

Entwicklung Fluoreszenz-basierter Assays zur kinetischen Untersuchung neuer Enzymvarianten

Dissertation von Thomas Scheidt



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Entwicklung Fluoreszenz-basierter Assays zur kinetischen Untersuchung neuer Enzymvarianten

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

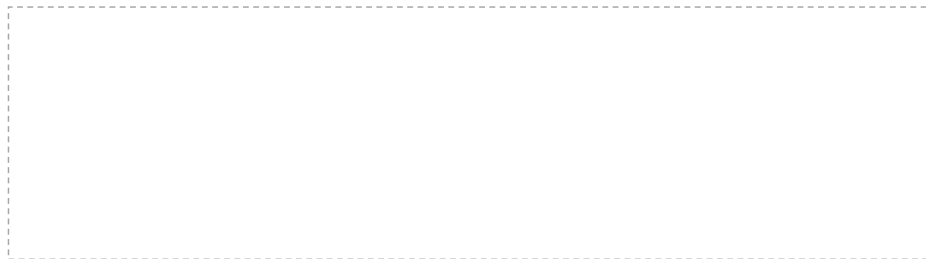
genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

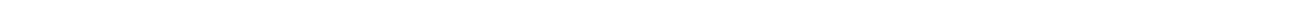
Dipl.-Chem. Thomas Scheidt
aus Groß-Gerau,

Referent: Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner
Korreferenten: Prof. Dr. Harald Kolmar
Tag der Einreichung: 12. Januar 2017
Tag der mündlichen Prüfung: 6. März 2017

Darmstadt 2017
D17

**Anaglyphenbrille**

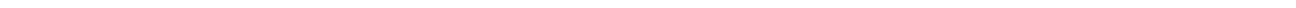
Die in diese Arbeit gezeigten Enzymmodelle sind im Anaglyphendruck dargestellt. Zur dreidimensionalen Wahrnehmung wird die Anaglyphenbrille rot-cyan benötigt, die dieser Arbeit beiliegt.



*Meiner Mutter,
in Dankbarkeit für all die Unterstützung*

*„Ein Hündchen wird gesucht,
das weder murrst noch beißt,
zerbroch'ne Gläser frisst
und Diamanten ...“*

J.W. Goethe, Xenien



Danksagungen

Folgende Personen möchte ich im Besonderen danken:

Zu aller erst Herrn Prof. Dr. Fessner, für die abwechslungsreiche Themenstellung, für sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, die gute Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft.

Ebenso Herrn Prof. Dr. Kolmar für die Übernahme des Co-Referates.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen der Arbeitsgruppe sowie meinen Studienfreunden *Elisabeth Fischer*, *Victoria Petermann* und *Theresa Lorenz* für die Unterstützung und anregende fachliche Diskussionen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dencher danke ich für die Gelegenheit, die Fluoreszenzspektren zu messen.

Herrn Dr. Meusinger für die Hilfe bei komplexeren NMR-Auswertungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Asmita Prabhune vom *National Chemical Laboratory* in Pune, Indien, die mir ermöglichte, Ihre Arbeitsgruppe vor Ort zu besuchen; sowie dem DAAD für die finanzielle Unterstützung dabei.

Herrn Kickstein danke ich für die Herstellung und Aufreinigung der Enzyme sowie die praktische Einarbeitung in die Biotechnologie.

Zu guter Letzt auch den Studenten *Kasturi Joshi*, *Alina Hanlon*, *Max Briesnik*, *Angélica Aujon* und *Maxime DeSousa Lopes Moreira*, die an wesentlichen Teilen dieser Arbeit beteiligt waren und zum Erfolg mit beigetragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

- dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt und verfasst habe, dass alle Hilfsmittel und sonstigen Hilfen angegeben und dass alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht worden sind;
- dass die Dissertation in der vorgelegten oder einer ähnlichen Fassung noch nicht zu einem früheren Zeitpunkt an der Technischen Universität Darmstadt oder einer anderen in- oder ausländischen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist.



Thomas Scheidt

Veröffentlichungen

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits zuvor veröffentlicht:

“Fluorescence-Based Kinetic Assay for High-Throughput Discovery and Engineering of Stereoselective ω -Transaminases”

Thomas Scheidt, Henrik Land, Mattias Anderson, Yujie Chen, Per Berglund, Dong Yi and Wolf-Dieter Fessner, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2015**, *8*, 1721 – 1731; 10.1002/adsc.201500215

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Danksagungen | i |
| Erklärung | ii |
| Veröffentlichungen | ii |
| 1.....Allgemeine Einleitung | 1 |
| 1.1 Geschichte der Biotechnologie | 1 |
| 1.2 Klassifizierung von Enzymen | 3 |
| 1.3 Physikochemische Betrachtungen | 5 |
| 1.3.1 Kinetik von katalysierten Reaktionen | 5 |
| 1.3.2 Absorption und Fluoreszenz | 14 |
| 1.4 Die Aldol-Reaktion | 21 |
| 1.5 Biotechnologie | 25 |
| 1.5.1 Enzyme engineering | 25 |
| 1.6 Einführung: High Throughput Screening | 28 |
| 2.....Aufgabenstellung | 29 |
| 3.....Spezieller Teil | 32 |
| 3.1 Aldolase Assays | 32 |
| 3.1.1 Fructose-6-phosphat Aldolase | 32 |
| 3.1.2 Mutationsansätze | 36 |
| 3.1.3 Assay-Entwicklung für FSA Mutanten | 42 |
| 3.1.4 Methodol und Derivate | 47 |
| 3.1.5 Methodol-Assays für FSA - Mutanten | 57 |
| 3.1.6 ADH/NADH Assay | 71 |
| 3.1.7 Sitophilure | 77 |
| 3.1.8 Fazit erster Teil | 80 |
| 3.2 Assay für ω -Transaminasen | 81 |
| 3.2.1 Einführung Transaminasen | 81 |
| 3.2.2 Prinzip des Fluoreszenz-Assays | 87 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3.2.3 | Synthese der Substrate | 88 |
| 3.2.4 | Assay-Entwicklung und Ergebnisse | 94 |
| 3.3 | Fazit und Ausblick Transaminase-Assay | 101 |
| 4..... | Zusammenfassung | 102 |
| 4.1 | Fructose-6-phosphat-Aldolase | 102 |
| 4.1.1 | Methodol | 103 |
| 4.1.2 | ADH/NADH Assay | 107 |
| 4.2 | ω -Transaminasen | 110 |
| 5..... | English Abstract | 114 |
| 6..... | Experimenteller Teil | 118 |
| 6.1.1 | Allgemeine Reaktionsbedingungen | 118 |
| 6.1.2 | Lösungsmittel | 118 |
| 6.1.3 | Chemikalien | 118 |
| 6.1.4 | Apparate und Messgeräte | 119 |
| 6.1.5 | Software | 120 |
| 6.2 | Medien und Pufferlösungen | 121 |
| 6.2.1 | Allgemeines | 121 |
| 6.2.2 | 10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) | 121 |
| 6.2.3 | LB-Medium | 122 |
| 6.2.4 | TB-Medium | 122 |
| 6.2.5 | AI-Medium (Autoinduktionsmedium) | 122 |
| 6.2.6 | 1000x Trace Metals Mix | 123 |
| 6.2.7 | High Protein AI –Medium | 124 |
| 6.2.8 | Lysis-Puffer | 125 |
| 6.2.9 | Vektorkarte | 126 |
| 6.2.10 | Produktion von Enzymen | 127 |
| 6.3 | Analytik | 129 |
| 6.3.1 | Bestimmung FSA-Gehalt (SDS-PAGE) | 129 |
| 6.3.2 | Chromatographie | 129 |
| 6.3.3 | HPLC Analytik | 130 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.3.4 | ¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektroskopie | 130 |
| 6.4 | präparative Säulenschromatographie | 130 |
| 6.5 | Fluoreszenzspektren | 131 |
| 6.6 | Mikrotiter Assays | 132 |
| 6.6.1 | FSA Methodol | 132 |
| 6.6.2 | FSA Methodol quick | 132 |
| 6.6.3 | FSA ADH / FSA ALDH | 133 |
| 6.6.4 | FSA Assay für natürliche Reaktion | 134 |
| 6.6.5 | FSA Hantzsch – Assay | 134 |
| 6.6.6 | Transaminasen | 135 |
| 6.6.7 | Statistik | 136 |
| 6.7 | Synthese der FSA-Substrate | 137 |
| 6.7.1 | AAV: Fluorogene Naphthylaldole vom Methodol-Typ (1) | 137 |
| 6.7.2 | Kinetische Racemattrennung mit Lipasen (Aldole) | 146 |
| 6.7.3 | Aldolreaktion (Gasstrom-Variante) | 149 |
| 6.8 | Transaminase Substrate | 151 |
| 6.8.1 | AAV Grignard Reaktion Methode 1 (11b-d) | 151 |
| 6.8.2 | AAV Grignard Reaktion an Methode 2 (11e-f) | 152 |
| 6.8.3 | AAV Jones-Oxidation zu (6'-Methoxynaphth-2'-yl)-ketonen 12 b-f | 153 |
| 6.8.4 | AAV Reduktive Aminierung | 155 |
| 6.8.5 | Racemattrennung von 1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-ethylamin (13a) | 158 |
| 6.8.6 | Enantioselective Synthese aus Naproxen [®] | 161 |
| 7..... | Anhang | 163 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis | 163 |
| 7.2 | Aminosäuren | 164 |
| 7.3 | Literaturverzeichnis | 165 |

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Geschichte der Biotechnologie

Enzyme sind katalytisch wirksame Proteine, die an fast jeder Stoffumwandlung in lebenden Organismen beteiligt sind. Ihre Verwendung reicht, wenn auch zunächst unwissentlich, geschichtlich weit zurück. Enzymatische oder biotechnische Umsetzungen sind vermutlich die ältesten Herstellungsprozesse der menschlichen Zivilisation und sogar älter als die Eisenverhüttung. Die alkoholische Gärung, also die gezielte Umsetzung zuckerhaltiger Lebensmittel in alkoholische Getränke, stellt den wahrscheinlich größten Meilenstein der Menschheitsgeschichte nach der Beherrschung des Feuers dar. Der Ursprung reicht mindestens bis 5000 v. Chr. zurück, als erstmals Bier und Wein in Babylon und später in Ägypten hergestellt wurde.^[1] Einzelne Funde legen nahe, dass die Gärung bereits um 6500 v. Chr. beherrscht wurde^[2]. Die Gerinnung von Milch durch Feigensaft bei der Käseherstellung wird bereits durch den griechischen Dichter Homer in seinen Stücken erwähnt. Ab 300 v. Chr. ist in Ostasien die Verwendung von Schimmelpilzen „Qu“ (meist *Monascus purpureus*^[3]), belegt, um Sojaprodukte haltbarer zu machen oder den Geschmack zu beeinflussen. Im 3. Jh. n. Chr. wurde in Japan der Reiswein, *Sake*, immer beliebter und bereits in größeren Manufakturen hergestellt. Dabei kam der wohl erste industrielle Zwei-Stufen-Prozess in der Geschichte der Lebensmitteltechnologie zum Einsatz: Da als Kohlenhydratquelle polierter Reis verwendet wurde, der nicht mehr keimfähig war, musste die komplexe Reisstärke anders aufgeschlossen werden als beim Mälzen. Der Reis wurde (und wird noch heute) mit einem Schimmelpilz, dem *Kōji* 麹 (*Aspergillus oryzae*) angeimpft^[4], dessen α -Amylasen die Stärke zu niederen Zuckern abbauen^[5]. Das Fermentations-Produkt enthält nach einigen Tagen neben Aromastoffen vor allem Glucose, die dann mit Hefe vergoren werden kann. Wenn gleich diese Methoden über Jahrhunderte Bestand hatten, wurden sie lediglich traditionell angewandt und nur gelegentlich handwerklich verbessert. Es hat sich bis heute aber kein Beleg gefunden, dass diese Vorgänge in der Antike nach unseren heutigen Begriffen wissenschaftlich untersucht wurden. Erst mit dem Erstarken der modernen Naturwissenschaften zur Zeit der Aufklärung stieg das Interesse, auch biochemische Prozesse und deren Hintergründe zu verstehen. Einer der ersten war der französische Naturforscher Réaumur, der 1752 die „Verdauungssäfte“ von Greifvögeln untersuchte. Dabei trieb ihn die Frage an, wie diese Tiere ohne Kauwerkzeuge zum mechanischen Aufschluss Fleisch verwerten können. Die Tatsache, dass Greifvögel ihre Beute ganz oder zumindest in großen Stücken schlucken und anschließend die nicht verwertbaren Teile wieder auswürgen, legt nahe, dass die Nahrung wohl durch „Fer-

mente“ verflüssigt und So zugänglich werde. Um seine These zu untermauern Verfütterte Réaumur seinen Vögel in Draht- und Bleiröhrchen eingepackte Fleischstücke, wobei der Vogel die leeren Röhrchen wie sonst Knochen wieder auswürgte.

Gottlieb Kirchhoff entdeckte 1814, dass keimendes Getreide einen Stoff erzeuge, der Stärke in Zucker verwandle, und erklärte so die über Jahrhunderte bekannten aber bis dahin unklaren Vorgänge des Mälzens. Große Beachtung erlangte die Entdeckung Kirchhoffs 1833 durch Anselme Payen, den Direktor der Pariser Zuckerwerke. Zusammen mit seinem Kollegen Jean Françoise Persoz isolierte er das „stärke-verflüssigende Prinzip“ aus Gerstenmalz.^[6] Im wohl ersten Bio-technischen Industrieprozess der Moderne zeigten die beiden Wissenschaftler, dass eine „verhältnismäßig kleine Menge an Präparat“ große Mengen Stärke verflüssigen konnte. Ferner beobachteten sie, dass Erhitzen den Prozess stoppt fortwährende Verdünnung und Stärkezugabe ihn am Laufen hält. Die „Diastase“ ist somit das erste im Labor aufgereinigte und untersuchte der Fermente.

Was diese *Fermente* genau sind, war zu diesem Zeitpunkt noch unklar. Dass es sich bei den Beobachteten Prozessen um katalysierte Vorgänge handelt, fasste 1836 Berzelius zusammen.^[7] Um eine einheitliche Terminologie zu erreichen, führte 1877 Wilhelm Kühne den Begriff „Enzym“ ein. Der Begriff leitet sich vom griechischen *εν* (en = in) und *ζυμη* (zümē = Sauerteig) ab:

„Um Missverständnissen vorzubeugen und lästige Umschreibungen zu vermeiden schlägt Vortragender vor, die ungeformten oder nicht organisierten Fermente, deren Wirkung ohne Anwesenheit von Organismen und außerhalb derselben erfolgen kann, als Enzyme zu bezeichnen“ ^[8]

Am 9. Januar 1897 veröffentlicht Eduard Buchner die erste Enzymreaktion außerhalb ganzer Zellen, wobei auf frühere Erkenntnisse mit toten, aber z.T. intakten Zellen zurück griff. Buchner setzte die in Hefe enthaltenen Enzyme frei, indem der die Zelle mit Kieselgel in einem Mörser verrieb und verwendete sie anschließend erfolgreich zur Vergärung von Zuckerlösung. Er erhielt für seine Arbeit „Über alkoholische Gärung ohne Hefezellen“ 1907 den Nobelpreis. Zwei weitere große Schritte machte die Biotechnologie durch Alexander Flemming, der 1922 die Cytolyse durch Lysozym^[9] und 1928 die bakterizide Wirkung des Penicillin aus Schimmelpilzen^[10] beobachtete.

Um 1926 gelang die erste Kristallisation eines Enzymes durch James B. Sumner an einer Urease.^[11] Enzyme waren nun kristallisierbar und zeigten dabei Eigenschaften, die von Protei-

nen bekannt waren. Dass Enzyme katalytisch aktive Proteine sind, wurde nach langen Debatten Von John Northrop in den 1930er Jahren am Rockefeller Institute bewiesen und festgeschrieben^[12].

Heute sind weit über 4000 enzymatische Reaktionen bekannt.^[13] Gerade in der heutigen Zeit spielen Enzyme auch in der chemischen Industrie eine immer wichtigere Rolle. Gerade unter dem Gesichtspunkt der „Green Chemistry“, der sowohl umweltschonenden als auch Kosteneffizienten chemischen Prozessführung sind Enzyme von immer größer werdenden Interesse.

1.2 Klassifizierung von Enzymen

Die IUPAC und die International Union of Biochemistry haben eine Nomenklatur der Enzyme erarbeitet, um diese Gruppe von Molekülen zu klassifizieren:

1. Enzymnamen enden auf *-ase*, wenn es sich nicht um mehrere Enzyme in einem System handelt.
2. Der Enzymname soll die Reaktion erklären, die das Enzym katalysiert (z.B. Esterase)
3. Der Enzymname soll eine Klassifikation enthalten, die die Reaktion einschränkt oder näher beschreibt.

Problematisch wird die Nomenklatur bei Enzymen, die mehrere Reaktionen katalysieren. Für sie existieren deshalb manchmal mehrere Namen. Einige Enzyme tragen darüber hinaus immer noch (ältere) Trivialnamen, die nicht erkennen lassen, dass es sich bei der genannten Substanz um Enzyme handelt. Dies ist der Fall, wenn die Namen traditionell eine breite Verwendung fanden. (z.B.: die Verdauungsenzyme Trypsin und Pepsin). Außerdem wurde mit dem EC-Nummern-System ein Kodierungssystem entwickelt, in dem die Enzyme unter einem vierstelligen Zahlencode eingeteilt werden. Die erste Zahl bezeichnet eine der sechs Enzymklassen (s. unten), die restlichen drei Stellen spezifizieren das Enzym anhand der katalysierten Reaktion:

-
- EC 1: *Oxidoreduktasen* katalysieren Redoxreaktionen.
- EC 2: *Transferasen* übertragen funktionelle Gruppen von einem Substrat auf ein anderes.
- EC 3: *Hydrolasen* spalten Bindungen unter Einsatz von Wasser.
- EC 4: *Lyasen*, Synthetisieren oder spalten komplexere Produkte aus einfachen Substraten *ohne* Verbrauch von ATP.
- EC 5: *Isomerasen* beschleunigen die Umwandlung in ein anderes Konstitutions- oder Stereoisomer. Hierzu zählen auch die *Epimerasen*.
- EC 6: *Ligasen* oder *Synthetasen*, katalysieren die Additionsreaktionen mithilfe von ATP. Die Umkehrreaktion, also die Spaltung, findet hier nicht statt.

Einige Enzyme sind in der Lage, mehrere verschiedene Reaktionen zu katalysieren, sie werden dann auch mehreren Enzymklassen gleichzeitig zugerechnet. Das heißt, ein solches Enzym hat mehrere EC-Nummern je nach betrachteter Funktionalität.

Insbesondere in Datenbanken wie z.B. bei BRENDA gewährleistet der Code ein schnelleres Auffinden des Enzyms. Zwar beschreiben auch die Codes bereits die Eigenschaften der Reaktion, die das Enzym katalysiert, doch in der Praxis erwiesen sie sich als eher unhandlich. Daher werden in der Regel systematische Namen genutzt, die nach den oben genannten Regeln gebildet werden.

1.3 Physikochemische Betrachtungen

1.3.1 Kinetik von katalysierten Reaktionen

Allgemeines zur Katalyse

Bereits 1835 entdeckte Berzelius, dass einige Substanzen, selbst wenn sie nur in Spuren vorhanden sind, den Ablauf einer chemischen Reaktion stark beeinflussen, und nannte diese Stoffgruppe Katalysatoren. Erst 1907 beschrieb schließlich Ostwald in der bis heute gültigen Definition, was ein Katalysator ist:

„Katalysatoren sind Stoffe, deren Zusatz bereits in geringen Mengen die Geschwindigkeit einer Reaktion beeinflusst. Charakteristisch ist, dass diese Stoffe chemisch unverändert vor und nach der Reaktion in gleicher Menge vorliegen“

Katalysatoren sind dabei spezifisch für eine bestimmte Reaktion und begünstigen bei mehreren Möglichkeiten jeweils einen Reaktionsweg abhängig vom gewählten Katalysator. Dies macht sie für die chemische Synthese interessant, da so auch unter Normalbedingungen ungünstige Reaktionen mit hoher Effizienz durchgeführt werden können.

In der Technik unterscheidet man dabei zunächst zwei Fälle. Liegen die Reaktanden und der Katalysator in einer gemeinsamen Phase vor, so spricht man von *Homogener Katalyse*. In kinetischer Hinsicht wird bei der homogenen Katalyse oft die Anzahl der Teilchen, die für das Zustandekommen einer Reaktion kollidieren müssen, reduziert (z.B. Oxidation von SO_2 zu SO_3 durch Sauerstoff mit NO). In anderen Fällen werden ungünstige Oxidationsstufen vermieden (z.B. Mn^{2+} -katalysierte Reduktion von Ce^{4+} mit I^-) oder eine deutliche reaktivere Spezies gebildet, was besonders bei Säure/Base-Katalyse gilt. Da die Konzentration des Katalysators nahezu konstant bleibt, ist die Kinetik in der Regel erster Ordnung im Substrat, aber die Gesamtgeschwindigkeit abhängig von der Katalysatormenge.

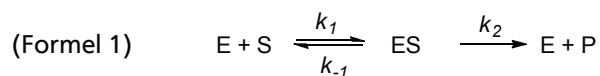
Bei der zweiten Methode, der *Heterogenen Katalyse* ist der Katalysator nicht Teil der Reaktionsphase. Meist handelt es sich um feste Katalysatoren und flüssige oder gasförmige Reaktionsgemische. Da die eigentliche Reaktion an der Oberfläche des Katalysators stattfindet, kommen hier zur eigentlichen Katalyse Oberflächeneffekte wie Adsorption und Desorption hinzu. Dies führt bei hohen Substratkonzentrationen und geringen Katalysatormengen zur Sättigung des Katalysators. Eine weitere Steigerung der Substratkonzentration hat keinen Einfluss mehr auf die Reaktionsgeschwindigkeit, die Kinetik weicht von der einer Reaktion erster Ordnung ab.

Enzymatische Reaktionen weichen von diesen klassischen Regeln der katalysierten Reaktionskinetik ab, da die Enzymkatalyse zwischen homogener und heterogener Katalyse steht. Obwohl die Proteine in der Regel gut löslich sind und somit ein scheinbar einphasiges Gemisch vorliegt, bildet sich doch ein Kolloid. Alle zurzeit bekannten Enzyme sind Makromoleküle zwischen 10 und 100 nm im Durchmesser und haben nur eine oder wenige reaktive Stellen. Die enzymatische Katalyse weist dadurch ein Phänomen auf, das es bei der homogenen Katalyse nicht gibt; wie bei heterogenen System ist auch hier die Sättigung des Katalysators durch das Substrat zu beobachten. Daher wird die Biokatalyse manchmal auch als mikro-heterogen bezeichnet. Für alle enzymatischen Reaktion gelten folgende drei Grundsätze:

- Bei gleicher Anfangskonzentration des Substrates ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration des Enzyms.
- Bei konstanter Enzymkonzentration ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration des Substrats, solange dessen Konzentration gering ist.
- Bei hoher Anfangskonzentration des Substrates verhält sich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr proportional. Es tritt Katalysatorsättigung ein und die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt nahezu konstant.

Michaelis-Menten-Modell

Als Grundlage für enzymatische Reaktionen wird der Mechanismus nach Michaelis und Menten angenommen.



In der Michaelis-Konstante K_M werden alle Geschwindigkeitskonstanten des Systems zusammengefasst. Das Fehlen einer Konstante k_{-2} geht auf das Modell der irreversiblen Umsetzung zurück.

(Formel 2)
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{([E]_{eff} - [ES]) \cdot [S]}{[ES]}$$

Praktisch stellt K_M in erster Linie ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar, je kleiner der Wert, desto stabiler ist der Enzym-Substrat-Komplex. Diese Aussage gilt jedoch nur, solange $k_2 < k_{-1}$ ist, also die Dissoziation von ES schneller als die Umsatzreaktion ist. Die Micha-

elis-Konstante ist für jedes Enzym/Substrat-Paar einzigartig und muss jeweils empirisch neu bestimmt werden. Abweichungen über mehrere Größenordnungen sind dabei normal.

Interessant ist die Michaelis-Konstante, in ihrer Dimension eine Konzentration, für die kinetischen Untersuchungen von Enzymreaktionen. Gilt $[S] \ll K_M$, also ist nur wenig Substrat vorhanden (welches dann direkt umgesetzt wird) so ist die Reaktion erster Ordnung in $[S]$ und $[E]$ ^[14]. Die Geschwindigkeit steigt linear mit der Konzentration an Substrat oder Enzym. Für den Sonderfall $[S] = K_M$ ist die Reaktionsgeschwindigkeit genau halbmaximal. Ist viel Substrat vorhanden, also $[S] \gg K_M$, so wird die Reaktionskinetik nullter Ordnung bezüglich des Substrates und erster Ordnung in der Konzentration des Enzymes. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist dann unabhängig von der Substratmenge, da das Enzym immer mit Substrat gesättigt ist; die Reaktionsgeschwindigkeit ist dann maximal. In der Realität ist diese Geschwindigkeit nicht die Maximalgeschwindigkeit v_{max} , sondern ihr nur angenähert, v_{max} wird aber nie erreicht. Nach dem Modell geht die Reaktionsgeschwindigkeit also mit der Konzentration an Substrat von linear in eine asymptotische Annäherung an einen Maximalwert über. Dies lässt sich durch eine Hyperbelgleichung in Formel 3 beschreiben (vgl. Abb. 1 links).

(Formel 3)
$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Der rechte Teil der Gleichung in Formel 2 wurde bereits 1925 von Briggs und Haldane entwickelt und besitzt eine zentrale Bedeutung in der Enzymkinetik. Sie ist zwar streng genommen – wie eingangs erwähnt – nur für den einfachen Fall einer irreversiblen unimolekularen Reaktion abgeleitet, bleibt jedoch unter bestimmten Bedingungen und auch für komplexere Mechanismen anwendbar.

Die zweite wichtige Größe in Formel 3 ist die maximal mögliche Umsatzgeschwindigkeit v_{max} . Das Modell geht davon aus, dass keine Dissoziation des Enzym-Substrat-komplexes stattfindet und das Enzym stets gesättigt ist. Der Umsatz ist damit unabhängig von der Substratkonzentration $[S]$ und das System befindet sich im stationären Gleichgewicht (*steady state*), wobei für die Enzymkonzentration $[E]$ gilt $[E]_0 = [E]$. Dann kann v_{max} durch Formel 4 beschrieben werden.

(Formel 4)
$$v_{max} = k_2 \cdot [E]_0$$

Messungen der Umsatzgeschwindigkeit der gleichen Reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen und gleicher Enzymmenge liefern Messpunkte entlang einer durch Formel 3 beschriebenen Hyperbel. Durch iteratives nicht lineares Fitting, heute durch Computerprogramme

in sehr kurzer Zeit möglich, können die Parameter K_M und v_{max} dann direkt und schnell bestimmt werden. Früher war dazu eine doppelt-reziproke Linearisierung üblich. Diese auch als Lineweaver-Burk-Auftragung bekannte Methode ist jedoch fehleranfällig, da Konzentrationsabweichungen bei hohen Verdünnungen starken Einfluss auf die ermittelten Werte haben. Allerdings sind für eine zuverlässige direkt-lineare Auftragung Substratkonzentrationen von mehreren K_M nötig, eine Bedingung, die durch schlechte Löslichkeit des Substrats nicht immer erfüllt werden kann. Die Lineweaver-Burk-Methode kann auch mit Substratkonzentrationen nur unterhalb K_M noch verwertbare Daten liefern. Für einen schnellen Vergleich, z.B. verschiedener Enzyme oder Mutanten desselben Enzyms untereinander für die gleiche Reaktion, lässt sich oft schon die Anfangsgeschwindigkeit v_0 heranziehen und direkt gegenüberstellen. Für genauere Untersuchungen müssen die Michaelis-Parameter ermittelt werden.

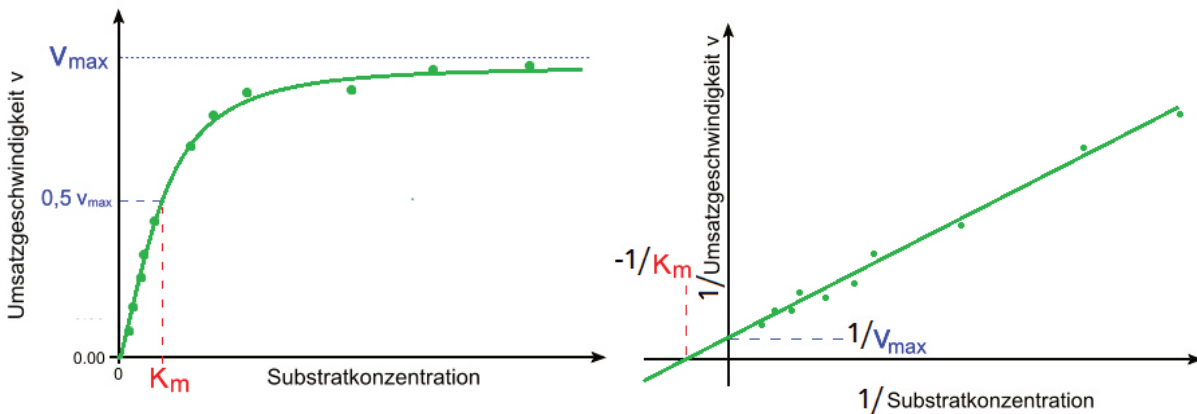


Abbildung 1: Direkt-lineare Auftragung als Cornish-Bowden-Diagramm links und die heute nahezu obsoleete Lineweaver-Burk-Linearisierung (exemplarisch). Durch iteratives nicht lineares Fitting können die Parameter im Cornish-Bowden-Diagramm direkt und genauer bestimmt werden. Die reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung hingegen ist fehleranfällig, da Konzentrationsabweichungen bei hohen Verdünnungen starken Einfluss auf die ermittelten Werte haben.

Weitere Parameter

Aus den Werten K_M und v_{max} lassen sich dann weitere wichtige Kenngrößen ableiten. So hängt die aus den Messungen und hyperbolischem Fitting erhaltene Größe v_{max} immer noch von der eingesetzten Enzymmenge ab; der Zahlenwert ist damit nur für die eine Messreihe gültig und nicht universell. Um die Menge des eingesetzten Enzyms heraus zu rechnen und damit universell gültige Zahlen für die jeweilige Reaktion zu erhalten, haben sich zwei Methoden durchgesetzt. Zum einen ist es möglich, v_{max} direkt durch die *Konzentration* des Enzyms zu teilen (bei Enzymen, die mehrere aktive Zentren oder Untereinheiten haben, durch die Konzentration der

Aktiven Zentren). Nach Formel 4 erhält man nun die Reaktionskonstante k_2 . In diesem Zusammenhang wird diese Konstante als k_{cat} bezeichnet und auch „Wechselzahl“ genannt. Die Wechselzahl hat die Dimension reziproker Zeit und bezeichnet die Anzahl an Reaktionen pro aktivem Zentrum pro Zeiteinheit für die jeweilige Reaktion.

Von praktischer Bedeutung ist daneben die *Spezifische Aktivität*. Sie gibt die Leistungsfähigkeit des Enzyms als Biokatalysator an. Hierbei wird v_{max} in $\mu\text{mol}/\text{min}$ (manchmal auch *Aktivität* genannt) durch die Enzymmenge (in mg) geteilt. Die Einheit der spezifischen Aktivität wird auch als „International Unit“ bezeichnet und mit U abgekürzt.

Als letzte wichtige Größe soll noch Quotient k_{cat}/K_M erwähnt werden, der die katalytische Effizienz ergibt. Das Michaelis-Menten-Modell beschreibt die enzymatische Reaktion in zwei Stufen: Die reversible Bindung des Substrats und die irreversible Umsetzung zum Produkt (betrachtet man den Reaktionsbeginn, kann die Rückreaktion des Produktes auch in der Realität vernachlässigt werden, da noch kein bzw. sehr wenig Produkt vorhanden ist.) Für eine effiziente Reaktion sind also eine gute Bindung des Substrats, eine schnelle Umsetzung und eine deutlich schlechtere Bindung des Produktes von Nöten.

Extrem hohe katalytische Effizienz haben im menschlichen Körper einige Enzyme, wie z.B. Katalasen für die Zerlegung von cytotoxischem Wasserstoffperoxid aus anderen enzymatischen Redox-Reaktionen, oder die Acetylcholinesterase für den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin zum Beenden der synaptischen Erregung. Die Tabelle 3.4-1 zeigt einige exemplarische Werte.

Tabelle 3.4-1: Kinetische Parameter einiger Enzyme im Vergleich

| Enzym | Reaktion | k_{cat} in s^{-1} | K_M in mmol/l | k_{cat}/K_M in $\text{s}^{-1} \cdot (\text{mmol}/\text{l})^{-1}$ |
|---|--|---------------------------------|------------------------------------|---|
| Katalase ^[15] (Rind) | $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ | 600.000 | 29 | 21.000 |
| Urease ^[16] (<i>Canavalia ensiformis</i>) | Harnstoff $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{NH}_3$ | 5.900 | 2,9 | 2.000 |
| Carboanhydrase I ^[17] (Mensch) | $\text{CO}_2 + \text{OH}^- \rightarrow \text{HCO}_3^-$ | > 1.300.000 | 9 | 150.000 |
| Fumarase ^[18] (Mensch) | Fumarat \rightarrow (S)-Malat | 1150 | 0,2 | 5.560 |
| | (S)-Malat \rightarrow Fumarat | 600 | 0,9 | 700 |
| Acetylcholinesterase ^[19] (Maus) | AcCholin \rightarrow Cholin + AcOH | 2300 | 0,05 | 46.000 |

Liegen bei chiralen Verbindungen beide Enantiomere im Verhältnis 1:1 vor, so spricht man von einem Racemat; überwiegt eines der Enantiomere, so wird das durch den Enantiomerenüberschuss kurz *ee* (engl.: enantiomeric excess) angegeben. Der Enantiomerenüberschuss ist eine dimensionslose Zahl und wird oft als Prozentwert zwischen 0% (Racemat) und 100% (enantiomerenreine Verbindung) angegeben. Berechnet wird der Wert aus den Anteilen des jeweiligen (*R*)- und (*S*)-Enantiomers in der Mischung:

(Formel 5)
$$ee = \frac{|[(R)] - [(S)]|}{[(R)] + [(S)]}$$

Eine wichtige Größe, um enantioselektive enzymatische Reaktionen hinsichtlich ihrer präparativen Nutzbarkeit zu bewerten, ist neben der Umsatzgeschwindigkeit der *E*-Wert. Dieser liefert Zahlenwerte für die Enantiomerenpräferenz des Enzyms und ist definiert als der Quotient der Reaktionskonstanten des jeweiligen Enantiomers mit dem Enzym.

(Formel 6)
$$E = \frac{K_{(R)}}{K_{(S)}} > 1$$

Der Wert ist für jedes Enzym-Substrat-Paar einzigartig und nicht auf andere Substrate oder Enzyme übertragbar. Ein Wert größer als 50 gilt dabei als selektiv, größer 100 als hoch selektiv; ein Wert von 1 hingegen deutet auf gar keine Unterscheidung der Enantiomere hin. Bei einer enzymatischen Reaktion ist sowohl der *ee* des gebildeten Produkts als auch der verbleibenden Substrats interessant. Es gilt für jede Enzymatische Reaktion die zwei Substrate A und B (Enantiomere des Substrats) verschieden schnell zu zwei Produkten P und Q (Enantiomere des Produkts) umsetzt^[20]:

(Formel 7)
$$ee_S = \frac{[B] - [A]}{[A] + [B]}; \quad ee_P = \frac{[P] - [Q]}{[P] + [Q]}$$

Der Reaktionsfortschritt χ wird nach Formel 7 definiert.

(Formel 8)
$$\chi = 1 - \frac{[A] + [B]}{[B]_0 + [B]_0}$$

In Abhängigkeit von den Enantiomerenüberschüssen des Edukts und Produkts ausgedrückt ergibt sich:

$$\text{(Formel 9)} \quad \chi = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

Daraus ergeben sich die E -Werte bei Substratabbau nach Formel 7 und für die Selektivität bei der Produktbildung nach Formel 8. Treten neben der Hauptreaktion noch andere Reaktionswege auf, müssen diese Werte nicht zwingend gleich sein.

$$\text{(Formel 10)} \quad E = \frac{\ln\{(1-\chi) \cdot (1-ee_S)\}}{\ln\{(1-\chi) \cdot (1+ee_S)\}}$$

$$\text{(Formel 11)} \quad E = \frac{\ln\{1-\chi \cdot (1-ee_P)\}}{\ln\{1-\chi \cdot (1+ee_P)\}}$$

Aus Formel 7 und 9 lässt sich der E -Wert so zusammenfassen, dass die Reaktionsrate χ eliminiert wird, und E für die Produktbildung nur noch durch die jeweiligen Enantiomerenüberschüsse beschrieben wird.

$$\text{(Formel 12)} \quad E = \frac{\ln \left[\frac{(1-ee_S)}{\left(\frac{ee_S}{1+ee_P} \right)} \right]}{\ln \left[\frac{(1+ee_S)}{\left(\frac{ee_S}{1+ee_P} \right)} \right]} = \frac{\ln \left[\frac{ee_P \cdot (1-ee_S)}{(ee_P + ee_S)} \right]}{\ln \left[\frac{ee_P \cdot (1+ee_S)}{(1ee_P + ee_S)} \right]}$$

Dies ist jedoch streng genommen nur zulässig, wenn die Umsetzung Michaelis-Menten-artig abläuft und als uni-uni-Mechanismus beschrieben werden kann.^[21] Darüber hinaus muss die Reaktion in homogener Phase und im Batch-Reaktor laufen, auch darf die Probennahme erst am Anfang oder kurz vor Abschluss der Umsetzung erfolgen.

Enzymhemmung

Die bisherigen Beschreibungen gehen jedoch von zwei vereinfachten Annahmen aus: In der Reaktion $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ tritt zum einen keine Rückreaktion auf, zum anderen werden Nebenreaktionen und Effekte der Produkte auf das System ignoriert. Die Rückreaktion lässt sich durch einen starken Überschuss an Substrat unterdrücken, oder indem das Produkt (bzw. eines der Produkte) aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Der zweite Punkt ist es nicht so einfach zu realisieren. Die Aktivität eines Enzyms kann in der Realität von vielen Substanzen beeinflusst werden. Oft wird der Umsatz gegenüber dem theoretischen Wert herabgesetzt, man spricht von Inhibition. Während Enzym-Inhibitoren als Wirkstoffe in der medizinischen Chemie eine große Rolle spielen (MAO-Hemmer, ACE-Inhibitoren, ...) ^[22], ist Inhibition in der Katalyse eher

unerwünscht, da sie die Effizienz des Systems reduziert. Ein Inhibitor ähnelt dem Substrat grundsätzlich soweit, dass er in der *active site* binden kann, aber anders als das Substrat geht er keine Reaktion ein. Allen Inhibitionsvorgängen ist gemein, dass die Bindung des Inhibitors die Geschwindigkeit der Hauptreaktion herabsetzt. Dabei kann die Wechselwirkung des Inhibitors mit dem Enzym reversibel oder irreversibel sein. Im irreversiblen Fall wird das Enzym – meist durch nicht solvatisierbare kovalente Bindung des Inhibitors – dauerhaft funktionsunfähig und kann nicht mehr regeneriert werden. Im Fall der reversiblen Hemmung konkurrieren Inhibitor und Substrat um die *active site*. Die Stärke des Inhibitors hängt hier von den K_M -Werten der beiden Substanzen für das Enzym ab. Je nach Art und Komplexität der Gleichgewichte unterscheidet man vier Haupttypen von Inhibition: Kompetitive, unkompetitive, nicht-kompetitive und partielle Inhibition.^[23]

Bei der kompetitiven Inhibition (Abb. 2, Schema 1) haben beide Substanzen eine Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms und es konkurrieren Substrat und Inhibitor um die Bindestelle. Der Inhibitor ähnelt dabei dem Substrat stark genug um von der *active site* erkannt zu werden, kann aber die Reaktion nicht eingehen. Durch das Gleichgewicht zwischen freiem Enzym und Enzym-Inhibitor-Komplex, dessen Bildung durch die Konstante k_i bestimmt wird, wird die Konzentration an freiem Enzym herab gesetzt. Während dabei v_{max} gleich bleibt, wird K_M scheinbar erhöht, da nun mehr Substrat nötig ist, um $\frac{1}{2} v_{max}$ zu erreichen.

Bei der unkompetativen Hemmung (Abb. 2, Schema 2) wirkt der Hemmstoff ausschließlich auf den Enzym-Substratkomplex und verhindert die Produktbildung. Diese Art der Inhibition ist nur möglich, wenn durch die Aufnahme des Substrats eine allosterische Bindestelle, also eine Bindestelle außerhalb des aktiven Zentrums, für den Inhibitor geschaffen wird. Da die Hemmung nicht am aktiven Zentrum stattfindet, bleibt K_M unverändert. Durch die verlangsamte Produktbildung wird v_{max} jedoch scheinbar verringert. Damit nicht zu verwechseln ist die Nicht-kompetitive Hemmung (Abb. 2, Schema 3). Sie unterscheidet sich dahingehend, dass der Inhibitor sowohl auf das freie Enzym als auch – mit einer anderen Gleichgewichtskonstante – auf den Enzym-Substratkomplex wirken kann.

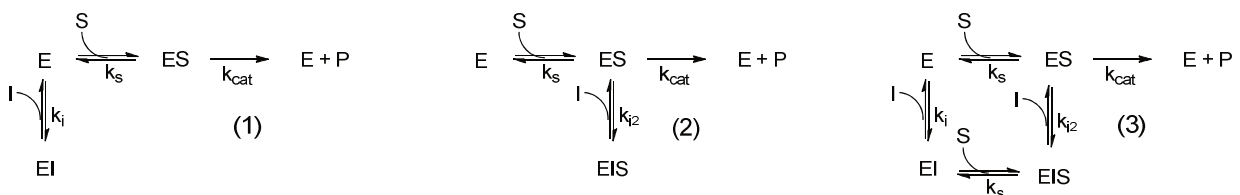


Abbildung 2 : Reaktionsschemata für verschiedene Inhibitionen. Kompetitive (1), unkompetitive (2) und nicht-kompetitive (3) Inhibition^[23]

In beiden Fällen findet eine allosterische Bindung statt. Bei dieser Inhibition erscheinen K_M und v_{max} ist verringert gegenüber der ungehemmten Reaktion.

Bei beiden Formen der allosterischen Hemmung kommt es auch für die Bindestelle des Inhibitors zu Sättigungseffekten, so dass die Effekte sigmoidal mit der Konzentration des Hemmstoffs verlaufen. Bei allen drei Inhibitionen wird das inhibierte Enzym, bzw. der inhibierte Enzym-Substrat-Komplex als vollständig inaktiv betrachtet. Dies unterscheidet sie von der partiellen Hemmung; hier ist der Inhibitor-Substrat-Enzym-Komplex immer noch zur Produktbildung fähig, jedoch mit anderer Geschwindigkeit. Ein interessanter Sonderfall der partiellen Hemmung sind Promotoren: Hier ist der Promotor-Substrat-Enzym-Komplex aktiver und v_{max} höher als beim unbeeinflussten Substrat-Enzym-Komplex.

Neben zusätzlichen Substanzen wirken in der Katalyse vor allem oft das nicht-bevorzugte Enantiomer des Substrats und mit steigender Konzentration das Produkt selbst als Inhibitor.

1.3.2 Absorption und Fluoreszenz

Moleküle können mit elektromagnetischer Strahlung auf verschiedene Weise wechselwirken. Photonen werden von Materie absorbiert und geben ihre Energie an das Molekül ab, welches sie aufnimmt und seinen Zustand abhängig von der Energiemenge ändert. Nach den Gesetzmäßigkeiten der Quantenmechanik kann dieser innere Zustand eines Moleküls nur bestimmte, diskrete Werte annehmen. Jeder Zustand wird dabei beschrieben durch seine Wellenfunktion und einen zugehörigen Energieeigenwert, den das Molekül in dem Zustand annimmt. Die Änderung des Molekülzustands kann also Anregung auf drei Arten stattfinden:

- elektronische Anregung durch Veränderung der Energieniveaus von Elektronen im Molekül,
- Vibrations-Anregung durch die Schwingungen der Atome des Moleküls miteinander,
- Rotations-Anregung durch die Drehung des gesamten Moleküls.

Treffen Photonen aus dem Bereich des sichtbaren oder ultravioletten Lichtes (2-5 eV) auf die Elektronenwolke des Moleküls, kann es zu derartigen Elektronenübergängen kommen, das heißt einzelne Elektronen werden in Zustände höherer Energie verschoben, den sogenannten angeregten Zustand. Nach dem Übergang verändern sich die auf das Molekül wirkenden Kräfte stark, worauf das Molekül mit Schwingungen reagiert um die einzelnen Atomkern-Positionen den neuen Kräften anzupassen.

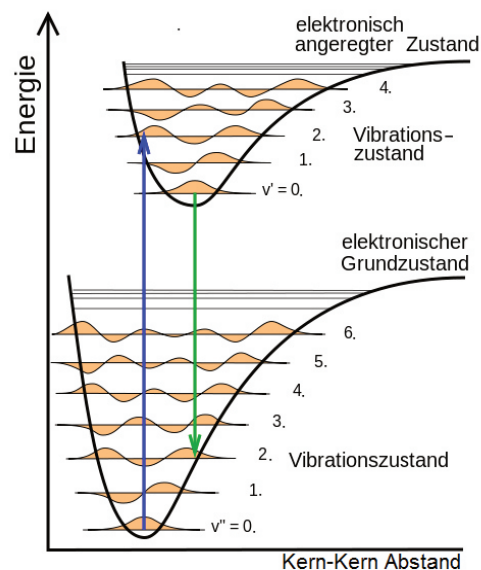


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips

Diese Schwingungsstruktur lässt sich allerdings nur in Lösung oder in der Gasphase beobachten. Von Bedeutung sind diese Unterstrukturen für die Übergangswahrscheinlichkeit und damit für die Intensität der Absorption.

Die Physiker James Franck und Edward Condon beschrieben dies durch eine qualitative Anwendung der Born-Oppenheimer-Näherung. Das nach ihnen benannte Franck-Condon-Prinzip beruht auf der Tatsache, dass der Elektronenübergang so schnell stattfindet (innerhalb von Femtosekunden, 10^{-15} Sekunden), so dass sich der Kernabstand während der Anregung nicht ändert, da eine Änderung der Kernschwingungsperiode im Bereich von 10^{-12} Sekunden liegt. (s. Abbildung 5). Diese hohe Geschwindigkeit des elektronischen Übergangs gegenüber der Kernbewegung wird hauptsächlich durch die geringe Masse der Elektronen – ca. 1/1800 der Masse eines Protons – erklärt, analog zur Born-Oppenheimer-Näherung.

Für die elektronischen Übergänge resultiert daraus, dass die Wahrscheinlichkeit in welchen elektronischen Zustand das Molekül übergeht, um so höher ist, je besser die Vibrations-Wellenfunktionen der beiden Zustände zueinander kompatibel sind, also wenn die Kernkoordinaten möglichst ähnlich denen des Grundzustandes sind. Einige vibrionische Unterzustände des elektronisch angeregten Zustandes sind damit wahrscheinlicher als andere. Durch das Franck-Condon-Prinzip lassen sich die Intensitäten dieser Übergänge berechnen. Trägt man nun die Potentialkurven und Wellenfunktionen für beide Zustände in ein gemeinsames Diagramm ein, das die Energiesituation über dem Kern-Kernabstand der angeregten Bindung zeigt, so wird der wahrscheinlichste und damit häufigste Übergang durch eine senkrechte Linie repräsentiert (Vertikaler Übergang). Dabei müssen Start- und Endpunkt in Position und Form der Wellenfunktion die größtmögliche Ähnlichkeit aufweisen, das *Überlappungsintegral* also größtmöglich sein. Am vereinfachten Beispiel für ein zweiatomiges Molekül der Zustände in Abbildung 3 bedeutet dies: Für den Übergang aus dem Vibrations-Grundzustand des elektronischen Grundzustands ist der wahrscheinlichste Übergang in den elektronisch angeregten Zustand derjenige, der im 2. Vibrations-Zustand endet. Übergänge in andere Vibrations-Zustände (hier: den 4.) können auch stattfinden, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit dafür geringer. Von Bedeutung ist dies, da sich die für den Übergang benötigte Energie und damit die absorbierte Wellenlänge der Strahlung aus der Summe der elektronischen und der Vibrationsübergänge berechnet.

Nach dem Grundsatz der Energieminimierung ist das Molekül bestrebt, wieder in den Grundzustand zurückzufallen. Bei Einzelatomen geschieht das, in dem ein Photon der gleichen Wellenlänge wie bei der Anregung emittiert wird, bei mehratomigen Molekülen ist der Sachverhalt komplexer. Ein elektronisch angeregtes Molekül kann seine Energie auf mehreren Wegen abgeben. Zum einen die *strahlende Desaktivierung*, bei der ein Photon emittiert wird und so die

Energie abführt, und die *strahlungslose Desaktivierung*, die elektronische Energie als Schwingung, Rotation oder Translation an die Umgebung abgibt, wo bei letztlich Wärme freigesetzt wird. Häufig treten beide Formen zusammen auf, da die strahlende Desaktivierung nur aus dem Vibrations-Grundzustand heraus erfolgen kann, und auch dabei die Franck-Condon-Regeln zu beachten sind (s. Abbildung 3).

Auch kann das angeregte Molekül zerfallen oder weiter reagieren. Typische Photoreaktionen sind Doppelbindungsinversionen^[24], [2+2]-Cycloadditionen^[25], und Radikalreaktionen; dies sei hier aber nur um der Vollständigkeit Willen erwähnt.

Von besonderem praktischen Interesse ist die strahlende Desaktivierung, da aus der leicht zu messenden Wellenlänge des emittierten Photons Rückschlüsse auf das Molekül gezogen werden können. Meist tritt nach einer kurzen Verweildauer im angeregten Zustand eine statistisch verteilte *Spontane Emission* auf, die auch als *Fluoreszenz* bezeichnet wird. Die Übergangszeiten liegen dabei im Bereich von Nanosekunden bis (selten) Mikrosekunden. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist hierbei – anders als bei Atomen – immer länger als die Anregungswellenlänge. Wie schon zuvor erwähnt, endet die Anregung in einem elektronisch und vibrionisch angeregten Zustand. Die große Energiedifferenz zwischen den elektronischen Zuständen kann normalerweise nicht strahlungsfrei an die Umgebung abgegeben werden. Durch die Emission fällt das Molekül aus dem vibrionischen Grundzustand des angeregten Zustands in den quantenchemisch nächstähnlichen Vibrationszustand des elektronischen Grundzustandes, der dann seinen Grundzustand relaxiert. Da die jeweilige Vibration über thermische Dissipation abgebaut wird, steht für die Emission ein geringerer Energiebetrag zur Verfügung. Diese Verschiebung der Wellenlänge wird auch als Stokes-Shift bezeichnet. Abbildung 4 fasst diesen Sachverhalt in einem vierstufigen Energie-Niveau-Schema zusammen. Ein wichtiger Wert zur Beurteilung eines Fluoreszenzfarbstoffes ist die Quantenausbeute. Die Quantenausbeute gibt an, welcher Anteil der vom Molekül absorbierten Photonen zur Fluoreszenzemission führen.

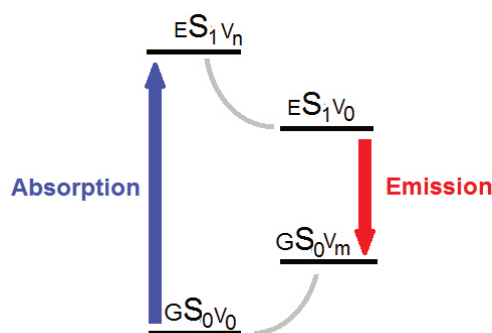


Abbildung 4: Energie-Niveau-Schema der Fluoreszenz

Bei einigen Verbindungen ist es möglich, dass die Elektronen des angeregten Singulett-Zustandes gleich nicht in den Grundzustand zurückfallen, sondern in den Triplettzustand übergehen. Schweratome beispielsweise begünstigen dies, da der dominierende Mechanismus für diesen Übergang, das *intersystem crossing* (ISC), bei organischen Molekülen die Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment des Spins und dem des zugehörigen Orbitals (Spin-Bahn-Kopplung) ist. Die Spin-Bahn-Kopplung wiederum hängt in der vierten Potenz von den Ordnungszahlen der beteiligten Atome abhängig. ISC bezeichneter Übergang ist dann möglich, wenn Die S_1 - und T_1 -Zustände ähnlich Wellenfunktionen auf gleichem Energieniveau liegen und gleichen Multiplizitäten besitzen. Um in den Grundzustand S_0 zurückzukehren gibt es drei Möglichkeiten. Zum einen kann das Elektron über ein zweites ISC wieder in den S_1 -Zustand zurückkehren und dann Strahlung als verzögerte Fluoreszenz emittieren. Bei der verzögerten Fluoreszenz findet also zunächst ein ISC aus dem T_1 -Zustand in den energetisch höher liegenden S_1 -Zustand statt. Dies geht aber nur, wenn die Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen vergleichsweise gering ist, und die notwendige Energie thermisch aufgebracht werden kann. Verzögerte Fluoreszenz ist dadurch nachzuweisen, dass Lichtemission mit der Wellenlänge des Fluoreszenzlichts erfolgt, wohingegen Phosphoreszenz auf Grund der kleineren Energiedifferenz stärker rot-verschoben ist.

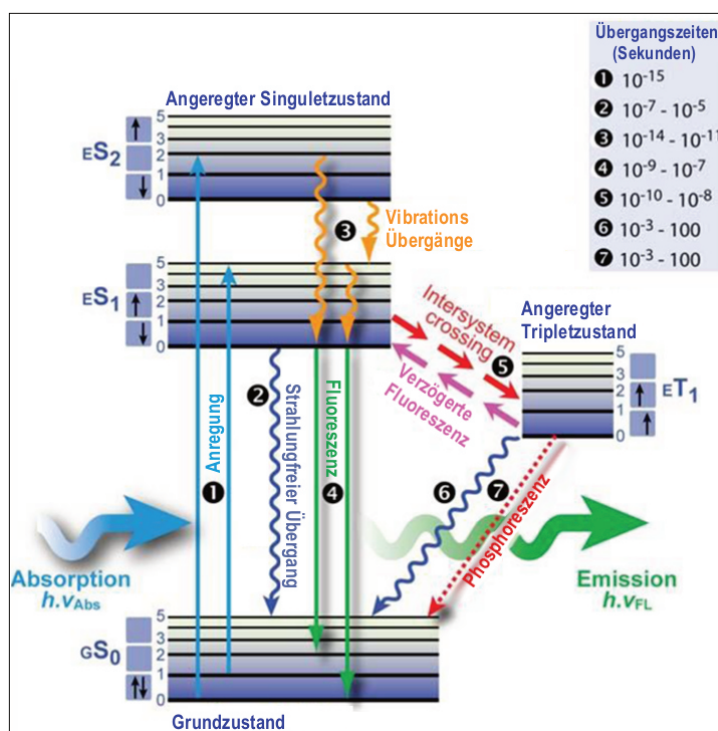


Abbildung 5: Jablonski-Diagramm der verschiedenen elektronischen Übergänge und deren Übergangszeiten modifiziert nach Ankerhold [26]

Die Emission zeigt das Verhalten eines thermisch aktivierten Vorgangs wie Temperaturabhängigkeit; die verzögerte Fluoreszenz lässt sich somit in der Kälte unterbinden. Bei tiefen Temperaturen ist ein ISC zurück in den S_1 -Zustand nicht mehr möglich, da die Aktivierungsenergie fehlt.^[27]

Die häufigere Variante ist die Phosphoreszenz. Das Elektron fällt aus dem T_1 direkt in S_0 zurück. Wegen des Spinverbotes sind diese Übergänge unwahrscheinlich und die Lebensdauer des Triplett-Zustandes ungewöhnlich lang, von einigen Sekunden bis Stunden. Letztlich ist auch ein ISC in einen sehr hohen Vibrationszustand von S_0 , und die vibronische strahlungsfreie Relaxation, die innere Konversion, möglich. Auch hier gilt das Spinverbot und die Übergangszeiten sind entsprechend lang. In dem Jablonski-Diagramm in Abb. 5 werden alle strahlenden und strahlungsfreien Prozesse, die sich in Molekülen ereignen können, und deren Übergangszeiten noch einmal zusammen aufgezeigt.

Will man chemische Reaktionen kinetisch untersuchen, sind vor allem Absorption und Fluoreszenz von Interesse. Da die Übergangszeiten viele Zehnerpotenzen unter dem Messintervall liegen, können sie vernachlässigt werden. Verzögerte Fluoreszenz und Phosphoreszenz sind hier störende Effekte, da die Relaxationszeiten in der gleichen Größenordnung wie die Messung selbst liegen und somit das Ergebnis bis zu Unbrauchbarkeit verfälschen.

Die Empfindlichkeit von Fluoreszenzmessungen ist deutlich höher als von Absorptionsmessungen. Da nicht die Verdunklung eines zweier Lichtstrahlen gegen 100% gemessen wird, sondern die Emission von Licht gegen absolute Dunkelheit, lassen sich noch mehr als 100-fach geringere Konzentrationen bis in den nanomolaren Bereich nachweisen.^[28]

Trotzdem hat es auch Nachteile, die Intensität von Fluoreszenz zu messen. Da Fluoreszenz oft mit energiereicher Strahlung angeregt wird, kann es zu Fotoreaktionen kommen, die das Molekül zerstören; man spricht dabei vom Ausbleichen. So kann ein Molekül des Farbstoffs Fluorescein beispielsweise im Mittel ca. 30.000 mal zur Fluoreszenz angeregt werden, bevor es durch Fotoreaktionen zerstört wird und damit nicht mehr fluoreszenzfähig ist^[29].

Man spricht allgemein von Löschung der Fluoreszenz oder englisch *Quenching*, wenn äußere Faktoren eine eigentlich mögliche Fluoreszenz verhindern. Diese Fluoreszenzlöschung tritt immer dann auf, wenn verschiedene strahlungsfreie Prozesse mit der Emission um die freizusetzende Energie konkurrieren. Diese können sowohl intermolekularer Natur sein, aber auch intramolekular auftreten.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dynamischem und statischem Quenchen^[30], wobei in allen Fällen eine große Nähe oder ein Kontakt zwischen Fluorophor und Quencher erforderlich ist.

Dynamisches oder statisches Quenching weist auf räumlich nahe Moleküle oder Teile des gleichen Moleküls hin, die entweder durch Diffusion oder Änderung der Konformation mit dem angeregten Molekül(teil) kollidieren und die Energie des angeregten Zustands abführen.

Dynamische Quenchingprozesse wirken sich in der Regel entweder auf die Quantenausbeute oder die Lebensdauer des angeregten Zustandes negativ aus. Anders als bei der Fotoreaktion werden beide Moleküle dabei nicht verändert oder kombiniert. Die Mechanismen des dynamischen Quenchens sind dabei sehr unterschiedlich, neben der Stoßanregung gibt es Elektronentransfers, Spin-Bahn-Effekte oder Begünstigen eines ISC.

Es gibt eine Vielzahl von – meist einfachen – Substanzen, die als dynamischer Quencher fungieren können. Die einfachste Form ist das Kollisions-Quenching. In diesem Fall diffundiert der Quencher während der Lebenszeit des angeregten Zustands zum Fluorophor und kollidiert mit dem Molekül. Durch die Kollision wird die Anregungsenergie abgeführt und der Fluorophor kehrt strahlungsfrei in den Grundzustand zurück. Am bekanntesten für dieses Quenching sind Sauerstoff^[31], Halogenid-Anionen^[32] und Elektronenmangelverbindungen. Besonders gut untersucht ist die Unterdrückung der Fluoreszenz von Chinolinen durch Kollision mit Chloridionen.^[32] Auch das Lösungsmittel selbst kann eine Rolle spielen. Die Möglichkeit zur intermolekularen Löschung hängt dann davon ab, wie gut die Moleküle des Lösungsmittels die Energie des angeregten Moleküls aufnehmen können. Lösungsmittelmoleküle mit weit auseinanderliegenden Vibrationsniveaus wie Wasser oder Methanol können z.T. so große Energiemengen aufnehmen, dass die Emission unterdrückt und der Energiebetrag dann thermisch an das Lösungsmittel abgegeben wird.

Ein anderer beobachtbarer Fall ist die Kollision eines angeregten Moleküls mit einem anderen Molekül, jedoch gefolgt von einer Elektronenübertragung, das *Dexter-electron-transfer* Quenching. Durch die Kollision oder Annäherung auf unter 2 nm kommt es hier zur Anregung des zweiten Moleküls, in dem das Elektron des angeregten Zustands übertragen wird. Durch einen weiteren Elektronentransfer aus dem Grundzustand des zweiten (jetzt negativ geladenen) Moleküls in den Grundzustand des Fluorophors kehrt dieser in der Summe ohne Emission in den Grundzustand zurück. Der Quencher baut seinen angeregten Zustand dann strahlungsfrei oder durch Emission auf einer anderen Wellenlänge ab.

Dieser Effekt kann auch kontaktlos über Dipol-Dipol Wechselwirkungen erfolgen. Erste experimentelle Hinweise auf einen solchen Energietransfer zwischen zwei Molekülen gelang 1922 G. Cario und James Franck. Sie beobachteten, dass ein Quecksilber-Thallium-Dampfgemisch Licht der für Thallium charakteristischen Wellenlänge emittiert, wenn es mit Licht einer Wellenlänge bestrahlt wird, die spezifisch für die Anregung von Quecksilber ist.^[33] Bei dem von Theodor Förster 1946 beschriebenen und nach ihm benannten Förster-Resonanzenergie-Transfer (FRET)

wird die Energie des angeregten Zustandes strahlungsfrei zur Anregung des Quenchers genutzt. Voraussetzung ist dabei ein gleicher Energieniveauabstand und eine gleiche räumliche Orientierung der Schwingungsebenen.^[34] Die Rate ist stark vom Abstand der Komponenten abhängig. FRET tritt nur zwischen 2 und 10 nm auf und die Rate nimmt mit dem Abstand in der 6. Potenz ab.^[35]

Eine weitere Form des dynamischen Quenchens ist die Exiplex-Bildung, die Ausbildung eines Komplexes zwischen dem Quencher und dem Fluorophor im angeregten Zustand. Einige Amine sind in der Lage, mit dem angeregten Molekül Charge-Transfer-Komplexe zu bilden und so die Energie strahlungsfrei abzuführen.^[14]

Daneben gibt es auch statische Fluoreszenzlöschung oder *complex quenching*. Hierzu kommt es, wenn nicht-fluoreszierende Komplexe aus Fluorophor und Quencher gebildet werden. Durch die inaktiven Komplexe wird die Konzentration an verfügbarem Fluorophor verringert. Anders als beim Exiplex wird hier ein reversibler Komplex zwischen Fluorophor und Quencher bereits im Grundzustand gebildet, der dann ein anderes Absorptionsverhalten zeigt. Das statische Quenchen hängt nicht von Diffusion und intermolekularen Kollisionen ab, auch übt es keinen Einfluss auf die Lebensdauer des angeregten Zustands aus.

Manchmal tritt auch ein scheinbares Quenching auf, das in einer starken Absorption der anregenden Strahlung seine Ursache hat. Durch die Absorption erreichen weniger eingestrahelte Photonen den Fluorophor und die Quantenausbeute wird makroskopisch scheinbar verringert. Ursachen hierfür können neben absorbierenden Nebenkomponten auch zu hohe Konzentrationen des Fluorophors selber sein (*self-quenching*). Letztlich kann die Ursache auch in der Absorption des emittierten Lichtes durch andere entsprechend farbige Komponenten liegen (*Farbquenching*)^[36]. Quenching ist oft ein unerwünschter Effekt, er kann aber auch gezielt dazu genutzt werden, um den Farbstoff zu „schalten“.

1.4 Die Aldol-Reaktion

Die Aldolreaktion ist eine der bekanntesten und bedeutendsten Reaktionen der Carbonylchemie. Mit ihr ist es sehr einfach möglich über C-C-Verknüpfungen längere, funktionalisierte Molekülketten aufzubauen. Aus der Synthese von Makrolid-Antibiotika, neuen Kohlenhydraten und anderen Naturstoffen ist sie heute nicht mehr wegzudenken.

Entdeckt wurde diese Reaktion (unabhängig voneinander) um das Jahr 1870 von Charles Adolphe Wurtz^[37] und dem eher als Komponisten bekannten Alexander Porfirjewitsch Borodin^[38]. Die α -Protonen von Ketonen und Aldehyden sind so sauer, dass diese Verbindungen von alkalischen Lösungen dort deprotoniert werden können.

Die Aldolreaktion läuft in der Regel Basen-katalysiert ab. Durch die aziden Wasserstoffe kann das Keton deprotoniert werden. Das Molekül kann dann sowohl als Enolat beschrieben werden als auch als carbanionische Struktur, wobei beide in einem tautomeren Gleichgewicht zu einander stehen. Das Carbanion ist ein starkes Nukleophil (Donor) und kann so den Carbonyl-Kohlenstoff des Aldehyds (Akzeptor) leicht angreifen. Auf diese Weise wird eine neue C-C-Bindung geknüpft und ein β -Hydroxyketon erzeugt.

Bei der Aldolreaktion wird nun sowohl am Carbonylkohlenstoff des Akzeptors, wie auch am α -Kohlenstoff des Donors, wenn sich nicht um ein Methylketon handelt, ein neues Stereozentrum erzeugt. Daher sind bis zu vier Produkte möglich: *S,S*-, *S,R*-, *R,S*-, *R,R*- Aldol. Diese liegen jedoch nicht zwingend im gleichen Verhältnis vor, da verschiedene Faktoren die Bildung der einzelnen Isomere beeinflussen.

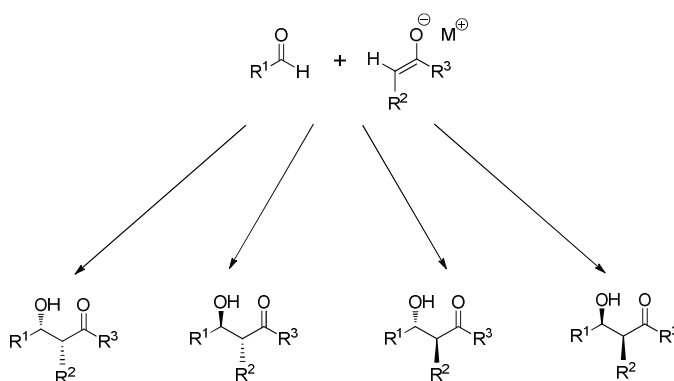


Abbildung 6: Bei der Aldolreaktion werden bis zu zwei neue Stereozentren generiert. Daher sind vier Diastereomere möglich.

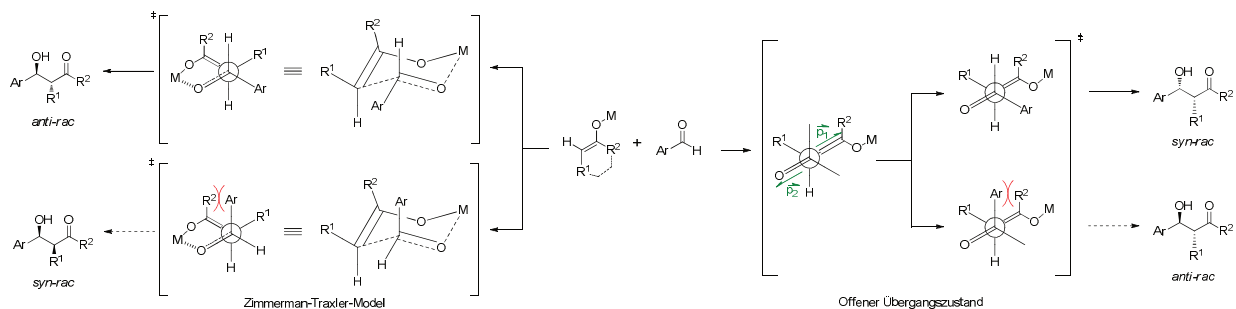
Wichtig für die Kontrolle über die bevorzugt gebildeten Diastereomeren ist die Konformation des Enolates und ob der Mechanismus über einen cyclischen, geschlossenen Übergangszustand oder über einen offenen beschrieben werden muss. Durch die Ausbildung der Doppelbindung zwi-

schen Carbonyl- und α -Kohlenstoff geht die freie Drehbarkeit verloren, und die Symmetrie der Doppelbindung ist in *E* oder *Z* festgesetzt. Welches Isomer entsteht, hängt von den verwendeten Reagenzien und der Größe des Restes am α -Kohlenstoff ab. Zu beachten ist, dass sich *E* und *Z* nicht auf die Reste R^2 und R^3 zueinander, sondern gemäß der IUPAC-Regel auf die Stellung von R^2 zum Sauerstoff des Enolates bezieht.

Stark komplexierend sind dabei Borate, gefolgt von Titan und Zirkonium, sowie in einigem Abstand auch Lithium. Dabei spielt das Modell eines cyclischen 6-gliedrigen Übergangszustands eine Rolle, um die *relative* Stereochemie vorauszusagen, das nach den Entwicklern als Zimmermann-Traxler-Modell bezeichnet wird. Die relative Stereochemie wird zum einen durch pseudo-axiale bzw. pseudo-äquatoriale Ausrichtung der Reste beider Moleküle bestimmt. Wie bei der Konformationsanalyse des Cyclohexans sind große axial stehende Reste und sterische 1,3-diaxiale Wechselwirkungen ungünstig, das daraus entstehende Produkt ist das energetisch ungünstigere und damit seltenere. Ein zweiter Punkt ist die Konfiguration des Enols des Donorketons. Wichtig ist das vor allem bei cyclischen Ketonen, die keine *E*-Enolate bilden können.

Dem gegenüber steht der offene Übergangszustand. Er wird nicht von Metall-Sauerstoff-Komplexen, sondern über die Dipolmomente der C-O-Bindungen eingestellt. Nach den Gesetzen der Elektrostatik richten sich diese möglichst gegensätzlich aus, die Präferenzen sind also umgekehrt zum Zimmermann-Traxler-Modell (s. Schema 2). Der offene Übergangszustand tritt in Abwesenheit von Metallsalzen auf, wie bei der Verwendung organischer Basen oder bei der Mukaiyama-Variante. Ebenso der Zusatz von Lewisäuren nach der Enolatbildung oder manchmal auch bei der Verwendung von LDA als Base zum offenen Übergangszustand. Durch die gegensätzliche Orientierung der Reaktionspartner ergibt sich durch die sterischen Effekte die umgekehrte Stereopräferenz. Von Bedeutung ist das bei der Erzeugung von *cis*-Aldolen mit cyclischen Ketonen, die nur *E*-Enolate bilden können.

Diese Mechanismen sind jedoch nur diastereoselektiv, es entstehen immer die Racemate; darüber hinaus erlauben sie nur eine grobe Abschätzung, da die Selektivitäten je nach Komponenten sehr unterschiedlich stark wirken. Bei schlecht komplexierenden Metallen können auch cyclischer und offener Mechanismus parallel auftreten. Um wirklich nur eine Komponente zu erhalten, sind weitere Schritte nötig, die im folgenden beschrieben werden.



Schema 1: Abschätzung der Präferenz für die Diastereomere nach dem cyclischen Modell von Zimmerman und Traxler (links) oder dem offenen Übergangszustand (rechts). Sterische Wechselwirkungen zwischen den Resten begünstigen jeweils ein Diastereomer. Für (*E*)-Enolate ergibt sich genau die gegenteilige Stereochemie.

Eine stereoselektive Synthese eines einzigen Enantiomers gelingt z.B. durch die Einführung von Hilfsgruppen, so genannten Auxillaren, die die Annäherung von einer Seite des prochiralen Zentrums verhindern, wie von Evans^[39] beschrieben. Interessanterweise kann auch durch die Verwendung von Prolin als Katalysator ein bestimmtes Enantiomer erzeugt werden, wobei das Prolin nach der Reaktion jedoch nicht aufwändig entfernt werden muss. Prolin ist strukturell gesehen ein chirales Derivat des Pyrrolidins, welches oft als Organokatalysator für Aldol-Reaktionen eingesetzt wird. der

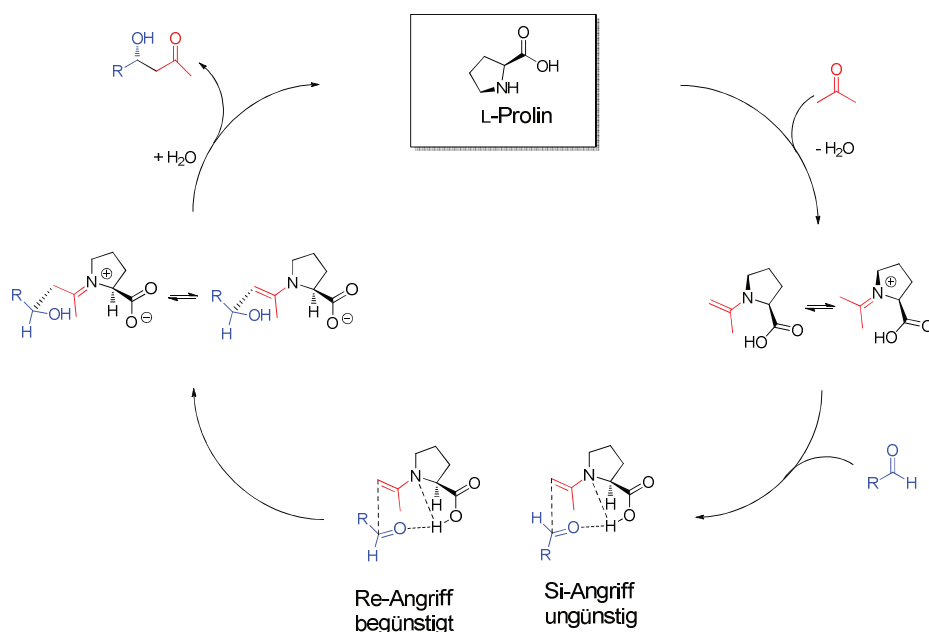


Abbildung 7: Mechanismus der Prolin-katalysierten asymmetrischen Aldoladdition. Die dreidimensionale Struktur des L-Prolins sorgt für sterische Hinderung des Si-Angriffs des koordinierten Aldehyd-Akzeptors.

Der Mechanismus dieser seit den 1970er Jahren bekannten Reaktion wurde 2000 durch Barbas et al. untersucht^[40] und das Postulat von Hajos und Parrish durch Reaktionen in ¹⁸O-markiertem Wasser und Isotopenuntersuchungen des Aldols bestätigt.^[41]

Die Prolin-katalysierte intramolekulare Aldoladdition ist auch als *Hajos–Parrish–Eder–Sauer–Wiechert Reaktion* bekannt^[41-42].

Aldole sind, wie eingangs erwähnt, Teile oder Vorstufen vieler Naturstoffe. Daher existieren auch Wege, wie Lebewesen diese Reaktion auf biochemischen Weg über Enzyme einsetzen können. Der vorrangige Mechanismus bei Aldolreaktionen, die durch Enzyme vermittelt werden ist die Reaktion über eine Schiffbase, analog zur Prolinkatalyse, wobei die Schiffbase oft mit dem Stickstoff eines Lysins gebildet wird. Die enzymatischen Reaktionen zeichnen sich dabei durch hohe Selektivität für ein bestimmtes Enantiomer aus, da jede nicht zielführende Synthese unnötig Rohstoffe verbraucht und so einen evolutionären Nachteil darstellt. Die Hohe Spezifität und die Tatsache, dass Enzyme unter milden Bedingungen in wässriger Umgebung eingesetzt werden können, machen sie zu sehr wirkungsvollen und für die Industrie interessanten Katalysatoren.

1.5 Biotechnologie

1.5.1 Enzyme engineering

Enzyme spielen in der Natur eine wichtige Rolle beim Auf- und Abbau von Stoffen in den jeweiligen Organismen. Ihre katalytischen Fähigkeiten möchte sich auch gerne die chemische Synthese zu Nutze machen, da sich so komplizierte Verbindungen sehr effizient unter milden Bedingungen herstellen lassen. Enzyme sind jedoch im Laufe der Evolution gut an ihre natürliche Reaktion angepasst und eignen sich nur bedingt für Reaktionen mit nicht-natürliche Substraten. Um ein Enzym für eine nicht-natürliche Reaktion zu optimieren, müssen entweder einzelne Aminosäuren oder größere Teile der Tertiärstruktur verändert werden.

Bakterien und Archaeen besitzen neben dem Bakterienchromosom kleine, in der Regel ringförmige, sich unabhängig replizierende doppelsträngige DNA-Moleküle, die als *Plasmide* bezeichnet werden. Ihre Größe beträgt 1000 bis über eine Million Basenpaare.^[43]

Plasmide enthalten zusätzliche Gene, wie z. B. Resistenzen gegen Antibiotika, was zu einem evolutionären Selektionsvorteil für das Wirtsbakterium führt.

Jedes Plasmid enthält mindestens eine Sequenz, die als Replikationsursprung (engl. *Origin of Replication*, kurz ORI) dient. Ist der Replikationsursprung kompatibel zu dem Bakterienstamm, so kann das Plasmid unabhängig von der chromosomalen DNA repliziert werden. Dies ermöglicht, Proteine die dem Bakterium fremd sind, in der Wirtszelle synthetisieren zu lassen.

Dazu wird das Gen durch Mutagenese verändert, welches das Enzym codiert und wieder in die Bakterien transformiert um das neue Enzym zu exprimieren. Abbildung 8 gibt eine schematische Übersicht über gängige Methoden dazu.

Ist die dreidimensionale Struktur des Enzyms bekannt, etwa durch eine Röntgenstruktur oder ein Homologiemodell, und hat man außerdem Kenntnisse über den katalytischen Mechanismus, kann ein zielgerichteter Ansatz gewählt werden. Beim „rational design“ wird am Computer das Modell des neuen Enzyms durch einzelne Veränderungen erstellt und mittels Kraftfeldberechnungen überprüft. Diese Veränderungen müssen nun in das Gen eingebaut werden, damit die Zellen das neue Protein produzieren. Diese punktuellen Veränderungen, man spricht von Punktmutationen, werden durch Primer erzeugt. Der Primer ist ein Stück DNA, das der Region um die zu verändernde Stelle entspricht und die Veränderung enthält. Damit bei der Vervielfältigung der DNA die Veränderung an die richtige Stelle eingebaut wird, ist ein gewisser Überlapp vor und nach der Veränderung nötig, in der Regel je ca. 10 Basenpaare. So kann sich der Primer immer nur an die richtige Stelle optimal anlagern. Die nötige Länge und Struktur des

Primers, also beide Überlappungen und das veränderte Tripple lassen sich heute mit Computerprogrammen gut berechnen.

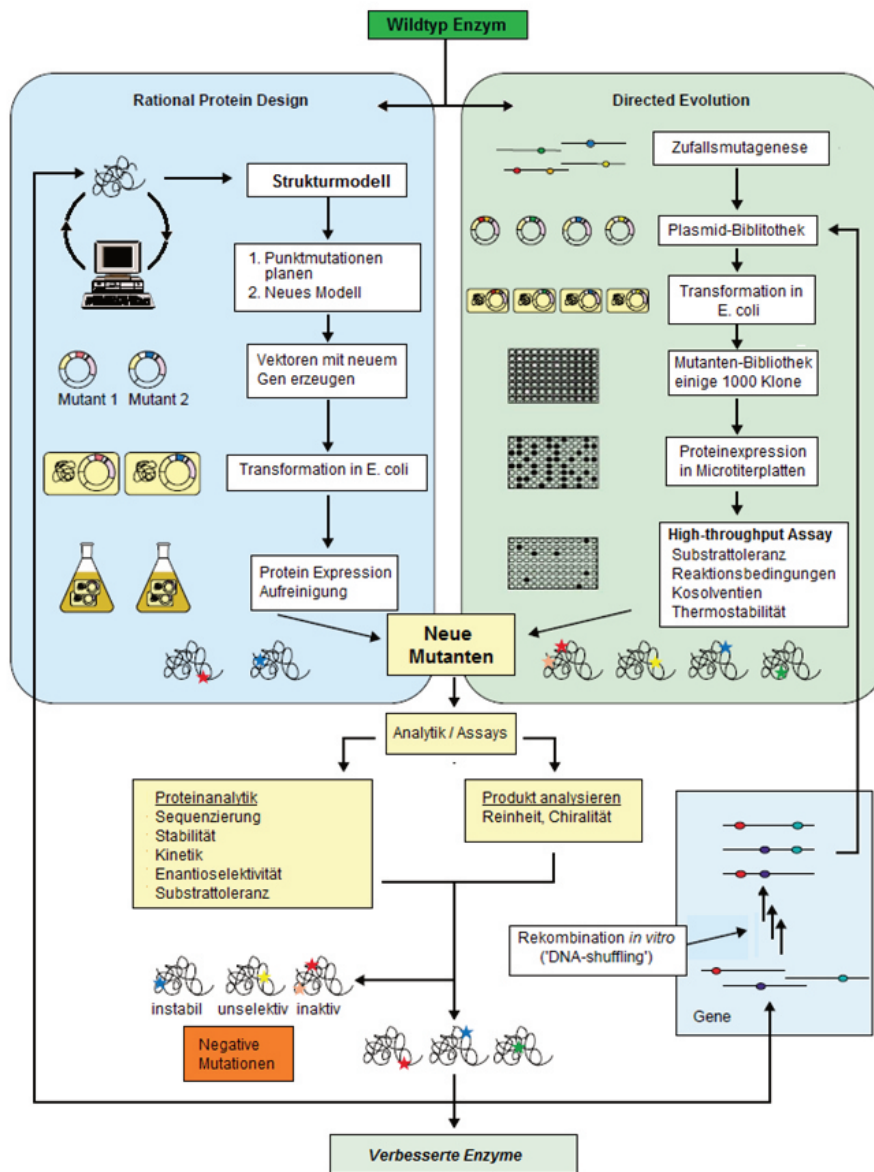


Abbildung 8: Schematische Darstellung der beiden gängigen Methoden des *protein engineering* zur Erzeugung neuer verbesserter Enzyme als Biokatalysatoren; modifiziert nach Bornscheuer^[44].

Der ursprüngliche Vektor wird dann unter Zugabe des Primers mittels PCR vermehrt, wobei zunächst sowohl Plasmide des ursprünglichen als auch des modifizierten Enzyms entstehen. Um den ursprünglichen Templat-Vektor wieder entfernen zu können, wird dieser aus Zellen entnommen, die Teile der DNA methylieren. Abschließend wird ein Enzym zugegeben, das selektiv methylierte DNA spaltet, so dass nur der veränderte Vektor intakt bleibt. Die neuen Plas-

mide werden dann in die für die Expression gewählten Zellen transformiert und das neue Enzym exprimiert. Auf diese Weise lassen sich jedoch nur wenige Varianten auf einmal erzeugen, dafür jedoch zielgerichtet die vielversprechendsten. Die Menge der erzeugten Enzyme ist dafür deutlich höher, was deren Untersuchung und Beurteilung erleichtert.

Ist die Struktur noch nicht bekannt, etwa weil sich das Enzym bisher nicht kristallisieren ließ, ist keine punktuelle Mutation möglich. In diesem Fall z.B. werden zufallsgesteuerte Methoden eingesetzt. So werden in die Plasmide, die das Enzym codieren, bei der Vervielfältigung Fehler eingebaut (Zufallsmutagenese). Die neuentstandenen Enzyme werden exprimiert und getestet. Zeigen sich Verbesserungen, so kann das zugrunde liegende Plasmid sequenziert werden um die Primärstruktur des Enzyms zu erhalten. Eine andere Methode „zerschneidet“ das dem Enzym zugrunde liegende Gen mit Restriktionsenzymen in Bruchstücke und setzte diese anschließend zufällig zusammen (DNA-shuffling). Die Trefferrate für tatsächliche Verbesserungen ist bei solchen Methoden jedoch deutlich geringer als beim rationalen Ansatz und die Zahl der erzeugten Varianten sehr groß, was den Screening-Aufwand erhöht.

1.6 Einführung: High Throughput Screening

Um die Bildung von Reaktionsprodukten in einer Mischung zu verfolgen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die einfachsten und ältesten Nachweise sind Fällungsreaktionen. Photometrische Methoden stechen durch geringen Aufwand und kontinuierliche Messung hervor. Viele kolorimetrische Methoden, also absorptive Messungen im sichtbaren Bereich, haben den Vorteil, sowohl mit dem bloßen Auge als auch apparativ in kleinen Konzentrationen beobachtet werden zu können. Durch ihre hohe Empfindlichkeit spielen auch auf Fluoreszenz basierende Methoden eine große Rolle.

Gerade in der industriellen Biochemie – aber auch in der pharmazeutischen Chemie – gewinnt es jedoch immer mehr von Bedeutung, automatisierte, parallele Verfahren anzuwenden, und die benötigten Mengen an Substanz und Target-Enzym zu reduzieren. Nur so ist es möglich, der schierem Vielzahl an Möglichkeiten Herr zu werden. Sollen beispielsweise in einem Protein an verschiedenen Positionen die Aminosäuren zufällig ausgetauscht werden, so nimmt die Zahl aller Möglichkeiten schnell astronomische Werte an (vgl. Tab. 3.5-1). Auch wenn oft einzelne Variationen von vorherein als nicht vielversprechend aussortiert werden können, ist es je nach gewählter Methode nicht immer möglich, deren Herstellung zu vermeiden (s. nächstes Kapitel).

Tabelle 3.5-1: Exponentieller Anstieg der möglichen Proteinvarianten beim Austausch einzelner Aminosäuren

| Zahl der Mutationen | Mögliche Proteine |
|---------------------|-------------------|
| 1 | 20 |
| 2 | 400 |
| 3 | 8.000 |
| 4 | 160.000 |
| 5 | 3.200.000 |
| ... | ... |

An diesen Zahlen wird schnell deutlich, dass manuelle, sequenzielle Analysen nicht nur große Mengen an Material verbrauchen, sie stellen auch einen immensen Zeit- und Kostenfaktor dar. Daher ist es nötig, Methoden zu entwickeln, die mit minimalen Reagenzmengen parallel und automatisiert bearbeitet werden können. Eine optische Auswertung über Farbigkeit oder Fluoreszenz hat sich unter diesen Gesichtspunkten als besonders geeignet erwiesen.

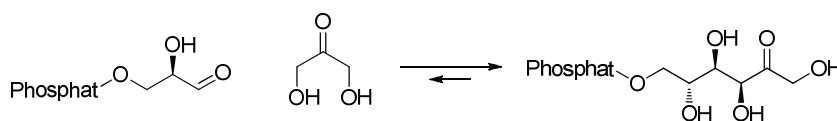
2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von Assays für die Fructose-6-phosphat-Aldolase und ω -Transaminasen. Mit den Assays sollte die Eignung der Enzyme für nicht-natürliche Reaktionen ermittelt werden und neue, besser geeignete Mutanten identifiziert werden.

Die Aldol-Reaktion ist als eine der bekanntesten Reaktionen zur Knüpfung neuer C-C-Bindungen für die chemische Synthese von großer Bedeutung. Fast immer ist die Synthese dabei durch den Bedarf an Schutzgruppen oder Auxillaren aufwändig, sobald nur ein Stereoisomer erhalten werden soll. Ein in der Literatur viel beachteter Bio-Katalysator ist der katalytische Antikörper 38C2. Dieser weist neben einer großen Substratbreite hohe Selektivitäten und gute Umsatzraten von bis zu $k_{cat} = 1/\text{min}$ für nicht-natürliche aromatische Substrate auf^[45]. Als Antikörper wird 38C2 jedoch in immortalisierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) den CHO-Zellen exprimiert, deren Kultivierung nicht trivial ist. Eine rekombinante Expression in *E. coli* verläuft derzeit noch wenig effektiv. Dennoch hat die Synthese durch Biokatalysatoren in Wasser grundsätzlich große Vorteile für die industrielle Synthese.

- Wasser ist deutlich billiger als alle anderen Lösemittel.
- Wasser ist nicht brennbar, nicht korrosiv und nicht toxisch.
- Reduzierung der Umweltbelastung durch die chemische Industrie (*Green Chemistry*)
- Synthese-Aufwand wird geringer, da durch Wegfall von Schutzgruppenchemie mehrere Syntheseschritte entfallen
- Aufarbeitung ist oft schon durch einfache Extraktionsverfahren möglich

Eine vielversprechende Alternative zum Antikörper 38C2 stellen Aldolasen dar. Diese meist am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligten Enzyme weisen für ihre jeweiligen natürlichen Reaktionen eine hohe Selektivität auf und lassen sich gut in *E. coli* exprimieren. Leider ist die Substratbreite oft sehr eng, so dass das betreffende Enzym durch Punktmutationen für die Reaktion optimiert werden muss. Die Fructose-6-phosphat-Aldolase (FSA), 2001 von Schürmann^[46] et al. beschrieben, setzt im Stoffwechsel von *E. coli* (K12) Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton zu Fructose-6-phosphat um.



Schema 2: Natürliche Reaktion der FSA Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton wird zu Fructose-6-phosphat umgesetzt.

Von der FSA ist bekannt, dass sie neben dem natürlichen Substrat Dihydroxyaceton auch Hydroxyaceton als Donorsubstrat für die Aldoladdition akzeptiert, was dann zur Synthese von 1-Desoxyfructose führt. Von synthetischem Interesse war daher, ob dieses Enzym nun auch Aceton, aliphatische Methylketone oder Cycloketone als Donoren akzeptiert, und welche Mutationen dafür nötig sind.

Als Messmethode sollte dabei ein Fluoreszenzassay dienen, da Fluoreszenzmessungen andere optische Verfahren durch eine deutlich höhere Empfindlichkeit übertreffen und apparativ weit einfacher durchzuführen sind als z.B. chromatographische Verfahren. Analog zu den Arbeiten der Arbeitsgruppe Barbas am Antikörper 38C2 wurde auch das Methodol als Aldol-Sensor gewählt, und sich für die Retro-Aldolspaltung als fluorogene Messmethode entschieden.

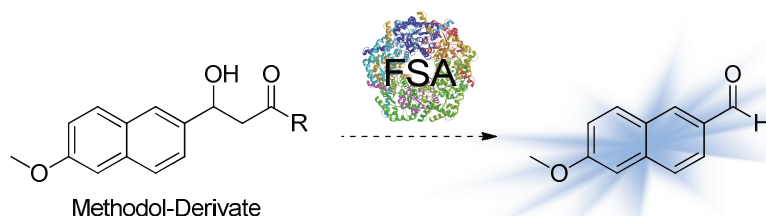


Abbildung 9: Idee der Spaltung des flourogenen Aldols durch die FSA. Die Fluoreszenz des freigesetzten 6-Methoxynaphth-2-aldehyds kann als Messsignal verwendet werden, um die katalytische Effektivität der Enzym-Variante zu beurteilen.

Eine weitere für die chemisch-pharmazeutische Industrie bedeutende Substanzklasse sind chirale Amine. Eine Vielzahl etablierter und experimenteller Wirkstoffe (Rivastigmin, Fendilin, ...) enthalten chirale Amine als Kernkomponente. Für die Zulassung als Medikament ist es wichtig, die Substanzen enantiomerenrein herzustellen und getrennt zu prüfen. In der klassischen Synthese ergibt sich daraus ebenfalls ein großer Aufwand, wenn Stereoselektiv synthetisiert werden muss und dafür neben mehr Syntheseschritten oft auch Komplexe Katalysatoren und Schutzgruppen nötig sind, was die Effizienz und Wirtschaftlichkeit der Synthese reduziert.

Transaminasen (TA; EC 2.6.1.x), oder genauer Aminotransferasen, sind Enzyme, die Ketone stereoselektiv in Amine überführen und umgekehrt^[47]. Mit Transaminasen können chirale Amine in hoher Enantiomerenreinheit erhalten werden. Dies ist – neben den ursprünglichen biologischen Funktionen – heute vor allem für die pharmazeutische Chemie von Bedeutung. Trotz ihrer Bedeutung für die chemische Industrie ist bis heute kein fluorometrischer Assay bekannt, um Transaminasen hinsichtlich Substratbreite und Umsatzgeschwindigkeit zu untersuchen.

Für die Untersuchung von Transaminasen sollte ein mit der für die FSA entwickelten Methode vergleichbarer Fluoreszenz-basierter Assay erstellt werden. Auch hier war von besonderem Interesse, über eine modulare Synthese mehrere, stückweise erweiterbare Moleküle mit vergleichbaren Fluoreszenzeigenschaften herzustellen, um die Substratbreite des Enzyms zu bestimmen.

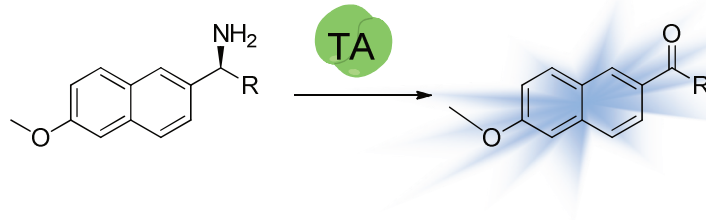


Abbildung 10: Umsatz eines chiralen Amins zum Keton durch eine Transaminase. Das Fluoreszenzsignal kann z.B. durch einen konjugierten Methoxynaphthylrest erzeugt werden.

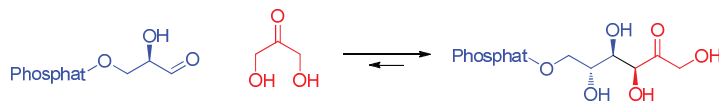
Neben der Entwicklung von Assays für die zuverlässige Bestimmung von kinetischen Parametern der einzelnen Enzyme und Enzymvarianten, war auch die Fragestellung eines eventuell teil-automatisierbaren High-Throughput-Assays verbunden, mit dem geeignete Mutanten direkt in der Zellkultur identifiziert werden können.

3 Spezieller Teil

3.1 Aldolase Assays

3.1.1 Fructose-6-phosphat Aldolase

Die Fructose-6-phosphat-Aldolase ist ein Enzym aus der Klasse der Lyasen (EC-Klasse 4.1.2.x), das zuerst in *Escherichia coli* K-12 entdeckt und 2001 von Schürmann und Sprenger beschrieben wurde.^[48] Die natürliche Reaktion ist die Bildung von Fructose-6-phosphat aus Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-phosphat, bzw. die Rückreaktion davon.



Schema 3: Natürliche Reaktion der Fructose-6-Phosphat-Aldolase

Die FSA setzt sich aus zwei ringförmigen Pentameren zusammen von denen jede der Untereinheiten aus 220 Aminosäuren besteht und eine Molekülmasse von ca. 23.000 Dalton besitzt. Diese komplexe Struktur macht das Enzym thermostabil, Thermo-shift Untersuchungen ergaben eine strukturelle Stabilität bis 80 °C^[49], was das Enzym als Bio-Katalysator interessant macht.

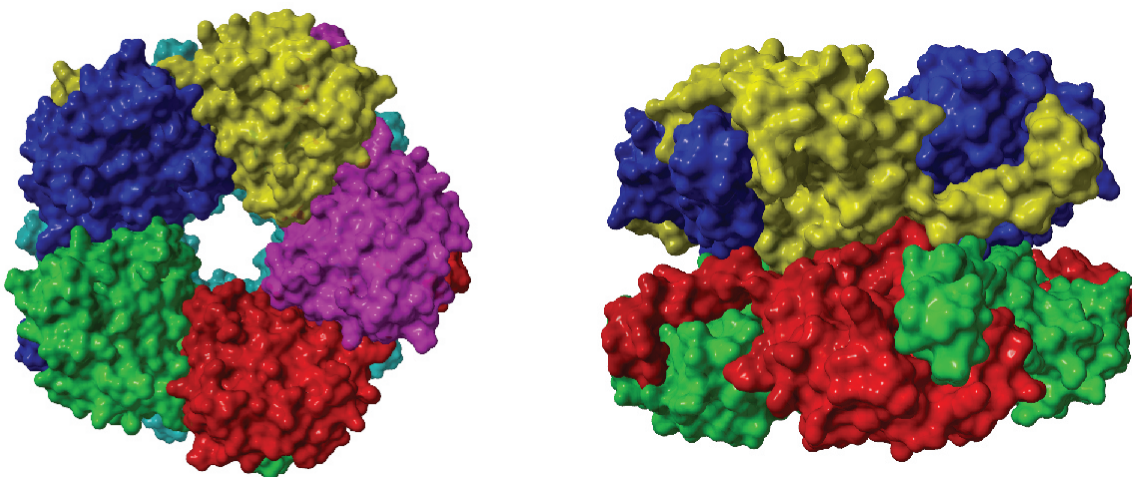


Abbildung 11: Computermodell der FSA basierend auf Röntgenbeugung (PDB 1L6W)^[48]: Je fünf der 10 identischen Untereinheiten bilden ineinandergreifend eine ringförmige Struktur, von denen sich zwei aneinander lagern. Die Zugänge zum aktiven Zentrum sind entlang dieser Kontaktfläche. Anaglyphes Bild siehe Bildtafel 1.

Die Primärstruktur einer Untereinheit der FSA (Wildtyp) ist unten aufgeführt, Bereiche die eine α -Helix bilden sind grün, Regionen, in denen ein β -Faltblatt vorherrscht, gelb unterlegt. Auffallend ist eine hohe Homologie der Fructose-6-phosphat-Aldolase mit anderen die Aldolreaktion katalysierenden Enzymen wie etwa der Transaldolase vom Typ B (TAL-B)^[50].

```

10      20      30      40      50      60      70
MELYLD TSDV VAVKALS RIF PLAGVT TNPS IIAAGKKP LD VVLPQLHEAM GGQGR LFAQV MATT AEGMVN

80      K85    90      100     110     120     130     140
DALKLRSI IA DI VVKVPVTA EGLAAIKMLK AEGIP TLGTA VYGA AQGLLS ALAGA EYVAP YVNRIDA QGG

150     160     170     180     190     200     210
SGIQTVTDLH QLLKMHAPQA KVLAA SFKTP RQALDCLLAG CESITL PLDV AQQMISY PAV DAAVAKFEQD

220
WQGAFGRTSI

```

Abbildung 12: Aminosäuresequenz eines Monomers der FSA (wildtyp). Die Farben repräsentieren die Sekundärstruktur: α -Helix sind grün, β -Faltblatt gelb unterlegt

In der Struktur lassen sich einige Besonderheiten ausmachen. Die lange Helix von P198 bis F215 bildet den „Haken“ welcher die Verbindung zur nächsten Untereinheit darstellt. Das aktive Zentrum befindet sich in einer von den β -Faltblättern erzeugten Tonnenstruktur. Lysin K85 kommt dabei eine Schlüsselrolle zu; hier wird in Form eines Enamins als Nucleophil die Schiff-Base mit dem Ketondonor ausgebildet und das Keton für die Aldol-Addition aktiviert^[51]. Das bei der Schiff-Kondensation freigesetzte Wasser wird über die polaren Gruppen von T109, Y131 und Q59 koordiniert^[48]. Eine Wirkung von Q59 als Säure-Base-Katalysator analog zur E60 bei Transaldolase liegt nahe.

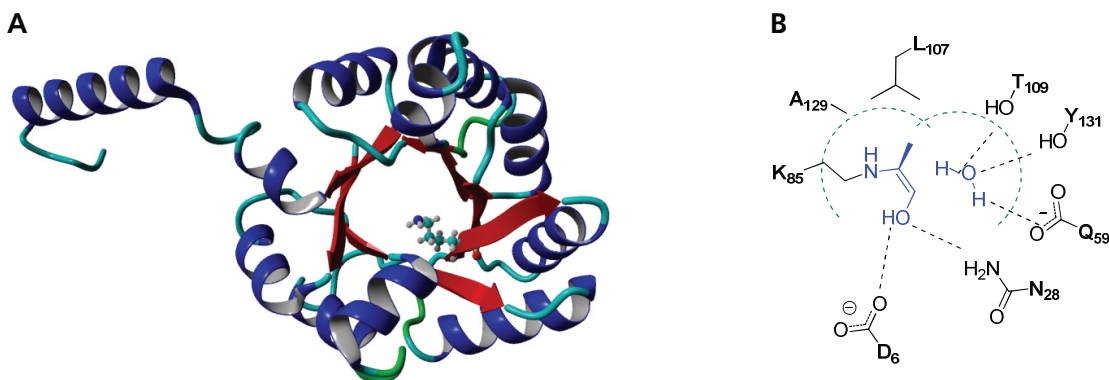


Abbildung 13: A) Modell einer Untereinheit der FSA aus der von Schürmann publizierte Struktur. Das katalytische Lysin K85 ist hervorgehoben. B) Schematische Darstellung des katalytischen Zentrums. Mit dem Ketondonor wurde bereits die Schiff-Base gebildet. Der Blick geht aus dem Aktiven Zentrum heraus in Richtung Lösungsumgebung.

Die Aminosäuren L107 und L163 sowie F57 begrenzen die katalytische Tasche nach innen. A129 trägt ebenfalls zur räumlichen Begrenzung bei, allerdings haben frühere Arbeiten gezeigt, dass der Wildtyp hier nicht die bestmögliche Variante gebildet hat. Variante A129S kann Dihydroxyaceton besser binden und die Effizienz des Enzyms für die scheinbar „natürliche“ Reaktion ist erhöht.^[52] Alanin A165 liegt dem katalytischen Lysin gegenüber und sorgt für eine Engstelle, die die Bildung der Schiff-Base erleichtert, aber an der 3-Position des Aldols nur Methylengruppen gut toleriert (Anaglyphe Bildtafel 3).

Mechanistisch handelt es sich um eine Basen-katalysierte Aldoladdition, die über eine Schiff-Base als Zwischenstufe verläuft, vergleichbar der durch Aminbasen katalysierten Reaktion.

Das Keton bildet mit der Aminogruppe von K85 eine Schiff-Base. Das α -Proton wird abstrahiert, wobei die Aminosäuren D6 und N28 eine Rolle für die Substrattoleranz zu spielen scheinen. Der so aktivierte Ketondonor greift dann den aldehydischen Akzeptor nucleophil an und bildet so das Aldol^[49]. Bei (Di-)Hydroxyaceton stellt die Aminosäure D6 zusätzlich eine koordinierende Stelle für die Hydroxygruppe dar und ist somit für die Stereochemie an C3 verantwortlich.

Die Rolle des Tyrosins Y131 ist nicht eindeutig geklärt. Schürmann sieht die Aminosäure wie schon erwähnt für die Koordination des Reaktionswassers verantwortlich.^[48]

Tittmann et al. sehen die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins zusätzlich als Säure-Base-Katalysator an der Aldolreaktion beteiligt.^[53] Diese Erklärung stützt sich vor allem auf eine entsprechende Funktion von Tyrosin bei anderen Aldolasen wie der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase^[54]. Experimente hierzu wurden jedoch nur mit einem als „Pseudo-FSA“ bezeichnetem von einer Transaldolase aus *Thermoplasma acidophilum* (*TacTAL*) abgeleitetem Enzym. Versuche die katalytische Aktivität einer FSA-Mutante Y131F wurden dabei nicht durchgeführt.

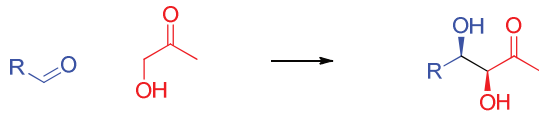
An der Eingangsstelle ist vor allem die Aminosäure R134 interessant, welche wohl ein Koordinationspartner für den Phosphatrest des Glycerinaldehyd-3-phosphats bei der natürlichen Reaktion darstellt (Anaglyphe Bildtafel 2)^[48].

Von der FSA ist bereits bekannt, dass sie neben den natürlichen Substraten Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Fructose-6-phosphat auch den nicht-phosphorylierten Glycerinaldehyd als Akzeptor nutzen und Fructose direkt bilden kann. Die Geschwindigkeiten sind dabei allerdings erheblich geringer (0,01 U/mg vs. 45U/mg)^[55].

Auch die Verwendung von Hydroxyaceton als Donor zur Bildung von 1-Desoxyfructose ist bekannt, auch hier mit geringerer Geschwindigkeit als für die natürliche Reaktion (1U/mg für DL-Glycerinaldehyd-3-phosphat, 0,1 U/mg für D-Glycerinaldehyd)^[55].

Als Biokatalysator ist die FSA vor allem deshalb interessant, weil sie verhältnismäßig große Mengen an organischem Lösungsmittel als Co-solvent toleriert. DMF, Acetonitril und sogar

Ethanol können bis zu 20% im Puffer enthalten sein, ohne die Aktivität oder Stabilität des Enzym wesentlich zu beeinträchtigen.^[56]



Schema 4: Auch nicht phosphorylierte Aldehyde und Hydroxyacetone werden stereoselektiv umgesetzt.

Hieraus resultierte der Forschungsansatz dieser Arbeit, die Umsetzung von aliphatischen und aromatischen Aldehyden mit Aceton oder anderen Methylketonen zu untersuchen und das Enzym dahingehend zu mutieren.

3.1.2 Mutationsansätze

Während dieser Arbeit wurden gleichzeitig mit der Entwicklung der Assays verschiedene mögliche Mutationen geplant, um die FSA für die Reaktionen mit aliphatischen Methylketonen zu optimieren. Dabei fand hauptsächlich *rational design* Anwendung. Durch Modellrechnungen an der von Schürmann publizierten Struktur wurden einige interessante Positionen ausgemacht. Wie erwähnt, begrenzen die Aminosäuren L107 und L163 sowie F57 die katalytische Tasche nach innen. Verkürzung der Ketten von L107 und L163 zu beispielsweise Alanin würde diese Tasche deutlich vergrößern und so länger-kettige Methylketone als Substrate zulassen^[49]. F57 bietet mutiert zu F57A zwar einen großen Raum, aber nur in Kombination mit den beiden anderen Positionen, da sonst keine Verbindung zum katalytischen Zentrum besteht. Die Trippelmutante F57A, L107A, L163A würde die Tasche aber vermutlich eher destabilisieren. Aminosäuren aus der direkten Umgebung könnten den durch Konformationsänderung Platz einnehmen, sodass der Raumgewinn z. T. wieder zunichte gemacht würde.

Die für Dihydroxyaceton als effizienter beschriebene Mutante A129S^[52] ist in diesem Kontext nicht von Interesse, da die hydrophile OH-Gruppe die Akzeptanz für hydrophobe, aliphatische Reste eher senken würde.

Alanin A165 sorgt für eine Engstelle gegenüber dem katalytischen Lysin, die die Bildung der Schiff-Base erleichtert, aber an der 3-Position des Aldols höchstens Methylengruppen akzeptiert. A165G ist hier ein Ansatz, den Platz etwas zu erhöhen, und auch verzweigte Ketone zuzulassen^[57]. Gleichzeitig besteht hier die Gefahr, dass die Bildung der Schiff-Base beeinflusst wird, da die räumliche Nähe von Lysin-NH₂ und Carbonylgruppe herabgesetzt ist.

Diese Ansätze zielen alle auf die Substratbreite ab, wobei die katalytische Aktivität selbst nicht beeinträchtigt werden sollte, und nur die sterische Akzeptanz der Substrate sollte erweitert werden. Weitere Mutationsansätze hatten eine Verbesserung der Katalyse für aliphatische Ketone im Blick.

Interessant ist dafür zunächst die *active site* selbst; hier bildet Lysin K85 die Schiff-Base mit dem Ketondonor^[51], jede Mutation hier sollte das Enzym vollständig deaktivieren und eine Negativkontrolle liefern.

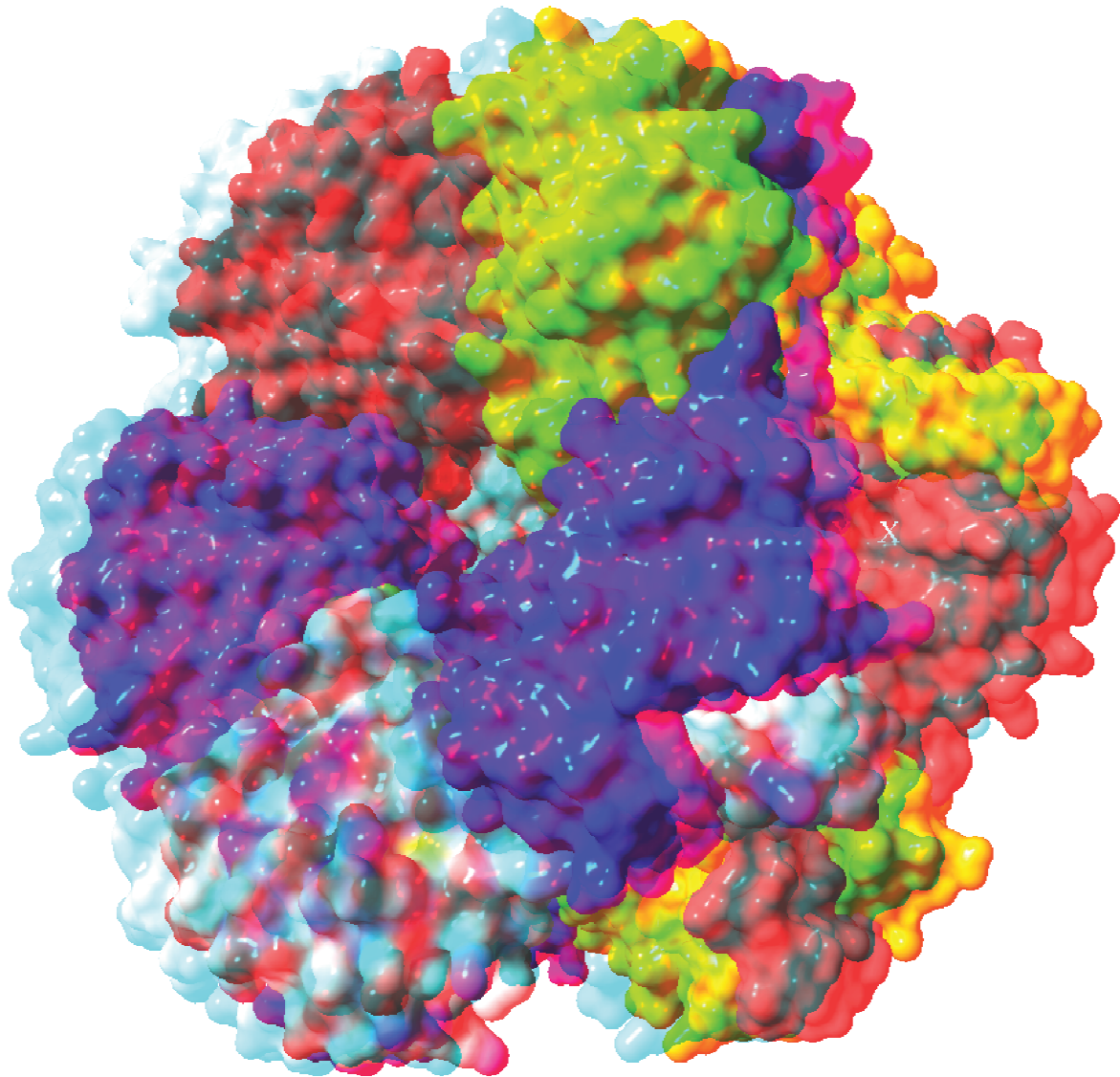
Die Aminosäure D6 spielt neben der Koordination des Hydroxyketons wohl auch eine Rolle bei der Abstraktion des α -Protons. Mutationen hier sind sehr vielversprechend, da die Deprotonierung den ersten Schritt zur Spaltung darstellt. Auch N28 scheint dabei beteiligt zu sein. Zufällige Mutationen an D6 bzw. N28 stellen gute Ansätze dar, schnell potentielle Kandidaten zu finden.

An der Eingangsstelle ist Arginin R134 ein Koordinationspartner für den Phosphatrest bei der natürlichen Reaktion, gleichzeitig nimmt der Guanidinrest viel Raum ein und verengt den Zugang zum katalytischen Zentrum. Die Bindestelle ist für nicht phosphorylierte Substrat nicht interessant, so dass eine Verkürzung zu R134A wohl eine bessere Mutante für größere Moleküle darstellt^[57]. Neben R134 begrenzen insbesondere die Aminosäuren S166 und K168 den Eingang zum katalytischen Zentrum. Kürzere Reste hier sollen die Akzeptanz für raumgreifende aromatische Reste erhöhen. (s. Anaglyphe Bildtafel 2).

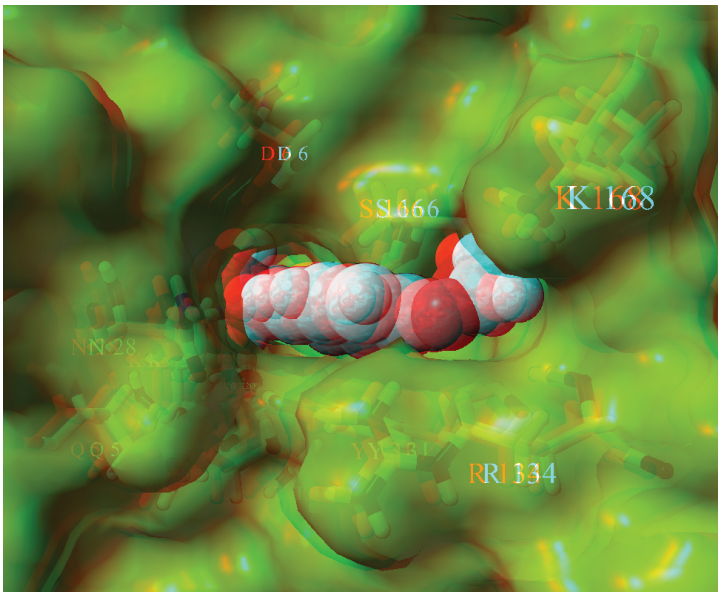
Einige dieser Enzymvarianten und Mehrfachmutationen mit Kombinationen davon wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt, um als Testenzyme für die Assayentwicklung zu dienen. Eine Variante Y131F um die These Tittmanns zu überprüfen erwies sich wie schon zu vor beschrieben^[58] als nicht stabil.

Anaglyphe Bildtafel 1

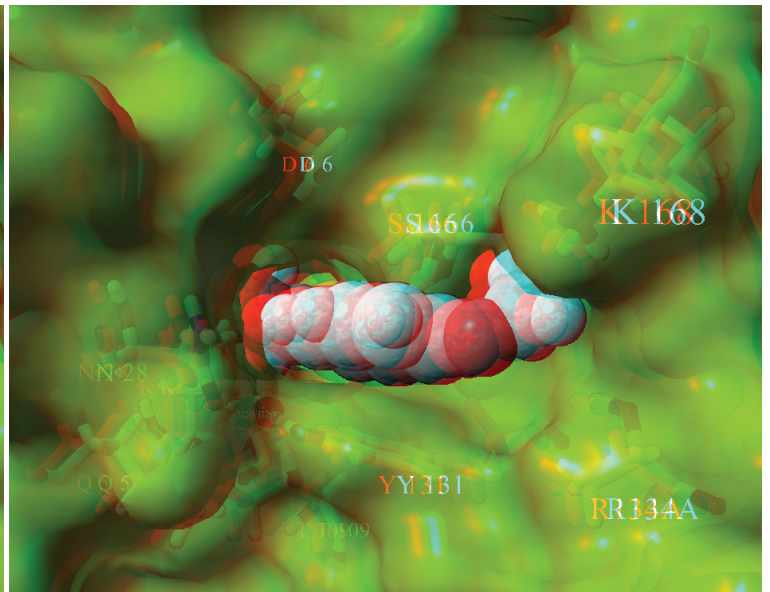
Computermodell der FSA: Je fünf der 10 identischen Untereinheiten bilden, ineinandergreifend, eine ringförmige Struktur, von denen sich zwei an einander lagern. Die Zugänge zum aktiven Zentrum sind entlang dieser Kontaktfläche. (Rechts exemplarisch mit X markiert)



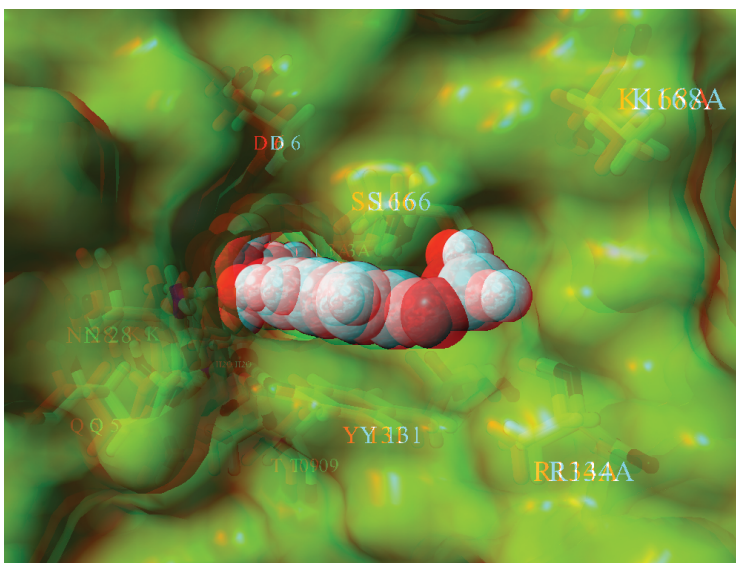
Anaglyphe Bildtafel 2
Eingang zur *active site* mit Methodol als Substrat



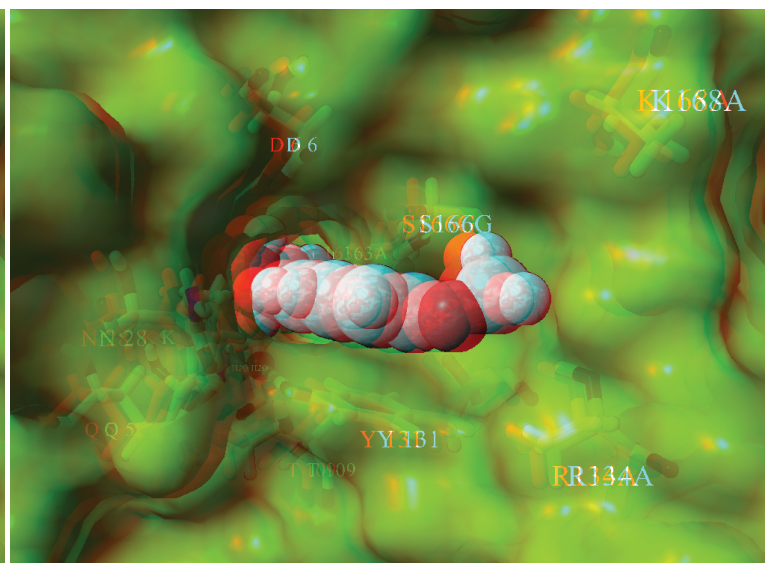
Wildtyp



Mutante R134A



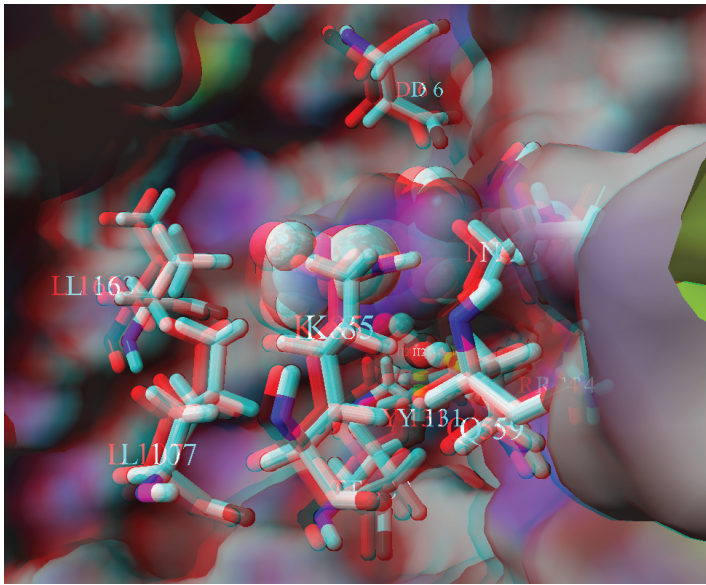
Mutante R134A-K168A



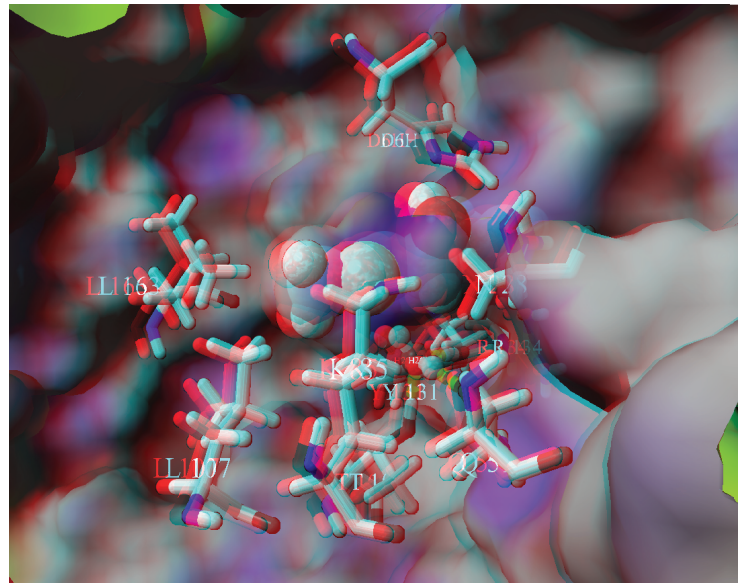
Mutante R134A-S166G-K168A

Anaglyphe Bildtafel 3

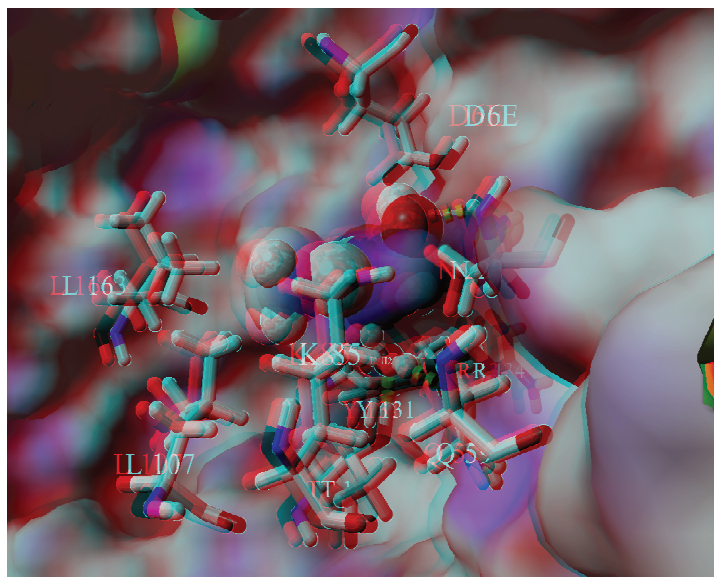
active site „Innenansicht“ mit Substrat
Methodol gebunden an Lys-85



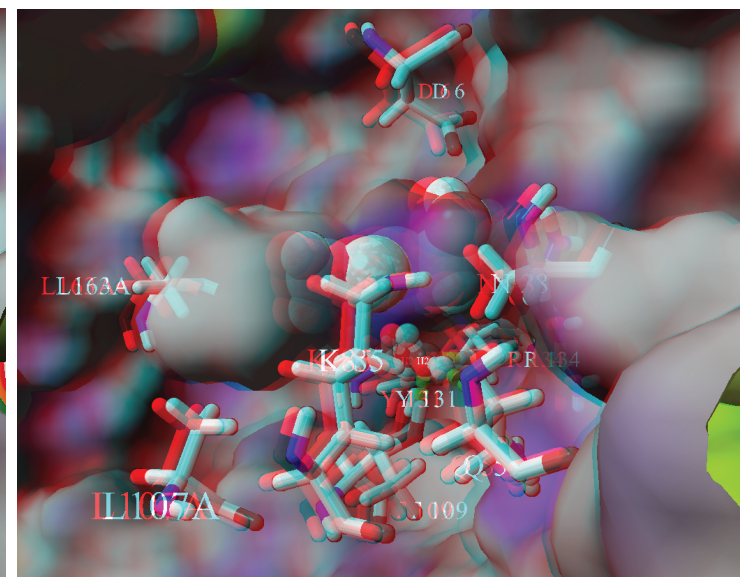
Wildtyp



Mutante D6H



Mutante D6E

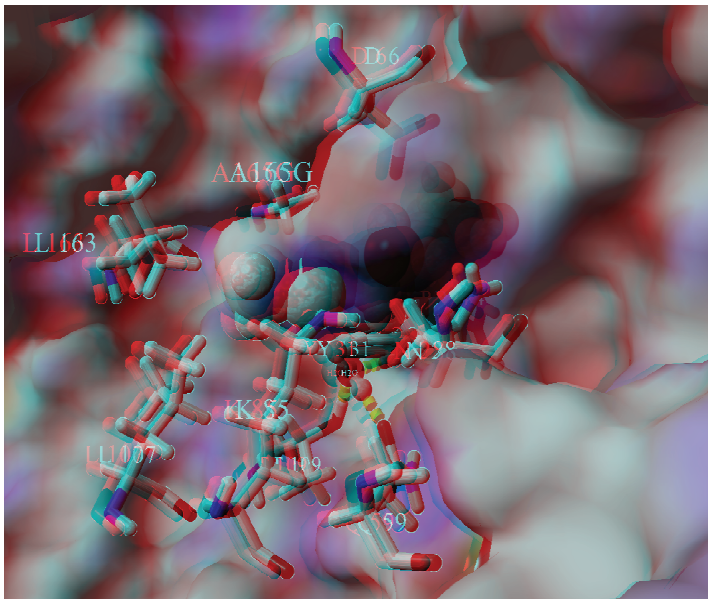


Mutante L107A-L163A

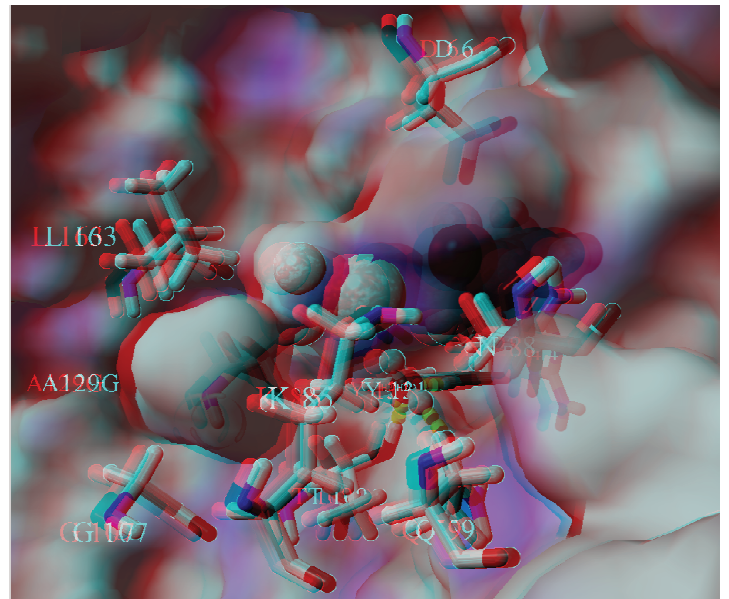
Anaglyphe Bildtafel 4

active site „Innenansicht“ mit Substrat

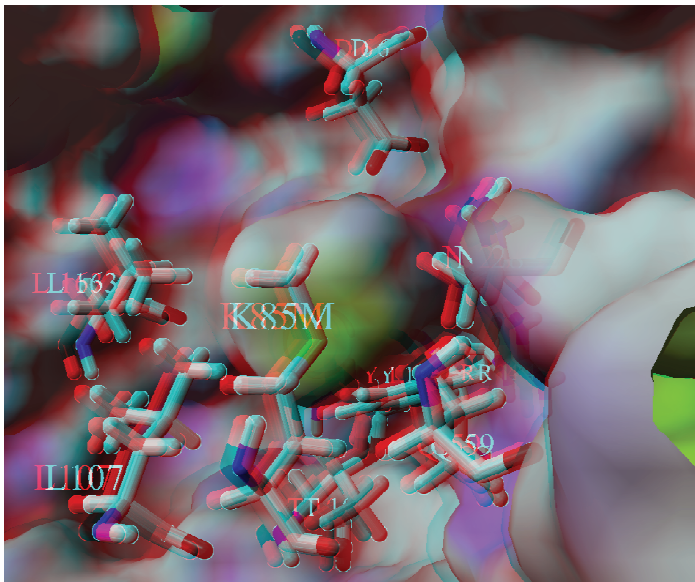
Methodol gebunden an Lys-85



Mutante A165G



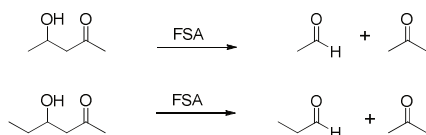
Mutante A129G



Mutante K85M

3.1.3 Assay-Entwicklung für FSA Mutanten

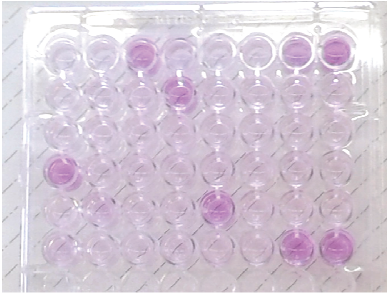
Ein Ziel dieser Arbeit war, Mutanten der Fructose-6-phosphat-Aldolase (FSA) zu erzeugen, die zur nicht-natürlichen Reaktion zwischen Aceton und einem Aldehyd fähig sind. Um diese neuen Enzyme zu bewerten, ist ein Assaykonzept nötig, mit dem man die Reaktion verfolgen und kinetisch beurteilen kann. Um dies zu erreichen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt, welche im Folgenden beschrieben werden. Ein erster Ansatz für einen Assay zur Bestimmung der Aktivität von FSA-Mutanten war die Rückspaltung eines aus einem kurzkettigen aliphatischen Aldehyd und Aceton gebildeten Hydroxyketons durch die FSA, und der anschließende spezifische Nachweis des freigesetzten Aldehyds in Gegenwart eines hohen Überschusses an Hydroxyketon.



Schema 5: Zu Grunde liegende Reaktion der Aldolspaltung an kurzkettigen Hydroxyketonen.

Für Aldehyde gibt es nun eine Vielzahl von spezifischen Nachweisen, die jedoch oft nicht für die Anwendung in *High-Throughput Assays* geeignet sind. Der mit bekannteste Nachweis ist die *Schiffsche Probe* mit Leuko-Fuchsin, die bereits 1866 von Hugo Schiff entdeckt und 1921 von Heinrich Wieland und Georg Scheubing detailliert beschrieben wurde, wobei auf Verständnisfehler Schiffs bezüglich des Mechanismus der Reaktion hingewiesen wird^[59]. Der genaue Mechanismus wurde 1979 von Robins et al. durch Untersuchungen der Zwischenstufen geklärt.^[60] Schon Wieland und Scheubing wiesen auf die gute Quantifizierbarkeit der Methode zur Gehaltsbestimmung von Aldehyden in wässriger Lösung hin^[59].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde zunächst ein kolorimetrischer Assay entwickelt, der auf der Spaltung von 4-Hydroxyhexan-2-on in Aceton und Propanal durch die FSA und den Nachweis des freigesetzten Aldehyds mit der Schiff'schen Probe beruhen sollte. Da die Schiff'sche Probe normaler Weise im schwach sauren Milieu durchgeführt wird, der Assay aber wegen des Optimums der FSA im neutralen oder schwach alkalischen Bereich durchgeführt werden muss, wurde zunächst das Detektionssystem für diesen pH-Bereich optimiert. Interessanterweise zeigte sich hier der Wildtyp in ersten Messungen als bestes Enzym, um 4-Hydroxyhexan-2-on umzusetzen, was jedoch bei Messungen nach anderen Methoden, wie z.B. der enzymatischen Reduktion der Spaltprodukte, nicht festgestellt werden konnte.



| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PPL | PPL | WT | D6H | PPL | PPL | D6E | WT |
| PPL | D6E | PPL | WT | PPL | PPL | PPL | PPL |
| PPL | PPL | PPL | PPL | PPL | PPL | PPL | PPL |
| WT | PPL | D6H | PPL | D6E | PPL | D6E | PPL |
| PPL | D6H | PPL | PPL | WT | PPL | PPL | PPL |
| D6H | PPL | PPL | D6E | PPL | PPL | WT | WT |

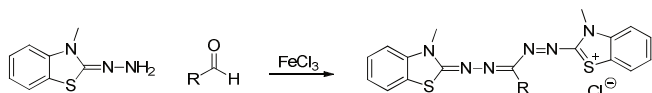
Abbildung 14: Auf der Schiff'schen Probe basierender kolorimetrischer Assay und Belegungsplan, hauptsächlich der Wildtyp zeigt Aktivität gegenüber 4-Hydroxyhexan-2-on, was anderen Messungen widerspricht.

Im Laufe der Methodenoptimierung brachte die Idee, diese Reaktion auf einen Retro-Aldolassay anzuwenden jedoch einige Schwierigkeiten: Die Ergebnisse der Messungen hängen von der Zusammensetzung und Konzentration des Reagenz ab, insbesondere durch schwankende Qualität des Aldols ist eine Reproduzierbarkeit nicht gewährleistet und die Idee wurde daher wieder verworfen.

Eine weitere Möglichkeit, Aldehyde nachzuweisen, ist die Bildung von Simon-Awe-Komplexen mit Natriumprussid, systematisch als Dinatriumpentakis-cyano(-C)nitrosylferrat(II) bezeichnet. In Gegenwart von sekundären Aminen bildet Natriumprussid mit Aldehyden z.T. intensive gefärbte Komplexe^[61]. Die Reaktion wird sowohl zum Nachweis von Acetaldehyd wie auch umgekehrt als Reagenz auf sekundäre Amine vielfältig genutzt, das bekannteste Beispiel sind dabei forensische Schnelltests für Betäubungsmittel auf Amphetaminbasis^[62]. Die Reaktion ist für Acetaldehyd hochempfindlich und zeigt bereits bei geringsten Spuren an Aldehyd eine intensive Blaufärbung. Auch wenn eine spezifische und hochempfindliche Nachweisreaktion eigentlich wünschenswert ist, ließ sie sich als Detektionsreaktion im Assay nicht verwenden, da immer vorliegende geringe Verunreinigungen des Substrates mit Acetaldehyd – etwa durch Spaltung unabhängig vom Enzym – sowie Kreuzkontamination durch Verdunstung falsch-positive Ergebnisse lieferte und eine Unterscheidung von positiven Hits zum Hintergrund unmöglich machte. Die Verwendung des stabileren auf Propionaldehyd basierenden Aldols als Target hingegen war auf Grund der deutlich geringeren Farbigkeit des Komplexes mit Propionaldehyd nicht möglich. Auch neigen die Komplexe zu schnellem Ausbleichen,^[61] was eine kinetische Messung erschwert. Die Herstellung eines Aktiv-Agar basierend auf dieser Reaktion, um geeignete Mutanten enthaltende Kolonien direkt zu identifizieren, war aus denselben Gründen nicht erfolgreich.

Die nächste untersuchte Methode um Aldehyde photometrisch zu quantifizieren, war die Fe^{III}-katalysierte Bildung eines Formazans. Eine Detektionsgrenze von unter 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ soll für Propio-

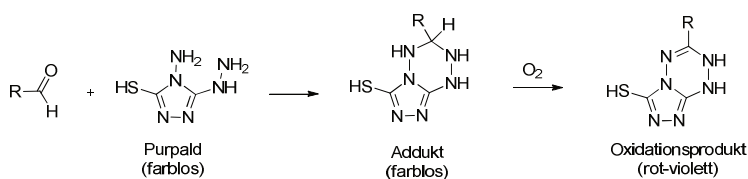
naldehyd möglich sein.^[63] Da diese Reaktion im Sauren abläuft, ist auch hier nur eine Endpunktmessung denkbar. Die Säurezugabe führte jedoch stärker als zunächst erwartet zu einer chemischen Spaltung des Aldol-Substrats, so dass auch hier falsch-positive Ergebnisse erzeugt wurden. So dass auch diese Methode nicht über die Vorversuche hinaus weiter verfolgt wurde.



Schema 6: Bildung des Formazan-Farbstoffs

In der Dünnschichtchromatographie wird u.a. 4-Amino-5-hydrazino-1,2,4-triazol-3-thiol, vertrieben unter dem Handelsnamen „Purpald[®]“, als Sprühreagenz für Aldehyde verwendet. Ist ein Aldehyd präsent, so bildet Purpald zunächst spontan ein farbloses Addukt. An der Luft wird dieses zu einem charakteristisch rot-violett gefärbten Dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-b]-[1,2,4,5]tetrazine-3-thiol oxidiert.^[64] Während die Addition auch mit Ketonen möglich ist, ist die Oxidation zum Farbstoff spezifisch für Aldehyde und erlaubt die Bestimmung in Gegenwart von Ketonen. Wenn diese Methode auch nicht für kontinuierliche Messungen geeignet ist, so ist der Einsatz als vergleichende Endpunktmessung nach einer festen Reaktionszeit denkbar.

Die zur Farbbildung führende Oxidationsreaktion läuft im stark basischen Milieu ab und benötigt einige Minuten um den Farbstoff zu bilden. Da das farblose Addukt – wie schon erwähnt – auch mit dem Aldol sowie dem freigesetzten Aceton gebildet wird würde das teure Reagenz in überstöchiometrischen Mengen benötigt was die Methode vom wirtschaftlichen Standpunkt aus wenig attraktiv macht.



Schema 7: Aldehydnachweis mit Purpald[®]

Leider erwiesen sich die eingesetzten Aldole aus Acetaldehyd bzw. Propionaldehyd und Aceton unter diesen Bedingungen als nicht ausreichend stabil. Der in Folge einer raschen basenkatalysierten Spaltung des Aldols freigesetzte Aldehyd erzeugt falsch-positive Ergebnisse, die sich auch in der Intensität ihrer Färbung nicht von tatsächlich positiven Messungen unterscheiden ließen.

Eine weitere, sehr bekannte Reaktion in der Carbonylchemie ist die Synthese symmetrisch substituierter Dihydropyridine nach Hantzsch^[65]. In der Hantzsch-Reaktion wird ein Aldehyd und zwei 1,3-Dicarbonylverbindungen zu einem meist stark farbigen Dihydropyridin-Derivat kombiniert. Der bekannteste Vertreter dieser Stoffgruppe ist das Antihypertonikum „Nifedipin“. Der große Vorteil dieser Assay-Reaktion ist die gut untersuchte, große Substanzbreite.^[66] Eine Anwendung der Dihydropyridin-Synthese zur fluorometrischen Detektion von Spuren aliphatischer Aldehyde wurde von Bartos und Pesez beschrieben.^[63] Basierend auf dieser Nachweisreaktion wurde ein Konzept erarbeitet, um in einer zweistufigen Reaktion die relativen Umsatzgeschwindigkeiten verschiedener Mutanten zu vergleichen. Die FSA spaltet das als Testsubstanz zugegebene Aldol und der freigesetzte Aldehyd reagiert in der Prüflösung zum Farbstoff ab. Die Substanz wurde im Mikromaßstab synthetisiert und ein Emissionsspektrum aufgenommen.

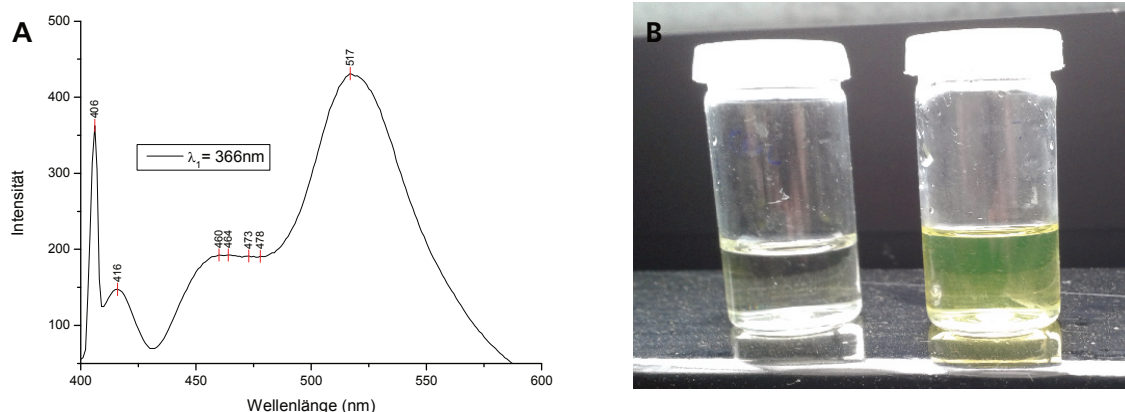


Abbildung 15: A) Fluoreszenzspektrum des Dihydropyridins bei pH > 8 und Anregung bei 366 nm B) Fluoreszenz des Farbstoffs im Sonnenlicht (rechts) und Meßlösung zum Vergleich (links)

Die Fluoreszenzentwicklung über die Zeit soll zur Bestimmung relativer Geschwindigkeiten genutzt werden. Im basischen Milieu zeigt der Farbstoff eine deutliche gelbliche Fluoreszenz, im neutralen nur eine schwache bläuliche. Da die deutliche gelbe Fluoreszenz nur bei höheren pH-Werten über 8,0 auftritt, stellt sich wieder die Frage nach der Stabilität des eingesetzten Aldols.

Dies führte zu der Vorgehensweise, den Assay bei pH 7 durchzuführen und unmittelbar vor der Messung Natronlauge zuzusetzen, was jedoch nur noch eine Endpunktmessung nach fester Zeit erlaubt.

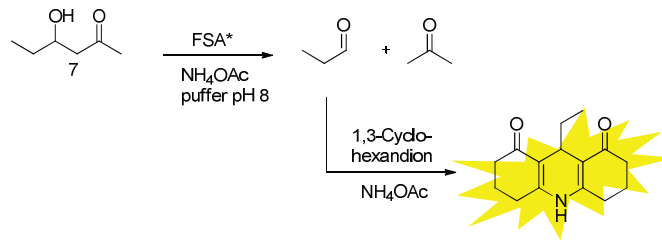
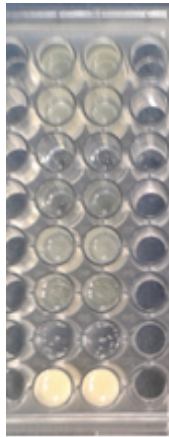


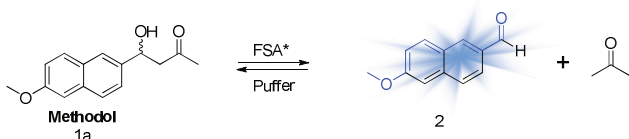
Abbildung 16: Optische Auswertung und schematische Darstellung des Prinzips. Der Ausschnitt links zeigt Doppelbestimmungen mit verschiedenen Enzymen (Von oben nach unten: Wildtyp, D6H, leer, K85M, L107A/L163A, blank, leer, 0,05N NaOH). Auch wenn das Prinzip funktionierte, waren die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität selbst bei maschineller Auslesung nicht signifikant.

Die für die Hantzsch-Reaktion benötigte hohe Temperatur von 50 °C wird von der FSA durchaus toleriert, führt aber zu einem hohen Hintergrund, da sich das Substrat bei höheren Temperaturen auch im Neutralen bereits zersetzt. Auch in mehreren Optimierungsschritten konnte dem nicht entgegengewirkt werden.

Ein kurz verfolgter Ansatz war, die Reagenzien schon direkt nach der Lyse in Deep-well Platten zuzugeben. Dieser Versuch eines High-Throughput-Systems erwies sich aber als nicht praktikabel. Zwar tritt auch im neutralen pH Bereich Fluoreszenz auf, dann im blauen Teil des Spektrums. Hier liegt aber auch die Emission vieler Proteine und auch die des LB-Mediums, welches immer in Spuren vorhanden ist und die Auswertung erschwert.

3.1.4 Methodol und Derivate

Auf Grund seiner Eigenschaften rückte Methodol^[45] in den Focus. Methodol ist ein Aldol-Addukt aus 6-Methoxynaphth-2-aldehyd und Aceton. Das Aldol selbst ist nicht fluoreszierend, da eine elektronenziehende Gruppe als Auxochrom fehlt. Nach einer retro-Aldolreaktion wird 6-Methoxynaphth-2-aldehyd freigesetzt, welches stark fluoresziert (Schema 8).



Schema 8: Fluoreszenzentwicklung durch Aldol-Spaltung

6-Methoxynaphth-2-aldehyd **2** ist ein gut untersuchter Fluoreszenzfarbstoff, der mit einer Quantenausbeute $\Phi > 0.3$ im blauen Bereich emittiert. Substituierte Naphthaldehyde sind bereits seit den 1940er Jahren als Fluoreszenzfarbstoffe bekannt.^[67] Das selbst nicht fluoreszierende Aldol kann in einer Retro-Aldolreaktion gespalten werden und den Farbstoff freisetzen, der sich wiederum direkt fluorometrisch detektieren lässt.

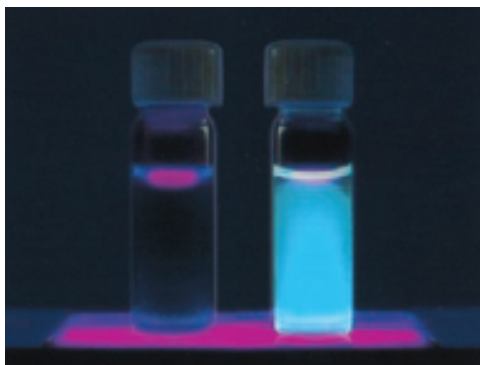


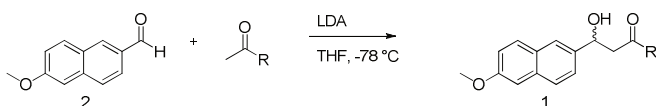
Abbildung 17: Lösungen von Methodol (links) und Methoxynaphthaldehyd (rechts) unter UV-Licht. Modifiziert nach: List et al.^[45]

Barbas III. benutzte Methodol für die Entdeckung und Verbesserung des katalytischen Antikörpers 38C2, welcher Aldolase-Eigenschaften zeigt. Von Interesse für Barbas war dabei, dass Methodol ein sehr schlechtes Substrat für native Aldolasen der Zellen ist, welche den Antikörper exprimieren sollen (CHO-Zellen), von dem erzeugten Antikörper jedoch schnell und selektiv umgesetzt wird.

Die Tatsache, dass Methodol kein gutes Substrat für Aldolasen ist, mag zunächst einer Anwendung als Substrat eben für die bakterielle FSA entgegenstehen. Die FSA sollte jedoch so modifiziert werden, dass sie Aceton und aromatische Aldehyde als Substrat akzeptiert. So bietet Methodol die Möglichkeit, Varianten, die zu dieser Umsetzung befähigt sind, schnell zu identifizieren und die Fortschritte zu verfolgen.

Die Synthese nach List^[45] bildet in trockenem THF bei -78 °C aus LDA und dem Keton zunächst das entsprechende Lithiumenolat, welches dann mit 6-Methoxynaphthaldehyd zum Aldol reagiert, wobei die niedriger substituierte Seite eines Methylketons kinetisch bevorzugt reagiert. Umkristallisation aus Ethylacetat/Heptan liefert das Substrat in guter Reinheit (NMR-Untersuchung). Die Methode ließ sich ohne weitere Abänderungen anwenden, um Analoga des Methodols, basierend auf anderen (Methyl)-Ketonen oder auch Cycloketonen zu erzeugen, und lieferte die Produkte in guten Ausbeuten.

Somit bestand die Möglichkeit, über eine modulare Synthese eine Substratbibliothek zu erzeugen, um die Substrattoleranz der FSA für verschiedene strukturanaloge Aldole zu ermitteln. Da das Detektionssystem identisch ist, lässt sich der Einfluss der Struktur des Ketons auf die enzymatische Reaktion gut vergleichen. So ist die Substanzbibliothek durch die einheitliche Synthese beliebig erweiterbar, was die Untersuchung von verschiedenen Mutationensansätzen mit dem selben Assaysystem – und so Vergleichbarkeit untereinander – erlaubt.



Schema 9: Synthese von Methodol und Strukturanaloga nach List et al.

Neben Methodol selbst wurden folgende Analoga erzeugt die verschiedene aliphatische Reste tragen. Neben Methodol war bisher nur das Cyclohexanderivat in der Literatur zu finden.

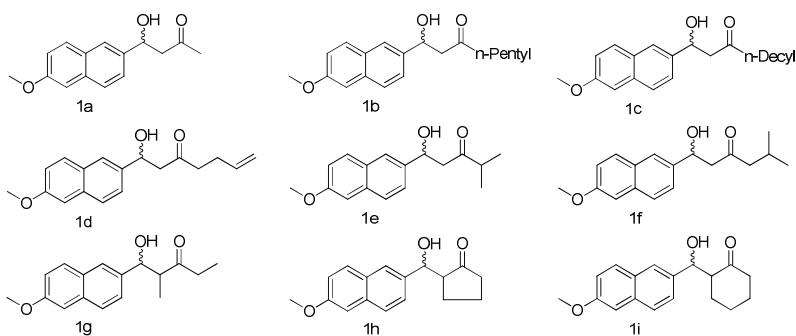
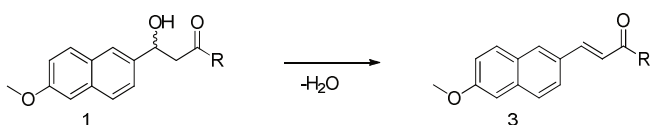


Abbildung 18: Verschiedene auf die gleiche Weise synthetisierte Derivate des Methodols

Eine sowohl bei der Synthese als auch der weiteren Verwendung des Methodol immer wieder auftretende Reaktion ist die Eliminierung zum α,β -ungesättigten Keton **3**, welches ebenfalls Fluoreszenz zeigt (Schema 10). Bei der Synthese ließ sich entstehendes Naphthylidenacetone noch durch Umkristallisation entfernen und minderte so lediglich die Ausbeute. Dahingegen stellt während der Assaymessungen gebildetes Eliminierungsprodukt einen bedeutenden Teil des Hintergrunds dar.



Schema 10: Eliminierung zum fluoreszierenden Naphthylidenacetone

Ogleich sich die Fluoreszenzspektren von 6-Methoxynaphthylidenacetone und 6-Methoxynaphthaldehyd unterscheiden, beeinflusst die Eliminierung doch die Selektivität und Genauigkeit der Fluoreszenzmessung. Die Spektren sind im Transparenzbereich des Filters zu ähnlich, so dass auf Filtern basierende Photometer dies nicht ausreichend differenzieren können.

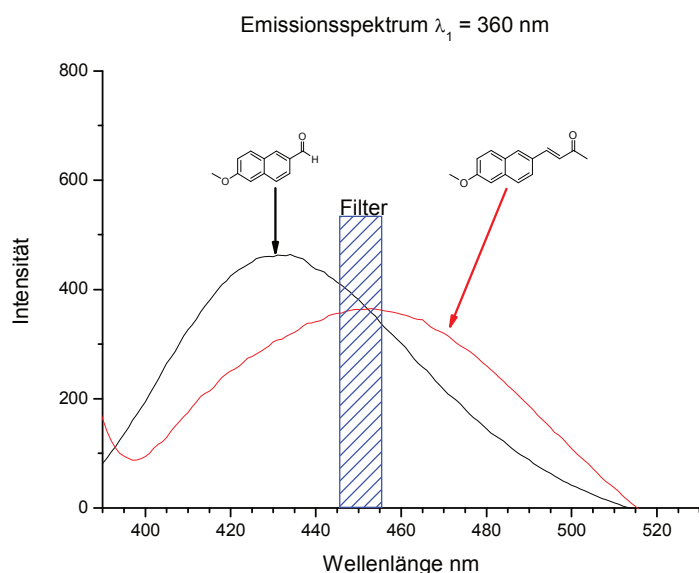
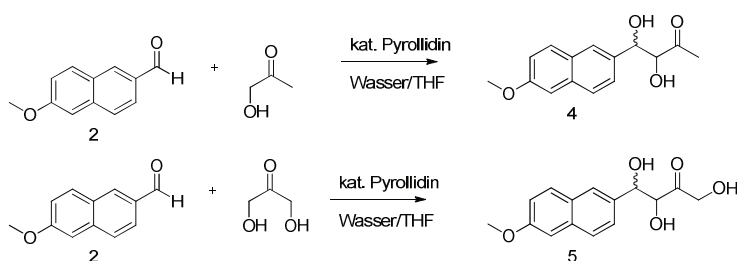


Abbildung 19: Vergleich der Emissionsspektren von 6-Methoxy-naphth-2-carbaldehyd und 6'-Methoxy-naphthylidenacetone. Der blau schraffierte Bereich stellt die Transparenz des Filters dar.

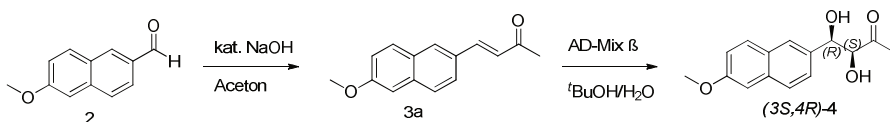
Um die FSA näher zu untersuchen waren auch Sonden von Interesse, die konstitutionell näher an der Zuckerstruktur liegen. So wurde auch eine Aldolreaktion mit Hydroxy- und Dihydroxyaceton durchgeführt. Durch die höhere Reaktivität der Hydroxyketone konnte bei der Synthese eine basen-katalysierte Aldolreaktion im wässrigen Milieu eingesetzt werden. Hierzu wurde Hydroxyaceton in Wasser gelöst. Im Falle des Dihydroxyaceton wurde die Lösung zunächst erwärmt, um das Dimer zu spalten. Pyrrolidin wurde als Katalysator zugesetzt und der Aldehyd in THF gelöst zugegeben. Die entstehende Suspension wurde mit einem Tropfen Pyrrolidin als Katalysator versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein dicker weißer Niederschlag des Rohprodukts bildet. Zur Aufarbeitung wurde mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit PBS gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt kann nach Zugabe von n-Heptan über Nacht in der Kälte gefällt und aus Toluol umkristallisiert werden.



Schema 11: Synthese von Hydroxyderivaten des Methodols

Beide Substanzen erwiesen sich, verglichen mit den Monohydroxyketonen vom Methodol-Typ, als deutlich weniger stabil. Mit der Dihydroxyverbindung konnten einige Untersuchungen durchgeführt werden, jedoch zeigte sich eine starke Tendenz zur retro-Aldol-Spaltung und besonders zur Eliminierung in wässriger Lösung. Unterhalb von $\text{pH} = 6,8$ bzw. oberhalb eines pH -Werts von $\text{pH} 7,6$ war die Zersetzung so schnell, dass eine Messung von Enzymkinetiken nicht durchführbar war; bei $7,4$ gingen die Messungen mit einem hohen Hintergrund und damit mit einem hohen statistischen Fehler einher.

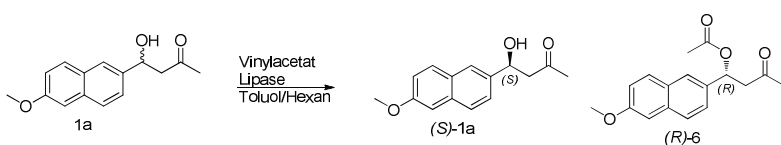
Parallel wurden über eine Sharpless-Dihydroxilierung die beiden *cis*-Isomere erzeugt. Die für verschiedene α,β -ungesättigte Ketone beschriebene Reaktion^[68] ließ sich gut auf das Naphthylidenaceton übertragen, wenn auch mit nur mäßigen Ausbeuten. Durch die schon für das Racemat beschriebene Empfindlichkeit des Substrats gegenüber retro-Aldolspaltungen konnten leider keine signifikanten Messungen durchgeführt werden. Zu beobachtende Tendenzen zu einer schnelleren Umsetzung des (*3S,4R*)-Isomers gegenüber der Isomeren Mischung waren insgesamt nicht aussagekräftig.



Schema 12: Synthese des *(3S,4R)*-Dihydroxymethodol via Sharpless-Reaktion^[68]

Die Trihydroxy-Verbindung erwies sich dabei nicht nur als nicht lagerfähig, sie konnte wegen ihrer Instabilität leider für Assayzwecke überhaupt nicht eingesetzt werden. Die Substanz zersetzt sich bereits auf einer TLC-Platte nach Verdunsten von organischen Lösemitteln binnen weniger Minuten zu fluoreszierenden Produkten; vornehmlich durch Rückspaltung zum Aldehyd und Eliminierung zum Diketon. Wird die isolierte, getrocknete Substanz in wässrige Lösung gegeben, stellt sich auch im Neutralen binnen 10-15 Minuten ein Gleichgewicht zwischen Aldol und Aldehyd ein, was zu sehr starker Fluoreszenz führt, die alle anderen Kinetiken überlagert.

Neben dem Racemat des Methodol waren auch die enantiomerenreinen Verbindungen von Interesse. Die gezielte Synthese von *(S)*-Methodol mit Prolin ist zwar bekannt, liefert aber nur einen geringen ee, was auch für strukturell ähnliche Verbindungen berichtet wurde^[69]. Eine racemische Synthese und anschließende Racematspaltung per Lipase war ein sinnvollerer Ansatz um enantiomerenreines Methodol zu erhalten. Aufbauend auf Arbeiten von Nair^[70] und Tjosås^[71] wurde eine Lipase-katalysierte Racematspaltung gewählt, um stereochemisch angereichertes Material zu erhalten. Während Nair Vinylacetat als Reagenz und Lösungsmittel einsetzte, verwendete Tjosås ein Gemisch aus Toluol und n-Hexan als Lösungsmittel und setzte Vinylacetat nur schwach überstöchiometrisch ein. Beide Methoden erwiesen sich für Methodol als vergleichbar gut geeignet. Letztlich wurde im Hinblick auf die Geruchsbelästigung durch Vinylacetat die Methode von Tjosås genutzt. Neben der von Nair verwendeten CRL und der CAL-A bei Tjosås wurden noch zahlreiche andere Lipasen getestet (s. Tabelle 3.4.1-2).



Schema 13: Erwartete Deracemisierung von Methodol entsprechend der Regel von Kazlauskas

Gemäß der Regel von Kazlauskas^[72] sollte dabei das von der FSA bevorzugte *(S)*-Enantiomer nicht umgesetzt werden und das für den FSA-Assay unpassende *(R)*-Methodol durch die Lipase acetyliert werden (Schema 13). Um die Reaktionen zu verfolgen, wurde eine HPLC-Methode entwickelt, bei der die Trennung durch eine chirale Säule auf Basis eines modifizierten Cylo-

dextrins erfolgt. Wegen ihrer großen Breite an verwendbaren mobilen Phasen fiel die Wahl auf die ChiraCel IB von DaiCel. Als mobile Phase wurde eine Mischung von 10-11% Isopropanol in n-Hexan verwendet.

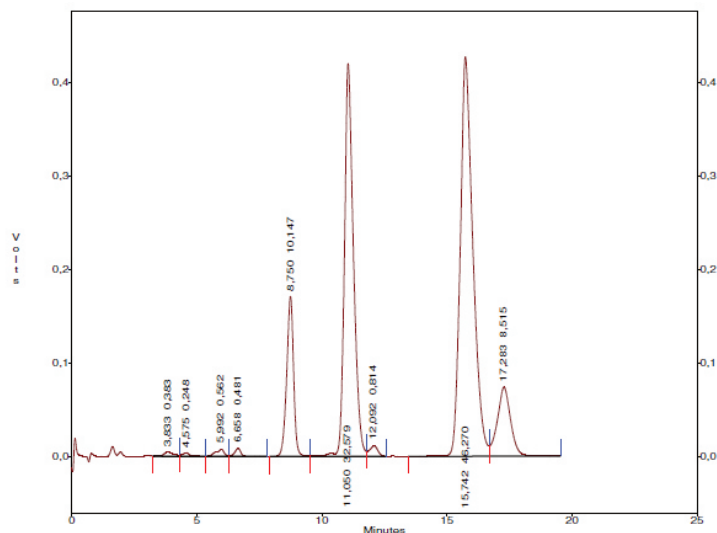


Abbildung 20: Exemplarisches Chromatogramm der Racematspaltung mittels einer Lipase, hier CAL-A; für die Zuordnung der Peaks siehe Tabelle 3.1.4-1

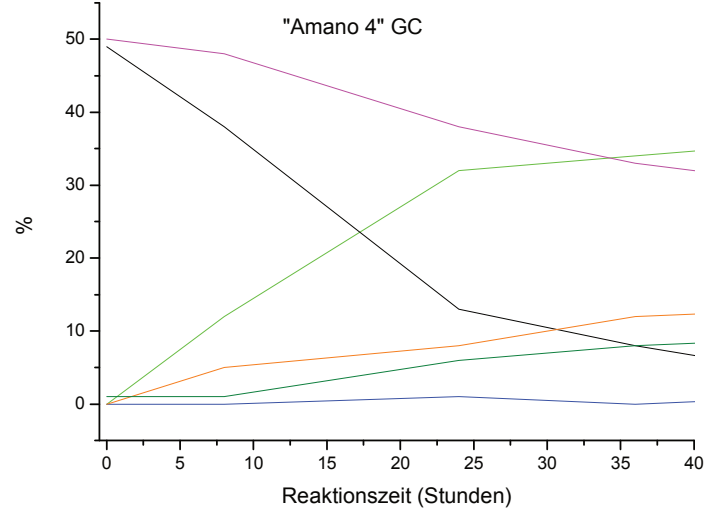
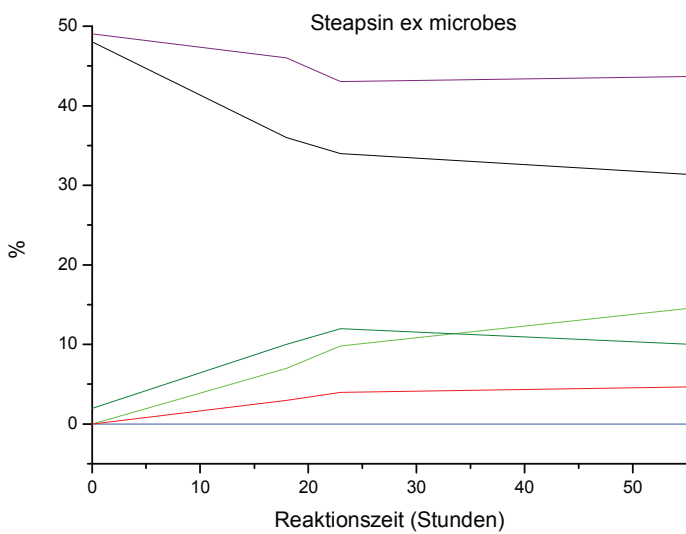
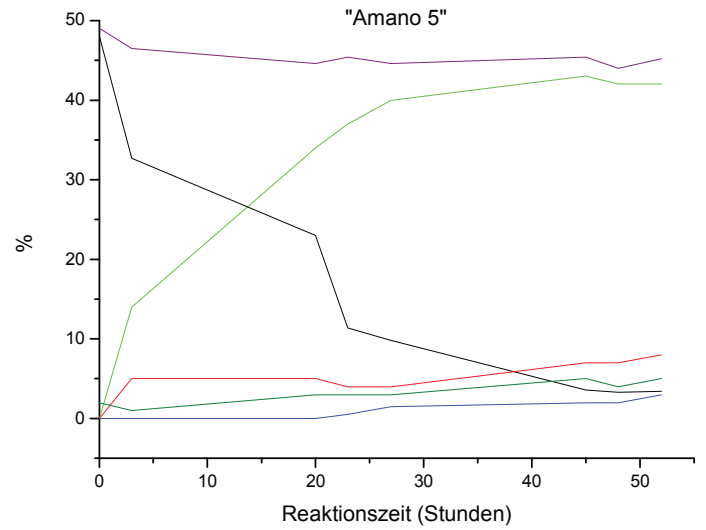
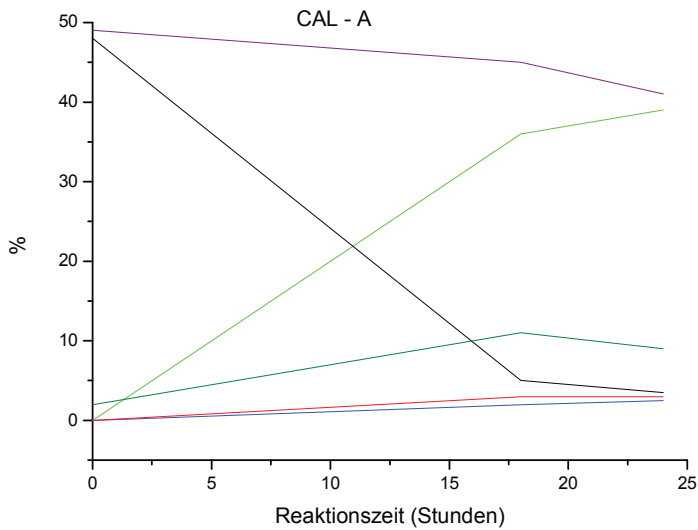
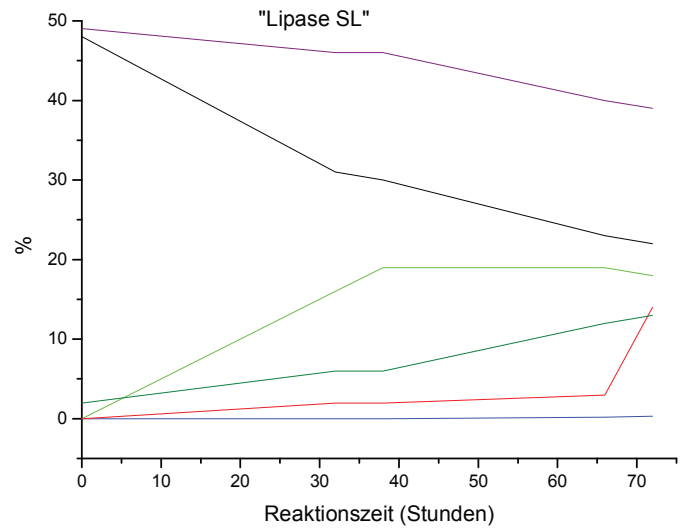
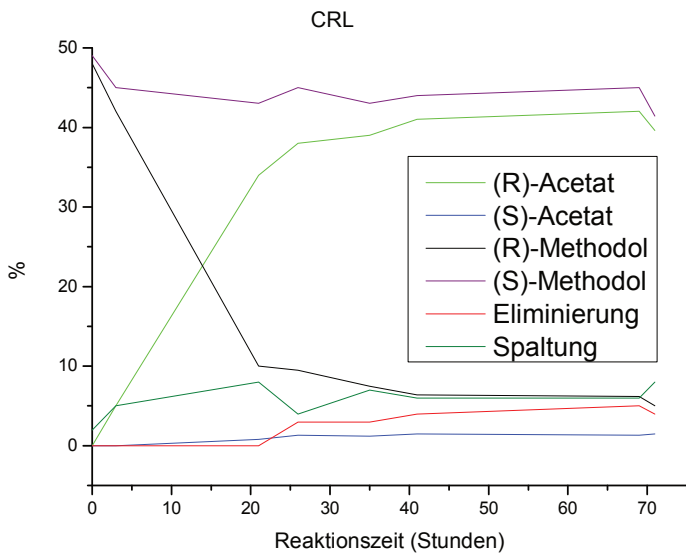
Der Anteil an Alkohol im Gemisch war für die Trennung äußerst kritisch und auch von der Umgebungstemperatur abhängig. Daher musste das Verhältnis zu Beginn jeder Mess-Serie mittels Referenzsubstanzen neu eingestellt werden. In der folgenden Tabelle sind die Substanzen den Peaks zugeordnet und die relativen Anteile im Gemisch beschrieben.

Tabelle 3.1.4-1: Zuordnung der Signale im obigen Chromatogramm.

| Rt (min) | Substanz | Anteil (%) | Bemerkung |
|----------|------------------------------------|------------|----------------------|
| 3,83 | 6-Metthoxynaphth-2-aldehyd | 0,38 | |
| 5,99 | Unbekannte Verunreinigung | 0,56 | Schon im Aldehyd |
| 6,65 | Unbekannte Verunreinigung | 0,48 | Schon im Aldehyd |
| 8,75 | 6-Methoxynaphth-2-ylidenacetone | 10,15 | Eliminierungsprodukt |
| 11,05 | Acetat des (<i>R</i>)-Methodols* | 32,58 | |
| 12,09 | Acetat des (<i>S</i>)-Methodols* | 0,81 | |
| 15,74 | (<i>S</i>)-Methodol* | 46,27 | |
| 17,28 | (<i>R</i>)-Methodol* | 8,51 | |

* (*R*) und (*S*) nach Kazlauskas zugeordnet

Um den einzelnen Peaks Substanzen zuordnen und die HPLC-Methode so zur Reaktionskontrolle einsetzen zu können, wurden Einzelkomponenten für die Methodenentwicklung benötigt. Zunächst wurde die Methode lediglich mit racemischem Methodol optimiert, um hier eine ausreichende Trennung der Peaks zu erhalten. Ebenso stand der Aldehyd als Referenz zu Verfügung. Das Eliminierungsprodukt wurde durch eine Aldol-Kondensation hergestellt, indem 6-Methoxynaphthaldehyd in mit methanolischer Kalilauge versetztem Aceton erhitzt wurde. Der große Überschuss an Aceton lässt ausschließlich das Monokondensat entstehen. Die Acetate des Methodols wurden als Racemat über eine Steglich-Veresterung mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 4-*N,N*-Diaminopyridin (DMAP) erzeugt. Somit konnten alle Hauptkomponenten zugeordnet werden. Enantiomerenreine Verbindungen wurden nicht erzeugt, die Zuordnung der absoluten Stereokonfiguration der Komponenten bei der Deracemisierung erfolgte entsprechend der Regel von Kazlauskas^[71] und durch Vergleich mit bekannten vergleichbaren Reaktionen der Lipasen^[73]. Um für die Racematspaltung geeignete Lipasen zu finden, wurden zunächst Experimente im Halb-Mikro-Maßstab durchgeführt. Ausgehend von der Methode bei Nair et al.^[73] wurde dazu in einem 2 ml-*eppendorf*-Reaktionsgefäß aus PP wird 20 mg *rac*-Methodol in 1,5 ml Vinylacetat gelöst und mit einer geringen Menge einer Lipase versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde im Thermoschüttler auf 38 °C gehalten und regelmäßig kleine Proben entnommen. Die Probe wurde in Vakuum zur Trockene eingeengt, in 100 µl THF aufgenommen und mittels chiraler HPLC vermessen. Trat nach 4 Stunden keine Reaktion ein, so wurde das Experiment noch einmal mit der fünffachen Menge an Enzym wiederholt. Dies war unter anderem bei der CRL und dem mikrobiellen Steapsin nötig.



Lipasen mit gutem Umsatz und hoher Selektivität wurden dann für präparative Zwecke eingesetzt.

Unter den getesteten Lipasen zeigten lediglich zwei keine Reaktivität: Schweine-Pankreas-Lipase (PPL) und die Lipase aus *Candida antarctica* Typ B (CAL-B) waren ungeeignet. Im Fall der CAL-B ist das nicht weiter verwunderlich, da mit diesem Enzym nur Veresterungen an der 1- oder 2-Position beschreiben sind^[74]. Lipasen aus *Humicola lanuginosa* („Amano 5“) und *Geotrichum candidum* („Amano 4“) erwiesen sich als besonders selektiv, benötigten aber über 40 Stunden, um das Plateau zu erreichen. Das über das „National Chemical Laboratory“ in Pune, Indien bezogene *Steapsin aus Mikroben* hatte die höchste Selektivität unter den getesteten Lipasen und bildete praktisch kein (*S*)-Acetat.

Es war aber zugleich der langsamste Katalysator bezüglich des Umsatzes. Lipase aus *Candida antarctica* Typ A (CAL-A) war zwar nicht so selektiv, erreichte aber bereits nach 24 Stunden den nahezu vollständigen Abbau des (*R*)-Methodol zwar wurde auch eine gewisse Menge (*S*)-Acetat gebildet, es blieb aber ausreichend angereichertes (*S*)-Methodol mit einem ee >95% zurück. Die CAL-A war damit ein vielversprechender Kandidat für eine präparative Racematspaltung.

Tabelle3.4.1-2: Übersicht über die E-Werte der untersuchten Lipasen nach 24h

| Enzym | Edukt | | Produkt | | ee(E) | ee(P) | <i>E</i> | Umsatz Nach 24 h |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|----------|---------------------|
| | (<i>R</i>) | (<i>S</i>) | (<i>R</i>) | (<i>S</i>) | | | | |
| Steapsin microb. ¹ | 18,97 | 41,72 | 23,46 | 0,12 | 0,37 | 0,99 | > 200 | 12 % |
| CRL nach 16h | 3,12 | 28,57 | 32,89 | 2,17 | 0,80 | 0,88 | 37 | 39 % |
| CRL nach 96h | 1,77 | 39,76 | 45,60 | 2,76 | 0,91 | 0,89 | 53 | “ |
| „Amano 5“ ² | 1,94 | 23,99 | 26,90 | 0,23 | 0,85 | 0,98 | > 200 | 38 % |
| CAL-A | 8,51 | 46,27 | 32,58 | 0,81 | 0,69 | 0,95 | 83 | 48 % |
| „Amano 4“ ³ (GC) | 16,40 | 49,61 | 33,99 | 0,18 | 0,50 | 0,99 | > 200 | ## |
| PPL Typ II ⁴ | 20,80 | 21,72 | 2,15 | 1,10 | 0,02 | 0,32 | 2 | < 1 % |
| Lipase SL ⁵ | 22,72 | 39,77 | 18,15 | 0,21 | 0,27 | 0,98 | 118 | 12 % |
| Lipase M ⁶ | 17,24 | 27,13 | 15,02 | 0,25 | 0,22 | 0,98 | 105 | |

¹Steapsin ex microbes ist eine Mischung von Lipasen verschiedenen mikrobiellen Ursprungs; u.a. *Pseudomonas cepacia*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*. ² vermutlich Lipase CE aus *Humicola lanuginosa*. ³Lipase aus *Geotrichum candidum*. ⁴Es trat praktisch keine Reaktion ein. ⁵Lipase aus *Burkholderia cepacia* ⁶Lipase aus *Mucor javanicus*.

Aus den vorliegenden Ergebnissen musste von einer langen Reaktionszeit ausgegangen werden, sollte der Einsatz an Protein überschaubar bleiben.

Um die Stabilität des Reaktionssystems zu bewerten, wurde für die nach 40 Stunden gute Werte liefernde Lipase „Amano 5“ über bis zu 144 Stunden weiter verfolgt. Hierbei kam es zur

Bildung eines nicht mehr verwendbaren Gemisches, da neben einem hohen Anteil an Eliminierungsprodukt auch die retro-Aldolspaltung eine zunehmend wichtige Rolle spielte.

(*R*)-Methodolacetat, (*S*)-Methodol, Methoxynaphthaldehyd und Naphthylidenaceton lagen zu diesem Zeitpunkt in nahezu gleichen Anteilen vor. (*S*)-Methodolacetat wurde jedoch auch nach dieser langen Zeit nur im einstelligen Prozentbereich gebildet. Aus den Messungen lässt sich ableiten, dass Reaktionszeiten über 48h nicht mehr sinnvoll sind.

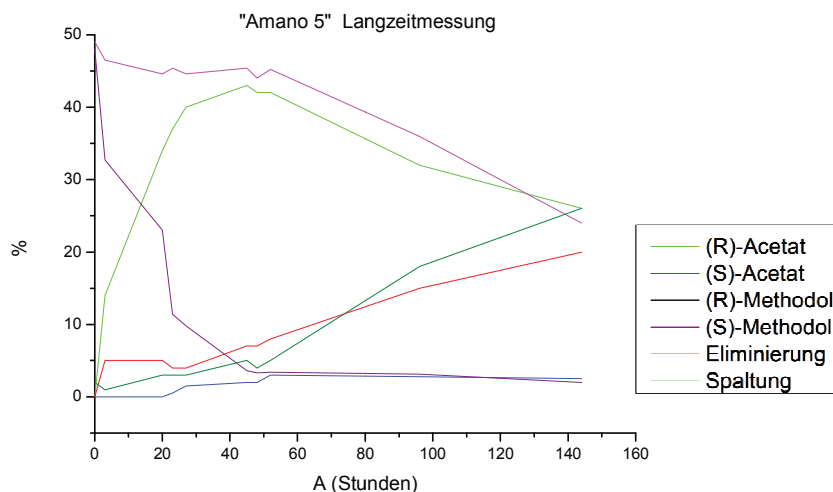


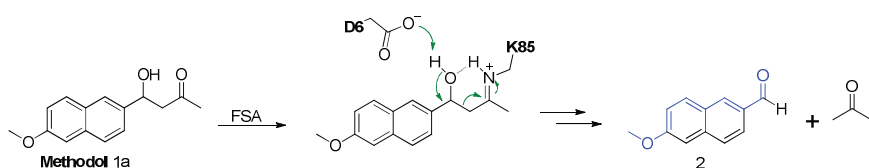
Abbildung 21: Langzeitmessung der Racemat-Trennung nach 140 Stunden. (*R*)-Methodolacetat, (*S*)-Methodol, Methoxynaphthaldehyd und Naphthylidenaceton liegen in nahezu gleichen Anteilen vor.

„Steapsin aus Mikroben“ war jedoch nur schlecht verfügbar, da der einzige Vertreiber in Indien ansässig war. „Amano 4“ und „Amano 5“ aus dem verwendeten Enzymset waren inzwischen nicht mehr kommerziell verfügbar. Da deren mikrobielle Herkunft nicht sicher bestätigt werden konnte, schied auch diese hervorragende Variante aus. Die im Screening selektivsten Enzyme konnten daher nicht für präparative Umsetzungen gewählt werden. Lipase aus *Candida antartica* (CAL-A) zeichnete sich im Vergleich durch geringste Reaktionszeiten aus. Für den Einsatz im Assay war vor allem das (*S*)-Methodol wichtig, welches von der FSA bevorzugt akzeptiert werden sollte. Die Bildung des (*R*)-Acetats war nur Mittel zum Zweck, die Verbindung selbst wurde nicht direkt benötigt. Für die präparative Racemattrennung bedeutet das, dass das Acetat nicht besonders enantiomerenrein sein musste, sondern nur möglichst angereichertes (*S*)-Methodol zurückbleiben musste. Die präparative Racemattrennung wurde zunächst auch in der gleichen Weise wie das Screening im Multigramm-Maßstab durchgeführt. Später wurde nach der Methode von Tjosås verfahren, welcher Toluol als Lösungsmittel einsetzte und so den Bedarf an Vinylacetat deutlich verringert. Hinsichtlich der Ausbeuten und Enantiomerenrein-

heit sind beide Methoden vergleichbar. Da nun ausreichend fluorogene Substanzen vorhanden waren, konnte mit der Entwicklung eines Assays begonnen werden. Dieser sollte sowohl die angenommene Stereopräferenz bestätigen als auch die Substratbreite der FSA ermitteln. Veränderungen am Enzym durch Punktmutationen wurden geplant, um das Enzym schließlich den Substraten anzupassen.

3.1.5 Methodol-Assays für FSA - Mutanten

Methodol als Substrat für die Katalysatorsuche nach Lysin-abhängigen Aldol-Spaltungen wurde schon von Barbas bei der Suche nach katalytischen Antikörpern^[45] und Hilvert für die Bewertung von durch *de novo*-Design erhaltenen Biokatalysatoren^[75] beschrieben. Die Theorie dahinter ist, dass Methodol mit dem katalytischen Lysin zunächst ein Imin bildet. Die jetzt deutlich saurere Hydroxylgruppe wird deprotoniert und die Bindung zwischen C2 und C1 bricht. Dabei werden der fluoreszierende Aldehyd und das Enamin des Acetons gebildet. Letzteres wird dann wieder protoniert und hydrolytisch freigesetzt.



Schema 14: Ablauf der Lysin85-katalysierten Spaltung von Methodol.

In Vorversuchen wurde der Assay zunächst auf eine Endpunktbestimmung optimiert und der bei Barbas beschriebene Antikörper 38C2 sowie 0.1 N Natronlauge als Positivkontrolle eingesetzt. Der geringen Löslichkeit des Aromaten in wässrigem Puffer konnte entgegengewirkt werden, in dem eine 0.1 M Stammlösung von Methodol in DMF angesetzt wurde und diese in die Pufferlösung für eine Endkonzentration von 5 mM bei 5% DMF-Gehalt gegeben wurde.

Im ersten erfolgreichen Anlauf wurde eine Reaktion in Deepwell-Platten zu je 200 μL angesetzt. In jedes Well wurden 10 μL Methodol-Stammlösung gegeben, entsprechend 5 mM Endkonzentration. Im ersten Well befand sich lediglich PBS zur Bestimmung des Hintergrunds. Die nächsten beiden enthielten 500 μg FSA wt bzw. FSA A129S (= 90 mU, lt. Angabe Labor Clapés). Well Nr.4 enthielt eine Probe Desoxyribose-Aldolase (DERA) entsprechend ebenfalls 90mU. Angaben zur nominellen Aktivität in Units beziehen sich jeweils auf die natürliche Reaktion. Die fünfte Position enthielt Wasser, gefolgt von einer Positivkontrolle und einer 10 μM Lösung des Aldehyds.

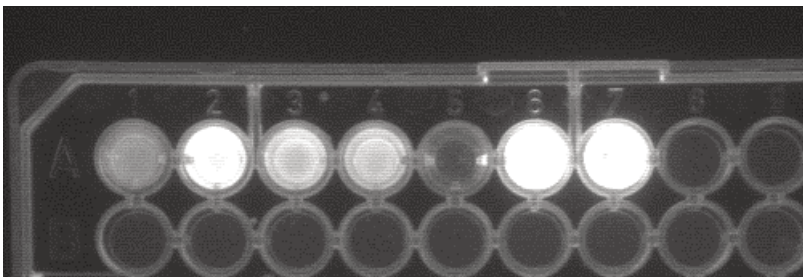


Abbildung 22: Fluoreszenzentwicklung nach 8 Stunden für 5mM Methodol in PBS. Von links nach rechts. Blank, 500 μg FSA wt, 500 μg FSA A129S, 500 μg DERA wt, Wasser als Nullwert, 0,1 N Natronlauge, 10 μM Aldehyde als Endwert (100%).

Nach 8 Stunden wurden die jeweils entwickelten Fluoreszenzen in ihrer Intensität verglichen. Gegenüber dem Hintergrund zeigte der Wildtyp eine starke, A129S und DERA immer noch deutliche Fluoreszenz (Abb. 14). Auch wenn es in der Aufnahme so erscheint, kamen diese bei weitem nicht an die Intensität der Positivkontrolle heran. Lediglich die Sättigung der Kamera führte zu einem verfälschten Eindruck.

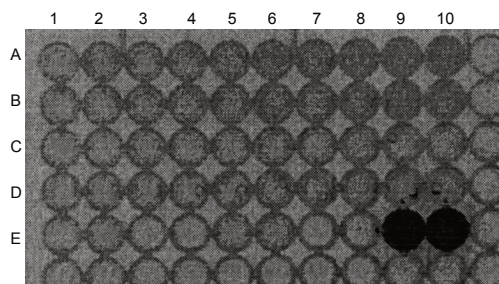
Auf diesen Vorversuchen wurde ein qualitativer Assay aufgebaut. Der Assay wurde ebenfalls in Mikrotiterplatten mit 96 Wells durchgeführt mit einem Reaktionsvolumen von jeweils 200 μL . Eine Lösung von Methodol in PBS mit DMF wurde vorbereitet und je 100 μL für alle Messungen eingesetzt. Protein-Stammlösungen von 1 mg/ml in PBS wurden so zugegeben, so dass die Enzymmenge innerhalb der Zeile von 10 μg auf 100 μg in Schritten von 10 μg anstieg. Zur Messung wurde mit PBS jeweils auf 200 μL aufgefüllt. In Abbildung 23 ist eine typische Messung exemplarisch wiedergegeben. Die Fluoreszenz wurde wenige Minuten nach der Zugabe der Enzyme bzw. des Antikörpers gemessen und dann nochmals nach 16 Stunden. Die Messungen wurden durch digitale Schwarz/weiß-Fotografie und anschließendes Invertieren der Bildintensitäten qualitativ ausgewertet (Abbildung 23).

In Reihe A wurde der Wildtyp der FSA eingesetzt, der eine schwache Reaktion zeigen sollte. Zum Vergleich wurde in Reihe B zuvor mit heißem Ethanol denaturierte FSA eingesetzt. Auf Grund ihrer Aldolaseaktivität war auch die DERA von Interesse (Reihe C). Schließlich wurde noch in Reihe D Albumin aus Rinderblutserum (BSA) als nicht-katalytisches Protein eingesetzt. In Reihe E wurden die Vergleiche eingebracht: E2 ist der Blindvergleich ohne Enzym, E5 und E6 enthalten den auch von Barbas und List benutzten katalytischen Antikörper 38C2 als Positivkontrolle. E9 und E10 eine Lösung des Aldehyds zur Kalibration der Aufnahme.

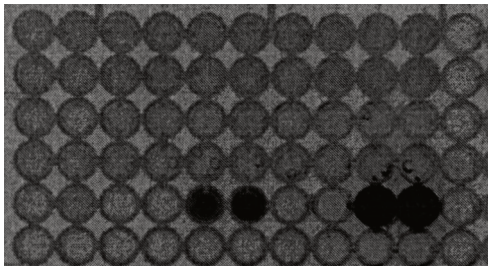
1)

| | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|
| FSA wt. 10 - 100 μ l / 200 μ l (1 mg/mL) | | | | | |
| FSA denat. 10 - 100 μ l / 200 μ l (1 mg/mL) | | | | | |
| DERA wt. 10 - 100 μ l / 200 μ l (1 mg/mL) | | | | | |
| BSA wt. 10 - 100 μ l / 200 μ l (1 mg/mL) | | | | | |
| N | Bl | P1 | P1 | P2 | P2 |

2)



3)



4)

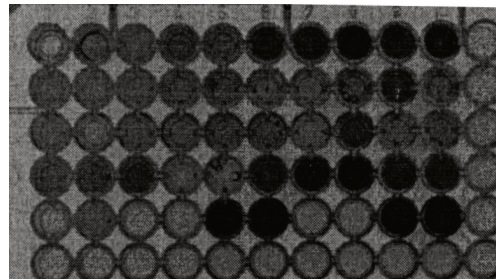


Abbildung 23: Qualitativer Assay zur Fluoreszenzentwicklung als Vorversuch in der Methodenentwicklung und Belegungsplan (1). Invertierte Aufnahme der Fluoreszenzentwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten. 2) $t = 0$ min, 3) $t = 2$ min, 4) $t = 16$ h.

Die Positivkontrolle durch den katalytischen Antikörper zeigte bereits nach 2 Minuten ein deutliches Signal und bestätigte somit das Konzept. Nach 16 h bei Raumtemperatur zeigte der Blindwert eine schwache Fluoreszenz, die Fluoreszenzentwicklung hier geht ausschließlich auf chemische Hintergrund-Reaktionen wie Aldolspaltung und Eliminierung zurück. In der ersten Reihe zeigte die FSA eine von der Proteinmenge abhängige Intensivierung der Fluoreszenz, was auf eine enzymatische Katalyse schließen lässt. Bei den denaturierten Enzymen tritt eine sehr schwache Fluoreszenz ungefähr in der Intensität des Blindwertes auf, die nicht mit der Enzym-

menge korreliert und wohl auf vereinzelte Katalyse durch freie Aminosäuren (z.B. Lysin) zurückgeht. Für die DERA konnte kein eindeutiges Fazit gezogen werden, weshalb dieses Enzym zunächst nicht weiter verfolgt wurde. Interessant war die Zeile, in der BSA verwendet wurde, da diese sie doch entgegen der Erwartung eine deutliche Fluoreszenz zeigte. Dies konnte aber nach näherer Untersuchung zu einem großen Teil einer Eigenfluoreszenz des BSA zugeschrieben werden.

Nach diesen erfolgreichen Vorversuchen wurde begonnen, die Messung in einem „BMG Optima“ Platerreader mit Filtervorwahl durchzuführen um die Reaktion zu quantifizieren. Ein großes Problem war bei den weiteren Messungen lange Zeit eine schlechte Reproduzierbarkeit der Werte. Diese ging vermutlich auf die stark unterschiedliche Qualität der erzeugten Proteine zurück. Analysen des Zell-Lysats zeigten im SDS-Gel starke Unterschiede im FSA-Gehalt bei verschiedenen Mutanten und Chargen. So wurden Gehalte von 18 bis 98 Prozent erreicht. Ein Grund hierfür ist offenbar, dass bei zu langer Expression im Fermenter wie auch in Schüttelkulturen die Zellen das Protein wieder abbauen. Expressionszeiten über 18h zeigten einen deutlichen Abfall der FSA-Konzentration. Neben dem direkten Gehalt spielte auch die Stabilität des Proteins eine große Rolle. Zwar ist die FSA strukturell außerordentlich stabil, dennoch zeigten Enzymlösungen schon nach circa einer Stunde an der Luft bei Raumtemperatur einen merklichen Rückgang der Aktivität. Letzterem konnte durch die Zugabe von 1,4-Dithioerythritol (DTT) bereits während der Lysis und ebenso zum Dialyse-Puffer und der Messlösung entgegen gewirkt werden. Dennoch blieb es notwendig, den Gehalt an FSA jeder Charge separat zu bestimmen und die Einwaage bzw. die Verdünnung anzupassen.

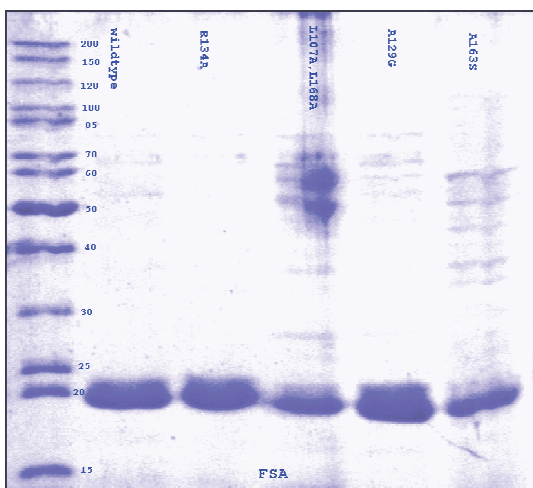


Abbildung 24: Die Gelelektrophorese (SDS-Page) zeigt deutliche Unterschiede in der Qualität der Enzyme. Cut-off der Dialyse bei 10.000 D

Als Positivkontrolle wurde auch hier der schon erwähnte Antikörper 38C2 genutzt, dessen Aldolase-Aktivität gut untersucht ist. Im vorliegenden Assay bleiben alle Varianten der FSA weit unter der Aktivität der Referenz.

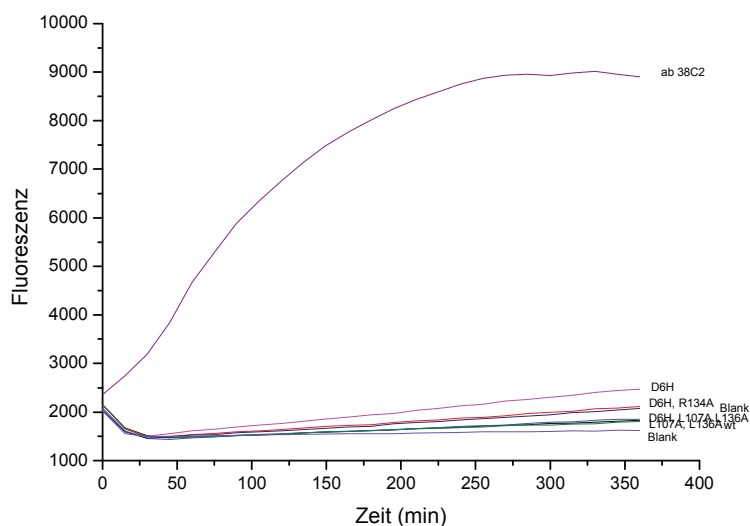


Abbildung 25: Fluoreszenzentwicklung bei der Spaltung von Methodol durch einige Mutanten und den Antikörper 38C2 im Vergleich.

Da Methodol nicht völlig stabil ist und es sich nur durch Umkristallisation sinnvoll reinigen lässt, sind im Substrat immer Spuren des Fluoreszenzfarbstoffs enthalten, was zu einem geringen Hintergrund führt. Auffallend ist bei allen Messungen, dass diese anfängliche Fluoreszenz, verursacht durch geringe Mengen an 6-Methoxynaphth-2-aldehyd im Substrat, zunächst über ca. 20 Minuten abnimmt, bevor die lineare Fluoreszenzentwicklung durch die Aldolspaltung einsetzt (s. Abb. 16). Die Ursache hierfür konnte nicht gefunden werden. Denkbar ist eine Absorption des Aldehyds am Protein oder am Plastikmaterial der Platten. Da die Absorptionsgeschwindigkeit jedoch nur sehr unwahrscheinlich von den Mutationen im Inneren des Proteins beeinflusst werden kann, unterliegen alle Messungen dem gleichen Fehler, und die Vergleichbarkeit ist weiterhin gegeben.

Eine Oxidation des fluoreszierenden Aldehyds zur Carbonsäure durch Luftsauerstoff und ein damit einher gehender Rückgang der Fluoreszenz trat unter den Messbedingungen nicht auf. Beobachtet wurde dies jedoch in stark alkalischer Lösung, etwa wenn der Positivkontrolle versehentlich zu viel Natronlauge zugesetzt wurde. In diesem Fall kam es nach raschem Anstieg

der Fluoreszenzentwicklung zu einem allmählichen kontinuierlichen Rückgang, sowie zum Ausfallen des Natriumsalzes als leicht bräunlichem Feststoff.

Hinweise auf eine allosterische Beeinflussung des Proteins durch den Aldehyd konnten nicht gefunden werden. Dies ist jedoch nur unter Vorbehalt zu werten, da kein hochreines Material zur Verfügung stand und lediglich die weitere Zugabe von Aldehyd (5 – 20 μM) keinen weiteren Effekt zeigte.

Um die Fluoreszenz dem Umsatz zuzuordnen, wurde eine Kalibrationsgerade im mikro-molaren Bereich aufgenommen (Abbildung 26) und fortan alle Messungen mit gleichen Geräteeinstellungen durchgeführt. Die Gerade wurde vor jeder Mess-Serie wieder neu aufgenommen, wobei sich jedoch nur geringe Unterschiede ergaben. Somit war es nun möglich, die Enzymreaktionen zu quantifizieren und für einige Varianten die Michaelis-Menten-Parameter zu ermitteln. Ein Problem dabei bleibt die hohe Proteinmenge, die wegen der extrem langsamen Reaktion eingesetzt werden musste.

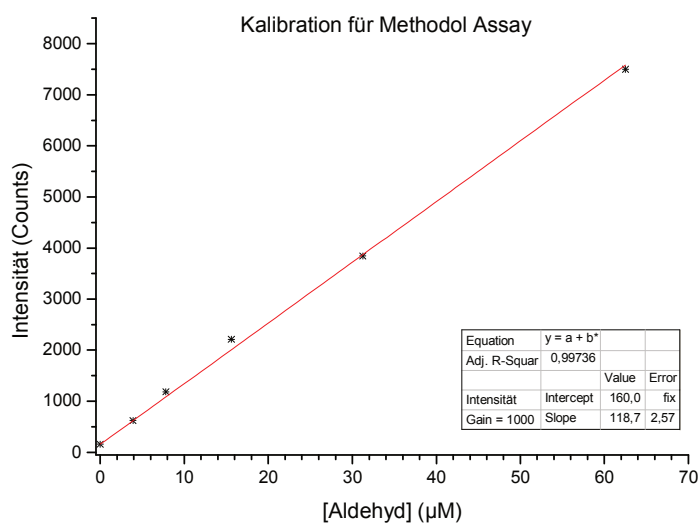


Abbildung 26: Kalibrationsgerade für den Fluoreszenz-Assay.

Eine Reaktionstemperatur über 44°C zur Beschleunigung der Reaktion war technisch nicht möglich, und auch ein Wechsel des Puffersystems brachte keinen Fortschritt. Eine von Schürmann beschriebene Inhibition der FSA durch anorganische Phosphate^[48] konnte nicht beobachtet werden, die Reaktionen in Gly-Gly-, Citrat-, und Tris-Puffer waren von vergleichbarer Geschwindigkeit. Die beschriebene Inhibition durch anorganische Phosphate scheint daher nur phosphorylierte Substrate zu betreffen. Das pH-Optimum des Enzyms von pH = 8,4 konnte allerdings nicht ausgenutzt werden, da sich Methodol oberhalb eines pH-Wertes von 7,6 nicht

mehr als ausreichend stabil erwies. Bei pH= 7,4 konnten reproduzierbare Werte ermittelt werden, wenn auch eine Messzeit von mehreren Stunden nötig war. Dies und der hohe Proteinbedarf sprechen gegen einen Einsatz als HTS-Methode, lassen aber eine gute Evaluierung einzelner, durch Punktmutation veränderter Enzymvarianten zu.

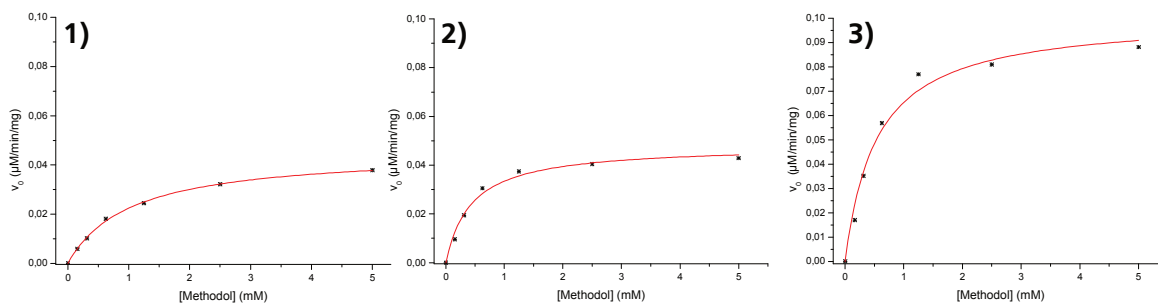


Abbildung 27: Exemplarische Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter für FSA wt (A), FSA* L107A, L163A (B) und FSA* D6E (C).

Mit diesem Assay wurden nun für 4 Varianten der FSA kinetische Parameter bestimmt und untereinander verglichen. Es ergaben sich jeweils Messpunkte, die dem Modell von Michaelis und Menten folgen, und somit auf die Katalyse durch das Enzym hinweisen. Während die Mutante L107A, L163A (Abb. 27 B) nur eine leichte Verbesserung gegenüber dem Wildtyp zeigte, hat sich für D6E (Abb. 27 C) eine deutliche Verbesserung ergeben.

In Tabelle 4.1.6-1 sind die ermittelten Michaelis-Menten-Parameter und daraus abgeleitete Größen zusammengefasst. Der K_M Wert verbesserte sich gegen über dem Wildtyp leicht in vergleichbarem Maße jeweils um den Faktor zwei, die Umsatzgeschwindigkeit stieg für die Variante D6H deutlich. Die Effizienz k_{cat}/K_M verbesserte sich bei der Variante D6H gegenüber dem Wildtyp circa um den Faktor vier.

Tabelle 4.1.6-1: Eine Zusammenfassung der ermittelten Werte

| Mutante | K_M (mM) | v_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) | K_{cat} (s^{-1}) | K_{cat} / k_M $\cdot 10^{-5}$ |
|-------------|-----------------|---|----------------------------------|------------------------------------|
| wt | $1,02 \pm 0,04$ | $0,045 \pm 0,001$ | 0,00021 | 20,05 |
| R134A | $0,45 \pm 0,06$ | $0,041 \pm 0,005$ | 0,00019 | 40,19 |
| L107A, 163A | $0,43 \pm 0,06$ | $0,048 \pm 0,002$ | 0,00022 | 50,01 |
| D6E | $0,53 \pm 0,10$ | $0,100 \pm 0,005$ | 0,00047 | 88,77 |

Da der Schwerpunkt dieser Assay-Entwicklung jedoch auf der Nutzung neuer FSA-Mutanten als Biokatalysator lag, wurde auch ein vereinfachter Assay genutzt. Im Folgenden wurden nur noch die anfänglichen Umsatzgeschwindigkeiten unter identischen Bedingungen direkt verglichen. Für diesen Assay wurden von den zu untersuchenden Mutanten relativ hohe Proteinmengen von 200-300 μg pro well (200 μL) eingesetzt. Als Messlösung diente eine 15 mM Lösung von Methodol in PBS mit 5% DMF. Unter diesen Bedingungen findet auch eine nicht von dem Enzym katalysierte Hintergrundreaktion statt, welche jedoch bedeutend langsamer abläuft.

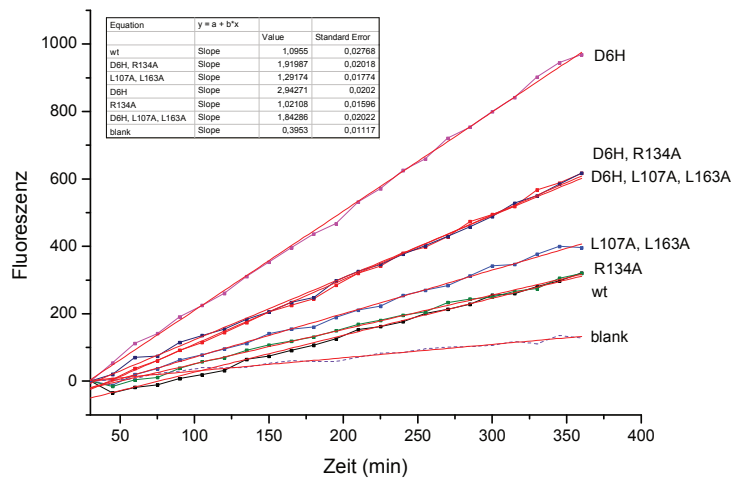


Abbildung 28: Vergleich der Fluoreszenz-Entwicklung durch die Spaltung von Methodol bei einigen ausgewählten Mutanten der FSA

Die Fluoreszenzentwicklung wurde über die Zeit von 5 Stunden ausgewertet und die – um den Hintergrund korrigierten – Raten direkt verglichen. In dieser Weise ließen sich wie oben in Abbildung 18 gezeigt, einzelne Reaktionsgeschwindigkeiten ermitteln und direkt vergleichen. Eine Zusammenstellung ausgewählter Enzymvarianten zeigt dabei Werte zwischen der halben und der dreifachen Umsatzgeschwindigkeit bezogen auf den Wildtyp, wie unten wiedergegeben.

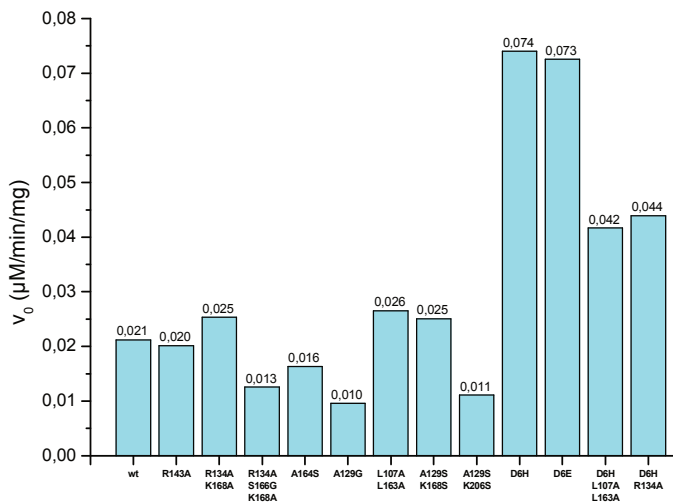


Abbildung 29: Vergleich der anfänglichen Umsatzraten für Methodol durch verschiedene Mutanten der FSA, normiert auf die eingesetzte Enzymmenge bei 15 mM Substratlösung und 40°C ohne Ko-Solvent.

Einige Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp eine verbesserte Umsetzung des Substrates. Besonders auffällig sind dabei die Varianten D6H und D6E, die gleichzeitig ihre Fähigkeit verloren haben, das natürliche Substrat umzusetzen. Die Ausweitung der katalytischen Tasche brachte hingegen nur eine leichte Verbesserung, da Methodol nur kurzketzig ist. Kombinationen der Mutationen erbrachten keine synergistischen Effekte.

Während der Messungen fiel für alle Varianten auf, dass die Aktivität der FSA binnen einiger Tage nachließ, auch wenn die Enzyme bei -30 °C gelagert wurden. Die Verwendung von DTT bei der Herstellung konnte dies nur unzureichend verhindern. Infolge dessen entstanden immer wieder Unterschiede in den absoluten Messwerten der Reaktionsgeschwindigkeiten.

Ausgehend von diesen Daten wurde umgekehrt im nächsten Experiment die Substratbreite einiger ausgewählter Mutanten bestimmt. Als vielversprechend angesehen wurden der Wildtyp zum Vergleich, die schnellste Variante D6H, sowie die Doppelmutante L107A, L163A deren Substrattasche vergrößert ist und A165G, die nicht die Engstelle am katalytischen Zentrum besitzt (Anaglyphentafel 3 und 4). Jedoch lösten sich bei nur <5 % DMF nicht alle Substrate vollständig oder zum Teil überhaupt nicht.

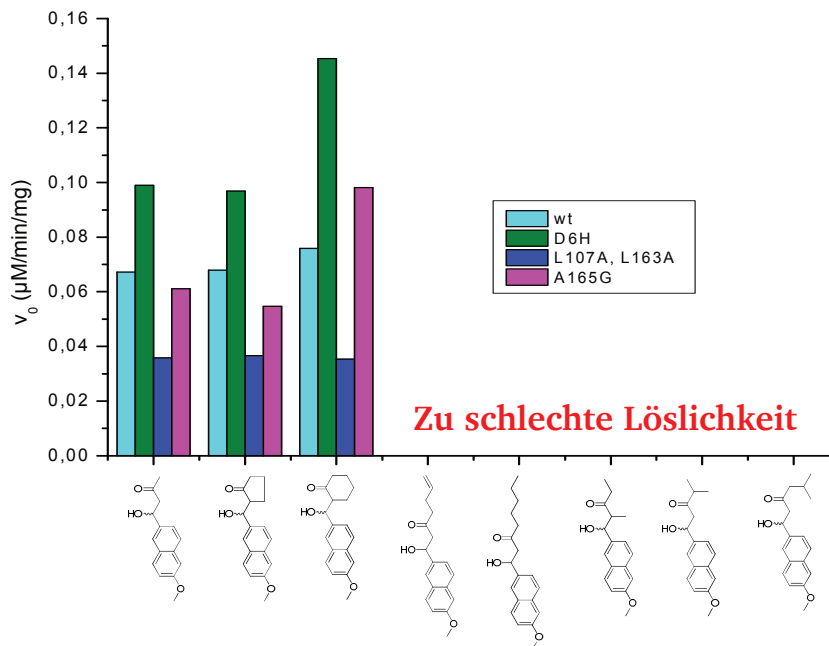


Abbildung 30: Vergleich der Umsatzraten bei 3.5 mM Substratlösungen und 600 μg /200 μL Enzym Lösung. Die Enzyme wurden frisch hergestellt, daher höhere Aktivität als in Abb. 23.

Um die Löslichkeit zu erhöhen, wurde die Menge an DMF als Co-Solvent schrittweise bis auf 22,5 % erhöht, um die Grenzen des Enzyms auszuloten. Dabei wurde die Entdeckung gemacht, dass die FSA bis zu Bedingungen von 25% DMF im Puffer noch katalysiert, aber die Unterschiede zwischen den Mutanten bei hohem Gehalt an DMF verschwinden.

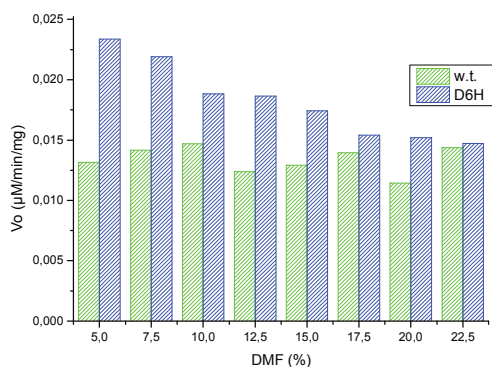


Abbildung 31: Vergleich der Umsatzraten bei 0,12 mM Substratlösungen und 600 μg 200 μL Enzym Lösung in Abhängigkeit von der Menge an Ko-Solvent DMF.

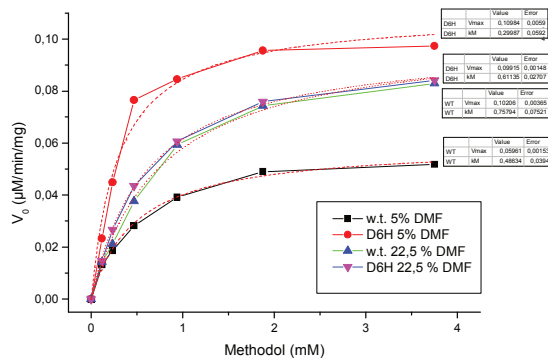


Abbildung 32: Auswirkungen der DMF- Konzentration auf die Michaelis-Menten Parameter. Die bei 5% DMF deutlich verschiedenen Hyperbeln fallen bei 22,5% DMF zusammen. Nach iterativen Fitting nähert sich v_{max} des Wildtyps dem Wert der aktiveren Mutante D6H an, während K_M leicht fällt.

Für die vergleichenden Messungen wurde ein Zusatz von ca. 15% DMF und eine geringe Konzentration von 0,375 mM der Substrate gewählt. Auch wenn die Unterschiede zwischen der Leistungsfähigkeit der verschiedenen Enzyme geringer werden, sollten sich noch gute qualitative Aussagen zur Substrattoleranz treffen lassen.

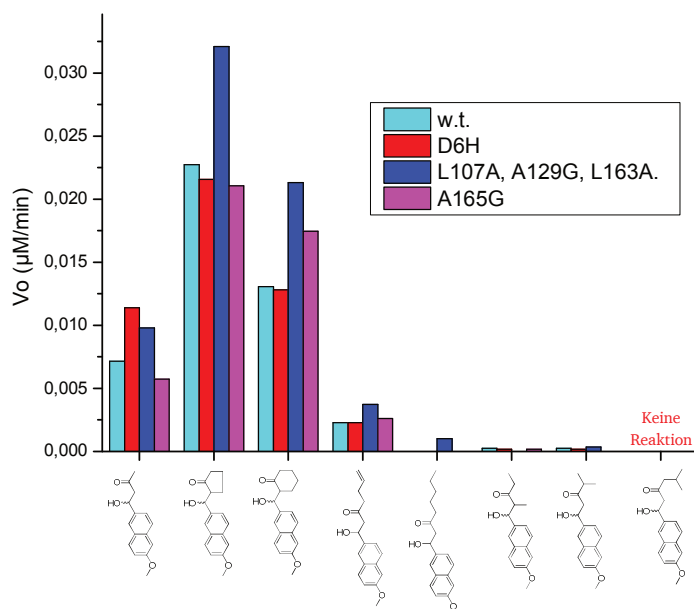


Abbildung 33: Anfängliche Umsatzgeschwindigkeiten für Derivate des Methodol und einigen Varianten der FSA. Gemessen bei 38°C mit 400μg Enzym/200μL; 0,375 mM Substanz in PBS mit 15% DMF bereits um den Blindwert korrigiert. Die cyclischen Verbindungen reagieren überproportional gut.

Die verzweigten Aldole 1d, 1g, 1h brachten hierbei keine erfolgreichen Resultate. Für das Butenyl-Derivat 1f konnte eine schwache Aktivität nachgewiesen werden, die sich für die großräumige Variante leicht verbessert. Die beiden cyclischen Verbindungen hingegen zeigten ein Verhalten, dass mit dem bisherigen Modell nicht erklärt werden kann.

Der hohe Umsatz kann aus sterischen Gründen nicht aus einer Reaktion am aktiven Zentrum her rühren, daher muss zusätzlich ein anderes katalytisches Reaktionszentrum vorliegen. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde eine inaktive Variante, die die Mutation K85M trägt, erzeugt. Hierbei ist das aktive Zentrum durch den Austausch des katalytischen Lysins zu Methionin zerstört. Sowohl für Methodol als auch für die cyclischen Derivate zeigte sich jedoch weiterhin eine Aktivität.

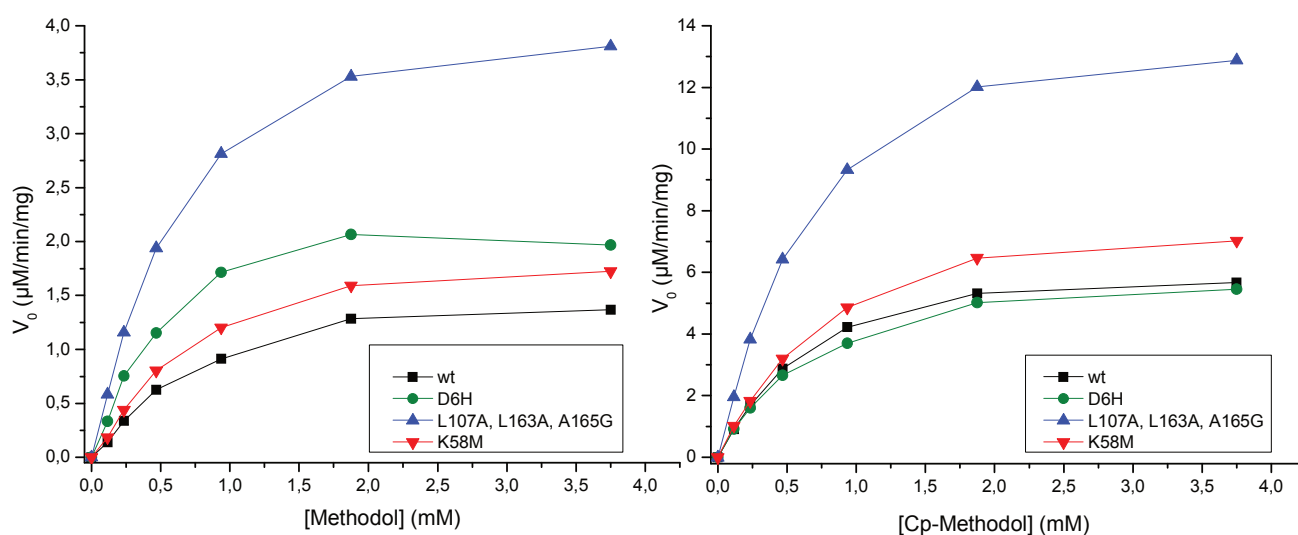


Abbildung 34: Umsatzraten für Methodol (**1a**) und das Cylopentyl-Derivat (**1h**). Die Negativkontrolle mit K85M zeigt auch Aktivität, was auf eine Aldolase-Aktivität außerhalb des eigentlichen katalytischen Zentrums hinweist, welche sich mit der K85-katalysierten Spaltung überlagert. Gemessen bei 40°C mit 400 µg Enzym/200 µL; 0,375 mM Substanz in PBS mit 22% DMF; bereits um den Blindwert korrigiert.

Die Daten zeigten ebenfalls eine deutliche Aktivität der Variante K85M, welche in der Größenordnung der Aktivität des Wildtyps liegt. Daraus folgte die Annahme, dass eine Aktivität außerhalb des eigentlichen katalytischen Zentrums vorliegt, welche sich mit der K85-katalysierten Spaltung überlagert. Da dieser Effekt für alle Varianten gleich stark sein müsste, führt eine Subtraktion der Geschwindigkeiten für K85M (d.h. als Hintergrund betrachtet) lediglich bei der dreifach-Mutante L107A/L163A/A165 zu einer Restaktivität, die dem Michaelis-Menten-Prinzip folgt.

Um ausschließen zu können, dass der Fehler in der Expression des Enzyms liegt, wurden die Varianten auf ihre natürliche Reaktion hin untersucht. In einem zweistufigen Assay wurde Fructose-6-phosphat von der FSA gespalten und das dabei gebildete Glycerinaldehyd-Phosphat durch eine NADH-abhängige Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD) reduziert. Der Verbrauch an NADH wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt und so die Reaktion überwacht.

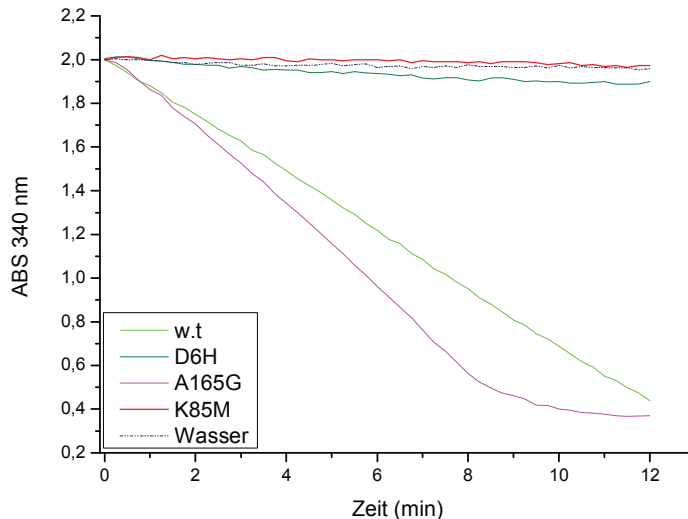


Abbildung 35: Spaltung von Fructose-6-phosphat durch die FSA und die anschließende Reduktion des freigesetzten Glycerinaldehydphosphat durch eine NADH-abhängige Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD). D6H und K85M sind inaktiv, da kein NADH verbraucht wird.

Für die K85M zeigte sich hierbei kein Umsatz an NADH, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das katalytische Zentrum inaktiv ist. Der Umsatz von Methodol hat daher andere Gründe. Verunreinigungen des Substrates konnten ausgeschlossen werden. Der geringe Hintergrund im Blindwert spricht gegen Instabilität des Substrats unter den Messbedingungen. Die Tatsache, dass auch die Kinetik der FSA* K85M immer noch dem Michaelis-Menten-Prinzip zu folgen scheint, spricht für eine Katalyse durch das Enzym jenseits des aktiven Zentrums. Vor allem Lysine sind dabei interessante Aminosäuren, da auch das ursprüngliche Katalyse über diesen Rest abläuft. Abbildung 28 zeigt alle Lysine auf dem Enzym. Stark exponierte Ketten wie K14, K36, K74, K100, K154 und K206 sind besonders interessante Stellen.

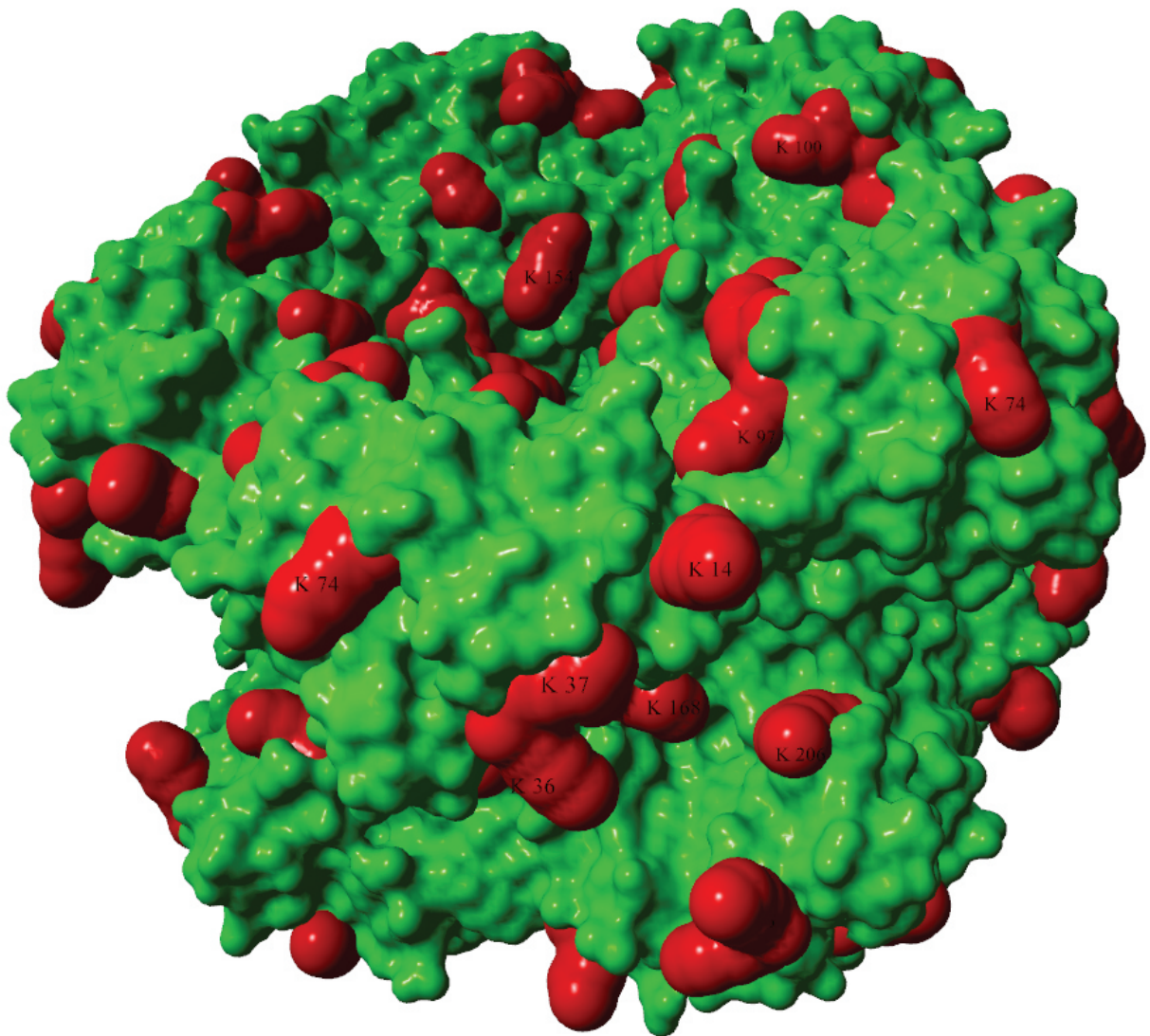


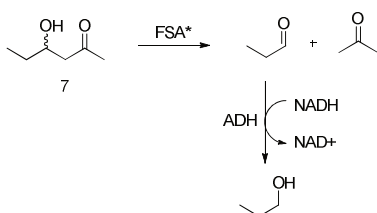
Abbildung 36: Möglicherweise katalytisch aktive Lysine in der *outer sphere* des Enzyms: K14, K36, K74, K154 und K206

Untersuchungen, in welcher Weise diese Lysine eine katalytische Aktivität entfalten, ist ein spannendes Thema für künftige Untersuchungen.

3.1.6 ADH/NADH Assay

Da die Umsetzung mit Methodol sehr langsam erfolgte, und aromatische Aldehyde auch eine sterisch anspruchsvolle nicht-native Substratstruktur repräsentierten, wurde ein alternativer Assay für kleine, nicht fluoreszierende Substrate entwickelt. Dabei wurde wieder auf die anfänglich verwendete Struktur des aus Propionaldehyd und Aceton gebildeten 4-Hydroxyhexan-2-ons zurück gegriffen.

Die Messung beruhte auf einer zwei-Stufen-Reaktion. Zuerst wurde das Aldol durch die FSA gespalten, und der freigesetzte Aldehyd direkt durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) zu 1-Propanol reduziert. Bei der Reduktion wird eine stöchiometrische Menge an NADH verbraucht, was sich bei 340 nm photometrisch verfolgen lässt. Gemessen wurde die Zeit, bis sich die Absorption nicht mehr ändert.

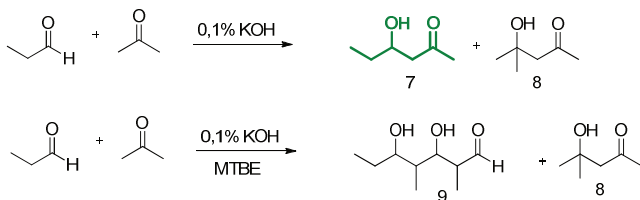


Schema 15: Prinzip des zweistufigen Assays. Der Verbrauch an NADH wird photometrisch verfolgt.

Da die Reduktion deutlich schneller als die Spaltung abläuft, und die Relationen zwischen Spaltung, Reduktion und NADH-Verbrauch 1:1:1 ist, lässt sich der Umsatz an Aldol bei bekannter NADH-Konzentration direkt aus der Änderung der Absorption berechnen.

Zur Synthese des Aldols wurde Propionaldehyd bei Raumtemperatur im Argonstrom verdunstet und das dampfgesättigte Gas bei 0 °C in Aceton eingeleitet, welches mit katalytischen Mengen methanolischer Kalilauge versetzt war. Die Basen-katalysierte Reaktion lieferte das Aldol in sehr guter Ausbeute. Das Produkt war lediglich durch 10-15% Diacetonalkohol – aus der Addition des Acetons mit sich selbst – verunreinigt, der sich nicht durch Destillation entfernen ließ, da die Siedepunkte zu dicht bei einander lagen. Auch durch Verdünnung des Acetons mit MTBE konnte dem nicht entgegen gewirkt werden. Bei einer 1:1 Verdünnung bildeten sich ausschließlich Diacetonalkohol und das trimere Addukt des Propionaldehyd. Eine Eliminierung

zum Mesityloxid fand allerdings weder während der Reaktion noch bei der Reinigungsdestillation statt.



Schema 16: Synthese des Substrates. Bei Verdünnung des Acetons mit MTBE war keine Produktbildung zu beobachten.

Der Gehalt an Aldol und Diacetonalkohol wurde über $^1\text{H-NMR}$ grob bestimmt und das Gemisch durch Zugabe von Pufferlösung und anschließendem Zentrifugieren getrennt, worauf der Diacetonalkohol eine überstehende Phase bildete. Die wässrige Lösung des Aldols wurde dann direkt eingesetzt. Für die Reaktion wurde eine Enzymkonzentration von $300\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ eingesetzt. Das entspricht $6,52\mu\text{M}$ Enzym oder $65,205\mu\text{M}$ bezogen auf die Anzahl der active sites des Dekamers. Die Konzentration an NADH lag bei $0,75\text{ mM}$ ($= 0,5\text{ mg}/\text{ml}$) und die der ADH bei $5\mu\text{L}$ fertiger Suspension (Roche) pro Milliliter in PBS. Da die Messkurve zum Ende hin abflacht, wurde eine Linearisierung nur bis zu einem Umsatz von ca. 90% gewählt, um die Änderung der Konzentration mit der Zeit zu bestimmen.

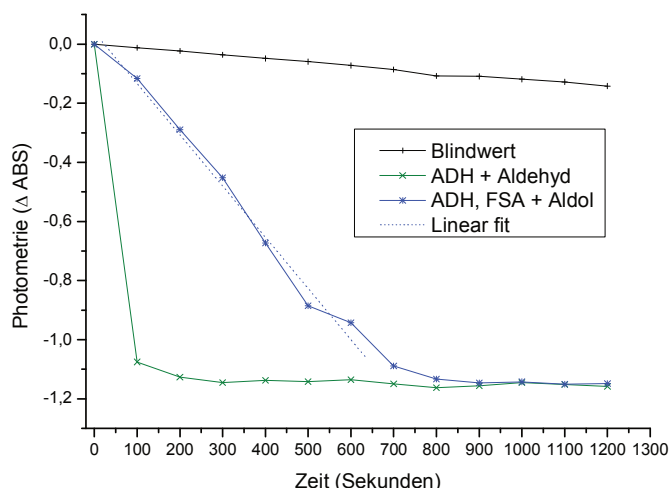


Abbildung 37: Absorptionskurven im Vorversuch. Blindwert: Aldol und ADH. Als FSA-Mutante wurde D6H verwendet

Der Wildtyp zeigte dabei kaum Aktivität, während die auch in anderen Aldol-Spaltungen bisher effektivere Mutante D6H das Substrat hingegen reproduzierbar umsetzte. Kinetische Parameter ließen sich nach dem Michaelis-Menten-Model bestimmen zu $K_M = 52,17 \pm 7 \text{ mM}$ und $v_{max} = 0,094 \pm 0,005 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (=U/mg). Unter mathematischer Berücksichtigung einer möglichen Substratinhibition ergäben sich leicht abweichende Werte (vgl. Abb. 38):

| | Michaelis-Menten-Model | Inhibitions-Model |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------|
| v_{max} ($\mu\text{M}/\text{s}$) | $2,36 \pm 0,13$ | $4,66 \pm 0,75$ |
| v_{max}° (U/mg) | $0,094 \pm 0,005$ | $0,186 \pm 0,029$ |
| K_M (mM) | $52,17 \pm 7,02$ | $151,97 \pm 27,2$ |
| k_{cat} (s^{-1}) | $0,036 \pm 0,002$ | $0,07 \pm 0,011$ |
| k_i (mM) | -- | $230,35 \pm 64,3$ |

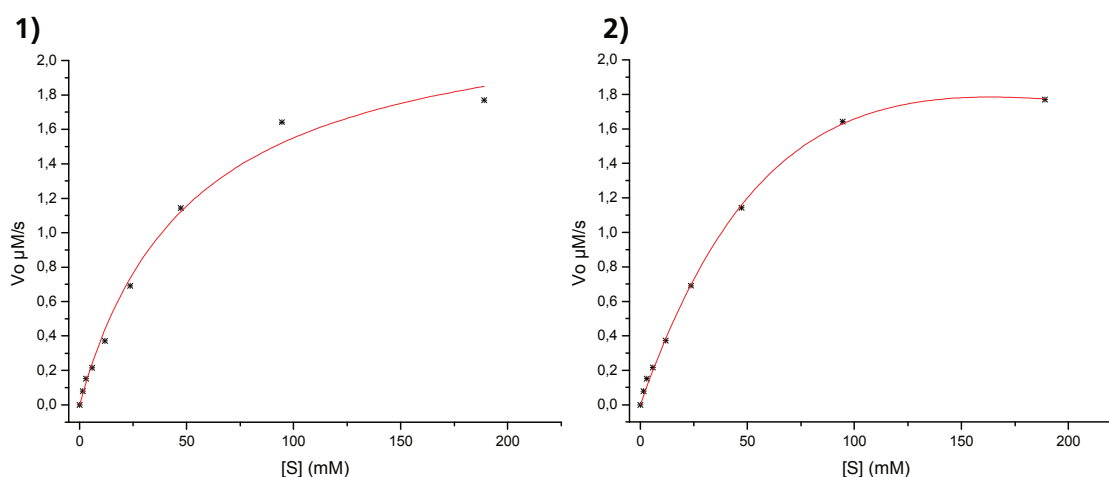


Abbildung 38: Direkt-Lineare Auftragung der Messwerte und hyperbolisches Fitting. A) Gemäß Michaelis-Menten-Model B) unter Berücksichtigung möglicher Inhibitionen durch hohe Substratkonzentration.

Dies ist beides weit entfernt von den Geschwindigkeiten des Wildtyps bei der natürlichen Reaktion ($v_{max} = 7 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ für die Spaltung von D-Fructose-6-phosphat) und liegt im Bereich nicht-natürlicher Reaktionen wie der Spaltung von D-Arabinose-5-phosphat durch den Wildtyp ($v_{max} = 0,160 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$),^[48] wie auch für die Bildung anderer nicht-natürlicher Substrate.^[49] Um eine statistische Einschätzung der Reproduzierbarkeit zu bekommen, wurde in einer Messung je die Hälfte einer Mikrotiter-Platte mit $100 \text{ } \mu\text{l}$ einer Lösung von jeweils $2 \text{ mg}/\text{ml}$ FSA-Wildtyp bzw. D6H-Mutante in PBS befüllt und eine Lösung von 4-Hydroxyhexan-2-

on und NADH und Aldehyd-Dehydrogenase (ADH) in Wasser zugegeben. Über einen Zeitraum von 20 Minuten der Verbrauch an NADH durch die Reduktion des freigesetzten Aldehyds verfolgt. Diese Versuche mit 300 μg Enzym pro Well zeigten sehr deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der für die Reaktion mit Aceton gefundenen besten Mutante D6H sowie generell nur eine geringe Streuung innerhalb der Positivkontrolle.

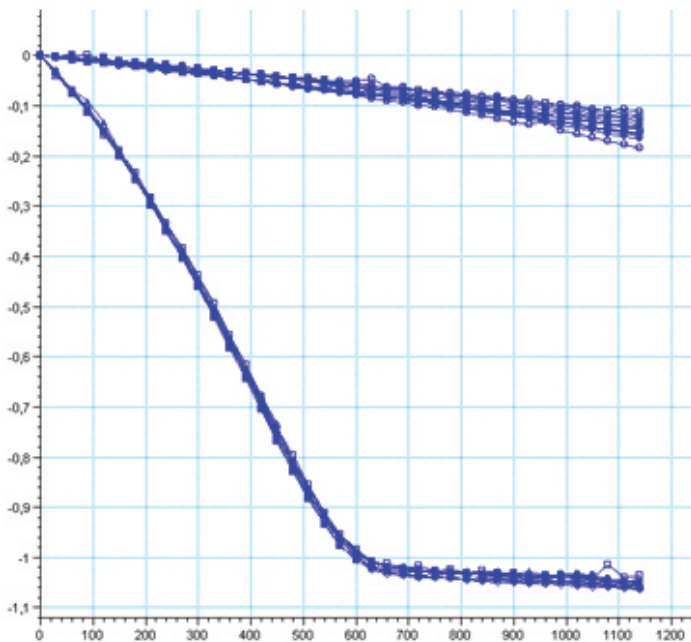


Abbildung 39: Kolorimetrische Messung des NADH-Verbrauchs für FSA Wildtyp im gekoppelten Spaltungs-Reduktions-Assay bei 340 nm. Blindwerte und die Werte des Wildtyps überlagern sich im oberen Bereich (eine farbliche Unterscheidung läßt die Software des Readers leider nicht zu), die D6H Mutante zeigt ein deutliches Signal.

Ermutigt durch diese Ergebnisse wurde überlegt, das Prinzip auf einen High-Throughput-Assay zu übertragen, um weitere geeignete Mutanten zu finden, die dem Wildtyp überlegen sind. Dazu wurden in einer Versuchsreihe durch Sättigungs-Punktmutagenese Plasmide für eine D6x-Mutantenbibliothek erzeugt, so dass neben neuen Varianten auch die bereits bekannten Typen D6E und D6H als Positivkontrolle enthalten sein sollten. Die entsprechenden kompetenten Zellen (BL21) wurden in Deepwell-Platten mit Autoinduktionsmedium kultiviert und anschließend lysiert. Nach einer Hitzebehandlung bei 65 °C wurde der von Fremdproteinen befreite Überstand, der praktisch nur noch FSA enthält, mit den obigen Bedingungen vermessen. Leider ließ sich auch nach verschiedenen Optimierungsversuchen für die Zellkultur und die Messung kein statistisch befriedigendes Ergebnis erreichen.

Offenbar war die auf diese Weise gewonnene Menge an Enzym zu gering, um einen signifikanten Beitrag zur Reaktion zu liefern. Positive wie negative Kandidaten wurden von der nicht-enzymatischen Hintergrundreaktion überlagert, wie ein Vergleich mit den Blindwerten zeigte:

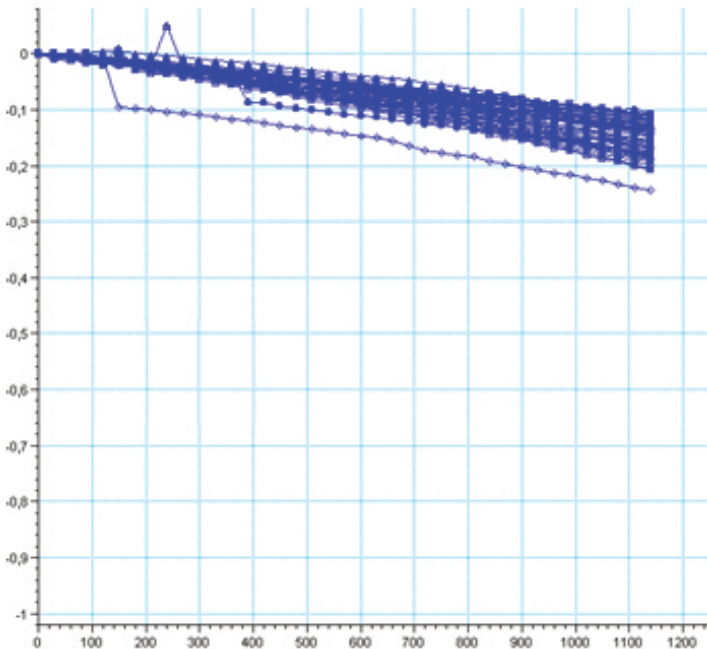


Abbildung 40: Anwendung des Prinzips auf ein High-Throughput-Screening direkt aus dem Zell-Lysat. Blindwert, negative und positive Ergebnisse überlagern sich.

Gründe für den abfallenden Blindwert, also einen Verbrauch von NADH unabhängig von der enzymatischen Spaltung des Aldols, können im Wesentlichen in zwei Punkten liegen: Zu einem ist das Substrat chemisch nicht völlig stabil, auch bei Lagerung in der Kälte zerfällt es langsam, so dass immer ein kleiner Gehalt an freiem Aldehyd vorliegt. Zum Anderen wird das Aldol unter den Assay-Bedingungen, besonders bei erhöhter Temperatur auch ohne Enzym, gespalten und dadurch Aldehyd freigesetzt.

Der Gehalt an freiem Aldehyd im Substrat kann herabgesetzt werden, indem die Substratlösung vor der Messung mit ADH versetzt wird und NADH zugesetzt wird, bis die Absorption bei 340 nm konstant bleibt. Dieses Vorgehen zeigte eine leichte Verbesserung, so dass der Blindwert deutlich langsamer abfiel. Der immer noch messbare NADH-Verbrauch ist wohl auf chemische Retro-Aldolisierung unabhängig von der Enzymaktivität begründet. Der chemischen Zersetzung konnte bisher nicht erfolgreich entgegen gewirkt werden. Auch nach mehreren Optimierungsschritten war der Unterschied zwischen FSA-Wildtyp (als Minimum) und der als Positivkontrolle eingesetzten D6H-Mutante statistisch nicht signifikant.

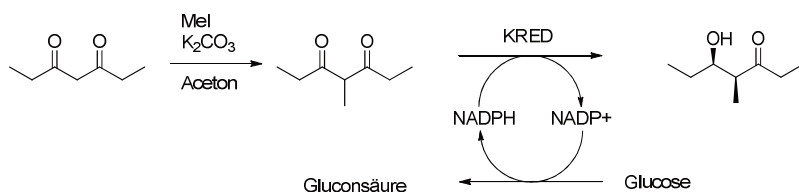
Der Grund hierfür ist wohl in der geringen Enzymmenge zu sehen, die in den *Deepwell*-Platten jeweils erzeugt werden kann. Ein weiteres immer wieder auftretendes Problem war, dass nicht vollständig abgetrennte oder versehentlich resuspendierte Partikel aus der Lysis eine extrem hohe Aktivität vortäuschten. Ob dies in einer chemischen Aldolspaltung oder einem anderweitigen Verbrauch an NADH begründet ist, konnte nicht abschließend geklärt werden. Für kinetische Untersuchungen von aufgereinigten Mutanten der FSA zur Spaltung kleiner Aldole ist der Assay jedoch bestens geeignet.

Bei langsamen Spaltungsreaktionen stand auch die Frage im Raum, in wie weit eventuell die ADH die Ketogruppe des Aldols direkt reduziert werden kann, und so das Ergebnis verfälscht. Auch wenn die Wahrscheinlichkeit dafür gering ist, wurde ein alternativer Assay entwickelt, der auf der Oxidation des freigesetzten Propionaldehyds durch eine Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) beruht, einer mit Ketonen nicht möglichen Reaktion.

Die ALDH, verwendet wurde die ALDH aus *E. coli* K12^[76], oxidiert den Aldehyd zur entsprechenden Carbonsäure unter NAD⁽⁺⁾-Verbrauch und NADH-Freisetzung, Das gebildete NADH kann dann entweder photometrisch bei $\lambda_{\text{abs}}=340$ nm oder fluorometrisch bei $\lambda_{\text{emi}}= 460$ nm ($\lambda_{\text{ext}}= 340$ nm) nachgewiesen werden. Im direkten experimentellen Vergleich zeigten sich beide Assays als gleichwertig; eine Reduktion des Aldols zum Diol kann somit ausgeschlossen werden.

3.1.7 Sitophilure

Aldole spielen in der Biologie eine vielseitige Rolle. Aldolreaktionen sind hauptsächlich an der Kohlenhydrat- und Fettsäuresynthese beteiligt, kommen aber auch in anderen Bereichen vor. Ein Beispiel ist (4*S*,5*R*)-5-Hydroxy-4-methylheptan-3-on, auch als (+)-Sitophilure bekannt. Es ist ein Aggregationspheromon des Reiskäfers *Sitophilus oryzae* sowie des Maiskäfers *Sitophilus zeamais*.^[77] Beide Käfer sind bedeutende Vorratsschädlinge, die in Kornlagern und Teigwarenfabriken extremen Schaden bis zur kompletten Vernichtung der Vorräte anrichten können. Vor diesem Hintergrund ist das Pheromon für die Herstellung von Fallen zur Abwehr der Insekten von großem Interesse. Eine große Vereinfachung der Synthese gelang Kalaitzakis et al. 2006 durch die Verwendung einer Ketoreduktase,^[78] um die Verbindung aus einer prochiralen Vorstufe stereoselektiv zu erzeugen. Diese wiederum wurde aus 3,5-Heptandion durch Alkylierung mit Methyljodid hergestellt.



Schema 17: Synthese von Sitophilure aus einer prochiralen Vorstufe nach Kalaitzakis et al.

Da die absolute Stereochemie prinzipiell derjenigen entspricht, welche auch die FSA bevorzugt, kam die Idee auf, diese wertvolle Verbindung durch FSA-katalysierte Aldolsynthese herzustellen, und dafür geeignete Mutanten durch Spaltungsassays zu identifizieren. Die Ausgangsmaterial wären dann Propionaldehyd und 3-Pentanon, beides sehr preiswerte Industriechemikalien.



Schema 18: Konzept einer Synthese von Sitophilure mit der FSA.

Zunächst mussten geeignete FSA-Varianten gefunden werden, die das Substrat akzeptieren. Basieren auf vorherigen Ergebnissen mit 4-Hydroxyhexan-2-on wurde die D6H-Mutante ge-

wählt, da diese offenbar am besten geeignet erschien. 5-Hydroxy-4-methylheptan-3-on wurde nach der bereits beschriebenen Gasstrom-Methode hergestellt und als Diastereomerengemisch eingesetzt. Die literaturbekannte Synthese aus Heptan-3,5-dion wurde wegen des hohen Preises der Substanz verworfen. Das Diastereomerengemisch wurde per NMR untersucht und bestand demnach zu 85% aus dem *syn*-Isomer und zu 15% aus dem *anti*-Isomer, jeweils als Racemat. Die Substanz wurde im Spaltungs-Assay wie zuvor beschrieben untersucht. Die ursprüngliche Methode ließ sich problemlos auf diese Substanz übertragen und eine Spaltung durch die FSA-Variante konnte verifiziert werden. Mehrere Mess-Serien legten eine Kinetik nach dem Michaelis-Menten-Modell nahe.

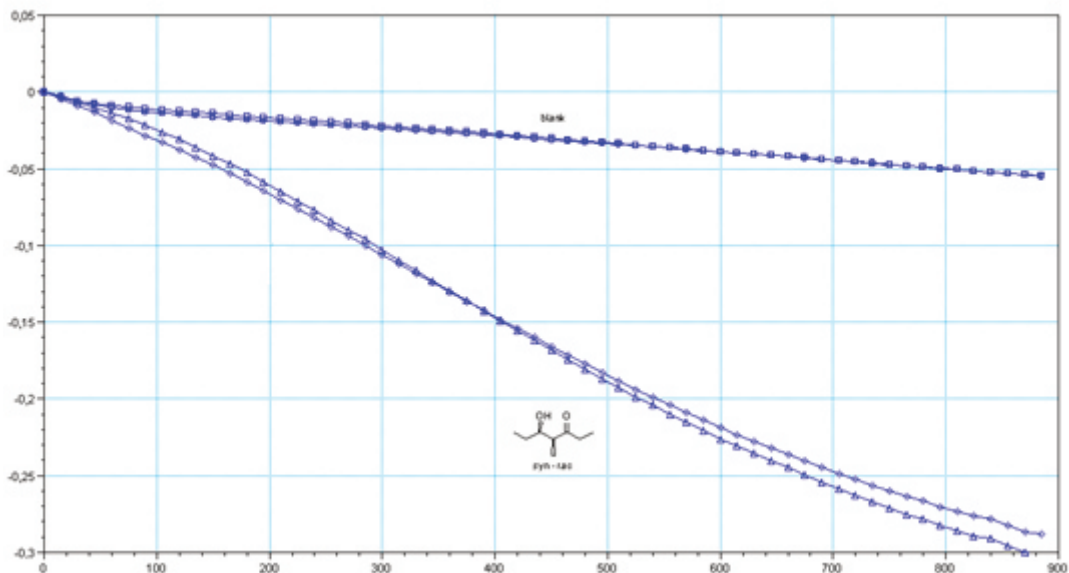


Abbildung 41: *rac*-Sitophilure wird von der FSA-Mutante D6H gespalten, gemessen am NADH-Verbrauch bei der Reduktion des freigesetzten Aldehyds.

Die FSA setzt das Substrat jedoch nur sehr schlecht um. Die mit dem NADH-gekoppelten Spaltungsassay gewonnenen kinetischen Werte zeigten eine geringe Akzeptanz des Materials durch die wt-FSA; beste Werte wurden mit der D6H Mutante erreicht, andere Mutanten wie L107A, L163A und die entsprechende Doppelmutante brachten keine Verbesserung. Insbesondere die Mutation A165G, in welcher der Engstelle am katalytischen Zentrum verbreitert ist, brachte entgegen der Erwartung keine Verbesserung gegenüber dem Wildtyp.

Versuche einer präparativen kinetischen Racematspaltung am Substrat um die Diastereoselektivität des Enzyms zu untersuchen wurden nicht unternommen.

Mit der Variante D6H wurde eine Untersuchung hinsichtlich einer Kinetik nach dem Michaelis-Menten-Modell durchgeführt. Messungen mit Konzentrationen zwischen 10 und 500 mM ergaben kinetische Parameter von $k_M = 532 \text{ mM}$ und $v_{\max} = 2 \mu\text{M s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, bei 500 μg Enzym pro 200 μl Ansatz. Im gleichen Versuch zeigte der Wildtyp keinen von der Hintergrundreaktion unterscheidbaren Umsatz. Weitere Mutanten wurden basierend auf vorherigen Ergebnissen nicht vermessen.

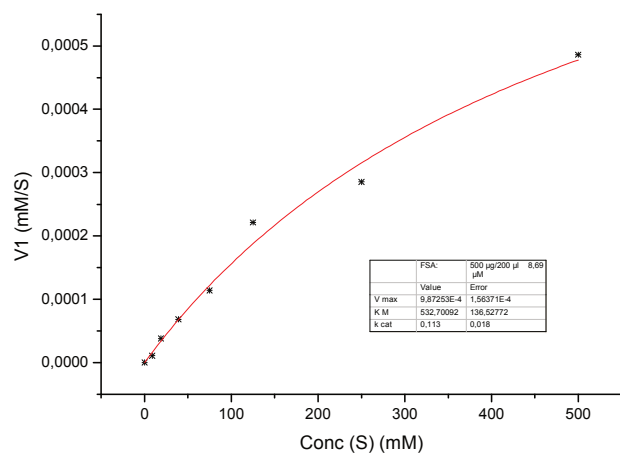


Abbildung 42: Bestimmung der kinetischen Parameter für die Spaltung von *rac*-Sitophilure durch FSA* D6H.

Eine präparative kinetische Racematspaltung oder Untersuchungen zu Diastereomeren-Selektivität wurden hierbei nicht unternommen.

Versuche zur enzymatischen Synthese von Sitophilure der FSA-Mutante D6H im Halbmikromaßstab mit zeigten jedoch auch nach mehreren Tagen Reaktionsdauer nahezu keine Produktbildung. Auch bei größeren Ansätzen bis zu 500 ml Gesamtvolumen und mehreren Tagen Reaktionszeit ließen sich nur Spuren des Produktes per GC nachweisen. Diese könnten jedoch auch durch Hintergrundreaktionen ohne Beteiligung des Enzyms entstanden sein.

Auch Versuche zur Synthese mit ganzen Zellen konnten die Ausbeute nicht verbessern. Bei der Herstellung von (+)-Sitophilure aus 3-Pentanon und Propionaldehyd ist die FSA sowohl als Wildtyp wie auch die untersuchte Mutante D6H derzeit der etablierten Methode der enzymatischen Reduktion^[78] noch weit unterlegen.

3.1.8 Fazit erster Teil

Sowohl der auf NADH und Alkoholdehydrogenase basierende Assay für kurzkettige Aldole wie auch ein entsprechender Assay mit einer NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenase konnten erfolgreich etabliert werden und kinetische Messungen an (*rac*)-4-Hydroxyhexan-2-on sowie (*rac*)-5-Hydroxy-4-methylheptan-3-on (Sitophilure) wurden erfolgreich durchgeführt. Auch hier bleibt in der praktischen Anwendung das Manko des hohen Proteinbedarfs von über $1,5 \text{ mg/ml}$ für FSA bestehen, was allerdings auf die schlechte Katalyseaktivität des Enzyms, selbst bei kleinen Substratmolekülen zurückzuführen ist. Die Anwendung der Assays auf andere Aldehydfreisetzende Reaktionen ist durchweg positiv zu bewerten.

Methodol in Assays zur Untersuchung der Fructose-6-Phosphat-Aldolase (FSA) anzuwenden, war im Ansatz erfolgreich, dennoch ist ein gemischtes Fazit zu ziehen. Der Assay funktioniert im Prinzip und liefert mit Mengen von $>5,0 \text{ mg/ml}$ Enzym bei $200 \mu\text{l}$ Probenvolumen in Deepwell-Platten gute und reproduzierbare Ergebnisse. Es ist möglich, die Akzeptanz von nicht-natürlichen Substraten durch die FSA zu messen und über die Fluoreszenzentwicklung zu quantifizieren. Ebenso lassen sich für einzelne Substrat-Enzym-Paare die Michaelis-Menten-Parameter bestimmen. Einige Fragen, insbesondere zu Katalyse durch Lysine außerhalb des aktiven Zentrums sind noch nicht vollständig geklärt und Thema weiterer Forschungen.

Für ein High-Throughput-Screening ist der Ansatz jedoch nicht praktikabel. Die langen Messzeiten von mehreren Stunden, bzw. der für rationale Messzeiten hohe Proteinbedarf von mehreren hundert μg pro well und die im Vergleich zur Löslichkeit das Aromaten in wässrigen Puffersystemen sehr hohen K_M -Werte für die Mutanten der FSA stehen der Nutzung dieser Methode in High-Throughput-Assays wohl auf bis weiteres im Wege.

Da das Prinzip, die Fluoreszenz von Methoxynaphthyl-Carbonylen einzusetzen, um enzymatische Umsetzungen zu quantifizieren, jedoch sehr selektiv und vielversprechend ist, wurde versucht, es auf andere Enzyme anzuwenden. Transaminasen beispielsweise wandeln Amine in Keton um (und umgekehrt) und wären daher gut geeignet, ein derartiges Assay-System darauf anzuwenden.

3.2 Assay für ω -Transaminasen

3.2.1 Einführung Transaminasen

Transaminasen (EC 2.6.1.x), oder genauer *Aminotransferasen*, sind Cofaktor-abhängige Enzyme, die Ketone in Amine überführen und umgekehrt^[47]. Der Cofaktor Pyridoxal-5-phosphat (PLP), ein Derivat des Vitamins B₆, überträgt dabei die Aminofunktionalität, das Enzym sorgt lediglich für die katalytische Ausrichtung des Substrates im Raum und somit für die Stereokonfiguration. α -Transaminasen bilden dabei ausschließlich α -Aminosäuren aus α -Ketosäuren (und umgekehrt) während ω -Transaminasen entferntere Positionen modifizieren können; dabei ist ihre Substratbreite jedoch begrenzt. Für Ketone oder die entsprechenden Amine darf der kleinere Rest oft nur eine Methylgruppe sein. Transaminasen sind in der Natur an der Synthese von Aminosäuren und biologisch aktiven Aminen beteiligt. Sie weisen daher für das natürliche Substrat eine sehr hohe Stereoselektivität auf, was sie auch für die chemische Synthese interessant macht.

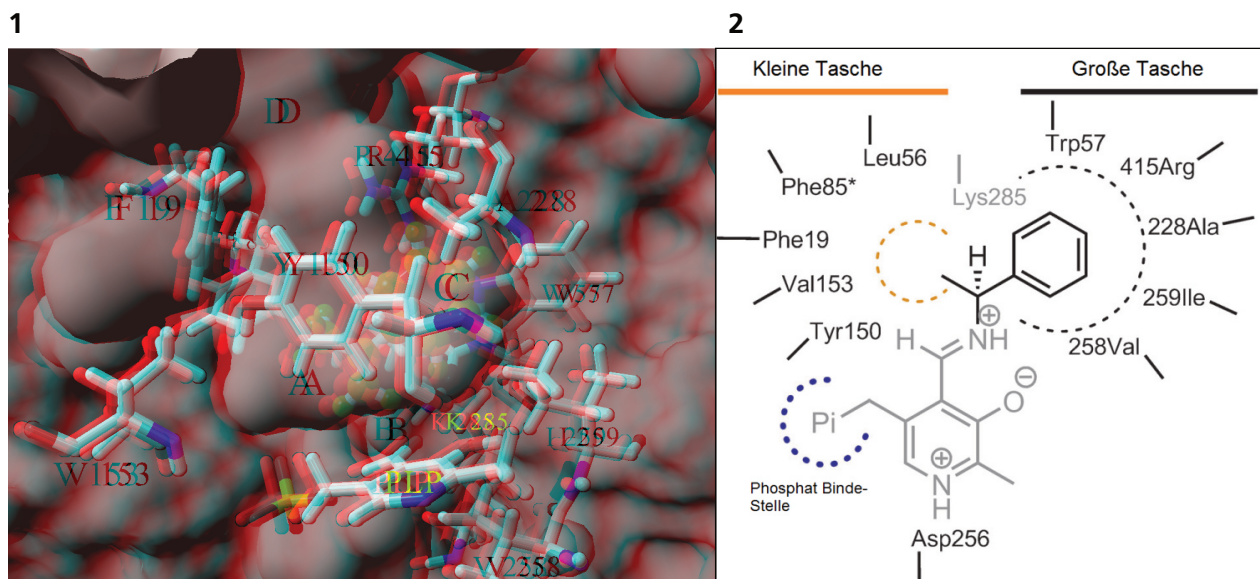


Abbildung 43: 1) Anaglyphe Darstellung der active site einer Transaminase aus *Vibrio fluvialis* (PDB-Code 4E3Q). Die Stabmodelle zeigen die die Taschen begrenzenden Aminosäuren, PLP und das katalytische Lysin sind gelb beschriftet, die Tasche enthält (*S*)- α -Methylbenzylamin (MBA) als Substrat. A: kleine Tasche, B: PLP Bindestelle, C: große Tasche und D: Ausgang. 2) Schematische Skizze der active site, modifiziert nach Nobili.^[79]

Strukturell betrachtet treten Transaminasen immer als Homodimere (oder auch Dimere davon) auf, wobei die *active site* von beiden Ketten an der Schnittstelle der beiden Monomereinheiten gebildet wird. Erste Erklärungsversuche zur Struktur und Funktionalität stammen von Kim et al.^[80] Das katalytische Zentrum besteht aus zwei Bindestellen, einer großen und einer kleinen Tasche (Abb. 7 B). Besonders die kleine Tasche begrenzt die Substratbreite, hydrophobe Wechselwirkungen und starke sterische Hinderungen lassen nur selten Reste größer als eine Ethylgruppe zu.

Der katalytische Zyklus läuft nach dem Prinzip einer ping-pong/bi-bi Reaktion ab. Bei diesem Typ von enzymatischen Reaktionen werden (Zwischen-)Produkte freigesetzt bevor alle Substrate umgesetzt werden. Diese auch als Doppelverdrängung beschriebenen Reaktionen zeichnen sich dadurch aus, dass niemals beide Substrate gleichzeitig gebunden sind. Die Transaminierung stellt unter enzymatischen Umsetzungen jedoch insofern einen Sonderfall dar, als die funktionelle Gruppe des Substrates nicht am Enzym gebunden ist, sondern direkt vom Co-Faktor übernommen wird.

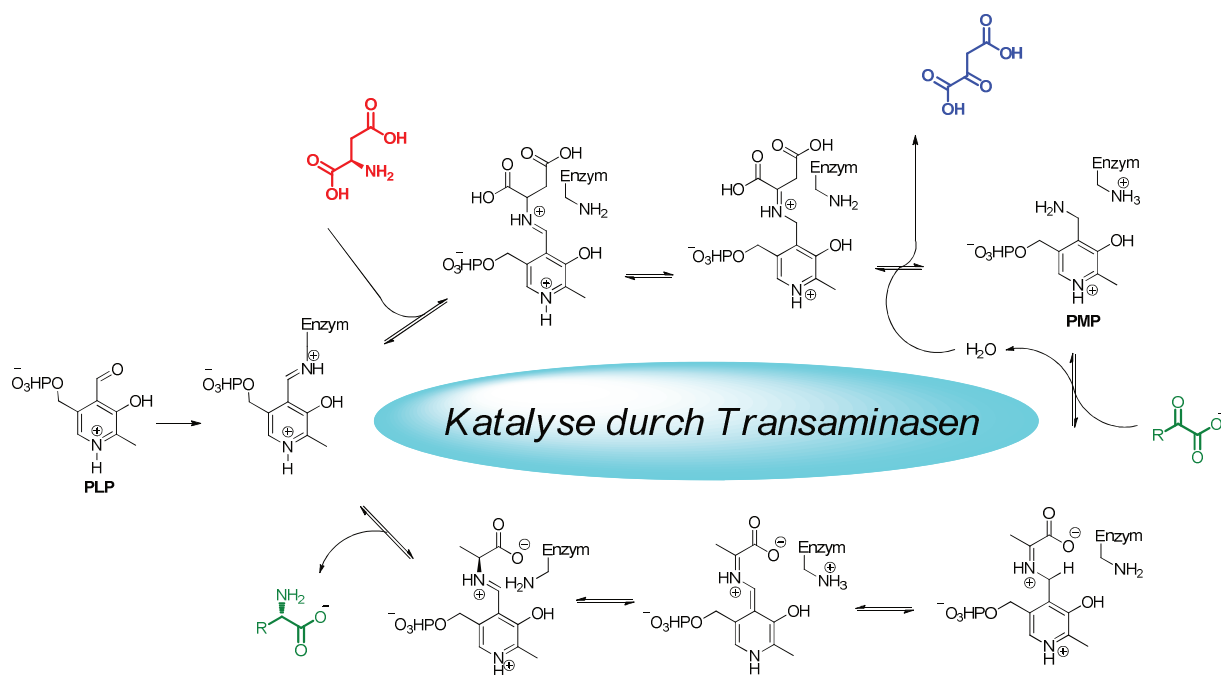


Abbildung 44: Schematische Darstellung des katalytischen Kreislaufes in Transaminasen

Mit Transaminasen können chirale Amine in hoher Enantiomerenreinheit erhalten werden. Dies ist – neben den ursprünglichen biologischen Funktionen – heute vor allem für die pharmazeutische Chemie von Bedeutung. Eine Vielzahl etablierter und experimenteller Wirkstoffe enthalten chirale Amine als Kernkomponente. Rivastigmin, Fendilin, Oxifedrin, Amphetamin, Cinacalcet, u.a. stellen nur eine kleine Auswahl daraus dar.

Für die Zulassung als Medikament ist es wichtig, die Substanzen enantiomerenrein herzustellen und getrennt zu prüfen. Dies geht vor allem auf die dramatischen Ereignisse um das Präparat „Contergan“ zurück. Das als Racemat verkaufte Beruhigungsmittel führte, in der frühen Schwangerschaft eingenommen, zu schweren Missbildungen am Kind. Während die Hauptwirkung vom (*R*)-Enantiomer ausgeht, war für die fruchtschädigende Wirkung nur das (*S*)-Enantiomer verantwortlich^[81]. Auch wenn nicht immer gleich eine Giftigkeit eines der Enantiomere besteht, ist es doch von Nutzen, nur das wirksame Enantiomer (Eutomer) einzusetzen, um den Körper und insbesondere die Leber vor unnötiger Belastung zu schützen. Die hohe Selektivität von Transaminasen erlaubt es, mit ihnen sowohl enantiomerenreine Substanzen durch direkte asymmetrische Synthese herzustellen, als auch Racemate zu spalten.

Ein Paradebeispiel ist dafür die Deracemisierung von Mexiletin.^[82] Mexiletin ist ein zur Therapie von Herzarrhythmien eingesetzter Na-Kanalblocker. Das unerwünschte Enantiomer wird im ersten Teil der Ein-Topf-Synthese von einer Transaminase zum prochiralen Keton umgesetzt, dieses dann zum Eutomer mit einer zweiten Transaminase entgegengesetzter Stereoselektivität. Sowohl (*S*)- wie auch (*R*)-Verbindung ließen sich so in sehr hoher Reinheit und Ausbeute herstellen.

Dennoch spielten Transaminasen in der industriellen chemischen Synthese lange Zeit eine untergeordnete Rolle, da ihr Einsatz auf Methylketone begrenzt war. Besondere Aufmerksamkeit erhielt die enzymatische Synthese von chiralen Aminen in der pharmazeutischen Industrie erst durch das Antidiabetikum *Sitagliptin*.^[83] Die Umsetzung des prochiralen Pro-Sitagliptin-Ketons zur Sitagliptinbase, eine asymmetrische reduktive Aminierung, wurde bis dahin über das Enamin und dessen asymmetrisch Hydrierung an einem komplexen Rhodiumkatalysator geführt. Letzterer musste anschließend aufwändig quantitativ entfernt werden, da der Katalysator selbst giftig ist. Savile et al. setzten ihre Arbeit daran an, diesen zentralen Schritt in der Synthese des Sitagliptins mit einer Transaminase durchzuführen.

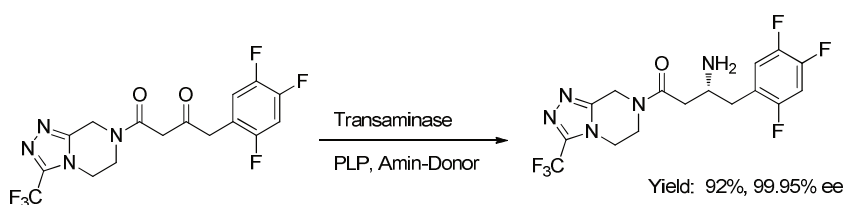


Abbildung 45: Enzymatischer Reaktionsschritt für die asymmetrische Synthese von Sitagliptin

Für die enzymatische Umsetzung ging man von der bekannten Transaminase ATA-117 aus. Dieses gut untersuchte Enzym ist jedoch nur zur Umsetzung kleiner Methylketone geeignet. Da

von ATA-117 trotz der guten Verfügbarkeit noch keine Röntgenstruktur existiert, musste ein Homologiemodell erstellt werden, um das Proteindesign zu planen. Durch eine Serie gezielter Proteinengineerings wurden in 14 Stufen insgesamt 27 Punktmutationen eingeführt, bis die finale Mutante gefunden war. Mit einer Substratkonzentration von 200 g/L bei 50% DMSO als Co-Solvens ist diese Methode auch für den industriellen Maßstab geeignet. Die Umsetzung läuft mit 92% Ausbeute und 99,95% ee ab und übertrifft damit auch die ältere metallorganische Route bei weitem.

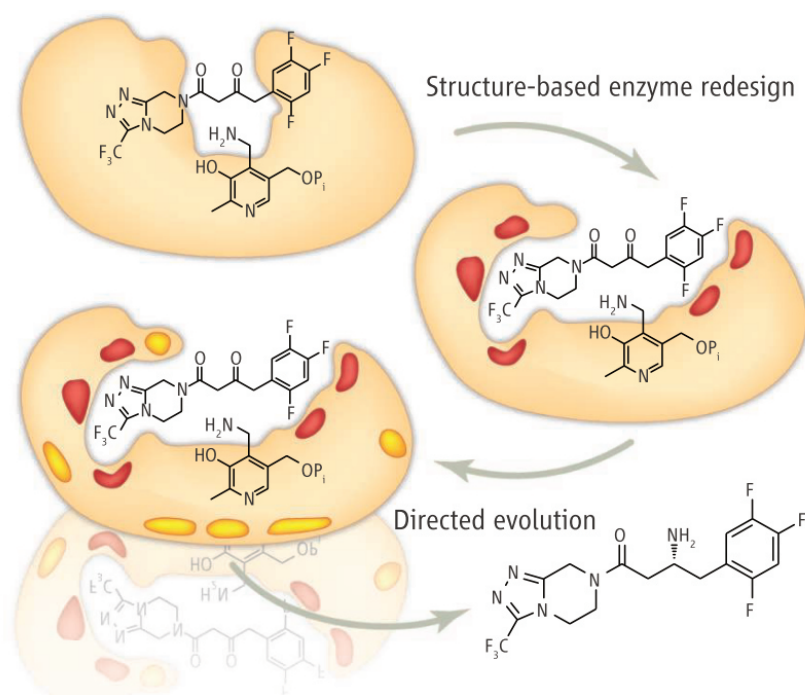


Abbildung 46: Vereinfachte Darstellung des *Protein Engineerings* an ATA-117 zur Synthese von Sitagliptin. Veränderungen in der *active site* sind rot dargestellt, gelb nötig Mutationen um das Dimer zu stabilisieren.^[84]

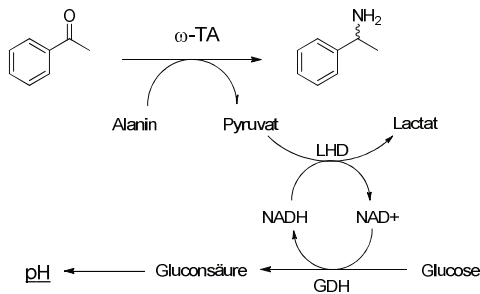
Gezieltes *protein engineering* kann also sowohl die Substratbreite^[85], als auch die Stereopräferenz^[86] einer Transaminase beeinflussen. Es ist sowohl möglich die Enantioselektivität weiter zu verbessern, als auch sie komplett umzukehren. Eine deutliche Verbesserung konnte beispielsweise bei der (*R*)-selektiven Transaminase aus *Pseudomonas putida* erreicht werden: Gezielte Mutationen an der Position 112 nahe der PLP-Bindestelle erhöhten die Selektivität beachtlich. In wenigen Schritten konnte die Selektivität für die Deracemisierung von Phenylpropylamin auf >99% ee gegenüber gerade 6,5% ee des Wildtyps erhöht werden^[47]. Die Inversion der Enantioselektivität gelang 2015 Bornscheuer et al. bei Arbeiten mit der Transaminase aus *Vibrio fluvialis*.^[87] In einer Kaskadenreaktion wird (*3S*)-Methylcyclohexanon aus einer vorgeschalteten Enoat-Reduktase-Reaktion mit der Transaminase zu 1-Amino-3-methylcyclohexan

weiter umgesetzt. Mittels *Protein-Engineering* wurden zwei Varianten erzeugt, die gegenüber dem Wildtyp verbesserte Diastereoselektivitäten zeigen. Interessanterweise ist die Mutante Leu56Val (*R*)-selektiv und bildet bevorzugt (*1R*, *3S*)-Methylcyclohexanon (66 % de) und Leu56Ile das (*1S*, *3S*)-Produkt (70 % de) bildet. Anhand dieser Beispiele zeigt sich, dass Enzyme gezielt sich der Syntheseroute anpassen und so modifizieren lassen, dass sie nicht-natürliche Substanzen in hoher Reinheit und Ausbeute umsetzen.

Enzyme als Katalysatoren einzusetzen hat sowohl ökologische, als auch ökonomische Vorteile. Der Bereich *green chemistry* ist einer der großen Trends in der chemischen Industrie. Sonderabfälle zu vermeiden und energieeffizient zu arbeiten sind Schlüsselemente für jeden Produktionsprozess. Enzyme erlauben oft, Reaktionen bei moderaten Temperaturen und Drücken zu führen und bis auf wenig Co-solvent im wässrigen Milieu zu arbeiten. Gerade für die pharmazeutische Produktion sind Biokatalysatoren von großem Interesse, da sie nicht toxisch und einfach zu entfernen sind. Die für die Zulassung eines Präparates nötige vollständige Entfernung von Schwermetallrückständen aus der klassischen metallorganischen Synthese gestaltet sich mitunter sehr schwierig. 2014 gelang es der Arbeitsgruppe um Wolfgang Kroutil im Labormaßstab, die Synthese des Antiallergikums Ramatroban durch den Einsatz einer Transaminase entscheidend zu verbessern^[88]. So wurde bei gleicher Enantiomerenreinheit die Ausbeute von 62% auf 96% erhöht und der Zeitaufwand von zwei Tagen auf vier Stunden verringert. Gleichzeitig wurden toxische Hilfsstoffe wie Diphenylphosphorylazid (DPPA) und Diethylazodicarboxylat (DEAD) vermieden und die Substratkonzentration von 50mM macht eine Durchführung im technischen Maßstab möglich. Diese Beispiele zeigen das hohe Potential von Enzymen und insbesondere Transaminasen in der chemischen Synthese. Um nun Enzyme als maßgeschneiderte Biokatalysatoren zu verwenden, sind zuverlässige Methoden notwendig, um die Wirksamkeit und Funktion der neuen Enzyme zu bewerten.

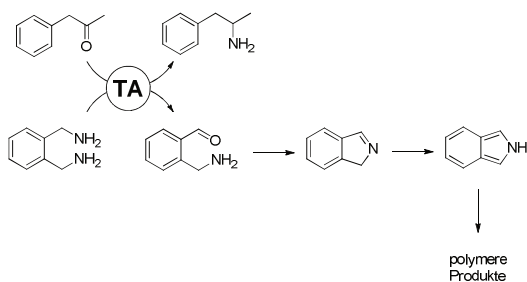
Ein Standardverfahren ist dabei die Bildung von Acetophenon aus α -Methylbenzylamin (MBA), was durch Messung der UV-Absorption bei 245 nm verfolgt werden kann. Einen guten Überblick über die derzeitigen Assaymethoden um Transaminasen zu bewerten, liefert der Übersichtsartikel von Mathew^[89]. So ist neben der MBA-Methode auch die Biuret-Reaktion mit der aus der Ketosäure gebildeten Aminosäure gebräuchlich, oder Reaktionen, die neben der Transaminierung ein gekoppeltes Detektionssystem mit anderen Enzymen beinhalten. Ein weiteres Beispiel ist der dreistufige pH-Assay nach Truppo^[90]. Dabei wird Alanin als Aminodonor eingesetzt und zu Pyruvat umgewandelt. Das bei der Transaminierung gebildete Pyruvat wird dann unter NADH-Verbrauch zu Lactat reduziert. Um NADH nachzuliefern, wird in einem Recycling-system Glukose unter NAD-Verbrauch zu Glukonsäure oxidiert. Der durch die gebildete Säure

verursachte Abfall des pH-Wertes wird mit geeigneten Indikatoren wie Phenolrot nachgewiesen und dient letztlich als Signal zur Auswertung der Enzymaktivität.



Schema 19: Mehrstufiger pH-Assay für Transaminasen nach Truppo^[90]

Eine weitere kürzlich von Greene et al. publizierte Methode geht von einem Acetophenonderivat als Akzeptor und *ortho*-Xylendiamin als Amindonor aus. Das entstehende Isoindol polymerisiert der Folge zu intensiv gefärbten Nebenprodukten.^[91]



Schema 20: Transaminasen-Assay nach Greene: Die Bildung von Isoindol zieht das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte und löst die Farbreaktion aus

Diese auch für die Synthese chiraler Amine durchaus praktische Methode lässt nur die Reaktion in Richtung von Isoindol und der gewünschten Aminkomponente zu, die Rückreaktion ist nicht möglich. Für die Untersuchung der Stereoselektivität des Enzyms ist sie aber nur bedingt geeignet, da sie von einem prochiralen Keton und einem achiralen Amin ausgeht und die gebildeten chiralen Amine nachher gesondert, ggf. chromatographisch, auf ihr Enantiomerenverhältnis untersucht werden müssen.

3.2.2 Prinzip des Fluoreszenz-Assays

Wegen der großen Bedeutung der ω -Transaminasen für die bio-organische Chemie wurden bereits zahlreiche Assays entwickelt, um Vertreter dieser Enzymklasse zu bewerten. Die meisten beruhen auf Absorptions-Messungen, entweder die der gebildeten Carbonylkomponente direkt, oder diejenige einer angeschlossenen Farbreaktion. Um die Stereopräferenz zu bewerten, blieben oft nur chromatographische Ansätze wie chirale HPLC, was zu geringem Probendurchsatz führte und es nicht möglich machte, große Mengen an Enzymvarianten parallel zu analysieren. Im Hinblick auf die Empfindlichkeit sind kolorimetrische Methoden der Fluoreszenz grundsätzlich unterlegen. Die Nachweisgrenze liegt bei guter Fluoreszenz-Quantenausbeute bis zu zwei Größenordnungen darunter. Der Versuch, ein fluoreszierendes Produkt zu erzeugen und damit die Reaktion direkt zu verfolgen wurde trotz der Vorteile einer Fluoreszenzmessung gegenüber der der Absorption bisher noch nicht unternommen.

Die Idee bestand nun darin einen Assay zu entwickeln, der auf der Erzeugung einer fluoreszierenden Komponente beruht und, wenn möglich, ein chirales Substrat verwendet, so dass die Stereopräferenz und die kinetischen Parameter eines Enzym gleichzeitig bestimmt werden können. Die Anwendung eines solchen Assays in 96-well Mikrotiterplatten sollte die Bewertung vieler Enzyme oder Enzymvarianten gleichzeitig ermöglichen. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Assay basiert auf der Bildung von 6-Methoxynaphth-2-ly-ketonen, einer seit langem bekannten Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit einer Quantenausbeute um 0,2^[92] gut für Fluoreszenzmessungen geeignet sind.

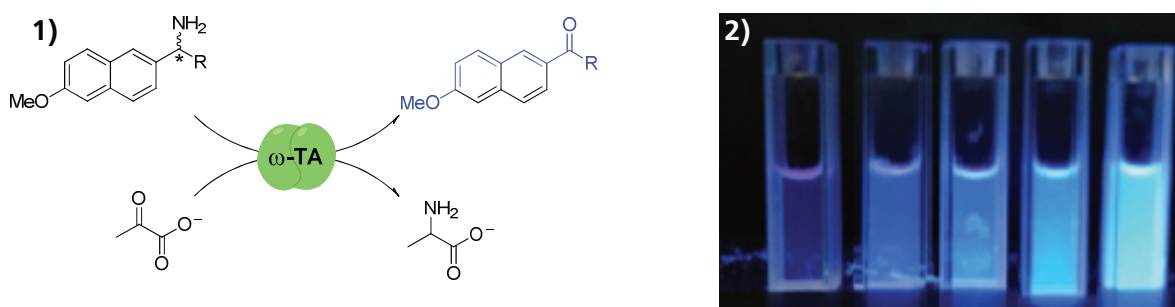
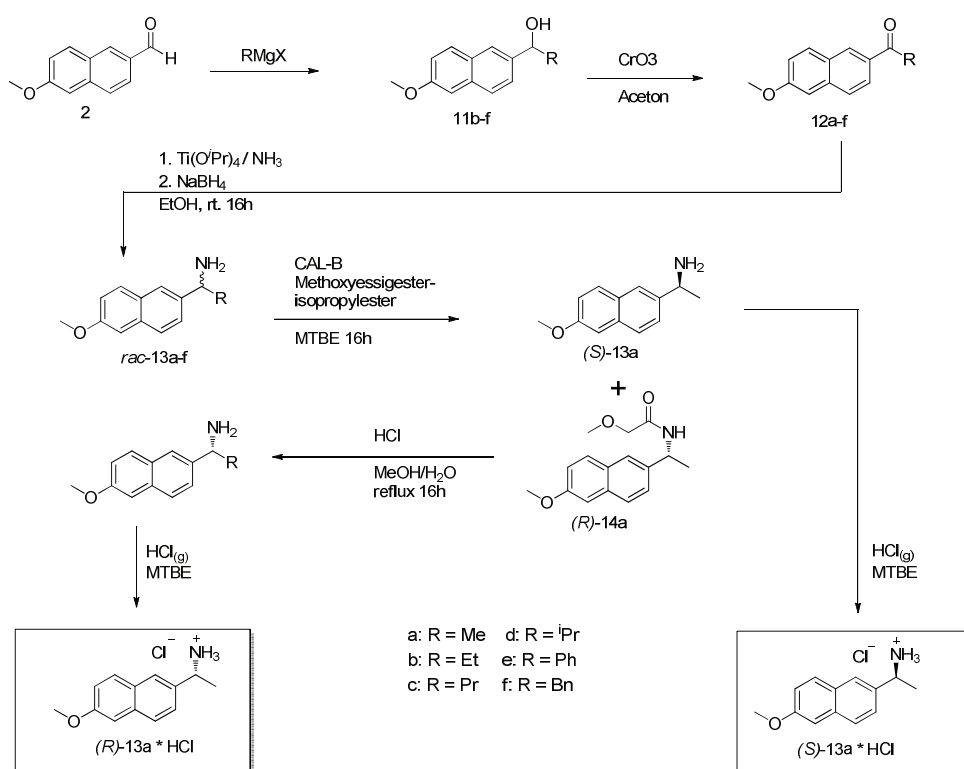


Abbildung 47: 1) Assayprinzip; mit Pyruvat als Aminoakzeptor wird aus dem chiralen Amin das fluoreszierende Keton gebildet. Um die Stereopräferenz zu bestimmen, kann wurde das Amin enantiomerenrein eingesetzt. 2) Zunehmende Fluoreszenz des Ketons in verschiedenen Konzentrationen erlaubt die Quantifizierung.

3.2.3 Synthese der Substrate

Der Assay beruht darauf, nicht-fluoreszierende chirale Amine zu fluoreszierenden Ketonen umzusetzen. Um die Substratbreite der Transaminase zu untersuchen ist es nötig Strukturvarianten mit vergleichbaren Fluoreszenzeigenschaften zu entwickeln. Es wurde eine modulare Synthese entwickelt, die es ermöglicht, ausgehend von dem gleichbleibenden Fluorophor das Molekül beliebig zu erweitern und stückweise zu vergrößern. Auch die Verfügbarkeit der jeweiligen enantiomerenreinen Verbindungen war von großem Interesse, um die Enantiopräferenz der Transaminasen zu untersuchen.

Die benötigten Ketone wurden nicht, wie bisher in der Literatur beschrieben, mittels Friedel-Crafts-Acylierung^[93] hergestellt, sondern über eine Grignard-Addition des Alkylrestes an kommerziellen 6-Methoxy-naphthaldehyd **2** gefolgt von einer Jones-Oxidation. Dadurch spielte die Regioselektivität einer Acylierung keine Rolle mehr und die Aufreinigung der Produkte wird deutlich vereinfacht. Die benötigten Amine lassen sich als Racemat gut durch reduktive Aminierung der erhaltenen Ketone erhalten.



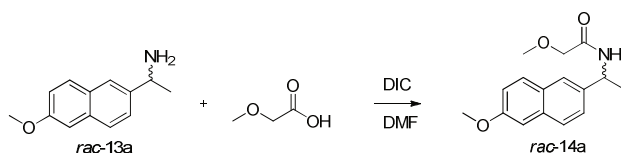
Schema 21: Allgemeine Syntheseroute für strukturanaloge Amin-Substrate 13a-f und kinetische Racemattrennung von 13a durch CAL-B

Für die reduktive Aminierung beschrieb Miriyala^[94] eine einfache und effiziente Methode einer Titan-katalysierten Iminierung des entsprechenden Ketons mit anschließender Reduktion durch Natriumborhydrid. Die so erhaltenen Amine wurden als Hydrochloride gefällt.

Für die Untersuchung der Stereoselektivität der Transaminasen sind Enantiomeren reine Verbindungen nötig, die aus dem Racemat gewonnen werden sollten um den Syntheseaufwand zu minimieren und einheitliche Qualität zu gewährleisten. Eine Racematspaltung der Amin-Substrate könnte ebenfalls – wie zuvor bei den Aldolen – mittels Lipasen durchgeführt werden, da die Kazlauskas-Regel ist auch für die Umsetzung von Aminen zu Amiden gültig ist^[95].

Die Racemattrennung sollte wieder über HPLC-Analyse verfolgt werden. Für die Methodenentwicklung war es daher nötig, zunächst authentisches Referenzmaterial zu synthetisieren. Neben dem racemischen Amin **13a** selbst wurde auch das entsprechende Methoxyacetamid **14a**, welches bei der Lipase-katalysierten Racemattrennung gebildet wird, benötigt, um die chromatographische Auftrennung optimieren zu können. Um die Peaks im Chromatogramm vollständig zuzuordnen zu können, und zu bestätigen, dass die Lipasen-katalysierte Racematspaltung tatsächlich der Regel von Kazlauskas^[72] folgt wurde neben dem racemischen Amin **13a** und seinem Methoxyacetamid **14a** muss auch ein enantiomerenreines Amin (*S*)-**13a** selektiv hergestellt.

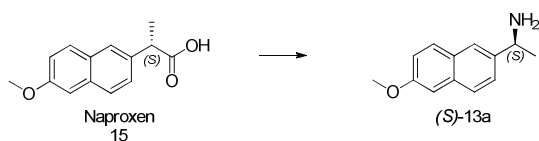
Amide lassen sich aus den entsprechenden Aminen und Carbonsäuren mit Dialkylacarbodiimiden (Dicyclohexylcarbodiimid DCC, Diisopropylcarbodiimid DIC) in nahezu quantitativer Umsetzung herstellen, so dass sich diese Methode auch für den Erzeugung der Amid-Referenz anbietet.



Schema 22: Synthese des racemischen Amids mit Methoxyessigsäure und Diisopropylcarbodiimid als Referenz für die HPLC.

Zur Synthese des enantiomerenreinen Amins als Referenzverbindung muss von einer Substanz mit bekannter Stereochemie ausgegangen werden. Das käuflich verfügbare Schmerzmittel Naproxen[®], ein nicht-steroidaler Entzündungshemmer (NSAID), stellt dafür eine gute Ausgangsverbindung da, weil ausschließlich als (*S*)-Enantiomer im Handel ist. Die als Wirkstoff enthaltene (*S*)-2-(6'-Methoxynaphthalen-2'-yl)propionsäure **15** kann über einen Curtius- oder

Hoffmann-Abbau unter Retention des Stereozentrums in das benötigte Amin überführt werden (Schema 23).



Schema 23: Mögliche Ausgangsverbindung für enantiomerenreines Amin (**(S)**-13a stellt der Wirkstoff Naproxen dar. Die Carbonsäure kann über Curtius- oder Hoffmann-Abbau zum kettenverkürzten Amin umgesetzt werden.

Zunächst wurde das Ethylamin **13a** synthetisiert. Das benötigte 6-Methoxy-2-acetylnaphthalin **12a** war bereits kommerziell verfügbar und musste synthetisiert werden. Bei der Optimierung der Synthese stellt sich heraus, dass es zweckmäßig war, das Keton in Titantertraisopropylat zu lösen und ca. 15 min zur Bildung des Komplexes reagieren zu lassen, bevor die ethanolische Ammoniaklösung zu gesetzt wird. Nach Ende der Reaktionszeit wurde direkt mit Natriumborhydrid reduziert, da es keine Möglichkeit zu Reaktionsverfolgung gibt. Das Imin ist zu empfindlich gegen Hydrolyse, und der Titankomplex nicht chromatographierbar. Nach der Reduktion liegt daher ein Gemisch aus Amin **13a** (Hauptkomponente) und Alkohol **11a** (aus nicht umgesetztem Keton) vor. Zur Aufarbeitung wurde mit wässriger Ammoniaklösung gequench und das Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt. Der noch feuchte, weiße pastöse Rückstand wurde mit Ethylacetat extrahiert und die Extraktionslösung über Na_2SO_4 getrocknet. Die Lösung und im Vakuum zur Trockne eingengt und der Rückstand in MTBE gelöst. Aus der etherischen Lösung wurde das Amin durch Einleiten von HCl-Gas als Hydrochlorid quantitativ gefällt (85% Ausbeute, bezogen auf das Keton). Der noch in Lösung befindliche Alkohol (aus der Reduktion nicht umgesetzten Ketons) konnte rückgewonnen und per Jones-Oxidation wieder in das Keton **12a** überführt werden. Scale-Up ermöglichte schließlich die Synthese von bis zu 20 g racemisches Amin **13a** pro Synthese.

Für die Entwicklung der HPLC-Methode zur Kontrolle der Racematspaltung wurde im Mikromaßstab das racemische Methoxyacetamid **14a** in einer Amidkopplung mit DIC in DMF hergestellt^[96]. Mit beiden Verbindungen als Racemat konnte nun mit der Entwicklung der Trennmethode begonnen werden. Für die analytische Trennung wurde wieder die chirale Säule ChiralPac IB von DaiCel verwendet und ausgehend von einem 10:1 Gemisch aus n-Hexan und Ethylacetat die mobile Phase optimiert. Letztlich erwies sich ein Gemisch aus n-Hexan/Isopropanol/TFA 100:11:0.5 bei einer Flussrate von 1,3 mL/min als optimal. Die Komponenten wurden über ihre Absorption 330 nm mit einem CCD Detektor verfolgt.

Die genaue anteilige Zusammensetzung des Lösemittelgemischs war für die Trennung entscheidend und ließ nur wenig Spielraum für Abweichungen. Während sich die Qualität der Trennung mit der Temperatur kaum änderte, bestand ein Einfluss auf die absoluten Retentionszeiten von z.T. über einer Minute.

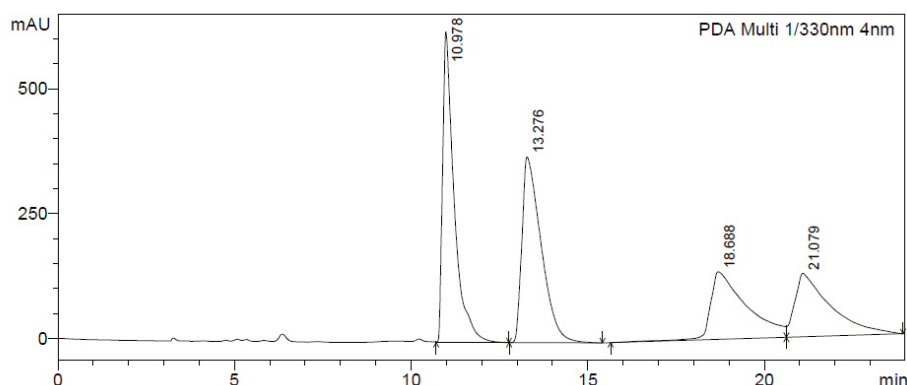
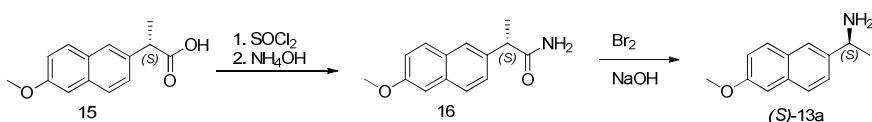


Abbildung 48: Chromatogramm einer Mischung aus Racemischen Ethylamin 13a t_R 18,6; 21,0 min und dessen Methoxiacetat 14a t_R 10,9; 13,27 min.

Um die Doppelpeaks den einzelnen Enantiomeren zuzuordnen zu können wurden die jeweiligen (*S*)-Enantiomere ausgehend von Naproxen hergestellt. Die freie Naproxen-Säure wurde zunächst aus handelsüblichen Tabletten mittels Soxhlett-Verfahren mit DCM extrahiert. Versuche, daraus das Amin über eine publizierte Route mittels Curtius-Umlagerung herzustellen^[97], lieferte nur sehr schlechte Ausbeuten, was wohl auf die Instabilität des Säureazides zurückzuführen ist. Daraufhin wurde Naproxen zunächst über das Säurechlorid in das Säureamid **16** überführt und dann über einen Hofmann-Abbau das reine (*S*)-Amin in ebenfalls nur moderaten Ausbeuten um 50% erhalten, für die HPLC wurden jedoch nur wenige Milligramm benötigt.



Schema 24: Synthese des (*S*)-Amins aus Naproxen

Das so gewonnene (*S*)-Amin **13a** wurde wieder mit Methoxyessigsäure und DIC in das (*S*)-Amid **14a** überführt und beide Substanzen als Gemisch in der HPLC-Analyse vermessen, um die Enantiomere zuzuordnen.

Für des Ethylamins **13a** wurde eine präparative kinetische Racematspaltung durchgeführt. In Anlehnung an Arbeiten von Balkenhohl^[98] wurde in MTBE mit Methoxyessigsäureisopropylester und immobilisierter Lipase Typ B aus *Candida antarctica* (CAL-B) selektiv das (*R*)-Amid gebildet. Die Verwendung eines Überschusses an Ester und Spuren von Wasser führten dazu, dass das (*S*)-Amin als Methoxyacetat größtenteils ausfällt während das gebildete (*R*)-Amid in der etherischen Lösung verbleibt. Dessen Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure liefert das (*R*)-Amin. In einem auf 38 °C temperierten Reaktor konnten innerhalb von 20 h bis zu 15 g racemisches Amin umgesetzt werden. Die Enantiomerenreinheit lag für beide Enantiomere über 99% ee bei fast quantitativer Ausbeute. Abb. 51 zeigt das zugehörige Chromatogramm der Reaktionskontrolle bei nahezu vollständigem Umsatz gezeigt. Das erste zeigt die racemischen Referenzen und deren Retentionszeiten die Reaktionsmischung am Ende der Racematspaltung.

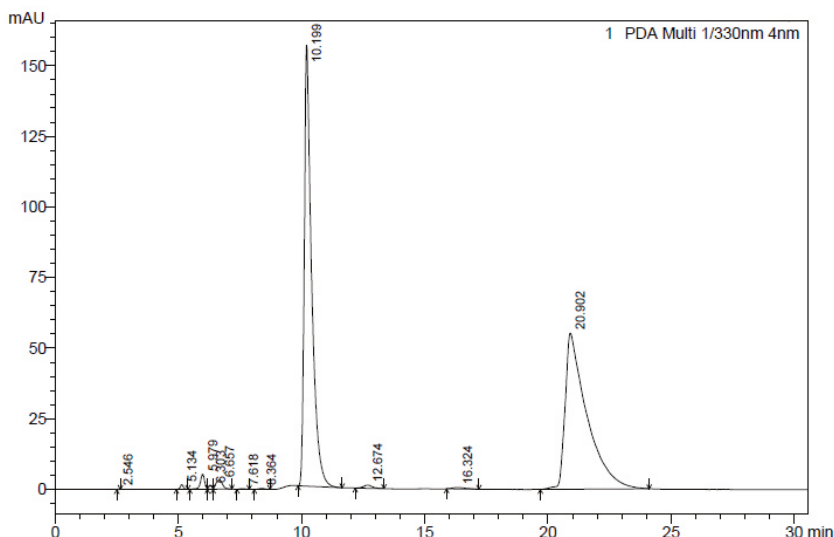


Abbildung 49: HPLC Chromatogramm der Reaktionskontrolle der Racemattrennung von **13a** bei nahezu vollständigem Umsatz. Deutliche Signale für die gewünschten Hauptprodukte (*S*)-Amin erkennbar ($t_R = 16,3$ min), sowie kaum (*S*)-Amid ($t_R = 12,6$ min). Es sind nur noch Spuren an (*R*)-Amin erkennbar ($t_R = 16,3$ min), sowie kaum (*S*)-Amid ($t_R = 12,6$ min)

Die höheren Homologen Amine **13b-f** wurden nach der in Schema 21 gezeigten Methode in drei Syntheseschritten als Racemat erzeugt.

Die Alkohole **11b-f** wurden über eine Grignard-Reaktion erzeugt, wobei für **11b-d** die organometallische Spezies aus dem entsprechenden Alkylbromid und elementarem Magnesium erzeugt wurde. Die Aromatischen Verbindungen **11e-f** erwiesen sich hier als schwierig, da die Bildung des Phenylmagnesiumhalogenids und besonders das Benzylmagnesium-halogenids Ne-

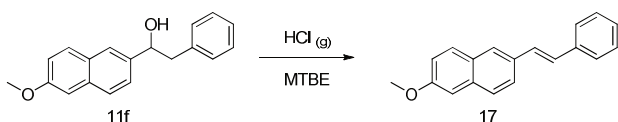
benreaktionen wie Wurtz-artige Kupplungen eingingen. Hier wurde kommerziell erhältliche Lösung des Reagenz eingesetzt. In späteren Synthese wurde für alle Synthesen der Alkohole grundsätzlich kommerziell erhältliches Grignard-Reagenz verwendet. Dadurch wurde die Synthese verkürzt und die Zahl der Nebenprodukte verringert und die Ausbeuten auf 60-75% erhöht wurden.

Die Jones Oxidation musste wegen der schlechten Löslichkeit der Alkohole **11b-f** mit einem starken Überschuss an Aceton durchgeführt werden. Während der Zugabe des Jones-Reagenz musste auch immer wieder Aceton nachdosiert werden. Die schlechte Löslichkeit des Alkohols wie auch des Acetons erleichterte dafür die Aufarbeitung erheblich. Durch Zugabe von Wasser ließen sich beide Komponenten fällen. Das Keton konnte anschließend per Flash-Chromatographie aufgereinigt werden, wobei auch sämtliche Reste an chromhaltigen Nebenprodukten entfernt wurden.

Sämtliche Ketone **12b-f** ließen sich in guten Ausbeuten >90% erzeugen. Leider zeigte sich an dieser Stelle, dass das Phenyl-Naphthylketon **12e** aufgrund inneren Quenchings nicht fluoreszierte und die Herstellung des entsprechenden Amins als Testsubstanz für den Assay nicht zielführend ist.

Die reduktive Aminierung der Ketone **12b-d** verlief vergleichbar mit der Synthese von **13a** auch bei der Aufarbeitung ergaben sich keine Probleme. Das Benzylnaphthylaminomethan **13f** ließ sich nur in sehr schlechten Ausbeuten um 10% erzeugen. Grund dafür ist die sehr schlechte Löslichkeit des Ketons **12f** in Titan-tetraisopropylat, was für die Bildung des reaktiven Komplexes ausschlaggebend ist. Versuche mit DCM, Ethanol oder Isopropylalkohol als Solvent brachten hier bisher keine Verbesserung.

Bei der Fällung des Amins mit HCl-Gas eliminiert der noch vorliegende Alkohol **11f** spontan zum Olefin **17**, so dass er nicht isoliert und wiederverwendet werden kann. Dies gestaltet die Synthese von **13f** in größeren Mengen zurzeit schwierig.



Schema 25: Durch das stark saure HCl-Gas eliminiert der Alkohol zum Olefin, was sich in einer intensiven Färbung der Lösung äußert.

Es gelang auf diesem Weg homologe Substrate für Transaminasen herzustellen bei denen der kleine Rest von Methyl bis Benzyl variiert wurde. Die erhaltenen Mengen lagen bei **13a-d** bei Massen um mehrere Gramm sowie einige hundert Milligramm für **13f**. Eine Racematspaltung

der höheren Homologen wurde jedoch nicht vorgenommen, da das zum Zeitpunkt nicht von Interesse für das Projekt war. Arbeiten von Tjosås^[71] legen nahe, dass für die Racemattrennung der höheren Homologen **13c-f** die Lipase Typ A aus *Candida antarctica* (CAL-A) besser geeignet ist.

3.2.4 Assay-Entwicklung und Ergebnisse

Als Substrat für die Transaminase werden die korrespondierenden Naphthylamine in enantiomerenreiner Form und Natriumpyruvat als Ketodonor vorgelegt. Die Transaminase setzt das jeweilige nicht fluoreszierende Amin zum fluoreszierenden Keton um und die Fluoreszenzentwicklung über die Zeit kann direkt beobachtet werden.

Da für die späteren Messungen in Mikrotiterplatten nur ein Fluoreszenzphotometer mit Filtervorwahl zu Verfügung stand, wurde zunächst ein Absorptions- und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen, anhand dessen die bestmöglich geeigneten Filter unter den verfügbaren ausgewählt wurden. Abbildung 45 zeigt das Spektrum und die von den Filtern abgedeckten Wellenlängen. Der Nennwert befindet sich in der Mitte der Rechtecke, deren Breite entspricht der Bandbreite des Filters. Mit 330 nm liegt die Anregung nicht direkt im Maximum, das sich bei 310 nm befindet, dennoch wird ausreichend Licht zu Fluoreszenzerzeugung absorbiert. Eine derzeit nicht mögliche Anregung mit 310 nm würde die Empfindlichkeit zweifellos erhöhen. Der Filter für die Emission liegt nahe genug am Maximum, um eine sehr gute Signalerfassung zu gewährleisten.

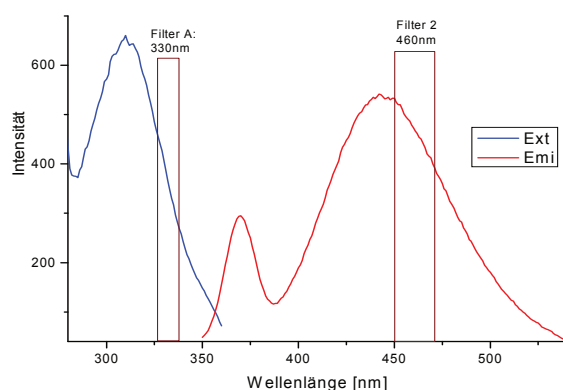


Abbildung 50: Fluoreszenzspektrum des Methylketons und gewählte Filter am Spektrometer.

Nachdem die Methode im Grundsatz geeignet war, musste sie auf Robustheit hin überprüft werden. Neben der Frage der Linearität und der Signifikanz war es dafür wichtig zu untersuchen, in wie fern das Fluoreszenzsignal durch Quenching beeinflusst wird. Während Quenching durch das Keton selbst durch dessen geringe Konzentration ausgeschlossen werden kann, ist konzentrationsabhängiges Quenchen seitens des Amins durchaus möglich. Zur Untersuchung des Problems wurden zwei verschiedene Konzentrationsreihen des Amins mit einer geringen Mengen an Keton versetzt.

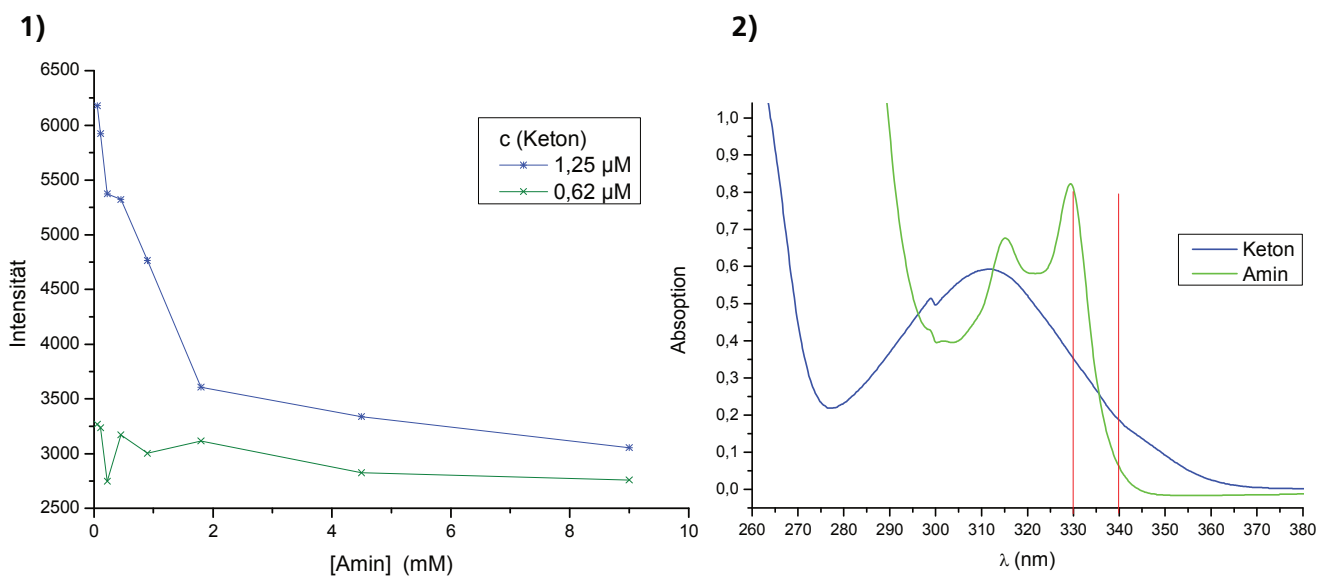


Abbildung 51: 1) Unterdrückung der Fluoreszenzsignale bei zwei verschiedenen Ketonkonzentrationen in Abhängigkeit der Konzentration des Amin-Hydrochlorids. 2) Absorptionsspektren des Ketons und korrespondierenden Amins im Vergleich. Die durch die Filter vorgegebenen möglichen Anregungswellenlängen sind rot dargestellt.

Die Messung zeigt ein deutliches Quenching bei hohen Keton- und Aminkonzentrationen, während bei geringen Konzentrationen an Keton, wie sie zu Beginn der Assaymessung vorliegen, der Effekt zu vernachlässigen ist. Bei langer Messzeit oder sehr hohen Umsatzraten kann das Quenching allerdings eine niedrigere bzw. abfallende Reaktionsgeschwindigkeit vortäuschen. Ein bei Chinolinen verbreitetes Kollisionsquenching durch Chloridionen aus dem Puffer konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden. Ob es sich nun um Statisches Quenching unter Ausbildung eines π - π Komplexes zwischen aromatischem Amin und Keton oder simple Abschattung handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Auffallend ist jedoch, dass das Amin eine Absorptionsbande um 330 nm also im Bereich der Anregung aufweist, was stark für eine Abschattung durch Absorption des zur Anregung benötigten Lichtes spricht. Eine Anregung

mit 340 nm brachte aufgrund des schlechteren Absorptionsverhaltens des Ketons und der damit verbundenen geringeren Empfindlichkeit keine Verbesserung. Eine Lösung wäre die Anregung bei 295 nm, wo das Absorptionsspektrum des Amins ein Minimum zeigt, was z.Zt. jedoch technisch nicht möglich ist. Für niedrige Konzentrationen an Keton bis $6 \mu\text{M}$ konnte eine lineare Abhängigkeit der Intensität der Fluoreszenz von der Konzentration gemessen werden. Bei Konzentrationen unter $0.5 \mu\text{M}$ konnte das Quenching vernachlässigt werden, was für die meisten Messungen auf Grund der langsamen Umsetzung ausreichend war. Eine kontinuierliche Quantifizierung der Enzymaktivität ist mit dem Assay möglich. Statistische Auswertungen ergaben ein Detektionslimit (LOD) von $0,35 \text{ nmol/min}$ und eine Quantifizierungsgrenze (LOQ) von $1,2 \text{ nmol/min}$. Berechnet wurden die Werte über $\text{LOD} = 3,3 \cdot \sigma$ und $\text{LOQ} = 10 \cdot \sigma$ [99].

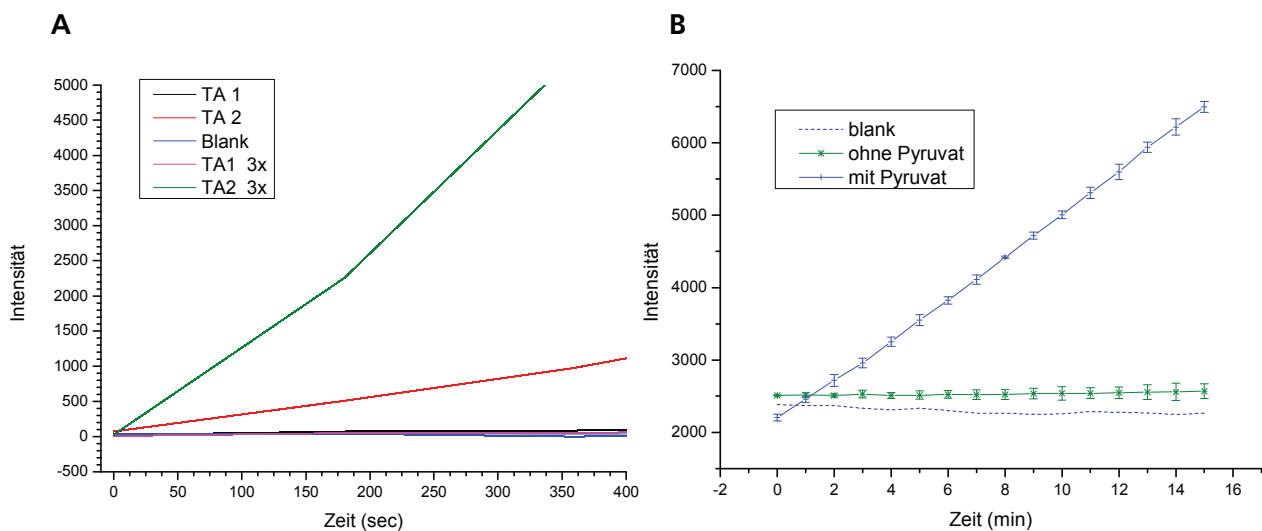


Abbildung 52: A) Abhängigkeit der Fluoreszenzentwicklung von der Enzymkonzentration für eine das Substrat akzeptierende Transaminase (TA2; *N. fischeri*) und ein ungeeignete Transaminase als Negativkontrolle (TA1; Sigma Nr.77856). B) Reaktionsverfolgung durch Fluoreszenzentwicklung in Gegenwart von Pyruvat als Co-Substrat (blau) und ohne Pyruvat (grün) gegen den Blindwert.

Erste Versuche zur Verifizierung des Assays wurden mit der kommerziell verfügbaren Transaminase aus *N. fischeri* (Sigma-Aldrich, 93006) durchgeführt. Die Reaktion wurde in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 8.5 mit $4,5 \text{ mM}$ Pyruvat als Co-Substrat geführt. Die Zeit – Fluor-

reszenzkurven zeigten lineares Verhalten. Eine Erhöhung der Enzym-Konzentration zeigte eine gleichsamer Erhöhung der Aktivität, und bewies damit die Enzym-Abhängigkeit der Reaktion. In Abwesenheit von Pyruvat trat keine Reaktion ein, zumindest solange kein Überschuss an PLP vorlag (Abb. 52). Es ist anzunehmen, dass in diesem Fall PLP selbst als Co-Substrat wirkt und das schlechter bindende PMP das Enzym verlässt.

Die anfänglich in Küvetten durchgeführten Messungen zeigten auch in der Multititerplatte hohe Reproduzierbarkeit. Im Hinblick auf die Möglichkeiten, mehrere Enzyme parallel zu messen und eine Kalibrationskurve direkt bei jeder Messung mit aufzunehmen, wurden die Verdünnungen und Volumina für 96-Well Platten optimiert. Eine Verdünnungsreihe des Amins in PBS mit ca. 0,5% DMSO als Co-Solvent von 7,0 mM bis 0,03 mM ermöglichte bei ersten Messungen die schnelle Bestimmung kinetischer Parameter.

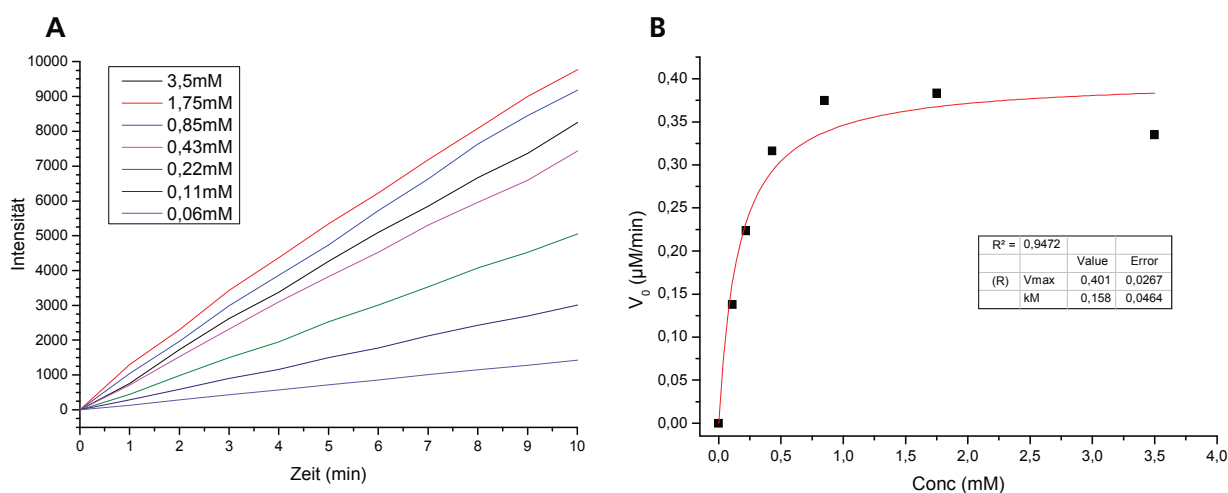


Abbildung 53: Rohdaten (A) und Direkt-Lineare Auftragung (B). Die gemessene v_0 fällt für $[S] > 1,5 \text{ mM}$ wieder, was auf Substrat-Inhibition hindeutet.

Diese Methode erlaubt bereits erste Bestimmungen von kinetischen Konstanten und die Ermittlung der Selektivität der verwendeten Enzyme über das Prinzip des „quickE“. Der quickE berechnet sich aus dem Quotienten der Umsatzraten für beide Enantiomere. Auch wenn diese Werte nur die Relation von (R)- und (S)-Präferenz zueinander angeben, erlauben sie doch eine grobe Abschätzung der Selektivität. (Vgl. Tabelle 3).

Auffallend war bei den Messungen, dass die Fluoreszenzentwicklung, und damit wohl die Reaktionsgeschwindigkeit, bei Aminkonzentrationen über 1,5 mM wieder abnimmt. Im Michaelis-Menten-Modell wird die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzent-

ration durch die in Gleichung 1 wiedergegebene Hyperbelfunktion beschrieben. Die Messkurve sollte sich also v_{max} asymptotisch annähern und in ein Plateau übergehen.

Tabelle 4.2.2-1: Bestimmung der Enantioselektivität über „quickE“

| Enzyme | pH | | (R)-Amine | (S)-Amine | quickE |
|-------------------|-----|-----------|---------------------------------|--------------------------------|----------|
| TA N. fischeri | 8,2 | k_M | 0,405 mM | 0,928 mM | 9,3 (R) |
| | | V_{max} | 0,41 $\mu\text{M}/\text{min}$ | 0,044 $\mu\text{M}/\text{min}$ | |
| TA DSM465 | 8,2 | k_M | 0,672 mM | 0,47 mM | 21,7 (S) |
| | | V_{max} | 0,0045 $\mu\text{M}/\text{min}$ | 0,098 $\mu\text{M}/\text{min}$ | |

Die gute Übereinstimmung von Messwerten und Modell für kleine [S] und die starke Abweichung für [S] größer 2 mM (Abbildung 14, rote Kurve) legen nahe, dass die Reaktion vom Michaelis-Menten-Modell abweicht und weitere Effekt eine Rolle spielen. Transaminasen sind bekannt dafür, komplexe Substrat- und Produktinhibition zu zeigen. PLP wird durch das Keton, Pyruvat und das nicht bevorzugte Amin beeinflusst, PMP durch beide Enantiomere des Amins und durch aus Pyruvat gebildete Alanin.

Formel 13:
$$Y = \frac{v_{max} \cdot [S]}{k_M + [S]}$$

Formel 14:
$$Y = \frac{v_{max} \cdot [S]}{k_M + [S] \left(1 + \frac{[S]}{k_i}\right)}$$

Bisher ist nur eine ω -Transaminase aus *Ochrobactrum anthropi* bekannt, die dieses Inhibitionsverhalten nicht aufweist^[100]. Die Einführung der Inhibitor-Konstante k_i in die Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 12) soll dies berücksichtigen und den Fit verbessern. Formel 13 gibt die zugehörige Funktion wieder, die der gesamten Inhibition im System nach dem Modell der unkompetitiven Substrathemmung Rechnung trägt, ohne auf die Beiträge der einzelnen Komponenten zur Inhibition des Systems einzugehen. Das Model mit Inhibition führte zu einer modifizierten Hyperbel mit deutlich besserem Fitting (Abbildung 49, blaue Kurve).

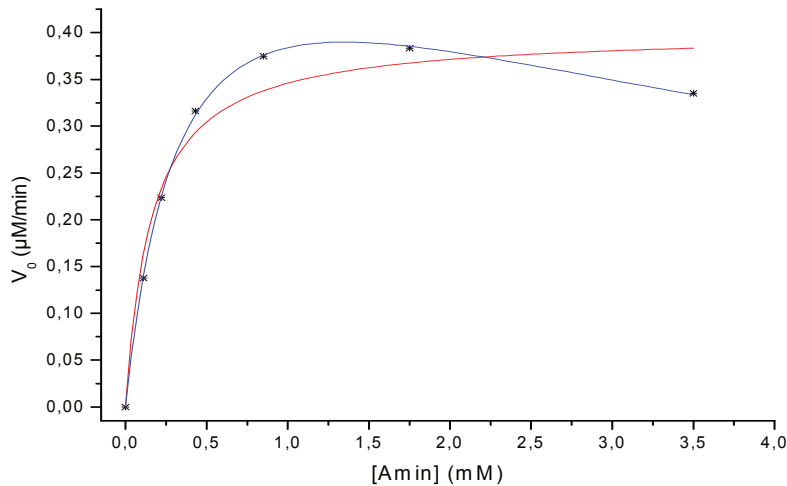


Abbildung 54 : Direkt-lineare Auftragung der Messwerte für TA aus *N. fischeri* mit zwei verschiedenen Anpassungen. Rot stellt ein hyperbolisches Fitting nach Michaelis-Menten dar, blau die Kurve unter Berücksichtigung inhibitorischer Effekte (Gleichung 2).

Messungen von Shik und Park zeigten im α -MBA-Assay k_i -Werte in der Größenordnung von $1 - 10 K_M^{[100]}$, Daten die sich auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit decken. Möglich wäre auch, dass es sich nicht nur um Inhibition handelt, sondern dass auch Quenchingeffekte diese vortäuschen. Beides führt zu einer Abnahme der Fluoreszenzentwicklung über die Zeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates, auch wenn die Ursachen völlig verschieden sind. Allerdings wäre die Anwendung von Gleichung 2 auf den Quenchingeffekt als zusätzliche „Inhibition“ auf Grund der gleichen Auswirkung mathematisch korrekt und weiterhin gerechtfertigt.

Der Assay wurde im Rahmen einer Kooperation mit zwei weiteren Laboratorien an der KTH Stockholm und der East China University unabhängig getestet und erlaubte reproduzierbare Messungen der Aktivität und Selektivität. Die Enantio-Selektivität der Enzyme wurde über den „E-Wert“ bestimmt. Dieser wurde hier nach Gleichung 14 aus dem Quotienten der Spezifitäten k_{cat}/k_M beider Enantiomere bestimmt, wobei der Quotient so zu bilden ist, dass der Wert >1 sein muss.

Formel 15:
$$E_{(S)} = \frac{(k_{cat}/k_M)_{(S)}}{(k_{cat}/k_M)_{(R)}}$$

Für die Selektivitäten wurden Werte zwischen 19 und 200 ermittelt. Dabei stach die bereits zuvor erwähnte Transaminase aus *Vibrio fluvialis* durch besonders hohe Selektivität und Umsatzrate hervor.

Im Konzentrationsbereich von 0,006 bis 1,7 mM wurden für insgesamt 10 ω -Transaminasen unterschiedlicher Herkunft kinetische Parameter bestimmt. Die ermittelten v_{max} -Werte lagen zwischen 0,00003 und 22 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Der fluorogene Assay erlaubt eine Bestimmung von Werten über 6 Größenordnungen. Für die ermittelten K_M lagen die Werte im Bereich von 0,002 bis 1,6 mM. Tabelle 4.2.2-2 fasst die mit dem Assay ermittelten Daten für verschiedene ω -Transaminasen zusammen.

Tabelle 4.2.2-2: Zusammenstellung der Messergebnisse

| Herkunft | Enantiomer | k_M (mM) | k_i (mM) | v_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$) | v_{max}/k_M | E-Wert |
|---|------------|---------------|---------------|---|---------------|----------|
| <i>Neosartorya fischeri</i> ¹ | (S) | 1,20 | 4,90 | 0,00015 | 0,000125 | 30 (R) |
| | (R) | 0,59 | 3,20 | 0,0023 | 0,003898 | |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> ¹ | (S) | 0,45 | 1,40 | 0,76 | 1,688889 | 19 (R) |
| | (R) | 1,10 | 5,10 | 0,099 | 0,090000 | |
| <i>Vibrio fluvialis</i> ² | (S) | 0,77 | 2,00 | 22 | 28,571429 | >200 (S) |
| | (R) | 0,65 | 2,00 | 0,035 | 0,053846 | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> ² | (S) | 0,77 | 1,30 | 0,002 | 0,002597 | 42 (R) |
| | (R) | 0,27 | 0,73 | 0,031 | 0,114815 | |
| <i>Aspergillus terreus</i> ² | (S) | 1,10 | 2,00 | 0,00011 | 0,000100 | 80 (R) |
| | (R) | 0,05 | 1,10 | 0,0004 | 0,008000 | |
| ATA 117 ^{2,3} | (S) | 2,00 | 0,31 | 0,044 | 0,022000 | 50 (R) |
| | (R) | 0,23 | 0,52 | 0,25 | 1,086957 | |
| ATA 113 ^{2,3} | (S) | 0,0025 | 1,10 | 0,012 | 4,800000 | 110 (S) |
| | (R) | 0,55 | 0,68 | 0,023 | 0,041818 | |
| <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ¹ | (S) | 0,80 | 6,10 | 0,00039 | 0,000488 | 38 (S) |
| | (R) | 1,60 | 5,60 | 0,00002 | 0,000013 | |
| <i>Geobacillus thermoleovorans</i> ¹ | (S) | 0,58 | 6,10 | 0,000031 | 0,000053 | n.d. |
| | (R) | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |

¹⁾ Daten aus eigener Messung, ²⁾ Daten von Henrik Land, KTH Stockholm, abweichend gemessen in HEPES-Puffer ³⁾ Organismus unbekannt, bezogen über Codexis Inc.

3.3 Fazit und Ausblick Transaminase-Assay

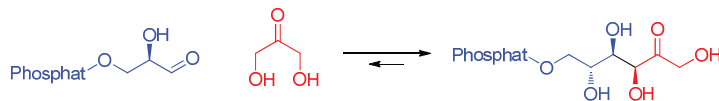
Die entwickelte modulare Synthese der fluorogenen Substrate hat den Vorteil, ausgehend von dem gleichbleibenden Fluorophor das Molekül beliebig zu erweitern und schrittweise zu vergrößern zu können. Durch die Verwendung des 6-Methoxynaphthaldehyds ist das Substitutionsmuster am Naphthyl-Fluorophor vorgegeben und eine aufwendige Trennung von Isomeren wie bei der Friedel-Crafts-Synthese ist nicht nötig. Einfache Variationen der Kopplungskomponente ermöglichen eine sukzessive Erweiterung des Restes, der für die kleine Tasche des Enzyms bestimmt ist. Somit können leicht homologe Substrate als Sonden für die Substrattoleranz hergestellt werden. Auch wird das als Referenzsubstanz und zur Kalibrierung ohnehin nötige Keton ebenfalls mit jeder Sequenz erhalten. Es konnte eine homologe Reihe von Aminen mit R= Methyl bis R= Benzyl synthetisiert und an Transaminasen vermessen werden, wobei Benzonaphthon nicht als Substrat geeignet, da es keine Fluoreszenz zeigte. Der große Vorteil dieser Synthesereihe ist, dass durch die abschließende Racemattrennung für jedes Substrat beide enantiomerenreinen Komponenten erhalten werden, was direkte Messungen der Enantioselektivität des Enzymes und „Quick-E“-Bestimmungen erlaubt. Bei der Suche nach neuen Enzymvarianten für die Synthese können im Assay ebenfalls direkt Mutanten der gewünschten Substrattoleranz und Stereochemie ermittelt werden.

Die Ergebnisse der enzymatischen Messungen zeigen das z.T. hohe Potential der erarbeiteten Methoden. Für die Messung an Transaminasen sind in Zukunft Mutagenese-Experimente empfehlenswert, die auf sukzessive Vergrößerung der kleinen Tasche zielen. Das Vorhandensein von Messsonden, die z.B. den Bereich von Methyl bis Benzyl abdecken, erlaubt hier eine schnelle Erfassung geeigneter Enzyme ohne großen Aufwand. Auch Versuche, durch Punktmutationen die Stereoselektivität von bereits vielversprechenden Transaminasen zu verbessern oder zu beeinflussen, sind ein interessanter Ansatz. Auf diese Weise können wohlmöglich in Zukunft herausragende neue Bio-Katalysatoren gefunden werden, die die Effizienz von Synthesereaktionen steigern. Gerade für den Bereich der Life-science und in der Herstellung von APIs ergeben sich dadurch neue Möglichkeiten. Da auch erste Vorversuche erfolgreich waren, den Assay an Monoaminoxidasen anzuwenden, sollte auch hier weiter geforscht werden. Sowohl screenings nach Oxidasen mit breiterem Substratspektrum für die Synthese chiraler Amine, als auch Inhibitionsstudien zur Identifizierung neuer Hemmstoffe als Pharmaka (MAO-Hemmer) sind denkbar.

4 Zusammenfassung

4.1 Fructose-6-phosphat-Aldolase

Die Fructose-6-phosphat Aldolase ist ein Enzym aus der Klasse der Lyasen (EC-Klasse 4.1.2.x), Die natürliche Reaktion ist die Bildung von Fructose-6-phosphat aus Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-phosphat, sowie die Rückreaktion.



Schema 26: Natürliche Reaktion der Fructose-6-Phosphat-Aldolase

Von der FSA ist bereits bekannt, dass sie neben den natürlichen Substraten Dihydroxyaceton und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Fructose-6-phosphat auch den nicht-phosphorylierten Glycerinaldehyd als Akzeptor nutzen und Fructose direkt bilden kann. Die Geschwindigkeiten sind dabei allerdings erheblich geringer (0.01 U/mg vs. 45U/mg,)^[55].

Auch die Verwendung von Hydroxyaceton als Donor zur Bildung von 1-Desoxy-Fructose bekannt^[55]. Als Biokatalysator ist die FSA vor allem auch deshalb interessant, weil sie verhältnismäßig große Mengen an organischen Lösungsmitteln in der Reaktionslösung toleriert.^[56] Der Einsatz von Aceton als Donor und die Bildung von Didesoxyzuckern durch die FSA ist vor diesem Hintergrund eine spannende Fragestellung. Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von Assays für die Fructose-6-phosphat-Aldolase für nicht-natürliche Reaktionen.

Als Messmethode sollte dabei ein Fluoreszenzassay dienen, da Fluoreszenzmessungen andere optische Verfahren durch eine deutlich höhere Empfindlichkeit übertreffen. Analog zu den Arbeiten der Arbeitsgruppe Barbas mit dem Antikörper 38C2 wurde auch hier „Methodol“ als Aldol-Sensor gewählt, und sich für die Retro-Aldolspaltung als fluorogene Messmethode entschieden.

4.1.1 Methodol

Methodol ist ein Aldol-Addukt aus 6-Methoxynaphth-2-aldehyd und Aceton. Nach einer retro-Aldolreaktion wird 6-Methoxynaphth-2-aldehyd freigesetzt, welches stark fluoresziert (Abb. 56).

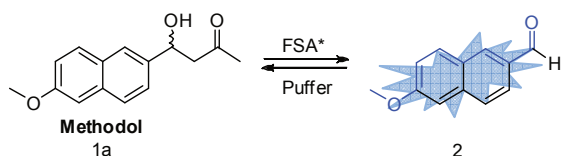


Abbildung 55: Fluoreszenzentwicklung durch Aldol-Spaltung.

Die Synthese nach List^[45] ließ sich auch auf andere Methylketone übertragen. Somit bestand die Möglichkeit, über eine modulare Synthese eine Substratbibliothek zu erzeugen, und die Substrattoleranz der FSA für verschiedene strukturanaloge Aldole zu ermitteln.

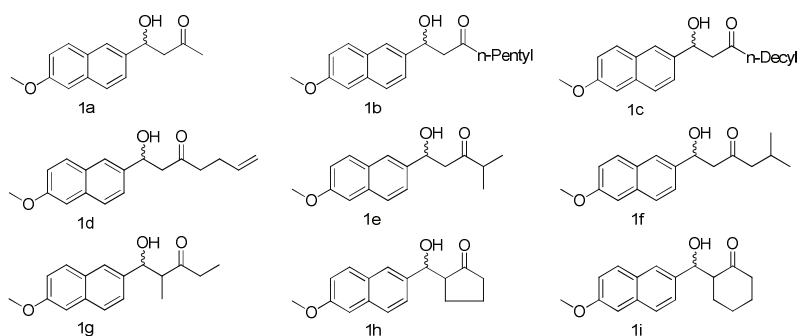
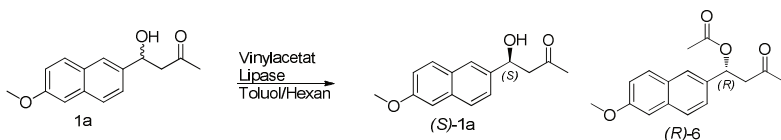


Abbildung 56: Verschiedene auf die von List beschriebene Weise synthetisierte Derivate des Methodols

Neben dem Racemat des Methodol waren auch die enantiomerenreinen Verbindungen von Interesse, dafür wurde eine Lipase-katalysierte Racematspaltung gewählt, um stereochemisch angereichertes Material zu erhalten. Neben der von Nair verwendeten CRL und der CAL-A bei Tjosås wurden noch zahlreiche andere Lipasen getestet. Gemäß der Regel von Kazlauskas^[72] sollte dabei das von der FSA bevorzugte (*S*)-Enantiomer nicht umgesetzt werden und das unpassende (*R*)-Methodol durch die Lipase acetyliert werden.



Schema 27: Erwartete Deracemisierung von Methodol entsprechend der Regel von Kazlauskas

Um die Reaktionen zu verfolgen wurde eine chirale HPLC-Methode entwickelt und um den einzelnen Peaks Substanzen zuordnen zu können, wurden Einzelkomponenten für die Methodenentwicklung synthetisiert.

Zunächst wurde die Methode lediglich mit racemischem Methodol optimiert um hier eine ausreichende Trennung der Peaks zu erhalten. Die Zuordnung der absoluten Stereokonfiguration der Komponenten bei der Deracemisierung erfolgte entsprechend der Regel von Kazlauskas^[71]. Um für die Racematspaltung geeignete Lipasen zu finden wurden zunächst Experimente im Halb-Mikro-Maßstab durchgeführt. Die Ergebnisse aller untersuchten Lipasen sind in Tabelle zusammen gefasst. Aus diesen Daten ging letztlich die CAL-A als vielversprechender Kandidat für eine präparative Racematspaltung hervor.

Tabelle 4.1.1-1: Übersicht über Die E-Werte der untersuchten Lipasen nach 24h

| Enzym | Edukt | | Produkt | | ee(E) | ee(P) | <i>E</i> | Umsatz Nach 24 h |
|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|----------|---------------------|
| | (<i>R</i>) | (<i>S</i>) | (<i>R</i>) | (<i>S</i>) | | | | |
| Steapsin microb. ¹ | 18,97 | 41,72 | 23,46 | 0,12 | 0,37 | 0,99 | > 200 | 12 % |
| CRL nach 16h | 3,12 | 28,57 | 32,89 | 2,17 | 0,80 | 0,88 | 37 | 39 % |
| CRL nach 96h | 1,77 | 39,76 | 45,60 | 2,76 | 0,91 | 0,89 | 53 | " |
| „Amano 5“ ² | 1,94 | 23,99 | 26,90 | 0,23 | 0,85 | 0,98 | > 200 | 38 % |
| CAL-A | 8,51 | 46,27 | 32,58 | 0,81 | 0,69 | 0,95 | 83 | 48 % |
| „Amano 4“ ³ (GC) | 16,40 | 49,61 | 33,99 | 0,18 | 0,50 | 0,99 | > 200 | ## |
| PPL Typ II ⁴ | 20,80 | 21,72 | 2,15 | 1,10 | 0,02 | 0,32 | 2 | < 1 % |
| Lipase SL ⁵ | 22,72 | 39,77 | 18,15 | 0,21 | 0,27 | 0,98 | 118 | 12 % |
| Lipase M ⁶ | 17,24 | 27,13 | 15,02 | 0,25 | 0,22 | 0,98 | 105 | |

¹Steapsin ex microbes ist eine Mischung von Lipasen verschiedenen mikrobiellen Ursprungs. ²vermutlich Lipase CE aus *Humicola langinosa*. ³Lipase aus *Geotrichum candidum*. ⁴Es trat praktisch keine Reaktion ein. ⁵Lipase aus *Burkholderia cepacia* ⁶Lipase aus *Mucor javanicus*.

Lipase aus *Candida antartctica* (CAL-A) zeichnete sich im Vergleich durch geringste Reaktionszeit aus. Für den Einsatz im Assay war vor allem das (*S*)-Methodol wichtig, das (*R*)-Acetats wurde nicht direkt benötigt. Für die präparative Racemattrennung bedeutet das, nur möglichst hoch angereichertes (*S*)-Methodol zurückbleiben musste.

Zunächst wurde der Assay mit racemischem Methodol entwickelt. Die FSA spaltete das Methodol, was zu einer über die Zeit zunehmenden Fluoreszenz führte. Als Positivkontrolle wurde der katalytische Antikörper 38C2 genutzt. Im vorliegenden Assay bleiben alle Varianten der FSA weit unter der Aktivität der Referenz.

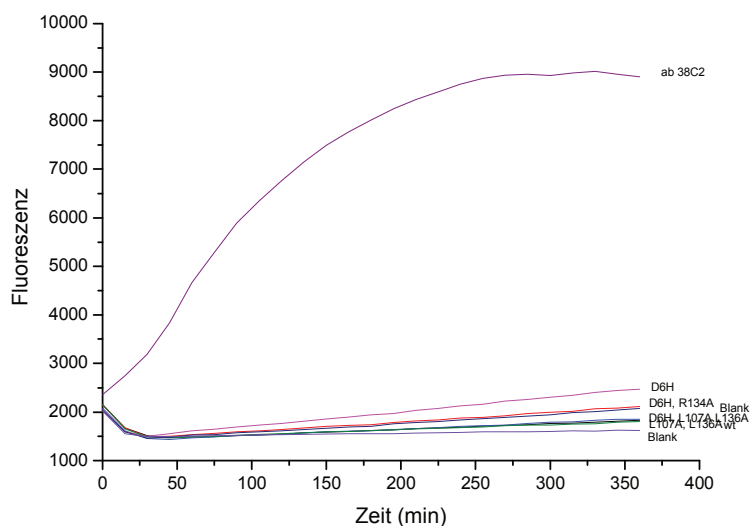


Abbildung 57: Fluoreszenzentwicklung bei der Spaltung von Methodol durch einige Mutanten und den Antikörper 38C2 im Vergleich.

Um die Fluoreszenz dem Umsatz zuzuordnen, wurde eine Kalibrationsgerade im mikro-molaren Bereich aufgenommen und fortan alle Messungen mit gleichen Geräteeinstellungen durchgeführt. Somit war es nun möglich die Enzymreaktionen zu quantifizieren und für einige Varianten die Michaelis-Menten-Parameter zu ermitteln. Ein Problem dabei bleibt der wegen der extrem langsamen Reaktion hohe Proteinbedarf.

Mit diesem Assay wurden nun für 4 Varianten der FSA kinetische Parameter bestimmt und untereinander verglichen. In Tabelle 4.1.6-1 sind die ermittelten Michaelis-Menten-Parameter und daraus abgeleitete Größen zusammengefasst. K_M verbesserte sich gegen über dem Wildtyp leicht in vergleichbarem Maße jeweils um den Faktor zwei, die Umsatzgeschwindigkeit stieg für die Variante D6H deutlich. Die Effizienz k_{cat}/K_M verbesserter sich bei der Variant D6H gegenüber dem Wildtyp circa um den Faktor vier.

Tabelle 4.1.6-1: Eine Zusammenfassung der ermittelten Werte

| Mutante | k_M (mM) | v_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) | K_{cat} (s^{-1}) | K_{cat} / k_M $\cdot 10^{-5}$ |
|-------------|-----------------|---|----------------------------------|------------------------------------|
| wt | $1,02 \pm 0,04$ | $0,045 \pm 0,001$ | 0,00021 | 20,05 |
| R134A | $0,45 \pm 0,06$ | $0,041 \pm 0,005$ | 0,00019 | 40,19 |
| L107A, 163A | $0,43 \pm 0,06$ | $0,048 \pm 0,002$ | 0,00022 | 50,01 |
| D6E | $0,53 \pm 0,10$ | $0,100 \pm 0,005$ | 0,00047 | 88,77 |

Die Fluoreszenzentwicklung wurde über die Zeit von 5 Stunden ausgewertet und die – um den Hintergrund korrigierten – Raten direkt verglichen. In dieser Weise ließen sich wie oben in Abbildung 18 gezeigt, einzelne Reaktionsgeschwindigkeiten ermitteln und direkt vergleichen. Eine Zusammenstellung ausgewählter Enzymvarianten zeigt dabei Werte zwischen der halben und der dreifachen Umsatzgeschwindigkeit bezogen auf den Wildtyp, wie unten wiedergegeben.

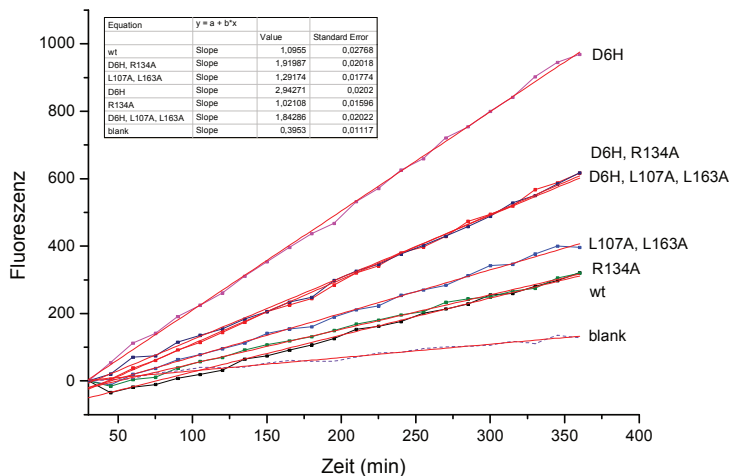


Abbildung 58: Vergleich der Fluoreszenz-Entwicklung durch die Spaltung von Methodol bei einigen ausgewählten Mutanten der FSA

Einige Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp eine verbesserte Umsetzung des Substrates. Besonders auffällig sind dabei die Varianten D6H und D6E, die gleichzeitig ihre Fähigkeit das natürliche Substrat umzusetzen verloren haben. Die Ausweitung der katalytischen Tasche

brachte hingegen nur eine leichte Verbesserung, da Methodol nur kurzketzig ist. Kombinationen der Mutationen erbrachten keine synergistischen Effekte (Abb. 61).

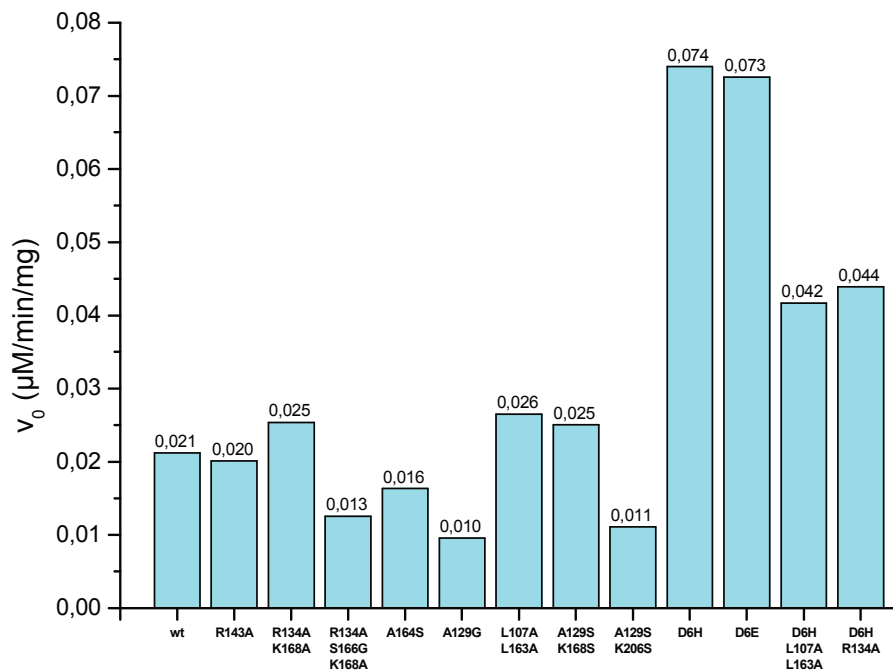
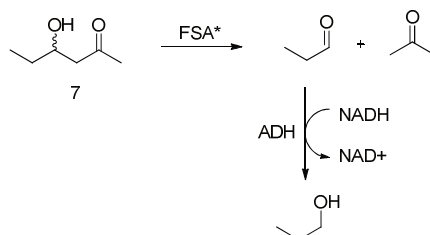


Abbildung 59: Vergleich der anfänglichen Umsatzraten für Methodol durch verschiedene Mutanten der FSA, normiert auf die eingesetzte Enzymmenge bei 15 mM Substratlösung und 40°C ohne Ko-Solvent.

4.1.2 ADH/NADH Assay

Da die Umsetzung mit Methodols sehr schwierig war, und aromatische Aldehyde auch eine nicht-native Substratstruktur repräsentieren, wurde ein Assay für kleine, nicht fluoreszierende Substrate entwickelt. Die Messung beruhte auf einer zwei-Stufen-Reaktion. Zuerst wurde das Aldol durch die FSA gespalten, und der freigesetzte Aldehyd dann durch eine Alkoholdehydrogenase (ADH) zu 1-Propanol reduziert. Bei der Reduktion wird NADH verbraucht, was sich bei 340 nm photometrisch verfolgen lässt.



Schema 28: Prinzip des zweistufigen Assays. Der Verbrauch an NADH wird Photometrisch erfolgt.

Zur Synthese des Aldols wurde Propionaldehyd bei Raumtemperatur im Argonstrom verdunstet und das dampfgesättigte Gas bei 0 °C in Aceton eingeleitet, welches mit katalytischen Mengen methanolischer Kalilauge versetzt war. Die Konzentration der wässrigen Lösung des Aldols wurde aus Einwaage und Gehalt nach NMR berechnet und direkt eingesetzt. Eventuellen Inhibitionen durch das Substrat oder das nicht bevorzugte Isomer wurden durch Erweiterung der Michaelis-Menten Gleichung berücksichtigt. In den Spaltungsassays zeigte der Wildtyp kaum Aktivität, während die auch in anderen Aldol-Spaltungen bisher effektivere Mutante D6H hingegen das Substrat reproduzierbar umsetzte, die Werte sind in Tabelle 5.1-01 wiedergegeben.

Tabelle 5.1-01: Kinetische Parameter die Spaltung von 4-Hydroxyhexan-2-ons durch die FSA-Variante D6E mit und ohne Berücksichtigung von Inhibition.

| | Michaelis-Menten-Model | Inhibitions-Model |
|-------------------------------|------------------------|-------------------|
| v_{max} ($\mu\text{M/s}$) | $2,36 \pm 0,13$ | $4,66 \pm 0,75$ |
| v_{max}° (U/mg) | $0,094 \pm 0,005$ | $0,186 \pm 0,029$ |
| K_M (mM) | $52,17 \pm 7,02$ | $151,97 \pm 27,2$ |
| k_{cat} (s^{-1}) | $0,036 \pm 0,002$ | $0,07 \pm 0,011$ |
| k_i (mM) | -- | $230,35 \pm 64,3$ |

Dies ist beides weit entfernt von den Geschwindigkeiten des Wildtyp bei der natürlichen Reaktion ($v_{max} = 7 \mu\text{mol/min/mg}$ für die Spaltung von D-Fructose-6-phosphat) und liegt im Bereich nicht-natürlicher Reaktionen wie der Spaltung von D-Arabinose-5-phosphat durch den Wildtyp ($v_{max} = 0,160 \mu\text{mol/min/mg}$),^[48]

Statistische Versuche in Mikrotiterplatten mit 300 μg Enzym pro well zeigten sehr deutliche Unterschiede für zwischen Wildtyp und der Mutante D6H und generell nur geringe Streuung innerhalb der Positivkontrolle.

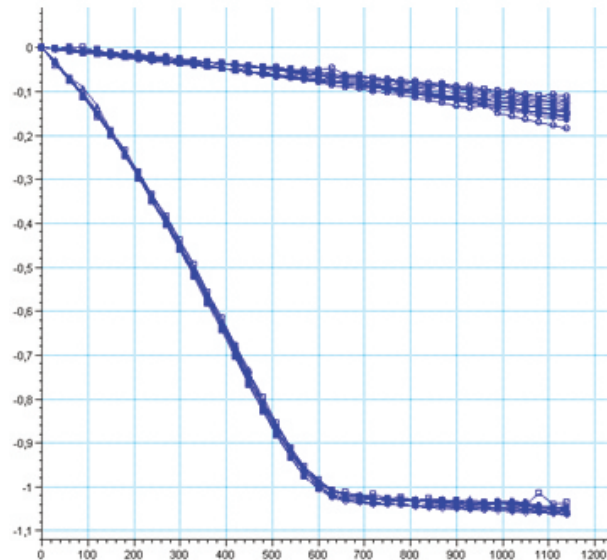


Abbildung 60: Kolorimetrische Messung des NADH-Verbrauchs für FSA Wildtyp im gekoppelten Spaltungs-Reduktions-Assay bei 340 nm. Blindwerte und die Werte des Wildtyps überlagern sich im oberen Bereich, die D6H Mutante zeigt ein deutliches Signal.

Für kinetische Untersuchungen von einzelnen Mutanten der FSA zur Spaltung kleiner Aldole ist der Assay bestens geeignet. Um bei den langsamen Spaltungsreaktionen eine eventuelle Reduktion die Ketogruppe des Aldols auszuschließen, wurde ein zweiter oxidativer Assay mit einer Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) entwickelt. Die ALDH oxidiert Aldehyde zur entsprechenden Carbonsäure unter NAD-Verbrauch und NADH-Freisetzung, eine für Ketone nicht mögliche Reaktion. Das gebildete NADH kann dann entweder nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich zeigten sich beide Assays als gleichwertig. Eine Reduktion des Aldols zum Diol kann somit ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Beispiel für Aldole ist das Aggregationspheromon des Reiskäfers *Sitophilus oryzae* sowie des Maiskäfers *Sitophilus zeamais*^[77]: (4*S*,5*R*)-5-Hydroxy-4-methylheptan-3-on, auch als (+)-Sitophilure bekannt. Da die absolute Stereochemie prinzipiell derjenigen entspricht, welche auch die FSA bevorzugt, kam die Idee auf, diese wertvolle Verbindung durch FSA-katalysierte Aldolsynthese herzustellen, und geeignete Mutanten dafür durch Spaltungsassays zu finden.



Schema 29: Potentielle Synthese von (+)-Sitophilure mit der FSA.

In den Spaltungs-Assays ließen sich reproduzierbare Resultate erzeugen, die enzymatische Synthese gelang jedoch aus bisher nicht geklärten Gründen nicht.

4.2 ω -Transaminasen

Transaminasen (EC 2.6.1.x), oder genauer *Aminotransferasen*, sind Cofaktor-abhängige Enzyme, die Ketone in Amine überführen und umgekehrt. Mit Transaminasen können chirale Amine in hoher Enantiomerenreinheit erhalten werden Dies ist vor allem für die pharmazeutische Chemie von Bedeutung. Transaminasen erhielten erst besondere Aufmerksamkeit durch die chemoenzymatische Synthese des Antidiabetikum *Sitagliptin*^[83].

Um Transaminasen als Katalysatoren einzusetzen, ist ein Assay nötig, mit dem die Effizienz bestimmt werden kann. Ein Standardverfahren ist dabei die Bildung von Acetophenon aus α -Methylbenzylamin (MBA), was durch Messung der UV-Absorption bei 245 nm verfolgt werden kann.

Um die Stereopräferenz zu bewerten, blieben bisher oft nur chromatographische Ansätze wie chirale HPLC, was zu geringem Probendurchsatz führte und es nicht möglich machte, große Mengen an Enzymvarianten parallel zu analysieren. Eine Fluoreszenzmessung wurde bisher noch nicht entwickelt.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Assay basiert auf der Bildung von 6-Methoxynaphth-2-yl-ketonen, einer seit langem bekannten Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit einer Quantenausbeute um 0,2^[92] gut für Fluoreszenzmessungen geeignet sind.

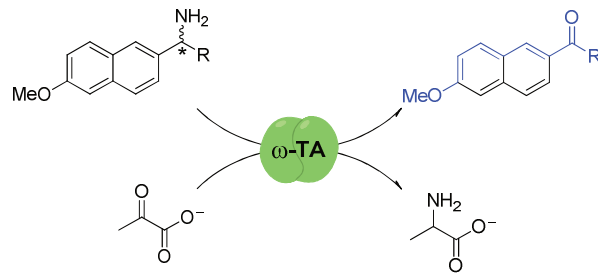
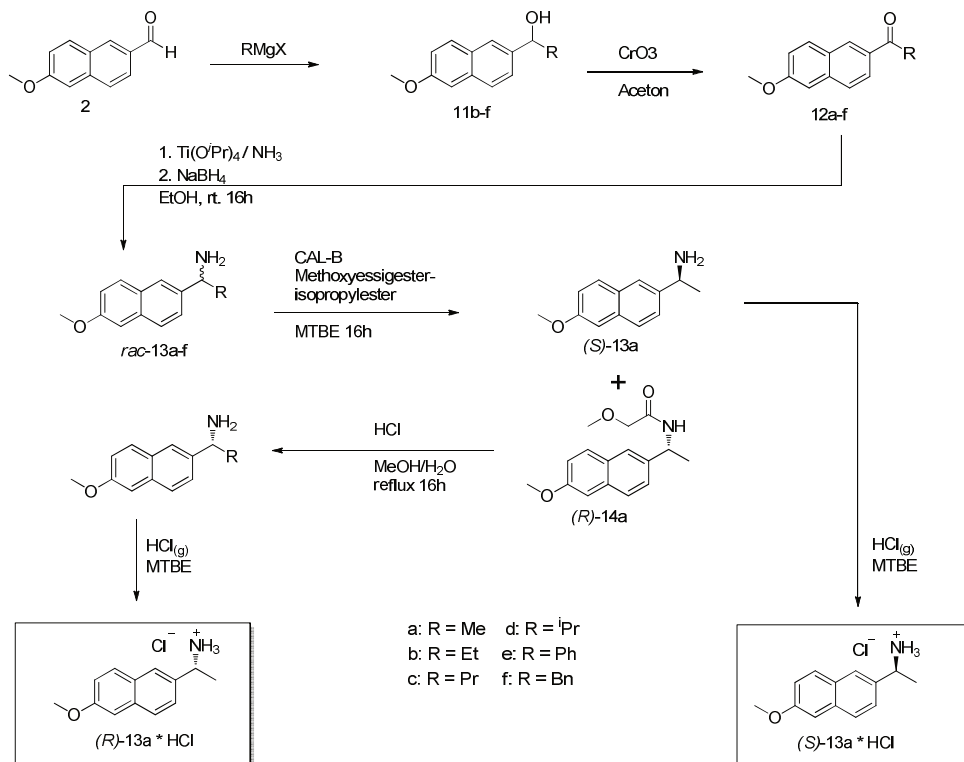


Abbildung 61: Assayprinzip; mit Pyruvat als Aminoakzeptor wird aus dem chiralen Amin das fluoreszierende Keton gebildet. Um die Stereopräferenz zu bestimmen, kann wurde das Amin enantiomerenrein eingesetzt.

Um die Substratbreite der Transaminase zu untersuchen ist es nötig, Strukturvarianten mit vergleichbaren Fluoreszenzeigenschaften zu entwickeln. Die entwickelte modulare Synthese der fluorogenen Substrate hat den Vorteil, ausgehend von dem gleichbleibenden Fluorophor das Molekül beliebig zu erweitern und schrittweise zu vergrößern zu können. Die entsprechenden Ketone wurden über eine Grignard-Reaktion gefolgt von einer Jones-Oxidation erzeugt.



Schema 30: Allgemeine Syntheseroute für strukturanaloge Amin-Substrate 13a-f und kinetische Racemattrennung von 13a durch CAL-B

Für die reduktive Aminierung beschrieb Miriyala^[94] eine einfache und effiziente Methode einer reduktiven Aminierung, nach der die so erhaltenen Amine als Hydrochloride gefällt wurden.

Die Racemattrennung wurde mittels Lipase-Katalyse erreicht und über HPCL verfolgt.

Innerhalb der erzeugten homologen Reihe von R = Methyl bis R = Benzyl war lediglich das Benzonaphthon-Derivat nicht als Substrat geeignet, das es keine Fluoreszenz zeigte. Der große Vorteil dieser Synthesereihe ist, dass durch die abschließende Racemattrennung für jedes Substrat beide enantiomerenreinen Komponenten erhalten werden, was direkte Messungen der Enantioselektivität des Enzymes erlaubt.

Bei der Suche nach neuen Enzymvarianten für die Synthese können im Assay ebenfalls direkt Mutanten der gewünschten Substrattoleranz und Stereochemie ermittelt werden.

Die Transaminase setzt das jeweilige Amin zum fluoreszierenden Keton um und die Fluoreszenzentwicklung über die Zeit kann direkt beobachtet werden.

Erste Versuche zur Verifizierung des Assays wurden mit der kommerziell verfügbaren Transaminase aus *N. fischeri* (Sigma-Aldrich, 93006) durchgeführt, wo bei eine für Transaminasen typische Substrat-Inhibition auffiel.

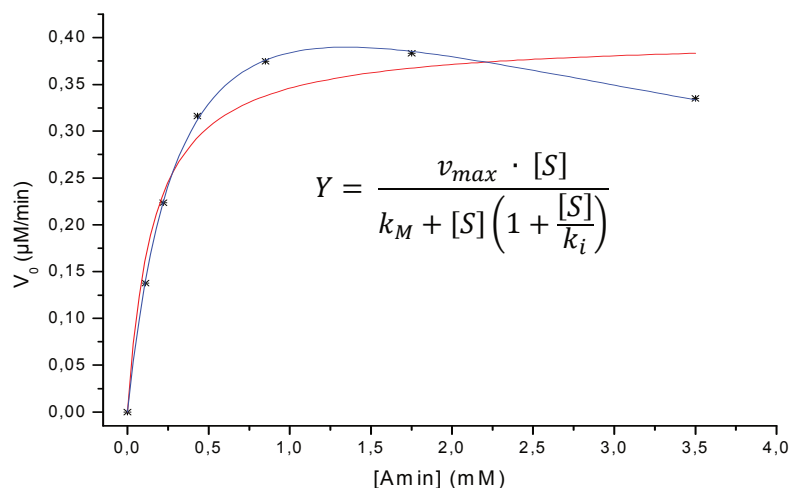


Abbildung 62 : Direkt-lineare Auftragung der Messwerte für TA aus *N. fischeri* mit zwei verschiedenen Anpassungen. Rot stellt ein hyperbolisches Fitting nach Michaelis-Menten dar, blau die Kurve unter Berücksichtigung inhibitorischer Effekte (Gleichung 2).

Statistische Untersuchungen ergaben ein Detektionslimit (LOD) von 0,35 nmol/min und eine Quantifizierungsgrenze (LOQ) von 1,2 nmol/min. Berechnet wurden die Werte über $LOD = 3,3 \cdot \sigma$ und $LOQ = 10 \cdot \sigma$ ^[99]. Eine kontinuierliche Quantifizierung der Enzymaktivität ist mit dem Assay somit möglich; für neun zufällig ausgewählte Transaminasen wurden kinetische Parameter und E-Werte bestimmt.

Tabelle 5.2-1: Zusammenstellung der Messergebnisse:

| Herkunft | Enantiomer | k_M (mM) | k_i (mM) | v_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$) | v_{max}/k_M | E-Wert |
|---|------------|---------------|---------------|--|---------------|-------------|
| <i>Neosartorya fischeri</i> ¹ | (S) | 1,20 | 4,90 | 0,00015 | 0,000125 | 30 (R) |
| | (R) | 0,59 | 3,20 | 0,0023 | 0,003898 | |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> ¹ | (S) | 0,45 | 1,40 | 0,76 | 1,688889 | 19 (R) |
| | (R) | 1,10 | 5,10 | 0,099 | 0,090000 | |
| <i>Vibrio fluvialis</i> ² | (S) | 0,77 | 2,00 | 22 | 28,571429 | >200 (S) |
| | (R) | 0,65 | 2,00 | 0,035 | 0,053846 | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> ² | (S) | 0,77 | 1,30 | 0,002 | 0,002597 | 42 (R) |
| | (R) | 0,27 | 0,73 | 0,031 | 0,114815 | |
| <i>Aspergillus terreus</i> ² | (S) | 1,10 | 2,00 | 0,00011 | 0,000100 | 80 (R) |
| | (R) | 0,05 | 1,10 | 0,0004 | 0,008000 | |
| ATA 117 ^{2,3} | (S) | 2,00 | 0,31 | 0,044 | 0,022000 | 50 (R) |
| | (R) | 0,23 | 0,52 | 0,25 | 1,086957 | |
| ATA 113 ^{2,3} | (S) | 0,0025 | 1,10 | 0,012 | 4,800000 | 110 (S) |
| | (R) | 0,55 | 0,68 | 0,023 | 0,041818 | |
| <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ¹ | (S) | 0,80 | 6,10 | 0,00039 | 0,000488 | 38 (S) |
| | (R) | 1,60 | 5,60 | 0,00002 | 0,000013 | |
| <i>Geobacillus thermoleavorans</i> ¹ | (S) | 0,58 | 6,10 | 0,000031 | 0,000053 | n.d. |
| | (R) | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |

¹⁾ Daten aus eigener Messung, ²⁾ Daten von Henrik Land, KTH Stockholm, abweichend gemessen in HEPES-Puffer ³⁾ Organismus unbekannt, bezogen über Codexis Inc.

5 English Abstract

This work is about the development of assays to investigate mutants of the bacterial Fructose-6-phosphate-aldolase (FSA) and α -transaminases as well as the synthesis of the substrate molecules. The assays are usable to find mutants of the enzymes capable of non-natural reactions. By employing absorptive photometry or fluorescence measurement in total three assays were established. The task of employing the developed methods as a high-throughput-assay to identify the desired mutants directly in micro-scale cell culture could not be completed sufficiently.

The first assay developed for the aldolases was a fluorescence-based one employing the cleavage of a fluorogenic aldol from 6-Methoxynaphth-2-carbaldehyde and methyl ketones and the detection of the fluorescence of the released 6-Methoxynaphth-2-carbaldehyde. With that method several mutants of FSA were investigated and kinetics determined for that non-natural reaction.

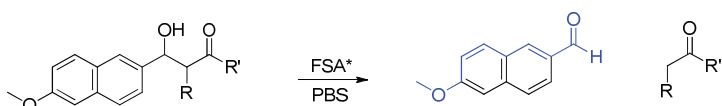
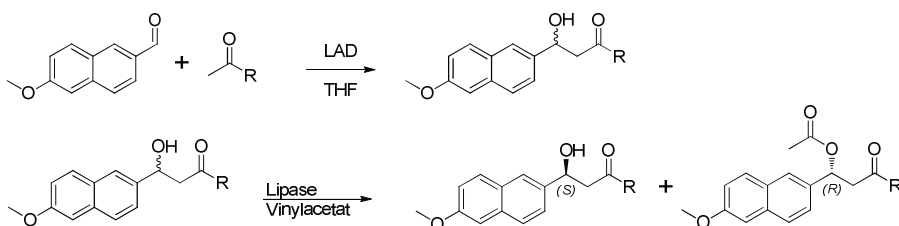


Fig. 1: Principle of a fluorogenic assay for aldolase activity by observing retro-aldol cleavage.

The synthesis of the fluorogenic substrates was an aldole reaction of 6-methoxynaphth-2-aldehyde and a variation of methyl ketones induced by lithium diisopropyl amide. Followed by a lipase catalyzed de-racemization.



Scheme 1: Reaction path for syntheses of racemic and enantio-pure Methodol-like substrates for fluorogenic assay.

Attempts for synthesizing dihydroxy ketones from α,β -unsaturated aromatic ketones were also successful but the product unfortunately decomposed during work-up and isolation.

Also a photometric assay was developed to investigate the cleavage of small aldol by FSA mutants. The assay is a coupled cleavage-reduction-assay in the first step the aldol is cleaved by the FSA, then the liberated aldehyde reduced by an NADH depending alcohol dehydrogenase. For the second step is much faster than the cleavage itself, it can be ignored in kinetics and the Michealis-Menten parameters for the first step calculated directly from the depletion of NADH during the reaction.

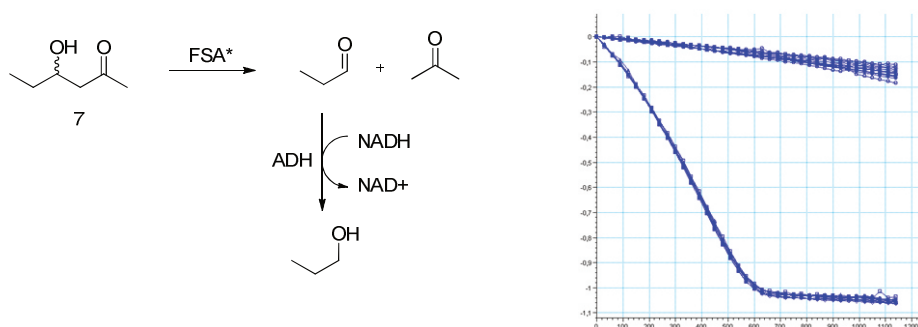


Fig. 2: Principle of a retro-aldol assay, measuring the NADH depending reduction of the liberated aldehyde.

The assay for the transaminases in the second part of this thesis was based on knowledge obtained from the fluorogenic FSA-assay. Transaminases convert ketones into amine compounds and vice versa. Although this behavior is well investigated, no fluorescence-based assay has been developed yet. As this assay employs enantio-pure chiral substrates, not only the kinetics of that non-natural reaction could be easily measured but the stereo preference of the enzyme as well.

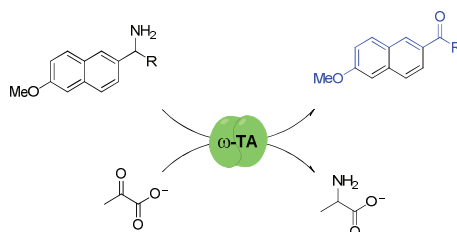
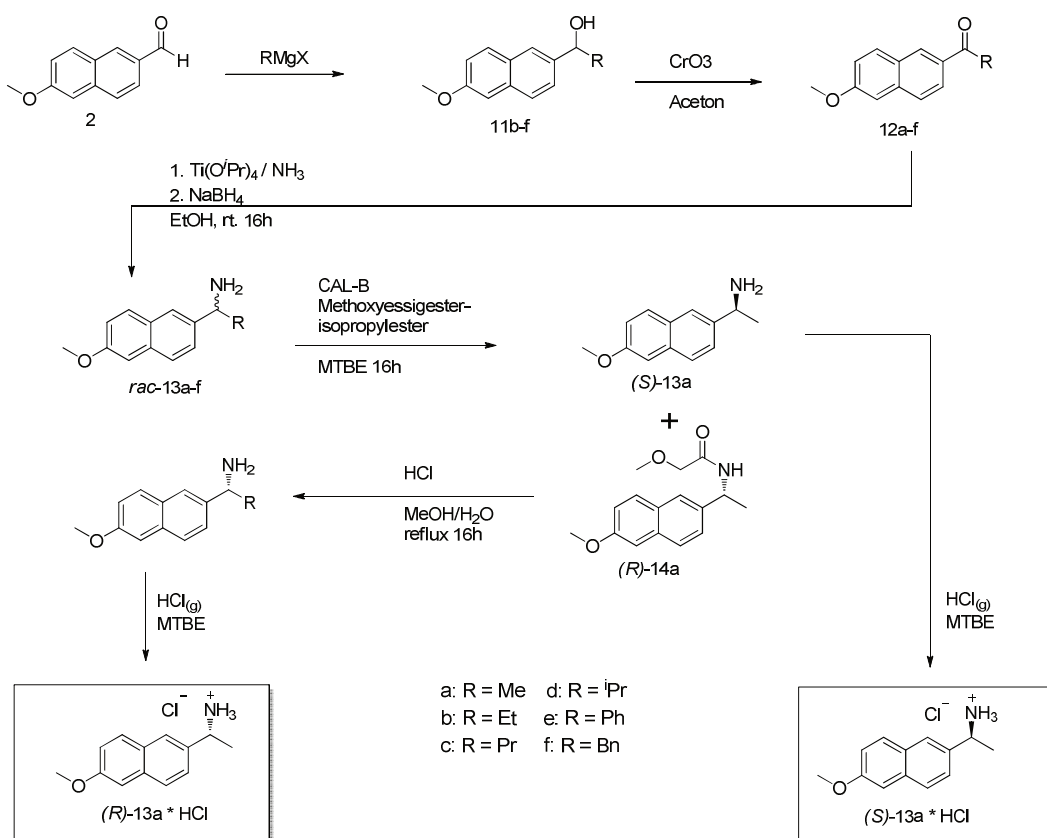


Fig. 3: Concept of a fluorogenic assay for transaminases activity.

To explore the activity of the Enzymes towards bulky non-natural substrates a modular synthesis had to be developed (Scheme 1)

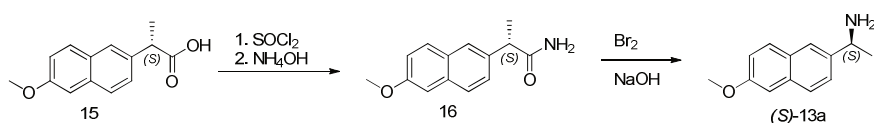
Generally, the synthesis of the racemic amines can be achieved by reductive amination of the corresponding 6-methoxy-2-acylnaphthalenes, later used as detector molecule. This was only useful for R = Methyl, in view of the high costs of higher homologous ketones but with a desire

to investigate a broader variety of structural variations in the R group, and the need to circumvent the separation of regioisomers obtained by Friedel–Crafts acylation I decided for an alternative modular approach consisting of a Grignard addition to the related aldehyde followed by Jones oxidation of the carbinol. Efficient titanium mediated reductive amination of the resultant ketones followed by borohydride reduction furnished the racemic amines with increasing residues in high overall yields.



Scheme 2: Modular synthesis of structurally related fluorogenic amines and enzymatic resolution of the enantiomers.

Enantiomers of the R = methyl species were kinetically resolved by lipase-catalyzed transacylation in organic medium using ethyl methoxyacetate and immobilized lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B) according to a literature precedent. Both antipodes were obtained with >99% ee (HPLC analysis) in excellent yield, including recrystallization and hydrolysis of the easily separable methoxyacetamide (R)-5a. Although not yet performed in this study, kinetic resolution of higher homologous amines using this method should be similarly straightforward, Maybe employing CAL-A or Lipase PS instead of CAL-B.



Scheme 3: Synthesis of enantiopure (S)-amine from the (S)-configured NSAID naproxen.

Configurational assignments should follow the general predictions of the Kazlauskas Rule, and were proven by independent synthesis of the (S)-configured enantiomer of the amine from the inexpensive NSAID naproxen (Scheme 2), which is marketed as the enantiomerically pure drug in the (S)-configuration. Conversion of the acid by a published Curtius degradation gave erratic results, but Hofmann rearrangement of the corresponding carboxamide provided the expected (S)-amine.

6 Experimenteller Teil

6.1.1 Allgemeine Reaktionsbedingungen

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien werden unter einer Argonatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Glasapparaturen aus Borosilicatglas 3.3 werden dafür mehrmals im Ölpumpenvakuum ($p < 0,05$ mbar) mittels Heißluftföhn ausgeheizt und mit Argon der Firma Linde geflutet. Wenn nicht anders angegeben, werden sämtliche Reaktionsansätze magnetisch gerührt. Die angegebenen Temperaturen werden mittels Innenthermometer direkt in der Reaktionslösung bestimmt. Tiefe Temperaturen von -50°C - -70°C werden mittels eines Kältebades aus Trockeneis und technischem Isopropanol erreicht, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches mit einem Kältethermometer direkt in der Apparatur gemessen wird.

6.1.2 Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel werden für luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen gängigen Trocknungs- und Reinigungsverfahren unterworfen und unter Schutzgas über aktiviertem 3\AA oder 4\AA Molekularsieb aufbewahrt. Diethylether (Ether) und Tetrahydrofuran (THF) werden über Kaliumhydroxid vorgetrocknet und bei Bedarf über Natrium mit Benzophenon als Indikator bis zur Blaufärbung erhitzt und stets kurz vor Gebrauch abdestilliert. Essigsäureethylester (Essigester, EE) Cyclohexan (Cy) und n-Hexan (Hex) werden über Calciumchlorid. Methanol und Ethanol werden über Magnesiumspänen am Rückfuß erhitzt und abdestilliert. Dichlormethan wird einige Stunden über Phosphorpentoxid unter Rückfluß gekocht und anschließend destilliert. Aceton wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat vortrocknet und destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel werden in der Qualitätsstufe "pro analysi" bezogen und ohne Vorbehandlung verwendet.

6.1.3 Chemikalien

Ausgangsmaterialien und Feinchemikalien und Hilfsstoffe werden von den gängigen Firmen SIGMA-ALDRICH, FLUKA, ROTH, MERCK-VWR, ACROS und TCI-Europe bezogen und wenn nicht anders angegeben ohne Reinigung eingesetzt. Käufliches Molekularsieb wird mehrere

Stunden im Hochvakuum bei 200-250°C ausgeheizt (Kugelrohröfen) und anschließend unter Argon aufbewahrt.

6.1.4 Apparate und Messgeräte

Gefriertrocknung:

Lyovac GT 2, *Steris*

Fermenter:

Biostat[®] B, *B.Bralin*

Inkubatoren:

Plattenschüttler : *Heidolph Uminmax 1010*

Brutschrank: *Heaeus*

Zentrifugen:

Biofuge 28 RS, *Heraeus Sepatech*

Centrifuge 5415 R, *Eppendorf*

Ultrafiltration:

Amicon 8400, Membran: YM 10 (MWCO: 10 kDa), *Amicon*

pH-Meter:

Minitrode, *Hamilton*

pH-Elektrode, *VWR*

Photometer:

UV-1800 (UV Spectrophotometer), *Shimadzu*

V-560 (UV/VIS Spectrophotometer), *Jasco*

Fluoreszenzphotometer:

AK Denscher, Spektralfluorophotometer RF-1501, *Shimadzu*

Reader für Multititerplatten

Fluorostar optima, *BMG*

6.1.5 Software

Neben Gerätespezifischer Firmware wurden in dieser Arbeit folgende PC-Programme verwendet:

Microsoft™ Office™ Paket in der Version von 2007

ChemBioDraw™ Ultra 12.0 © 2009 CambridgeSoft

OriginPro 8.1 SR2, © OriginLab Corporation

MestReNova LITE V. 5.2.5-4731 © 2008 Mestrelab Research S.L.

PYMOL für Windows, PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 © Schrödinger, LLC.

YASARA für Windows ©1993-2015 by Elmar Krieger s. *Proteins* **2002** , 47, 393 – 402

6.2 Medien und Pufferlösungen

6.2.1 Allgemeines

Antibiotika

Allen Zellkulturmedien, Vorkulturen wie Expressionskulturen, wurde das Antibiotikum Ampicillin zugesetzt. Dazu wurde eine Stammlösung von 100mg/mL Ampicilin in dd Wasser hergestellt und im Verhältnis 1/1000 dem Medium zugesetzt.

Induktion

Wurde kein lac-Autoinduktionsmedium verwendet. So wurden die Zellen mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (ITPG) induziert. Dazu wurde eine Stammlösung von 2mM ITPG in dd Wasser hergestellt und im Verhältnis 1/1000 dem Medium zugesetzt.

6.2.2 10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

Die Konzentrationen der standartmäßigen phosphat-gepufferten Salzlösung sind: 1370,0 mM NaCl, 81,0 mM Na₂HPO₄, 27,0 mM KCl, 14,7 mM KH₂PO₄. Es werden

In 800 ml dest. Wasser werden gelöst:

80,0 g NaCl

2,0 g KCl

11,4 g Na₂HPO₄

2,0g KH₂PO₄

Der pH-Wert wird mit 1N Natronlauge auf 7,5 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1L aufgefüllt. Die Lösung wird bei 120 °C autoklaviert.

6.2.3 LB-Medium

In 800ml dest. Wasser werden gelöst:

10g Bacto-trypton.

5g Hefeextrakt.

10g NaCl.

Der pH-Wert wird mit 6N Natronlauge auf 7,5 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1L aufgefüllt

Die Lösung wird bei 120 °C autoklaviert.

6.2.4 TB-Medium

In 800 ml dest. Wasser werden gelöst:

12g Trypton

24g Hefeextrakt

Es wird mit dest. Wasser auf 900 ml aufgefüllt und die Lösung wird bei 120 °C autoklaviert.

Unmittelbar vor der Verwendung werden 5ml steriles Glycerin (85%) und 100 ml autoklavierter Phosphatpuffer zugegeben. (0,17 M KH_2PO_4 und 0,72 M K_2HPO_4 ; entspr. 23,0 g KH_2PO_4 + 125,7 g K_2HPO_4 pro Liter)

6.2.5 AI-Medium (Autoinduktionsmedium)

Für autoinduktive Proteingewinnung wurde das „Autoinduktions-Medium für T7-Plasmide“ nach Studier^[101] verwendet. Das Medium enthält 1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 40 mM K_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 50 mM NH_4Cl , 5 mM Na_2SO_4 , 2 mM Mg_2SO_4 , 0,5% Glycerin, 0,05% Glucose, 0,2% Lactose und Spurenelemente.

In 900 ml dest. Wasser werden gelöst:

10 g Pepton

5 g Hefeextrakt

Anschließend werden zugegeben:

5,0 g Glycerol
2,7 g NH₄Cl
0,7 g Na₂SO₄
0,5 g Glucose
2,0 g Lactose

Die Lösung wird bei 120 °C autoklaviert.

Unmittelbar vor der Verwendung werden unter Sterilfiltration (<0,22µm) auf 1 Liter Nährlösung zugegeben:

1 ml 2M Lösung von MgSO₄ in dest. Wasser
1ml 1000x Trace Metals Mix (siehe 4.1.6.4)
40 ml 1M Lösung von K₂HPO₄ in dest Wasser
10 ml 1M Lösung von KH₂PO₄ in dest Wasser
1ml/L Ampicilin 100^{mg}/ml

Das Medium wird einfach am Vortag mit etwas Glycerolstock oder einer Kolonie von der Platte angeimpft und 18 – 24 h bei 37°C geschüttelt. Danach kann direkt geerntet werden. Zugabe von IPTG ist zur Induktion nicht nötig. (Erfolgreich getestet bisher mit Vektoren pET16b und pJF119).

6.2.6 1000x Trace Metals Mix

Die Spurenelemente-Mischung für das Auto-Induktions-Medium enthält 50 mM FeCl₃, 20 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, 10 mM ZnSO₄, 2 mM CoCl₂, 2 mM CuCl₂, 2 mM NiCl₂, 2 mM Na₂MoO₄, Na₂ 2 mM SeO₃ und 2 mM H₃BO₃ und ist 1000-fach konzentriert. Alle Stammlösungen in Tab. 4.1 bis auf FeCl₃ werden in Wasser gelöst, das Eisensalz in 0,1M Salzsäure. Die Metallsalzlösungen werde gemäß dem Pipettierschema in der Tabelle zusammen gegeben. Es werden noch 36 ml dest. Wasser zugegeben und die Lösung rasch durch einen Sterilfilter (<0,22 µm) in ein autoklaviertes Gefäß abgefüllt.

Tab. 4.1: Stammkonzentrationen und Verdünnung der Metallsalz-Lösungen

| Stammlösungen | Volumen | Molmasse g/mol | Ionenkonzentration 1-fach |
|---|---------|------------------|---------------------------|
| 0.1 M FeCl ₃ •6H ₂ O | 50 ml | 270.30 | 50 μ M Fe |
| 1M CaCl ₂ | 2 ml | 110.99 | 20 μ M Ca |
| 1M MnCl ₂ •4H ₂ O | 1 ml | 197.91 | 10 μ M Mn |
| 1 M ZnSO ₄ •7H ₂ O | 1 ml | 287.56 | 10 μ M Zn |
| 0.2 M CoCl ₂ •6H ₂ O | 1 ml | 237.95 | 2 μ M Co |
| 0.1 M CuCl ₂ •2H ₂ O | 2 ml | 170.48 | 2 μ M Cu |
| 0.2 M NiCl ₂ •6H ₂ O | 1 ml | 237.72 | 2 μ M Ni |
| 0.1 M Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O | 2 ml | 241.98 | 2 μ M Mo |
| 0.1 M Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O | 2 ml | 263.03 | 2 μ M Se |
| 0.1 M H ₃ BO ₃ | 2 ml | 61.83 | 2 μ M B |

6.2.7 High Protein AI –Medium

Das Medium basiert auf dem „Autoinduktions-Medium für T7-Plasmide“ nach Studier^[101] kombiniert mit dem TB Medium und enthält 1,2% Pepton, 2,5% Hefextrakt, 40 mM K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM Mg₂SO₄, 0,5% Glycerin, 0,1% Glucose, 0,4% Lactose und Spurenelemente.

In 900 ml dest. Wasser werden gelöst:

- 12 g Pepton
- 25 g Hefextrakt

Anschließend werden zugegeben:

- 5,0 g Glycerol
- 2,7 g NH₄Cl
- 0,7 g Na₂SO₄
- 1,0 g Glucose
- 4,0 g Lactose

Die Lösung wird bei 120 °C autoklaviert.

Unmittelbar vor der Verwendung werden unter Sterilfiltration (<0,22 μ m) Pro Liter Nährlösung zugegeben:

1 ml 2M Lösung von MgSO_4 in dest. Wasser
1ml 1000x Trace Metals Mix (4.1.6.4)
40 ml 1M Lösung von K_2HPO_4 in dest Wasser
10 ml 1M Lösung von KH_2PO_4 in dest Wasser
1ml/L Ampicilin 100 mg/ml

6.2.8 Lysis-Puffer

Zur Lyse der Zellen bei der Proteingewinnung wurde ein frisch anzusetzender Lysis-Puffer verwendet:

60 ml Wasser
7,5 ml Phosphatpuffer 1M pH=7,25
50 μl CaCl_2 1M
50 μl MgSO_4 1M
100 μl DNase
45 mg Lysozym
500 μl BugBuster[®]
50 μl DDT Lösung 2M

6.2.10 Produktion von Enzymen

Deep-Well-Platte

In 2 ml deep well platten quadratischen Querschnitts werden 1,6 ml Autoinduktionsmedium je well werden die well einzeln angeimpft und die Zellen 16 Stunden bei 36 °C wachsen lassen. Die Platte wird dabei mit einer zur besseren Belüftung punktierten Klebefolie verschlossen. Danach wird bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und erneut bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wird in 200 μ l Lysispuffer resuspendiert und die Zellen 20 min bei 37 °C lysiert. Die Suspension wird in eine klare Mikrotiterplatte überführt und zur Hitzeaufreinigung anschließend für 10 min auf 65 °C erwärmt. Danach wird bei 4000 rpm abzentrifugiert und 160 μ l des Überstands für die folgenden Messungen verwendet.

Schüttelkultur

In 1 L Schikanekolben werden 250 ml Autoinduktionsmedium (mit Ampicillin) mit Zellen aus Cryostocks angeimpft und die Zellen 16 Stunden bei 36 °C und 220 rpm wachsen lassen. Danach wird die Suspension gleichmäßig Zentrifugengefäße verteilt, bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in PBS resuspendiert, erneut bei 6000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nun wird in 100 ml Lysispuffer resuspendiert und die Zellen 30 min bei 37 °C lysiert. Zur Hitzeaufreinigung wird direkt anschließend für 10 min auf 65 °C erwärmt. Danach wird bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in eine Ultrafiltrationszelle (MC = 10000 D) gegeben. Mit Stickstoff wird bei 4 bar Überdruck zweimal dialysiert. Der viskose Rückstand wird mit 5 ml PBS, versetzt mit DDT zu 1 mMol, aufgenommen und auf $<0,22 \mu$ m steril filtriert. Die Enzymlösung wird schockgefroren und gefriergetrocknet.

Fermenter

In einem sterilen Reagenzglas 10 mL LB-Medium (mit Ampicillin) mit Zellen aus Cryostocks angeimpft und die Zellen 16 Stunden bei 36 °C und 220 rpm auf einem Orbitalschüttler wachsen lassen.

Der Fermenter wird mit 5L AI-Medium, ebenfalls mit Ampicillin versetzt, befüllt und Die Übernachtskultur zugegeben. Unter stetigem Rühren und Belüftung mit steril-filtrierter Druckluft wird für 16-18 Stunden inkubiert. Die Bakteriensuspension wird mit einer peristaltischen Pumpe abgepumpt und in Portionen zu je 250 mL bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Rückstand mit PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert.

Anschließend werden die Zellen nach der gleichen Methode wie für die Schüttelkultur in Portionen zu jeweils 250 mL lysiert das Protein wie dort beschrieben aufgereinigt.

Gehaltsbestimmung (Gesamtprotein)

Die Bestimmung des Proteingehalts im Lyophilisat erfolgt nach Bradford mit kommerziell erhältlicher Reagenzlösung „Rotiquant 5x“. Zur Kalibration wird eine lineare Verdünnungsreihe von BSA in Phosphatpuffer von 100 µg/ml bis 0 µg/ml in Schritten von 10µg/ml angelegt. Die Lyophilisate werden zu 5mg/ml in Phosphatpuffer gelöst. Das Reagenz wird 1:4 mit Phosphatpuffer verdünnt.

Die Messung erfolgt in Deep-well-Platten; je well werden 100 µl verdünnte Reagenz eingesetzt. Für die Kalibrationsgerade werden pro well 100 µl der BSA-Verdünnung zugegeben. Nach der Gleichung $Y = mx + y_{(0)}$ wird die Steigung bestimmt. Von den Probelösungen (5,0 mg/ml) werden 10 µl sowie 90 µl Phosphatpuffer eingesetzt. Die Messung erfolgt bei 596 nm. Der Gehalt der Probe wird aus der Steigung der Kalibrationsgeraden rückgerechnet.

6.3 Analytik

6.3.1 Bestimmung FSA-Gehalt (SDS-PAGE)

Die Bestimmung des FSA-Anteils im Protein erfolgt mittels Gelelektrophorese. Nach der Färbung des Gels erfolgte eine Abschätzung der Bandengröße durch betrachten gegen Millimeterpapier.

6.3.2 Chromatographie

Alle Reaktionen und säulenchromatographische Trennungen werden durch analytische Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Dazu werden mit Kieselgel (KG60 F₂₅₄) beschickte Aluminiumfolien der Firma Merck verwendet. Als Laufmittel werden in der Regel Lösungsmittelgemische aus n-Hexan (Hex) bzw. Cyclohexan (Cy) und Essigester (EE) verwendet. Die Detektion UV-aktiver Substanzen erfolgt durch Absorption bei 254 nm; fluoreszierende Stoffe werden mit 366 nm angeregt und die Fluoreszenz beobachtet. Zur Detektion UV-inaktiver Verbindungen werden folgende Tauchlösungen verwendet:

Anisaldehyd-Reagenz: 9,2 ml Anisaldehyd,
 3,5 ml Eisessig,
 12,5 ml Schwefelsäure 98%
 340 ml Ethanol (redestilliert)
 Die Lagerung erfolgt bei -18°C

Cer(IV)sulfat-Reagenz: 1,0 g Cer(IV)sulfat,
 15 ml konz. Schwefelsäure
 85 ml Wasser.

Die Detektion erfolgt in beiden Fällen nach Erhitzen im Heißluftstrom. Neben den R_f-Werten wird das Laufmittelgemisch und der subjektive Farbeindruck angegeben.

6.3.3 HPLC Analytik

Hochdruckflüssigchromatographie wird an einem Modulsystem der Fa. Shimadzu des Typs LC-20A genutzt. Für die analytische HPLC wird eine Säule der Typs Chiracell IB der Firma DaiCel mit der Dimension (4 x 250 mm) verwendet. Die Zusammensetzung und Trennung der Proben werden mit UV-Detektor verfolgt. Die Ermittlung der Peakflächen bei den analytischen Trennungen erfolgt PC-unterstützt mit der Software von Shimadzu.

6.3.4 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Alle ^1H -Spektren und ^{13}C -NMR-Spektren (^1H -Breitband-entkoppelt) werden entweder mit einem AC300 oder DRX500 Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. Als Lösungsmittel wird CDCl_3 , Methanol- d^4 , D_2O , oder DMSO-d^6 verwendet. Die chemische Verschiebung wird in ppm (δ -Einheiten) angegeben unter Verwendung von Der Protonensignale des Lösemittels (Chloroform: $\delta = 7,26$, DMSO: $\delta = 2,50$). Die Spektren werden nach erster Ordnung ausgewertet. Zur Charakterisierung der Aufspaltungsmuster werden die üblichen Abkürzungen verwendet:

s (Singulett), d (Dublett), dd (Doppeldublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplet).

Die Kopplungskonstanten werden in Hertz angegeben und mit $^nJ_{xy}$ abgekürzt. In einigen Fällen wird die Zuordnung der chemischen Verschiebung der Protonen mit Hilfe von ^1H , ^1H -COSY (Correlated Spectroscopy) HSQC und HMBC vorgenommen. Zur Bestimmung der Konfiguration werden von einigen Verbindungen NOE-Spektren (Nuclear Overhauser Effect) gemessen.

6.4 präparative Säulenchromatographie

Bei der Reinigungschromatographie wird *Kieselgel 60* der Firmen Roth oder Acros verwendet (Korngröße 0,063 – 0,2 mm für Schwerkraftsäulen; 0,040 – 0,063 mm für Flashsäulen bei 2,5 bar Betriebsdruck), wobei die mobile Phase aus den bei der analytischen Dünnschichtchromatographie verwendeten Laufmittelgemischen mit der unten genannten Formel bestimmt wird.

$$\% \text{ Polares Lösemittel} = \frac{\% \text{ Polares LM in DC}}{10 \times R_f(\text{Produkt})}$$

Verwendete Feste Phasen waren:

Kieselgel 60, Korngröße 40-63 μm , *Fa. Roth*

Kieselgel 60, Korngröße 63-200 μm , *Fa. Roth*

Kieselgur Celite 533, *Fa. Fluka* (als Filterhilfe)

Kieselgel 100 C18-Umkehrphase, Korngröße 40-63 μm , fully uncapped, *Fluka*

6.5 Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden an einem Spektralfluorophotometer „RF-1501“ von Shimadzu gemessen. Die Messung erfolgt als ethanolische Lösung der Substanz in Quarzglasküvetten 10x10x30 mm. Als Lichtquelle dient eine Xenonentladungslampe die Monochromatoren bestehen aus konkaven Spiegelgittern (F/2.4, 900 Gräben/mm). Die Aufnahme der Daten erfolgt mittels Firmware, eine eventuelle Bearbeitung erfolgte mit Origin[®] Ver. 8.1.

6.6 Mikrotiter Assays

6.6.1 FSA Methodol

Der Assay wird in 96-well Platten von Sarstedt mit dem BMG Optima Platereader gemessen. Die Wellenlänge für die Anregung wird mit Filtern auf 340 ± 5 nm und die Emission auf 460 ± 10 nm begrenzt. Eine Kalibrationskurve wird aufgenommen, in dem eine Lösung des entsprechenden Naphthaldehyds in DMF mit PBS, der 10 % DMF enthält auf Konzentrationen zwischen 0,0 (= Blindwert) und $5,0 \mu\text{M}$ verdünnt und unter den obigen Bedingungen 5-fach gemessen und gemittelt wurde. Die lineare Beziehung zwischen Bildung des Ketons und Anstieg der Fluoreszenz wird beschrieben durch die Geradengleichung $y = mx + b$.

Eine 100 mM Lösung von Methodol (oder des Derivates) in DMF wird zunächst mit PBS, der 10% DMF enthält 1:4 verdünnt. Diese Lösung (25,0 mM) wird schrittweise mit PBS, der 10% DMF (pH = 7,4) enthält 1:2 verdünnt, so dass das letzte Glied der Verdünnungsreihe 0,31 mM konzentriert ist. Je well werden $180 \mu\text{L}$ dieser Lösung und $20 \mu\text{L}$ einer Lösung von 30,0 mg Enzym in 1,0 mL PBS zusammen gegeben. Die Endkonzentrationen betragen damit: 22,5 – 0,27 mM Aldol, und $300 \mu\text{g}/200\mu\text{L}$ FSA.

Das Instrument wurde auf 45°C vorgeheizt und die Fluoreszenzentwicklung alle 10 Minuten über 3 Stunden verfolgt. Die Rohdaten wurden mit Origin 8.1 bearbeitet und die kinetischen Parameter durch lineares und hyperbolisches Fitting erhalten.

6.6.2 FSA Methodol quick

Zum schnellen Vergleich der v_0 -Werte wurde eine vereinfachte Version des Assay angewandt.

Der Assay wird ebenfalls in 96-well Platten von Sarstedt mit dem BMG Optima Platereader gemessen. Die Wellenlänge für die Anregung wird mit Filtern auf 340 ± 5 nm und die Emission auf 460 ± 10 nm begrenzt. Eine Kalibrationskurve wird aufgenommen, in dem eine Lösung des entsprechenden Naphthaldehyds in DMF mit PBS, der 5 % DMF enthält auf Konzentrationen zwischen 0,0 (= Blindwert) und $5,0 \mu\text{M}$ verdünnt und unter den obigen Bedingungen 5-fach gemessen und gemittelt wurde. Die lineare Beziehung zwischen Bildung des Ketons und Anstieg der Fluoreszenz wird beschrieben durch die Geradengleichung $y = mx + b$. Die statistischen Parameter LOD und LOQ sind definiert als $\text{LOD} = 3,3\sigma/\langle m \rangle$ und $\text{LOQ} =$

$10\sigma/\langle m \rangle$. σ ist dabei die Standardabweichung der Steigung der (Negativ-) Kontrollmessung und $\langle m \rangle$ der Mittelwert der Steigung der Messgeraden (Details s. 6.6.7).

Eine 300 mM Lösung von Methodol in DMF wird zunächst mit PBS, der 10% DMF enthält 1:10 verdünnt. Von den Enzymen werden Lösungen von 1mL in BPS angesetzt, die ca. 5 mg/mL enthalten. (genaue Werte werden notiert). Je well werden 100 μ L Methodol-Lösung und Enzymlösung entsprechend 300 μ g Protein gegeben und mit PBS zu 200 μ L ergänzt. Die Endkonzentrationen betragen damit: 15 mM Methodol, und 300 μ g/200 μ L FSA.

Das Instrument wurde auf 45 °C vorgeheizt und die Fluoreszenzentwicklung alle 15 Minuten über 4-5 Stunden verfolgt. Die Rohdaten wurden mit Origin 8.1 bearbeitet und die kinetischen Parameter durch lineares und hyperbolisches Fitting erhalten.

6.6.3 FSA ADH / FSA ALDH

Der Zweistufige Assay beruht auf der Spaltung von 4-Hydroxyhexan-2-on durch die FSA und die anschließende Reduktion des freigesetzten Propionaldehyds durch eine NADH-abhängige Alkoholdehydrogenase.

Der Assay wird in 96-well Platten von Sarstedt mit dem BMG Optima Platereader gemessen. Die Wellenlänge für die Absorption wird auf 340 ± 2 nm per Software vorgegeben. Zur Kalibration wird der Messlösung 50 μ L Acetaldehyd zugesetzt, was zum sofortigen Verbrauch des NADH und einem Abfall der Absorption führt. Die Differenz wird zur Konzentration an NADH in Relation gesetzt: $\Delta(\text{ABS}) = \Delta c(\text{NADH})$. Die lineare Beziehung zwischen Spaltung des Aldols und Abnahme der Absorption wird beschrieben durch die Geradengleichung $y = -mx + b$. Der Achsenabschnitt wird per Software auf $Y = 0$ gesetzt und m als maximale Steigung bestimmt. Aus Abnahme der Absorption pro Zeit und der Relation zwischen Absorption und Konzentration an NADH wird die Umsatzgeschwindigkeit berechnet. Jede Enzym-Mutante wird dann unter folgenden Bedingungen vermessen: In 10 mL PBS werden 20 mg NADH, 100 μ L ADH-Suspension (Roche) und FSA entsprechend 15 mg Protein gelöst (Lösung A). Eine Verdünnungsreihe von 4-Hydroxyhexan-2-on in PBS von 400 bis 3.2 mM dient als Prüflösung. In einer Mikrotiterplatte werden je 100 μ L Lösung A und Prüflösung zusammengegeben und sofort die Absorption vermessen. Die Rohdaten wurden mit Origin 8.1 bearbeitet und die kinetischen Parameter durch lineares und hyperbolisches Fitting erhalten.

6.6.4 FSA Assay für natürliche Reaktion

Der Assay beruht auf der Spaltung von Fructose-6-phosphat durch die FSA und die anschließende Reduktion des freigesetzten Glycerinaldehydphosphat durch eine NADH-abhängige Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD).

Der Assay wird in 96-well Platten von Sarstedt mit dem BMG Optima Platereader gemessen. Die Wellenlänge für die Absorption wird auf 340 ± 2 nm per Software vorgegeben. Zur Kalibration wird der Messlösung $5 \mu\text{L DL}$ -Glycerinaldehydphosphat zugesetzt, was zum sofortigen Verbrauch des NADH und einem Abfall der Absorption führt. Die Differenz wird zur Konzentration an NADH in Relation gesetzt: $\Delta(\text{ABS}) = \Delta c(\text{NADH})$. Die lineare Beziehung zwischen Spaltung des Aldols und Abnahme der Absorption wird beschrieben durch die Geradengleichung $y = -mx + b$. Der Achsenabschnitt wird per Software auf $Y = 0$ gesetzt und m als maximale Steigung bestimmt. Aus Abnahme der Absorption pro Zeit und der Relation zwischen Absorption und Konzentration an NADH wird die Umsatzgeschwindigkeit berechnet. Jede Enzym-Mutante wird dann unter folgenden Bedingungen vermessen: In 10 mL PBS werden 2 mg NADH, 5 mg Fructose-6-phosphat, $100 \mu\text{L}$ GDH-Suspension (Sigma; $6,1 \text{ mg/mL}$, 173 U/mg) (Lösung A). Zusätzlich wird FSA entsprechend 8 mg/mL Protein in PBS gelöst (Prüflösung). In einer Mikrotiterplatte werden $150 \mu\text{L}$ Lösung A und $50 \mu\text{L}$ Prüflösung zusammengegeben und sofort die Abnahme der Absorption bei $38 \text{ }^\circ\text{C}$ vermessen. Die Rohdaten wurden mit Origin 8.1 bearbeitet und die kinetischen Parameter durch lineares Fitting erhalten.

6.6.5 FSA Hantzsch – Assay

Der Assay wird in 96-well Platten von Sarstedt mit dem BMG Optima Platereader gemessen. Die Wellenlänge für die Anregung wird mit Filtern auf 366 ± 5 nm und die Emission auf 520 ± 10 nm begrenzt. Eine Kalibrationskurve wird aufgenommen, in dem eine Lösung des entsprechenden Dihydropyridins in Ammoniumacetat-Puffer auf Konzentrationen zwischen $0,0$ (= Blindwert) und $5,0 \mu\text{M}$ verdünnt und unter den obigen Bedingungen 5-fach gemessen und gemittelt wurde. Die lineare Beziehung zwischen Bildung des Hantzsch-Produkts und Anstieg der Fluoreszenz wird beschrieben durch die Geradengleichung $y = mx + b$. Jede Enzym-Mutante wird dann unter folgenden Bedingungen vermessen:

10,0 g (130 mmol) Ammoniumacetat werden in 100 mL Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1N NaOH auf 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 1L auf gefüllt (Messpuffer). Auf 10 ml Messpuffer werden 50 mg 1,3-Cyclohexadion und 1ml 4-Hydroxyhexan-2-on gelöst und der pH-Wert wieder mit 1N NaOH auf 7,4 eingestellt. Je well werden 180 μ L dieser Lösung und 20 μ l einer Lösung von 15,0 mg Enzym in 1,0 mL PBS (= 300 μ g / 200 μ L) zusammen gegeben und die Entwicklung der Fluoreszenz verfolgt. Die Rohdaten wurden mit Origin 8.1 bearbeitet und die kinetischen Parameter durch lineares und hyperbolisches Fitting erhalten.

6.6.6 Transaminasen

Der Assay wird in 96-well Platten von Sarstedt mit dem BMG Optima Platereader gemessen. Die Wellenlänge für die Anregung wird mit Filtern auf 330 ± 5 nm und die Emission auf 460 ± 10 nm begrenzt. Eine Kalibrationskurve wird aufgenommen, in dem eine Lösung des entsprechenden Naphthylketons in PBS mit 5% DMF auf Konzentrationen zwischen 0.0 (= Blindwert) und 5,0 μ M verdünnt und unter den obigen Bedingungen 5-fach gemessen und gemittelt wurde. Die lineare Beziehung zwischen Bildung des Ketons und Anstieg der Fluoreszenz wird beschrieben durch die Geraden-gleichung $y = mx + b$. Die statistischen Parameter LOD und LOQ sind definiert als $LOD = 3,3\sigma / \langle m \rangle$ und $LOQ = 10\sigma / \langle m \rangle$. σ ist dabei die Standardabweichung der Steigung der (Negativ-) Kontrollmessung und $\langle m \rangle$ der Mittelwert der Steigung der Messgeraden (Details s. 6.6.7).

Jedes Substrat-Enzym-Paar wird dann unter Folgenden Bedingungen vermessen:

Eine 5,0 mM Lösung des Amines in PBS wird schrittweise 1:2 verdünnt, so dass das letzte Glied der Verdünnungsreihe 0,08 mM konzentriert ist. Eine Lösung von 10,0 mg Natriumpyruvat in 1 mL (90 mM) wird als Stammlösung hergestellt und bei -30 °C gelagert. In jedes well werden 140 μ L Aminlösung, 10 μ L Pyruvatlösung und 50 μ L Enzymlösung (ca. 1,5 mg/mL) gegeben. Die Endkonzentrationen betragen damit: 3,5 – 0,6 mM Amin, 4,5 mM Pyruvat und 375 μ g/200 μ L Enzym. Bei schnellen Umsatzraten wurde die Enzymmenge durch verdünnen der Stammlösung halbiert.

Das Instrument wurde auf 38 °C vorgeheizt und die Fluoreszenzentwicklung alle 30 Sekunden über 10 min verfolgt. Die Rohdaten wurden mit Origin 8.1 bearbeitet und die kinetischen Parameter durch lineares und hyperbolisches Fitting erhalten.

6.6.7 Statistik

Zur Bestimmung der statistischen Parameter LOD, LOQ und Z-Faktor wurde der Assay für eine niedrige, aber nicht zu geringe Konzentration des Substrates (in der Regel 0,3-0,5 mM) gegen die Reaktion ohne Enzym (Hintergrundreaktion) als 5fach-Bestimmung gemessen. Die Steigung der Reaktionsgeraden wurde um den Hintergrund korrigiert und für korrigierte Reaktion und Hintergrund jeweils Mittelwert und Standardabweichung für bestimmt.

Die statistischen Parameter LOD und LOQ sind definiert als

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma_0}{\bar{m}_R}$$

und

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma_0}{\bar{m}_R}$$

Dabei ist σ_0 die Standardabweichung der Steigung der (Negativ-) Kontrollmessung und \bar{m}_R der Mittelwert der Steigung der Messgeraden für die Reaktion.

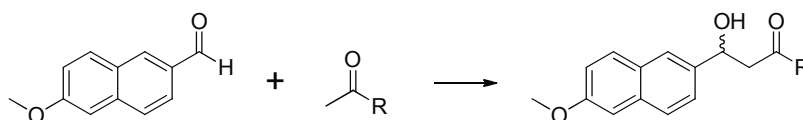
Der Z-Faktor ist eine Größe, um die Brauchbarkeit eines Assays einzuschätzen und berechnet sich aus den in der 5fach-Bestimmung erhaltenen Werten nach:

$$Z = 1 - \frac{3(\sigma_R + \sigma_0)}{|\bar{m}_R - \bar{m}_0|}$$

Werte zwischen 0,5 und 1,0 zeigen einen guten Assay an, bei Werten unter 0,5 ist der Assay nur eingeschränkt zuverlässig. Negative Werte zeigen an, dass der Assay für das betrachtete Problem nicht einsetzbar ist.

6.7 Synthese der FSA-Substrate

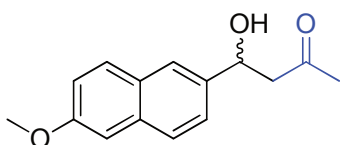
6.7.1 AAV: Fluorogene Naphthylaldehyde vom Methodol-Typ (1)



Vorschrift zur Synthese fluorogener Aldole nach der Methode List und Barbas III.^[45] Unter Argon-Atmosphäre bei -78 °C 2,5ml (2eq) einer 2M Lösung von LDA in THF/Heptan vorgelegt und mit 5 mmol (2eq) mit des entsprechenden Alkylmethylketons versetzt. Nach 10 min werden 0,5 g 2,5 mmol (1eq) 6-Methoxynaphth-2-aldehyd in 2 ml abs. THF langsam zugegeben und für 15-30 min gerührt. Danach wird in der Kälte 1 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und auftauen lassen. Die Lösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle entfärbt in filtriert. Das Filtrat wird mit dem gleichen Volumen n-Heptan oder Isooctan versetzt und im Vakuum bis zum Beginn einer Trübung eingengt. Die Zielkomponente wird über Nacht bei 2-5 °C kristallisiert und nochmals in n-Hexan umkristallisiert.

Für die Zuordnung der Atome im NMR werden alle Verbindungen als 1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-1-hydroxy-3-Ketone betrachtet

4-Hydroxy-4-(6-methoxynaphth-2-yl)butan-2-one (Methodol, 1a):

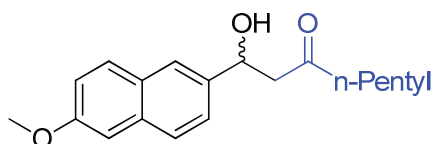


Ausbeute: 65%, Smp: 103-105 °C.

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7,48 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3'-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7'-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5'-H), 5,42 (d, J = 4,6 Hz, 1H, OH), 5,14 (dt, J = 8,9 Hz, 4,6 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,82 (m, 2H, 2-H), 2,14 (s, 3H, 4-H);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 208,2 (C-3), 157,0 (C-6'), 140,3 (C-4a'), 133,4 (C-2'), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'), 124,9 (C-4'), 123,8 (C-3'), 118,5 (C-7'), 105,7 (C-5'), 69,0 (C-1), 55,1 (OCH_3), 52,8 (C-2), 30,4 (C-4). Entspricht Lit. ^[97]

1-Hydroxy-1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)octan-3-on (1b)



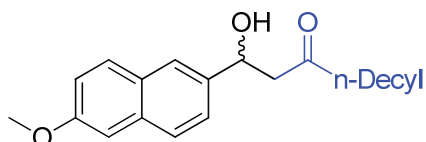
Ausbeute: 55%, Smp: 89 °C.

^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻-H), 7,48 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7⁻-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻-H), 5,42 (d, J = 4,6 Hz, 1H, OH), 5,14 (ddd, J = 8,9 Hz, 4,6 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 2,83 (dd, J = 15,1 Hz, 8,8 Hz, 1H, 2-H_a), 2,70 (dd, J = 15,1 Hz, 4,6 Hz, 1H, 2-H_b), 2,45 (m, 2H, 4-H), 1,44 (m, 2H, 5-H), 1,19 (m, 4H, 6-, 7-H), 0,82 (t, J = 9,6 Hz, 3H, 8-H);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 208,2 (C-3), 157,0 (C-6'), 140,3 (C-4a'), 133,4 (C-2'), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'), 124,9 (C-4'), 123,8 (C-3'), 118,5 (C-7'), 105,7 (C-5'), 69,0 (C-1), 55,1 (OCH_3), 51,9 (C-2), 42,6 (C-4), 30,7 (C-5), 22,5 (C-6), 21,9 (C-7) 13,8 (C-8);

HRMS (EI): $[\text{M}]^+$ m/z berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$: 282,1620; gefunden: 282,1614

1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-1-hydroxytridecan-3-on (1c)

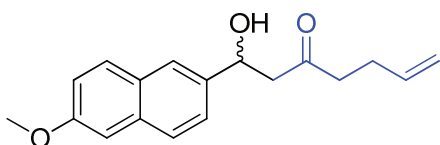


Ausbeute: 50%, Smp: 128 °C.

^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻-H), 7,48 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7⁻-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻-H), 5,42 (d, J = 4,6 Hz, 1H, OH), 5,14 (ddd, J = 8,9 Hz, 4,6 Hz, 4,6 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 2,83 (dd, J = 15,1 Hz, 8,8 Hz, 1H, 2-H_a), 2,70 (dd, J = 15,1 Hz, 4,6 Hz, 1H, 2-H_b), 2,45 (m, 2H, 4-H), 1,58 (m, 2H, 5-H), 1,26 (m, 14H, 6-,...,12-H), 0,92 (t, J = 9,6 Hz, 3H, 13-H);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 208,2 (C-3), 157,0 (C-6'), 140,3 (C-4a'), 133,4 (C-2'), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'), 124,9 (C-4'), 123,8 (C-3'), 118,5 (C-7'), 105,7 (C-5'), 69,0 (C-1), 55,1 (OCH_3), 51,9 (C-2), 42,6 (C-4), 30,7 (C-11), 5x 29,5-29,1, (C-6 – C-10), 22,5 (C-5), 21,9 (C-12) 13,8 (C-13).

1-Hydroxy-1-(6'-methoxynaphth-2'-yl)-hept-6-en-3-on (1d)



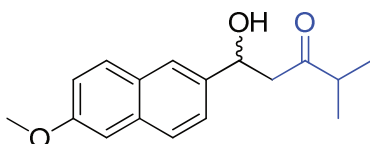
Ausbeute: 62%, Smp: 85 °C.

^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻-H), 7,48 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7⁻-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻-H), 5,78, (ddt, J = 16,7 Hz, 10,2 Hz, 6,9 Hz, 1H, 6-H), 5,42 (d, J = 4,6 Hz, 1H, OH), 5,14 (ddd, J = 8,9 Hz, 4,6 Hz, 4,6 Hz, 1H, 1-H), 4,97 (m, 2H, 7-H), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 2,85 (dd, J = 15,1 Hz, 8,8 Hz, 1H, 2-H_a), 2,70 (dd, J = 15,1 Hz, 4,6 Hz, 1H, 2-H_b), 2,59 (m, 2H, 4-H), 2,21 (dtd, J = 8,3, 6,9, 1,5 Hz, 2H, 5-H);

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 208,2 (C-3), 157,0 (C-6'), 140,3 (C-4a'), 137,6 (C-6), 133,4 (C-2'), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'), 124,9 (C-4'), 123,8 (C-3'), 118,5 (C-7'), 114,9 (C-7), 105,7 (C-5'), 69,0 (C-1), 55,1 (OCH_3), 51,9 (C-2), 41,6 (C-4), 36,9 (C-5);

HRMS (EI): $[\text{M}]^+$ m/z berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3$: 284,1411; gefunden: 284,1407.

1-Hydroxy-1-(6-methoxynaphth-2-yl)-4-methyl-pentan-3-on (1e)



Ausbeute: 52%, Smp: 83 °C.

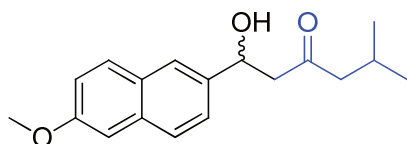
^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻-H), 7,48 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7⁻-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻-H), 5,42 (d, J =

4,6 Hz, 1H, OH), 5,14 (ddd, $J = 8,9$ Hz, 4,6 Hz, 1H, 1-H₁), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,83 (dd, $J = 15,1$ Hz, 8,8 Hz, 1H, 2-H_a), 2,70 (dd, $J = 15,1$ Hz, 4,6 Hz, 1H, 2-H_b), 2,61 (hept, $J = 9,6$ Hz, 1H, 4-H), 0,95 (dd, $J = 6,9$ Hz, 17,4 Hz, 6H, 4-Me-, 5-H);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 211,9$ (C-3), 157,0 (C-6'), 140,3 (C-4a'), 133,4 (C-2'), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'), 124,9 (C-4'), 123,8 (C-3'), 118,5 (C-7'), 105,7 (C-5'), 69,0 (C-1), 55,1 (OCH₃), 49,7 (C-2), 40,3 (C-4), 17,6 (C4-Me) 17,5(C-5);

HRMS (EI): [M]⁺ m/z berechnet für C₁₇H₂₀O₃: 272,1402; gefunden: 272,1407.

1-Hydroxy-1-(6-methoxynaphth-2-yl)-5-methyl-hexan-3-on (1f)



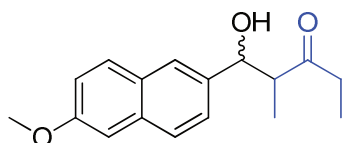
Ausbeute: 60%, Smp: 80 °C.

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): $\delta = 7,83$ -7,74 (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻H), 7,48 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻H), 7,28 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, 7⁻H), 7,15 (dd, $J = 8,9$ Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻H), 5,42 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, OH), 5,14 (ddd, $J = 8,9$ Hz, 4,6 Hz, 4,6 Hz, 1H, 1-H₁), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,83 (dd, $J = 15,1$ Hz, 8,8 Hz, 1H, 2-H_a), 2,70 (dd, $J = 15,1$ Hz, 4,6 Hz, 1H, 2-H_b), 2,32 (m, 2H, 4-H), 2,02 (ddq, $J = 13,4$ Hz, 6,7 Hz, 6,7 Hz, 1H, 5-H), 0,82 (dd, $J = 6,7$ Hz, 3,17 Hz, 6H, 5-Me-, 6-H);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 206,2$ (C-3), 157,0 (C-6'), 140,3 (C-4a'), 133,4 (C-2'), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'), 124,9 (C-4'), 123,8 (C-3'), 118,5 (C-7'), 105,7 (C-5'), 69,0 (C-1), 55,1 (OCH₃), 52,2 (C-2), 51,7 (C-4), 23,6 (C-5), 2x 22,3 (C5-Me, C-6);

HRMS (EI): [M]⁺ m/z berechnet für C₁₈H₂₀O₃ [M]⁺: 268,1451; gefunden: 268,1458.

1-Hydroxy-1-(6-methoxynaphth-2-yl)-2-methyl-pentan-3-on (1g)



Ausbeute: 66%, Smp: 97-98 °C.

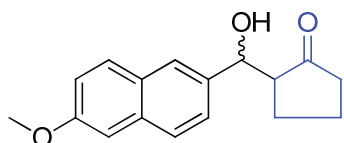
Isomerengemisch C1/C2 Cis:trans = 1:1,

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7,48 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 0,5 H, 3'-H_{trans}), 7,43 (dd, J = 8,6 Hz, 1,7 Hz, 0,5 H, 3'-H_{cis}), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7'-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5'-H), 5,45 (d, J = 4,4 Hz, 1H, OH), 4,97 (pt, J = 5,4 Hz, 1H, 1-H_{cis}), 4,66 (dd, J = 9,4 Hz, 4,0 Hz, 0,5H, 1-H_{trans}), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,91 (m, 1H, 2-H), 2,61 (m, 1H, 4-H_{cis}), 2,45 (dq, J = 18,1Hz, 7,1 Hz, 0,5H, 4-H_{trans A}), 2,25 (dq, J = 18,1Hz, 7,1 Hz, 0,5H, 4-H_{trans B}), 0,98 (m, 3H, 5-H_{cis} + 2_{cis}-CH₃); 0,68 (t, J = 7,0 Hz, 1,5H, 5-H_{trans}), 0,58 (d, J = 7,0 Hz, 1,5H, 2_{trans}-CH₃);

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 206,2 (C-3_{cis}), 206,2 (C-3_{trans}), 157,2 (C-6'_{trans}), 157,1 (C-6'_{cis}), 139,2 (C-4a'_{cis}), 138,8 (C-4a'_{trans}), 133,7 (C-2'_{trans}), 133,4 (C-2'_{cis}), 129,2 (C-8'), 128,1 (C-8a'), 126,6 (C-1'_{trans}), 126,3 (C-1'_{cis}), 125,4 (C-4'), 125,1 (C-3'_{cis}), 124,4 (C-3'_{trans}), 118,5 (C-7'), 105,7 (C-5'), 75,9 (C-1_{trans}), 73,3 (C-1_{cis}), 55,1 (OCH₃), 53,1 (C-2_{cis}), 52,6 (C-2_{trans}), 35,6 (C-4_{cis}), 34,3 (C-4_{trans}), 13,7 (C2-Me_{trans}) 11,3 (C2-Me_{cis}) 7,4 (C-5);

HRMS (EI): $[M]^+$ m/z berechnet für C₁₇H₂₀O₃: 272,1401; gefunden: 272,1407.

2-(Hydroxy(6-methoxynaphth-2-yl)methyl)cyclopentanon (1h)



Ausbeute: 43%, Smp: 131 °C.

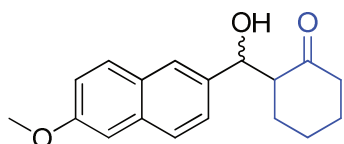
Isomerengemisch Cis:trans = 1:4,

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3): $\delta = 7,83\text{-}7,74$ (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻-H), 7,48 (dd, $J = 8,6$ Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻-H), 7,28 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, 7⁻-H), 7,15 (dd, $J = 8,9$ Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻-H), 5,42 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H, OH), 5,20 (m, $J = 4,4$ Hz, 0,8H, 1-H_{trans1,2^{''}}), 5,05 (dd, $J = 4,4$ Hz, 0,2H, 1-H_{cis1,2^{''}}), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,53 (m, 1H, 2⁻-H), 2,27-1,91 (m, 4H, cp), 1,60 (m, 2H, cp),

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 218,2$ (C_{cp}-1), 157,0 (C-6[']), 140,3 (C-4a[']), 133,4 (C-2[']), 129,2 (C-8[']), 128,1 (C-8a[']), 126,6 (C-1[']), 124,9 (C-4[']), 123,8 (C-3[']), 118,5 (C-7[']), 105,7 (C-5[']), 70,3 (C-1), 55,2 (OCH₃), 55,0 (C_{cp}-2), 39,1 (C_{cp}-5), 22,4 (C_{cp}-3), 20,5 (C_{cp}-4).

HRMS (EI): $[\text{M}]^+$ m/z berechnet für C₁₇H₁₆O₃: 270,1245; gefunden = 270,1250.

2-(Hydroxy(6-methoxynapht-2-yl-)methyl)cyclohexanon (1i)



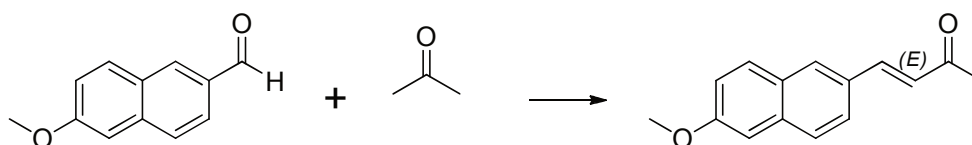
Ausbeute: 35%, Smp: 136 °C.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,70\text{-}7,43$ (m, 3H, 8⁻, 4⁻, 1⁻-H), 7,48 (dd, $J = 8,5$ Hz, 1,7 Hz, 1H, 3⁻-H), 7,28 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H, 7⁻-H), 7,15 (dd, $J = 8,9$ Hz, 2,6 Hz, 1H, 5⁻-H), 5,23 (d, $J = 4,1$ Hz, 0,2 H, OH_{trans}), 5,17 (d, $J = 4,6$ Hz, 0,2H, OH_{cis}), 5,06 (dd $J = 8,3$ Hz, 4,1 Hz, 0,8 H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OMe), 2,68 (m, 1H, Cy2-H), 2,37 (m 2H, Cy6-H) 1,81 – 1,14 (m, 6H, Cy3-, Cy4- Cy5-H);

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 218,2$ (C_{cp}-1), 157,0 (C-6[']), 140,3 (C-4a[']), 133,4 (C-2[']), 129,2 (C-8[']), 128,1 (C-8a[']), 126,6 (C-1[']), 124,9 (C-4[']), 123,8 (C-3[']), 118,5 (C-7[']), 105,7 (C-5[']), 71,7 (C-1), 57,7 (Cy-2), 55,2 (OMe), 41,0 (Cy-6), 29,9 (Cy-5), 27,7 (Cy-3), 22,8 (Cy-4),

HRMS (EI): $[\text{M}]^+$ m/z berechnet für C₁₈H₁₈O₃: 266,1287; gefunden 266,1301.

(E)-6'-Methoxynaphth-2'-ylidenaceton (3)



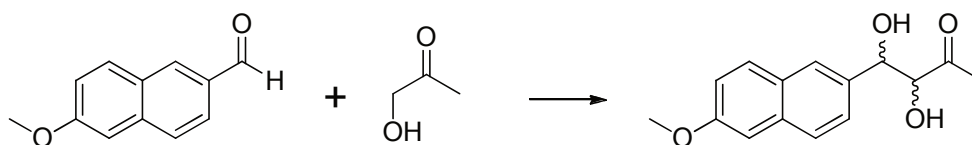
2,0 g (10 mmol) 6-Methoxynaphth-2-aldehyd werden in 50 ml trockenem Aceton gelöst und mit 0,5 ml 1N methanolischer Kalilauge versetzt. Die tieforange Lösung wird 2 Stunden zum Sieden erhitzt und anschließend im Vakuum zu Trockene eingengt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, filtriert und erneut eingengt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie gereinigt.

Ausbeute : 0.32 g (46%), farblose bis gelbliche Kristalle, Smp.: 119 °C

$^1\text{H-MNR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7,90 (m, 1H, 8'-H), 7,73-7,78 (m, 2H, 1', 3'-H), 7,67 (m, 1H, 4'-H), 7,63 (m, 1H, 4-H), 7,15-7,20 (m, 2H, 7', 5'-H), 6,80 (d, J = 16,2 Hz, 1H, 3-H), 3,95 (s, 3H, OCH_3), 2,42 (s, 3H, 1-H);

$^{13}\text{C-MNR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 196,5 (C-2), 159,7 (C-6'), 143,6 (C-4), 137,2 (C-4a'), 132,3 (C-2'), 131,1 (C-8'), 129,4 (C-8a'), 127,9 (C-1'), 127,1 (C-4'), 126,8 (C-3) 124,7 (C-3'), 119,6 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,4 (OCH_3), 31,5 (C-1).

4-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-3,4-Dihydroxybutan-2-on (4)



5,0 g (5,0 ml, 49 mmol) Hydroxyaceton werden in 10 ml Wasser gelöst und eine Lösung von 0,5 g (2,5 mmol) 6-Methoxynaphth-2-aldehyd in 2 ml THF zugegeben. Die entstehende Suspension wird mit einem Tropfen Pyrrolidin als Katalysator versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich ein dicker weißer Niederschlag bildet. Zur Aufarbeitung wird dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit PBS (3x30 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Es werden 15 ml n-Heptan zugegeben und am

Rotationsverdampfer bis zum Beginn einer Trübung eingengt. Das Rohprodukt wird über Nacht bei +2 °C gefällt und aus Toluol umkristallisiert.

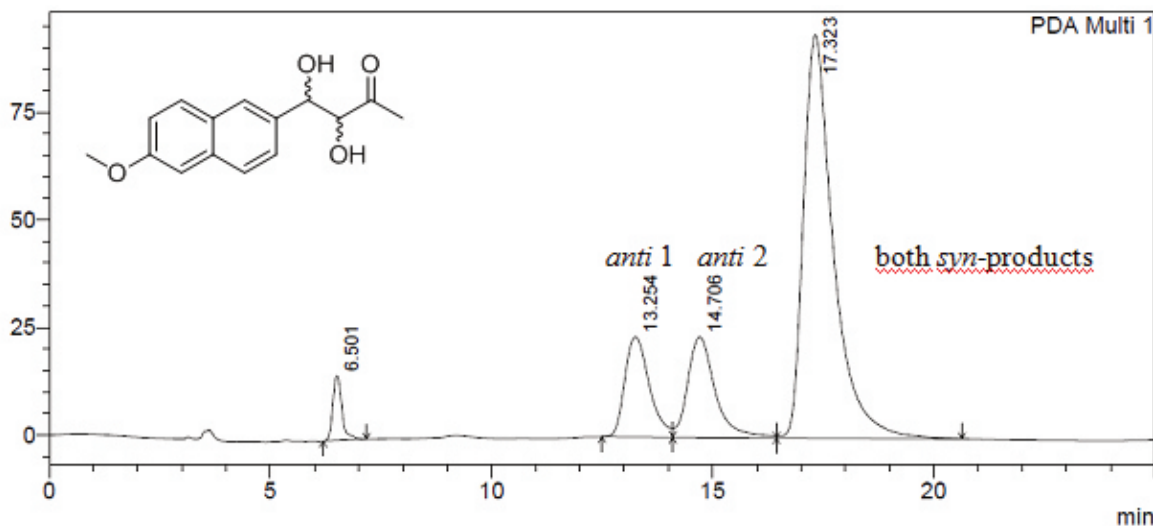
Das Produkt fällt als Isomerengemisch mit ca. 60% *syn* an.

Ausbeute : 0.53 g (76%), farblose Kristalle, Smp . 139-141 °C;

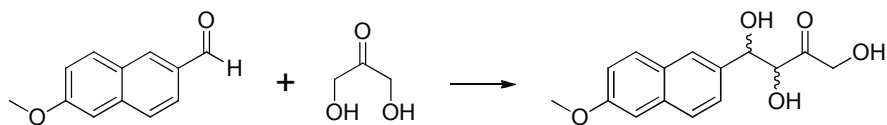
¹H-MNR (DMSO, 300 MHz): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7,48 (ddd, J = 8,6 Hz, 5,3 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3'-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7'-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5'-H), 5,64 (d, J = 4,8 Hz, 0,4H, 4-OH_{trans}), 5,50 (pt, J = 5,8 Hz, 2*0,5H, 4-OH_{cis} + 3-OH_{trans}), 5,10 (d, J = 6,6 Hz, 0,5H, 3-OH_{cis}), 5,05 (dd J = 5,8 Hz, 3,1 Hz, 0,6 H, 4-H_{cis}), 4,76 (dd J = 6,7 Hz, 4,8 Hz, 0,4 H, 4-H_{trans}), 4,15 (dd J = 6,6 Hz, 3,1 Hz, 0,6 H, 3-H_{cis}), 4,02 (dd J = 6,6 Hz, 5,8 Hz, 0,4 H, 3-H_{trans}), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,19 (s, 1,7H, 1-H_{cis}), 2,06 (s, 1,3H, 1-H_{trans});

¹³C-MNR (DMSO, 75 MHz): δ = 208,2 (C-2) 157,6 (C-6'), 120,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 126,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 128,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 94,9 (C-2), 75,2 (C-4), 55,3 (OCH₃), 26,2 (C-1).

HPLC(chiralpak IB,n-Hexan + 11% ⁱPrOH, 750 μ L/min) :



4-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-1,3,4-Trihydroxybutan-2-on (5)



Ausbeute: 55-65%, Smp: 151 °C.

2,0 g (22 mmol) Dihydroxyacetone (Dimer) werden in 20 ml Wasser gelöst und 5 min zum Sieden erhitzt. Es wird eine Lösung von 0,5 g (2,5 mmol) 6-Methoxynaphth-2-aldehyd in 2 ml THF zugegeben und wie oben beschrieben weiter verfahren.

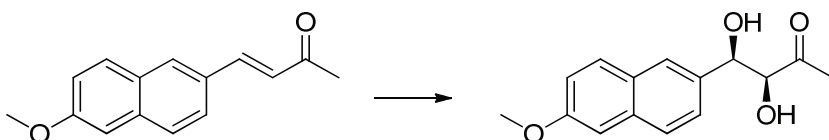
Ausbeute: 1,32 g (46%), farblose Kristalle, Smp.: Das Produkt ist äußerst hydrolyseempfindlich. Eine analytisch reine Probe ließ sich nicht gewinnen.

¹H-MNR (DMSO, 300 MHz): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,28 (m, 1H, 7'-H), 7,15 (m, 1H, 5'-H), 5,55 (m, 1H, 1-H), 5,25 (m, 1H, 3-H), 5,15 (m, 1H, 4-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 3,39 (br, 3H, OH)*, 2,19 (s, 2H, 1-H);

¹³C-MNR (DMSO, 75 MHz): δ = 200,4 (C-2) 157,6 (C-6'), 120,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 126,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 128,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 94,9 (C-3), 75,2 (C-4), 66,2 (C-1), 55,3 (OCH₃).

*Von Wasser überlagert

(3S,4R) -4-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-3,4-Dihydroxybutan-2-on ((3S,4R)-4)



Für die Synthese wurde zunächst ein „verbessertes AD-Mix“ hergestellt. 14 g käuflichem DA-Mix- β (Sigma-Aldrich) wurde zusätzliches Kaliumosmat zugegeben, dass der Gehalt an Osmat letztlich 1% beträgt. 2,5 g NaHCO₃ und 1,0 g Methylsulfonamid MeSO₂NH₂ wurden zugegeben und die Mischung in einem Becherglas gut gemischt.

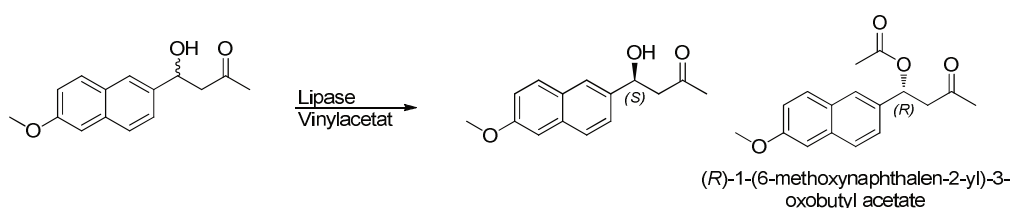
9 g dieser Mischung wurden in 50 mL einer 1:1-Mischung aus t-Butanol und Wasser gelöst und die Lösung im Umlauf-Wasserbad auf 0°C gekühlt (Messung der Temperatur in der Lösung).

1g (4,5 mmol) (E)-6'-Methoxynaphth-2'-ylidenaceton (**3**) gelöst in 3 ml Toluol wurden zugegeben und die Lösung bei 0°C für 24 h gerührt (DC –Kontrolle). 5 g Na₂S₂O₅ gelöst in ca. 50 ml Wasser wurden langsam zugesetzt und der entstehende Niederschlag mit Ethylacetat extrahiert. Die Extraktionslösung wurde über Natriumsulfat getrocknet, 15 mL n-Heptan zugegeben und am Rotationsverdampfer bis zum Beginn einer Trübung eingengt. Das Produkt wurde über Nacht bei +2 °C auskristallisiert.

Ausbeute: 0,52 g (45%), Weißes Pulver.

¹H-MNR (DMSO, 300 MHz): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8', 4', 1'-H), 7,48 (ddd, J = 8,6 Hz, 5,3 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3'-H), 7,28 (d, J = 2,6 Hz, 1H, 7'-H), 7,15 (dd, J = 8,9 Hz, 2,6 Hz, 1H, 5'-H), 5,50 (m, J = 5,8 Hz, 1H, 4-OH), 5,10 (d, J = 6,6 Hz, 0,5H, 3-OH), 5,08 (dd, J = 5,8 Hz, 3,1 Hz, 1 H, 4-H_{cis}), 4,12 (dd, J = 6,6 Hz, 3,1 Hz, 0,6 H, 3-H_{cis}), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,06 (s, 3H, 1-H);
¹³C-MNR (DMSO, 75 MHz): δ = 208,2 (C-2) 157,6 (C-6'), 120,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 126,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 128,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 94,9 (C-2), 75,2 (C-4), 55,3 (OCH₃), 26,2 (C-1).

6.7.2 Kinetische Racemattrennung mit Lipasen (Aldole)



Lipase screening:

In einem 2ml-Reaktionsgefäß aus PP wird 20 mg *rac*-Methodol in 1,5 ml Vinylacetat gelöst und mit einer geringen Menge einer Lipase versetzt. Das Reaktionsgefäß wird im Thermoschüttler auf 38 °C gehalten und alle 120 Minuten eine Probe von ca. 50 μ l entnommen. Die Probe wird in Vakuum zur Trockene eingengt, in 100 μ l THF aufgenommen und mittels chiraler HPLC vermessen. Tritt nach 4 Stunden keine Reaktion ein, so wird das Experiment noch einmal mit

der fünffachen Menge an Enzym wiederholt. Lipasen mit gutem Umsatz und hoher Selektivität werden dann für präparative Zwecke eingesetzt.

HPLC: DaiCel ChiralPak IB 4x250 mm, n-Hexan mit 10-11% iso-Propanol 750 μ L/min bei 35 bar, Detektion über UV-Absorption bei 330 nm

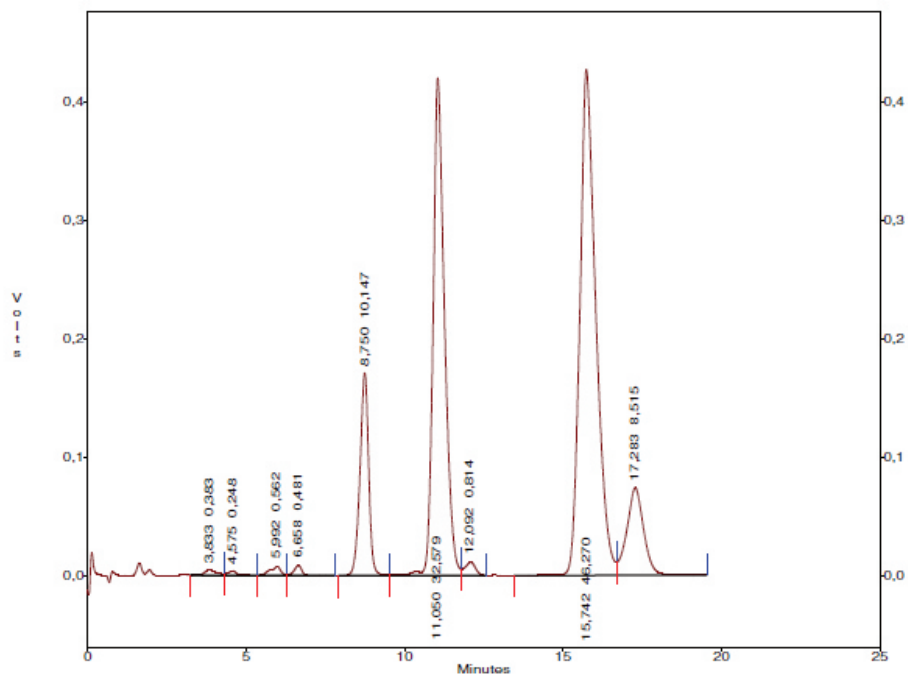


Abbildung 63: Chromatogramm der Prozesskontrolle (CAL-A, 24 h)

Tabelle 3: Zuordnung der peaks.

| Rt (min) | Substanz | Anteil (%) | Bemerkung |
|----------|-----------------------------|------------|-----------------------|
| 3,83 | 6-Methoxynaphth-2-aldehyd | 0,38 | Retro-Aldol Spaltung |
| 5,99 | Unbekannte Verunreinigung | 0,56 | Schon in der Kaufware |
| 6,65 | Unbekannte Verunreinigung | 0,48 | Schon in der Kaufware |
| 8,75 | (6'-MeO-)Naphthylidenaceton | 10,15 | Eliminierungsprodukt |
| 11,05 | Acetat des (R)-Methodols | 32,58 | - |
| 12,09 | Acetat des (S)-Methodols | 0,81 | - |
| 15,74 | (S)-Methodol | 46,27 | - |
| 17,28 | (R)-Methodol | 8,51 | - |

Preparative Racematspaltung:

Methode 1

Ausgehend von der Methode bei Nair et al.^[73] werden 2g racemisches Methodol in 50 mL Vinylacetat gelöst und in einem 100 mL Reaktionsgefäß mit Heizmantel magnetisch gerührt (schwebender Rührkern!). Über den Heizmantel wird die Temperatur auf 38 °C gehalten und die Temperatur zusätzlich über ein Innenthermometer kontrolliert. Es werden 3 g immobilisierte Lipase oder 0,5 g lyophilisiertes Pulver zugegeben, und die Reaktion mit HPLC überwacht. Nachdem ein Enantiomer umgesetzt ist (HPLC Kontrolle), wird das Enzym über einen Papierfilter entfernt und die Lösung zur Trockene eingengt und mit einer 50 ml heißen Mischung aus n-Hexan und Isopropanol (10:1) aufgenommen. Kaltes Isopropanol (ca. 15 mL) wird bis zum Beginn einer Trübung zugegeben und das Acetat auskristallisiert. Eine analytische Probe wurde zweimal aus Isopropanol umkristallisiert. Die Lösung wurde erneut zur Trockene eingengt und in wenig THF aufgenommen. (*S*)-Methodol wurde durch Zugabe von Heptan gefällt.

Methode 2

Nach der Methode von Tjosås et al.^[71] werden 2g racemisches Methodol in 100 mL einer 1:2 Mischung aus Toluol und n-Hexan gelöst. Wenn nötig wurden einige mL THF zur vollständigen Lösung zugegeben. 5 mL Vinylacetat und 2g Immobilisierte CAL-A (Sigma-Aldrich) wurden zugefügt und einem 100 mL Reaktionsgefäß mit Heizmantel magnetisch gerührt (KPG-Rührer). Über den Heizmantel wird die Temperatur auf 38 °C gehalten und die Temperatur zusätzlich über ein Innenthermometer kontrolliert. Die Reaktion mit HPLC überwacht. Und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Beide Methoden sind hinsichtlich Ausbeute und Reaktionsdauer vergleichbar und unterscheiden sich lediglich im Verbrauch an Vinylacetat.

(*S*)-4-Hydroxy-4-(6-methoxynaphth-2-yl)butan-2-on; (*S*)-Methodol ((*S*)-1a).

95%ee (HPLC), 33% isolated yield (*S*).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.83-7.74 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7.48 (dd, J = 8.6 Hz, 1,7 Hz, 1H, 3'-H), 7.28 (d, J = 2.6 Hz, 1H, 7'-H), 7.15 (dd, J = 8.9 Hz, 2.6 Hz, 1H, 5'-H), 5.42 (d, J = 4.6 Hz, 1H, OH), 5.14 (dt, J = 8.9 Hz, 4.6 Hz, 1H, 4-H), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 2.82 (m, 2H, 3-H), 2.14 (s, 3H, 1-H);

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 208.2 (C-2), 157.0 (C-6'), 140.3 (C-4a'), 133.4 (C-2'), 129.2 (C-8'), 128.1 (C-8a'), 126.6 (C-1'), 124.9 (C-4'), 123.8 (C-3'), 118.5 (C-7'), 105.7 (C-5'), 69.0 (C-4), 55.1 (OCH_3), 52.8 (C-3), 30.4 (C-1).

(*R*)-4-Acetoxy-4-(6-methoxynaphth-2-yl)butan-2-on; (*R*)-Methodolacetat ((*R*)-6)

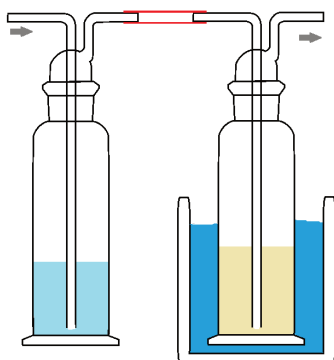
Ausbeute: 35%, Smp: 123 °C.

^1H -NMR (300MHz, CDCl_3): δ = 7,83-7,74 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,28 (m, 1H, 7'-H), 7,15 (m, 1H, 5'-H), 6,32 (m, 1H, 4-H), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,18 (dd, $J = -16,5$ MHz, 6,5 Hz, 1H, 3-Ha), 2,93 (m, 1H, 3-Hb), 2,21 (s, 3H, Ac-CH_3) 2,09 (s, 3H, 1-H);

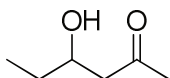
^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 208,2 (C-3), 172,3 (Me-CO_2) 157,6 (C-6'), 120,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 126,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 128,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 70,2 (C-4), 55,3 (OCH_3), 52,9 (C-3), 29,2 (C-1), 22,5 (Ac-CH_3).

6.7.3 Aldolreaktion (Gastrom-Variante)

In die zweite zweier hintereinander geschaltete Waschflaschen werden 30 ml trockenes Keton gegeben und mit 5 ml 1M KOH in Methanol versetzt, in die erste werden 30 ml frisch destilliertes Propanal gegeben. Die hintere Flasche wird mit Eis/Salz-Mischung auf $T \leq 0$ °C gehalten und der Aldehyd mittels eines langsamen Argonstroms überführt (Aufbauschema unten). Nach 30 Minuten wird Oxalsäure Dihydrat (0,88 g, 7 mmol) gelöst in 5 ml MeOH zugegeben und das gebildete Kaliumsalz abfiltriert. Nach Entfernen der Lösemittel wird im (Hoch-)Vakuum fraktioniert.



4-Hydroxyhexan-2-on (7)

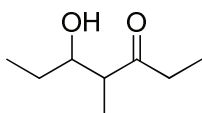


Sdp.: 40 °C / 0,3 mbar. Ausbeute 50 - 65 % bezogen auf Aceton, Produkt enthält 10-15% Diaceton-alkohol.

$^1\text{H-MNR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 3,91 (m, 1H, 4-H), 3,27 (b, 1H, OH) 2,56 (m, 2H, 3-H), 2,13 (s, 1H, 1-H), 1,46 (m, 2H, 5-H), 0,89 (t, $^3J_{5,6}=7,4$ Hz, 3H, 6-H).

$^{13}\text{C-MNR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 210,1 (C-2), 49,0 (C-3), 30,2 (C-1), 25,9 (C-5) 8,2 (C-6).

5-Hydroxy-4-Methyl-heptan-3-on (10)



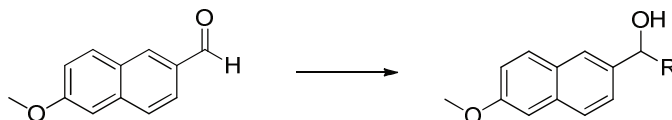
Sdp.: 75 °C / 0,3 mbar. Ausbeute 65 % bezogen auf Aceton,

$^1\text{H-MNR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 3,62 (dt, J = 7,5Hz, 0,85H *syn*-2-H), 3,53 (dt, J = 7,5Hz, 0,15H, *anti*-2-H), 2,59 (m, 1H, 4-H), 2,49 (dq, $J=6,5$ Hz, 2H, 1), 1,33 (m, 2H, 5-H), 1,00 (d, $J=7$ Hz, 3H, 7-H), 0,93 (m, 6H, 1-, 6-H),

$^{13}\text{C-MNR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 212,1 (C-3), 73,2 (C-5), 48,3 (C-4), 33,8 (C-2), 25,9 (C-6), 12,3 (C-4a), 11,0 (C-7), 8,3 (C-1).

6.8 Transaminase Substrate

6.8.1 AAV Grignard Reaktion Methode 1 (11b-d)



Magnesiumspähne (0,5 g, 22 mmol) werden in einem Mörser unter Heptan verrieben um die Oberfläche zu aktivieren und anschließen in einen Rundkolben Tropftrichter und Metallkühler unter Argon-atmosphäre überführt und mit 20 ml abs. Diethylether überschichtet. Unter Rühren werden 25 mmol Alkylbromid in 20 ml abs. Diethylether so zugetropft, dass die Lösung selbstständig gelinde siedet. Nach abklingen der Reaktion wird noch eine Stunde zu Sieden erhitzt und anschließend 6-Methoxynaphth-2-aldehyd (3.0 g, 17 mmol) in 5 ml abs. THF vorsichtig zugetropft. Nach Ende der Reaktion wird mit ges. NH_4Cl Lösung gequench und 20 ml Wasser zu besseren Phasentrennung zugegeben. Die wässrige Phase wird dreimal mit 25ml Ethylacetat gewaschen und die organischen Phasen vereinigt. Die Organik wird mit Natriumsulfat getrocknet, mit Aktivkohle entfärbt und im Vakuum zur Trockene eingeengt. Das Rohprodukt wird in einer Mischung aus 20 ml THF und 10 ml n-Heptan und gelöst, bis zu einer Trübung eingeengt und der Alkohol über Nacht bei 2 °C auskristallisiert.

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)propan-1-ol (11b):

Ausbeute : 1,87 g (76%), farblose Kristalle, Smp . 71 °C;

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7,70-7,43 (m, 3H, 8'-, 4'-, 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,15 (m, 2H, 5'-, 7'-H), 4,67 (t, J = 6,5 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 2,19 (br, 1H, OH) 1,85 (m, 2H, 2-H), 0,91 (t, J = 7,5 Hz, 3H, 3-H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 157,6 (C-6'), 140,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 128,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 124,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 76,2 (C-1), 55,3 (OCH_3), 34,9 (C-2), 10,2 (C-3).

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)butan-1-ol (11c):

Ausbeute: 1,74 g (75%), Farblose Kristalle, Smp. 75 °C;

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,70-7,43 (m, 3H, 8', 4', 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,15 (m, 2H, 5', 7'-H), 4,67 (t, J = 6,5 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 1,95-1,76 (m, 2H, 2-H), 1,72 (br, 1H, OH), 1,53-1,40 (m, 2H, 3-H), 1,38 (t, J = 7,2 Hz, 3H, 4-H);

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 157,6 (C-6'), 140,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 128,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 124,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 74,5 (C-1), 55,5 (OCH₃), 41,1 (C-2), 19,1 (C-3), 14,0 (C-4).

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)-2-methylpropan-1-ol (11d):

Ausbeute 1,23 g (50%) Farblose Kristalle Smp. 73 °C.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,70-7,43 (m, 3H, 8', 4', 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,15 (m, 2H, 5', 7'-H), 4,67 (t, J = 6,5 Hz, 1H, 1-H), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 2,06 (m, 2H, 2-H), 1,92 (b, 1H, OH), 1,04 (d, J = 7Hz, 3H, 3-H), 0,82(d, J =7Hz, 3H, 3a-H);

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ = 157,6 (C-6'), 140,0 (C-2'), 134,1 (C-4a'), 129,4 (C-8'), 128,7 (C-1'), 127,1 (C-4'), 124,7 (C-3'), 124,5 (C-8a'), 118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 74,5 (C-1), 55,5 (OCH₃), 35,2 (C-2), 19,1(C-3), 18,4(C-3a).

6.8.2 AAV Grignard Reaktion an Methode 2 (11e-f)

Unter Argon wird 6-Methoxynaphth-2-aldehyd (2.0 g, 11 mmol) in 30 ml abs. THF gelöst und bei 0°C mit einer Lösung der aromatischen Grignard-Komponente in THF (12 mmol) versetzt. Nach einer Stunde wird die Reaktion durch Zugabe von 5 ml ges. Ammoniumchloridlösung und 10 ml Wasser gestoppt und das Reaktionsgemisch mit THF extrahiert (3 x 30 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird aus Toluol/n-Heptan umkristallisiert.

(6-Methoxynaphth-2-yl)(phenyl)methanol (11e)

Ausbeute: 1,73 g (60%) Farblose Kristalle Smp. 67 °C.

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ = 7,80-7,43 (m, 3H, 8', 4', 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,39-7,21 (m, 5H, Ph), 7,15 (m, 2H, 5', 7'-H), 5,97 (s, 1H, 1-H), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 2,23 (b, 1H, OH);

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 157,6 (C-6'), 143,8 (C-1''), 138,9 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,5 (C-8'), 128,7 (C-8a'), 128,5 (C-3'' 2x), 127,6 (C-3'), 127,2 (C-1'), 126,6 (C-2'' 2x), 125,3 (C-4''), 125,0 (C-4'), (118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 76,3 (C-1), 55,5 (OCH_3).

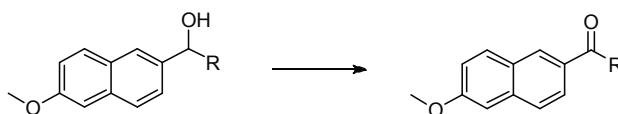
1-(6-Methoxynaphth-2-yl)-2-phenylethan-1-ol (11f)

Ausbeute: 1,82 g (61%) Farblose Kristalle Smp. 133 °C.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3): δ = 7,80-7,43 (m, 3H, 8', 4', 1'-H), 7,41 (m, 1H, 3'-H), 7,39-7,21 (m, 5H, Ph), (7,15 (m, 2H, 5', 7'-H), 5,97 (s, 1H, 1-H), 3,92 (s, 3H, OCH_3), 3,02 (m, 2H, 2-H), 1,37 (b, 1H, OH);

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3): δ = 157,6 (C-6'), 143,8 (C-1''), 138,9 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,5 (C-8'), 128,7 (C-8a'), 128,5 (C-3'' 2x), 127,6 (C-3'), 127,2 (C-1'), 126,6 (C-2'' 2x), 125,3 (C-4''), 125,0 (C-4'), (118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 76,3 (C-1), 55,5 (OCH_3), 46,0 (C-2).

6.8.3 AAV Jones-Oxidation zu (6'-Methoxynaphth-2'-yl)-ketonen 12 b-f



22 mmol des aromatischen Alkohols werden in 40 frisch destilliertem Aceton gelöst und die Lösung in Eis-Kochsalz Mischung auf 0 °C gekühlt. Unter Argon werden 18 ml einer 2M Lösung von CrO_3 in 30% H_2SO_4 langsam zugetropft, so dass die Innentemperatur unter 5 °C bleibt. Sollte organisches Material ausfallen, wird weiter Aceton zugesetzt. Nach einer Stunde wird überschüssiges Chrom(VI) mit Natriumsulfitlösung vernichtet. Das Rohprodukt wird durch Zugabe von Wasser gefällt und ab filtriert. Der Rückstand wird in Ether gelöst und die Lösung der Reihe nach mit 10% Natriumcarbonatlösung, Wasser und Brine gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wird aus Wasser/Ethanol umkristallisiert.

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)propan-1-on „Promene®“ (12b):

Ausbeute: 4,46 g (90%), farblose Kristalle, Smp.: 112 °C (Lit.:^[93a] 111,5 °C);

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,42 (d, J = 1,7 Hz 1H, 3'-H), 8,04 (dd, J = 8,7, 1,8 Hz, 1H, 8'-H), 7,86 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 1'-H), 7,78 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 4'-H), 7,18 (m, 2H, 5', 7'-H), 3,96 (s, 3H, OCH₃), 3,12 (q, J = 7,3 Hz, 2H, 2-H), 1,30 (t, J = 7,3 Hz, 3H, 3-H);

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ = 200,5 (C-1), 159,7 (C-6'), 137,2 (C-4a'), 132,3 (C-2'), 131,1 (C-8'), 129,4 (C-8a'), 127,9 (C-1'), 127,1 (C-4'), 124,7 (C-3'), 119,6 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,4 (OCH₃), 31,7 (C-2), 8,5 (C-3).

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)butan-1-on (12c):

Ausbeute: 4,26 g (86%), farblose Kristalle, Smp.: 88 °C (Lit:^[102] 89-90 °C);

¹H-MNR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,42 (d, J = 1,7 Hz 1H, 1'-H), 8,04 (dd, J = 8,7, 1,8 Hz, 1H, 8'-H), 7,86 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 3'-H), 7,78 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 4'-H), 7,18 (m, 2H, 5', 7'-H), 3,96 (s, 3H, OCH₃), 3,05 (t, J = 7,3 Hz, 2H, H-2), 1,82 (m, 2H, H-3), 1,10 (t, J = 7,2 Hz, 3H, H-4);

¹³C-MNR (75 MHz, CDCl₃): δ = 200,5 (C-1), 159,7 (C-6'), 137,2 (C-4a'), 132,3 (C-2'), 131,1 (C-8'), 129,4 (C-8a'), 127,9 (C-1'), 127,1 (C-4'), 124,7 (C-3'), 119,6 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,4 (OCH₃), 40,4 (C-2), 18,0 (C-3), 14,0 (C-4).

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)-2-methylpropan-1-on (12d):

Ausbeute: 1,56 g (76%), farblose Kristalle, Smp.: 56 °C (Lit: 57-59 °C^[102]),

¹H-MNR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,42 (d, J = 1,7 Hz 1H, 1'-H), 8,04 (dd, J = 8,7 Hz, 1,8 Hz, 1H, H-8'), 7,86 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 3'-H), 7,78 (d, J = 8,7 Hz, 1H, 4'-H), 7,18 (m, 2H, 5', 7'-H), 3,96 (s, 3H, OCH₃), 3,50 (h, J = 7,2 Hz, 2H, H-2), 1,58 (dt, J = 7,5 Hz, 6H, H-3, H-3a)

¹³C-MNR (75 MHz, CDCl₃): δ = 204,2 (C-1), 159,7 (C-6'), 137,2 (C-4a'), 132,3 (C-2'), 131,1 (C-8'), 129,4 (C-8a'), 127,9 (C-1'), 127,1 (C-4'), 124,7 (C-3'), 119,6 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,4 (OCH₃), 35,2 (C-2), 19,4 (C-3, C-3a).

(6-Methoxynaphth-2-yl)(phenyl)keton (12e)

Ausbeute: 2,46 g (76%), farblose Kristalle, Smp.: 84 °C

¹H-MNR (300 MHz, CDCl₃): δ = 8,22 (d, J = 1,7 Hz 1H, 1'-H), 7,86 (dd, J = 8,7 Hz, 1,8 Hz, 1H, H-8'), 7,54 (m, 4H, 4', 3', 2''(2x)-H), 7,24 (m, 1H, 4''-H), 7,21 (m, 2H, 3''-H(2x)), 7,20 (m, 2H, 5', 7'-H), 3,97 (s, 3H, OCH₃);

^{13}C -MNR (75 MHz, CDCl_3): δ = 196,6 (C-1), 159,7 (C-6'), 138,2 (C-1''), 137,0 (C-4a'), 132,4 (C-4''), 132,1 (C-2'), 131,9 (C-8'), 131,0 (C-2'' 2x), 130,0 (C-3'' 2x), 128,4 (C-8a'), 127,0 (C-1'), 126,6 (C-4'), 124,7 (C-3'), 119,7 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,4 (OCH_3).

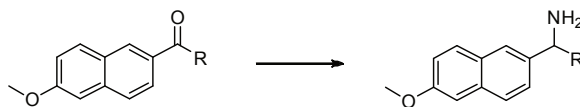
1-(6-Methoxynaphth-2-yl)-2-phenylethan-1-on (12f)

Ausbeute: 1,46 g (46%), orange Kristalle, Smp.: 115 °C.

^1H -MNR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8,49 (m, 1H, 1'-H), 8,00 (dt, $J=8,7$ Hz, 1,2 Hz, 1H, H-8'), 7,77(d, $J = 8,9$ Hz 1H, 4'-H),), 7,35 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, 3'-H), 7,36(m, 1H, 5'-H), 7,33 (m, 3H, 7'', 3''-H(2x)), 7,28-7,16(m, 3H, 4'',2''-H(2x)), 4,33 (s, 2H, 2-H), 3,89 (s, 3H, OCH_3);

^{13}C -MNR (300 MHz, CDCl_3): δ = 197,3 (C-1), 159,8 (C-6'), 137,3 (C-4a'), 134,9 (C-1''), 132,0 (C-2'), 131,2 (C-4''), 130,3(C-8'), 129,5 (C-2'' 2x), 128,7 (C-3'' 2x), 127,8 (C-8a'), 127,2 (C-1'), 126,8 (C-4'), 125,0 (C-3'), 119,7 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,4 (OCH_3), 45,4 (C-2).

6.8.4 AAV Reduktive Aminierung



Unter Argon werden 6-Methoxynaphth-2-yl-keton(20 mmol) mit Titanium(IV)isopropylat (12ml, 40 mmol) suspendiert und für 15 min bei RT. gerührt. 55 ml trockenes Ethanol wird bei -20 °C mit Ammoniak gesättigt bis zu einer Konzentration von ca. 2M. und rasch zu der Suspension gegeben. Die Mischung bei RT. für 16 Stunden gerührt. Danach werden 1.1g (26mmol) Natriumborhydrid zugegeben und weitere 3 Stunden gerührt. Die Lösung wird mit wässriger Ammoniaklösung (2 M, 50 mL) gequenchet. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer entfernt und der weiße pastöse Rückstand mit Ethylacetat extrahiert (3 x 75 mL). Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in MTBE gelöst (ca. 25 ml/g). Unter Verwendung einer Einweg-Glaspipette als Düse wird für 10 Sekunden ein Strom trockenen HCl-Gases eingeleitet. Als ausgefallene Hydrochlorid wird über eine G3 Fritte abgesaugt und mit Ether säurefrei gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum werden die Hydrochloride bei -18 °C gelagert. Eine analytische Probe wird aus trockenem Aceton umkristallisiert. Ein Scale-up bis 15 g (100 mmol) war für 1-(6-Methoxynaphth-2-yl)ethylamin erfolgreich.

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)ethyl amin • HCl (*rac*-13a):

Ausbeute: 3.42 g (85%), farblose Kristalle, Smp. 220°C.

¹H-MNR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,63 (br, 3H, NH), 7,95 (m, J = 12,0 Hz, 1H, 8'-H), 7,84 (dd, J = 8,7, 16,0 Hz, 2H, 1'-, 4'-H), 7,66 (dd, J = 8,8, 1,9 Hz, 1H, 3'-H), 7,35 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 7'-H), 7,20 (dd, J = 2,5, 8,8 Hz, 1H, 3'-H), 4,50 (q, J = 6,7 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 1,60 (d, J = 6,7 Hz, 3H, 2-H);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157,6 (C-6'), 134,3 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,3 (C-8'), 128,0 (C-1'), 127,2 (C-4'), 125,7 (C-3'), 125,1 (C-8a'), 119,1 (C-7'), 105,8 (C-5'), 55,2 (OCH₃), 50,0 (C-1), 20,6 (C-2);

HRMS (EI): [M]⁺ m/z berechnet für C₁₄H₁₇NO: 201,1154; gefunden 201,1165.

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)propyl amin • HCl (*rac*-13b):

Ausbeute: 2.6 g (65%), farblose Kristalle, Smp. 255-257°C.

¹H-MNR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,63 (br, 3H, NH), 7,95 (m, J = 12,0 Hz, 1H, 8'-H), 7,84 (dd, J = 8,7, 16,0 Hz, 2H, 4'-, 1'-H), 7,66 (dd, J = 8,8, 1,9 Hz, 1H, 3'-H), 7,35 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 7'-H), 7,20 (dd, J = 2,5, 8,8 Hz, 1H, 3'-H), 4,50 (q, J = 6,7 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,08 (m, 1H, H-2), 1,94 (m, 1H, H-2), 0,76 (t, J = 7,5 Hz, 3H, 3-H);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157,6 (C-6'), 134,3 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,3 (C-8'), 128,0 (C-1'), 127,2 (C-4'), 125,7 (C-3'), 125,1 (C-8a'), 119,1 (C-7'), 105,8 (C-5'), 55,2 (OCH₃), 52,2 (C-1), 27,2 (C-2), 10,0 (C-3);

HRMS (EI): [M]⁺ m/z berechnet für C₁₄H₁₇NO: 215,1310; gefunden 215,1304.

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)butyl amin • HCl (*rac*-13c):

Ausbeute: 2,7 g (65%), farblose Kristalle, Smp. 272-273°C.

¹H-MNR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ = 8,63 (br, 3H, NH), 7,95 (m, J = 12,0 Hz, 1H, 8'-H), 7,84 (dd, J = 8,7, 16,0 Hz, 2H, 4'-, 1'-H), 7,66 (dd, J = 8,8, 1,9 Hz, 1H, 3'-H), 7,35 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 7'-H), 7,20 (dd, J = 2,5, 8,8 Hz, 1H, 3'-H), 4,50 (q, J = 6,7 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 1,24 (m, 1H, 2-H), 1,13 (m, 1H, 3-H), 0,86 (t, J = 7,5 Hz, 3H, 4-H);

¹³C-MNR (CDCl₃, 75 MHz) δ = 157,6 (C-6'), 134,3 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,3 (C-8'), 128,0 (C-1'), 127,2 (C-4'), 125,7 (C-3'), 125,1 (C-8a'), 119,1 (C-7'), 105,8 (C-5'), 56,2 (OCH₃), 54,4 (C-1), 36,7 (C-2), 18,5 (C-3), 13,4 (C-4);

HRMS (EI): [M]⁺ m/z berechnet für C₁₅H₁₉NO: 229,1467; gefunden: 229,1479.

1-(6-Methoxynaphth-2-yl)-2-methylpropyl-1-amin•HCl (*rac*-13d):

Ausbeute: 1.6 g (42%), farblose Kristalle, Smp. 245-247°C.

¹H-MNR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 8,53 (br, 3H, NH), 7,95 (m, J = 12,0 Hz, 1H, 8'-H), 7,84 (dd, J = 8,7, 16,0 Hz, 2H, 4'-, 1'-H), 7,66 (dd, J = 8,8, 1,9 Hz, 1H, 3'-H), 7,35 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 7'-H), 7,20 (dd, J = 2,5, 8,8 Hz, 1H, 3'-H), 4,25 (q, J = 6,7 Hz, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 2,28 (m, 1H, H-2), 1,04 (m, 3H, C2-CH₃), 0,86 (t, J = 7,5 Hz, 3H, 3-H);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157,6 (C-6'), 134,3 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,3 (C-8'), 128,0 (C-1'), 127,2 (C-4'), 125,7 (C-3'), 125,1 (C-8a'), 119,1 (C-7'), 105,8 (C-5'), 60,6 (C-1), 55,2 (OCH₃), 32,0 (C-2), 19,4 (C2-CH₃), 18,7 (C-3).

(6-Methoxynaphth-2-yl)(phenyl)methyl amin•HCl (*rac*-13e):

Ausbeute: 0.65 g (25%), farblose Kristalle, Smp. 255°C(Zersetzung).

¹H-MNR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 9,13 (br, 3H, NH), 7,95 (m, J = 12,0 Hz, 1H, 8'-H), 7,84 (dd, J = 8,7, 16,0 Hz, 2H, 3'-, 4'-H), 7,56 (m, 1H, 1'-H), 7,54 (m, 2H, 3''-H), 7,35 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 7'-H), 7,33 (m, 1H, 4''-H), 7,22 (m, 2H, 2''-H), 7,18 (dd, J = 2,5, 8,8 Hz, 1H, 3'-H), 5,71 (m, 1H, 1-H), 3,88 (s, 3H, OCH₃);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157,6 (C-6'), 138,8 (C-1''), 134,3 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,3 (C-8'), 128,8 (C-3'' 2x), 128,0 (C-1'), 127,4 (C-4''), 127,3 (C-2'' 2x), 125,9 (C-4'), 125,4 (C-3'), 125,1 (C-8a'), 119,1 (C-7'), 105,8 (C-5'), 57,3 (C-1); 55,2 (OCH₃).

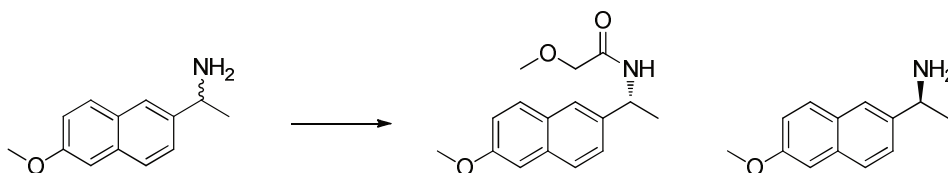
1-(6-Methoxynaphth-2-yl)-2-phenylethyl-1-amin•HCl (*rac*-13f):

Ausbeute: 0.85 g (35%), farblose Kristalle, Smp. 275°C(Zersetzung).

¹H-MNR: (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 9,13 (br, 3H, NH), 7,84 (dd, J = 8,7, 16,0 Hz, 2H, 3'-, 4'-H), 7,66 (dd, J = 8,8, 1,9 Hz, 1H, 1'-H), 7,45 (d, J = 2,5 Hz, 1H, 7'-H), 7,39-7,21 (m, 5H, Ph), 7,20 (dd, J = 2,5, 8,8 Hz, 1H, 3'-H) 5,97 (s, 1H, 1-H), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,02 (m, 2H, 2-H), 1,37 (b, 1H, OH);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 157,6 (C-6'), 143,8 (C-1''), 138,9 (C-2'), 134,0 (C-4a'), 129,5 (C-8'), 128,7 (C-8a'), 128,5 (C-3'' 2x), 127,6 (C-3'), 127,2 (C-1'), 126,6 (C-2'' 2x), 125,3 (C-4''), 125,0 (C-4'), (118,9 (C-7'), 105,7 (C-5'), 56,3 (C-1), 55,5 (OCH₃), 46,0 (C-2).

6.8.5 Racemattrennung von 1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-ethylamin (13a)



In einem 500ml Erlenmeyerkolben werden 10g (42 mmol) of racemisches Amine-HCl in 250 ml MTBE mit 15 ml 4N NaOH (60 mmol) für 15 min kräftig gerührt. Die Phasen werden getrennt, die organische mit 100ml Wasser gewaschen und über Natriumcarbonat getrocknet. In einem temperierbaren Kolben mit KPG-Rührer werden zu der etherischen Lösung des Amins 8 ml (62 mmol) Isopropyl- methoxyacetate 7 g *candida antarctica* Lipase Typ B immobilisiert auf *imobeads* (Novozym 435, BASF) zugegeben und die Mischung unter Argon bei 42-45 °C für ca. 40 h gerührt. Die Reaktion wird mittels Chiraler HPLC überwacht. Während der Reaktion bildet sich ein weißer Niederschlag aus Methoxyacetat des (*S*)-Amins; das (*R*)-Methoxyacetamid bleibt in Lösung. Wenn das (*R*)-Amin aufgebraucht ist. Wird die Mischung durch eine Glasfritte filtriert. Das Filtrat wird auf 0 °C gekühlt und mit HCl Gas gesättigt, um restliche Amine auszufällen, die verworfen werden. Einengen zu Trokene liefert das (*R*)-Amid zu 45% mit >95% ee.

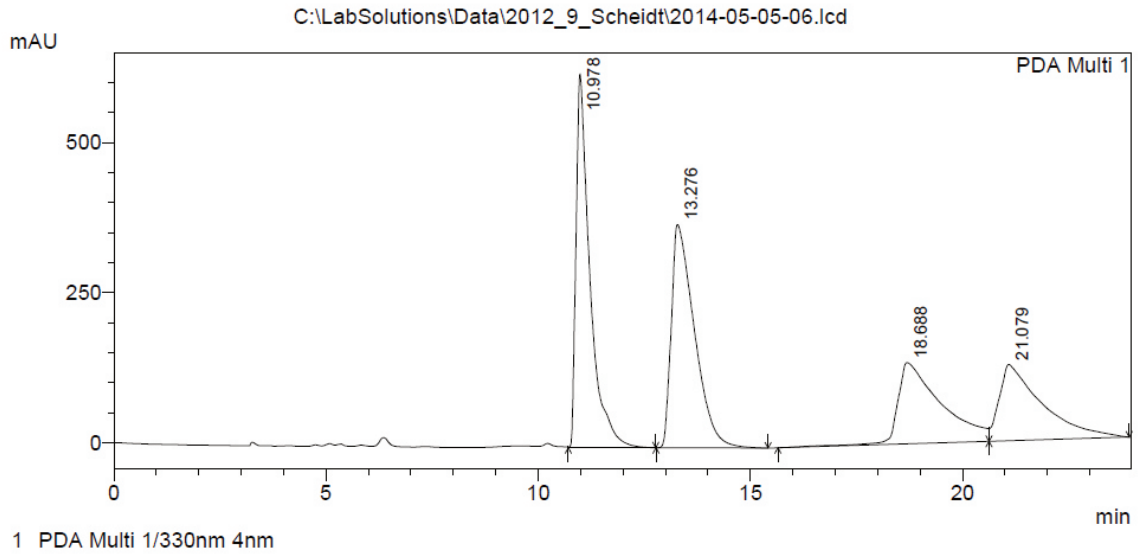
Der Rückstand der ersten Filtration wird mit Wasser behandelt, um das (*S*)-Amin von den *enzyme beads* zu trennen. Die Lösung wird mit NaOH auf pH > 10 gebracht und das Amin mit MTBE extrahiert. Die organische Phase wurde getrocknet und das (*S*)-Amin-Hydrochlorid gefällt wie unter 3.4.8 beschrieben. Ausbeute: 50 % (*S*)-Amine mit >99%ee.

Ausbeute: 4,7 g (45%), bräunliches Pulver, Smp. 94°C; Die NMR-Daten entsprechen der Referenzsubstanz (s. u.).

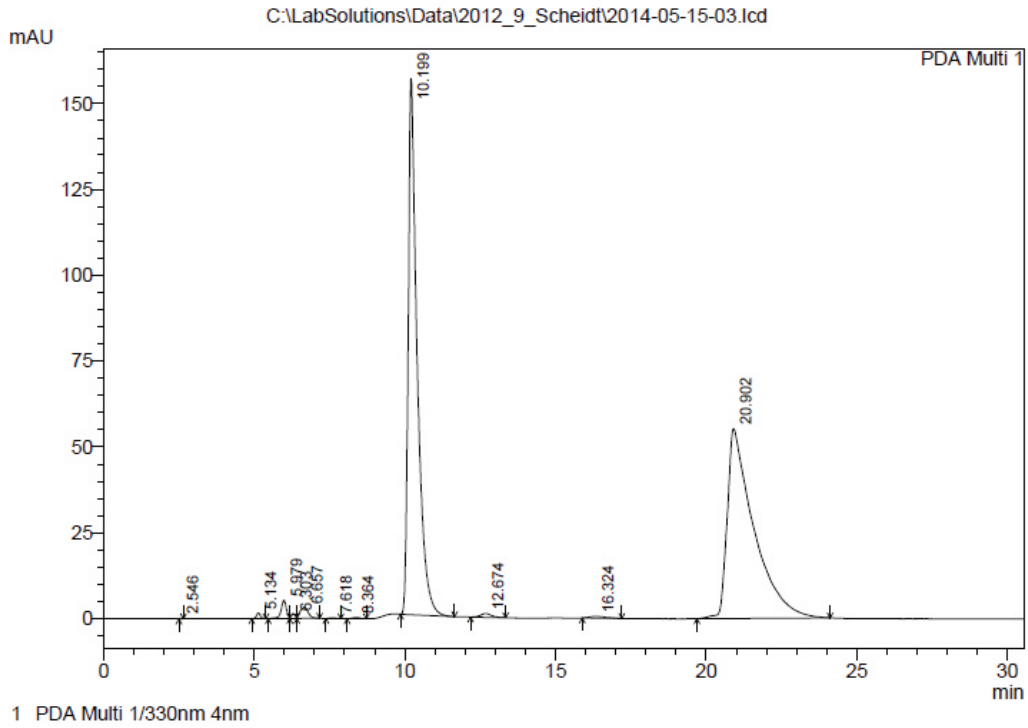
Hinweis: Für größere Alkylreste ist die Verwendung von CAL-A oder Lipase PS sinnvoll.

HPLC: (Column ChiralPac IB, mobile Phase: n-Hexan/Isopropanol/TFA 100/11/0.5, Flussrate 1,3 mL/min, Absorption bei 330 nm): 10.2 min = (*R*)-Amid, 12.6 min = (*S*)-Amid, 20.9 min (*S*)-Amin-HCl, 24.8 min = (*R*)-Amin-HCl.

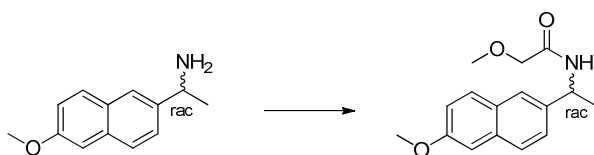
<Chromatogram>



<Chromatogram>



(rac) – Methoxyacetamid; Referenzsubstanz (rac -14a)



Die Reaktion wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss (Lichtschutz durch Aluminiumfolie) geführt.

In einem mit Aluminiumfolie umwickelten 50ml Schlenkkolben werden 1 Äquivalent Amin-HCl und 1 Äquivalent TEA in getrocknetem DMF gelöst. Nach 15 min Rühren werden 1.2 ~ 1.5 Äquivalente der entsprechenden Methoxyessigsäure zu der Reaktionsmischung gegeben. Es wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt und 1.1 Äquivalente 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt) gefolgt von 1.2 Äquivalent *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) zu der Mischung gegeben. Die Reaktionsmischung wird in der Kälte bei 0 °C gerührt bis die DC-Kontrolle keinen weiteren Umsatz anzeigt.

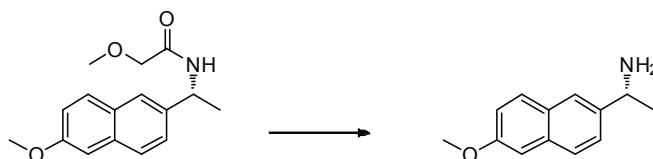
Zur Aufarbeitung wird die Mischung über eine Fritte abgesaugt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Hochvakuum wird der Rückstand in MTBE aufgenommen und durch eine kurze Flash-Kieselgelsäule aufgereinigt. Man erhält das gewünschte Produkt als ein Gemisch der beiden Enantiomere.

Ausbeute: 0,37 g (75%), bräunliches Pulver, Smp. 94°C.

¹H-MNR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,71 (m, 3H, 8', 4', 3'-H), 7,69 (dd, J = 8,8, 1,9 Hz, 1H, 1'-H), 7,15 (m, 2 H, 7', 5'-H), 6,83 (bd, J = 8,5 Hz, 1H, NH), 5,33 (dq, J = 8,5 Hz, J = 6,9 Hz, 1H, 1-H), 3,98 (s, 1H, 2''-H), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,41 (s, 1H, OCH₃'), 1,60 (d, J = 6,9 Hz, 3H, 2-H);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 167,6 (C1''), 156,7 (C-6'), 136,3 (C-2'), 132,8 (C-4a'), 128,3 (C-8'), 127,7 (C-1'), 126,3 (C-4'), 124,2 (C-3'), 123,4 (C-8a'), 118,0 (C-7'), 104,6 (C-5'), 70,9 (C2''), 58,1 (OCH₃'') 56,2 (OCH₃), 47,0 (C-1), 20,7 (C-2).

(R)-1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-ethylamin (*(R)*-13a)



10 g des (*R*)-Methoxyacetamids wird in 500 ml halb konzentrierter Salzsäure suspendiert. Unter Argonatmosphäre wird die Mischung bei 70 °C (Ölbadtemperatur) gerührt, bis sich eine klare Lösung bildet. Die Salzsäure wird am Rotationsverdampfer vorsichtig entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird in MTBE gelöst und das Amin wie oben beschrieben als Hydrochlorid gefällt. Ausbeute: 60 - 70%, weißes Pulver.

NMR-Daten identisch mit (*S*)-1-(6'-Methoxynaphth-2'-yl)-ethylamin [(*S*)-13a].

6.8.6 Enantioselective Synthese aus Naproxen[®]

(2*S*)-(6-methoxynaphth-2-yl)propanoyl chloride (nicht isoliert)

Naproxen (15) wurde aus kommerziell erhältlichen Tabletten mittels Soxhlett-Extraktion mit DCM gewonnen (quantitativ). Zu einer Lösung von Naproxen (5,0 g, 21,7 mmol) und einigen Tropfen trockenes DMF in 40 mL DCM wird Thionylchlorid (2,0 mL, 27,5 mmol) bei RT über 10 min zugegeben. Die Mischung wurde unter Argon für drei Stunden gerührt und im Vakuum eingedunstet. Das rohe Naproxen-Säurechlorid wurde ohne Aufreinigung direkt weiter eingesetzt.

(2*S*)-(6-methoxynaphth-2-yl)propanoyl amide (16)

In einem 500-mL Kolben mit Tropftrichter und KPG-Rührer werden 50 mL konz. Ammoniaklösung (25%) vorgelegt. Die Apparatur wird in einem Eis-Salz-Bad gekühlt und eine Lösung von Naproxen-Säurechlorid (5.0 g, 20 mmol) in 50 ml MTBE langsam zugegeben, so dass die Innentemperatur unter 15 °C bleibt. Nach beendeter Zugabe wird noch eine Stunde bei RT gerührt. Die Mischung wird im Vakuum zur Trockne eingedunstet und der Rückstand mit 100 mL Ethylacetat ausgekocht. Die noch heiße Lösung wird rasch durch eine vorgewärmte Glasfritte filtriert

und die Fritte mit Heißem Ethylacetat gewaschen (2 x 15 mL). Das Produkt wird bei 0 °C auskristallisiert und abfiltriert. Einengen der Mutterlauge und erneute Kristallisation liefert eine zweite Charge an Produkt.

Ausbeute: 3,92 g (85%), farblose Kristalle.

¹H-MNR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,80-7,65 (m, 3H, 8²-, 4²-, 3'-H), 7,41 (dd, J = 8,6, 1,9 Hz, 1H, 1'-H), 7,24-7,09 (m, 2H, 5²-, 7'-H), 5,59 and 5,42 (2 bd, 2H, NH), 3,93 (s, 3H, OCH₃), 3,74 (q, J = 7,2 Hz, 1H, 2-H), 1,61 (d, J = 7,2 Hz, 3H; 3-H);

¹³C-MNR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 176,8 (C-1), 127,8 (C-6'), 136,3 (C-4a'), 133,8 (C-2'), 129,2 (C-8'), 129,0 (C-1'), 127,6 (C-4'), 126,1 (C-3'), 126,1(C-8a'), 119,2 (C-7'), 105,7 (C-5'), 55,3 (OCH₃) 45,5 (C-2), 18,2 (C-3).

(*S*)-1-(6-methoxynaphth-2-yl)ethylamin • HCl, ((*S*)- 13a)

In einem 500 ml Rundkolben mit Rückflusskühler und Septum werden 100 ml 1 N Natronlauge vorgelegt. Elementares Brom (1,0 mL, 20 mmol) werden bei 0 °C mit einer Kanüle unter rühren langsam zugegeben. Nach 15 min wird Naproxenamid (4.0 g, 17.5 mmol) auf ein Mal zugegeben und bei 60 °C gerührt, bis die DC vollständigen Umsatz zeigt. Überschüssiges Brom wird mit Natriumsulfit-Lösung reduziert und die wässrige Phase mit MTBE (6 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das (*S*)-1-(6-methoxynaphth-2-yl)ethylamin als Hydrochlorid gefällt, wie zuvor beschrieben. Ausbeute: 2,10 g (50%), farbloses Pulver. NMR und Smp. bestätigen Identität.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|--|
| abs. | absoluiert, wasserfrei |
| ADH | Alkoholdehydrogenase |
| ALH | Aldehyddehydrogenase |
| BSA | <u>B</u> ovine <u>S</u> erum- <u>A</u> lbumine, Protein aus dem Blutplasma von Rindern |
| conc. | konzentriert, Höchste kommerziell verfügbare Konzentration |
| DCM | Dichlormethan |
| DEAD | Diethylazodicarboxylat |
| DEE | Diethylether |
| DIC | <i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPPA | Diphenylphosphorylazid |
| ee | Enantiomerenüberschuss |
| EtOH | Ethanol |
| GC | Gaschromatographie |
| ges. | gesättigt |
| HOBt | 1-Hydroxy-benzotriazol |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| LAH | Lithiumaluminiumhydrid |
| LDA | Lithium isopropylamid |
| mCBPA | <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure |
| MeOH | Methanol |
| NAD | Nicotinamidadenindinukleotid oxidierte Form |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid reduzierte Form |
| nm | Nanometer = 10 ⁻⁹ Meter |
| PBS | Phosphate buffered saline, Eine Pufferlösung s. Experimententeil |
| PLP | Pyridoxal-5'-phosphate |
| PMP | Pyridoxamine-5'-phosphate |
| r.t. | Raumtemperatur |
| TEA | Triethylamin |
| THF | Tetrahydrofuran |

7.2 Aminosäuren

| | | |
|---|-----|--------------|
| A | Ala | Alanin |
| R | Arg | Arginin |
| N | Asn | Asparagin |
| D | Asp | Aspartat |
| C | Cys | Cystein |
| E | Glu | Glutamat |
| Q | Gln | Glutamin |
| G | Gly | Glycin |
| H | His | Histidin |
| I | Ile | Isoleucin |
| L | Leu | Leucin |
| K | Lys | Lysin |
| M | Met | Methionin |
| F | Phe | Phenylalanin |
| P | Pro | Prolin |
| S | Ser | Serin |
| T | Thr | Threonin |
| W | Trp | Tryptophan |
| Y | Tyr | Tyrosin |
| V | Val | Valin |

7.3 Literaturverzeichnis

- [1] a) R. H. Michel, P. McGovern, V. R. Badler, *Nature* **1992**, *360*, 24;
b) P. E. McGovern, M. armen, G. R. Hall, *PNAS* **2009**, *106*, 7361-7366.
- [2] P. E. McGovern, J. Zhang, J. Tang, Z. Zhang, G. R. Hall, R. A. Moreau, A. Nunez, E. D. Butrym, M. P. Richards, C. S. Wang, G. Cheng, Z. Zhao, C. Wang, *PNAS* **2004**, *101*, 17593-17598.
- [3] W. Shurtleff, A. Aoyaga, *History of Koji Soyinfo Center*, Lafayette, CA 94549-0234, USA, **2012**.
- [4] R. W. Atkinson, *Memoire of the Science Department Tôkyô Daigaku* **1881**, 6.
- [5] K. Kitamoto, *Advances in Applied Microbiology* **2002**, *51*, 129-153.
- [6] H. Pringsheim, *Die Polysaccharide*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin **1923**.
- [7] P. Walden, *Naturwissenschaften* **1947**, *34*, 321-327.
- [8] W. Kühne, in *Verhandlungen des naturhistorisch-medicinischen Vereins zu Heidelberg, Vol. 1*, **1877**.
- [9] a) A. Fleming, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **1922**, *93*, 306-317;
b) A. Fleming, V. D. Allison, *British journal of experimental pathology* **1922**, *3*, 252-260.
- [10] A. Fleming, *British journal of experimental pathology* **1929**, *10*, 226-236.
- [11] J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.* **1926**, *69*, 435-441.
- [12] M. A. Shampo, R. A. Kyle, *Mayo Clin Proc* **2000**, *75*, 254.
- [13] A. Bairoch, *Nucleic acids research* **2000**, *28*, 304-305.
- [14] G. G. Aloisi, F. Masetti, U. Mazzucato, *Chemical Physics Letters* **1974**, *29*, 502-505.
- [15] Ö. Alptekin, S. S. Tükel, D. Yıldırım, D. Alagöz, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *64*, 177-183.
- [16] B. Krajewska, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *59*, 9-21.
- [17] S. Turkoglu, A. Maresca, M. Alper, F. Kockar, S. Isik, S. Sinan, O. Ozensoy, O. Arslan, C. T. Supuran, *Bioorg Med Chem* **2012**, *20*, 2208-2213.
- [18] M. Estevez, J. Skarda, J. Spencer, L. Banaszak, T. M. Weaver, *Protein Sci* **2002**, *11*, 1552-1557.
- [19] A. E. Boyd, A. B. Marnett, L. Wong, P. Taylor, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 22401-22408.
- [20] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 5 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [21] A. S. Bommarius, B. R. Riebel-Bommarius, *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, **2007**.
- [22] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Mutschler: Arzneimittelwirkungen*, 8 ed., Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **2001**.
- [23] H. Bisswanger, 3., völlig neuabearb. Aufl. ed., Wiley-VCH, Weinheim u.a., **2000**.
- [24] Y. Inoue, N. Yamasaki, T. Yokoyama, A. Tai, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 1332-1345.
- [25] K. Mizuno, Y. Otsuji, *Chemistry Letters* **1986**, *15*, 683-686.
- [26] H. C. Ishikawa-Ankerhold, R. Ankerhold, G. P. C. Drummen, *Molecules* **2012**, *17*, 4047-4132.
- [27] N. J. Turro, in *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito CA, USA, **1991**.
- [28] H. Günzler, M. A. Bahadir, R. Borsdorf, K. Danzer, W. Fresenius, W. Huber, I. Lüderwald, G. Schwedt, G. Tölg, H. Wisser, *Analytiker-Taschenbuch*, Springer Berlin Heidelberg, **2013**.

- [29] B. Herman, V. E. C. Frohlic, J. R. Lakowicz, D. B. Murphy, K. R. Spring, M. W. Davidson, *Vol. 2015*, The Florida State University, <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>, **2009**.
- [30] J. R. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Ed.: J. Lakowicz), Springer US, **2006**, pp. 277-330.
- [31] W. R. Ware, *The Journal of Physical Chemistry* **1962**, *66*, 455-458.
- [32] aM. S. Mehata, H. B. Tripathi, *Journal of Luminescence* **2002**, *99*, 47-52; bC. D. Geddes, Kathleen Apperson, J. Karolin, D. J. S. Birch, *Analytical Biochemistry* **2001**, *293*, 60-66.
- [33] G. Cario, J. Franck, *Z. Physik*. **1922**, *11*, 161-166.
- [34] B. R. Masters, *EPJ H* **2014**, *39*, 87-139.
- [35] L. Stryer, *Annual Review of Biochemistry* **1978**, *47*, 819-846.
- [36] A. Pingoud, C. Urbanke, *Arbeitsmethoden der Biochemie*, De Gruyter, **1997**.
- [37] C. A. Wurtz, *Bulletin de la Société Chimique de France* **1872**, *17*, 436-442.
- [38] aV. v. Richter, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1869**, *2*, 552-554; bA. P. Borodin, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1873**, *6*, 982-985.
- [39] D. A. Evans, J. Bartroli, T. L. Shih, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 2127-2129.
- [40] Benjamin List, Richard A. Lerner, Carlos F. Barbas III., *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 2395-2396.
- [41] Zoltan G. Hajos, D. R. Parrish, *The Journal of Organic Chemistry* **1974**, *39*, 1615-1621.
- [42] Ulrich Eder, Gerhard Sauer, Rudolf Wiechert, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1971**, *10*, 496-497.
- [43] M. T. Madigan, J. M. Martinko, T. D. Brock, D. A. Stahl, D. P. Clark, *Brock Mikrobiologie*, Pearson Studium, **2013**.
- [44] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, *5*, 137-143.
- [45] Benjamin List, Carlos F. Barbas III, R. A. Lerner, *PNAS* **1998**, *95*, 15351-15355.
- [46] M. Schürmann, G. A. Sprenger, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 11055-11061.
- [47] M. Höhne, U. T. Bornscheuer, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Vol. 1*, 3. ed. (Eds.: K. Drauz, H. Dröger, O. May), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 779-820.
- [48] M. Melanie Schürmann, G. A. Georg A Sprenger, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 11055-11061.
- [49] D. Güclü, A. Szekreny, X. Garrabou, M. Kickstein, S. Junker, P. Clapés, W.-D. Fessner, *ACS Catalysis* **2016**, *6*, 1848-1852.
- [50] M. Rale, S. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, W. D. Fessner, *Chemistry* **2011**, *17*, 2623-2632.
- [51] L. Stellmacher, T. Sandalova, S. Leptihn, G. Schneider, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3140-3151.
- [52] J. A. Castillo, C. Guérard-Hélaine, M. Gutiérrez, X. Garrabou, M. Sancelme, M. Schürmann, T. Inoue, V. Hélaine, F. Charmantray, T. Gefflaut, L. Hecquet, J. Joglar, P. Clapés, G. A. Sprenger, M. Lemaire, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, *352*, 1039-1046.
- [53] V. Sautner, M. M. Friedrich, A. Lehwiss-Litzmann, K. Tittmann, *Biochemistry* **2015**, *54*, 4475-4486.
- [54] I. A. Rose, E. L. O'Connell, A. H. Mehler, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1758-1765.

- [55] M. Schürmann, M. Schürmann, G. A. Sprenger, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, 19-20, 247-252.
- [56] Wolf-Dieter Fessner, T. Anthonsen, *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Wiley, **2009**.
- [57] M. Gutierrez, T. Parella, J. Joglar, J. Bujons, P. Clapes, *Chemical Communications* **2011**, 47, 5762-5764.
- [58] I. Tomoyuki, Dissertation thesis, Universität Stuttgart (Stuttgart), **2006**.
- [59] H. Wieland, G. Scheuing, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1921**, 54, 2527-2555.
- [60] J. H. Robins, G. D. Abrams, J. A. Pincock, *Canadian Journal of Chemistry* **1980**, 58, 339-347.
- [61] W. Wiegerebe, M. Vilbig, *Z. Naturforsch.* **1981**, 37b, 490-493.
- [62] Karl-Artur Kovar, M. Laudszun, *United Nations Scientific and technical notes* **1989**.
- [63] J. Bartos, M. Pesez, *Pure & Appl. Chem.* **1979**, 51, 1803 - 1814.
- [64] M. S. Quesenberry, Y. C. Lee, *Analytical Biochemistry* **1996**, 234, 50-55.
- [65] A. Hantzsch, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1882**, 215, 1-82.
- [66] aV. Sivamurugan, R. S. Kumar, M. Palanichamy, V. Murugesan, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2005**, 42, 969-974; bH. Kiyani, M. Ghiasi, *Research on Chemical Intermediates* **2014**, 41, 5177-5203; cJ.-J. Xia, K.-H. Zhang, *Molecules* **2012**, 17, 5339-5345; dA. Debache, L. Chouguiat, R. Boulcina, a. B. Carboni, *The Open Organic Chemistry Journal* **2012**, 12-20.
- [67] P. D. Desai, W. S. Waravdekar, *Proceedings - Indian Academy of Sciences, Section A* **1946**, 24, 382 - 388.
- [68] P. J. Walsh, K. B. Sharpless, *Synlett* **1993**, 1993, 605-606.
- [69] B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 2395-2396.
- [70] S. Joly, M. S. Nair, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, 22, 151-160.
- [71] F. Tjosås, T. Anthonsen, E. Egholm-Jacobsen, *ARKIVOC* **2008**, 81-90.
- [72] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56, 2656-2665.
- [73] S. Joly, S. M. Nair, *J Mol Catal B-Enzym* **2003**, 22, 151-160.
- [74] U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley, **2006**.
- [75] aG. Lars, S. Caner, R. Obexer, P. Kast, D. Baker, N. Ban, D. Hilvert, *Nat Chem Biol* **2013**, 9, 494-498; bB. Wörsdörfer, L. M. Henning, R. Obexer, D. Hilvert, *ACS Catalysis* **2012**, 2, 982-985.
- [76] J. E. Jo, S. Mohan Raj, C. Rathnasingh, E. Selvakumar, W. C. Jung, S. Park, *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, 81, 51-60.
- [77] D. Enders, B. B. Lohray, *Angewandte Chemie* **1988**, 100, 594-596.
- [78] D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 2006, 2309-2313.
- [79] A. Nobili, F. Steffen-Munsberg, H. Kohls, I. Trentin, C. Schulzke, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2015**, 7, 757-760.
- [80] J.-S. Shin, B.-G. Kim, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 2848-2853.
- [81] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, P. Höglund, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2000**, 52, 807-817.
- [82] D. Koszelewski, D. Pressnitz, D. Clay, W. Kroutil, *Org Lett* **2009**, 11, 4810-4812.

-
- [83] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.
- [84] S. Lutz, *Science* **2010**, *329*, 285-287.
- [85] A. R. Martin, R. DiSanto, I. Plotnikov, S. Kamat, D. Shonnard, S. Pannuri, *Biochemical Engineering Journal* **2007**, *37*, 246-255
- [86] Lilly Skalden, Christin Peters, Jonathan Dickerhoff, Alberto Nobili, Henk-Jan Joosten, Klaus Weisz, Matthias Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1041-1045.
- [87] L. Skalden, C. Peters, J. Dickerhoff, A. Nobili, H. J. Joosten, K. Weisz, M. Hohne, U. T. Bornscheuer, *Chembiochem* **2015**, *16*, 1041-1045.
- [88] E. Busto, R. C. Simon, B. Grischek, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2014**, *356*, 1937-1942.
- [89] S. Mathew, G. Shin, M. Shon, H. Yun, *Biotechnology and Bioprocess engineering* **2013**, *18*, 1-7.
- [90] M. D. Truppo, J. D. Rozzell, J. C. Moore, N. J. Turner, *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 395-398.
- [91] A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angewandte Chemie* **2014**, *126*, 10890-10893.
- [92] J. Wierzchowski, W. P. Däfeldecker, B. Holmquist, B. I. Vallee, *Analytical Biochemistry* **1989**, *178*, 57-62.
- [93] aC. Giordano, M. Villa, R. Annuziata, *Synthetic Communications* **1990**, *20*, 383 - 392; bW. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 925-935.
- [94] B. Miriyala, S. Bhattacharyya, J. S. Williamson, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1463-1471.
- [95] Y. Asano, L. Babich, B. C. Ponzano, A. Díaz-Rodríguez, M. Bertau, *Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis*, Thieme, **2015**.
- [96] N. He, Technische Univ. Darmstadt (Darmstadt), **2012**.
- [97] A. G. M. Al-Sehemi, A M Sh El-Sharief, Y. A. Ammar, *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* **2006**, *45B*, 450 - 455.
- [98] F. Balkenhohl, K. Ditrach, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381-384.
- [99] aD. Yi, T. Devamani, J. Abdoul-Zabar, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet, W. D. Fessner, *Chembiochem* **2012**, *13*, 2290-2300; bJ.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, K. R. Oldenburg, *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, *4*, 67-73.
- [100] E. S. Park, J. S. Shin, *Appl Environ Microbiol* **2013**, *79*, 4141-4144.
- [101] F. W. Studier, *Protein Expr Purif* **2005**, *41*, 207-234.
- [102] R. Gay, A. Horeau, *Bulletin de la Société Chimique de France* **1955**, 955 - 962.

Diplom-Chemiker
Hauptfach: Organische Chemie
Nebenfach: Pharmakologie

Am Klingenteich 9
64367 Mühlthal (Hessen)
Email: thscheidt@aol.com
Geburtsdatum: 08.07.1981



AUSBILDUNGSVERLAUF

| | |
|------------------------|---|
| Jun. 2010 – Aug. 2015 | Promotionsstudium im Bereich Bio-organische Chemie/Enzymatik an der Techn. Universität Darmstadt. |
| 23. Sept. 2008 | Abschluss Diplom Chemiker (Note 1,6), Diplomarbeit in Pharmazeutischer Chemie: „Synthesis of <i>h</i> H3 histamine antagonists“, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stark. |
| Apr. 2004 – Sept. 2008 | Hauptstudium an der Goethe Universität Frankfurt/Main Chemie und Pharmakologie. |
| 31.3.2004 | Vordiplom (Note 1,6) TU Darmstadt. |

BERUFSERFAHRUNG

| | |
|-----------------------|---|
| Sept. 2016 | Fortbildung Qualitätsmanagement-Beauftragter ISO9000ff |
| Seit Sept. 2015 | Selbstständig; Auftragsforschung (TU Darmstadt), Beratung, Nachhilfe |
| Jul. 2015 – Aug. 2015 | Praktikum im Bereich Portfoliomanagement bei Merck - Millipore in Darmstadt, Dr. Peter Reynders |
| Jun. 2013 – Nov. 2013 | Eigenverantwortliche Leitung eines Forschungsprojekts an der Techn. Universität Darmstadt |
| Jun. 2010 – Aug. 2015 | Promotionsphase |
| Okt. 2008 – Aug. 2014 | Technischer Assistent / Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Bereich Bio-organische Synthese an der Technischen Universität Darmstadt, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Fessner |

VERÖFFENTLICHUNGEN

| | |
|----------|--|
| Mai 2015 | Advanced Synthesis and Catalysis: „ <i>Fluorescence-Based Kinetic Assay for High-Throughput Discovery and Engineering of Stereoselective ω-Transaminases</i> “ Adv. Synth. Catal., 2015 , 357(8), 1721-1731 |
|----------|--|

Juni 2006

"An Efficient Metal Catalyzed Hydroarylation of Styrenes",
M. Rueping, B. J. Nachtsheim, T. Scheidt, Org. Lett. **2006**, 8,
3717 - 3719

KERNKOMPETENZEN

| | |
|---------------------|---|
| Synthese: | Chemo-enzymatische und metall-organische Synthese, Enzymatische Racemat-Spaltung |
| Analytische Chemie: | GC, HPLC auch chirale Säulen NP und RP NMR, ICP-OES, FAAS, Fluoreszenzmessung |

WEITERE QUALIFIKATIONEN

Qualitäts- und Projektmanagement

Projektplanung, erste Führungsverantwortung.

Expertenkenntnisse MS Office (Word, Excel, Powerpoint, Outlook, Lync)
Grundkenntnisse Makros für MS Excel.

Grundkenntnisse Projekt- und Portfoliomanagement: PMBOK 5th Edition, MS Project.

| | |
|---------------------------------|--|
| 2000 – 2005 (Semesterpausen) | Werkstudent bei Merck in Darmstadt. Nass-chemische und instrumentelle Analyse für QC z.T. unter GMP- Bedingun- gen |
|---------------------------------|--|

AUSLANDSERFAHRUNG

| | |
|------------------------|--|
| März 2013 | Doktoranden-Austausch mit der Arbeitsgruppe Dr. Prabhune am National Chemical Laboratory in Pune, In- dien. mit DAAD Stipendium. |
| Aug. 2010 – Sept. 2010 | Sprachkurs Japanisch an der <i>Asahi nihongo</i> Sprach- schule in Fukuoka, Japan. |

SPRACHEN

| | |
|--------------|--------------------|
| Deutsch: | Muttersprachler |
| Englisch: | Verhandlungssicher |
| Französisch: | Grundkenntnisse |
| Japanisch: | Grundkenntnisse |

Mühltal, den 09.01.2017

