 1.00 Äq. 3-Chlorstyrol (**45a**), 1.30 Äq. TosMIC (**46**), 2.00 Äq. NaOtBu in DMSO 18 h bei 50 °C. f) 1.00 Äq. 4-Vinylpyridin (**45b**), 1.30 Äq. TosMIC (**46**), 2.00 Äq. NaOtBu in DMSO 2 h bei RT. Der Pyrrol-2-Carbaldehyd (**26g**) war kommerziell erhältlich.

Mithilfe von Styrol (**45**), 3-Chlorstyrol (**45a**) und 4-Vinylpyridin (**45b**), konnten so die restlichen Surrogate, also 3-Phenyl-1*H*-pyrrol (3-PP) (**22j**), 3-(*meta*-Chlorphenyl)-1*H*-pyrrol (3-*m*CPP) (**22k**) und 3-*para*-Pyridyl-1*H*-pyrrol (3-*p*PyP) (**22l**) synthetisiert werden. Der Pyrrol-2-Carbaldehyd (2-CaP) (**26g**) wurde kommerziell erworben. Für diese Umsetzungen sind die einzelnen Chromatogramme und Massen im Anhang (Kapitel 14.2.1) gezeigt. Die Retentionszeiten, sowie die Umsatzraten sind in der folgenden Tabelle 6 aufgeführt und die Umsetzungen zur biokatalytischen Halogenierung mit PrnC in der Abbildung 70 gezeigt. In einem letzten Experiment sollte die biokatalytische Chlorierung mit Varianten der chemischen Halogenierung verglichen werden.

Tabelle 6: Retentionszeiten und Umsatzraten des natürlichen Substrats von PrnC MDA (**22c**) und Surrogat-Substraten.

Substrat mit Retentionszeit [min]	MDA (22c) 11.36	3- <i>o</i> NPP (22i) 11.17	3- <i>m</i> CPP (22k) 10.81	3-PP (22j) 9.95	3- <i>p</i> PyP (22l) 10.55	MDAF (44) 10.19	2-CaP (26g) 4.93
Umsatz zum einfach chlorierten Produkt mit Retentionszeit [min]	quantitativ 12.00	quantitativ 11.81	quantitativ 11.53	-	30 % 11.33	-	-
Umsatz zum zweifach chlorierten Produkt mit Retentionszeit [min]	-	-	-	quantitativ 11.19	-	-	-

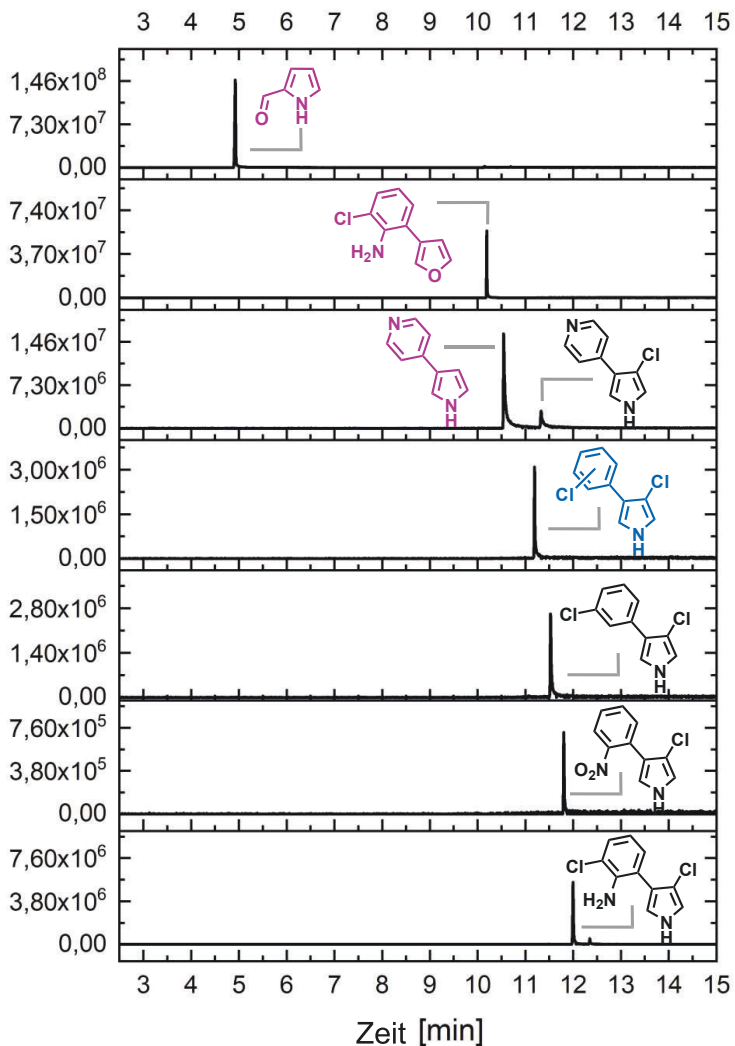


Abbildung 70: Umsetzung von MDA (**22c**) und Derivaten mit PrnC-His₉. Die Reaktionsbedingungen sind 60 min bei 35 °C und 700 rpm in 0.5 ml Gesamtvolumen. Gezeigt sind die *extracted ion chromatograms* (EIC) der GC-MS-Analyse nach der Extraktion mit 250 µl EE, welches den internen Standard (IS) gelöst hat. Von oben nach unten sind die Umsetzungen von 2-CaP (**26g**), MDAF (**44**), 3-pPyP (**22i**), 3-PP (**22j**), 3-mCPP (**22k**), 3-oNPP (**22i**) und MDA (**22c**) gezeigt. In lila dargestellt sind die Strukturen der Substrate, die nicht oder nicht vollständig umgesetzt wurden. In blau dargestellt ist das doppel chlorierte Produkt von 3-PP (**22j**).

Für die Betrachtung der Promiskuität (Kapitel 8.2.5) waren zunächst die Erkenntnisse von *Hamill et al.* die Grundlage, die zeigen konnten, dass diverse Substitutionen an den Positionen 4, 5 und 6 am Indolgerüst des Tryptophans zu (Amino)-Pyrrolnitrin-Derivaten in der Dünnschichtchromatographie führten.^[253, 258] Allerdings wurde die Flexibilität der 6-Position durch *Seibold et al.* wieder eingeschränkt, da 6-Chlortryptophan in ihren Arbeiten nicht zum korrespondierenden Aminopyrrolnitrin- und Pyrrolnitrin-Derivat führte, sondern an der Stelle des MDA-Derivates stoppte.^[202] Mit der Kristallstruktur von PrnB^[261] und den Homologie-Betrachtungen des Enzyms MarC (Abbildung 38) aus der Biosynthese von Marinochinolin^[277] wurde deutlich, dass PrnB auch Tryptophan ohne Chlorierung an 7-Position umsetzen kann. Bestimmt wird die Reaktion dann neben der Orientierung durch die Stabilisierung der Indol-Doppelbindung. Letztlich zeigten auch die Untersuchungen von *Tiwari et al.*, dass PrnD Aniline unabhängig vom Pyrrol-Gerüst zur Nitro-Gruppe oxidieren kann.^[317] Entsprechend dieser Erwartung (Abbildung 68 und Abbildung 69) wurden alle Aryl-Pyrrole durch PrnC chloriert (Abbildung 70). Die Doppelchlorierung von 3-PP (**22j**) lässt vermuten, dass eine andere Orientierung im aktiven Zentrum die Ursache ist. Durch fehlenden Substituenten am Aryl-Ring könnte der Pyrrol-Ring in zwei Orientierungen (bezogen auf den Aryl-Ring) binden, wie es für L-Tryptophan und PrnB beobachtet wurde.^[261] Auch dort fehlte mutmaßlich die dirigierende Wirkung des vergleichsweise großen Chlor-Substituenten. Nach unserer Auffassung lässt auch das Homologie-Modell für PrnC^[304] von *Peh et al.* mit dem dem Abstand des katalytischen Lysin K97 zum „gedockten“ Substrat (**22c**) diese Hypothese zu. Das 2-CaP (**26g**) war mutmaßlich durch das Fehlen des Arylrings nicht im aktiven Zentrum stabilisiert und diffundierte zu schnell wieder aus dem Enzym, noch war es elektronisch aktiviert. Dies dürfte auch die Begründung für die geringe Umsatzrate mit 3-PyP (**22i**) sein, denn der Stickstoff zieht mit seiner hohen Elektronegativität Elektronendichte aus dem π -System zu sich und führt zur Desaktivierung für elektrophile aromatische Substitutionen. Genau dies ist jedoch die Reaktion mit der formellen hypochlorigen Säure. Hinzu kommt eine mögliche Orientierung des 3-PyP im aktiven Zentrum, in der der Pyridin-Rest zum Hypochlorid zeigt. Dies hätte zwar eine mögliche *N*-Chlorierung zur Folge, würde aber nur zu einer weiteren Chlorierungsspezies führen, welche das Chlor an ein besseres Nukleophil verliert.^[318] Auch für das Furan-Derivat MDAF (**44**) gilt die geringere Reaktivität. *Ghomri* und *Mekelleche* zeigten, dass einerseits die Reaktivität für elektrophile aromatische Substitutionen bei Pyrrolen deutlich höher ist als bei Furanen und Thiophenen. Andererseits verdeutlichten sie, dass eine Halogenierung an β -Position trotz Bevorzugung der α -Position für Pyrrole möglich ist, Furane aber nur in α -Position bromiert werden können.^[319] Eine Umsetzung von MDAF ist nach unserer Analyse daher eher unwahrscheinlich und reduziert den Einsatz von PrnC weiterhin auf Arylpyrrole. Dies unterstützen auch die Ergebnisse von *Peh et al.*, die ebenfalls keine Umsetzung für Furane und Thiophene erreichen konnten.^[304] Was ihnen allerdings gelungen ist, war die Halogenierung eines Pyrrols mit Acryl-Seitenkette in 3-Position, wenngleich die Umsatzrate gering war. Ob sich dieses Verhalten auch auf Alkyl-Gruppen, wie bei dem Monopyrrol MAP, übertragen lässt, kann aus diesen Ergebnissen nicht geschlussfolgert werden.

8.2.6 Chemische Halogenierung von geschütztem und freiem MDA

Für die chemische Halogenierung von MDA (**22c**) und *N*-TIPS-MDA (Abbildung 71) wurden drei Ansätze verfolgt. Im ersten Versuch wurden die Halogenierungen in einem biomimetischen Ansatz durchgeführt. Hierbei sollten die Reaktionsbedingungen der Biokatalyse so ähnlich wie möglich sein. Analog zu den Volumina in der Biokatalyse wurde das in DMSO gelöste Startmaterial in Wasser gelöst und die wässrigen oder in Wasser gelösten Halogenierungsreagenzien hinzugefügt. Im zweiten Versuch wurden erhöhte Temperaturen (45 °C) genutzt und Chloroform als Lösemittel verwendet. Im dritten Versuch wurden tiefe Temperaturen (RT und 0 °C) gewählt. Für die Chlorierung des geschützten MDA (*N*-TIPS-**22c**) wurde eine Entschützung angeschlossen. Die Analyse erfolgte dann über die GC-MS-Methode, die auch zur Biokatalyse verwendet wurde (Abbildung 72). Die biomimetische Umsetzung zeigte keine Chlorierungen. Bei den erhöhten Temperaturen waren mehrere Nebenprodukte sichtbar, APRN (**22b**) aber nur mit 1 – 3 % (Signal 5). Bei Raumtemperatur zeigte nur das geschützte MDA mit 2 % die Bildung von APRN. Das beste Verhältnis ergab sich bei 0 °C mit etwa 10 % APRN. NCS (**2a**) und Palau'Chlor® (**47**) zeigten das gleiche Halogenierungsmuster.

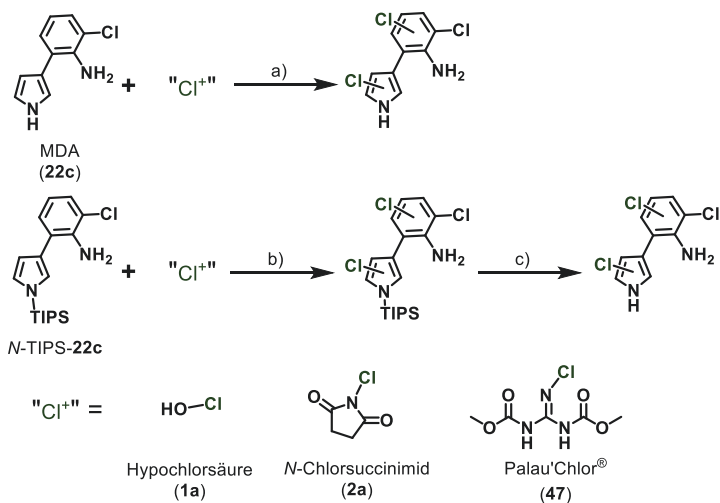


Abbildung 71: Chemische Chlorierung von MDA (**22c**) und *N*-TIPS-**22c**. Als Halogenierungsreagenzien wurden in diesem Fall hypochlorige Säure (**1a**), NCS (**2a**) und 2-Chlor-1,3-bis(methoxycarbonyl)guanidin (**47**) verwendet, die in der Reaktion als „Chloronium“ „Cl⁺“ dargestellt sind. a) Chemische Chlorierung von MDA (**22c**) unter verschiedenen Bedingungen. i) Biomimetische Halogenierung mit 1.00 Äq. MDA (**22c**), je Ansatz jeweils 1.00 Äq. NCS (**2a**), Palau'Chlor® (**47**), oder Hypochlorsäure (**1a**) (15 % Lösung) in Wasser mit 5 % (v/v) DMSO für 24 h bei RT. ii) 1.00 Äq. MDA (**22c**), je Ansatz jeweils 1.00 Äq. NCS (**2a**) oder Palau'Chlor® (**47**) in Chloroform 1 h bei 50 °C. iii) 1.00 Äq. MDA (**22c**), 1.00 Äq. Palau'Chlor® (**47**) in Chloroform 1 h bei RT. b) Chemische Chlorierung von *N*-TIPS-**22c** unter verschiedenen Bedingungen mit anschließender Entschützung. i) 1.00 Äq. *N*-TIPS-**22c**, 1.00 Äq. Palau'Chlor® (**47**) in Chloroform 1 h bei RT. ii) 1.00 Äq. *N*-TIPS-**22c**, 1.00 Äq. NCS (**2a**) in Chloroform 12 h bei 0 °C. c) 1.00 Äq. *N*-TIPS-**22c**, 2.00 Äq. TBAF (1 m in THF) in THF 1 h bei RT.

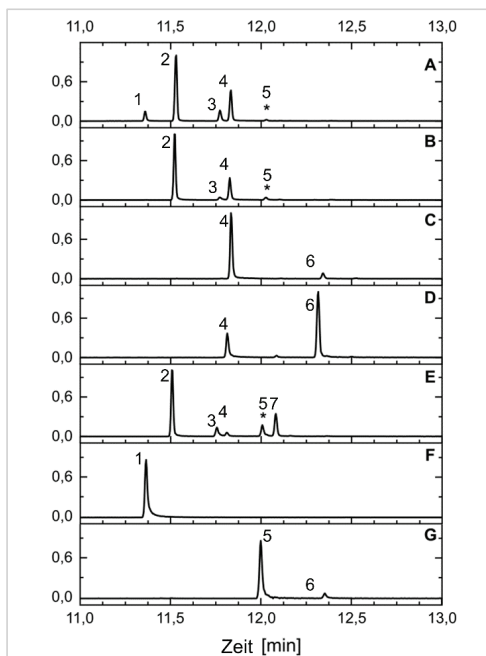


Abbildung 72: GC-MS-Chromatogramme zur chemischen Chlorierung von MDA (**22c**) (Signal 1) und *N*-TIPS-**22c**. Als Halogenierungsreagenzien wurden in diesem Fall NCS (**2a**) und Palau'Chlor® (**47**) verwendet. A) Chlorierung von MDA (**22c**) bei 50 °C mit NCS (**2a**). B) Chlorierung von MDA (**22c**) bei 50 °C mit Palau'Chlor® (**47**). C) Chlorierung von MDA (**22c**) bei Raumtemperatur mit Palau'Chlor® (**47**). D) Chlorierung von *N*-TIPS-**22c** mit Palau'Chlor® (**47**) bei Raumtemperatur und anschließender Entschützung. E) Chlorierung von *N*-TIPS-**22c** mit NCS (**2a**) bei 0 °C und anschließender Entschützung. F) MDA (**22c**) als Vergleichschromatogramm. G) Enzymatische Produktion von APRN (**22b**) (Signal 5) als Vergleichschromatogramm.

Bei der chemischen Halogenierung mit NCS (**2a**) und Palau'Chlor® (**47**) zeigte sich bei 50 °C kein deutlicher Unterschied im Chlorierungsmuster (Abbildung 72 A und B). Erst bei RT war eine Verringerung der Anzahl von Produkten erkennbar. Im Vergleich war APRN (**22b**) nicht mehr detektierbar, während es bei 50 °C in Spuren entstanden war (Signal 5 in Abbildung 72 A und B). Darüber hinaus änderte sich auch das Hauptprodukt. Während es zuvor das Produkt des Signals 2 war, ist es bei niedriger Temperatur das Produkt des Signals 2 (Abbildung 72 C). Ein weiterer Wechsel des Hauptproduktes zu Signal 6 wurde bei der Chlorierung des geschützten Pyrrols *N*-TIPS-**22c** sichtbar (Abbildung 72 D). Bei weiterer Reduktion der Temperatur auf 0 °C mit NCS (**2a**) konnte für das geschützte *N*-TIPS-**22c** am meisten APRN (**22b**) gewonnen werden (Abbildung 72 E), aber die Anzahl der Produkte wurde wieder erhöht. Die Unterschiede zwischen NCS (**2a**) und Palau'Chlor® (**47**), so wie Rodriguez *et al.* sie für andere Strukturen beschrieben,^[320] konnten an diesen Beispielen nicht bestätigt werden, genauso wie die Bevorzugung der elektronisch nicht-begünstigten Position in Strukturen wie Pyrrolen. Für die Bereitstellung von möglichst reinem APRN (**22b**) bleibt nach diesen Ergebnissen die Biokatalyse die bevorzugte Variante (Abbildung 72 G), sofern die Ausbeuten von PrnC noch erhöht werden können und die Stabilität des Enzyms optimiert wird.

8.3 Heterologe Biosynthese von Pyrrolnitrin & Derivaten

Um PrnC auch in Biosynthesen und Biotransformationen nutzen zu können, wurde einerseits ein PrnC-Konstrukt, als auch das ganze Pyrrolnitrin-Biosynthese-Cluster (Abbildung 35) in einen Shuttle-Vektor für *P. putida* gebracht. Für die spezielle Derivatisierung von Prodigininen **31** sollte zusätzlich die Halogenase PltA aus der Biosynthese von Pyoluteorin (**29a**) etabliert werden.

8.3.1 PrnC für die Prodigiosin-Biosynthese

Die ursprünglichen Klonierungen für den Vektor pVLT33 waren nicht erfolgreich. Zur Nutzung eines gemeinsamen Vektor-Systems im CombiCom-Projekt entwickelte Dr. Anita Löschke einen Shuttle-Vektor pCombiCom1 (pCC1). Dieser wurde in Anlehnung an die Parameter von Nora Bitzenhofer als *backbone* in dieser Arbeit amplifiziert. Ebenso erfolgte eine PCR von PrnC mit His₆-tag (Abbildung 73).

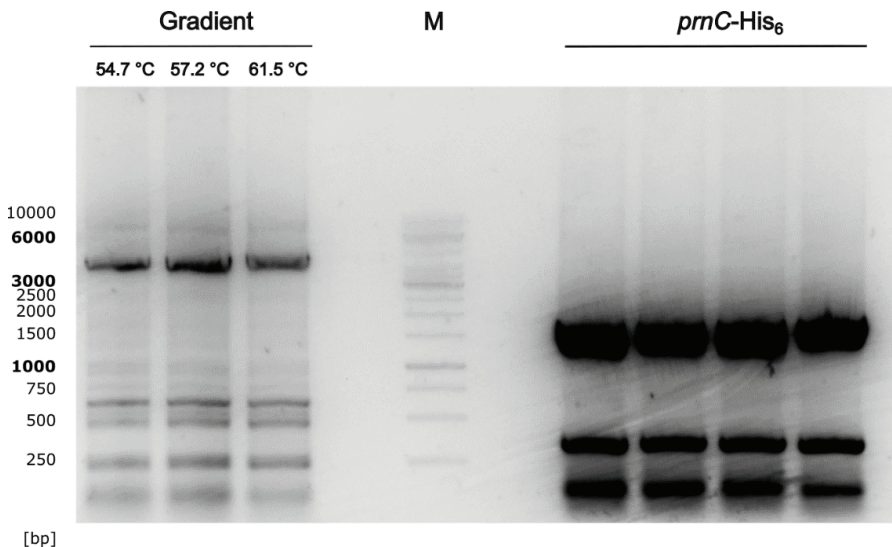


Abbildung 73: Präparatives Agarosegel zur Vektor-Amplifizierung von pCC1, sowie der PCR von *prnC*-His₆. Als Primer wurden JGE0109_pCC1 fw Vektorampl und JGE0109_pCC1 rv Vektorampl, als auch PrnC OL pCC1 fw sowie PrnC OL pCC1 rv verwendet. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen sind auf dem linken Gel die PCR-Produkte der verschiedenen Temperaturen zur Vektoramplifikation von pCC1 und rechts die PCR-Lösungen von *prnC*-His₆. Das PCR-Produkt der Vektoramplifikation hat eine Größe von ~4100 bp und *prnC*-His₆ hat eine Größe von ~1500 bp.

In einem Gibson Assembly wurde das Konstrukt pCC1-*prnC*-His₆ erstellt. Entsprechend des Promotors Ptac, als konsekutiver Promotor mit geringer Produktion, waren in *E. coli* BL21(DE3) und *P. putida* KT2440 keine Überexpressionen sichtbar. Zur Bewertung, ob PrnC sich für die Biosynthese von halogenierten Prodigininen **31** (Schema 1) eignet, wurde die Promiskuität der kondensierenden Enzyme dieses Biosyntheseweges untersucht. Dabei sollte das Bipyrrrol MBC (**32**) nicht mit dem natürlichen Monopyrrol MAP (**33**), sondern mit dem Arylpyrrol 3-*m*CPP (**22k**) kondensiert werden (Abbildung 74). Hierzu wurden in Vortests die kondensierenden Enzyme PigC, TamQ und TreaP verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde in der Biokatalyse MAP (**33**) mit PigC verwendet. Außerdem wurde die Reaktion ohne Enzym, dafür aber mit Salzsäure als Katalysator in Methanol durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde der Ansatz ohne Enzym oder Katalysator, sondern nur Verbindungen **32** und **22k** vermischt. Eine erwartete Verfärbung für die Produktion von Prodigininen **31** wurde für die drei Ansätze mit kondensierendem Enzym und Arylpyrrol 22k nicht beobachtet und auch die extrahierten Rohlysate und Zellpellets zeigten in der LC-MS-Analyse keine Signale.

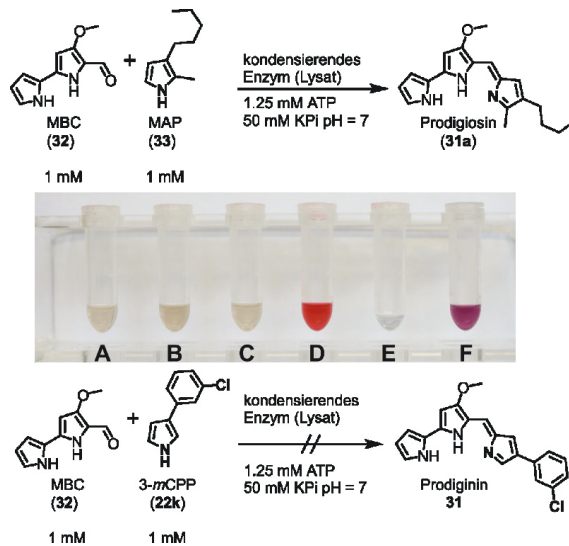


Abbildung 74: Kondensationsexperimente von MBC (**32**) mit MAP (**33**) und 3-*m*CPP (**22k**). durch Rohlysate von PigC, TamQ und TreaP (440 μ L in KPi 50 mM, pH = 7) wurden mit 25 μ L der Monopyrrole (20 mM Stockkonzentration in DMSO) und MBC vermischt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 10 μ L ATP (62.5 mM Stockkonzentration in H₂O). Die Reaktion erfolgte für 2 h bei RT. Von links nach rechts sind die Proben MBC (**32**) und 3-*m*CPP (**22k**) mit A) PigC, B) TamQ und C) TreaP dargestellt. Reaktion D) zeigt die Umsetzung von MBC (**32**) mit MAP (**33**) durch PigC, Reaktion E) ist MBC (**32**) und 3-*m*CPP (**22k**) ohne Enzym und Reaktion F) zeigt MBC (**32**) und 3-*m*CPP (**22k**) in MeOH mit HCl in MeOH.

Die Bereitstellung der Halogenase PrnC im pVLT33-Vektor war nicht erfolgreich, weshalb das Gen in den auf der pVLT-Reihe basierenden pCombicom1 (pCC1) transferriert wurde. Eine Überexpression war in *P. putida* KT2440 nicht sichtbar, was für die P_{tac} -regulierten Vektorsysteme nicht ungewöhnlich ist.^[321] Bevor die Aktivität von PrnC in *P. putida* bestimmt wird, sollte jedoch zunächst die Prämisse überprüft werden. Das Ziel der Expression von PrnC in *P. putida* war die Derivatisierung von Prodigininen **31**, also die Fütterung, Mutasyntese oder Coproduktion von Monopyrrolen für die Kondensation mit MBC (**32**) zu Prodigininen **31**. PrnC sollte hierfür die Halogenierung des Monopyrrols durchführen. Die Lysate der kondensierenden Enzyme PigC, Treap und TamQ (Zellpellets durch *Hannah U. C. Brass* bereitgestellt),^[282] zeigten jedoch keine kondensierende Aktivität für das verwendete Arylpyrrol **22k**. Während Monopyrrole mit langen Alkylketten auch in zyklisierter Form akzeptiert wurden, scheinen die aromatischen Substituenten nicht akzeptiert zu werden, was eine weitere Etablierung von PrnC in diesem Kontext obsolet machte.

8.3.2 Biosynthese von Pyrrolnitrin und halogenierten Prodigininen

Für die Biosynthese von Pyrrolnitrin (**22a**) wurden zunächst Versuche mit dem bestellten Konstrukt pET28a(+)-prnABCDF durchgeführt. Diese waren in *E. coli* nicht erfolgreich. Durch die geringe Überexpression mit pCC1 wurde auch das Konstrukt pCC1-prnABCDF nicht verwendet. Es sollte ein Shuttle-Vektor sein, bei dem eine Expressionskontrolle möglich ist. Aus diesem Grund wurde das Biosynthese-Cluster neu designed. Neben der Expressionskontrolle sollte auch die Möglichkeit bestehen, mit einem Konstrukt verschiedene Intermediate und Derivate zu produzieren. Deshalb wurde ein Konstrukt mit drei Promotoren geplant und für den Zielvektor pBTBX-2 erstellt (Abbildung 75).

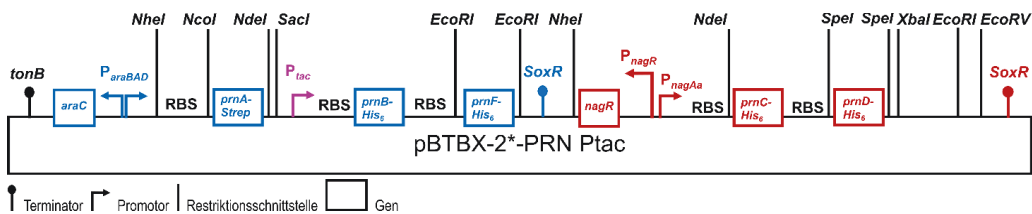


Abbildung 75: Vektorkarte des Biosynthese-Clusters von Pyrrolnitrin (**22a**) im Vektor pBTBX-2*-PRN Ptac. Durch den Zusatz des Promotors P_{tac} im Vergleich zum vorherigen Konstrukt wurde dieser Vektor entsprechend mit dem Zusatz P_{tac} benannt. Die Positionen und Größen dienen nur der Übersicht und sind folglich nicht maßstabsgetreu. Der Vektor zeigt eine Aufteilung in die Expressionskassette unter der Kontrolle von dem durch Arabinose induzierten Promotorsystem (P_{BAD}) in blau und die Expressionskassette unter der Kontrolle des Salicylsäure-induzierbaren Promotorsystems (P_{nagAa}) in rot. Außerdem hervorgehoben ist der konstitutive Promotor P_{tac} für die zusätzliche Expression von *pmB-His6*. Die genaue Vektorkarte (Vektor 31) findet sich im Anhang im Kapitel 14.1. Dargestellt sind die einzelnen Gene des Biosynthesewegs von PRN (**22a**) in Kästchen sowie die Regulatorgene *araC* und *nagR*. Die schwarzen Balken stellen die Restriktionsschnittstellen wie bspw. für *NheI* dar. RBS steht für Ribosomenbindestelle, P_{BAD} , P_{tac} und P_{nagR} sowie P_{nagAa} sind Promotoren und *SoxR* ist der Terminator.

Da pBTBX-2 jedoch keine passenden Schnittstellen für das zuvor bestellte Cluster hatte, wurde eine Variante pBTBX-2* generiert, die eine MCS wie pET28a(+) hat. Das geplante Biosynthese-Cluster beinhaltet *prnA-Strep*, *prnB-His₆* und *prnF-His₆* unter der Kontrolle des P_{araBAD} . Die Gene *prnB-His₆* und *prnF-His₆* standen zusätzlich unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{tac} . Der Promotor P_{nagAa} nach *prnF-His₆* beinhaltet das Regulator-Protein NagR und reguliert die Expression von *prnC-His₆* und *prnD-His₆*. Für den Aufbau dieses Biosynthese-Clusters erfolgte zunächst die Amplifikation der einzelnen Gene (Abbildung 76) aus dem bestellten pUC57b-prnABCDF.

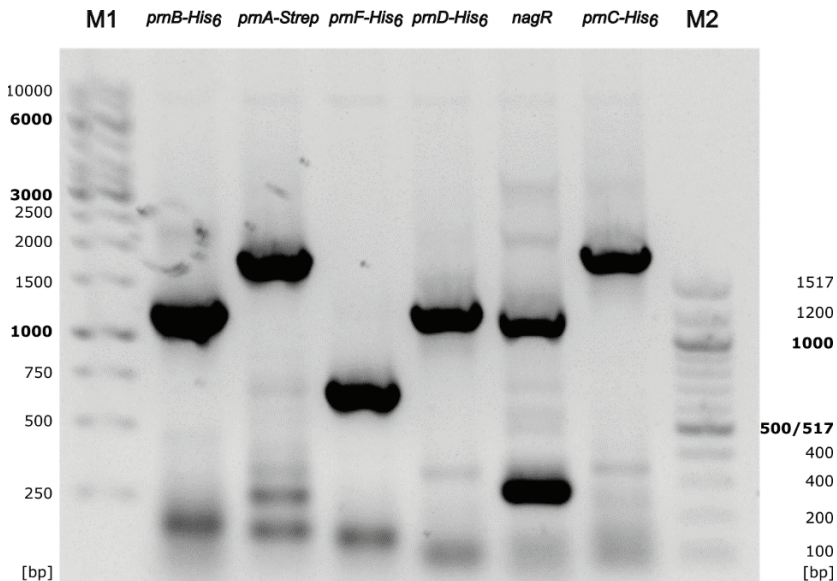


Abbildung 76: Analytisches Agarosegel zur Amplifikation der Pyrrrolnitrin-Gene, sowie $\text{nagR}/P_{\text{nagAa}}$. M1 steht hierbei für den Marker 1 (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*) und M2 steht hierbei für den Marker 2 (*New England Biolabs, Inc. (NEB) Quick-Load® 100 bp DNA Ladder*). Aufgetragen wurden für jedes PCR-Produkt die gepoolten Amplifikationen bei $45.0\text{ }^{\circ}\text{C} - 53.6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die erwarteten Bandengrößen sind für *pmB-His₆* ~1200 bp, *prnA-Strep* ~1750 bp, *prnF-His₆* ~680 bp, *prnD-His₆* ~1200 bp, *nagR/PnagAa* ~1150 bp und *prnC-His₆* ~1800 bp.

Danach wurden über oePCR die Fragmente *prnFnagR* (Abbildung 77), *prnCprnD*, sowie *prnAprnB* gebildet (Abbildung 78). In sukzessiven Gibson Assemblys entstanden die Vektoren, pBTBX-2*-*prnFnagR*, dann pBTBX-2*-*prnFnagRprnCD* mit und ohne EcoRI-Schnittstelle am Ende (P2.1 und P4). Darauf aufbauend wurde dann pBTBX-2*-PRN P_{tac} generiert. An dieser Stelle sei erwähnt, dass im Zuge der Klonierungen ein Konstrukt pBTBX-2*-*prnD-His₆* entstanden ist. Die Expression ist in Abbildung 82 gezeigt.

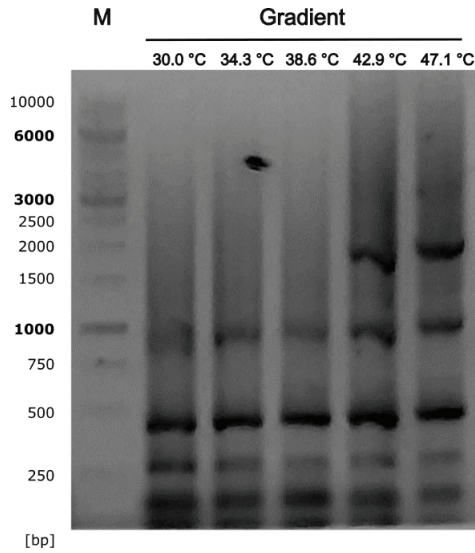


Abbildung 77: Analytisches Agarosegel zur *overlap extension* PCR von *pmFnagRIP_{nagAa}*. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der Temperaturen 30.0 °C – 47.1 °C. Die erwartete Bandengröße beträgt ~1900 bp.

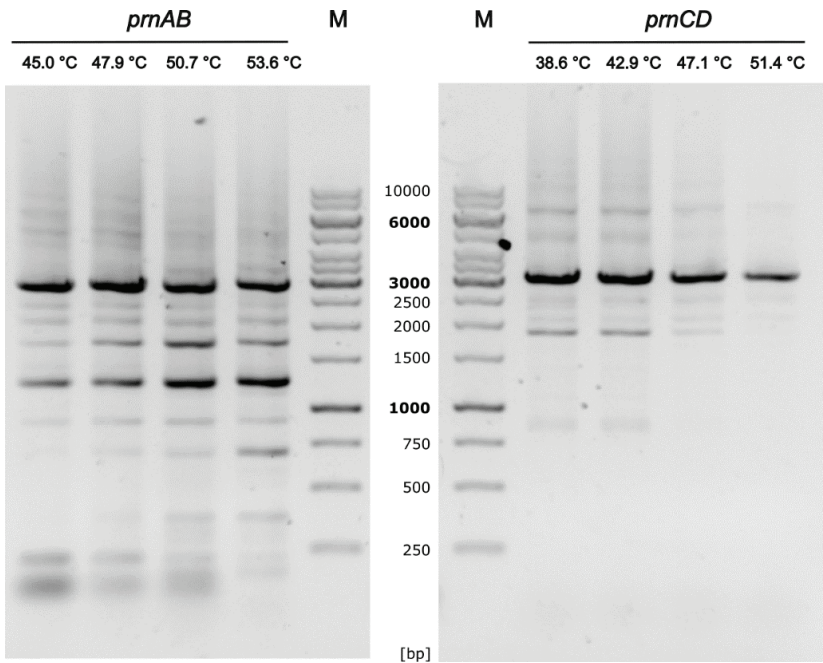


Abbildung 78: Analytisches Agarosegel zur *overlap extension* PCR von *pmAB* und *pmCD*. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der einzelnen Temperaturen. Die erwarteten Bandengrößen für *pmAB* betragen ~2900 bp und für *pmCD* ~3000 bp.

Nach erfolgreicher Zusammenstellung des Konstruktes pBTBX-2*-PRN Ptac erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5 α und Elektroporation von *P. putida* KT2440. Für die Expressionen wurden 20 mL LB_{Kan}-Medium mit 200 μ L Vorkultur inokuliert. Die Anzucht erfolgte bei 30 °C und 130 rpm. Bei einer OD₆₀₀ von 0.5 erfolgte dann die Induktion. Für die Untersuchung des Induktionsprofils wurden 2 x 4 verschiedene Hauptkulturen genutzt. Kulturen 1 wurden nicht induziert, Kulturen 2 wurden mit 100 – 133 mM L-Arabinose, Kulturen 3 mit 1 – 2 mM Salicylat und Kulturen 4 mit 133 mM L-Arabinose und 1 mM Salicylat induziert. Hierbei wurden vier Kulturen auf ihre Expression (Abbildung 79) und vier Kulturen auf die Produktion von Pyrrolnitrin und dessen Intermediate untersucht. Die Biosynthese-Kolben wurden zusätzlich mit 5 mM (1 mg/mL) L-Tryptophan versetzt. Die Zellernte und die Produktionsanalyse erfolgten nach 24 h. Die extrahierten Kulturüberstände und Zellen zeigten bei der Retentionszeit von MDA (22c) und APRN (22b) Signale der korrespondierenden Massen. Die Signale sind aber sehr gering und die Massen entsprechend sehr undeutlich. Eine absolute Aussage ließ sich nicht treffen.

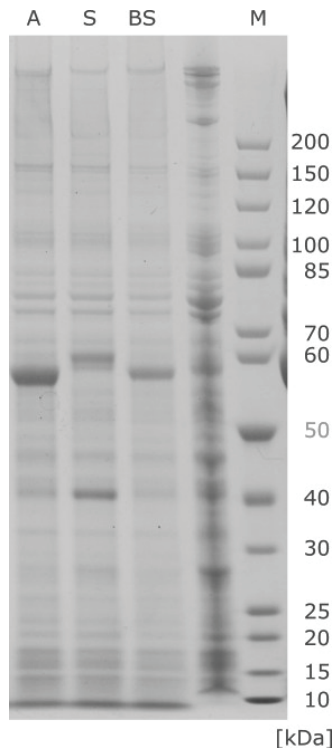


Abbildung 79: SDS-PAGE-Gel zur Expression von *P. putida* KT2440 pBTBX-2*-PRN ptac. Gezeigt sind die Spuren A für die Induktion mit Arabinose, S für die Induktion mit Salicylat und BS (Biosynthese) für die Induktion mit Arabinose und Salicylat. M ist der Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von Thermo Fisher Scientific Inc.). PrnA-Strep hat eine berechnete Größe von 62.3 kDa, PrnB-His₆ von 40.5 kDa, PrnC-His₆ von 65.9 kDa, PrnD-His₆ von 41.9 kDa und PrnF-His₆ von 20.8 kDa. prnA, prnB und prnF stehen unter der Kontrolle von P_{araBAD} (Arabinose), prnB und prnF stehen zusätzlich unter der Kontrolle von P_{tac} (konstitutiv) und PrnC und PrnD unter der Kontrolle von P_{NagAa} (Salicylat).

Neben den Halogenasen des Pyrrolnitrin-Biosynthesewegs sollte auch die Dichlorinase aus der Biosynthese von Pyoluteorin (**29a**) untersucht werden. Dazu erfolgte zunächst die Isolation der Gene von der Halogenase PltA, zusammen mit dem Gen des korrespondierenden Carrier-Proteins PltL, *via* PCR aus dem Genom des Stammes *P. protegens* Pf-5 (Abbildung 80).

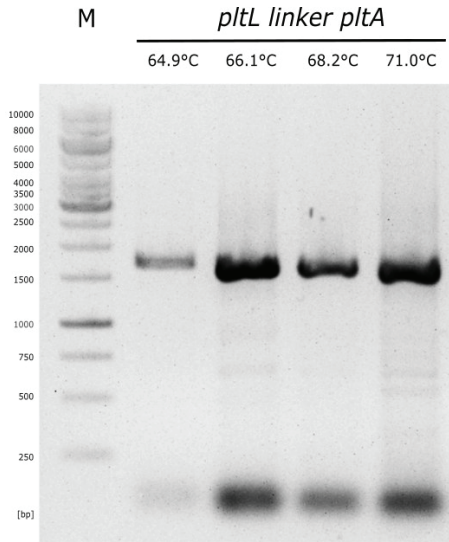


Abbildung 80: Analytisches Agarosegel zur PCR von *pltL*-genomischer Linker-*pltA*. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der einzelnen Temperaturen. Die erwartete Bandengröße für *pltLA* beträgt ~1650 bp.

Die ausgeschittene Bande der Temperaturen 66.1 °C– 71 °C wurde aus dem Gel eluiert, sowie in einer Ligation mit verdautem pUC19b verwendet. Nach der Transformation von *E. coli* DH5 α wurden die Zellen auf Agar-Platten mit X-Gal ausplattiert, um über Blau-weiß-Selektion positive Klone zu isolieren. Für die Expression sollte ein Transfer in den Vektor pBTBX-2 durchgeführt werden. Dafür erfolgte eine zweite PCR (Abbildung 81) basierend auf dem Konstrukt pUC19b-*pltLA*. Nach der Erstellung des Vektors pBTBX-2*-*pltLA* erfolgte die Elektroporation der Stammes *P. putida* KT2440. Die Expression erfolgte in 25 mL SOC_{Kan}-Medium bei 30 °C und 130 rpm. Bei einer OD₆₀₀ = 0.6 erfolgte die Induktion mit 2 % (w/v) L-Arabinose. Nach der Expression für 24 h wurden die Zellen geerntet und in einer SDS-PAGE getrennt. Neben der Produktion von PltL und PltA wurde parallel das zufällig entstandene Konstrukt pBTBX-2*-*prnD-His₆* aus der Klonierung des Pyrrolnitrin-Clusters exprimiert (Abbildung 82). Im Vergleich zum Leervektor ist hier eine Überexpression für beide Konstrukte erkennbar, die die entsprechenden Proteingrößen für PrnD und PltA aufweisen.

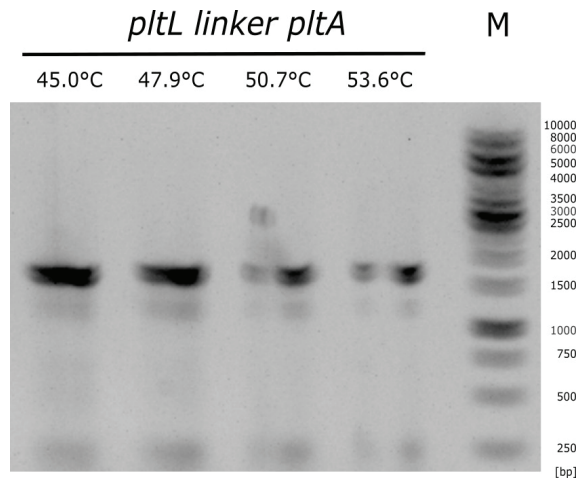


Abbildung 81: Analytisches Agarosegel zur PCR von *pltL*-genomischer Linker-*pltA*. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der einzelnen Temperaturen. Die erwartete Bandengröße für *pltLA* beträgt ~1650 bp.

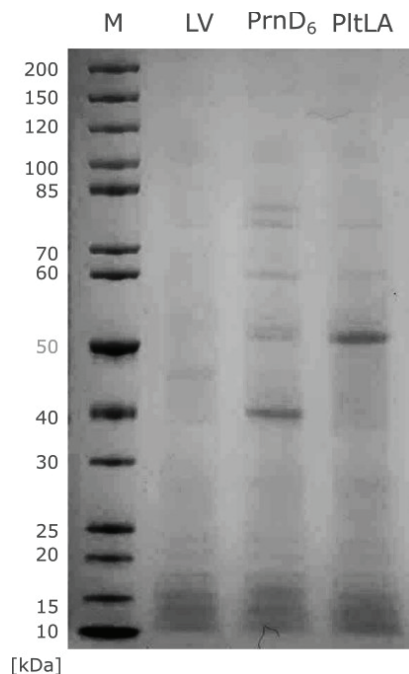


Abbildung 82: SDS-PAGE-Gel zur Expression von *P. putida* KT2440 pBTBX-2*-*pltL*-*pltA*, sowie pBTBX-2*-*prnD*-*His₆*. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von *Thermo Fisher Scientific Inc.*), LV für Leervektor-Kontrolle, PrnD für PrnD-*His₆* und PltLA für die Expression von PltL und PltA. PrnD-*His₆* hat eine erwartete Größe von 42.1 kDa, *pltL* von 10.1 kDa und PltA von 50.7 kDa

Die Verwendung von PltA als Halogenase für den Biosyntheseweg von MBC scheint vielversprechender als PrnC. Die Expression im Arabinose-induzierten Vektorsystem war erfolgreich und eine Flexibilität der Ligasen PigC, TreA und TamQ für Substituenten am MBC konnte, jedenfalls für Alkylketten, durch *Tim Moritz Weber et al.* bereits gezeigt werden.^[283] Alternativ zur Mutasyntese sollte dann die Strategie der Semisyntese verfolgt werden, in der Pyrrolnitrin und MBC parallel in einem *P. putida* KT2440-Stamm produziert werden und eine finale chemische Kondensation stattfinden kann. Hierfür wurde das Biosynthese-Cluster von Pyrrolnitrin im Vektor pBTBX-2 bereitgestellt und durch zusätzliche Promotoren als Expressionskassette ausgestattet. Eine funktionale Proteinproduktion mit diesem Vektor wurde in *P. putida* S12 für die Cumol-Dioxygenase (CumDO) von *Oberleitner et al.* gezeigt.^[322] Der P_{tac} -Promoter sollte eine zusätzliche Bereitstellung von PrnB und der Reduktase PrnF gewährleisten. Für eine Variation der Prodiginin-Produktion sollte im gleichen Vektor zusätzlich eine Regulation von PrnC und PrnD durch Salicylat gewährleistet werden. Die Überexpression von PrnA in diesem Konstrukt mit 100 mM Arabinose auch ohne zusätzlichen Arabinose-Transporter AraE ist hierbei in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Calero et al.* für GFP.^[323] Auch die Produktion von PrnC und PrnD waren mit dem P_{NagAa} -System^[324, 325] und Salicylat erfolgreich. In einigen Experimenten war jedoch auch in der uninduzierten Probe eine Überexpression erkennbar, was an der „leakyness“ des Salicylat-Promotors liegen kann. Im Falle der Induktion für alle Gene war nur PrnA deutlich erkennbar. Ob eine Expression aller Enzyme erfolgreich war, ließ sich anhand der Banden nicht erkennen. Die Detektion der Massen von MDA (**22c**) und APRN (**22b**) lassen aber darauf schließen. Eine Optimierung der Produktion könnte eine Alternative zur chemischen Synthese und Biokatalyse darstellen. Da Reduktasen in den Organismen vorhanden sind, müsste dazu ggf. PrnB direkt auf PrnA folgen, um die Überexpression sichtbar zu erhöhen. Bei der Evaluation des Konstruktdesigns für die Biosynthese sollte auch eine Optimierung hinsichtlich der Translationsraten in Betracht gezogen werden. Durch das Einfügen der Restriktionsschnittstellen vor und hinter den PRN-Genen ergeben sich ggf. zu große „spacer“. Zwar wurde die für *E. coli* empfohlene Nukleotidanzahl für optimale „spacer“ von neun nicht überschritten,^[326] da die Expression aber in *P. putida* stattfinden soll und tat, wäre hier eine Überprüfung möglich.

8.4 Charakterisierung putativer Halogenasen

8.4.1 BLAST search und AntiSMASH-Analyse

Für die Untersuchung von nicht beschriebenen Enzymen mit möglicherweise besseren Eigenschaften wurde eine BLAST *search* durchgeführt. Grundlage waren die Sequenzen der Pyrrol-Halogenasen PrnC und PltA. Gesucht wurde nach Sequenzen in den marinen *Pseudoalteromonaden* mit einer *query cover* (Sequenzlängenabdeckung) von mindestens 70 % jeweils zu PrnC und PltA. Als weiteres Kriterium wurden die Sequenzen auf konservierte Motive untersucht. Diese waren die Flavin-Bindedomäne mit GxGxxG, der Tryptophan-Tunnel mit WxWxl(P/R/G), sowie einem konservierten Lysin zwischen diesen beiden Bereichen. Die erhaltenen Sequenzen für PrnC und PltA teilten sich weiter in zwei Gruppen. Gruppe 1 der Sequenzen zeigte im Alignment eine direkte Überlagerung der konservierten Motive GxGxxG und WxWxlP an der gleichen Position, wohingegen die Sequenzen der Gruppe 2 einen Versatz dieser Motive um fünf bis 10 Aminosäuren aufwiesen. Für die Suche auf Basis von PltA ergab sich für die Gruppe 2-Sequenzen der folgende Stammbaum mittels Clustal Omega^[3] (Abbildung 83). Für PrnC wurde analog verfahren und ebenfalls ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abbildung 84).

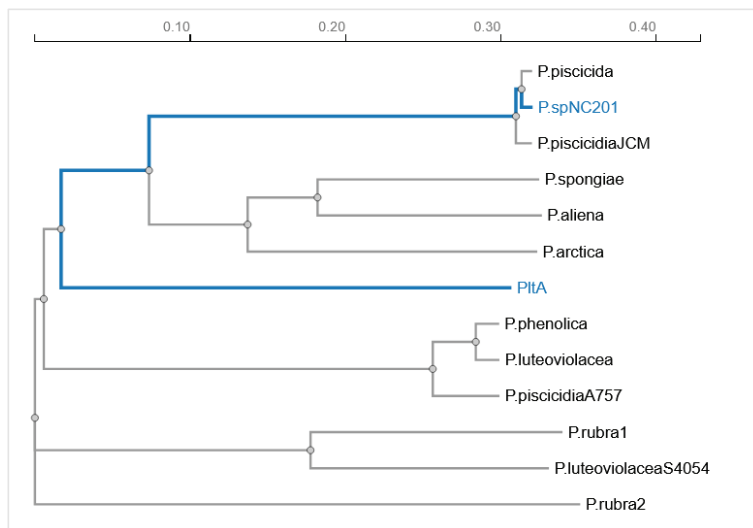


Abbildung 83: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Proteinsequenzen nach BLAST search auf Basis von PltA. Gezeigt sind die phylogenetischen Entfernungen der einzelnen Aminosäuresequenzen zueinander. Hervorgehoben ist der Abstammungszweig zwischen Ausgangssequenz (PltA) und gewähltem Protein (P.sp.NC201, WP_102056423.1). Erstellt am 04.05.2024. Die Abstandswerte zeigen laut Angabe von *Job Dispatcher Documentation* die Anzahl der Substitutionen von Aminosäureresten im Verhältnis zur Länge des Alignments ohne Lücken. Im Allgemeinen gilt: Je größer die Zahl, desto größer ist die genetische Veränderung.

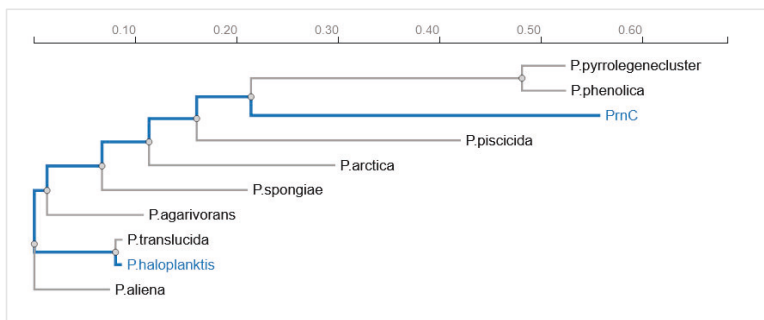


Abbildung 84: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Proteinsequenzen nach BLAST search auf Basis von PrnC. Gezeigt sind die phylogenetischen Entfernungen der einzelnen Aminosäuresequenzen zueinander. Hervorgehoben ist der Abstammungszweig zwischen Ausgangssequenz (PrnC) und gewähltem Protein (*P. haloplanktis*, WP_011330030.1). Erstellt am 04.05.2024. Die Abstandswerte zeigen laut Angabe von *Job Dispatcher Documentation* die Anzahl der Substitutionen von Aminosäureresten im Verhältnis zur Länge des Alignments ohne Lücken. Im Allgemeinen gilt: Je größer die Zahl, desto größer ist die genetische Veränderung.

Auf Grundlage dieser Auswahl, also PrnC und PltA, sowie den beiden Vertretern *P. sp.* NC201 (WP_102056423.1) und *P. haloplanktis* (WP_011330030.1) der Gruppe 2-Sequenzen, erfolgte die Auswahl der Sequenzen. Die erste Sequenz gehört zu dem von uns vorläufig benannten Protein NH153 (WP_063707674.1) aus dem Stamm *Pseudoalteromonas gelatinilytica strain NH153 NH153_S23* (LRRU01000023.1). Diese putative Halogenase befindet sich im phylogenetischen Stammbaum vergleichsweise nah an den Halogenasen PrnC und PltA, sowie an den Referenzproteinen der BLAST search WP_102056423.1 und WP_011330030.1 (Abbildung 85). Eine zweite putative Halogenase NC201 (WP_010605841.1), ebenfalls vorläufig benannt nach dem Ursprungstamm *Pseudoalteromonas sp. NC201* (AUJ68809.1), befindet sich in einer anderen Klade, die im phylogenetischen Stammbaum von den anderen benannten Proteinen entfernt liegt. Diese Entfernung bringt möglicherweise andere Eigenschaften mit sich.

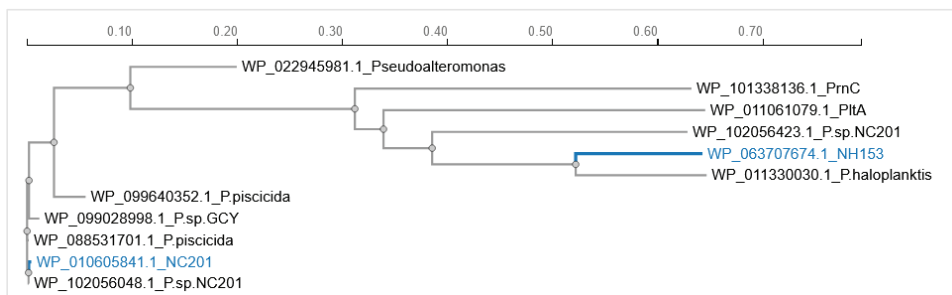


Abbildung 85: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Proteinsequenzen nach BLAST search auf Basis von PltA und PrnC, sowie zwei ausgewählten Sequenzen *P.sp.*NC201 (WP_102056423.1) und *P. haloplanktis* (WP_011330030.1). Erstellt am 04.05.2024. Die Abstandswerte zeigen laut Angabe von *Job Dispatcher Documentation* die Anzahl der Substitutionen von Aminosäureresten im Verhältnis zur Länge des Alignments ohne Lücken. Im Allgemeinen gilt: Je größer die Zahl, desto größer ist die genetische Veränderung.

Zusammenfassend sollen im folgenden Stammbaum alle 6 relevanten Proteine noch einmal mit Bezug zueinander dargestellt werden (Abbildung 86). Ein Sequenz-Alignment bis zum Bereich um die Bindetasche FxxPxxSxG zeigt das Vorhandensein der konservierten Regionen (Abbildung 87).

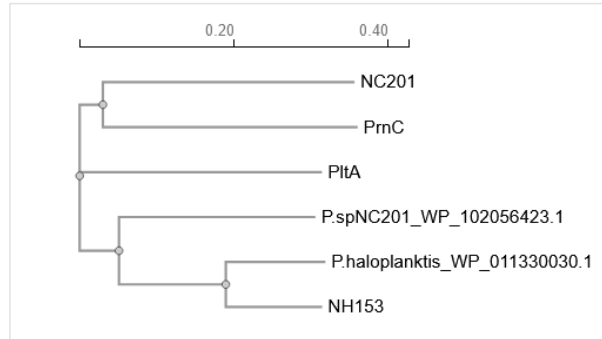


Abbildung 86: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Proteinsequenzen nach BLAST *search* auf Basis von PltA und PrnC, sowie zwei ausgewählten Sequenzen *P. sp.*NC201 (WP_102056423.1) und *P. haloplanktis* (WP_011330030.1) zur Verfeinerung, als auch die zu untersuchenden putativen Halogenasen NH153 (WP_063707674.1) und NC201 (WP_010605841.1). Erstellt am 04.05.2024. Die Abstandswerte zeigen laut Angabe von *Job Dispatcher Documentation* die Anzahl der Substitutionen von Aminosäureresten im Verhältnis zur Länge des Alignments ohne Lücken. Im Allgemeinen gilt: Je größer die Zahl, desto größer ist die genetische Veränderung.

NC201	-----MVSQYADVLIIGGSMAGACLARQLKLAHPDMKITVIERKQAFNSWVGESTL	51
PrnC	MTQKSPANEHDSNHFDVILIIGSGMSGTQMGAIL--AKQQFRVLIIEESSHPRFTIGESSI	58
PltA	-----MSDHDYDVVVIIGGPAGSTMASYL--AKAGVKCAVFEKELFEREHVGESLV	49
P.spNC201_WP_102056423.1	-----MAKENVDVLIIGAGPAGTMTAAKL--IQAGLTVKIVERSHFPRYVIGESLL	49
P.haloplanktis_WP_011330030.1	-----MNNPEQFDVVVIIGAGPSGALASSLL--VQKGWRVLVLEQQIFFRFTIGESLL	50
NH153	-----MNNVQQADVVIIGAGPSGAVAAASLL--VKKGWHVVVLEQQTFFRFSIGESLL	51
	*****:..*: . * : : ..* . :*** :	
NC201	ESFWDYMANDL-KLGF-----YLE-----TNHLYKHGLRFYFDS-----	84
PrnC	PETSLMNRIADRYGIPELDHTSFYSTORYVASSTGIKRNFGFVFKPGQEH-----	111
PltA	PATTPVLEIG---V-----MEKIEK---ANFPKKFGAAWTADSGBPDKMFGQ	92
P.spNC201_WP_102056423.1	PQSMQHLEDAG---F-----MDALVA---RNYQKIGANFKQDDFQ-----	84
P.haloplanktis_WP_011330030.1	PQCMEYLADAN---L-----VAPLHEHAASLGFQFNKGAAFHRAGEN-----	89
NH153	PQCMSFLAEAG---L-----EQAVVQTAQQLSGFQFNKGAAFQRGRDH-----	90
 * * * :	
NC201	-----DNRDLSVEELSELGRSWYHGIPAHQIDREKFDNDMVFQNFRELGDVVMGTTV	136
PrnC	-----DPKEFTQCVIPELPWG-----PESHYRQDVDAVLLQAAIKYGCKVHQKTTV	158
PltA	GLDHDFRSAEILFNFRKQEGVDRD-----FTFHVDRGKFDRIILEHAGSLGKAVFGVEI	147
P.spNC201_WP_102056423.1	-----EFFDFSKNVT--DGWT-----WTWVPRDDNDVNLAEVQKMGAPIEFGTSV	129
P.haloplanktis_WP_011330030.1	-----TAINFTEKSS--PGPG-----TTYQVKRGLFDKLLADNAQLQGVAVIRYQHSV	134
NH153	-----TTIDFTEKFS--EGPG-----TTFQVKRADFDKCLADGAMQQGAEIRYQHSV	135
	:. . . . * . * :	
NC201	NEISLDA-----QCGHT-----VVTSSGSTYTCRYLVDASGFNSPLGK	174
PrnC	TEYHAD-----KDGVA-----VTTAQGERFTGRYIMDCGGPRAPLAT	195
PltA	ADVEFL-----SPGNVIWNKLGKRSVEIKAKMVVDASGRNVLGR	188
P.spNC201_WP_102056423.1	VDANMD-----LEEPIIKVVNEAGDEQEIQAKFVVDSSGYGRVLAN	170
P.haloplanktis_WP_011330030.1	KDYKVTDFVENSSDKGNTNKDSTDKNGGATLLVHDAQQQPYVQQARFVLDASGFRVLPK	194
NH153	LAFT-----DCEDGALLEVTDENQGGYQIKGRFVLDASGFRVLPK	176
	: **..* *	
NC201	QLGLIESQNDRHPV-SSYWGRFKHIELIDH---LGSDEWRARSNFTSRALATNHMYKGY	230
PrnC	KFKLREPCRFKTHSRSLYTHMLGVKPFDDIFVKVGRW-----RWHEGLTHHMFEGG	248
PltA	RLGLREKDPVFNQF--AHSWFDNFDRKSAT--QSPDKV-----DYIFIH-FLPMTN	236
P.spNC201_WP_102056423.1	LLDLNEPSSAPTRA--TLFAQF---KPADGI--ETGAEN-----NKVTILV--HEEDV	214
P.haloplanktis_WP_011330030.1	LLNLELPSNFVRS--AYFSHF---VDNISD---ENFDR-----NKILLTVHPEHRDI	239
NH153	LLDLESANFPVWR--AFFSHF---KDNISD---TQFDR-----EKILINVHPEHKDI	221
	: * : : : .	

NC201	WIWLIPLNQD-----TFSIGITAKNNEVN-INIRSAEEFEQFLRSHQALNEILGQHAEI	283
PrnC	WLWVIFPNNHPRSTNNLVSVGLQDRVYPKTDISAQQEFDEFRLARFPSIGAQFRDAVPV	308
PltA	WVWQIPITET-----ITSVGVVTQKQNYTNSDLTYEEFFWEAVKTRENLHDALKASEQV	290
P.spNC201_WP_102056423.1	WVWLIPLFSDG-----RVSVGVFNPEYLESAEGDAKARFLTYLARDQHASAMLEGMALC	268
P.haloplanktis_WP_011330030.1	WYWLIPLFSDG-----TASIGVVAESERFNDDEAE--VMLNRFLQDPHLKALLAKRELI	291
NH153	WYWLIPLFSDG-----TASIGVVGKPEQLEDKQPL--AGLNEFIEQDSYSELNLANREAI	273
	* * * *: . : * : * . . . : : : : : :	
NC201	LDYTSMKRLSRKAKQSFSTERWFLTGMSSAFLDPDLLSPGSAYLTDANRMIGELIEADIAE	343
PrnC	RDWVKTDRLQFSSNAC-VGDRYCLMLHANGFIDPLFSRCLENTAVTIHALAARLIKALRD	367
PltA	RPFKKEADYSYGMKEV-CGDSFVLIGDAARFVDPIFSSGWSVALNSARIASGDIIEAVKN	349
P.spNC201_WP_102056423.1	MEPKEIKGYSGKGIQL-FGKNFVLVTGNASEFIDPVFSAGVMAFIESGARAAALIVAQLNG	327
P.haloplanktis_WP_011330030.1	GPARSITGYSSNVSKL-YGQHFALLGNAGEFLDPVVFSSGVTIALKSASLIAPLVQYLKG	350
NH153	GEARAIGYSANVSSL-YGEHFALLGNAGEFLDPVVFSSGVTIALKSASLVAPLVDSYLRG	332
 : * : * : * * : * * : : . : : :	

Abbildung 87: Sequenz-Alignment der Proteinsequenzen nach BLAST *search* auf Basis von PltA und PrnC, sowie zwei ausgewählten Sequenzen P.sp.NC201 (WP_102056423.1) und *P.haloplanktis* (WP_011330030.1) zur Verfeinerung, als auch die zu untersuchenden putativen Halogenasen NH153 (WP_063707674.1) und NC201 (WP_010605841.1). Der Asterisk (*) zeigt in allen Sequenzen konservierte Aminosäuren (aa) an der gleichen Position. Der Doppelpunkt (:) hebt aa mit stark ähnlichen Eigenschaften hervor und der Punkt (.) deutet aa mit schwach ähnlichen Eigenschaften an. Gezeigt sind außerdem die konservierten Bereiche der FAD-Bindung (gelb), das mutmaßlich katalytische Lysin (grün), der Tryptophan-Tunnel (orange), sowie der Bereich um die Substratbindetasche (schwarz). Für NC201 ist in rot eine Abweichung des FAD-Bindemotivs GxGxxG markiert. Erstellt am 05.05.2024.

Vergleicht man nun NC201 mit Vertretern der verschiedenen FI-Hal-Gruppen (Abbildung 88), so steht NC201 isoliert und scheint zu keiner der beschriebenen Halogenasen eine besondere Nähe zu haben.

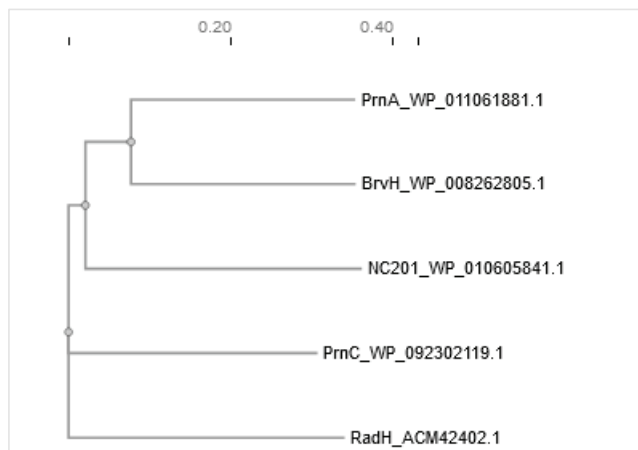


Abbildung 88: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Proteinsequenzen zur Einordnung von NC201 (WP_010605841.1) in die Kategorien der Tryptophan-Halogenasen (PrnA: WP_011061881.1), Phenol-Halogenasen (RadH: ACM42402.1), Pyrrol-Halogenasen (PrnC: WP_092302119.1) und der BrvH-Gruppe (WP_008262805.1). Erstellt am 04.05.2024. Die Abstandswerte zeigen laut Angabe von *Job Dispatcher Documentation* die Anzahl der Substitutionen von Aminosäureresten im Verhältnis zur Länge des Alignments ohne Lücken. Im Allgemeinen gilt: Je größer die Zahl, desto größer ist die genetische Veränderung.

Eine Analyse mittels AntiSMASH^[2] fand im Vergleich von Biosynthese-Clustern eine Ähnlichkeit von 45 % für das NH153-Cluster mit dem Biosynthese-Cluster von Arylpolyenen (APE) aus dem Stamm *Vibrio fischeri ES114* (MIBiG accession: BGC0000837). Die Proteine NH153 (WP_063707674.1) und VF_0841 bzw. AAW85336.1 (WP_011261511) zeigen eine *query cover* von 98 % und eine *identity* von 55 %. Eine ähnliche biologische Funktion kann daher angenommen werden. Für NC201 ergaben sich keine weiteren Informationen durch AntiSMASH.

Bei einer BLAST-Search der N-terminalen FAD-Bindedomäne von NC201 finden sich viele Proteine, die als Oxidoreduktasen (Bspw.: HEX5055604.1) oder Halogenasen (Bspw.: WP_025810126.1) annotiert sind und das GGSMAG- bzw. GXSMAG-Motiv tragen. Hierfür wird meistens auf die Arbeiten von *Hammer et al.* verwiesen.^[327] *Prem et al.* zeigten außerdem, dass in vier der fünf von ihnen untersuchten Oleat-Hydratasen (Ohy) in der FAD-Bindedomäne die konservierte Sequenz GGSxDG vorliegt.^[328] Mit der Bestätigung, dass auch die FAD-Bindedomäne von NC201 funktional in der Natur vorkommt und dem vorhandenen Transfer-Tunnel, ist die Wahrscheinlichkeit für eine halogenierende Aktivität gegeben. Zu welcher Gruppe die NC201 gehört, ist aber nach wie vor nicht eindeutig zu sagen. Eine erneute Expression und Charakterisierung nach dem vorgehen für BrvH, also dem Durchmustern verschiedenster Substratgruppen, könnte ein Anfangspunkt sein.^[193]

8.4.2 Biochemische Charakterisierung von NH153 und NC201

Die beiden Gene *nh153-His₆* und *nc201-His₆* wurden als synthetisches Konstrukt erhalten. Für eine Charakterisierung wurden die Gene für den Transfer in den Vektor pET28a(+) mittels PCR amplifiziert (Abbildung 89).

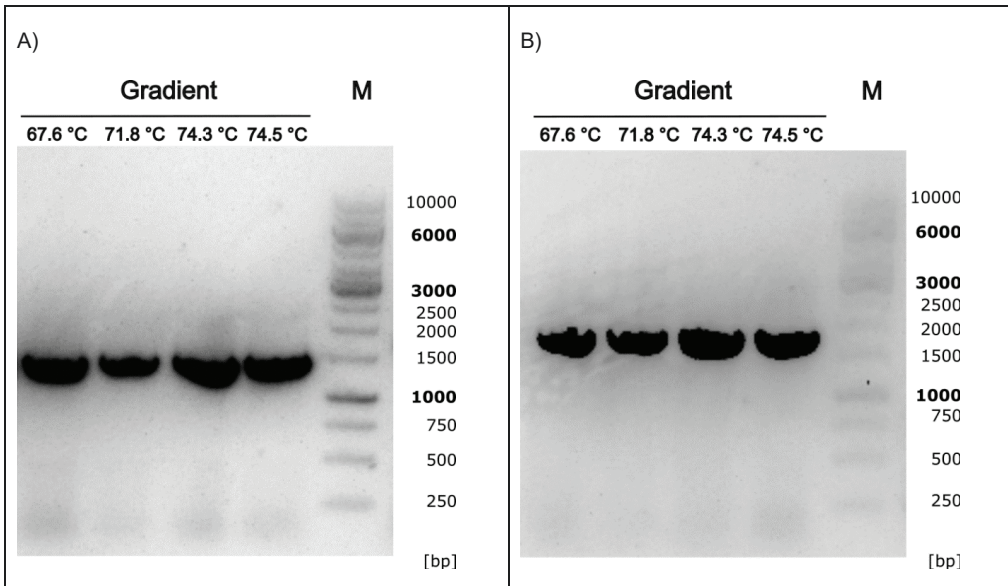


Abbildung 89: Analytisches Agarosegel zur PCR von A) *nh153-His₆* und B) *nc201-His₆*. M steht hierbei für den Marker (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der einzelnen Temperaturen. Als Primer wurden verwendet. Die erwarteten Bandengrößen sind für *nh153-His₆* ~1350 bp und für *nc201-His₆* ~1700 bp.

Diese PCR, sowie der anschließende Gibson Assembly und die Transformation von *E. coli* BL21 (DE3), sowie die initiale Expression wurde zusammen mit *Nena Billen* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Die Zellen *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*nh153-His₆* und *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*nc201-His₆* wurden dafür bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 bzw. 0.5 kultiviert. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C und die Schüttelfrequenz auf 180 rpm gesenkt. Induziert wurde mit 100 µM IPTG und die Zellen nach 16 h geerntet. Während für NH153-His₆ eine deutliche Überexpression zwischen 40 kDa und 50 kDa sichtbar ist, kann eine Überexpression der Kultur *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*nc201-His₆* unter 60 kDa nur erahnt werden (Abbildung 90).

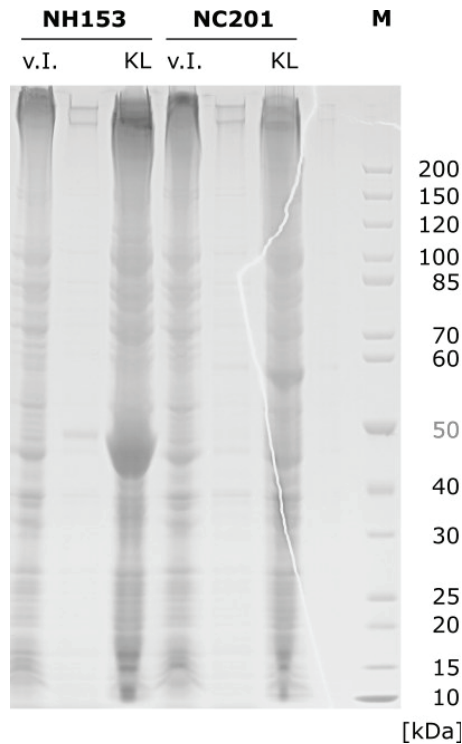


Abbildung 90: SDS-PAGE-Gel zur Expression von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*nh153*-His₆ und *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*nc201*-His₆ bei 25 °C. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von *Thermo Fisher Scientific Inc.*), v.I. für eine Probe vor der Induktion und KL für klares Lysat nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation. NH153-His₆ hat eine berechnete Größe von 47.3 kDa und NC201-His₆ von 62.9 kDa.

Es erfolgte eine erneute Expression von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*nh153*-His₆ bei 20 °C und 180 rpm. Hierfür wurde erneut bei einer OD₆₀₀ von 0.5 mit 100 µM IPTG induziert. Ein Kälteschock oder ähnliches wurde nicht durchgeführt. Die Zellernte erfolgte nach 24 h. Aus den 500 mL Kultur wurden ca. 7.5 g Zellpellet (CDW) gewonnen. Für die Reinigung (Abbildung 91) wurden 3.5 g Zellen in Äquilibriumspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, pH = 7.5) resuspendiert und mittels Ultraschalls aufgeschlossen. Für die Reinigung wurde das Äkta-Programm der SsuE (Gradient: 10 mM, 100 mM, 200 mM und 300 mM Imidazol) gewählt. NH153-His₆ zeigte auch nach der Entsalzung und der Konzentration auf 2 mL eine starke Gelbfärbung. Die Konzentration im neuen Kristallisationspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 7.5) mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280} = 51130$ wurde auf 6.25 mg/mL bestimmt. Dies ergibt eine Gesamtmenge an Zielprotein von 12.5 mg aus 3.5 g Zellen (~ 3.6 mg Protein/g Zellen, (~ 54 mg Protein/L Kultur).

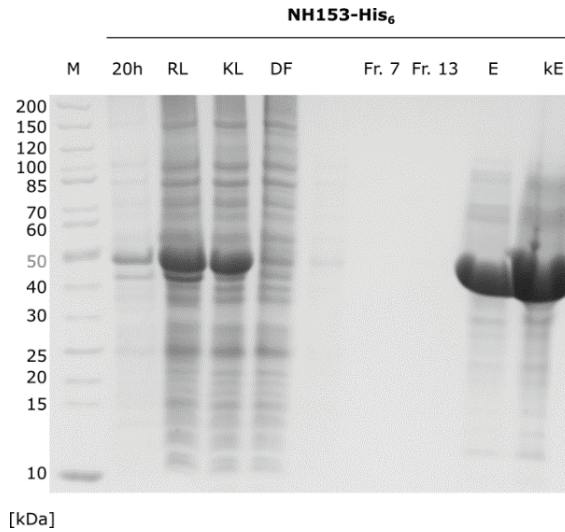


Abbildung 91: SDS-PAGE-Gel zur Expression von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-nh153-His₆ bei 20 °C. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von *Thermo Fisher Scientific Inc.*), eine Zellprobe nach 20 h Expression vor der Zentrifugation, das Rohlysat nach Zellaufschluss (RL), geklärtes LySAT nach dem Zellaufschluss und der Zentrifugation (KL), der Durchfluss der Säulenbeladung (DF), Fraktion 7 mit 100 mM Imidazol, Fraktion 13 mit 200 mM Imidazol und die Elutionsfraktionen 17 – 22 mit 200 mM Imidazol (E). Außerdem wurde eine Probe nach der Entsalzung und Konzentration aufgetragen. Als Anmerkung sei erwähnt, dass die Elutionsfraktionen 17 – 22 eine stark gelbe Färbung zeigten. NH153-His₆ hat eine berechnete Größe von 47.3 kDa.

Diese Lösung wurde für Kristallisationsversuche genutzt. Hierbei zeigte die Bedingung 07 (Bedingung *JCSG Core II Suite Well A7*; Ref: 136301-07, Kapitel 14.3) initiale Kristalle (Abbildung 92). Die Kristalle zeigten unter UV-Licht Tryptophan-Fluoreszenz, weshalb von Proteinkristallen ausgegangen werden kann, obgleich Li⁺ und P_i ebenfalls Salze bildet. Da die gewonnenen Kristalle zu klein waren, waren sie für eine Röntgenanalyse ungeeignet.

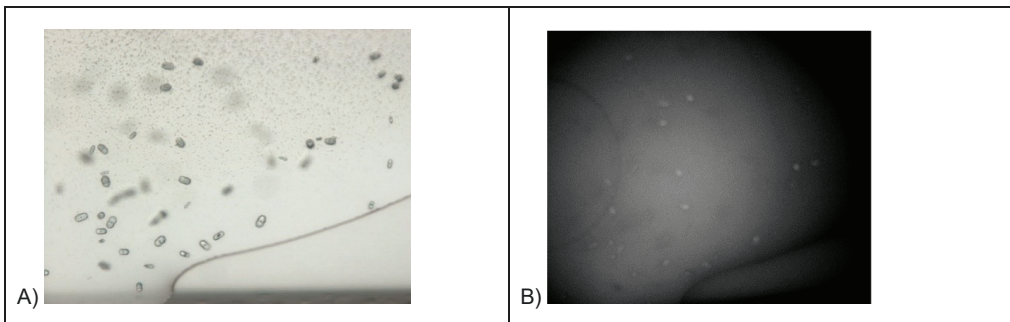


Abbildung 92: Photographien der Kristallisation von NH153-His₆, gelöst in 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 7.5. Kristallisationsbedingungen waren 07 (Bedingung *JCSG Core II Suite Well A7*: Reservoirlösung mit 1 M LiCl und 10 % (w/v) PEG 6000 in 100 mM Bicin, pH 9.0 mit finalem pH-Wert 9.0; Ref: 136301-07) Gezeigt sind die Kristalle A) im Hellfeld und B) die Fluoreszenz bei 280 nm für Tryptophan.

Für NH153 (413 aa) deutet sich anhand der Proteinlänge im Vergleich zu bspw. der Pyrrolyl-Halogenase PltA (449 aa) eine Carrier-Abhängigkeit (Variante B-Enzym) an. Jedoch ist die Tyrosyl-Halogenase CndH^[231] (512 aa) auch Carrier-abhängig und hat eine Länge >500 aa. Diese Länge ist aber für Enzyme der Variante A typisch, weshalb der Vergleich der Strukturen zielführender ist. Betrachtet man die Strukturen von Enzymen der Variante B wie CndH, dem uncharakterisierten Protein der PDB-ID: 3nix und PltA aus *Dachwitz et al.*^[189] im Vergleich zu dem Phyre2-Strukturhomologiemodell^[1] von NH153 (Abbildung 97), findet sich eine eindeutige Gemeinsamkeit. Alle drei Strukturen und das NH153-Modell dieser Arbeit zeigen, an die konservierte „Box“-Bindedomäne anschließend, nur eine kleine Helix als C-terminalen Domäne. Dies untermauert die Hypothese der Carrier-Abhängigkeit von NH153. Für die Bewertung der Produktion von NH153 sind daher Enzyme der Variante B maßgeblich. Bei der Isolation des GST-CndH-Fusionsproteins erreichten *Buedenbender et al.* eine Aubeute von 30 mg/L Kultur bei 25°C. Von diesen 30 mg/L konnten aber nur 0.5 mg Protein pro Liter Kultur als lösliches Enzym gewonnen werden.^[231] NH153 konnte in dieser Arbeit mit einer Proteinausbeute von 53.6 mg/L Kultur bei 20 °C isoliert werden und erreicht damit eine deutlich höhere Ausbeute. Die Proteinmenge ist um den Faktor 1.8 größer und wird nur das lösliche Protein verglichen, dann ist der Faktor sogar 107. Eine Färbung wurde für die Lösung des GST-CndH-Fusionsproteins nicht beschrieben. Für die Expression von *pltA* bei 18 °C in 2 L Kultur beschrieben *Pang et al.* eine Elution von reinem His₁₀-PltA mit 6 mL zu einer konzentrierten Proteinlösung von 10 mg/mL unbekanntem Volumens.^[243] Die Abbildung in der „Supporting Information“ von *Pang et al.* lässt auf ein Volumen von 100 – 200 µL schließen, was eine Proteinmenge von 1 – 2 mg bedeutet. Dies würde mit den Ausbeuten von CndH übereinstimmen. PltA zeigte bei *Pang et al.* in der Reinigung ebenfalls eine gelbe Färbung, was mit einer starken Wechselwirkung in der tiefliegenden Spalte im Enzym begründet wurde. Eine kovalente Bindung wie bei CmlS^[236] ist mit der Struktur nicht naheliegend. Für die Kristallisation lassen sich nur bedingt Vergleiche finden. Während PltA mit einer Konzentration von 10 mg/mL in 100 mM Bis-Tris-Propan (BTP) und 20 % (w/v) PEG 8000 zur Kristallbildung führte, konnte NH153-His₆ mit ähnlicher Konzentration von 6.3 mg/mL in 100 mM Bicin (BHG) und 10 % (w/v) PEG 6000 zur Initial-Kristallisation gebracht werden. Beide Proteine haben also in ähnlicher Konzentration im Beisein von PEG und einem organischen Puffer-System Kristalle ergeben. Allerdings war für PltA ein Zusatz von 50 mM MgSO₄ erfolgreich und für NH153-His₆ 1 M LiCl. Die Salze und Salzstärke weichen stark voneinander ab. Auch die pH-Werte von 7.0 für PltA und pH = 9 für NH153-His₆ weisen keine Korrelation mit den isoelektrischen Punkten (pI) von 5.58 für PltA und 5.04 für NH153-His₆ auf. Die genauen Bedingungen für die Kristallisation von NH153 lassen sich erst beschreiben, wenn die Bedingungen verfeinert werden. Nachdem NH153 erfolgreich erste Kristalle bildete, sollte sich eine Produktion größerer Proteinmengen anschließen, um nach erneuter und optimierter Kristallisation eine Röntgenaufnahme durchführen zu können und die Proteinstruktur zu beschreiben.

8.5 Rationales Design chimärer Halogenasen

Basierend auf den Vorteilen einer gefärbten Proteinlösung, nämlich die Sichtbarkeit, wo sich das Protein befindet und dem Vergleich der Expressionsbedingungen und Proteinausbeuten von PrnC und NH153, sowie den Strukturvergleichen von Halogenasen mit starker Konservierung der „Box“-Domäne, sollte eine PrnC-Variante erstellt werden, die im stark konservierten Bereich die Sequenz von NH153 erhält. Dieser Vergleich ist in der folgenden Tabelle 7 dargestellt. Analog zu den Sequenz-Alignments aus Abbildung 87 soll der Sequenzvergleich von NH153 mit P1tA (Abbildung 93), PrnC (Abbildung 94), sowie PrnA (Abbildung 95) Aufschluss über eine sinnvolle „Fusionsnaht geben“.

Tabelle 7: Vergleich der Eigenschaften und Produktion von PrnC-His₆ und NH153-His₆.

Eigenschaften	PrnC-His ₆	NH153-His ₆
Expressionstemperatur	10 – 15 °C	20 – 25 °C
Expressionsstamm	<i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Proteinausbeuten	1.0 – 1.5 mg Protein/g Zellen	3.2 – 3.6 mg Protein/g
Proteinpräzipitat für Lagerung bei Raumtemperatur	Nach ~ 24 h	-
Gelbe Färbung nach Entsalzung	nein	ja

```

NH153      MNNQVQADVVIIIGAGPSCAVAASLLVKKGWHVVVLEQQTFFRFSIGESLLPQCMSFLAEAGLEQAVQTQAQSLGFQFN  80
PltA      --MSDHDYDVVVIIGGGPAGSTMASYLAKAGVKCAVFEKELFEREHVGESLVPATTPVLLIEIGVMKIEKAN---FFK  78
          : : * * * * : * * * : * * : * * * * * * : * * * : * * : * * * : * * : * * * : * * :
NH153      GAAFQRR--G-----DHTTIDPTEKFSEGP--GTTFQVKRADFDKCLADGAMQGAIEIRYQHSVLAFTDCE  142
PltA      GAAWTSADSGPEDKMGFQGLDHDHFRSABILFNERKQEGVDRDFTFHVDRGKFDRIIHEHAGSLGAKVFQGVVEIADVF  154
          ***:      *      : * * * : * *      * : * * * * * * * * : * * : * * : * * : * * :
NH153      DGALLEVTDENQQGYQIKGRFVLDSAGFGRVLPRLLDLESASNFPVRWAF--FSHFKNISDTPQDREKILINVHPEHK  162
PltA      PGNVIVNAKLGKRSVEIKAKMVDASGRNVLGRRLGLREKDPVFNQFAIHSWFDNFRDKSATQSPDKVDYIFIHFLPMT  234
          * : : . : : : * * : * * * : * * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * : * * : * * :
NH153      DINWYLIPFSDGTASIGVVGKPEQLEDKQPLAGLNEF---IEQDSYSELNREAIGEARAIKGYANSVSSLYGEHFA  295
PltA      NTWVWQIPIETETITSVGVVTKQNYTNSDLT--YEEFFWEAVKTRENLHDALKASEQVRPFKKEADYSYGMKEVCGDS  312
          : * * * * : : * * * * : : : :      * *      : :      * : * * * : : : * * : * * * : * * :
NH153      LLGNAGEFLDPVFSSGVTIALKSASLVAPLVDSYLGRGEQVD--FKNDYSEPLQQGVNCFRTYVSAWYDGSFQDVI  373
PltA      LIGDAARFVDPVIFSSGVSVALNSARIASGDII EAVKNNDPFSKSSPTHYEGMIRNGIKNWyEPITLYRNLNLTAFV  392
          * : * * * * : * * * * * * * * * * * * : : : : : : : : : * * . : * * : * * : * * :
NH153      NQQVREMI SAILAGYAWDLQNPFVKQSNKRLNLTVE---LCR---D-----  413
PltA      --RYRLDILQLLQGDVYS-----GKRLEVLDMREIIAAVESDPEHLWHKYLGDQVPTAKPAF-----  449
          : * * : * * * : . . . . . * * * : * * : * * * * * * : * * * * * * :
    
```

Abbildung 93: Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen von P1tA (WP_011061079.1, PDB: 5DBJ_A) und NH153 (WP_063707674.1). Das Asterisk (*) zeigt in allen Sequenzen konservierte Aminosäuren (aa) an der gleichen Position. Der Doppelpunkt (:) hebt aa mit stark ähnlichen Eigenschaften hervor und der Punkt (.) deutet aa mit schwach ähnlichen Eigenschaften an. Hervorgehoben sind außerdem die konservierten Bereiche der FAD-Bindung (gelb), das mutmaßlich katalytische Lysin (grün), der Tryptophan-Tunnel (orange), sowie der Bereich um die Substratbindetasche (schwarz).

NH153	-----MNNQVQADVVIIGAGPSCAVAASLLVKKGHWVVLVEQQTFPRFSIGESLLPQCMSFLAE-----GLEQA-----	66
PrnC	MTQKSPANEHDSNHFVDVIIIGSGMSTQMGAAILAKQQFRVLLIEESSHPRTIGESSIPETSLMNRRIADRYGIPELDHTISFYST	86
	:: :: **:*:*:* * : .:*.* : : : : : . : . : : . : : : : . : : : : . : : : : *	
NH153	VQTQAQSLGFOENGAAFQRRGDH-TTIDFTE---KFSEPGTTFQVKRADFDKCLADGAMQQGAEIRYQHSVLAFTDCEDGALL	147
PrnC	QRYVASTGIENRNFQVFVHKPQEQHDKPEFTQCVIPELWPWGPESH--YYRQDVVAYLLQAAIKYGCKVHQKTTVEYHADKDGVA-	169
	* : *	
NH153	EVTDENQQGYQIKGRFVLDASGFGFRVLPRLLDLESASNFVVRWAFFS--HFKNISDQTFDR-----EKILINVHPEHKDI	221
PrnC	---VTTAQQGERFTGRYMI DCGGPRAPLTKFKLREE---PCRFKTHSRSLYTHMLGVKPFDDIFKVKGQRWRWHEGTLHMFEGG	248
	. ** : : . : . : . : . : . * : : * . * : : . : * . : : : : . * . : : . : * : : .	
NH153	WYWLIP FSDGTASIGVVGKP-EQLED-KQPLAGLNEFIEQDSYLSSELLANREAIGEARAIK-----GYSANVSSLYGEHFALLG	298
PrnC	WLWVIF FNNHPRSTNNLVSVGLQDPRVYPKTDISAQQEFDEFARFPSIGAQFRDAVPVRDVKVTDRLQFSSNACVGDRYCLML	333
	* * : * * : *	
NH153	NAGE F LDPVFSSGVTIALKSA-----SLVAPLVDSYLGRGEQVDFKNDYSEPLQQGV-----N-CFR-----TYVSAWY	360
PrnC	HANG F LDPLFSSRGLENTAVTIHALAARLIKALRDDDFSPEPERF---YIERLQKQLLDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHRLWA	414
	: * : *	
NH153	DGSFQDVIIFYSEKNQQVREMI SAILAGYAWDLQNPVFKQSNKRNLTLVELCRD-----	413
PrnC	VTGILGQFRLVQAAHARFRASR--NEG-----DLDDLNDPPYLGLYLCADMEEYQLFNDAKAEVEAVSAGRKPADEAAARI	488
	* : : . : : : : : . : * : : : : : * * * * : : : : . : * * * *	
NH153	-----	413
PrnC	HALIDERDFAKPMFGFYGCITGDKPQLNNKSYSLPAMRLMYWTQTRAPAEVKKYFDYNPMAFALLKAYITTRIGLALKK	567

Abbildung 94: Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen von PrnC (WP_092302119.1) und NH153 (WP_063707674.1). Das Asterisk (*) zeigt in allen Sequenzen konservierte Aminosäuren (aa) an der gleichen Position. Der Doppelpunkt (:) hebt aa mit stark ähnlichen Eigenschaften hervor und der Punkt (.) deutet aa mit schwach ähnlichen Eigenschaften an. Hervorgehoben sind außerdem die konservierten Bereiche der FAD-Bindung (gelb), das mutmaßlich katalytische Lysin (grün), der Tryptophan-Tunnel (orange), sowie der Bereich um die Substratbindetasche (schwarz).

NH153	MNNQVQADVVIIGAGPSCAVAASLLVKK--GHWVVLVEQQTFPRFSIGESLLPQCMSFLAE-AGLEQAVQTQAQSLGFO	77
PrnC	MNK--PIKNIVIVGGGTAGWMAASYLVRALQQQVNTLIESAAIPRIGVGEATIPSLQKVFDFDLGIPEREW--PQVNGA	77
	** : : : * : * : * * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NH153	F NGAAFQ---RRGDHTTIDF-TEKFSEGP-----GTT-----F-----QVKRADFDKCLADGAMQQGA	127
PrnC	F AAIKFVNWRKSPDPSREDFYHFLGFSVPNCQVPLTHYWLKREQGGFQQPMAYACYPQALDGKLAPCLADGTRQMSH	158
	** . * : : * : * : . : . . * * : * * : . : : : : * : . : : : * * : . : : * * : *	
NH153	EIRYQHSVLA-FT--DCEDGAL-----LEVT-----DENQQGYQIKGRFVLDASGFGFRVLPRLLDLESASNFVVR	189
PrnC	AWHFD AHLVDFLKRWAVERVNRVVEVQVLRDGRYISTLLTKEGRTLEADLFDICSGMRGLLINQALKEFFIDMS-D	238
	: : : * : * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NH153	WAFF-SHKDNISDQTFDREKILINVHPEHKDI WYWLIP FSDGTASIGVVGKPEQLE----DKQPLAGLNEFIEQDSYLS	264
PrnC	YLLCDSAVASAVPNDAREGVEPYTSAIAMNSG WTWKIF MLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLKLWGLSDNQQL----	314
	: : * . : . : : : . : . : * * * * : . : * * * * : : * * * * : : :	
NH153	ELLANREAIGEARAIKGY SANVSSLYGEHFALLGNAGE F LDPVFSSGVTIALKSAS-LVAPLVDSYLGRGEQVDFKNDYSEP	344
PrnC	---NQIKFRVGRNK-----RAWVNVCVIGLSSC F LEPLESTGIYFIYAALYLQVHKFPDTSFDP---RLRDAFNAE	380
	* : : * : * : : : : : * : : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NH153	LQQGVNCFRTYVS-AWYDGSFQDVIIFYSEKNQQVR-----EMIS	382
PrnC	IVYMFDDCRDFVQAHYFTTSREDTPFWLANRHELRLSDAIQEKVERYKAGLPLTTTSFDDSYEYETFDYEFKNFNLNGNY	461
	: . : * : * . : : * : * . : : : : *	
NH153	AILAGYAW--DLQNPVFKQSN-----KRLNLVE-----LCRD-----	413
PrnC	CIFAGLGMLPDRSLPLLQHRPESIQKAEAMFASIRREAERLRTSLPTNYDYLRSLRDGAQLSRNQHGPGLAAQERQ	537
	. * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Abbildung 95: Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen von PrnC (WP_011061881.1) und NH153 (WP_063707674.1). Das Asterisk (*) zeigt in allen Sequenzen konservierte Aminosäuren (aa) an der gleichen Position. Der Doppelpunkt (:) hebt aa mit stark ähnlichen Eigenschaften hervor und der Punkt (.) deutet aa mit schwach ähnlichen Eigenschaften an. Hervorgehoben sind außerdem die konservierten Bereiche der FAD-Bindung (gelb), das mutmaßlich katalytische Lysin (grün), der Tryptophan-Tunnel (orange), sowie der Bereich um die Substratbindetasche (schwarz).

Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend diesen Alignments wurde das Fusionsprotein NHprnC-His₆ konstruiert. Da es die „Box“-Domäne von NH153 erhalten hat und die „Pyramiden-Domäne“ nach der konservierten Sequenz FxxPxxSxG (Abbildung 96), wurde dieses Enzym auch als Chimäre bezeichnet.

PrnC-His9	MTQKSPANGHSDNSHFVDIILGSGMSGTQMGAAILAKQQFRVLIIEQSSHPRTFIGESSIPETSLMNRRIADRYDIP	75
NH153-His6	-----MGNNVQQQADVVIIIGAGPSGVAASLLVKKGWHVVVLEQQTFPRFSIGESLLPQCMSFLAEAGLEQAV--	68
NHprnC-His6	-----MGNNVQQQADVVIIIGAGPSGVAASLLVKKGWHVVVLEQQTFPRFSIGESLLPQCMSFLAEAGLEQAV--	68
	. . . : * : * : * : * * : . . : * : * : . . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
PrnC-His9	ELGHITSFYSTQRYVSSSTGIKRNGFVVFHFKPGQEHPKKEFTQCVIPELWPGPES--HYRQDVDAYLQAIAIKY	148
NH153-His6	-----QTQAQSLGFQFKNGAAFQRRGD-HTTIDFTE-----KFSEGGPTTFQVKNRADFDKCLADGAMQQ--	126
NHprnC-His6	-----QTQAQSLGFQFKNGAAFQRRGD-HTTIDFTE-----KFSEGGPTTFQVKNRADFDKCLADGAMQQ--	126
	. : . : * : * : : : . : * : * : : : * : * : : : * : * : : : * : * : : : * : * : : : * : * : : :	
PrnC-His9	GCTVQRKTSVTEYHADKDGVAVT---TAEGERFTGRYMIDCGGPGAPLTKFGLREE---PCRFKTHSRSLYTH	216
NH153-His6	GAEIRYQHSVLAFTDCELDGALLEVTDENQQQYQIKGRFVLDASGFGRLVPRLLDLESASNFPVRWAFFS--HFKD	199
NHprnC-His6	GAEIRYQHSVLAFTDCELDGALLEVTDENQQQYQIKGRFVLDASGFGRLVPRLLDLESASNFPVRWAFFS--HFKD	199
	*. : * : * : * : . : * : * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
PrnC-His9	MLGVKPFDDIFKVKGQRRWHEGTLHHMFTGGWLWVIFPNNHPRSTNNLVSVGLQLDPRVYPKTDIPAQQEFDEF	291
NH153-His6	-----NISDTQFDR-----EKILINVHPEHKDIWYLLIPFSFGTASIGVVGK-PEQLEDK-QPLAGLNEFIEQDSY	263
NHprnC-His6	-----NISDTQFDR-----EKILINVHPEHKDIWYLLIPFSFGTASIGVVGK-PEQLEDK-QPLAGLNEFIEQDSY	263
	. : . * : *	
PrnC-His9	LARFPSIGAQFRDAVPVRDWVKTDRLQFSSNACVGDYRCLMLHANGFIDPLFSSRGLENTAVTITHALAARLIKALR	366
NH153-His6	LSELLANREAIGEARAIK-----GYSANVSSLYGHEFALLGNAGEFLDPVFSSGVTIALKSAS---LVAPLIV	327
NHprnC-His6	LSELLANREAIGEARAIK-----GYSANVSSLYGHEFALLGNAGEFLDPVFSSGLENTAVTITHALAARLIKALR	332
	*. : : . : * : : : . : . : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
PrnC-His9	DDDFSPERFE----YIERLQOKLLDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHRLWAVGTILGQFRLVQAHARFRASRDE	437
NH153-His6	DSYLARGEQVDFKNDYSEPLQQGV-----N-CFR-----TYVSAWYDGSFQDVIFYSEKNQVREMISA	384
NHprnC-His6	DDDFSPERFE----YIERLQOKLLDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHRLWAVGTILGQFRLVQAHARFRASRDE	403
	*. : . * : : . : * * * * : . : * : . : * * * : : : . : * : : : * : : : . : : * :	
PrnC-His9	-----GDLDDLNDPYPYLGYLCADMEOYQLFNDAKAVEAVSAGHKSAEEAALRIHALIDERDFAKPM	501
NH153-His6	ILAGYAWDLQNPVFKQSNKRLNLTVELCRDEL-----GDLDDLNDPYPYLGYLCADMEOYQLFNDAKAVEAVSAGHKSAEEAALRIHALIDERDFAKPM	416
NHprnC-His6	-----GDLDDLNDPYPYLGYLCADMEOYQLFNDAKAVEAVSAGHKSAEEAALRIHALIDERDFAKPM	467
	. : : . : * * * *	
PrnC-His9	FGFGYCI TGDKPQLNNSKYSLIPAMKLMYWTQTRAPAEVKKYFDYNPMFALLKAYITTRIGLALKKELHHHHHHH	575
NH153-His6	-----ELHHHHHHH	424
NHprnC-His6	FGFGYCI TGDKPQLNNSKYSLIPAMKLMYWTQTRAPAEVKKYFDYNPMFALLKAYITTRIGLALKKELHHHHHHH	541

Abbildung 96: Sequenz-Alignment der Aminosäuresequenzen von PrnC-His₉, NH153-His₆ und NHprnC-His₆. Das Asterisk (*) zeigt in allen Sequenzen konservierte Aminosäuren (aa) an der gleichen Position. Der Doppelpunkt (:) hebt aa mit stark ähnlichen Eigenschaften hervor und der Punkt (.) deutet aa mit schwach ähnlichen Eigenschaften an. Hervorgehoben sind außerdem die übernommenen Sequenzbereiche von NH153 (gelb) und PrnC (orange), sowie die konservierte Sequenz FxxPxxSxG (schwarz) als „Fusionsnaht“ und der terminale Helixbereich der „Box“-Domäne (lila Buchstaben) (Abbildung 97).

Wie sich dies in Strukturen äußern könnte, sollte durch ein Modelling mittels Phyre2-Strukturhomologiemo[1] gezeit werden (Abbildung 97). Genauso wie die Tryptophan-Halogenasen (Abbildung 25) haben PrnC und NH153 in diesen Strukturen eine die „Box“-Domäne (rot) abschließende lange Helix, bevor die „Pyramiden“-Domäne (blau) beginnt. In beiden Strukturen, für PrnC und NH153, liegt die gewählte Fusionsnaht (schwarz) vor dieser abschließenden Helix, nämlich am Beginn der vorherigen Helix. Starke Unterschiede in den Strukturen in Form der „Pyramiden“-Domäne (blau) treten erst nach dem in lila markierten Bereich am Ende der langen „Box“-Domänen-Helix auf.

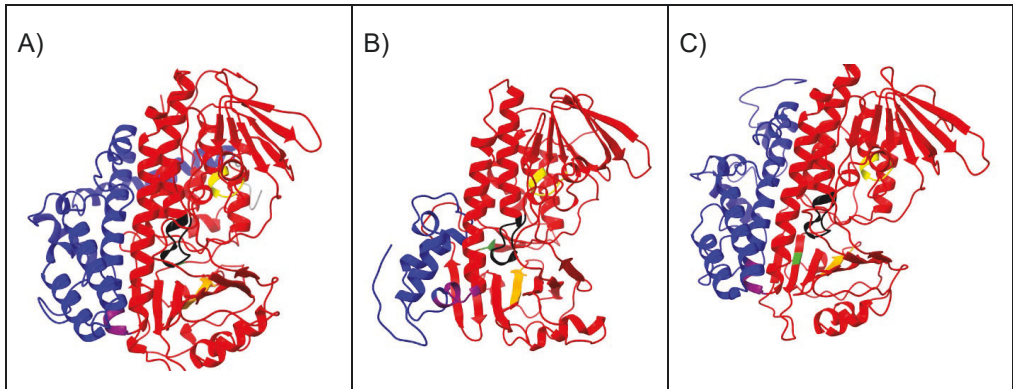


Abbildung 97: Modellerte Phyre2-Strukturhomologiemodelle^[1] von PrnC-His₉ (A), NH153-His₆ (B) und NHprnC-His₆ (C), basierend auf der schematischen Darstellung der Abbildung 26. Hervorgehoben sind die Sequenzbereiche der „Box“-Domäne (rot), die Flavin-Bindedomäne GxGxxG (gelb), der Transfertunnel WxWxIP (orange) und das konservierte Lysin K (grün). Auch gezeigt ist der Bereich um die Bindetasche FxxPxxSxG (schwarz) und der Bereich nach der letzten Helix der „Box“-Domäne in lila, sowie der N-terminale Bereich, der für die Tryptophan-Halogenasen bezeichneten „Pyramiden“-Domäne (blau).

Klonierung von *nhprnC-His₆*

Für die Konstruktion des Vektors pET28a(+)-*nhprnC-His₆* wurden die beiden Teilbereiche basierend auf den Vektoren pUC57-*nh153-His₆* und pCC1-*prnC-His₆* über PCR amplifiziert (Abbildung 98). In einem zweiten Schritt wurde über eine *Overlap Extension* PCR (oEPCR) das chimäre Gen erstellt (Abbildung 99).

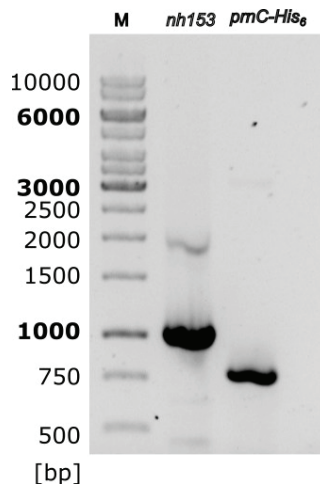


Abbildung 98: Analytisches Agarosegel zur PCR vom Sequenzbereich *nh153_Box* bis zur konservierten Sequenz FxxPxxSxG (gelb) und *prnC-His₆_Pyramid* ab der Sequenz FxxPxxSxG (orange). M steht hierbei für den Marker (Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der Temperatur 55.7 °C. Die verwendeten Primer sind JGE0215_NHprnC_prnC fw_NH153 OL, JGE0215_NHprnC_NH153 rv_prnC OL, NH153 fw OL und prnC-His6 rv_pET28a OL. Die erwarteten Bandengrößen sind für *nh153_Box* ~1000 bp und für *prnC-His₆* ~770 bp.

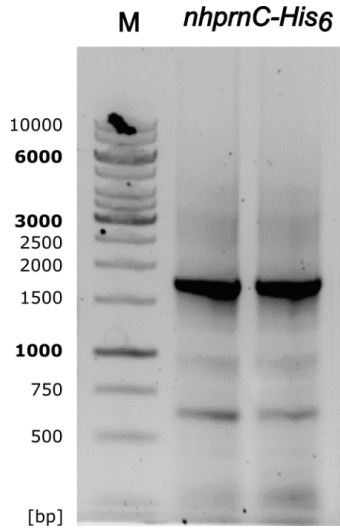


Abbildung 99: Analytisches Agarosegel zur α PCR vom Sequenzbereich *nh153_Box* und *prnC-His6_Pyramid* zu *nhprnC-His6*. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific™ O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp*). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der Temperaturen 47.1 °C und 51.4 °C. Die erwartete Bandengröße ist für *nhprnC-His6* ~1700 bp.

Expression von NHprnC-His₆

Nach einem Gibson Assembly erfolgte die Transformation von *E. coli* BL21(DE3) zum Produktionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*nhprnC-His6*. Für die Expression wurden 500 mL TB_{Kan}-Medium mit 1 % (v/v) Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 160 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.6 erfolgte die Induktion mit 100 μM IPTG. Nach Induktion wurde die Temperatur auf 20 °C und die Schüttelfrequenz auf 140 rpm reduziert. Die Zellernte erfolgte nach 24 h und ergab 7.5 g Zellen (CDW). Für die Reinigung von NHprnC-His₆ wurde das Protokoll zu PrnF-His₆ verwendet. Dazu wurden 7 g in 50 mL Äquilibriumspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 7.5) resuspendiert. Diese ~ 15 % (w/v) Resuspension wurde für den Aufschluss mit der EmulsiFlex verwendet. Nach der Reinigung wurden die verschiedenen Fraktionen in einer SDS-PAGE analysiert. Da eine Überexpression aber nicht ersichtlich wurde, erfolgte eine erneute Expression unter anderen Bedingungen. Dazu wurden 1 L TB_{Kan}-Medium mit 1 % (v/v) Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 160 rpm kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.4 erfolgte ein Kälteschock für 1 h bei 4 °C, sowie ein Ethanol-Schock mit 2 % (v/v) Ethanol. Dann erfolgte die Induktion mit 100 μM IPTG. Nach Induktion wurde die Temperatur auf 18 °C und die Schüttelfrequenz auf 140 rpm reduziert. Die Zellernte erfolgte nach 24 h und ergab 16 g Zellen (CDW). 5 g Zellen wurden in 25 mL Äquilibriumspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH = 7.5) resuspendiert. Diese ~ 20 % (w/v) Resuspension wurde für den Aufschluss mit Ultraschall und zur Reinigung (Abbildung 100) verwendet.

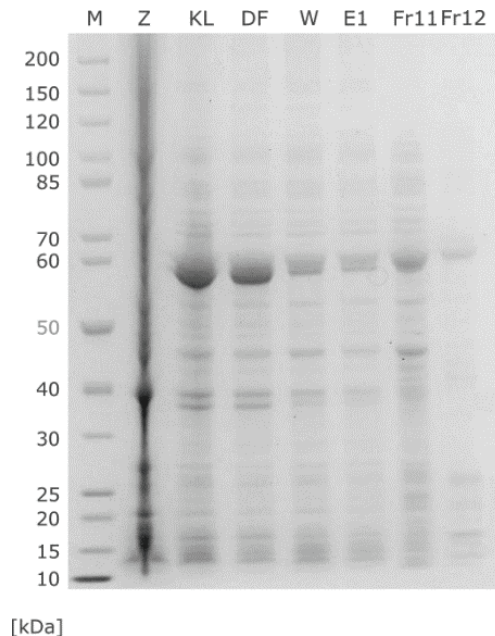


Abbildung 100: SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*nhprnC*-His₆ bei 20 °C. Gezeigt sind die Spuren M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von *Thermo Fisher Scientific Inc.*), Zellprobe vor Aufschluss (Z), geklärtes Lysat nach Zentrifugation (KL), Durchfluss bei Proteinauftragung auf die Säule (DF), Waschfraktion mit 100 mM Imidazol (W), Elutionsfraktion 1 (E1) mit 200 mM Imidazol und Fraktionen 11 und 12 der Elution mit 300 mM Imidazol. NHprnC-His₆ hat eine berechnete Größe von 61 kDa.

Die Zellprobe war überladen. Die erkennbare Doppelbande lässt auf die Produktion der Chaperonine schließen. Die Bande der Fr. 12 zeigt jedoch einen kleinen Teil Protein der erwarteten Größe. Jedoch ist die Menge so geringt, dass der Produktionsstamm gewechselt wurde. Nach Transformation von *E. coli* ArcticExpress(DE3) erfolgte die Expression analog zu *prnC*-His₉ bei 10 °C, 13 °C und 15°C. Nach 48 h bei 15 °C wurden die Zellen geerntet und ergaben 9 g CDW aus 500 mL Kultur. Diese 9 g wurden in 30 mL Äquilibriumspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH = 7.5) resuspendiert. Diese ~ 30 % (w/v) Resuspension wurde für den Aufschluss mit Ultraschall und zur Reinigung (Abbildung 101) verwendet. Auch bei dieser Expression sind zwei Banden um 60 kDa erkenntbar, die mutmaßlich für Zielprotein und Chaperonin stehen. Eine Elution ist allerdings nicht sichtbar.

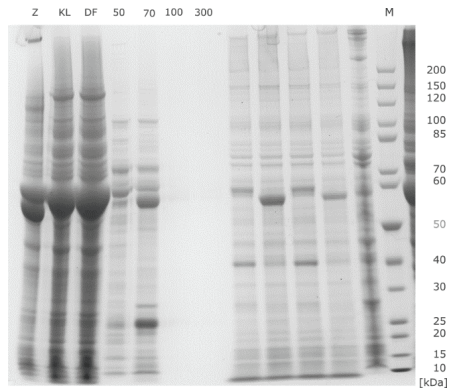


Abbildung 101: SDS-PAGE-Gel zum Reinigungsprofil der Expression von *E. coli* ArcticExpress(DE3) pET28a(+)-*nhprnC*-His₆ bei 15 °C. Gezeigt sind die Spuren Zellprobe vor Aufschluss (Z), geklärtes Lysat nach Zentrifugation (KL), Durchfluss bei Proteinauftragung auf die Säule (DF), Waschfraktion mit 50 mM Imidazol (50), mit 70 mM Imidazol (70), mit 100 mM Imidazol (100) und Elution mit 300 mM Imidazol (300). Außerdem steht M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von *Thermo Fisher Scientific Inc.*). Die nicht beschrifteten Spuren gehören zu einem anderen Experiment, sind aber wegen der Marker-Spur nicht ausgeschnitten worden. NHprnC-His₆ hat eine berechnete Größe von 61 kDa.

Zunächst ist festzustellen, dass die erhofften Verbesserungen bezüglich, Expressionstemperatur, -Stamm und Proteinausbeuten durch die Fusion der „Box“-Domäne und der „Pyramiden“-Domäne nicht erfolgreich war. Im Gegenteil. Eine Expression bei 15 °C und im Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) führte nicht zur Isolierung von Enzym nach der Affinitäts-Chromatographie und ist damit sogar eine Verschlechterung der Ergebnisse. Ein Grund dafür könnte in der falschen Position der „Fusionsnaht“ liegen. Betrachtet man die Unterteilungen der Domänen nach *Dachwitz et al.*, so lässt sich diese Trennung nicht direkt an der Sequenz ablesen, sondern viel mehr an der letzten langen α -Helix in der „Box“-Domäne und damit in der Proteinstruktur.^[189] Diese Domäntrennung zeigt sich in der Sequenz erst deutlich nach der in dieser Arbeit gewählten Sequenz FxxPxxSxG. Die maßgebliche Helix folgt erst nach der gewählten Sequenz, wie in der folgenden Abbildung 102 dargestellt.

Um also eine Art allgemeines Rückgrat der „Box“-Domäne mit vorteilhaften Eigenschaften zu finden, wie die hohe Proteinausbeute und Stabilität von NH153, sollte bei einem neuen Versuch der Bereich von NH153 bis hin zum konservierten Tyrosin (Y361) beibehalten werden und erst danach eine Fusion mit der „Pyramiden“-Domäne des Zielenzym erfolgen. Auch *Andorfer et al.* führen den Beginn der C-terminalen Domäne, der sie die Vermittlung der Substrat-Spezifität zuweisen, nach der hier als lange terminale „Box“-Domänen-Helix an.^[32] Sofern sich diese Strategie auch als Fehlversuch darstellt, ließe sich die Hypothese aufstellen, dass die Instabilität möglicherweise allein durch die C-terminale Domäne bestimmt ist. Für eine Mutagenese-Strategie zur Erhöhung der Stabilität könnte der Sequenzbereich und dadurch der Screening-Aufwand stark reduziert werden und bspw. durch eine „constraint network analysis“ bzw. einen CNA-Ansatz nur für die „Pyramiden“-Domäne verwirklicht werden.^[329]

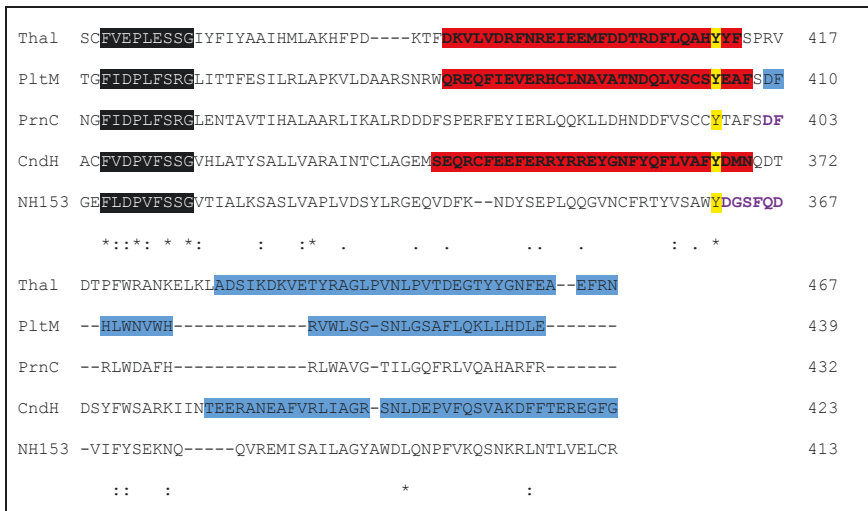


Abbildung 102: Ausschnitt des Sequenz-Alignments der Aminosäuresequenzen von Thal (PBD: 6h44), PltM (PDB: 6bza), CndH (PDB: 3e1t), PrnC-His₉ und NH153-His₆. Die Auswahl der Enzyme basiert auf den Gruppen nach *Dachwitz et al.*^[189] Das Asterisk (*) zeigt in allen Sequenzen konservierte Aminosäuren (aa) an der gleichen Position. Der Doppelpunkt (:) hebt aa mit stark ähnlichen Eigenschaften hervor und der Punkt (.) deutet aa mit schwach ähnlichen Eigenschaften an. Hervorgehoben sind außerdem die konservierten Sequenzen FxxPxxSxG (schwarz) vor der „Fusionsnaht“, sowie die letzte lange Helix der „Box“-Domäne (rot). Für PrnC und NH153 der Bereich nach der letzten langen Helix in lila. Außerdem ist die in *Dachwitz et al.*^[189] bezeichnete „flexible, kleine Unterdomäne“ (blau), die im Prinzip der „Pyramiden“-Domäne entspricht. Letztlich ist in gelb ein konserviertes Tyrosin im Bereich der letzten langen „Box“-Domänen-Helix hervorgehoben.

Generell ist die Strategie der Domänen-Fusion im Sinne dieser Arbeit eher nicht gängig und nach unserem Wissen für die Halogenasen bisher nicht erfolgt. Diese Strategie der „Domänen-Insertion“^[330] zeigte sich aber bspw. für die Phosphoglycerat-Kinase erfolgreich.^[331] Häufiger findet man in der Literatur (Fusionen von *tags* ausgenommen) entweder die Fusion von Bindedomänen für Materialien oder Substrate an katalytische Domänen und Enzyme^[332], oder die Fusion von Reduktasen oder deren Domänen an Monooxygenasen zur Bereitstellung eines selbstversorgenden artifiziellen Ein-Komponenten-Systems.^[333] Auch die Proteinfusion von Flavin-Reduktasen an Halogenasen über Linker-Systeme mit dem gleichen Ziel wurden bspw. für RebF und RebH durchgeführt.^[217] Alternativ gibt es generell in der Disziplin des Protein-Designs die Bestrebung „*de novo*“ Proteine mit Funktionen zu produzieren^[334], diese Designs beginnen jedoch komplett von Beginn an („*from scratch*“) und gehen weit über die Erstellung chimärer Enzyme durch Domänenfusion hinaus.

8.6 Etablierung literaturbekannter Halogenasen

Neben dem Fokus der Etablierung von Flavin-abhängigen Halogenasen für pyrrolbasierte Naturstoffe, sollten bereits gut beschriebene Halogenasen der anderen Struktur motive für die Funktionalisierung bereitgestellt werden. Einerseits war das Ziel die Möglichkeit zu schaffen, über Pyrrole hinaus, auch Indolalkaloide auf Basis von Tryptophan und phenolische Naturstoffe (Abbildung 40) derivatisieren zu können, wie bspw. das Violacein (**48**) und Physostigmin (**49**). Andererseits sollten auch Indol-Varianten der Prodiginine **31** halogeniert werden können, um an mehreren Positionen eine Funktionalisierung zu ermöglichen. Eine letzte Gruppe von Naturstoffen, die durch die Tryptophan-Halogenasen adressiert werden sollte, waren die über Anthranilsäure (**50**) gebildeten Chinolin-Alkaloide der Aurachine **51**.

8.6.1 Tryptophan-Halogenase PrnA

Zur Konstruktion von pET28a(+)-*prnA*-His₆ wurde der Vektor pUC57-prnABCDF als Templat genutzt. Die Gradienten-PCR (Abbildung 103 A) war für die verschiedenen Temperaturen erfolgreich. Nach Gelelution wurde ein Gibson Assembly durchgeführt. Zusätzlich wurden zwei Varianten von PrnA, PrnA (F103A) und PrnA (E450K_F454K) über eine *Round-the-Horn* PCR (R_HPCR) (Abbildung 103 B) generiert. Hierfür diente das neue Konstrukt pET28a(+)-*prnA*-His₆ als Templat. Nach der Gelelution und Ligation erfolgte die Transformation von *E. coli* ArcticExpress(DE3) mit allen drei Konstrukten.

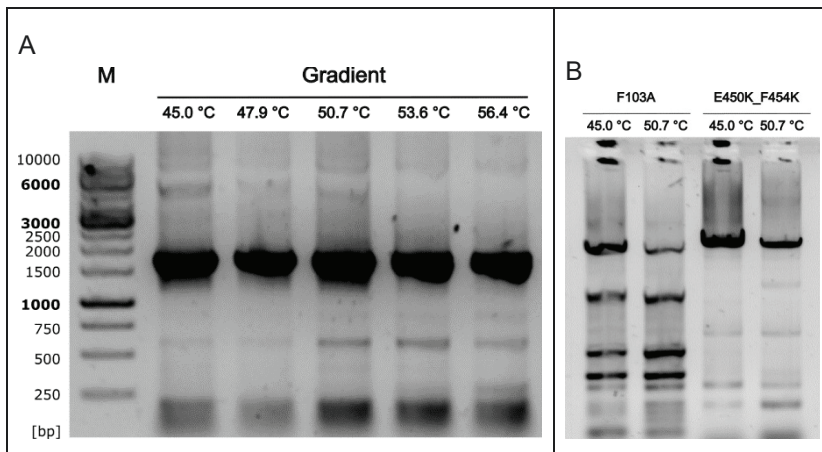


Abbildung 103: A) Analytisches Agarosegel zur PCR von *prnA*-His₆ mit Überhängen für pET28a(+). Als Primer wurden JGE0339_prnAHis_fw_OL_pET und JGE0339_prnAHis_rv_OL_pET verwendet. M steht hierbei für den Marker (*Thermo Scientific*TM *O'GeneRuler* 1 kb DNA Ladder, Ready-to-Use- 250-10,000 bp). Aufgetragen wurden die Amplifikationen der einzelnen Temperaturen. Die erwartete Bandengröße für *prnA*-His₆ beträgt ~1700 bp. B) Analytisches Agarosegel zur R_HPCR von pET28a(+)-*prnA*-His₆ zu pET28a(+)-*prnA*-His₆ (F103A) und (E450K_F454K). Aufgetragen wurden die Amplifikationen für die Temperaturen 45 °C und 50.7 °C. Als Primer wurden JGE0339_prnAHis_fw_F103A_RTH, JGE0339_prnAHis_rv_F103A_RTH, JGE0339_prnAHis_fw_Anthra_RTH und JGE0339_prnAHis_rv_Anthra_RTH verwendet.

8.6.2 Phenol-Halogenase RadH

Die Halogenase RadH wurde als synthetisches Konstrukt nach eigenem Design erhalten. Zur Expression von *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+)-*radH*-His₆ (D465E;T501S)-*fre*-His₆ und *E. coli* Tuner (DE3) pET28a(+)-*radH*-His₆ (D465E;T501S)-*fre*-His₆ bei 20 °C und 180 rpm wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5 mit 100 µM IPTG induziert. Ein Kälteschock oder ähnliches wurde nicht durchgeführt. Die Zellernte erfolgte nach 16 h. Aus den 500 mL Kultur wurden ca. 2.7 g Zellpellet (CDW) für *E. coli* BL21(DE3) und 3.2 g für *E. coli* Tuner (DE3) gewonnen. Für den Aufschluss wurde jeweils 1 g Zellen in Lagerungspuffer (25 mM KP_i, 300 mM NaCl, pH = 7.5 mit 10 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und mittels Ultraschalls aufgeschlossen. Die Expression war anhand der Bandengröße nur für RadH-His₆ (D465E;T501S) in *E. coli* BL21(DE3) erfolgreich (Abbildung 104).

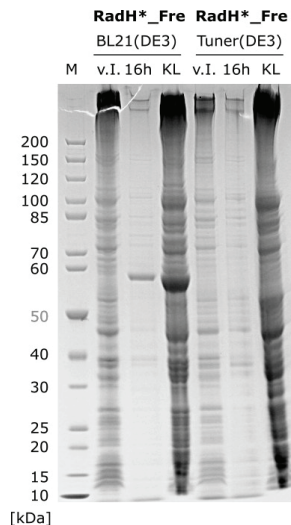


Abbildung 104: SDS-PAGE-Gel zur Expression von *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*radH*-His₆ (D465E;T501S)-*fre*-His₆ und *E. coli* Tuner(DE3) pET28a(+)-*radH*-His₆ (D465E;T501S)-*fre*-His₆ bei 20 °C. Gezeigt sind die Spuren steht M für Marker (PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter, 10 bis 200 kDa von Thermo Fisher Scientific Inc.), Zellproben vor der Induktion (v.I.), Zellproben vor Ernte (16h), sowie geklärtes Lysat nach Zentrifugation (KL). Das Asterisk (*) steht für die Doppelmutation von RadH. Sowohl RadH und Fre liegen His-tagged vor. RadH-His₆ hat eine berechnete Größe von 57.5 kDa und Fre-His₆ von 27.3 kDa.

8.6.3 Etablierung einer Analytik

Um eine einfache Analyse für Aktivitätstests der Tryptophan-7-Halogenase PrnA zu etablieren, wurden die Komponenten Tryptophan (**23a**), 7-Chlortryptophan (**23b**), Anthranilsäure (**50**) und 3-Cl-**50** via RP-HPLC analysiert. Die Chromatogramme sind in den folgenden Abbildung 105 und Abbildung 106 gezeigt.

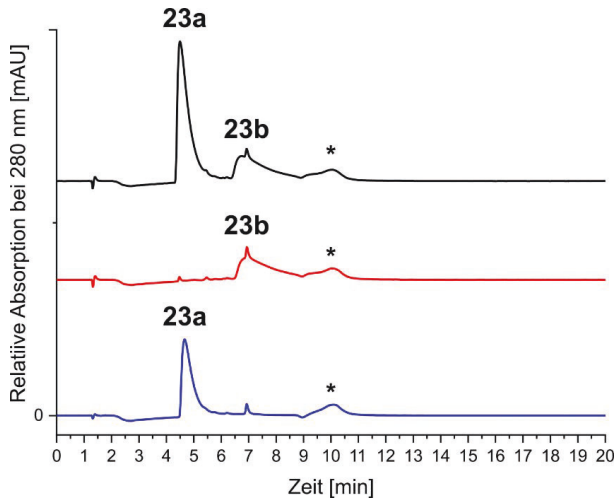


Abbildung 105: Chromatogramme der RP-HPLC zur Analyse von Tryptophan (**23a**) und 7-Chlor-Tryptophan (**23b**) bei 280 nm. Gezeigt sind die einzelnen Spuren für **23a** (blau) und **23b** (rot), sowie eine Probe mit beiden Komponenten (schwarz). **23a** zeigte eine Retentionszeit von 5,3 min und **23b** hatte eine Retentionszeit von 7,3 min. Beide Komponenten zeigen tailoring, wobei **23b** ein wesentlich undeutlicheres Signal gibt. Das Asterisk (*) zeigt eine unbekannte Verunreinigung.

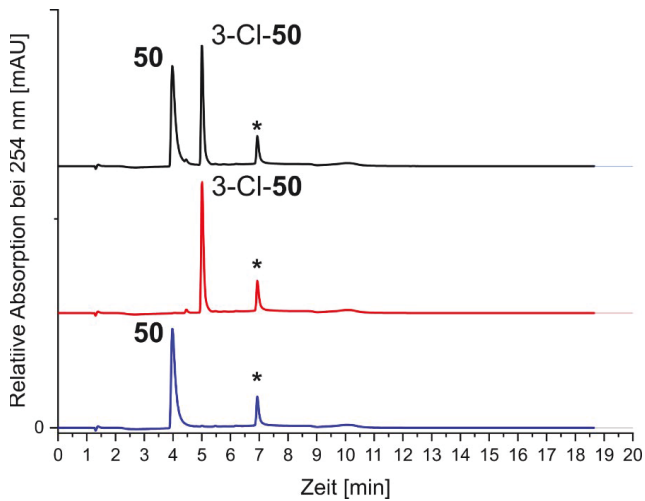


Abbildung 106: Chromatogramme der RP-HPLC zur Analyse von Anthranilsäure (**50**) und 3-Chlor-Anthranilsäure (**3-Cl-50**) bei 254 nm. Gezeigt sind die einzelnen Spuren für **50** (blau) und **3-Cl-50** (rot), sowie eine Probe mit beiden Komponenten (schwarz). Anthranilsäure zeigte eine Retentionszeit von 4,7 min und 3-Chlor-Anthranilsäure hatte eine Retentionszeit von 6,7 min. Das Asterisk (*) zeigt eine unbekannte Verunreinigung.

Für die Analyse der Aktivität von RadH wurde Umbelliferon (**25j**) vermessen. Die folgende Abbildung 107 zeigt die Retentionszeit von **25j**, sowie das Chromatogramm der Lysatumsetzung von RadH mit Umbelliferon.

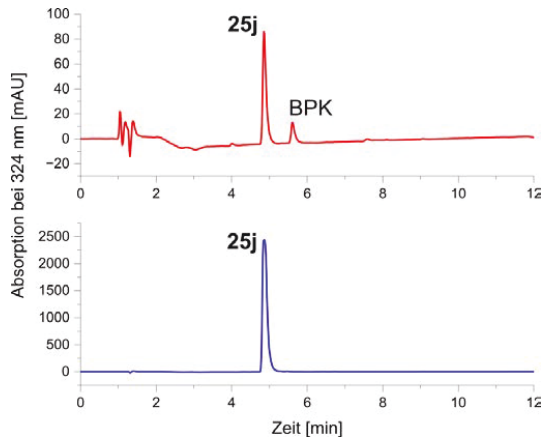


Abbildung 107: Chromatogramme der RP-HPLC zur Analyse von Umbelliferon (**25j**) und der Lysat-Umsetzung von RadH mit **25j** bei 254 nm. Gezeigt ist die einzelne Spur für **25j** (blau) und die Umsetzung mit Lysat (rot). Umbelliferon zeigte eine Retentionszeit von 4.8 min und das Biokatalyseprodukt (BKP) hatte eine Retentionszeit von 5.6 min mit einer prozentualen Fläche zum Umbelliferon von 8.3 %.

Die Bereitstellung von PrnA in *E. coli* ArcticExpress (DE3) dient der generellen biokatalytischen Anwendung zur Halogenierung von Indol-Gerüsten. Die Erstellung der Mutante F103A nach Vorbild von *Lang et al.* kann der weiteren Untersuchung ihrer Hypothese dienen, dass mit dieser Variante eine teilweise Umorientierung von Tryptophan erfolgt.^[216] Dies könnte für nicht natürliche Substrate sogar eine größere Rolle spielen. Um genau diese Substratspezifität zu ändern erfolgte die zweite Mutagenese. Die Doppelmutante E450K_F454K basiert auf den Ergebnissen von *Shephard et al.*, die mit dieser Variante die Umsetzung von Anthranilsäure (**50**) von unter 2 % für den Wildtyp auf fast 30 % mit gemischtem Chlorierungsmuster (Position 3 und 5) steigern konnten.^[155] PrnA und seine Varianten werden dann zu interessanten Enzymen für die Derivatisierung von pharmazeutisch relevanten Chinolinen.^[335] Die etablierte Analytik kann dann sowohl für die pBTBX-2-Konstrukte, als auch für die pET28a(+)-Konstrukte genutzt werden. Die Expression von *radH* erfolgte analog zur Proteinproduktion von *Menon et al.* bei 20 °C und lieferte qualitativ für die Variante D465E_T501S ähnliche Ausbeuten. Diese Variante wurde einerseits beschrieben als aktiver für 7-Hydroxy-Cumarine (Umbelliferon) und 7-Hydroxyisochinoline, als auch besser exprimierbar in *E. coli*. Die Nutzung von Lysaten und daher fehlende Angaben zur Proteinmenge machen den Vergleich zur Umsetzung von *Menon et al.* unmöglich. Daher lässt sich nicht beurteilen, warum die 73 % Chlorierung in dieser Arbeit nicht erreicht werden konnten. Allerdings ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Enzymmenge im Lysat deutlich geringer als die von *Menon et al.* eingesetzten 15 µM. Warum die Reduktase Fre nicht sichtbar überexprimiert wurde ist nicht geklärt. Da weder im Konstrukt für eine mRNA, noch für zwei getrennte mRNAs die Reduktase sichtbar produziert wurde, sollte für eine Co-Expression ein dafür geeigneter Vektor wie pETDuet verwendet werden.^[336] Andere Strategien zur Optimierung zur Produktion rekombinanter Proteine^[337] erscheinen hier erst einmal nicht sinnvoll.

9. AUSBLICK

Die erzielten Ergebnisse stellen einen Startpunkt für weitere Untersuchungen dar, wie bspw. Up-Scaling-Versuche und Integration der Enzyme in Kaskaden und Biosynthesen. Diese möglichen Folgeprojekte sollen in den folgenden Punkten beleuchtet werden.

9.1 Cofaktor-Recycling-System (CRS):

Eine weitere Untersuchung der SsuE ist nicht zielführend, da die etablierte Reduktase PrnF hohe Aktivitäten und Ausbeuten aufweist. Allerdings sollte der Ansatz des Enzym-freien Cofaktor-Recyclings untersucht werden. Einerseits sind die NAD *mimics* eine vielversprechende Alternative zur GDH-basierten Cofaktor-Regeneration (Abbildung 108). Die Stabilität des BNA (**21d**) übersteigt die des NAD(P)H, da hier keine Hydrolyse von Phosphat-Gruppen stattfinden kann. In initialen Experimenten war die Synthese von **21d** mit 96 % nahezu quantitativ. Und auch der Reduktionsschritt zum BNAH (Dihydro-**21d**) zeigte mit 80 % gute Ausbeuten. Beide sind mit der Literatur vergleichbar. *Ismail et al.* zeigten für die Reduktion von FAD mit BNAH bei gleicher Konzentration (150 μM) eine Aktivität von 0.72 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Trotz der um den Faktor ~ 3500 geringeren Aktivität im Vergleich zum Reduktase-Ansatz mit PrnF (2.5 $\mu\text{M}/\text{mL}$), wurden mit 10 mM BNAH und 100 μM FAD teilweise 3.5x – 4.7x höhere Reaktionsgeschwindigkeiten für die Halogenierung mit RebH und Thal erreicht.^[181] Da FAD kommerziell erhältlich ist und BNA im Multigramm-Maßstab günstig darstellbar ist, sollte also für ein Up-Scaling von enzymatischen Halogenierungen auf die chemische Reduktion umgestiegen werden.

Alternativ zum Einsatz von NAD *mimics* bleibt auch die photochemische Reduktion von FAD^[338] mittels Blaulicht (455 nm) und EDTA als „*sacrificial reductant*“ eine attraktive Alternative und sollte auch für die Halogenasen dieser Arbeit untersucht werden, da sie eine einfache Produktabtrennung nach vollständiger Umsetzung ermöglicht.^[176]

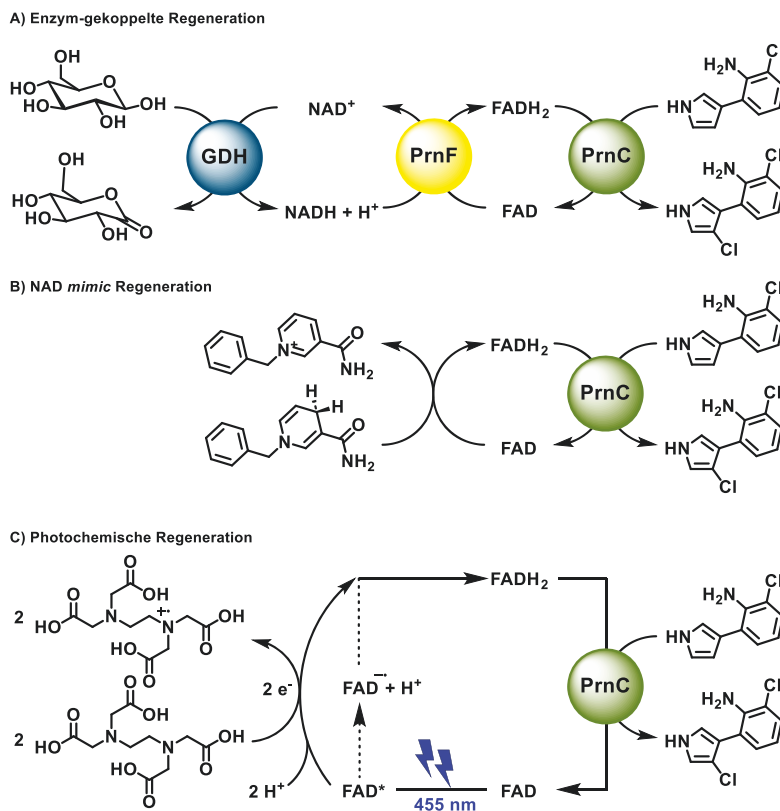


Abbildung 108: Cofaktor-Recycling-Systeme für die enzymatische Halogenierung. A) Enzym-basiertes Recycling mit Glucose-Dehydrogenase (GDH) und PrnF als Flavinreduktase. B) Direkte Reduktion von FAD mittels BNAH als NAD *mimic*. C) Anregung von FAD mit einer Wellenlänge von 455 nm und anschließender Reduktion durch den *sacrificial electron donor*^[339] Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)^{[340], [176]}

9.2 Biokatalyse mit PrnC

Die Darstellung der Halogenase PrnC gestaltet sich nach wie vor schwierig. Für eine industriell relevante Anwendung ist eine Optimierung der Expression und Isolation unumgänglich. Zunächst sollte eine Codon-optimierte Gensequenz zur Expression genutzt werden und auf die Einhaltung des His₆-tags geachtet werden. Sollte die angepasste *codon usage* für eine bessere Expressionsrate und Ausbeute an löslichem Protein nicht ausreichen, kann über eine Zufallsmutagenese mittels *error prone* PCR eine stabilere Proteinvariante gesucht werden. Neben Aktivitätstests und Ausbeuten kann dann über die Bestimmung der Schmelztemperatur die Verbesserung nominell bestimmt werden. Auch die Fusion mit der Reduktase PrnF kann in einem Folgeschritt nach dem Vorbild von RebF und RebH untersucht werden^[217], da PrnF selbst gute Ausbeuten zeigt

und möglicherweise N-terminal als eine Art Löslichkeits-*tag* fungieren kann. Nützlicher Nebeneffekt wäre bei der Beibehaltung des Enzym-basierten CRS die Verminderung von Expressionen und Reinigungen auf ein Fusionsprotein. Ein N-terminaler His-*tag* würde zudem die Modifikation der Halogenase bis auf den Linker reduzieren. Beachtet werden muss allerdings die beschriebene Dimer-Bildung von PrnC, die *Peh et al.* beobachteten.^[304] Alternativ wären klassische Fusionsproteine mit Maltose-Bindeprotein (MBP)^[213, 341] und ggf. TEV-Schnittstelle eine Option und ermöglicht eine reine Elution des Wildtypen.^[191] Im Vergleich zu RebH könnte auch die combiCLEAS-Strategie ein Erfolg sein, da PrnC so direkt aus dem Lysat mit der Reduktase PrnF und ggf. auch mit CRS immobilisiert werden könnte.^[301] Neben der Halogenierung von Aryl-substituierten Pyrrolen sollten nach wie vor weitere Strukturen in der Analyse untersucht werden (Abbildung 109). Obgleich Furane und Thiophene nicht reaktiv genug erscheinen, so ist doch eine Halogenierung von Pyrrolochinolinen^[342] und Pyrroloindolen^[343] in einem nächsten Schritt sinnvoll, um die Limitierungen der Substrat-Bindetaste zu untersuchen. Sollte die Halogenierung dieser Strukturen nicht erfolgreich sein, so sind die Chlorierungen von APPs als Vorstufen von Marinochinolinen^[276] als Vertreter der Pyrrolochinoline ein interessantes Ziel. Nach Etablierung eines geeigneten Maßstabes sollten weitere Optimierungen zur Bereitstellung auch von Fludioxonil-Derivaten erfolgen,^[285, 304] sowie die Untersuchung zur Möglichkeit der Oxidation von Pseudohalogeniden anstelle von Halogeniden, wie es für die Myeloperoxidase gezeigt wurde.^[344] Nachdem *Peh et al.* zeigen konnten, dass auch Pyrrole mit Substituenten an 2-Position halogeniert werden können,^[304] sollte für das Ziel der Prodiginin-Halogenierung auch MBC für die Chlorierung untersucht werden. Die Halogenierung am A-Ring erscheint hierbei am wahrscheinlichsten. Die gezeigte Halogenierung von Acryl-Pyrrolen kann außerdem für die Substitution von MAP im Falle des Prodigiosins interessant sein. Sollte diese Strategie nicht erfolgreich sein, wäre der Wechsel, vor allem für die Halogenierung von Prodigiosin durch unspezifische Halogenasen wie HalB, BrvH, VirX1 und Weitere denkbar. Es sollte sich jedoch um Enzyme der Gruppe Spätphasen-Halogenasen („*late stage halogenases*“) handeln.^[192] Dabei wäre zusätzlich die Verwendung von natürlichen Ein-Komponenten-Systemen zu empfehlen, wie beispielsweise die phenolische VemK^[228] oder die Tryptophan-Halogenase AetF^[345].

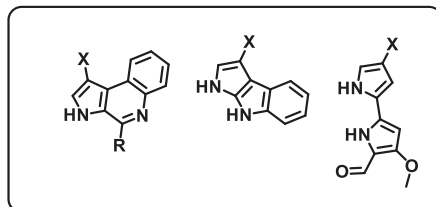


Abbildung 109: Potentielle Substrate von PrnC. X zeigt die putative Halogenierungsposition am Pyrrolochinolin, Pyrroloindol und MBC.

9.3 Biosynthese mit PrnC, PltA und PRN

Mit der zentralen Motivation der Arbeit durch Pyrrol-Halogenasen die Produktion von vor allem chlorierten Derivaten der Prodiginine **31** (Abbildung 110) zu ermöglichen, könnten sich sowohl PrnC, als auch PltA durch die Derivatisierung von MBC eignen. Durch eine Expression von *prnC* im Stamm *P. putida* pig-r2 Δ *pigD* könnte das sich akkumulierende MBC halogeniert werden, bevor das Prodigiosin-Derivat durch Zugabe eines Monopyrrols wie MAP gebildet wird. Letzteres wird mutmaßlich für PrnC unzugänglich sein.

Eine Untersuchung für das Finden eines geeigneten Zeitpunktes der Zugabe des Monopyrrols – nämlich einer maximalen Menge an chloriertem MBC – kann durch HPLC-Analysen erfolgen. Gleiches gilt für die Halogenase PltA. Nach erfolgreicher Expression sollte die Funktionalität von PltA über SNAc-Substrate untersucht werden. Wenn diese Aktivitätstests chloriertes Produkt zeigen, kann in einem nächsten Schritt MBC untersucht werden. Sollten sich mit PltA dann keine halogenierten MBC-Derivate zeigen, kann über *knock-out*-Studien zu PigF, PigM, PigH und PigJ das zu optimierende Enzym gefunden werden. Beginnend von PigF rückwärts kann so analysiert werden, bis zu welchem Intermediat in der Biosynthese das doppelt chlorierte Carrier-Pyrrol noch akzeptiert wird. Alternativ bleibt für die Halogenierungsmöglichkeiten dieser Arbeit andernfalls nur die Option der Halogenierung von Indol-Analoga des Prodigiosins wie bspw. dem Obatoclox^[346] als Zielstruktur bspw. über die Tryptophan-Halogenasen. Für die Biosynthese von Pyrrolnitrin (Abbildung 35) sollte in einem kommenden Schritt entweder das Cluster in einen Shuttle-Vektor für *Corynebacterium glutamicum* überführt werden, um die optimierten Stämme zur Produktion von Tryptophan zu verwenden, die als fermentative Produktionsstämme für die Bromierung publiziert wurden,^[218] oder eine analoge Anpassung des Metabolismus von *P. putida* KT2440 erfolgen, um die Titer von Tryptophan und folglich PRN und dessen Derivate zu erhöhen. Hierfür können die Produktionsstämme von Protocatechusäure als Vorlage genommen werden.^[347] Im Falle einer funktionalen Produktion könnte dann das Cluster bspw. durch Enzyme der Marinochinoline (Abbildung 38) erweitert werden. Generell bleibt die Überlegung bestehen, ob Halogenasen die als *late-stage* Enzyme bezeichnet werden, zu bevorzugen sind, um halogenierte Prodiginine zu produzieren.

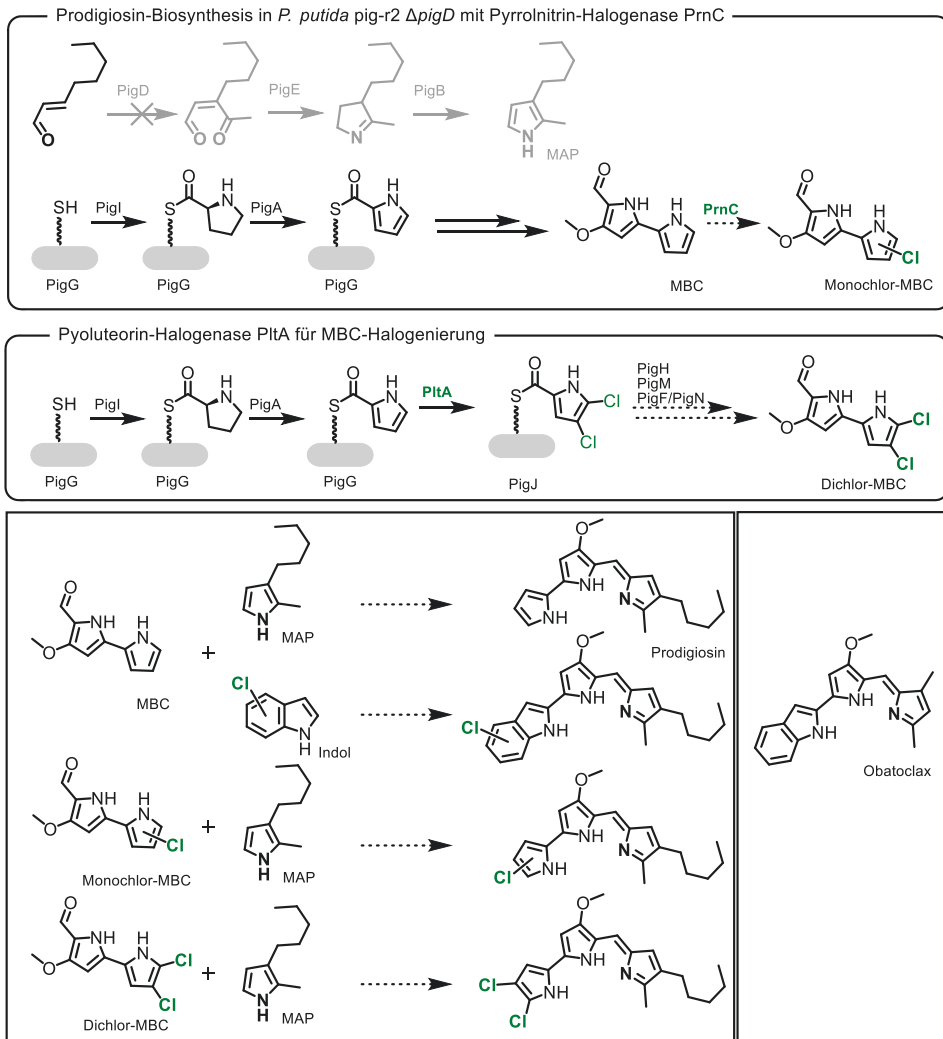


Abbildung 110: Übersicht über die gegabelte Biosynthese von Prodigiosin (**31a**) in Kurzform, mit den beiden Einzelrouten für MBC (**32**) und MAP (**33**). Der Biosynthesezweig von MAP ist durch den *knock-out* von *pigD* (durchkreuzter Pfeil) ausgeschaltet und daher in grau gezeigt. Diese Zusammensetzung der Prodigiosin-Biosynthese entspricht dem Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD und eignet sich für die Fütterung von Monopyrrolen. Dargestellt sind außerdem die hypothetischen, chlorierten Produkte von MBC nach Halogenierung mit PrnC (Monochlor-MBC) und das dichlorierte MBC durch Integration von *pItA* in den Biosynthesezweig von MBC. Die Kombination aus MBC und chlorierten Derivaten mit MAP ergibt Prodigiosin und die halogenierten Prodiginin-Derivate. Bei Kondensation von MBC mit einem halogenierten Indol kann ein Indol-Derivat des Prodigiosins entstehen, wie es bspw. das Prodiginin Obatoclax ist.

9.4 Putative Halogenasen

Für die Untersuchung der putativen Halogenase NC201 ist eine Expression nach Bedingungen von PrnC denkbar, da hier eine lösliche Proteinproduktion wahrscheinlicher ist. Ist eine Proteinbildung nachzuweisen, kann anschließend in einer Optimierung der Expression wieder schrittweise zu höheren Temperaturen gewechselt werden. Alternativ können auch der Vektor und Produktionsstamm gewechselt werden. Für NH153 sind die nächsten Schritte die Wiederholung der Kristallisation unter gleichen Bedingungen und die Optimierung der Kristallisation, basierend auf den gefundenen Konditionen. Integriert werden sollte im Zuge der Reinigung auch eine Größenausschlusschromatographie für die Bereitstellung einer monodispersen Proteinlösung. Parallel können erste Untersuchungen zum natürlichen Substrat erfolgen. Entsprechend der AntiSMASH-Ergebnisse wäre die Umsetzung von Alkylphenolen ein erster Schritt, sowie die SNAc-Derivate von Tyrosin und Hydroxybenzoesäuren, sowie die freie Hydroxybenzoesäure. Nach erfolgter Kristallisation und Lösung der Proteinstruktur kann ein Docking mit Substraten durchgeführt werden und ein Vergleich der Struktur mit dem Phyre2-Strukturhomologie-modell^[1] dieser Arbeit erfolgen, um die konservierten Aminosäuren, wie das Lysin, genau zu definieren.

9.5 Chimäres Enzym NHprnC

Wie in der Diskussion angerissen, kann für das chimäre Enzym NHprnC aus N-Terminus von NH153 und C-Terminus von PrnC eine optimierte Klonierstrategie über die neue Fusionsnaht Aufschluss über die Funktionalität und die Labilität der „Box“-Domäne geben. Ist dieser Versuch erfolgreich, eröffnet sich die Möglichkeit einer universellen „Box“-Domäne mit variierender „Pyramiden“-Domäne, die die Substratspezifität bestimmt. Ebenso könnte eine Deletion der C-terminalen Domäne von PrnC untersucht und unter gleichen Bedingungen wie NH153 Kristallisiert werden. Wenn sich die Aubeuten und Stabilität der N-terminalen „Box“-Domäne von PrnC denen von NH153 nähern, kann sich bei der Sequenzoptimierung auf die C-Terminale „Pyramiden“-Domäne von PrnC und NHprnC konzentriert werden. Damit wäre experimentell unterlegt, dass die „Pyramiden“-Domäne für die Stabilität und Produzierbarkeit ausschlaggebend ist. Zusätzlich zur weiteren Untersuchung dieser chimären Strategien ist auch die Bereitstellung von PrnC als Ein-Komponenten-System nach Vorbild von VemK und AetF eine Möglichkeit, um idealerweise Stabilität und Ausbeute zu erhöhen. Neben der Funktion als N-terminaler Löslichkeits-*tag* bietet die Fusion einer Reduktase an PrnC auch eine größere Simplität, da für die Halogenierung nur noch ein Protein produziert werden muss. Durch eine geeignete Linkerwahl könnte sich auch hier ein Standardkonstrukt ergeben, bei dem beliebig die Halogenase getauscht werden kann.

9.6 PrnA und RadH

Die beiden Literaturbekannten Halogenasen PrnA und RadH können nach den publizierten Bedingungen produziert, gereinigt und in Umsetzungen verwendet werden. Mit der etablierten Analytik können Tryptophan-7-Halogenasen über HPLC auf Aktivität untersucht werden. Der Produktionsstamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) pET28a(+) *prnA-His₆* wurde zur Expression bereitgestellt und kann für die Halogenierung von Indolen und Tryptophan genutzt werden. Auch die beiden Varianten PrnA (F103A) für eine Tryptophan-Halogenierung in Position 5 und 7 im Verhältnis 1:2 und PrnA (E450K_F454K) für die Umsetzung von Anthranilsäure stehen zur Expression bereit. Für die Halogenase RadH sollte die Entfernung der Reduktase aus dem Vektor erfolgen. Die bereitgestellte RadH, die eine Produktbildung im Lysat zeigte, bildet aber schon jetzt den Startpunkt für die Halogenierung von Phenolen. Analog zu Tryptophan und Anthranilsäure, sollte eine HPLC-Analytik für das chlorierte Umbelliferon erfolgen, um das Signal eindeutig der Halogenierung zuzuordnen. Anschließend kann an einer Optimierung der Reaktionsbedingungen zu vollem Umsatz erfolgen. Eine Kombination der Halogenasen PrnA und RadH mit Pyrrol-Halogenasen wie PrnC wäre bei geeignetem Zielmolekül ebenfalls möglich. So könnten mit RadH und PrnA doppelt halogenierte Violaceine an jeweils einem Indolring entstehen (Abbildung 40) oder die Kombination aus PrnA und PrnC doppelt halogenierte Marinochinoline hervorbringen (Abbildung 38).

10. GENERELLER EXPERIMENTALTEIL

10.1 Allgemeines

10.1.1 Geräte und Laborbedarf

In diesem Abschnitt werden sowohl manuelle als auch elektrische Geräte beschrieben, die zur Durchführung der Experimente essentiell waren. Unter Laborbedarf wird hier im weiteren Sinne alles betrachtet, was als Verbrauchsmaterialien bezeichnet wird.

Tabelle 8: Herstellerangaben zu den in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
Pipetten	
<i>Eppendorf Research</i> [®] , Pipette 0,1–2,5 µL	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Research</i> [®] , Pipette 0,5–10 µL	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Research</i> [®] , Pipette 10–100 µL	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Research</i> [®] , Pipette 100–1000 µL	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Gilson Pipetman</i> [®] , Pipette 0,5–5 mL	<i>Gilson</i> , Middleton, WI, USA
<i>Eppendorf Research</i> ^{® Plus} , Pipette 10–100 µL; 12 Kanal	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Research</i> ^{® Plus} , Pipette 30–300 µL; 8 Kanal	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Rainin</i> [™] <i>Pipet-Lite XLS</i> , Pipette 20–300 µL LTS; 8 Kanal	<i>Mettler-Toledo GmbH</i> , Gießen
<i>Rainin</i> [™] <i>Pipet-Lite XLS</i> , Pipette 100–1200 µL LTS; 6 Kanal	<i>Mettler-Toledo GmbH</i> , Gießen
Zentrifugen	
<i>Eppendorf Centrifuge 5242R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL)	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Eppendorf Centrifuge 5810R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL)	<i>Eppendorf SE</i> , Hamburg
<i>Beckman Coulter Type 50.2 Ti Rotor</i> , Festwinkel-Zentrifugationsrotor	<i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA
<i>Thermo Scientific</i> [™] <i>Sorvall</i> [™] <i>RC 6 Plus Zentrifuge</i>	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sorvall</i> [™] <i>F10S-4x1000</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA

<i>Sorvall™ F9S</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Thermo Scientific™ Sorvall™ Lynx 6000 centrifuge</i>	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Thermo Scientific™ Fiberlite™ F12-6 x 500 LEX</i> Festwinkelrotor mit Auto-Lock	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Fiberlite™ F21-8 x 50y</i> Festwinkelrotor	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Thermo Scientific™ Fiberlite™ F9-6 x 1000 LEX</i> Festwinkelrotor	<i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA
Schüttler/Inkubatoren	
BioCote Stuart rotator SB2, Rotationsschüttler (37 °C Raum)	<i>BioCote Ltd</i> , Wolverhampton, UK
Eppendorf Thermomixer compact, beheizt (1.5 – 2 mL)	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Hettich Benelux MKR23, beheizt/gekühlt (1.5 – 50 mL)	<i>Hettich Benelux B.V.</i> , Geldermalsen, Niederlande
New Brunswick™ Innova® 42R	<i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland
Waagen	
Sartorius MC1, Laborwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Sartorius LA1200S, Feinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Sartorius 2004MP, Ultrafeinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
PCR Cycler	
VWR Doppio	<i>VWR International GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland
Biometra TProfessional Basic Gradient	<i>Analytik Jena AG</i> , Jena, Deutschland
Zellaufschluss	
Sonopuls HD2070, diverse Horngrößen (1.5–50 mL)	<i>Bandelin electronic GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
EmulsiFlex-C5	<i>Avestin Europe GmbH</i> , Mannheim, Deutschland

<p>Ultraschallbad</p> <p>Sonorex RK 100H</p>	<p><i>Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland</i></p>
<p>Elektroporator</p> <p>ÄKTA™ Purifier</p>	<p><i>GE Healthcare, München, Deutschland</i></p>
<p>Chromatographie (Proteinreinigung)</p> <p>MicroPulser Electroporator</p>	<p><i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland</i></p>
<p>Geldokumentationssystem</p> <p>INTAS GeliX Imager</p>	<p><i>INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland</i></p>
<p>Agarosegelelektrophorese</p> <p>300 V Netzgerät</p> <p>Agarosegel-Kammern</p>	<p><i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i></p> <p><i>peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland</i></p>
<p>Gelelektrophorese für SDS-PAGE</p> <p>Gelelektrophoresesystem für Invitrogen precast SDS-PAGE-gels (XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System)</p> <p>Bio-Rad Mini-Protean® Tetra System</p>	<p><i>Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland</i></p> <p><i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland</i></p>
<p>Heißluftpistole</p> <p>Steinel HG3002LCD Typ 3458</p>	<p><i>Steinel Vertrieb GmbH, Herzebrock-Clahrholz, Deutschland</i></p>
<p>Heizschrank</p> <p>Jouan Innovens 234 EU1</p>	<p><i>Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA</i></p>
<p>Magnetrührer mit Heizplatte</p> <p>Heidolph MR 3001 K, kombiniert mit EKT HeiCon Kontaktthermometer</p>	<p><i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland</i></p>

<p>pH-Meter</p> <p>Mikroprozessor-pH-Meter 764</p> <p>pH-Elektrode</p> <p>NORDANTEC pH-Elektrode IJ44C</p> <p>pHenomenal® pH 1100L</p>	<p><i>Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland</i></p> <p><i>NORDANTEC GmbH, Bremerhaven, Deutschland</i></p> <p><i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i></p>
<p>UV-Lampe</p> <p>Prinz UV-Testlampe für Netzbetrieb</p>	<p><i>PRINZ Verlag GmbH, Passau, Deutschland</i></p>
<p>Rotationsverdampfer</p> <p>Büchi Rotavapor® R-210 Rotationsverdampfer mit Büchi B-491 Heizbad und Büchi V-700 Membranpumpe</p> <p>Büchi Rotavapor® R-114 Rotationsverdampfer mit Büchi B-480 Heizbad und Büchi V-700 Membranpumpe</p>	<p><i>Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland</i></p> <p><i>Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland</i></p>
<p>Pumpen</p> <p>Vaccubrand RZ 6 Drehschieberpumpe</p> <p>DIVAC 1.2 L Membranpumpe</p>	<p><i>Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland</i></p> <p><i>Leybold GmbH, Köln, Deutschland</i></p>
<p>Photometer</p> <p>Tecan Infinite® M1000 PRO, Mikrotiterplatten</p> <p>Shimadzu UV-1800; temperiert (Küvetten)</p> <p>NanoDrop 2000c, Kleinvolumenphotometer</p>	<p><i>Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz</i></p> <p><i>Shimadzu, Duisburg, Deutschland</i></p> <p><i>Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA</i></p>
<p>Fotoapparat</p> <p>Canon EOS 1000D, digitale Spiegelreflexkamera mit EF-S 60 mm f/2.8 USM Makroobjektiv</p> <p>Canon EOS 6D Mark II, digitale Spiegelreflexkamera mit Canon EF 24 – 105 mm f/4L IS USM Objektiv</p>	<p><i>Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland</i></p> <p><i>Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland</i></p>

Lösemittel-Trocknungsanlage <i>MB-SPS-800 solvent purification system</i>	<i>M. Braun Inertgas-Systeme GmbH, Garching, Deutschland</i>
Analytische Geräte <i>GC-MS Trace 1310 Gaschromatograph</i> <i>Dionex HPLC</i> <i>LC-MS; UltiMate 3000 HPLC, Dionex</i> <i>NMR Advance/ DRX 600 NMR Spectrometer</i>	<i>Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA</i> <i>Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA</i> <i>Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA</i> <i>Bruker Corporation, Billerica, MA, USA</i>

Zu den weiteren Verbrauchsmaterialien – welche in der Regel Einwegprodukte waren – zählen bspw. die verwendeten Pipettenspitzen (0.5–5000 µL) der verschiedenen Firmen. Außerdem fanden in dieser Arbeit Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL, 15 mL & 50 mL) Verwendung, Petrischalen in diversen Maßen aus Plastik und Mikrotiterplatten (Nunc[®]; Polystyrol, flacher Boden) von Nunc[™] *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA), sowie *Deep-Well* Platten (Polypropylen, lösungsmittelresistent, konischer Boden) von *Eppendorf AG* (Hamburg, Deutschland) und *FlowerPlates* (MTP-48-B, 48 Well) von *m2p labs GmbH* (Baesweiler, Deutschland). Außerdem fanden Semimikroküvetten (Polystyrol) von *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland), EP-102 Elektroporationsküvette von *cell projects Ltd* (Harrietsham, UK), sterile Einwegspritzen der *Injekt[®]* Serie (Polypropylen/Polyethylen) von *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Deutschland), sterile Spritzenfilter (0.20 µm, Celluloseacetatmembran) und Spritzenfilter mit regenerierter Cellulose (Sartorius Minisart RC4, 0.45 µm) von *VWR International GmbH* (Darmstadt, Deutschland) Verwendung. Zum austreichen von Kulturen wurden sterile *MoonLab[®]* Drigalskispatel (L-förmig, PS) der Firma *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland) genutzt. Zur Schnellanalytik in der Chemie wurden Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten mit Kieselgel 60 [Polygram[®]SIL G/UV₂₅₄; spezifische Oberfläche (BET) ≈ 500 m²/g, mittlere Porenweite 60 Å, spezifisches Porenvolumen 0.75 mL/g, Partikelgröße 5–17 µm] und DC-Platten mit Aluminiumoxid [Polygram[®]Alox N/UV₂₅₄; spezifische Oberfläche (BET) ≈ 200 m²/g, mittlere Porenweite 60 Å] von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) genutzt. Zur Produktreinigung in der *flash chromatography* fanden Kieselgel 60 (Partikelgröße 40–63 µm) von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) und basisches Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I, Partikelgröße 63–200 µm, pH-Wert bei 10 %iger Lösung zw. 8.5 – 10.5) von *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland) Anwendung.

10.1.2 Softwares und Applikationen

Für die diversen analytischen Anwendungen in Geräten, aber auch zur Ergebnisauswertung, Versuchsplanung und Darstellung wurden verschiedene Programme bzw. *Softwares* verwendet. Diese sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Programme mit Angaben zu Herstellern und Anwendung.

Software	Hersteller	Verwendung
ensochemLab 7.0.5	<i>enso Software GmbH</i>	Elektronisches Laborjournal für die Chemie
ChemBioDraw 16.0 & 18.0	<i>PerkinElmer Informatics</i>	Darstellung von Strukturformeln
CloneManager 9.4 Professional	<i>Scientific & Educational Software</i>	Planung von Klonierstrategien und Darstellung von Plasmidkarten
Design Expert 11 & 12	<i>StatEase, Inc.</i>	Planung & Auswertung von Experimenten
MestReNova 10.0 & 14.1.2	<i>Mestrelab Research S.L</i>	Analyse von NMR-, GC-MS- und LC-MS-Daten
OriginPro 9.6 (2019)	<i>OriginLab Corp.</i>	Darstellung von Graphen
EndNote™ 20.2.1	<i>Clarivate Analytics</i>	Citation und Literaturverwaltung
GIMP 2.10.12	<i>The GIMP Development Team. (2019)</i>	Bildbearbeitung
Inkscape 0.9.24	<i>Inkscape Project. (2020)</i>	Bildbearbeitung
UCSF Chimera 1.13.1	<i>Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311.</i>	Molekulare Grafiken und Analysen von Proteinen

10.1.3 Chemikalien, Kits und Stammlösungen

Alle nicht selbst synthetisierten Chemikalien wurden von den Herstellern *Carl Roth GmbH & Co KG* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma-Aldrich/ Fluka* (Steinheim, Germany) bzw. *Merck KGaA* (Darmstadt, Deutschland), *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, Deutschland), *TCl Europe* (Zwijndrecht, Belgien), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland) und *VWR International* (Radnor, PA, USA) bezogen.

Für verschiedene Operationen wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet. Für die Genom-Isolation wurde das *DNeasy® Plant Mini Kit* (50) (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Plasmid-Isolationen erfolgten abhängig vom Kulturvolumen entweder mittels *innuPREP Plasmid Mini Kit* von *Analytik Jena AG Life Science* (Jena, Deutschland) oder *NucleoSnap Plasmid Midi kit for plasmid DNA* der Firma *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland).

In Anlehnung an ein kommerzielles Kit wurde der Gibson Assembly durchgeführt und sei daher an dieser Stelle zwischen Kits und Stammlösungen aufgeführt. Zusammensetzung und Durchführung wird bei der entsprechenden Methodenbeschreibung näher beleuchtet. Für klassische Anwendungen wie Kultivierung, Expression oder Extraktionen wurden verschiedene Medien und Stammlösungen verwendet. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung und Verwendung der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Lösungen.

Medium/ Lösung	Zusammensetzung/ Konzentration	Anwendung
Medien		
LB-Medium (<i>lysogeny broth</i>)	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefe-extrakt, 2 g/L Natriumchlorid	Vorkulturen für Hauptkultur oder Elektroporation
TB-Medium (<i>terrific broth</i>) <i>Carl Roth GmbH & Co KG</i> (Karlsruhe, Deutschland)	12 g/L Casein, 24 g/L Hefe-extrakt, 12.54 g/L K ₂ HPO ₄ , 2.31 g/L KH ₂ PO ₄ ; hinzugefügt werden mussten 0.4 % (v/v) Glycerin	Hauptkulturen für Gen- expression und Biosynthesen
Antibiotika		
Kanamycin (<i>Kan50</i>)	50 mg/mL in Aqua dest (1000x)	Antibiotikum für pET28a(+)-, pGEB-, pCombiCom- und pBTBX-2-Vektoren
Ampicillin (<i>Amp100</i>)	100 mg/mL in Aqua dest (1000x)	Antibiotikum für pET22a(+)- und pUC-Vektoren
Gentamycin (<i>Gent20</i>)	20 mg/mL in Aqua dest (1000x)	Antibiotikum für das Arbeiten mit <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)
Irgasan (<i>Irg25</i>)	25 mg/mL in Ethanol (p.a.) (1000x)	Antibiotikum für das Arbeiten mit nativen <i>P. putida</i> KT2440
Expression		
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid (IPTG)	100 mM in Aqua dest (1000x)	Induktion der Expression von P _{T7} - und P _{tac} -Systemen

Genereller Experimentalteil

Natrium-Salicylat (Sal)	1000 mM in Aqua dest (500x)	Induktion der Expression von P _{NagAa} -Systemen
L-Arabinose (Ara)	1 – 2 % (w/v); 67 – 133 mM in Aqua dest	Induktion der Expression von P _{araBAD} -Systemen
Gelelektrophorese		
DNA-Ladepuffer (6x)	60 % (w/v) Glycerin, 10 % (w/v) SDS, 0.03 % (w/v) Bromphenolblau, 60 mM EDTA, 10 mM TRIS/HCl, pH 7.6	Probenvorbereitung zur Analyse <i>via</i> Agarose-Gelelektrophorese
TAE-Puffer (10x)	400 mM TRIS, 190 mM Essigsäure, 10 % (v/v) 100 mM EDTA (pH 8.0)	Puffersystem für Gelelektrophorese (1x)
SDS-Ladepuffer (5x)	30 % (w/v) Saccharose, 10 % (w/v) SDS, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 50 mM DTT 500 mM TRIS/HCl, pH 6.8	Probenvorbereitung zur Analyse <i>via</i> SDS-PAGE
Kolloidale Coomassie G-250 Lösung	50 g Al ₂ (SO ₄) ₃ * H ₂ O ₁₄₋₁₈ , 20 mL H ₃ PO ₄ , 100 mL 96 % Ethanol, 880 mL H ₂ O dest., 200 mg Coomassie Brilliant blue G-250	Färbung von Proteinbanden im SDS-PAGE Gel
Tricin-SDS-PAGE Sammelgel (4%)	0.8 mL 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1; Carl Roth GmbH & Co KG), 1.5 mL Gelpuffer (3x), 3.7 mL H ₂ O dest. 150 µL 10 % (w/v) APS, 10 µL TEMED	SDS-PAGE Gel
Tricin-SDS-PAGE Trenngel (10%)	3 mL 30 %iges Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1; Carl Roth GmbH & Co KG), 3 mL Gelpuffer (3x), 8.82 mL H ₂ O dest. + 0.71 g Glycerin, 150 µL 10 % (w/v) APS, 10 µL TEMED	
Gelpuffer (3x)	3 M TRIS, 1 M HCl, 0.3 % (w/v) SDS, pH 8.45	
Kathodenpuffer (10x)	1 M TRIS, 1 M Tricin, 1 % (w/v) SDS, pH 8.25	
Anodenpuffer (10x)	1 M TRIS, 0.225 M HCl, pH 8.9	
NuPAGE™	4 – 12 % Bis-Tris Proteingel	
NuPAGE™-MOPS-Puffer (20x)	50 mM MOPS, 50 mM TRIS, 0.1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7	

10.1.4 Enzyme

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden kommerzielle Enzyme verwendet. Für die PCR wurde die Phusion Hot Start II DNA-abhängige DNA-Polymerase von *Thermo Scientific*[™] mit einer Aktivität von 2 U/μL verwendet. Ebenfalls von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) stammen die T4 DNA-Ligase, die Desoxiribonucleotide (dNTPs) mit einer Konzentration von 10 mM und die Restriktionsenzyme (auch FastDigest Restriktionsendonukleasen). Für den selbst erstellten Gibson Assembly[®] Mastermix wurden die T5 Exonuklease mit einer Aktivität von 10 ku/mL und die DNA-abhängige *Taq* Ligase mit einer Aktivität von 40 ku/mL von *New England BioLabs GmbH* (Frankfurt a. M., Deutschland) genutzt. Für die *MALDI-ToF* Analyse von Proteinen erfolgte zunächst ein tryptischer Verdau mit Hilfe der *Thermo Scientific*[™] *Pierce*[™] Trypsin Protease (MS-Gütegrad). Die genutzte GDH wurde von unserem Partnerinstitut (*Institut für Molekulare Enzymtechnologie; IMET*) durch Fermentationsprozesse in Form von geernteten Zellen bereitgestellt.^[297]

10.1.5 Synthetische Gene, Vektoren und Oligonucleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Gene wurden über *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) bestellt. Grundsätzlich erfolgte die Synthese im pUC57-Brick(+) und einige Gene wurden zusätzlich in dem von unserem Partnerinstitut – IMET – konstruierten pCombiCom1-Vektor, kurz pCC1, versandt. In einem Fall erfolgte die Klonierung in dieser Arbeit im pUC19b für eine Blau-Weiß-Selektion. Für die generellen Expressionen in *E. coli* Stämmen erfolgte die Klonierung entweder in den pET28a(+)-Vektor von *Novagen*[®] (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland) oder einem in der MCS veränderten Derivat, den pGEB. Für die Arabinose-induzierten Expressionen in *P. putida* KT2440 wurde der pBTBX-2 („was a gift from Ryan Gill (*Addgene plasmid # 26068*)“ von der *Non-profit organization Addgene* (Watertown, MA, USA) verwendet. Die bereitgestellte GDH lag im pETDuet-1 vor. Oligonucleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stellte die Firma *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) als entsalztes Lyophilisat bereit. Sie wurden in deionisiertem (dest.) Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 mM eingestellt.

Tabelle 11: Auflistung der genutzten Primer mit Informationen über Namen des Oligonucleotids, der Sequenz, sowie der entsprechenden Verwendung. Hierbei wird unterschieden zwischen klassischer PCR, den Sonderformen Touchdown-PCR (τPCR) und Overlap Extension PCR (oEPCR). Oligonucleotide für Mutagenesen in QuikChange PCR (oCPCR) und Round-the-Horn PCR (rHPCR). Außerdem hervorgehoben sind die Primer für eine Backbone-Amplifikation (BB), sowie für eine PCR für einen anschließenden Gibson Assembly® (G). Zur Kontrolle wurden Primer genutzt für analytische PCR (A) und für Sequenzierungen (S).

Nummer	Name	Sequenz 5'→3'	Anwendung
1	JGE0190_pGEB_V3_fw	ctagaataattttgtaactttaagaaggagata-taccgcgcggatccg	BB
2	JGE0190_pGEB_V3_rv	aattcggatccgcgacggg-tatatcctctcttaaagtaaacaaaattatt	BB
3	AFE005_V001_pET28a_pnC fw	aataattttgtaactttaagaaggagatatacatgactcagaa-gagccccgcgaacgaa	τPCR
4	AFE005_V001_pET28a_pnC rv His	agtgggtgggtgggtgggtgcac-gtgcctctcagcggcaggccgatgc	τPCR
5	pnC-His9 E9G fw	atgactcagaagagccccgcgaacggacac	oCPCR
6	pnC-His9 E9G rv	gaagtgggtgctatcgtgtccgttcg	oCPCR
7	JGE0209_PrnF OL pET28 fw	gaataattttgtaactttaagaaggagata-taccatgattgtgccaccgaaaccaagtgc	G
8	JGE0209_PrnF OL pET28 rv	gttagcagccgatcctcagtggtgggtgggtgctcagtgca-gagctctattcgtgctgaggacgcttctg	G
9	JGE0209_PrnF-His6 OL pET28 rv	cggatcctcagtggtgggtgggtgctcagag-tcagagctcttaactagttcagtggtgggtgggtg gtagctag-ttctgctgaggacgcttc	G
10	radH-fre_short linker_fw_V2	agtcaccaccatcaccattaactagtaaccatgggctagc-gctgcaacttaagaaggagatatacaagctctcagatgaca-acctaaagctg	G
11	radH-fre_short linker_rv_V2	cagcttaagggtgtcatctcagagaagctgtatctctcttaaag-ttgacgcgtagcccatggttaactagttaatgggatgggtg-atgact	G
12	JGE0068_SsuE_fw	gagctcatcgtgtcatcaccctggcg	PCR
13	JGE0068_SsuE_His6_rv	ctcagtagtggtgggtgggtgggtgcacgtcgcagtggg-cattaccctgc	PCR
14	NH153 fw OL	gaaataattttgtaactttaagaaggagatataccatgggcaa-caaccaggtgcagcaggccgac	G
15	NH153 rv OL	gttagcagccgatcctcagtggtgggtgggtgctcagtgca-gagctctcagtgatgatgggtggagctcagctcgtcgcg-gcacagttc	G
16	NC201 fw OL	gaaataattttgtaactttaagaaggagatataccatgggcgt-gtcgagtagcggcagctgctg	G

17	NC201 rv OL	cagccggatctcagtggtggtggtggtgctcgcagtcagagct ctcagtggtgatgatggtggtgagctcgatggaacagctgc atggcgtg	G
18	NHprnC_prnC fw_NH153 OL	ggcaacgccggcgagttcctggaccgccgggttctcctcgggcct cgagaacaccgcggtagc	OE
20	NHprnC_NH153 rv_prnC OL	gcgccgcgagcgcgtggatggtcaccgcgggttctcgaggcc cgacgagaacaccgggtcc	OE
21	pltLA pB OL fw	gagataggcggagatacgaacttaagaaggagataaccat gggagacggaggaagttaaagaaaag	G
22	pltLA pB OL rv	cctgaatgatatacaagctgaatttggtagcaatttctagattaga acgcgggttggcggtag	G
23	PmC OL pCC1 fw	catatgtgaaagcttgagctcatgactcagaagagccccg	G
24	PmC OL pCC1 rv	ggatgcgaccactcgagctagatcagtggtggtggtggtgctc acgtgcttc	G
25	pBTBX-2_MCS OL fw	gtttctcatacccgttttttgggctagcgaattcccatgggctata acatatggagctcctgcacactagtctagaaaattcgtcaacg cattc	G
26	pBTBX-2_MCS OL rv	gaatgcgtgacgaatttctagaactagtgcgagcggagctccat atgtataagcccaggaattcgttagcccaaaaaaacgggta tggagaaac	G
27	prnA_pB OL fw	gagataggcggagatacgaacttaagaaggagataaccat gggaacaagccaatcaagaatatcgtc	OEPCR
28	PmA_prnABFCD_OL_rv	gtatctccgctatctcacacgagataggcggctcatggttacac gtgttagtggtgatgatggtggtgcacgtgctgctgctcctgcgcc gcgagcgtc	OEPCR
29	prnB_prnABFCD OL fw	gcctatcctggtgagataggcggagatacgaacttaagaagg agatatacagctcatggaacgcaccttgaacgggtatc	OEPCR
30	prnB_prnABFnagRCD_OL_rv	tgttaagtggccttatgctgactcctcagtgacccttaagttag tggtagatggtggtgcttaagggtatcatcgagcgcgcgcg gatg	OEPCR
31	prnC_prnABFCD OL fw	gcaatttcgtactgaaacatcttaacatgctaaaggagtttcata tggcaactcagaagagccccgcgaacggac	OEPCR
32	prnC_prnABFCD OL rv	ctcctttaaagtaaaaaattatacatatgcacgtgctagtg tgggtggtggtgcacgtgcttctcagagccaagccgatg	OEPCR
33	prnF_prnABFCD OL fw	taaggagctcgtgagataggcggagatacgaacttaagaagg agcccgaattcatgattgctgccaccgaaacaaaag	OEPCR

Genereller Experimentalteil

34	prnF_prnABFCD OL rv	gcccacaaggcgcttagttgtttcagtcagttacggaattc tcagtggtgggtgggtggttcgctgaggacgcttctgctc	oEPCR
35	nagR_prnABFCD OL fw	gaaaacaaactaaagcccttgggcgcttagttgttcgcg ggctagccagtcfaatgggttgcggaagcttatg	oEPCR
36	nagR_prnABFCD OL rv	gcatgattaagatgtttcagtcgaaaattgcttcattggtgatctcc tttttaagtgaactgggcccgttacctcctgttctctgtgccaag	oEPCR
37	prnD_prnABFCD OL fw	tgtataattttgtaactttaagaaggagatactagatgaacaac attcaattggatcaag	oEPCR
38	prnD_pB OL rv	cctgaatgatacgaagcttgaaattgtgacgaatttctagaacta gttcagtggtgggtgggtgcttaagctgctcactcgcgacac ggctcg	oEPCR
39	prnA fw intern	gacctgttcacgactgctc	S/A
40	PrnA fw intern 2	gaccggagtcgatccagaag	S/A
41	prnB fw intern	ctcgatccgctacag	S/A
42	prnB fw intern 2	ctacgctcggttcgccacag	S/A
43	prnC fw intern	ctgttgcaagcgccatc	S/A
44	prnC fw intern 2	cacaacgacgactctgctcag	S/A
45	prnF fw intern	atgattgctcccaccgaaac	S/A
46	nagR fw intern	gacgtagccacatgttgc	S/A
47	nagR fw intern 2	cgatacgtccggctgagcag	S/A
48	prnD fw intern	gaacggcctcagggacaag	S/A
49	prnF fw OL JGE0333	gataggcggagatacgaactttaagaaggagatatacccatgg gagctcgggtcactgagaggatcgg	oEPCR
50	nagR rv OL JGE0333	gcttgaatcgttgacgaatttctagagtcgctcggggctcttc tgagttgccatatgaaaacctccttagcatgattaagatgttccagt acga	oEPCR
51	JGE0339_prnAHis_fw_OL_pET	gaaataattttgtaactttaagaaggagatatacccatgggaaa caagccaatcaagaatatcgtc	G
52	JGE0339_prnAHis_fw_OL_pET	gatctcagtggtgggtgggtgctcagagctggcgttctcgcgc cgcgagcgtc	G

53	JGE0339_prnAHis_fw_F103A_RTH	[Pho] cttctaccatttggcaggcagcgtg	RHPCR
54	JGE0339_prnAHis_rv_F103A_RTH	[Pho] taatcttcgocgatgggtcg	RHPCR
55	JGE0339_prnAHis_fw_Anthra_RTH	[Pho] cgttcgactacaagtcaagaacaagtgggtgaacggc	RHPCR
56	JGE0339_prnAHis_rv_Anthra_RTH	[Pho] tctcgtagtagctggaatcg	RHPCR
57	JGE0109_pCC1 fw Vektorampl	tctagactcgagtggtcgcatc	BB
58	JGE0109_pCC1 rv Vektorampl	gagctcaagcttcacatatg	BB
59	prnC-His6 rv_pET28a OL	tctcagtggtgggtgggtgggtgctcgagctcagagctcagtggtgatgatgggtgggtgagctccttcttcagcgccag	G

Mit diesen zuvor genannten Primern konnten in der Folge die entsprechenden Konstrukte zur Expression erstellt werden.

Tabelle 12: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Vektoren, sowie deren genotypische Beschreibung.

Name	Genotyp	Herkunft
pET28a(+)	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori	Novagen
pGEB	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori Δ <i>NcoI-NdeI</i>	Diese Arbeit
pUC19	<i>Bla</i> , Amp ^R , <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1)	Novagen
pUC57-Brick(+)	<i>Bla</i> , Amp ^R , <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1)	GenScript USA Inc.
pCombiCom1 (pCC1)	<i>Ptac</i> , Kan ^R , <i>lacQ</i> , <i>oriV</i> , <i>rep</i>	Anita Loeschcke
pBTBX-2	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector	Provider PI: Ryan Gill Addgene ^[348]
pET28a(+)- <i>prnC</i> -His ₉	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>prnC</i> -His ₉	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>prnF</i>	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>prnF</i>	Diese Arbeit

Genereller Experimentalteil

pET28a(+)- <i>prnF</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>prnF</i> -His ₆	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>prnABCDF</i>	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>prnA</i> , <i>prnB</i> , <i>prnC</i> , <i>prnD</i> , <i>nagR</i> , <i>prnF</i>	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>radH</i> -His ₆ (D465E;T501S)_ <i>fre</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>radH</i> (D465E/T501S), <i>fre</i>	GenScript USA Inc.
pET28a(+)- <i>radH</i> -His ₆ (D465E;T501S)_ <i>fre</i> -His ₆ _V2	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>radH</i> (D465E/T501S), <i>fre</i>	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>nh153</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>NH153</i> -His ₆	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>nc201</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>NC201</i> -His ₆	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>nhprnC</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>NHprnC</i> -His ₆	Diese Arbeit
pGEB- <i>ssuE</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, Δ <i>NcoI-NdeI</i> , <i>ssuE</i> -His ₆	Diese Arbeit
pGEB- <i>prnABCDF</i>	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, Δ <i>NcoI-NdeI</i> , <i>prnA</i> , <i>prnB</i> , <i>prnC</i> , <i>prnD</i> , <i>nagR</i> , <i>prnF</i>	Diese Arbeit
pUC19- <i>pltL</i> _pltA	<i>Bla</i> , Amp ^R , <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1), <i>pltL</i> , <i>pltA</i>	Diese Arbeit
pUC57-Brick(+)- <i>nh153</i>	<i>Bla</i> , Amp ^R , <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1), <i>NH153</i> -Strep	GenScript USA Inc.
pUC57-Brick(+)- <i>nc201</i>	<i>Bla</i> , Amp ^R , <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1), <i>NC201</i> -Strep	GenScript USA Inc.
pUC57-Brick(+)- <i>prnABCDF</i>	<i>Bla</i> , Amp ^R , <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1), <i>prnA</i> , <i>prnB</i> , <i>prnC</i> , <i>prnD</i> , <i>nagR</i> , <i>prnF</i>	GenScript USA Inc.
pCC1- <i>nh153</i> -Strep	<i>Ptac</i> , Kan ^R , <i>lacIQ</i> , <i>oriV</i> , <i>rep</i> , <i>NH153</i> -Strep	GenScript USA Inc.
pCC1- <i>nc201</i> -Strep	<i>Ptac</i> , Kan ^R , <i>lacIQ</i> , <i>oriV</i> , <i>rep</i> , <i>NC201</i> -Strep	GenScript USA Inc.
pCC1- <i>prnC</i> -His ₆	<i>Ptac</i> , Kan ^R , <i>lacIQ</i> , <i>oriV</i> , <i>rep</i> , <i>prnC</i> -His ₆	Diese Arbeit
pETDuet™-1- <i>gdh</i> / pGDH	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, bla Amp ^R , pBR322 Ori, <i>gdh</i>	Daniel Bokonyi ^[297, 349, 350]
pBTBX-2*	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector, MCS des pET28a(+)	Diese Arbeit

pBTBX-2*- <i>prnD</i>	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector, MCS des pET28a(+), <i>prnD</i>	Diese Arbeit
pBTBX-2*- <i>pltL_pltA</i>	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector, MCS des pET28a(+), <i>pltL</i> , <i>pltA</i>	Diese Arbeit
pBTBX-2*- <i>prnFnagR</i>	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector, MCS des pET28a(+), <i>prnF</i> , <i>nagR</i>	Diese Arbeit
pBTBX-2*- <i>prnFnagRpmCD</i>	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector, MCS des pET28a(+), <i>prnF</i> , <i>nagR</i> , <i>pmC</i> , <i>pmD</i>	Diese Arbeit
pBTBX-2*- <i>PRN ptac</i>	<i>araC</i> P _{BAD} Promotor, Kan ^R , pBBR1 oriV, mobilizable vector, MCS des pET28a(+), <i>prnA</i> , <i>pmB</i> , <i>pmF</i> , <i>nagR</i> , <i>pmC</i> , <i>pmD</i>	Diese Arbeit
pET28a(+)- <i>prnA</i> -His ₆	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>prnA</i> -His ₆	Diese Arbeit

10.1.6 Stämme

Die Proteinproduktionen wurden in zwei Organismen durchgeführt.

Neben *Escherichia coli* K12 Stämmen, wurden auch *Pseudomonas putida* KT2440 Stämme genutzt. Genomisolationen wurden unter anderem aus *Pseudomonas protegens* Pf-5 durchgeführt.

Tabelle 13: Beschreibung der Mikroorganismen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Genotyp	Herkunft	Nutzung
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ</i> ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	[351]	Klonierung
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [<i>lac lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>] ⁺ K 12(λS)	[352]	Genexpression
<i>E. coli</i> Tuner™ (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1</i> (DE3)	Novagen	Genexpression
<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^R <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i> [<i>cpn10 cpn60 Gent</i> ^R]	Agilent Technologies, Inc.	Genexpression
<i>P. putida</i> KT2440	r, m ⁺	[353]	Genexpression

Genereller Experimentaltteil

<i>P. putida</i> pig-r44	r, m ⁺ , TREX-LipR Gm ^R	[354]	Biosynthese
<i>P. putida</i> pig-r2 Δ <i>pigD</i>	r, m ⁺ , <i>pig Cluster</i> , TREX-LipR Δ <i>pigD</i> Gm ^R Sm ^R	[355, 356] Nora L. Bitzenhofer	Biosynthese
<i>P. protegens</i> Pf-5 ^[357] (ATCC® BAA-477™)	Wildtyp	IMET (Katrín Röllén)	Genomisolation

10.2 Molekularbiologische Methoden

10.2.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des DNeasy® Plant Mini Kit (50) der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland). Durchgeführt wurde dies für die Stämme *Escherichia coli* DH5α und *Pseudomonas protegens* Pf-5. Hierzu wurde eine 5 mL Übernachtkultur schrittweise in einem 2.0 mL Eppendorf Reaktionsgefäß zentrifugiert (20k rpm, 5 min, RT). Anschließend erfolgte die Isolation nach Herstellerangaben des Abschnitts „Protocol: Purification of Total DNA from Plant Tissue (Mini Protocol)“. Da die genutzten bakteriellen Zellen keine Zellwände besitzen, wurde der Aufschluss mit Puffer AP1 ab Schritt 7 begonnen. Abweichend des Protokolls wird final mit dest. H₂O eluiert, um hohe Salzkonzentrationen bei Folgeschritten zu vermeiden.

10.2.2 Isolation von Plasmid DNA

Die Isolation von Plasmid DNA erfolgte aus *E coli* DH5α mit Hilfe des *innuPREP* Plasmid Mini Kit von Analytik Jena AG Life Science (Jena, Deutschland). Hierzu wurden Übernachtkulturen mit 5 mL oder 10 mL verwendet und dabei das jeweilige Protokoll genutzt. Dieses Kit wurde ebenfalls verwendet, um PCR-Reaktionsansätze zu reinigen, sofern keine Gelelution erfolgt ist. Wurden größere Mengen Plasmid DNA benötigt, oder sollten höhere Konzentrationen erzielt werden, erfolgte die Isolation mittels *NucleoSnap* Plasmid Midi Kit for plasmid DNA der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland).

10.2.3 Design von Oligonucleotiden zur PCR und Sequenzierung

Die Konstruktion von Oligonucleotiden bzw. Primern erfolgte mit *CloneManager*. Kriterien waren hierbei, dass die Länge 20 bp in der Regel nicht überschreiten sollte (Überhänge für *oL*PCR und Gibson Assembly® ausgeschlossen). Die Schmelztemperaturen des überlappenden Bereichs mit dem zu amplifizierenden Genbereich sollten außerdem im Bereich von 50 – 60 °C liegen. Der Überlapp der Primer folgte den gleichen Kriterien.

10.2.4 PCR Methoden

Neben der Amplifikation von Genen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), basierend auf genomischer oder Plasmid-DNA, wurden in dieser Arbeit auch Kolonie-PCRs (cPCR) durchgeführt, um in einem analytischen Verfahren zu testen, ob sich das Zielgen im gewünschten Vektor und somit Organismus befindet. Auch die Einführung von Punktmutationen zur Sequenzkorrektur oder gezielte Optimierungen an präzisen Stellen sind eine Anwendung der PCR-Methode und wurden durch die QuikChange PCR (QCPCR) oder wahlweise die Round-The-Horn Methode (RHPCR) verwirklicht. Letztlich war es für die Konstruktion eines geeigneten Biosynthese-Clusters zielführend, die *Overlap Extension* PCR (OEPCR) anzuwenden. Während im Folgenden die Bedingungen für die Genervielfältigung aus isolierter DNA und ganzen Zellen (cPCR) dargestellt werden sollen, befinden sich die weiteren Informationen zu den einzelnen Methoden in den entsprechenden Unterkapiteln.

10.2.4.1 Konventionelle PCR

Basierend auf der klassischen Polymerase-Kettenreaktion erfolgte die Zusammensetzung der Reaktionslösung wie in der folgenden **Tabelle 14** beschrieben. Hierbei wird für jedes Gen oder für jeden Vektor das Temperatur- bzw. Zyklus-Programm dargestellt.

Tabelle 14: PCR-Zusammensetzung. Generelle Bestandteile (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für den PCR-Mastermix mit Details zu Konzentrationen und Aktivitäten.

Komponente	Stock-Konzentration	Endkonzentration
dNTPs	10 mM	200 µM
DNA (Genom, Vektor)	10 - 40 ng/µL	1-5 ng/µL
Oligonucleotid	100 µM	0.5 µM
Phusion Polymerase	2 U/µL	40 mU/µL
Phusion Puffer	5x	1x
DMSO	-	3%
Water	-	-

Tabelle 15: PCR-Programme. Temperaturprogramme für die verschiedenen Genamplifikationen oder Vektor-Vervielfältigungen (BB). Die drei Schritte Denaturierung, Anlagerung und Elongation (gelb) wurden mit der Zahl der genannten Zyklen wiederholt. Hinter den Genen ist in Klammern der Zielvektor angegeben, in den das Amplifikat übertragen wird.

Schritt	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur
Deckeltemperatur	-	110 °C	-	110 °C	-	110 °C	-	110 °C
Initiale Aktivierung	1 – 3 min	98 °C	1 – 3 min	98 °C	1 – 3 min	98 °C	1 – 3 min	98 °C
Zahl der Zyklen	35		35		35		35	
Ende der PCR	∞	10 °C	∞	10 °C	∞	10 °C	∞	10 °C
Finale Elongation	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C
	<i>ssuE-His₆</i> (pGEB)		<i>pmfI pmF-His₆</i> (pET28)		pGEB		<i>nh153-His₆</i> (pET28)	
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C
Anlagerung (Gradient)	1 min	65 – 75 °C	1 min	50 – 70 °C	1 min	55 – 75 °C	1 min	55 – 75 °C
Elongation	10 s	72 °C	15 s	72 °C	210 s	72 °C	90 s	72 °C
	<i>nc201-His₆</i> (pET28)		C-Term. <i>nhpmC-His₆</i> (pET28)		N-Term. <i>nhpmC-His₆</i> (pET28)		pCC1 (BB)	
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C
Anlagerung (Gradient)	1 min	55 – 75 °C	1 min	55.7 °C	1 min	55.7 °C	1 min	61.5 °C
Elongation	90 s	72 °C	30 s	72 °C	30 s	72 °C	75 s	72 °C
	<i>pmC-His₆</i> (pCC1)		<i>pltL_pltA</i> (pUC19b)		<i>pltL_pltA</i> (pBTBx-2*)		<i>pmA-His₆</i> (pET28)	
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C
Anlagerung (Gradient)	1 min	61.5 °C	1 min	65 – 75 °C	1 min	45 – 65 °C	1 min	45 – 65 °C
Elongation	75 s	72 °C	35 s	72 °C	30 s	72 °C	45 s	72 °C

Schritt	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur
	<i>pmF</i> (pBTBX-2*)		<i>nagR</i> (pBTBX-2*)		<i>pmC</i> (pBTBX-2*)		<i>pmD</i> (pBTBX-2*)	
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C
Anlagerung (Gradient)	1 min	45 – 65 °C	1 min	45 – 65 °C	1 min	45 – 65 °C	1 min	45 – 65 °C
Elongation	40 s	72 °C	30 s	72 °C	40 s	72 °C	40 s	72 °C
	<i>pmA</i> (pBTBX-2*)		<i>pmB</i> (pBTBX-2*)		pCC1			
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C		
Anlagerung (Gradient)	1 min	45 – 65 °C	1 min	45 – 65 °C	1 min	54 – 76 °C		
Elongation	40 s	72 °C	40 s	72 °C	150 s	72 °C		

10.2.4.2 Touchdown PCR (τPCR)

Die Touchdown-PCR^[358] als Abwandlung der konventionellen PCR wird verwendet, um unspezifische Primer-Bindung zu minimieren bzw. die Menge an Nebenproduktion in der PCR zu reduzieren. Eine Ursache kann bspw. eine zu unterschiedliche Schmelztemperatur der zu nutzenden Primer sein. Hierfür werden in den ersten Phasen eines Touchdown-PCR-Zyklus hohe Annealing-Temperaturen verwendet, die mit jedem weiteren Zyklus schrittweise herabgesetzt werden. Der Primer wird bei der höchsten Temperatur annealed, die er tolerieren kann, ohne die unspezifische Bindung wesentlich zu beeinträchtigen. Dadurch liegt die erste amplifizierte Sequenz zwischen den Regionen mit der höchsten Primerspezifität, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es sich um die gewünschte Sequenz handelt. In den folgenden Runden werden diese Fragmente bei niedrigeren Temperaturen weiter amplifiziert, wodurch unspezifische Sequenzen, an die die Primer bei diesen niedrigeren Temperaturen binden können, verdrängt werden. Wenn der Primer zunächst an die Zielsequenz bindet (während der Phasen mit höheren Temperaturen), können zusätzliche Runden der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt werden, um diese Fragmente weiter zu amplifizieren. Touchdown erhöht die Reaktionsspezifität bei höheren Temperaturen und steigert die Effizienz zum Ende hin, indem die Annealing-Temperatur gesenkt wird.^[359] Diese Strategie wird häufiger bei Halogenase-Genen verwendet, wenn sie bspw. aus Organismen stammen, die einen hohen GC-Gehalt haben.^[360]

10.2.4.1 QuikChange®-PCR (qcPCR)

Diese Methode wird in der Regel verwendet, um Punktmutationen in Gene einzubringen. Hierbei werden komplementäre Primer verwendet, die jeweils einen der beiden DNA-Stränge vervielfältigen. Dafür können die initialen Amplifikationsschritte separat durchgeführt werden, um eine Paarung der beiden Primer zu verhindern. Ursprung dieser Technik ist eine PCR-Methode, die sich als „Ligation während der Vervielfältigung“ übersetzen lässt (ligation-during-amplification (LDA)). Dabei war zunächst die *in vitro* Erstellung von zirkularer Plasmid-DNA nach PCR das Ziel.^[361] Die Einführung von Mutationen, Insertionen oder Deletionen wurden im Folgenden entwickelt, indem ein Primer die gewünschten Veränderungen der Gensequenz in sich trug. Da die amplifizierten DNA-Stränge des Plasmids *in vitro* – im Gegensatz zu der parentalen Matrize – keine Methylierung tragen, erfolgt im Anschluss ein *DpnI*-Verdau, welcher nur Templat-DNA verdaut. Somit kann bei der anschließenden Transformation der Bakterien nur die amplifizierte DNA (Plasmid mit Mutationen) aufgenommen werden.^[362] Kommerzialisiert wurde diese Strategie erstmals als Quik-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Zur Einführung mehrerer Mutationen wurde dieses Protokoll dann weiterentwickelt.^[363] Auf Grund der entstehenden Lücken durch fehlende Ligation – sogenannten „Nicks“ – kann nur der parentale Strang amplifiziert werden, sodass es sich um eine lineare Vermehrung handelt und die Ausbeute von der eingesetzten DNA abhängt.

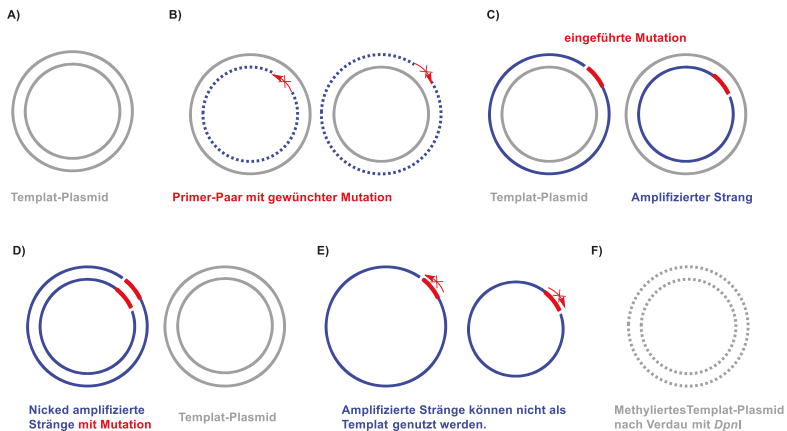


Abbildung 111: Schematische Darstellung der QuikChange-PCR (qcPCR). Der zu amplifizierende Vektor ist in grau dargestellt. Die Primer (rot), mit der durch das Kreuz angedeuteten Mutation, vervielfältigen jeweils einen der parentalen Stränge (blau). Durch die Amplifikation entstehen Kopien der Stränge mit Mutation, die nicht zum Zyklus verbunden sind (nicked). Die Strichelung zeigt den Abbau des parentalen Strangs, das Templat. Lineare Vervielfältigung.

10.2.4.1 Round-the-Horn-PCR (RHPCR)

Um die Limitation der QuikChange®-PCR (QCPCR) zu überwinden, kann eine Round-the-Horn PCR zielführend sein. Hierbei trägt nur einer der beiden Primer die Mutation und die Primer haben keinen Überlapp, sondern werden versetzt zur Amplifikation verwendet. Da hierdurch glatte Enden „blunt ends“ entstehen, müssen phosphorylierte (5'-Ende) Primer verwendet werden. In diesem Fall können die bereits amplifizierten Stränge erneut als Matrize verwendet werden, wodurch sich eine exponentielle Vervielfältigung ergibt. Aus diesem Grund ist der Verdau des parentalen Plasmids optional, abhängig von der Anzahl der PCR-Zyklen. Als finaler Schritt muss in der Regel eine Ligation folgen.

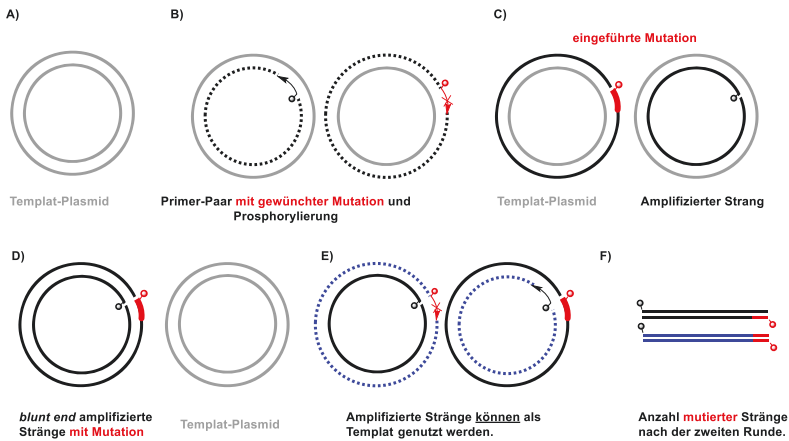


Abbildung 112: Schematische Darstellung der Round-the-Horn-PCR (RHPCR). Der zu amplifizierende Vektor ist in grau dargestellt. Der Primer, mit der durch das Kreuz angedeuteten Mutation (rot) und der zweite Primer ohne Mutation (schwarz), vervielfältigen jeweils einen der parentalen Stränge (schwarz). Beide Primer sind phosphoryliert [Pho] (Kreis). Durch die Amplifikation entstehen Kopien der Stränge, von denen einer die Mutation trägt. Beide Stränge werden nicht zum Zyklus verbunden (nicked). Ab der zweiten Amplifikation tragen beide Stränge (blau) die Mutation. Exponentielle Vervielfältigung.

Tabelle 16: PCR-Programme. Temperaturprogramme für die verschiedenen Sonderformen der Genamplifikationen. Dargestellt sind die Details für die Touchdown-, die QuikChange- und die Round-The-Horn-PCR. Die drei Schritte Denaturierung, Anlagerung und Elongation (gelb) wurden mit der Zahl der genannten Zyklen wiederholt. Für alle PCRs gilt: Deckeltemperatur 110 °C, Initiale Aktivierung von 1 – 3 min bei 98 °C, 35 Zyklen und eine finale Elongation für 10 min bei 72 °C. Die Lagerung erfolgte dann bis zur Weiterverwendung bei 10 °C.

Schritt	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur
	Touchdown <i>prnC-His₉</i>		QuikChange <i>prnC-His₉</i>		Round-the-Horn <i>PmA-His₆</i> (F103A)		Round-the-Horn <i>PmA-His₆</i> (E450K_F454K)	
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C
Anlagerung (Gradient)	15 s	45 – 60 °C	1 min	70 – 80 °C	1 min	45 – 65 °C	1 min	45 – 65 °C
Elongation	30 s	72 °C	210 s	72 °C	120 s	72 °C	120 s	72 °C

10.2.4.2 Kolonie-PCR (cPCR)

Wie zuvor erwähnt wurden für diese Methode ganze Zellen genutzt, die als Einzelkolonien von Agarplatten erhalten wurden. In der Regel wurde hierbei auf einen erneuten Ausstrich zur Vereinzelnung auf Agarplatten verzichtet, sondern direkt eine Vorkultur inokuliert. Diese Vorkulturen wurden dann genutzt, um Glycerin-Kulturen zu erstellen und das Plasmid zu isolieren. Letzteres erfolgte zur sukzessiven Sanger-Sequenzierung, sofern die Kolonie-PCR ein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe (Basenpaare [kb]) vermuten ließ. Hierfür wurde das standardisierte Protokoll der RedTag genutzt. <https://www.sigmaldrich.com/deepweb/assets/sigmaldrich/product/documents/372/183/r2523bul.pdf>

10.2.4.3 Overlap Extension PCR (oEPCR)

Diese PCR-Methode fand originär in der Einführung von Mutationen Anwendung^[364], wird aber unter Anderem auch zur Erstellung längerer DNA-Fragmente aus einzelnen Bereichen oder Genen genutzt. Durch das gezielte Zusammenführen von Genen über die Überhänge der Primer lassen sich so entweder Insertionen realisieren, Deletionen einfügen oder einfach – wie im Fall dieser Arbeit – gezielt Gencluster erstellen und optional direkt in den Zielvektor klonieren.^[365] Hierfür erfolgt zunächst eine Amplifikation von Gen 1 mit zwei Primer, von denen einer der Primer einen gewünschten Überlapp Ü1 trägt. Durch die Amplifikation in der PCR wird dadurch faktisch das Zielgen 1 um den Überlapp Ü1 verlängert. Gleiches geschieht nun für die Amplifikation von Gen 2. Trug bei der Amplifikation von Gen 1 der reverse Primer den Überhang Ü1, so ist es bei der Vervielfältigung von Gen 2 der forward Primer. Dieser Überhang Ü2 ist in vielen Fällen der gleiche wie Ü1, kann aber auch nur teilweise identisch sein. Dies kann passieren, wenn die Primer andernfalls zu lang werden, oder der inserierte Bereich (Überlapp) zu lang ist und damit nicht nur die Limitierung der Primerlänge betrifft, sondern ggf. auch einen zu hohen GC-Gehalt erreicht. In beiden Fällen erfolgt dann in Schritt 3 die Erstellung des Gesamtfragments Gen 1 – Überlapp – Gen 2, indem die Einzelstränge der zuvor generierten Fragmente Gen 1 – Ü und Ü – Gen 2 als neue Primer für die Amplifikation dienen.

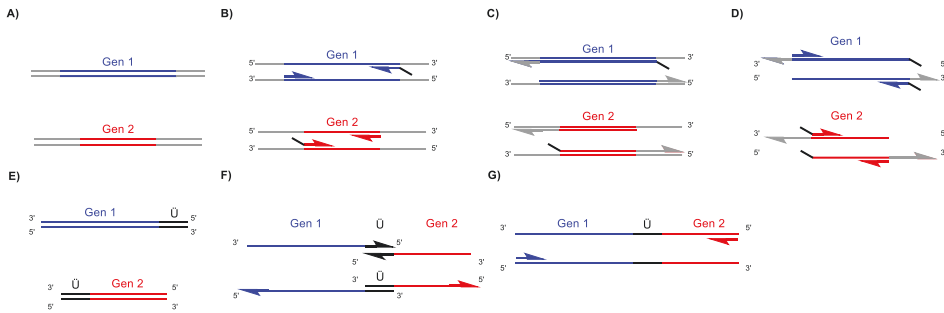


Abbildung 113: Schematische Darstellung der Overlap-Extension-PCR (OE-PCR). Die zu kombinierenden Gene sind in rot und blau dargestellt. Für die Annahme der Reihenfolge Gen1-Gen2 trägt der Gen 1 rv Primer einen Überlapp, der identisch ist mit dem Überlapp von Gen 2 fw Primer. Beide Gene werden für 5 Zyklen getrennt jeweils mit zusätzlich einem weiteren Primer ohne Überlapp amplifiziert. Nach 5 Zyklen werden beide PCR-Ansätze vereinigt. In den folgenden PCR-Zyklen dient jeweils ein Strang der eben amplifizierten Gene mit Überlapp als neuer Primer. Im letzten Schritt G werden nun die Primer ohne Überlapp für die exponentielle Amplifikation des Fragments Gen1-Gen2 verwendet.

Tabelle 17: PCR-Programme. Temperaturprogramme für die verschiedenen Sonderformen der Genamplifikationen. Dargestellt sind die Details für die Overlap Extension PCR. Die drei Schritte Denaturierung, Anlagerung und Elongation (gelb) wurden mit der Zahl der genannten Zyklen wiederholt. Deckeltemperatur 110 °C und Initiale Aktivierung (1 min bei 98°C). Am Ende Lagerung bei 10°C.

Schritt	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur	Zeit/Zyklus	Temperatur
Zahl der Zyklen	35		30		35		40	
	<i>pmFnagR</i> (pBTBX-2*)		<i>pmCprnD</i> (pBTBX-2*- <i>pmFnagR</i>)		<i>pmAprnB</i> (pBTBX-2*- <i>pmFnagRpmCD</i>)		<i>nhPrnC-His6</i> (pET28a(+))	
Denaturierung	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C	10 s	98 °C
Anlagerung (Gradient)	60 s	30 – 60 °C	60 s	30 – 60 °C	60 s	45 – 65 °C	60 s	30 – 60 °C
Elongation	180 s	72 °C	150 s	72 °C	90 s	72 °C	90 s	72 °C
Finale Elongation	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C

10.2.5 Restriktion und Ligation

Vereinzelt kam es vor, dass ein Assembly-Ansatz nach Gibson nicht erfolgreich war, oder andere Gründe für eine klassische Klonierung sprachen. Hierfür wurde das Restriktions-Ligationsverfahren genutzt. Auch die Bereitstellung von linearisiertem Zielvektor oder ein weiteres Testverfahren zur Kontrolle des Gen-Einbaus zu dem gewünschten Konstrukt boten sich für Restriktions-Verdaus an und wurden in Form von optimierten *FastDigest* Ansätzen (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) verwendet.

Anschließend an den Restriktionsverdau erfolgte eine Ligation mit der T4-DNA Ligase. Sowohl PCR-Amplifikate, als auch geschnittene Vektoren wurden in aller Regel vor der Ligation durch Gelelektion gereinigt, zumindest aber über das DNA-Isolations-Kit entsalzt. Die Ligation erfolgte dann in der Regel für 2h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Meistens wurde die Hälfte des Ansatzes nach 1h Raumtemperatur und die andere Hälfte nach 12 – 16h bei 4°C jeweils zur Transformation genutzt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

Komponenten	Menge
Verdauter Vektor	100 ng
PCR-Produkt	75 ng
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	4 µL
T4 DNA Ligase	2 µL
100 mM ATP	2 µL
Wasser (Milli-Q)	ad 40 µL

10.2.6 Gibson Assembly®

Bei diesem isothermen Assembly handelt es sich um eine Methode zur Kombination von mindestens zwei DNA-Fragmenten, welche einen überlappenden Bereich beinhalten. Durch die 5'-Exonuklease können so „blunt end“ Fragmente mit „sticky ends“ versehen werden, wodurch die homologen, überlappenden Bereiche aneinander anlagern können. Die durch den Einzelstrang-Verdau entstandenen Lücken, die nicht durch die Anlagerung abgedeckt sind, werden durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt und die übrigen beiden „nicks“ letztlich durch eine DNA-Ligase behoben, wodurch wieder ein geschlossenes, doppelsträngiges Fragment entsteht.^[366] Der Gibson Assembly wird bei 50°C für 1 h im ThermoCycler durchgeführt. Als Faustregel gilt das Verhältnis Insert zu Vektor 2:1.

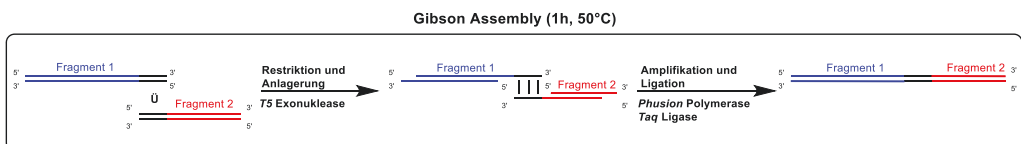


Abbildung 114: Gibson Assembly für zwei unspezifizierte Fragmente. Die bspw. durch PCR eingebrachten Überhänge (Ü) lagern sich nach dem Verdau aneinander an. Nach dem Annealing füllt die Polymerase die Lücken auf und schließlich erfolgt die Ligation. Die Reaktion dauert 1h bei 50°C. Die Exonuklease ist thermolabil und wird daher über die Zeit deaktiviert.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Gibson Assembly® Mastermixes und des ISO-Puffers.

Mastermix		5x ISO-Puffer	
Komponenten	Menge	Komponenten	Mengen
ISO-Puffer (5x)	60 µL	MgCl ₂ (2 M)	25 µL
<i>T5</i> -Exonuklease (100 U/mL)	24 µL	dATP (100 mM)	10 µL
<i>Phusion HotStart II</i> DNA-Polymerase (0.4 U/µL)	18 µL	dTTP (100 mM)	10 µL
<i>Taq</i> DNA Ligase (8000 U/mL)	39 µL	dCTP (100 mM)	10 µL
Wasser (Milli-Q)	309 µL	dGTP (100 mM)	10 µL
Summe	450 µL	DTT (1 M)	50 µL
		PEG-8000	250 mg
		NAD ⁺ (100 mM)	50 µL
		TRIS-HCl (1 M, pH = 7.5)	500 µL
		Summe	665 µL

10.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Durchführung dieser Trennung von DNA-Proben erfolgte unter anderem für die Untersuchung von PCR-Reaktionen, Restriktionen und zur Bestimmung der Reinheit nach Plasmidisolierungen. Neben dem klassischen analytischen Gel wurde in einigen Fällen auch ein präparatives Gel verwendet, um die Ausbeute durch höhere Probenbelastung zu steigern. Hierbei wurde eine Agaroselösung mit 0,8 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (1x) hergestellt. Diese wurde solange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Zugabe von Gel Red™ (*Bioticum Inc.*, Hayward, CA, USA) zur noch flüssigen Agarose-Lösung mit dem Verdünnungsfaktor 10000 ermöglichte eine spätere Visualisierung unter UV-Licht. Für präparative Gele wurde der Anteil von Agarose auf 1,0 % (w/v) und für kleine Gene und Fragmente nach Bedarf sogar bis zu 2,5 % (w/v) erhöht. Die Lagerung der fertigen Lösung erfolgte bei 60 °C im Heizschrank (ohne Farbstoff). Nach Gießen des Agarosegels fand die Polymerisierung bei Raumtemperatur für etwa eine halbe Stunde statt. Die Elektrophorese selbst erfolgte in TAE-Puffer (1x) für 30 min bei 180 v. Die Probenbelastung (10 µL) erfolgte nachdem die Taschen des Gels mit Puffer gefüllt waren. Zur Einordnung der Bandengröße wurde der Standard (auch Marker oder *Ladder* genannt) 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) mit 1 – 2 µL verwendet.

Bei kleinen Fragmenten wurde *Quick-Load*[®] 100 bp DNA Ladder (*New England BioLabs GmbH*, Frankfurt am Main, Deutschland) genutzt. Die Analyse und Bildgebung, sowie Dokumentation erfolgten *via Kamera (INTAS Science Imaging Instruments GmbH*, Göttingen, Deutschland).

Tabelle 20: Zusammensetzung der Lösungen für Agarosegelelektrophorese zur DNA-Trennung.

	Komponenten	Menge
TAE-Puffer (50x)	TRIS	2 M
	EDTA (500 mM, PH = 8)	50 mM
	Essigsäure	900 mM
Probenpuffer (5x)	EDTA	100 mM
	Glycerin	45 % (v/v) Glycerin
	Bromphenolblau	0.05 % (w/v)
Agarosegel	TAE-Puffer (50x)	(1x)
	Agarose	0.8 % – 2.5 % (w/v)
	Gel Red [™]	0.01 % (8 µL auf 80 mL)

10.2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Um zu bestimmen, welche Konzentration PCR-Produkte, isolierte Plasmide, oder andere DNA hatte, wurde mittels *NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)* die Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ gemessen. Sowohl zur „Ein-Punkt-Kalibrierung“ mittels „blank“ (Wasser), als auch zur Konzentrationsbestimmung der Probe wurden 2 µL verwendet. Zur Reinheitskontrolle der Proben wurde zusätzlich die Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. Der Quotient $\frac{A(260 \text{ nm})}{A(280 \text{ nm})}$ sollte hierbei für DNA ca. 1.8 betragen. Dies gilt allgemein als reine Probe. Ist der Quotient deutlich niedriger, so befinden sich Proteine, Phenole oder andere Verunreinigungen in der Probe (T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers 260/280 and 260/230 Ratios, *Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*).

10.2.9 Sequenzierung

Alle finalen Plasmide wurden zur Verifizierung sequenziert. Zwischenschritte wurden teilweise überprüft. Die Sequenzierungen der isolierten Vektoren wurden von der Firma *GATC Biotech AG* (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Der Service wurde fortgeführt, auch nachdem *Eurofins Scientific* (Luxemburg, Luxemburg) *GATC Biotech AG* übernommen hatte. Bei der genutzten Methode handelt es sich um die Sanger-Sequenzierung.

10.3 Mikrobielle Methoden

Für die Produktion der Biokatalysatoren mussten die Zellen zunächst eine ausreichende Zelldichte erreichen.

10.3.1 Anzucht und Lagerung

Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Anzucht der Kulturen zunächst als Übernacht-Kulturen (ÜNK) in LB-Medium (*lysogeny broth*, 5 mL, 10 g/L Trypton oder Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 2 g/L NaCl) aus Lager-/Cryo-Kulturen oder einer Agar-Platte (LB-Medium mit 1.5 % Agar-Agar). Während *E. coli* Stämme bei 37 °C kultiviert wurden, erfolgte das Wachstum von *P. putida* KT2440 bei 30 °C. Entsprechend der Resistenz bei Stämmen mit Plasmid erfolgte die Zugabe von Kanamycin (Kan_{50} , 50 µg/mL) bei pET28a(+), pCombiCom und pBTBX-2, sowie Ampicillin (Amp_{100} , 100 µg/mL) bei pUC19b mittels Stock-Lösung (Verdünnungsfaktor 1000). Da der Stamm *E. coli* ArcticExpress (DE3) zusätzlich noch ein pACYC-basiertes Plasmid für die *Oleispira antarctica* Chaperonine Cpn10 und Cpn60 trägt, wurde in diesem Fall auch noch Gentamycin ($Gent_{20}$, 20 µg/mL) hinzugefügt. Für die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte die 1 %ige Inokulation (5 mL ÜNK für 500 mL Hauptkultur). Für die Hauptkultur wurde – sofern nicht anders beschrieben – TB-Medium (*terrific broth*, 12 g/L Casein oder Trypton, 24 g/L Hefeextrakt, 12.54 g/L K_2HPO_4 , 2.31 g/L KH_2PO_4 , 0.4 % (v/v) Glycerin) verwendet. Auch bei Nutzung von kommerziell erhältlichem TB-Medium musste Glycerol hinzugefügt werden (*Carl Roth*, Karlsruhe, Germany). Gelagert wurden Zellkulturen bei -80 °C in 25 % (v/v) Glycerin. Hierfür wurden 600 mL Kultur mit 600 mL Glycerin-Lösung versetzt (50 % (v/v) in deionisiertem Wasser).

10.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen werden zunächst die hergestellten Lösungen A (100 mM $MgCl_2$) und B (100 mM $CaCl_2$, 15 % (w/v)) sterilfiltriert. Anschließend wurden die *E. coli* Zellen in 400 mL LB-Medium in einem

3 L Fernbachkolben mit Schikanen kultiviert. Inokuliert wurde mit einer ÜNK (0.5 %). Wenn nötig, erfolgte zusätzlich die Zugabe von Antibiotika. Die Anzucht erfolgt bis zu einer $OD_{600} = 0.4 - 0.6$ bei 37 °C und 120 rpm. Nach Zellernte (10 min, 1230 x g, 4 °C) wurde das Pellet mit eisgekühlter Lösung A überschichtet und ebenfalls während der Resuspension auf Eis gelagert. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (10 min, 1230 rcf, 4 °C), bevor das Pellet in 2 mL eisgekühlter Lösung B aufgenommen wird. Die resuspendierten Zellen werden anschließend steril in 1.5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Aliquots werden letztlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80 °C gelagert werden.

10.3.3 Hitzeschock-Transformation

Die Transformation chemisch kompetenter Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Ein Aliquot der chemisch kompetenten Zellen wurde für 30 min auf Eis aufgetaut, mit dem gewünschten Plasmid (~ 50 – 100 ng/ μ L) versetzt und ohne Resuspension, sondern durch Verrühren mit der Pipettenspitze vermischt. Im Falle des Gibson Assembly und anderen Reaktionen wie PCRs oder Ligationen wurden 10 – 15 μ L verwendet. Die Zellen wurden für weitere 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 s bei 42 °C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 700 μ L LB-Medium. Die folgende Inkubation ist abhängig von der jeweiligen Antibiotika-Resistenz, wurde jedoch in aller Regel für 60 min bei 37 °C durchgeführt (Phänische Expression). Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (2 min, 2000 x g, RT). Nach Entsorgung des Überstandes wurde das Zellpellet in 50 – 100 μ L Restvolumen resuspendiert und auf Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Agarplatten werden invertiert über Nacht bei 37 °C inkubiert.

10.3.4 Elektroporation

Für die Elektroporation von *E. coli* Zellen, aber vor allem für *P. putide* KT2440 wurde ein Protokoll genutzt, das von *Nora L. Bitzenhofer*^[367] (Institut für Molekulare Enzymtechnologie) bereitgestellt wurde. Vorteil dieser Methode ist der Verzicht auf kompetente Zellen, sowie die Durchführung bei Raumtemperatur. Es basiert auf der Publikation von *Tu et al.*^[368] Hierfür wurde 1 mL einer Vorkultur durch Zentrifugation (2 min, 2000 x g, RT) pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen zweimal mit Wasser (1 mL Milli-Q®) vorsichtig gewaschen (Pellet ist sehr weich und kann leicht verloren gehen). Danach wurde das Pellet in 80 μ L Wasser aufgenommen und resuspendiert. Da es sich um Wasser ohne Ionenstärke handelt, sollten diese Schritte zügig durchgeführt werden, da andernfalls die Gefahr besteht, die Zellen durch den osmotischen Druck zu zerstören. Vor der Elektroporation erfolgt die Zugabe von 1 μ L Plasmid (~ 50 – 100 ng/ μ L). Die Elektroporation erfolgte mittels *MicroPulser*

Electroporator (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Deutschland). Die etwa 80 μL Zell-Wasser-Suspension mit Plasmid wird in die Elektroporationsküvette *EP-102* (2 mm, *cell projects Ltd*, Harrietsham, UK) oder *Elektroporationsküvetten 450 μL* (2 mm, *Carl Roth GmbH & Co KG*, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Entsprechend der Anleitung „*MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide*“ erfolgte die Bedienung des Elektroporators. Für die Elektroporation von Mikroorganismen werden meist Küvetten mit 0.1 und 0.2 cm Abstand verwendet. Die Elektroporation von *E. coli* erfolgt im Allgemeinen bei einer Spannung von 1.8 kV ($E = 18 \text{ kV/cm}$), wenn Zellen in 0.1-cm-Küvetten elektroporiert werden und mit einer Spannung von 2.5 kV ($E = 12.5 \text{ kV/cm}$), wenn Zellen in 0.2-cm-Küvetten elektroporiert werden. Diese Elektroporationsbedingungen sind im *MicroPulser* als Programme *Ec1* ($V = 1,8 \text{ kV}$) und *Ec2* ($V = 2,5 \text{ kV}$) im Menü für die Bakterieneinstellungen vorprogrammiert. Entsprechend der 2 mm-Spalt-Küvetten wurde das Programm *Ec2* verwendet. Der Puls hatte eine Dauer von etwa 5 ms. Nach dem Puls wurde die Suspension mit 600 μL LB-Medium gemischt. Anschließend wurde 1 h (abhängig von der Resistenz) inkubiert (30°C *P. putida*, 37°C *E. coli*). Durch die in der Regel sehr hohe Elektroporationseffizienz werden nach der Inkubation nur 5 – 10 μL der Zellkultur auf der Resistenz entsprechenden LB-Agar-Platten ausplattiert.

10.3.5 Genexpression

Für die Produktion der Proteine wurden abhängig vom verwendeten Stamm und Induktor abgewandelte Protokolle genutzt. Generell erfolgte die Expression, sofern nicht anders beschrieben, in *E. coli* auf Basis der folgenden Bedingungen.

10.3.5.1 Genexpression in *E. coli*

In einem 3L-Fernbachkolben mit Schikanen wurden 500 mL TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum vorgelegt und das Medium mit 1 % LB-Kultur (ÜNK) inokuliert. Anschließend erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 130 rpm. Die Induktion erfolgte anschließend bei einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.6$ mit 100 μM IPTG (*Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid*). Für die Proteinproduktion wurde dann die Temperatur auf 10 – 20 °C, je nach Stamm und Protein gesenkt. Die Expression wurde über 12 – 36 h durchgeführt. Die folgende Tabelle 21 zeigt die variierenden Parameter für jedes einzelne Protein. Expressionen wurden teilweise mit der Unterstützung von *Beatrix Paschold* durchgeführt.

Tabelle 21: Bedingungen der Expression. Für jedes zu produzierende Protein sind auch Angaben zum verwendeten Vektor, der optischen Dichte zur Zeit der Induktion, der Durchführung eines cold shocks durch Temperatursenkung auf 4 °C und der Zugabe von Ethanol (4 % (v/v), der Temperatur während der Expression und der Expressionszeit hinterlegt.

Protein	Stamm	Vektor	OD ₆₀₀	Schock	Temperatur	Zeit
SsuE-His ₆	<i>E. coli</i> Tuner™ (DE3)	pGEB	0.6	no	18 °C	16 h
PrnC-His ₉	<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	pET28a(+)	0.5	yes	15 °C	48 h
PrnF	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.4	no	20 °C	18 h
PrnF-His ₆	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.4	no	20 °C	18 h
RadH-His ₆	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.5	no	20 °C	15 h
Fre-His ₆	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.5	no	20 °C	15 h
NH153-His ₆	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.5	no	20 °C	20 h
NC201-His ₆	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.5	no	20 °C	20 h
NHprnC-His ₆	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET28a(+)	0.8	yes	18 °C	20 h

10.3.5.2 Genexpression in *P. putida*

In einem 100 mL-Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden 20 mL TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum vorgelegt und das Medium mit 1 % LB-Kultur (ÜNK) inokuliert. Anschließend erfolgte die Kultivierung bei 30 °C und 130 rpm. Die Induktion erfolgte anschließend bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0.6 mit 100 mM L-Arabinose, 1 – 2 mM Salicylsäure und 100 µM IPTG. Die Expression wurde über 20 h durchgeführt. Die Induktion erfolgte jeweils einzeln mit den Induktoren, als auch kombiniert.

10.3.6 Zellaufschluss

Für die Verwendung von Zelllysaten oder zur Reinigung von Proteinen erfolgte in den meisten Fällen der Zellaufschluss über Ultraschall. Für größere Zellmengen wurde ein FrenchPress-System genutzt. Für den Ultraschallaufschluss wurden gefrorene Zellpellets mit 20 % (w/v) in Äquilibriumspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8) resuspendiert, sofern nicht anders beschrieben. Der Aufschluss erfolgte dann auf Eis mit 2 Zyklen á 5 min (50 % Intensität, 35 % Power). Zwischen beiden Zyklen wurde 1 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer und unaufgeschlossenen

Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 4 °C, 12,000 x g). Für größere Zellmengen erfolgte der Zellaufschluss über die *EmulsiFlex-C5* der Firma *Avestin Europe GmbH* (Mannheim, Germany), die von unserem Schwesterinstitut für Molekulare Enzymtechnologie zur Verfügung gestellt wurde. Nach Einweisung durch Esther Knieps-Grünhagen erfolgte der Aufschluss mit 10 – 15 % (w/v) in einem Volumen von 50 – 300 mL in Äquilibrierungs-Puffer (25 mM KPi, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8). In zwei Zyklen erfolgte der Aufschluss bei 1000 – 1500 bar mit permanenter Kühlung des gewonnenen Lysats. Das geklärte Lysat wird durch anschließende Zentrifugation (30 min, 4 °C, 10,000 x g) gewonnen.^[369]

10.4 Biochemische Methoden

10.4.1 Affinitätschromatographie

PrnC-His₉:

Zunächst wurde eine 5 mL Ni-NTA-Superflow-Kartusche (*QIAGEN GmbH*, Hilden, Deutschland) mit 5 Säulenvolumen (column volume, CV) Äquilibrierungspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8) äquilibriert. Das gereinigte Lysat wurde mit dem gesamten Volumen mit einer Peristaltikpumpe auf die Säule aufgetragen und danach zyklisch für 20 Minuten weiter beladen. Die weiteren Schritte wurden teilweise von Hand (Schwerkraftreinigung) oder mit einem automatischen System wie dem *Äkta Purifier* durchgeführt. Die Säule wurde mit 7 CV Waschpuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH = 8) gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 8 CV Elutionspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH = 8). Nach Konzentration der Proteinprobe mit *Vivaspin® 500* Zentrifugalkonzentratoren (cut-off 10 kDa) bei 4,000 u/min wurde PrnC dreimal mit Lagerungspuffer (25 mM KPi, 300 mM NaCl, pH = 7.5 mit 10 % (v/v) Glycerin) um den Faktor 10 verdünnt. Die Endkonzentration wurde bei 2 mL Volumen eingestellt. Die Proteinkonzentration wurde durch Absorption bei 280 nm bestimmt, da der Anteil an Tryptophanen relativ hoch ist. Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE überprüft, und die verbleibende Proteinlösung wurde aliquotiert und eingefroren. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. Bei größeren Elutionsvolumina wurde der Pufferaustausch im Schwerkraftverfahren durchgeführt. Es wurden PD10 Entsalzungssäulen für 2.5 mL Probenvolumen (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland) verwendet, wie in deren Handbuch beschrieben. Je nach Erfolg der Expression und damit der Enzymkonzentration, erschienen die Elutionsfraktionen manchmal gelb. In den meisten Fällen war die Elution jedoch farblos.

PrnF-His₆ und NHprnC-His₆:

Zunächst wurde eine 5 mL Ni-NTA-Superflow-Kartusche (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) mit 5 CV Äquilibriumspuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH = 8) äquilibriert. Das gereinigte Lysat wurde zu PrnC auf die Säule aufgetragen. Die Reinigung wurde fortfolgend mit der *Äkta Purifier* durchgeführt. Die Säule wurde mit 5 CV Äquilibriumspuffer und 7 CV Waschpuffer (50 mM KPi, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH = 8) gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit 10 CV Elutionspuffer (50 mM KPi, 200 mM NaCl, 200 mM Imidazol, pH = 8). Die Proteinlösung wurde wie zuvor beschrieben konzentriert und der Puffer durch Auffüllen und Zentrifugation gewechselt. Die erhaltenen 10 mL PrnF-His₆ im Lagerungspuffer wurden aliquotiert, die Proteinkonzentration mittels Absorption bei 280 nm bestimmt und bei -20 °C gelagert.

NH153-His₆:

Als Abwandlung zu den vorherigen Reinigungen erfolgt die Elution mit dem Elutionspuffer (50 mM KPi, 200 mM NaCl, 300 mM Imidazol, pH = 8). Die gelben Fraktionen wurden anschließend konzentriert auf ein Volumen von 2 mL.

10.4.2 SDS-PAGE

Genexpressionen oder Proteinreinigungen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden Tricin-SDS-PAGE Gele selbst hergestellt und genutzt. Teilweise wurden auch kommerzielle Gele (NuPAGE™ 4–12 % Bis-TRIS Protein Gele; *Thermo Fischer*, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Glycin-SDS-PAGE wurde mithilfe des *Mini-Protean® Tetra Cell Casting Stand* (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Deutschland) durchgeführt und die NuPAGES™ mit dem *XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System* (*Invitrogen GmbH*, Darmstadt, Deutschland) genutzt. Für das Gießen der Tricin-Gele wurde zunächst der Gelpuffer (3x, 3 M TRIS, 1 M HCl, 0.3 % (w/v) SDS, pH = 8.45) bereitgestellt. Danach wurde das Trenngel (10 %, 6.7 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, 37.5:1; *Carl Roth*), 6.7 mL Gelpuffer (3x), 4.7 mL dest. H₂O, 2 g Glycerin, 200 µL APS (10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat) und 20 µL TEMED (*N,N,N',N'*-Tetra-methylethylendiamin) gegossen und mit *iso*-Propanol überschichtet, um für einen geraden Gelrand zu sorgen. Nach Polymerisation des Trenngels und Entfernung des *iso*-Propanols erfolgte das Gießen des Sammelgels (4 %, 1.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, 37.5:1; *Carl Roth*), 3 mL Gelpuffer (3x), 7.4 mL dest. H₂O, 200 µL APS (10 % (w/v)) und 20 µL TEMED. Je nach Probenzahl wurden Probenkämme (10 oder 15 Taschen) gewählt. Die Proteinproben wurden mit Wasser und SDS-Ladepuffer (5x, 10 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Saccharose, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 0.5 M TRIS/HCl, pH = 6.8, 50 mM DTT) versetzt und für 10 min bei 98°C

denaturiert. Durch die Entfaltung kann so das SDS an die Proteine angelagert werden und für eine negative Nettoladung sorgen. Die fertigen Gele wurden dann mit 10 μL Probe und 5 μL Proteinmarker *Roti[®]-Mark 10–150* (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) beladen. Für die Tricin-Gele wurde das Kammersystem nun mit den entsprechenden Laufpuffern (1x) gefüllt. Mit einer Verdünnung des Faktors 10 wurden die Stammlösungen von Anodenpuffer (10x, 1 M TRIS, 0.225 M HCl, pH = 8.9; äußere Kammer) und Kathodenpuffer (1 M TRIS, 1 M Tricin, 1.0 % (w/v) SDS, pH = 8.25; innere Kammer) verwendet. Für die kommerziellen Gele wurde in beiden Kammerbereichen der MOPS-Puffer (20x, NuPAGE™ 4 – 12 % Bis-TRIS Protein Gele) in einer Verdünnung 1:20 verwendet. Die Elektrophorese zur Trennung der Proteine nach Größe erfolgte für die Tricin-Gele mit 30 v für 20 min; 60 v für 6 min und letztlich mit 190 v für 50 min. Für die NuPAGE™ wurden über eine Dauer von 50 min eine konstante Spannung von 200 v angelegt. Nach erfolgter Trennung wurden die Gele 10 min in dest. H₂O gewaschen, dann für 30 – 60 min in Fixierlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol, Wasser) inkubiert und erneut gewaschen. Die Färbung erfolgte mittels kolloidaler Coomassie G-250 Lösung (2 % (w/v) H₃PO₄, 10 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) Al₂(SO₄)₃, 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) über Nacht. Entfärbung erfolgte dann wieder in Wasser unter Zuhilfenahme von Zellstofftüchern. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter Verwendung eines Weißlicht Tisches (*Edvotek Inc.*, Washington, DC, USA) und einer digitalen EOS 1000D Spiegelreflexkamera mit einem EF-S 60 mm Objektiv (*Canon Deutschland GmbH*, Krefeld, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: ISO 400, Belichtungszeit 1/250 s, Blende F/8.0. Alternativ wurden die fertigen Gele in Plastiktüten transferiert und mittels Scanner digitalisiert.

10.4.3 MALDI-ToF

Für die Analyse von identifizierten Proteinbanden, die der erwarteten Größe entsprachen, wurden im Fall von PrnC-His₉ MALDI-ToF-MS-Experimente durchgeführt. Die mit dem Skalpell ausgeschnittenen Banden aus dem gefärbten SDS-PAGE Gel wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und in 750 μL Entfärbelösung (30 % (v/v) Acetonitril, 100 mM NH₄HCO₃) 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und der Vorgang wiederholt, bis das Gel-Stück farblos war (2x – 3x wiederholen). Das Acetonitril wurde mittels Vakuumzentrifuge (*Speed-Vac concentrator 5301*, *Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland) bei 40°C für 30 min entfernt. Für den tryptischen Verdau erfolgte die Zugabe von 6 μL Trypsin-Puffer (3 mM TRIS-HCl, pH = 8,8, 10 ng/ μL Trypsin). Das Reaktionsgefäß wurde anschließend mehrmals invertiert, dann für 1 min zentrifugiert und der Verdau für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden für den weiteren Verdau über Nacht ein weiteres Äquivalent von 6 μL Trypsin-Puffer hinzugefügt. Um dem Verdunstungseffekt entgegenzuwirken wurden nach der Inkubation über Nacht 10 μL deion. H₂O hinzugefügt

und für 30 min inkubiert. Schließlich wurde die Probe mit 10 µL Fällungs-Lösung (30 % Acetonitril, 0,2 % Trifluoressigsäure) versetzt. Da die Messung nicht am selben Tag stattfand, wurde die Probe bei -20 °C gelagert. Die Messung und Analyse erfolgte durch die Kollegin Christina Mack am Institut für Bio- und Geowissenschaften IBG-1: Biotechnologie (Forschungszentrum Jülich) an einem *Daltonics Ultraflex III* TOF/TOF-Massenspektrometer (*Bruker Daltonics GmbH & Co. KG*, Bremen, Deutschland).

10.4.4 DLS-Messungen

Für die Untersuchung des oligomären Zustandes von PrnC-His₉ und NH153-His₆ erfolgten Experimente zur dynamischen Lichtstreuung (dynamic light scattering) zusammen mit PD Dr. Oliver H. Weiergräber (Institut für Biologische Informationsprozesse, IBI-7: Strukturbiochemie, Forschungszentrum Jülich). Hierfür wurden PrnC-Proben (1 mg/mL) im Kristallisationspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 7.5) verwendet und NH153 (6 mg/mL) zur gleichen Konzentration verdünnt. Die Messung erfolgte nach Zentrifugation (30 min, 20.000 × g, 4 °C) an einem *SpectroSize 300-Instrument* (*Xtal Concepts GmbH*, Hamburg, Deutschland). Die Aufzeichnung erfolgte über 25 aufeinanderfolgende Akquisitionen (Intervall 10 s, 20 °C).

10.4.5 Kristallisation von Proteinen

Für die Kristallisation von PrnC-His₉ und NH153-His₆ mussten zunächst passende Konditionen gefunden werden. Hierzu erfolgte mit den Proben, die auch zur DLS-Messung genutzt wurden, ein initiales Screening bei 20 °C in Dampfdiffusionsexperimenten (vapor diffusion) im „*sitting-drop*“ Verfahren in Zusammenarbeit mit PD Dr. Oliver H. Weiergräber. Dieses Screening erfolgte an einem *Freedom Evo® robotic system* (*Tecan*, Männedorf, Schweiz) und einem Kristallisations-Kit von Sigma Aldrich (*Crystallization Low Ionic Strength Kit for Proteins* [Sigma-Aldrich, 86684]).

Für die initial beobachteten Kristalle von NH153-His₆ mit leichter Tryptophan-Fluoreszenz waren die Bedingungen 07 (Bedingung Well A7: Reservoirlösung mit 1 M LiCl und 10 % (w/v) PEG 6000 in 100 mM Bicin, pH 9.0 mit finalem pH-Wert 9.0; Ref: 136301-07). Die Proteinlösungen hatte hierbei für PrnC-His₉ eine Konzentration von 1.5 mg/mL und für die gelbe NH153-His₆ 6.3 mg/mL im Kristallisationspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH = 7.5). Protein- und Reservoirlösung wurden äquivoluminär (Verhältnis 1:1) mit jeweils 0.5 µL eingesetzt.

10.5 Analytische Methoden

Sowohl für den Nachweis von synthetisierten Produkten, als auch der Überprüfung von Biokatalysen wurden verschiedene Verfahren und Geräte genutzt. Zusätzlich wurden bereits etablierte bzw. in der Literatur bekannte Aktivitätsnachweise genutzt. Diese finden sich unter den folgenden Unterpunkten.

10.5.1 GC-MS

Für die Analyse flüchtiger Substanzen, vor allem aber zur Reaktionskontrolle von PrnC, sowie Pyrrolnitrin und dessen Derivate und Intermediate wurde die Gaschromatographie mit Massenspektrometrie verwendet. Hierfür wurde das Standard-Programm MIC41PPK verwendet. Als Säule wurde eine *Optima 5MS column* (30 m * 0.25 mm (ID) und 0.25 µm Dicke) verwendet. Als Transfer-Gas diente Helium mit einem konstanten Druck von 60 kPa. Die Temperatur des Injektors betrug 210 °C, der Transfer line 180 °C und für die Ionenquelle 200 °C. Die Proben wurden getrennt durch eine Initialtemperatur von 60 °C. Diese wurde für die Dauer von 1 min gehalten. Danach erfolgte ein gradueller Anstieg der Temperatur um 15 °C/min bis eine Temperatur von 185 °C erreicht wurde. Schließlich wurde die Temperatur mit einem Anstieg von 120 °C/min auf 280 °C erhöht. Diese Temperatur wurde für 5 min gehalten. Die Messungen wurden mit Unterstützung von *Birgit Henßen* durchgeführt.

10.5.2 HPLC

Für den initialen Nachweis der Aktivität von PrnA und RadH, sowie eine präparative Reinigung von Aminopyrrolnitrin (**22b**) wurde eine Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) in Umkehrphase (reverse phase RP) durchgeführt (Jasco RP-HPLC System). Vor der Trennung wurden alle Lösemittel 3 h im Ultraschallbad entgast. Die Nutzung erfolgte ausschließlich durch *Birgit Henßen*.

Analytische RP-HPLC:

Tabelle 22: Parameter für die HPLC-Analyse von Tryptophan, 7-Chlor-Tryptophan, Anthranilsäure, 3-Chlor-Anthranilsäure, sowie Umbelliferon.

Trennbedingungen	
Säule	HyperClone® ODS (C18) 120 Å, 125 × 4 mm, 5 µm (Fa. Phenomenex, USA) (Fully porous silica, C18-column)
Laufmittel	Gradient: 5 – 80 % ACN + 0.1 % HCOOH in 10 min (0-10 min) 80 % ACN + 0.1 % HCOOH (2 min) Gesamtanalysezeit (12 min) Equilibrieren der Säule vor jedem Lauf mit 5 % ACN + 0.1 % HCOOH (15 min)
Flussrate	1 mL/min
Detektionswellenlängen:	220 nm und 280 nm: Tryptophan und 7-Chlortryptophan 224 nm und 254 nm für Anthranilsäure und 3-Chlor-anthranilsäure 324 nm für Umbelliferon
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	30 µL

Für die Referenzen mit ca. 0.75 mg/mL in 33 % ACN ergaben sich folgende Retentionszeiten.

Tabelle 23: Retentionszeiten der Komponenten in der RP-HPLC.

Analyt	Retentionszeit
Tryptophan (20a)	5.3 min
7-Chlortryptophan (20b)	7.3 min
Anthranilsäure	4.7 min
3-Chlor-Anthranilsäure	6.7 min
Umbelliferon	4.8 min

Tabelle 24: Parameter für die HPLC-Analyse von MDA (**22c**). Die Retentionszeit betrug 6.0 – 8.0 min.

Trennbedingungen	
Säule	HyperClone® ODS (C18) 120 Å, 125 × 4 mm, 5 µm (Fa. Phenomenex, USA) (Fully porous silica, C18-column)
Laufmittel	35 % ACN + 0.1 % HCOOH Gesamtanalysenzeit (15 min) Spritzenspülung mit 100 % ACN
Flussrate	1 mL/min
Detektionswellenlängen:	212 nm und 225 nm
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	30 µL

Präparative RP-HPLC:

Tabelle 25: Parameter für die präparative HPLC von APRN (**22b**). Die Retentionszeit betrug 70 – 80 min.

Trennbedingungen	
Säule	HyperClone® ODS (C18) 120 Å, 250 × 10 mm, 5 µm (Fa. Phenomenex, USA) (Fully porous silica, C18-column)
Laufmittel	35 % ACN + 0.1 % HCOOH Gesamtanalysenzeit (180 min) → Abbruch nach 80 min Spritzenspülung mit 100 % ACN
Flussrate	3 mL/min
Detektionswellenlängen:	212 nm und 224 nm
Temperatur	25 °C
Injektionsvolumen	100 µL

10.5.3 NMR-Spektroskopie

Als Hauptanalysemethode für die chemische Synthese wurde die Kernspinresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) verwendet. Die Aufnahme der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte mit den *Advance/DRX 600 NMR Spektrometer* oder *Advance/DRX 300 NMR Spektrometer* (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) bei einer Temperatur von 297.0 K (Messfrequenz: ^1H -Spektren 600 MHz, ^{13}C -Spektren 151 MHz). Zur Aufnahme des Spektrums wurden deuterierte Lösungsmittel wie CDCl_3 oder DMSO-d_6 verwendet. Die chemische Verschiebung wird in ppm angegeben, dabei dient den ^1H -Spektren Tetramethylsilan [TMS, ^1H : $(\text{CH}_3)_4\text{Si} = 0$ ppm] als Referenz. Zur genauen Normierung werden jedoch die Lösungsmittel genutzt. Bei den ^{13}C -Spektren wurden die Signale von CDCl_3 (77.2 ppm) und DMSO-d_6 (39.5 ppm) als Normierung gewählt, während bei den ^1H -Spektren auf CDCl_3 (7.26 ppm) und DMSO-d_6 (2.5 ppm) normiert wurde. Neben ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden zusätzlich 2D-Spektren wie DEPT-135 (*distortionless enhancement by polarization transfer*), ^1H - ^1H -COSY (*correlation spectroscopy*), ^1H - ^{13}C -HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) und ^1H - ^{13}C -HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) aufgenommen und zur Zuordnung der Signale verwendet. Die Multiplizitäten der Signale werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, sext = Sextett, sept = Septett und m = Multipllett. Je nach Aufspaltung der Signale können sich Kombinationen ergeben.

10.5.4 Aktivitäts-Assay GDH

Rohlysate des Cofaktor-Recycling-Systems wurden von Beatrix Paschold zur Verfügung gestellt. Diese wurden vor der Verwendung zentrifugiert und die Aktivität des Überstandes vermessen. Hierzu wurden 10 μL eines verdünnten Lysats (Verdünnungsfaktor V_F : 10,000) mit 20 μL 100 mM NAD^+ -Lösung und 170 μL Reaktionspuffer (50 mM KPi pH = 7.2, 40 mM Glukose) vermischt. Die GDH-Aktivität wurde folglich durch Messung der Absorptionzunahme bei 340 nm (NAD(P)H) bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für die Berechnungen lautet $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Messungen wurden in einem Plattenlesegerät *Tecan Infinite® M1000 PRO* (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) mit einer definierten Weglänge $d = 0.5 \text{ cm}$ (200 μL in Mikrotiterplatte) durchgeführt.

10.5.5 Aktivitäts-Assay Reduktasen

Flavinreduktase-Aktivitäten wurden durch Messung der Absorptionsabnahme bei 340 nm (NAD(P)H) bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für die Berechnungen lautet $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Messungen wurden in einem Plattenlesegerät *Tecan Infinite® M1000 PRO* (*Tecan Group AG*, Männedorf, Schweiz) mit einer definierten Weglänge $d = 0.5 \text{ cm}$ (200 μL in Mikrotiterplatte) durchgeführt.

Für die Reduktase SsuE-His₆ wurden die Umsatzraten in 200 μL Reaktionsvolumen bestimmt. Dafür wurden 20 μL geklärtes Lysat mit 140 μL Reduktase-Puffer (50 mM KP_i, 100 mM NaCl, pH = 7.0) und 20 μL FAD-Lösung (30 μM) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μL NADPH (200 μM) gestartet. Als Leerprobe wurde eine Reaktionslösung mit 20 μL Reaktions-Puffer anstelle von Lysat verwendet. Die Reaktion erfolgte bei 30 °C.

Die Aktivitäten von PrnF und PrnF-His₆ wurden für gereinigtes Enzym bestimmt. Dafür mussten die Proteinproben verdünnt werden (V_F : 2,500). Nach Einstellen der Konzentration auf ca. 0.1 $\mu\text{g/mL}$ erfolgte die Aktivitätsbestimmung ebenfalls in 200 μL Reaktionsvolumen. In diesem Fall betrug die Konzentration von FAD (**10c**) 15 μM und die Reaktion wurde mit der Zugabe von 300 μM NADH gestartet. 1 Unit wurde hierbei definiert als Menge Enzym, die 1 μmol NAD(P)H in einer Minute zu NAD(P)⁺ oxidiert.

11. SPEZIELLER EXPERIMENTALTEIL

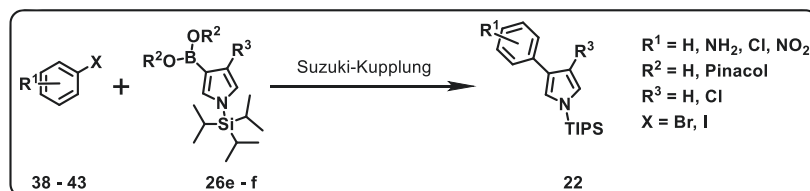
11.1 Chemische Methoden

Alle Synthesen dieser Arbeit wurden in einer Inert-Gas-Atmosphäre – wahlweise trockener Stickstoff oder Argon – durchgeführt, sofern nicht anders beschrieben. Vorausgesetzt die Startmaterialien lagen als Feststoff vor, wurden diese vor Reaktionsbeginn im Reaktionsgefäß vorgelegt und sekuriert. Hierzu wurden Kolben als auch Feststoffe mit einer Heizpistole ausgeheizt und anschließend mit Inert-Gas geflutet. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt. Trockene Lösemittel wurden entweder mit Septum unter Inertgas-Lagerung bestellt, oder der Lösemitteltrocknungsanlage der Firma MBraun Inertgas Systeme GmbH (MB SPS 800) entnommen.

In den folgenden Abschnitten sollen die verschiedenen Verbindungen, die synthetisiert wurden, mit Analytik und Synthesewegen dargestellt werden. Außerdem werden teilweise Analytik-Daten der Startmaterialien gezeigt, um die entsprechenden Veränderungen bspw. in den NMR-Signalen besser diskutieren zu können. Volumenangaben per Stoffmenge beziehen sich immer auf das Ausgangsmaterial der geringsten Äquivalente (Äq.). Für die Aufarbeitung der Reaktionen wurde die über Magnesiumsulfat (MgSO₄) getrocknete Lösung über Watte und Celite® unter Vakuum filtriert.

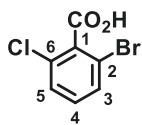
11.1.1 Synthese von Arylpyrrolen via Kreuzkupplungsreaktion

Für die Synthese des natürlichen Substrates der Halogenase PrnC und einigen Derivaten erfolgten Experimente in Anlehnung an die Publikation von *Matthew D. Morrison*.^[305] Diese Strategie beinhaltet eine Bifurkation des Synthesewegs bestehend aus der Synthese des substituierten Anilins auf der einen Seite und der Synthese von teilweise substituierten Pyrrolen auf der anderen Seite. Beide Syntheseweige werden in einer Suzuki-Kupplung zusammengeführt (Schema 2).



Schema 2: Reaktionsschema der Suzuki-Kreuzkupplung von *N*-TIPS-Pyrrolen mit halogenierten Arylen.

11.1.1.1 Synthese von 2-Brom-6-chlorbenzoesäure (39)

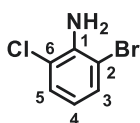


2-Brom-6-chlorbenzoesäure (39)

Für die Synthese von **39** wurden 1.40 Äq. *n*-BuLi (2.7 M Lösung in *n*-Heptan) zu 68 mL trockenem THF (2 mL/mmol Benzol **38**) bei 0 °C gegeben. Nach Zugabe von 1.50 Äq. DIPA (Diisopropylamin) wurde die Lösung mindestens 15 min. bei gleicher Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Temperatur auf -78 °C gesenkt (Aceton/CO₂(s)). Wenn nach Zugabe von CO₂(s) in den Dewar keine weitere Gasentwicklung sichtbar war (Zieltemperatur erreicht), wurde tropfenweise 1.00 Äq. 1-Brom-3-chlorbenzol (**38**) (4.00 mL, 6.50 g, 34.00 mmol) unter Beibehaltung der Temperatur hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 1 h durchgeführt, bevor dem Reaktionsgemisch CO₂(s) zugesetzt wurde. Dazu wurde eine 20-mL-Spritze mit Trockeneis gefüllt und die Nadel in das Septum gesteckt, um die Spritze mit CO₂(g) zu füllen. Angereicherte Kohlendioxid-Atmosphäre wurde dem Reaktionsgemisch mehrmals zugeführt (Nadel unter der Oberfläche), bis der Temperaturunterschied kleiner als 0.2 °C gewesen ist. Wenn keine Temperaturschwankungen mehr feststellbar waren, wurde CO₂(g) im Überschuss für 30 min. zugegeben. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt, mit Wasser gequench und in einen Scheidetrichter überführt. Die erste Extraktion wurde dreimal mit 100 mM NaOH-Lösung durchgeführt. Das Benzoat **39** in der gesammelten wässrigen Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden dann mit HCl auf pH = 1 angesäuert. Schließlich wurde die reprotonierte Benzoesäure **39** dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die gesammelten organischen Phasen mit Kochsalzlösung (*Brine*) gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ wurde die Lösung über Kieselgel filtriert und *in vacuo* eingengt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff in hoher Reinheit mit 58 – 90 % Ausbeute erhalten (Lit. quantitativ, *Morrison et al.* (2009)^[305]). In Bezug auf diese hochskalierte Charge wurden 4.60 g (19.70 mmol) isoliert.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.24 (t, ³J = 8.1 Hz, 1H, 4-H), 7.41 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, 3-H or 5-H), 7.53 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, 3-H or 5-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 119.74, 128.65, 131.24, 131.63, 131.83, 134.88, 169.60 (CO₂H). Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[305]

11.1.1.2 Schmidreaktion zur Synthese von 2-Brom-6-chloranilin (40)



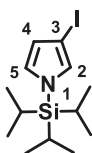
2-Brom-6-chloranilin (40)

39 (1.00 Äq., 5.00 g, 21.20 mmol) wurde in 55 mL konzentrierter H₂SO₄ (2.5 mL/mmol Benzoesäure **39**) gelöst und für 2 h auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wurde 1.00 Äq. NaN₃ schrittweise in kleinen Portionen zugegeben (starke Gasentwicklung!). Das resultierende Gemisch wurde 42 h lang gerührt. Die Lösung wurde anschließend schrittweise mit einer Pasteurpipette (Glas) in

eine auf Eis befindliche Lösung von 30 % NH₃ (in Wasser) überführt. Die basische Lösung wurde dreimal mit EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit *Brine* gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Produkt in ausreichender Reinheit zu erhalten (hellbeiger Feststoff). Das Anilin **40** wurde mit 90 % bis quantitativen Ausbeuten synthetisiert, was zu maximal 4.38 g (21.20 mmol) isoliertem Produkt führte (Lit. 92 %, *Morrison et al.* (2009)^[305]).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.50 (s, 2H, NH₂), 6.55 (t, ³J = 8.0 Hz, 1H, 4-H), 7.21 (dd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.4 Hz 1H, 3-H oder 5-H), 7.33 (dd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.4 Hz 1H, 3-H oder 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 109.37, 118.92, 119.48, 128.66, 131.16, 141.25. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[305]

11.1.1.3 Synthese von 3-Iod-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26b**)

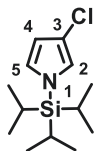


3-Iod-1-
(triisopropylsilyl)-
1*H*-pyrrol
(**26b**)

Zu einer Lösung von *N*-(TIPS)-Pyrrol (**26a**) (1.00 Äq., 2.50 mL, 2.30 g, 10.10 mmol) in 20 mL Aceton (2,0 mL/mmol Pyrrol) wurde *N*-Iodsuccinimid (**2b**) (NIS, 1.10 Äq., 2.50 g, 11,11 mmol) hinzugefügt. Der Reaktionskolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und die Lösung bei Raumtemperatur 11 h lang gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels GC-MS überwacht. Dazu wurde eine Pipettenspitze der Reaktionsmischung durch basisches Aluminiumoxid (ALOX) mit EtOAc (HPLC-Qualität) filtriert. Nach Abschluss der Reaktion wurde das rohe

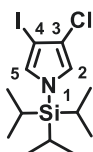
Gemisch *in vacuo* konzentriert. Das Rohprodukt (fast schwarz) wurde dann in 20 mL *n*-Pentan aufgenommen, über ALOX filtriert und erneut unter vermindertem Druck konzentriert, um das Produkt **26b** in hoher Reinheit mit 97 % (3.40 g, 9.80 mmol) als farbloses Öl zu erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.08 (d, ³J = 7.6 Hz, 18H, TIPS-CH₃), 1.42 (dq, ³J = 7.5 Hz, ³J = 15 Hz, 3H, TIPS-CH), 6.36 (dd, ³J = 2.7 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 1H, 4-H), 6.66 (t, ³J = 2.5 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.81 – 6.77 (m, 1H, 2-H oder 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.74, 17.86, 117.69, 125.83, 128.85, 129.76.

11.1.1.4 Synthese von 3-Chlor-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26c**)3-Chlor-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrol (**26c**)

Zu einer Lösung von **26b** (1.00 Äq., 2.50 g, 7.20 mmol) in 15 mL THF (2.0 mL/mmol Pyrrol **26b**) wurden 8.68 mL *tert*-BuLi bei -78 °C (2.05 Äq. einer 1.7 M Lösung in *n*-Pentan) tropfenweise zugegeben. Dieses Gemisch wurde 30 Minuten lang bei dieser Temperatur gerührt. Die beige-farbene Lösung wurde gelb und nach Zugabe von Hexachlorethan (2.0 Äq.) wieder trüb-beige. Das Hexachlorethan wurde vor der Zugabe in 22 mL THF (3.0 mL/mmol Pyrrol **26b**) gelöst und dann tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde weitere 30 Minuten bei -78 °C gerührt, bevor sie auf Raumtemperatur erwärmt wurde. Danach wurde mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gequenchet und das Gemisch in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde gesammelt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Rohprodukt zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie über deaktiviertem Kieselgel (5 % Triethylamin) gereinigt. Als mobile Phase wurde ein Gemisch von *n*-Pentan/Dichlormethan (99:1) verwendet. Das Produkt **26c** wurde als farbloses Öl mit 92 – 98 % Reinheit (bezogen auf andere Pyrrole als Nebenprodukte) und 60 – 82 % (1.26 g, 4.90 mmol) Ausbeute (Lit. 87 % Ausbeute, *Morrison et al.* (2009)^[305]) erhalten. Häufig war mehr als eine Säule erforderlich, um das Hexachlorethan-Nebenprodukt größtenteils zu entfernen. In diesem Fall wurde das Produkt dreimal gereinigt.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.09 (d, ³J = 7.5 Hz, 18H, TIPS-CH₃), 1.41 (dq, ³J = 7.6 Hz, ³J = 15.2 Hz, 3H, TIPS-CH), 6.23 (dd, ³J = 2.8 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, 4-H), 6.66 (t, ³J = 2.6 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.67 – 6.69 (m, 1H, 2-H oder 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.72, 17.86, 110.98, 113.99, 120.90, 124.15. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[305]

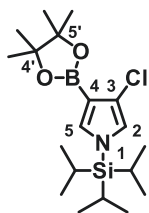
11.1.1.5 Synthese von 3-Chlor-4-iod-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (**26d**)3-Chlor-4-iod-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrol (**26d**)

Zu einer Lösung von 1.00 Äq. (2.50 g, 9.70 mmol) **26c** in 20 mL Aceton (2.0 mL/mmol Pyrrol **26c**) wurde *N*-Iodsuccinimid (**2b**) (1.10 Äq., 2.40 g, 10,67 mmol) zugegeben. Der Reaktionskolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und die Mischung 13 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels GC-MS überwacht. Dazu wurde eine Pipettenspitze der Reaktionsmischung durch basisches Aluminiumoxid (ALOX) mit EtOAc (HPLC-Qualität) filtriert. Sobald die Reaktion beendet war, wurde das Rohprodukt im Vakuum eingengt. Dieses konzentrierte Gemisch (fast schwarz) wurde dann in 20 mL

n-Pentan aufgenommen, durch ALOX filtriert und erneut *in vacuo* konzentriert, um das Produkt **26d** in moderater Reinheit (80 – 90 %) mit 60 – 90 % Ausbeute als farbloses Öl oder Feststoff zu erhalten. In dieser Reaktion wurde eine Ausbeute von 78 % (2.90 g, 7.60 mmol) erzielt. Nach einer Weile färbte sich das Produkt grün, behielt aber die korrekte Masse bei, was mittels GC-MS überprüft wurde.

1H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.09 (d, ³J = 7.5 Hz, 18H, TIPS-CH₃), 1.4 (dq, ³J = 7.4 Hz, ³J = 15 Hz, 3H, TIPS-CH), 6.70 (d, ⁵J = 2.5 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.74 (d, ⁵J = 2.5 Hz, 1H, 2-H oder 5-H); **13C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.63, 17.80, 66.77, 110.97, 121.17, 128.85.

11.1.1.6 Synthese von 3-Chlor-4-BPin-*N*-(TIPS)-1H-pyrrol (**26e**)

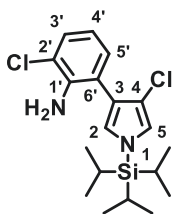


3-Chlor-4-(4',4',5',5'-tetramethyl-1',3',2'-dioxaborolan-2'-yl)-1-(triisopropylsilyl)-1H-pyrrol (**26e**)

In einem Ofen-getrockneten Schlenk Kolben wurden alle festen Ausgangsstoffe wie **26d** (1.00 Äq., 2.00 g, 5.20 mmol), Bis(acetonitril)dichlorpalladium(II)/ [PdCl₂(CH₃CN)₂, 0.03 Äq., 41.5 mg, 0.16 mmol], und 2-Dicyclohexylphosphin-2',6'-dimethoxybiphenyl/ SPhos (0.09 Äq., 192,9 mg, 0.47 mmol) vorgelegt. Lag **26d** als Öl vor, wurde es in Toluol gelöst und später mit dem restlichen Lösungsmittel zugegeben. Der Schlenk Kolben, der die festen Ausgangsmaterialien enthielt, wurde evakuiert und wieder mit Argon aufgefüllt (3x) und anschließend mit 10 mL trockenem Toluol (2.0 mL/mmol Pyrrol **26d**), entgastem Triethylamin (NEt₃) (2.50 Äq., 1.80 mL, 13.00 mmol) und schließlich Pinacolboran (**41**) (HBPIn, 1.30 Äq., 1.89 mL, 13.00 mmol) versetzt. Die resultierende Mischung wurde bei 95 °C für ca. 3 h erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch DC mit *n*-Pentan/Dichlormethan (95:5) überwacht. Das Produkt ist als auf dem Kopf stehender Fleck in U-Form sichtbar (Rf: 0.33), wobei Anisaldehyd als Färbereagenz genutzt wurde. Das Rohprodukt wurde dann durch einen Trichter filtriert, wobei EtOAc als Elutionsmittel verwendet wurde. Das Lösemittel wurde *in vacuo* reduziert. Reinigung durch Säulenchromatographie über deaktiviertem Kieselgel (5 % NEt₃) erfolgte zunächst mit *n*-Pentan, bevor das Lösungsmittel zu *n*-Pentan/Essigsäureethylester (98:2) gewechselt (Rf: 0.18) wurde. Dies lieferte das gewünschte Pinacolboronat. Um eine Zersetzung zu vermeiden, wurde die Säulenchromatographie so schnell wie möglich durchgeführt. **26e** wurde als grau-weißer Feststoff (kann gelbliche Spuren enthalten) mit 20 – 40 % Ausbeute (Lit. 80 %, Morrison *et al.* (2009)^[305]) und 80 – 90 % Reinheit erhalten. In dieser Reaktion lag die Ausbeute bei 20 % (0.40 g, 1.05 mmol).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.08 (d, ³J = 7.5 Hz, 18H, TIPS-CH₃), 1.33 (s, 12H, BPin-CH₃), 1.42 (dq, ³J = 7.5 Hz, ³J = 15 Hz, 3H, TIPS-CH), 6.70 (d, ⁵J = 2.3 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.07 (d, ⁵J = 2.3 Hz, 1H, 2-H oder 5-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.69, 17.83, 24.99, 83.01, 103.30, 119.42, 122.34, 133.83. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[305]

11.1.1.7 Synthese von *N*-(TIPS)-Aminopyrrolnitrin (*N*-TIPS-22b)

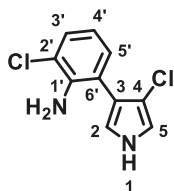


2'-Chlor-6'-(4-chlor-1-(triisopropylsilyl)-1H-pyrrol-3-yl)anilin
N-TIPS-(**22b**)

In einem Ofen-getrockneten Schlenkcolben wurden die festen Ausgangsstoffe vereinigt: **40** (1.00 Äq., 280 mg, 1.10 mmol), **26e** (1.20 Äq., 507 mg, 1.32 mmol), SPhos Pd G4 (0.05 Äq., 44 mg, 0.06 mmol), SPhos (0.10 Äq., 45 mg, 0.11 mmol), und K₃PO₄ (2.00 Äq., 467 mg, 2.20 mmol). Der Schlenkcolben, der die Feststoffe enthält, wurde evakuiert und mit Argon (3x) gefüllt. anschließend wurden die beiden Lösungsmittel [1571 µL entgastes *n*-Butanol und 629 µL entgastes, entionisiertes Wasser (Verhältnis 2.5:1)] mit insgesamt 2.20 mL

(2.0 mL/mmol Anilin **40**) getrennt hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde 12 h bei 35 °C erhitzt. Das Rohgemisch wurde dann durch einen Trichter mit basischem ALOX filtriert, wobei EtOAc als Elutionsmittel verwendet wurde. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Essigsäureethylester (98:2) über deaktiviertem Kieselgel (5 % NEt₃). Dies ergab das gewünschte Produkt (Rf: 0.2). *N*-TIPS-geschütztes Aminopyrrolnitrin mit 40 – 60 % Ausbeute (Lit. 82 %, Morrison *et al.* (2009)^[305]). In dieser Reaktion wurde eine Ausbeute von 59 % (249 mg, 0.65 mmol) erreicht.

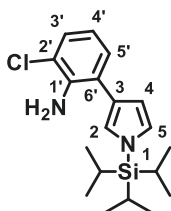
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.11 (d, ³J = 7.6 Hz, 18H, TIPS-CH₃), 1.43 (dq, ³J = 7.5 Hz, ³J = 15 Hz, 3H, TIPS-CH), 4.22 (s, 2H, NH₂), 6.70 (t, ³J = 7.8 Hz, 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 6.80–6.83 (m, 2H, 2-H and 5-H), 7.11 (dd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 7.21 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.69, 17.89, 113.67, 117.95, 119.49, 120.66, 121.16, 122.03, 123.30, 128.35, 129.96, 141.70. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[305]

11.1.1.8 Synthese von Aminopyrrolnitrin (APRN) (**22b**)

2'-Chlor-6'-(4-chlor-1H-pyrrol-3-yl) anilin
(**22b**)

Zu einer Lösung von *N*-TIPS-**22b** (1.00 Äq., 190 mg, 0.50 mmol) in 1 mL THF (2.0 mL/mmol Pyrrol *N*-TIPS-**22b**) wurden bei Raumtemperatur 1.00 mL einer 1 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (TBAF, 2.00 Äq, 1.00 mmol) tropfenweise zugegeben. Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt, um den Einfall von Licht zu minimieren. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bevor mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gequencht wurde. Das resultierende zweiphasige Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt. Die organische und die wässrige Schicht wurden getrennt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Rohprodukt zu erhalten. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie unter Verwendung von basischem Aluminiumoxid (ALOX) als stationäre und *n*-Pentan/Essigsäureethylester (90:10 bis 80:20) als mobile Phase. Das Produkt **22b** wurde bei den Entschätzungen mit 80 – 90 % Ausbeute und in diesem Fall mit 80 % (90 mg, 0.40 mmol) erhalten (Lit. 73 %, Morrison *et al.* (2009)^[305]).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.24 (s, 2H, NH₂), 6.72 (t, ³J = 7.8 Hz, 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 6.82 (td, J = 2.6, 2.4, 1.3 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.86 (dd, J = 3.3 Hz, 1.8 Hz 1H, 2-H oder 5-H), 7.09 (dd, 3J = 7.5 Hz, , ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 7.24 (dd, ³J = 8.0 Hz, , ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 8.45 (bs, 1H, 1-H); **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 4.7 (s, 2H, NH₂), 6.57 (t, ³J = 7.7, 7.7 Hz, 1H, 4'-H), 6.87 (t, J = 2.6, 1H, 2-H oder 5-H), 6.90–6.95 (dd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 6.98 (t, J = 2.5 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.14 (dd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 11.27 (bs, 1H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 112.20, 116.37, 117.29, 118.05, 119.29, 119.55, 120.34, 128.60, 130.17, 141.85. Die Signale im NMR stimmen mit der Literatur überein.^[279]

11.1.1.9 Synthese von *N*-(TIPS)-Monodechloraminopyrrolnitrin (*N*-TIPS-22c)

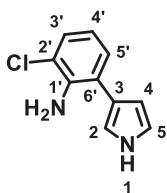
2'-Chlor-6'-(1-(triisopropylsilyl)-
1*H*-pyrrol-3-yl) anilin
N-TIPS-(22c)

In einem Ofen-getrockneten Schlenkcolben wurden die festen Ausgangsstoffe vereinigt: **40** (1.00 Äq., 1.20 g, 5.80 mmol), (*N*-TIPS-1*H*-Pyrrol-3-yl)boronsäure (**26f**) (1.20 Äq., 1.86 g, 6.96 mmol), ([1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen] Palladium(II)-dichlorid/ Pd(dppf)₂Cl₂, 0.05 Äq., 212 mg, 0.29 mmol), und Kaliumphosphat (K₃PO₄, 3.00 Äq., 3.69 g, 17.40 mmol). Der Schlenkcolben, der die Feststoffe enthält, wird evakuiert und mit Argon aufgefüllt (3x). Dann wurde das

Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 7.73 mL entgastem *n*-Butanol und 3.87 mL entgastem, deionisiertem Wasser (2:1) hinzugefügt. Das resultierende Gemisch wurde 12 h lang bei 35 °C erhitzt. Das rohe Reaktionsgemisch wurde dann über einen Trichter, gefüllt mit basischem ALOX, mit Essigsäureethylester filtriert und im Vakuum konzentriert. Die Reinigung wurde durch Säulenchromatographie über deaktiviertem Kieselgel (5 % Triethylamin) mit *n*-Pentan/Essigsäureethylester (98:2) als mobile Phase durchgeführt. *N*-TIPS-22c wurde als brauner Feststoff mit 45 – 80 % Ausbeute erhalten. In dieser Reaktion lag die Ausbeute bei 55 % (1.12 g, 3.20 mmol) (Lit. 82 %, Morrison *et al.* (2009)^[305]).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.13 (d, ³J = 7.5 Hz, 18H, TIPS-CH₃), 1.48 (dq, ³J = 7.5 Hz, 15.2 Hz, 3H, TIPS-CH), 4.37 (s, 2H, NH₂), 6.50 (dd, ³J = 2.4 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, 4-H), 6.69 (t, ³J = 7.7 Hz, 7.7 Hz, 1H, 4'-H), 6.85 (t, ³J = 2.4 Hz, 1.8 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.96 (t, ³J = 2.4 Hz, 1.8 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.14 (dd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 7.16 (dd, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H). Die Daten stimmen mit der Literatur überein. ^[305]

11.1.1.10 Synthese von Monodechloraminopyrrolnitrin (MDA) (22c)



2'-Chlor-6'-(1*H*-pyrrol-3-yl)
anilin
(22c)

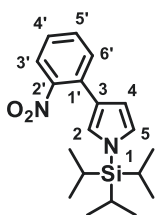
Zu einer Lösung von *N*-TIPS-22c (1.00 Äq., 0.95 g, 2.75 mmol) in 5.50 mL THF wurden 5.50 mL einer 1 M Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) (2.00 Äq., 5.50 mmol) tropfenweise bei Raumtemperatur zugegeben. Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt, um die Lichteinwirkung zu minimieren. Die Lösung wurde 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gequench und die resultierende zweiphasige Mischung wurde in einen Scheidetrichter überführt. Die

organischen und wässrigen Phasen wurden getrennt, und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit

gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Rohprodukt zu erhalten. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie unter Verwendung von basischem Aluminiumoxid (ALOX) als stationäre und *n*-Pentan/Essigsäureethylester (90:10 bis 80:20) als mobile Phase. Das Produkt **22c** wurde mit 65 – 80 % Ausbeute und in dieser Reaktion mit 76 % Ausbeute (0.40 g, 2.10 mmol) erhalten (Lit. 80%).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.37 (s, 2H, NH_2), 6.44 (q, $J = 2.2$ Hz, 2.2 Hz, 2.1 Hz, 1H, 4-H), 6.69 (t, $^3J = 7.8$ Hz, 7.8 Hz, 1H, 4'-H), 6.89 (q, $J = 2.5$ Hz, 2.5 Hz, 2.4 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.00 (q, $J = 2.1$ Hz, 2.1 Hz, 2.1 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.13 (dd, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H), 7.17 (dd, $^3J = 8.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, 3'-H oder 5'-H) 8.37 (bs, 1H, 1-H); **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 108.85, 116.51, 118.40, 118.79, 119.70, 121.66, 123.65, 127.38, 128.38, 140.77. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[305]

11.1.1.11 Synthese von 3-(*ortho*-Nitrophenyl)-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (*N*-TIPS-22i)

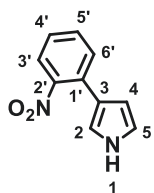


3-(2'-Nitrophenyl)-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrol
N-TIPS-(22i)

In einem Ofen-getrockneten Schlenkcolben wurden die festen Ausgangsstoffe vereinigt: 1-Iod-2-nitrobenzol (**42**) (1.00 Äq., 500 mg, 2.00 mmol), **26f** (1.20 Äq., 640 mg, 2.40 mmol), [1,1'-Bis(diphenyl-phosphino)ferrocen]- PdCl_2 / $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ (0.05 Äq., 73 mg, 0.10 mmol) und Kaliumphosphat (K_3PO_4 , 3.0 Äq., 1.27 g, 6.00 mmol). Der Schlenkcolben, der die Feststoffe enthält, wurde evakuiert und mit Argon (3x) aufgefüllt. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch (Verhältnis 2:1), bestehend aus 2.67 mL entgastem *n*-Butanol

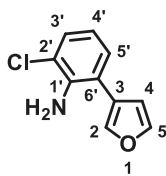
und 1.33 mL entgastem, entionisiertem Wasser, hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde bei 35 °C für 12 h erhitzt. Das rohe Reaktionsgemisch wurde dann über einem Trichter mit basischem ALOX und EtOAc filtriert und im Vakuum konzentriert. Reinigung durch Säulenchromatographie über deaktiviertem Kieselgel (5 % Triethylamin) erfolgte mit *n*-Pentan/Essigsäureethylester (80:20) als mobile Phase. *N*-TIPS-22i wurde als brauner Feststoff mit 40 – 70 % Ausbeute und in dieser Reaktion mit 50 % Ausbeute (0.34 g, 1.00 mmol) gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.12 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 18H, TIPS- CH_3), 1.45 (dq, $^3J = 7.5$ Hz, $^3J = 15.8$ Hz, 3H, TIPS-CH), 6.40 (dd, $^3J = 2.8$ Hz, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 6.79 (t, $^3J = 2.4$ Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.90 (t, $^3J = 1.8$ Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.28 (m, 1H), 7.48 (td, $J = 7.7$ Hz, 7.6 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.3 Hz, 1H).

11.1.1.1 Synthese von 3-(*ortho*-Nitrophenyl)-1*H*-pyrrol (3-*o*NPP) (**22i**)3-(2'-Nitrophenyl)-
1*H*-pyrrol
(**22i**)

Zu einer Lösung von *N*-TIPS-**22i** (1.0 Äq., 0.25 g, 0.74 mmol) in 2 mL THF (2.0 mL/mmol Pyrrol *N*-TIPS-**22i**) bei Raumtemperatur wurden 2.00 Äq. TBAF (1.48 mL einer 1 M Lösung in THF) tropfenweise zugegeben. Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt, um die Lichtexposition zu minimieren. Das Gemisch wurde 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gequenchet und das resultierende zweiphasige Gemisch in einen Scheidetrichter überführt. Die organische und die wässrige Phase wurden getrennt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck konzentriert, um das Rohprodukt zu erhalten. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie über deaktiviertem Kieselgel (5 % Triethylamin) und *n*-Pentan/Essigsäureethylester (90:10) als mobile Phase. Das Produkt **22i** wurde mit 70 % (0.10 g, 0.53 mmol) Ausbeute (Lit. 78%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.33 (td, *J* = 2.8 Hz, 2.7 Hz, 1.6 Hz, 1H, 4-H), 6.84 (q, *J* = 2.5 Hz, 2.5 Hz, 2.4 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 6.98 (dd, *J* = 2.8 Hz, 1.7 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.31 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 6.8 Hz, 1.9 Hz, 1H), 7.46-7.56 (m, 2H), 7.61 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.41 (bs, 1H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 108.61, 116.92, 119.01, 119.31, 123.43, 126.53, 129.92, 131.12, 131.61, 149.50.

11.1.1.2 Synthese von Monodechloraminofuralnitrin (MDAF) (**44**)2'-Chlor-6'-(furan-
3-yl)anilin
(**44**)

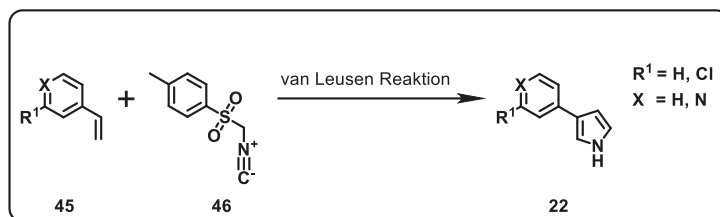
In einem Ofen-getrockneten Schlenk Kolben wurden die festen Ausgangsstoffe vereinigt: **40** (0.85 Äq.), 3-Furylboronsäure (**43**) (1.0 Äq., 0.22 g, 2.00 mmol), SPhos Pd G4 (0.1 Äq.), Dicyclohexyl(2',6'-dimethoxy[1,1'-biphenyl]-2-yl)phosphan (SPhos, 0.20 Äq.) und Kaliumcarbonat (K₂CO₃, 3.0 Äq.). Der Schlenk Kolben mit den Feststoffen wurde evakuiert und mit Argon wieder aufgefüllt (3x). Dann wurde 96 % entgastes Ethanol (50.0 mL/mmol Furan **43**) hinzugefügt. Die resultierende Mischung wurde bei 85 °C für 16 h

erhitzt. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan durch Kieselgel filtriert, im Vakuum konzentriert und durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit *n*-Pentan/Dichlormethan (60:40) gereinigt. Das Produkt **44** wurde als beiger Feststoff (0.27 g, 1.40 mmol) mit einer Ausbeute von 70 % (Lit. 81 %, (Read *et al.*, 2012)^[370] erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.27 (s, 2H, NH₂), 6.62 (dd, *J* = 1.8 Hz, 0.9 Hz, 1H), 6.71 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.66 (t, *J* = 1.2 Hz, 1H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 110.89, 118.54, 119.77, 119.96, 123.24, 128.37, 128.58, 140.20, 140.99, 143.67. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[370]

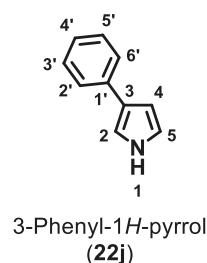
11.1.2 Synthese von Arylpyrrolen *via* van Leusen Reaktion

Für die Synthesen von weiteren Derivaten des Substrates der Halogenase PrnC erfolgten Experimente in Anlehnung an die Publikation von *Smith et al.*^[371]. Diese Strategie beinhaltet einen Aufbau des Pyrrolrings mittels Tosylmethylisocyanid (TosMIC) und der Doppelbindung des Styrols.



Schema 3: Reaktionsschema der van-Leusen-Reaktion von Styrolen mit TosMIC.

11.1.2.1 Synthese von 3-Phenyl-1*H*-pyrrol (3-PP) (22j)

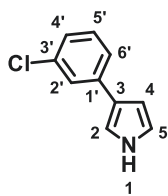


Zu einer Suspension von NaOtBu (2.00 Äq., 384 mg, 4.00 mmol) in 6 mL trockenem DMSO (3.0 mL/mmol Styrol **45**) wurde bei Raumtemperatur eine Lösung aus Styrol **45** (1.00 Äq., 230 µL, 210 mg, 2.00 mmol) und Tosylmethylisocyanid (TOSMIC) (**46**) (1.30 Äq., 508 mg, 2.60 mmol) in 6 mL DMSO (3.0 mL/mmol Styrol **45**) gegeben. Die beigefarbene Lösung wurde 18 h lang bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Essigsäureethylester und gesättigter

Kochsalzlösung verdünnt. Das resultierende zweiphasige Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit *n*-Pentan/Dichlormethan (80:20) gereinigt, um **22j** (Rf: 0.22) als braunen Feststoff mit 40 % Ausbeute (0.12 g, 0.80 mmol) zu erhalten (Lit. 47 %, *Smith et al.* (2002)).^[371]

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.56 (td, *J* = 2.7 Hz, 2.7 Hz, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 6.84 (q, *J* = 2.5 Hz, 2.5 Hz, 2.4 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.10 (q, *J* = 2.1 Hz, 2.1 Hz, 2.0 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.17 (tt, *J* = 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1.3 Hz, 1H, 4'-H), 7.34 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.52 (m, 2H), 8.27 (bs, 1H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 106.77, 114.67, 119.01, 125.42, 125.65, 127.22, 128.74, 138.47. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[371]

11.1.2.2 Synthese von 3-(*meta*-Chlorphenyl)-1*H*-pyrrol (3-*m*CPP) (22k)

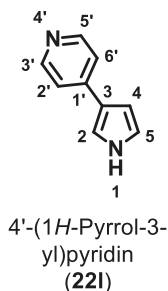


3-(3'-Chlorphenyl)-
1*H*-pyrrol
(22k)

Zu einer Suspension von NaOtBu (2.00 Äq., 672 mg, 7.00 mmol) in 10 mL trockenem DMSO (3.0 mL/mmol Styrol **45a**) wurden als Lösung 3-Chlorstyrol (**45a**) (1.00 Äq., 445 µL, 490 mg, 3.50 mmol) und TosMIC (**46**) (1.30 Äq., 889 mg, 4.55 mmol) in DMSO (3.0 mL/mmol Styrol **45a**) bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die beigefarbene Lösung wurde 6 h lang bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Essigsäureethylester und gesättigte Kochsalzlösung verdünnt. Das resultierende zweiphasige Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt. Die

wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit *n*-Pentan/Dichlormethan (80:20) gereinigt, um **22k** (Rf: 0.22) als braunen Feststoff mit 30 % Ausbeute (0.19 g, 1.05 mmol) zu erhalten (Lit. 58 %, *Smith et al.* (2002)).^[371]

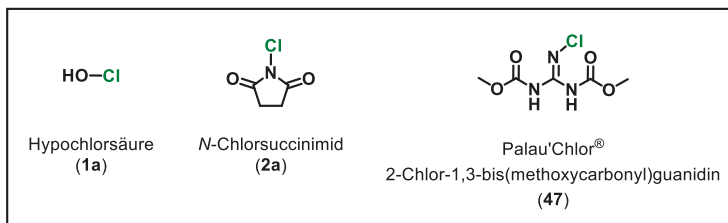
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.52 (q, *J* = 2.7 Hz, 2.6 Hz, 1.7 Hz, 1H, 4-H), 6.84 (q, *J* = 2.6 Hz, 2.6 Hz, 2.2 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.10 (q, *J* = 2.1 Hz, 2.0 Hz, 2.0 Hz, 1H, 2-H oder 5-H), 7.13 (ddd, *J* = 7.9 Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.23-7.28 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.40 (dt, *J* = 7.8 Hz, 1.3 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.31 (bs, 1H, 1-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 106.22, 110.15, 115.12, 119.21, 119.77, 123.22, 125.09, 125.13, 129.80, 138.01. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[371]

11.1.2.3 Synthese von 3-(*para*-Pyridinyl)-1*H*-pyrrol (3-*p*PyP) (**22I**)

Zu einer Suspension von NaOtBu (2.00 Äq., 547 mg, 5.70 mmol) in 9 mL trockenem DMSO (3.0 mL/mmol Styrol **45b**) wurde bei Raumtemperatur eine Lösung von 4-Vinylpyridin **45b** (1.00 Äq., 310 μ L, 300 mg, 2.85 mmol) und **46** (1.30 Äq., 724 mg, 3.71 mmol) in DMSO (3.0 mL/mmol Styrol **45b**) zugegeben. Die beigefarbene Lösung wurde 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Essigsäureethylester und gesättigter Kochsalzlösung verdünnt. Das resultierende zweiphasige Gemisch wurde in einen Scheidetrichter überführt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie auf Kieselgel unter Verwendung von *n*-Pentan/Dichlormethan (80:20) gereinigt, um Verunreinigungen zu entfernen. Dann wurde das Lösungsmittel durch Methanol ersetzt. Schließlich musste das Produkt in kaltem Methanol mehrere Male umkristallisiert werden, um die grün gefärbte Verunreinigung abzutrennen. Das Produkt **22I** wurde als weißer Feststoff mit 55 % Ausbeute (0.23 g, 1.57 mmol) erhalten (Lit. 67 %, *Smith et al.* (2002)).^[371]

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 6.56-6.60 (m, 1H, 4-H), 6.86 (q, *J* = 2.5 Hz, 2.5 Hz, 2.2 Hz 1H, 2-H oder 5-H), 7.47-7.51 (m, 3H), 8.37-8.41 (m, 2H), 11.18 (bs, 1H, 1-H);
¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 106.57, 117.32, 118.93, 119.70, 120.56, 143.26, 149.55. Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[371]

11.1.3 Chemische Halogenierung



Schema 4: Chemische Chlorierungs-Reagenzien. Neben hypochloriger Säure und *N*-Chlorsuccinimid ist auch das Guanidin-Derivat Palau'Chlor®^[320] zu sehen.

11.1.3.1 Biomimetischer Ansatz zur chemischen Chlorierung von MDA

Für den Vergleich von biokatalytischer Chlorierung und chemischer Halogenierung wurden beide – MDA (**22c**) und geschütztes *N*-TIPS-**22c** – verwendet. Zunächst wurden biomimetische Reaktionen durchgeführt, bei denen 50 µL DMSO-Stocks an **22c** (1.2 mM) in 950 µL deionisiertem Wasser gelöst wurden. Zu der entstandenen Lösung von 60 µM MDA (1.00 Äq., 11.56 µg, 60 nmol) mit 5 % (v/v) DMSO, wurden in zwei Reaktionsgefäßen anschließend jeweils 1.00 Äq. (8.01 µg, 60 nmol) NCS (**2a**) bzw. 1.00 Äq. (12.58 µg, 60 nmol) Palau'Chlor® (**47**) hinzugefügt. In einem dritten Ansatz erfolgte die Zugabe von 15 % Hypochlorsäure (**1a**). Wegen der hohen Konzentration wurde die 15 %-Lösung von Hypochlorsäure (150 g/L) um den Faktor 1000 verdünnt (150 mg/L), bevor sie in der Reaktion eingesetzt wurde. Nach der Vorlage von 50 µL DMSO-Stock an **22c** (1.00 Äq., 11.56 µg, 60 nmol), erfolgte dann die Zugabe von 971 µL Wasser, bevor 29 µL der verdünnten hypochlorigen Säure (1.00 Äq., 150 mg/L, 4.35 µg, 60 nmol) als Halogenierungsreagenz hinzugefügt wurden. Für alle drei Reaktionen betrug das Endvolumen 1 mL. Die Reaktion wurde 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Proben wurden mit Essigsäureethylester extrahiert und über einer mit Watte und MgSO₄ gefüllten Pasteurpipette getrocknet. Die Reaktion wurde mittels GC-MS analysiert. Bei diesem Experiment wurde nur 1 % Chlorierung für **2a** und keine für die anderen Halogenierungsreagenzien nachgewiesen.

11.1.3.2 Chlorierung von MDA bei verschiedenen Temperaturen

Im folgenden Versuch wurden in zwei Reaktionsgefäßen jeweils 1.00 Äq. (10 mg, 51.90 μmol) von MDA **22c** in 1 mL Chloroform (20.0 mL/mmol **22c**) gelöst. Für Reaktion 1 wurden 2.20 Äq. (15.24 mg, 114.18 μmol) NCS (**2a**) und für Reaktion 2 wurden 2.20 Äq. (23.94 mg, 114.18 μmol) Palau'Chlor® (**47**) hinzugefügt. Die Reaktionen 1 und 2 wurden bei 50 °C für eine Stunde gerührt. Die Proben wurden mit Essigsäureethylester extrahiert und über einer mit Watte und MgSO_4 gefüllten Pasteurpipette getrocknet. Die Reaktion wurde mittels GC-MS analysiert. In diesem Fall zeigten beide Halogenierungsreagenzien das gleiche Produktmuster (Rodriguez et al., 2014)^[320]. Um eine bessere Selektivität zu erhalten, wurde anschließend die Temperatur auf Raumtemperatur reduziert und die Reaktion sowohl mit 1.00 Äq. (18.11 mg, 51.90 μmol) *N*-TIPS-**22c**, als auch 1.00 Äq. (10 mg, 51.90 μmol) MDA (**22c**) und 2.20 Äq. (23.94 mg, 114.18 μmol) Palau'Chlor® (**47**) wiederholt. Für die Chlorierung von 1.00 Äq. (18.11 mg, 51.90 μmol) *N*-TIPS-**22c** wurde zum Vergleich erneut auch NCS (**2a**) (2.20 Äq. 15.25 mg, 114.18 μmol) in einer Reaktion bei Raumtemperatur verwendet. Der letzte Ansatz war die Chlorierung von 1.00 Äq. (18.11 mg, 51.90 μmol) *N*-TIPS-**22c** mit NCS (**2a**) (2.20 Äq. 15.25 mg, 114.18 μmol) bei 0 °C für 12 h und anschließender Erwärmung auf Raumtemperatur. Die Reaktionen wurden mit Essigsäureethylester extrahiert und über einer mit Watte und MgSO_4 gefüllten Pasteurpipette getrocknet, um mittels GC-MS analysiert zu werden. Die Ansätze mit geschütztem MDA wurden nach der Extraktion und vor der GC-MS-Analyse analog dem Kapitel 11.1.1.10 mit 2.00 Äq. TBAF (1 M in THF) in THF versetzt und für 1 h bei RT zur Entschützung gerührt.

11.1.4 Synthese von Nicotinamid-Derivaten

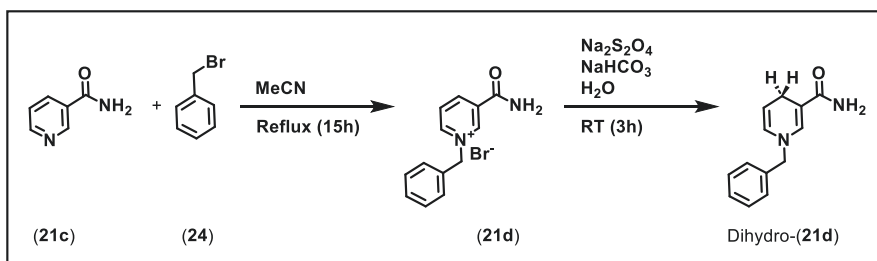
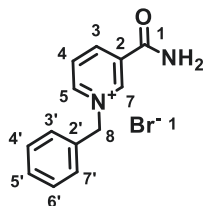


Abbildung 115: Zwei-Schritt-Synthese von *N*-Benzyl-1,4-dihydropyridin-3(4H)-on (BNAH) aus Nikotinamid und Benzylbromid über die Zwischenstufe des *N*-Benzylpyridin-3(4H)-on (BNA) für die FADH_2 -Regeneration.^[181, 372]

11.1.4.1 Synthese von *N*-Benzylnicotinamid (**21d**)



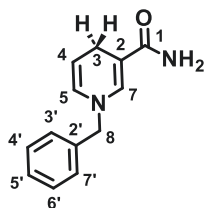
1-Benzyl-3-carbamoylpyridiniumbromid (**21d**)

In einem Ofen-getrockneten Zweihalskolben mit Acetonitril (MeCN, 260 mL) wurden die festen Ausgangsstoffe Nicotinamid (**21c**) (1.00 Äq., 10.0 g, 81.9 mmol) und Benzylbromid (**24**) (1.00 Äq., 9.7 mL, 81.9 mmol) vereinigt. Diese Suspension wurde für 15 h unter Rückfluss bei 90 °C erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur gekühlt und 100 mL Diethylether zur Präzipitierung hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Filtrierung. Der klebrige, schaumartige Feststoff wurde anschließend dreimal mit 20 mL weiterem Diethylether gewaschen. Nach Evaporieren des Lösemittels wurde das farblose Pulver des

21d mit 96 % Ausbeute (23.0 g, 78.5 mmol) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 5.95 (s, 2H, 8-H), 7.45 (m, 3H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, Ph), 7.59 (m, 2H, 3'-H, 7'-H, Ph), 8.19 (s, 1H, NH), 8.29 (dd, 1H, 4-H), 8.62 (s, 1H, NH), 8.99 (dt, 1H, 3-H), 9.33 (dt, 1H, 5-H), 9.67 (t, 1H, 7-H).

11.1.4.2 Synthese von *N*-Benzyl-1,4-dihydronicotinamid (**BNAH**) (**Dihydro-21d**)



1-Benzyl-1,4-dihydronicotinamid H₂ (**21d**)

In einem Ofen-getrockneten Schlenk Kolben wurden das *N*-Benzylnicotinamid (**21d**) (1.00 Äq., 2.93 g, 10.0 mmol) und Natriumhydrogencarbonat NaHCO₃ (5.00 Äq., 4.20 g, 50.0 mmol) vorgelegt und der Kolben sekuriert. Über eine Spritze wurden 60 mL entgastes Wasser hinzugefügt. Nachdem das Ausgangsmaterial gelöst war (klare Lösung), wurde der Kolben mit Alufolie umwickelt. Unter N₂-Atmosphäre wurden dann 5.00 Äq. Natriumdithionit Na₂S₂O₄ (8.71 g, 50.0 mmol) vorsichtig unter Gasentwicklung hinzugefügt. Die nun gelbe Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur im Dunklen gerührt.

Nach 1 h war ein präzipitierter Feststoff sichtbar. Das Produkt wurde filtriert und mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Nacht wurde das gelbe BNAH (**Dihydro-21d**) mit 79 % (1.69 g, 7.90 mmol) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.18 (dd, 2H, 3-H), 4.30 (s, 2H, 8-H), 7.77 (m, 1H, 4-H), 5.29 (s, 2H, NH₂), 5.76 (d, 1H, 5-H), 7.17 (s, 1H, 7-H), 7.20-7.40 (m, 5H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H, 7'-H, Ph).

11.2 Biosynthese von Pyrrolnitrin & Halogen-Prodigininen

Nach der erfolgreichen Elektroporation von *P. putida* KT2440, *P. putida* KT2440 pig-r44 und *P. putida* KT2440 rot1 Δ pigD^[280, 355, 373] (basierend auf dem Stamm *P. putida* KT2440 pig-r1)^[373] mit jeweils dem Vektor pBTBX-2* (Leervektorkontrolle), pBTBX-2*-pltLA (Dichlorierung von MBC) und pBTBX-2*-PRN ptac (PRN als MAP-Ersatz) erfolgte ein Biosynthese-Ansatz von Pyrrolnitrin und Prodiginin-Derivaten (Abbildung 40 und Abbildung 110). Die Kombination von Pyrrolnitrin im Kontext der Prodigosin-Biosynthese basiert unter anderem auf den Arbeiten von *Zhao et al.* (Abbildung 39).^[284] Hierfür wurden 10 mL ÜNK in LB-Medium angesetzt. Die jeweiligen Antibiotika wurden mit 20 µg/mL (Gentamycin) bzw. 50 µg/mL (Kanamycin) zugesetzt. Die Hauptkulturen werden in 20 mL LB-Medium angezogen und bei 30 °C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0.5 wachsen gelassen. Die Induktion erfolgte dann mit 1 – 2 mM Salicylat bzw. 2 % L-Arabinose^[374] (133 mM, 20 mg/mL) (Abbildung 79 und Abbildung 82).^[323] Die Temperatur wurde auf Grund der Proteinstabilität auf 18 °C gesenkt und nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die Überstände mit einem Volumen EE extrahiert, konzentriert und in Methanol aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels *CellLytic™ P Cell Lysis Reagent* der Firma *Sigma Aldrich* [C2360].

11.3 Untersuchung des Substratspektrums von PrnC

Die Reaktionen wurden für 60 min bei 35 °C und 700 rpm in 0.5 mL durchgeführt. Der Reaktionspuffer basierte auf KP_i mit einer Konzentration von 25 mM und einem pH-Wert von 7.2 und enthielt 20 mM Glucose und 30 mM NaCl (aus dem Lagerungspuffer). PrnC wurde bis zu einer Endkonzentration von 14 µM (0,93 mg/mL) zugegeben. Die Flavin-Reduktase PrnF wurde bis zu einer volumetrischen Aktivität von 2 U/mL (1.2 µM) und das Cofaktor-Recycling-System GDH bis zu einer Aktivität von 2 U/mL zugesetzt. Cosubstrate waren NADH (1 mM) und FAD (30 µM). Die Substrate wurden als DMSO-Stammlösung (20x) zugegeben, was eine Endkonzentration von 60 µM der Verbindung und 5 % (v/v) DMSO ergab. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.25 mL Essigsäureethylester mit internem Standard (50 µM m Chlortoluol) gestoppt. Das Gemisch aus Reaktionslösung und organischer Phase wurde gemischt (Vortexer) und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein GC-Vial überführt. Die Umsetzung wurde durch GC-MS-Analyse bestimmt (Abbildung 70) und Produktpeakfläche für jede Probe auf die Fläche des internen Standards normiert. Als kleine Bibliothek wurden die Arylpyrrole **22i-I**, das Furan (**44**) und Pyrrol-2-Carbaldehyd (**26g**) als einfaches Pyrrol getestet. Das natürliche Substrat **22c** wurde als Vergleich und Positivkontrolle verwendet.

11.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Quantifizierung des Umsatzes und zur Bestimmung der Aktivität musste eine Kalibrierung des biokatalytischen Produkts APRN (**22b**) vorgenommen werden. Dazu wurden 50 μL APRN-Stocks in DMSO mit Konzentrationen von 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM , 120 μM , 160 μM und 200 μM mit 950 μL Reaktionspuffer ohne PrnC gemischt. Die anschließende Extraktion erfolgte analog zu dem bei der Bestimmung des Substratspektrums, allerdings mit 100 μM *m*-Chlortoluol im Lösemittel.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde eine Reaktionsmischung mit 25 mM KPi (pH = 7.2), 30 mM NaCl, 20 mM Glucose, 1 % Glycerin (aus dem Lagerungspuffer), 30 μM FAD, 2 U/mL PrnF, 2 U/mL GDH und 0.3 mg/mL PrnC ($\sim 4.5 \mu\text{M}$) zu in DMSO gelöstem MDA (20 μM – 2000 μM) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH auf ein Endvolumen von 1 mL in einem 2 mL Reaktionsgefäß gestartet und mit 700 U/min bei 30 °C geschüttelt (*Eppendorf Thermomixer compact*, beheizter Schüttelblock für 1,5 – 2 mL, *Eppendorf AG*, Hamburg, Deutschland). Die 30 °C waren ein Kompromiss zwischen der Stabilität von Verbindungen und Enzymen und der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Proben wurden direkt nach Beginn der Reaktion (0 min), nach 5 min, 10 min, 15 min und 20 min gezogen. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Volumens Essigsäureethylester mit IS (100 μM *m*-Chlortoluol) gestoppt. Die organische Phase wurde nach dem Mischen (Vortexer) und Zentrifugieren zur Phasentrennung extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein GC-Vial überführt und analysiert (Abbildung 67). Die Rohdaten finden sich im Anhang unter dem Kapitel 14.4.

11.5 Design of Experiment

Für eine systematische Analyse der Reaktionsbedingungen für PrnC erfolgte ein *Design of Experiment* Verfahren mithilfe der Software *Design Expert* (*StatEase*, Inc.). Hierfür wurde das sogenannte „*Factorial Design*“ als Grundlage gewählt und die Reaktionen in Duplikaten durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle dienten Proben ohne Enzym PrnC.

Für die Untersuchung wurden für jeden Parameter zwei Grenzwerte getestet. Diese waren für die Reaktionstemperatur 20 °C und 40 °C, Die Reduktaseaktivität SsuE 7 U/L bzw. 34 U/L, pH = 7 oder 8, FAD-Konzentration 10 μM und 500 μM , NADPH mit 50 μM oder 1000 μM und eine Konzentration von NaCl 10 mM bzw. 100 mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADPH gestartet. Die Reaktion erfolgte in 1 mL Reaktionslösung in 50 mM KPi , 1 % Glycerin, 500 μM Substrat, 20 mM Glucose, 10 U/mL GDH und PrnC (4.5 μM bzw. 0.3 mg/mL). Bei entsprechender Temperatur wurde die Reaktion für 2 h und 700 rpm durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL Essigsäureethylester (EE mit internem Standard 500 μM *meta*-Chlortoluol) gestoppt. Die obere organische

Phase wurde nach Schütteln und Zentrifugation abgenommen, über Magnesiumsulfat getrocknet und mit Hilfe von GC-MS analysiert (Abbildung 65). Das Planen der Experimente erfolgte unter Anleitung von *Dr. Thomas Classen*. Die Rohdaten finden sich im Anhang unter dem Kapitel 14.4.

12. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, M. J. Sternberg, *Nat. Protoc.* **2015**, 10, 845-858; 'The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis', <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- [2] K. Blin, S. Shaw, H. E. Augustijn, Z. L. Reitz, F. Biermann, M. Alanjary, A. Fetter, B. R. Terlouw, W. W. Metcalf, E. J. N. Helfrich, G. P. van Wezel, M. H. Medema, T. Weber, *Nucleic Acids Res.* **2023**, 51, W46-W50; 'antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation', <https://doi.org/10.1093/nar/gkac344>.
- [3] F. Madeira, M. Pearce, A. R. N. Tivey, P. Basutkar, J. Lee, O. Edbali, N. Madhusoodanan, A. Kolesnikov, R. Lopez, *Nucleic Acids Res.* **2022**, 50, W276-W279; 'Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022', <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>.
- [4] O. Salcher, F. Lingens, *J. Gen. Microbiol.* **1980**, 118, 509-513; 'Isolation and characterization of a mutant of *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926 with an increased capacity for synthesis of pyrrolnitrin', <https://doi.org/10.1099/00221287-118-2-509>.
- [5] D. S. Hill, J. I. Stein, N. R. Torkewitz, A. M. Morse, C. R. Howell, J. P. Pachlatko, J. O. Becker, J. M. Ligon, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 78-85; 'Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease', <https://doi.org/10.1128/aem.60.1.78-85.1994>.
- [6] 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', <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00032>.
- [7] C. M. Harris, R. Kannan, H. Kopecka, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6652-6658; 'The role of the chlorine substituents in the antibiotic vancomycin: preparation and characterization of mono- and didechlorovancomycin', <https://doi.org/10.1021/ja00309a038>.
- [8] F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3364-3378; 'Nature's inventory of halogenation catalysts: oxidative strategies predominate', <https://doi.org/10.1021/cr050313i>.
- [9] C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Cent. Sci.* **2021**, 7, 55-71; 'Power of Biocatalysis for Organic Synthesis', <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496>.
- [10] 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', <https://doi.org/10.1002/jlac.19425510103>.
- [11] B. L. Duncan, R. C. Ness, **1993**, Process for the production of highly pure concentrated slurries of sodium hypochlorite, USA, WO1991011387A1.
- [12] J. N. Howarth, A. Dadgar, R. H. Sergent, **1995**, Recovery of bromine and preparation of hypobromous acid from bromide solution, US5385650A.
- [13] M. Kesner, *Bromine and Bromine Compounds From the Dead Sea, Israel Products in the Service of People*, The Weizmann Institute of Science, Israel, **1999**, <http://www.weizmann.ac.il/sci-teal/Brombook/pdf/cont.pdf>.
- [14] G. L. Squadrito, E. M. Postlethwait, S. Matalon, *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* **2010**, 299, L289-L300; 'Elucidating mechanisms of chlorine toxicity: reaction kinetics, thermodynamics, and physiological implications', <https://doi.org/10.1152/ajplung.00077.2010>.
- [15] M. Hofmann, R. Müller, A. Christidis, P. Fischer, F. Klauke, S. Vomberg, G. Tsatsaronis, *AIChE J.* **2022**, 68, e17480; 'Flexible and economical operation of chlor-alkali process with subsequent polyvinyl chloride production'; (Aiche J), <https://doi.org/10.1002/aic.17480>.

- [16] Euro Chlor, Report, **2017/2018**, Chlor-alkali Industry Review Sector Group of Cefic (European Chemical Industry Council), https://www.eurochlor.org/wp-content/uploads/2019/05/euro_chlor_industry_review_FINAL.pdf, Zugriff: 15.12.2024
- [17] Euro Chlor, Report, **2019/2020**, Chlor-alkali Industry Review Sector Group of Cefic (European Chemical Industry Council), <https://www.eurochlor.org/publication/chlor-alkali-industry-review-2019-2020/>, Zugriff: 15.12.2024
- [18] J. Tao, J. H. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 43-50; 'Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.01.018>.
- [19] G. W. Gribble, *Naturally Occurring Organohalogen Compounds*, Vol. 121, Springer, **2023**, ISBN: 978-3-031-26628-7, 978-3-031-26629-4, <https://doi.org/10.1007/978-3-031-26629-4>.
- [20] B. R. K. Menon, D. Richmond, N. Menon, *Catal. Rev.* **2022**, 64, 533–591; 'Halogenases for biosynthetic pathway engineering: Toward new routes to naturals and non-naturals', <https://doi.org/10.1080/01614940.2020.1823788>.
- [21] G. W. Gribble, *J. Chem. Educ.* **2004**, 81, 1441; 'Natural Organohalogens: A New Frontier for Medicinal Agents?', <https://doi.org/10.1021/ed081p1441>.
- [22] F. Chast, in *The Practice of Medicinal Chemistry (Third Edition)*, Elsevier, **2008**, pp. 1-62, ISBN: 9780123741943, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374194-3.00001-9>.
- [23] 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', <https://doi.org/10.2174/138945010790711996>.
- [24] 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', <https://doi.org/10.1038/srep34750>.
- [25] K. Li, Q. Fan, H. Chuai, H. Liu, S. Zhang, X. Ma, *Trans. Tianjin Univ.* **2021**, 27, 202-216; 'Revisiting Chlor-Alkali Electrolyzers: from Materials to Devices', <https://doi.org/10.1007/s12209-021-00285-9>.
- [26] C. Rodriguez, W. Borzecka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 673-681; 'Steric vs. electronic effects in the *Lactobacillus brevis* ADH-catalyzed bioreduction of ketones', <https://doi.org/10.1039/C3OB42057D>.
- [27] G. Gerebtzoff, X. Li-Blatter, H. Fischer, A. Frentzel, A. Seelig, *ChemBioChem* **2004**, 5, 676-684; 'Halogenation of drugs enhances membrane binding and permeation', <https://doi.org/10.1002/cbic.200400017>.
- [28] C. L. Gentry, R. D. Egleton, T. Gillespie, T. J. Abbruscato, H. B. Bechowski, V. J. Hruby, T. P. Davis, *Peptides* **1999**, 20, 1229-1238; 'The effect of halogenation on blood-brain barrier permeability of a novel peptide drug', [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(99\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(99)00127-8).
- [29] M. T. Kim, A. Sedykh, S. K. Chakravarti, R. D. Saiakhov, H. Zhu, *Pharm. Res.* **2014**, 31, 1002-1014; 'Critical evaluation of human oral bioavailability for pharmaceutical drugs by using various cheminformatics approaches', <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1222-1>.
- [30] L. R. Murphy, T. L. Meek, A. L. Allred, L. C. Allen, *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 5867-5871; 'Evaluation and Test of Pauling's Electronegativity Scale', <https://doi.org/10.1021/jp000288e>.
- [31] A. V. Fejzagić, J. Gebauer, N. Huwa, T. Classen, *Molecules* **2019**, 24, 4008; 'Halogenating Enzymes for Active Agent Synthesis: First Steps Are Done and Many Have to Follow', <https://doi.org/10.3390/molecules24214008>.
- [32] M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, 87, 159-185; 'Understanding and improving the activity of flavin-dependent halogenases via random and targeted mutagenesis', <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012042>.

- [33] 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', <https://doi.org/10.1039/b926326h>.
- [34] E. S. Marsan, C. A. Bayse, *Chem. - Eur. J.* **2020**, 26, 5200-5207; 'Halogen Bonding Interactions of Polychlorinated Biphenyls and the Potential for Thyroid Disruption', <https://doi.org/10.1002/chem.201903904>.
- [35] 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', <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.678829>.
- [36] 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', <https://doi.org/10.1021/jm200644r>.
- [37] Z. Xu, Z. Yang, Y. Liu, Y. Lu, K. Chen, W. Zhu, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 69-78; 'Halogen bond: its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development', <https://doi.org/10.1021/ci400539g>.
- [38] S. Sirimulla, J. B. Bailey, R. Vegesna, M. Narayan, *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 2781-2791; 'Halogen interactions in protein-ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design', <https://doi.org/10.1021/ci400257k>.
- [39] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements*, Elsevier, 2012, **2012**, ISBN: 9780080501093.
- [40] 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', [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00886-D](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00886-D).
- [41] L. M. Lima, E. J. Barreiro, *Current Medicinal Chemistry* **2005**, 12, 23-49; 'Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design', <https://doi.org/10.2174/0929867053363540>.
- [42] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330; 'Fluorine in medicinal chemistry', <https://doi.org/10.1039/B610213C>.
- [43] C. W. Lindsley, *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, 8, 1635-1636; 'New 2016 Data and Statistics for Global Pharmaceutical Products and Projections through 2017', <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00253>.
- [44] S. S. Ramalingam, F. Blackhall, M. Krzakowski, C. H. Barrios, K. Park, I. Bover, D. S. Heo, R. Rosell, D. C. Talbot, R. Frank, S. P. Letrent, A. Ruiz-Garcia, I. Taylor, J. Q. Liang, A. K. Campbell, J. O'Connell, M. Boyer, *J. Clin. Oncol.* **2012**, 30, 3337-3344; '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', <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.9433>.
- [45] T. Kaiho, in *Iodine Chemistry and Applications* (Ed.: T. Kaiho), Wiley, **2014**, pp. 433-437, ISBN: 9781118466292, 9781118909911, <https://doi.org/10.1002/9781118909911.ch23>.
- [46] K. Pommerehne, J. Walisko, A. Ebersbach, R. Krull, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103, 3627-3636; 'The antitumor antibiotic rebeccamycin-challenges and advanced approaches in production processes', <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09741-y>.
- [47] I. Gentile, A. R. Buonomo, F. Borgia, G. Castaldo, G. Borgia, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2014**, 23, 561-571; 'Ledipasvir : a novel synthetic antiviral for the treatment of HCV infection', <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.892581>.
- [48] L. P. Sheets, in *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, **2010**, pp. 2055-2064, ISBN: 9780123743671, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00095-1>.

- [49] S. Singh, V. Kumar, A. Chauhan, S. Datta, A. B. Wani, N. Singh, J. Singh, *Environmental Chemistry Letters* **2017**, 16, 211-237; 'Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine', <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0665-8>.
- [50] L. C. Blasiak, C. L. Drennan, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 42, 147-155; 'Structural perspective on enzymatic halogenation', <https://doi.org/10.1021/ar800088r>.
- [51] J. A. Bush, B. H. Long, J. J. Catino, W. T. Bradner, *The Journal of Antibiotics* **1987**, 40, 668-678; 'Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent', <https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.668>.
- [52] N. T. S. Phan, M. Van Der Sluys, C. W. Jones, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 609-679; 'On the nature of the active species in palladium catalyzed Mizoroki–Heck and Suzuki–Miyaura couplings—homogeneous or heterogeneous catalysis, a critical review'; (*Adv Synth Catal*), <https://doi.org/10.1002/adsc.200505473>.
- [53] I. P. Beletskaya, A. V. Cheprakov, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 2337-2364; 'Copper in cross-coupling reactions: The post-Ullmann chemistry'; (*Coordin Chem Rev*), <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.014>.
- [54] 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', <https://doi.org/10.1021/jo800197u>.
- [55] 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', <https://doi.org/10.1002/chem.201803360>.
- [56] 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', <https://doi.org/10.1002/anie.201800364>.
- [57] G. r. Cahiez, G. Lefèvre, A. Moyeux, O. Guerret, E. Gayon, L. Guillonnet, 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', <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00665>.
- [58] J. W. B. 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'; (*Org Process Res Dev*), <https://doi.org/10.1021/op0100100>.
- [59] 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'; (*Org Process Res Dev*), <https://doi.org/10.1021/op0499021>.
- [60] M. J. Buskes, M.-J. Blanco, *Molecules* **2020**, 25, 3493; 'Impact of Cross-Coupling Reactions in Drug Discovery and Development', <https://doi.org/10.3390/molecules25153493>.
- [61] K. Tamao, K. Sumitani, M. Kumada, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 94, 4374-4376; 'Selective carbon-carbon bond formation by cross-coupling of Grignard reagents with organic halides. Catalysis by nickel-phosphine complexes', <https://doi.org/10.1021/ja00767a075>.
- [62] N. Miyaura, A. Suzuki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**; 'Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst', <https://doi.org/10.1039/C39790000866>.
- [63] D. Milstein, J. K. 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', <https://doi.org/10.1021/ja00479a077>.

- [64] A. O. King, N. Okukado, E.-i. Negishi, *J. Chem. Soc., 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', <https://doi.org/10.1039/C39770000683>.
- [65] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 4467-4470; 'A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines', [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91094-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91094-3).
- [66] R. F. Heck, J. P. Nolley, *J. Org. Chem.* **1972**, 37, 2320-2322; 'Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides', <https://doi.org/10.1021/jo00979a024>.
- [67] M. Oestreich, *The Mizoroki-Heck Reaction*, John Wiley & Sons Inc, **2009**, ISBN-10: 0470033940, ISBN-13: 978-0470033944
- [68] A. S. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7901-7902; 'Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in situ Generated Aminostannanes', <https://doi.org/10.1021/ja00096a059>.
- [69] F. Paul, J. Patt, J. F. Hartwig, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 116, 5969-5970; 'Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling of aryl halides and tin amides', <https://doi.org/10.1021/ja00092a058>.
- [70] G. W. Gribble, *Chemosphere* **2003**, 52, 289-297; 'The diversity of naturally produced organohalogens', [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(03\)00207-8](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(03)00207-8).
- [71] H. R. Thapa, A. J. Lail, N. Garg, V. Agarwal, *Methods Enzymol.* **2018**, 604, 333-366; 'Chemoenzymatic Synthesis of Starting Materials and Characterization of Halogenases Requiring Acyl Carrier Protein-Tethered Substrates', <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.01.028>.
- [72] D. R. M. Smith, S. Grünschow, R. J. M. Goss, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 276-283; 'Scope and potential of halogenases in biosynthetic applications', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.01.018>.
- [73] D. G. Fujimori, C. T. Walsh, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, 11, 553-560; 'What's new in enzymatic halogenations', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.002>.
- [74] K. Kuhnel, 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', <https://doi.org/10.1074/jbc.M603166200>.
- [75] D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 1763-1768; 'Chloroperoxidase', [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96701-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96701-3).
- [76] M. Nieto-Dominguez, P. I. Nickel, *ChemBioChem* **2020**, 21, 2551-2571; 'Intersecting Xenobiology and Neometabolism To Bring Novel Chemistries to Life', <https://doi.org/10.1002/cbic.202000091>.
- [77] M. Buchhaupt, S. Hüttmann, 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', <https://doi.org/10.1159/000375123>.
- [78] A. Butler, M. Sandy, *Nature* **2009**, 460, 848-854; 'Mechanistic considerations of halogenating enzymes', <https://doi.org/10.1038/nature08303>.
- [79] W.-D. Woggon, *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 127-136; 'Metalloporphyrines as active site analogues lessons from enzymes and enzyme models', <https://doi.org/10.1021/ar040079j>.
- [80] 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', <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.02.016>.

- [81] J. W. P. M. van Schijndel, E. G. M. Vollenbroek, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1993**, 1161, 249-256; 'The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme', [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90221-c](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90221-c).
- [82] 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*', [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00055-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00055-e).
- [83] E. De Boer, Y. Van Kooyk, M. G. M. Tromp, H. Plat, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1986**, 869, 48-53; 'Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group?', [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90308-0](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90308-0).
- [84] R. Wever, in *Vanadium: biochemical and molecular biological approaches* (Ed.: H. Michibata), **2012**, pp. 95-125, ISBN: 9400709129.
- [85] J. M. Winter, B. S. Moore, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 18577-18581; 'Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases', <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.001602>.
- [86] Z. Chen, *Coord. Chem. Rev.* **2022**, 457, 214404; 'Recent development of biomimetic halogenation inspired by vanadium dependent haloperoxidase'; (*Coord. Chem. Rev.*), <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214404>.
- [87] E. F. Gérard, T. Mokkaewes, L. O. Johannissen, J. Warwicker, R. R. Spiess, C. F. Blanford, S. Hay, D. J. Heyes, S. P. de Visser, *ACS Catal.* **2023**, 13, 8247-8261; 'How Is Substrate Halogenation Triggered by the Vanadium Haloperoxidase from *Curvularia inaequalis*?', <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c00761>.
- [88] D. S. Gkotsi, J. Dhaliwal, M. M. W. McLachlan, K. R. Mulholland, R. J. M. Goss, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, 43, 119-126; 'Halogenases: powerful tools for biocatalysis (mechanisms applications and scope)', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.01.002>.
- [89] A. S. Aslan-Üzel, A. Beier, D. Kovář, C. Cziegler, S. K. Padhi, E. D. Schuitem, M. Dörr, D. Böttcher, F. Hollmann, F. Rudroff, *ChemCatChem* **2019**, 12, 2032-2039; 'An ultrasensitive fluorescence assay for the detection of halides and enzymatic dehalogenation', <https://doi.org/10.1002/cctc.201901891>.
- [90] A. V. Fejzagić, S. Myllec, 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', <https://doi.org/10.1002/open.202000184>.
- [91] J. Littlechild, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 28-34; 'Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions', [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)80006-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)80006-4).
- [92] B. Hofmann, S. Tölzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K. H. van Pée, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, 279, 889-900; 'Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases', <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1802>.
- [93] K. H. van Pee, C. Dong, S. Flecks, J. Naismith, E. P. Patallo, T. Wage, *Adv. Appl. Microbiol.* **2006**, 59, 127-157; 'Biological halogenation has moved far beyond haloperoxidases', [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)59005-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)59005-7).
- [94] H. Hussain, A. Al-Harrasi, I. R. Green, I. Ahmed, G. Abbas, N. U. Rehman, *RSC Adv.* **2014**, 4, 12882-12917; 'meta-Chloroperbenzoic acid (m CPBA): a versatile reagent in organic synthesis', <https://doi.org/10.1039/C3RA45702H>.
- [95] S. D. Wong, M. Srnc, M. L. Matthews, L. V. Liu, Y. Kwak, K. Park, C. B. Bell III, E. E. Alp, J. Zhao, Y. Yoda, *Nature* **2013**, 499, 320-323; 'Elucidation of the Fe(IV)=O intermediate in the catalytic cycle of the halogenase SyrB2', <https://doi.org/10.1038/nature12304>.
- [96] X. Liu, in *Methods Enzymol.*, Vol. 604, 20180411 ed., Elsevier, **2018**, pp. 389-404, ISBN: 1557-7988, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.02.015>.

- [97] F. H. Vaillancourt, J. Yin, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10111-10106; 'SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII alpha-ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase', <https://doi.org/10.1073/pnas.0504412102>.
- [98] L. C. Blasiak, F. H. Vaillancourt, C. T. Walsh, C. L. Drennan, *Nature* **2006**, *440*, 368-371; 'Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis', <https://doi.org/10.1038/nature04544>.
- [99] H. Deng, D. O'Hagan, C. Schaffrath, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 773-784; 'Fluorometabolite biosynthesis and the fluorinase from *Streptomyces cattleya*', <https://doi.org/10.1039/B415087M>.
- [100] H. Deng, D. O'Hagan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 582-592; 'The fluorinase, the chlorinase and the *duf-62* enzymes', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.036>.
- [101] 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', <https://doi.org/10.1002/cbic.201300732>.
- [102] 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', <https://doi.org/10.1039/C6RA00100A>.
- [103] Y. Jiang, M. Yao, H. Niu, W. Wang, J. He, B. Qiao, B. Li, M. Dong, W. Xiao, Y. Yuan, *J. Agric. Food Chem.* **2024**, *72*, 1203-1212; 'Enzyme Engineering Renders Chlorinase the Activity of Fluorinase', <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c08185>.
- [104] A. M. Edwards, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1146 (Eds.: S. Weber, E. Schleicher), Humana Press, New York, NY, **2014**, ISBN 978-1-4939-0452-5, <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0452-5>.
- [105] S. Liu, W. Hu, Z. Wang, T. Chen, *Microb. Cell Fact.* **2020**, *19*, 1-16; 'Production of riboflavin and related cofactors by biotechnological processes', <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01302-7>.
- [106] J. T. Pinto, J. Zemljeni, *Adv. Nutr.* **2016**, *7*, 973-975; 'Riboflavin', <https://doi.org/10.3945/an.116.012716>.
- [107] E. P. o. F. Additives, N. S. a. t. Food, *EFSA J.* **2013**, *11*, 3357; 'Scientific Opinion on the re-evaluation of riboflavin (E 101 (i)) and riboflavin-5'-phosphate sodium (E 101 (ii)) as food additives', <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3357>.
- [108] O. Isler, G. Brubacher, *Vitamine. 2. Wasserlösliche Vitamine: 31 Tabellen*, Thieme, **1988**, ISBN: 3137165016.
- [109] R. Huang, H. J. Kim, D. B. Min, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2359-2364; 'Photosensitizing effect of riboflavin, lumiflavin, and lumichrome on the generation of volatiles in soy milk', <https://doi.org/10.1021/jf052448v>.
- [110] M. Y. Jung, Y. S. Oh, D. K. Kim, H. J. Kim, D. B. Min, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 170-174; 'Photoinduced generation of 2,3-butanedione from riboflavin', <https://doi.org/10.1021/jf061999y>.
- [111] D. L. J. Kurt Borch Christensen, Svend E. Christensen, Johannes Grimmer, Hans Kiefer, **1992**, *Verbessertes Verfahren zur Herstellung des Mononatriumsalzes von Riboflavin 5'-phosphat*, Europäisches Patentamt Europäische Union, EP0523582B1.
- [112] G. Walsh, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 151-159; 'Therapeutic insulins and their large-scale manufacture', <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1809-x>.
- [113] L. A. Averianova, L. A. Balabanova, O. M. Son, A. B. Podvolotskaya, L. A. Tekutyeva, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 570828; 'Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview', <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>

- [114] J. Drenth, M. W. Fraaije, in *Flavin-Based Catalysis*, **2021**, pp. 29-65, ISBN: 9783527348343, 9783527830138, <https://doi.org/10.1002/9783527830138.ch2>.
- [115] O. Warburg, W. Christian, *Naturwissenschaften* **1932**, 20, 688-688; 'Ein zweites sauerstoffbertragendes Ferment und sein Absorptionsspektrum', <https://doi.org/10.1007/BF01494406>.
- [116] E. R. Lee, K. F. Blount, R. R. Breaker, *RNA Biology* **2009**, 6, 187-194; 'Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression', <https://doi.org/10.4161/rna.6.2.7727>.
- [117] R. Grinter, C. Greening, *FEMS Microbiol. Rev.* **2021**, 45, fuab021; 'Cofactor F420: an expanded view of its distribution, biosynthesis and roles in bacteria and archaea', <https://doi.org/10.1093/femsrel/fuab021>.
- [118] K.-P. Choi, N. Kendrick, L. Daniels, *J. Bacteriol.* **2002**, 184, 2420-2428; 'Demonstration that fbiC is required by *Mycobacterium bovis* BCG for coenzyme F(420) and FO biosynthesis', <https://doi.org/10.1128/jb.184.9.2420-2428.2002>.
- [119] G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *ChemCatChem* **2013**, 5, 403-415; 'Recent developments in flavin-based catalysis', <https://doi.org/10.1002/cctc.201200466>.
- [120] A. Bacher, S. Eberhardt, W. Eisenreich, M. Fischer, S. Herz, B. Illarionov, K. Kis, G. Richter, *Vitam. Horm. (London, U. K.)* **2001**, 61, 1-49; 'Biosynthesis of riboflavin', [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(01\)61001-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(01)61001-X).
- [121] M. Fischer, W. Römisch, S. Saller, B. Illarionov, G. Richter, F. Rohdich, W. Eisenreich, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 36299-36308; 'Evolution of vitamin B2 biosynthesis: structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin', <https://doi.org/10.1074/jbc.M404406200>.
- [122] G. Richter, C. Krieger, R. Volk, K. Kis, H. Ritz, E. Gotze, A. Bacher, *Methods Enzymol.* **1997**, 280, 374-382; 'Biosynthesis of riboflavin: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase', [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)80128-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)80128-0).
- [123] C. T. Walsh, T. A. Wenczewicz, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 175-200; 'Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways', <https://doi.org/10.1039/c2np20069d>.
- [124] P. Macheroux, B. Kappes, S. E. Ealick, *FEBS J.* **2011**, 278, 2625-2634; 'Flavogenomics—a genomic and structural view of flavin-dependent proteins', <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08202.x>.
- [125] I. Hanukoglu, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2015**, 43, 206-209; 'Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites', <https://doi.org/10.1002/bmb.20849>.
- [126] P. A. Karplus, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1987**, 195, 701-729; 'Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution', [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90191-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90191-4).
- [127] J. Freigang, K. Diederichs, K. P. Schafer, W. Welte, R. Paul, *Protein Science* **2002**, 11, 253-261; 'Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*', <https://doi.org/10.1110/ps.28602>.
- [128] C. L. Drennan, K. A. Patridge, C. H. Weber, A. L. Metzger, D. M. Hoover, M. L. Ludwig, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 711-724; 'Refined structures of oxidized flavodoxin from *Anacystis nidulans*', <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3151>.
- [129] C.-I. Brändén, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 978-983; 'The TIM barrel—the most frequently occurring folding motif in proteins', [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(91\)90094-A](https://doi.org/10.1016/0959-440X(91)90094-A).
- [130] J. Ball, R. A. G. Reis, J. Agniswamy, I. T. Weber, G. Gadda, *Protein Science* **2019**, 28, 167-175; 'Steric hindrance controls pyridine nucleotide specificity of a flavin-dependent NADH:quinone oxidoreductase', <https://doi.org/10.1002/pro.3514>.

- [131] G. Nöll, S. Trawoger, M. von Sanden-Flohe, B. Dick, M. Grininger, *ChemBioChem* **2009**, 10, 834-837; 'Blue-light-triggered photorelease of active chemicals captured by the flavoprotein dodecin', <https://doi.org/10.1002/cbic.200900014>.
- [132] R. A. G. Reis, H. Li, M. Johnson, P. Sobrado, *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, 699, 108765; 'New frontiers in flavin-dependent monooxygenases', <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108765>.
- [133] Y. Deng, Q. u. Zhou, Y. Wu, X. Chen, F. Zhong, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 2622; 'Properties and Mechanisms of Flavin-Dependent Monooxygenases and Their Applications in Natural Product Synthesis', <https://doi.org/10.3390/ijms23052622>.
- [134] M. M. E. Huijbers, S. Montersino, A. H. Westphal, D. Tischler, W. J. H. van Berkel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 544, 2-17; 'Flavin dependent monooxygenases', <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.005>.
- [135] W. J. H. van Berkel, N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.* **2006**, 124, 670-689; 'Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts', <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044>.
- [136] T. A. Ewing, M. W. Fraaije, A. Mattevi, W. J. H. Van Berkel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, 632, 104-117; 'The VAO/PCMH flavoprotein family', <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.022>.
- [137] M. Toplak, A. Matthews, R. Teufel, *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, 698, 108732; 'The devil is in the details: The chemical basis and mechanistic versatility of flavoprotein monooxygenases'; (*Arch Biochem Biophys*), <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108732>.
- [138] T. Heine, W. J. Van Berkel, G. Gassner, K.-H. Van Pée, D. Tischler, *Biology* **2018**, 7, 42; 'Two-component FAD-dependent monooxygenases: current knowledge and biotechnological opportunities', <https://doi.org/10.3390/biology7030042>.
- [139] S. Eswaramoorthy, J. B. Bonanno, S. K. Burley, S. Swaminathan, *PNAS* **2006**, 103, 9832-9837; 'Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase', <https://doi.org/10.1073/pnas.0602398103>.
- [140] D. P. Ballou, B. Entsch, L. J. Cole, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, 590-598; 'Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases', <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.081>.
- [141] R. Tinikul, P. Chaiyen, in *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 3* Vol. 154, **2016**, pp. 47-74, 3319274058, https://doi.org/10.1007/10_2014_281.
- [142] S. Chakraborty, M. Ortiz-Maldonado, B. Entsch, D. P. Ballou, *Biochemistry* **2010**, 49, 372-385; 'Studies on the Mechanism of p-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*: A System Composed of a Small Flavin Reductase and a Large Flavin-Dependent Oxygenase', <https://doi.org/10.1021/bi901454u>.
- [143] J. Sucharitakul, R. Tinikul, P. Chaiyen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 555-556, 33-46; 'Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases', <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.009>.
- [144] M. Ingelman, S. Ramaswamy, V. Nivière, M. Fontecave, H. Eklund, *Biochemistry* **1999**, 38, 7040-7049; 'Crystal Structure of NAD(P)H:Flavin Oxidoreductase from *Escherichia coli*', <https://doi.org/10.1021/bi982849m>.
- [145] M. Hammerstad, H.-P. Hersleth, *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, 702, 108826; 'Overview of structurally homologous flavoprotein oxidoreductases containing the low M_r thioredoxin reductase-like fold – A functionally diverse group', <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108826>.
- [146] M. Medina, C. Gómez-Moreno, *Photosynth. Res.* **2004**, 79, 113-131; 'Interaction of ferredoxin–NADP⁺ reductase with its substrates: optimal interaction for efficient electron transfer', <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015386.67746.2c>.

- [147] M. B. Murataliev, R. Feyereisen, F. A. Walker, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2004**, 1698, 1-26; 'Electron transfer by diflavin reductases', <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.10.003>.
- [148] 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', <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20550>.
- [149] M. Zeghouf, G. Defaye, M. Fontecave, J. Covès, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 246, 602-605; 'The Flavoprotein Component of the *Escherichia coli* Sulfite Reductase Can Act as a Cytochrome P450c17 Reductase', <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8671>.
- [150] M. Fontecave, R. Eliasson, P. Reichard, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 12325-12331; 'NAD(P)H: flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase', [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45356-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45356-2).
- [151] M. Ingelman, V. Bianchi, H. Eklund, *J. Mol. Biol.* **1997**, 268, 147-157; 'The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from *Escherichia coli* at 1.7 Å resolution', <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0957>.
- [152] F. Fieschi, V. Niviere, C. Frier, J.-L. Décout, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 30392-30400; 'The Mechanism and Substrate Specificity of the NADPH: Flavin Oxidoreductase from *Escherichia coli* (*)', <https://doi.org/10.1074/jbc.270.51.30392>.
- [153] T. M. Louie, H. Yang, P. Kamchanaphanurach, X. S. Xie, L. Xun, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 39450-39455; 'FAD Is a Preferred Substrate and an Inhibitor of *Escherichia coli* General NAD (P) H: Flavin Oxidoreductase', <https://doi.org/10.1074/jbc.M206339200>.
- [154] J. Büchler, A. Papadopoulou, R. Buller, *Catalysts* **2019**, 9, 1030; 'Recent Advances in Flavin-Dependent Halogenase Biocatalysis: Sourcing, Engineering, and Application', <https://doi.org/10.3390/catal9121030>.
- [155] S. A. Shepherd, C. Karthikeyan, J. Latham, A.-W. Struck, M. L. Thompson, B. R. K. 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', <https://doi.org/10.1039/c5sc00913h>.
- [156] E. Eichhorn, J. R. van der Ploeg, T. Leisinger, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 26639-26646; 'Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from *Escherichia coli*', <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26639>.
- [157] B. Gao, H. R. Ellis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 331, 1137-1145; 'Altered mechanism of the alkanesulfonate FMN reductase with the monooxygenase enzyme', <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.033>.
- [158] C. M. Driggers, P. V. Dayal, H. R. Ellis, P. A. Karplus, *Biochemistry* **2014**, 53, 3509-3519; 'Crystal structure of *Escherichia coli* SsuE: defining a general catalytic cycle for FMN reductases of the flavodoxin-like superfamily', <https://doi.org/10.1021/bi500314f>.
- [159] P. C. Dorrestein, E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, 102, 13843-13848; 'Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH2-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis', <https://doi.org/10.1073/pnas.0506964102>.
- [160] V. Weichold, D. Milbredt, K.-H. van Pée, *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', <https://doi.org/10.1002/anie.201509573>.
- [161] V. Weichold, D. Milbredt, K.-H. van Pée, *Angew. Chem.* **2016**, 55, 6374-6389; 'Die spezifische enzymatische Halogenierung – von der Entdeckung halogenierender Enzyme bis zu deren Anwendung in vitro und in vivo', <https://doi.org/10.1002/ange.201509573>.

- [162] P. C. Schmartz, K. Zerbe, K. Abou-Hadeed, J. A. Robinson, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 5574-5577; 'Bis-chlorination of a hexapeptide-PCP conjugate by the halogenase involved in vancomycin biosynthesis', <https://doi.org/10.1039/c4ob00474d>.
- [163] I. Wynands, doctoral thesis, Technische Universität Dresden **2007**.
- [164] 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', <https://doi.org/10.1128/JB.01050-07>.
- [165] M. K. Tiwari, R. K. Singh, J.-K. Lee, H. Zhao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 1344-1347; 'Mechanistic studies on the flavin: NADH reductase (PrnF) from *Pseudomonas fluorescens* involved in arylamine oxygenation', <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.12.078>.
- [166] M. Frese, P. H. Guzowska, H. Voß, N. Sewald, *ChemCatChem* **2014**, 6, 1270-1276; 'Regioselective Enzymatic Halogenation of Substituted Tryptophan Derivatives using the FAD-Dependent Halogenase RebH'; (*ChemCatChem*), <https://doi.org/10.1002/cctc.201301090>.
- [167] M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem.* **2015**, 127, 302-305; 'Enzymatische Halogenierung von Tryptophan im Gramm-Maßstab', <https://doi.org/10.1002/ange.201408561>.
- [168] B. R. K. Menon, J. Latham, M. S. Dunstan, E. Brandenburger, U. Klemstein, D. Leys, C. Karthikeyan, M. F. Greaney, S. A. Shepherd, J. Micklefield, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 9354-9361; 'Structure and biocatalytic scope of thermophilic flavin-dependent halogenase and flavin reductase enzymes', <https://doi.org/10.1039/c6ob01861k>.
- [169] J. P. Fessel, W. M. Oldham, *Antioxid. Redox Signaling* **2018**, 28, 180-212; 'Pyridine dinucleotides from molecules to man', <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7120>.
- [170] 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', <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>.
- [171] K. Bachosz, J. Zdarta, M. Bilal, A. S. Meyer, T. Jesionowski, *Sci. Total Environ.* **2023**, 868, 161630; 'Enzymatic cofactor regeneration systems: A new perspective on efficiency assessment', <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161630>.
- [172] Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 483-488; 'Catalysis of regioselective reduction of NAD⁺ by ruthenium(II) arene complexes under biologically relevant conditions', <https://doi.org/>.
- [173] V. K. Sharma, J. M. Hutchison, A. M. Allgeier, *ChemSusChem* **2022**, 15, e202200888; 'Redox Biocatalysis: Quantitative Comparisons of Nicotinamide Cofactor Regeneration Methods', <https://doi.org/10.1002/cssc.202200888>.
- [174] P. G. Jones, M. Mitta, Y. Kim, W. Jiang, M. Inouye, *PNAS* **1996**, 93, 76-80; 'Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*', <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.76>.
- [175] C. Zhang, H. Zhang, J. Pi, L. Zhang, A. Kuhn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2022**, 61, e202111804; 'Bulk Electrocatalytic NADH Cofactor Regeneration with Bipolar Electrochemistry', <https://doi.org/10.1002/anie.202111804>.
- [176] 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'; (*ChemCatChem*), <https://doi.org/10.1002/cctc.201800280>.
- [177] F. Marpani, M. Pinelo, A. S. Meyer, *Biochem. Eng. J.* **2017**, 127, 217-228; 'Enzymatic conversion of CO₂ to CH₃OH via reverse dehydrogenase cascade biocatalysis: Quantitative comparison of efficiencies of immobilized enzyme systems'; (*Biochem Eng J*), <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.08.011>.

- [178] W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126; 'Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.005>.
- [179] F. d. M. Bastos, A. G. dos Santos, J. Jones Jr, E. G. Oestreicher, G. F. Pinto, L. M. C. Paiva, *Biotechnol. Tech.* **1999**, *13*, 661-664, <https://doi.org/10.1023/A:1008957711413>.
- [180] I. Zachos, C. Nowak, V. Sieber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *49*, 59-66; 'Biomimetic cofactors and methods for their recycling', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.003>.
- [181] M. Ismail, L. Schroeder, M. Frese, T. Kottke, F. Hollmann, C. E. Paul, N. Sewald, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1389-1395; 'Straightforward Regeneration of FADH₂ Required for Enzymatic Tryptophan Halogenation', <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b04500>.
- [182] 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', <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.07.003>.
- [183] C. Dong, S. Flecks, S. Unversucht, C. Haupt, K.-H. Van Pée, J. H. Naismith, *Science* **2005**, *309*, 2216-2219; 'Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination', <https://doi.org/10.1126/science.1116510>.
- [184] X. Zhu, W. De Laurentis, K. Leang, J. Herrmann, K. Ihlefeld, K.-H. van Pée, J. H. Naismith, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 74-85; 'Structural insights into regioselectivity in the enzymatic chlorination of tryptophan', <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.008>.
- [185] E. Yeh, L. C. Blasiak, A. Koglin, C. L. Drennan, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1284-1292; 'Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases', <https://doi.org/10.1021/bi0621213>.
- [186] H. Minges, N. Sewald, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 4450-4470; 'Recent Advances in Synthetic Application and Engineering of Halogenases'; (ChemCatChem), <https://doi.org/10.1002/cctc.202000531>.
- [187] R. D. Barker, Y. Yu, L. De Maria, L. O. Johannissen, N. S. Scrutton, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 15352-15360; 'Mechanism of Action of Flavin-Dependent Halogenases', <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c05231>.
- [188] A. Phintha, K. Prakinee, P. Chaiyen, *Enzymes* **2020**, *47*, 327-364; 'Structures, mechanisms and applications of flavin-dependent halogenases', <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2020.05.009>.
- [189] S. Dachwitz, C. Widmann, M. Frese, H. H. Niemann, N. Sewald, in *Amino Acids, Peptides and Proteins*, **2020**, pp. 1-43, ISBN: 978-1-78801-689-6, <https://doi.org/10.1039/9781788017008-00001>.
- [190] B. F. Fisher, H. M. Snodgrass, K. A. Jones, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1844-1856; 'Site-selective C-H halogenation using flavin-dependent halogenases identified via family-wide activity profiling', <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00835>.
- [191] P. R. Neubauer, C. Widmann, D. Wibberg, L. Schroder, M. Frese, T. Kottke, J. Kalinowski, H. H. Niemann, N. Sewald, *PLoS One* **2018**, *13*, 1-12; 'A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination', <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196797>.
- [192] J. Zeng, J. Zhan, *Isr. J. Chem.* **2019**, *59*, 1-17; 'Chlorinated Natural Products and Related Halogenases'; (*Isr J Chem*), <https://doi.org/10.1002/ijch.201800175>.
- [193] P. R. Neubauer, S. Pienkny, L. Wessjohann, W. Brandt, N. Sewald, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 3282-3288; 'Predicting the Substrate Scope of the Flavin-Dependent Halogenase BrvH', <https://doi.org/10.1002/cbic.202000444>.
- [194] C. Widmann, M. Ismail, N. Sewald, H. H. Niemann, *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **2020**, *76*, 687-697; 'Structure of apo flavin-dependent halogenase Xcc4156 hints at a reason for cofactor-soaking difficulties', <https://doi.org/10.1107/S2059798320007731>.

- [195] 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'; (*Adv Synth Catal*), <https://doi.org/10.1002/adsc.201801591>.
- [196] D. S. Gkotsi, H. Ludewig, S. V. Sharma, J. A. Connolly, J. Dhaliwal, Y. Wang, W. P. Unsworth, R. J. K. Taylor, M. M. W. McLachlan, S. Shanahan, J. H. Naismith, R. J. M. Goss, *Nat. Chem.* **2019**, 11, 1091-1097; 'A marine viral halogenase that iodinated diverse substrates', <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0349-z>.
- [197] H. Ludewig, S. Molyneux, S. Ferrinho, K. Guo, R. Lynch, D. S. Gkotsi, R. J. Goss, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, 65, 51-60; 'Halogenases: structures and functions', <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.012>.
- [198] S. Zehner, A. Kotsch, B. Bister, R. D. Süssmuth, C. Méndez, J. A. Salas, K.-H. van Peé, *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **2005**, 12, 445-452; 'A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005'; (*Chem Biol*), <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.02.005>.
- [199] J. Zeng, J. Zhan, *Biotechnol. Lett.* **2011**, 33, 1607-1613; 'Characterization of a tryptophan 6-halogenase from *Streptomyces toxytricini*', <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0595-7>.
- [200] A. C. Moritzer, H. Minges, T. Prior, M. Frese, N. Sewald, H. H. Niemann, *J. Biol. Chem.* **2019**, 294, 2529-2542; 'Structure-based switch of regioselectivity in the flavin-dependent tryptophan 6-halogenase Thal', <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005393>.
- [201] A. Phintha, K. Prakinee, A. Jaruwat, N. Lawan, S. Visitsatthawong, C. Kantiwiriyawanitch, W. Songsungthong, D. Trisrivirat, P. Chenprakon, A. Mulholland, K. H. van Pée, P. Chitnumsub, P. Chaiyen, *J. Biol. Chem.* **2021**, 296, 100068; 'Dissecting the low catalytic capability of flavin-dependent halogenases', <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.016004>.
- [202] 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. Biotransform.* **2006**, 24, 401-408; 'A flavin-dependent tryptophan 6-halogenase and its use in modification of pyrrolnitrin biosynthesis'; (*Biocatal Biotransfor*), <https://doi.org/10.1080/10242420601033738>.
- [203] J. R. Heemstra Jr., C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14024-14025; 'Tandem Action of the O₂- and FADH₂-Dependent Halogenases KtzQ and KtzR Produce 6,7-Dichlorotryptophan for Kutzneride Assembly', <https://doi.org/10.1021/ja806467a>.
- [204] C. Crowe, S. Molyneux, S. V. Sharma, Y. Zhang, D. S. Gkotsi, H. Connaris, R. J. M. Goss, *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 9443-9481; 'Halogenases: a palette of emerging opportunities for synthetic biology—synthetic chemistry and C–H functionalisation', <https://doi.org/10.1039/D0CS01551B>.
- [205] P. R. Neubauer, O. Blifernez-Klassen, L. Pfaff, M. Ismail, O. Kruse, N. Sewald, *Catalysts* **2021**, 11, 485; 'Two Novel, Flavin-Dependent Halogenases from the Bacterial Consortia of *Botryococcus braunii* Catalyze Mono- and Dibromination', <https://doi.org/10.3390/catal11040485>.
- [206] S. Rachid, D. Krug, B. Kunze, I. Kochems, M. Scharfe, T. M. Zabriskie, H. Blöcker, R. Müller, *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **2006**, 13, 667-681; 'Molecular and biochemical studies of chondramide formation—highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5', <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.06.002>.
- [207] K. Lingkon, J. J. Bellizzi, 3rd, *ChemBioChem* **2020**, 21, 1121-1128; 'Structure and Activity of the Thermophilic Tryptophan-6 Halogenase BorH', <https://doi.org/10.1002/cbic.201900667>.
- [208] J. C. f. S. G. (JCSG), *World Wide Protein Data Bank wwPDB* **2007**; 'Crystal structure of tryptophan halogenase (YP_750003.1) from *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 at 1.50 Å resolution', <https://doi.org/10.2210/pdb2pxl/pdb>.

- [209] M. A. Ortega, D. P. Cogan, S. Mukherjee, N. Garg, B. Li, G. N. Thibodeaux, S. I. Maffioli, S. Donadio, M. Sosio, J. Escano, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 548-557; 'Two flavoenzymes catalyze the post-translational generation of 5-chlorotryptophan and 2-aminovinyl-cysteine during NAI-107 biosynthesis', <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01031>.
- [210] D. R. M. Smith, A. R. Uria, E. J. N. Helfrich, D. Milbredt, K. H. van Pee, J. Piel, R. J. M. Goss, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1281-1287; 'An Unusual Flavin-Dependent Halogenase from the Metagenome of the Marine Sponge *Theonella swinhoei* WA', <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01115>.
- [211] C. B. Poor, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1286-1289; 'Improving the stability and catalyst lifetime of the halogenase RebH by directed evolution', <https://doi.org/10.1002/cbic.201300780>.
- [212] M. C. Andorfer, J. E. Grob, C. E. Hajdin, J. R. Chael, P. Siuti, J. Lilly, K. L. Tan, J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 1897-1904; 'Understanding flavin-dependent halogenase reactivity via substrate activity profiling', <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b02707>.
- [213] J. T. Payne, C. B. Poor, J. C. Lewis, *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4300-4304; 'Directed Evolution of RebH for Site-Selective Halogenation of Large Biologically Active Molecules', <https://doi.org/10.1002/ange.201411901>.
- [214] S. A. Shepherd, B. R. Menon, H. Fisk, A. W. Struck, C. Levy, D. Leys, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 821-824; 'A Structure-Guided Switch in the Regioselectivity of a Tryptophan Halogenase', <https://doi.org/10.1002/cbic.201600051>.
- [215] M. C. Andorfer, H. J. Park, J. Vergara-Coll, J. C. Lewis, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3720-3729; 'Directed Evolution of RebH for Catalyst-Controlled Halogenation of Indole C-H Bonds', <https://doi.org/10.1039/C5SC04680G>.
- [216] A. Lang, S. Polnick, T. Nicke, P. William, E. P. Patallo, J. H. Naismith, K. H. van Pée, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2951-2953; 'Changing the regioselectivity of the tryptophan 7-halogenase PrnA by site-directed mutagenesis', <https://doi.org/10.1002/anie.201007896>.
- [217] M. C. Andorfer, K. D. Belsare, A. M. Girlich, J. C. Lewis, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 2099-2103; 'Aromatic Halogenation by Using Bifunctional Flavin Reductase-Halogenase Fusion Enzymes', <https://doi.org/10.1002/cbic.201700391>.
- [218] K. H. Veldmann, S. Dachwitz, J. M. Risse, J.-H. Lee, N. Sewald, V. F. Wendisch, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 219; 'Bromination of L-tryptophan in a Fermentative Process With *Corynebacterium glutamicum*', <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00219>.
- [219] M. Frese, C. Schnepel, H. Minges, H. Voß, R. Feiner, N. Sewald, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1799-1803; 'Modular Combination of Enzymatic Halogenation of Tryptophan with Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions', <https://doi.org/10.1002/cctc.201600317>.
- [220] H. Größ, N. Sewald, *Chem. - Eur. J.* **2020**, *26*, 5328-5340; 'Late-Stage Diversification of Tryptophan-Derived Biomolecules', <https://doi.org/10.1002/chem.201903756>.
- [221] 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', <https://doi.org/10.1002/anie.201605635>.
- [222] J. Zeng, A. K. Lytle, D. Gage, S. J. Johnson, J. Zhan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1001-1003; 'Specific chlorination of isoquinolines by a fungal flavin-dependent halogenase', <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.038>.
- [223] 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', <https://doi.org/10.1002/anie.201706342>.

- [224] Y. H. Chooi, R. Cacho, Y. Tang, *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **2010**, *17*, 483-494; 'Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*', <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.015>.
- [225] G. Peh, G. A. Gunawan, T. Tay, E. Tiong, L. L. Tan, S. Jiang, Y. L. Goh, S. Ye, J. Wong, C. J. Brown, H. Zhao, E. L. Ang, F. T. Wong, Y. H. Lim, *Biomolecules* **2023**, *13*, 1081; 'Further Characterization of Fungal Halogenase RadH and Its Homologs', <https://doi.org/10.3390/biom13071081>.
- [226] F. Panter, R. Garcia, A. Thewes, N. Zaburanyi, B. Bunk, J. Overmann, M. V. Gutierrez, D. Krug, R. Müller, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 2713-2719; 'Production of a dibrominated aromatic secondary metabolite by a planctomycete implies complex interaction with a macroalgal host', <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00641>.
- [227] C. S. Neumann, C. T. Walsh, R. R. Kay, *PNAS* **2010**, *107*, 5798-5803; 'A flavin-dependent halogenase catalyzes the chlorination step in the biosynthesis of *Dictyostelium* differentiation-inducing factor 1', <https://doi.org/10.1073/pnas.1001681107>.
- [228] R. Song, H. Shi, J. Zhu, H. Wang, Y. Shen, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 2533-2537; 'A Single-Component Flavoenzyme Catalyzed Regioselective Halogenation of Pyrone in the Biosynthesis of Venemycins', <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00554>.
- [229] L. Kong, Q. Wang, Z. Deng, D. You, *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01225-01220; 'Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Halogenase XanH and Engineering of Multifunctional Fusion Halogenases', <https://doi.org/10.1128/AEM.01225-20>.
- [230] S. Mori, A. H. Pang, N. T. Chandrika, S. Garneau-Tsodikova, O. V. Tsodikov, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1255; 'Unusual substrate and halide versatility of phenolic halogenase PltM'; (*Nat Commun*), <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09731-8>.
- [231] S. Buedenbender, S. Rachid, R. Müller, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 520-530; 'Structure and action of the myxobacterial chondrochloren halogenase CndH: a new variant of FAD-dependent halogenases', <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.057>.
- [232] M. Costa, I. E. Sampaio-Dias, R. Castelo-Branco, H. Scharfenstein, R. Rezende de Castro, A. Silva, M. P. C. Schneider, M. J. o. Araújo, R. r. Martins, V. F. Domingues, *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 393-402; 'Structure of Hierridin C, Synthesis of Hierridins B and C, and Evidence for Prevalent Alkylresorcinol Biosynthesis in Picocyanobacteria', <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b01038>.
- [233] Y.-W. He, X.-Q. Cao, A. R. Poplawsky, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2020**, *33*, 705-714; 'Chemical Structure, Biological Roles, Biosynthesis and Regulation of the Yellow Xanthomonadin Pigments in the Phytopathogenic Genus *Xanthomonas*', <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0326-CR>.
- [234] A. El Gamal, V. Agarwal, S. Diethelm, I. Rahman, M. A. Schorn, J. M. Sneed, G. V. Louie, K. E. Whalen, T. J. Mincer, J. P. Noel, *PNAS* **2016**, *113*, 3797-3802; 'Biosynthesis of coral settlement cue tetrabromopyrrole in marine bacteria by a uniquely adapted brominase-thioesterase enzyme pair', <https://doi.org/10.1073/pnas.1519695113>.
- [235] J. He, N. Magarvey, M. Pirae, L. C. Vining, *Microbiology* **2001**, *147*, 2817-2829; 'The gene cluster for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 includes novel shikimate pathway homologues and a monomodular non-ribosomal peptide synthetase gene', <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2817>.
- [236] 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', <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.020>.
- [237] P. Chankhamjon, Y. Tsunematsu, M. Ishida-Ito, Y. Sasa, F. Meyer, D. Boettger-Schmidt, B. Urbansky, K.-D. Menzel, K. Scherlach, K. Watanabe, C. Hertweck, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 11955-11959; 'Regioselective Dichlorination of a Non-Activated Aliphatic Carbon Atom and Phenolic Bismethylation by a Multifunctional Fungal Flavoenzyme', <https://doi.org/10.1002/anie.201604516>.

- [238] J. P. Harris, P. G. Mantle, *Phytochemistry* **2001**, 57, 165-169; 'Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*', [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00004-8).
- [239] A. Altmann, W. Burd, P. E. Hammer, K. Hohaus, D. S. Hill, J. M. Ligon, S. T. Lam, K. H. van Pée, in *Mechanisms of Biohalogenation and Dehalogenation.*, Vol. 98 (Eds.: D. B. Janssen, K. Soda, R. Wever), *Verhandelingen Natuurkunde, North-Holland Publishing Co*, **1997**, pp. 43-54, ISBN: 9780444858160.
- [240] 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*', <https://doi.org/10.1128/JB.180.7.1939-1943.1998>.
- [241] 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', <https://doi.org/10.1002/anie.199720121>.
- [242] I. Wynands, K. H. van Pee, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 237, 363-367; 'A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 and detection of *in vitro* halogenase activity', <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.053>.
- [243] A. H. Pang, S. Garneau-Tsodikova, O. V. Tsodikov, *J. Struct. Biol.* **2015**, 192, 349-357; 'Crystal structure of halogenase PltA from the pyoluteorin biosynthetic pathway', <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.09.013>.
- [244] 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*', <https://doi.org/10.7554/eLife.22835>.
- [245] Y. Qiao, J. Yan, J. Jia, J. Xue, X. Qu, Y. Hu, Z. Deng, H. Bi, D. Zhu, *J. Nat. Prod.* **2019**, 82, 318-323; 'Characterization of the Biosynthetic Gene Cluster for the Antibiotic Armeniaspirols in *Streptomyces armeniacus*', <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00753>.
- [246] X. Zhang, R. J. Parry, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 946-957; 'Cloning and characterization of the pyrrolomycin biosynthetic gene clusters from *Actinosporangium vitaminophilum* ATCC 31673 and *Streptomyces* sp. strain UC 11065', <https://doi.org/10.1128/aac.01214-06>.
- [247] Q. Yan, B. Philmus, C. Hesse, M. Kohen, J. H. Chang, J. E. Loper, *Front. Microbio.* **2016**, 7, 497; 'The Rare Codon AGA Is Involved in Regulation of Pyoluteorin Biosynthesis in *Pseudomonas protegens* PF-5', <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00497>.
- [248] N. M. Haste, C. C. Hughes, D. N. Tran, W. Fenical, P. R. Jensen, V. Nizet, M. E. Hensler, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 3305-3312; 'Pharmacological properties of the marine natural product marinopyrrole A against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', <https://doi.org/10.1128/aac.01211-10>.
- [249] K. Yamanaka, K. S. Ryan, T. A. Gulder, C. C. Hughes, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12434-12437; 'Flavoenzyme-catalyzed atropo-selective N,C-bipyrrrole homocoupling in marinopyrrole biosynthesis', <https://doi.org/10.1021/ja305670f>.
- [250] J. C. Corpuz, L. M. Podust, T. D. Davis, M. J. Jaremko, M. D. Burkart, *RSC Chem. Biol.* **2020**, 1, 8-12; 'Dynamic visualization of type II peptidyl carrier protein recognition in pyoluteorin biosynthesis', <https://doi.org/10.1039/C9CB00015A>.
- [251] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, A. R. Howard-Jones, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 517-531; 'Biological formation of pyrroles: nature's logic and enzymatic machinery', <https://doi.org/10.1039/B605245M>.
- [252] V. Agarwal, A. A. El Gamal, K. Yamanaka, D. Poth, R. D. Kersten, M. Schorn, E. E. Allen, B. S. Moore, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 640-647; 'Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria', <https://doi.org/10.1038/nchembio.1564>.

- [253] S. Pawar, A. Chaudhari, R. Prabha, R. Shukla, D. P. Singh, *Biomolecules* **2019**, 9, 443; 'Microbial pyrrolnitrin: natural metabolite with immense practical utility', <https://doi.org/10.3390/biom9090443>.
- [254] V. R. M. Putri, M.-H. Jung, J.-Y. Lee, M.-H. Kwak, T. C. Mariyes, A. Kerbs, V. F. Wendisch, H. J. Kong, Y.-O. Kim, J.-H. Lee, *Microb. Cell Fact.* **2024**, 23, 1-14; 'Fermentative aminopyrrolnitrin production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*', <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02424-y>.
- [255] N. Someya, M. Kubota, K. Takeuchi, Y. Unno, R. Sakuraoka, T. Morohoshi, *Microbes Environ.* **2020**, 35, 1-7; 'Diversity of Antibiotic Biosynthesis Gene-possessing Rhizospheric Fluorescent *Pseudomonads* in Japan and Their Biocontrol Efficacy', <https://doi.org/10.1264/jisme2.ME19155>.
- [256] J. Gebauer, T. Classen, J. Pietruszka, *Front. Catal.* **2023**, 3, 1231765; 'Expression & Characterization of PrnC-A Flavin-dependent Halogenase from the Pyrrolnitrin Biosynthetic Pathway of *Pseudomonas protegens* Pf-5', <https://doi.org/10.3389/ftls.2023.1231765>.
- [257] K. Arima, H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta, G. Tamura, *Agric. Biol. Chem.* **1964**, 28, 575-576; 'Pyrrolnitrin, a New Antibiotic Substance, Produced by *Pseudomonas*', <https://doi.org/10.1080/00021369.1964.10858275>.
- [258] R. L. Hamill, R. P. Elander, J. A. Mabe, M. Gorman, *Appl. Environ. Microbiol.* **1970**, 19, 721-725; 'Metabolism of Tryptophan by *Pseudomonas aureofaciens*: III. Production of Substituted Pyrrolnitrins from Tryptophan Analogues', <https://doi.org/10.1128/am.19.5.721-725.1970>.
- [259] C. J. Chang, H. G. Floss, D. J. Hook, J. A. Mabe, P. E. Manni, L. L. Martin, K. Schröder, T. L. Shieh, *The Journal of Antibiotics* **1981**, 34, 555-566; 'The biosynthesis of the antibiotic pyrrolnitrin by *Pseudomonas aureofaciens*', <https://doi.org/10.7164/antibiotics.34.555>.
- [260] K. H. van Pée, O. Salcher, F. Lingens, *Liebigs Annalen der Chemie* **1981**, 1981, 233-239; 'Synthese von 7-Chlor-L- und 7-Chlor-D-tryptophan; Biosynthese von Pyrrolnitrin', <https://doi.org/10.1002/jlac.198119810207>.
- [261] X. Zhu, K. H. van Pée, J. H. Naismith, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 21126-21133; 'The ternary complex of PrnB (the second enzyme in the pyrrolnitrin biosynthesis pathway), tryptophan, and cyanide yields new mechanistic insights into the indolamine dioxygenase superfamily', <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120485>.
- [262] K.-H. van Pée, O. Salcher, P. Fischer, M. Bokel, F. Lingens, *The Journal of Antibiotics* **1983**, 36, 1735-1742; 'The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens*', <https://doi.org/10.7164/antibiotics.36.1735>.
- [263] 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', <https://doi.org/10.1002/ange.19971091829>.
- [264] P. E. Hammer, D. S. Hill, S. T. Lam, K.-H. Van Pée, J. M. Ligon, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 2147-2154; 'Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin', <https://doi.org/10.1128/aem.63.6.2147-2154.1997>.
- [265] 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*', [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000703\)39:13%3C2300::AID-ANIE2300%3E3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000703)39:13%3C2300::AID-ANIE2300%3E3.0.CO;2-I).
- [266] J. Lee, M. Simurdiak, H. Zhao, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 36719-36727; 'Reconstitution and characterization of aminopyrrolnitrin oxygenase, a Rieske N-oxygenase that catalyzes unusual arylamine oxidation', <https://doi.org/10.1074/jbc.M505334200>.
- [267] N. L. Grenade, G. W. Howe, A. C. Ross, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, 69, 17-25; 'The convergence of bacterial natural products from evolutionarily distinct pathways', <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.10.009>.

- [268] 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', <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02193>.
- [269] A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245-3259; 'Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering', <https://doi.org/10.1039/b709549j>.
- [270] P. M. Wright, I. B. Seiple, A. G. Myers, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 8840-8869; 'The evolving role of chemical synthesis in antibacterial drug discovery', <https://doi.org/10.1002/anie.201310843>.
- [271] T. Classen, J. Pietruszka, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1285-1303; 'Complex molecules, clever solutions - Enzymatic approaches towards natural product and active agent syntheses', <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.045>.
- [272] C. Anderle, S. Alt, T. Gulder, G. Bringmann, B. Kammerer, B. Gust, L. Heide, *Arch. Microbiol.* **2007**, *187*, 227-237; 'Biosynthesis of clorobiocin: investigation of the transfer and methylation of the pyrrolyl-2-carboxyl moiety', <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0190-9>.
- [273] M. G. Thomas, M. D. Burkart, C. T. Walsh, *Chem. Biol. (Oxford, U. K.)* **2002**, *9*, 171-184; 'Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis', [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00100-X).
- [274] G. Prasad, J. W. Amoroso, L. S. Borketey, N. A. Schnarr, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1992-2002; 'N-activated beta-lactams as versatile reagents for acyl carrier protein labeling', <https://doi.org/10.1039/C2OB06846J>.
- [275] G. Prasad, L. S. Borketey, T. Y. Lin, N. A. Schnarr, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6717-6723; 'A mechanism-based fluorescence transfer assay for examining ketosynthase selectivity', <https://doi.org/10.1039/c2ob26008e>.
- [276] P. W. Okanya, K. I. Mohr, K. Gerth, R. Jansen, R. Muller, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 603-608; 'Marinoquinolines A-F, pyrroloquinolines from *Ohtaekwangia kribbensis* (Bacteroidetes)', <https://doi.org/10.1021/np100625a>.
- [277] L. Linares-Otoya, Y. Liu, V. Linares-Otoya, L. Armas-Mantilla, M. Crüsemann, M. L. Ganoza-Yupanqui, J. Campos-Florian, G. M. König, T. F. Schäberle, *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 176-181; 'Biosynthetic Basis for Structural Diversity of Aminophenylpyrrole-Derived Alkaloids', <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00993>.
- [278] R. Roddan, J. M. Ward, N. H. Keep, H. C. Hailes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 69-76; 'Pictet-Spenglerases in alkaloid biosynthesis: Future applications in biocatalysis', <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.12.003>.
- [279] R. D. Shingare, V. Aniebok, H. W. Lee, J. B. MacMillan, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1516-1519; 'Synthesis and Investigation of the Abiotic Formation of Pyonitrins A-D', <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c00098>.
- [280] A. S. Klein, A. Domröse, P. Bongen, H. U. C. Brass, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, L. Laraia, S. Sievers, K.-E. Jaeger, *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 1757-1765; 'New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*', <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00099>.
- [281] A. S. Klein, H. U. C. Brass, D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K. E. Jaeger, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1545-1552; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440', <https://doi.org/10.1002/cbic.201800154>.
- [282] H. U. C. Brass, A. S. Klein, S. Nyholt, T. Classen, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2659-2667; 'Condensing Enzymes from Pseudoalteromonadaceae for Prodiginine Synthesis', <https://doi.org/10.1002/adsc.201900183>.

- [283] T. M. Weber, A. Leyens, L. Berning, B. Stork, J. Pietruszka, *Catal. Sci. Technol.* **2023**, 13, 6165-6184; 'New prodigiosin derivatives – chemoenzymatic synthesis and physiological evaluation against cisplatin-resistant cancer cells', <https://doi.org/10.1039/D3CY00913K>.
- [284] Z. Zhao, T. Shi, M. Xu, N. L. Brock, Y.-L. Zhao, Y. Wang, Z. Deng, X. Pang, M. Tao, *Org. Lett.* **2016**, 18, 572-575; 'Hybrubins: bipyrrrole tetramic acids obtained by crosstalk between a truncated undecylprodigiosin pathway and heterologous tetramic acid biosynthetic genes', <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b03609>.
- [285] T. T. Brandhorst, I. R. L. Kean, S. M. Lawry, D. L. Wiesner, B. S. Klein, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 5047; 'Phenylpyrrole fungicides act on triosephosphate isomerase to induce methylglyoxal stress and alter hybrid histidine kinase activity', <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41564-9>.
- [286] S.-G. Zhang, C.-G. Liang, Y.-Q. Sun, P. Teng, J.-Q. Wang, W.-H. Zhang, *Molecular Diversity* **2019**, 23, 1-11; 'Design, synthesis and antifungal activities of novel pyrrole- and pyrazole-substituted coumarin derivatives', <https://doi.org/10.1007/s11030-019-09920-z>.
- [287] P. Leroux, C. Lanen, R. Fritz, *Pestic. Sci.* **2006**, 36, 255-261; 'Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*', <https://doi.org/10.1002/ps.2780360312>.
- [288] J. J. Füller, R. Röpke, J. Krausze, K. E. Rennhack, N. P. Daniel, W. Blankenfeldt, S. Schulz, D. Jahn, J. Moser, *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 20068-20084; 'Biosynthesis of Violacein, Structure and Function of L-Tryptophan Oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*', <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741561>.
- [289] J. Liu, T. Ng, Z. Rui, O. Ad, W. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 136-139; 'Unusual acetylation-dependent reaction cascade in the biosynthesis of the pyrroloindole drug physostigmine', <https://doi.org/10.1002/anie.201308069>.
- [290] L. G. Darlington, C. M. Forrest, G. M. Mackay, R. A. Smith, A. J. Smith, N. Stoy, T. W. Stone, *Int. J. Tryptophan Res.* **2010**, 3, 51-59; 'On the Biological Importance of the 3-hydroxyanthranilic Acid: Anthranilic Acid Ratio', <https://doi.org/10.4137/IJTR.S4282>.
- [291] A. Sandmann, J. Dickschat, H. Jenke-Kodama, B. Kunze, E. Dittmann, R. Müller, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2768-2772; 'Aurachin-Biosynthese im Gram-negativen Bakterium *Stigmatella aurantiaca*: Beteiligung einer Typ-II-Polyketidsynthase', <https://doi.org/10.1002/ange.200603513>.
- [292] A. Aliverti, B. Curti, M. A. Vanoni, in *Flavoprotein Protocols*, Vol. 131 (Eds.: S. K. Chapman, G. A. Reid), Humana Press, **1999**, pp. 9-23, ISBN 978-1-59259-266-1, <https://doi.org/10.1385/1-59259-266-X:9>.
- [293] K. Kusano, M. R. Waterman, M. Sakaguchi, T. Omura, N. Kagawa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 367, 129-136; 'Protein synthesis inhibitors and ethanol selectively enhance heterologous expression of P450s and related proteins in *Escherichia coli*', <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1248>.
- [294] K. Tsumoto, M. Umetsu, I. Kumagai, D. Ejima, J. S. Philo, T. Arakawa, *Biotechnol. Prog.* **2004**, 20, 1301-1308; 'Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification', <https://doi.org/10.1021/bp0498793>.
- [295] J. Chen, Y. Liu, X. Li, Y. Wang, H. Ding, G. Ma, Z. Su, *Protein Expression Purif.* **2009**, 66, 82-90; 'Cooperative effects of urea and L-arginine on protein refolding', <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.02.004>.
- [296] P. Salotra, D. K. Singh, K. P. Seal, N. Krishna, H. Jaffe, R. Bhatnagar, *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 131, 57-62; 'Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc esenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress', <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07754.x>.

- [297] D. Bakonyi, A. Wirtz, W. Hummel, *Zeitschrift für Naturforschung B* **2012**, 67, 1037-1044; 'Large-scale Enzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid from Dehydrocholic Acid by Simultaneous Combination of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* and 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*', <https://doi.org/10.5560/znb.2012-0165>.
- [298] A. K. Mohanty, M. C. Wiener, *Protein Expression Purif.* **2004**, 33, 311-325; 'Membrane protein expression and production: effects of polyhistidine tag length and position', <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.10.010>.
- [299] S. Knecht, D. Ricklin, A. N. Eberle, B. Ernst, *J. Mol. Recognit.* **2009**, 22, 270-279; 'Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces', <https://doi.org/10.1002/jmr.941>.
- [300] Z. Yan, Q. Zhu, L. Ma, G. Li, E. Su, J. Zeng, Y. Chen, E. Meng, S. Deng, *Processes* **2023**, 11; 'Effects of His-Tag Length on the Soluble Expression and Selective Immobilization of D-Amino Acid Oxidase from *Trigonopsis variabilis*: A Preliminary Study', <https://doi.org/10.3390/pr11061588>.
- [301] M. Frese, N. Sewald, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54, 298-301; 'Enzymatic Halogenation of Tryptophan on a Gram Scale', <https://doi.org/10.1002/anie.201408561>.
- [302] R. Latimer, K. Podzelinska, A. Soares, A. Bhattacharya, L. C. Vining, Z. Jia, D. L. Zechel, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* **2009**, 65, 260-263; 'Expression, purification and preliminary diffraction studies of CmlS', <https://doi.org/10.1107/S1744309108043091>.
- [303] T. K. M. Nguyen, M. R. Ki, R. G. Son, S. P. Pack, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, 103, 2205-2216; 'The NT11, a novel fusion tag for enhancing protein expression in *Escherichia coli*', <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09595-w>.
- [304] G. Peh, T. Tay, L. L. Tan, E. Tiong, J. Bi, Y. L. Goh, S. Ye, F. Lin, C. J. X. Tan, Y. Z. Tan, J. Wong, H. Zhao, F. T. Wong, E. L. Ang, Y. H. Lim, *Commun. Chem.* **2024**, 7, 7; 'Site-selective chlorination of pyrrolic heterocycles by flavin dependent enzyme PmC', <https://doi.org/10.1038/s42004-023-01083-1>.
- [305] M. D. Morrison, J. J. Hanthorn, D. A. Pratt, *Org. Lett.* **2009**, 11, 1051-1054; 'Synthesis of pyrrolnitrin and related halogenated phenylpyrroles', <https://doi.org/10.1021/ol8026957>.
- [306] M. Murata, S. Watanabe, Y. Masuda, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6458-6459; 'Novel Palladium(0)-Catalyzed Coupling Reaction of Dialkoxyborane with Aryl Halides: Convenient Synthetic Route to Arylboronates', <https://doi.org/10.1021/jo970963p>.
- [307] M. Murata, T. Oyama, S. Watanabe, Y. Masuda, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 164-168; 'Palladium-catalyzed borylation of aryl halides or triflates with dialkoxyborane: A novel and facile synthetic route to arylboronates', <https://doi.org/10.1021/jo991337g>.
- [308] R. M. Palmere, R. T. Conley, *J. Org. Chem.* **2002**, 35, 2703-2707; 'The Schmidt Reaction of α -Arylkyl-Substituted Carboxylic Acids', <https://doi.org/10.1021/jo00833a049>.
- [309] P. A. Cox, M. Reid, A. G. Leach, A. D. Campbell, E. J. King, G. C. Lloyd-Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 13156-13165; 'Base-Catalyzed Aryl-B(OH)(2) Protodeboration Revisited: From Concerted Proton Transfer to Liberation of a Transient Aryl Anion', <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07444>.
- [310] H. G. Kuivila, K. V. Nahabedian, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 2159-2163; 'Electrophilic Displacement Reactions. X. General Acid Catalysis in the Protodeboration of Areneboronic Acids 1-3', <https://doi.org/10.1021/ja01470a028>.
- [311] T. Ishiyama, T.-a. Ahiko, N. Miyaura, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6889-6892; 'A synthesis of allylboronates via the palladium(0)-catalyzed cross-coupling reaction of bis(pinacolato)diboron with allylic acetates', [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(96\)01505-5](https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01505-5).
- [312] T. Ishiyama, Y. Itoh, T. Kitano, N. Miyaura, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3447-3450; 'Synthesis of arylboronates via the palladium(0)-catalyzed cross-coupling reaction of tetra(alkoxo)diborons with aryl triflates', [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)00642-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)00642-4).

- [313] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **2002**, 60, 7508-7510; 'Palladium(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Alkoxydiboron with Haloarenes: A Direct Procedure for Arylboronic Esters', 10.1021/jo00128a024.
- [314] J. G. Calvert, *Pure & Appl. Chem.* **1990**, 62, 2167-2219; 'Glossary of atmospheric chemistry terms (Recommendations 1990)', <https://doi.org/10.1351/pac199062112167>.
- [315] J. Zeng, J. Zhan, *ChemBioChem* **2010**, 11, 2119-2123; 'A Novel Fungal Flavin-Dependent Halogenase for Natural Product Biosynthesis', <https://doi.org/10.1002/cbic.201000439>.
- [316] Z. Ma, Z. Ma, D. Zhang, *Molecules* **2018**, 23; 'Synthesis of Multi-Substituted Pyrrole Derivatives Through [3+2] Cycloaddition with Tosylmethyl Isocyanides (TosMICs) and Electron-Deficient Compounds', <https://doi.org/10.3390/molecules23102666>.
- [317] M. K. Tiwari, J. K. Lee, H. J. Moon, H. Zhao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2873-2876; 'Further biochemical studies on aminopyrrolnitrin oxygenase (PrnD)', <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.03.087>.
- [318] M. D'Auria, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 6333-6336; 'Electrophilic substitutions and HOMOs in azines and purines', <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.07.033>.
- [319] A. Ghomri, S. M. Mekelleche, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **2010**, 941, 36-40; 'Reactivity and regioselectivity of five-membered heterocycles in electrophilic aromatic substitution: A theoretical investigation', <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2009.10.035>.
- [320] R. A. Rodriguez, C.-M. Pan, Y. Yabe, Y. Kawamata, M. D. Eastgate, P. S. Baran, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 6908-6911; 'Palau'chlor: A Practical and Reactive Chlorinating Reagent'; (*J Am Chem Soc*), <https://doi.org/10.1021/ja5031744>.
- [321] V. de Lorenzo, L. Eltis, B. Kessler, K. N. Timmis, *Gene* **1993**, 123, 17-24; 'Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq*/*P*_{trp}-*lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes', [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90533-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90533-9).
- [322] N. Oberleitner, A. K. Ressmann, K. Bica, P. Gärtner, M. W. Fraaije, U. T. Bornscheuer, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, *Green Chem.* **2017**, 19, 367-371; 'From waste to value—direct utilization of limonene from orange peel in a biocatalytic cascade reaction towards chiral carvulactone'; (*Green Chem*), <https://doi.org/10.1039/c6gc01138a>.
- [323] P. Calero, S. I. Jensen, A. T. Nielsen, *ACS Synth. Biol.* **2016**, 5, 741-753; 'Broad-host-range ProUSER vectors enable fast characterization of inducible promoters and optimization of *p*-coumaric acid production in *Pseudomonas putida* KT2440', <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00081>.
- [324] L. E. Hüsken, R. Beeftink, J. A. de Bont, J. Wery, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, 55, 571-577; 'High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system', <https://doi.org/10.1007/s002530000566>.
- [325] R. J. Mitchell, M. B. Gu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, 120, 183-197; 'Construction and evaluation of *nagR*-*nagAa::lux* fusion strains in biosensing for salicylic acid derivatives', <https://doi.org/10.1385/ABAB:120:3:183>.
- [326] S. K. Berwal, R. K. Sreejith, J. K. Pal, *Anal. Biochem.* **2010**, 405, 275-277; 'Distance between RBS and AUG plays an important role in overexpression of recombinant proteins', <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.06.003>.
- [327] P. E. Hammer, W. Burd, D. S. Hill, J. M. Ligon, K. H. van Pée, *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, 180, 39-44; 'Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains', <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08775.x>.
- [328] S. Prem, C. P. O. Helmer, N. Dimos, S. Himpich, T. Bruck, D. Garbe, B. Loll, *Microb. Cell Fact.* **2022**, 21, 1-15; 'Towards an understanding of oleate hydratases and their application in industrial processes', <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01777-6>.

- [329] F. Contreras, C. Nutschel, L. Beust, M. D. Davari, H. Gohlke, U. Schwaneberg, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, 19, 743-751; 'Can constraint network analysis guide the identification phase of KnowVolution? A case study on improved thermostability of an endo-beta-glucanase', <https://doi.org/10.1016/j.csbi.2020.12.034>.
- [330] K. Yu, C. Liu, B. G. Kim, D. Y. Lee, *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 155-164; 'Synthetic fusion protein design and applications', <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.005>.
- [331] B. Collinet, M. Herve, F. Pecorari, P. Minard, O. Eder, M. Desmadril, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 17428-17433; 'Functionally accepted insertions of proteins within protein domains', <https://doi.org/10.1074/jbc.M000666200>.
- [332] D. Ribitsch, A. O. Yebra, S. Zitzenbacher, J. Wu, S. Nowitsch, G. Steinkellner, K. Greimel, A. Doliska, G. Oberdorfer, C. C. Gruber, K. Gruber, H. Schwab, K. Stana-Kleinschek, E. H. Acero, G. M. Guebitz, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1769-1776; 'Fusion of binding domains to *Thermobifida cellulolytica* cutinase to tune sorption characteristics and enhancing PET hydrolysis', <https://doi.org/10.1021/bm400140u>.
- [333] N. Jawanda, K. Ahmed, S. C. Tu, *Biochemistry* **2008**, 47, 368-377; 'Vibrio harveyi flavin reductase--luciferase fusion protein mimics a single-component bifunctional monooxygenase', <https://doi.org/10.1021/bi701392b>.
- [334] D. Listov, C. A. Goverde, B. E. Correia, S. J. Fleishman, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2024**, 25, 639-653; 'Opportunities and challenges in design and optimization of protein function', <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00718-y>.
- [335] M. F. A. Mohamed, G. E.-D. A. Abu-Rahma, *R. Soc. Chem. Adv.* **2020**, 10, 31139-31155; 'Molecular targets and anticancer activity of quinoline-chalcone hybrids: literature review', <https://doi.org/10.1039/D0RA05594H>.
- [336] C. Scheich, D. Kummel, D. Soumailakakis, U. Heinemann, K. Bussow, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, e43; 'Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins', <https://doi.org/10.1093/nar/gkm067>.
- [337] G. J. Gopal, A. Kumar, *The Protein Journal* **2013**, 32, 419-425; 'Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*', <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>.
- [338] A. Penzkofer, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 9157-9183; 'Reduction-oxidation photocycle dynamics of flavins in starch films', <https://doi.org/10.3390/ijms13079157>.
- [339] Y. Pellegrin, F. Odobel, *C. R. Chim.* **2016**, 20, 283-295; 'Sacrificial electron donor reagents for solar fuel production', <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.11.026>.
- [340] Q. G. Mulazzani, M. Venturi, M. Z. Hoffman, *J. Phys. Chem.* **1985**, 89, 722-728; 'Radiolytically induced one-electron reduction of methylviologen in aqueous solution. Reactivity of EDTA radicals toward methylviologen', <https://doi.org/10.1021/j100250a032>.
- [341] J. T. Payne, M. C. Andorfer, J. C. Lewis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 5271-5274; 'Regioselective arene halogenation using the FAD-dependent halogenase RebH', <https://doi.org/10.1002/anie.201300762>.
- [342] M. Akula, J. P. Sridevi, P. Yogeewari, D. Sriram, A. Bhattacharya, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2014**, 145, 811-819; 'New class of antitubercular compounds: synthesis and anti-tubercular activity of 4-substituted pyrrolo[2,3-c]quinolines'; (*Monatsh Chem*), <https://doi.org/10.1007/s00706-013-1141-1>.
- [343] S. Vijay Kumar, B. Saraiah, G. Parameshwarappa, H. Ila, G. K. Verma, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 7961-7978; 'Synthesis of N-functionalized/NH-multisubstituted indoles, thienopyrroles, pyrroloindoles, and pyrazolopyrroles via sequential one-pot base-mediated and copper-catalyzed inter- and intramolecular amination of 2-[2-bromo(het)aryl]-3-(het)aryl-3-(methylthio)acrylonitriles', <https://doi.org/10.1021/jo501114a>.

- [344] P. G. Furtmuller, U. Burner, C. Obinger, *Biochemistry* **1998**, 37, 17923-17930; 'Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate', <https://doi.org/10.1021/bi9818772>.
- [345] L. Dai, H. Li, S. Dai, Q. Zhang, H. Zheng, Y. Hu, R. T. Guo, C. C. Chen, *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 260, 129312; 'Structural and functional insights into the self-sufficient flavin-dependent halogenase', <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129312>.
- [346] M. Espona-Fiedler, V. Soto-Cerrato, A. Hosseini, J. M. Lizcano, V. Guallar, R. Quesada, T. Gao, R. Perez-Tomas, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, 83, 489-496; 'Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: Prodigiosin vs. obatoclox', <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.11.027>.
- [347] J. Li, B. C. Ye, *Bioresour. Technol.* **2021**, 319, 124239; 'Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for high-yield production of protocatechuic acid', <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124239>.
- [348] J. E. Prior, M. D. Lynch, R. T. Gill, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, 106, 326-332; 'Broad-host-range vectors for protein expression across gram negative hosts', <https://doi.org/10.1002/bit.22695>.
- [349] E. Vazquez-Figueroa, V. Yeh, J. M. Broering, J. F. Chaparro-Riggers, A. S. Bommarium, *Protein Eng., Des. Sel.* **2008**, 21, 673-680; 'Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus method also show increased stability in salts solutions and homogeneous aqueous-organic media', <https://doi.org/10.1093/protein/gzn048>.
- [350] K. A. Lampel, B. Uratani, G. R. Chaudhry, R. F. Ramaley, S. Rudikoff, *J. Bacteriol.* **1986**, 166, 238-243; 'Characterization of the developmentally regulated *Bacillus subtilis* glucose dehydrogenase gene', <https://doi.org/10.1128/jb.166.1.238-243.1986>.
- [351] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, 166, 557-580; 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids', [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8).
- [352] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, 189, 113-130; 'Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes', [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- [353] K. E. Nelson, C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummler, C. M. Fraser, *Environ. Microbiol.* **2002**, 4, 799-808; 'Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440', <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00366.x>.
- [354] A. Domröse, J. Hage-Hülsmann, S. Thies, R. Weihmann, L. Kruse, M. Otto, N. Wierckx, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 7028; 'Pseudomonas putida rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes', <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43405-1>.
- [355] A. Domrose, A. S. Klein, J. Hage-Hulsmann, S. Thies, V. Svensson, T. Classen, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Frontiers in Microbiology* **2015**, 6, 972; 'Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*', <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00972>.
- [356] A. Domröse, doctoral thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **2017**.
- [357] I. T. Paulsen, C. M. Press, J. Ravel, D. Y. Kobayashi, G. S. Myers, D. V. Mavrodi, R. T. DeBoy, R. Seshadri, Q. Ren, R. Madupu, R. J. Dodson, A. S. Durkin, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, S. A. Sullivan, M. J. Rosovitz, M. L. Gwinn, L. Zhou, D. J. Schneider, S. W. Cartinour, W. C. Nelson, J. Weidman, K. Watkins, K. Tran, H. Khouri, E. A. Pierson, L. S. Pierson, 3rd, L. S. Thomashow, J. E. Loper, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 873-878; 'Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5', <https://doi.org/10.1038/nbt1110>.

- [358] R. H. Don, P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, J. S. Mattick, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 4008; 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification', <https://doi.org/10.1093/nar/19.14.4008>.
- [359] K. H. Roux, *BioTechniques* **1994**, 16, 812-814; 'Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR'.
- [360] M. Pirae, L. C. Vining, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 29, 1-5; 'Use of degenerate primers and touchdown PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230', <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000263>.
- [361] Z. Chen, D. E. Ruffner, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1126-1127; 'Amplification of closed circular DNA in vitro', <https://doi.org/10.1093/nar/26.4.1126>.
- [362] A. R. Shenoy, S. S. Visweswariah, *Anal. Biochem.* **2003**, 319, 335-336; 'Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA', [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00286-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00286-0).
- [363] A. Sawano, A. Miyawaki, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, e78-e78; 'Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis', <https://doi.org/10.1093/nar/28.16.e78>.
- [364] R. Higuchi, B. Krummel, R. Saiki, *Nucleic Acids Res.* **1988**, 16, 7351-7367; 'A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions', <https://doi.org/10.1093/nar/16.15.7351>.
- [365] W. Guo, B. Xie, M. Jiang, X.-J. Zhu, M. Qiu, Z.-M. Dai, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 15637; 'An improved overlap extension PCR for simultaneous multiple sites large fragments insertion, deletion and substitution', <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52122-8>.
- [366] D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Nat. Methods* **2009**, 6, 343-345; 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases', <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- [367] N. L. Bitzenhofer, C. Höfel, S. Thies, A. J. Weiler, C. Eberlein, H. J. Heipieper, R. Batra-Safferling, P. Sundermeyer, T. Heidler, C. Sachse, T. Busche, J. Kalinowski, T. Belthle, T. Drepper, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke, *Microb. Biotechnol.* **2023**, 17, e14312; 'Exploring engineered vesiculation by *Pseudomonas putida* KT2440 for natural product biosynthesis', <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14312>.
- [368] Q. Tu, J. Yin, J. Fu, J. Herrmann, Y. Li, Y. Yin, A. F. Stewart, R. Müller, Y. Zhang, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 24648; 'Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency', <https://doi.org/10.1038/srep24648>.
- [369] G. Ölçücü, B. Baumer, K. Küsters, K. Möllenhoff, M. Oldiges, J. r. Pietruszka, K.-E. Jaeger, U. Krauss, *ACS Synth. Biol.* **2022**, 11, 1881-1896; 'Catalytically active inclusion bodies—benchmarking and application in flow chemistry', <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00035>.
- [370] M. L. Read, A. Krapp, P. O. Miranda, L.-L. Gundersen, *Tetrahedron* **2012**, 68, 1869-1885; 'Synthesis of complex fused polycyclic heterocycles utilizing IMDAF reactions of allylamino- or allyloxy-furyl(hetero)arenes'; (*Tetrahedron*), <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.12.079>.
- [371] N. D. Smith, D. Huang, N. D. P. Cosford, *Org. Lett.* **2002**, 4, 3537-3539; 'One-step synthesis of 3-aryl- and 3, 4-diaryl-(1 H)-pyrroles using tosylmethyl Isocyanide (TosMIC)', <https://doi.org/10.1021/ol0267073>.
- [372] J. M. Moore, J. M. Hall, W. L. Dilling, A. W. Jensen, P. J. Squattrito, P. Giolando, K. Kirschbaum, *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.* **2017**, 73, 531-535; 'N-Benzylnicotinamide and N-benzyl-1,4-dihydronicotinamide: useful models for NAD⁺ and NADH', <https://doi.org/10.1107/S2053229617008877>.

- [373] A. Domroese, J. Hage-Hülsmann, S. Thies, R. Weihmann, L. Kruse, M. Otto, N. Wierckx, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschke, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 7028; 'Pseudomonas putida rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes', <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43405-1>.
- [374] M. Groeneveld, H. L. van Beek, W. A. Duetz, M. W. Fraaije, *Tetrahedron* **2016**, 72, 7263-7267; 'Identification of a novel oxygenase capable of regiospecific hydroxylation of D-limonene into (+)-trans-carveol'; (*Tetrahedron*), <https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.12.061>.
- [375] J. Yan, Y.-H. Wu, F.-X. Meng, C.-S. Wang, S.-L. Xiong, X.-Y. Zhang, Y.-Z. Zhang, X.-W. Xu, D.-M. Zhang, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, 66, 3538-3545; 'Pseudoalteromonas gelatinilytica sp. nov., isolated from surface seawater', <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001224>.
- [376] L. Sorieul, C. Rückert, A. Al-Dilaimi, A. Winkler, J. Kalinowski, D. Pham, N. Wabete, V. Boulo, *Microbiol. Resour. Announce.* **2019**, 8; 'Whole-genome sequence of Pseudoalteromonas sp. NC201, a probiotic strain for Litopenaeus stylirostris hatcheries in New Caledonia', <https://doi.org/10.1128/MRA.00477-19>.
- [377] J. Jancarik, S.-H. Kim, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, 24, 409-411; 'Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins'; (*J Appl Crystallogr*), <https://doi.org/10.1107/S0021889891004430>.
- [378] R. Giegé, A. Ducruix, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, 2 ed., Oxford University Press: New York, **1999**, ISBN: 9780199636785.
- [379] A. McPHERSON, in *EJB reviews 1990*, **1990**, pp. 49-71, ISBN : 978-3-540-53290-3.
- [380] E. F. Garman, E. P. Mitchell, *J. Appl. Crystallogr.* **1996**, 29, 584-587; 'Glycerol concentrations required for cryoprotection of 50 typical protein crystallization solutions'; (*J Appl Crystallogr*), <https://doi.org/10.1107/S0021889896004190>.
- [381] W. Palm, P. M. Colman, *J. Mol. Biol.* **1974**, 82, 587-588, IN513-IN514; 'Preliminary X-ray data from well-ordered crystals of a human immunoglobulin G molecule', [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90250-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90250-2).

13. DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn *Prof. Dr. Jörg Pietruszka* für die tolle Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit in seinem Institut durchführen zu dürfen. Neben der Freiheit mein Projekt nach meinen Vorstellungen gestalten zu können, bin ich auch für die familiäre Atmosphäre dankbar, die ohne ihn nicht möglich gewesen wäre. Auch die ständige Verfügbarkeit zum Besprechen von Problemen oder einfach für den lockeren Austausch am Abend bleiben mir als positives Beispiel in Erinnerung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei *Prof. Dr. Thomas Drepper* für die kurzfristige Übernahme des Korreferats, sowie für die vielen Jahre des freundlichen und konstruktiven Miteinanders.

Besonderer Dank gilt auch *Dr. Thomas Classen* für die Betreuung meiner Doktorarbeit, sowie der gemeinsamen Planung des Projekts. Mit seinem breiten Wissen in diversen Disziplinen konnte ich eine Menge bei und von ihm lernen. Neben der wissenschaftlichen Diskussion habe ich in der gemeinsamen Zeit auch seinen großartigen Humor genossen und gebannt seinen unterhaltsamen Erzählungen gelauscht.

Zuletzt möchte ich mich auf wissenschaftlicher Seite bei *Dr. Anita Löschcke* für die Koordination des BioSC-Focus-Labs CombiCom bedanken. Ihr immer freundlicher Umgang hat jedem Projekttreffen zu einer angenehmen Atmosphäre verholfen.

Ich bedanke mich für die Beiträge meiner Bachelorstudentin *Nena Billen*, bei meinem Auszubildenen *Florian Garnebode* und meiner Austauschstudentin *Claire Page*.

Auch bedanken möchte ich bei meiner Arbeitsgruppe *Sekundärmetabolismus-Enzymologie*. Neben *Dr. Thomas Classen* als Gruppenleiter waren wir mit *Nikolai Huwa* und *Alexander Veljko Fejzagić* ein interessantes Gespann. Besonders *Alex* ist mir nach diesen Jahren ein besonderer Freund geworden. Wir hatten unglaublich viel Spaß zusammen. Das war ein herausragender Faktor für die tolle Zeit, der so manches Tal nur halb so tief erscheinen lies.

Birgit Henßen, Beatrix Paschold, Vera Ophoven und Monika Gehsing möchte ich ebenfalls für den Rundum-Support in Labor und Administration danken. Ihr habt dieses Team durch euren Einsatz durch so manche schwierige Phase gebracht. Während *Bea* eine große Unterstützung im Bio-Labor war, hat *Birgit* in unzählbaren Bereichen geholfen. Ob es die diversen Analytiken waren, in der Verwaltung, oder was eben spontan dazukam. Auf *Birgit* war immer Verlass. Auch die Zeit der letzten Phase konnten wir über das Arbeitsumfeld hinaus noch viele persönliche bzw. private Geschichten teilen, die uns eine weitere Verbindung gegeben haben.

Neben den Laborleitern bleibt mir nur noch der Dank an das ganze Team IBOC, welches durch vielfältige Kompetenzen und tolle Charaktere eine Bereicherung für meine Vita war.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Mutter *Kathrin Prieff* bedanken. Außerhalb der Arbeitsgruppe hat sich wohl niemand so viel Gemecker, Geklage und Gefluche anhören müssen wie sie. Sie war mir immer eine Stütze durch ihr offenes Ohr. Egal nach wie viel Bahnhof es für sie geklungen hat. Sie hat immer geduldig zugehört und Ratschläge gegeben. Auch deine Unterstützung ist ein Pfeiler für das Fertigstellen dieser Arbeit. Darüber hinaus warst du mir natürlich im gesamten Leben eine riesen Hilfe und die beste Mama, die ich mir hätte wünschen können.

Obleich es an dieser Stelle keine Danksagung für die Dissertation selbst ist, möchte ich mich grundsätzlich bei meiner Oma *Margret Tews* bedanken. Leider konntest du die Beendigung der Arbeit nicht mehr miterleben, aber ich weiß, dass auch dir der Abschluss dieses Lebensabschnittes viel bedeutet hat. Danke für die tolle Kindheit und die Unterstützung die du mir und Mama warst.

Nun zu der beeindruckendsten Frau, die sich seit Anbeginn meiner Zeitrechnung in meinem Leben befindet. *Denise Detlof* ist einer der wichtigsten Menschen in meinem Leben und hat folglich auch viel meiner Promotionszeit mitbekommen. Ich möchte auch dir für deine Ratschläge und dein Ohr danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Partner *Florian Kiehl* bedanken. Nach 2.5 Jahren Gerede über die fast fertige Arbeit ist es nun soweit. Auch du hast mich in der Schreibphase unterstützt und mir den benötigten Freiraum gegeben. Deine liebevolle Art und deine Geduld haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit das geworden ist, was sie ist. Danke dir, wie auch Mama und *Alex* für das Korrekturlesen.

14. ANHANG

14.1 Vektorkarten mit Gen- und Aminosäuresequenzen

pGEB ist ein modifizierter Vektor pET28a(+), in welchem die multiple cloning site (MCS) ausgetauscht wurde.

1. pET28a(+):

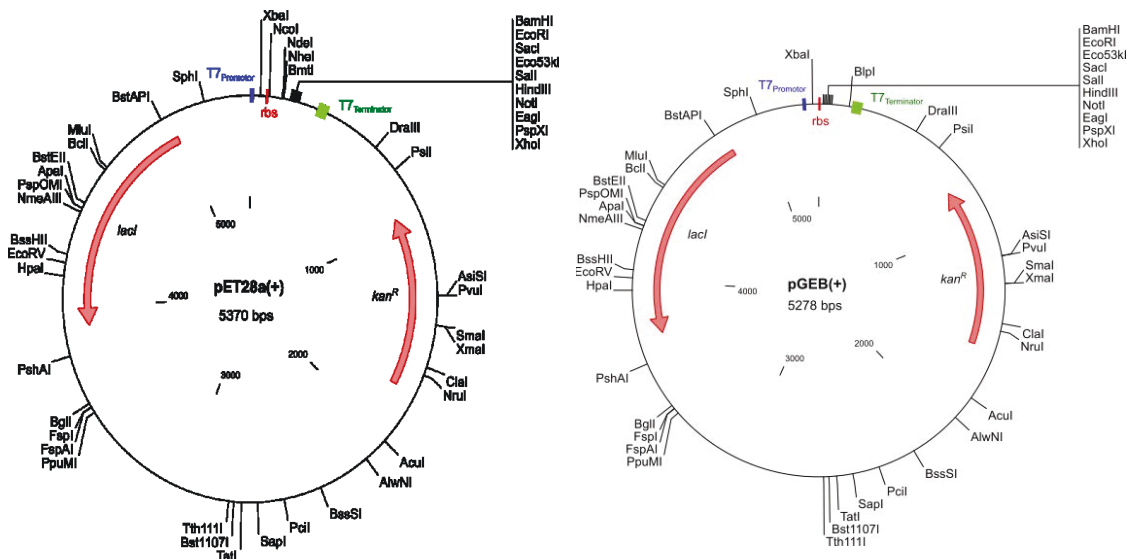
TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGaaggagATATACCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTC

2. pGEB:

TCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGaaggagATATACCCGTCGCGGATCCGAATTC

XbaI SCHNITTSTELLE, Ribosombindestelle (RBS), (former) NcoI SCHNITTSTELLE,

underlined area was deleted, EcoRI SCHNITTSTELLE



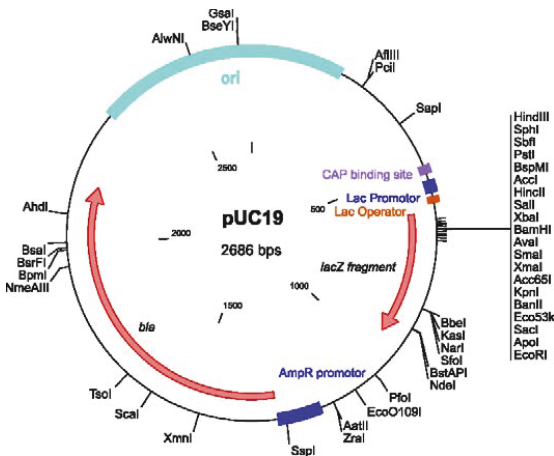
Weitere kommerziell erhältliche Vektoren die in dieser Arbeit genutzt wurden. Entweder als Lagerungsplasmid, Selektion oder durch Genbestellungen.

3. pUC19:

Sequenz der MCS:

```
TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTatg
ACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGTGCAGTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACCTGGC
CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCG
CCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGC
CTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTC
TGATGCCGCATAG
```

Lac Promotor, **LAC Operator**, Start-Codon des LacZ Fragments, **HindIII**, **Stop-Codon des LacZ Fragments**

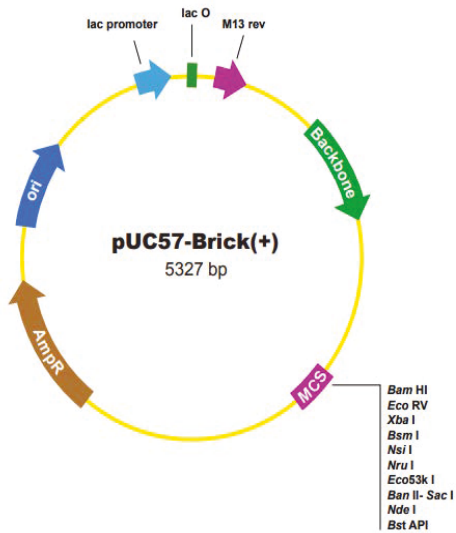


4. pUC57-Brick(+):

Sequenz der MCS:

```
TGCGGATCCGATATCTAGATGCATTGCGGAGGTACCGAGCTCAAGCTTGAGTATTCTATAGTCTCACCTAAATAGCT
TGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTAC
ACCGCATATGGTG
```

BamHI Schnittstelle, NdeI Schnittstelle



Für die Arbeit mit mehreren Organismen wurden folgende Shuttle-Vektoren genutzt:

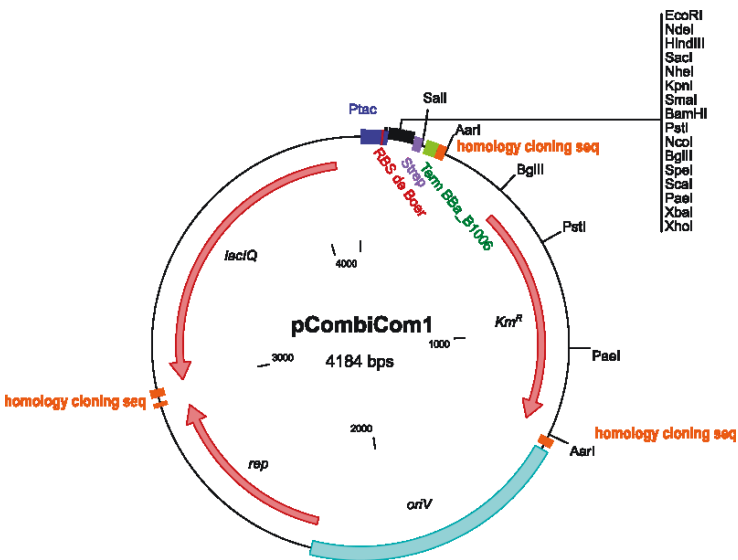
5. pCombiCom1 (pCC1):

Als Nachfolger des pVLT33 wurde dieser Vektor vom Projektkoordinator Dr. Anita Löschcke designed.

Sequenz der MCS:

```
AATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGAAATCATATGTGAAAGCTTGAGCTCGCTAGCGGTACCCGGG
GATCCCTGCAGCCATGGAGATCTACTAGTAGTACTGCATGCTCTAGActcgagTGGTCCGATCCACAATTTGAGAAA
TAAgTCGACTACTAGAAAAAAACCOCGCCCTGACAGGGCGGGTTTTTTT
```

LacO de Boer, RBS de Boer, EcoRI Schnittstelle, NdeI Schnittstelle, Start- und Stopp-Codon, XhoI Schnittstelle, Strep-tag, Sall Schnittstelle, Bba_1006 Terminator



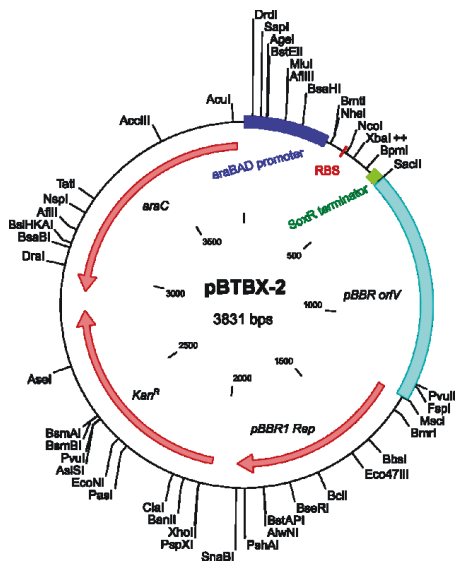
6. pBTBX-2:

Sequenz der MCS:

```
ACTTTAAGAAGGAGATATACCCATGGTAAAAATGGTCAGTATTGAGCGATACTCTAGAGAATTCGTCAACGAATCAAG
CTTGATATCATTCAGGACGAGCCTCAGACTCCAGCGTAACTGGACTGAAAACAAACTAAAGCGCCCTTGTGGCGCTT
TAGTTTT
```

Ribosomenbindestelle (RBS), NcoI Schnittstelle, Start- und Stop-Codon, XbaI,

SoxR Terminator



Pseudomonas protegens Pf-5 monodechloraminopyrrolnitrin (MDA) halogenase **PrnC**

GenBank: AAY92872.1

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): 85885 M⁻¹ cm⁻¹

Molekulargewicht: 66.2 kDa

7. pET28a(+)-*prnC*-His₉:

Aminosäuresequenz:

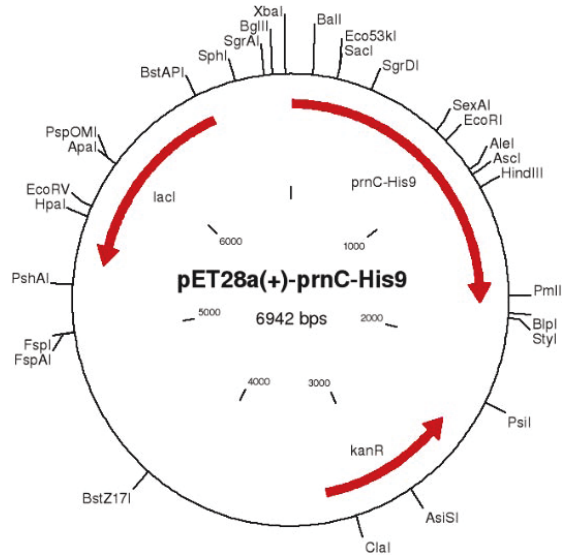
MTQKSPANGHDSNHFDVILGSGMSGTQMGAILAKQQFRVLIIEQSSHPRFTIGESSIPETSLMNRIADRYDIPEL
GHITSFYSTQRYVSSSTGIKRNFGVFKPGQEHDPKFTQCVIPELPWPESHYYRQVDAYLLQAAIKYGCTVRQ
KTSVTEYHADKDGVAVTTAEGERFTGRYMIDCGGPGAPLTKFGLREEPKRFKTHSRSLYTHMLGVKPFDDIFKVKG
QRWRWHEGTLHHMFTGGWLWVIFNNHPRSTNNLVSVGLQLDPRVYPKTDIPAQQEFDEFLLARFPSIGAQFRDAVPV
RDWVKTRDLRQFSSNACVGDYRCLMLHANGFIDPLFSRGLENTAVTIHALAARLIKALRDDDFSPERFEYIERLQOKL
LDHNDDFVSCCYTAFSDFRWLDAFHRLWAVGTILGQFRLVQAHARFRASRDEGLDHLNDPYPYLYCADMEQYYQ
LFNDAKAEVEAVSAGHKSAAEEAALRIHALIDERDFAKPMFGFGYICITGDKPQLNNSKYSLIPAMKLMYWTQTRAPAE
VKKYFDYNPMFALLKAYITTRIGLALKKHV**HHHHHHHH**

Gensequenz:

aaggagATATACatgactcagaagagccccgcgaacgaacacgatagcaaccacttcgacgtaatcatcctcggttc
gggcatgtccggtaaccagatagggggccatcctggcacaacaacagtttcgctgctgatcatcgagcagtcgctgc
accgcgggttcacgatcggcgaatcgtcgatccccgaaacgtctctcatgaaccgcatcatcgctgatcgctacgac
attccggagctcggccacatcacctcgttctactcgacgcagcgttacgtttcgctcgagcagggcatcaagcga
cttcggcttcgctgtccacaaacctggccaggagcagcagccgaaggagttaaccagtgctcattcccagctgc
cgtggggccggagagccattattaccggcaggacgtcgacgcctatctgttgcaagcggccatcaaaatagctgc
acggtccgccagaagacgagcgtgaccgaatatcacgcggacaaggacggcgtcgcggtgaccaccgcccaggggca
gcggttcaccggccggtacatgatcgaactgcggaggaccggcgcgctggcgaccaagtccgggtccgccaag
agccgtgctcgttcaagacgactcgcgcagcctctacacgcacatgctcggggcaagccgttcgacgacatcttc
aaggtaaggggcagcgtggcgtggcagcaaggaacctgcaccacatgttcaccggcggctggctctgggtgat
tccgttcaacaaccaccgctcgaccaataacctggtgagcgtcggcctgcagctcgaccgcgctgtctaccgga
aaaccgacattcccgcgagcaggaatcgcagagttcctcgcggttcccagacatcggcctcagttccgggac
gccgtgccagtgccgactgggtcaagaccgaccctgcagttctcgtcgaacgcctgcgtcggcagccgctactg
cctgatgctgcacgcgaacgggttcacgcaccgctcttctcccgggggctcgagaacaccgcggtgaccatccag
cgctcgcggcgcgctcatcaaggcgtacgcgacgacgacttctccccgagcgttcgagtagatcgagcgcctg
cagcaaaagcttttgaccacaacgacgacttcgtcagctgctgtacacggcgttctcggacttcgcctatggga
cgcgttccaccggctgtggggcgtcggcactatcctcgggcagttccggctggtgcaagcccacgcgaggtttcgcg
cgtcgcgcgacgagggcgacctcgatcacctcgacaacgacccgcctacctcgggtacctgtgcgggacatggag
cagtagtaccagttgttcaacgacgcccgaagcggaggtcgaggctgtgagcgcggggcacaagtccggccgaggaggc
cgcgttgccgatcaccgcctcatcgacgaacgagacttcgccaagccgatgttcggcttcgggtactgcatcaccg
gggacaagccgcagctcaacaactcgaagtacagcctgataccggcgtgaaagctgatgtactggacgcaaacccgc
gcggcgcagaggtgaagaagtacttcgactacaaccggatgttcgcgctgctcaaggcgtacatcaccaccgcat

cggcctggcgctgaagaagcacgtg **CACCACCACCACCACCACCACCAC** *tga* GATCCGGCTGCTAACAAAGCCC
 GAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTG
 AGGGGTTTTTTG

Start- und Stop-Codon, **HIS-TAG**, **Ribosombindestelle (RBS)**, **T7 TERMINATOR**



Pseudomonas protegens Pf-5 flavin reductase **PrnF**

GenBank: AAY92875.1

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): 13075 M⁻¹ cm⁻¹

Molekulargewicht: 21.0 kDa

8. pET28a(+)-*prnF*:

Aminosäuresequenz:

MIAATETKVHDLLEDAEGRDVRDARELRNVLGQFATGVTVITTRTADGRNVGVTANSFSSLSLSPALVLWLSLARTAPSLKAFCSASHFAINVLAGHQHHLSEQFARAAAADKFAGVAHSYGKAGAPVLDVVAVLVCRNVTQYEGGDHLIFIGEIEQYRYSGAEPLVFHAGQYRGLGSNRAESVLKHE

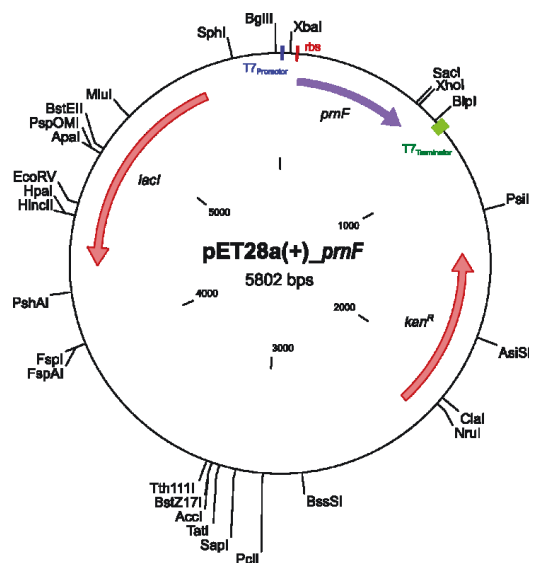
Gensequenz mit His-tag:

CTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAG**aaggag**ATATACCC**atg**attgctgccaccgaaaccaaagttcacgatttgctcgatgccgagggccgcgatgtccgcgatgccctggaactgcgcaactgctggggcagtttgctaccgggtgtgacggtgatcaccacccgcaccgcagacggccgcaactgcggtgtgacggccaactcgttctcctcactgtcgtgtgaccggcgtggtgctctggagcctggcacgcacggcaccgcagcctgaaggccttttgctcggcgagccaacttcgccatcaacgtactggcgccaccagcaccacctgtcggagcagttcgcacgggcaagcagccgacaagttcgccggtgtagctcatctcctatggcaaggcgggagccccggtgctggacgatgtggtggcagtgctggtgtgccgaacgtcaccagtacgagggcggtgaccacctgatcttcattggcgcagatcgaaacaataccgctacagcggcgccagaaaccgctggtcttccatgcaggccagtagccgggctaggggagcaatagagcagaaagcgtcctcaagcagaa**taa**GAGCTCTGA**CTCGAG**

XbaI Schnittstelle, Vorherige **NcoI** Schnittstelle,

Start- und Stop-Codon, **XhoI** Schnittstelle,

Ribosombindestelle (RBS)



9. pET28a(+)-prnF-His6:

Aminosäuresequenz mit His-tag:

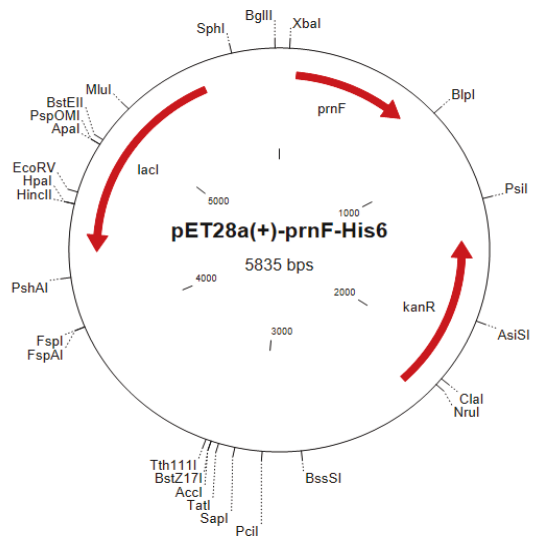
MIAATETKVDLLDAEGRDVRDARELRNVLGQFATGVTVITTRTADGRNVGVTANSFSSLSLSPALVLWSLARTAPS
LKAFCASHFAINVLGAHQHHLSEQFARAAADKFAVAHSYGKAGAPVLDVVAVLVCARNVTQYEGGDHLIFIGEIE
QYRYSGAEPLVFHAGQYRGLGSNRAESVLKHETS**HHHHHH**

Gensequenz mit His-tag:

aaggagATATAC**CCatg**attgctgccaccgaaaccaaagttcacgatttgctcgatgccgaggccgcgatgtccgc
gatgcccgtgaactgcgcaacgtgctggggcagtttgctaccggtgtgacctgatcaccaccgcaccgcagacgg
ccgcaacgtcgggtgtgacggccaactcgttctcctcactgtcgtgtcaccggcgctggtgctctggagcctggcac
ctgctcggagcagcctgaaggccttttgcctcggcagccacttcgcaatcaacgtaactggcgcgccaccgaccac
cctgctcggagcagttcgcacggcagcagccgacaagtctgcgggtgtagctcattcctatggcaaggcgggagcccc
ggtgctggacgatgtggtggcagtgctggtgtgccgcaacgtcaccagtagcagggcggtgaccacctgatcttca
ttggcgagatcgaacaataccgctacagcggcgcagaaaccgctggtcttccatgcaggccagtaccgggggtaggg
agcaatagagcagaaaagcgtcctcaagcacgaaactagt**caccaccaccaccaccactga**ACTAGTTAAGAGCTCTG
ACTCGAG

Start- und Stop-Codon, **HIS-TAG**, ribosombindestelle (RBS),

Vorherige NcoI Schnittstelle, **SpeI und XhoI Schnittstellen**



Pseudomonas protegens Pf-5 Biosynthese-Cluster für Pyrrolnitrin **PrnABCDF**

GenBank: PrnA (AA92870.1), PrnB (AA92871.1), PrnC (AA92872.1), PrnD (AA92873.1), PrnF (AA92875.1)

Molekulargewicht: PrnA (62.5 kDa), PrnB (40.8 kDa), PrnC (66.1 kDa), PrnD (42.1 kDa), PrnF (19.9 kDa)

10. pET28a(+)-prnABCDF:

Aminosäuresequenzen:

PrnA-Strep:

MNKPIKNIVIVGGGTAGWMAASYLVRALQQQVNITLIESAAIPRIGVGEATIPSLQKVFFDFLGIPIREWMPQVNGA
FKAAIKFVNWRKSPDPSREDFYHFLFGSVPCDGVPLTHYWLKRKREQGFQQPMAYACYPPGALDGLAPCLADGTR
QMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVERGVRVVEVVEVQLNDRGYISTLLTKEGRTLEADLFIDCSGMRGLLINQALKE
PFIDMSDYLLCDSAVASAVPNDAREGEVPEYTSIAMNSGWTWKIPMLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLKWLGL
SDNQQLNQIKFRVGRNKRAWVNNCVSIGLSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKHFPDTSFDPRLRDAFNAEIVYMF
DDCRDFVQAHYFTTSREDDPFWLANRHELRLSDAIQEKVERYKAGLPLTTTSFDDSTYYETFDFYEFKNFWLNGNYC
IFAGLGMLPDRSLPLLQHRPESIQKAEAMFASIRREAERLRTSLPTNYDYLRSLRDGAQLSRNQHGPTLAAQERQHV
WSHPQFEK

PrnB-Strep:

MERTLNRVSAFAATHAAVAACDPLQARALVQLPALNRDKDVP GIVGLLRDFLPVSGVPSSWGFVEAAAAMRDIGFF
LGSLKRHGHEPVDLVPGLERVLLDLARVTDLPPRETL LHVTVWNPAAADAQRSYTGLPDEAHLLESVRI SMAALEAA
IALTVELSDVSLRSPAFAGQCDELEAYLQKMVESIVYAYRFISPQVFYDELRFYEPYIRVGGQSYLGP GAVEMPLFV
LEHVLWGSQSDDPAYREFKETYLPYVLPAYRAVYARFATEPALIDRALDEARAAGTQGEHVRAGLTALERVFKVLLR
FRAPHLKLAERAYEAGRSGPTTGSGGYAPSM LGDLLTLTCAA

PrnC-Strep:

MATQKSPANGHDSNHFDVVIILGSGMSGTQMGAAILAKQQFRVLIIEQSSHPRFTIGESSIPETSLMNRIIADRYDIPE
LGHITSFYSTQRVSSSTGIKRNFGVFHKGQEHDPKEFTQCVIPELPWGPESHYYRQDQVDAYLLQAAIKYGCTVR
QKTSVTEYHADKDGVAVTTAEGERFTGRYMICGGPGAPLTKFGLREPCRFKTHRSRSLYTHMLGVKPFDDIFKVK
GQRWRWHEGTLHHMFTGGWLWVIFPNNHPRSTNNLVSVGLQLDPRVYPKTDIPAQQEFDEF LARFPSIGAQFRDAVP
VRDWKTDRLQFSSNACVGDYCLMLHANGFIDPLFSRGLENTAVTIHALAARLIKALRDDDFSPERFEYIERLQQK
LLDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHRLWAVGTILGQFRLVQAHARFRASRDEGLDHLNDPPYLG YLCADMEQYY
QLFNDAKAEVEAVSAGHKSAAEEAALRIHALIDERDFAKPMFGFGYCI TGDKPQLNNSKYS LI PAMKLMYWTQTRAPA
EVKKYFDYNPMFALLKAYITTRIGLALKKHVWSHPQFEKRSRIRAALDES LKWSHPQFEK

PrnD-Strep:

MNNIQLDQANVKKHPPGAYDATTRVAASWYVAMRSNGLRDKPKELTLFGRPYVAWRAATGQAVVMDRHC SHLGANLA
 DGRIKDGCIQCFHHWRYDEQGKCVHIPGHSEVVVRQLEFPVPRAARQPTLVTTTERYGYVWVWYGSPPQLHPLPEITAA
 DVDNGDFMHLHFAFETTTAVLRIVENFYDAQHATPVHALPISAFELKLFDDWSRWPEVESLARAGAWFGAGIDFHVN
 RYFGPLGMLSRALGLNMSQMNLFHDGYPGGCVMVTVALDADVYKLLQCVTPVSDGKNIMHMLISIKKVVGGVLRRAATD
 FVLFGLQTRQAAGYDVKIWNMGKPDGGGAYS KYDKLV LKYRAF YR G W V D R V A S E Q L K W S H P Q F E K

PrnF-Strep:

MIAATETKVHLLD A E G R D V R D A R E L R N V L G Q F A T G V T V I T T R T A D G R N V G T A N S F S S L S L S P A L V L W S L A R T A P S
 LKAFCSASHFAINVLAGHQHHLSEQFARAAAADKFAGVAHSY GKAGAPV LDDVVAVLVCRNVTQYEGGDHLIFIGEIE
 QYRYSGAEPLVFHAGQYRGLGSNRAESVLKHE

DNA-Sequenz (im Vector pET28a(+)):

TAAG**AAGGAG**ATATACCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC**CA**
TATGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATT**CATatg**aacaagccaatcaagaatatcgt
 catcgtggggcggggcaccgcgggctggatggccgcttcgtacctcgtccggcgctccaacagcaggtaaacatca
 cgctcatcgagtctcgccgcatccccggatcggcgtggggcagggcgaccatcccagtttcgagaaggtgttcttc
 gacttctcgggataccggagcgggagtgatgccc aagtgaacgcgccctcaaggcgcgatcaagttcgtgaa
 ctggagaaaatctcccgaccatcgcgcgaagattacttctaccatttgttcggcagcgtgccgaactgcgacggcg
 tgccgcttaccactactggctgcgcaagcgcgaacagggcttcagcaaccgatggcgtacgcgtgtaccgcgag
 cccggggccctcgacgcaagctggcaccttgctgcccagcggcaccgcagatgtcccacgcgtggcacttcga
 cgcgcaacctggtggccgacttcttgaagcgtggggcgtcagcgcggggtgaatcgcgtggtcgacgaggtcgtgg
 aggttcaactgaacgaccgcggtacatctccacctgttaaccaaggaagggcggagcgtggaggcggacctgttc
 atcgactgctccggcatgcgagggtcctgatcaatcaggccctgaaggaaccttcatcgacatgtccgactacct
 gctgtgcgacagcggctcgcacgcctgtcccacgacgacgcgcgcgagggggtcgagccgtacacctccgcaa
 ttgccatgaactcgggatggacctggaagattccgatgctgggcccgttcggcagcggctacgtcttctccagcaag
 ttcacctcgcgcgaccaggccaccgcccgaacttctcaaactctggggcctctcgggacaatcagcagctcaaccagat
 caagttccgggtcgggcgcaacaagcgggctgggtcaacaactgcgtctcgatcgggctgtcgtcgtgcttcttg
 agccctggaatcgacgggaatctacttcatctacgcggcgtttaccaactcgtgaagcacttccccgacacctcg
 ttcgaccgcggttgcgcgacgcatcaacgcgagatcgtctacatgttcgacgactgccgagactcgtccagge
 gcactatttactactcgtcgcgcgaagacacgcgcttctggctcgcgaaccggcagcaactgcccgtctcggagcca
 tccaggagaaggttgagcgtacaagggcggctgccaactgaccaccctcgttcgacgattccactactacgag
 acgttcgactacgagttcaagaacttctggttgaacggcaactactactcgtcatttggccgctcgggcatgctgcc
 cgaccggtcgtcggcctcctgcagcaccgaccggagtcgatccagaagggcgaagcgatgttcgccagcatccggc
 gcgaagccgagcgcctgcgacgagcctgcccagcaactacgactactcgggtcactgctgctgacggcgcgcagctg
 tcgcgcaaccagcagggccgacgctcgcggcgcaggaaccgacgacgctgtg**gtcgcatccacaatttgagaaa**ta
 aCACGTGTAAGTCGACTACTAGAAAAAAAACCCCGCCCTGACAGGGCGGGTTTTTTT**CATATG**CGATTTAGGC
 GAAAGCTT**GAGCTC**CAGCTG**TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG**TGTGG**AATTGTGAGCGGATAACAAT**TTC
 ACAC**AGGA**AACA**atggaacgcaccttgaaccgggtatccgcattcgcggccacacacgctgccgtggcggcctgcga**
tccgctacaggcagcgcgctggttctgcagctgcccggcctgaaccgtgacaaggacgtgcccgcatcgtcggcc
tgtgcggattctctcccgtgagcggcgtgccctccagctggggcttcgtcgaagcggccggcgcgatgcccggac
atcggtttcttctcggggtcgtcaagggcagggacatgagcccgtggacctggtgccgggcttgaacgggtgct
 gctcgacctggcaggggtgaccgacttggccgcgcgagacactcctgcatgtgacggtctggaaccggcggcgg
 ccgatgcgacggagctacaccgggtgcccgacgaagcgcacctgctcgaagcgtgcgcatctcogatggcggcc
 ctcgaagcggccatcgcgttgaccgtcgagctgtccgatgtatccctgcgctcggccgcttcgcgcaaggggtgcga
 tgagctggaagcctacctgcagaaaa**tggtcgaatcgatcgtctacgcgtacccgttcatctcggcccaggtcttct**

*acgatgagctgcgcccttctacgaaccgattcgagtcgggggcccagagctacctcgcccccggcgccgtagaagtgc
cccctctctcgtgctggagcacgtcctgtggggctcgcaatcggacgacccagcgtatcgagagttcaagagacgta
cctgcctacgtgcttcccgcgtacaggggggtctacgctcggttcgccacagagccggcgctcatcgaccgcgctg
tcgacgagggcgagcgggggtacgcagggcgagcacgtccgggtgggctgacggccctcgaacgggtcttcaag
gtcctgctgcgcttccgggcctcactcaaatggcggagcgggcatcgaagccgggagcggcccccacaac
cggcagcgggggtacgcgccagcatgctcggcgtactactacgctcactgtgccggcggtcccgatccggc
ccgctcgatgaatcccttaagtgtcgcgatccacaatttgagaaa* *taaCTTAAGTAAGTCGACTACTAGAAAAA
AAACCCCGCCCTGACAGGGCGGGTTTTTTTTGAGCTCGCTAGCAATTTACGGTCAGTCAATATGGGTTTGTGGA
AGCTTATGCTTCAGAGAAAAGCTCGACGAACAACACTGACGTAGCCACATGTTTGCCCGGATCCCAGTTGTACTTGGCAT
GCCAAAACAGGTTGATGGCGATGTCGGGCAGCTTGGCCGGGTGCGGGGATGTCGTGACACCAAAGGCAATTTGCAG
CGAACGGCAAACCGTGCGGCACGGTCGCGATGAGGTGGTGTGTCAGAATGGGGCCGATCGCAATGAAATGCGG
CACCACCAGCCGATGCGCCTTTTGTATGCTGCGGTCGAGCAGGCCATCGACCTACCCTGTCGGTGTGAGTG
CGACCAGCCGACATGGTCCAGTTCACTGAACTGTTTCAGGTCATGGGGATTTGGCGCTTGGATGGTCTTGGCG
AACATGCATACGTAGCGGTGCGGAAAGAGGCCCGCTGGAAGAATCCGGTCTGTAGCTTGGCAGAAGACCCAAAGC
GAGATCAACCCACCCGACTCCATATCTCTCCTCAGATTGCCAGCATTCCGGCGCAGCGTGTGATCTGGATGTGAG
GAGCACGTTGCGCAAGCGCTTCCATCAGTGGGGCATGAAGTACATCTCGCCGATGTCGGTCAATGCCAAGTTGAAG
GTGCGCGTGTGGCAAAATGGGTGAAAGAGTACGGGTCGTAGTCCGCTCTGCAGCGTGTGAGCGCATAGATCAC
GGGCTCCGAAGATGCAGTGCATACGGTGTCCGCTCCATGCCTTTTGGAGTGCGAAGAACAATCGTCTTTAGCG
CCGACGCAGCCGTTTAAAGTGAATTGCTGACGGCAGGCTGCGTCAGCCCCAGTTTTTTCGCCGGCCGTCGATACGCTC
CGGTCGAGCAGTAGCTGGTTGAAGACCACCAGCAGATTCAAGTCGATGTCGCGCAGATCCATGATGCCTCACCATTA
TTCATGCTGGTGATTTTAACTATCAGACTTGATCTATAGCGCTATACCGATCGACGCCAGAATCGCAGCCATTTCG
GAGACAACCTGAAAAAAGAGCTTGCCACAGGAAACAGGAGGTACCGTACACAGGAAACACCa* *tggtgcaactcagaaga
gccccgcgaacggacacgatagcaaccacttcgacgtaatcatcctcgggtcgggcatgtccggtaccagatgggg
gccatcctggcacaacaacagtttcgcgtgctgatcatcgagcagtcgtcgcaccccggttacgatcggcgaatc
gtcgatccccgaaacgtctctcatgaaccgcatcatcgctgatcgctacgaacattccggaactcggccacatcaact
cgttctaactcgacgcagcgttacgtttcgtcgagcacgggcatcaagcgaacttcggcttcggttccacaaact
ggccaggagcagcagccgaaggagtttcacccagtgctcattcccagctgcccgtgggggcccggagagccattatta
ccggcaggagcgtcgacgcctatctgttgcaagcggccatcaaatatggctgacgggtccgccaagaagcagcagcgtga
ccgaatatcacgcggacaaggacggcgtcgcggtgaccaccgccgagggcgagcgggttcaaccggccggtacatgatc
gactgcggaggaccggcgccgctggcgaccaagtccgggtccgcgaagagccgtgtcgttcaagacgcactc
gcgagcctctacacgcacatgctcggggtcaagccgttcgacgacatcttcaaggtcaaggggagcgcgtggcgt
ggcacaaggaacctgcaccacatgctcaccggcggtggctctgggtgatccgttcaacaaccaccggcgtcg
accaataacctggtgagcgtcggctcagctcgaccgcgctgtctaccgaaaaccgacatcccgcgcagcagga
gttcgacgagttcctcgcgcggttcccagacatcggcgctcagttccgggacccgtgccagtgcgcgactgggtca
agaccgaccgctcagttctcgtcgaacgcctgctcggcgaccgctactgctgatgctgcaocgcaacgggttc
atcgacccgctcttcccgggggtcgaaaaaccgcggtgacctccacgcgctcgcggcgcctcatcaaggc
gctacgcgacgacgacttctccccgagcgttcgagtacatcgagcgcctcgagcaaaagcttttgaccacaacg
acgacttctcagctgctgctacacggcgttctcggacttcccctatgggacgcggttccaccggctgtggcggtc
ggcactatcctcgggcagttccggctggtgcaagccacgcgaggttttcgcgctcgcgacagggcgacctoga
tcacctcgacaacgacccgcgtacctcgggtacctgtgcgggacatggagcagtaactaccagttgttcaacgcagc
ccaaagccgaggtcgaggcgtgagcgcgggcacaagtgcggccgaggaggccgcttgcggttacgcgcctcatc
gacgaacgagacttcgccaagccgatgttcggcttcgggtactgcatcaccggggacaagccgcagctcaacaactc
gaagtacgcctgataccggcgatgaagctgatgtactggacgcaaacccgcgcgcccggcagaggtgaagaagtact
tcgactacaaccogatgttcgcgctgctcaaggcgtacatcaccaccgcctcggcttggtctgaagagacagctg
tggtcgcgatccacaatttgagaaa* *TAACACGTGTAAGTCGACTACTAGAAAAAACC* *CGCCCTGACAGGGCGG
GGTTTTTTTTCCATGGCGATTTAGGCAGATCTACTAGTCAGTCAATATGGGTTTGGCTGGAAGCGATGCCTCACCATT
ATT* *CATGCTGGTGATTTTAACTATCAGACTTGATCTATAGCGCTATACCGATCGACGCCAGAATCGCAGCCATT
CGGAGACAACCTGAAAAAAGAGCTTGCCACAGGAAACAGGAGGTACCGTACACAGGAAACA* *Aatgaacaacattcaatt
ggatcaagcgaacgtcaagaagcatccccgggggctacgacgcgaccacacgcgtggccgcgagctggtacgtcg
cgatgcgctcgaacggcctcagggacaagccgaaggagttgacgctttttggcgtccgtacgtggcggtggcgca*

*cgacggggcaggccgtggtgatggaccgccaactgctcgcaactggcgcgaaacctggctgacggggcgatcaagga
 cgggtgcatccagtgcccggttaccacctggcgctacgacgagcaaggcaagtgcgttcacatccccggccacagcg
 aggtggtgcccagctggagccggtgccacgcgcccgcgcccagccgacgcttgggtcaccaccgagcgataccggtac
 gtgtgggtctggtacggctccccgcagccgctgcacccgctgcccgaatcaccgcagccgacgtcgacaacggcga
 ctctcatgcacctgcacttcgcttcgagacgacgacggcggtcttcgaggatcgctcgagaactctacgacgcaacagc
 acgcaacccccgtgcaacggctcccgatctcggcctcgaactcaagctcttcgacgactggagccggtggccggag
 gttgagtgcgtggcccggggcgcgctggttcgggtgccgggatcgacttccacgtaaacccgctacttcggccccc
 cggcatgctgctcgccgctcggcctgacatgctcgacagtgacacctgcaactcgatggctaccgccgggtgcg
 tcatgaccgttgccctggacgacgacgtcaaatatacaactgctccagtgtgtgacaccggtgacgcaaggcaagaac
 atcatgcacatgctcatctcgatcaagaagtgggcgcgctcctgcgccgtgcgaccgacttcgtgctgttcgggct
 cgacaccagacaggcaggggtacgacgtcaaaatctggaacgggatgaaagcccagcggcgcgccgctacagca
 agtacgacaagctcgtgctcaagtaccgtgcgttctaccgcgctgggtcgaccggttcgcaagtgcgacgcttaag
 tggctgcatccacaatttgagaaa* *taaCTTAAGTAAGTCGACTAAAAAAAACCCGCCCTGACAGGGCGGGTTT*
 TTTT**ACTAGT**TCCGGAACAAGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGA
 TAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAAGTTGGGAA
 GCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGA
 CAGGAT**AGGA**TCGTTTCGCatgattgctgccaccgaaacaaagttcacgatttgctcgatgccagggcgcgat
 gtccgcatgcccgtgaactgcgcaactgctggggcagtttgctaccggtgtgaccgtgatcaccaccgcaccgc
 agacggccgcaacgtcgtgtgacggccaactgcttctcctcactgctcgctgtcaccggcgctggtgctctggagcc
 tggcagcacggcaccgagcctgaaggccttttgctcggcgagccacttcgccatcaacgtaactggcgcgccaccag
 caccacctgctcggagcagttcgacggcgagcagccgacaagttcgccggttagctcatctctatggcaagcggg
 agccccggtgctggacgatgtggtggcagtgctggtgtgccgcaacgtcaccagctacgagggcggtgaccacctga
 tcttcattggcgagatcgaaacaatccgctacagcggcgagaaacctggtcttccatgcaggccagtacggggg
 ctaggagcaatagacgaaaagcgtcctcaagcacgaataaTCCGGACTCGAG

RBS,

NdeI Schnittstelle

gene

Strep-tag

SacI Schnittstelle

LacO de Boer

RBS de Boer

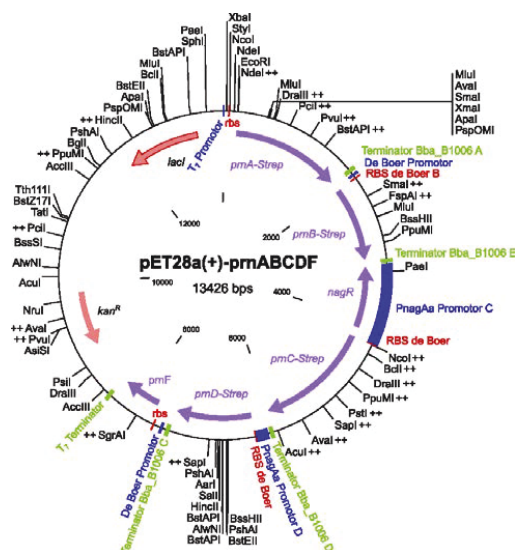
PnagAa Promotor/ (nagR)

NcoI

SpeI Schnittstelle

XhoI

Ptac



Chaetomium chiversii/*Floropilus chiversii* Radicol Halogenase **RadH** mit *Escherichia coli* K12 Flavinreductase **Fre**

GenBank: RadH (ACM42402.1), Fre (M61182.1)

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): RadH ($62715 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), Fre ($27055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Molekulargewicht: RadH (57.5 kDa), Fre (27.3 kDa)

11. pET28a(+)-RadH-His₆ (D465E;T501S)_Fre-His₆:

Aminosäuresequenz:

RadH-His₆ (D465E_T501S):

MGSIPKSCEVLVAGGGPAGSYAASALAREGVDVLLLEADKHPRYHIGESMLPSIRPLRFIDLEETFEKHGFQKKLGA
AAFKLTAKREGYTDVFAAHGPNGYSWNVVRSSEDELLEFKHAAKSGALTFQGVKVDLSLEFEPYDSDFPSSGGKVANPGR
PVAARWSAKDGRSGTISFQYLVDATGRAGITSTKYLKNRKFNEGLKNLAIWGYKARPWAEGTPRENQPYFEGMRD
GAGWCWTIPLHNGTVSVGAVLRSDLFFAKKSLGEDVTNAMIMAECMKLCPTIKELLEPAELVSDIKQATDYSYSAS
AYAGPYFRIVGDAGCFIDPFFSSGHHLAMAGALAAAVSIRASMKGDCSEYEASNWHARKVDEGYTLFLVVMAALKQ
IRMQEPEVLSIDIDDDGFDRAFQFLKPVIQSSGSAEIVKRFTKKEVSEIDFAVLALDNMAGAGEHANETNGSNGTGE
TNGEAKTLENIITVEDEKVLGIRILAKVAPSADMKDLEGS AIDGFMPRLEHGHGLNLRVTS **HHHHHH**

Fre-His₆:

MTTLSCKVTSVEAITDVTYRVRIVPDAAFSFRAGQYLMVVMDERDKRPFMSASTPDEKGFIELHIGASEINLYAKAV
MDRILKDHQIVVDIPHGAEAWLRDDEERPMILIAAGTGFSYARSILLTALARNPNRDIRITYWGGREEQHLYDLCELEA
LSLKHPGLQVVPVVEQPEAGWRGRGTGTVLTAVLQDHGTLAEHDIYIAGRFEAKIARDLFCSEARNAREDRFLFGDAFA
FIEL **HHHHHH**

Gensequenz mit His-tag:

TAAG**AAGGAG**ATATACCCatggaagcattccgaaaagctgcgaagtgctggtggcggcgccgcccggcgag
ctatgcccgcagcgcgctggcgcgcaagggcgtggtatggtgctgctggaagcggataaacatccgcgctatcata
ttggcgaagcatgctgcccagcattcgcccgctgctgcgctttattgatctggaagaaacctttgaaaaatggc
tttcagaaaaaactggcgcgcgcttttaactgaccgcgaaacgcgaaggctataccgattttgtggcgcgcatgg
cccgaacggctatagctggaacgtggtgcgagcgaagcgcgtaactgctgtttaaacatgcccgcgaaaagcggc
cgctgacctttcagggcgtgaaagtggatagcctggaattttgaaccgatgatagcgcgattttccgagcggcgcaaa
gtggcgaacccgggcccggcggcgctggagcgcgaaagatggccgcagcggcaccattagctttcagta
tctggtgcatgacccggcgcgcgccgattaccagacccaaatatctgaaaaaccgcaaatttaacgaaggcctga
aaaacctggcgatttggggctattataaaggcgcgcgccctggtggcggaaggcaccggcgcaaaaccagccgctat
tttgaaggcatgcccgatggcgcgggcgtggtgctggaccattccgctgcataaacggcaccgctgagcgtggcgcggt

gctgcgagcgatctgttttttgcgaaaaaaaaagcctggcggaagatgtgaccaacgcgatgattatggcggaa
gcatgaaactgtgcccaccattaaagaactgctggaaccggcggaactggtgagcgatattaaacagggcagccgat
tatagctatagcgcgagcgcgtatgctggggcccgatatttctgcattgtggcgatgctgggctgctttatgatccgtt
ttttagcagcggccatcatctggcgatggcgggcgcgctggcgggcgcggtgagcattcgcgcgagcatgaaagggc
atgacagcgaatatgaagcgagcaactggcatgctgcgcaaaagtggatgaagctataccctgtttctgctggtggtg
atggcggcgctgaaacagattcgcatgcaggaagaaccggctgctgagcgatattgatgatgatggctttgatcgccg
gtttcagtttctgaaaccgggtgattcagggcagcggcagcgcgaaatgtgaaacgctttacccaaaaagaagtga
cgaaagcgattgattttgctgctgctggcgctggataacatggcgggcgcgggcgaacatcggaacgaaaccaacggc
agcaacggcaccggcgaaaccaacggc**Pa**gcgaaaaaccctgaaaaacattaccgtggaagatgaaaaagtgtgag
cgcatctgcatttctggcgaaagtggcgccgagcgggatatgaaagatctggaaggc**GGC**gcgattgatggcttta
tgccgcgctggaacatggccatctggcctgaaccgctgactagt**catcaccaccatcaccat**taa**ACTAGT**TAA
CCATGGGCTAGCGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGG
TTTTTGTCTGAAAGGAGGAACATATATCCGGATTGGCGAAGGATCGAGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCA
CTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAG**AAGGAG**ATATACCCT
TGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGCGCAGCAAGCTT**CTCGAG**atgacaacc
ttaagctgtaaagtgacctcggtagaagctatcacggataccgtataatcgtgtccgcatcgtgccagacgcgccctt
ttcttttctgctgctggtcagtatttgatggtagtgatggatgagcgcgacaaacgtccgtttctcaatggcttcgacgc
cggtgaaaaagggtttatcgagctgcataatggcgcttctgaaatcaacctttacgcgaaagcagtcattggaccgc
atcctcaaagatcatcaaatcgtggtcgacatccccacggagaagcgtggctgcgcatgatgaagagcgtccgat
gattttgattgccccggcaccgggttctcttatgcccgcctcgattttgctgacagcgttggcggtaacccaaacc
gtgatatcaccatcttactggggcgcgctgaagagcagcatctgtagatctctgagcgttgaggcgcttctgctg
aagcatcctggtctgcaagtggctgcccgtggttgaacaaccggaagcgggctggcgtggcgctactggcaccgtgtt
aacggcggatgacagatcacggtagcctggcagagcatgatattctatattgccgacgttttgagatggcgaaaa
ttgcccgcatctgttttgacgtgagcgtaatgcccgggaagatcgctggtttggcgatgctttgcatttatcgag
ctc**caccaccatcatcaccat**tga**GAGCTC**TGA**CTCGAG**CAC

RBS, NcoI Schnittstelle, **gene**, **His-tag**, **SpeI Schnittstelle**, **XhoI Schnittstelle**,

SacI Schnittstelle, **Mutationsstellen**, getauschte Linker-Sequenz:

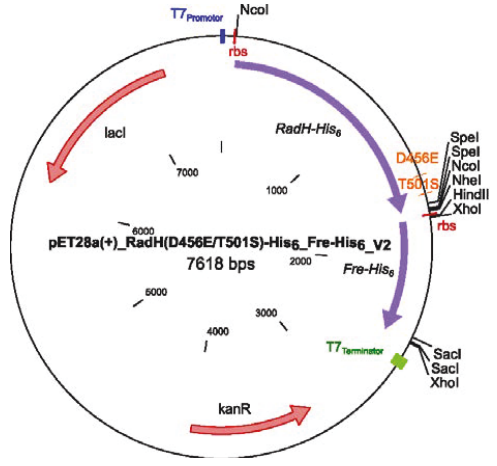
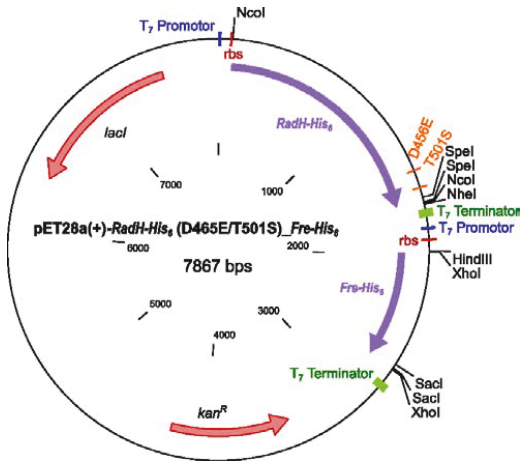
11. pET28a(+)-RadH-His₆ (D465E;T501S)_Fre-His₆:

catcaccaccatcaccattaa**ACTAGT**TAACCATGGGCTAGCGCTGC**TGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAAC**
CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGTCTGAAAGGAGGAACATATCCGGATTGGCGAAGGATCGAG
ATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATT
TTGTTTAACTTTAAG**AAGGAG**ATATACCCTTGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCC
CGCGGCAGCAAGCTT**CTCGAG**atg

12. pET28a(+)-RadH-His₆ (D465E;T501S)_Fre-His₆_V2:

catcaccaccatcaccattaa**ACTAGT**TAACCATGGGCTAGCGCTGCAACTTTAAG**AAGGAG**ATATACAAGCTT**CTC**
GAGatg

entfernter Bereich



Im Folgenden finden sich die Sequenzen der beiden putativen Halogenasen.

Pseudoalteromonas gelatinilytica strain NH153 NH153_S23 putative Halogenase **NH153**

GenBank: Genom (LRRU01000023.1) Bereich 253875...255116 (komplementär)

NCBI Reference Sequence: WP_063707674.1

Organismus-Informationen^[375]: [Pseudoalteromonas gelatinilytica NH153 | Type strain | DSM 100951, CGMCC 1.15370 | BacDiveID:132999 \(dsmz.de\)](#)

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): $51130 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Molekulargewicht: 47.3 kDa

13. pET28a(+)-NH153-His₆:

Aminosäuresequenz:

MGNNQVQQADVVIIGAGPSGAVAASLLVKKGWHVVVLEQQTFPRFSIGESLLPQCMSFLAEAGLEQAVQTQAQSLGFQFKNGAAFQRRGDHTTIDFTEKFSEGGTTFQVKRADFDKCLADGAMQQGAEIRYQHSVLAFTDCEDEGALLEVTDENQQGYQIKGRFVLDASGFGRVLPRLLDLESANFPVRWAFFSHFKDNISDTQFDREKILINVHPEHKDIWYWLIPFSDGTASIGVVGKPEQLEDKQPLAGLNEFIEQDSYLSSELLANREAIGEARAIKGYSANVSSLYGEHFALLGNAGEFLDPVFSSGVTIALKSASLVAPLVDSYLRGEQVDFKNDYSEPLQQGVNCFRTYVSAWYDGSFQDVIIFYSEKNQQVREMISAILAGYAWDLQNPVFKQSNKRLNLTLEVELCRDELELHHHHHH

Gensequenz mit His-tag:

AG**AAGGAG**ATATACCC**atggg**caacaaccaggtgcagcaggccgacgtggtgatcatcggcgcggcccgctcggggccgctggccgcctcgcctgctgctggtgaagaaggcctggcagctggtgctggaacagcagacctcccgcgcttctcgtatcggcgaatcgctgctgcccagtgcatgtcgcttccctggcgaagccggcctggaacaggccgctgcagaccaggccagtcgctggcttccagttcaagaacggcggcggccttccagcggcggcgaccacaccacctcgaacttcaaccgaaaagtctcgggaaggcccgaccaccttccaggtgaagcggcggcggcacttcgacaagtgctggccgacggcggcctatgcagcaggcggcggcgaatccgctaccagcactcggctgctggccttcaaccgactgcgaagacggcggcctgctggaagtgaaccgacgaaaaccagcagggtaccagatcaaggccgcttctgctgctggaagcctcgggcttccggccgctgctgcccgcgctgctggacctggaatcggcctcgaacttcccggctgctggtggccttcttctcgcacttcaaggacaacatctcggacacccagctcgaccggcgaagaatcctgatcaacgtgcacccggaacacaaggacatctgggtactggctgatcccgttctcggacggcaccggcctcgatcggcgtggtggcgaagccggacagctggaagacaagcagccgctggccggcctgaaacgagttcatcgaacaggactcgtacctgctcggaaactgctggccaaccggcgaagccatcggcgaagcccgccatcaagggtactcggccaacgtgtcgtcgtgtgacggcgaacacttcgcccctgctgggcaacggcggcgaatcctggaccgggttctcgtcggcggcgtgaccatcgccctgaagtcggcctcgcctggtggccccgcctggtggaactcgtacctgcccggcgaacaggtggacttcaagaacgactactcggaaccgctgcagcagggcgtgaaactgcttccgc

acctacgtgtcggcctggtacgacggctcgttccaggacgtgatcttctactcggaaaagaaccagcaggtgcgcga
aatgatctcggccatcctggccggctacgcctgggacctgcagaaccggtctcgtgaagcagtcgaacaagcgctga
acacctggtggaactgtgcccgcgacGAGCTCGAGCTCcaaccaccatcaccactgaGAGCTCTGACTCGAGCAC
C

RBS, NcoI Schnittstelle, *gen*, **SacI Schnittstelle**, **XhoI Schnittstelle**, **His-tag**, **Start- und Stopp-Codon**

Pseudoalteromonas sp. NC201 putative Halogenase **NC201**

GenBank: AUJ68809.1, Genom^[376] (CP022522.1) Bereich 546120...547736 (komplementär)

NCBI Reference Sequence: WP_010605841.1 (Sequenzidentisch zu Gen aus *Pseudoalteromonas flavipulchra* (GenBank: Genom: NZ_JH650743.1))

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): 89520 M⁻¹ cm⁻¹

Molekulargewicht: 62.9 kDa

14. pET28a(+)-NC201-His₆:

Aminosäuresequenz:

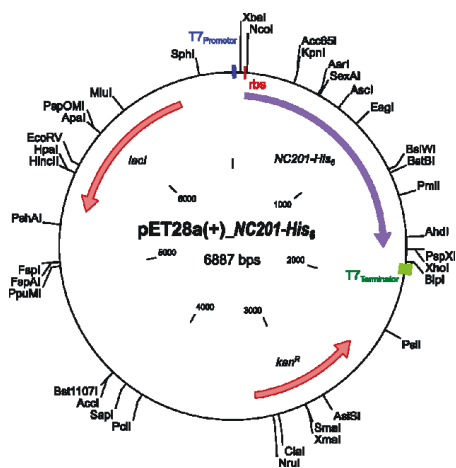
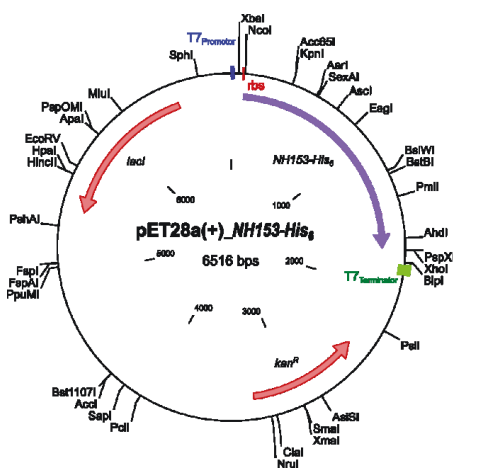
MGVSQYADVLIIGGSMAGACLARQLKLAHPDMKITVIERKQAFNSWVGESTLESFWDYMANDLKLGFYLETNHLYKH
GLRFYFDSNDRDLSVEELSELGRSWYHGIPAHQIDREKFDNDMVQFNRELGDVVMGTTVNEISLDAQQGHTVVTSS
GSTYTCRYLVDASGFNSPLGKQLGLIESQNDRHVPSSYWGRFKHIELIDHLGSEDEWRARSNFTSRALATNHFMKYGY
WIWLIPLNQDTFSIGITAKNNEVNLNIRSAAEFEQFLRSHQALNEILGQHAELLDYTSMKRLSRKAKQSFSTERWFL
TGMSSAFLDPLSPGSAYLTDANRMIGELIEADIAEDAIEVFAKTKAFNAYLLSWYESFMLHITGNYHGSYEVHKTH
FEALLMHWFILPSSMSRRYGYCPSLHGMSQDEVNQKAIAMIENAAIARIHVLKDEFIQLIKGYEYRYNRGHFFDI
ELTRQRMKHAHTRGAMLDAAIAELDHALLEVTYQGFRLSLCEIQKVFDEEKMPMVVQAAIEDKLSLTHAMQLFHI
ELHHHHHH

Genesequenz mit His-tag:

TAA**GAAGGAG**ATATACCC**atg**ggcgtgtcgcagtacccgacgtgctgatcatcggcggctcgatggccggcgctc
cctggccccgcagctgaagctggcccaccggacatgaagatcacctgatcgaacgcaagcagccttcaactcgt
gggtggcggaatcgaccctggaatcgttctcgggactacatggccaacgacctgaagctgggcttctacctggaacc
aaccacctgtacaagcagggcctgcgcttctacttcgactcggacaaccgcgacctgtcgggtggaagaactgtcggg
actggccgctcgtggtaccacggcatcccggcccaccagatcgaccgcaaaagttcgacaacgacatggtgcagt
tcaaccggaactggcgctggacgtggtgatggcaccacctgaacgaaatctcgtggagcccagcagggccac
accgtggtgacctcgtcgggctcgacctacacctgcccctacctggtggacgcctcgggcttcaactcgccgctggg
caagcagctgggctgatcgaatcgagaacgaccgccaccgggtgtcgtcgtactggggcgcttcaagcacatcg

aactgatcgaccacctgggctcggagcaatggcgcgcccgctcgaacttcacctcgcgcgccctggccaccaaccac
 ttcatgtacaagggtactggatctggctgatcccgcgaaccaggacacctctctcgatcggcatcacccgcaagaa
 caacgaagtgaacctgaacatccgcctcggccgaagaatttgaacagttcctcgcgctcgcaccaggccctgaacgaaa
 tcttgggccagcagcgcgaactgctggactacacctcgatgaagcgctgtcgcgcaaggccaagcagctggtctctc
 accgaacgctggttctcgtaccggcatgtcgtcggccttcttgaccgctgctgctgcgcccggctcggcctacctgac
 cgacgccaaccgcgatgatcggcgaactgatcgaagccgacatcgccgaagacgcccgaagtgttcgcccggaagacca
 aggccttcaacgcctacctgtcgtcgttgatcgaatcgttcatgctgcacatcaccggcaactaccaaggctcgtac
 gaagtgcacaagaccacttcgaagccctgctgatgcactggttcggcttcatctcctcgcctcgtcgtatgctcgcgcg
 ctacggctactgccctcgtcgcacggcatgtcgcaggacgaagtgaaccagaaggccatcgccatgatcgaaaacg
 ccgccatcgcccgcatcccagtgctgaaggcgaatttatccagctgatcaagggtactgaataaccgtataaccgc
 ggccacttctcgcacatcgaactgaccgccagcgcatgaagcagccacaccgcggcgccatgctggacgagc
 cgccatcgccgaactggaccagccctgctggaagtgcctaccagggttctcgcgctcgtcgtcgcgaaatccaga
 aggtggacttcgacgaaagaaagatgccgatggtggtgcaggcccatcgaagacaagctgtcgtgacccacgpc
 atgcagctgttccacatcgagctcaccaccatcatcaccactgaGAGCTCTGACTCGAGCAC

RBS, NcoI Schnittstelle, *gen*, SacI Schnittstelle, XhoI Schnittstelle, His-tag, Start- und Stop-Codon



Die folgenden Sequenzen definieren den Versuch eines chimären Enzyms aus Teilen von NH153 und PrnC, genannt **NHprnC**.

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): $65695 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Molekulargewicht: 60.9 kDa

15. pET28a(+)-NHprnC-His:

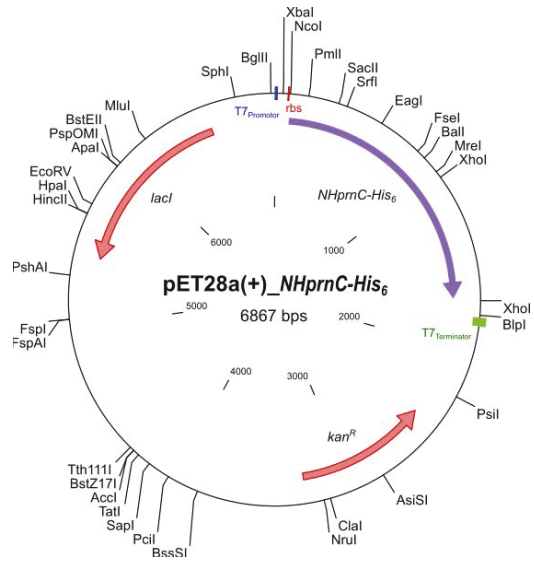
Aminosäuresequenz:

MGNNQVQQADVVIIGAGPSGAVAASLLVKKGWHVVVLEQQTFPRFSIGESLLPQCMSFLAEAGLEQAVQTQAQSLGF
QFKNGAAFQRRGDHTTIDFTEKFSEGGTTFQVKRADFDKCLADGAMQQGAEIRYQHSVLAFTDCEDGALLEVTDEN
QQGYQIKGRVLDASGFGRVLPRLLDLESASNFVWRWAFFSHFKDNISDTQFDREKILINVHPEHKDIWYWLIPFSD
GTASIGVVGKPEQLEDKQPLAGLNEFTEQDSYLSELLANREAIGEARAIKGYSANVSSLYGEHFALLGNAGEFLDPV
FSSGLENTAVTIHALAARLIKALRDDDFSPERFEYIERLQQKLLDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHRLWAVGTIL
GQFRLVQAHARFRASRDEGLDHLNDPYPYLYLCADEMYQYQLFNDAKAEVEAVSAGHKSAEBAALRIHALIDERD
FAKPMFGFGYCI TGDKPQLNNSKYS LI PAMKLMYWTQTRAPAEVKKYFDYNPMPFALLKAYITTRIGLALKKELHHHH
HH

Genesequenz mit His-tag:

AG**AAGGAG**ATATACC**atgggcaacaaccaggtgcagcaggccgacgtggtgatcatcgggcgcggcccgctcgggc**
ccgtggccgcctcgctgctggtgaagaagggctggcagctggtggtgctggaacagcagacctcccgcgcttctcg
atcggcgaatcgctgctgccgagtgcatgtcgcttccctggcgaagccggcctggaaacaggccgtgcagaccaggc
ccagtcgctgggcttccagattcaagaacggcgcgccttccagcgcggcggaaccacacccatcgacttcaccg
aaaagtctcggaaagcccgccaccaccttccaggtgaagcgcgcgacttcgacaagtgctggccgacggcgcc
atgcagcagggcgccgaaatccgctaccagcactcggtgctggccttaccgactgcgaagacggcgccctgtgga
agtgaaccgacgaaaaccagcagggctaccagatcaaggccgcttctgtgctggacgcctcgggcttcggccgctgtc
tgccgcgctgctggacctggaatcgccctcgaactcccgtgctggccttcttctcgcacttcaaggacaac
atctcggacacccagttcgaccgcgaaaagatcctgatcaacgtgcaccggaaacacaaggacatctggtactggct
gatcccgttctcggacggcaccgcctcgatcggcgtggtggcaagccggaacagctggaagacaagcagccgctgg
ccggcctgaacgagttcatcgaacaggactcgtacctgtcggactgctggcaaccggaagccatcgccgaagcc
cgcgccatcaagggtactcggccaaacgtgtcgtcgtgacggcgaacacttcgacctgctgggcaacgcccggca
gttccctgacccgggttctcgtcgggctcgcgagaaacccgcggtgacctcaacgcgctcgcggcgccgctcatca
aggcgtctacgcgacgacgacttctcccgcgagcgttctcgagtacatcgagcgctgcagcaaaagcttttgaccac
aacgacgacttctgtagctgctgctacacggcgttctcggacttccgcctatgggacgcggttccaccggctgtggc
ggtcggcactatcctcgggacgttccggctggtgcaagcccacgcgaggtttcgcgctcgcgcgacgagggcgacc
tcgatcaacctcgacaacgaccgcccactcctcgggtacctgtgcgcggacatggagcagtaactaccagttgttcaac
gacgccc aaagccgaggtcgaggtgtgagcgcggggcacaagtcggccgaggaggccgcttgcggattcacgccct
catcgacgaacgagacttccgcaagccgatgttcggcttcgggtactgcatcaccggggacaagccgagctcaaca
actcgaagtacagcctgataccggcagatgaagctgtactggacgcaaacccgcgcgcccggcagaggtgaagaag
tacttgcactacaaccgatgttcgcgctgctcaaggcgtacatcaccaccgcatcggcctggcgtgaagaagGA
GCTC**caccaccatcatcaccad****tgaGAGCTC**TG**ACTCGAG**CAC

RBS, NcoI Schnittstelle, *gen*, **SacI Schnittstelle**, **XhoI Schnittstelle**, **His-tag**, **Start- und Stopp-Codon**, NH153 Sequenz, PrnC Sequenz



Escherichia coli (K12) FMN Reduktase (NADPH) **SsuE**

GenBank: LC388000.1

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy: 21430 M⁻¹ cm⁻¹

Molekulargewicht: 22.3 kDa

16. pGEB-ssuE-His₆:

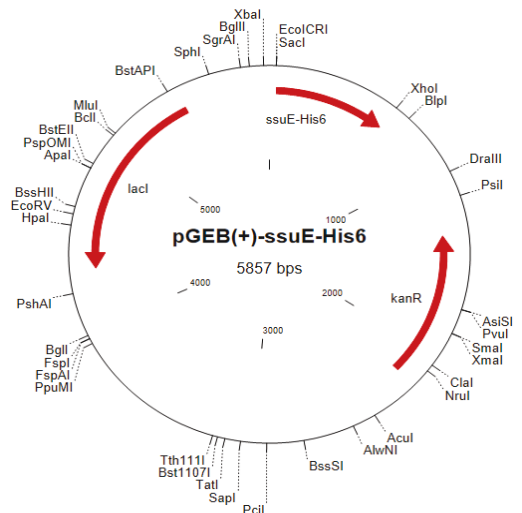
Aminosäuresequenz:

MRVITLAGSPRFPSPRSSSLLEYAREKLNGLDVEVYHWNLQNFAPEDLLYARFDSPALKTFTEQLQQADGLIVATPVY
 KAAYSALKTLDDLPERALQKVVLPATGGTVVAHLLAVDYALKPVLSALKAQEILHGVFADDSQVIDYHHRPQFT
 PNLQTRLDTALETFWQALHRRDVQVPDLLSLRGNAAHV**HHHHHH**

Genesequenz:

aaggagATATAACCCGTCGCGGATCCGAATTC**GAGCTC**atgcggtgtcatcacccctggcgggtagtcctcgctttcctt
 ctcgctccagctccttgcggaaatgcgcgggaaaaactaaatggcctggatgtagaggtttatcactggaatctg
 caaaaattcgccccggaagatctactttatgctcgtttcgatagtcgagcactcaagaccttcaccgaacagctgca
 acaggccgatgggctgatgtgcgccacgcctgtgataaaagccgcctattccggctgcgttgaaaacctgctcgacc
 tgctgcccagaacgcgctttgcaaggcaaagtgggtgctaccgctggcgacgggcggtaaccgtggcccatctgctggcg
 gtcgatgatgcccctaaaccagttttaagcgcaactgaaagctcaggagatcctgcacggcgtgtttgccgatgactc
 acaagtaattgattaccatcacagacccagttcacgcaaatctgcaaacccgctcttgataccgcgctagaaaactt
 tctggcaggcatatgcaccgcgcgatgttcagggtcctgacacctctgtctctgcgaggtaatgcccatgcgcacgtg
CACCACCACCACCACCACtaaCTCGAG

Ribosombindestelle (RBS), Start- und
Stopp-Codon, **HIS-TAG**, Schnittstellen



17. pGEB-prnABCDF:

DNA-Sequenz (im Vector pGEB):

TAAG**AAGGAG**ATATACCCGTCGCGGATCCGAATT**CATa**tgaaacaagccaatcaagaatatcgatcatcgtggcgccg
 gcaccgcggttgatggccgcttcgtacctcgtccggcgctccaacagcaggtaaacatcacgctcatcgagtct
 cgccgatccccggatcgccgtggcgaggcgaccatcccagatttcgagaagggtgttcttcgacttctccgggat
 accggagcgggagtgatgccccaaagtgaacggcgccctcaaggcccgcatcaagttcgtgaactggagaaaaatctc
 ccgaccatcgcggaagattacttctaccatttggctcggcagcgtgccgaactgcgacggcgctgcccgttaccac
 tactggctgcgcaagcggaacagggtctccagcaaccgatggcgtacgcgtgctaccgcagcccgggcccctcga
 cggcaagctggcacttgctggccgacggcaccgccagatgtcccacgcgtggcacttcgacgcgcacctgggtg
 ccgacttcttgaagcgtggccgctcgagcgggggtgaatcgcggtgctgcagaggtcgtggaggttcaactgac
 gaccgcgctacatctccaccctgttaaccaaggaagggcgagcgtggaggggacctgttcatcgactgctccgg
 catgaggggtcctgatcaatcaggccctgaaggaacccttcatcgacatgtccgactacctgctgtgcaacgagc
 cggctgccagcggctgcccacgacgacgcgcgaggggtcgagccgtacacctccgcaattgccatgaactcg
 ggatggacctggaagattccgatgctgggcccgttcggcagcggctacgtcttctccagcaagttcaactcgcgca
 ccaggccaccgcaacttctcaaacctctggggcctctcggacaatcagcagctcaaccagatcaagttccgggtcg
 ggccaacaagcggcggtgggtcaacaactgcgtctcgatcgggctgctcgtcgtgcttcttgagcccctggaatcg
 acgggaatctacttcatctacggcgctttaccaactcgtgaagcacttccccgacacctcgttcgaccgcgggtt
 gcgcgacgcatcaacgcgcgagatcgtctacatgctcgacgactgccgagacttctccaggcgaactatctacta
 cgtcgcggaagacacggcgttctggctcgcgaaccggcacgaactcgggctctcggacgccatccaggagaaggtt
 gagcgtacaaggccgggtgccactgaccaccctcgttcgacgattccacgtaactcagagcgttcgactacga
 gttcaagaacttctggttgaacggcaactactactgcatcttggccgctgggcatgctgcccagaccggtcgtg
 cgctcctgcagcaccgacggagtcgatccagaagcgaagcagatgttcgccagcatccggcgcgaagcgcagc
 ctgcccagcagcctcgcgacgaactacgactacctgcggtcactgcgtgacggcgagctgctcgcgcaaccagca
 cggccgacgctcgcggcgaggaacgcgcagcagcgtg**ggctcgcatccacaatttgagaaa**taaCACGTGTAAGTCG
 ACTACTAGAAAAAAAAAACCCCGCCCTGACAGGGCGGGTTTTTT**CATATG**CGATTAGCGCAAAGCTT**GAGCTC**
 CAGCTT**TGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG**TGTGG**AATTGTGAGCGGATAACAAT**TCACAC**AGGA**AACAat
 ggaacgcaccttgaaacgggtatccgcatctcgggcccacacacgctgcccgtggcgccctgcgactccgctacagggac
 gcgcgctggttctgcagctgcccgcctgaaaccgtgacaaggacgtgcccgcgcatcgtcggcctgctgcgcgattt
 ctcccggtagcggcgtgccctccagctgggcttcgtcgaagccgcgcccgcgcatcgggacatcggtttcttct
 ggggtcgtcaagcggcagcggacatgagcccgtggacctggtgccgggcttgaacgggtgctgctcgacctggcac
 gggtagaccacttgcccgcgagacactcctgatgtgacggtctggaacccggcggcgccgatgcccagcgg
 agctacaccgggtgcccgcgaagcgcacctgctcgaagcgtgcccacatctcgatggcggcctcgaagcggccat
 cgggtgaccgtcgagctgtccgatgtatccctgcgctcggccgcttcgcccgaaggtgagctgagctggaagcct
 acctgcagaaaatggtcgaatcgatcgtctacgcgtaccgcttcatctcggcccaggtcttctacgatgagctggc
 ccttctacgaaccgattcgagtcggggccagagctacctcggcccggcgcgtagaatgccctcttctgctgct
 ggagcacgctcctggtgggctcgaatcggacgaccagcgtatcgagagttcaagagacgtaacctgcctacgtgc
 tcccgcgtacagggcgttctacgctcgggttcgccacagagcggcctcatcgaccgcgctcgaagggcgca
 gcggcgggtacgcagggcagcagctcgggctgggctgacggccctcgaacgggtcttcaaggtcctgctgcgctt
 ccgggcgctcacctcaaatggcgagcgggcatacgaagcgggcgagcggccccacaaacgggaagcgggggt
 acgcccagcatgctcgggatctactcacgctcaactgtgccgcccgggtcccgcacccgcccgcgctcgatgaa
 tcccttaagt**gtcgcatccacaatttgagaaa**taaCTTAAGTAAGTCGACTACTAGAAAAAAAAAACCCCGCCCTG
 ACAGGGCGGGTTTTTTT**GAGCTC**GCTAGCAATTTACGGTCAGTCAATATGGGTTTGTCTGGAAGC**TATGCTTCAG**
AGAAAAGCTCGACGAACAACTGACGTAGCCACATGTTGCCCGGATCCCGGTTGTACTTGGCATGCCAAAACAGGTTG
ATGGCGATGTCGGGCAGCTTGGCCGGGTGCGGGGATGTCGTGACACAAAAGGCAATTTGCAGCGAACGGCAAACG
CTGCGGCACGGTCGCATGAGGTCGGTGTGTGCAGAATGGGGCCGATCGCAATGAAATGCGGCACCACCAGCCGCA
TGCGCCTTTTGATGCTTGCAGCTTGCAGCAGCCATCGACCTCACCGTGTCCGGTGTGAGTGCAGACCAGCCGACA

TGGTCCAGTTCACTGAACTGTTTCAGGCTCATGGGGGATTTGGCGCTTGGATGGTCCCTTGCAGAACATGCATACGTA
CGGGTCGCGAAAGAGGCGCCGCTGGAAGAATCCGGTCTGTAGCTCTGGCAGAAGACCCAAGGCGAGATCAACCGCAC
CGGACTCCATATCCTCCTCAGATTGCCAGCATTTCGGGCGCAGCGTGTGATCTGGATGTGAGGAGCAGTTGCGCA
AGCGCTTCCATCAGTGGGGGCATGAAGTACATCTCGCCGATGTCGGTCATTGCCAAGTTGAAGGTGCGCGTGTGCGC
AAATGGGTGCGAAAGAGTACAGGGTTCAGTCCGCTTCGACGCGTGTGAGCGCATAGATCACGGGCTCCGCAAGAT
GCAGTGCATACGGTGTGCGCTCCATGCCTTTTGGAGTGCACAAGAACAATCGTCTTTAGCGCCGCACGCAGCCGT
TTAAGTGAATTGCTGACGGCAGGCTGCGTCAGCCCCAGTTTTCGCCGGCCGTCGATACGCTCCGGTCGAGCAGTAG
CTGGTTGAAGACCACAGCAGATTCAAGTCGATGTCGCGCAGATCCATGATGCCTCACCATTATTCATGCTGGTGAT
TTTAACTATCAGACTTGATCTATAGCGCTATACCGATCGACGCGCCAGAATCGCAGCCATTTCGGAGACAACCTGAAA
AAGAGCTTGCCACAGGAAACAGGAGGTACCGTCACACAGGAACAACCaaggcaactcagaagagccccggaacgga
cacgatagcaaccacttcagcgaatcatcctcggttcgggcatgtccggtaaccagatgggggccaatcctggccaa
acaacagtttcgctgctgatcatcagcagctcgtcgaccgctggttcacgatcggcgaatcgtcgatccccgaaa
cgtctctcatgaaccgcatcatcgtgatcgctacgacattcccgaactcggccacatcacctcgttctactcgagc
cagcgttacgtttcgtcgagcagggcatcaagcgcaacttcggcttcgtgttcacaaaacctggccaggagcacga
cccgaaggagttcacccagtcgctcattcccagctgcccgtgggggcccggagagccattattaccggcaggacgtcg
acgcctatctgttgcaagcgccatcaaatatgggtgcacggtccgccagaagacgagcgtgaccgaatatcacgcy
gacaaggacggcgtcgcggtgaccaccgcccagggcgagcgttcaccggccggtacatgatcgactcgggaggacc
cggcgcgcccgtggcgaccaagttcgggctccggaagagcgtgtcgcttcaagacgactcgcgacgctctaca
cgcacatgctcggggtcaagcgttcgacgacatctcaaggtcaaggggacgctggcgtggcacgaaggaaacc
ttgaccacatgttcacggcggtggtctcgggtgatccgttcaacaaccaaccgctcgaccaataacctggt
gagcgtcggcctgcagctcgaccgctgtctaccgaaaaccgacattcccgcgagcaggagttcgacgagttcc
tcgcyggttcccagcactcgctcaggttcgggacgcccgtgacgtgcygactgggtcaagaccgaccgctg
cagttctcgtcgaacgctcgtcggcgaccgctactgctgatgctgcacgcaacgggttcacgacccgctctt
ctcccggggctcgaaaacaccggtgaccatccacgctcgcgcygcccctcatcaaggcgtacgcygagcag
acttctccccgagcgttcgagtaacatcgagcgttcgacaaaagcttttggaccacaacgacgacttcgtcagc
tgctgctacacggcgttctcggacttcgcctatgggacgcttccaccggctgtggcggtcggcaatactcgg
gcagttccggctggtgcaagcccacgcgaggtttcgcgctcgcgcygagggcgacctcgatcacctcgacaacg
accgcccgtacctcgggtacctgtgcygagatggagcagtaactaccagttggtcaacgagccaaaagccgaggtc
gaggccgtgagcgcgggcacaagtccggcagggagccgcttgccgattcacgcccctcatcgacgaacgagactt
cgccaagccgatgttcgggttcgggtactgcatcaccggggacaagccgagctcaacaactcgaagtacagcctga
taccggcgatgaagctgatgtactgagcgaaccccgcgcccggcagaggtgaagaagtacttcgactacaacccg
atgttcgctgctcgaagcgtacatcacaccgctcggcttggctcgaagaagcagctgtggtcgcaccca
atttgagaaaTAACACGTGTAAGTCGACTACTAGAAAAAACCCTGACAGGGCGGGGTTTTTTTTCCAT
GGCGATTTAGGCAGATCTACTAGTCAGTCAATATGGGTTTGTCTGGAAGCGATGCCTCACCATTATTCATGCTGGTGA
TTTTAACTATCAGACTTGATCTATAGCGCTATACCGATCGACGCGCCAGAATCGCAGCCATTTCGGAGACAACCTGAAA
AAAGAGCTTGCCACAGGAAACAGGAGGTACCGTCACACAGGAACAAtgaacaacattcaattggatcaagcgaacg
tcaagaagcatccccggggcgtacgacgcygaccacgctggccgagctggtacgtcgatgcygctcgaac
ggcctcagggaacaagccgaaggagttgacgctttttggcctccgtacgtggcgtggcgcgacgcygagggcaggc
cgtggtgatggaccgcaactgctcgacactggcgcaacctgggtgacggcggtcaaggacgggtgcatccagt
gcccgtttcaccactggcgtacgacgagcaaggcaagtgcgttcacatccccggccaacgaggggtggtgcccag
ctggagccggtgccacgcygcccgcgacgagcgttgggtcaccaccgagcgatacggctacgtgtgggtctggtg
cggctccccgagccgctgcaccgctgcccgaatcaccgacgcccagctcgacaacggcgacttcatgacactgc
acttcgcttcgagacgacgacggcggtcttcgggatcgtcgagaacttctacgacgcaacgacgcaacccccgtg
cagcgcctcccgatctcggccttcgaactcaagctcttcgacgactggagccggtggccggaggttagtgcgtggc
ccgggcccggcgtggttcgggtgccgggatcgacttccacgtaaacgctacttcggccccctcggcatgctgtcgc
gcygctcggcctgaaacatgtcgagatgaacctgcaacttcgatggctacccggcggtgctcatgaccgttgc
ctggacgagcagctcaaatataaactgctccagtgtgtgacacgggtgagcgcaggaagaacatcatgcacatgct
catctcgatcaagaaggtggcgcgctcctgcgccgtgcgaccgacttcgtgctggtcgggctgcagaccagacag
cagcgggtgacagcgtcaaaaactcgaaacgggatgaagcccagcggcgggcgcgtacagcaagtacgacaagctc
gtgctcaagtaccgtgcttctaccggtgggtgcaccgtgctcgcgagtgagcagcttaagtgtcgcaccca

attgagaaataaCTTAAGTAAGTCGACTAAAAAAAAACCCCGCCCTGACAGGGCGGGTTTTTTTT**ACTAGT**TCC
 GGAACAAGGGAAAACGAAGCGCAAAGAGAAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGC
 GGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAA
 ACTGGATGGCTTCTTGC CGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGAT**AGGAT**CG
 TTTCG**atgattgctgccaccgaaacaaagt**tcacgattt**gctcgatgcccagggccgga**tgtccgcatgcccg
 tgaactgcgcaacgtgctgggcagttt**gctaccggtgtgaccgtgatcaccacccgaccgcagacggccgcaacg**
 tcgggtgtagcggcaactcgttctcctcactgctcgctgtcaccggcgctggtgctctggagcctggcaccgcacggca
 ccgagcctgaaggcctttt**gctcggcgagccacttcgccatcaacgta**ctggcgccaccgaccactcgtcggga
 gcagttcgcacgggcagcagccgacaagttcgcgggtgtagtcatctcctatggcaaggcgggagcccgggtgctgg
 acgatggtggcagtgctggtgtgcccgaacgtcaccagtagcagagggcggtgaccacctgatcttcaattggcgag
 atcgacaataccgctacagcggcgagaaccgctggtcttccatgcaggccagtaccgggggctagggagcaatag
 agcagaaagcgtcctcaagcagcaataaTCCG**ACTCGAG**

RBS,

NdeI Schnittstelle

gene

Strep-tag

SacI Schnittstelle

LacO de Boer

RBS de Boer

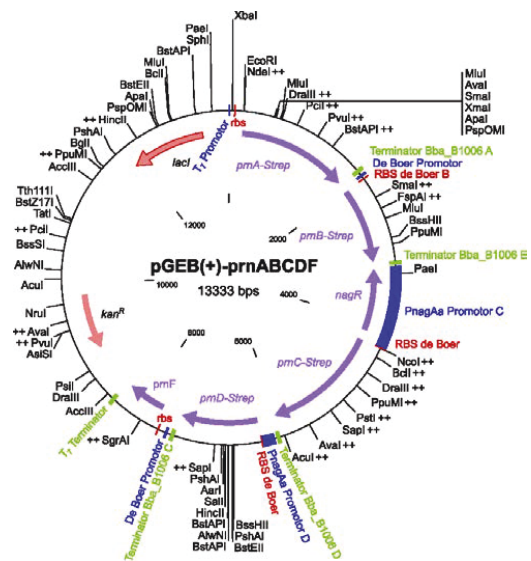
PnagAa Promotor/ (nagR)

NcoI

SpeI Schnittstelle

XhoI

Ptac



Pseudomonas protegens Pf-5 Pyoluteorin Carrier-Protein und Halogenase **PtlL und PtlA**

GenBank: PtlL (AAD24885.1), PtlA (AAD24884.1)

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expsy (oxidized): PtlL ($9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), PtlA ($59485 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Molekulargewicht: PtlL (10.1 kDa), PtlA (50.7 kDa)

18. pUC19-ptlL_ptlA:

Aminosäuresequenzen:

PtlL

MDGEEVKEKIRRYIMEDLIGPSAKEDELDDQTPLEWGI LNSMNIVKLMVYIRDGMGVSIPSTHITGKYFKDLNAIS
RTVEQLKAECA

PtlA

MSDHDYDVVIIGGGPAGSTMASYLAKAGVKCAVFEKELFEREHVGESLVPATTPVLEIGVMEKIEKANFPKKFGAA
WTSADSGPEDKMGFQGLDHDHFRSAEILFNERKQEGVDRDFTFHVDRGKFDRI LLEHAGSLGAKVFGVEIADVEFLS
PGNVI VNAKLGKRSVEIKAKMVVDASGRNVLLGRRLGLREKDPVFNQFAIHSWFDNFRKSATQSPDKVDYIFIHFL
PMTNTWVWQIPITETITSVGVVTQKQNYTNSDLTYEEFFWEAVKTRENLHDALKASEQVRPFKKEADYSYGMKEVCG
DSFVLIGDAARFVDPIFSSGSVALNSARIASGDIIEAVKNNDFSKSSFTHYEGMIRNGIKNWYEFITLYRNLILF
TAFVQDPRYRLDILQLLQGDVYSGKRLEVLDMKREIIAAVESDPEHLWHKYLGDMPVTPAKPAF

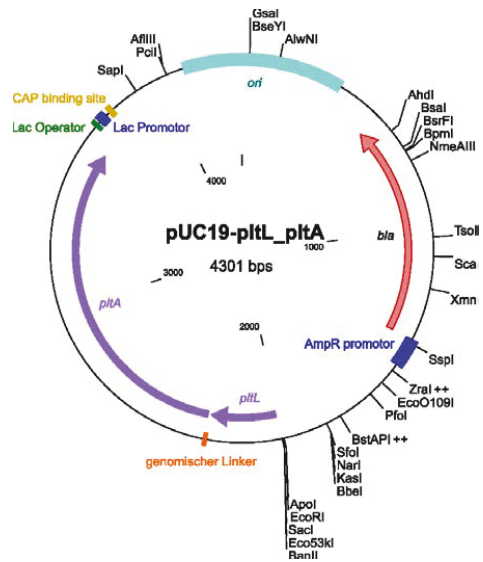
Gensequenz:

CGGCCAGTGAATTCGAGCTCatggacggagaggaagttaaagaaaagattcgtcgctacatcatggaagatttgatc
gggccaagtgcaaaggaagatgagcttgatgaccagactccactactggagtgggcattctcaactcgatgaatat
cgtcaagctcatgggtcatcatcagggatgaaatgggtgctcgtattccaagtaccatatacaccggaaaaatattta
aagacctgaatgcaatatccaggactgtcgagcaactaaaggccgagtgcgcttaaCAGGGAGTGGCAatgagcga
tcatgatattgatgtagtgattatcgggtggcggccggcggttcgaccatggcctcctacctggcaaaagccggtg
tcaaatgcgcggtgttcgaaaaagaactgttcgagcgcgagcatgttggcgagtcgctggtaccggccaactcctc
gtgctgctggaatcggggtgatggaagaatcgagaaagccaacttcccgaagaagtccggcgctgcctggacctc
ggcagattccggccccgaagacaagatgggcttccaggggtggaccacgatttccgctcggcggaatcctcttca
acgagcgaagcaggaaggggtcgatcggaacttcagttccacgtcgaccggcgaagttcgaccgcatctctctg
gagcagcaggttcgctggggccaaggtctccagggcgtggagatcgctgacgtcgagtttctcagcccgggcaa
tgtcatgtcaatgccaagctgggcaagcgcagcgtggagatcaaggccaagatgggtggtggtgccagcggctcgca
acgtgctgctggcccgcggtcgggttcgcgagaaaaggaccggctctcaaccagttcgcgattcaactcctggttc
gacaacttcgaccgcaagtcggcgacgcaaaagcccggacaaggtcgactacatcttcactcctcctgccgatgac
caatacctgggtctggcagatcccgatcaccgaaaccattaccagcgtggcggtggttacgcagaagcagaactaca
ccaactccgacctcacctatgaagagtctctctgggaagcgggtgaagaccgggaaaaacctgcatgacgcgctgaag
gcatcggagcaggtccgcccgttcaagaaaagggcgactacagctacggcatgaaaagaagtctgtggcgacagctt
cgtgctgatcggcgatgccgcacggttcgtcgaccgatcttctccagcggcgtcagcgttgcaactcaacagtgcgc

`gcatcgccagcggcgacatcatcgaggcgggtgaagaacaacgacttttagcaagtccagtttctactcactacgaaggc`
`atgatcaggaatggcatcaagaactggtatgagttcatcacgctctattaccgctgaacatcctcttcaccgcgtt`
`cgttcaagaccacgctaccgcctggacatcctgcaattgctgcaaggggacgctctacagcggcaagcgcttgaag`
`tgctggacaagatgcgcgaaatcatcgctgcggttgaagcgacccggaacacctctggcacaagtacctggggcgac`
`atgcaggttctaccgccaacccgcgttctaaTCTAGAGTCGACCTGCAGGC`

SacI Schnittstelle, Start- und Stopp-Codon, Gene, genomischer Linker,

XbaI Schnittstelle



22. pCC1-NH153(-Strep):

Aminosäuresequenzen:

MNNQVQQADVVIIGAGPSGAVAASLLVKKGWHVVVLEQQTFFRFSIGESLLPQCMSFLAEAGLEQAVQTQAQSLGFQ
FKNGAAFQRRGDHTTIDFTEKFSEGGPTTFQVKRADFDKCLADGAMQQGAEIRYQHSVLAFTDCEGDGALLEVTDENQ
QGYQIKGRFVLDASGFGRVLPRLLDLESANFPVRWAFFSHFKDNI SDTQFDREKILINVHPEHKDIWYWLIPFSDG
TASIGVVGKPEQLEDKQPLAGLNEFIEQDSYLSSELLANREAI GEARAIKGYSANVSSLYGEHFALLGNAGEFLDPVF
SSGVTIALKSASLVAPLVDSYLRGEQVDFKNDYSEPLQQGVNCFRTYVSAWYDGSFQDVIFYSEKNQQVREMISAIL
AGYAWDLQNPVFKQSNKRLNLTLEVELCRDEL

Genesequenz:

AATTGTGAGCGGATAACAATTTCACAC**AGGA**AACA**GAATTC****CATatg**aacaaccaggtgcagcaggccgacgtggtg
atcatcggcgccggcccgctcggcgccgctggccgcctcgctgctggtgaagaaggctggcacgtggtggtgctgga
acagcagaccttcccgcgcttctcgcagcggcgaaatcgctgctgccgcagtgcatgtcgttctcggccgaagccggcc
tggaacaggccgctgcagaccaggccagctcgtgggcttccagttcaagaacggcgccgccttccagcgcccgccg
gaccacaccacctcgcacttaccgaaaagtctcggaggccgggaccacacctccaggtgaagcgccgactt
cgacaagtgcctggccgacggcgccatgcagcaggcgccgaaatccgctaccagcactcggctgctggccttaccg
actgcaagacggcgccctgctggaagtgaccgacgaaaccagcagggtaccagatcaaggccgcttctgctgct
gacgctcgggcttccggcgcgctgctgcccgcctgctggacctggaatcggcctcgaacttcccggcgctggc
cttcttctcgcacttcaaggacaacatctcggacaccagttcgaccgcaaaagatcctgatcaacgtgcacccgg
aacacaaggacatctggtactggctgatcccgttctcggacggcaccgctcgcagcggctgggcaagccggaa
cagctggaagacaagcagccgctggccggcctgaacaggttcatcgaacaggactcgtacctgctggaactgctggc
caaccgcaagccatcggcgaagcccgcgccatcaagggtactcggccaacgtgctgctgctgacggcgaacact
tcgcccctgctgggcaacgcccggcaggttctcggaccgggtgttctcgtcggcgctgaccatcgccctgaagtggcc
tcgctggtggccccgctggtggactcgtacctcgcggcgcaacagggtggacttcaagaacgactactcggaaaccgct
gcagcagggcgtgaaactgcttccgcacctacgtgtcggcctggtacgacggctcgttccaggacgtgatcttctact
cgaaaaagaaccagcaggtgcgcgaaatgatctcggccatcctggccggctacgcctgggacctgcagaaccgctt
gtgaagcagtcgaacaagcgccctgaacaccctggtggaactgtgccgcgacgagctc**tgaTCTAGA****CTCGAGTGTCTC**
GCATCCACAATTGAGAAATAAGTCGACTACTAG

LacO de Boer, **RBS de Boer**, **EcoRI Schnittstelle**, **NdeI Schnittstelle**, **Start- und Stopp-**
Codon, **XbaI Schnittstelle**, **XhoI Schnittstelle**, **Strep-tag**, **Sall Schnittstelle**

23. pCC1-NC201(-Strep):

Aminosäuresequenzen:

MVSQYADVLI IGGSMAGACLARQLKLAHPDMKITVIERKQAFNSWVGESTLESFWDYMANDLKLGFYLETNHLKYG
 LRFYFSDNRDL SVEELSELGRSWYHGIPAHQIDREKFDNDMVQFNRELGVVVMGTTVNEISLDAQQGHTVVTSSG
 STYTCRYLVDASGFNSPLGKQLGLIESQNDRHPVSSYWGRFKHIELIDHLGSDEWRARSNFTSRALATNHFMYKGYW
 IWLIPLNQDTFSIGITAKNNEVNLNIRSABEEFEQFLRSHQALNEILGQHAELLDYTSMKRLSRKAKQSFSTERWFLT
 GMSSAFDPLPLSPGSAYLTDANRMIGELIEADIAEDAIEVFAKTKAFNAYLLSWYESFMLHITGNHYGSYEVHKTHF
 EALLMHWFGLFILPSSMSRRYGYCPSLHGMSQDEVNQAIAMIENAAIARIHV LKDEFIQLIKGYEYRNRGHFFDIE
 LTRQRMKHAHTRGAMLDDAAIAELDHALLEVTYQGFRLSLCEIQKVD FDEEKMPMVVQAAIEDKLSLTHAMQLFHIE
 L

Genesequenz:

AATTTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAACA GAATTC CATatg GTGTGCAGTACGCCGACGTGCTGATCATC
GGCGGCTCGATGGCCGGCCCTGCCTGGCCCGCCAGCTGAAGCTGGCCACCCGGACATGAAGATCACCGTGATCGA
ACGCAAGCAGGCCTTCAACTCGTGGGTGGGGCAATCGACCCTGGAATCGTTCTGGGACTACATGGCCAACGACCTGA
AGCTGGGCTTCTACCTGGAACAACACCTGTACAAGCACGGCCTGCGCTTCTACTTCGACTCGGACAACCCGGAC
CTGTCCGTGGAAGAACTGTTCGGAAGTGGCCGCTCGTGGTACCACGGCATCCCGGCCACCAGATCGACCCGCAAAA
GTTTCGACAACGACATGGTGCAGTTCAACCCGCAACTGGGCGTGGACGTGGTGATGGGCACCACCGTGAACGAAATCT
CGCTGGACGCCAGCAGGGCCACACCGTGGTACCTCGTGGGCTCGACCTACACCTGCCGCTACCTGGTGGACGCC
TCGGGCTTCAACTCGCCGCTGGGCAAGCAGTGGGCTGATCGAATCGCAGAACGACCCGCCACCCGGTGTGTCGTA
CTGGGGCCGCTTCAAGCACATCGAACTGATCGACCACCTGGGCTCGGACGAATGGCGCCCGCTCGAACTTACCT
CGCGCGCCCTGGCCACCAACCACTTTCATGTACAAGGGCTACTGGATCTGGCTGATCCCGCTGAACCAGGACACCTTC
TCGATCGGCATCACCGCCAAGAACAACGAAGTGAACCTGAACATCCGCTCGGCCGAAGAAATTTGAACAGTTCCTGCG
CTCGCACAGGCCTGAACGAAATCCTGGGCCAGCAGCCGAAGTGTGGACTACACCTCGATGAAGCGCCTGTGCG
GCAAGGCCAAGCAGTCTTCTCGACCGAACGCTGGTTCCTGACCGCATGTGTCGGCCTTCTGACCCGCTGCTG
TCGCCGGGCTCGGCCTACCTGACCGACGCCAACCGCATGATCGGCCAAGTGAAGCCGACATCGCCGAAGACGC
CGAAGTGTTCGCCGCAAGACCAAGGCCTTCAACGCCTACCTGCTGTCGTGGTACGAATCGTTCATGTGCACATCA
CCGGCAACTACCACGGCTCGTACGAAGTGCACAAGACCCACTTCGAAGCCCTGCTGATGCACCTGGTTGCGCTTCATC
CTGCCGTCGTGATGTGCGCCGCTACGGCTACTGCCGCTCGCTGCACGGCATGTGCGAGGACGAAGTGAACCAGAA
GGCCATCGCCATGATCGAAAACGCCGCCATCGCCCGCATCCACGTGCTGAAGGACGAATTTATCCAGCTGATCAAGG
GCTACGAATACCGCTACAACCGCGGCCACTTCTTCGACATCGAACTGACCCGCCAGCGCATGAAGCACGCCACACC
CGCGCGCCATGCTGGACGACGCCCATCGCCGAAGTGGACCACGCCCTGCTGGAAGTGACCTACCAGGGCTTCT
GCGCTCGTGTGCGAAATCCAGAAGGTGGACTTCGACGAAGAAAAGATGCCGATGGTGGTGCAGGCCGCCATCGAAG
ACAAGCTGTGCTGACCCACGCCATGCAGCTGTCCACATCGAGCTctgaTCTAGCTCTGAGTGTCTCGCATCCACAA
TTTGAGAAATAAGTCGACTACTAG

LacO de Boer, RBS de Boer, EcoRI Schnittstelle, NdeI Schnittstelle, Start- und Stopp-
 Codon, XbaI Schnittstelle, XhoI Schnittstelle, Strep-tag, SalI Schnittstelle

24. pCC1-PrnC-His6:

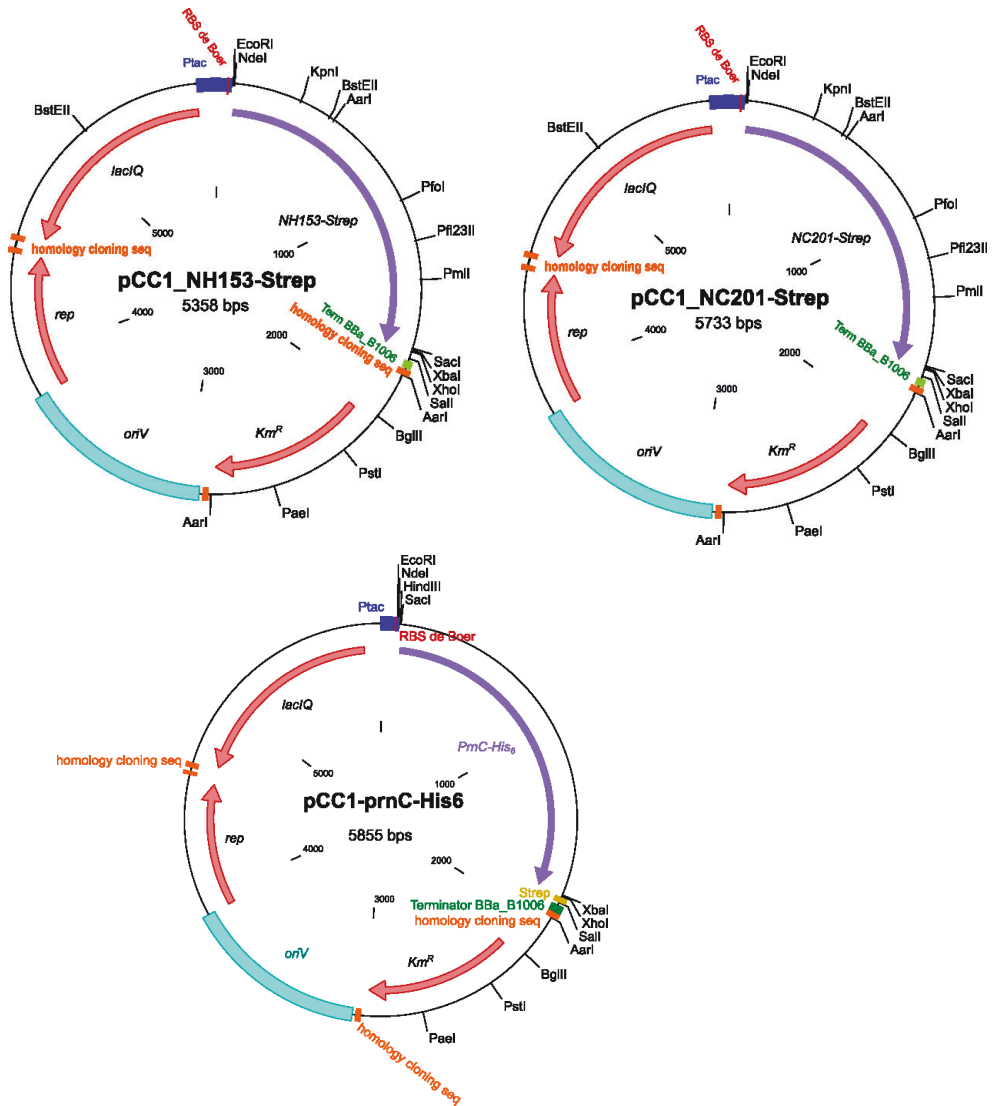
Aminosäuresequenzen:

MTQKSPANGHDSNHFDVILILGSGMSGTQMGAILAKQQFRVLIIEQSSHPFRFTIGESSIPETSLMNRIIADRYDIPEL
GHITSFYSTQRYVSSSTGIKRNFVGFVHKPGQEHPKEFTQCVIPELPWPGEPESHYYRQDVEDAYLLQAAIKYGCVTVRQ
KTSVTEYHADKDGVAVTAEGERFTGRYMICGPGGAPLATKFGLEEEPCRFKTHSRSLYTHMLGVKPFDDIFKVKG
QRWRWHEGTLHHMFTGGWLWVIFPNNHPRSTNNLVSVGLQLDPRVYPKTDIPAQQEDEFELARFPSIGAQFRDAVPV
RDWVKTDRLQFSSNACVGDYCLMLHANGFIDPLFSRGLENTAVTIHALAARLIKALRDDDFSPERFEYIERLQOKL
LDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHLWAVGTILGQFRLVQAHARFRASRDEGLDLHDNDPPYLGYLCADMEQYYQ
LFNDAKAEVEAVSAGHKSAAEALRIHALIDERDFAKPMFGFGYICITGDKPQLNNSKYSLIPAMKLMYWTQTRAPAE
VKKYFDYNPMPFALLKAYITTRIGLALKKHVHHHHHH

Genesequenz:

AAT**TGTGAGCGGATAACAATT**TCACAC**AGGA**AACAG**AATTC****CATatg**TGAAAGCT**GAGCTC***catgactcagaagagc*
ccgcgaaacggacacgatatgcaaccacttcgacgtaatcatcctcgggtcgggcatgtccggatccagatggggc
catcctcggccaaacaacagtttcgctgctgatcatcgagcagtcgctcgaccccggttcacgatcggcgaatcgt
cgatccccgaaacgtctctcatgaaccgcatcatcgctgatcgctacgacattccggagctcgccacatcacctcg
ttctactcgacgcagcgttacgtttcgctcgagcacggcatcaagcgcaactccggctcgtgttccacaaacctgg
ccaggagcacgaccgaaaggagttcaccagtcgctcattccgagctgcccgtggggccggagagccattattacc
ggcaggacgtcgacgcctatctgttgaaagcggccatcaaataatggctgcacggtccgccagaagacgagcgtgacc
gaatatcacgcggacaaggacggcgtcgcggtgaccaccgcccaggggcgagcgggtcaccggccgggtacatgatcga
ctgcgaggagaccggcgccgctggcgaccaagttcgggctccggaagagccggtgctcgcttcaagacgcaactcgc
gcagcctctacacgcacatgctcggggtcaagccgttcgacgacatcttcaaggtcaaggggcagcgtggcgctgg
cacgaaggaacctgcaccacatgttcaccggcggtggtctgggtgattccggttcaacaaccaccggcgtcgac
caataacctggtgagcgtcgccctgcagctcgaccgcgtgcttaccggaaaaccgacattcccgcgcagcaggaat
tcgacgagttcctcgcgggttcccagcatcgccgctcagttccgggagccggtgccagtgccgactgggtcaag
accgaccgctcagttctcgtcgaaacgcctcgtcggcgaccgctactgcctgatgctgacgcgaaacgggtcat
cgaccgctcttctcccggggctcgagaacaccggtgaccatccacgcgctcggcgccgctcatcaaggcgc
tacgcgacgacgacttctccccgagcgttcgagtagatcgagcgcctgcagcaaaaagcttttggaaccacaacgac
gacttcgtcagctgctgtacacggcgttctcggacttccgctatgggacgcgttccaccgctgtggggcgtcgg
cactatcctcgggcagttccggctggtgcaagcccacgcgaggtttcggcgtcgcgcgacgagggcgacctcgatc
acctcgacaacgacccgacctcgggtacctgtgcgggacatggagcagtaactaccagttggtcaacgacgcc
aaagccgaggtcgaggctgtgagcgcgggcaaaagtccggccgaggagccgcttgcggattcacgccctcatcga
cgaaacgagacttcgcaagccgatggtcggcttcgggtactgcatcaccggggacaagccgacgtcaacaactcga
agtacagcctgataccggcgatgaagctgatgactggacgcaaacccgcgcggcgagaggtgaagaagtacttc
gactacaaccgatggtcgcgctgctcaaggcgtacatcaccaccgcacatcgccctggcgtgaagaagcagctgca
ccaccaccaccaccactga**CTAGA****CTCGAGTGGTCGCATCCACAATTTGAGAATAA****CTCGAC**

LacO de Boer, **RBS de Boer**, **EcoRI Schnittstelle**, **NdeI Schnittstelle**, **SacI Schnittstelle**, **Start- und Stopp-Codon**, **His-tag**, **XbaI Schnittstelle**, **XhoI Schnittstelle**, **Sall Schnittstelle**



25. pETDuet™-1gdh (pGDH)^[297, 349, 350]:

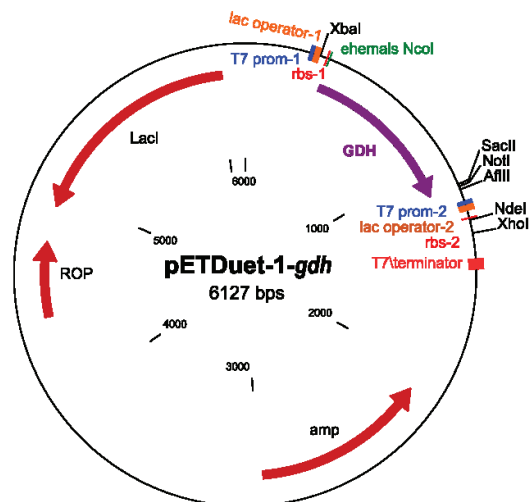
Aminosäuresequenzen:

MYPDLKGVVAITGAASGLGKAMAIRFGKEQAKVVINYYSNKQDPNEVKKEVIKAGGEAVVVQGDVTKEDVKNIQ
 TAIKEFGTLDIMINNAGLENPVPSHEMPLKDWKVIIGNLTGAFLLGSREAIKVFVENDIKGNVINMSSVHEVIPWPL
 FVHYAASKGGIKLMTKTLALEYAPKGI R VNNIGPGAINTPINA EK FADPKQKADVESMIPMGYIGEPEEIAVAAWL
 ASKEASYVTGITL FADGGMTLYPSFQAGRG

Genesequenz:

CCTCTAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAG**AAGGAG**ATATACCatgtatccggattttaaaggaaaagtcgctgcta
 ttacaggagctgcttcagggtcgcgaaaggcgatggccattcgccttcggcaaggagcaggcaaaagtgggtatcaac
 tattatagtaataaacaagatccgaacgaggtaaaaagaagggtcatcaaggcgggctgaaagctgttgcgtcca
 aggagatgtcacgaaagaggaagatgtaaaaaatatcgtgcaaacggcaattaaggagttcggcacactcgatatta
 tgattaataatgcccgtcttgaaaatcctgtgccatctcacgaaatgccgctcaaggattgggataaagtcacggc
 acgaacttaacgggtgccttttaggaagccgtgaagcgattaaatatctcgtagaaaacgatatcaaggaaaatgt
 cattaacatgtccagtggtgcacgaagtattccttgccggttatttgtccactatgcccgaagtaaaggcgggataa
 agctgatgacaagacattagcgttgaatacgcgccaaggccattcgcgtcaataatattgggccaggtgcgcatc
 aacacgccaatcaatgctgaaaaattcgcgtgaccctaaacagaaagctgatgtagaaagcatgattccaatgggata
 tatcggcgaaccggaggagatcgccgcagtagcagcctggcttgcctcgaaggaagccagctacgtcacaggcatca
 cgttattcgcggacggcggtatgacactctatccttcattccaggcaggcccggttaa**GCGGCCGC**ATAATGCTTA
 AGTCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAG
 CGGATAACAATTCCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAG**AAGGAG**ATATA**CATATG**CGCAGATCTCAATTGGATA
 TCGGCCGCCACGCGATCGCTGACGTCGGTACC**CTCGAG**

RBS, Start- und Stopp-Codon, gen, **NotI**, **NdeI** Schnittstelle, **XhoI** Schnittstelle



26. pBTBX-2* (pBTBX-2_MCS_RBS):

Sequenz der MCS des kommerziellen pBTBX-2:

```
ACTTTTAAGAAGGAGATATACCCATGGtaaaatggtcagattatgagcgataTCTAGAGAATTCGTCAACGAATCAAG
CTTGATATCATTCAGGACGAGCCTCAGACTCCAGCGTAACTGGACTGAAAACAAACTAAAGCGCCCTTGTGGCGCTT
TAGTTTT
```

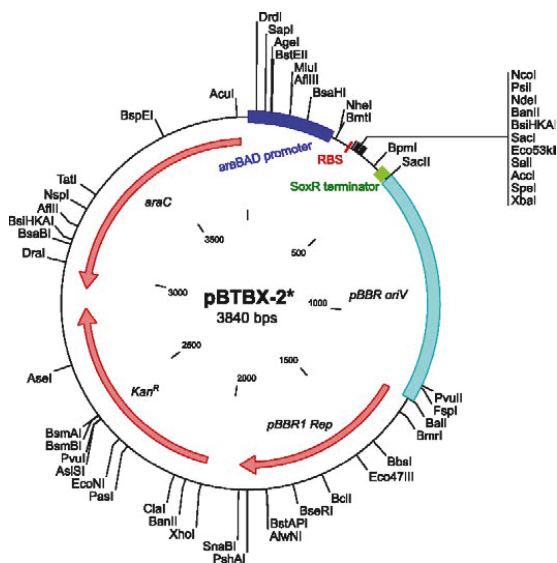
Ribosomenbindestelle (RBS), NcoI Schnittstelle, **Start- und Stop-Codon**, **XbaI**,

SoxR Terminator

Sequenz der MCS des angepassten pBTBX-2*:

```
TTTTTTTGGECTAGGACCGCCTATCTCGTGTGAGATAGCGGAGATACGAACCTTAAGAAGGAGATATACCCATGGg
cttataacatatgagctccgctgacactagtTCTAGAAAATT
```

NheI, **NcoI**, **NdeI**, **SacI**, **SpeI**, **Sall**, **XbaI** Schnittstellen, ausgetauschter Bereich MCS



27. pBTBX-2*-prnD:

Aminosäuresequenzen mit His-tag:

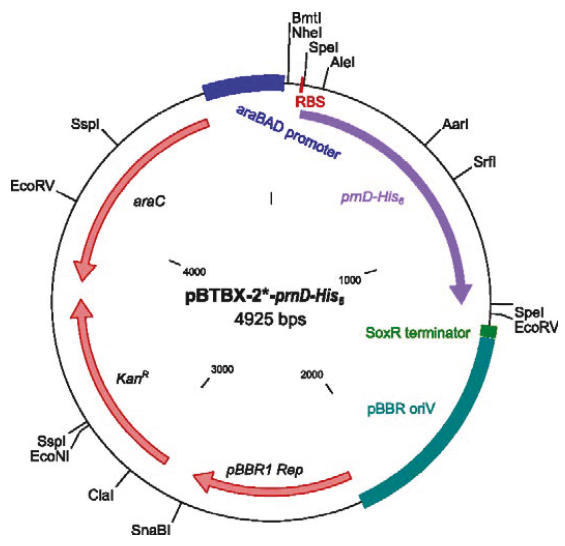
MNNIQLDQANVKKHPPGAYDATTRVAASWYVAMRSNGLRDKPKELTLFGRPYVAWRAATGQAVVMDRHCShLgANLA
 DGRIKDGCIQCPFHhWRYDEQgKCVHIpGHSEVVRQLEpVPRAARQPTLVTTERYGYVWVWYgSPQPLHPLPEITAA
 DVDNGDFMHLHFafETTTAVLRIVENfYDAQHATpVHALPIsAFELKLFDDWSRWPEVESLARAGAWFGAGIDfHVN
 RYfGPLGMLSRALGLNMSQmNLHFDGyPGGCvMTVALDADvKYKLLQcVTPVSDgKNIMHMLISIKKvGGVLRRAtd
 FVLfGLQTRQaAGYdVKIwNGMKPDGGGAYsKYDKLVlKYRAFyRGWDRVASEQLK**HHHHHH**

Genesequenz:

TTTTTTGGGCTAGCACCCCTATCTCGTGTGAGATAGCGGAGATACGAACCTTAA**GAAGGAG**AT**ACTAGT**atgaac
 aacattcaattg gatcaagcgaacgtcaagaagcatccccggggcgtagcagcgcgaccacagcgtggccgcgag
 ctggtagctcgcgatgcctcgaacgcctcagggacaagcgaaggagttgacgcttttggccgtccgtacgtgg
 cgtggcgcgcagcagcgggcaaggcctggtgatggaccgccactgctcgcaactgggcgcgaacctggtgacggg
 cggatcaaggacgggtgcatccagtgccgcttcaccactggcgtacgacgagcaaggaagtgcgttcacatccc
 cggccacagcaggtggtgcccagctggagccggtgccacgcgcggcgcgcagccgacgttggtcaccaccgagc
 gatacggctacgtgtgggtctggtacggctccccgcagccgctgcaccgctgcccgaatcacccgcagccgacgtc
 gacaacggcgacttcatgcacctgcacttcgcgttcgagacgacgacggcggtcttgcggatcgtcgagaacttcta
 cgacgcacagcagcgaacccccgtgcacgcgctcccgatctcggccttcgaactcaagctcttcgacgactggagcc
 ggtggccggaggttgagtgcgtggcccggggcggcgctggttcgggtgccgggatcgaactccacgtaaacgcctac
 ttccggccccctcggcatgctgtcgcgcggcctcggcctgaacatgtcgcagatgaacctgcacttcgatggctacc
 cggcgggtgctcatgaccgttgcctggacgcagacgtcaaatataaactgctccagtgtgtgacaccggtgagcg
 acggcaagaacatcatgcacatgctcatctcgatcaagaagtgggcggcgtcctgcgccgtgcgaccgacttcgtg
 ctgttcgggctgcagaccagacaggcagcgggtacgacgtcaaaatctggaacgggatgaagcccgcgcgccggg
 cgcgtacagcaagtagcacaagctcgtgctcaagtaccgtgcgttctaccgcggctgggtcgaccgtgtcgcgagt
 agcagcttaag**accaccaccaccactga****ACTAGT****TCTAGA**A

Ribosomenbindestelle (RBS), NheI,
 SpeI, Start- und Stopp-Codon, His-
 tag, XbaI Schnittstellen, Gen

CC



28. pBTBX-2*-pltLA:

Aminosäuresequenzen mit His-tag:

PtlL:

MGDGEVKEKIRRYIMEDLIGPSAKEDLDDQTPLLEWGIILNSMNIVKLMVYIRDEMGSVIPSTHITGKYFKDLNAI
SRTVEQLKAECA

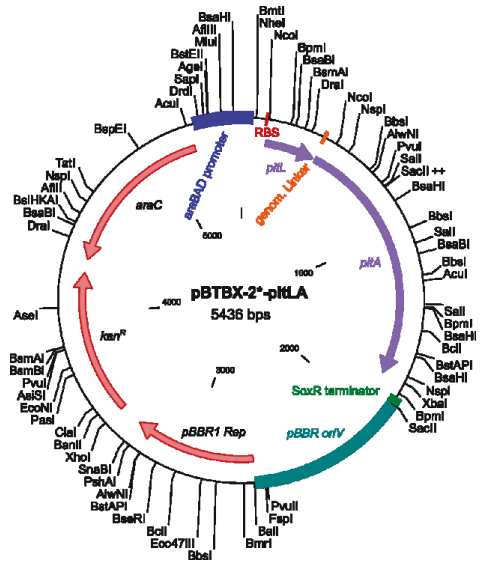
PItA:

MSDHDYDVVIIGGGPAGSTMASYLAKAGVKCAVFEKELFEREHVGESLVPATTPVLLLEIGVMEKIEKANFPKFFGAA
WTSADSGPEDKMGFQGLDHDHFRSAEILFNERKQEGVDRDFTFHVDRGKFDRIILLEHAGSLGAKVVFQVEIADVEFLS
PGNVI VNAKLKGRSVEIKAKMVVDASGRNVLLGRRLGLREKDPVFNQFAIHSWFDNFRKSATQSPDKVDYIFIHFL
PMTNTWVWQIPITETITSVGVVTQKQNYTNSDLTYEEFFWEAVKTRENLDALKASEQVRPFKKEADYSYGMKEVCG
DSFVLI GDAARFVDPI FSSGVSVALNSARIASGDIIEAVKNNDFSKSSFTHYEGMIRNGIKNWEYEFITLYRNLILF
TAFVQDPRYRLDILQLLQGDVYSGKRLEVLDKMREIIAAVESDPEHLWHKYLGMQVPTAKPAF

Gensequenz:

GCTAGCACCGCCTATCTCGTGTGAGATAGGCGGAGATACGAACTTTAAGAAGGAGATATACCC**atgg**gagacggaga
ggaagttaaagaaaagattcgtcgcctacatcatggaagatttgatcgggccaaagtgcaaaggaagatgagccttgatg
accagactccactactggagtggggcattctcaactcgatgaatatcgtcaagctcatggtctacatcagggatgaa
atgggtgtctcgattccaagtaaccaatcacccgaaaatatTTTaaagacctgaatgcaatatccaggactgtcga
gcaactaaagccgagtgccct**taaCAGGGAGTGGGCA**atgagcgatcatgattatgatgtagtgattatcggtgcc
ggccggcggttcgaccatggcctcctacctggcaaaagccgggtgcaaatgocggtggttcgaaaaagaactgtt
cgagcgcgagcatggtggcgagtcgctggtaccggccaccactccggtgctgctggaatccgggtgatgaaaaaga
tcgagaaagccaactccccgaagaagttcggcgtgacctggacctcggcagatccggccccgaagaagaatgggc
ttccaggggctggaccacgatttccgttcggcgaaatcctcttcaacgagcgaagcaggaaggggtcgatcgcca
cttcaagttccacgtcgaccgccaagttcgcaccgcatctctctggagcagcaggttcgctggggccaaggtct
tccagggcgtggagatcgctgacgtcgagtttctcagcccggcaatgtcatgtgcaatgccaagctgggcaagcgc
agcgtggagatcaaggccaagatggtggtggatgccagcgttcgcaacgtgctgctgggccgcccggctgggcttgcg
agaaaaaggaccgggtcttcaaccagttcgcgattcactcctggttcgacaacttcgaccgcaagtgcgagcgcgaaa
gcccggacaaggtcgactacatcttcatctcacttctcctgcccgatgaccaatactcgggtctggcagatcccgatcacc
gaaaccattaccagcgtgggcgtggttacgcagaagcagaactacaccaactccgacctcacctatgaagagttctt
ctgggaagcgggtgaagaccgggaaacctgcatgacgcgctgaaggcatcggagcaggtccgcccgttcaagaaag
aggcggactacagctacggcatgaaagaagttcgtggcgacagcttctgctgatcggcgatgccgcacgggttcgtc
gaccgatcttctccagcggcgtcagcgttgactcaacagtgccgcgatcggcagcggcgaatcatcgaggcgggt
gaagaacaacgacttagcaagtccagtttcaactcactacgaaggcatgatcaggaatggcatcaagaactggtatg
agttcatcacgctctattaccgctgaacatcctctcaccgcttcggttcaagaccacgctaccgctggacatc
ctgcaattgctgcaagggcagctctacagcggcaagcgcctggaagtgctggaacaagatgocgcaaatcattgctgc
ggttgaagcgcacccggaacacctctggcacaagtaactggcgacatgcaggttctcaccgcaaaccccgcttct
aatctagaa

NheI, **NcoI**, **XbaI** Schnittstellen, Gene, genomischer Linker

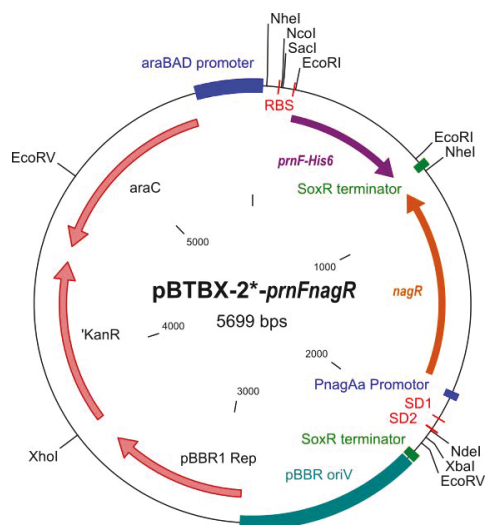


29. pBTBX-2*-prnFnaGR:

Genesequenz:

TTTTTTGGGCTAGCACCGCCTATCTCGTGTGAGATAGGCGGAGATACGAACTTTAA**GAAGGAG**ATATACCCATGG**GA**
gctcGGGTCACTGAGAGGATCGGACATAAGGCCACTTACACAG**GAAGGAG**CCC**GAATTC**atgattgctgccaccgaaa
 ccaaagttcacgatttgctcgtatgccagggccgcgatgtccgcgatgccctggaactgpcgaacgtgctggggcag
 ttgctaccggtgtgaccgtgatcaccacccgcaccgcagacggcccaacgtcggtgtgacggccaactcgttctc
 ctcactgtcgtgtcaccggcgctggtgctctggagcctggcagcagccagcagcctggaaggccttttgctcgg
 cgagccacttcgcatcaacgtactggcgccgaccagcaccacctgtcggagcagttcgcaaggcagcagccgac
 aagttcggcgtgtagctcattcctatggcaaggcgggagccccgggtgctggacgatgtggtggcagtgctggtgtg
 cgcgaacgtcaccagtagagggcggtgaccacctgatcttcattggcgagatcgaaacaataccgctacagcggcg
 cagaaccgctggtcttccatgcaggccagtaccggggctagggagcaatagagcagaagcgtcctcaagcacgaa
 caccaccaccaccaccactga**GAATTC**CGTAACTGGACTGAAAACAACTAAAGCGCCCTTGTGGCGCTTTAGTTTT
 GTTCCGCGG**ECTAGC**CAGTCAATATGGGTTTGTGGAGCT**TATGCTTCAGAGAAAAGCTCGACGAACAAC**TGACGT
 AGCCACATGTTGCCCGGATCCCGGTTGTACTTGGCATGCCAAAACAGGTTGATGGCGATGTCGGGCAGCTTGCCCGG
 GTGCGGGGATGTCGTGAGACAAAAGGCAATTTGCAGCGAACGGCAAAAACGCTGCGGCACGGTCGCGATGAGGTCCG
 TGCTGTGCAGAAATGGGGCCGATCGCAATGAAATGCGGCACCACCAGCCGATGCGCCCTTTTGATGCCTGCGCGTTCCG
 AGCAGGCCATCGACCTCACCGTGTCCGGTGTGAGTGCACCCAGCCGACATGGTCCAGTTCACTGAACTGTTTCAG
 GTCATGGGGGATTTGGCGCTTGGATGGTCTTGCAGCAATGCATACGTAGCGGTGCGAAAAGAGGCGCCGCTGGA
 AGAATCCGCTCTGTAGCTCTGGCAGAAGACCAAGCGGAGATCAACCGCACCGGACTCCATATCCTCCTTCAGATTG
 CCAGCATTCGGGGCAGCGTGTCTGATCTGGATGTGAGGAGCACGTTGCGCAAGCGCTTCCATCAGTGGGGGCATGAA
 GTACATCTCGCGATGTCGGTCATTGCCAAGTTGAAGGTGCGCGTCTGCGCAAATGGGTCGAAAGAGTCACGGGTCG
 TCAGTGCCGCTCGCAGCGTGTGAGCGCATAGATCACGGGCTCCGCAAGATGCAGTGCATACGGTGTGCGGCTCCATG
 CTTTTTGGAGTGCAGCAAGAACAATCGTCTTTAGCGCCGACAGCCGTTAAGTGAATGCTGACGGCAGGCTG
 CGTCAGCCCCAGTTTTTCGCGGCCGCTCGATACGCTCCGGTCGAGCAGTAGTGGTTGAAGACCACCAGCAGATTCA
 AGTCGATGTCGCGCAGATCCAATGATGCCTCACCATTATTCATGCTGGTGATTTTAACTATCAGACTTGATCTATAGC
 GCTATACCGATCGACGCGCCAGAATCGCAGCCATTCGGAGACAACGAAAAAGAGCTTGCCACAGGAAACAGGAGG
 TACCGGCCAAGTTCACTTAAA**AAGGAGA**TCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAAGTGAACATCTTAATCATGCT**TAAG**
GAGGTTT**CATatg**GCAACTCAGAAGAGCCCCGCGAACGGAC**TCTAGA**

NheI, **RBS (SD)**, **NcoI**, **SacI**, **EcoRI**, **NdeI**,
XbaI Schnittstellen, **nagR/PnagAa**, **Start-**
und Stop-Codon, **Gen**



30. pBTBX-2*-prnFnaGPrnCD:

Aminosäuresequenzen:

PrnF-His₆:

MIAATETKVDLLDAEGRDVRDARELRNVLGQFATGVTVITTRTADGRNVGVTANSFSSLSLSPALVLWLSLARTAPS
LKAFCSASHFAINVLAGHQHLSSEQFARAAADKFAGVAHSYGKAGAPVLDVVAVLVCRNVTQYEGGDHLIFIGEIE
QYRYSGAEPLVVFHAGQYRGLGSNRAESVLKHEHHHHHH

PrnC-His₆:

MATQKSPANGHDSNHFDVILGSGMSGTQMGAIIAKQQFRVLIIEQSSHPRTIGESSIPETSLMNRIIADRYDIPE
LGHITSFYSTQRYVSSSTGIKRNFGVVFHKPGQEHPKEFTQCVIPELPWGPESHYYRQDVDAYLLQAAIKYGCTVR
QKTSVTEYHADKDGAVTTAEGERFTGRYMIDCGGPGAPLTKFGLREEPKRFKTHRSRSLYTHMLGVKPFDDIFKVK
QQRWRWHEGLTHHMFTGGWLWVIFPNNHPRSTNNLVSVGLQLDPRVYPKTDI PAQQEFDEFLLARFPSIGAQFRDAVP
VRDWKTDRLQFSSNACVGDYCLMLHANGFIDPLFSRGLENTAVT IHALAARLIKALRDDDFSPERFEYIERLQOK
LLDHNDDFVSCCYTAFSDFRLWDAFHRLWAVGTILGQFRLVQAHARFRASRDEGLDHLNDPPYLGYL CADMEQYY
QLFNDAKA EVEAVSAGHKSAAEEAALRIHALI DERDFAKPMFGFGYCI TGDKQLNNSKYSLSI PAMKLMYWTQTRAPA
EVKKYFDYNPMFALLKAYITTRIGLALKKHVHHHHHH

PrnD-His₆:

MNIQLDQANVKKHPPGAYDATRVAASWYVAMRSNGLRDKPKELTLFGRPYVAWRAATGQAVVMDRHCSHLGANLA
DGRIKDGCIQCFHHWRYDEQKQCVHIPGHSEVVRQLEPVPRAARQPTLVTTERYGYVWVWYGSPPQLHPLPEITAA
DVDNGDFMHLHFAFETTTAVLRIVENFYDAQHATPVHALPISAFELKLFDDWSRWPEVESLARAGAWFGAGIDFHVN
RYFGPLGLMSRALGLNMSQMLNHFDPYGGCVMTVALDADVKYKLLQCVTPVSDGKNIMHMLISIKKVGGLRRATD
FVLFGLQTRQAAGYDVKIWNMGKPDGGGAYSKYDKLVLYKRAFYRGWVDRVASEQLKHHHHHH

Gensequenz:

TTTTTTGGGCTAGCACCGCCTATCTCGTGTGAGATAGCGGAGATACGAACTTAAGAAGGAGATATACCCATGGG
GCTCGGGTCACTGAGAGGATCGGACATAAGGCCACTTACACA GAAGGAGCCC GAATTCatgatgtgctgccaccgaaa
ccaaagtccacgatttgctcgatgccgagggccgcgatgtccgcgatgccctgaactgcgcaactgctggggcag
tttgctaccggtgtgaccgtgatcaccaccgacccgcagacggccgcaactgctgggtgacggccaactcgttctc
ctcactgtcgctgtcaccggcgctggtgctctggagcctggcaccgcaacggcaccgagcctgaaggccttttgctcgg
cgagccacttcgcatcaactgactggcgccaccagcaccacctgtcggagcagttcgcacgggcagcagccgac
aagtccgccggtgtagctcattcctatggcaaggcgggagccccggtgctggacgatgtggtggcagtgctggtgtg
ccgcaactgcaaccagtaacgagggcggtgaccacctgatcttcattggcgagatcgaacaataaccgctacagcggc
cagaaccgctggtcttccatgcaggccagtaaccggggctagggagcaatagagcagaagcgtcctcaagcagaa
caccaccaccaccaccactgaSAATTCGTAAC TGGACTGAAAACAACTAAAGCGCCCTTG TGGCGCTTTAGTTT
GTTCCGCGGCTAGCCAGTCAATATGGGTTTGTCTGGAAGCTTATGCTTCAGAGAAAAGCTCGACGAACTGACGT
AGCCACATGTTGCCCGGATCCCGGTTGTACTTGGCATGCCAAAACAGGTTGATGGCATGTGCGGCAGCTTGGCCGG
GTGCGGGGATGTCGTGAGACCAAAGGCAATTTGCAGCGAACCGCAAAACCGTGC GCGCACGGTCCGATGAGGTCGG
TGCTGTGCAGAAATGGGCCGATCGCAATGAAATGCGGCACCACCAGCCGATGCGCCCTTTTGATGCC TGC GCGTTCCG
AGCAGGCCATCGACCTCACCGTGTCCGGTGTGAGTGC GACCACGCCGACATGGTCCAGTTCACTGAACTGTTTCAG
GCTCATGGGGGATTTGGCGCTTGATGTTGCTTGC GGAACATGCATACGTAGCGGTGCGGAAAGAGGCCCGCTGGA
AGAATCCGGTCTGTAGCTCTGGCAGAAGACCAAGCGGAGATCAACCCGACCGGACTCCATATCTCTCTCAGATTG

CCAGCATTCGGGCGCAGCGTCTGATCTGGATGTGAGGAGCACGTTGCGCAAGCGCTTCCATCAGTGGGGGCATGAA
 GTACATCTCGCCGATGTCGGTTCATTGCCAAGTTGAAGGTGCGCGTGTGGCAAATGGGTCGAAAGAGTCACGGGTCG
 TCAGTGCCGTCTGCAGCGTGTGAGCGCATAGATCACGGGCTCCGCAAGATGCAGTGCATACGGTGTCTGGTCCATG
 CCTTTTGGAGTGGCAAGAACAATCGTCTTTAGCGCCGCACGCAGCGCTTAAAGTGAATTGCTGACGGCAGGCTG
 CGTCAGCCCCAGTTTTTCGCCGGCGTGCATACGCTCCGGTCGAGCAGTAGCTGGTGAAGACCACCAGCAGATTA
 AGTCGATGTCGGCAGATCCAATGATGCCTCACCATTATTCATGCTGGTGATTTAACTATCAGACTTGATCTATAGC
 GCTATACCGATCGACGCGCCAGAATCGAGCCATTCCGAGACAACGAAAAAGAGCTTGCCACAGGAAACAGGAGG
 TACCGGCCAAGTTCACTTAAA**AAGGAGA**TCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACTGAAACATCTTAATCATGC**TAAG**
GAGGTTTTCATatggaactcagaagagccccgcgaacggacagatagcaaccacttcgacgtaatoatccctcggg
 tcgggatgtccggatccagatggggccatcctggccaaacaacagtttcgctgctgatcatcgacgagtcgctc
 gcaccgcgggttcacgatcggcgaatcgtcgatccccgaaacgtctctcatgaaccgcatcatcgctgatcgctacg
 acattcccgaactcggccacatcacctcgtttactcgacgacgcttacgcttcgctcgagcaggggatcaagcgc
 aacttcggcttcggttccacaaacctggccaggagcagcaccgaaggagtccaccagtcgctcatcccagagct
 gccgtggggccggagagccattattaccggcaggagctcgacgcctatctgttgcaagcggccatcaaatatggct
 gcacggtccgcagaagcagcagcgtgaccgaatatcaccgggacaaggacggcgtcgcggtgaccaccgcggagggc
 gagcgggttcaccggcccggtacatgatcgactcgggaggaccggcgccgctggcgaccaagtccgggtcccgga
 agagccgtgtcgcttcaagacgcaactcggcagcctctacacgcacatgctcggggcgaagccgttcgacgacatct
 tcaaggtcaagggcagcgcgtggcgctggcacaaggaacctgcaccacatggtcaccggcggctggctctgggtg
 attccgttcaacaaccaccgcgctcgaccaataacctggtagcgtcggcctgcagctcgaccgcgctgtctacc
 gaaaaccgacattcccgcgacgaggagttcgacgagttcctcgcgcggttcccgagcatcggcgctcagttccggg
 acgccgtgccagtcgacgactgggtcaagaccgaccgctgaagttctcgtcgaaacgctcgtcggcgaccgctac
 tgcctgatgctgcacgcaacgggttcatcgaccgcctctctcccggggctcgaaaacaccgcggtgaccatcca
 cgcgctcgcggcgcgctcatcaaggcgctacgcgacgacgacttctccccgagcgcttcgagtagatcgagcgcc
 tgcagcaaaagcttttgaccacaacgacgacttcgctcagctgctgtacacggcgcttctcggacttccgcctatgg
 gacgcttccaccggctgtgggggctcggcactatcctcgggcagttccggctggtgcaagccaccgcgaggtttcg
 cgctcgcgcgacgagggcgacctcgatcacctcgacaacgaccgcccgtacctcgggtacctgtgcgcggacatgg
 agcagtagtaccagttgttcaacgacgcccgaagccgaggtcgagggcctgagcgcgggcaacaagtccggccgaggg
 gccgcttgccgattcacgcctcatcgacgaacgagacttcgccaagccgatggtcgggttcgggtactgcatcac
 cggggacaagccgagctcaacaactcgaagtacagcctgataccggcgatgaagctgatgtagtggacgcaaaccc
 gcgcccggcagaggtgaagaagtagtctcgactacaaccgatggttcgctgctcaagggctacatcaccaccgc
 atcggcttgctctgaagaagcagtgaccaccaccaccaccactgaCAGCCAGTTACATCTATACCTGTAAGTTC
 TATCCG**GAAGGAGAT****ACTAGT**atgaacaacattcaattggatcaagcgaacgtcaagaagcatccccggggcgt
 acgacgcgaccacacgcgctggccgcgagctggtacgtcgcgatgctcgcgacgagccgctcagggacaagccgaaggag
 ttgacgctttttggccgctccgatcgtggcgtggcgcgacgacggggcagccgctgggtgatggaccgcaactgctc
 gcacctggggcgaacctggctgacggcggtcaaggacgggtgcatccagtgccggtttaccactggcgctacg
 acgagcaaggcaagtgcgttcacatccccggccacagcgaggtggtgcgccagctggagccggtgccacgcgcggg
 cgccagccgacgttggtcaccaccgagcgatacggctacgtgtgggtctggtacggctccccgcagccgctgcacc
 gctgccggaatcaccgcagccgacgtcgacaacggcgacttcatgcaactgcaacttcgcttcgagacgacgacgg
 cggctttgcggtcgtcgagaacttctacgacgcacagcagcaaacccccgtgcacgcgctcccgatctcggccttc
 gaactcaagctcttcgacgactggagccggtggccggaggttgagtcgctggcccggggcgcgctggttcgggtgc
 cgggatcgacttccacgtaaacgcctacttcggccccctcgccatgctgtcgcgcgctcggcctgaacatgctgc
 agatgaacctgcaacttcgatggctaccccgcggggtgctcatgaccgttgccctggacgcgacgctcaaatacaaa
 ctgctccagtggtgacaccggtgagcagcggcaagaacatcatgcacatgctcatctcgatcaagaaggtggggcg
 cgtcctgcccgtgacaccgacttctgctgcttcgggctgcagaccagacaggcagcggggatcagacgtcaaaatct
 ggaacgggatgaagcccagcggcgggcgcgctacagcaagtacgacaagctcgtgctcaagtaccgtgcttctac
 cgcgctgggtcgaccgctgcgagtgagcagcttaagcaccaccaccaccaccactga**ACTAGT****CTAGA**AAATT
 CGTCAAC**GAATTC**AAGCTT**GATATC**ATTC

NheI, RBS (SD), NcoI, SacI, EcoRI, NdeI, SpeI, XbaI, EcoRV, Schnittstellen, nagR/PnagAa, Start- und Stopp-Codon, Gen

Von diesem Vektor bestehen zwei Varianten. P2.1 und P4.

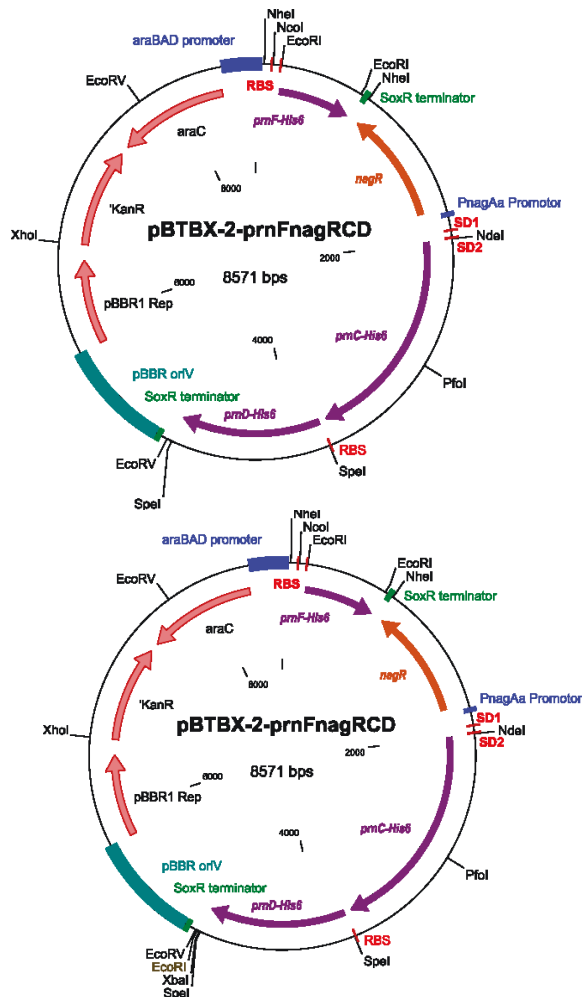
Hierbei fehlen der P2.1-Variante das XbaI und die EcoRI Schnittstelle am Ende.

P2.1:

cgcggtctgggtcgaccgtgtcgcgagtgagcagcttaagcaccaccaccaccaccacttgaACTAGTCTAAAAATTC
GTCAACAAATTCAGCTTGATATCATTC

P4:

*cgcggtctgggtcgaccgtgtcgcgagtgagcagcttaagcaccaccaccaccaccacttgaACTAGTCTCTAGA**AAATTC*
CGTCAACGAATTCAGCTTGATATCATTC



31. pBTBX-2*-PRN ptac:

Basiert auf pBTBX-2*-prnF_{nag}R_{prn}CD P2.1 ohne XbaI und EcoRI am Ende.

Aminosäuresequenzen:

PrnA-Strep:

MGNKPIKNIVIVGGGTAGWMAASYLVRALQQQVNITLIESAAIPRIGVGEATIPSLQKVFFDFLGIPEREWMPQVNG
AFKAAIKFVNWRKSPDPSREDFYHFLFGSVNCDGVLTHYWLKREQGFQQPMAYACYPPGALDGLAPCLADGT
RQMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVERGVNRVVDEVVEVQLNDRGYISTLLTKEGRTLEADLFIDCSGMRGLLINQALK
EPFIDMSDYLLCDSAVASAVPNDDAREGVEPYTSAIAMNSGWTWKI PMLGRFGSGYVFSSKFTSRDQATADFLKLWG
LSDNQQLNQIKFRVGRNKRAWVNNCVS IGLSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKHFPDTSFDPRLRDAFNAEIVYM
FDDCRDFVQAHYFTTSREDTPFWLANRHELRLSDAIQEKVERYKAGLPLTTTSFDDSTYYETFDFEYKFNFWLNGNYY
CIFAGLGLMPDRSLPLLQHRPESIQKAEAMFASIRREAERLRTSLPTNYDYLRSLRDGAQLSRNQHGPTLAAQERQH
VWSHPQFEK

PrnB-His₆:

MERTLNRVSAFAATHAAVAACDPLQARALVLQLPALNRDKDVPGIVGLLRDFLPVSGVPSWGFVEAAAAMRDIGFF
LGSLKRHGHEPVDLVPGLERVLDDLARVTDLPRETL LHVTVWNPAAADAQRSYTGLPDEAHLLSVRISMAALEAA
IALTVELSDVSLRSPAFAGQCDLEAYLQKMVESIVYAYRFISPQVYDELRFYEPYIRVGGQSYLPGAVEMPLFV
LEHVLWGSQSDPAYREFKETYLPLYVLPAYRAVYARFATEPALIDRALDEARAAGTQGEHVRAGLTALERVFKVLLR
FRAPHLKLAERAYEAGRS GPTTGSGGYAPSMGLDLLTLTCAARSRI RAALDESLKHHHHHH

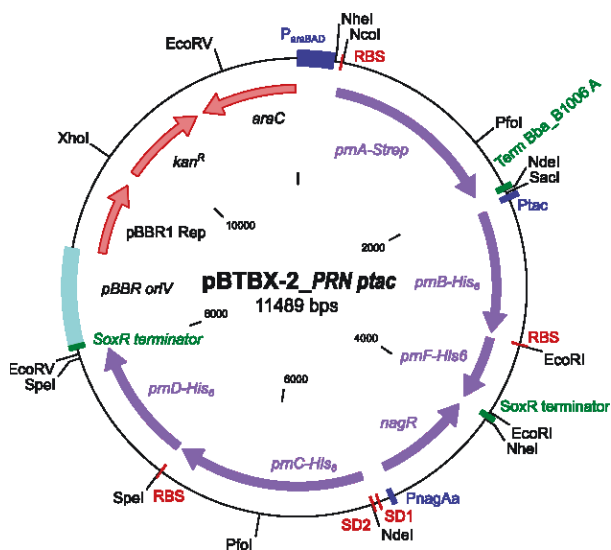
Genesequenz:

GCTAGCACCGCCTATCTCGTGTGAGATAGGCGGAGATACGAACTTTA**GAAGGAG**ATATAC**CCatgg**gaacaagcc
aatcaagaatatcgtcatcgtggcgccgaccgcgggctggatggccgctcgtacctcgtccggcgctccaac
agcaggtaaacatcacgctcatcgagctcgcggcgatccccggatcggcgtggcgaggcgaccatcccagatttg
cagaaggtgttcttcgacttctcgggataccggagcgggagtgatgccccaaagtgaacggcgccttcaagccgc
gatcaagttcgtgaaatggagaaaatctcccaccatcgcgcaagattacttctaccatttgttcggcagcgtgc
cgaactcgcagcggcgtgccgcttaccactactggctgcgcaagcgcgaacagggcttccagcaaccgatggcgta
cgctgtaccgcagccgggcccctcgacggcaagctggcaccttgcctggccgacggcaccggccagatgtccc
cgctggcacttcgacgcgcacctggtggccgacttcttgaagcgtgggcccgtcgagcgcgggtgaaatcgcgtg
tcgacgaggtcgtggaggttcaactgaacgaccgcgctacatctccaccctgttaaccaaggaagggcggacgctg
gaggcggacctgttcatcgactgctccggcatgcgagggtcctgatcaatcaggccctgaaggaaccttcatcga
catgtccgactacctgctgtgcgacagcggctgcaccagcgcctgcccacgacgacgcgcgaggggggtcgagc
cgtacacctccgcaatgcatgaactcgggatggacctggaagattccgatgctggccggttcggcagcggctca
gtcttctccagcaagttcacctcgcgcgaccaggccaccgcgacttctcaactctgggcccctctcggacaatca
gcagctcaaccagatcaagttccgggtcggcgcaacaagcggcgctgggtcaacaactgcctctcgatcgggctgt
cgtcgtgcttctggagcccctggaatcgacgggaatctacttcatctacgcggcgctttaccaactcgtgaagcac
tccccgacacctcgttcgaccccggttgcgagcagcattcaacgcgcgagatcgtctacatgttcgacgactgcc
agacttcgtccaggcgcactatttcaactacgtcgcgcgaagacacgcgcttctggctcgcgaaccggcacgaaactgc
ggctctcggacgccatccaggagaaggttgagcgtacaaggccggctgccaactgaccaccacctcgttcgacgat
tccacgtactacgagcgttcgactacgagttcaagaacttctggttgaacggcaactactactgcatctttccgg

*cctgggcatgtgcccagccggtcgctgccgctcctgcagcaccgaccggagtcgatccagaaggccgaagcgatgt
tcgccagcatccggcgcgaagccgagcgcctgcgcacgagcctgccagcaactacgactacctgcggtcactgcggt
gacggcgcgcagctgtcgcgcaaccagcaccggccgacgctcgggcgcaggaacgccagcactggtggtcgcatcc
acaatttgagaaa**taa**CACGTGTAAGTCGACTACTAGAAAAAACCCTGCCCTGACAGGGCGGGGTTTTTTT**C**
ATATGCGATTTAGCGAAAGCTT**AGCTC**CAGCTG**TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG**TGTGGAATTGTGA
GCGGATAACAATTTACAC**AGGA**AACA**atg**gaacgcaccttgaaccgggtatccgcattcgcggccacacacgctgc
cgtggcggcctcgatccgctacaggcagcgcgctggttctgcagctgccggccctgaaccgtgacaaggacgtgc
ccggcatcgtcggcctgctgcgcgatttctcctccgggtgagcggcgtgccctccagctggggctcgtcgaagccgc
gccgcatcgtcgggacatcgggttctcctggggtcgctcaagcggcagcggacatgagcccgtagcactggtgcccgg
gcttgaacgggtgctgctcgacctggcaggggtgacgacttgccgcgcgcgagacactcctgcatgtgacggtct
ggaaccggcggcggcggatgcgcagcggagctacaccgggtgcccgacgaagcgcacctgctcgaagcgtgccc
atctcgatggcggccctcgaagcggccatcgcttgaaccgtcgagctgtccgatgtatccctgctcgcggcgtt
cgcgcaagggtgcatgagctggaagcctacctgcagaaaatggtcgaatcgatcgtctacggtaccgcttcatct
cgccccaggctcttctacgatgagctgcgccccttctacgaaccgattcgagtgggggcccagagctacctcgcccc
ggcgcctgagaaatgccctcttctgctgtagcagctcctgtggggtcgcaatcggacgacccagcgtatcgaga
gttcaaagagacgtacctgccctacgtgcttcccgcgtacagggcggtctacgctcgggtcggccacagagccggcgc
tcatcgaccgcgcgctcgacgagggcgcagcggcggttacgagggcgagcagctccgggtgggtgacggccctc
gaacgggtcttcaaggtcctgctgcttccgggcctcacctcaaattggcggagcgggcatacgaagcggggc
cagcggcccccacaaccggcagcggggctacgcgccagcatgctcggcgtctactcagctcacctgtgccggc
ggtcccgatccgcgcgctcgatgaatcccttaagcaccacctatcaccact**taa**CTTAAGGGTCACTGAGA
GGATCGGCATAAGGCCACTTACACA**GAAGGAG**CCC**GAATTC****atg**attgctgccaccgaaaccaagttcacgattt
gctcgatgccagggccgcgtagtccgcgtagccctgaaactgcgcaacgtgctggggcagtttctaccgggtgta
ccgtgatcaccaccgcaccgcagacggccgaacgtcggtgtgacggccaactcgttctcctcactgtcgtgtca
ccggcgtggtgctctggagcctggcagcagcagcagcctgaaggccttctgctcggcagcacttcgccat
caacgtactgggcgcgaccagcaccacctgtcggagcagttcgcaagggcagcagccgacaagtctcggcgtgtag
ctcattcctatggcaaggcggagccccgggtgctggacgatggtggcagtgctggtgtgcccaacgtcaccag
tacgagggcggtgaccacctgatcttctattggcagatcgaacaataccgctacagcggcgcagaaccgctggtctt
ccatgcaggccagctaccgggggctagggagcaatagagcagaagcgtcctcaagcagcaacaccaccaccacc
actga**GAATTC**CGTAAGTGGACTGAAACAACTAAAGCGCCTTGTGGCGCTTAGTTTTGTTCGCGG**GCTAGC**
AGTCAATATGGGTTTGTGGAAGCT**TTATGCTTCAGAGAAAAGCTCGACGAACA**ACTGACGTAGCCACATGTTGCCCG
GATCCCGGTTACTTGGCAGTCCAAAACAGGTTGATGGCGATTCGGGCAGCTTGGCCGGTTCGGGGATGCTGCTC
AGACCAAAGGCAATTTGCAGCGAACCGCAAAACGCTGCGGCACGGTGCAGATGAGGTCGGGTGCTGCGAGAAATGGG
GCCGATCGCAATGAAATGCGGCACCACCGCCGCTTTTGGATGCTGCGCGTTCGAGCAGCCATCGACCT
CACCGTGTCCGGTGTGAGTGCAGCCACCGCAGATGGTCCAGTTCACTGAATGTTTCAGGTCATGGGGGATTTG
GCGCTTGGATGGTCTTGCAGCAATGCATACGTAGCGGTTCGCAAGAGGCCTGGAAGAATCCGGTCTGTAG
CTCTGGCAGAAGACCAAGGCAGATCAACCGCACCAGGACTCCATACTCTTTCAGATTGCCAGCATTCGGGCGCA
GCGTGTGATCTGGATGTGAGGAGCAGTTGCGCAAGCGCTTCCATCAGTGGGGCATGAAGTACATCTCGCCGATG
TCGGTCATTGCCAAGTTGAAGGTGCGCGTGTGGCAATGGGTTCGAAAGAGTACGGGTGCTCAGTGCCTGTCAG
CGTGTGAGCGCATAGATCACGGCTCCGCAAGATGCAGTGCATACGGTGTGCGGCTCCATGCCTTTTGGGTGCGCA
AGAACAATCGTCTTTAGCGCCGACGCGAGCCGTTTAAAGTGAATGCTGACGGCAGGCTGCGTACGCCCCAGTTTT
TCGCGGCGGTCGATACGCTCCGGTCGAGCAGTAGCTGGTTGAAGACCACCAGCAGATTCAAGTCGATGTCGCGCAG
ATCCATGATGCCTCACCATTATTCATGCTGGTGATTTTAACTATCAGACTTGATCTATAGCGTATACCGATCGACG
CGCCAGAATCGCAGCCATTCCGAGACAACGAAAAAGAGCTTGCCACAGGAACAGGAGGTACCGGCCAAGTTCA
CTTAAA**AAGGAGA**TCAACAATGAAAGCAATTTTCGTAAGCAATCTTAATCATGCT**TAAGGAGG**TTT**CATatg**gc
aactcagaagagccccggaacggacacgatagcaaccacttcgacgtaaatcatcctcgggttcgggcatgtccggta
cccagatgggggccaatcctggccaaaacaagtttccgctgctgatcatcgagcagtcgctgcaccccggttcaag
atcggcgaatcgtcgatccccgaaacgtctctcatgaaccgcatcatcgctgatcgtacgacattccggaactcgg
ccacatcacctcgttctactgcagcagcgttacgttctcgtcgagcagggcatcaagcgcacttcggcttctggt
tcacaaaacctggccaggagcagaccggaaggagtaccaccagtcgctcattcccgagctgcccggggccggag
agccattattaccggcaggacgtcgacgcctatctgttgaagcggccatcaaatatggctgcacggtccgccaaga*

gacgagcgtgaccgaatatcacgcggaacaaggacggcgtcgcgggtgaccaccgccgagggcgagcgggttcaccggcc
 ggtacatgatcgactcgggaggaccggcgcccgctggcgaccaagtccgggctccgcgaagagccgtgtcgcttc
 aagacgcactcggcagcctctacacgcacatgctcggggtcaagccgttcgacgacatcttcaaggtcaaggggca
 gcgctggcgctggcacgaaggaaccttgaccacatgttcaccggcggtggctctgggtgatccggttcaacaacc
 acccgcgctcgaccaataacctgggtgagcgtcgccctgcagctcgaccggcgtgtctaccgaaaaccgacattccc
 gcgacgaggagttcgacgagttcctcggcggttcccgcagcatcggcgctcagttccgggacgcgctgccagtgcg
 cgactgggtcaagaccgaccgctgcagttctcgtcgaacgcctgcgtcggcgaccgctactgctgatgtgcacg
 cgaacgggttcacgaccgctcttccgggggctcgaaaaccggcggtgaccatccacgcgctcggcgcgccg
 ctcatcaaggcgtacgcgacgacgacttctccccggagcgttcgagttacatcgagcgcctcgagcaaaaagctttt
 ggaccacaacgacgacttctcagctgctgtacacggcgttctcggacttccgcctatgggacgcgctccaccggc
 tgtggcggtcggcactatctcggcgagttccggctgggtgcaagccacgcgaggtttcgcgcgctcgcgacgag
 ggcgacctcgatcacctcgacaacgaccgctacctcgggtacctgtgcgcggaatggagcagtagtaccagtt
 gttcaacgacgccaagccgaggtcgaggccgtgagcgcgggacaaagtccggcggaggagccgcttgcggattc
 acgcccctcatcgacgaacgagacttcgccaagccgatgttcggcttcgggtactgcatcaccggggacaagccgag
 ctcaacaactcgaagtacagcctgataccggcgatgaagctgatgtactggacgcaaacccgcgcccggcagaggt
 gaagaagtacttcgactacaaccggatgttcgcgctgctcaaggcgtacatcaccaccgcgcatcggcttggctctga
 agaagcagctgcaccaccaccaccaccactgaCAGCCAGTTACATCTATACCTGTAAGTTCATCCGA**GAAGGAGAT**
ACTAGTatgaacaacattcaattggatcaagcgaacgtcaagaagcatccccggggcgtaacgacgcgaccacacg
 cgtggccgagctggtacgtcgcgatgcgctcgaacggcctcagggacaagccgaaggagtgcagctttttggcc
 gtccgtacgtggcgtggcgcgacgcaagggcaggccgtggtgatggaccgccactgctgcacctggcgcgaac
 ctggctgacgggggatacaaggacgggtgcatccagtgcccgtttcaccactggcgctacgacgagcaaggcaagt
 cgttcacatccccggccacagcaggtggtgcgccagctggagccggtgccacgcgcccggcgccagccgacgttgg
 tcaccaccgagcgatacggctacgttgggtctggtacggctccccgcagccgctgcaccgcgtgccgaaatcacc
 gcagccgacgtcgacaacggcgacttcatgcaactgcacttcgcgttcgagacgacgacggcggtcttgcggatcgt
 cgagaacttctacgacgcacagcagcaacccccgtgcaccgcgtcccgatctcggccttcgaactcaagctcttcg
 acgactggagccggtggccggaggttgagtcgctggcccggcgggcgctggttcggtgcccgggatcgacttccac
 gtaaacggctacttcggccccctcggcatgtgtcgcgcgctcggcctgaaacatgtcgcagatgaacctgcactt
 cgatggctacccccgggggtcgtcatgaccgttgcctggacgcagacgtcaaatacaaacgtctccagtggtgga
 caccggtgagcgacggcaagaacatcatgcacatgctcatctcgatcaagaaggtggggcggtcctcgcgcgtgcg
 accgacttcgtgctgttcgggctgcagaccagacaggcagcgggtacgacgtcaaaaatcggaacgggatgaagcc
 cgacggcgggcggtacagcaagtagacaagctcgtgctcaagtaccgtgcttaccggcgtgggtcgacc
 gtgtcgcgagtgagcagcttaagcaccaccaccaccaccactga**ACTAGT**TCTAGA^{AAATTCGTCAAC}**GAATTC**AAG
 CTT**GATATC**ATTC

NheI, **RBS (SD)**, **NcoI**, **SacI**, **EcoRI**,
NdeI, **SpeI**, **XbaI**, **EcoRV**,
 Schnittstellen, **nagR/PnagAa**, **Start-**
und Stopp-Codon, **Gen. Ptac**



Pseudomonas protegens Pf-5 Tryptophan-Halogenase **PrnA**

GenBank: AAY92870.1

Extinktionskoeffizient (280 nm) Expasy (oxidized): 100770 M⁻¹ cm⁻¹

Molekulargewicht: 62.3 kDa

32. pET28a(+)-prnA-His₆:

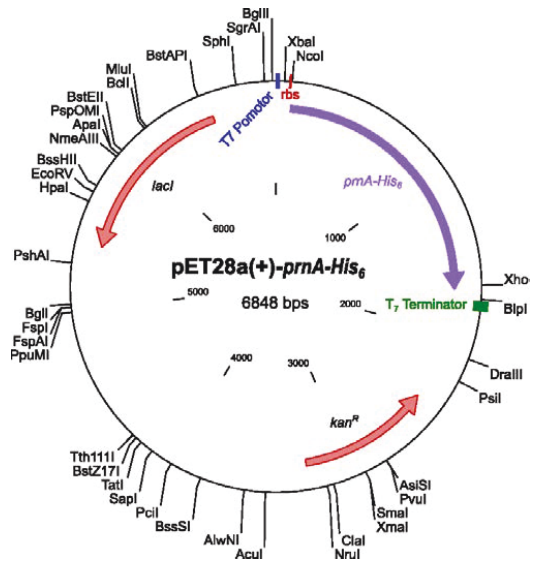
Aminosäuresequenz:

MGNKPIKNIIVIVGGGTAGWMAASYLVRALQQVNIITLIESAAIPRIGVGEATIPSLQKVFVDFLGIPIREWMPQVNG
AFKAAIKFVNWRKSPDPSREDYFYHLFGSVPNC DGVPLTHYWLKREQGFQQPMAYACYPPQALDGLKAPCLADGT
RQMSHAWHFD AHLVADFLKRWAVERGVNRVDEVVEVQLNDRGYISTLLTKEGRTLEADLFIDCSGMRGLLINQALK
EPFIDMSDYLLCDSAVASAVPND DAREGVEPYTSAIAMNSGWTWKI PMLGRFGSGYVFSKFTSRDQATADFLKLWG
LSDNQQLNQIKFRVGRNKRAWVNNCVS IGLSSCFLEPLESTGIYFIYAALYQLVKHFPDTSFDPRLRDAFNAEIVYM
FDDCRDFVQAHYFTTSREDTPFWLANRHELRLSDAIQEKVERYKAGLPLTTTSFDDSTYYETFDYEFKNFWLNGNYY
CIFAGLGMPLPDRSLPLLQHRPESIQKAEAMFASIRREAERLRTSLPTNYDYLRSLRDLGAQLSRNQHGPTLAAQERQL
EHHHHHH

Gensequenz:

TCTAGAAATAATTTTGTTAACTTTAAG**AAGGAG**ATATACCC**atggg**aaacaagccaatcaagaatatcgtcacgt
ggcgccggcaccgcgggctggatggcgcgttcctgtaacctcgtccggcgctccaacagcaggtaaacatcacgctca
tcgagctctgccccgatccccggatcggcgtggcgagggcaccatccccgagtttgacagaaggtgttcttcgacttc
ctcgggataccggagcgggagtgatgccccaaagtgaacggcgccctcaaggccgcgatcaagttcgtgaactggag
aaaatctcccgaaccaatcgcgcaagattacttctaccatttgctcggcagcgtgccgaactgcgacggcgtgccgc
ttaccactactggctcgcgaagcgcgaacagggttcacgaaccgatggcgtacgcgtgctaccgcagcccggg
gccctcgacggcaagctggcaacctgacctggccgacggcaccgccagatgtcccacgcgtggcacttcgacgcga
cctggtggccgacttcttgaagcgtggcggcgtcgagcgcgggtgaatcgctggtcgacgaggtcgtggaggttc
aactgaacgacccgcgctacatctccacctgttaaccaaggaagggcggacgctggaggcgacctgttcatcgac
tgctccggcatgaggggctcctgatcaatcaggccctgaaggaaccttcatcgacatgtccgactacctgctgtg
cgacagcgcggtcgccagcgcgtgccaacgacgacgcgcgagggggtcgagccgtacacctccgcaattgcc
tgaactcgggatggacctggaagattccgatgctggcgggttcggcagcggctacgtcttctccagaagttcacc
tcgcgccgaccaggccaaccgcgacttctcaaaactctgggacctcgcgacaatcagcagctcaaccagatcaagtt
ccgggtcgggcgcaacaagcggcgtgggtcaacaactgcgtctcgatcgggctgctgctgctgttctggagcccc
tggaatcgacgggaatctacttcatctacgcggcgtttaccaactcgtgaagcacttccccgacacctcgttcgac
ccgcggttgccgacgcattcaacgcccagatcgtctacatgttcgacgactgccgagacttctgcccaggcgaacta
tttcaactcgtcgcgcaagacacgcccgttctggctcggaacggcgaacgactgcggctctcggacgccatccagg
agaaggtgagcgtacaagcggggtgccactgaccaccacctcgttcgacgattccactactacgagacgttc
gactacgagttcaagaactctggttgaacggcaactactactgcatctttgcccggctgggcatgctgccgaccg
gtcgtgcccgtcctcgacgacccgacggagtcgatccagaaggccgaagcgtatgttcgccagcatccggcgcgaag
ccgagcgcctcgccagcagcctgccgacgaactacgactacctgcccgtcactgcgtgacggcgcgacgctgtcgcg
aaccagcacgggccgacgctcgggcccaggaacgcagctcgag**CACCACCACCACCACCAC**tgagATCCGGCTGC
TAACAAAGCCC GAAAGGAAG

XbaI, Ribosombindestelle (RBS), NcoI, start and stop codon, XhoI, HIS-TAG



14.2 Strukturen und Spektren

14.2.1 GC-MS Spektren

Massenspektren zu den GC-MS-Chromatogrammen von MDA, APRN und PRN aus der Abbildung 61.

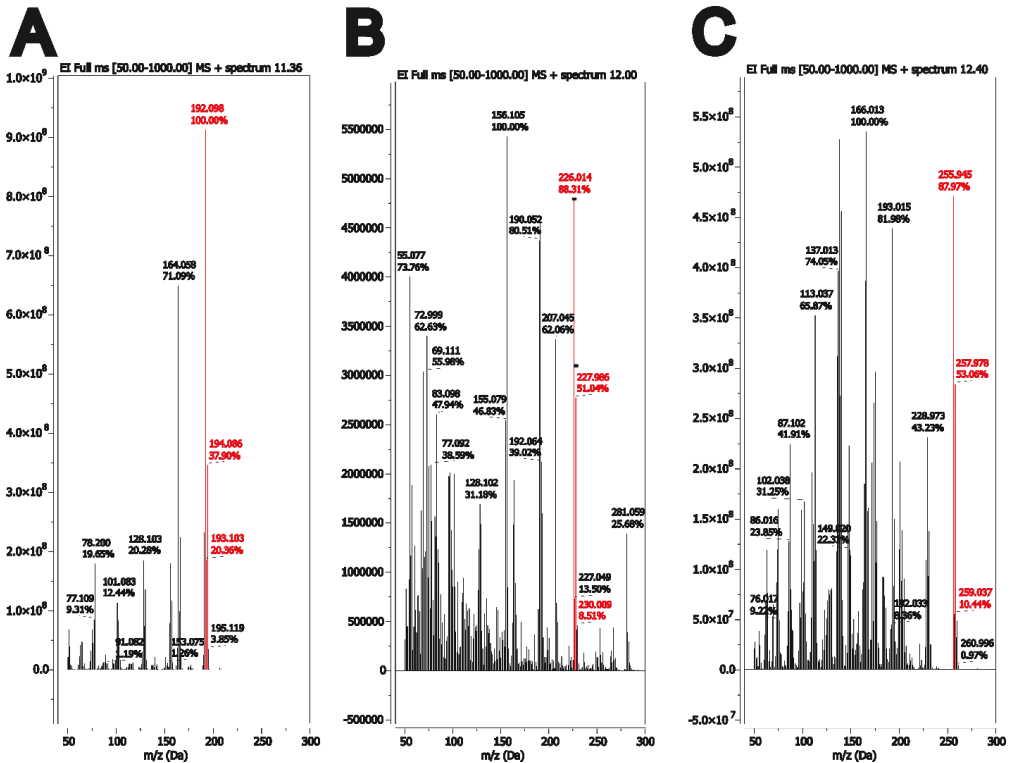


Abbildung 116: Massenspektren der extrahierten GC-MS-Chromatogramme von MDA (**22c**), APRN (**22b**) und PRN (**22a**). Hierbei zeigt MDA (A) der Retentionszeit von 11.36 min die spezifischen Massen m/z: 192.098, 194.086 im Verhältnis 3:1. Für APRN (B) der Retentionszeit 12.00 min ist das Isotopenmuster m/z: 226.014, 227.986, 230.009 im Verhältnis 9:6:1. PRN (C) mit Retentionszeit 12.34 min hat die Massen m/z: 255.945, 257.978, 259.037 im Verhältnis 9:6:1.

Chromatogramme der Substrate und Umsetzungen in der Untersuchung des Substratspektrums von PrnC.

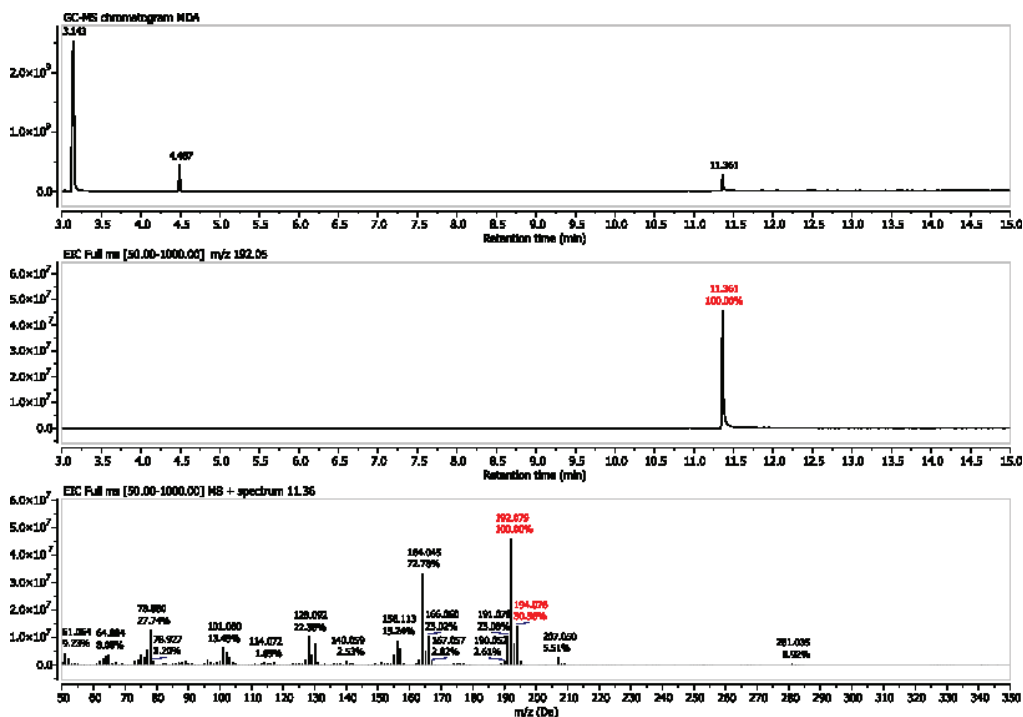


Abbildung 117: GC-MS-Chromatogramm von MDA (**22c**) (11.36 min) als DMSO-Stock (3.14 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von 60 μM (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.49 min).

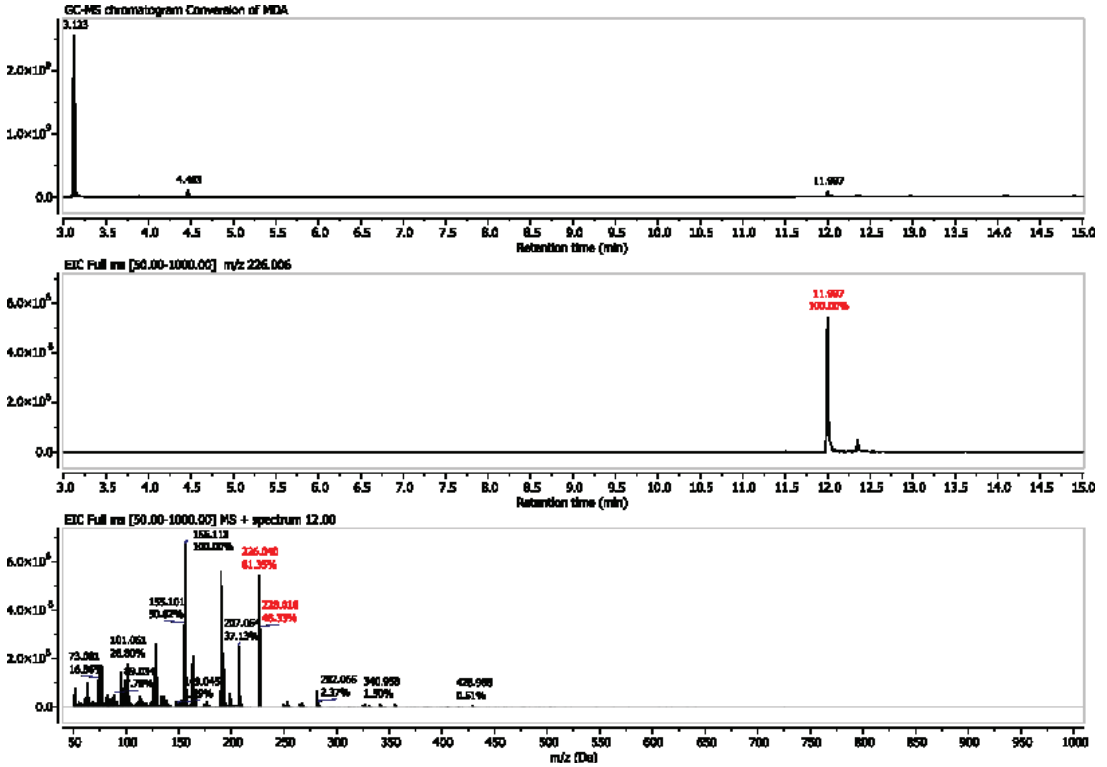


Abbildung 118: GC-MS-Chromatogramm der Umsetzung von MDA (22c) zu APRN (22b) (12.00 min). Die Reaktion wurde für 1 h bei 35 °C durchgeführt. Das zusätzliche Signal bei 12.35 min ist ein oxidatives Nebenprodukt.

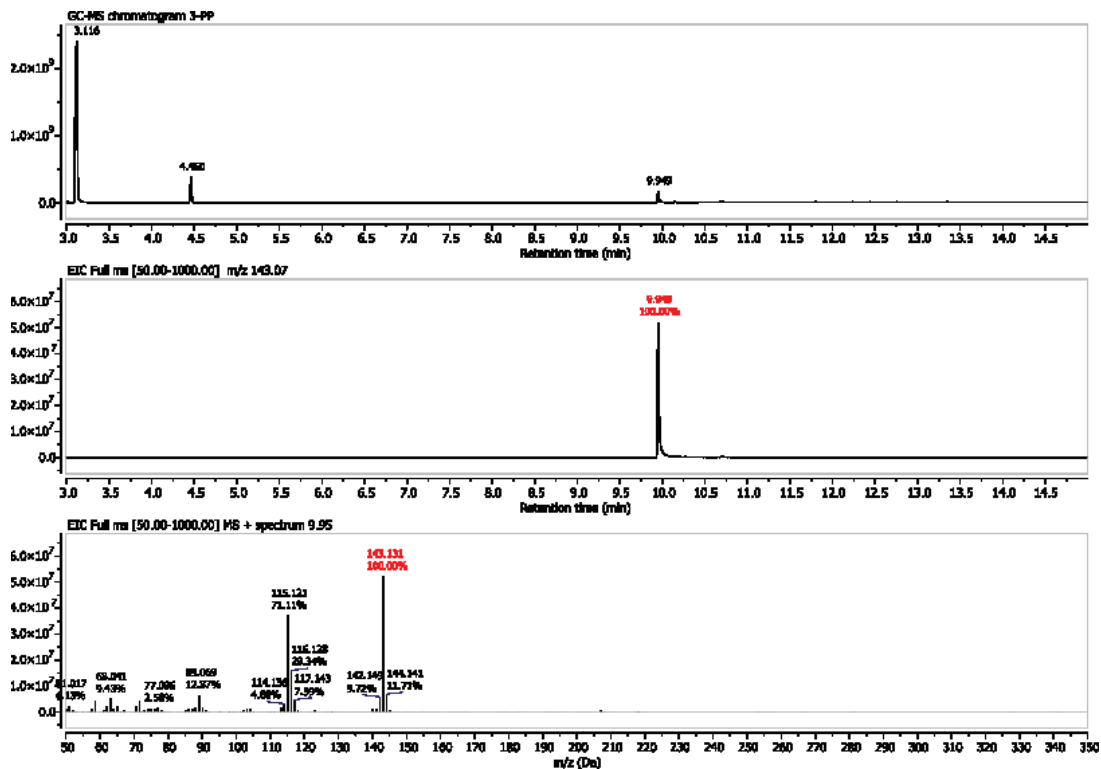


Abbildung 119: GC-MS-Chromatogramm von 3-PP (**22j**) (9.95 min) als DMSO-Stock (3.12 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.46 min).

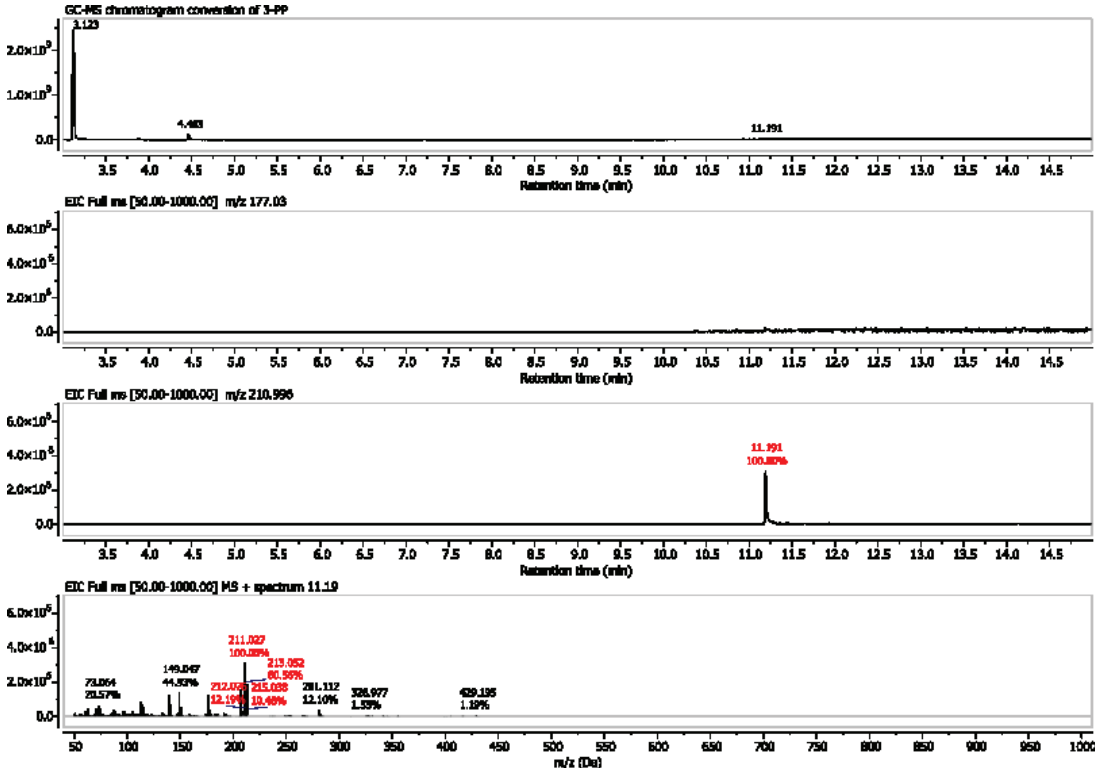


Abbildung 120: GC-MS-Chromatogramm der Umsetzung von 3-PP (22j) zu doppelt chloriertem 3-PP (11.19 min). Monochloriertes Produkt (m/z 177.03) konnte nicht detektiert werden. Die Reaktion wurde für 1 h bei 35 °C durchgeführt.

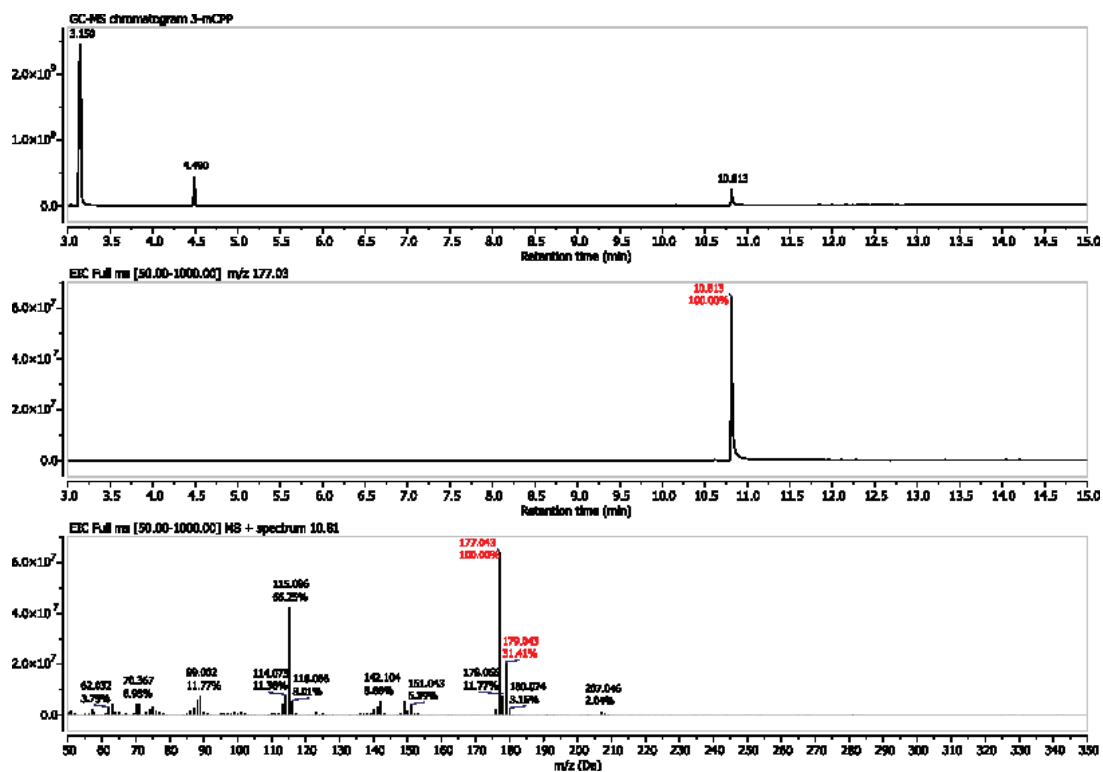


Abbildung 121: GC-MS-Chromatogramm von 3-mCPP (22k) (10.81 min) als DMSO-Stock (3.15 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.49 min).

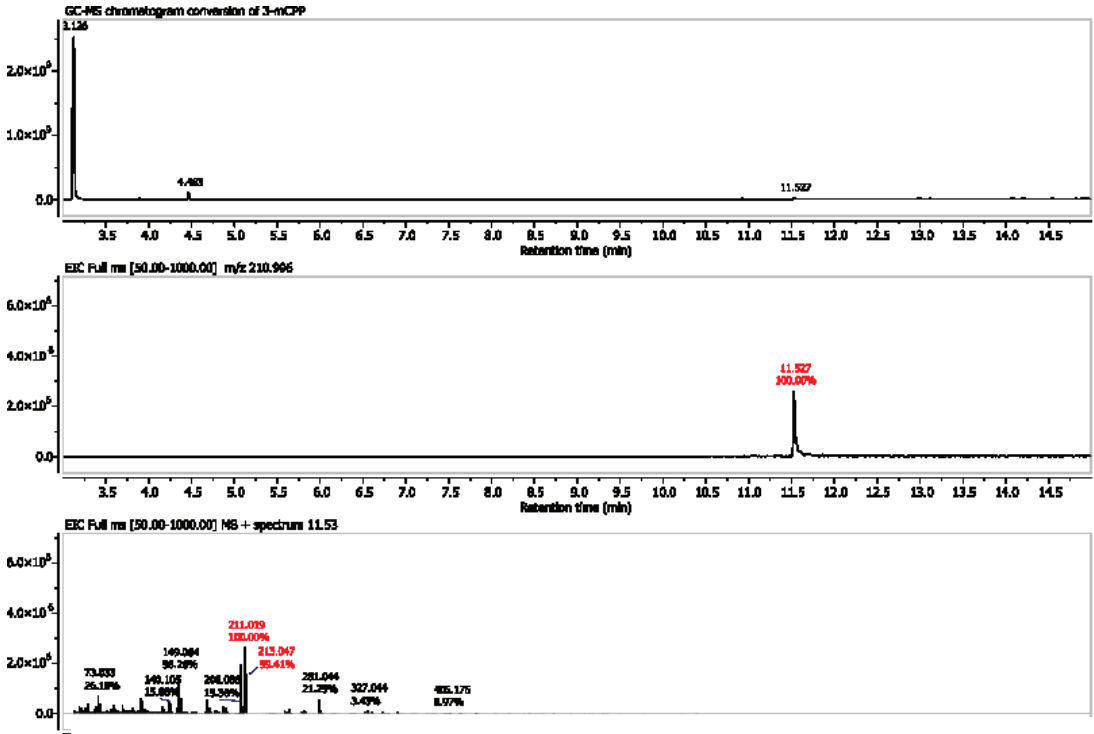


Abbildung 122: GC-MS-Chromatogramm der Umsetzung von 3-mCPP (22) zu monochloriertem 3-mCPP (11.53 min). Die Reaktion wurde für 1 h bei 35 °C durchgeführt.

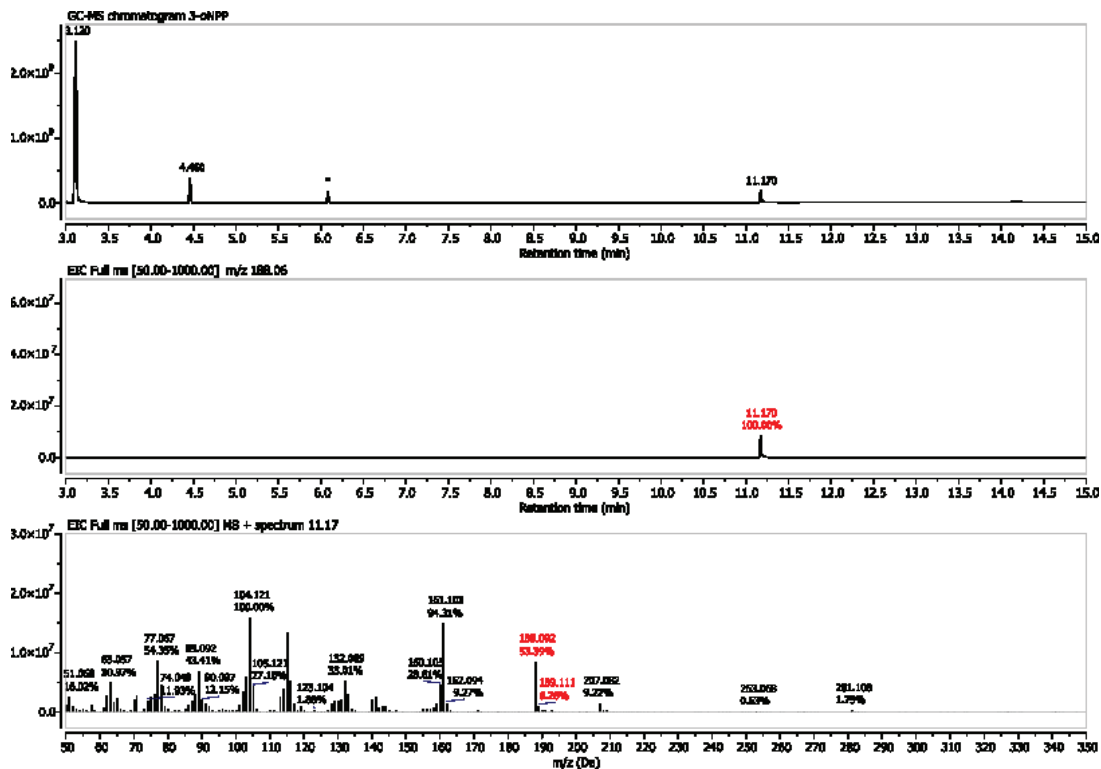


Abbildung 123: GC-MS-Chromatogramm von 3-oNPP (22i) (11.17 min) als DMSO-Stock (3.12 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von 60 μM (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.46 min). Das Signal bei 6.08 min (*) ist eine Verunreinigung.

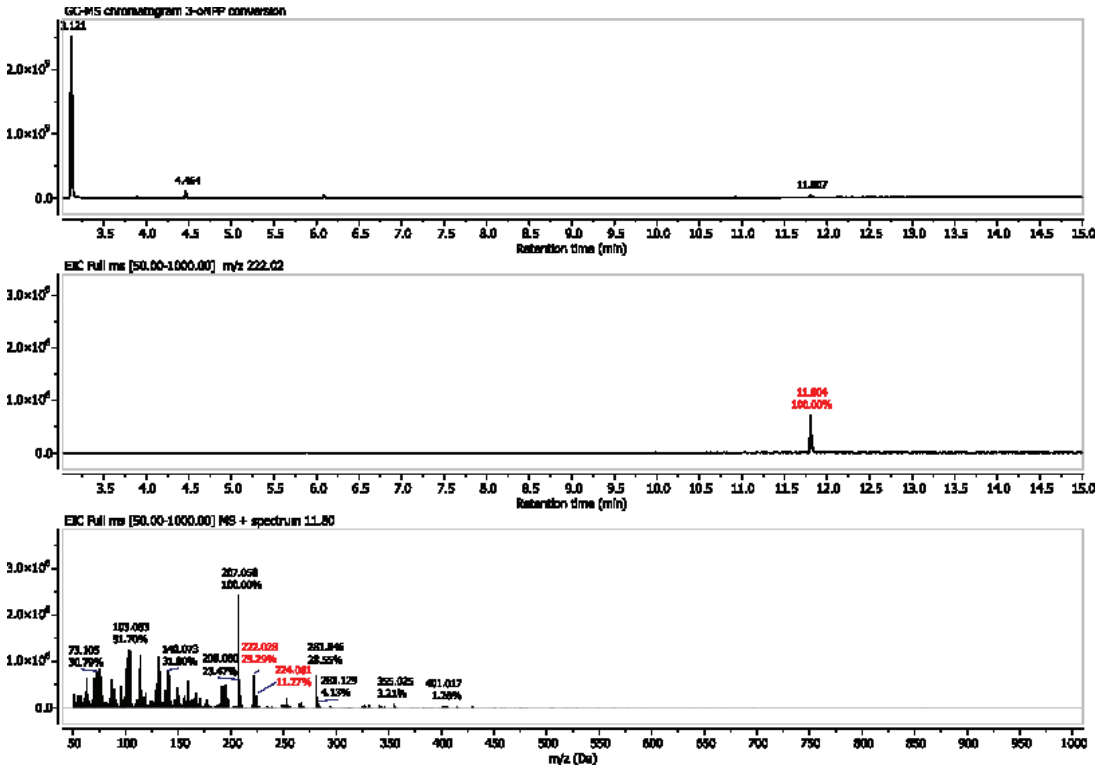


Abbildung 124: GC-MS-Chromatogramm zur Umsetzung von 3-oNPP (22i) zum monochlorierten 3-oNPP (11.80 min). Die Reaktion wurde für 1 h bei 35 °C durchgeführt.

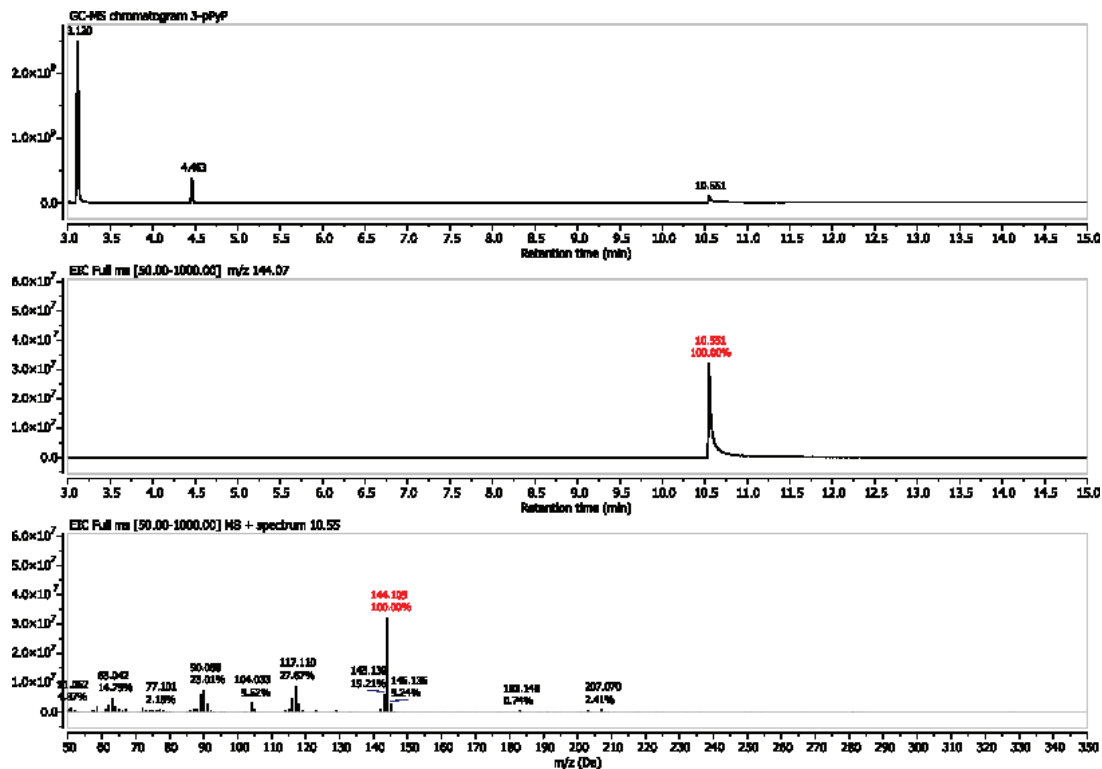


Abbildung 125: GC-MS-Chromatogramm von 3-pPyP (221) (10.55 min) als DMSO-Stock (3.12 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von $60 \mu\text{M}$ (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.46 min).

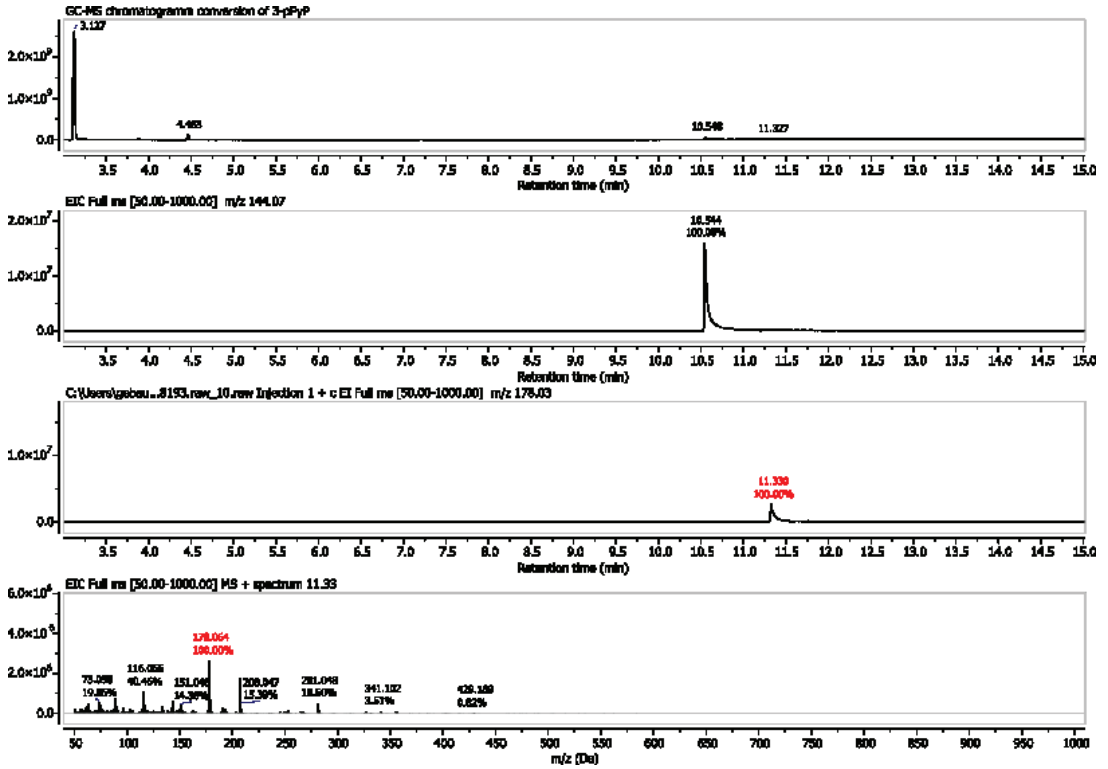


Abbildung 126: GC-MS-Chromatogramm zur Umsetzung von 3-pPyP (221) (10.54 min) zum monochlorierten 3-pPyP (11.33 min). Bei dieser Umsetzung war das Substrat nach 1 h Reaktionszeit und 35 °C Reaktionstemperatur als Hauptsignal noch detektierbar.

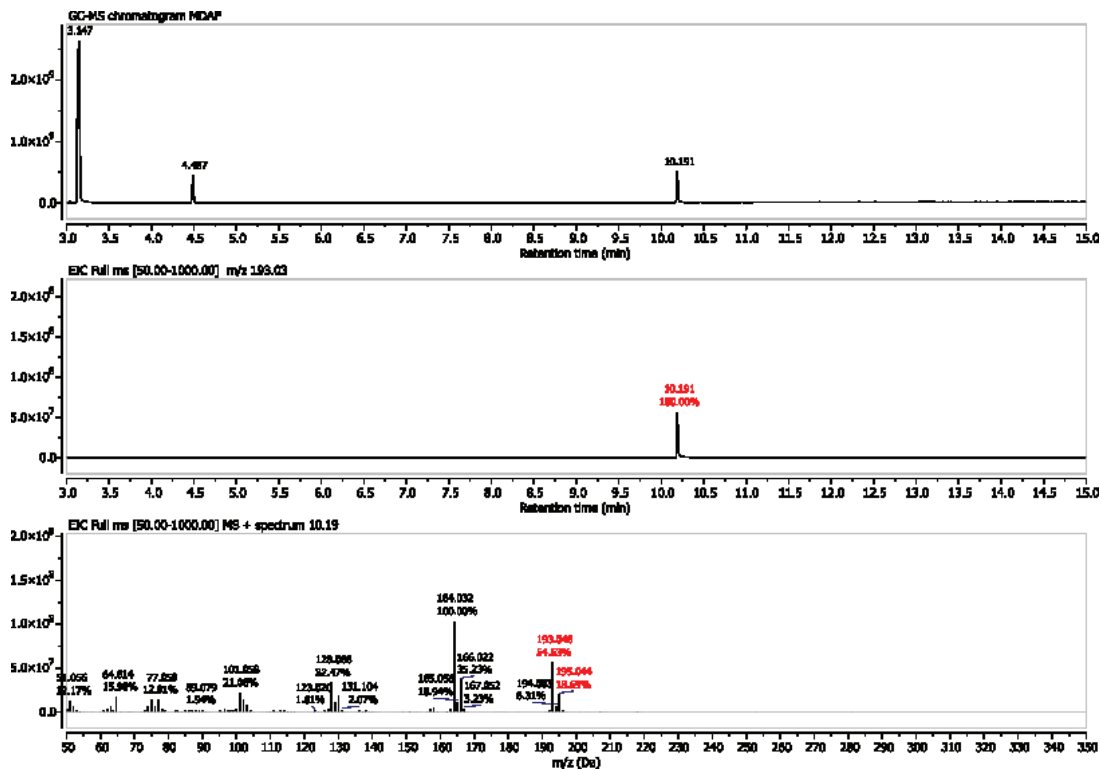


Abbildung 127: GC-MS-Chromatogramm von MDAF (44) (10.19 min) als DMSO-Stock (3.15 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von 60 μM (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.49 min).

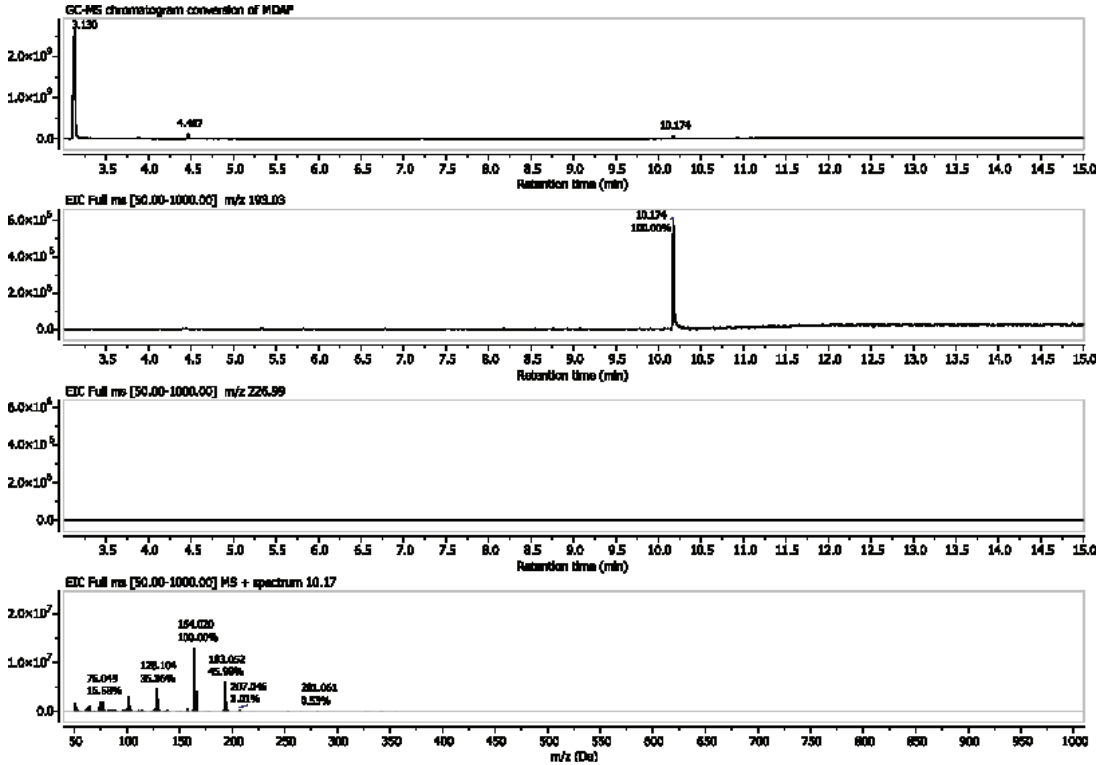


Abbildung 128: GC-MS-Chromatogramm zur Umsetzung von MDAF (44) (10.17 min). Bei dieser Umsetzung war nach 1 h Reaktionszeit und 35 °C Reaktionstemperatur kein Produkt detektierbar. Anstelle eines monochlorierten Produktes (m/z 266.99) war nur das Substrat-Signal erkennbar.

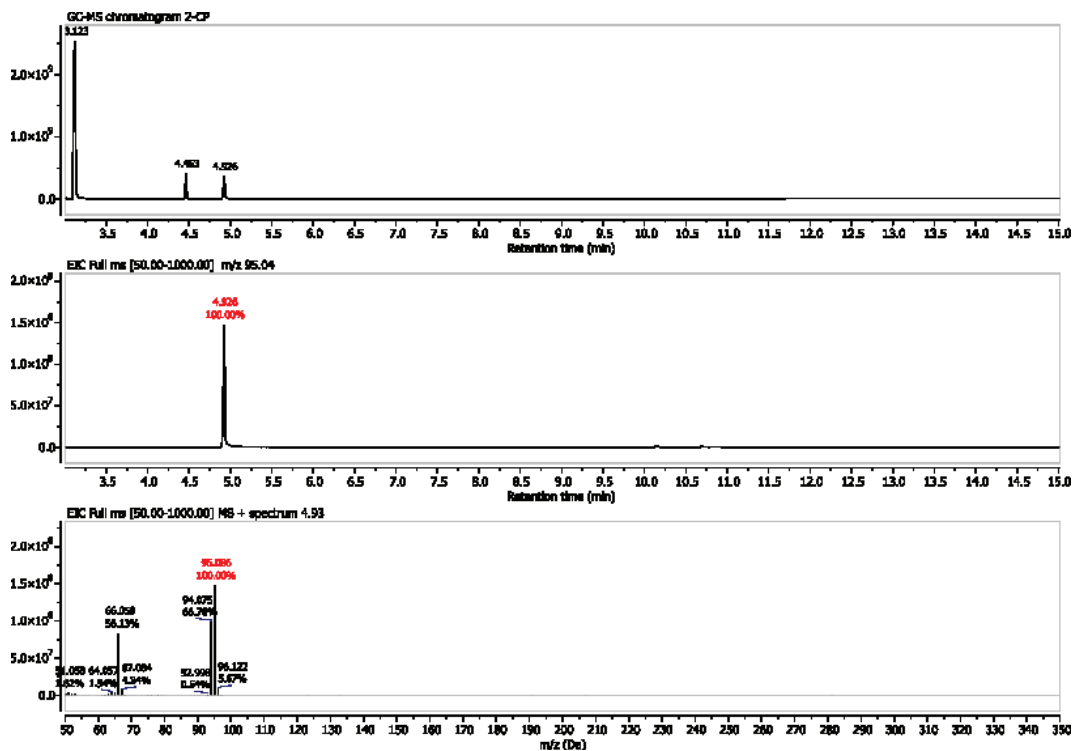


Abbildung 129: GC-MS-Chromatogramm von 2-CaP (26g) (4.93 min) als DMSO-Stock (3.12 min) gelöst in Reaktionspuffer zu einer Konzentration von 60 μM (5 % (v/v) DMSO). Extraktion erfolgte mit Essigsäureethylester. Gelöst war darin IS *m*-Chlortoluol (4.46 min).

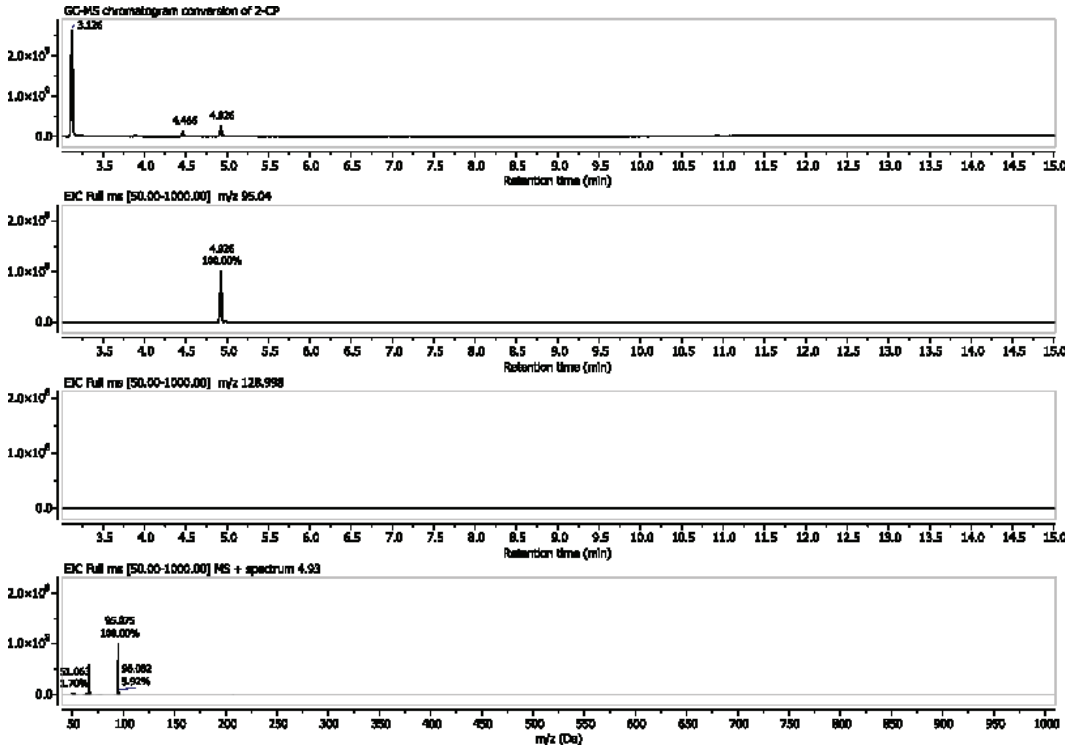


Abbildung 130: GC-MS-Chromatogramm zur Umsetzung von 2-CaP (**26g**) (4.93 min). Bei dieser Umsetzung war nach 1 h Reaktionszeit und 35 °C Reaktionstemperatur kein Produkt detektierbar. Anstelle eines monochlorierten Produktes (m/z 129.00) war nur das Substrat-Signal erkennbar.

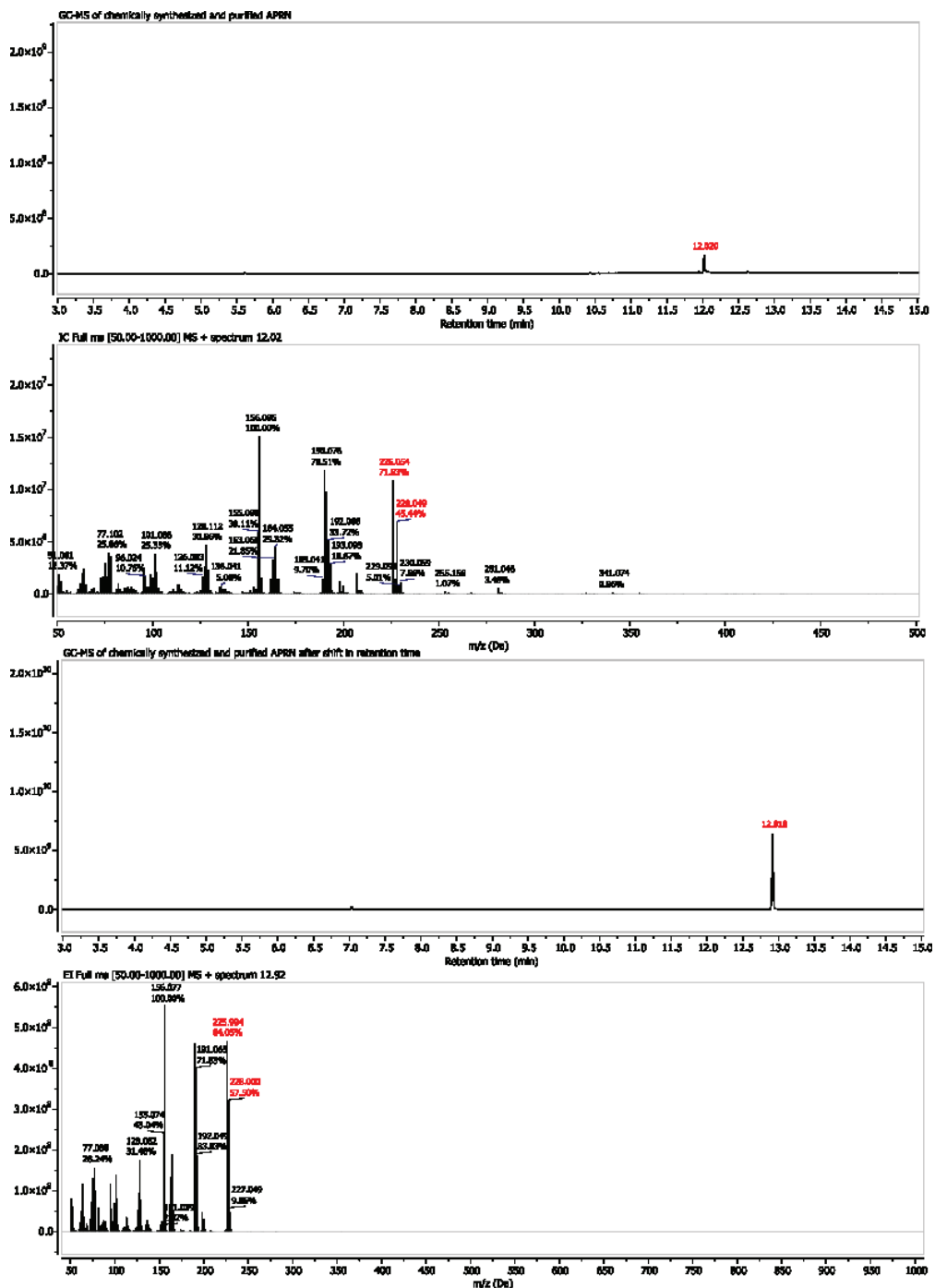


Abbildung 131: GC-MS-Chromatogramm des chemisch synthetisierten APRN (**22b**) nach Reinigung. Das obere Chromatogramm wurde vor der Verschiebung der Retentionszeit (~12.0 min) aufgenommen. Das untere Chromatogramm zeigt APRN (**22b**) nach der Verschiebung der Retentionszeit (~12.9 min). Die Verschiebung trat nach dem Wechsel der Gas-Kutsche auf.

Chromatogramme zur Kalibrierung von APRN (**22b**). Durch den Wechsel der Gas-Katusehe kam es zu einer Verschiebung der Retentionszeit um 0.8 min. Dass es sich um die gleiche Substanz handelt, zeigen die MS-Daten.

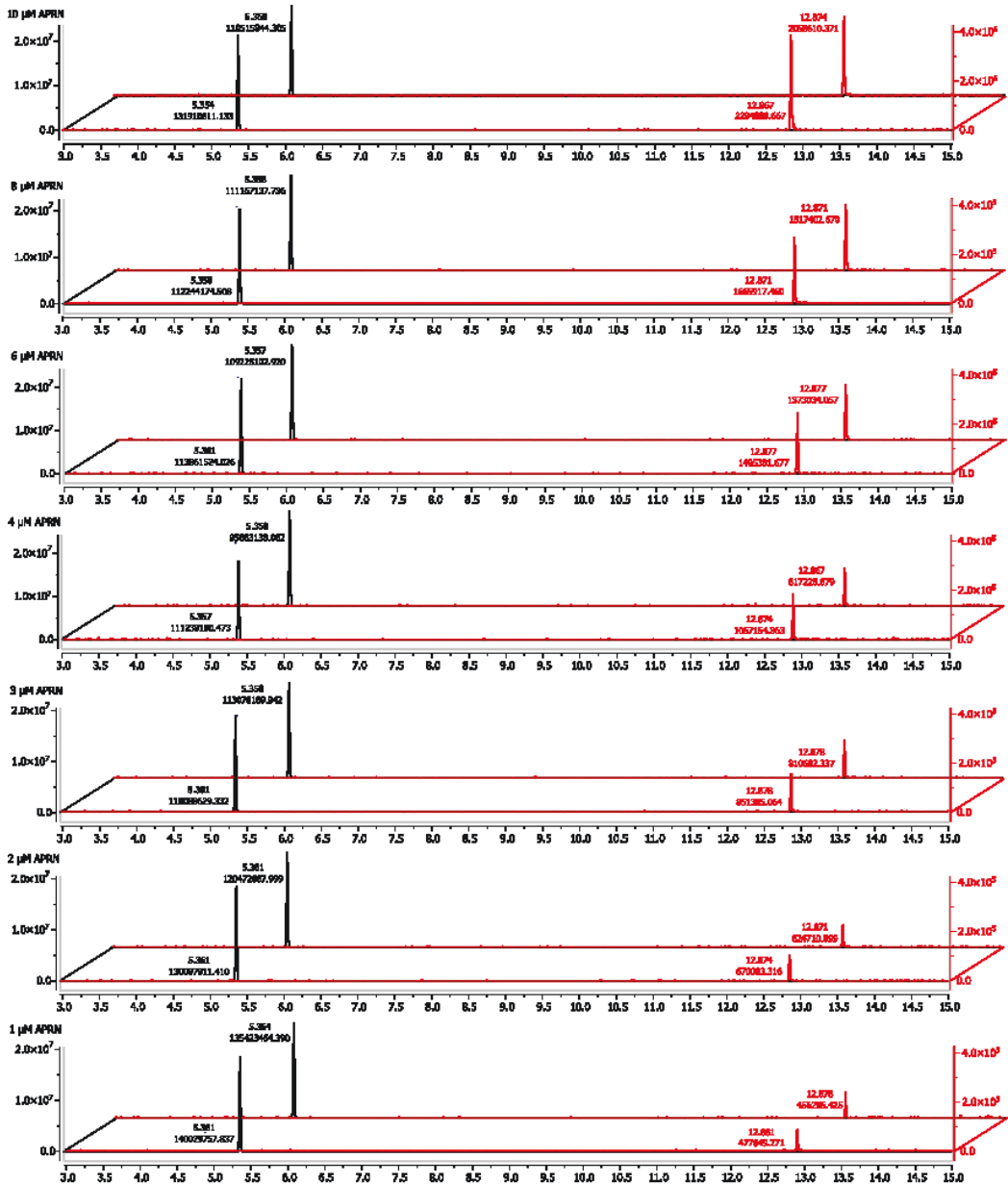
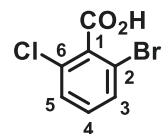


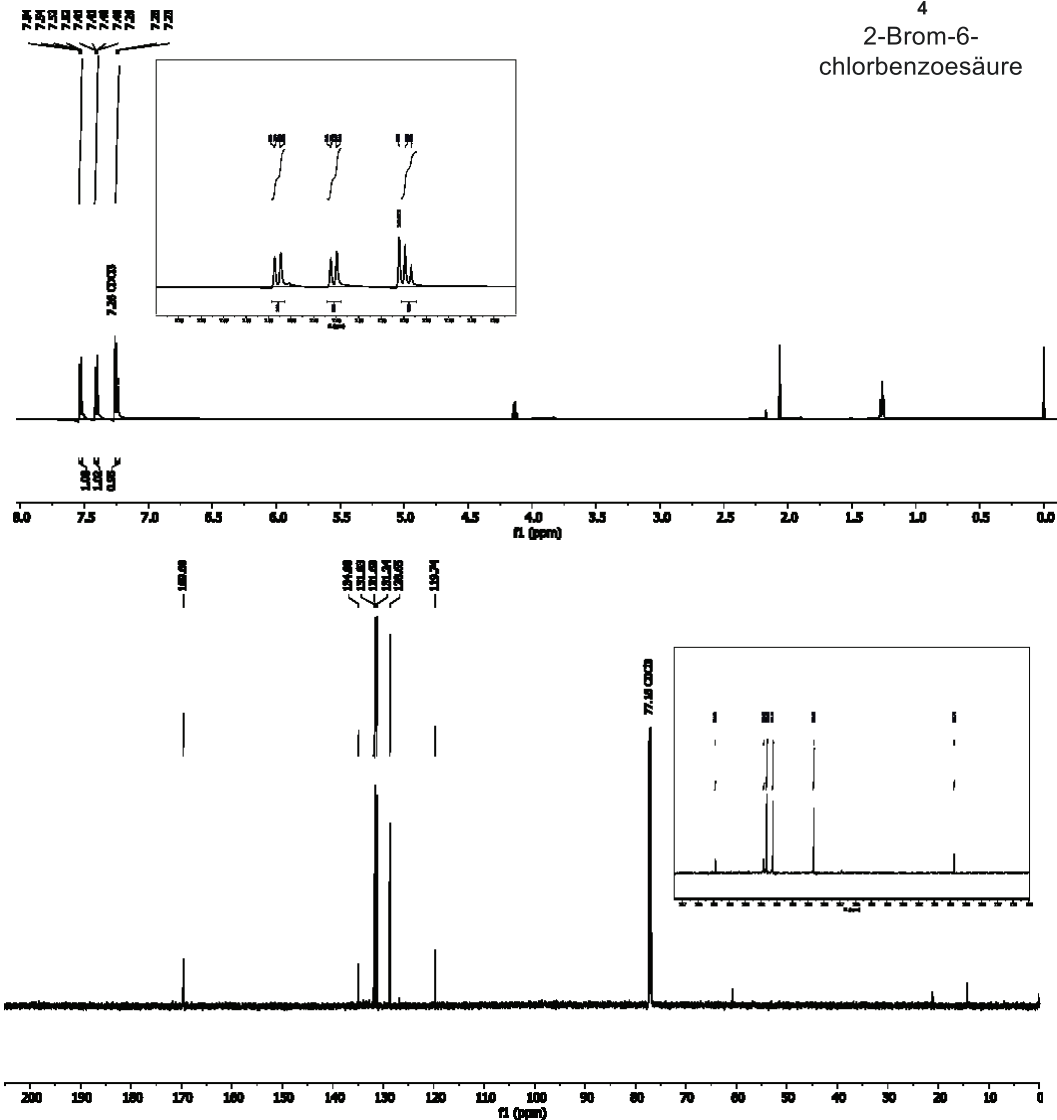
Abbildung 132: GC-MS-Chromatogramme zur Kalibrierung von APRN (**22b**). In schwarz gezeigt sind die extrahierten Ionen-Chromatogramme (EIC) des IS *m*-Chlortoluol (5.36 min) und in rot die EIC von APRN (**22b**) (12.88 min). Jede Ebene repräsentiert die Chromatogramme der verschiedenen APRN-Konzentrationen (1 µM – 10 µM) als Duplikate. Die obere Nummer jedes Signals gibt die Retentionszeit in Minuten und die untere Nummer die Gesamtfläche des Signals an.

14.2.2 NMR-Spektren

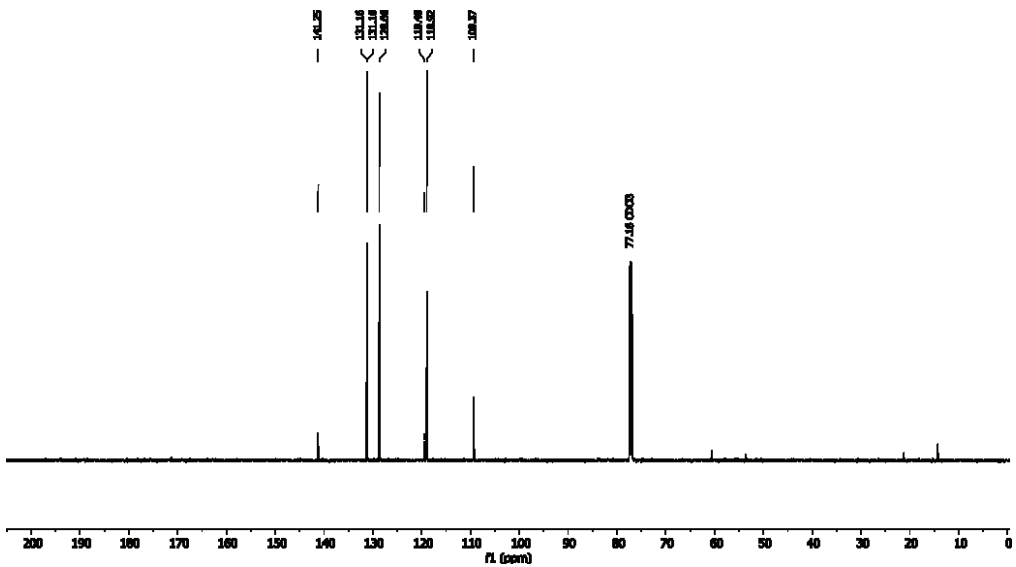
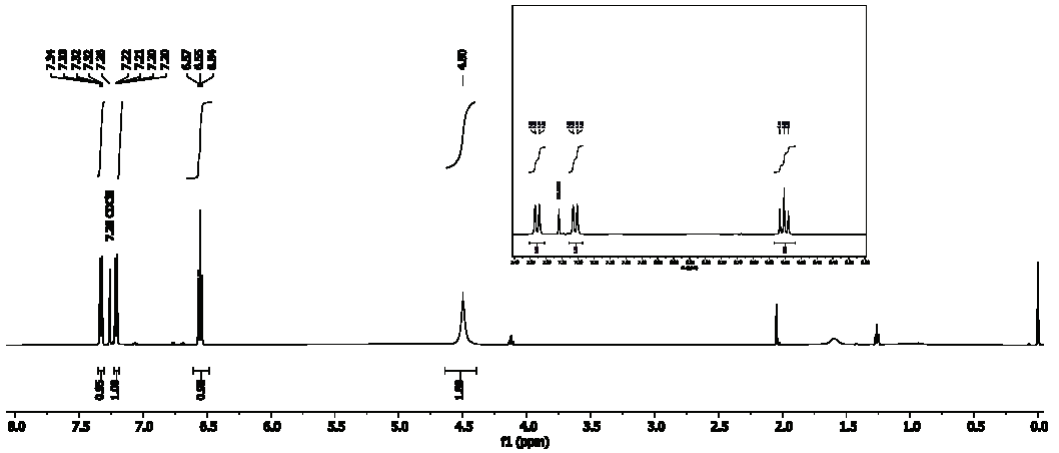
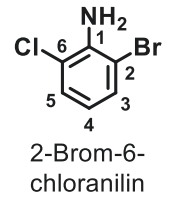
14.2.2.1 2-Brom-6-chlorbenzoesäure (39):

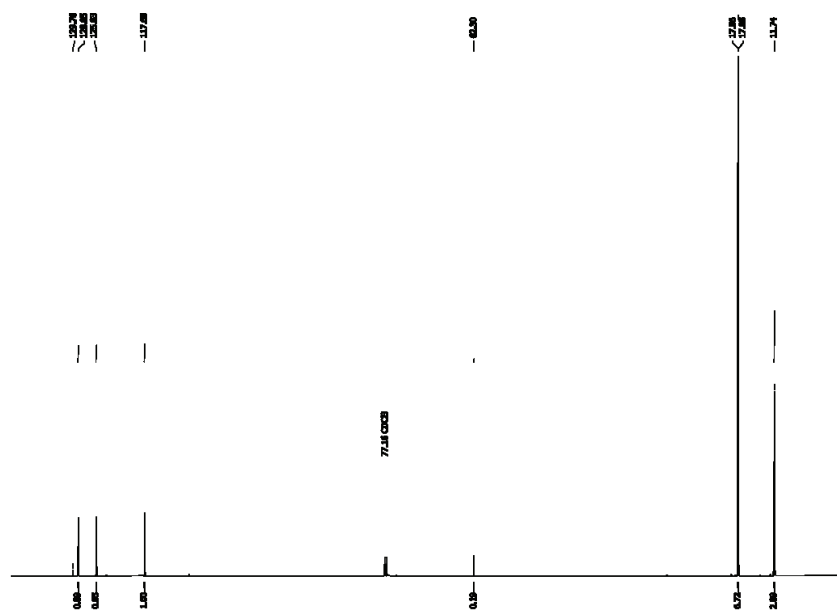
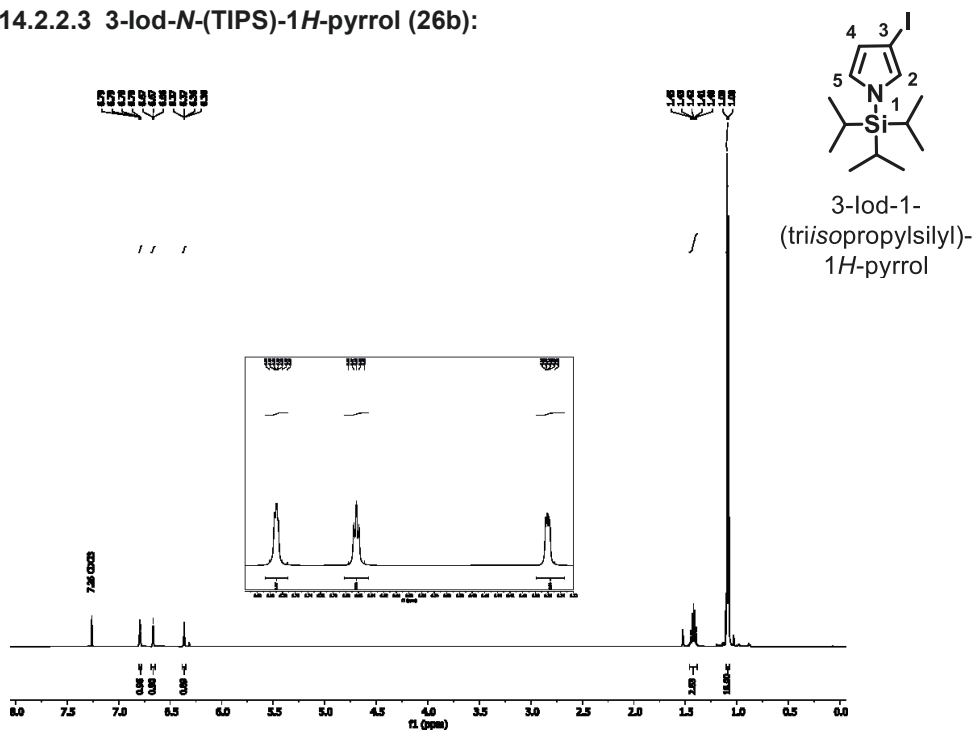


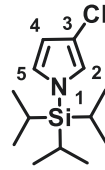
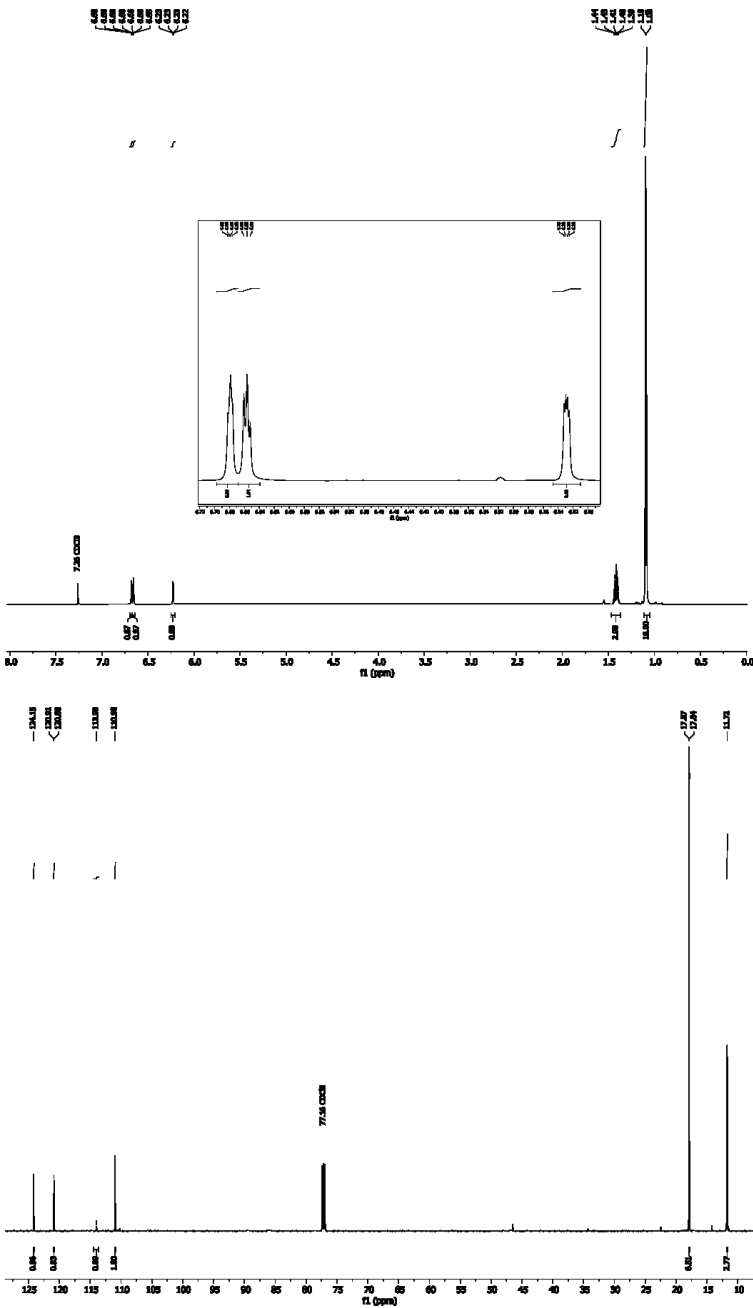
2-Brom-6-chlorbenzoesäure

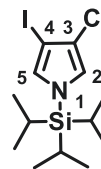
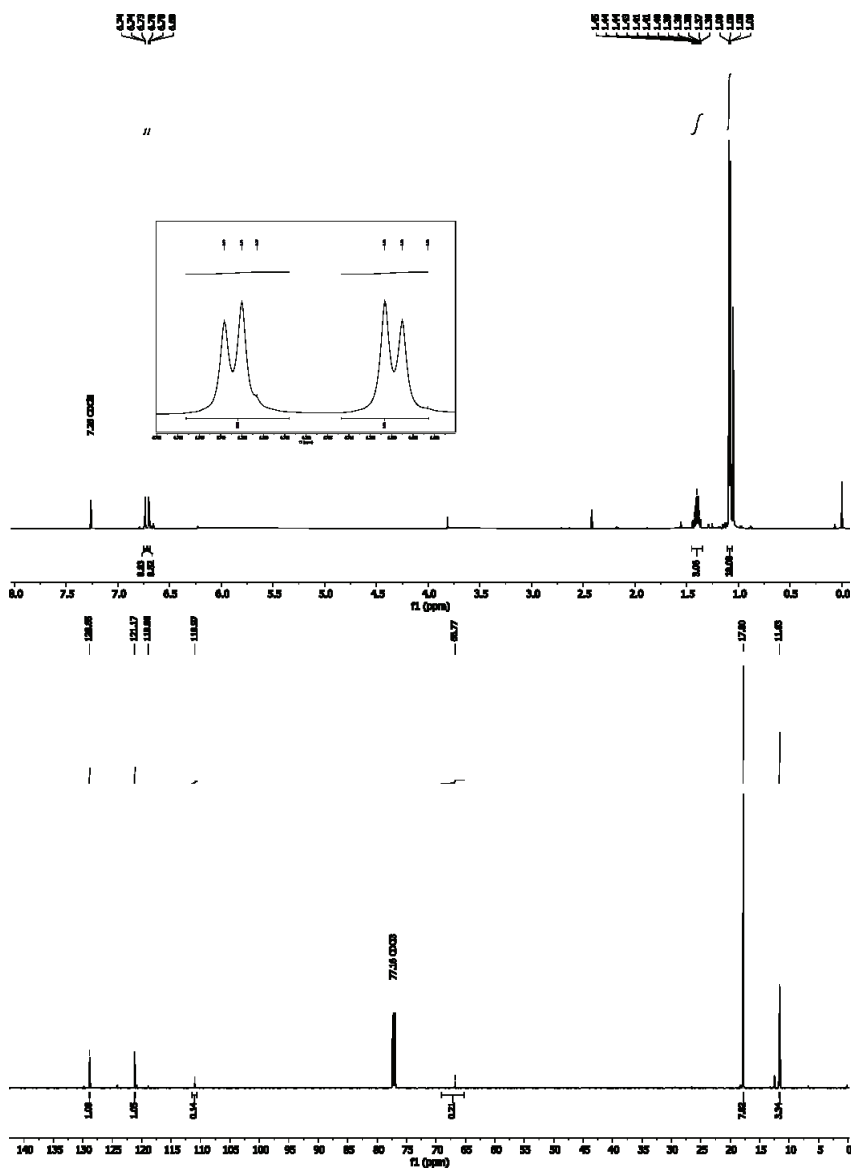
Abbildung 133: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **39** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

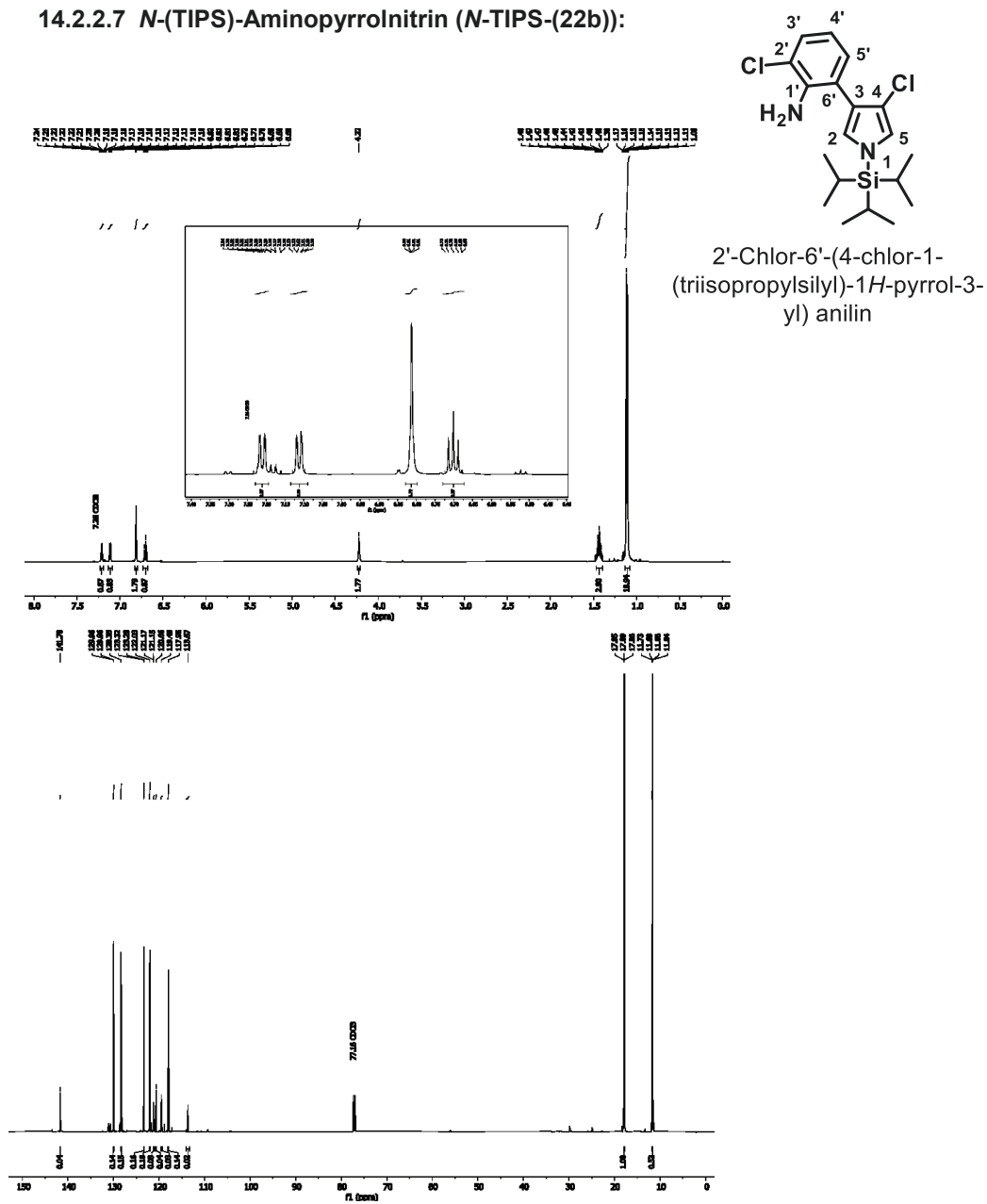
14.2.2.2 2-Brom-6-chloranilin (40):

Abbildung 134: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von 40 in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

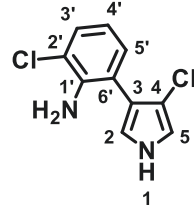
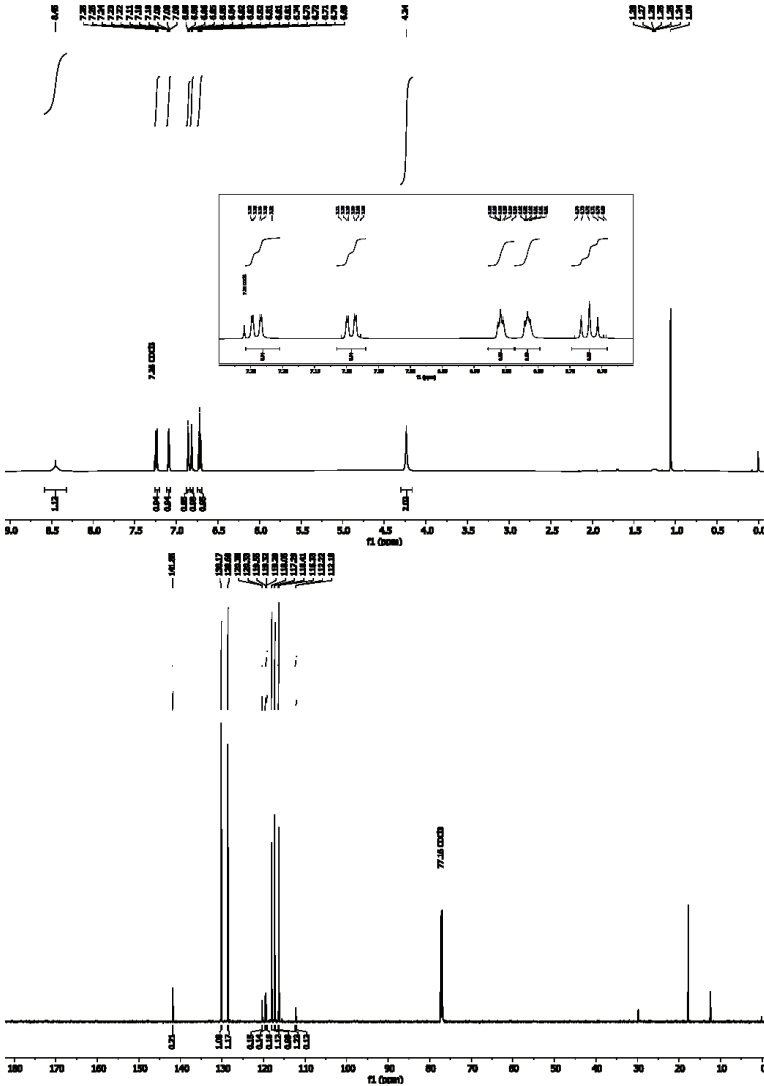
14.2.2.3 3-Iod-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (26b):Abbildung 135: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von **26b** in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

14.2.2.4 3-Chlor-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (26c):3-Chlor-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrolAbbildung 136: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **26c** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

14.2.2.5 3-Chlor-4-iod-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (26d)3-Chlor-4-iod-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrolAbbildung 137: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von 26d in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).

14.2.2.7 *N*-(TIPS)-Aminopyrrolnitrin (*N*-TIPS-(22b)):Abbildung 139: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren von *N*-TIPS-22b in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).^[279]

14.2.2.8 Aminopyrrolnitrin (APRN) (22b):

2'-Chlor-6'-(4-chlor-1*H*-pyrrol-3-yl) anilinAbbildung 140: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von **22b** in CDCl_3 (600 MHz/151 MHz).^[279]

Quantitatives NMR:

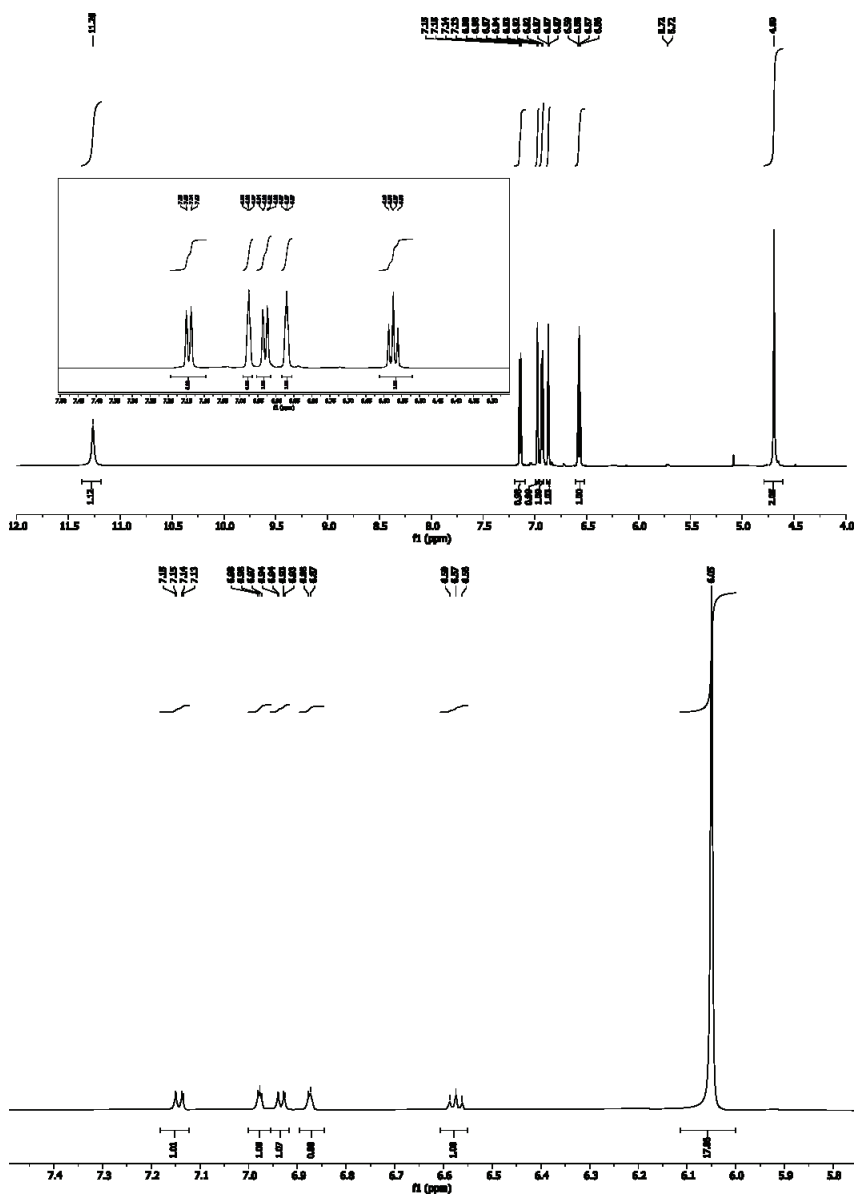
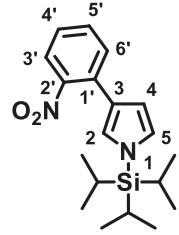
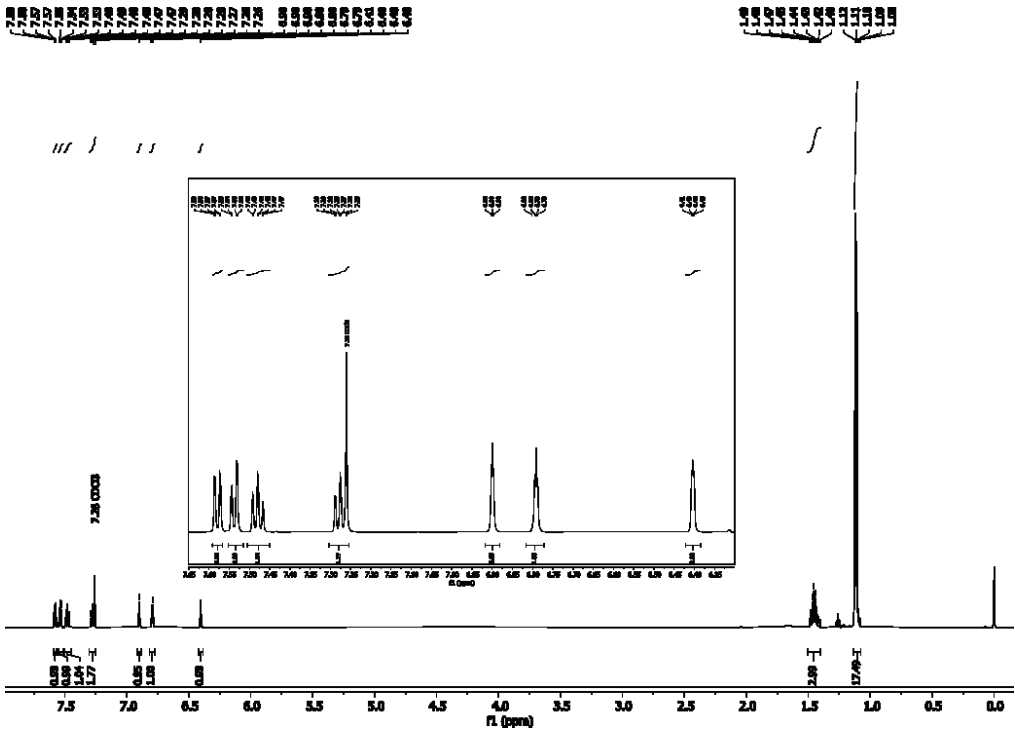
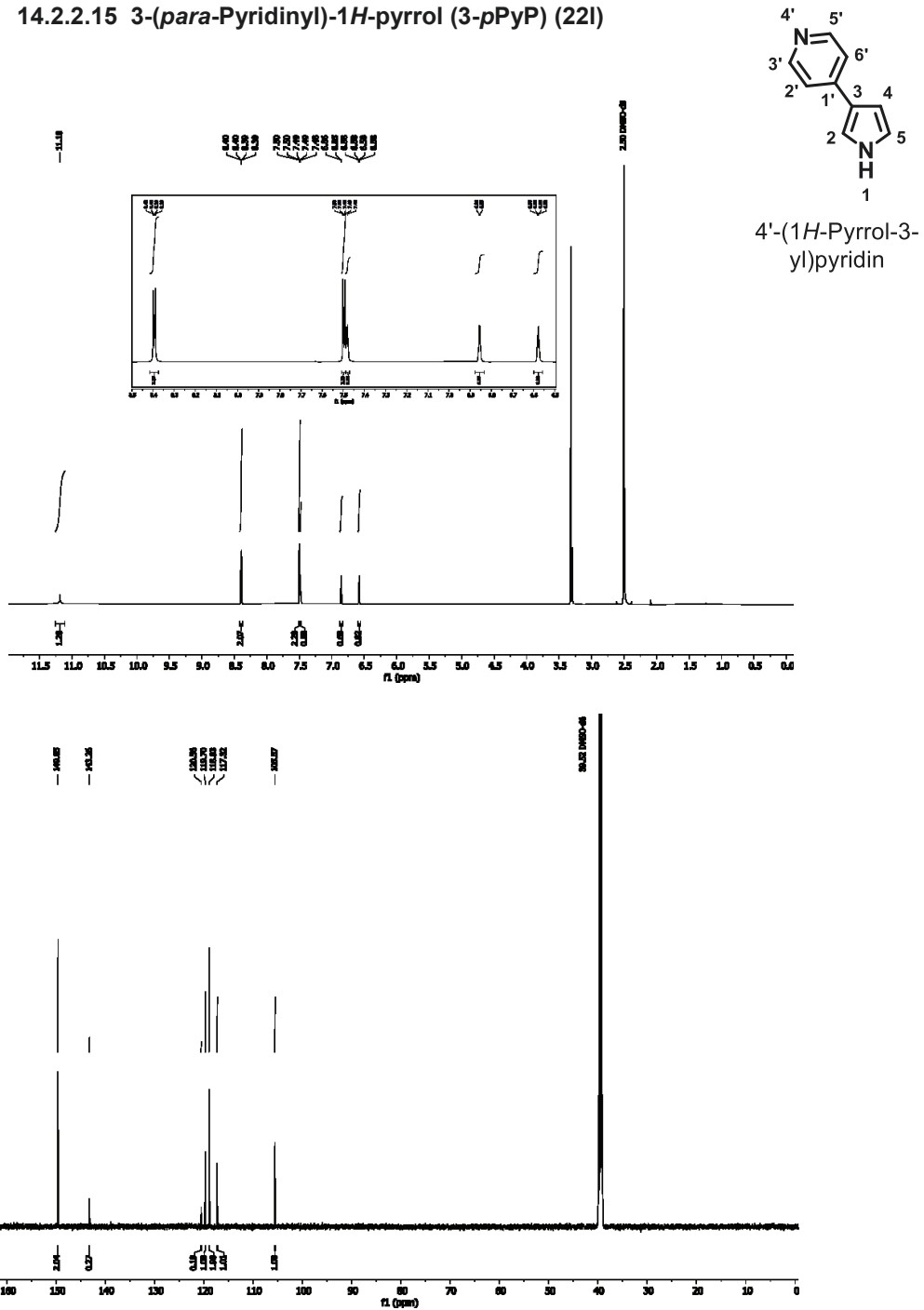
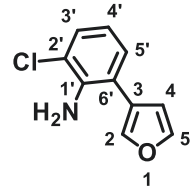


Abbildung 141: ^1H -qNMR-Spektrum von **22b** in DMSO-d_6 (600 MHz/151 MHz). Das obere Spektrum zeigt APRN ohne internen Standard. Das untere Spektrum zeigt die aromatischen Protonen von APRN, sowie das 1,3,5-Trimethoxybenzol (6.05 ppm) als Referenz (15.8 mg; 0.09 mmol). Die Reinheit wurde durch Verunreinigung mit BPIn auf 50 % berechnet.

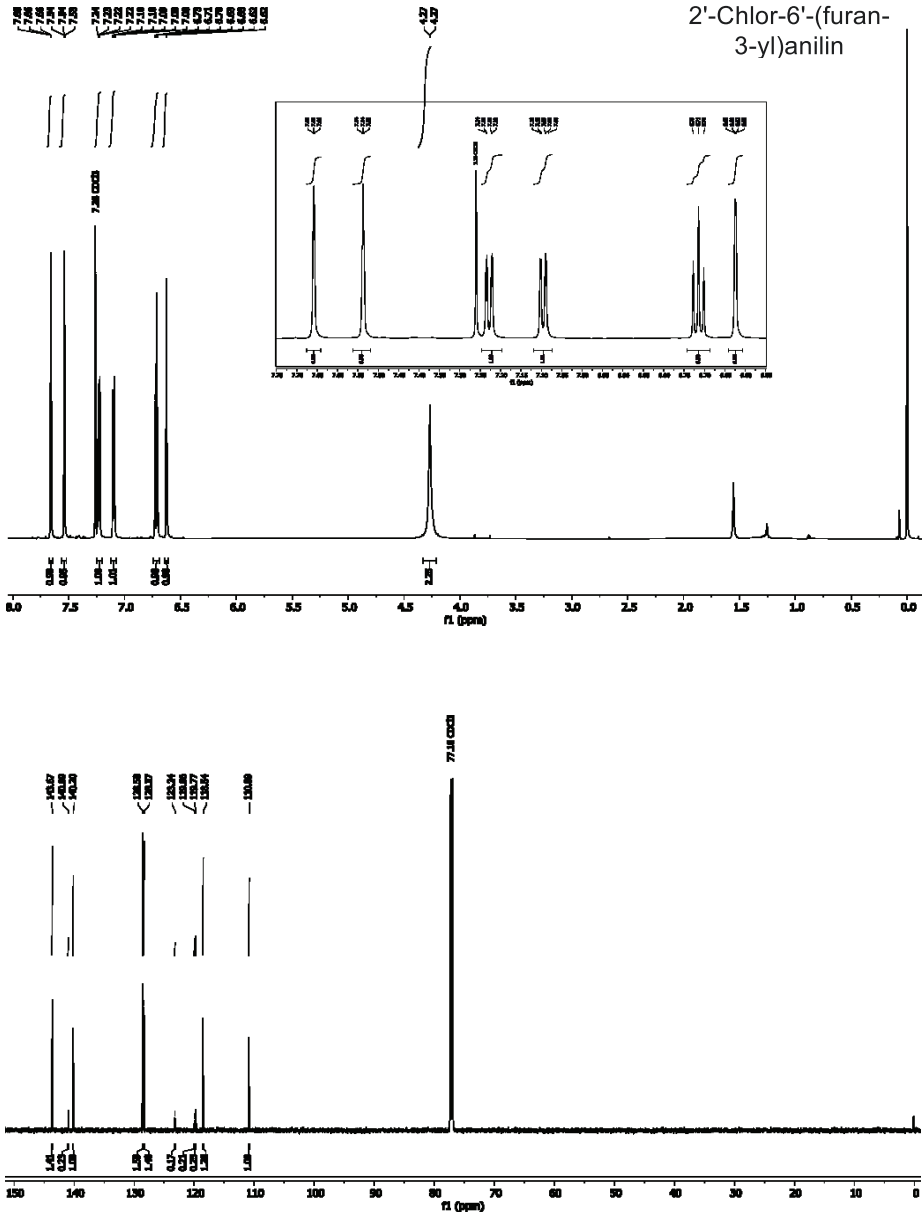
14.2.2.11 3-(*o*-Nitrophenyl)-*N*-(TIPS)-1*H*-pyrrol (*N*-TIPS-22i):3-(2'-Nitrophenyl)-1-(triisopropylsilyl)-1*H*-pyrrolAbbildung 144: ¹H-NMR-Spektrum von *N*-TIPS-22i in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

14.2.2.15 3-(*para*-Pyridinyl)-1*H*-pyrrol (3-*p*PyP) (221)Abbildung 148: ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren von 221 in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz/ ^{13}C 151 MHz).^[371]

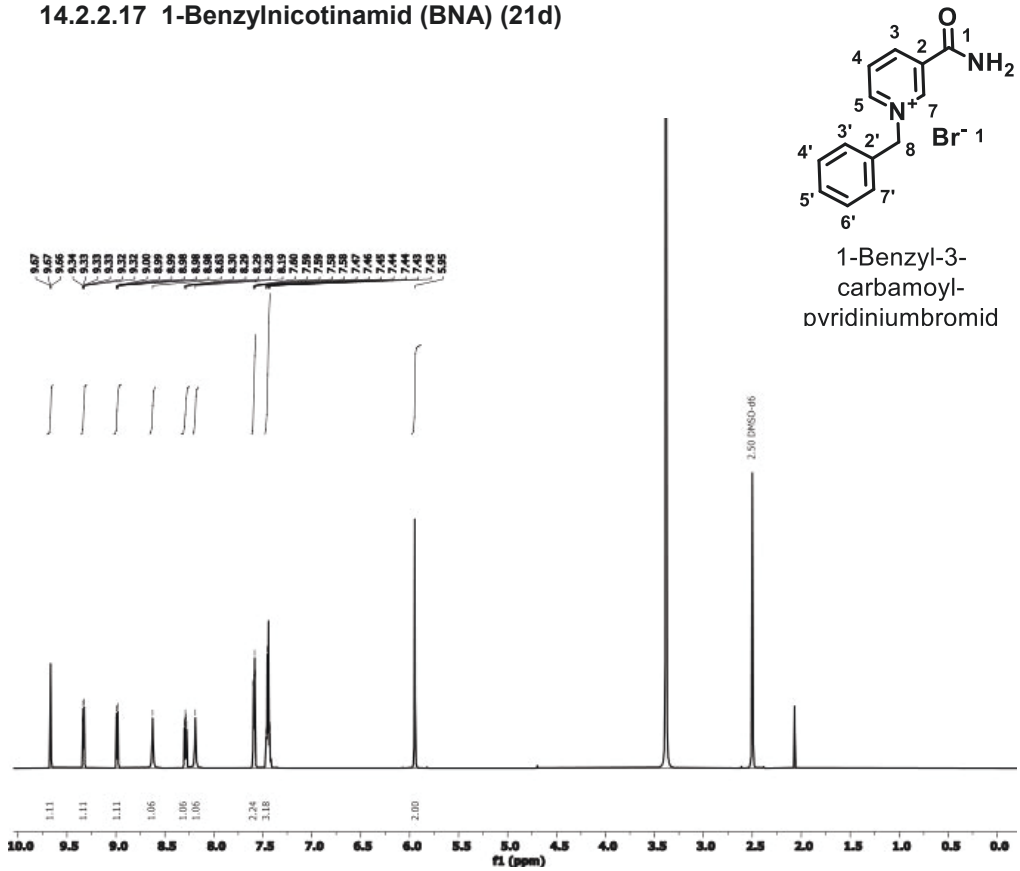
14.2.2.16 Monodechloraminofuralnitrin (MDAF) (44)



2'-Chlor-6'-(furan-3-yl)anilin



14.2.2.17 1-Benzylnicotinamid (BNA) (21d)

Abbildung 150: ¹H-NMR-Spektrum von 21d in DMSO-d₆ (600 MHz).^[181, 372]

14.3 Proteinkristallisation:

Das Screening erfolgte mit zwei verschiedenen Screening-Kits.

Einerseits mit dem *Crystallization Low Ionic Strength Kit for Proteins*^[377-381] von *Sigma Aldrich* (heute *Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland) mit der Produktnummer 86684:

<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/158/046/86684dat.pdf>

Tabelle 26: Zusammensetzung des Crystallization Low Ionic Kit for Proteins.

Nummer	Sigma Aldrich	Name
1.	83171	Na-citrate (pH 3.0) 0.05M, PEG 3350 4%
2.	95988	Na-citrate (pH 3.0) 0.05M, PEG 3350 12%
3.	96376	Na-citrate (pH 3.0) 0.05M, PEG 3350 20%
4.	95918	Na-citrate (pH 3.0) 0.05M, PEG 3350 28%
5.	94191	Na-citrate (pH 4.0) 0.05M, PEG 3350 4%
6.	96711	Na-citrate (pH 4.0) 0.05M, PEG 3350 12%
7.	75402	Na-citrate (pH 4.0) 0.05M, PEG 3350 20%
8.	78667	Na-citrate (pH 4.0) 0.05M, PEG 3350 28%
9.	80654	Na-citrate (pH 4.5) 0.05M, PEG 3350 4%
10.	71586	Na-citrate (pH 4.5) 0.05M, PEG 3350 12%
11.	80089	Na-citrate (pH 4.5) 0.05M, PEG 3350 20%
12.	80552	Na-citrate (pH 4.5) 0.05M, PEG 3350 28%
13.	73291	Na-citrate (pH 5.0) 0.05M, PEG 3350 4%
14.	78067	Na-citrate (pH 5.0) 0.05M, PEG 3350 12%
15.	80749	Na-citrate (pH 5.0) 0.05M, PEG 3350 20%
16.	77657	Na-citrate (pH 5.0) 0.05M, PEG 3350 28%

Nummer	Sigma Aldrich	Name
17.	77652	Na-citrate (pH 5.5) 0.05M, PEG 3350 4%
18.	80538	Na-citrate (pH 5.5) 0.05M, PEG 3350 12%
19.	87007	Na-citrate (pH 5.5) 0.05M, PEG 3350 20%
20.	91788	Na-citrate (pH 5.5) 0.05M, PEG 3350 28%
21.	86309	MES-Na (pH 6.0) 0.05M, PEG 3350 4%
22.	86287	MES-Na (pH 6.0) 0.05M, PEG 3350 12%
23.	89781	MES-Na (pH 6.0) 0.05M, PEG 3350 20%
24.	92179	MES-Na (pH 6.0) 0.05M, PEG 3350 28%
25.	91341	Bis-TRIS-HCl (pH 6.5) 0.05M, PEG 3350 4%
26.	89146	Bis-TRIS-HCl (pH 6.5) 0.05M, PEG 3350 12%
27.	89776	Bis-TRIS-HCl (pH 6.5) 0.05M, PEG 3350 20%
28.	87316	Bis-TRIS-HCl (pH 6.5) 0.05M, PEG 3350 28%
29.	86313	Imidazole-HCl (pH 7.0) 0.05M, PEG 3350 4%
30.	95479	Imidazole-HCl (pH 7.0) 0.05M, PEG 3350 12%
31.	74563	Imidazole-HCl (pH 7.0) 0.05M, PEG 3350 20%
32.	94774	Imidazole-HCl (pH 7.0) 0.05M, PEG 3350 28%
33.	92538	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.05M, PEG 3350 4%
34.	86461	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.05M, PEG 3350 12%
35.	92021	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.05M, PEG 3350 20%
36.	92146	HEPES Na-salt (pH 7.5) 0.05M, PEG 3350 28%
37.	92154	TRIS-HCl (pH 8.0) 0.05M, PEG 3350 4%
38.	80866	TRIS-HCl (pH 8.0) 0.05M, PEG 3350 12%
39.	89785	TRIS-HCl (pH 8.0) 0.05M, PEG 3350 20%
40.	95129	TRIS-HCl (pH 8.0) 0.05M, PEG 3350 28%

Nummer	Sigma Aldrich	Name
41.	92477	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.05M, PEG 3350 4%
42.	94611	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.05M, PEG 3350 12%
43.	94586	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.05M, PEG 3350 20%
44.	94845	TRIS-HCl (pH 8.5) 0.05M, PEG 3350 28%
45.	93209	Glycine Na-salt (pH 9.0) 0.05M, PEG 3350 4%
46.	92636	Glycine Na-salt (pH 9.0) 0.05M, PEG 3350 12%
47.	96261	Glycine Na-salt (pH 9.0) 0.05M, PEG 3350 20%
48.	75289	Glycine Na-salt (pH 9.0) 0.05M, PEG 3350 28%
49.	77584	Glycine Na-salt (pH 10.0) 0.05M, PEG 3350 4%
50.	88194	Glycine Na-salt (pH 10.0) 0.05M, PEG 3350 28%

Und andererseits mit dem *JCSG Core II Suite* der *Qiagen GmbH* (Hilden, Deutschland).

<https://www.qiagen.com/fr/resources/resourcedetail?id=cc67316f-5458-4c28-a942-90c10dc54107&lang=en>

https://www.wakenbtch.co.jp/media/NeXtal_%E7%B5%84%E6%88%90%E8%A1%A8/Formulations_EN_130725_130925.pdf

Da das Produkt nicht mehr erhältlich zu sein scheint, sei als Alternative *NEXTAL BIOTECHNOLOGIES NeXtal DWBlock JCSG Core II Suite* von *Thermo Fisher Scientific Inc.* genannt, mit der Catalog No.50-197-8952.

<https://www.fishersci.com/shop/products/nextal-screen-block-96x1-5-ml-22/501978952>

Tabelle 27: Zusammensetzung des JCSG Core Suite II (NeXtal Tubes).

Nummer	Well	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Finaler pH	Cat. No. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 mL tubes)
1	A1	0.2 M Sodium chloride	0.1 M CAPS pH 10.5	20% (w/v) PEG 8000		136301-01
2	A2	0.2 M Sodium chloride	0.1 M CHES pH 9.5	1.26 M Ammonium sulfate		136301-02
3	A3	1.0 M Sodium citrate	0.1 M CHES pH 9.5			136301-03

Nummer	Well	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Finaler pH	Cat. No. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 mL tubes)
4	A4	0.2 M Sodium chloride	0.1 M CHES pH 9.5	10% (w/v) PEG 8000		136301-04
5	A5		0.1 M Bicine pH 9.0	10% (w/v) PEG 20000; 2% (v/v) 1,4-Dioxane		136301-05
6	A6	0.1 M Sodium chloride	0.1 M Bicine pH 9.0	20% (w/v) PEG 550 MME		136301-06
7	A7	1.0 M Lithium chloride	0.1 M Bicine pH 9.0	10% (w/v) PEG 6000	9.0	136301-07
8	A8		0.1M TRIS pH 8.5	5% (w/v) PEG 8000; 20% (v/v) PEG 300; 10% (v/v) Glycerol		136301-08
9	A9	0.01 M Nickel chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	20% (w/v) PEG 2000 MME		136301-09
10	A10		0.1 M TRIS pH 8.5	20% (v/v) Ethanol		136301-10
11	A11		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	2.0 M Ammonium dihydrogen phosphate		136301-11
12	A12		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	8% (w/v) PEG 8000		136301-12
13	B1		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	2.0 M Ammonium sulfate		136301-13
14	B2	0.2 M Lithium sulfate	0.1M TRIS pH 8.5	40% (v/v) PEG 400		136301-14
15	B3	0.2 M Calcium acetate	0.1 M Imidazole pH 8.0	10% (w/v) PEG 8000		136301-15
16	B4	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Imidazole pH 8.0	35% (v/v) MPD		136301-16
17	B5	1.0 M Lithium chloride	0.1 M TRIS pH 8.5	20% (w/v) PEG 6000	8.0	136301-17
18	B6		0.1 M TRIS pH 8.5	20% (w/v) PEG 6000	8.0	136301-18
19	B7	0.2 M Lithium Acetate		20% (w/v) PEG 3350		136301-19
20	B8	0.2 M Magnesium chloride	0.1M Imidazole pH 8.0	40% (v/v) MPD		136301-20
21	B9	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	15% (v/v) Ethanol		136301-21
22	B10		0.1 M HEPES pH 7.5	70% (v/v) MPD		136301-22
23	B11		0.085 M Sodium HEPES pH 7.5	17% (w/v) PEG 4000; 15% (v/v) Glycerol; 8.5% (v/v) Isopropanol		136301-23

Nummer	Well	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Finaler pH	Cat. No. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 mL tubes)
24	B12	0.6 M sodium dihydrogen phosphate/ 0.6 M potassium dihydrogen phosphate	0.075 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (v/v) Glycerol		136301-24
25	C1	0.18 M Magnesium chloride	0.09 M Sodium HEPES pH 7.5	27% (v/v) PEG 400; 10% (v/v) Glycerol		136301-25
26	C2		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	2% (v/v) PEG 400; 2.0 M Ammonium sulfate		136301-26
27	C3	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 400		136301-27
28	C4	0.2 M Sodium chloride	0.1M Na/K phosphate pH 6.2	50% (v/v) PEG 200		136301-28
29	C5	0.2 M Sodium fluoride		20% (w/v) PEG 3350		136301-29
30	C6	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M TRIS pH 7.0	2.0 M Ammonium sulfate		136301-30
31	C7	0.2 M Calcium acetate	0.1M Sodium cacodylate pH 6.5	40% (v/v) PEG 300		136301-31
32	C8		0.1 M TRIS pH 7.0	20% (w/v) PEG 1000		136301-32
33	C9	1.0 M Lithium chloride	0.1 M HEPES pH 7.0	10% (w/v) PEG 6000	7.0	136301-33
34	C10		0.1 M HEPES pH 6.5	10% (w/v) PEG 6000	7.0	136301-34
35	C11	0.2 M Sodium chloride	0.1M Na/K phosphate pH 6.2	40% (v/v) PEG 400		136301-35
36	C12		0.1M Sodium citrate pH 5.5	50% (v/v) PEG 200		136301-36
37	D1		0.1M Na/K phosphate pH 6.2	25% (v/v) 1,2-Propanediol; 10% (v/v) Glycerol		136301-37
38	D2	0.2 M Sodium nitrate		20% (w/v) PEG 3350		136301-38
39	D3	0.05 M Lithium sulfate	0.1M TRIS pH 7.0	50% (v/v) PEG 200		136301-39
40	D4	0.2 M Potassium sulfate		20% (w/v) PEG 3350		136301-40
41	D5	0.2 M Magnesium formate				136301-41
42	D6		0.1M Sodium citrate pH 5.5	40% (v/v) PEG 600		136301-42
43	D7	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	20% (w/v) PEG 1000		136301-43
44	D8	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	10% (w/v) PEG 3000		136301-44

Nummer	Well	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Finaler pH	Cat. No. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 mL tubes)
45	D9	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	30% (v/v) PEG 400		136301-45
46	D10	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	2.0 M Ammonium sulfate		136301-46
47	D11		0.1 M MES pH 6.5	12% (w/v) PEG 20000		136301-47
48	D12	0.2 M Lithium sulfate		20% (w/v) PEG 3350		136301-48
49	E1	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	20% (w/v) PEG 1000		136301-49
50	E2		0.1 M MES pH 5.0	10% (v/v) MPD	6.0	136301-50
51	E3	1.0 M Lithium chloride	0.1 M MES pH 6.0	20% (w/v) PEG 6000	6.0	136301-51
52	E4	1.0 M Lithium chloride	0.1 M MES pH 6.0	10% (w/v) PEG 6000	6.0	136301-52
53	E5		0.1 M MES pH 5.0	5% (w/v) PEG 6000	6.0	136301-53
54	E6	0.2 M Zinc acetate	0.1M Imidazole pH 8.0	25% (v/v) 1,2-Propanediol; 10% (v/v) Glycerol		136301-54
55	E7	0.2 M Zinc acetate	0.1M Imidazole pH 8.0	40% (v/v) PEG 600		136301-55
56	E8	0.5 M Ammonium sulfate	0.1M TRIS pH 7.0	30% (v/v) PEG 600; 10% (v/v) Glycerol		136301-56
57	E9	1.0 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium citrate pH 5.6	0.5 M Ammonium sulfate		136301-57
58	E10	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Sodium citrate pH 5.6	30% (w/v) PEG 4000		136301-58
59	E11			24% (w/v) PEG 1500; 20% (v/v) Glycerol		136301-59
60	E12	0.2 M Sodium chloride	0.1M Sodium acetate pH 4.5	40% (v/v) PEG 300		136301-60
61	F1		0.1M Sodium acetate pH 4.5	35% (v/v) MPD; 10% (v/v) Glycerol		136301-61
62	F2		0.1M Phosphate-citrate pH 4.2	40% (v/v) PEG 300		136301-62
63	F3		0.1M Sodium acetate pH 4.5	5% (w/v) PEG 1000; 50% (v/v) Ethylene glycol		136301-63
64	F4	0.1 M Sodium chloride	0.1M Sodium acetate pH 4.5	30% (v/v) PEG 200		136301-64
65	F5		0.1M Sodium acetate pH 4.5	40% (v/v) 1,2-Propanediol		136301-65

Nummer	Well	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Finaler pH	Cat. No. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 mL tubes)
66	F6		0.1M Sodium acetate pH 4.5	40% (v/v) Ethylene glycol		136301-66
67	F7		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	10% (v/v) MPD	5.0	136301-67
68	F8		0.1 M Citric acid pH 4.0	2.4 M Ammonium sulfate	5.0	136301-68
69	F9		0.1 M Citric acid pH 4.0	1.6 M Ammonium sulfate	5.0	136301-69
70	F10		0.1 M Citric acid pH 4.0	0.8 M Ammonium sulfate	5.0	136301-70
71	F11	1.0 M Lithium chloride	0.1 M Citric acid pH 5.0	20% (w/v) PEG 6000	5.0	136301-71
72	F12		0.1M Phosphate-citrate pH 4.2	5% (w/v) PEG 3000; 25% (v/v) 1,2-Propanediol; 10% (v/v) Glycerol		136301-72
73	G1			2.0 M Ammonium sulfate; 5% (v/v) Isopropanol		136301-73
74	G2			2.0 M Ammonium sulfate		136301-74
75	G3	0.2 M Magnesium chloride	0.1M MES pH 5.5	40% (v/v) PEG 400		136301-75
76	G4	0.01 M Cobalt chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.0 M Hexanediol		136301-76
77	G5		0.08 M Sodium acetate pH 4.6	1.6 M Ammonium sulfate; 20% (v/v) Glycerol		136301-77
78	G6		0.07 M Sodium acetate pH 4.6	5.6% (w/v) PEG 4000; 30% (v/v) Glycerol		136301-78
79	G7	0.14 M Calcium chloride	0.07 M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) Glycerol; 14% (v/v) Isopropanol		136301-79
80	G8	0.16 M Ammonium sulfate	0.08 M Sodium acetate pH 4.6	20% (w/v) PEG 4000; 20% (v/v) Glycerol		136301-80
81	G9	0.018 M Calcium chloride	0.09 M Sodium acetate pH 4.6	27% (v/v) MPD; 10% (v/v) Glycerol		136301-81
82	G10		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.0 M Ammonium sulfate		136301-82
83	G11	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	10% (w/v) PEG 3000		136301-83
84	G12	0.2 M Ammonium sulfate	0.1M Phosphate-citrate pH 4.2	20% (v/v) PEG 300; 10% Glycerol		136301-84
85	H1	0.2 M Calcium acetate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	30% (v/v) PEG 400		136301-85

Nummer	Well	Salz	Puffer	Fällungsmittel	Finaler pH	Cat. No. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 mL tubes)
86	H2	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	30% (w/v) PEG 8000		136301-86
87	H3			25% (v/v) Ethylene glycol		136301-87
88	H4	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	10% (v/v) Isopropanol		136301-88
89	H5	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20% (w/v) PEG 8000		136301-89
90	H6			10% (w/v) PEG 1000; 10% (w/v) PEG 8000		136301-90
91	H7	0.17 M Ammonium sulfate		25.5% (w/v) PEG 4000; 15% (v/v) Glycerol		136301-91
92	H8			30% (w/v) PEG 1500		136301-92
93	H9	0.4 M Ammonium dihydrogen phosphate				136301-93
94	H10			35% (v/v) 1,4-Dioxane		136301-94
95	H11		0.1 M Citric acid pH 2.5	10% (v/v) MPD	4.0	136301-95
96	H12		0.1 M Citric acid pH 2.5	20% (w/v) PEG 6000	4.0	136301-96

14.4 Daten zum Design of Experiment und zur Michaelis-Menten-Kinetik

Tabelle 28: Bedingungen des *factorial design of experiment*. Untersucht wurden Reaktionsparameter und ihr Einfluss auf die Chlorierung mit der Halogenase PrnC-His₉. Eingesetzt wurden 500 µM MDA (**22c**) als Substrat und 0.3 mg/mL (~ 4.5 µM) Enzym. Dargestellt sind die Ergebnisse als relative Umsetzungen durch Quotientenbildung (Normalisierung) der Singlfläche von APRN (**22b**) zu internem Standard. Die höchste normalisierte Produkt-Signalfäche wurde hierbei als 1 bzw. 100 % gesetzt. Die Analyse erfolgte mittels GC-MS.

Std	Run	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Response
		A: Temperatur	B: SsuE-Aktivität	C: pH-Wert	D: [FAD]	E: [NADPH]	F: [NaCl]	Relative Umsetzung
		[°C]	[µM/mL]		[µM]	[µM]	[mM]	%
17	20	20	7	7	500	50	100	0.16
30	24	20	34	8	500	50	100	0.30
22	29	20	34	7	500	1000	10	0.44
29	27	20	34	8	500	50	100	0.47
18	14	20	7	7	500	50	100	0.79
32	4	40	34	8	500	1000	100	0.92
20	13	40	7	7	500	1000	100	1.15
25	17	20	7	8	500	1000	10	1.32
23	6	40	34	7	500	50	10	1.36
5	31	20	34	7	10	1000	100	1.38
13	26	20	34	8	10	50	10	1.47
21	21	20	34	7	500	1000	10	1.55
24	12	40	34	7	500	50	10	2.09
26	8	20	7	8	500	1000	10	2.60
6	11	20	34	7	10	1000	100	2.80
14	25	20	34	8	10	50	10	2.83
7	18	40	34	7	10	50	100	3.66
8	16	40	34	7	10	50	100	3.91

Anhang




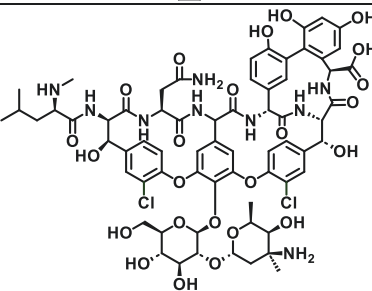
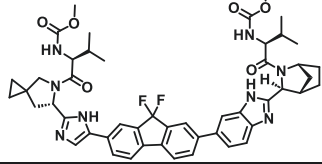
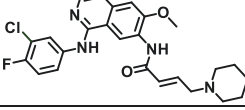
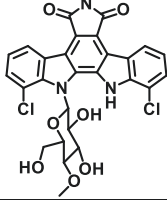
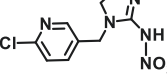
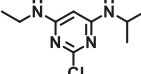
Std	Run	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Response
		A: Temperatur	B: SsuE-Aktivität	C: pH-Wert	D: [FAD]	E: [NADPH]	F: [NaCl]	Relative Umsetzung
		[°C]	[mU/mL]		[µM]	[µM]	[mM]	%
15	2	40	34	8	10	1000	10	5.94
28	5	40	7	8	500	50	10	7.64
27	19	40	7	8	500	50	10	8.13
31	3	40	34	8	500	1000	100	9.64
10	7	20	7	8	10	1000	100	10.07
9	28	20	7	8	10	1000	100	14.91
16	23	40	34	8	10	1000	10	16.03
12	30	40	7	8	10	50	100	18.04
11	10	40	7	8	10	50	100	21.30
1	9	20	7	7	10	50	10	24.86
2	22	20	7	7	10	50	10	26.94
19	1	40	7	7	500	1000	100	82.37
4	32	40	7	7	10	1000	10	97.99
3	15	40	7	7	10	1000	10	100.00

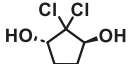

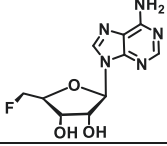
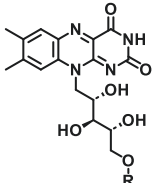
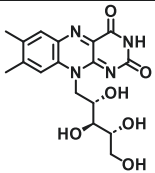
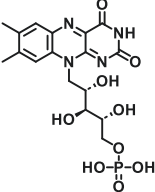
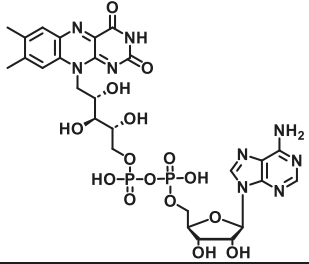
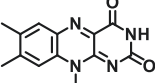
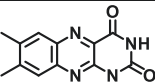
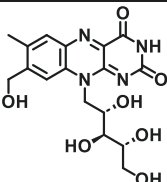
Tabelle 29: Bestimmung der kinetischen Parameter für die Chlorierung mit PrnC-His₉. Gezeigt sind die Konzentrationen des Substrats MDA (**22c**), sowie die Zunahme der Flächenquotienten aus dem Produkt APRN (**22b**) und internem Standard (IS) *m*-Chlortoluol pro Zeit in Minuten und Enzymkonzentration in mg/mL. Aus diesen Werten wurden zusätzlich mit Hilfe der Kalibrierung und dem Molekulargewicht (MW) von PrnC-His₉ die spezifischen Aktivitäten [$\mu\text{u}/\text{mg}$], sowie die Reaktionsraten [min^{-1}] bestimmt.

MDA	$\frac{\Delta \text{normalisierte Fläche APRN}}{\Delta \text{Zeit} \cdot c(\text{PrnC})}$	$\frac{\Delta \text{normalisierte Fläche APRN}}{\Delta \text{Zeit} \cdot c(\text{PrnC})}$	Mittelwert	Standardabweichung
	Probe 1	Probe 2		
[μM]	[$\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{mL}$]			
20	$3.08 \cdot 10^{-2}$	$2.99 \cdot 10^{-2}$	$3.03 \cdot 10^{-2}$	$6.12 \cdot 10^{-4}$
30	$3.31 \cdot 10^{-2}$	$3.29 \cdot 10^{-2}$	$3.30 \cdot 10^{-2}$	$1.53 \cdot 10^{-4}$
40	$3.57 \cdot 10^{-2}$	$3.44 \cdot 10^{-2}$	$3.51 \cdot 10^{-2}$	$9.25 \cdot 10^{-4}$
100	$4.32 \cdot 10^{-2}$	$4.48 \cdot 10^{-2}$	$4.40 \cdot 10^{-2}$	$1.13 \cdot 10^{-3}$
300	$4.54 \cdot 10^{-2}$	$4.55 \cdot 10^{-2}$	$4.54 \cdot 10^{-2}$	$9.30 \cdot 10^{-5}$
1000	$5.02 \cdot 10^{-2}$	$4.89 \cdot 10^{-2}$	$4.95 \cdot 10^{-2}$	$9.48 \cdot 10^{-4}$
1500	$5.17 \cdot 10^{-2}$	$4.88 \cdot 10^{-2}$	$5.02 \cdot 10^{-2}$	$2.08 \cdot 10^{-3}$
1750	$4.94 \cdot 10^{-2}$	$4.38 \cdot 10^{-2}$	$4.66 \cdot 10^{-2}$	$3.92 \cdot 10^{-3}$
2000	$4.93 \cdot 10^{-2}$	$4.82 \cdot 10^{-2}$	$4.87 \cdot 10^{-2}$	$7.81 \cdot 10^{-4}$
MDA	Spez. Aktivität Probe 1	Spez. Aktivität Probe 2	Mittelwert	Standardabweichung
[μM]	[$\mu\text{u mg}^{-1}$]			
20	15.45	15.00	15.23	0.32
30	16.67	16.55	16.61	0.08
40	18.08	17.39	17.73	0.49
100	21.99	22.83	22.41	0.59
300	23.14	23.21	23.17	0.05
1000	25.68	24.98	25.33	0.50
1500	26.47	24.92	25.70	1.09
1750	25.25	22.33	23.79	2.06
2000	25.21	24.63	24.92	0.41
MDA	Umsatzrate Probe 1	Umsatzrate Probe 2	Mittelwert	Standardabweichung
[μM]	[min^{-1}]			
20	1.024	0.993	1.009	$2.13 \cdot 10^{-2}$
30	1.104	1.097	1.100	$5.35 \cdot 10^{-3}$
40	1.197	1.152	1.175	$3.22 \cdot 10^{-2}$
100	1.457	1.512	1.484	$3.94 \cdot 10^{-2}$
300	1.533	1.537	1.535	$3.24 \cdot 10^{-3}$
1000	1.701	1.654	1.678	$3.30 \cdot 10^{-2}$
1500	1.753	1.651	1.702	$7.24 \cdot 10^{-2}$
1750	1.672	1.480	1.576	$1.37 \cdot 10^{-1}$
2000	1.670	1.631	1.650	$2.72 \cdot 10^{-2}$

15. MOLEKÜLVERZEICHNIS

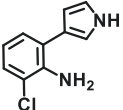
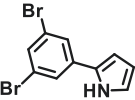
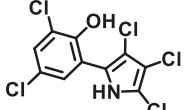
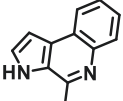
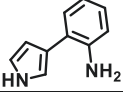
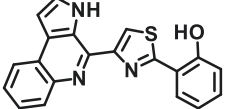
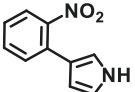
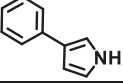
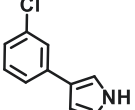
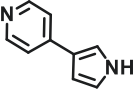

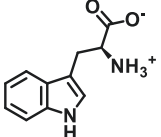
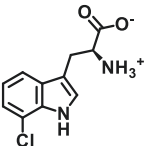
Tabelle 30: Liste der chemischen Strukturen für die in dieser Arbeit vorkommenden Moleküle mit Namen, Strukturformeln und Molekülnummern. Die Nummern mit Asterisk (*) wurden in dieser Arbeit synthetisiert.

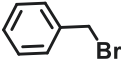
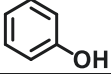
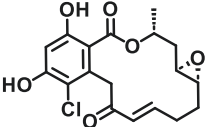
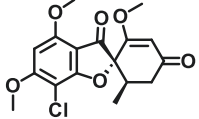
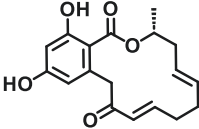
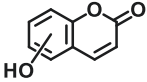
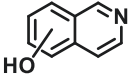
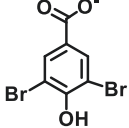
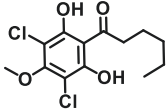
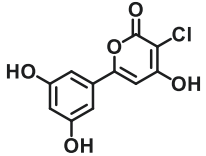
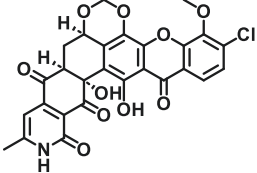
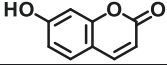

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
1	Hypohalogenensäure	$\text{HO}-\text{X}$	1	
2	Hypochlorsäure	$\text{HO}-\text{Cl}$	1a	
3	Hypobromsäure	$\text{HO}-\text{Br}$	1b	
4	N-Halogensuccinimid		2	
5	N-Chlorsuccinimid		2a	
6	N-Iodsuccinimid		2b	
7	Vancomycin		3	
8	Ledipasvir		4	
9	Dacomitinib		5	
10	Rebeccamycin		6	
11	Imidacloprid		7	
12	Atrazin		8	

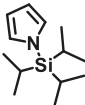
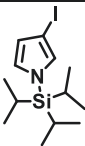
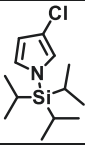
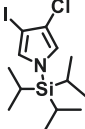
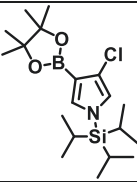
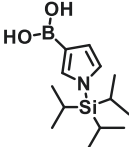

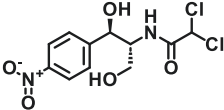
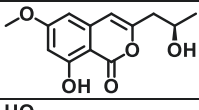
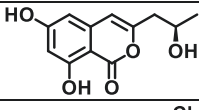
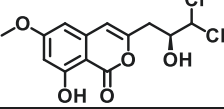
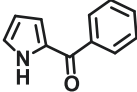
Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
13	Caldariomycin		9	
14	1,3-Cyclopentadion		10	
15	5'-FDA		11	
16	Flavin		12	
17	Riboflavin		12a	
18	FMN		12b	
19	FAD		12c	
20	Lumiflavin		12d	
21	Lumichrom		12e	
22	8-Hydroxymethylriboflavin		12f	

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
23	Roseoflavin		12g	
24	F420		12h	
25	FO		12i	
26	GTP		13	
27	2-Amino-5-formamid-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-triphosphat		14	
28	2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat		15	
29	5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat		16	
30	5-Amino-6-(5-D-ribitylamino)uracil		17	
31	1-Desoxy-L-glycero-tetrose-4-phosphat		18	
32	Ribulose-5-phosphat		19	

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
33	6,7-Dimethyl-8-ribityllum- azin		20	
34	Nicotinamid-Nucleotide, Pyridin-Dinucleotide		21	
35	NAD		21a	
36	NADP		21b	
37	Nicotinamid		21c	
38*	1-Benzylnicotinamid (BNA)		21d	JGE0192
39	Arylpyrrol		22	
40	Pyrrolnitrin (PRN)		22a	
41*	Aminopyrrolnitrin (APRN)		22b	JGE0316 JGE0332

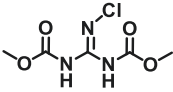
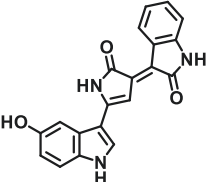
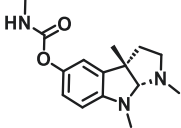
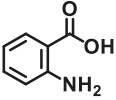
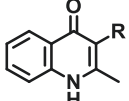
Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
42*	Monodechloraminopyrrolnitrin (MDA)		22c	JGE0156 FGA002V025
43	2-(3,5-Dibromphenyl)pyrrol		22d	
44	Pentachlorpseudilin		22e	
45	Marinochinolin A		22f	
46	3-ortho-Aminophenylpyrrol (3-oAPP)		22g	FGA002V022
47	Pyonitrin C		22h	
48*	3-ortho-Nitrophenylpyrrol (3-oNPP)		22i	FGA002V021
49*	3-Phenylpyrrol (3-PP)		22j	JGE0127
50*	3-meta-Chlorphenylpyrrol (3-mCPP)		22k	JGE0124
51*	3-para-Pyridinylpyrrol (3-pPyP)		22l	JGE0331
52	Indol		23	
53	Tryptophan		23a	
54	7-Chlor-Tryptophan		23b	

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
55	Benzylbromid		24	
56	Phenol		25	
57	Radicalol		25a	
58	Griseofulvin		25b	
59	Monocillin II		25c	
60	Hydroxycoumarin		25d	
61	Hydroxyisochinolin		25e	
62	3,5-Dibrom-4-Hydroxybenzoat		25f	
63	DIF-1		25g	
64	Venemycin		25h	
65	Xantholipin		25i	
66	Umbelliferon		25j	
67	Pyrrrol		26	

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
68	<i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol		26a	
69*	3-Iod- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol		26b	JGE0308
70*	3-Chlor- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol		26c	JGE0309
71*	3-Chlor-4-iod- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol		26d	JGE0311
72*	3-Chlor-4-BPin- <i>N</i> -(TIPS)-1 <i>H</i> -pyrrol		26e	JGE0334
73	(<i>N</i> -TIPS-Pyrrol-3-yl) boronsäure		26f	
74	Pyrrol-2-Carbaldehyd (2-CaP)		26g	
75	Chloramphenicol		27	
76	Diaporthin		28	
77	Orthosporin		28a	
78	Dichlordiaporthin		28b	
79	Benzoylpyrrole		29	

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
80	Pyoluteorin		29a	
81	Marinopyrrol A		29b	
82	Armeniaspirol C		29c	
83	Pyrrolomycin J		29d	
84	L-Prolin		30	
85	Prolin-AMP		30a	
86	Carrier-S-Pyrrol-2-Carboxy-thioester		30b	
87	dichloriertes Carrier-S-Pyrrol-2-Carboxy-thioester		30c	
88	Carrier-S-Dichlorpyrrol-2-Carbonyl-Acylthioester		30d	
89	Prodiginin		31	
90	Prodigosin		31a	JGE0074
91	MBC		32	JGE0072 JGE0073

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
92	MAP		33	JGE0069
93	Tetramsäure		34	
94	Hybrubin		35	
95	Fludioxonil		36	
96	Fenpiclonil		37	
97	1-Brom-3-Chlorbenzol		38	
98*	2-Brom-6-chlorbenzoesäure		39	JGE0302
99*	2-Brom-6-chloranilin		40	JGE0304
100	Pinakolboran		41	
101	1-Iod-2-nitrobenzol		42	
102	3-Furylboronsäure		43	
103*	Monodechloraminofuralitrin (MDAF)		44	JGE0307
104	Styrol		45	
105	3-Chlorstyrol		45a	
106	4-Vinylpyridin		45b	
107	TosMIC		46	

Nr.	Molekülname	Struktur	Molekül-Nr.	Versuchs-Nr.
108	Palau'Chlor®		47	
109	Violacein		48	
110	Physostigmin		49	
111	Anthranilsäure		50	
112	Aurachine		51	

Band 35

Ammoniumylide in der asymmetrischen Organokatalyse

L. Öhler (2019), V, 377 pp

ISBN: 978-3-95806-407-2

Band 36

Enantioselektive Totalsynthese von Altersolanolen

B. Mechsner (2019), I, V, 311 pp

ISBN: 978-3-95806-412-6

Band 37

Glycosynthases – tuning glycosidase activity towards glycoside diversification and synthesis

M. R. Hayes (2019), VI, 225 pp

ISBN: 978-3-95806-441-6

Band 38

**Chemoenzymatische Synthesemethoden –
Zugang zur duftenden Welt der Chemie und darüber hinaus**

C. Kumru (2019), V, 338 pp

ISBN: 978-3-95806-446-1

Band 39

**Oxidoreduktasen für die Bereitstellung von Schlüsselbausteinen
der Natur- und Wirkstoffsynthese**

R. Krug (2020), 216 pp

ISBN: 978-3-95806-454-6

Band 40

**Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese
bioaktiver Naturstoffderivate**

H. U. C. Braß (2021), IX, 349 pp

ISBN: 978-3-95806-523-9

Band 41

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

D. Dickmann (2021), 274 pp

ISBN: 978-3-95806-573-4

Band 42

**Chemie ohne Grenzen –
Biokatalysatoren und Bororganyle als wertvolle Hilfsmittel
für die zielmolekülorientierte, enantioselektive Synthese**

M. R. Mantel (2021), 487 pp

ISBN: 978-3-95806-585-7

Band 43

**Über tetraolbasierte Allylboronsäureester und deren Potential
in der stereoselektiven Synthese**

P. Ullrich (2022), xii, 324 pp

ISBN: 978-3-95806-618-2

Band 44

**Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger *photocaged compounds* –
Optimierte Werkzeuge zur Etablierung wellenlängenselektiver Genexpression**

F. Hogenkamp (2022), V, 456 pp

ISBN: 978-3-95806-637-3

Band 45

**Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese
von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen**

P. Schneider (2023), x, 315 pp

ISBN: 978-3-95806-690-8

Band 46

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

A. V. Fejzagić (2023), XI, 264 pp

ISBN: 978-3-95806-728-8

Band 47

Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen

N. Huwa (2024), X, 235 pp

ISBN: 978-3-95806-745-5

Band 48

**Immobilisierte Enzyme und Kofaktor-Regenerierung in der kontinuierlichen
Durchflusssynthese**

B. Baumer (2024), XVIII, 231 pp

ISBN: 978-3-95806-783-7

Band 49

**Biaryl-based natural products as structural motif for pharmaceutically relevant
compounds**

M. K. T. Klischan (2025), V, 657 pp

ISBN: 978-3-95806-801-8

Band 50

Flavin-abhängige Halogenasen zur Derivatisierung von Naturstoffen

J. Gebauer (2025), XXIV, 321 pp

ISBN: 978-3-95806-850-6

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

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Halogene finden sich in rund 8000 Naturstoffen und sind in 40 % der Synthesen von Arzneimitteln oder deren Endprodukten vorhanden. Als Bestandteil von Wirkstoffen inhibieren sie beispielsweise durch ihre Größe oder Wechselwirkungen Enzymzentren oder blockieren die Abbaupositionen des Wirkstoffs bei der Leberoxidation.

Im Vergleich zur chemischen Halogenierung bietet der enzymatische Halogeneinbau einige Vorteile. So kann einerseits durch die Verwendung von handelsüblichem Kochsalz als Quelle für Chlorid-Ionen der energieintensive Chloralkali-Prozess umgangen werden. Andererseits ermöglicht die Biokatalyse bei der Umsetzung von Aromaten, die häufig mehrere konkurrierende Reaktionspositionen aufweisen, eine gezielte, regioselektive Halogenierung und reduziert somit die Anzahl von Nebenprodukten.

Diese Arbeit legt den Fokus vorrangig auf die Gruppe der Flavin-abhängigen Halogenasen (Fl-Hal) für die Chlorierung von Pyrrol-Strukturen. Dafür wurden Flavinreduktasen zur Bereitstellung von FADH_2 sowie ein Cofaktor-Recycling-System basierend auf der Glucose-Dehydrogenase (GDH) eingesetzt. Schwerpunkt der Untersuchungen ist die Charakterisierung der Halogenase PrnC aus der Pyrrolnitrin-Biosynthese. Außerdem wurden das gesamte Biosynthese-Cluster von Pyrrolnitrin im heterologen Stamm *Pseudomonas putida* KT2440 sowie die Pyrrol-Halogenase PltA aus der Pyoluteorin-Biosynthese untersucht, beide mit dem Ziel der Derivatisierung von Prodigininen. Weiterhin wurden putative Halogenasen aus *Pseudoalteromonas* sp. NC201 und *Pseudoalteromonas gelatinilytica* NH153 anhand von BLAST-Daten identifiziert und ausgewählt. Auf Grundlage der Ergebnisse zu PrnC und der putativen Halogenase NH153 wurde das chimäre Enzym NHprnC als Strategie zur Enzymoptimierung konzipiert. Ergänzend wurden die in der Literatur beschriebenen Halogenasen PrnA für Tryptophan und RadH für Phenol-Strukturen bereitgestellt, um das Enzymportfolio zu erweitern und alle drei Substratgruppen Pyrrole, Indole und Phenole vollständig abzudecken.

Band 50

ISBN 978-3-95806-850-6