

Identifizierung und Charakterisierung Flavin- abhängiger Halogenasen aus metagenomischen Datensätzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von

Pia Rebecca Neubauer

aus Bielefeld

Organische und Bioorganische Chemie

der Fakultät für Chemie

an der Universität Bielefeld

Bielefeld

2019

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe
-Organische und Bioorganische Chemie-
an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld
unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald
im Zeitraum September 2015 bis Februar 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald – Organische und Bioorganische Chemie
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörn Kalinowski – Mikrobielle Genomik und Biotechnologie
Centrum für Biotechnologie (CeBiTec), Universität Bielefeld

Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker.

Er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt...

MARIE CURIE

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Sewald, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem interessanten Thema zu forschen und mich mit Ratschlägen und vollem Vertrauen unterstützt hat.

Prof. Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die Tätigkeit als Zweitgutachter sowie die nette Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich weiterhin bei Dr. Daniel Wibberg vom CebiTec, der mich bei vielen bioinformatischen Fragen und auch in der Schreibphase der Doktorarbeit mit vielen Ideen und aufbauenden Worten unterstützt hat sowie Dr. Marcel Frese mit dem ich viele spannende Diskussionen führen durfte und der für mich sowohl die Manuskripte als auch die Doktorarbeit Korrektur gelesen hat. Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kruse und Dr. Olga Blifernez-Klassen für die zur Verfügungstellung des metagenomischen Datensatzes „*Botryococcus braunii* Race A+B und Symbionten“ sowie die nette Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die schöne Zeit danken. Vorallem Adina und Eduard, mit denen ich viele schöne Stunden sowohl im Büro als auch in meiner Freizeit verbracht habe. Ein besonderer Dank geht an unser Biolabor mit Christian Schnepel, Hannah Minges, Mohamed Ismail und Carmela Michalek für unsere gegenseitige Unterstützung, Diskussion und Wissensaustausch über die Welt der Flavin-abhängigen Halogenasen.

Auch möchte ich Christiane Widmann und Dr. Lea Schröder für deren Engagement in unseren gemeinsamen Arbeiten danken, mit denen mir das gemeinsame forschen viel Spaß bereitet hat.

Ein großer Dank geht weiterhin an die engagierten Studenten Lara Pfaff, Eugenia Werner, Caroline Besse, Adil Allahverdiyev, Saskia Plöger, Isabel Eickholz, Elisa Bartsch und Claire Rothschild, die ihre Bachelor-, Master- und Forschungsarbeiten im Biolabor unter meiner Aufsicht angefertigt haben. Vorallem bei Lara Pfaff, die mich viel tatkräftig unterstützt hat.

Ein großes Dankeschön gebührt meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich sowohl menschlich als auch finanziell unterstützt haben und es ermöglicht haben, dass ich die ganzen Jahre studieren und forschen konnte. Ich möchte auch meinen Geschwistern und meiner Oma sowie meinen Freunden danken, die auch für mich da waren, wenn ich gestresst war und wenig Zeit hatte.

Zu guter Letzt möchte ich Raimund danken, der mein Fels in der Brandung ist, mir stets zugehört hat und mir auch in stressigen Zeiten die Ruhe und Kraft gab die Doktorarbeit zu vollenden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht.

Originalartikel:

Neubauer PR, Widmann C, Wibberg D, Schröder L, Frese M, Kottke T, *et al.* A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. PLoS ONE. **2018**;13:e0196797.

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract.....	1
2. Einführung.....	3
2.1. Halogenierte Verbindungen in der Natur und der Industrie	3
2.2. Halogenierende Enzyme	5
2.3. Flavin-abhängige Halogenasen.....	8
2.3.1. Tryptophan-Halogenasen.....	14
2.3.2. Flavin-abhängige-Pyrrol-Halogenasen	19
2.3.3. Flavin-abhängige-Phenol-Halogenasen	20
2.4. Anwendung der Flavin-abhängigen Halogenasen für nicht natürliche Substrate und chemische Reaktionen.....	22
2.5. Identifizierung Flavin-abhängiger Halogenasen in der Natur	26
2.6. Identifizierung von Enzymen in Metagenomen	27
3. Zielsetzung.....	31
4. Material und Methoden.....	33
4.1. Gerätschaften.....	33
4.2. Verbrauchsgegenstände	34
4.3. Kits.....	35
4.4. Enzyme	35
4.5. Verwendete Primer	36
4.6. Plasmide	36
4.7. Bakterienstämme	38
4.8. Chemikalien und Lösungsmittel.....	38
4.8.1. Antibiotika	38
4.9. Medien und Puffer.....	38
4.10. Software	41
4.11. Bioinformatische Methoden	41
4.12. Molekularbiologische Arbeiten	43
4.12.1. Synthetische Gene	43
4.12.2. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	46
4.12.3. Herstellung von Glycerin-Kulturen	47
4.12.4. Isolierung von Plasmid-DNA.....	48
4.12.5. Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration.....	48
4.12.6. Klonierung der synthetischen Gene in pET28a-Vektor.....	48
4.12.6.1. Restriktionsverdau	49
4.12.6.2. Agarose-Gelelektrophorese	49
4.12.6.3. Ligation.....	50
4.12.6.4. Biotransformation von DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	50

4.12.7.	Ortsspezifische Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
4.12.8.	Sequenzierung	52
4.13.	Proteinexpression und -Aufreinigung	52
4.13.1.	Heterologe Proteinexpression der F-Hal-Gene in <i>E. coli</i>	52
4.13.2.	Heterologe Proteinexpression der RR-ADH in <i>E. coli</i>	52
4.13.3.	Heterologe Proteinexpression von PrnF in <i>Pseudomonas Fluorescens</i>	53
4.13.4.	Zellernte	53
4.13.5.	Zellaufschluss mittels French Press.....	53
4.13.6.	Enzymaufreinigung mittels Kobalt-TALON Matrix	53
4.13.7.	Enzymaufreinigung <i>per</i> Hitzefällung	54
4.13.8.	Puffertausch der aufgereinigten Enzyme	54
4.13.9.	Polyacrylamidgelelektrophorese	55
4.14.	Biochemische Arbeiten	56
4.14.1.	Aktivitätsbestimmung der Alkoholdehydrogenase RR-ADH	56
4.14.2.	Aktivitätsbestimmung der Flavinreduktase PrnF	56
4.14.3.	Aktivitätsbestimmungen der identifizierten F-Hals.....	57
4.14.4.	Vergleich der Bromierungs- und Chlorierungsaktivität	67
4.14.5.	FAD-Rekonstitution.....	67
4.14.6.	Bestimmung der Regioselektivität.....	67
4.14.6.1.	Herstellung der <i>combi</i> CLEAs.....	68
4.14.6.2.	Aufarbeitung der CLEA-Produkte.....	69
4.15.	Analytik.....	74
4.15.1.	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	74
4.15.2.	Analytische Gaschromatographie mit Massenspektrometrikopplung (GC-MS)	77
4.15.3.	ESI-Masse-Spektrometrie.....	77
4.15.4.	Kernresonanzspektroskopie	77
5.	Ergebnisse und Diskussion	79
5.1.	Metagenom-Analysen zur Identifizierung neuer Flavin-abhängiger Halogenasen...79	
5.1.1.	Sequenz-Analysen von BrvH, Pia-2, B38 und HotH	86
5.2.	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der identifizierten Flavin-abhängigen Halogenasen	91
5.2.1.	Klonierung in den Expressionsvektor und heterologe Expression in <i>E. coli</i>	91
5.2.2.	Substrat-Umsatzversuche der neu identifizierten FHals	93
5.2.3.	Prominente Nebenreaktionen.....	115
5.2.4.	Bestimmung der Regioselektivität der einzelnen Enzyme	118
5.2.5.	Bestimmung der Flavin-Abhängigkeit der Enzyme	135
5.2.6.	Brom als favorisiertes Halogen.....	139
5.2.7.	Bestimmung der kinetischen Parameter der F-Hals BrvH und Pia-2.....	145

5.2.8. Stabilität der identifizierten FHals	151
6. Zusammenfassung.....	159
7. Ausblick.....	165
8. Literaturverzeichnis	167

1. Abstract

Already in ancient times natural substances from plants were used for medicinal applications. Nowadays natural compounds are employed for cancer treatment, antibiotics, and for many other functions. Halogenated compounds often possess higher biological activities in comparison to the non-halogenated species. For the chemical halogenation by electrophilic aromatic substitution, elemental halogen, organic solvents, and Lewis acids as well as protecting groups are required for addressing non-activated carbon-atoms. Flavin-dependent halogenases (F-Hals) can regioselectively halogenate non-activated carbon-atoms in water and represent an environment-friendly alternative to the chemical halogenation. Unfortunately, the enzymes show low activities and high specificity towards their substrates, which makes them yet not applicable for industrial usage. Until now, novel F-Hals have been identified using degenerated primers and genomic mining based on conserved amino acid regions. The aim of this work was the identification of novel F-Hals for the first time in metagenomic data sets by a generated profile hidden markov-model (pHMM) based on the conserved amino acid regions of F-Hals. In metagenomic datasets not only genomic data from one organism, but from a whole community within one biotope is available. Therefore, it is possible to screen in one step F-Hals in many organisms. 17 metagenomic datasets were screened leading to 113 putative F-Hals which showed the conserved amino acid sequences (GxGGG, conserved lysine residue (K), WxWxIP) and possess the correct size of known F-Hals between 400 and 700 amino acids. Four putative F-Hals (BrvH, Pia-2, B38 and HotH) from these hits were chosen for *in vitro* activity assays to show that the detected F-Hals are active halogenating enzymes. For the *in vitro* experiments, the enzymes were purified and the substrates L-tryptophan, indole and its derivatives were tested. All four enzymes catalyzed the halogenation of indole, which underlines that the generated pHMM can detect active F-Hals in metagenomic datasets. Further indole derivatives and other aromatic compounds have been found as accepted substrates for the enzymes, but only HotH catalyzes the di-bromination of substrates. The substrates were mostly halogenated at the most activated position in the indole ring (C3 or C2). Only B38 was able to halogenate tryptophol and indole-3-propionic acid at the unfavoured C5-position. Furthermore, all four identified enzymes prefer bromination over chlorination. Even in tenfold excess of chloride, the enzymes BrvH and Pia-2 prefer the bromination. When only chloride is accessible all four enzymes catalyze chlorination to a small extent. Further experiments towards enzyme activity and stability were carried out for characterization of the enzymes. The determined kinetic parameters do not show higher activities in comparison to already known F-Hals, while the natural substrate of the four novel F-Hals is yet unknown. All in all, in this work a powerful pHMM was generated leading to active F-Hals.

2. Einführung

2.1. Halogenierte Verbindungen in der Natur und der Industrie

Schon in der Antike wurden Naturstoffe für medizinische Anwendungen genutzt. Die erlangten Erkenntnisse über Heilkräuter, wie deren medizinische Verwendung und Anbau, wurden bereits früh schriftlich festgehalten. So entstand unter anderem das Werk „*Historia naturalis*“ von Gaius Plinius Secundus (23/24-79 n. Chr.) und „*De materia medica*“ von Pedanios Dioskurides (1. Jhd. N. Chr) [1]. Nicht nur die Salicylsäure, wurde gegen Fieber und Schmerzen eingesetzt, sondern auch Morphin aus Opium gewonnen oder später auch Penicillin aus dem Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* wurden als Heilmittel verwendet [2]. Berechnungen zufolge stammen 25% aller Humanmedikamente aus Naturstoffen [3].

Eine wichtige Klasse der Naturstoffe sind die Halometabolite. Einer der ersten identifizierten Halometabolite war die iodierte Aminosäure Diiodotyrosin **1**, die aus der Koralle *Gorgonia cavolii* isoliert wurde [4]. In der Natur sind vor allem chlorierte Verbindungen, gefolgt von bromierten Verbindungen, weitverbreitet. Fluorierte und iodierte Verbindungen hingegen sind nur selten vorzufinden [5]. Halogenierte Metabolite können verschiedene Funktionen im Organismus innehaben. Beispiele hierfür sind das Thyroxin **2**, ein Hormon aus Säugetieren [6], 2,6-Dichlorphenol **3**, ein Pheromon aus der Schildzecke (*Amblyomma americanum*) [7] oder 4-Chlorindol-3-essigsäure **4**, ein Pflanzenwachstumshormon [8]. Die meisten Halometabolite dienen vermutlich als Schutz gegenüber Feinden und besitzen daher häufig toxische Eigenschaften [9]. So weisen viele halogenierte Verbindungen einen antibiotischen Charakter (Vancomycin **5**, Chlortetracyclin **6**), eine Anti-Tumor-Wirksamkeit (Rebeccamycin **7**) oder auch eine Anti-HIV Wirksamkeit (Ambigol A **8**) auf (Abbildung 1) [6, 10, 11].

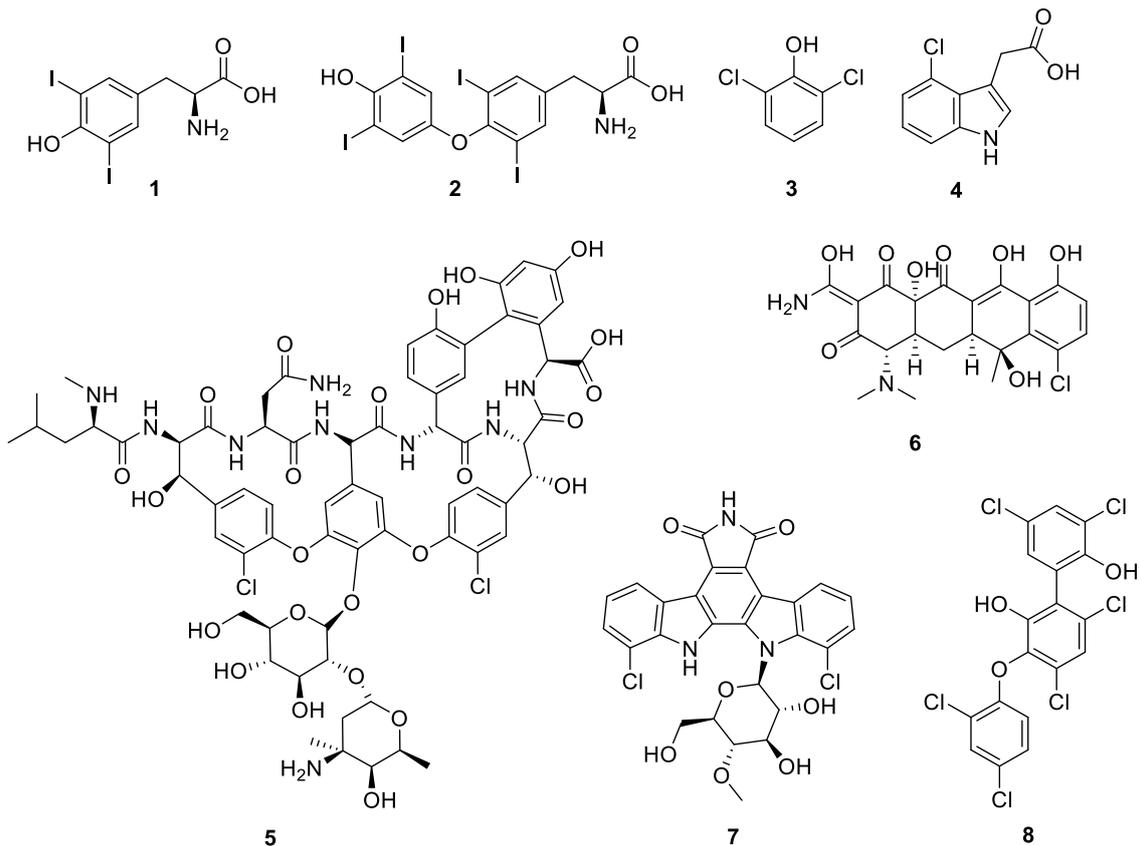


Abbildung 1: Struktur der natürlichen halogenierten Verbindungen: Diodotyrosin **1**, Thyroxin **2**, 2,6-Dichlorphenol **3**, 4-Chlorindol-3-Essigsäure **4**, Vancomycin **5**, Chlortetracyclin **6**, Rebeccamycin **7** und Ambigol A **8**.

Durch den Halogensubstituenten ergeben sich für viele dieser Verbindungen höhere Bioaktivitäten verglichen mit nicht-halogenierten Verbindungen [12, 13]. So weisen die halogenierten Naturstoffe Vancomycin **5** und Rebeccamycin **7** eine um ein Vielfaches höhere biologische Aktivität auf als Verbindungen ohne Halogenatom [14, 15]. Die erhöhte Bioaktivität wird nicht nur durch eine erhöhte Lipophilie oder nicht spezifische hydrophobe Interaktionen des Halogenatoms hervorgerufen, sondern auch durch eine Halogenbindung des Halogens im Kohlenstoffgerüst mit dem Zielmolekül. Diese Halogenbindung entsteht durch eine Region, die eine geringe Elektronendichte (Sigma-Loch“) mit positivem Potential aufweist. Das positive Potential tritt bei der Kohlenstoff-Halogen-Bindung auf. Eine gerichtete intermolekulare Wechselwirkung tritt mit freien Elektronenpaaren an Heteroatomen wie Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel im Zielmolekül auf, die mit einer Wasserstoffbrückenbindung verglichen werden kann [16–18].

Mehr als 5000 halogenierte Verbindungen sind bisher bekannt [2, 17]. Allein im Jahr 2018 sind über 200 natürliche Halogenmetabolite beschrieben worden, die aus Algen, Schwämmen, Korallen, Bakterien, Pflanzen, Pilzen und einer Vielzahl weiterer

Organismen stammen [19]. Viele dieser Verbindungen wurden in marinen Habitaten identifiziert, welche vornehmlich bromierte Verbindungen sind. Terrestrische Halogenmetabolite hingegen stellen meist chlorierte Verbindungen dar [18]. Im marinen Milieu wurden viele halogenierte Metabolite bestehend aus einem Indolgerüst isoliert, wie Meridianin B **9** aus *Aplidium meridianum*, oder Aplicyanin A **10** aus *Aplidium cyaneum* (Abbildung 2) [20, 21].

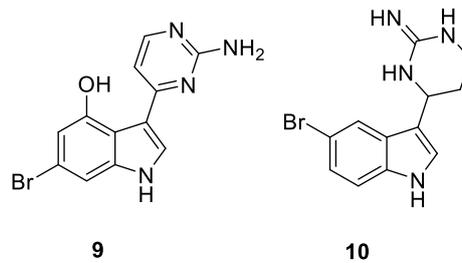


Abbildung 2: Struktur der marinen Halogenmetabolite Meridianin B **9** und Aplicyanin A **10**.

Die Halogenierung erfolgt oftmals in C5- (**10**) oder C6-Position (**9**) oder in beiden Positionen [22], auch die Halogenierung in C4 Position tritt häufig in marinen Alkaloiden auf [9].

Heutzutage lassen sich halogenierte Verbindungen in Pharmazeutika, in Agrochemikalien und, in Materialien wie Polymere finden. Ebenso dienen sie als wichtige chemische Synthesebausteine, die durch nukleophile Substitutionen oder durch metallkatalysierte Kreuzkupplung vielfältig modifiziert werden können [10, 23, 24].

Bei der konventionellen Halogenierung werden elementare Halogene verwendet. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen entstehen jedoch häufig Regioisomere und Nebenprodukte, die der Umwelt schaden und die daher einer besonderen Aufreinigung und Entsorgung unterliegen [25, 26]. Die enzymatische Halogenierung bietet eine umweltfreundliche Alternative, da die Reaktion im wässrigen Milieu bei geringen Temperaturen um die 25°C sowie einem neutralen pH-Wert ablaufen kann. Zudem werden mit Luftsauerstoff und Halogenid-Salzen nur ungiftige Edukte benötigt [27].

2.2. Halogenierende Enzyme

Die Halogenierung von Naturstoffen wurde lange Zeit nicht verstanden und wurde daher als „unnatürlich und Zufallsprodukte der Natur“ abgetan [28]. 1959 publizierten Hager und Shaw das erste halogenierende Enzym aus *Caldariomyces fumago*. Dieses benötigte zur Halogenierung Wasserstoffperoxid und wurde aus diesem Grund Haloperoxidase genannt [29]. Die Haloperoxidasen waren die einzige bekannte halogenierende Enzymklasse bis Hammer *et al.* 1997 das Gencluster von Pyrrolnitrin **29**

aus *Pseudomonas fluorescens* und in Folge dessen die erste Flavin-abhängige Halogenase PrnA identifizierten [30].

Die Enzymklasse der Halogenasen kann in zwei Klassen unterteilt werden: (i) die Haloperoxidasen (HPO) und (ii) die substratspezifischen Halogenasen.

Die Haloperoxidasen katalysieren eine nicht-regioselektive Halogenierung. Mit Hilfe von Wasserstoffperoxid wird dabei eine hypohalogenige Säure gebildet, die aus dem Enzym in die Reaktionslösung diffundiert und dort eine Verbindung durch eine elektrophile Reaktion halogenieren kann (Abbildung 3). Da der Halogenierungsschritt nicht im aktiven Zentrum kontrolliert wird, ist die Halogenierung nicht selektiv und findet stets an der elektrophilsten Position statt [31, 32].



R: nukleophile Verbindung

Abbildung 3: Schematische Reaktionsdarstellung der Halogenierung durch Haloperoxidasen (in diesem Beispiel der Bromperoxidase) [32].

Es wurden Haloperoxidasen entdeckt, die sowohl die Chlorierung, Bromierung als auch die Iodierung katalysieren können [33]. Diese können anhand ihrer Kofaktoren in drei weitere Klassen unterteilt werden: die Metall-freien, die Vanadium-abhängigen und die Häm-Eisen-abhängigen HPOs. Bei allen drei HPOs wird die aktive hypohalogenige Säure über Peroxide gebildet und die Halogenierung findet außerhalb des Enzyms statt [34–37]. Zu den Häm-Eisen-abhängigen Halogenasen gehört die erste identifizierte Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago* [29]. Die Vanadium-abhängigen Halogenasen stammen zumeist aus dem marinen Habitat und sind Bromperoxidasen. Von diesen wurden auch regioselektive Enzyme identifiziert. So wurden 2001 zwei regioselektive Vanadium-abhängigen Halogenasen detektiert und 2004 eine Vanadium-abhängige Bromperoxidase aus der roten Alge (*Rhodophyta*), die eine enantioselektive Halogenierung katalysiert [38].

Zu den substratspezifischen Halogenasen gehören die α -Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen (α -KGs) und die Flavin-abhängigen Halogenasen (F-Hals). Die α -KGs benötigen im Gegensatz zu Haloperoxidasen und F-Hals keine elektronenreichen, aktivierten Kohlenstoffatome wie Doppelbindungen oder aromatische Systeme zur Halogenierung und können stark desaktivierte und sp^3 -hybridisierte aliphatische Kohlenstoffatome halogenieren [39, 40]. Diese sind auch Kofaktor-abhängig und benötigen für die Halogenierung einer Verbindung Eisen-II (Fe^{2+}), α -Ketoglutarat,

Sauerstoff und ein Halogenid-Salz (NaX) [40]. Die α -KGs sind in der nichtribosomalen Peptidsynthese beteiligt, aufgrund dessen die zu halogenierenden Verbindungen meist *Carrier*-gebunden vorliegen [41]. Die erste α -KG SyrB2 wurde 2005 identifiziert und halogeniert die Methylgruppe von L-Threonin während der Synthese von Syringomycin E **11** [40, 42]. Zunächst wurde angenommen, dass alle α -KGs nur *Carrier*-gebundene Substrate umsetzen können. Allerdings wurde 2014 die Halogenase WelO5 aus *Hapalosiphon welwitschii* identifiziert, die kein Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) benötigt. Dieses Enzym halogeniert stereoselektiv 12-*epi*-Fischerindol G **12**, wodurch ein neues stereogenes Zentrum entsteht [33, 43, 44].

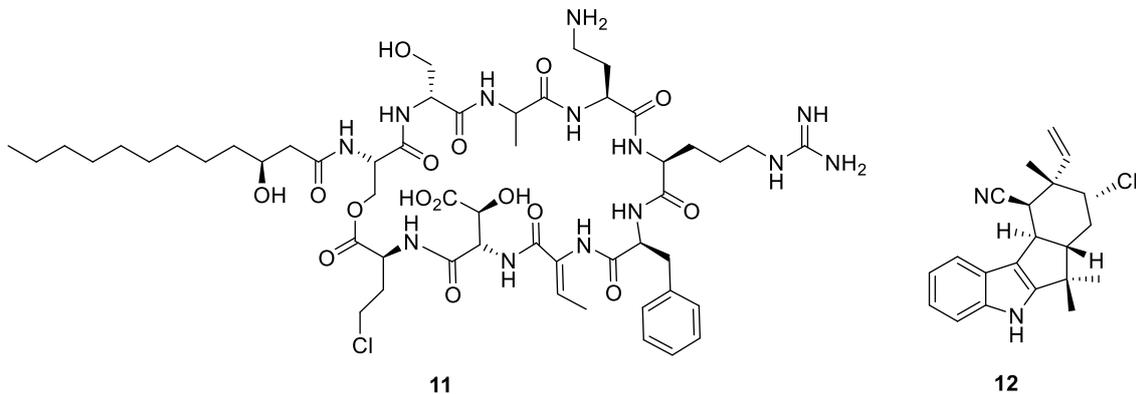


Abbildung 4: Struktur der Verbindungen Syringomycin E **11** und 12-*Epi*-Fischerindol G **12**, die von den α -KGs SyrB2 und WelO5 halogeniert werden.

Diese Selektivität macht die Enzymklasse interessant für industrielle Anwendungen, wobei die Enzymaufreinigung unter inerten Bedingungen und die geringe Enzymaktivität ein Problem darstellen können [33].

F-Hals sind regioselektive Enzyme, die zur Halogenierung den Kofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid in der reduzierten Form (FADH₂), Sauerstoff und ein NaX benötigen. Bekannte Enzyme dieser Klasse sind die Tryptophan-Halogenasen (Trp-Halogenasen) PrnA, RebH, PyrH und Thal, die freies Tryptophan an unterschiedlichen nicht-aktivierten Positionen im Indolring halogenieren [45–48].

2.3. Flavin-abhängige Halogenasen

Die erste identifizierte F-Hal ist PrnA aus dem Gencluster der Pyrrolnitrin **29**-Biosynthese aus *Pseudomonas fluorescens* gewesen [45, 49]. Bei PrnA handelt es sich um eine Trp-Halogenase, die freies L-Tryptophan in C7-Position halogeniert [45]. Nachdem PrnA identifiziert wurde, konnten weitere Trp-Halogenasen identifiziert werden, die Tryptophan an unterschiedlichen Positionen halogenieren können. Dazu gehören die Trp-7-Halogenase RebH [46], die Trp-6-Halogenase Thal [48] und die Trp-5-Halogenase PyrH [47]. Aber nicht nur die Trp-Halogenasen gehören zu den F-Hals, es wurden viele weitere F-Hals mit unterschiedlichen Substratspektren identifiziert, die sowohl bakteriellen als auch pilzlichen Ursprungs sind [23].

F-Hals gehören zur Familie der Flavin-abhängigen Monooxygenasen, deren Kofaktor Flavin aus Vitamin B₂ (Riboflavin **13**) entsteht. Dabei kann es sich um Flavin-Mononukleotid (FMN **14**) oder Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD **15**) handeln (Abbildung 5) [50].

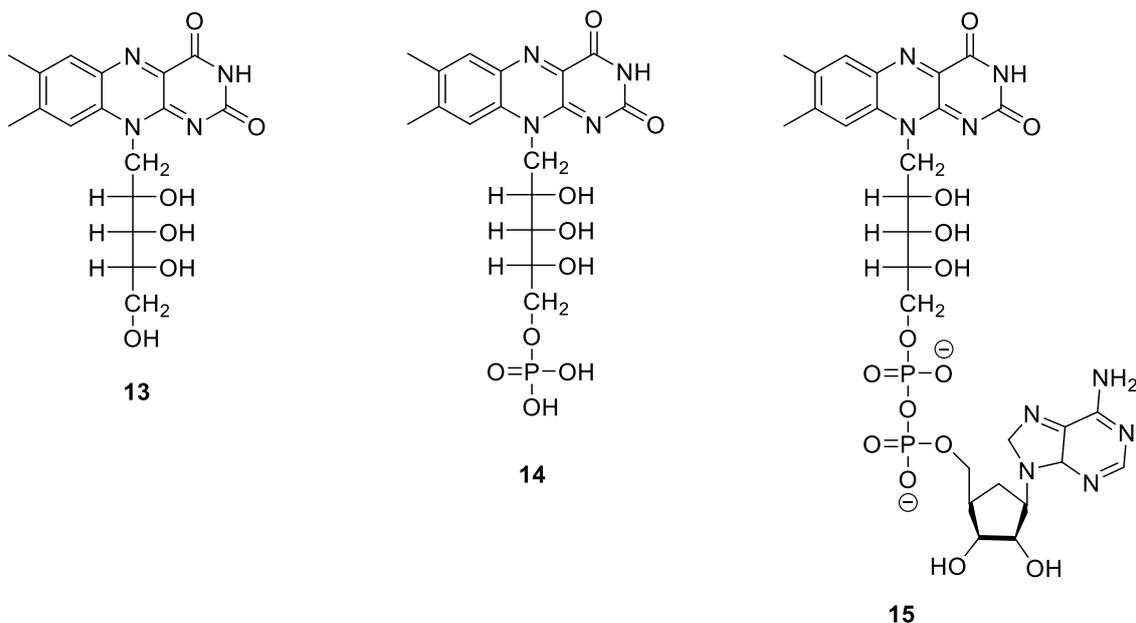


Abbildung 5: Strukturelle Darstellung der drei Flavine: Riboflavin **13**, FMN **14** und FAD **15**.

Die bisher bekannten F-Hals sind von reduziertem FAD (FADH₂) abhängig und zeigen keine Akzeptanz gegenüber FMN **14** oder Riboflavin **13** [51]. Typisch für F-Hals ist, dass sie eine externe Flavinreduktase zur Kofaktor-Regenerierung benötigen [23, 50]. Durch die kristallographische Aufklärung der 3D-Proteinstrukturen von PrnA [52], aber auch anderer F-Hals, wurde ein Reaktionsmechanismus der Halogenierung postuliert (Abbildung 6) [53, 54].

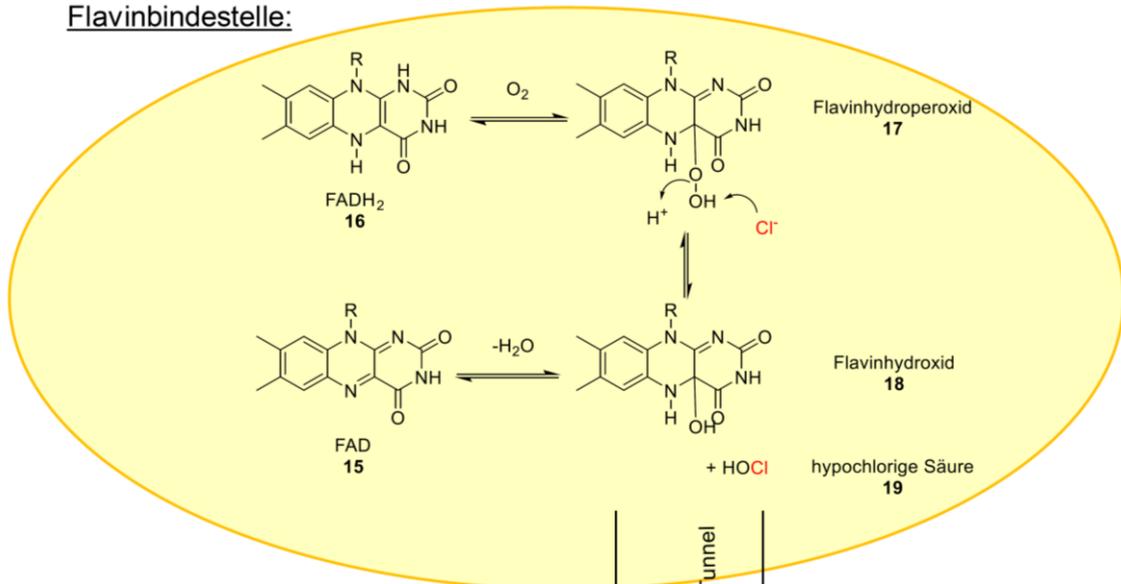
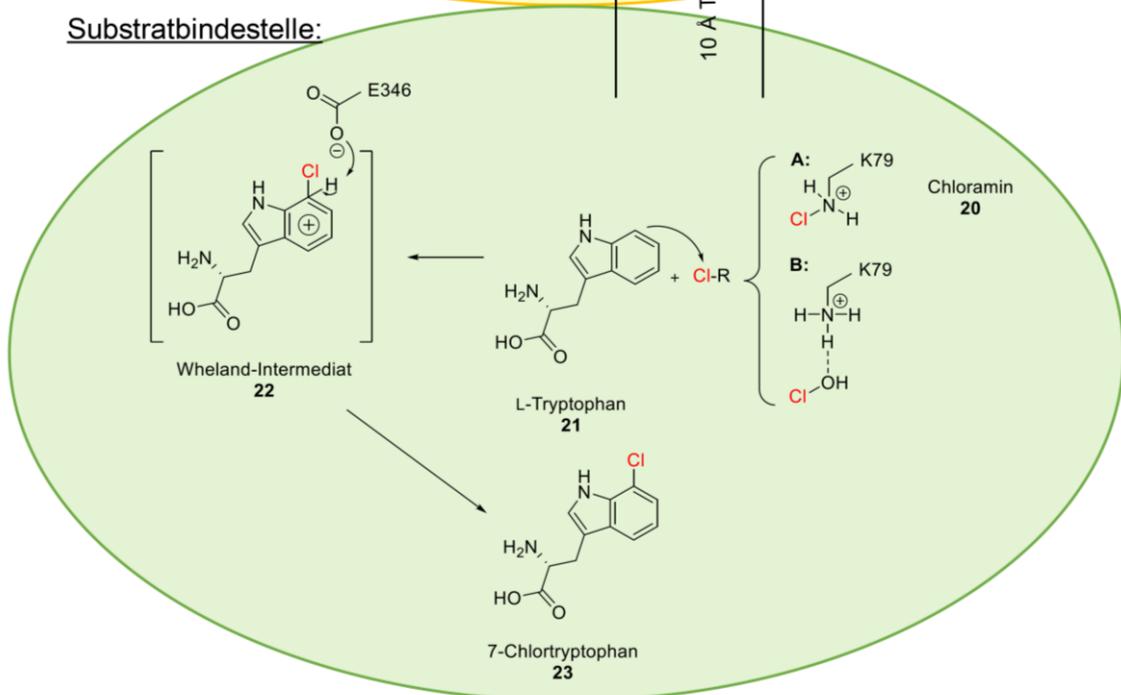
Flavinbindestelle:Substratbindestelle:

Abbildung 6: Darstellung des Halogenierungsmechanismus von F-Hals in den beiden Bindedomänen der Flavin- und der Substratbindestelle, die durch einen 10 Å langen Tunnel miteinander verbunden sind. In dieser Abbildung wurde beispielhaft die Halogenierung von L-Tryptophan **21** zu 7-Chlortryptophan **23** durch die F-Hal PrnA verwendet [52]. A und B zeigen die beiden möglichen Reaktionsmechanismen der Halogenierung. Diese könnte entweder über eine langlebige Chloramin-Spezies **20** (A) oder mit der freien hypochlorigen Säure **19**, die über das konservierte Lysin stabilisiert wird (B) katalysiert werden. Dieses wird bis *dato* noch diskutiert [55, 56].

Der erste Schritt der Halogenierung läuft vermutlich ähnlich zum Mechanismus der Flavin-abhängigen Monooxygenasen ab, in dem das reduzierte Flavin ($FADH_2$ **16**) mit Sauerstoff zu dem aktiven Flavinhydroperoxid ($FAD-OOH$ **17**) reagiert [57]. Der weitere Mechanismus unterscheidet sich allerdings von den Monooxygenasen. Denn das $FAD-OOH$ **17** wird nun vom Halogenid nukleophil attackiert und die hypohalogenige Säure

(HOX **19**) wird gebildet. Dieser Schritt geschieht in den F-Hals in der hoch konservierten Flavinbindestelle (GxGxxG). Die Flavinbindetasche und die Substratbindestelle liegen im Enzym voneinander getrennt und werden durch einen 10 Å langen Tunnel miteinander verbunden (Abbildung 7) [58].

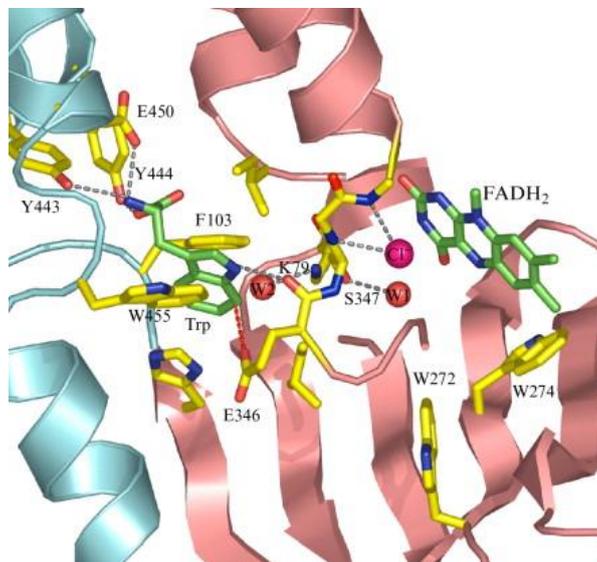


Abbildung 7: 3D-Struktur der F-Hal PrnA. In dieser Abbildung sind nicht alle Strukturelemente des aktiven Zentrums aus Gründen der Übersichtlichkeit abgebildet. Zu sehen ist die Flavinbindestelle mit gebundenem Isoalloxazinring des FADH₂ (rechts), der 10 Å-Tunnel (mittig) und die Substratbindestelle mit einem gebundenen Tryptophanmolekül (Trp, links). Weiterhin ist das konservierte Lysin (K79) und Glutamat (E346) abgebildet. Das Chloratom ist bei der Flavinbindestelle gebunden. Außerdem sind zwei Wassermoleküle abgebildet (W1, W2). Verschiedene Interaktionen zwischen dem Tryptophan und dem Chloratom mit unterschiedlichen Aminosäure-Resten sind durch gestrichelte Linien dargestellt [51, 52].

Die halogenierende Spezies HOX **19** muss den Tunnel passieren um zur Substratbindestelle zu gelangen [52, 54, 59]. Molekulardynamische Berechnungen unterstützen die Annahme dieser Migration und ergaben, dass die Flavinbindestelle und die Substratbindestelle nicht über Konformationsänderungen angenähert werden können [60]. Bei der Durchquerung des Tunnels der hypohalogenigen Säure **19** spielen für die regioselektive Halogenierung verschiedene konservierte Aminosäuren eine wichtige Rolle. Die Arbeit von Yeh *et al.* stellte dabei die Bedeutung des konservierten Lysins (PrnA und RebH: K79) im 10 Å-Tunnel heraus. Das Lysin formt demnach im Fall der Chlorierung ein langlebiges Chloramin (Lys-εNH-Cl) **20**, das die Chlorierung am Substrat durchführt. Dadurch wird im Enzym sichergestellt, dass eine regioselektive Halogenierung ermöglicht wird indem das reaktive HOCl **19** korrekt positioniert wird [55]. Die Bildung der Chloramin-Spezies **20** wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Die andere Hypothese postuliert, dass das konservierte Lysin das HOCl **19** über eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert und positioniert, aber nicht kovalent bindet. In beiden Fällen folgt die elektrophile Addition [56]. Die elektrophile Halogenspezies reagiert nun mit dem Substrat (in diesem Fall L-Tryptophan **21**) in der

Substratbindetasche und es entsteht das Wheland-Intermediat **22**. In den Trp-Halogenasen sorgt ein konserviertes Glutamat (PrnA: E346) für die Stabilisierung und Deprotonierung des Wheland-Intermediats **22** zum halogenierten Produkt (in diesem Fall 7-Chlortryptophan **23**) [52]. Flecks *et al.* postulierten weiterhin, dass die negative Ladung der Glutaminsäure mit dem Proton der HOCl **19** oder des Chloramins **20** interagiert, so dass die Elektrophilie erhöht und das Chlor für die regioselektive Halogenierung ausgerichtet wird. Dabei wurde durch quantenchemische Berechnungen herausgestellt, dass die Interaktion der Carboxygruppe der Glutaminsäure mit dem HOX **19** möglich ist, während die Interaktion mit dem Chloramin nicht möglich wäre, da die Chloramin-Spezies **20** und die Glutaminsäure über 5 Å voneinander entfernt liegen [56]. Nicht-Trp-Halogenasen besitzen in der Regel keine Glutaminsäure in dieser Position, was darauf zurückgeführt wird, dass andere Substrate wie Phenole oder Pyrrole empfänglicher für die Halogenierung durch HOX **19** oder das Chloramin **20** sind [56]. Das Motiv WxWxIP ist in allen bekannten F-Hals hochkonserviert. Dieses Motiv soll die Monooxygenase-Aktivität der F-Hals unterdrücken, indem die großen Aminosäureseitenketten der beiden Tryptophane verhindern, dass das Substrat zu nah am Isoalloxazinring des FAD bindet [52].

Da alle F-Hals abhängig von reduziertem FAD sind, es aber nicht selbst regenerieren können, benötigen die F-Hals eine externe Kofaktor-Regenerierung. Die Kofaktor-Regenerierung übernimmt in der Natur die Enzymklasse der Flavinreduktasen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die F-Hals dabei nicht auf eine spezifische Flavinreduktase angewiesen sind und freies FADH₂ verwenden können [51, 61]. Flavinreduktasen reduzieren Flavin mittels des Kofaktors NADH+H⁺ und sind somit auch Kofaktor-abhängig [62, 63]. Für *in vitro*-Halogenierungsreaktionen werden meistens F-Hals in einem Zwei-Komponenten-System, bestehend aus der F-Hal und dem Kofaktor-Regenerierungssystem eingesetzt. Häufig wird die Flavinreduktasen RebF (aus dem Rebeccamycin-Biosynthesecluster), PrnF (aus dem Pyrrolnitrin-Biosynthesecluster **29**), Fre (Flavinreduktase aus *E. coli*) oder SsuE (Flavinreduktase aus *E. coli*) verwendet [27, 45, 64–66]. Die Kofaktor-Regenerierung des NADH+H⁺ erfolgt dabei entweder über eine Alkoholdehydrogenase, die 2-Propanol zu Aceton oxidiert und dabei die Elektronen des 2-Propanols auf das NAD⁺ überträgt oder mittels einer Glukosedehydrogenase, die D-Glukose **24** und NAD⁺ zu D-Glukono-1,5-Lakton **25** und NADH+H⁺ katalysiert (Abbildung 8) [27, 45, 64–66]. Die gentechnische Fusion von Flavinreduktase und F-Hals führte in *in vitro*-Versuchen zu keinen höheren Umsatzraten im Vergleich zum Zwei-Komponenten-System [67].

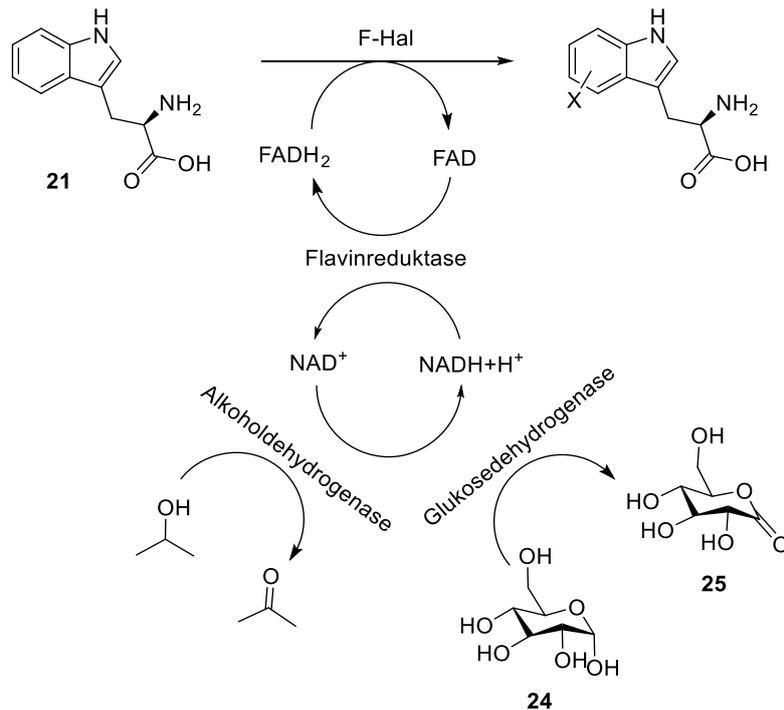


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kofaktor-Regenerierung für die *in vitro* Halogenierung mittels F-Hals am Beispiel von L-Tryptophan. Dazu können verschiedene Flavinreduktasen verwendet werden, die wiederum NADH+H⁺-abhängig sind. NADH+H⁺ wird dazu entweder mittels einer Alkoholdehydrogenase oder einer Glukosedehydrogenase regeneriert.

Unversucht *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass die enzymatische Halogenierung auch mit chemisch reduziertem FAD durchgeführt werden kann. Dazu wurde der Organometall-Komplex (Pentamethylcyclopentadienyl)-rhodium-bipyridin als Elektronendonator verwendet [61]. Auch NADH-Mimetika wie 1-Benzyl-1,4-dihydronicotinamid (BNAH) können zur Kofaktor-Regenerierung von FAD zu FADH₂ verwendet werden und die F-Hals RebH, Thal und PyrH zeigten sogar höhere Halogenierungsaktivitäten als mit der enzymatischen Kofaktor-Regenerierung [68]. Erst kürzlich wurde die Methode der photochemischen Regenerierung von FADH₂ für F-Hals gezeigt. Dabei ist es möglich, gebundenes FAD in der F-Hal photochemisch (455 nm) mit einem Reduktionsmittel (zum Beispiel EDTA) zu reduzieren und somit die Halogenierungsreaktion zu ermöglichen [69].

F-Hals werden in zwei Varianten eingeteilt. F-Hals der Variante A sind in der Lage freies Substrat zu halogenieren. Hierzu gehören auch die Trp-Halogenasen. Die F-Hals der Variante B benötigen die Bindung des Substrats an ein Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) und sind nicht in der Lage freies Substrat zu halogenieren [70]. Diese sind vor allem in der nichtribosomalen-Peptidsynthese und Polyketid-Synthese beteiligt. Strukturell unterscheiden sich die Variante B-F-Hals zu den Variante A-F-Hals, da sie um 70 Aminosäuren kürzer sind und eine nicht-polare Oberfläche besitzen, welche vermutlich mit dem PCP interagiert [70–72]. Außerdem wurde von Variante B-F-Hals

berichtet, die am C-Terminus eine blockierende Domäne besitzen, die durch Konformationsänderungen die Bindung des Substrates erst ermöglichen [70, 73, 74].

F-Hals können aber auch anhand ihrer Substratpräferenz in Trp- Halogenasen, Pyrrol-F-Hals und Phenol-F-Hals eingeteilt werden [23, 72]. 2017 wurde das Substratspektrum von acht verschiedenen F-Hals untersucht, indem 93 Substrate aus den Substratklassen der Indole, Pyrrole, Aniline, Anilide und Phenole untersucht und Aktivitätsprofile erstellt wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichten die mögliche Einteilung der F-Hals in die Trp-Halogenasen, Pyrrol-F-Hals und Phenol-F-Hals [75]. Allerdings sind auch F-Hals bekannt, die in dieser Klassifizierung nicht eindeutig zugeordnet werden können. Dazu gehören die F-Hals CmlS, HalY und MalA [73, 76, 77].

CmlS ist vermutlich für die Dichlorierung der Dichloracetyl-Einheit des Antibiotikums Chloramphenicol zuständig. Allerdings konnte dieses noch nicht *in vitro* nachgewiesen werden. Die Röntgen-Kristallstruktur des Enzyms ist aufgeklärt und zeigt, dass CmlS vermutlich ein PCP-gebundenes Substrat während der Chloramphenicol Biosynthese chloriert. Interessanterweise ist CmlS in der Lage, das FAD kovalent über einen Aspartat-Rest zu binden [73]. Dieses ist sonst nur von den Variante B-Halogenasen PltA, BhaA und CndH bekannt [70, 71, 78]. Alle anderen F-Hals benötigen zusätzliches Flavin in der Reaktionslösung [51].

HalY wurde in *Streptomyces* sp. JCM9888 identifiziert und soll die regioselektive Halogenierung von Adenin katalysieren. Eine *in vitro*-Aktivität wurde für dieses Enzym wie für CmlS noch nicht nachgewiesen. Die Röntgen-Kristallstruktur des Enzyms weist eine hohe Ähnlichkeit zu CndH und CmlS auf, sodass auch von einer Variante B-F-Hal ausgegangen wird [76].

Malbrancheamid ist ein dichloriertes Alkaloid aus den Pilzen *Malbranchea aurantiaca* und *Malbranchea graminicola*. In den Genclustern des Biosynthesewegs von Malbrancheamid wurden in beiden Pilzen eine F-Hal identifiziert: MalA (*Malbranchea aurantiaca*) und MalA' (*Malbranchea graminicola*). Diese katalysieren im Spätstadium der Biosynthese die Halogenierung von Premalbrancheamid. Es wurde postuliert, dass diese eine neue Klasse von F-Hals bilden könnten, da sie eine Zn²⁺-Bindestelle besitzen und ein flexibles aktives Zentrum aufweisen, in dem große Substrate für die Halogenierung gebunden werden können [77].

2.3.1. Tryptophan-Halogenasen

Die Trp-Halogenasen sind die wohl am besten charakterisierten F-Hals. Sie weisen hohe Sequenzähnlichkeiten zueinander auf und zeigen dieselben konservierten Bereiche. Vor allem die Flavinbindestelle sowie das konservierte Lysin liegen höchstkonserviert vor. Alle bisher bekannten Trp-Halogenasen präferieren die Chlorierung gegenüber der Bromierung, eine katalysierte Iodierung oder Fluorierung konnte bisher noch nicht detektiert werden [51]. Sie unterscheiden sich in ihrer Regioselektivität und halogenieren L-Tryptophan in der C7-, C6-, oder C5-Position (Abbildung 9). Eine Trp-4-Halogenase ist bis *dato* noch nicht bekannt.

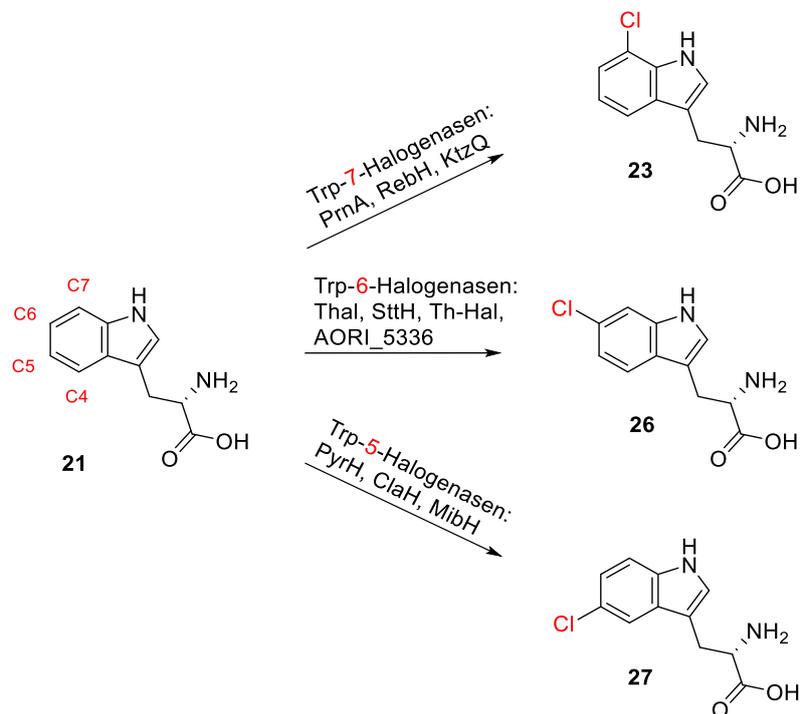


Abbildung 9: Darstellung der Halogenierung von L-Tryptophan **21** durch die verschiedenen Trp-7-, Trp-6-, Trp-5- Halogenasen.

Die Trp-Halogenasen sind alle in verschiedenen Biosynthesewegen biologisch aktiver Halogenmetabolite involviert (Abbildung 10).

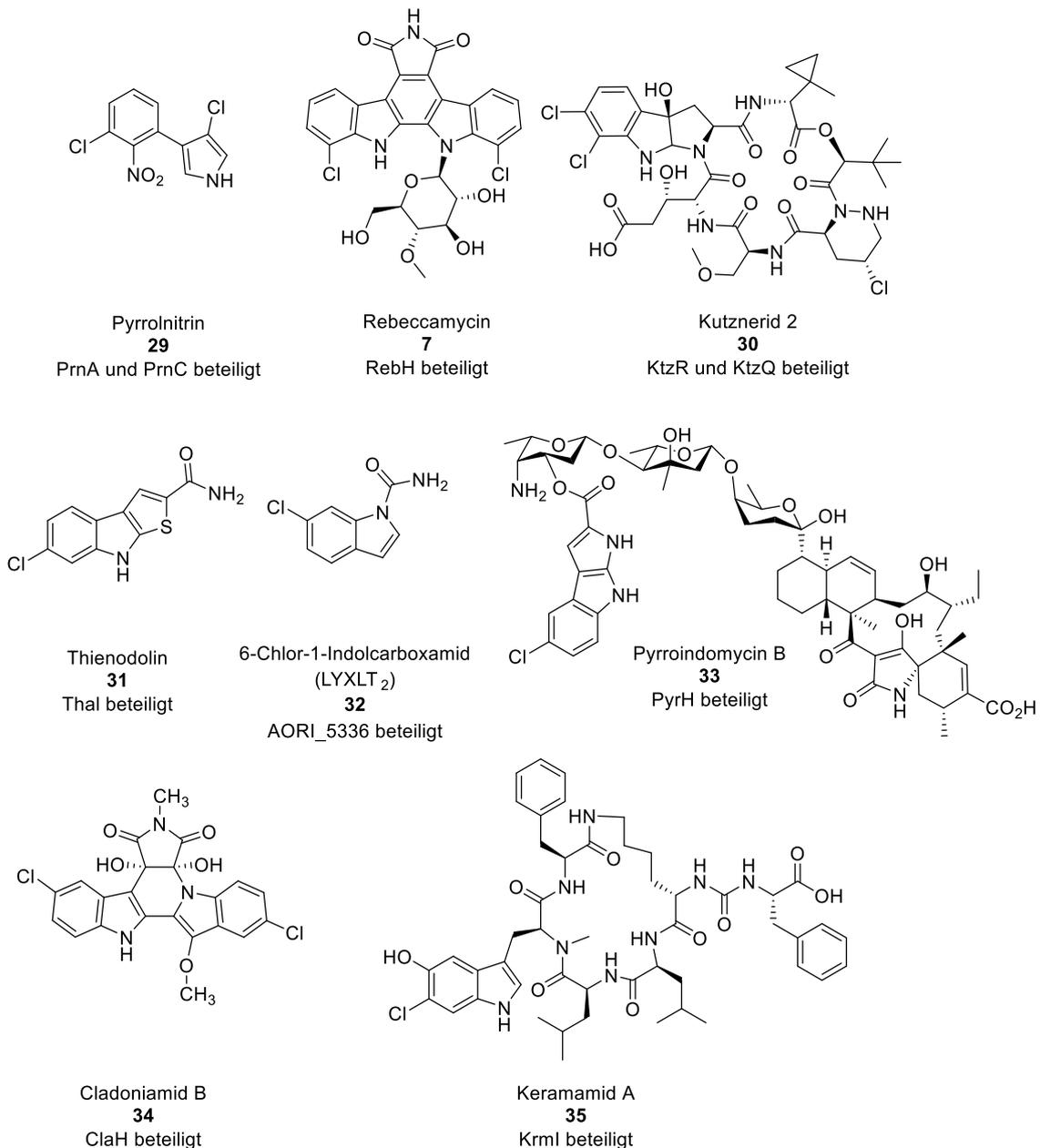


Abbildung 10: Halogenmetabolite an deren Biosynthese Trp-Halogenasen beteiligt sind.

PrnA ist eine Trp-7-Halogenase, die an der Biosynthese von Pyrrrolnitrin **29** in *Pseudomonas fluorescens* beteiligt ist [45]. Sie weist 53,9% Sequenzidentität zu der Trp-7-Halogenase *RebH* aus *Lechevalieria aerocolonigenes* auf, die an der Biosynthese des Antitumor-Reagenz Rebeccamycin **7** beteiligt ist [46, 79].

PrnA halogeniert das natürliche Substrat L-Tryptophan **21** in C7-Position, während es andere Substrate wie Tryptamin- und Indol-Derivate an der am meisten aktivierten C2-Position halogeniert [80]. Interessanterweise ist *RebH* in der Lage, Tryptamin in der C7-

Position zu halogenieren, wenn auch in geringen Ausbeuten [81]. Es wird angenommen, dass sich die Regioselektivität zur höchstaktivierten Stelle der Verbindung verschiebt, wenn das Substrat nicht optimal in der Substratbindetasche gebunden werden kann [80]. Die Trp-7-Halogenasen können zu dem natürlichen Substrat auch weitere Indol- und Tryptophan-Derivate halogenieren. So führten Shepherd *et al.* mit PrnA die Halogenierung von nicht-indolischen Verbindungen durch und zeigten, dass PrnA auch Kynurenin in *ortho*-Position und, Anthranilamid und Anthranilsäure in einem Mix aus *ortho*- und *para*- halogeniert [65]. Für RebH konnte eine Halogenierungsaktivität für die Substrate 5-Methyltryptophan, 5-Hydroxytryptophan, 5-Fluortryptophan und in geringem Maße von 5-Bromtryptophan nachgewiesen werden [82].

Aus *Kutzneria* sp. 744 wurden zwei Trp-Halogenasen KtzQ und KtzR identifiziert, die an der Biosynthese von Kutznerid **30** beteiligt sind. KtzQ chloriert L-Tryptophan an C7-Position und KtzR chloriert 7-Chlortryptophan **23** an C6-Position zum 6,7-Dichlortryptophan **28** (Abbildung 11). KtzR ist zwar auch in der Lage, L-Tryptophan an C6-Position zu chlorieren, bevorzugt allerdings zu mehr als dem 120-fachen das chlorierte Tryptophan [83].

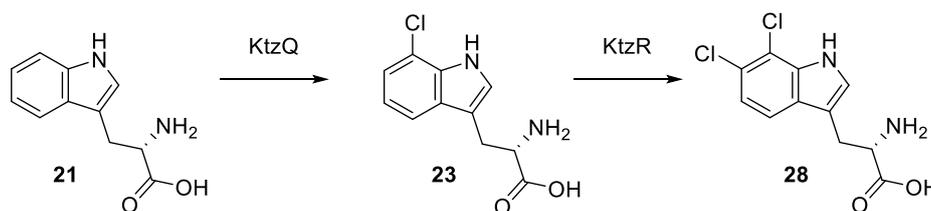


Abbildung 11: Tandem Chlorierung der F-Hals KtzR und KtzQ zum 6,7-Dichlortryptophan.

Die Trp-6-Halogenasen Thal ist für die Halogenierung des Tryptophans in der Thienodolin **31** Biosynthese zuständig und stammt aus *Streptomyces albobrogriseolus* [48].

Weitere Trp-6-Halogenasen wurden in den letzten Jahren identifiziert. Hierzu zählen SttH aus *Streptomyces toxytricini* NRRL 15443 [84], Th-Hal aus dem thermophilen *Streptomyces violaceusniger* SPC6 Stamm [85] und AORI_5336 aus dem Biosynthesecluster von 6-Chlor-1-indolcarbamid (LYXLT₂) **32** in *Amycolatopsis orientalis*, dessen Aktivität bisher allerdings nur durch *Knock-Out*-Experimente gezeigt werden konnte [86]. SttH und Th-Hal zeigen ein ähnliches Substratspektrum, auch wenn das natürliche Substrat von Th-Hal nicht bekannt ist, da die Halogenase allein durch Sequenzhomologien in genomischen Datensätzen identifiziert wurde [66, 85]. Th-Hal halogeniert L-Tryptophan und 1-Methyltryptophan in C6-Position und katalysiert die Halogenierung von 5-Hydroxytryptophan in C4-Position. Die nicht-indolischen

Verbindungen Kynurenin, Anthranilsäure und Anthranilamid werden von Th-Hal an der meistaktivierten Stelle der Verbindungen (C5) halogeniert [85].

PyrH ist eine bekannte Trp-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus* LL-42D005 und in die Pyrroindomycin-Biosynthese **33** involviert [47]. Bei Untersuchungen bezüglich des Substratspektrums von PyrH wurde gezeigt, dass es auch die Halogenierung von nicht-indolischen Verbindungen katalysieren kann. So halogeniert diese Kynurenin, Anthranilamid und Anthranilsäure in *para*-Position [65].

Weitere bekannte Trp-5-Halogenasen sind ClaH aus der Biosynthese von Cladoniamid **34** in *Streptomyces uncialis* und MibH aus der Biosynthese des Lantibiotikums NAI-107 (Microbisporicin A1) [87, 88]. Die Besonderheit an MibH ist, dass es die erste Trp-Halogenase ist, die Tryptophan nur im Peptid vorliegend halogenieren kann. Freies Substrat wird nicht akzeptiert. Dieses wird durch die im Vergleich zu den anderen Trp-Halogenasen größere aktive Tasche ermöglicht [88].

2017 wurde von Smith *et al.* eine neue Trp-Halogenase (Krml) aus *Theonella swinhoei* WA identifiziert. Krml katalysiert die Chlorierung von 5-Hydroxytryptophan an C6-Position in der Biosynthese von Keramid A **35**. *In vitro*-Experimente zeigten, dass Krml in der Lage ist, 5-Hydroxytryptophan zu chlorieren und in geringerem Maße auch zu bromieren. Damit ist Krml neben KtzR die einzige Trp-Halogenase, die substituiertes Tryptophan dem L-Tryptophan vorzieht. Weiterhin zeigten Experimente bezüglich des Substratspektrums, dass Hydroxyindole, 5-Aminoindol und 7-Azaindol halogeniert werden, während andere Indol-Derivate wie Fluor-, Chlor- und Nitroindole sowie Phenol-Derivate nicht halogeniert werden [89].

Alle bekannten Trp-Halogenasen weisen sehr hohe Sequenzähnlichkeiten auf und unterscheiden sich dennoch in ihrer Regioselektivität. Dabei spielt vermutlich die Orientierung des Tryptophans in der Substratbindetasche eine essentielle Rolle [51, 60]. In den Trp-7-Halogenasen ist der Indolring so positioniert, dass der Stickstoff des Indolrings in Richtung des Tunnels zeigt und dessen Proton dem Glutamat (E346) interagiert. Andere reaktive Stellen im Tryptophan werden durch große Aminosäurereste abgeschirmt (W455, F103) [90]. Im Gegensatz dazu ist der Indolring in PyrH um 180° gedreht positioniert, sodass das Stickstoffproton mit der Hydroxylgruppe des Tyrosins in Position Y454 interagiert und somit die C5-Position in Richtung des Tunnels zeigt (Abbildung 12) [51, 54, 60].

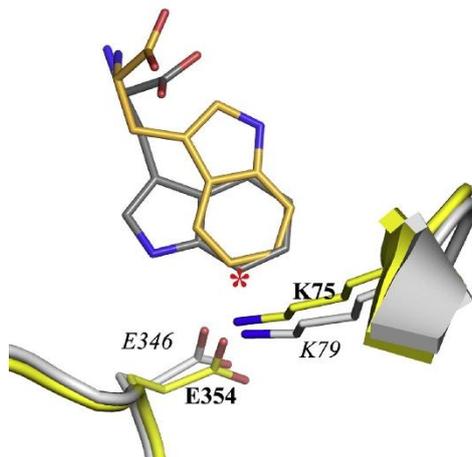


Abbildung 12: Tryptophanbindestelle von PrnA und PyrH. In grau ist das konservierte Glutamat und Lysin von PrnA dargestellt und in gelb von PyrH. Das dunkel graue Tryptophan stellt die Ausrichtung des Substrats in PrnA dar und das orangene Tryptophan in PyrH. Dieses zeigt, dass die Ausrichtung des Tryptophans in der Substratbindestelle essentiell für die Position der regioselektiven Halogenierung ist [54].

Lang *et al.* mutierten 2011 ein Phenylalanin in der Substratbindetasche zum kleineren Alanin (F103A) und beeinflussten so die Regioselektivität von PrnA. Die Mutante halogeniert nicht nur in C7-Position des Tryptophans, sondern bildet einen 2:1-Mix von C7- und C5-halogeniertem Produkt [90]. 2016 gelang es durch eine Dreifachmutante von SttH (L460F/P461E/P462T), die Regioselektivität von 90% Chlorierung in C6-Position zu 75% Chlorierung in C5-Position von Indol-3-Propionsäure zu verändern. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Regioselektivität nicht die katalytische Aktivität beeinflusst [66]. Auch gerichtete Evolution, eine zufallsbasierte Mutagenese wurde bezüglich der Veränderung der Regioselektivität genutzt. Durch diese Methodik wurden zwei RebH-Mutanten (8F und 10S) identifiziert, die Tryptamin selektiv in C5- und C6-Position halogenieren, wobei der Wildtyp (WT) in C7-Position halogeniert [91]. 2018 wurde von Moritzer *et al.* eine 5-fach Mutante aus Thal erschaffen, die statt der C6-Position zu 95% die C7-Position halogeniert, was die erste Arbeit darstellt, die eine fast vollständige Änderung der Regioselektivität erschaffen konnten [92].

Trp-Halogenasen wurden auch bezüglich ihrer Thermostabilität untersucht. Im Rahmen der Identifizierung der Th-Hal wurden über Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie die Denaturierungstemperaturen der Enzyme Th-Hal, PyrH, PrnA, SttH, KtzR und RebH bestimmt und verglichen. Dabei zeigte sich, dass Th-Hal die höchste Denaturierungstemperatur mit 47.8°C aufweist, während die anderen Trp-Halogenasen zwischen 30 und 40°C denaturieren [85]. Dahingegen gaben Poor *et al.* 2014 für RebH einen Denaturierungspunkt von 52.4°C an, der wie von Th-Hal mittels CD-Spektroskopie ermittelt wurde [93]. In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen versucht, über

gerichtete Evolution die F-Hals bezüglich ihrer Stabilität oder des Substratspektrums zu optimieren [91, 93–95].

2.3.2. Flavin-abhängige-Pyrrol-Halogenasen

Die Flavin-abhängigen-Pyrrol-Halogenasen (Pyrrol-F-Hals) scheinen im Vergleich zu Trp-Halogenasen in Biosynthesewegen kleinerer Produkte involviert zu sein (Abbildung 13).

Die meisten gehören zu den Variante B-Halogenasen, die ein PCP-gebundenes Substrat benötigen. Nur PrnC aus demselben Biosynthesegencluster von **28** wie PrnA aus *Pseudomonas fluorescens* ist in der Lage, ein freies Pyrrol-Substrat zu chlorieren [49]. Die anderen bisher bekannten Pyrrol-F-Hals gehören zu den Variante B-Halogenasen. Zum Beispiel PltA, das in der Biosynthese von Pyoluteorin **36** aus *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 eine Dichlorierung zuerst zu 5-Chlorpyrrolyl-S-PCP und dann zu 4,5-Dichlorpyrrolyl-S-PCP katalysiert [71]. Die Röntgenstrukturanalyse dieser F-Hal zeigte, dass PltA zu den bekannten Trp-Halogenasen eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweist und auch die konservierten Bereiche, wie die Flavinbindestelle oder das konservierte Lysin, besitzt. Allerdings weist PltA keinen Glutamatrest auf, der in den Trp-Halogenasen zur Stabilisierung und Deprotonierung des Wheland-Intermediates **22** wichtig ist. Stattdessen wird davon ausgegangen, dass ein Wassermolekül die Deprotonierung übernehmen kann [74]. Die F-Hal HalB aus *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 weist eine hohe Ähnlichkeit zu PltA auf, die auch PCP-gebundene Pyrrol-Derivate halogeniert [76, 96]. Über *Knock-Out*-Experimente identifizierten Moore *et al.* 2012 die F-Hal Mpy16 aus *Streptomyces* sp. CNQ-418, die ein PCP-gebundenes Marinopyrrol dichloriert sowie 2013 die putative F-Hal Clz5 aus *Streptomyces* sp. CNH-287, die für die Chlorierung eines Pyrrol-PCP in der Biosynthese von Chlorizidin A **37** zuständig ist [97, 98]. Eine weitere bekannte Pyrrol-F-Hal ist Bmp2 aus *Pseudoalteromonas*, die in der Biosynthese von Pentabrompseudilin **38** die Dreifachbromierung eines PCP gebundenen Pyrrols katalysiert. Diese kann sowohl bromieren als auch in geringem Maße iodieren, jedoch nicht chlorieren [99].

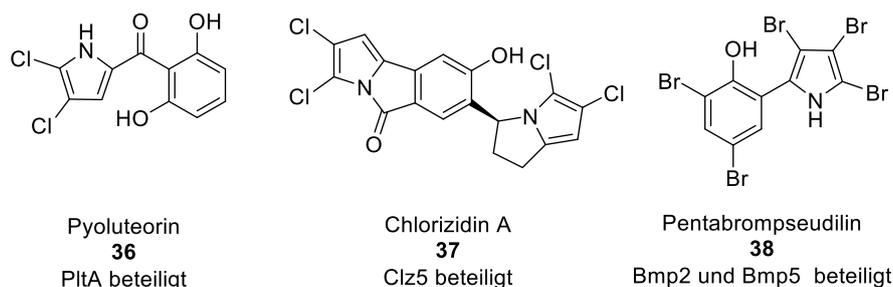


Abbildung 13: Halogenmetabolite an deren Biosynthese Flavin-abhängige-Pyrrol-Halogenasen beteiligt sind.

2.3.3. Flavin-abhängige-Phenol-Halogenasen

Die Flavin-abhängigen-Phenol-Halogenasen (Phenol-F-Hals) katalysieren wie die Trp-Halogenasen und die Pyrrol-F-Hals die Halogenierung in verschiedenen Biosynthesewegen von Halogenmetaboliten (Abbildung 14).

Unter den Phenol-F-Hals gibt es mehrere Enzyme, die Tyrosyl-PCPs halogenieren. Hierzu zählen die F-Hal VhaA aus dem Vancomycin **5**-Biosyntheseweg in *Amycolatopsis orientalis* DSM40040, sowie die F-Hal BalH aus dem Balhimycin **39**-Biosyntheseweg in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. VhaA und BalH katalysieren jeweils die Chlorierung von zwei Hydroxytyrosin-Einheiten [100, 100, 101, 101].

Die F-Hal SgcC3 aus der Biosynthese des Endiin-Antitumor-Antibiotikums C1027 **40**, CrpH aus der Biosynthese der Antitumor-Verbindung Cryptophycin **41** und CloH aus der Biosynthese des antibakteriellen Clorobiocin **42** chlorieren PCP-gebundenes Tyrosin [102–104]. Auch CndH aus der Chondrochloren A-Biosynthese chlortiert vermutlich ein Tyrosyl-PCP. Bisher ist allerdings nur die Röntgenstruktur des Enzyms aufgeklärt und keine *in vitro*-Aktivität konnte nachgewiesen werden [70].

Bmp5 ist die erste identifizierte F-Hal, die sowohl halogenieren als auch decarboxylieren kann. Sie stammt aus demselben Pentabrompseudilin-Biosyntheseweg **38** aus *Pseudoalteromonas* wie Bmp2 und kann wie Bmp2 sowohl die Bromierung als auch die Iodierung katalysieren, jedoch nicht die Chlorierung. Durch seine bifunktionelle Wirkungsweise unterscheidet sich Bmp5 strukturell von den bisher bekannten F-Hals. Des Weiteren ist diese in der Lage, FAD eigenständig mit Hilfe einer Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Bindestelle (GLGESSAD) zum FADH₂ zu reduzieren, wodurch keine externe Flavinreduktase benötigt wird [105].

Weitere Phenol-F-Hals sind Ram20 und End30. Beide chlorieren in unterschiedlichen Positionen 4-Hydroxyphenylglycin in der Biosynthese von Ramoplanin (Ram20) und Enduracidin (End30) [106, 107].

In den letzten Jahren wurden neue F-Hals, die phenolische Verbindungen halogenieren auch in Pilzen identifiziert. Die erste pilzliche F-Hal war Rdc2 aus *Pochonia chlamydosporia*, die in der Radicol-Biosynthese **43** Monocillin II halogeniert [108]. RadH ist Rdc2 sequenziell sehr ähnlich und stammt aus *Chaetomium chiversii*, wo RadH wie Rdc2 für die Halogenierung im Radicol-Biosyntheseweg **43** zuständig ist [109]. Von beiden Enzymen erfolgt die Halogenierung im Gegensatz zu anderen F-Hals im Spätstadium der Synthese [108, 109].

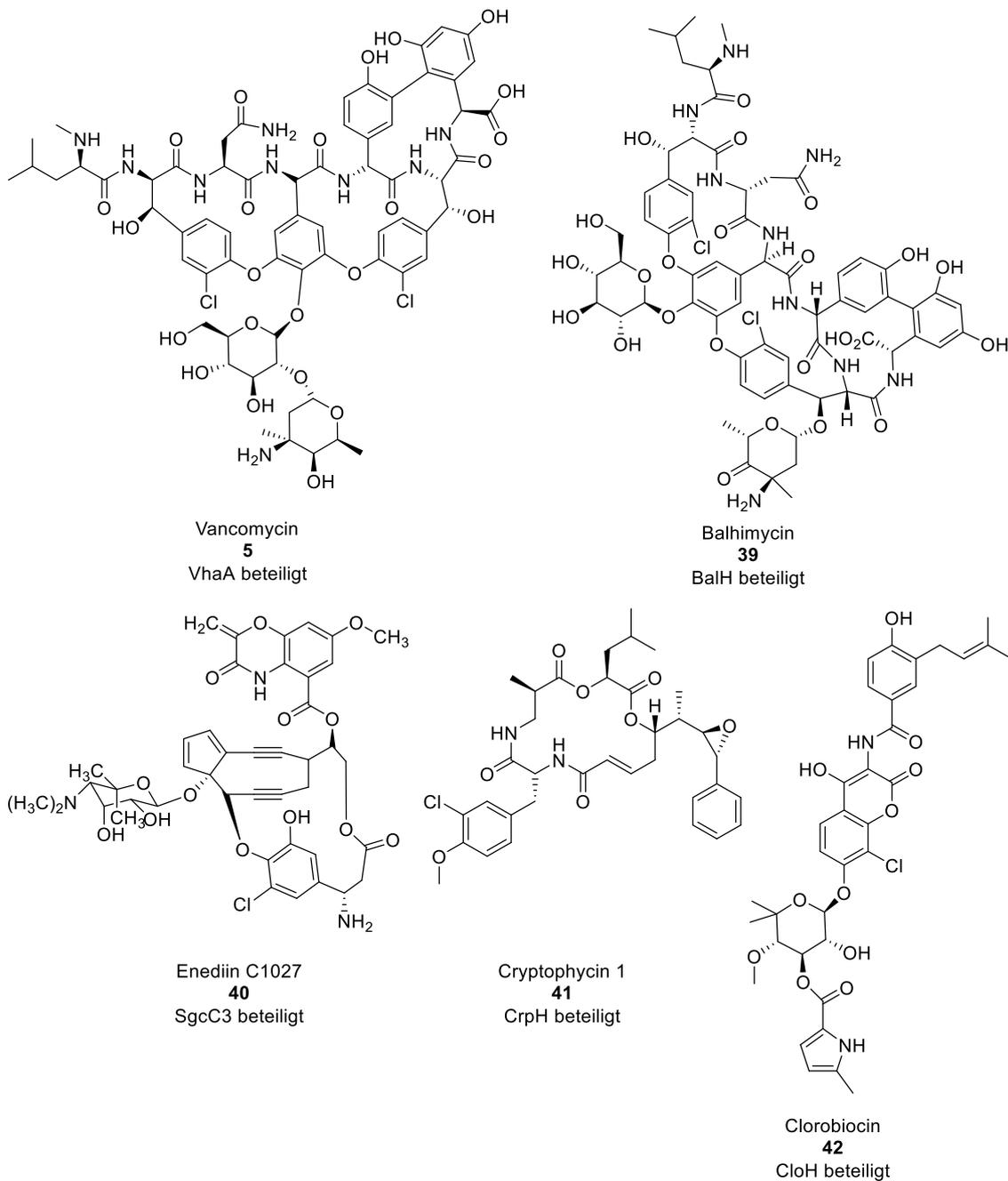


Abbildung 14: Halogenmetabolite in deren Biosynthese Flavin-abhängige-Phenol-Halogenasen beteiligt sind.

Für RadH wurde das Substratspektrum eingehender betrachtet und es zeigte sich, dass RadH sowohl die Chlorierung als auch, in etwas geringerem Maße, die Bromierung katalysieren kann. Weiterhin wurde 6-Hydroxyquinolin und 7-Hydroxycumarin von RadH halogeniert. Wenn allerdings die Hydroxygruppe in der Verbindung fehlt, wurde kein Umsatz erhalten. Dieses suggeriert, dass die Hydroxygruppe für den Halogenierungsmechanismus essenziell ist. Auch pflanzliche Flavonoide wurden von RadH umgesetzt [109].

Die F-Hal ChIA wurde in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* identifiziert und ist in der Biosynthese des Differenzierungs-induzierenden Faktors 1 (DIF-1) **44** für die Dichlorierung von 4,6-Trihydroxyphenyl-1-hexan-1-on zuständig [110].

Auch im Schimmelpilz *Penicillium aethiopicum* wurde die chlorierende F-Hal Gsfl identifiziert, die in der Biosynthese von Griseofulvin **45** für die Halogenierung verantwortlich sein könnte [111]. Andorfer *et al.* zeigten, dass die F-Hal Gsfl viele verschiedene Phenol-Derivate halogenieren kann [75].

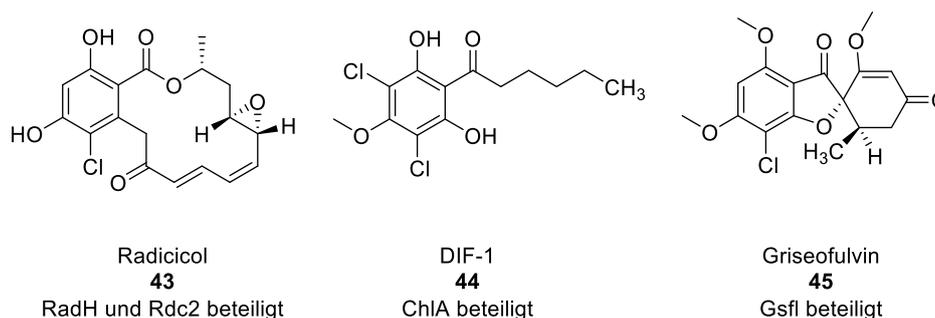


Abbildung 15: Halogenmetabolite in deren Biosynthese Flavin-abhängige-Phenol- Halogenasen pilzlichen Ursprungs beteiligt sind.

2.4. Anwendung der Flavin-abhängigen Halogenasen für nicht natürliche Substrate und chemische Reaktionen

Durch die Eigenschaft der F-Hals, regioselektiv Substrate im wässrigen Milieu und bei geringen Temperaturen in nicht aktivierten Positionen zu halogenieren, ohne dass Schutzgruppen eingeführt werden müssen, sind diese auch für die präparative Anwendung interessant [112]. Die halogenierten Produkte können zudem durch etablierte Synthesen weiter chemisch modifiziert werden, wie zum Beispiel durch Palladium-katalysierte Kreuzkupplung für die C-H-Funktionalisierung [112, 113]. Ein Problem stellt allerdings die Instabilität, die geringe katalytische Aktivität und das oft kleine Substratspektrum der Enzyme dar [72]. Durch Optimierungsverfahren wurde versucht, diese negativen Aspekte der Enzyme zu ausschalten.

Vor allem die Trp-Halogenasen unterlagen in den letzten Jahren vielen verschiedenen Optimierungsverfahren hinsichtlich des Substratspektrums, der Regioselektivität sowie der weiteren Nutzung der halogenierten Verbindungen.

Micklefields Arbeitsgruppe untersuchte das Substratspektrum von PrnA und PyrH und verglich dazu die Aktivität und Regioselektivität der beiden Enzyme in Bezug auf nicht-indolische Verbindungen (Kynurenin **46**, Anthranilamid **47**, Anthranilsäure **48**, N-Phenylanthranilsäure **49**, 2-Amino-4-methylbenzamid **50** und 2-Amino-N-ethylbenzamid **51**) (Abbildung 16).

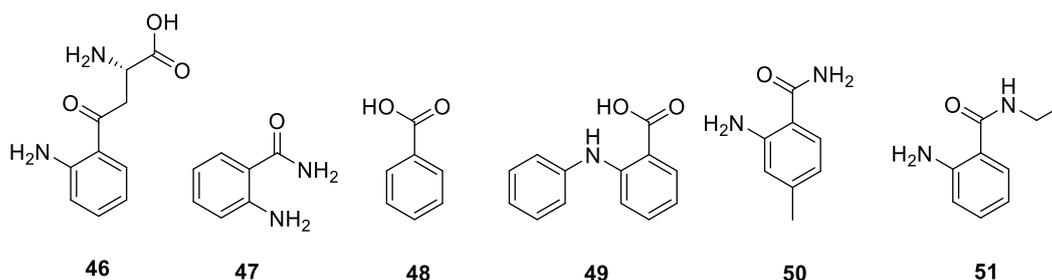


Abbildung 16: Nicht-indolische Verbindungen (Kynurenin **46**, Anthranilamid **47**, Anthranilsäure **48**, N-Phenylanthranilsäure **49**, 2-Amino-4-Methylbenzamid **50** und 2-Amino-N-ethylbenzamid **51**), die von F-Hals halogeniert werden können.

Zusätzlich wurde durch strukturbasierte (gerichtete) Mutagenese die Aktivität von PrnA bezüglich der Anthranilsäure verbessert. Dies zeigte, dass die Mutagenese sowohl Aktivität als auch Regioselektivität beeinflussen kann [65]. Ein ähnliches Substratspektrum scheint die Trp-6-Halogenase SttH aufzuweisen. Dieses Enzym kann ebenfalls die Verbindungen Indol-3-propionsäure, N-Methyltryptophan, L-Kynurenin **46**, Anthranilamid **47**, Anthranilsäure **48** und N-Phenylanthranilsäure **49** halogenieren [66]. Lewis' Arbeitsgruppe nutzte gerichtete Evolution, um mit RebH-Mutanten größere Substrate umzusetzen, wobei zwei Mutanten entstanden: Die Mutante 3-SS, die trizyklische Tryptolin-Derivate halogenieren kann und 4-V, die eine Reihe von größeren Indolen und Carbazolenen umsetzen kann [94].

Um die Stabilität der Trp-Halogenasen zu erhöhen, wurde von Frese *et al.* die Methodik der *combi*CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*) etabliert. Dabei werden die F-Hals mit ihrem Kofaktor-Regenerierungssystem immobilisiert. Zunächst werden die Enzyme gemeinsam durch Ammoniumsulfat präzipitiert und anschließend über deren Lysin-Reste mittels Glutaraldehyd kovalent quervernetzt. Durch diese Methodik ist es möglich, höhere Konzentrationen an Substrat umzusetzen und die Enzyme sogar für weitere Reaktionen zu regenerieren [27].

Die Stabilität von F-Hals wurde durch gerichtete Evolution hinsichtlich ihrer Temperaturtoleranz verbessert. Dies ist von Interesse, da die Enzyme so in chemischen Eintopf-Synthesen eingesetzt werden können, aber auch, weil die Thermostabilität oftmals mit einer Langzeitstabilität, Proteolysestabilität und Lösungsmittelstabilität einhergeht [93, 93, 114, 114]. So wurden zwei Mutanten von RebH identifiziert, die hinsichtlich ihres Temperaturoptimums verbesserte Parameter aufweisen als der WT: Die Mutante 3-LR, deren Temperaturoptimum 5°C höher als die des WT ist und die Mutante 3-LSR, deren halbmaximale Inaktivierungstemperatur (T_M) um 18°C erhöht ist [93]. Schnepel *et al.* etablierten ein Verfahren, optimierte Mutanten zum Beispiel aus gerichteten Evolutionsexperimenten schnell und einfach im *E. coli*-Rohextrakt zu detektieren. Bei diesem Verfahren reagiert das enzymatisch halogenierte L-Tryptophan über die Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung mit *m*-Aminophenylboronsäure. Das Produkt weist ein Emissionsmaximum bei $\lambda=430$ nm auf, während L-Tryptophan bei dieser Wellenlänge keine Fluoreszenz zeigt [95]. So ist eine schnelle visuelle Einordnung der Mutanten im Hochdurchsatz möglich und es ist nicht nötig, die Aktivität jeder Mutante über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC), Flüssigchromatographie mit Massenkopplung (LC-MS) oder matrixunterstützter Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (MALDI-ToF) zu analysieren [91, 93]. Mit Hilfe dieser Methode wurde über die gerichtete Evolutions-Methode eine Mutante von Thal mit zwei Mutationen (ThalGR) detektiert, die eine um 10°C erhöhte T_M aufweist [95]. Die Mutanten weisen nicht nur eine höhere Thermostabilität auf, sondern auch verbesserte Umsatzraten und ein erweitertes Substratspektrum. Dies zeigt, dass die Verbesserung der Stabilität auch andere Parameter optimieren kann [93].

Die mögliche weitere C-H-Funktionalisierung der enzymatisch halogenierten Verbindungen mittels Palladium-katalysierter Kreuzkupplung stellt eine halb enzymatische, halb chemische Synthesemethode von Arylverbindungen dar. 2016 publizierten drei Arbeitsgruppen die weitere Modifizierung *via* Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung von halogenierten Verbindungen durch Trp-Halogenasen [112, 115, 116]. Dabei zeigte sich, dass die enzymatische Halogenierung durch die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplungsreagenzien gestört wird und die beiden Reaktionsschritte nicht simultan ablaufen können [115]. Durch die Einführung einer Membran als Trennwand zwischen den beiden Reaktionen kann dieses Problem behoben werden. Hierfür kann eine Cellulosemembran mit einem Ausschluss von 10 kDa oder eine Polydimethylsiloxanmembran, die von unpolaren Verbindungen durchdrungen werden kann, genutzt werden [116]. Die Gruppe von Goss führte das Gen der F-Hal PrnA in den

Biosyntheseweg des Antibiotikums Pacidamycin (**52**) in *Streptomyces coeruleorubidus* ein, wo es heterolog exprimiert wurde und das produzierte PrnA Tryptophan in C7-Position halogenierte. Durch die Anwesenheit von PrnA im Organismus wurde zusätzlich zu **52** auch das chlorierte Pacidamycin erhalten. Die chlorierte Position nutzten Goss und ihre Mitarbeiter für die weitere C-H-Funktionalisierung mittels der Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung und erhielten so verschiedene Pacidamycin-Derivate [113]. Dieses zeigt, dass F-Hals auch in anderen Organismen aktiv sein können und deren Produkte in die Biosynthese des Organismus integriert werden können, was zu neuen halogenierten Verbindungen führen kann. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde von O'Connor und ihren Mitarbeitern gewählt. Diese klonierten das Gen der F-Hal RebH in *Catharanthus roseus* und produzierten in diesem statt 19,20-Dihydrokuammizin **53** die in C12-Position chlorierte Spezies (Abbildung 17) [81, 117]. In einem nächsten Schritt gelang es, das halogenierte Indolalkaloid über die Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung zu funktionalisieren und drei Analoga in Milligrammausbeute zu erhalten [118].

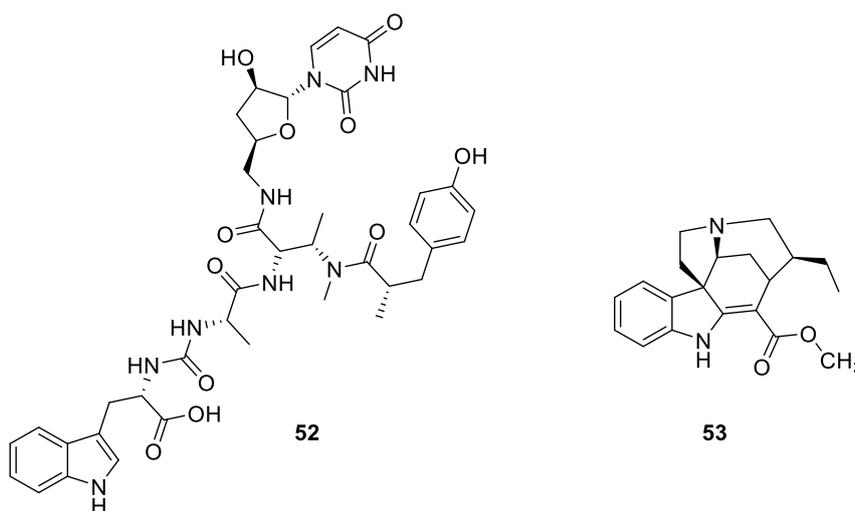


Abbildung 17: Chemische Struktur der natürlichen Verbindungen Pacidamycin **52** aus *Streptomyces coeruleorubidus* und 19,20-Dihydrokuammizin **53** aus *Catharanthus roseus*.

Daraus resultiert, dass die F-Hals auch in der Synthese Verwendung finden können. Zum einen, um die Bioaktivität von Verbindungen zu erhöhen und zum anderen, um Verbindungen für die weitere Palladium-katalysierte Reaktion zu aktivieren.

2.5. Identifizierung Flavin-abhängiger Halogenasen in der Natur

Wie in 2.3 erwähnt sind F-Hals häufig an der Biosynthese biologisch aktiver Verbindungen zum Beispiel für Krebstherapeutika oder Antibiotika beteiligt und stammen aus Mikroorganismen oder auch Pilzen. Berechnungen zufolge gibt es rund 100 Millionen Spezies auf der Erde, von denen bisher vermutlich weniger als 2% identifiziert wurden [2]. In dieser Menge an unbekanntem Spezies könnten noch viele unentdeckt sein, die eine Fülle an noch unbekanntem halogenierten Verbindungen produzieren. Diese unbekanntem Spezies können als Quelle für eine Vielzahl neuartiger F-Hals dienen, die an der Synthese neuer biologisch aktiver Verbindungen beteiligt sind und eine umweltfreundlichere Alternative zur chemischen Halogenierung darstellen könnten.

Aufgrund der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten von F-Hals und nicht zuletzt der regioselektiven Halogenierung von chemisch nicht aktivierten Kohlenstoffatomen wurden in den letzten 12 Jahren eine Vielzahl von F-Hals identifiziert. Die erste F-Hal PrnA wurde 1997 im Gencluster von Pyrrolnitrin **29** entdeckt. Hierzu wurden die vier Biosynthese-Gene des Pyrrolnitrin **29** heterolog in *E.coli* exprimiert, wodurch dieser Stamm befähigt wurde, die Verbindung zu produzieren [30]. Darauf folgte 2002 die Identifizierung von RebH, die auch über die heterologe Expression der Biosynthese-Gene von Rebecamycin **7** aber *Streptomyces albus* J1074 erfolgte [46]. Da F-Hals hohe Sequenzähnlichkeiten und konservierte Bereiche aufweisen, konnten weitere Vertreter detektiert werden, indem speziell entwickelte degenerierte Primer genutzt wurden, die diese konservierten Bereiche abdecken und eine anschließende PCR-Amplifikation ermöglichen. So identifizierten Zehner *et al.* 2005 PyrH, Fujimori *et al.* 2007 die beiden F-Hals KtzR und KtzQ [47, 119]. Smith *et al.* identifizierten weiterhin 2017 zum ersten Mal eine F-Hal aus einer Metagenomprobe mittels degenerierter und spezifischer Primer [89].

Durch die Etablierung von Hochdurchsatzsequenzierungen, wurde die Identifizierung von neuen F-Hals deutlich erleichtert. Basierend auf diesen Hochdurchsatz-Methoden wurden in den letzten Jahren viele Genome von Organismen sequenziert und für die Öffentlichkeit verfügbar. Dementsprechend sind viele F-Hals über bioinformatische Analysen sequenzierter Genomdaten detektiert worden. Die Identifizierung erfolgte dabei referenzbasiert zum Beispiel mittels *basic local alignment search tool* (BLAST) [120] und den konservierten Aminosäuresequenzen der F-Hals [85–88, 105, 108, 111, 121, 122].

2.6. Identifizierung von Enzymen in Metagenomen

Der Term „Metagenom“ wurde erstmals 1998 von Handelsman *et al.* verwendet. *Meta* ist griechisch und bedeutet „darüber hinaus“, womit der Term Metagenom „über das Genom hinaus“ übersetzt werden kann. Dieser beschreibt somit alle genomische DNA in einer Probe aus einem Biotop und nicht nur eines individuellen Organismus [123, 124]. Durch die Einführung der Hochdurchsatzsequenzierung, auch *Next Generation Sequencing* (NGS) genannt, wurde es möglich schneller Datensätze zu analysieren. Außerdem verringerten sich die einhergehenden Kosten um ein Vielfaches, wodurch die Anzahl an sequenzierten Metagenomen enorm anstieg [125]. Die ersten Hochdurchsatzgeräte wurden von Roche und Illumina eingeführt. Diese haben den Vorteil, dass sie relativ geringe DNA-Konzentrationen benötigen, verhältnismäßig kostengünstig sind und viele Daten produzieren. Allerdings generieren sie nur kurze Leselängen (<500 bp) [126, 127]. Die resultierenden kurzen Sequenzen, sogenannte *Reads*, können über die Assemblierung zu *Contigs* verbunden werden zum Beispiel mit dem *denovo*-Assembler MEGAHIT [128]. Über weitere *Binning*-Methoden ist es möglich, die *Contigs* individuellen taxonomischen Gruppen zuzuordnen, dabei gibt es verschiedene Techniken, die für die Zuordnung genutzt werden können, zum Beispiel *Alignments* und Ähnlichkeiten [127]. Außerdem können basierend auf den *Contigs* Gen-Vorhersagen getroffen werden. Eine beliebte Methode hierfür ist das Programm Prodigal (*Prokaryotic dynamic programming gene-finding algorithm*), das für die Gen-Vorhersage in Mikroorganismen genutzt werden kann (Abbildung 18) [129].

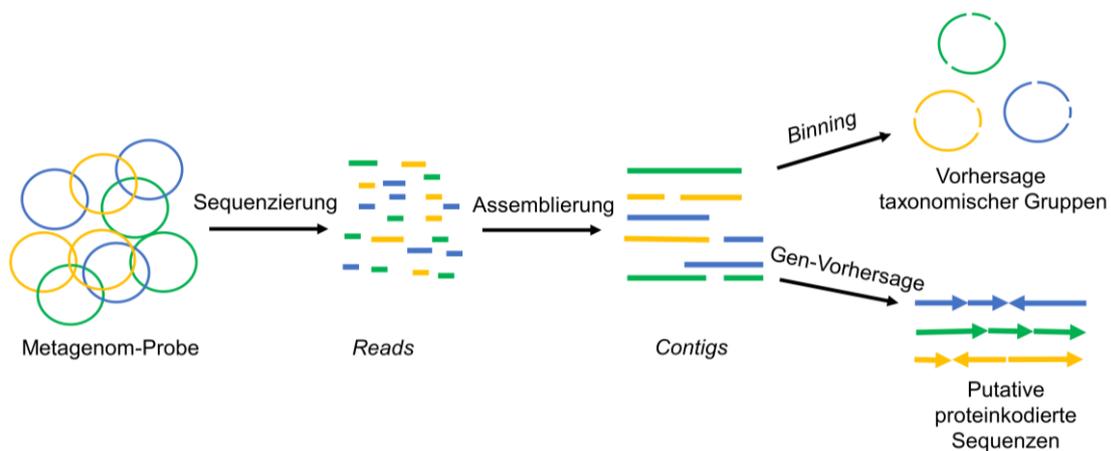
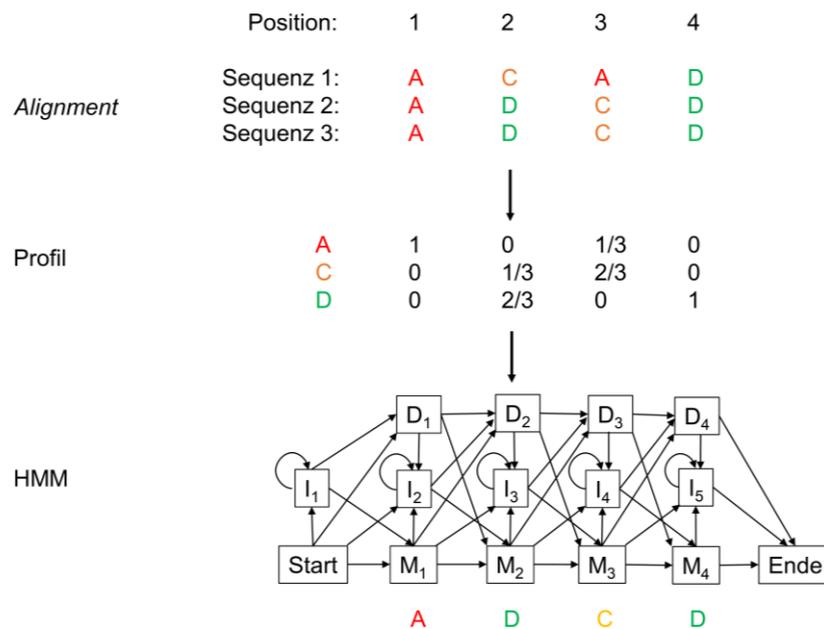


Abbildung 18: Schematische Darstellung der möglichen Bearbeitungsmethoden von sequenzierten metagenomischen Datensätzen. Zunächst wird eine Probe, die mehrere Genome beinhaltet sequenziert. Es folgen viele kleine *Reads*, die durch die Assemblierung zu längeren *Contigs* aneinandergereiht werden können. Aus diesen *Contigs* können zum einen Gen-Vorhersagen und zum anderen Genom-Vorhersagen über Ähnlichkeiten und Alignments getroffen werden [127–129].

Die Identifizierung neuer Enzyme in metagenomischen Datensätzen über bioinformatische Analysen wurde in den letzten Jahren von vielen Arbeitsgruppen

erfolgreich angewandt. So wurden zum Beispiel Laccase-ähnliche Enzyme aus Biogasanlagen sowie einer aktiven Chitinase aus einer mit Chitin angereicherten Bodenprobe identifiziert [130, 131]. Diese wurden mit Hilfe eines jeweils spezifischen Profil-Hidden-Markov-Modells (pHMM) detektiert, das auf Wahrscheinlichkeitsverteilungen von Aminosäuren oder Nukleotiden beruht [130, 132]. Multiple Sequenz-Alignments (MSA) von Enzymfamilien zeigen, dass diese konservierte Bereiche besitzen, die verschieden hoch konserviert sind. Mit pHMMs können die konservierten Bereiche aus MSAs in positions-spezifischen *Scoring*-Matrizen abgebildet werden, die für die Suche von verwandten Sequenzen in Datenbanken oder in Sequenzdatensätzen verwendet werden können [132]. Zunächst wurden HMMs in der Signalverarbeitung in der Physik und Mathematik verwendet, bis Churchill *et al.* 1989 dieses auch für molekulare Sequenzen einsetzten und somit die HMMs Anwendung für MSAs von Proteinsequenzen fanden [133, 134]. Zur Erstellung eines HMM wird zunächst ein MSA durchgeführt, wobei ähnliche Sequenzen unterschiedliche Längen durch Insertionen (eingefügte Basen/Aminosäuren) und Deletionen (fehlende Base/Aminosäure) aufweisen können. In einem *Alignment* werden Deletionen als *gap* dargestellt. Aus dem MSA wird im Folgenden ein statistisches Profil mit endlichem Zustand und aus diesem Profil ein HMM erstellt. Insertionen werden über Insertionszustände (I_n) und Deletionen über Deletionszustände (D_n) im HMM dargestellt (Abbildung 19, A). Wenn das HMM mit einer anderen Sequenz abgeglichen wird, wird schrittweise pro Base/Aminosäure durch die einzelnen Zustände gegangen (Abbildung 19, B). Es wird als *hidden* (versteckt) bezeichnet, da nur die Zustände beobachtet (Emission) werden und nicht die dazwischen liegenden Schritte (Transitionen) [135, 136].

A



B

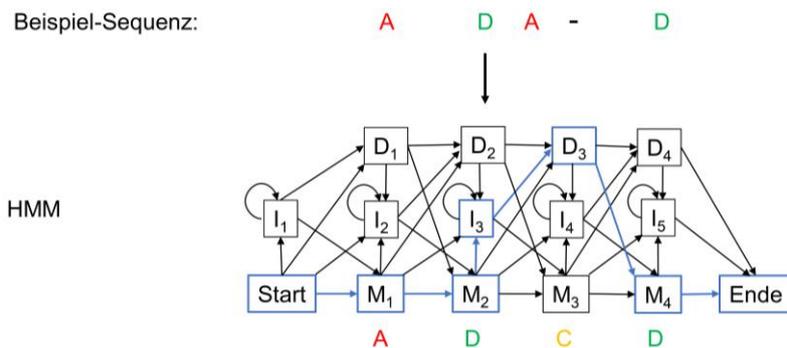


Abbildung 19: Beispielhafte Darstellung vom Sequenz-Alignment zum HMM (A) [135, 137] und beispielhafter Vergleich eines HMM mit einer Beispiel-Sequenz (B).

Das Profil-HMM (pHMM) gibt zusätzlich Informationen zum Grad der Konservierung einer bestimmten Position im MSA und beinhaltet somit eine positions-spezifische Bewertung. Dazu wird mit Hilfe eines MSAs ein Bewertungsprofil (*Scoring-Matrix*) erstellt, in der Werte, aber auch *gap*-Strafen positions-spezifisch in einer Tabelle aufgetragen werden. Dabei werden *gap*-Strafen zum Beispiel in hoch-konservierten Aminosäure-Bereichen höher bewertet als an nicht-konservierten Bereichen, was die Bewertung positions-spezifisch macht [135, 136, 138]. Um eine Sequenz mit einem pHMM abzugleichen, wird ein Programm benötigt zum Beispiel das HMMer-Software Paket [139], das den wahrscheinlichsten Weg durch die Sequenz mit Hilfe von Insertions- und Deletionszuständen findet und jeden Weg mit Wahrscheinlichkeiten bewertet [135, 138].

Diese Methode ist durch die Positions-spezifische Bewertung um einiges sensitiver und spezifischer im Vergleich zu heuristischen Methoden wie BLAST, die eine positions-unabhängige Bewertung vornehmen. Spezifische pHMMs können sowohl zur Datenbank-Suche von Proteinen eingesetzt werden als auch zur Analyse von Sequenzen, zur Vorhersage von Protein-Strukturen und von Genen in vorhergesagten *open-reading frames* [135, 138].

Ausec *et al.* generierte ein spezifisches pHMM für Laccase-ähnliche Enzyme in einer Zwei-Schritte-Methode. Im ersten Schritt wurden neue putative Enzyme über die BLAST-Suche (basic local alignment search tool) identifiziert [120, 130]. Über *Alignments*, Filtermethoden und phylogenetische Analysen wurde im Folgenden ein initiales pHMM generiert. Im zweiten Schritt wurde das initiale pHMM optimiert. Dieses geschah, indem mit dem initialen pHMM neue putative Laccasen aus einer Datenbank (NCBI) identifiziert wurden. Mit den daraus resultierenden Treffern (putativen Laccasen) wurde über *Alignments*, Filtermethoden und eine Evaluierung das finale pHMM erzeugt (Abbildung 20). Mit dem finalen pHMM wurden verschiedene Metagenome erfolgreich nach Laccase-ähnlichen Enzymen abgesucht.

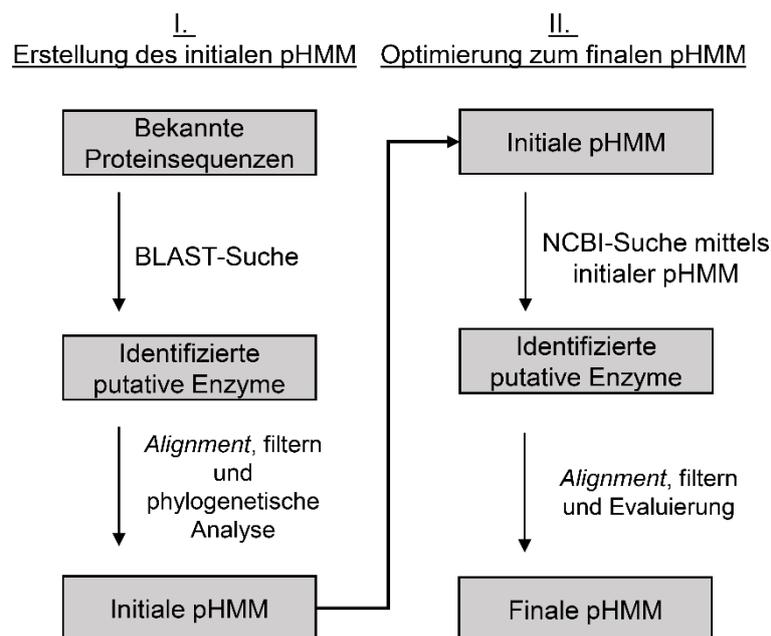


Abbildung 20: Zwei-Schritte-Methodik zur Erstellung des finalen pHMM zur Identifizierung neuer Enzyme in genomischen und metagenomischen Datensätzen [130].

Ein großer Vorteil der metagenomischen Analysen ist, dass auch Enzyme aus nicht-kultivierbaren Organismen verfügbar werden [140].

3. Zielsetzung

Ziel dieser vorgelegten Doktorarbeit war es neue Flavin-abhängige Halogenasen in metagenomischen Datensätzen zu identifizieren und im Weiteren zu zeigen, dass es sich bei diesen identifizierten Enzymen um aktive Flavin-abhängige Halogenasen handelt.

Nachdem 1997 die erste Trp-Halogenase PrnA identifiziert wurde [30], wurden viele weitere Flavin-abhängige Halogenasen gefunden [46, 47, 71, 73, 83, 99, 104, 108, 109, 111]. Diese haben den Vorteil, gegenüber der chemischen Halogenierung, dass sie regioselektiv, im wässrigen Milieu und bei adäquaten Temperaturen halogenieren können [82]. Viele dieser identifizierten F-Hals sind an der Biosynthese von biologisch aktiven Verbindungen wie Krebstherapeutika oder Antibiotika, beteiligt [46, 73, 100]. Die Halogenierung dieser Verbindungen fördert deren biologische Aktivität und ist somit essentiell [14, 15]. Aus diesem Grund ist es von Interesse weitere neue F-Hals mit höherer Aktivität und variablem Substratspektrum zu identifizieren. Bisherige Charakterisierungen dieser Enzymklasse zeigten, dass F-Hals höchstkonservierte Aminosäurebereiche aufweisen, die schon in vorherigen Arbeiten zur Identifizierung neuer Halogenasen genutzt werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zum ersten Mal neue F-Hals auf Basis der höchstkonservierten Aminosäurebereiche in metagenomischen Datensätzen identifiziert werden. Metagenome bieten den Vorteil, dass in einer Probe viele verschiedene Genome sowohl von kultivierbaren als auch nicht-kultivierbaren Organismen enthalten sind [140] und somit eine hohe Vielzahl an verschiedenen, bis *dato* unbekanntem Genomen untersucht werden kann. In einem ähnlichen Ansatz wie von Ausec *et al.* [130] wurde ein pHMM in Kooperation mit Dr. Daniel Wibberg und Prof. Dr. Jörn Kalinowski generiert, das die Metagenome nach den konservierten Bereichen der F-Hals absucht. Die detektierten Treffer sollten im Weiteren genauer begutachtet und vier Treffer für weitere *in vitro*-Arbeiten ausgewählt werden, um zu testen, ob mit dem generierten pHMM aktive F-Hals identifiziert werden können. Die *in vitro*-Arbeiten stützen sich zunächst auf die Aktivitätsbestimmung, die Charakterisierung des Substratspektrums sowie deren Regioselektivitäten bezüglich verschiedener Indol-Derivate. Weiterhin soll gezeigt werden, dass es sich bei den halogenierenden Enzymen um Flavin-abhängige Enzyme handelt, indem entsprechende Experimente zur Flavin-Abhängigkeit und – Bindung durchgeführt werden. Dieses beweist, dass das generierte pHMM in der Lage ist, aktive F-Hals in Metagenomen zu identifizieren. Nachfolgend werden die neuen,

Zielsetzung

bisher unbekanntes Enzym biochemisch bezüglich Halogenidpräferenz, kinetischer Parameter und Thermo- und Lagerstabilität charakterisiert.

4. Material und Methoden

4.1. Gerätschaften

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	BP410S	Sarorius, DE
Analytische HPLC	Accela 600	ThermoScientific, DE
Analytische HPLC	Nexera XR	Shimadzu, DE
CD-Spektrometer	J-8-10	JASCO, DE
Drehrad		Heidolph Elektro GmbH, DE
Drehinkubator	Stuart SRT1	Stone, GB
Duale Spritzenpumpe		Kd Scientific
Eismaschine	B100	Ziegra, DE
ESI-MS	Esquire 3000	Bruker Daltonics GmbH, DE
Electrophoresis Power Supply	EPS 601	Amersham Bioscience Europe GmbH, DE
Elektrophoresekammern für Polyacrylamid-Gele		Bio-Rad, DE
Elektrophoresekammern für DNA-Agarosegele		Bio-Rad, DE
Feinwaage	XS105 DualRange	Mettler Toledo, DE
French Pressure Cell Press	SLM Aminco	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, DE
GC-Massenspektrometer	Trace GC Ultra, Gaschromatographie ITQ900, Massenspektrometer	ThermoScientific, DE
Kamera	LAS 3000	Fuji Photo Film GmbH, DE
Kühlschrank (3 °C)		Bosch, DE
Kulturschüttler	Certomat ® IS	Sartorius Stedim Biotech GmbH, DE
LC-Massenspektrometer	Waters HT Alliance ZQ 2000	Garden State Scientific, USA
Magnetrührer	IKA COMBIMAG RCT	IKA Labortechnik, DE
Mikrowelle		Bomann, DE
Minischüttler	Mini Rocker MR-1	Biosan, DE
NMR-Spektrometer	DRX-500	Bruker Daltonics, DE
NMR-Spektrometer	Avance III 500	Bruker Daltonics, DE
NMR-Spektrometer	Avance 600	Bruker Daltonics, DE
PCR-Gerät	Pegstar	VWR Peqlab, DE
Präparative HPLC	Hitachi D-7000	Merck, DE

Material und Methoden

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	MP220	Mettler Toledo, DE
Pipetten 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5mL	Research Plus	Eppendorf
Schüttelinkubator	innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, DE
Schüttelinkubator	CERMOMAT IS	Satorius Stedim, DE
Spannungsgeber für Gelelektrophorese	Power PAC 20	Bio-Rad, DE
Sterilisator	Autoklav	Systemec, DE
Sterilwerkbank	HERAsafe	Thermo Electron, DE
Thermomixer	compact	Eppendorf, DE
Tiefkühlschrank (-20 °C)		Liebherr Comfort, DE
Tiefkühlschrank (-80 °C)		Panasonic Ultra
Transilluminator		Biometra, DE
Trockenschrank		Heraeus, DE
Reinwassersystem	MilliQ Bicell Q-Grad ® 3	Merck KGaA, DE
Rotationsvakuumpkonzentrator	SpeedVac RVC 2-18	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, DE
Rotationsverdampfer	Laborota 4000	Heidolph, DE
Ultraschallbad	Sonorex	Bandelin electronic GmbH, DE
UV-VIS-Spektrophotometer	3100PC	VWR, DE
UV-VIS-Spektrophotometer	UV-2450	Shimadzu, DE
NanoDrop	NanoDrop ONE	Thermo Scientific, DE
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge	5810R	Eppendorf, DE
Zentrifuge	Multifuge X3R	Heraeus, DE
Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, DE

4.2. Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstände	Hersteller
Centricon, Vivaspin20 (10000 Da)	Sartorius, DE
Dialysemembran ZelluTrans	Roth, DE
Einmalhandschuhe	VWR, DE
Einwegspritzen	Henke-Sass-Wolff, DE
Einwegküvetten	Sarstedt, DE
Eppendorf-Gefäße 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt, DE

Verbrauchsgegenstände	Hersteller
HiTrap Desalting column 5 mL (Sephadex G-25 resin)	GE Healthcare, DE
HPLC Säule Hypersil GOLD, C18, 3 µm (150x2.1 mm)	Thermo Scientific, DE
HPLC Säule NUCLEOSHELL1, C18, 18.5 µm (150x2.1 mm)	Macherey-Nagel, DE
HPLC Säule Luna C18(2) 100 Å, 3 µm, (100x2 mm)	Phenomenex, DE
Mikroflasche (Glas)	VWR, DE
Parafilm	BEMIS Neenah
Pasteurpipetten (Glas)	Brand, DE
Petrischalen	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen	Sarstedt, DE
Polyethylen-Röhrchen 15 mL, 50 mL	Sarstedt, DE
Schnappring-Mikroflasche	Fischerbrand, DE
96-Well Platten, transparent, flacher Boden	Greiner, DE
Whatman Filter 0.2 µm, 0.45 µm	GE Healthcare, DE

4.3. Kits

Kit	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep	Quiagen, DE
QUIAquick Gel Purification	Quiagen, DE
QUIAquick PCR Purification	Quiagen, DE

4.4. Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI-HF, 20 U/mL	New England BioLabs, DE
T4-DNA Ligase, 3 U/mL	Promega, DE
DpnI, 20 U/mL	New England BioLabs, DE
DNase (5160,7 U/mg)	AppliChem GmbH, DE
NdeI, 20 U/mL	New England BioLabs, DE
GoTaq-G2-DNA-Polymerase, 5 U/mL	Promega, DE
Katalase aus der Rinderleber, 2000-5000U/mL	Sigma Aldrich, DE
Pfu-HF DNA-Polymerase, 2 U/µL	Promega, DE
PrnF	Prof. Dr. Van Pée
RR-ADH	Prof. Dr. Hummel
Trypsin	New England BioLabs, DE

4.5. Verwendete Primer

Alle verwendeten Primer wurden mit Geneious geplant und durch die Firma Eurofins Genomics erhalten.

Primer	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
Pia-1_ala	GCAACCCAGGCAACCTGT GCGCTGGGTATTCGTTTT	
Pia-1_ala_Rev	AAAACGAATACCCAGCGCA CAGGTTGCCTGGGTTGC	
Pia-2_ala	ATGTGAAGCCACCGCA GCGCTGGGTATTCGTTTT	Primer für die Punktmutation des konservierten Lysins zum Alanin, welche zu folgenden Mutanten führte:
Pia-2_ala_Rev	AAAACGAATACCCAGCG CTGCGGTGGCTTCACAT	
B38_ala	GCATGTAATGCACCTATG CGCTGGGTATT	BrvH_K83A Pia-2_K85A
B38_ala_Rev	AAAGCGAATACCCAGCGCAT AGGTTGCATT	B38_K80A HotH_K82A
HotH_ala	AACCCAGGGCTCATTTGCT CTGGGTATTCGTTTTGAAGAT	
HotH_ala_Rev	ATCTTCAAACGAATACCCA GAGCAAATGAGCCCTGGGTT	
Pia-1_pETM11_For	AGGCCGAACCATGGATGAAATTGAT GATCCGCG	Primer für die Klonierung des Gens von BrvH in den Expressionsvektor pETM11 für die spätere Kristallisierung
Pia-1_pETM11_Rev	AAAAAAGCGGCCGCTTATGCTGCGCT TGCTG	

4.6. Plasmide

Name	Resistenz	Größe [bp]	Referenz	Beschreibung
pClBhis-PrnF	Tet	21625	Prof. Dr. Van Pée	Expressionsvektor mit Flavinreduktase PrnF
pET21_ADH	Amp		Prof. Dr. Hummel	Expressionsvektor mit Alkoholdehydrogenase RR-ADH
pET28a	Kan	5369	Novagen, DE	Expressionsvektor
pET28_b38	Kan	6878	Pia Neubauer	Expressionsvektor mit b38-Gen enthält NdeI und BamHI Schnittstelle

Name	Resistenz	Größe [bp]	Referenz	Beschreibung
pET28_ <i>brvH</i>	Kan	6908	Pia Neubauer	Expressionsvektor mit <i>brvH</i> - Gen enthält Ndel und BamHI Schnittstelle
pET28_ <i>hotH</i>	Kan	6896	Pia Neubauer	Expressionsvektor mit <i>hotH</i> - Gen enthält Ndel und BamHI Schnittstelle.
pET28_ <i>pia-2</i>	Kan	6917	Pia Neubauer	Expressionsvektor mit <i>pia-2</i> - Gen enthält Ndel und BamHI Schnittstelle
pMA-T_B38	Amp	3883	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, DE	Klonierungsvektor enthält Gen der F-Hal B38. Gen ist an Enden mit Ndel und BamHI Schnittstelle ausgestattet
pMK- RQ_BBAL3	Kan	3817	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, DE	Klonierungsvektor enthält Gen der F-Hal BrvH. Gen ist an Enden mit Ndel und BamHI Schnittstelle ausgestattet
PMA- T_HotHalo	Amp	3901	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, DE	Klonierungsvektor enthält Gen der F-Hal HotH. Gen ist an Enden mit Ndel und BamHI Schnittstelle ausgestattet
pMA-T_Pia-2	Amp	3922	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, DE	Klonierungsvektor enthält Gen der F-Hal Pia-2. Gen ist an Enden mit Ndel und BamHI Schnittstelle ausgestattet
pETM11_Hall	Kan	7496	Prof. Dr. Niemann	Expressionsvektor mit TEV- Protease-Seite um den HisTag abzuschneiden. Dient der Kristallisation der Enzyme.
pETM11_BrvH	Kan	7568	Pia Neubauer	Expressionsvektor mit TEV- Protease-Seite um den HisTag abzuschneiden. Dient der Kristallisation von BrvH.

4.7. Bakterienstämme

Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C in Glycerin gelagert.

Bakterienstamm	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α (DE3)	Novagen, Merck, DE
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen, Merck, DE
<i>E. coli</i> BL21_pGro7 (DE3)	Dr. Marcel Frese

4.8. Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden in angemessener Qualität von den Herstellern Sigma-Aldrich, VWR, Carl Roth, Acros Organics, Merck und AppliChem bezogen.

Im Folgenden werden spezielle Chemikalien aufgelistet:

Chemikalien	Hersteller
Coomassie Brilliant Blue G250	SERVA Feinbiochemika, DE
DNA-Größenstandard (1 Kb)	Thermo Fisher Scientific, DE
Kieselgel 60 C18 (0,035-0,07 mm)	Carl Roth, DE
Kobalt-TALON Matrix	TaKaRa Bio Inc., FR
Proteinleiter Color Prestained Protein Standard (11-245 kDa)	New England BioLabs, DE
Roti® GelStain	Carl Roth, DE

4.8.1. Antibiotika

Antibiotika	Stamm-Konzentration	Hersteller
Ampicillin (Amp)	100 mg/mL	AppliChem, DE
Chloramphenicol (Cmp)	50 mg/mL	AppliChem, DE
Kanamycinsulfat (Kan)	60 mg/mL	AppliChem, DE
Tetracyclin (Tet)	30 mg/mL	AppliChem, DE

4.9. Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden wie in der folgenden Tabelle angegeben hergestellt. Wenn es nicht weiter vermerkt wird, sind diese in Wasser (*ddH₂O*) gelöst. Der korrekte pH-Wert wird, nachdem sich alle Bestandteile vollständig gelöst haben, mit dem in 4.1 angeführtem pH-Meter eingestellt.

Medien	Menge
LB (<i>lysogeny broth</i>)-Medium, pH 7 ¹	10 g/L Trypton
	10 g/L NaCl
	5 g/L Hefeextrakt
	10 g/L Agar
LB-Agar-Medium, pH 7 ²	10 g/L Trypton
	10 g/L NaCl
	5 g/L Hefeextrakt
	2% (w/v) Trypton
SOC-Medium, pH 7	0.5% (w/v) Hefe
	10 mM NaCl
	2 mM KCl
	10 mM MgSO ₄ x 6 H ₂ O

¹Die Medien zur bakteriellen Kultivierung wurde alle vor der Nutzung autoklaviert. Das passende Antibiotikum wurde nach Abkühlen der Medien vor der Kultivierung hinzugegeben.

²Zur Herstellung der Agarlösung wurden alle Bestandteile gelöst und autoklaviert. Nachdem die Lösung handwarm abgekühlt ist, wird das passende Antibiotikum (s. 4.8.1; 1:1000) hinzugefügt, die Lösung steril in Petrischalen gegossen, abgekühlt und bei 4°C gelagert.

Puffer	Menge
<u>Agarose-Gelelektrophorese:</u>	
TAE-Puffer	40 mM Tris
	40 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
<u>SDS-PAGE:</u>	
Laemmli-Puffer	187.5 mM TRIS HCl pH 6.8
	6% (w/v) SDS
	30% (v/v) Glycerin
	15% (v/v) 2-Mercaptoethanol
	0.008% (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	14.4 g/L Glycin
	3 g/L Tris
	1 g/L SDS
Tris 1.5 M, pH 8.8	Tris 1.5 M
Tris 0.5 M, pH 6.8	Tris 0.5 M
<u>Protein-Aufreinigung:</u> ³	
Elutionspuffer, pH 7.4	50 mM Na ₂ HPO ₄

Material und Methoden

	300 mM NaCl/NaBr
	300 mM Imidazol
Entsalzungspuffer, pH7.4	50 mM Na ₂ HPO ₄
	50 mM NaCl/NaBr
100 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer, pH 7.4	100 mM Na ₂ HPO ₄
10 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer, pH 7.4	100 mM Na ₂ HPO ₄
	50 mM Na ₂ HPO ₄
Waschpuffer, pH7.4	300 mM NaCl/NaBr
	10 mM Imidazol
<u>FAD-Rekonstitution:³</u>	
	50 mM Na ₂ HPO ₄
FAD-Rekonstitutionspuffer, pH7.4	150 mM NaBr
	1 mM FAD
Rekonstitutionspuffer, pH7.4	50 mM Na ₂ HPO ₄
	150 mM NaBr
<u>CD-Spektroskopie:</u>	
	10 mM Na ₂ HPO ₄
CD-Puffer, pH 7.4	5 mM NaCl
³ Die verwendeten Puffer wurden vor der Nutzung steril filtriert (0,2 µm).	
Lösungen	Menge
Acrylamid/Bisacryl-Lösung	40% Acrylamid
Agarose-Lösung (1.5%)	1.5% Agarose in TAE-Puffer
L-Arabinose	2 g/L L-Arabinose
CoCl ₂ -Lösung	50 mM CoCl ₂
	0.02% Coomassie Brilliant Blue G250
	5% Aluminiumsulfat-18-hydrat
Coomassie-Färbelösung	10% Ethanol
	2% Phosphorsäure
EDTA-Lösung	0.2 mM EDTA
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG
NaCl-Lösung	300 mM Natriumchlorid

4.10. Software

Name der Software	Referenz	Beschreibung
AntiSMASH 4.0	[141, 142]	Genutzt um biosynthetische Gencluster von Sekundärmetaboliten (Polyketide, Terpene, Peptide etc.) in pilzlichen und bakteriellen Genomen zu identifizieren.
BLASTp	[120]	Für den Vergleich identifizierter putativer F-Hals mit bereits bekannten F-Hals in einer Datenbank.
Geneious 9.1.8.	[143]	Wird für die Begutachtung von DNA- und Aminosäure-Sequenzen sowie die Erstellung von Primern verwendet.
HMMer3 Software-Paket	[139]	Zur Generierung des finales pHMM und für die Suche nach F-Hals mit dem pHMM in metagenomischen Datensätzen.
MestreNova, Version 12	[144]	NMR-Datenauswertung
MEGA7	[145]	Zur Erstellung der phylogenetischen Bäume genutzt.
MEGAHIT	[128]	NGS, <i>de novo</i> Assembler
MUSCLE	[146]	Erstellung von MSAs.
Prodigal	[129]	Algorithmus zur Genvorhersage in Prokaryoten.
Simfit	[147, 148]	Wird zur Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter verwendet.
TopSpinSoftware, Version 2.1	Bruker, UK	NMR-Datenauswertung

4.11. Bioinformatische Methoden

Die Identifizierung neuer F-Hals in metagenomischen Datensätzen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Wibberg und Prof. Dr. Jörn Kalinowski vom Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) durchgeführt. Dazu wurde zuerst ein pHMM in einer Zwei-Schritte-Methode generiert. Hierzu wurde eine ähnliche Herangehensweise wie bei Ausec *et al.* verwendet [130]. Die Referenzsequenzen aus dem entsprechenden *Seed* des Modells wurden mit der NCBI Datenbank abgeglichen [120]. Die Ergebnisse aus dem Datenbankabgleich werden mit funktionell-charakterisierten Trp-Halogenasen-Sequenzen (RebH, PrnA, Thal, PyrH) abgeglichen. Nur die Sequenzen, die einen Grenzwert von über 50 % Sequenzidentität und 90 % Sequenzabdeckung aufwiesen, wurde für den nächsten Schritt verwendet. Im zweiten Schritt wurde ein multiples Alignment aus den ausgewählten und den bekannten Trp-Halogenasen-Sequenzen

mittels MUSCLE [149] verglichen. Sequenzen, die keine bekannten konservierten Bereiche aufweisen, z.B. GxGxGG oder das konservierte Lysin, wurden manuell herausgefiltert. Im Folgenden wurde mit dem HMMer3-Softwarepaket [139]. Mit dem finalen pHMM werden 17 metagenomische Datensätze analysiert. Die Metagenome wurden aus den Datenbanken „i.microbe.us“ oder „gold.jgi.doe.gov“ (Tabelle 8) heruntergeladen. In wenigen Fällen mussten zunächst die Rohdaten von den ausgewählten Metagenomen mit Hilfe von des Programms MEGAHIT assembliert werden [128]. Nachfolgend wurde dann die Genvorhersage mit Prodigal durchgeführt [129]. Die meisten Metagenomdatensätze lagen bereits assembliert vor, sodass hier auch nur noch die Genvorhersage mit Prodigal durchgeführt werden musste. Diese vorhergesagten Gene wurden dann mit dem Halogenasen-pHMM verglichen. Nur die Gene, die mindestens einen *e-value* von $< 1 \times 10^{-150}$ aufwiesen, wurden zur weiteren Analyse berücksichtigt. Nachfolgenden wurde die Gene auf ihre Vollständigkeit geprüft, z.B. dass das Gen einen Start- und Stopcodon sowie die konservierten Bereiche der Trp-Halogenasen aufweisen und eine Länge zwischen 400 und 700 Aminosäuren hat. Mit den identifizierten, putativen und den funktionell-charakterisierten F-Hals wurden im Folgenden mit MEGA7 [145] (Multiples Sequenzalignment mit MUSCLE [149], *Neighbor-Joining* Methode (NJ) [150] für die Baumkonstruktion und Bootstrapping [151] mit 1000 Wiederholungen) phylogenetische Bäume zur Analyse erstellt. Vier putative F-Hals (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) wurden für *in vitro*-Experimente ausgewählt. Die Auswahl basierte hauptsächlich darauf, dass BrvH, Pia-2, B38 und HotH die konservierten Bereiche der F-Hals innehatten sowie, dass diese im phylogenetischen Baum mit den Variante A F-Hals, die freie Substrate halogenieren, eine Klade bilden. Für die Substrat-Umsatz-Versuche der Enzyme ist die Handhabung mit freien Substraten einfacher als mit PCP-gebundenen Substraten, weshalb F-Hals der Variante A ausgewählt werden sollten. Durch einen Datenbankabgleich mit Blastp wurde die vier ausgewählten F-Hals taxonomisch eingeordnet.

>BrvH

```
MDEIDDPRIKSVVIVGGGTAGWMTAAALVQHFRTPAPLKITVVESSDIGTIGVGEATIPTIRRFYQQLGLRDDD
VMRATQATCKLGRFLDWSGPGSDFIHPFGLYGQDVKIGIFHHYWLKQRRAGDAAPLAAYSLGAALAAG
GKFTLPSPHPPSQLSVFDWALHLDAGLFAQHLRAYAEAGGCARIDARIRSVELRPEDGFVRALTLDDGRE
VEGDLFVDCSGFKGLVIGEALGVGFEDWGRWLPDCAAYAVQSENRPDAPAPFTRVARSAGWQWGIP
LRHRAGNGLVFSSAHLSDQALAEMLPHLLGDPLTEPRRIPFRPGRRSQAWAKNCVAIGLSSGFLEPLES
TSIALIETGIERLKALFPDRRFAQPILDEFNDQTAREMERVRDFIILHYKLNRRDTDFWRDCREMPVPETLE
RKIALWTARGQFVRYRWEMFHPASWLAIDYDGFGLYPDHHDPVADAMPAYLARSLAEMRANIADLVART
PEHAQFLAGLDPAAASAA*
```

>Pia-2

```
MKHGGMASGAIERVVIVGGGTAGWMAAALGAYLAGAGTRITLIESSEIGTIGVGEATIPTIRRFYAALGMT
DAEVMRACEATAKLGIRFVDWKPSTFVHPFGRFGQDLRGIDFHQYWQKARQAGRAAPLEEYSLGAMLA
REGHASVPLNPPSQLSVFDWALHFDAARFAAHMRYAERAGVARIDARITDVTLHGETGFIEAVTLDSGE
```

RVAGDLFVDCSGFRGLLIGEALGTPYRDWSHWLLCDGAFVQSERVGEPPSCTTVTARTAGWQWRIPLR
SREGNGLVFASDFQGDDEARAELLANIPGAPTMEPRRLRFTPGRREVAWARNCVSLGLASGFLEPLESTS
IALIETGIERLKQLFPDKGFDPVIAIEYNAQSAEEMERVRDFILLHYHLSTRDGPFWQACREMTLPDSLAAK
LELWRARGAFLRYRWEMFSPASWLAIIYGGFEHLPERLDPGVAAVGTDELAQGLEQMRAAIARTVADTPT
HSEFLATVDGAAAEPMRTSA*

>B38

MSDSKAPNVVVLGGGSAGWITACLLHRQWSEKGGSVTVVESPEIGIIGVGEESTPQLKAFFDQLGIAESE
WMPACNATYKLGIRFNGWSERAGFESYYHFPFGPIDLHSEPGFIGNCMLARHQIDVAHPDDWFLATHLS
EAGKSPAAENFPFAPSYYHFDAYALGAFLRDWAVKRGVVHRPLKVTAVERRADDGDIAALLCEGGERIE
GDLFVDCSGFRAMLAEQELGATFLPFAENLFNDSAVVLPHTGHGAPFKPQTEATAMRAGWRWSIPLTTRV
NGYVYSSKYISNEDAEAEALRGALGLAGDGPPEARFLKMKVGRLENSWTRNCLAVGLSQGFLEPLEATALH
IVITALEFAQAYEQGGYGPQHRDAFNASIAARYEGIRDYIVAHYRVNQRSDTYWRDNAANDRLSNGLKT
MMTAWFRHQDIHAANDEAYGGKRYANASWHCLFAGYGTFFPQERMEAVPEGIRPADPAEARAMLEAC
AQNFPSYDPIAS*

>HotH

MQKTAHQIQFVIVGGGTAGWIAAATLANIFKGDVAITLVEAEIGIIGVGEATIPPFLATLHSLGLDEAEFIK
ATQGSFKLGIRFEDWHQRGEHYHFPFGLGRITIDGHEFFQCWLKAKAEGDDTPLMAHSPESVLSHDGKF
FLPHKAMGTALAGTHYALHLDSTLVGQYLRTFAEKLGVVVRVEGHIESIQQSETGDIAAVLQDQRIAGDF
FIDCSGFRGLLIEQLHTGYDDWSAYLPCNRAVTVQTKNAVPTPYTTSTAKEAGWIWRIPLQHRTGNGYV
FCDKFCSDDEEATATLLAAVEGEQITAPRIIPFVTGIRKQAWNRNCLALGLAQGFLEPLESTAIHLVSKTLALF
VRMFPDRNCHPVLREDFNRVRADYEEIRDVLVHYCTTKRDDSPFWRWCQTEMEVAPSLQRKLEFFRA
GGGLIPGTEELFQPTSWYAVFTGMGQMPAAYNPTVDALDYPKLALSQRGKDAILAATLKQPNHTDFIAQF
CQAPKI*

4.12. Molekularbiologische Arbeiten

4.12.1. Synthetische Gene

Die Gene der putativen F-Hals *brvH*, *pia-2*, *b38* und *hotH* werden synthetisch von der Firma Invitrogen, Thermo Fisher Scientific in den Vektoren pMK-RQ oder pMA-T erhalten. Diese werden vorab für die Expression in *E. coli* Codon optimiert und manuell NdeI- und BamHI-Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in einen passenden Expressionsvektor angehängt. Die synthetisierten Gene werden außerdem von Invitrogen, Thermo Fisher Scientific zur Kontrolle sequenziert, sodass die korrekten Gene erhalten werden.

>*brvH*

CATATGGATGAAATTGATGATCCGCGTATTCGTAGCGTTGTTATTGTTGGTGGTGCCACCGCAGGTTG
GATGACCGCAGCAGCACTGGTTCAGCATTTTCGTACCGCACCCTGAAAATTACCGTTGTTGAAAGCA
GCGATATTGGCACCATTGGTGTGGTGAAGCAACCATTCCGACCATTCGTCGTTTTATGGTCAGCTG
GGTCTGCGTGATGATGATGTTATGCGTGCAACCCAGGCAACCTGTAACTGGGTATTCGTTTTCTGGA
TTGGAGCGGTCCGGGTAGCGATTTTATTCATCCGTTTGGTCTGTATGGTCAGGATGTTAAAGGTATCG
GCTTTCATCATTATTGGCTGAAACAGCGTCGTGCCGGTGATGCAGCACCGCTGGCAGCATATAGCCT
GGGTGCAGCCCTGGCAGCCGGTGGCAAATTTACCCTGCCGAGTCCGCATCCGCCAGCTGAG
CGTTTTGATTGGGCACTGCATCTGGATGCAGGTCTGTTTGCACAGCATCTGCGTGCCTATGCCGAA
GCCGGTGGTTGTGCACGTATTGATGCACGATTCGATGTTGAACTGCGTCCGGAAGATGGTTTTT
TTCGTGCACAGCCCTGAAAGCATGATGGTCTGTAAGTTGAAGGTGACCTGTTTGTGATTGTAGCGATTTT
AAAGGTCTGGTTATTGGCGAAGCACTGGGTGTTGGTTTTGAAGATTGGGGTCGTTGGCTGCCGTGTG
ATGCTGCCTATGCAGTTCAGAGCGAAAATCGTCCGGGTGATGCACCGGCACCGTTTACCCGTGTTAC
CGCACGTAGTGCAGGTTGGCAGTGGGGTATTCGCTGCGTCATCGTGCAGGTAATGGTCTGGTTTTT
AGCAGCGCACATCTGAGTGATGATCAGGCACTGGCAGAAGTATGCCGCATCTGCTGGGTGATCCG
CTGACCGAACCCTGCGTATTCCGTTTTCGTCTGGTCTGTCGTAGCCAGGCATGGGCAAAAAATTGTG
TTGCAATTGGTGTGACGAGCGGCTTTCTGGAACCGCTGGAAGCACCAGCATTGCACTGATTGAAAC
CGGATTGAACGTCTGAAAGCATGTTCCGGATCGTCTGCTTTGCCAGCCGATTCTGATTGAAATCA
ATGATCAGACCGCACGTGAAATGGAACGTGTTCTGATTTTATCATTCTGCATTATAAACTGAACCGTC
GCACCGATACCGATTTTTGGCGTGATTGTCGTGAAATGCCGGTCCGGAAACCCTGGAACGTAATAAT

GCACTGTGGACCGCACGCGGTCAGTTTGTTCGTTATCGTTGGGAAATGTTTCATCCGGCAAGCTGGC
 TGGCAATTTATGATGGCTTTGGCCTGTATCCAGATCATCATGATCCGGCAGTTGATGCAATGGACCT
 GCATATCTGGCACGTAGCCTGGCAGAAATGCGTGCGAATATTGCAGATCTGGTTGCACGTACACCGG
 AACATGCACAGTTTCTGGCAGGTCTGGACCCAGCAGCAAGCGCAGCATAAGGATCC

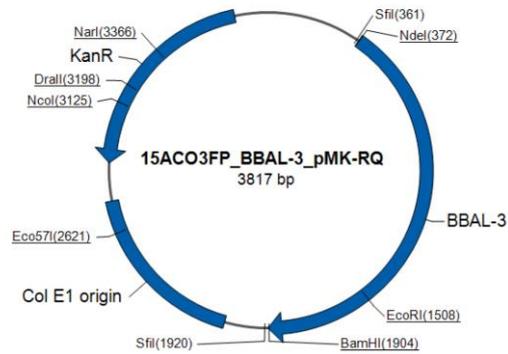


Abbildung 21: Vektor-Karte des erhaltenen Vektors pMK-RQ mit enthaltenem synthetischem F-Hal-Gen von *brvH* (BBAL-3).

>*pia-2*

CATATGAAACATGGTGGTATGGCAAGCGGTGCAATTGAACGTGTTGTTATTGTTGGTGGTGGCACCG
 CAGGTTGGATGGCAGCAGCAGCACTGGGTGCATATCTGGCAGGCGCAGGCACCCGATTACCCTGA
 TTGAAAGCAGCGAAATTGGCACCATTGGTGTGGTGAAGCAACCATTCCGACCATTGTCGTTTTTAT
 GCAGCCCTGGGTATGACCGATGCCGAAGTTATGCGTGCATGTGAAGCCACCGCAAACCTGGGTATTC
 GTTTTGTTGATTGGAAACCGGGTACAAGCTTTGTTTCATCCGTTTGGTTCGTTTTGGTCAGGATCTGCGT
 GGTATTGATTTTCATCAGTATTGGCAGAAAGCACGTCAGGCAGGTCGTGCAGCACCGCTGGAAGAAT
 ATAGCCTGGGTGCCATGCTGGCACGTGAAGGTCATGCAAGCGTTCCGCTGCCGAATCCGCCTAGCC
 AGCTGAGCGTTTTTGGTGGCACTGCATTTTGCAGCACGTTTTGCAGCACACATGCGTGCCTAT
 GCAGAACGTGCCGGTGTTCACGTATTGATGCGCGTATTACCGATGTTACCCTGCATGGTGAACCG
 GCTTTATTGAAGCAGTTACCCTGGATAGCGGTGAACGCGTTGCCGGTGACCTGTTTGTGGATTGTAG
 CGGTTTTCTGTTGCTGCTGATTGGCGAAGCACTGGGCACCCCGTATCGTGATTGGAGCCATTGGCTG
 CTGTGTGATGGTGCATTTGCAGTTCAGAGCGAACGTGTGGGTGAACCGCCTAGCTGTACCACCGTTA
 CCGCACGTACCGCAGGCTGGCAGTGCGTATTCCGCTGCGTAGCCGTGAAGGTAATGGTCTGGTTTT
 TGCAAGCGATTTTCAGGGTGATGATGAAGCACGTGCAGAACTGCTGGCAAATATTCCGGGTGCACCG
 ACAATGGAACCGCGTCGCTGCGTTTTACACCGGGTCGTCGTGAAGTTGCATGGGCACGTAATTGTG
 TGAGCCTGGGTCTGGCAAGTGGTTTTCTGGAACCTCTGGAAGCACCAGCATTGCACTGATCGAAAC
 CGGTATTGAACGTCTGAAACAACCTGTTTCCGGATAAAGGTTTTGATCCGGCAGTTATTGCAGAATAAA
 TGCACAGAGTGCCGAAGAAATGGAACGTGTTTCGTGATTTTTATTCTGCTGCATTATCATCTGAGCACC
 GTGATGGTCCTTTTTGGCAGGCATGTCGTGAAATGACCCTGCCGGATAGCCTGGCAGCCAAACTGGA
 ACTGTGGCGTGACGTGGTGCCTTTCTGCGTTATCGTTGGGAAATGTTTAGTCCGGCAAGCTGGCTG
 GCAATTTATGGTGGTTTTGAACATCTGCCGGAACGTCTGGACCCTGGTGTTCAGCAGTTGGCACCG
 ATGAACTGGCACAGGGTCTGGAACAAATGCGTGCAGCAATTGCCCGTACCGTTGCAGATACCCCGAC
 CCATAGCGAATTTCTGGCAACCGTTGATGGTGCCGACGAGAACCAGTACCGTACCAGCGCATAAGGA
 TCC

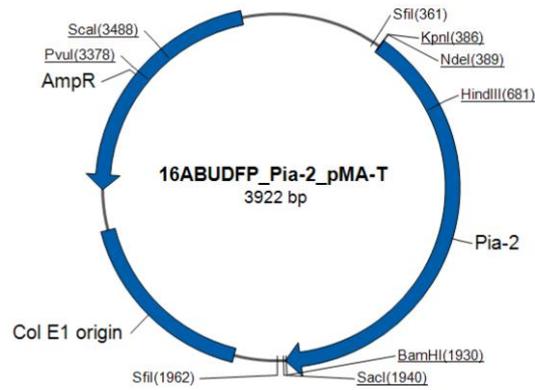


Abbildung 22: Vektor-Karte des erhaltenen Vektors pMA-T mit enthaltenem synthetischem F-Hal-Gen von *pia-2*.

>*b38*

CATATGAGCGATAGCAAAGCACCGAATGTTGTTGTTTTAGGTGGTGGTAGCGCAGGTTGGATTACCG
 CATGTCTGCTGCATCGTCAGTGGTCAGAAAAAGGTGGTAGTGTTACCGTTGTTGAAAGTCCGGAAATT
 GGTATTATTGGTGTGGTGAAGGTAGCACACCCGAGCTGAAAGCATTGTTGATCAGCTGGGTATTGC
 AGAAAGCGAATGGATGCCTGCATGTAATGCAACCTATAAACTGGGTATTTCGCTTAAATGGTTGGAGCG
 AACGTGCAGGTTTTGAAAGCTATTATCATCCGTTTCCGGGTCCGATTGATCTGCATAGCGAACCAGGTT
 TTTATTGGTAATTGTATGCTGGCACGTCATCAGATTGATGTTGCAGCACATCCTGATGATTGGTTTCTG
 GCAACCCATCTGAGCGAAGCAGGTAAAAGCCCGATTGCAGCAGAAAACTTTCCGTTTGCACCGAGCT
 ATGGTTATCATTTTTGATGCCTATGCACTGGGTGCATTTCTGCGTGATTGGGCAGTTAAACGTGGTGT
 GTTCATCGTCCGCTGAAAGTTACCGCAGTTGAACGTGCCGATGATGGTGATATTGCAGCCCTGCTGT
 GTGAAGGTGGTGAACGTATTGAAGGTGACCTGTTTGTGATTGTAGCGGTTTTCTGTCGAATGCTGGCA
 GAACAAGAAGTGGGTGCCACCTTTCTGCCGTTTGCAGAAAACCTGTTTAAATGATAGCGCAGTTGTGCT
 GCCGACCGGTCATGGTGCACCGTTTAAACCGCAGACCGAAGCAACCGCAATGCGTGCCGTTGGCG
 TTGGAGCATTCCGCTGACCACACGTGTTGGTAATGGTTATGTGTATAGCAGCAAATACATCAGCAATG
 AAGATGCCGAAGCAGAATGCGTGGTGCCTGGGTTAGCCGGTGATGGTCCGGAAGCACGTTTTCT
 GAAAATGAAAGTTGGTCTGCTGGAAAATAGCTGGACCCGTAATTGCTGCGAGTTGGTCTGAGCCAG
 GGTTTTCTGGAACCGCTGGAAGCCACCGCACTGCATATTGTTATTGTTACCGCACTGGAATTTGCACA
 GGCCTATGAACAAGGTGGTTATGGTCCGCGCAGCATCGTATGCATTTAATGCGAGCATTGCAGCACGT
 TATGAAGGTATTCTGATTACATTGTTGCCATTATCGTGTTAATCAGCGTAGTGATACCCAGTATTGG
 CGTGATAATGCAGCAAATGATCGTCTGAGCAATGGTCTGAAAACCATGATGACCGCATGGTTTTCGCCA
 TCAGGATATTCATGCTGCCAATGATGAAGCCTATGGTGGTAAACGTTATTATGCAAATGCAAGCTGGC
 ATTGTCTGTTGTCAGGTTATGGCACCTTTCCGCCTCAAGAACGTATGGAAGCAGTTCCGGAAGGCATT
 CGTCCGGCAGATCCAGCCGAAGCACGTGCCATGCTGGAAGCATGTGCACAGAATTTCCGAGTTATG
 ATCCGATTGCCAGCGGATCC

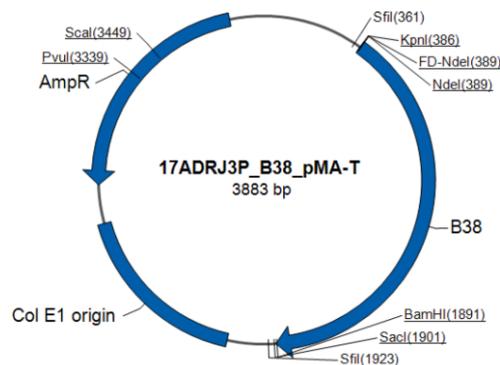


Abbildung 23: Vektor-Karte des erhaltenen Vektors pMA-T mit enthaltenem synthetischem F-Hal-Gen von *b38*.

>*hotH*

```
CATATGCAGAAAACCGCACATCCGATTGAGCAGTTTGTATTGTTGGTGGTGGCACCCGAGGTTGGAT
TGCAGCAGCAACCCTGGCAAATATCTTTAAAGGTAAGATGTTGCGATCACCCCTGGTTGAAAGCGCAG
AAATTGGTATTATTGGTGTGGTGAAGCAACCATTCCGCCTTTTCTGGCAACCCTGCATAGCCTGGGT
TTAGATGAAGCAGAATTTATCAAAGCAACCCAGGGCTCATTTAAACTGGGTATTCGTTTTGAAGATTGG
CATCAGCGTGGCGAACATTATTTTCATCCGTTTGGCACCCCTGGGTCGTACCATTGATGGTCATGAATT
TTTTCAGTGTGGCTGAAAGCAAAAGCCGAAGGTGATGATACACCGCTGATGGCACATAGTCCGGAA
AGCGTTCTGAGCGATCATGGTAAATCTTTCTGCCGCATAAAGCAATGGGCACCCGCACTGGCAGGCA
CCATTATGCACTGCATCTGGATAGCACCCCTGGTGGGTCAGTATCTGCGTACCTTTGCAGAAAAACTG
GGTGTGTTTCGTGTTGAAGGTCATATTGAAAGCATTGAGCAGAGCGAAACCGGTGATATTGCAGCCGT
TGTTCCTGCAGGATGGTCAGCGTATTGCCGGTGATTTTTTTCATTGATTGTAGCGGTTTTTCGTGGCCTGC
TGATTGAACAGACACTGCATACCGGTTATGATGATTGGAGCGCATATCTGCCGTGTAATCGTGCAGTT
ACCGTTCAGACCAAAAATGTTGCACCGCCTACACCGTATACCACAGTACCGCAAAAAGAAGCCGGTT
GGATTTGGCGTATTCCGCTGCAGCATCGTACCGGTAATGGTTATGTTTTTTGCGACAAATTTTGCAGC
GACGAAGAAGCAACCGCAACACTGCTGGCAGCGGTTGAAGGTGAGCAGATTACCGCACCGCGTATT
ATTCCGTTTGTACCGGTATTCGTAACAGGCATGGAATCGTAATTGTCTGGCATTAGGTCTGGCACA
GGTTTTCTGGAACCGCTGAAAGCACCAGCAATTCATCTGGTTAGCAAAACCCTGGCGCTGTTTGTTC
GTATGTTTCCGGATCGCAATTGTCATCCGTTCTGCGTGATGAATTTAATCGTGTGTTTCGTGCAGAT
TATGAAGAAATCCGTGATTTTTCTGGTGCTGCATTATTGTACCACCAAACGTGATGATAGCCCCTTTTGG
CGTTGGTGTGACAGCCGAAATGGAAGTTGCACCGAGCCTGCAGCGTAAACTGGAATTTTTTCCGTGCCG
GTGGTGGTCTGATTCCGGGTACAGAAGAACTGTTTCAGCCGACCAGTTGGTATGCGGTTTTTACCGG
CATGGGTGATGCTGCAGCATATAATCCGACCGTTGATGCACTGGATTATCCGAAACTGGCACTGT
CACTGCAGCGTGGCAAAGATGCAATTCTGGCAGCGACCCTGAAACAGCCGAATCATACCGATTTTATT
GCACAGTTTTGTACAGGCACCGAAGATCTAAGGATCC
```

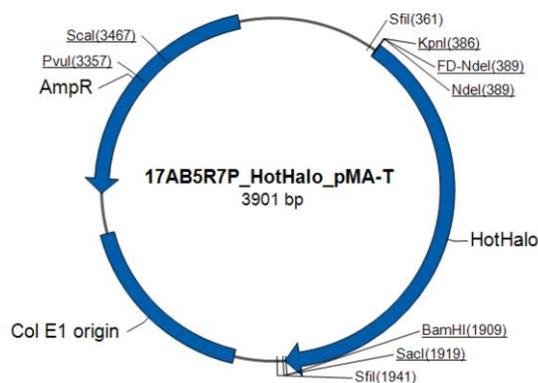


Abbildung 24: Vektor-Karte des erhaltenen Vektors pMA-T mit enthaltenem synthetischem F-Hal-Gen von *hotH* (HotHalo).

4.12.2. Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die Kultivierung von *E. coli* aus kryokonservierten Stammkulturen oder Einzelkolonien erfolgt standardmäßig in LB-Medium bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute (rpm). Das LB-Medium wird für die Kultivierung von rekombinanten Bakterienkulturen mit einer Plasmid-vermittelten Antibiotikaresistenz mit einem passenden Antibiotikum (60 µg/mL Kanamycin, 50 µg/mL Chloramphenicol, 100 µg/mL Ampicillin, 30 µg/mL Tetracyclin; s. 4.8.1; Stammlösung 1:1000) versetzt. Für die Kultivierung auf LB-Agar-Platten, wurde der LB-Agar mit passendem Antibiotikum (s. 4.8.1; Stammkonzentration 1:1000) supplementiert, die Zellen darauf steril ausgestrichen und in einem Inkubator bei 37°C inkubiert. Die *E. coli* DH5α-Zellen werden zur Plasmid-Produktion verwendet, während *E. coli* BL21- und *E. coli* BL21_pGro7-Zellen zur Proteinexpression eingesetzt werden.

4.12.3. Herstellung von Glycerin-Kulturen

Die Kryokonservierung wird genutzt um rekombinante *E.coli*-Zellen bei -80°C zu lagern und langfristig zu konservieren. Dazu wird eine Einzelkolonie der rekombinanten Zellen über Nacht in LB-Medium und passendem Antibiotikum (s. 4.8.1; Stammlösung 1:1000) bei 37°C , 150 rpm kultiviert. Davon werden 1.5 mL bei 13000 rpm zentrifugiert und 1 mL des Überstands verworfen. Das entstandene Pellet wird nun in der restlichen Lösung gelöst und 500 μl autoklaviertes Glycerin zugegeben und invertiert. Das Gemisch wird nun in flüssigem Stickstoff eingefroren und direkt bei -80°C gelagert.

Diese erstellten Glycerin-Kulturen können zum Inokulieren von Expressions-Kultivierungen verwendet werden, indem mit einer sterilen Pipettenspitze von der gewünschten eingefrorenen Glycerin-Kultur ein wenig in 10-50 mL LB-Medium mit passendem Antibiotikum (s. 4.8.1; Stammlösung 1:1000) über Nacht inkubiert wird.

Im Folgenden sind alle erstellten Glycerin-Kulturen chronologisch aufgelistet. Die Nummerierung entspricht der Beschriftung der Glycerin-Kulturen im -80°C Kühlschrank.

Nr.	Erstellungs-Datum	Vektor	Resistenz	Organismus
1	30.10.2015	pMK-RQ_ <i>BbaI3</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
2	31.10.2015	pET28	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
3	13.11.2015	pET28a_ <i>brvH</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
4	04.12.2015	pET28a_ <i>brvH</i>	Kan	<i>E. coli</i> BL21
5	05.12.2015	pET28a	Kan	<i>E. coli</i> BL21
6	19.01.2016	pET28a_ <i>brvH</i>	Kan+Cmp	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
7	23.05.2016	pETM11_ <i>brvH</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
8	23.05.2016	pETM11_ <i>hall</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
9	25.05.2016	pETM11_ <i>brvH</i>	Kan	<i>E. coli</i> BL21
10	25.05.2016	pETM11_ <i>brvH</i>	Kan+Cmp	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
11	16.06.2016	pET28a_ADH	Amp+ Cmp	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
12	12.07.2016	pMAT_ <i>pia-2</i>	Amp	<i>E. coli</i> DH5 α
13	15.07.2016	pET28a_ <i>pia-2</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
14	16.07.2016	pET28a_ <i>pia-2</i>	Kan	<i>E. coli</i> BL21
15	17.07.2016	pET28a_ <i>pia-2</i>	Kan	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
16	01.12.2017	pCIBhis-PrnF	Tet	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
17	08.08.2017	pETM11_ <i>pia-2</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
18	16.08.2017	pET28a_ <i>hotH</i>	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
19	16.08.2017	pET28a_ <i>hotH</i>	Kan+Cmp	<i>E. coli</i> BL21_pGro7

Nr.	Erstellungs-Datum	Vektor	Resistenz	Organismus
20	05.07.2017	pMAT_hotHalo	Amp	<i>E. coli</i> DH5 α
21	18.10.2017	pET28a_brvH_ala	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
22	25.10.2017	pET28a_brvH_ala	Kan+Cmp	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
23	13.12.2017	pMAT_b38	Amp	<i>E. coli</i> DH5 α
24	14.12.2017	pET28a_b38	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
25	18.12.2017	pET28a_b38	Kan+Cmp	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
26	08.06.2018	pET28a_b38_ala	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
27	08.06.2018	pET28a_pia-2_ala	Kan	<i>E. coli</i> DH5 α
28	27.06.2018	pET28a_b38_ala	Kan	<i>E. coli</i> BL21_pGro7
29	27.06.2018	pET28a_pia-2_ala	Kan	<i>E. coli</i> BL21_pGro7

4.12.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen (zum Beispiel aus einer Glycerin-Kultur) werden diese über Nacht in 10 mL LB-Medium mit korrespondierendem Antibiotikum (s. 4.8.1; Stammlösung 1:1000) kultiviert. 6 mL dieser Kultivierung werden bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun erfolgt die Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels des Kits QIAprep Spin Miniprep nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 30 μ l ddH₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

4.12.5. Bestimmung der DNA- und Proteinkonzentration

Die DNA-Konzentration wird mittels der NanoDrop bestimmt. Diese ermittelt die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm, welche das Absorptionsmaximum darstellt. Eine Absorption von 1 entspricht 50 μ g/ μ l doppelsträngige DNA. Das Absorptionsverhältnis von 260 nm und 280 nm beschreibt die Reinheit der DNA und sollte idealerweise zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

Auch die Proteinkonzentration wird über die NanoDrop-Messung bestimmt. Dieses erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm, da die aromatischen Aminosäuren bei hier π - π^* -Absorption aufweisen und so photometrisch nachweisbar sind. Die Proteinkonzentrationen werden in mg/mL angegeben. Die Reinheit der Enzymproben wurde über die SDS-Gelelektrophorese genauer betrachtet.

4.12.6. Klonierung der synthetischen Gene in pET28a-Vektor

Für die Proteinexpression müssen die Gene von *brvH*, *pia-2*, *b38* und *hotH* zunächst in einen passenden Expressionsvektor (pET28a) kloniert werden. Dieser ermöglicht die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG). Außerdem werden die Gene so eingesetzt, dass diese

nach der Expression einen N-terminalen Hexahistidin-Tag (HisTag) besitzen, der durch den Vektor eingeführt wird.

4.12.6.1. Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau mit Restriktionsendonukleasen dient der Klonierung von DNA in einen geeigneten Vektor. Dieses beruht auf der spezifischen Endonukleaseaktivität der Enzyme zu ihren palindromischen Erkennungssequenzen. In diesem Fall dienen die Restriktionsendonukleasen NdeI (CATATG) und BamHI (GGATC) dazu die F-Hal Gene aus den Vektoren pMK-RQ-*bbal-3*, pMA-T-*pia-2*, pMA-T-*b38* und pMA-T-*hothalo* auszuschneiden und diese in den restrigierten pET28a-Vektor zuklonieren. Es werden zwei Restriktionsendonukleasen verwendet, um klebrige Enden zu erzeugen, die einer Re-Ligation des Vektors entgegenwirken. Der Reaktionsansatz (Tabelle 1) wird in einem 1 mL Eppendorfgefäß zusammengegeben und für 2 Stunden bei 37°C, 150 rpm inkubiert.

Tabelle 1: Reaktionsansatz zur Restriktion eines Vektors mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI.

Komponenten	Menge
NEB Cut Smart Puffer (10x)	5 µL
NdeI-Enzym	1 µL
BamHI-Enzym	1 µL
Vektor	1 µg/µL
ddH ₂ O	ad 50 µl

Nach der Inkubation wird der gelungene Restriktionsverdau über ein Agarosegel (1%) überprüft, indem die Vektor-DNA, die größer als das Gen ist, vom Gen aufgetrennt wird. Die Vektor-DNA, die kein Gen trägt (pET28a), wird mittels des QUIAquick PCR Purification-Kits für die folgende Ligation aufgereinigt.

4.12.6.2. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können unterschiedlich große DNA-Fragmente der Molekülgröße nach aufgetrennt werden. Dieses geschieht, da kleine DNA-Fragmente einfacher und somit schneller das Agarose-Gel durchdringen können als große Fragmente. Die negativ geladene DNA wandert dabei zum positiven Pol, der durch Strom erzeugt wird.

Zur Auftrennung der restrigierten DNA wird ein 1%iges (w/v) Agarose-Gel verwendet. Dieses wird in der Mikrowelle erwärmt und zu der handwarmen Lösung wird Roti® GelStain (1:10000) zur späteren Visualisierung der DNA zugegeben. Nachdem das Agarose-Gel ausgehärtet ist, wird dieses mit TAE-Puffer bedeckt und die DNA-Proben

können aufgetragen werden. Dafür werden die DNA-Proben mit 6:1 DNA-Ladepuffer (6x) versetzt und 15 µl in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich werden 6 µl eines DNA-Größenstandard (1 Kb) zum DNA-Größenvergleich mitaufgetragen. Nun wird die Agarose-Gelelektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 150 V für 25 Minuten (min) durchgeführt und darauf die Banden durch einen Transilluminator sichtbar gemacht.

Wenn das Agarose-Gel nur der Überprüfung dient, kann es danach verworfen werden. Dient es der Auftrennung des Vektors und eines Gens, so kann DNA aus dem Agarose-Gel isoliert werden. Dazu wird das QUIAquick Gel Purification-Kit nach den Herstellerangaben verwendet. Dabei wird bei der Befüllung des Agarose-Gels darauf geachtet, dass eine Kammer mit Probe befüllt wird, die der Detektion durch einen Transilluminator dient und eine Kammer daneben mit Probe, die ausgeschnitten wird. So wird sichergestellt, dass es zu keinen Mutationen durch UV-Bestrahlung kommt. Die Konzentration der isolierten DNA wird anschließend mittels der NanoDrop untersucht.

4.12.6.3. Ligation

Nachdem das mit den Endonukleasen NdeI und BamHI geschnittene Gen und der geschnittene Vektor aufgereinigt erhalten werden (s. 4.12.6.1, 4.12.6.2), werden beide in einen Ligationsansatz (Tabelle 2) über Nacht bei Raumtemperatur eingesetzt.

Tabelle 2: Reaktionsansatz der Ligation von Vektor und Gen.

Komponente	Menge
T4-DNA-Ligase Puffer (10x)	2 µL
T4-DNA-Ligase	1 µL
Vektor	37.5 ng/µl
Gen	50 ng/µl
ddH ₂ O	ad 20 µL

4.12.6.4. Biotransformation von DNA in kompetente *E. coli*-Zellen

Um Plasmid-DNA in *E. coli* zu biotransformieren wird die Hitzeschock-Transformation gewählt. Dazu wird zu 100 µL chemisch-kompetente *E. coli* Zellen 5 µL Plasmid-DNA (~80 ng/µl) beziehungsweise 20 µL Ligationsansatz zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgt der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden, danach 1 min auf Eis, dann wird auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium (1 mL) zum Ansatz hinzugegeben und bei 37°C (500 rpm) inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation werden zunächst 50 µL des Ansatzes auf einer Agar-Platte mit passendem Antibiotikum ausgestrichen. Der Rest wird für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand bis auf 50 µL abgenommen und das Pellet in diesen gelöst. Dieser Rest wird auf einer weiteren Agar-Platte mit

passendem Antibiotikum (s. 4.8.1; Stammlösung 1:1000) ausgestrichen und beide Platten bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

4.12.7. Ortsspezifische Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die ortsspezifische Mutagenese dient der Mutation des konservierten Lysins zum Alanin. Hierfür werden spezifische Primer entworfen (4.5), die ~20 Nukleotide lang sind und mittig die Sequenz des konservierten Lysins überlappen. Statt des Codes für Lysins (AAA), ist in den Primern allerdings, das Codon für Alanin (GCT) eingebaut. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den Primern werden Gene mit dem Alanin-Code vervielfältigt. Alle Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes werden zusammengegeben (Tabelle 3) und in dem PCR-Gerät erfolgt die PCR-Amplifikation (Tabelle 4).

Tabelle 3: Reaktionsansatz der PCR für die ortsgerechtere Mutagenese mit den entworfenen Primern und der Pfu-HF DNA-Polymerase.

Komponente	Menge
Pfu-Reaktionspuffer (10x)	5 µL
Vektor mit F-Hal-Gen (70 ng/µL)	1 µL
dNTP-Mix	200 µM
Primer_For	125 ng
Primer_Rev	125 ng
Pfu-HF DNA-Polymerase	2,5 U/µl
ddH ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 4: PCR-Methode zur ortsgerechtere Mutagenese.

Zyklen	Temperatur [°C]	Minuten
1	95	0,5
	95	0,5
16	55	1
	68	7
1	68	5

Nach der PCR-Amplifikation ist noch parentale Plasmid-DNA mit einem Lysin- statt des Alanin-Codons vorhanden. Die Endonuklease DpnI ist in der Lage, methylierte DNA abzubauen. Da nur die parentale Plasmid-DNA methyliert vorliegt, wird diese mit DpnI (10 U/µl) bei 37°C abgebaut. Nach 1 Stunde werden die PCR-Amplifikate in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Die erfolgreiche Mutagenese wird über eine Sequenzierung bestätigt.

4.12.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA in dem pET28a- und pETM11-Vektor wird durch die Firma GATC Biotech, DE mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Für diese werden die Primer der Firma T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) und pET-RP (CTAGTTATTGCTCAGCGG) verwendet.

4.13. Proteinexpression und -Aufreinigung

4.13.1. Heterologe Proteinexpression der F-Hal-Gene in *E. coli*

Für die heterologe Proteinexpression der Gene *brvH*, *pia-2*, *b38* und *hotH* werden die Bakterienstämme *E.coli* BL21_pGro7 mit dem jeweiligen F-Hal_pET28a-Vektorkonstrukte verwendet. Zunächst wird die Vorkultur (VK) in 50 mL LB-Medium, Kanamycin (60 µg/mL) und Chloramphenicol (50 µg/mL) mit der jeweiligen Glycerin-Kultur inokuliert und über Nacht bei 37°C, 150 rpm inkubiert. Mit der VK wird am nächsten Tag die Hauptkultur (HK) inokuliert. Dafür werden 8 mL VK in 500 mL LB-Medium mit passendem Antibiotikum (s. 4.8.1; Stammkonzentration 1:1000) gegeben und bei 37°C, 150 rpm inkubiert. Über die Absorption bei 600 nm wird die optische Dichte (OD₆₀₀) der Bakterien bestimmt und bei einer OD₆₀₀ von 0,4, wird die Kultivierungstemperatur auf 25°C herabgesetzt, eine halbe Stunde inkubiert und danach die heterologe Proteinexpression induziert. Die Induktion für die Gene *brvH*, *pia-2*, *b38* und *hotH* im pET28a-Vektor geschieht mit 0,1 mM IPTG. Die Expression soll in Koexpression mit dem Chaperonen-System GroEL-GroES stattfinden, das über den Vektor pGro7 von TaKara Bio Inc. codiert ist. Dieser wird mit 2 g/L L-Arabinose induziert. Nach der Induktion werden die Zellen weiter bei 25°C, 150 rpm für 22 Stunden inkubiert.

4.13.2. Heterologe Proteinexpression der RR-ADH in *E. coli*

Für die heterologe Proteinexpression der Alkoholdehydrogenase (RR-ADH) werden 50 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (50 µg/mL) versetzt und mit der Glycerin-Kultur (11) inokuliert. Die VK wird über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Mit 8 mL VK werden je 500 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) und Chloramphenicol (50 µg/mL) inokuliert und bei 37°C, 150 rpm inkubiert. Wenn die OD₆₀₀ einen Wert von 0,4 erreicht, werden die Zellen bei 25°C inkubiert und mit L-Arabinose (2 g/L) und Zink-Chlorid (0,5 mM) induziert. Erreicht die OD₆₀₀ einen Wert von 0,6 wird mit 0,1 mM IPTG die Expression der RR-ADH induziert. Die Zellen der HK werden für 22 Stunden bei 25°C, 150 rpm inkubiert.

4.13.3. Heterologe Proteinexpression von PrnF in *Pseudomonas Fluorescens*

Die heterologe Proteinexpression der Flavinreduktase PrnF in *Pseudomonas Fluorescens* erfolgte zunächst mit einer VK von 50 mL LB-Medium und Tetracyclin (30 µg/mL), die mit der Glycerin-Kultur (16) inokuliert wird und über Nacht bei 30°C und 150 rpm inkubiert wird. Für die HK werden 5 mL VK in 500 mL LB-Medium und Tetracyclin (30 µg/mL) gegeben und für 3 Tage bei 30°C und 150 rpm inkubiert. Eine Induktion ist für dieses Plasmid nicht notwendig.

4.13.4. Zellernte

Nachdem die Zellen 22 Stunden beziehungsweise 3 Tage gewachsen sind, werden die Zellen geerntet. Dazu werden jeweils 1.5 L HK zu einem Pellet vereint. Für die Ernte werden die Zellen bei 4200x g, 4°C für 1 Stunde zentrifugiert, das Biomasse-Pellet mit 30 mL 100 mM Na₂HPO₄-Puffer gewaschen und wieder bei 4200x g, 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Biomasse-Pellet wird mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

4.13.5. Zellaufschluss mittels French Press

Der Zellaufschluss erfolgte mit den bei -20°C gelagerten 1.5 L-Pellets aus der Kultivierung (3.6.4). Diese wurden zunächst bei Raumtemperatur für 10 min aufgetaut und in 30 mL 100 mM Na₂HPO₄-Puffer (im Fall von der RR-ADH in 20 mL 100 mM Na₂HPO₄-Puffer) gelöst. Der Zellaufschluss findet mechanisch mittels French Press 3x bei 1000 PSIG auf Eis statt. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 10000 rpm, um lösliche von unlöslichen Fragmenten zu trennen. Für den Zellaufschluss vom heterolog exprimierten PrnF wird zusätzlich eine Spatelspitze DNase und 300 µl DNase-Puffer vor der Zentrifugation zugegeben. Der Überstand mit den löslichen Enzymen wird dabei behalten und auf Eis gelagert.

4.13.6. Enzymaufreinigung mittels Kobalt-TALON Matrix

Die Proteinaufreinigung erfolgt für die heterolog exprimierten Enzyme BrvH, Pia-2, B38, HotH und PrnF jeweils über deren HisTag. Zunächst werden die Lysat-Überstände nach dem Zellaufschluss (3.6.5) auf Eis gefiltert (0,45 µm). Zur Enzymaufreinigung wird eine Kobalt (Co)-TALON Matrix genutzt, dessen komplexiertes Kobalt mit den HisTags der Enzyme bindet und somit diese von den anderen Enzymen aufgetrennt werden. Zunächst wird die Co-TALON Säule (2 mL) vorbereitet, indem diese mit 15 mL ddH₂O und danach mit 15 mL 100 mM Na₂HPO₄-Puffer gewaschen wird. Nun kann der gefilterte Lysat-Überstand der Enzyme auf die Säule aufgetragen werden und für eine Stunde bei 4°C, 10 rpm inkubiert werden. Darauf wird der Überstand abgelassen und die Säule mit

20 mL 100 mM Na₂HPO₄-Puffer und dann mit 20 mL Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt über die Verdrängung der HisTag-gebundenen Enzyme durch Imidazol (300mM). Es werden 10 Fraktionen auf Eis mit jeweils 750 µL Elutionspuffer in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wird mit Hilfe der NanoDrop ermittelt und die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen vereint.

4.13.7. Enzymaufreinigung *per* Hitzefällung

Die RR-ADH wird mittels Hitzeschock von den anderen Enzymen aus dem *E. coli*-Lysat nach dem Zellaufschluss abgetrennt. Dazu wird je 1 mL Zell-Lysat in 1.5 mL Eppendorfgefäße übertragen und für 20 min bei 60°C und 500 rpm inkubiert. Danach werden die löslichen Fragmenten von unlöslichen Fragmenten durch die Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt und der Überstand mit der löslichen RR-ADH wird in neue 1.5 mL Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

4.13.8. Puffertausch der aufgereinigten Enzyme

4.13.8.1. Puffertausch mittels Entsalzungssäule

Nach der Enzymaufreinigung über die Co-TALON Matrix sind hohe Konzentrationen an Imidazol in der Lösung. Diese können in den weiteren Enzymarbeiten stören, weshalb nach der HisTag-gebundenen Aufreinigung der Puffer über eine Entsalzungssäule (s. 4.2; HiTrap Desalting column) getauscht wird. Diese Methodik wird für die Enzyme BrvH, Pia-2, B38, HotH und PrnF verwendet. Im ersten Schritt wird die Säule mit 25 mL Entsalzungspuffer und einer Durchflussrate von 5 mL/min gewaschen. Je nach dem welche Halogenierungsreaktion durchgeführt werden soll, wird der Natriumbromid (NaBr) oder Natriumchlorid (NaCl) Puffer verwendet. Nun werden 1.5 mL Enzymprobe auf die Säule aufgetragen und mit 2 mL Entsalzungspuffer (5 mL/min) eluiert. Von der erhaltenen Enzymprobe wird im Folgenden die Proteinkonzentration *per* NanoDrop bestimmt und kann nun für Enzym-Tests und Halogenierungsreaktionen eingesetzt werden. Zur Lagerung der Säule wird nach der Elution die Entsalzungssäule noch einmal mit 15 mL Entsalzungspuffer, darauf mit 15 mL 20%igem Ethanol gewaschen und bei 4°C gelagert.

Weiterhin wird diese Methodik auch für den Puffertausch zu dem FAD-Rekonstitutionspuffer für die FAD-Rekonstitution verwendet. Dabei wird die obenstehende Methode verwendet. Allerdings wird statt des Entsalzungspuffers der FAD-Rekonstitutionspuffer verwendet. Nach der Elution der Probe wird mit 25 mL Entsalzungspuffer und darauf mit 15 mL 20%igem Ethanol gewaschen.

4.13.8.2. Puffertausch mittels Dialyse

Die Methode der Dialyse wird für die Vorbereitung der Enzymprobe für die CD-Spektroskopie verwendet. Dazu werden 0,3 mg/mL Enzym in einem Gesamtvolumen von 30 μ L in eine Dialyse-Membran gegeben und über Nacht bei 4°C in 4 L CD-Puffer inkubiert.

4.13.9. Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Visualisierung von Proteinen verwendet und trennt diese unabhängig von ihrer Ladung, der Größe nach auf. Dazu werden zwei diskontinuierliche Gelsysteme, das Sammelgel (4%) und das Trenngel (15%) nach Laemmli (1970) eingesetzt. Das Erstere dient der Fokussierung der Banden, während im Trenngel die eigentliche Trennung der Proteine stattfindet. Zunächst wird das Trenngel wie in Tabelle 5 angegeben hergestellt, wobei APS als Radikalstarter und TEMED als Polymerisationskatalysator zuletzt zugegeben werden. Dieses wird noch flüssig in die vorgesehene Vorrichtung im SDS-PAGE Gelsystem gegeben, mit 1 mL 2-propanol überschichtet und für 10 min ausgehärtet. Danach kann das Sammelgel hergestellt werden und dieses mit Kamm für die Probenaschen über das Trenngel gegeben werden. Dieses wird über Nacht bei 4°C ausgehärtet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE.

Komponente	Sammelgel (4%)	Trenngel (15%)
<i>ddH</i> ₂ O	2.89 mL	3.6 mL
Tris 1.5 M (pH8.8)	-	2.5 mL
Tris 0.5 M (pH 6.8)	1.26 mL	-
10% SDS	50 μ l	100 μ L
40% Acrylamid/Bisacrylamid	0.5 μ l	3 mL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 μ L	5 μ L
1.5%		
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	800 μ L	300 μ L

Am nächsten Tag können die Proteinproben in die Taschen aufgetragen werden. Dazu werden zunächst die Proteinproben vorbereitet, indem 20 μ l Proteinprobe mit 10 μ l Laemmli-Puffer versetzt werden und bei 98°C, 500 rpm für 10 min gekocht werden. Das im Puffer enthaltene SDS lagert sich um die denaturierten Proteinproben an, wodurch diese mit einer negativen Ladung versehen werden und sich nur noch in ihrer Größe unterscheiden. Nachdem die Proben abgekühlt sind, werden 7 μ l Proteinprobe und 6 μ l

Proteinmarker in die Geltaschen gegeben. Die SDS-PAGE wird nun für 15 min bei 100 V gestartet und läuft anschließend für eine weitere Stunde bei 170 V. Zur Visualisierung wird das Gel im Folgenden in Coomassie-Färbelösung über Nacht inkubiert und darauf in ddH_2O entfärbt. Mit der Kamera LAS 3000 wird das SDS-Gel dokumentiert.

4.14. Biochemische Arbeiten

Alle Arbeiten mit Enzymen wurden stets auf Eis durchgeführt.

4.14.1. Aktivitätsbestimmung der Alkoholdehydrogenase *RR-ADH*

Die Alkoholdehydrogenase *RR-ADH* wird genutzt um NAD^+ zu $NADH$ zu regenerieren, dabei setzt diese 2-propanol zu Aceton um. $NADH$ absorbiert bei einer Wellenlänge von 340 nm, umso mehr $NADH$ gebildet wird, desto höher wird die Absorption. Dieses wird genutzt, um die Reaktionsgeschwindigkeit und somit die Aktivität der *RR-ADH* zu bestimmen.

Für die Messung wird zunächst das UV-Vis-Photometer mit einer Referenzprobe (800 μ L Na_2HPO_4 -Puffer (10 mM) und 200 μ L 2-Propanol) kalibriert. Danach kann die Messung mit *RR-ADH* durchgeführt werden. Dazu werden 780 μ L Na_2HPO_4 -Puffer (10 mM), 200 μ L 2-propanol, 10 μ L *RR-ADH* (1:10 mit ddH_2O verdünnt) und 10 μ L NAD (10 mM) zusammen invertiert und über 1 min bei 340 nm vermessen. Dieses wird im Triplikat angefertigt und die Steigung des Umsatzes wird für die ersten 15 Sekunden berechnet.

Für die Berechnung der Aktivität wird folgende Formel (1) verwendet:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{U}{mL} \right] = \frac{d A_{340 \text{ nm}}}{dt} \cdot \frac{V_t \cdot F}{V_s \cdot \epsilon \cdot d} \quad (1)$$

$\frac{d A_{340 \text{ nm}}}{dt}$ = Steigung (für die ersten 15 Sekunden)

d= Schichtdicke (1 cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient ($6.3 \mu\text{mol}^{-1}\text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$)

V_t = Gesamtvolumen

V_s = eingesetzte Volumen an Enzym

F= Verdünnungsfaktor

4.14.2. Aktivitätsbestimmung der Flavinreduktase *PrnF*

Bei *PrnF* handelt es sich um eine Flavinreduktase, die FAD zu $FADH_2$ reduziert, indem diese $NADH$ zu NAD oxidiert. $NADH$ absorbiert bei einer Wellenlänge von 340 nm,

während der enzymatischen Reaktion wird NADH verbraucht, welches über die Wellenlänge verfolgt und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden kann.

Im ersten Schritt wird das UV-Vis-Photometer mit einer Nullprobe (9.8 mL Na_2HPO_4 (10 mM) und 0.2 mL FAD (1 mM) kalibriert. Für die Messung werden 960 μL Nullprobe mit 20 μL NADH und 20 μL PrnF (1:100 mit $d\text{dH}_2\text{O}$ verdünnt) invertiert und bei 340 nm über 1 min im Triplikat vermessen. Von dieser wird die Steigung für die ersten 15 Sekunden bestimmt. Die Berechnung der Aktivität wird durch Formel (1) bestimmt.

4.14.3. Aktivitätsbestimmungen der identifizierten F-Hals

Die Halogenierungsreaktionen der identifizierten F-Hals liegen alle der von Frese *et al.* etablierten Methodik zugrunde [27, 82]. Dieses basiert auf einem Drei-Komponenten-System zur Kofaktor-Regenerierung und Halogenierung. Dabei wird die F-Hal zur Halogenierung eingesetzt, die FADH_2 zu FAD verbraucht. Dieses wird durch die Flavinreduktase PrnF regeneriert, indem diese NADH zu NAD^+ oxidiert. Um NAD^+ wiederum zu NADH zu regenerieren wird die RR-ADH eingesetzt, die dazu 2-propanol zu Aceton oxidiert (Abbildung 25).

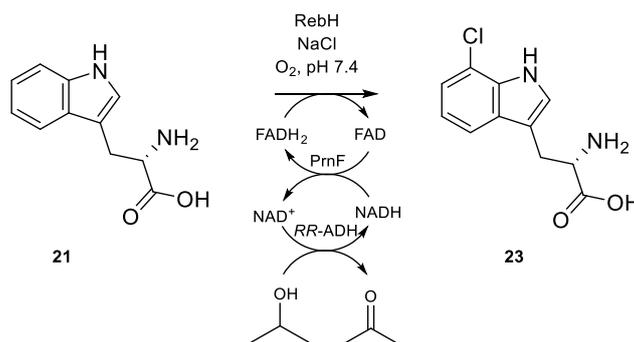


Abbildung 25: Von Frese *et al.* etablierte Halogenierungsreaktion mit Kofaktor-Regenerierung am Beispiel der F-Hal RebH dargestellt [82].

Alle Enzymreaktionen wurden mit der analytischen RP-HPLC verfolgt. Dazu werden 50-100 μL der Reaktion abgenommen und mit Methanol 1:1 versetzt. Dieses stoppt die Reaktion, indem die Enzyme denaturieren. Die unlöslichen Komponenten werden für 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und die Überstände vermessen (s. weitere Probenaufarbeitung in 4.15.1.1). Die Integrale der Edukt- und Produkt-Peaks werden zur Berechnung der prozentualen Produktumsätze genutzt.

4.14.3.1. Substrat-Umsatzversuche von F-Hals

Die Substrat-Umsatzversuche erfolgen alle über 48 Stunden bei 25°C , 500 rpm mit 1.25 mg/mL aufgereinigtem Enzym und 1 mM Substrat (Tabelle 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die Substrat-Umsatzversuche. Nur für die Substrate der Aminosäure-Verbindungen wurde zusätzlich 2-propanol zum Reaktionsansatz gegeben. Die anderen Verbindungen werden in 2-propanol gelöst.

Komponente	Finalkonzentration
FAD	1 µM
NAD	100 µM
NaBr/NaCl	50 mM
PrnF	2.5 U/mL
RR-ADH	2 U/mL
F-Hal	1.25 mg/mL
Substrat	1 mM
2-propanol	5% (v/v)
100 mM Na ₂ HPO ₄ -Puffer	ad 500 µl oder 1 mL

Die Indol-Derivate lösen sich sehr gut in 2-Propanol, weshalb alle Indol-Derivate und Phenole in einer 20 mM Stammlösung in 2-Propanol gelöst werden. Zu diesen Reaktionen muss kein zusätzliches 2-Propanol für die Kofaktor-Regenerierung gegeben werden.

Die Aminosäureverbindungen (L-Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin), 5-Hydroxytryptophan und Kynurenin hingegen wurden in *ddH*₂O gelöst und zur Reaktion musste zusätzliches 2-Propanol (5% (v/v)) zugegeben werden.

Sind alle Komponenten zusammengegeben wird direkt eine Nullprobe, nach 48 Stunden Reaktionszeit wird wieder eine zur Reaktionskontrolle genommen und diese in der analytischen RP-HPLC und LC-ESI-MS vermessen. Der prozentuale Umsatz wurde nach 48 Stunden über die Integrale der Retentionspeaks bestimmt.

1) Bromierung von Indol

Bromindol: theoretische Masse [C₈H₆NBr] *m/z* 194.97, 196.97

Dibromindol: theoretische Masse [C₈H₅NBr₂] *m/z* 274.88, 272.88, 276.87

BrvH: prozentualer Umsatz: 100%, GC-ESI-MS [M+H]⁺: 195.14, 197.12 (*t_R*: 20.79 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 100%, ESI-MS [M+H]⁺: 195.55, 197.53

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 193.94, 195.94 (*t_R*: 9.0 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 37% monobromiertes Indol LC-ESI-MS [M-H]⁻: 193.94, 195.94 (*t_R*: 9.1 min); 63% dibromiertes Indol LC-ESI-MS [M-H]⁻: 273.85, 271.85, 275.84 (*t_R*: 10.00 min)

2) Bromierung von 2-Methylindol

Brom-2-methylindol: theoretische Masse $[C_9H_8BrN]$ m/z 208.98, 210.98

Dibrom-2-methylindol: theoretische Masse $[C_9H_5Br_2N]$ m/z 288.89, 286.89, 290.89

BrvH: prozentualer Umsatz: 100%, GC-ESI-MS $[M+H]^+$: 209.1, 211.16 (t_R : 22.1 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.98, 209.97 (t_R : 9.8 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.96, 209.96 (t_R : 10.7 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 78% monobromiertes 2-Methylindol LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.96, 209.95 (t_R : 8.4 min). 22% dibromiertes 2-Methylindol GC-ESI-MS $[M+H]^+$: 290.43, 287.50, 292.42 (t_R : 27.6 min)

3) Bromierung von 3-Methylindol

Brom-3-methylindol: theoretische Masse $[C_9H_8BrN]$ m/z 208.98, 210.98

Dibrom-3-methylindol: theoretische Masse $[C_9H_5Br_2N]$ m/z 288.89, 286.89, 290.89

BrvH: prozentualer Umsatz: 98%, GC-ESI-MS $[M+H]^+$: 210.09, 212.09 (t_R : 20.00 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 98%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.98, 209.88 (t_R : 9.9 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: keine Masse korrekte Masse gefunden

HotH: prozentualer Umsatz: 65% monobromiertes 3-Methylindol LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.96, 209.95 (t_R : 8.4 min); 35% dibromiertes 3-Methylindol GC-ESI-MS $[M+H]^+$: 290.43, 287.50, 292.42 (t_R : 27.6 min)

4) Bromierung von 5-Methylindol

Brom-5-methylindol: theoretische Masse $[C_9H_8BrN]$ m/z 208.98, 210.98

Dibrom-5-methylindol: theoretische Masse $[C_9H_5Br_2N]$ m/z 288.89, 286.89, 290.89

BrvH: prozentualer Umsatz: 97%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.98, 209.98 (t_R : 9.9 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 98%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.98, 209.98 (t_R : 9.9 min)

B38: prozentualer Umsatz: 95%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 209.99, 211.98 (t_R : 9.6 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 15% monobromiertes 5-Methylindol LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 207.96, 209.95 (t_R : 8.4 min); 85% dibromiertes 5-Methylindol GC-ESI-MS $[M+H]^+$: 290.48, 287.65, 292.43 (t_R : 27.1 min)

5) Bromierung von 5-Nitroindol

Brom-5-nitroindol: theoretische Masse [$C_8H_5BrN_2O_2$] m/z 239.95, 241.95

BrvH: prozentualer Umsatz: 98%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 240.96, 242.95 (t_R : 8.9 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 97%, ESI-MS $[M-H]^-$: 238.95, 240.95 (t_R : 9.1 min)

B38: prozentualer Umsatz: 95%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 238.95, 240.95 (t_R : 9.0 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 96%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 238.96, 240.95 (t_R : 9.4 min)

6) Bromierung von 5-Chlorindol

Brom-5-chlorindol: theoretische Masse [C_8H_5BrClN] m/z 228.93, 230.93

BrvH: prozentualer Umsatz: 41%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 227.94, 229.93 (t_R : 10.2 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 43%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 227.94, 229.95 (t_R : 10.2 min)

B38: prozentualer Umsatz: 47%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 227.9, 229.9 (t_R : 10.1 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 84%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 227.91, 229.91 (t_R : 10.1 min)

7) Bromierung von 5-Bromindol

Brom-5-bromindol: theoretische Masse [$C_8H_5Br_2N$] m/z 274.88, 272.88, 276.87

BrvH: prozentualer Umsatz: 52%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 275.88, 273.88, 277.88 (t_R : 10.4 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 55%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 275.88, 273.88, 277.88 (t_R : 10.3 min)

B38: prozentualer Umsatz: 65%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 275.89, 273.89, 277.89 (t_R : 10.3 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 81%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 275.88, 273.88, 277.89 (t_R : 10.3 min)

8) Bromierung von 5-Fluorindol

Brom-5-fluorindol: theoretische Masse [C_8H_5BrFN] m/z 212.96, 214.96

Dibrom-5-fluorindol: theoretische Masse [$C_8H_4Br_2FN$] m/z 292.87, 290.87, 294.87

BrvH: prozentualer Umsatz: 97%, LC-ESI-MS $[M+H]^+$: 213.96, 215.96 (t_R : 9.5 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS $[M-H]^-$: 211.93, 213.93 (t_R : 9.4 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 213.97, 215.97 (t_R: 9.4 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 90% monobromiertes 5-Fluorindol LC-ESI-MS [M-H]⁻: 211.94, 213.94 (t_R: 9.3 min); 10% dibromiertes 5-Fluorindol, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 291.83, 289.83, 293.83 (t_R: 10.1 min)

9) Bromierung von 5-Cyanindol

Brom-5-cyanindol: theoretische Masse [C₉H₅BrN₂] *m/z* 219.96, 221.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 99%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 218.96, 220.96 (t_R: 8.5 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 99%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 218.96, 220.96 (t_R: 8.6 min)

B38: prozentualer Umsatz: 99%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 218.95, 220.94 (t_R: 8.5 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 98%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 218.95, 220.95 (t_R: 8.5 min)

10) Bromierung von 5-Hydroxyindol

Brom-5-hydroxyindol: theoretische Masse [C₈H₆BrNO] *m/z* 210.96, 212.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 96%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 209.87, 211.87 (t_R: 6.9 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 94%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 209.96, 211.96 (t_R: 6.9 min)

B38: prozentualer Umsatz: 92%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 209.93, 211.93 (t_R: 6.7 min)

11) Bromierung von Indol-5-carbonsäure

Bromindol-5-carbonsäure: theoretische Masse [C₉H₆BrNO₂] *m/z* 238.96; 240.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 95%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.85; 239.85 (t_R: 7.1 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 20%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.95; 239.95 (t_R: 7.4 min)

B38: prozentualer Umsatz: 90%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.93; 239.93 (t_R: 7.0 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 55%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.93; 239.93 (t_R: 7.0 Min)

12) Bromierung von Indol-2-carbonsäure

Bromindol-2-carbonsäure: theoretische Masse [C₉H₆BrNO₂] *m/z* 238.96, 240.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 35%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 239.96, 241.96 (t_R: 7.7 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 9%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.96, 239.96 (t_R: 7.9 min)

B38: prozentualer Umsatz: 35%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 239.97, 241.97 (t_R: 7.9 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 9%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.93, 239.93 (t_R: 7.8 min)

13) Bromierung von Indol-2-methanol

Bromindol-2-methanol: theoretische Masse [C_9H_8BrNO] m/z 224.98, 226.98

Dibromindol-2-methanol: theoretische Masse [$C_9H_7Br_2NO$] m/z 304.89, 302.89, 306.89

BrvH: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 223.88, 225.88 (t_R : 7.9 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 99%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 223.99, 225.98 (t_R : 7.9 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 223.95, 225.95 (t_R : 8.6 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 84% monobromiertes Indol-2-methanol, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 223.95, 225.95 (t_R : 7.8 min); 16% dibromiertes Indol-2-methanol, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 303.85, 301.85, 305.85 (t_R : 9.0 min)

14) Bromierung von 2-Methyl-5-nitroindol

Brom-2-methyl-5-nitroindol: theoretische Masse [$C_9H_7BrN_2O_2$] m/z 253.97, 255.97

BrvH: prozentualer Umsatz: 78%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 252.86, 254.86, 253.85 (t_R : 9.7 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 28% + 5 NPs, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 252.97, 254.96 (t_R : 9.7 min)

B38: prozentualer Umsatz: 72%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 252.94, 254.94 (t_R : 9.5 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 73%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 252.95, 254.94 (t_R : 9.6 min)

15) Bromierung von 7-Azaindol

Brom-7-azaindol: theoretische Masse [$C_7H_5BrN_2$] m/z 195.96, 197.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 12%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 194.99, 196.94 (t_R : 7.0 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 96%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 196.97, 197.97 (t_R : 7.0 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 194.94, 196.94 (t_R : 6.9 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 194.94, 196.93 (t_R : 7.1 min)

16) Bromierung von Pyrrol-2,3-pyrimidin

Brompyrrolo-2.3-pyrimidin: theoretische Masse [$C_6H_4BrN_2$] m/z 196.96, 198.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 195.88, 197.87 (t_R : 4.0 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 195.96, 197.95 (t_R : 4.1 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 195.93, 197.93 (t_R: 4.2 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 100%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 195.93, 197.93 (t_R: 4.0 min)

17) Bromierung von Azulen

Bromazulen: theoretische Masse [C₁₀H₇Br] *m/z* 205.97, 207.97

Dibromazulen: theoretische Masse [C₁₀H₆Br₂] *m/z* 285.88, 283.88, 287.88

BrvH: prozentualer Umsatz: 81%, GC-ESI-MS [M+H]⁺: 206.14, 208.14 (t_R: 26.7 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 96%, GC-ESI-MS [M+H]⁺: 206.14, 208.14 (t_R: 26.7 min)

B38: prozentualer Umsatz: 0%

HotH: prozentualer Umsatz: 86%, GC-ESI-MS [M+H]⁺: 206.11, 208.13 (t_R: 26.7 min)

18) Bromierung von 4-*n*-Hexylresorcinol

Brom-4-*n*-hexylresorcinol: theoretische Masse [C₁₂H₁₇BrNO₂] *m/z* 272.04, 274.04

BrvH: prozentualer Umsatz: 67%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 270.91, 272.91 (t_R: 10.5 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 21% + 4 NPs, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 271.03, 273.03 (t_R: 10.6 min)

B38: prozentualer Umsatz: kein Edukt mehr, 21%+11 NPs, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 271.01, 273.00 (t_R: 10.5 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 95%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 271.01, 273.01 (t_R: 10.4 min)

19) Bromierung von Tryptophol

Bromtryptophol: theoretische Masse [C₁₀H₁₀BrNO] *m/z* 238.99, 240.99

BrvH: prozentualer Umsatz: 0%

Pia-2: prozentualer Umsatz: 5%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 237.99, 239.99 (t_R: 7.7 min)

B38: prozentualer Umsatz: 21%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 240.01, 242.01 (t_R: 7.7 min)

20) Bromierung von Indol-3-propionsäure

Bromindol-3-propionsäure: theoretische Masse [C₁₁H₁₀BrNO₂] *m/z* 266.99, 268.99

Dibromindol-3-propionsäure: theoretische Masse [C₁₁H₉BrNO₂] *m/z* 346.9, 344.9, 348.9

BrvH: prozentualer Umsatz: 0%

Pia-2: prozentualer Umsatz: 2%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 265.99, 267.99 (t_R: 8.1 min)

B38: prozentualer Umsatz: 20%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 268.00, 270.00 (t_R: 8.0 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 37% monobromierte Indol-3-propionsäure LC-ESI-MS [M-H]⁻: 265.96, 267.96 (t_R: 8.0 min); 10% dibromierte Indol-3-propionsäure, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 345.86, 343.86, 347.86 (t_R: 8.7 min)

21) Bromierung von Chinoxalin

Bromchinoxalin: theoretische Masse [C₈H₅BrN₂] m/z 207.96, 209.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 0%

Pia-2: prozentualer Umsatz: 11% (RP-HPLC), LC-ESI-MS [M-H]⁻: keine Masse korrekte Masse gefunden

B38: prozentualer Umsatz: 3% (RP-HPLC), LC-ESI-MS [M-H]⁻: keine Masse korrekte Masse gefunden

HotH: prozentualer Umsatz: 0%

22) Bromierung von Indol-3-essigsäure

Bromindol-3-essigsäure: theoretische Masse [C₁₀H₈BrNO₂] m/z 252.97, 254.97

BrvH: prozentualer Umsatz: 0%

Pia-2: prozentualer Umsatz: 0%

B38: prozentualer Umsatz: 15%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 251.94, 253.94 (t_R: 7,5 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 7%; LC-ESI-MS [M-H]⁻ ergab Doppelpeak mit selben Massen: 251.94, 253.94 (t_R: 7.4 min); 251.94, 253.94 (t_R: 7.5 min)

23) Bromierung von Phenol

Bromphenol: theoretische Masse [C₆H₅BrO] m/z 171.95, 173.95

BrvH: prozentualer Umsatz: 0%

Pia-2: prozentualer Umsatz: 17%; GC-ESI-MS [M+H]⁺: 172.13, 174.12 (t_R: 12.5 min)

B38: prozentualer Umsatz: 23%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: keine Masse korrekte Masse gefunden

HotH: prozentualer Umsatz: 0%

24) Bromierung von 2,3-Dimethylindol

Brom-2,3-dimethylindol: theoretische Masse [C₁₀H₁₀BrN] m/z 223.00, 225.00

Dibrom-2,3-dimethylindol: theoretische Masse [C₁₀H₉BrN] *m/z* 302.91, 300.91, 304.91

BrvH: prozentualer Umsatz: 0%

Pia-2: prozentualer Umsatz: 15%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 222.00, 224.00 (t_R: 10.4 min),

B38: prozentualer Umsatz: 31%, LC-ESI-MS [M-H]⁻: 221.97, 223.96 (t_R: 10.4 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 83%, LC-ESI-MS [M+H]⁺: 223.0, 224.99 (t_R: 10.4 min)

25) Bromierung von L-Kynurenin

Bromkynurenin: theoretische Masse [C₁₀H₁₁BrN₂O₃] *m/z* 286.00, 287.99

BrvH: 0%

Pia-2: 0%

B38: prozentualer Umsatz: 24%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 284.99, 286.99 (t_R: 4.8 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 24%; LC-ESI-MS [M-H]⁻: 284.99, 286.99 (t_R: 4.9 min)

26) Bromierung von Anthranilsäure

Bromanthranilsäure: theoretische Masse [C₇H₆BrNO₂] *m/z* 214.96, 216.96

BrvH: prozentualer Umsatz: 100% 2 Produktpeaks (P1: 73%, P2: 27%), LC-ESI-MS [M-H]⁻: 213.95, 215.95 (P1 t_R: 7.3 min; P2 t_R: 7.6 min)

Pia-2: prozentualer Umsatz: 36% 2 Produktpeaks (P1: 71%, P2: 29%), LC-ESI-MS [M-H]⁻: 213.95, 215.95 (P1 t_R: 7.3 min; P2 t_R: 7.6 min)

B38: prozentualer Umsatz: 100% 2 Produktpeaks (P1: 82%, P2: 18%), LC-ESI-MS [M-H]⁻: 213.95, 215.95 (P1 t_R: 7.3 min; P2 t_R: 7.6 min)

HotH: prozentualer Umsatz: 0%

4.14.3.2. Aktivitätsbestimmung der F-Hals

4.14.3.2.1. Bestimmung der spezifischen Aktivität

Um die spezifische Aktivität der F-Hals zu bestimmen werden wie in 4.14.3.1 die Reaktionen mit 0.05 mM Substrat und 10 µM Enzym angesetzt und alle 5 Minuten über 20 Minuten Proben genommen. Diese werden 1:1 mit Methanol abgestoppt, in der analytischen RP-HPLC vermessen und die prozentualen Produktumsätze bestimmt. Aus den prozentualen Produktumsätzen wiederum kann die umgesetzte Produktkonzentration berechnet werden. Diese wird gegen die Zeit (Min) aufgetragen,

wodurch die Steigung m berechnet werden kann. Diese wird in die Formel (2) eingesetzt und es folgt die spezifische Aktivität des Enzyms.

$$\text{spezifische Aktivität} \left[\frac{mU}{mg} \right] = \frac{m}{c_E \cdot M_E} \cdot 10^9 \quad (2)$$

c_E = Enzymkonzentration (10 μ M)

M_E = Enzymmasse (Da)

4.14.3.2.2. Bestimmung der kinetischen Parameter

Die kinetischen Parameter wurden nach Michaelis-Menten bestimmt. Hierzu wurden Enzym-Reaktionen wie in 4.14.3.2.1 mit je 7 verschiedenen Substratkonzentrationen (0.01 mM, 0.02 mM, 0.03 mM, 0.04 mM, 0.05 mM, 0.07 mM, 0.1 mM) in Triplikaten angesetzt. Wie für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden diese über 20 Minuten bei 25°C, 500 rpm inkubiert und alle 5 Minuten eine Probe 1:1 mit Methanol gestoppt und in der analytischen RP-HPLC vermessen. Es werden die prozentualen Produktumsätze bestimmt und aus diesen die umgesetzten Produktkonzentrationen berechnet. Diese werden gegen die Zeit (Min) aufgetragen und die Steigung m ermittelt. Die Steigungen m der einzelnen Substratkonzentrationen werden genutzt um die kinetischen Parameter der Michaelis-Menten Konstante (K_M) und der katalytischen Aktivität (k_{kat}) zu bestimmen. Dieses erfolgte mit dem Programm Simfit [147, 148]. Hier wird das mmfit-Model (Fit Michaelis-Menten functions) im Substrat-Modus verwendet.

4.14.3.3. Bestimmung der Langzeitstabilität

Für die Bestimmung der Langzeitstabilität der Enzyme bei 4°C werden die Enzyme wie in 4.13.5, 4.13.6 und 4.13.8.1 beschrieben aufgereinigt und die Enzyme in Eppendorfgefäßen bei 4°C gelagert. Nach 3 Monaten, 6 Monaten oder 2,5 Jahren Lagerung wurden die Enzyme in Substrat-Umsatzreaktionen wie in 4.14.3.1 mit Indol als Substrat eingesetzt und eine Nullstunden-Probe sowie eine 48 Stunden Probe 1:1 mit Methanol gestoppt. Diese werden in der analytischen RP-HPLC vermessen und die prozentualen Produktumsätze, mit denen von direkt verwendetem Enzym verglichen.

4.14.3.4. Bestimmung der Thermostabilität über Hitzeinkubation

Zur Bestimmung der Thermostabilität werden die Enzyme wie in 4.13.5, 4.13.6 und 4.13.8.1 beschrieben aufgereinigt, je 100 μ L in Eppendorfgefäße überführt und bei 41°C, 45°C, 51°C und 55°C für 30 Minuten inkubiert. Darauf wurden die Enzyme auf Eis für 1 Minuten gelagert und danach in Substrat-Umsatzreaktionen (s. 4.14.3.1) bei 25°C mit Indol als Substrat inkubiert. Es wird eine Nullstunden-Probe sowie eine 48 Stunden mit 1:1 Methanol gestoppt und in der analytischen RP-HPLC vermessen. Die prozentualen

Produktumsätze werden bestimmt und mit denen von Enzym, das nicht inkubiert wurde, verglichen.

4.14.3.5. Bestimmung der Thermostabilität über CD-Messung

Die Thermostabilität der F-Hals BrvH, Pia-2 und HotH wird zusätzlich mittels der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie untersucht. Dazu werden die Enzyme wie in 4.13.5 und 4.13.6 beschrieben aufgereinigt und der Puffer über die Dialyse zum CD-Puffer getauscht (4.13.8.2). Dabei werden 0,3 mg/mL Enzym in einem Gesamtvolumen von 30 μ L dialysiert.

Im ersten Schritt wird das CD-Spektroskop mit CD-Puffer als Referenz kalibriert. Darauf wird das dialysierte Enzym (0,3 mg/mL, 30 μ L) eingesetzt und in einem Temperaturintervall von 20°C bis 90°C in 5°C Schritten zwischen 190 nm und 250 nm vermessen.

4.14.4. Vergleich der Bromierungs- und Chlorierungsaktivität

Zur Bestimmung des favorisierten Halogenatoms werden die F-Hals sowohl mit NaBr als auch mit NaCl inkubiert. Dazu wurden drei Substrat-Umsatzversuche ähnlich zu 4.14.3.1 mit 100 mM NaCl, mit 100 mM NaCl und 10 mM NaBr und mit 100 mM NaCl und 100 mM NaBr angesetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei 25°C, 150 rpm für 48 Stunden inkubiert, mit Methanol 1:1 gestoppt und sowohl in der analytischen RP-HPLC und in der LC-ESI-MS vermessen.

4.14.5. FAD-Rekonstitution

Um zu zeigen, dass es sich bei den identifizierten putativen F-Hals um Flavin-abhängige Halogenasen handelt, erfolgt die FAD-Rekonstitution. Dazu wird der Puffer der aufgereinigten Enzyme (s. 4.13.5, 4.13.6) zum FAD-Puffer mit Hilfe der Entsalzungssäule (4.13.8.1) getauscht und bei 4°C auf einer Wippe über Nacht inkubiert. Die Enzymkonzentration beträgt dabei ~7 mg/mL in 2 mL Volumen. Darauf wird mit Hilfe von Centricons (Vivaspin20 (10000 Da)) der Puffer zum Rekonstitutionspuffer getauscht, sodass kein freies Flavin in Lösung ist und nur gebunden vorliegt. Die Enzymprobe (1 mL) wird dann im UV/VIS Spektrometer vermessen.

4.14.6. Bestimmung der Regioselektivität

Für Bestimmung der Regioselektivität müssen mit den Enzymen Substrate im mg-Maßstab umgesetzt werden, um die gewonnenen Produkte mittels NMR-Spektroskopie untersuchen und die Position der Halogenierung detektieren zu können.

Die F-Hals zeigen allerdings nur geringe Umsätze und scheinen in Lösung schnell an Aktivität zu verlieren. Aus dem Grund werden die F-Hals zusammen mit den Kofaktor-

regenerierenden Enzymen immobilisiert. Dieses geschah mit der Methodik der *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) [27].

4.14.6.1. Herstellung der *combi*CLEAs

Für die Erstellung der CLEAs wird ein Pellet aus einer 1.5 L Kultivierung der F-Hal mit der French Press aufgeschlossen (4.13.5) und dann halbiert, sodass aus einem Pellet zwei CLEA-Ansätze entstehen. Im Folgenden wird die Herstellung eines CLEA-Ansatzes für ein Substrat beschrieben.

Das mit der French Press aufgeschlossene *E. coli*-Lysat wird mit aufgereinigtem PrnF (2.5 U/mL) und aufgereinigter RR-ADH (1 U/mL) versetzt. Zur Fällung werden 8.1 g feingemörstertes Ammoniumsulfat (95% Sättigung) hinzugefügt und bei 4°C für eine Stunde im Drehrad inkubiert. Nun erfolgt die Quervernetzung der Enzyme mit 0.5% Glutaraldehyd (w/v) und wird weitere 2 Stunden bei 4°C im Drehrad inkubiert. Nach der Inkubation werden die entstandenen Aggregate für 30 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das CLEA-Pellet mit 30 mL 100 mM Na₂HPO₄-Puffer gewaschen. Dieses wird 3 Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wird das CLEA-Pellet im Reaktionspuffer gelöst (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reaktionspuffer (pH 7,4) für die Halogenierungsreaktionen der identifizierten F-Hals durch *combi*CLEAs.

Komponente	Finalkonzentration
FAD	1 µM
NAD	100 µM
NaBr	30 mM
Na ₂ HPO ₄	15 mM
2-propanol	5% (v/v)
Substrat	1.5 mM
ddH ₂ O	ad 500 mL

Bei den ausgewählten Substraten handelt es sich um Indol und dessen Derivate, welche schwerlöslich in Wasser sind. Aus dem Grund wird das Substrat bevor es in den Reaktionspuffer gegeben wird, in dem 2-propanol gelöst, das auch zum Reaktionspuffer gegeben wird.

Nachdem die CLEAs gut im Reaktionspuffer gelöst wurden, werden diese bei 25°C und 150 rpm inkubiert. Der Reaktionsverlauf wird mittels analytischer HPLC verfolgt. Ist zwischen 8 und 11 Tagen keine Erhöhung des Umsatzes zu sehen, werden die Reaktionen gestoppt. Dazu werden die CLEAs von der Lösung abgefiltert und die Lösung mit dem Rohprodukt gehalten. Die CLEAs können nun für eine neue Reaktion eingesetzt oder verworfen werden.

4.14.6.2. Aufarbeitung der CLEA-Produkte

Die von den CLEAs abgefilterte Reaktionslösung wird dreimal mit dest. Dichlormethan (je 250 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum (~300 mbar) entfernt. Das erhaltene Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt und das Produkt lyophilisiert. Dieses wird mit Hilfe von LC-ESI-MS und der 1D- und 2D-Spektroskopie analysiert.

Die mit combiCLEAs untersuchten Verbindungen und die korrespondierenden Enzymprodukte sind im Folgenden aufgelistet:

A) Umsatz von Indol zu 3-Bromindol

Ausbeuten: BrvH 24.6% (0.18 mmol, 35.9 mg), Pia-2: 35.6% (0.267 mmol, 52.05 mg), HotH: 16.8% (0.126 mmol, 24.6 mg)

HRMS: m/z berechnet für C_8H_6BrN 194.9589; beobachtet: 194.9862

BrvH 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.46 (s, NH), 7.54 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.42 (dd, $J = 8.2, 0.9$ Hz, C^7H), 7.40 (dd, $J = 7.9, 1.0$ Hz, C^4H), 7.18 (ddd, $J = 8.3, 6.9, 1.3$ Hz, C^6H), 7.11 (ddd, $J = 7.9, 6.9, 1.0$ Hz, C^5H).

BrvH ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 135.3, 126.1, 124.8, 122.2, 119.8, 117.9, 112.1, 88.7

Pia-2 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.47 (s, NH), 7.54 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.44 (dd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, C^7H), 7.41 (dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, C^4H), 7.18 (ddd, $J = 8.2, 7.0, 1.3$ Hz, C^6H), 7.11 (ddd, $J = 7.9, 7.0, 1.0$ Hz, C^5H).

Pia-2 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 135.4, 126.1, 124.8, 122.2, 119.9, 117.9, 112.1, 88.7

HotH 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.47 (s, NH), 7.54 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.43 (dd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, C^7H), 7.41 (dd, $J = 7.9, 1.0$ Hz, C^4H), 7.18 (ddd, $J = 8.2, 6.9, 1.2$ Hz, C^6H), 7.11 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.1$ Hz, C^5H).

HotH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 135.4, 126.1, 124.8, 122.2, 119.9, 117.9, 112.1, 88.7.

B) Umsatz von 2-Methylindol zu 3-Brom-2-methylindol

Ausbeuten: BrvH: 9.2% (0.069 mmol, 14.5 mg); Pia-2: 18.9% (0.142 mmol, 29.6 mg); B38: 19.1% (0.143 mmol, 29.9 mg); HotH: 24.3% (0.1818 mmol, 38 mg)

HRMS: m/z berechnet für C_9H_7BrN 207.9767; beobachtet: 207.9757

BrvH ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 (s, NH), 7.32 (d br., *J* = 8.0 Hz, C⁴H), 7.30 (d br., *J* = 7.7 Hz, C⁷H), 7.09 (ddd, *J* = 7.3, 7.3, 1.4 C⁵H), 7.06 (ddd, *J* = 7.8, 7.8, 0.9 C⁶H), 2.37 (s, CH₃).

BrvH ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 134.8, 133.2, 126.9, 121.4, 119.6, 117.1, 111.2, 87.7, 11.9.

Pia-2 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 (s, NH), 7.32 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, C⁴H), 7.30 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, C⁷H), 7.10 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.4 Hz, C⁵H), 7.05 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.2 Hz, C⁶H), 2.37 (s, CH₃).

Pia-2 ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 134.8, 133.2, 126.9, 121.4, 119.6, 117.1, 111.2, 87.74, 11.9.

B38 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 (s, NH), 7.32 (dd, *J* = 8.1, 0.9 Hz, C⁴H), 7.30 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, C⁷H), 7.10 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.4 Hz, C⁵H), 7.05 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.2 Hz, C⁶H), 2.37 (s, CH₃).

B38 ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 134.8, 133.2, 126.9, 121.4, 119.6, 117.1, 111.2, 87.7, 11.9.

HotH ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 (s, NH), 7.33 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, C⁴H), 7.30 (d br., *J* = 7.8 Hz, C⁷H), 7.10 (ddd, C⁵H), 7.06 (ddd, C⁶H), 2.38 (s, CH₃).

HotH ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 134.8, 133.2, 126.87, 121.4, 119.6, 117.2, 111.2, 87.8, 11.9.

C) Umsatz von 3-Methylindol zu 2-Brom-3-methylindol

Ausbeuten: BrvH 0.7% (5.5 μmol, 1.1 mg); Pia-2 1.5% (0.0115 mmol, 2.4 mg), B38: 2.4% (0.0177 mmol, 3.7 mg), HotH: 10.9% (0.0813 mmol, 17 mg)

BrvH ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.53 (s, NH), 7.45 (dd, *J* = 7.8 Hz, C⁴H), 7.26 (dd, *J* = 8.1, 0.9 Hz, C⁷H), 7.08 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.2 Hz, C⁶H), 7.00 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, C⁵H), 2.18 (s, CH₃).

Pia-2 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.53 (s, NH), 7.45 (d br., *J* = 7.9 Hz, C⁴H), 7.26 (d br., *J* = 7.1 Hz, C⁷H), 7.08 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, C⁶H), 7.00 (ddd, *J* = 7.5, 7.1, 1.2 Hz, C⁵H), 2.18 (s, CH₃).

Pia-2 ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 136.0, 127.7, 121.5, 119.0, 117.8, 110.6, 109.0, 108.3, 9.2.

B38 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.53 (s, NH), 7.45 (d br., *J* = 7.8 Hz, C⁴H), 7.26 (dd, *J* = 8.1, 0.9 Hz, C⁷H), 7.08 (ddd, *J* = 8.2, 7.1, 1.2 Hz, C⁶H), 7.00 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.1 Hz, C⁵H), 2.18 (s, CH₃).

B38 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 179.7, 142.3, 131.3, 127.6, 123.7, 121.3, 109.1, 40.2, 15.1.

HotH ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.54 (s, NH), 7.45 (d br., $J = 7.9$ Hz, C^4H), 7.27 (d br., $J = 8.1$ Hz, C^7H), 7.08 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.2$ Hz, C^6H), 7.01 (ddd, $J = 7.6, 7.0, 0.6$ Hz, C^5H), 2.18 (s, CH_3).

HotH ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 136.0, 127.7, 121.5, 119.0, 117.8, 110.6, 109.0, 108.3, 9.2.

D) Umsatz von 5-Methylindol zu 3-Brom-5-methylindol

Ausbeuten: BrvH: 11.8% (0.089 mmol, 18.5 mg); Pia-2: 26.2% (0.196 mmol, 41 mg); HotH: 35.1% (0.263 mmol, 55mg)

BrvH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 (s, NH), 7.47 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, C^7H), 7.18 (dd, $J = 1.8, 0.9$ Hz, C^4H), 7.00 (dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, C^6H), 2.40 (s, CH_3).

BrvH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 134.2, 129.06, 126.7, 125.1, 124.3, 117.8, 112.3, 88.6, 21.6.

Pia-2 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 (s, NH), 7.47 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, C^7H), 7.18 (d, $J = 0.9$ Hz, C^4H), 6.99 (dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, C^6H), 2.39 (s, CH_3).

Pia-2 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 133.7, 128.6, 126.3, 124.7, 123.9, 117.4, 111.8, 88.1, 21.1.

HotH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.33 (s, NH), 7.47 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, C^7H), 7.19 (d, $J = 1.9, 0.9$ Hz, C^4H), 7.01 – 6.99 (m, C^6H), 2.40 (s, CH_3).

HotH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 133.7, 128.6, 126.3, 124.7, 123.9, 117.4, 111.8, 88.2, 21.1.

E) Umsatz von 5-Nitroindol zu 3-Brom-5-nitroindol

Ausbeuten: BrvH: 4.5% (0.034 mmol, 8,2 mg), Pia-2: 12.8% (0.0954 mmol, 22.9 mg), B38: 9.8% (0.0733 mmol, 17.6 mg); HotH: 18.4% (0.38 mmol, 33 mg)

HRMS: m/z berechnet $\text{C}_8\text{H}_4\text{BrN}_2\text{O}_2^-$ 238.462; beobachtet: 238.9448

BrvH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.21 (s, NH), 8.31 (d, $J = 2.3$ Hz, C^4H), 8.07 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, C^6H), 7.87 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.63 (d, $J = 9.0$ Hz, C^7H).

BrvH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 141.4, 138.6, 129.1, 125.6, 117.5, 114.9, 113.0, 91.0.

Pia-2 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.21 (s, NH), 8.31 (d, $J = 2.2$ Hz, C^4H), 8.07 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, C^6H), 7.87 (s, C^2H), 7.63 (d, $J = 9.0$ Hz, C^7H).

Pia-2 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 141.4, 138.6, 129.1, 125.6, 117.5, 114.9, 113.0, 91.0.

B38 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.20 (s, NH), 8.30 (d, $J = 2.2$ Hz, C^4H), 8.06 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, C^6H), 7.86 (d, $J = 1.8$ Hz, C^2H), 7.62 (d, $J = 9.0$ Hz, C^7H).

B38 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 141.4, 138.6, 129.1, 125.7, 117.5, 115.0, 113.00, 91.1, 40.0, 39.9, 39.7, 39.5, 39.4, 39.2, 39.0.

HotH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12,20 (s, NH), 8,29 (d, $J = 2,2$ Hz, C^4H), 8,05 (dd, $J = 9,0, 2,3$ Hz, C^6H), 7,85 (s, C^2H), 7,62 (d, $J = 9,0$ Hz, C^7H).

HotH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 141.4, 138.6, 129.0, 125.6, 117.5, 114.9, 113.0, 91.1.

F) Umsatz von 5-Cyanindol zu 3-Brom-5-cyanindol

Ausbeuten: BrvH: 31.6% (0.237 mmol, 52.3 mg); Pia-2: 37.8% (0.282 mmol, 62 mg)

HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_9\text{H}_4\text{BrN}_2^-$ 218.9563; beobachtet: 218.9551

BrvH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.05 (s, NH), 7.91 (d, $J = 1.6$ Hz, C^4H), 7.79 (s, C^2H), 7.61 (d, $J = 8.5$ Hz, C^7H), 7.52 (dd, $J = 8.5, 1.6$ Hz, C^6H).

BrvH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 137.2, 127.8, 126.1, 124.9, 123.7, 120.1, 113.5, 102.2, 89.5.

Pia-2 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.04 (s, NH), 7.91 (d, $J = 1.6$ Hz, C^4H), 7.79 (s, C^2H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, C^7H), 7.53 (dd, $J = 8.5, 1.6$ Hz, C^6H).

Pia-2 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 137.2, 127.8, 126.1, 124.9, 123.7, 120.1, 113.6, 102.2, 89.5.

G) Umsatz von 5-Bromindol zu 3-Brom-5-bromindol

Ausbeuten: BrvH: 17.2% (0.129 mmol, 35.4 mg), Pia-2: 8.8% (0.066 mmol, 18 mg), B38: 2.9% (0.0216 mmol, 5.9 mg); HotH: 13.2% (0.099 mmol, 27 mg)

HRMS: m/z berechnet für $\text{C}_8\text{H}_4\text{Br}_2\text{N}^-$ 271.8716; beobachtet: 271.8711

BrvH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.69 (s, NH), 7.63 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.53 (d, $J = 1.9$ Hz, C^4H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, C^7H), 7.29 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, C^6H).

BrvH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 134.1, 127.9, 126.7, 124.8, 120.1, 114.3, 112.4, 87.9.

Pia-2 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.69 (s, NH), 7.62 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.53 (d, $J = 1.9$ Hz, C^4H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, C^7H), 7.29 (dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, C^6H).

Pia-2 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 134.2, 127.9, 126.6, 124.9, 120.1, 114.3, 112.5, 87.9.

B38 ^1H NMR ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.69 (s, NH), 7.62 (d, $J = 2.6$ Hz, C^2H), 7.53 (d, $J = 1.9$ Hz, C^4H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, C^7H), 7.29 (dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, C^6H).

B38 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 134.2, 127.9, 126.6, 124.9, 120.1, 114.3, 112.5, 87.9.

HotH ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.69 (s, NH), 7.62 (d, $J = 2.6$ Hz, C ^2H), 7.54 (d, $J = 1.9$ Hz, C ^4H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, C ^7H), 7.29 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, C ^6H).

HotH ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 134.2, 127.9, 126.6, 124.8, 120.1, 114.3, 112.5, 87.9.

H) Umsatz von 5-Fluorindol zu 3-Brom-5-fluorindol

Ausbeuten: BrvH: 7% (0.052 mmol, 11.2 mg), B38: 6.7% (0.0535 mmol, 11.4 mg)

HRMS: m/z berechnet für C $_8\text{H}_4\text{BrFN}^-$ 211.9517; beobachtet: 211.9518

BrvH ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.59 (s, NH), 7.63 (d, $J = 2,7$ Hz, C ^2H), 7.44 (dd, $J = 8.8, 4.5$ Hz, C ^4H), 7.12 (dd, $J = 9.4, 2.5$ Hz, C ^7H), 7.03 (ddd, $J = 9.2, 9.2, 2.5$ Hz, C ^6H).

BrvH ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 132.1, 126.9, 113.5 (d, $J = 9.7$ Hz), 110.8, 110.6, 102.7, 102.5.

B38 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.58 (s, NH), 7.63 (d, $J = 2.7$ Hz, C ^2H), 7.44 (dd, $J = 8.8, 4.4$ Hz, C ^4H), 7.12 (dd, $J = 9.4, 2.5$ Hz, C ^7H), 7.03 (ddd, $J = 9.2, 9.2, 2.6$ Hz, C ^6H).

B38 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 132.1, 126.9, 126.4 (d, $J = 10.8$ Hz), 113.5 (d, $J = 9.7$ Hz), 110.8, 110.6, 102.7, 102.5, 88.4 (d, $J = 4.6$ Hz).

I) Umsatz von Tryptophol zu 5-Bromtryptophol

Ausbeute: B38: 9,3% (0.07 mmol, 16.8 mg)

HRMS: m/z berechnet für C $_{10}\text{H}_9\text{BrNO}^-$ 237.9873, bestimmt:237.9868

B38 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.06 (s, NH), 7.68 (d, $J = 2.0$ Hz, C ^2H), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, C ^7H), 7.19 (d, $J = 2.4$ Hz, C ^4H), 7.15 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, C ^6H), 3.62 (t, $J = 7.1$ Hz, C $^9\text{H}_2$), 2.80 (td, $J = 7.2, 0.8$ Hz, C $^{10}\text{H}_2$).

B38 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 134.8, 129.4, 124.6, 123.2, 120.8, 113.3, 111.7, 110.8, 61.7, 28.6.

J) Umsatz von Indol-3-propionsäure zu 5-Bromindol-3-propionsäure

Ausbeute: B38: 7.9% (0.059 mmol, 15.9 mg)

HRMS: m/z berechnet für C $_{11}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2^-$ 266.9895; beobachtet: 267.0124

B38 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.01 (s, NH), 7.70 (d, $J = 1,9$ Hz, C ^4H), 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, C ^7H), 7.18 (d, $J = 2.3$ Hz, C ^2H), 7.16 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, C ^6H), 2.90 (ddd, $J = 7.5$ Hz, C $^9\text{H}_2$), 2.56 (t, $J = 7.5$ Hz, C $^{10}\text{H}_2$).

B38 ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 174.1, 134.9, 128.8, 124.1, 123.4, 120.6, 113.4, 113.4, 110.9, 34.60, 20.03.

K) Umsatz von Indol-3-propionsäure zu einem bromierten Indol-3-propionsäure-Mix

Ausbeute HotH: 7.5% (0.0562 mmol, 15 mg)

LC-ESI-MS: m/z berechnet für $C_{11}H_{10}BrNO_2$ 265.99, 267.99; beobachtet [M-H]⁻ 265.99, 267.99

HotH ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.03 (s, NH), 10.94 (s, NH), 7.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 6.93 (ddd, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.91 (q, $J = 7.9$ Hz, 4H), 2.61 – 2.53 (m, 4H).

HotH ¹³C NMR (126 MHz; DMSO- d_6) δ 174.2, 137.1, 134.5, 128.8, 126.0, 123.7, 123.6, 123.4, 121.1, 120.1, 119.8, 117.9, 115.0, 113.9, 113.9, 113.8, 104.2, 34.5, 34.5, 20.3, 20.1.

L) Umsatz von 7-Azaindol zu 3-Brom-7-azaindol

Ausbeuten: Pia-2: 7.4% (0.056 mmol, 11 mg)

Pia-2 ¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.09 (s, NH), 8.30 (dd, $J = 4.6, 1.5$ Hz, C⁶H), 7.85 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, C⁴H), 7.72 (d, $J = 1.9$ Hz, C²H), 7.18 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, C⁵H).

Pia-2 ¹³C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 147.0, 143.7, 126.6, 125.7, 118.8, 116.4, 87.2.

4.15. Analytik

4.15.1. Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) wird sowohl im analytischen Rahmen verwendet, um den Umsatz der Halogenierungsreaktionen zu verfolgen als auch im präparativen Ansatz, um Verbindungen voneinander zu trennen. Dieses wird durch ein Zwei-Phasen-System aus stationärer Phase und mobiler Phase vermittelt. Dabei verweilen unpolare Verbindungen länger in der stationären Phase, da diese aus unpolarem Säulenmaterial besteht (C18-Säule) und diese über Van-der-Waals-Bindungen interagieren. Die mobile Phase verläuft als Gradient aus Wasser und Acetonitril, wodurch die interagierenden Verbindungen je nach Löslichkeit unterschiedlich schnell und somit zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren. In diesem Fall weisen die Edukte eine frühere Retentionszeit auf als die bromierten Produkte, da diese polarer sind.

4.15.1.1. Analytische RP-HPLC

Für die analytische RP-HPLC werden die zu analysierenden Proben mit 1:1 Methanol gestoppt, was die enthaltenden Proteine denaturiert. Das Präzipitat wird bei 13400 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand gehalten. In frühen Arbeiten dieser

Doktorarbeit wird nun die Probe in der analytischen RP-HPLC vermessen. Diese Proben weisen allerdings hohe Injektionspeaks auf, die die Vermessung von geringen Produktkonzentrationen einschränken. Aus diesem Grund werden die Proben weiter mit einer C18-Silika aufgereinigt.

Zur weiteren Aufarbeitung wird eine 1 mL Einwegspritze mit 0.5 cm Wolle und 1 cm C18-Silika Kieselgel (0.035-0.07 mm) befüllt. Diese wird mit 1 mL ddH_2O vorgewaschen und anschließend 200 μ l der abgestoppten Probe aufgetragen, die zweimal mit 1 mL ddH_2O gewaschen wird. Darauf folgt die Elution mit 100 μ l Acetonitril. Zur Wiederverwendung der Säule wird diese zweimal mit 1 mL Acetonitril und darauf zweimal mit 1 mL ddH_2O gewaschen. Die eluierte Probe wird in der RP-HPLC vermessen.

Da es während der Anfertigung der Doktorarbeit zu einigen RP-HPLC wechseln kam, werden im Folgenden die unterschiedlichen Methoden verschiedener RP-HPLCs aufgelistet. Aus diesem Grund differieren in dem Ergebnisteil die Retentionszeiten von Produkten je nach genutzter Methodik. In allen Methoden wird die Absorption bei den Wellenlängen 220 nm, 254 nm und 280 nm aufgenommen. Die genauere Betrachtung und Ermittlung der prozentualen Produktumsätze über die Integrale der Peaks erfolgt bei 280 nm.

Method A: Es wird die RP-HPLC Accela 600 von Thermo Fisher Scientific mit der Säule Hypersil GOLD 3 μ m von Thermo Fisher Scientific (150 \times 2.1 mm) verwendet. Die Flussrate beträgt 700 μ L/min mit einem linearen Gradienten von Eluent A ($H_2O/CH_3CN/TFA = 95:5:0.1$) zu Eluent B ($H_2O/CH_3CN/TFA = 5:95:0.1$) über 5 min zu 100% Eluent B. Darauf verbleibt die Methode 1 min bei 100% Eluent B und wird dann für eine halbe Minute zu Eluent A geändert.

Method B: In dieser Methode wird die RP-HPLC Accela 600 von Thermo Fisher Scientific mit der Säule NUCLEOSHELL1 RP C18 (18.5 μ m) von Macherey-Nagel (150 \times 2.1 mm) genutzt. 100% Eluent A ($H_2O/CH_3CN/TFA = 95:5:0.1$) verläuft zu 100% Eluent B ($H_2O/CH_3CN/TFA = 5:95:0.1$) mit einer Flussrate von 900 μ L/min in einem linearen Gradient innerhalb von 5 min, dann verbleibt diese für 1 min bei 100% Eluent B und wird dann über eine halbe Minute zu 100% Eluent A gewechselt, das für 2 weitere Minuten bei Eluent A verbleibt.

Method C: Hier wird die RP-HPLC Shimadzu Nexera XR mit der C18-Säule Luna1 (3 μ m, 100 \AA) von Phenomenex (100 \times 2 mm) verwendet. Diese wird mit einer Flussrate von 500 μ L/min isokratisch mit 35% Eluent B ($H_2O/CH_3CN/TFA = 5:95:0.1$) in Eluent A ($H_2O/CH_3CN/TFA = 95:5:0.1$) über 5 min durchlaufen.

Method D: Hier wird die RP-HPLC Shimadzu Nexera XR mit der C18-Säule verwendet. Diese wird mit einer Flussrate von 650 $\mu\text{L}/\text{min}$ isokratisch mit 35% Eluent B ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA} = 5:95:0.1$) in Eluent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA} = 95:5:0.1$) über 7 min durchlaufen.

Method E: In dieser Methode wird die RP-HPLC Shimadzu Nexera XR mit der C18-Säule Luna1 (3 μm , 100 \AA) von Phenomenex (100 \times 2 mm) verwendet. Das Programm startet mit 95% Eluent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1$) und 5% Eluent B ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA} = 100:0.1$) und verläuft in einem linearen Gradienten (650 $\mu\text{L}/\text{min}$) zu 95% Eluent B und 5% Eluent A, dieses Verhältnis wird für eine halbe Minute gehalten und wird nun wieder auf 95% Eluent A und 5% Eluent B verändert und 3 min gehalten. Dabei werden Quasimolekülonen in positiver ($[\text{M}+\text{H}]^+$) oder auch negativer Spannung ($[\text{M}-\text{H}]^-$) detektiert.

4.15.1.2. RP-HPLC mit Massenspektrometrikopplung (LC-ESI-MS)

Die Messung der LC-ESI-MS dient sowohl der Auftrennung der Verbindungen *via* RP-HPLC als auch der Identifizierung der Masse der vorhandenen Verbindungen. Die massenspektroskopische Analyse erfolgte mittels Elektrosprayionisation (ESI)-MS, in der Verbindungen in einem elektrischen Feld ionisiert und nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) aufgetrennt werden.

Die aufgereinigte Proben werden mit der Agilent Technologies 1200 mit der C18-Säule Hypersil Gold C18 (3 μM , 150 \times 2,1 mm) von Thermo Fisher Scientific und dem Massenspektrometer Agilent Technologies 6220 Accurate Mass TOF/ LC-MS (Gastemperatur: 325°C, Kapillarspannung: 2500 V, Fragmentorspannung: 175 V) mit Dual-ESI Quelle (Sprühspannung 2,5 kV) vermessen. Die Methode zur Vermessung verläuft mit einer Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ zunächst bei 100% Eluent A ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{Ameisensäure} = 95:5:0.1$) und steigt mit einem kontinuierlichen Gradienten bis zur 10. min auf 2% Eluent A und 98% Eluent B ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{Ameisensäure} = 5:95:0.1$) und stagniert in dem Verhältnis für 1 min. Darauf verändert sich das Eluentenverhältniss innerhalb einer halben Minute auf 100% Eluent A und wird für 3,5 min gehalten. Stickstoff dient sowohl als Zerstäubergas als auch als Trockengas und wird vom Stickstoffgenerator NGM 11 erzeugt. Viele Indol-Derivate werden im Negativmodus vermessen, aber auch im Positivmodus.

Zur Feinmasse (HRMS)-Analyse wird die oben angeführte LC-ESI-MS verwendet, dessen Massenachse zunächst extern mit ESI-L-Tuning Mix (Agilent Technologies, USA) als Kalibrierstandard kalibriert wird. Die Massenspektren werden mit der MassHunter Workstation Akquisition B.04.00 (Agilent Technologies, USA) sowohl im Profil- als auch im Zentroidmodus aufgenommen und für die Verarbeitung sowie die

Mittelwertbildung der Einzelspektren wird die MassHunter Qualitative Analyse B.07.00-Software (Agilent Technologies, USA) verwendet.

4.15.1.3. Präparative RP-HPLC

Die präparative RP-HPLC wird zur Trennung der Produkte von den Edukten oder anderen Nebenprodukten verwendet. Hierzu wird die LaChrom HPLC von Merck-Hitachi mit der C18-Säule Hypersil Gold C18 (8 μ M, 250 x 21.2 mm) von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die verwendete Methode läuft die ersten 5 min mit einer Flussrate von 10 mL/min bei 100% Eluent A (H₂O/TFA = 100:0.1) und steigt im linearen Gradienten über 45 min zu 100% Eluent B (CH₃CN/TFA = 100:0.1), wird für 5 min gehalten und wechselt für die nächsten 5 min zu 100% Eluent A.

4.15.2. Analytische Gaschromatographie mit Massenspektrometrikopplung (GC-MS)

Um die Proben in der gaschromatographisch zu untersuchen, werden die Proben zunächst für einen Tag im -20°C Kühlfach eingefroren, um die enthaltenen Enzyme zu denaturieren. Im Folgenden werden die Proben 3-mal mit Ethylacetat (v/v 1:1) extrahiert und die organische Phase in einem neuen Gefäß gesammelt. Die vereinigten organischen Phasen werden bei 50°C abgedampft und für die Vermessung in 100 μ l Ethylacetat resuspendiert. Für die GC-MS Analyse wird die Trace GC Ultra Gaschromatographie von ThermoScientific mit VF-5 Säule (30 m x 0.25 mm, 5% Diphenylsiloxan, 95% Dimethylsiloxan) verwendet. Als mobile Phase dient Helium mit einem Temperaturgradienten von 5°C pro min zwischen 80°C und 325°C. Das Massenspektrometer ITQ900 von ThermoFinnigan misst 20 Messungen pro min (50-750 *m/z*).

4.15.3. ESI-Masse-Spektrometrie

Nano ESI-Masse Spektrometrie wird mit dem Esquire 3000 Ion trap mass Spektrometer der Bruker Daltonik GmbH aufgezeichnet. Die Proben werden mit hauseigenen Glasemittern in das statische Nano-ESI injiziert. Stickstoff dient sowohl als Zerstäubergas als auch als Trockengas durch einen Bruker—Stickstoffgenerator NGM 11. Helium dient als Kühlgas für die Ionenfalle und als Kollisionsgas für MS-Experimente. Messungen fanden sowohl im Positiv- als auch Negativmodus statt, wobei die Ionisierung der Indole im Negativmodus häufig besser war.

4.15.4. Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) dient der Strukturaufklärung von Verbindungen und wird in dieser Arbeit zur Bestimmung der halogenierten Position in den Verbindungen genutzt. Dazu werden sowohl 1D- (¹H-NMR, ¹³C-NMR) als auch 2D (¹H-

^1H -COESY, ^1H - ^1H -ROESY, HMQC) Vermessungen in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO- d_6) bei 25°C mit dem DRX-500 und AV500, Bruker (Resonanzfrequenzen: ^1H : 500 MHz, ^{13}C : 126 Hz) durchgeführt. Die Daten-Auswertung erfolgte mit der TopSpinSoftware, Version 2.1 und MestreNova, Version 12.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Metagenom-Analysen zur Identifizierung neuer Flavin-abhängiger Halogenasen

Die Identifizierung neuer F-Hals fand in metagenomischen Datensätzen statt, da diese eine Vielzahl von Genen sowohl von kultivierbaren als auch nicht-kultivierbaren Organismen abbilden [140]. Die untersuchten Metagenome wurden von der Webseite „i.microbe.us“ oder „gold.jgi.doe.gov“ erhalten und mit einem pHMM auf F-Hals untersucht. Das pHMM wurde eigens in Zusammenarbeit mit Dr. Daniel Wibberg und Prof. Dr. Jörn Kalinowski generiert. Dieses erfolgte in einer Zwei-Schritte-Methode und stellt eine modifizierte Methodik zu Ausec *et al.* [130] dar (Abbildung 26).

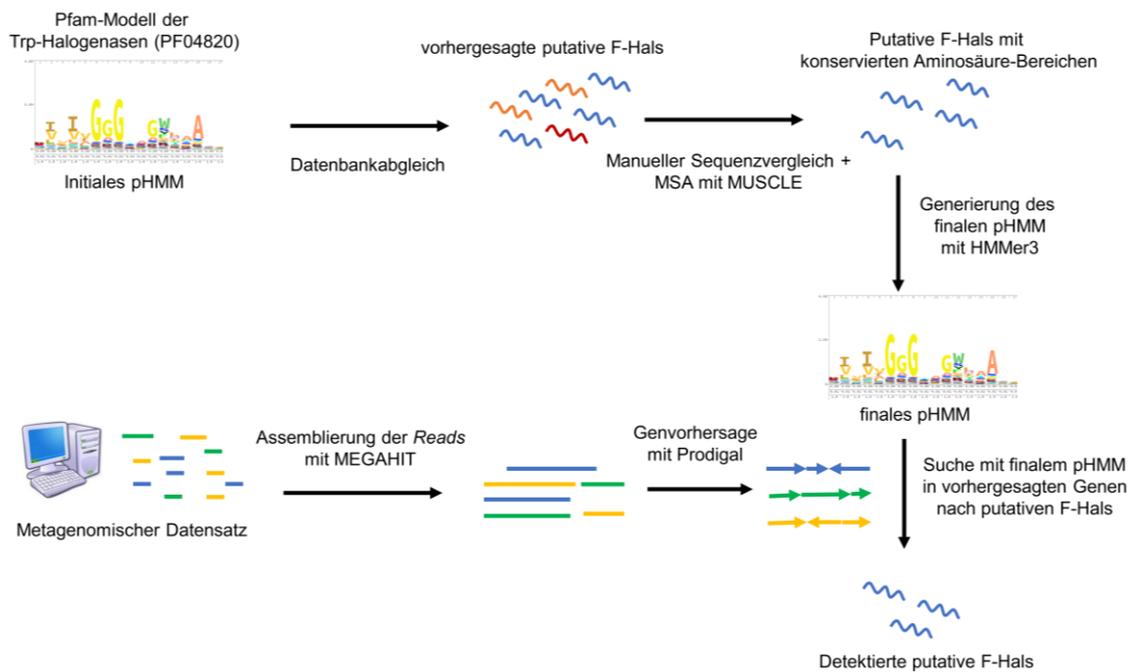


Abbildung 26: Schematische Darstellung der durchgeführten bioinformatischen Identifizierung von F-Hals in metagenomischen Datensätzen durch das in einer Zwei-Schritte Methode generierte pHMM.

Um ein verlässliches Modell für die Suche nach Flavin-abhängigen Halogenasen zu erstellen, wurde als Grundlage das PFAM-Modell PF04820 für Tryptophan-Halogenasen ausgewählt und durch einen Datenbankabgleich mit der NCBI Datenbank verbessert. Verwandte Sequenzen, mit einer Sequenzidentität über 50% und einer Sequenzabdeckung von über 90%, wurden manuell auf typische konservierte Domänen für F-Hals überprüft und für ein multiples Sequenzalignment mittels MUSCLE [149] ausgewählt. Dieses Sequenzalignment bildete die Grundlage für das finale HMM, das mit Hilfe des HMMer3-Software Pakets [139] erstellt wurde. Mit diesem finalen pHMM wurden 17 metagenomische Datensätze mit Hilfe von MEGAHIT [128] analysiert. Im

letzten Schritt wurden Genvorhersagen mit Hilfe von Prodigal [129] durchgeführt und die detektierten Enzyme mit dem finalen pHMM durch das HMMer3-Software Paket verglichen. Nur die detektierten Gene, die mindestens eine Wahrscheinlichkeit (E-Wert) von $<1 \times 10^{-150}$ aufwiesen, wurden für die weitere Analyse berücksichtigt. Die nun detektierten putativen F-Hal-Aminosäure-Sequenzen (Treffer) wurden auf deren Vollständigkeit in Bezug auf die konservierten Bereiche und deren Länge manuell untersucht. RebH zum Beispiel umfasst 530 Aminosäuren (AS) [46]. Somit wurden Treffer kleiner als 400 AS und größer als 700 AS ausgefiltert. In Tabelle 8 sind die durchsuchten Metagenom-Daten mit den erzielten Treffern aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der analysierten metagenomischen Datensätze mit zusätzlichen Informationen.

	Bezeichnung	Metagenome	Project ID Gold ID	Fundort	Habitat	File- Größe	Temp. [°C]	Alle Treffer	Vollständige Treffer
1	Kaneohe Bay	Kaneohe Bay	CAM_SMPL_000824 (www.imicrobe.us)	Kaneohe, Hawaii	Marines Sediment, 1m Tiefe	40 Mb	25°C	1	-
2	Botany Bay	Botany Bay	CAM_SMPL_001699 (www.imicrobe.us)	Sydney, Australia	Marines Sediment, 7m Tiefe	91 Mb	25°C	42	42
3	Tiefsee Bohrloch	Enigmatic life underneath	Gp0057578 (gold.jgi.doe.gov)	Juan de Fuca Ridge flank, Pazifischer Ozean	Tiefsee ozeanische Basalt-Basalt hydrothermale Flüssigkeit, Korkbohrloch	20 Gb	k.A.	1	1
4	Yellowstone Geysir	Perpetual spouter A (PS_A)MetaG	Gp0093345 (gold.jgi.doe.gov)	Yellowstone Nationalpark, Wyoming, USA	Perpetual spouter, thermische Quelle, Geysir	16 Gb	k.A.	0	-
5	Mammoth heiße Quelle	Mammoth Hot Spring	Gp0054656 (gold.jgi.doe.gov)	Mammoth Hot Spring (Liberty Cap Streamers), Yellowstone National Park, Wyoming, USA	Heiße Quelle	6 Gb	k.A.	0	
6	Tshipise heiße Quelle	Tshipise hot spring metaG	Gp0138775 (gold.jgi.doe.gov)	Tshipise, Limpopo, South Africa	Heiße Quelle	17 Gb	42- 90°C	0	
7	Sagole heiße Quelle	Sagole Hot spring metaG	Gp0138776 (gold.jgi.doe.gov)	Sagole Baobab, Limpopo, South Africa	Heiße Quelle	14 Gb	45°C	42	15
8	Monterey Bay	AOA Metagenome C0912_C49A8_80	Gp0056852 (gold.jgi.doe.gov)	Monterey Bay, California, USA	Marines Metagenom, Ammonium- oxidierende marine mikrobielle Communities	5 Gb	k.A.	0	
9	Panama Kanal	Two Panamanian Oscillatoria strains	Gp0054795 (gold.jgi.doe.gov)	Panama Kanal, Panama	Marine Cyanobakterien- Communities	28 Gb	k.A.	18	0
10	Atlantischer Ozean	An uncultivated bacterial phylum	Gp0112845 (gold.jgi.doe.gov)	Küste des atlantischen Ozeans	marines Sediment	26 Gb	k.A.	150	16

	Bezeichnung	Metagenome	Project ID Gold ID	Fundort	Habitat	File- Größe	Temp. [°C]	Alle Treffer	Vollständige Treffer
11	Hydro-Schwamm	Hydro Schwamm	AZHW00000000 und AZHX00000000 (CeBiTec Bielefeld) [152]	Hachijo Jima, Japan	k.A., Schwamm	10 Gb	k.A.	11	11
12	Algen+ Symbionten	<i>Botryococcus braunii</i> Race A+B und Symbionten	PRJEB21978 (CeBiTec Bielefeld)	<i>Botryococcus braunii</i> Race A: Serra de Estrela, Portugal+ <i>Botryococcus braunii</i> Race B: Paquemar, Martinique, Frankreich	Frischwasser	12.75 Gb	25- 30°C	25	25
13	Blue Lagoon	Blue Lagoon, Island	MF_SL1157 (i.microbe.us)	Blue Lagoon, Island	Salzwasser, marines Habitat 2 m Tiefe		k.A.	0	0
14	Guaymas Basin	Guaymas Basin deep-sea Metagenome	CAM_S_467 (i.microbe.us)	Guaymas Basin Tiefsee	Salzwasser, marines Habitat 1900m Tiefe		2,58°C		
15	Line Islands	Marine Metagenome from Line Islands	LINEISLAND_SMPL_X MASLIVIR080505 (i.microbe.us)	Northern Line Island	Salzwasser Marines Habitat		k.A.	0	0
16	Heiße Bison Quelle	Metagenome from Yellowstone Bison Hot Spring	BISONMETAGENOME _SMPL_BISONPOOL_ 1 (i.microbe.us)	Bison Hot Spring Pool 1, Yellowstone Park, USA	Frischwasser		80°C	0	0
17	North Perry Reef	Symbiotic prokaryotic communities in sponges	XmTAM.5 (i.microbe.us)	North Perry Reef, Bahamas, Karibik	Salzwasser, marines Habitat 15m Tiefe		31°C	6	0

Insgesamt wurden 296 Treffer in den 17 Metagenomen mit dem finalen pHMM detektiert, von denen 113 als vollständige, putative F-Hal Sequenzen eingestuft wurden. Als vollständig gelten F-Hals, die die konservierten Bereiche (GxGGG, das konservierte Lysin, WxWxIP) und eine Größe zwischen 400 und 700 Aminosäuren aufweisen. Diese 113 putativen Enzyme wurden im Folgenden in einem phylogenetischen Baum auf Aminosäure-Basis verglichen und zu den bereits bekannten F-Hals zugeordnet (Abbildung 27).

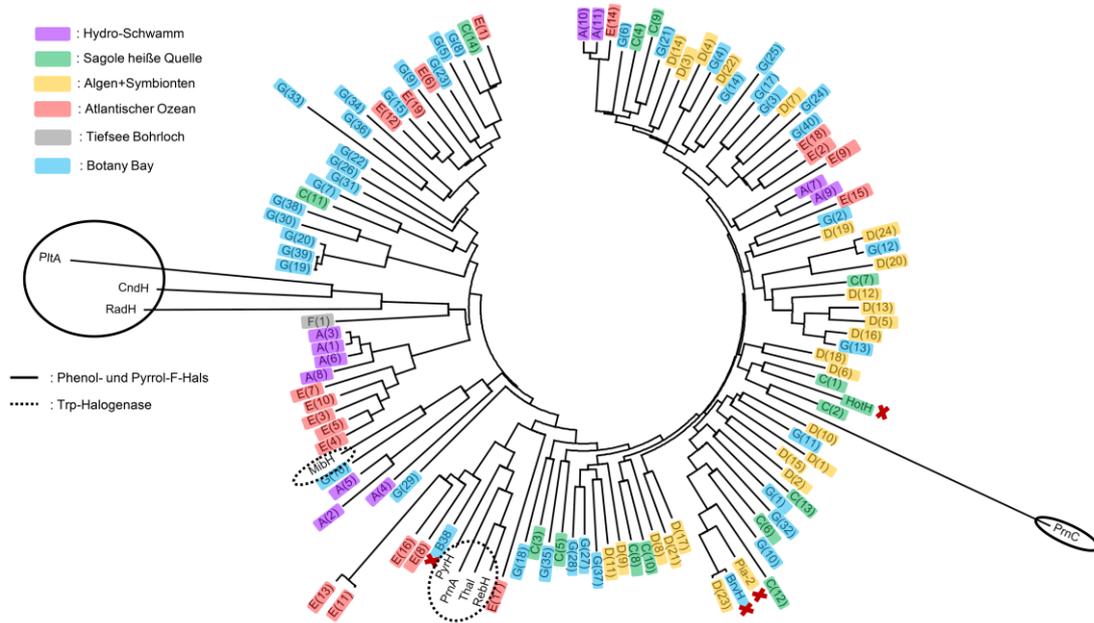


Abbildung 27: Phylogenetischer Baum der mit dem pHMM identifizierten, vollständigen Treffer und bekannten Trp- Halogenasen (PrnA, RebH, Thal, PyrH, MibH), Pyrrol-F-Hals (PrnC, PltA), Phenol-F-Hals (CndH) und einer pilzlichen Phenol-F-Hal (RadH). Dieser wurde mit Hilfe der *Neighbor-Joining*-Methode (NJ) und einem Bootstrap von 1000 generiert [150, 151]. Die evolutionäre Analyse basierte auf 122 Aminosäure-Sequenzen und wurde mit dem Programm MEGA7 konstruiert [145]. Die vier Aminosäure-Sequenzen mit einem roten X wurden für *in-vitro*-Experimente ausgewählt.

Zur Einordnung von Genen und Proteinen werden häufig phylogenetische Bäume angefertigt, die deren Verwandtschaften widerspiegeln. Die Phylogenie unterliegt der Kladistik. Diese betrachtet die Evolution als fortschreitende Gabelung von abgeleiteten, gemeinsamen Merkmalen. Somit zeigt der phylogenetische Baum Verwandtschaften von Enzymen, indem Sequenzen, die sich mehr ähneln als andere, näher verwandt sind und somit auch räumlich im phylogenetischen Baum näher zueinander dargestellt werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass einerseits die Sequenz die Struktur von Enzymen und andererseits die Struktur die Funktion von Enzymen mitbestimmt. Somit sollten Enzyme mit gleichen Eigenschaften auch ähnliche Strukturen und Sequenzen aufweisen und im phylogenetischen Baum eine Klade bilden [153].

Abbildung 27 zeigt den phylogenetischen Baum, der aus den identifizierten, vollständigen Treffern und bekannten Trp- Halogenasen (PrnA, RebH, Thal, PyrH, MibH), Pyrrol-F-Hals

(PrnC, PltA), Phenol-F-Hals (CndH) und einer pilzlichen Phenol-F-Hal (RadH) generiert wurde.

Der phylogenetische Baum spaltet sich in zwei große Kladen: eine mit den Trp-Halogenasen und eine mit den Pyrrol- und Phenol-F-Hals. Es zeigt sich, dass die Trp-Halogenasen PrnA, RebH, Thal und PyrH zusammen eine Klade bilden, da alle L-Tryptophan nur in unterschiedlichen Positionen chlorieren. MibH ist zwar auch eine Trp-Halogenase, halogeniert Tryptophan jedoch nur innerhalb einer Peptidkette und nicht in freier Lösung. Somit bildet MibH eine eigene Subklade. Die Pyrrol- und Phenol-F-Hals bilden auch zusammen eine Klade, nur die Pyrrol-F-Hal PrnC ist in der Klade der Trp-Halogenasen zu finden.

Diese phylogenetische Analyse diente zur Begutachtung der Treffer und zeigt, dass identifizierte Treffer sowohl in der Klade der Trp-Halogenasen als auch in der Klade der Phenol- und Pyrrol-F-Hals zu finden sind, obwohl das pHMM auf Trp-Halogenasen basierte.

Um zu testen, ob die identifizierten Treffer auch aktive F-Hals darstellen, wurden vier Enzymsequenzen ausgewählt und in *in vitro*-Experimenten auf deren Aktivität getestet. Die Auswahl erfolgte manuell mit Hilfe des phylogenetischen Baums. Bei der Auswahl der weiter zu untersuchenden Treffer war ein wichtiger Aspekt, dass diese freies Substrat umsetzen können und somit den F-Hals der Variante A angehören. Denn, wenn das natürliche Substrat der Enzyme unbekannt ist, ist es einfacher *in vitro*-Experimente mit freien Substraten durchzuführen. Aus dem Grund wurden alle vier ausgewählten Treffer aus der großen Klade der Trp-Halogenasen, die zu den Variante A-F-Hals gehören, ausgewählt.

Eine Proteinsequenz, die B38 genannt wurde, stammt aus dem „Botany Bay“-Metagenom und bildet eine Klade mit den Trp-Halogenasen. Diese wurde in der Annahme gewählt, dass es sich bei B38 ebenfalls um eine Trp-Halogenase handeln könnte. Des Weiteren wurde eine Proteinequenz gewählt, die mit PrnC clustert. PrnC ist in der Lage freies Substrat zu halogenieren und benötigt daher kein PCP-gebundenes Substrat. Die hier ausgewählte Sequenz stammt aus dem „Sagole Hot Springs“-Metagenom und wurde im Zuge dieser Arbeit HotH genannt. HotH könnte zusätzlich noch thermostabile Eigenschaften aufweisen, da das Metagenom aus einer heißen Quelle (45°C) stammt. Die anderen beiden Proteinsequenzen, benannt BrvH und Pia-2, stammen zum einem aus dem „Botany Bay“-Metagenom und zum anderem aus dem „Algen+Symbionten“-Metagenom. Beide Sequenzen sind in der Klade der Trp-Halogenasen, bilden allerdings eine eigene Subklade und stellen somit eventuell eine eigene Klasse an F-Hals dar.

die den Trp-7-Halogenasen mehr ähneln (Thal, AORI_5336) und andererseits in die, die den Trp-5-Halogenasen mehr ähneln (SttH, KtzR, Th-Hal). Die vier ausgewählten Treffer (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) sind in der Klade der Trp-Halogenasen aufzufinden, bilden aber wie MibH eine eigene Subklade und scheinen sich somit von den anderen bekannten Trp-Halogenasen abzuheben. Dementsprechend sind diese anscheinend ähnlich zu den bekannten Trp-Halogenasen, scheinen sich aber, wie MibH, in einer noch unbekannt Form von diesen abzugrenzen. Die Kladenbildung der F-Hals stimmt im Großen und Ganzen mit den charakteristischen Eigenschaften der bekannten F-Hals überein und spaltet sich in die Substratspezifitäten der Enzyme auf.

5.1.1. Sequenz-Analysen von BrvH, Pia-2, B38 und HotH

Alle vier ausgewählten putativen F-Hals umfassen eine Größe um die 500 AS und besitzen die hochkonservierten Bereiche der F-Hals. Da das pHMM auf den Trp-Halogenasen beruht wurde mit drei bekannten Vertretern (RebH, Thal, PyrH) und den vier Treffern ein Multibles Sequenzalignment (MSA) mit dem Programm ClustalW angefertigt (Abbildung 29) [155]. Dieses zeigt, dass sich die hochkonservierten Regionen der Trp-Halogenasen, auch in den vier Treffern wiederfinden lassen. So sind die wichtigen konservierten Bereiche wie die Flavinbindestelle (GGGxxG), das konservierte Lysin, das konservierte Glutamat und die WxWxIP Region auch in den identifizierten F-Hals BrvH, Pia-2, B38 und HotH konserviert. Zusätzlich sind im MSA weitere Bereiche hoch konserviert (Schwarze Balken um Aminosäuren), die bisher noch nicht in Gänze beschrieben wurden.

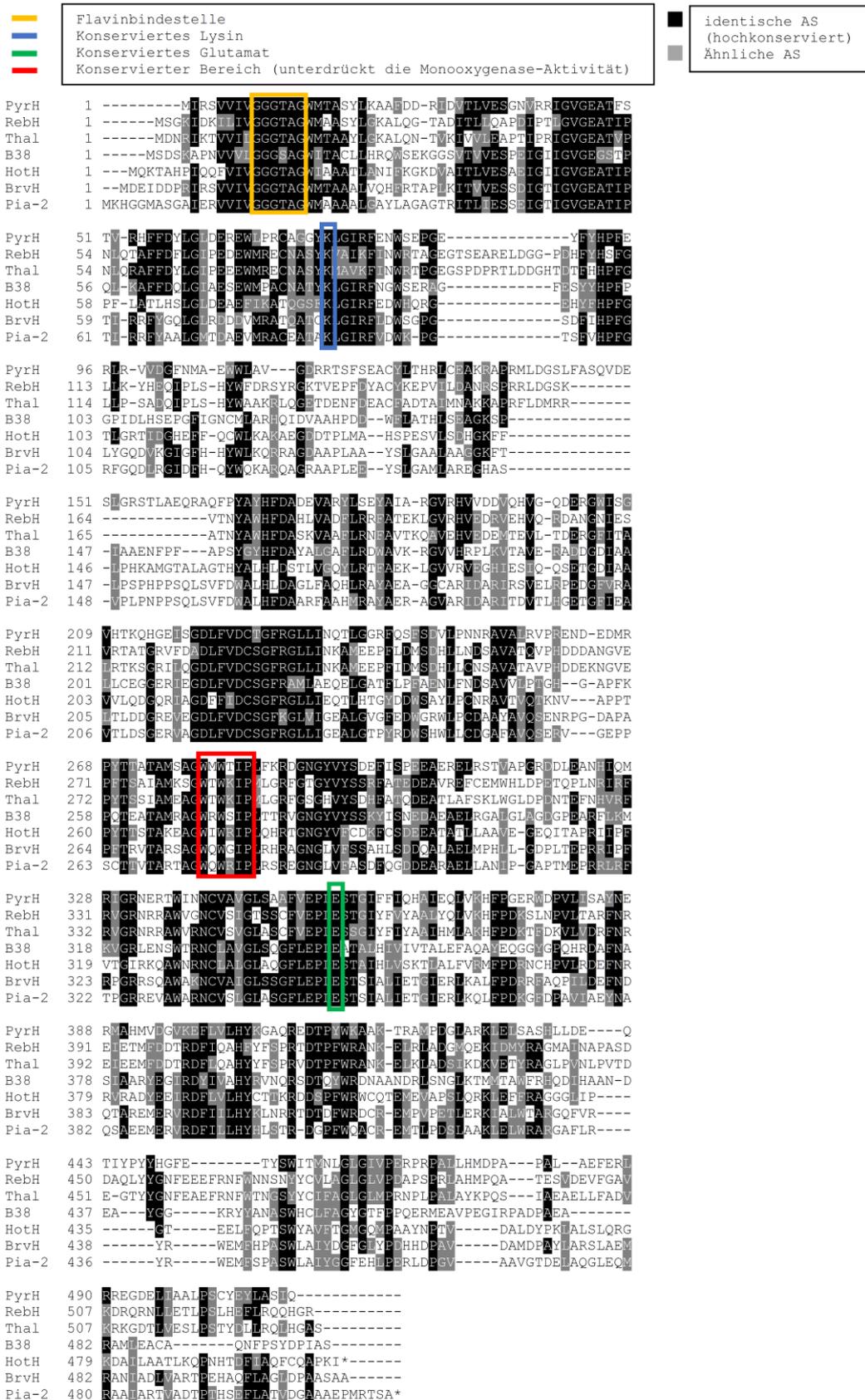


Abbildung 29: MSA der vier ausgewählten putativen F-Hals (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) mit den bekannten Trp-Halogenasen RebH, Thal, PyrH basierend auf Aminosäuresequenzen angefertigt mit ClustalW. Dieses zeigt, dass hochkonservierte Regionen der Trp-Halogenasen auch in den vier ausgewählten putativen F-Hals wiederzufinden sind.

Mit den vier ausgewählten Treffern wurde zusätzlich eine BLASTp-basierte Suche durchgeführt und die Ergebnisse eingehender betrachtet. Die Daten wurden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammengefasste Daten der vier ausgewählten Treffer (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) sowie der BLASTp und AntiSMASH Ergebnisse.

Enzym	BrvH	Pia-2	B38	HotH
Enzymangaben				
Enzymgröße [AS]	509	513	500	506
Enzymgröße [kDa]	56.29	55.82	54.80	56.07
bestes BLASTp- Ergebnisse:	annotierte Trp- Halogenase	annotierte Trp- Halogenase	annotierte Trp-7- Halogenase	annotierte Trp-7- Halogenase
Sequenzabdeckung	100%	98%	100%	99%
Sequenzidentität	100%	100%	100%	70%
Accession #	EDX81295.1	OJY54131.1	WP_011413605.1	WP_068373175.1
Herkunfts- Organismus	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3	<i>Sphingomonas</i> sp. 67-41	<i>Erythrobacter</i> <i>litoralis</i>	<i>Alteromonadales</i> - Spezies
Ergebnis der Anti- SMASH-Analyse	Bakteriozin Gencluster	Lassopeptid-, Terpen-, NRPS- und Bakteriozin- Gencluster	verschiedene Carotenoid- Genclustern und ein Terpen-Gencluster	-

Die BrvH Sequenz umfasst 509 Aminosäuren. Dementsprechend wurde eine Größe von 56,29 kDa berechnet. Die BLASTp-basierte Datenbank-Suche bei NCBI ergab, dass BrvH 100% Sequenzidentität und 100% Sequenzabdeckung zu einer annotierten Trp-Halogenase aus *Brevundimonas* Bal3 (EDX81295.1) aufweist [120]. Die Annotation geht aus einem Genom-Sequenzierungsprojekt hervor, die Aktivität der annotierten Trp-Halogenasen wurde aber noch nicht *in vivo* oder *in vitro* nachgewiesen. Da die Aminosäuresequenzen zu 100% Sequenzidentität und 100% Sequenzabdeckung aufweisen, wurde davon ausgegangen, dass BrvH aus *Brevundimonas* Bal3, einem aeroben, gram-negativen α -Proteobakterium, stammt. Die AntiSMASH-Analyse des *Brevundimonas* Bal3 Genoms (NZ_ABRU00000000.1) ergab ein Bakteriozin-Gencluster [141].

Die Aminosäuresequenz der putativen F-Hal Pia-2 beinhaltet 513 Aminosäuren (55,82 kDa). Die BLASTp-basierte Suche in der Datenbank NCBI ergaben keinen 100%igen Treffer in der Sequenzabdeckung, aber in der Sequenzidentität [120]. Diese Sequenz stammt aus *Sphingomonas* sp. 67-41 (OJY54131.1) und ist eine annotierte Trp-Halogenase, aus einem Genom-Sequenzierungsprojekt, dessen Aktivität noch nicht *in vivo* oder *in vitro* nachgewiesen wurde. Die Sequenzabdeckung liegt bei 98%, da das annotierte Enzym 6 Aminosäuren kleiner als Pia-2 vorliegt. Diese decken sich aber zu 100%, was durch die Identität beschrieben wird. Der zweitbeste Treffer ist eine annotierte Trp-7-Halogenase aus *Sphingomonas* sp. IBVSS2 (WP_086130039.1) mit 98%

Sequenzabdeckung und 96% Sequenzidentität. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Pia-2 aus einer *Sphingomonas* Spezies stammt, welche gram-negative, aerobe α -Proteobakterien sind [156]. Mit Hilfe von AntiSMASH wurde der Stamm *Sphingomonas* sp. 67-41 (MKWJ00000000.1) auf interessante Genclustern untersucht [141]. Dieses ergab vier verschiedene Biosynthese-Gencluster: ein Lassozeptid-, ein Terpen-, ein NRPS- und ein Bakteriozin-Gencluster.

Die putative F-Hal B38 ist 500 Aminosäuren lang und somit 54.8 kDa groß. Die Suche in der NCBI-Datenbank basierend auf BLASTp ergab mehrere Treffer [120]. Der beste hat sowohl 100% Sequenzabdeckung als auch 100% Sequenzidentität und ist eine annotierte Trp-7-Halogenase aus *Erythrobacter litoralis* (WP_011413605.1). Für die annotierte Trp-7-Halogenase wurden noch keine Aktivitäten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestimmt. Da die annotierte Trp-7-Halogenase 100% Sequenzabdeckung und 100% Sequenzidentität aufweist, wurde davon ausgegangen, dass B38 aus *Erythrobacter litoralis*, einem marinen, gram-negativen α -Proteobakterium, stammt. Dieses ist aerob und enthält Bakteriochlorophyll und viele Carotenoide [157]. Mit den genomischen Daten von *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 (NC_007722.1) wurde eine AntiSMASH-Analyse durchgeführt. Die Analyse resultierte in verschiedenen Carotenoid-Genclustern und einem Terpen-Gencluster [141].

Die Aminosäure Sequenz der putativen F-Hal HotH umfasst 506 Aminosäuren (56.07 kDa). Die BLASTp-basierte Suche in der NCBI-Datenbank ergab viele Treffer, allerdings gab es keinen Treffer mit 100% Sequenzabdeckung oder 100% Identität [120]. Die beiden besten Treffer sind annotierte Trp-7-Halogenasen, die eine Sequenzabdeckung von 99% und eine Sequenzidentität von 70% bzw. 71% aufweisen und aus *Paraglaciecola hydrolytica* (WP_068373175.1; 508 AS) bzw. *Paraglaciecola arctica* (WP_007619266.1; 504 AS) stammen. Der dritt- und viertbeste Treffer weisen ähnliche Sequenzabdeckungen und Sequenzidentitäten zum besten und zweitbesten Treffer auf (99% Sequenzabdeckung; 70% Identität), stammen aber nicht aus einer *Paraglaciecola*-Spezies, sondern aus der *Shewanella*-Spezies (WP_012326524.1; WP_065187841.1). Somit lässt sich über die BLASTp-basierte Analyse kein genauer Rückschluss auf den Ursprungsorganismus schließen. Im Folgenden wurde der metagenomische Datensatz näher betrachtet und ergab, dass das Gen *hotH* vermutlich aus einem *Alteromonadales*-Stamm kommt.

Daraufhin wurden die ermittelten Gencluster der vier ausgewählten Treffer (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) in den metagenomischen Datensätzen genauer betrachtet. In keinem der Gencluster wurde in naher Umgebung eine Flavinreduktase identifiziert, was von der aktuellen Forschungsliteratur bereits beschrieben wurde, denn viele F-Hals nutzen externe

Flavinreduktasen und besitzen kein spezifisches Enzym [51, 61]. Interessanterweise clustern sowohl BrvH, Pia-2 als auch HotH mit weiteren F-Hals in einem Gencluster.

Upstream zu BrvH liegt ein Gen, das eine weitere putative F-Hal G12 (514 AS) kodiert (s. Abbildung 27). Die Aminosäuresequenzen der beiden putativen F-Hals weisen eine Sequenzidentität von 42.7% auf. Bei PrnA und RebH liegt die Identität beispielsweise bei 53.9% auf Aminosäureebene. Die BLASTp-basierte Suche in der NCBI-Datenbank ergab für G12 mehrere Treffer [120]. Der beste Treffer weist 100% Sequenzabdeckung und 100% Sequenzidentität auf und ist eine annotierte Trp-7-Halogenase aus *Brevundimonas* (WP_008264259.1). Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den BLASTp Suchergebnissen von BrvH überein.

Upstream zu Pia-2 liegt das putative F-Hal Gen, das die putative F-Hal D20 (513 AS) kodiert (s. Abbildung 27). Die beiden Aminosäuresequenzen weisen eine Sequenzidentität von 40.4% auf. Mit Hilfe von BLASTp wurde die NCBI-Datenbank nach annotierten Enzymen abgesucht [120]. Die Suche ergab einen Treffer mit 100% Sequenzabdeckung und 100% Sequenzidentität einer annotierten Trp-Halogenase auch aus *Sphingomonas* sp.67-41 (OJY54132.1), welches derselbe annotierte Organismus ist wie bei der Suche von Pia-2.

Im Gencluster von HotH wurden sogar zwei weitere putative F-Hals detektiert (C12 (515 AS) und C6 (500 AS)) (s. Abbildung 27). HotH weist zu C12 eine Sequenzidentität von 43.1% und zu C6 von 44.9% auf. Die BLASTp-basierte Suche ergab für beide keinen 100%igen Treffer [120], jedoch wurden für beide dieselben beiden Treffer (WP_068373172.1, WP_007619267.1) wie für HotH detektiert. Für C12 war der beste Treffer WP_068373172.1 aus *Paraglaciecola hydrolytica* mit einer Identität von 67% und für C6 WP_007619267.1 aus *Paraglaciecola arctica* mit 70% Identität. Da für HotH somit kein Ursprungsorganismus angegeben werden konnte, wurde das Metagenom noch einmal genauer mit der Unterstützung von Dr. Daniel Wibberg untersucht. Die Untersuchung ergab, dass die drei putativen F-Hal Gene vermutlich aus einer *Alteromonadales* Spezies stammen.

Für B38 konnte keine weitere Aussage über die genetische Umgebung getroffen werden, da der Contig des Datensatzes zu kurz für weitere Analysen war.

In der Literatur sind sowohl PrnA und PrnC, die beiden Trp-Halogenasen KtzQ und KtzR als auch Bmp2 und Bmp5 bekannt, die in einem Gencluster vorliegen und gemeinsam eine Verbindung in verschiedenen Positionen halogenieren [45, 83, 105]. Es lässt sich vermuten, dass die identifizierten, putativen F-Hals in ähnlicher Weise interagieren.

5.2. *In vitro*-Charakterisierung der identifizierten Flavin-abhängigen Halogenasen

5.2.1. Klonierung in den Expressionsvektor und heterologe Expression in *E. coli*

Für die weitere Charakterisierung der Enzyme sollten die vier identifizierten Gene in *E. coli* exprimiert werden. Um die Genexpression im Organismus zu gewährleisten, wurden die Codons der identifizierten Gene *brvH*, *b38*, *pia-2* und *hotH* für *E. coli* optimiert. Außerdem wurden Restriktionsschnittstellen für NdeI (CATATG) und BamHI (GGATCC) an die 5'- und 3'-Enden der Gene eingefügt. Die Gene wurden im Folgenden von Invitrogen (ThermoFisher) *de-novo* synthetisiert und im pMK-RQ Vektor (*brvH*) oder im pMA-T Vektor (*b38*, *pia-2*, *hotH*) erhalten. Die Vektoren wurden über eine Hitzeschock-Biotransformation in *E. coli* DH 5 α (DE3) kloniert und amplifiziert. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme NdeI und BamHI wurden die Gene aus den Vektoren ausgeschnitten und in den pET28a-Expressionsvektor ligiert. Die erfolgreiche Klonierung der Gene in pET28a wurde mittels Agarose-Gel (1.5 %) verfolgt. Hierzu wurden die in *E. coli* DH 5 α (DE3) transformierten und aufgereinigten Vektorkonstrukte, einer wiederholten Restriktion mit den Enzymen BamHI und NdeI unterzogen (Abbildung 30). Per Sequenzierung wurde für jedes Vektorkonstrukt (pET28a_*brvH*, pET28a_*pia-2*, pET28a_*b38*, pET28a_*hotH*) gezeigt, dass das entsprechende Gen fehlerfrei in den pET28a-Vektor kloniert wurde.

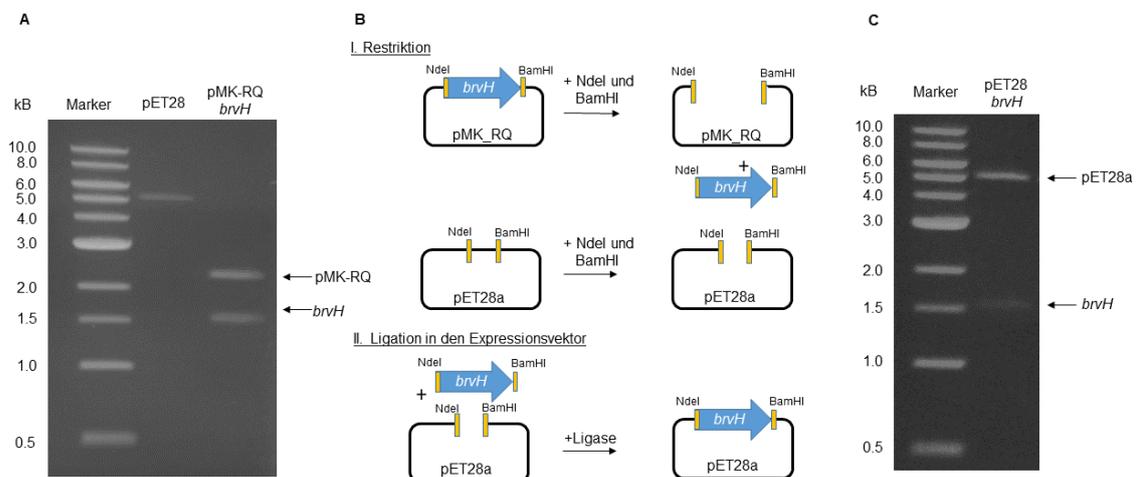


Abbildung 30: Klonierung des Halogenasegens, *brvH* in den pET28a Expressionsvektor. Die gleichen Klonierungsschritte erfolgten für die Halogenasegene *b38*, *pia-2* und *hotH* aus dem Vektor pMA-T in pET28a. **A:** 1.5 % Agarosegel mit den von den Restriktionsenzymen (NdeI und BamHI) geschnittenen Vektoren pET28a und pMK-RQ_*brvH*. Marker: 1 Kilobasen (kB) DNA-Leiter von NEB Inc. Nach der Restriktion ist für den pET28a-Vektor eine Bande zwischen 6 und 5 kB vom pET28a-Vektor (5.369 kB) zu sehen und zwei Banden für den pMK_RQ (2.393 kB) und für das Gen, *brvH* (1.539 kB). Im Folgenden wurde das ausgeschnittene Gen, *brvH* in den geschnittenen pET28a-Vektor (5.369 kB) ligiert.; **B:** Schematische Darstellung der Klonierung des Gens, *brvH* vom pMK-RQ-Vektor in den pET28a-Vektor. **C:** 1.5 % Agarosegel vom Vektor pET28a_*brvH* nach der Restriktion mit NdeI und BamHI. Marker: 1 kb DNA Leiter von NEB Inc. Nach der Restriktion sind deutlich zwei Banden ersichtbar (eine für den pET28a-Vektor (5.369 kB) und eine für *brvH* (1.539 kB)). Dieses beweist, dass die Ligation des Gens in den Vektor erfolgreich war.

Die pET28a-Konstrukte wurden zur Amplifikation in *E. coli* DH 5 α (DE3) und zur Genexpression in *E. coli* BL21 (DE3)_pGro7 eingebracht. Die Besonderheit an *E. coli* BL21 (DE3)_pGro7 liegt in der Koexpression der Chaperonen GroEL/GroES. Dieses Chaperonen-System von TaKaRa Bio Inc. fungiert als Faltungshelfer und gewährleistet eine erhöhte Expressionsrate an löslichem heterologen Enzym.

Im Folgenden wurden die Gene *brvH*, *pia-2*, *b38* und *hotH* einzeln in *E. coli* BL21 (DE3)_pGro7 exprimiert. Die Zellen mit dem heterolog exprimierten Enzymen wurden mittels French Press aufgeschlossen und über deren N-terminalen HexahistidinTag (HisTag) mit einer Kobalt-TALON Matrix aufgereinigt (Abbildung 31). Nach dieser HisTag-gebundenen Aufreinigung wurde das in der Enzymlösung enthaltene Imidazol über eine Entsalzungssäule entfernt.

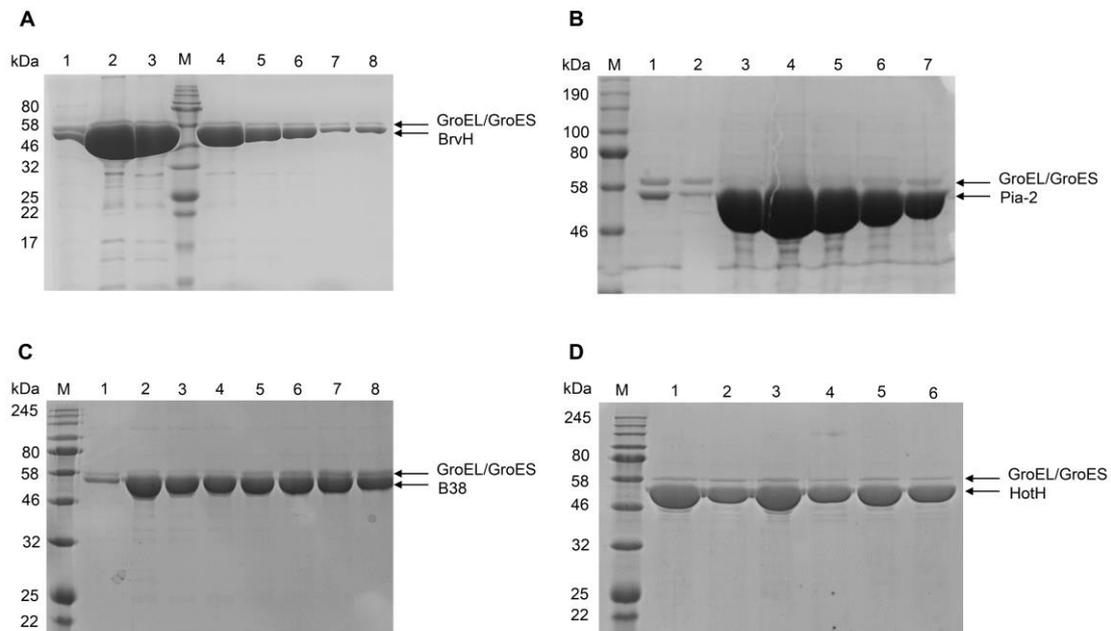


Abbildung 31: 12 %ige *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) der eluierten Enzymfraktionen der Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH. Die Enzyme wurden über deren N-terminalen HisTag mittels Kobalt-TALON Matrix aufgereinigt und in Fraktionen á 750 μ l eluiert. **A:** Fraktionen 1-8 der eluierten Fraktionen von BrvH (56.29 kDa); **B:** Fraktionen 1-7 der eluierten Fraktionen von Pia-2 (55.82 kDa). **C:** Fraktionen 1-8 der eluierten Fraktionen von B38 (54.8 kDa). Fraktionen bis auf Fraktion 1 wurden auf 0.7 mg/mL normiert. **D:** Fraktionen 1-6 der eluierten Fraktionen von HotH (56.07 kDa). Die Fraktionen wurden auf 0.7 mg/mL normiert; M: vorgefärbte Protein-Leiter von NEB Inc. (11-245 kDa); Alle SDS-PAGE Gele zeigen nicht nur die Enzyme mit den korrekten Größen, sondern auch die koexprimierten Chaperonen GroEL/GroES (60 kDa).

5.2.2. Substrat-Umsatzversuche der neu identifizierten FHals

Um zu zeigen, dass es sich bei den identifizierten F-Hals um aktive F-Hals handelt, wurden diese mit verschiedenen Substraten inkubiert und deren Umsätze bestimmt. Alle vier ausgewählten Treffer (BrvH, Pia-2, B38 und HoH) wurden mit dem pHMM, das auf Trp-Halogenasen basierte, identifiziert, weshalb die Enzyme zunächst auf den Umsatz von L-Tryptophan, Indol, dessen Derivate und weitere aromatische Verbindungen getestet wurde.

Die Substrat-Umsatzversuche erfolgten mit 1.25 mg/mL Enzym und 1 mM Substrat über 48 Stunden(h) in 1 mL Reaktionsansatz. Zu der Enzymreaktion wurde zusätzlich ein Kofaktor-Regenerierungssystem eingesetzt, das schon durch Frese *et al.* [82] etabliert wurde. Dabei wird eine Flavin Reduktase (PrnF) aus *Pseudomonas fluorescens* für die Regenerierung von FAD zum instabilen FADH₂ eingesetzt. Das dabei verbrauchte NADH wird durch die eingesetzte Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus ruber* (RR-ADH) über die Oxidation von 2-Propanol zu Aceton regeneriert.

Nach 48 h diente Methanol zur Denaturierung der Enzyme und somit zum Stoppen der Enzymreaktion. Partikel, die nun nicht mehr in Lösung waren, wurden abzentrifugiert und der Überstand mittels reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) analysiert. Die Substrate, die halogeniert wurden, weisen nach 48 h eine spätere Retentionszeit auf, da diese mit Brom- oder Chlor- Substituent polarer sind.

Für alle vier ausgewählten F-Hals überwog die Bromierung gegenüber der Chlorierung. Aus diesem Grund wird bei der Substratanalyse zunächst nur auf die Bromierung eingegangen. In Kapitel 5.2.6 wird genauer auf die Chlorierungsaktivität der Enzyme und auf das Brom als favorisiertes Halogenatom eingegangen.

5.2.2.1. Substratanalysen der F-Hal BrvH

BrvH weist gegenüber L-Tryptophan **21** keine halogenierende Aktivität auf, Indol **54** hingegen wird bromiert (Abbildung 32).

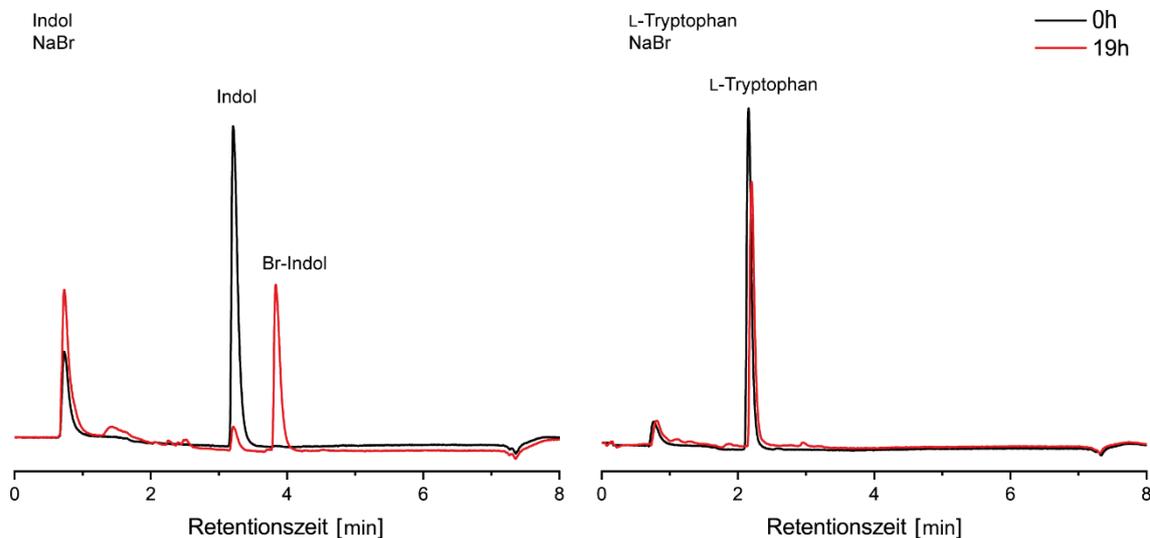


Abbildung 32: RP-HPLC-Chromatogramm (280 nm) von den Umsatzversuchen von Indol (links) und L-Tryptophan (rechts) mit BrvH und NaBr. Zur Kofaktor-Regenerierung wurden die RR-ADH und PrnF zugegeben. Indol (t_R : 3.2 min) wird innerhalb von 19 h von BrvH bromiert (t_R : 3.9 min), während keine Bromierung des L-Tryptophan (t_R : 2.2 min) katalysiert wird.

Bei einer Bromierung des Eduktes wird ein neuer Peak mit späterer Retentionszeit in der RP-HPLC erwartet, da das Produkt gegenüber dem Edukt unpolarer ist. Das Chromatogramm der RP-HPLC des Reaktionsansatzes mit BrvH, das mit L-Tryptophan **21** und Natriumbromid für 19 Stunden inkubiert wurde, zeigt keinen neuen Peak nach 19 Stunden. Somit ist davon auszugehen, dass BrvH die Bromierung von L-Tryptophan **21** nicht katalysieren kann. Indol **54** wird hingegen von dem Enzym als Substrat akzeptiert, das RP-HPLC Chromatogramm zeigt nach 19 Stunden Inkubation einen zweiten intensiven Peak (3.9 min) mit längerer Retentionszeit als das Edukt. Über Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um das bromierte Indol handelt (Abbildung 33). Somit kann die identifizierte F-Hal BrvH als ein aktives Enzym beschrieben werden.

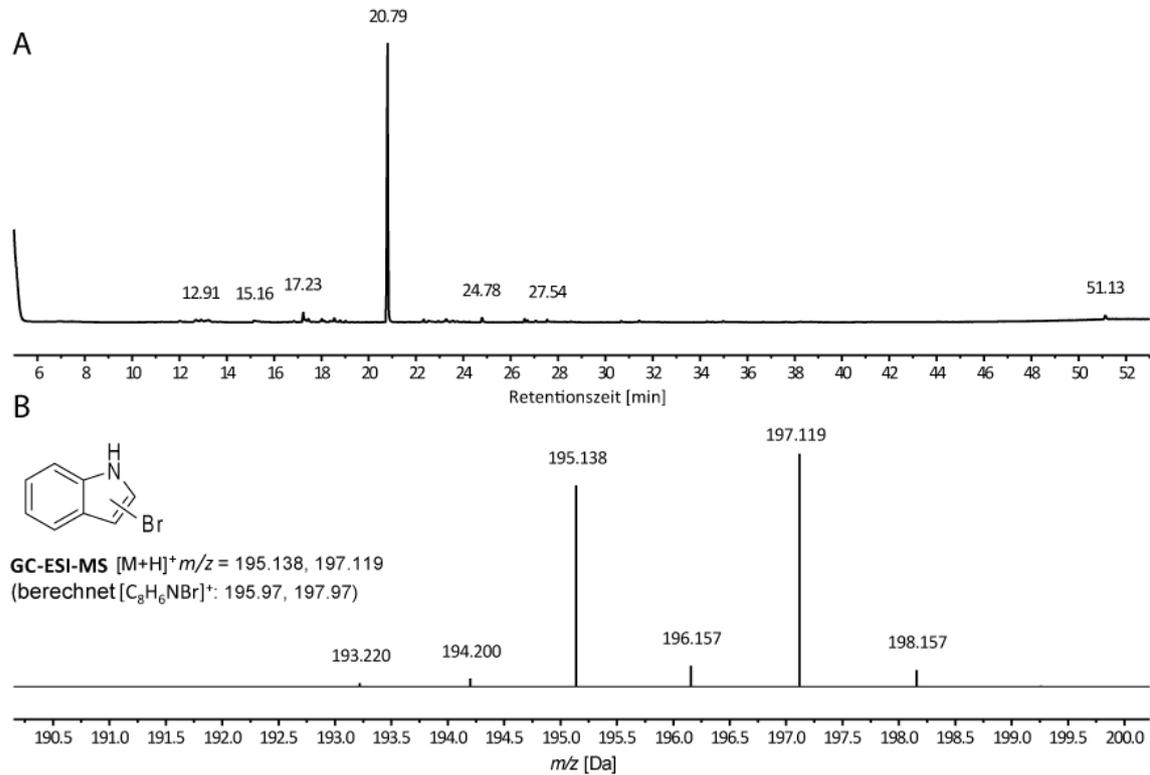


Abbildung 33: GC-MS-Chromatogramm des bromierten Produktes von Indol, das mit BrvH und NaBr inkubiert wurde. **A:** 280 nm Chromatogramm; **B:** MS⁺-Spektrum des Produktes.

In dem Massenspektrum des bromierten Indols **54** ist das typische Isotopenmuster ersichtlich, was die Bromierung des Indols zeigt. Das Isotopenmuster wird durch die Bromisotope ⁷⁹Br und ⁸¹Br verursacht, da nur die Isotope ⁷⁹Br und ⁸¹Br stabile Isotope darstellen.

Zur weiteren Charakterisierung des Substratspektrums von BrvH, wurden weitere Substrate, vornehmlich Indol-Derivate getestet. Im Ganzen wurden 39 Substrate getestet von denen 19 von BrvH bromiert wurden, was zusätzlich über Massenanalyse positiv verifiziert wurde. Die prozentualen Produktumsätze wurden über die Integrale der Peaks aus der Chromatogramme der RP-HPLC bestimmt (Abbildung 34).

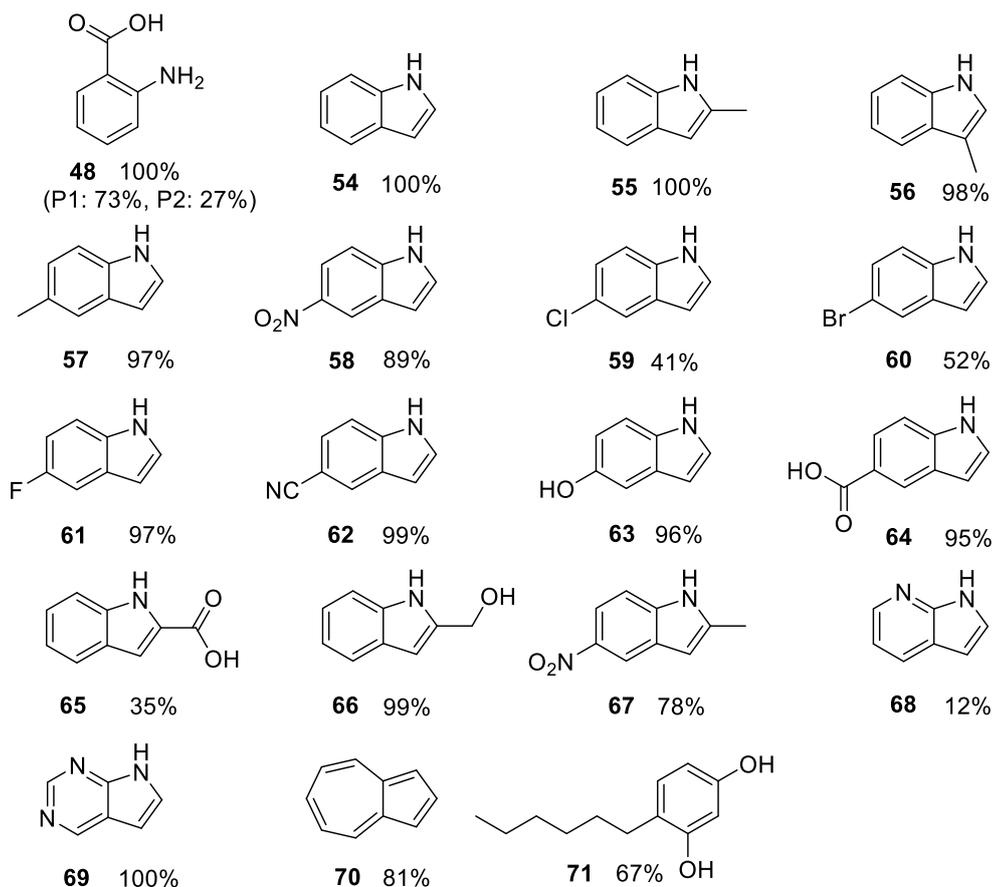


Abbildung 34: Substrate, die von BrvH bromiert werden mit den prozentualen Produktumsätzen. Die prozentualen Produktumsätze wurden mittels analytischer RP-HPLC über die Flächen der Peaks ermittelt. P1: Produkt 1; P2: Produkt 2

Zu den Substraten, die von BrvH bromiert wurden, zählen hauptsächlich Indol **54** und dessen Derivate. Nur drei Substrate weichen von dem Grundgerüst des Indols ab. Diese sind das Azulene **70**, das keine Stickstoffgruppe beinhaltet und statt eines 6-Rings einen 7-Ring besitzt, das 4-*n*-Hexylresorcinol **71**, das zwei Alkoholgruppen an einem 6-Ring beinhaltet und keinen weiteren 5-Ring besitzt sowie Anthranilsäure **48**. Für alle Produkte wurde ein monobromiertes Produkt nachgewiesen, außer bei der Bromierung von Anthranilsäure **48**. Die Inkubation von BrvH und der Anthranilsäure **48** führte zu zwei monobromierten Produkten, die in ihren Retentionszeiten voneinander abwichen, aber die gleichen Produktmassen aufwiesen. Für alle Produkte konnten die korrekten Massen der bromierten Produkte mit den korrespondierenden Isotopenmustern mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) oder GC-MS ermittelt werden und bestätigen damit die Bromierung durch BrvH. Sowohl elektronenziehende als auch elektronenschiebende Substituenten im 6-Ring werden von BrvH akzeptiert, haben allerdings einen Einfluss auf den prozentualen Umsatz der einzelnen Substrate. 5-Fluorindol **61** wird von BrvH am besten (97%) im Vergleich zu 5-Bromindol **60** (52%) und 5-Chlorindol **59** (41%) umgesetzt. Der Fluor-Substituent besitzt

identifiziert werden. Auch Tryptophan-Derivate wie 5-Hydroxytryptophan **72**, Tryptophol **73** oder Tryptamin **74** wurden nicht von BrvH bromiert. L-Tryptophan **21** und dessen Derivate weisen Substituenten in C3-Position des Indolrings auf und scheinen somit eine Bromierung zu vermeiden. Dies stimmt auch mit den nicht akzeptierten Indol-Derivaten überein. Indol-Derivate, die in C5- oder C2-Position Substituenten aufweisen, werden bromiert und Indol-Derivate mit Substituenten an C3-Position nicht. 3-Methylindol **56** stellt hierbei die Ausnahme dar, was durch die geringe Größe des Methylsubstituenten begründet sein könnte und somit im aktiven Zentrum von BrvH umgesetzt werden kann.

In Kooperation mit Prof. Dr. Niemann und Christiane Widmann (Universität Bielefeld) wurde die Kristallstruktur von *apo*-BrvH entschlüsselt. Hier konnte gezeigt werden, dass der größte Unterschied zwischen der Trp-7-Halogenase RebH und BrvH in der Substratbindetasche liegt. In RebH bilden vier Aminosäuren (Y454, Y455, E461, F465) Wasserstoffbrückenbindungen mit der Amino- und Carboxygruppe des Substrats L-Tryptophan **21** aus. In BrvH ist dieser Bereich nicht vorhanden. Dies führt vermutlich dazu, dass die Affinität von BrvH zu L-Tryptophan **21** gering ist, sodass keine Halogenierung katalysiert werden kann. Somit ist die Substratbindetasche von BrvH offener als die von RebH, wodurch auch größere Verbindungen wie Peptide im aktiven Zentrum gebunden und halogeniert werden könnten [158]. Allerdings wurden noch keine größeren Substrate als die hier aufgezeigten getestet.

5.2.2.2. Substratanalysen mit der FHal Pia-2

Pia-2 wurde wie die anderen Enzyme mittels des pHMM basierend auf Trp-Halogenasen identifiziert. In den Substrat-Umsatzversuchen konnte gezeigt werden, dass Pia-2 nicht in der Lage ist, die Halogenierung von L-Tryptophan **21** zu katalysieren. Indol **54** wurde hingegen akzeptiert (Abbildung 36).

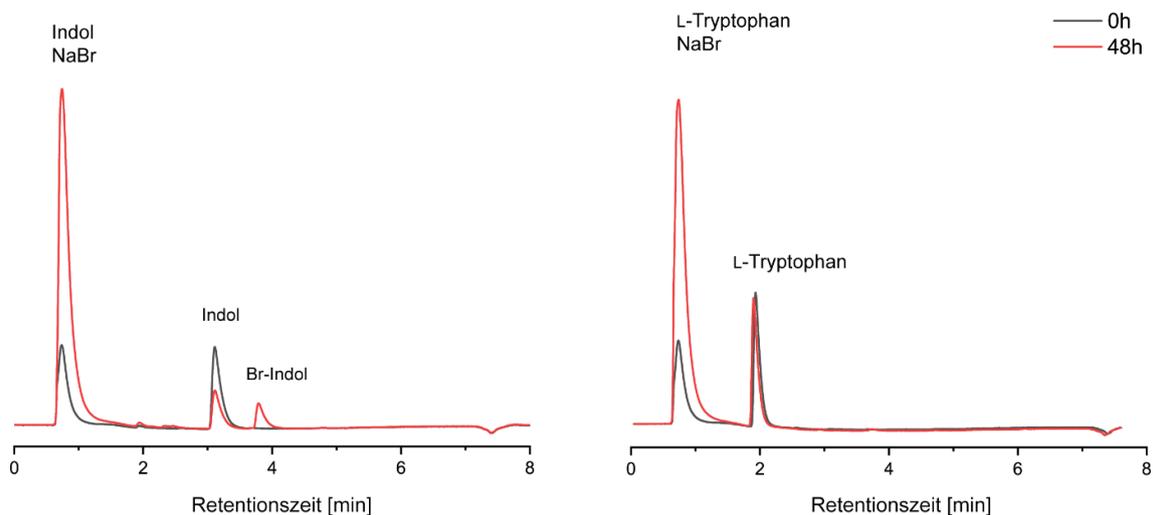


Abbildung 36: RP-HPLC-Chromatogramm (280 nm) von den Umsatzversuchen von Indol (links) und L-Tryptophan (rechts) mit Pia-2 und NaBr als Halogenquelle. Zur Kofaktor-Regenerierung wurden *RR*-ADH und PrnF verwendet. Nach 19 Stunden Inkubation von Pia-2 mit Indol (t_R : 3.2 min) und NaBr entsteht als Produkt, Bromindol (t_R : 3.8 min). Während Pia-2 keine Bromierung von L-Tryptophan (t_R : 2 min) katalysiert.

Das Chromatogramm der RP-HPLC des Reaktionsansatzes von Indol mit Pia-2 (Abbildung 36, links) zeigt nach 19 h Inkubation einen zusätzlichen Peak zum Edukt, bei dem es sich um das bromierte Indol handelt. Das Chromatogramm mit dem Reaktionsansatzes von L-Tryptophan **21** und Pia-2 (Abbildung 36, rechts) blieb unverändert und keine Bromierung fand statt. Die Bromierung des Indols **54** wurde über Elektrosprayionisation mit Massenspektrometrie-Kopplung (ESI-MS)-Messungen verifiziert (Abbildung 37).

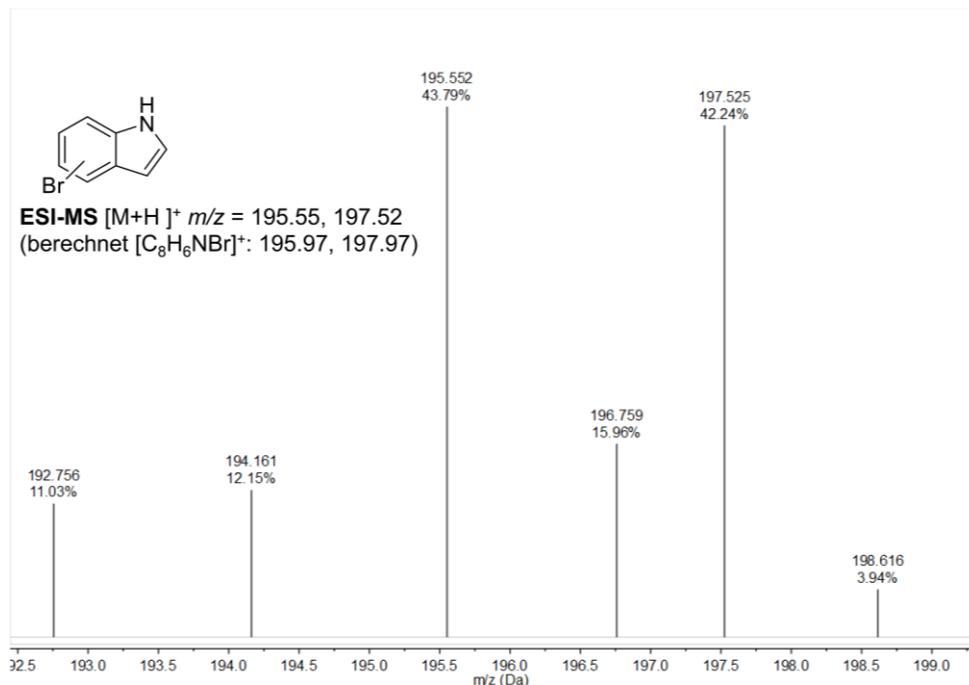


Abbildung 37: ESI-MS⁺ Spektrum des Bromindols, katalysiert durch Pia-2. Das typische Isotopenmuster durch ⁷⁹Br und ⁸¹Br konnte identifiziert werden, wodurch die Umsetzung von Indol zu Bromindol durch Pia-2 bewiesen wird.

Durch die ESI-MS Messung wurde sowohl die korrekte Masse des Bromindol als auch das typische Isotopenmuster des Broms (⁷⁹Br, ⁸¹Br) identifiziert und somit bewiesen, dass Indol **54** von Pia-2 bromiert wird.

Dieses Ergebnis bestätigt, dass es sich bei der vorhergesagten F-Hal um ein aktives Enzym handelt. Insgesamt wurden 41 verschiedene aromatische Substrate getestet, von denen 24 Substrate bromiert wurden (Abbildung 38).

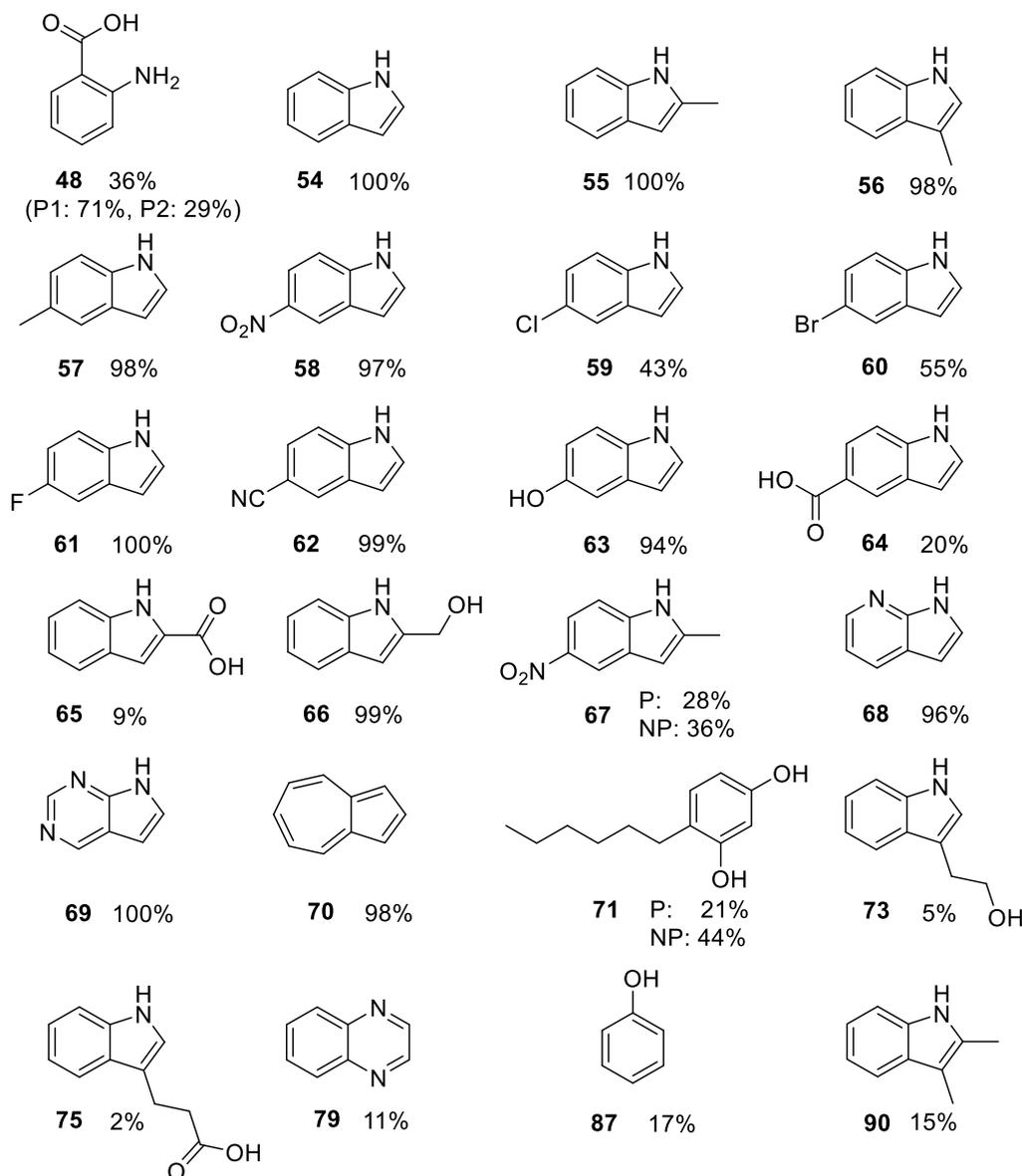


Abbildung 38: Von Pia-2 bromierte Substrate mit den prozentualen Produktumsätzen. Die prozentualen Produktumsätze wurden mittels RP-HPLC über die Flächen der Peaks ermittelt. Produktumsatz [%]; P1:Produkt 1; P2:Produkt 2; NP: Nebenprodukt Umsatz [%].

Vor allem Indol **54** und dessen Derivate werden von Pia-2 bromiert. Indol mit aktivierenden Methylgruppen (**55**, **56**, **57**) werden innerhalb von 48 h fast zu 100 % umgesetzt. Dieses gilt auch für die Azaindole 7-Azaindol **68** (96%) und Pyrrol-2,3-pyrimidin **69** (100%). Indole mit Substituenten an C5-Position (**57**, **58**, **59**, **60**, **61**, **62**, **63**, **64**, **67**) werden von Pia-2 in unterschiedlichen Umsatzraten in Abhängigkeit vom Substituenten umgesetzt. Die Bromierung von 5-Chlorindol **59** wird wie von BrvH am schlechtesten von den Halogenindolen katalysiert. Pia-2 setzt auch Indolderivate um, die in C3-Position Substituenten tragen. 3-Methylindol **56** wird zu 98% umgesetzt, aber Tryptophol **73** und Indol-3-propionsäure **75** werden auch im geringeren Maße (5% und 2%) umgesetzt. Fünf der 24 positiv getesteten Substrate weichen vom Indolgerüst ab und werden dennoch

bromiert. Diese sind Anthranilsäure **48**, Azulen **70**, 4-*n*-Hexylresorcinol **71**, Chinoxalin **79** und Phenol **87**.

Die Bromierung wurde über die korrekten Produktmassen und deren Isotopenmustern mittels LC-MS und GC-MS bestätigt. Nur für das Substrat Chinoxalin **79** konnte die Masse des bromierten Edukts nicht bestätigt werden.

Pia-2 bromiert von den 41 getesteten Substraten 17 Substrate nicht (Abbildung 39).

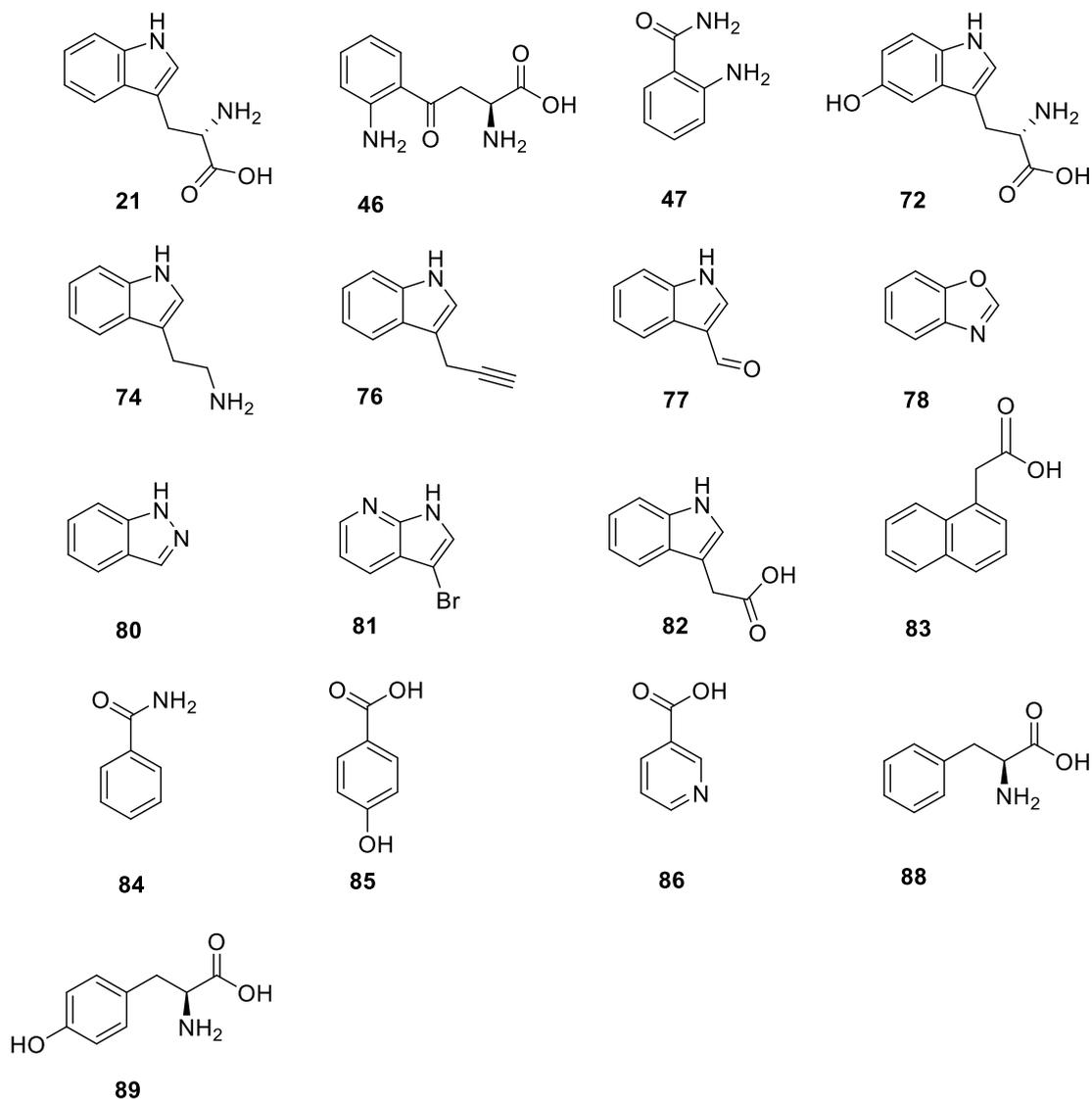


Abbildung 39: Von Pia-2 getestete und nicht bromierte Substrate.

Diese umfassen alle getesteten Aminosäuren (L-Tryptophan **21**, Tyrosin **88** und Phenylalanin **89**) sowie die Indol-Derivate: L-Kynurenin **46**, Anthranilamid **47**, Tryptamin **74**, Indol-3-azetonitril **76**, Indol-3-carbaldehyd **77**, Benzoxazol **78**, Indazol **80**, 3-Brom-7-azaindol **81**, Indol-3-essigsäure **82**, 1-Naphthalylessigsäure **83** und Benzamid **84**, 4-Hydroxybenzoesäure **85**, Nicotinsäure **86**.

Obwohl die Bromierung von Tryptophol **73** und Indol-3-propionsäure **75** in geringen Mengen von Pia-2 katalysiert wird, wird L-Tryptophan **21** nicht umgesetzt. Die Aminogruppe des L-Tryptophans **21** scheint die korrekte Positionierung im aktiven Zentrum und somit eine Halogenierung zu behindern.

Weiterhin ist Pia-2 in der Lage Anthranilsäure **48**, Phenol **87** und 4-*n*-Hexylresorcinol **71** zu halogenieren, aber die Benzol-Derivate Anthranilamid **47**, Benzamid **84**, 4-Hydroxybenzoesäure **85**, Nicotinsäure **86** nicht.

Generell lässt sich nur eine geringe Tendenz zum natürlichen Substrat vorhersagen. Es scheinen Indol und dessen Derivate gut umgesetzt zu werden, was eventuell auf einen Aromaten als natürliches Substrat schließen lässt. Dennoch müssten noch weitere Substrate getestet werden, die auf Ähnlichkeiten zu anderen Stoffklassen und bessere Rückschlüsse auf die bevorzugten Substrate des Enzyms schließen lässt.

5.2.2.3. Substratanalysen mit der FHal B38

Auch für B38 wurde zunächst die Halogenierung von L-Tryptophan **21** und Indol in einem Umsatzversuch getestet. Dieser Versuch zeigte, dass B38 die Halogenierung von L-Tryptophan **21** nicht katalysiert, hingegen die von Indol **54** zu Bromindol (Abbildung 40).

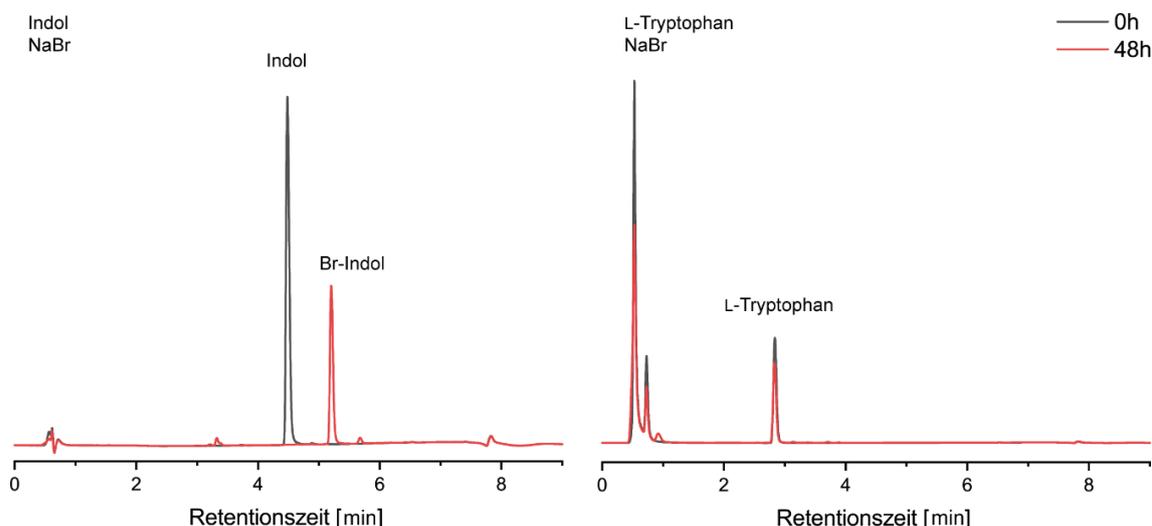


Abbildung 40: RP-HPLC-Chromatogramm (280 nm) von den Umsatzversuchen von Indol (links) und L-Tryptophan (rechts) mit B38 und NaBr als Halogenquelle. Zur Kofaktor-Regenerierung wurden RR-ADH und PrnF verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation von B38 mit Indol (t_R : 4.5 min) und NaBr entsteht als Produkt, Bromindol (t_R : 5.2 min). Während keine Bromierung von L-Tryptophan (t_R : 2.8 min) durch B38 katalysiert wird.

Der Reaktionsansatz von B38 mit Indol **54** weist nach 48 h Chromatogramm der RP-HPLC keinen Eduktpeak von Indol (4.5 min) mehr auf, stattdessen wird ein Peak mit späterer Retentionszeit (5.2 min) identifiziert. Hierbei handelt es sich um das unpolare Produkt, Bromindol. Dieses konnte über LC-ESI-MS-Messungen verifiziert werden (Abbildung 41).

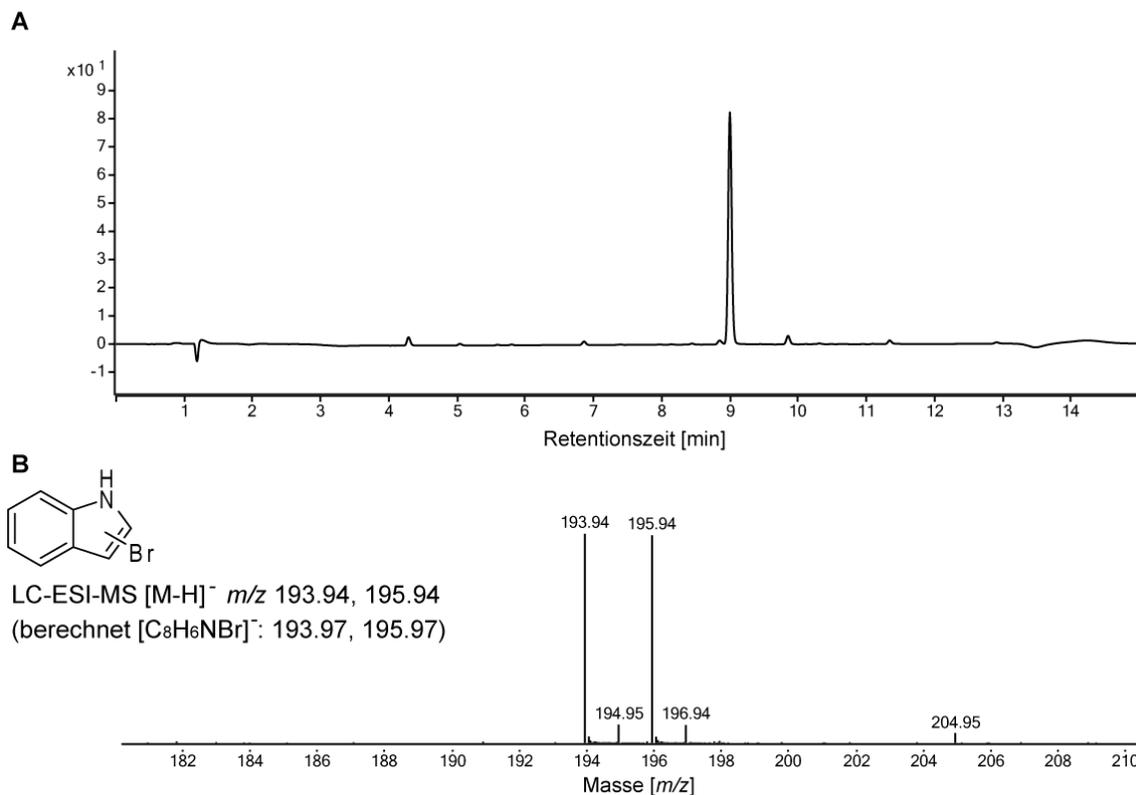


Abbildung 41: LC-ESI-MS-Chromatogramm von Bromindol, das aus der Inkubation von B38 mit Indol und NaBr nach 48 h gebildet wurde. **A:** 280 nm Chromatogramm. Das Produkt Bromindol eluiert mit einer Retentionszeit von 9 Minuten; **B:** MS⁻ Spektrum des Produktes, das die korrekte Masse des Bromindols zeigt. Die Masse wurde im Negativmodus bestimmt.

Das Produkt weist das typische Isotopenmuster bromierter Verbindungen (^{79}Br , ^{81}Br) auf und kann über die korrekte Masse dem bromierten Indol zugewiesen werden.

Bei der identifizierten F-Hal B38 handelt es sich somit in der Tat um ein aktives halogenierendes Enzym. Insgesamt wurden 41 verschiedene Verbindungen auf Umsatz getestet, von denen 25 von B38 bromiert wurden (Abbildung 42).

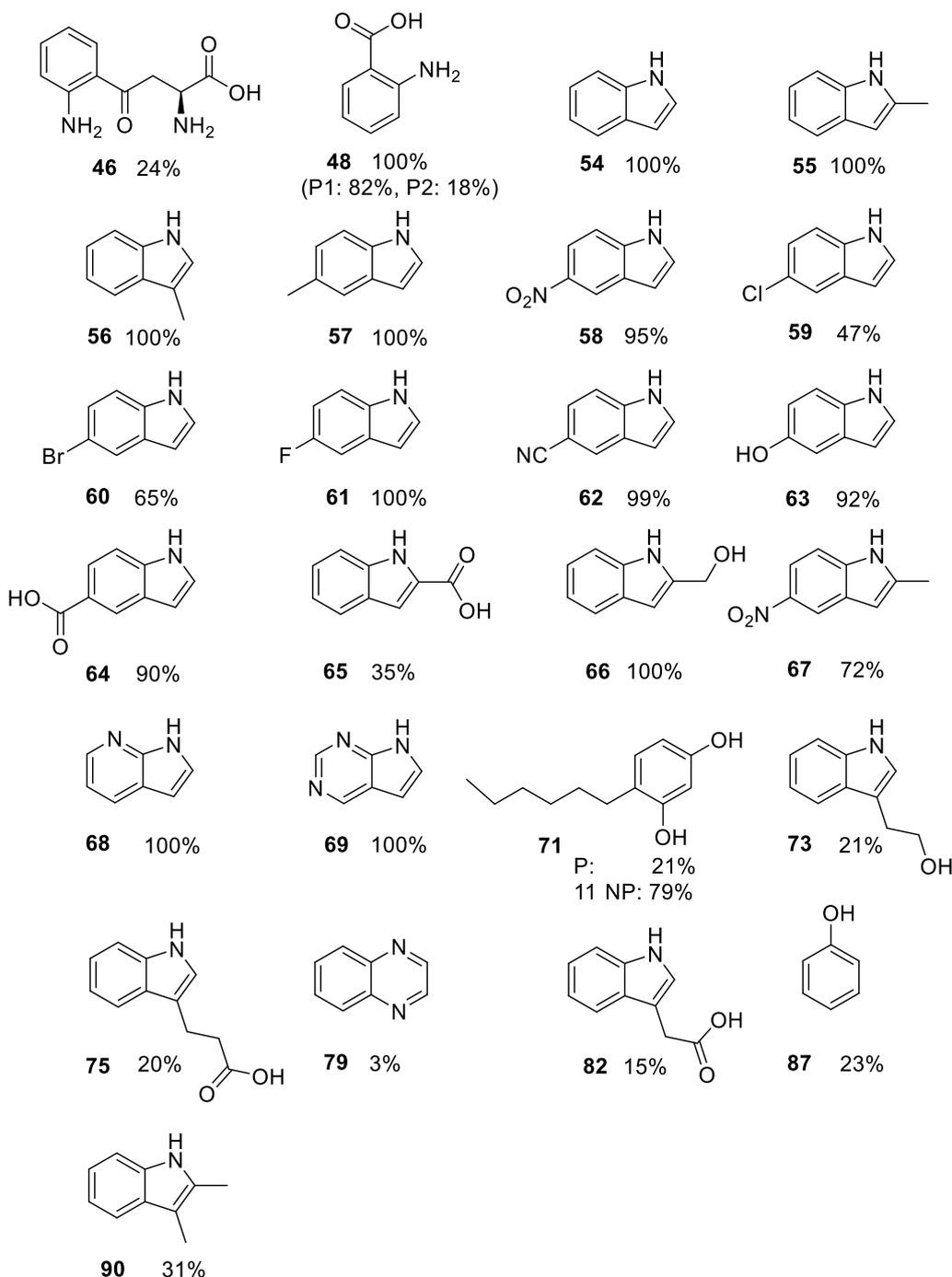


Abbildung 42: Von B38 bromierte Substrate mit den prozentualen Produktumsätzen. Die prozentualen Produktumsätze wurden mittels RP-HPLC über die Flächen der Peaks ermittelt. P: Produktumsatz [%]; P1: Produkt 1; P2: Produkt 2; NP: Nebenprodukt Umsatz [%]

Bei den von B38 bromierten Verbindungen handelt es sich hauptsächlich um Indol-Derivate. Indol **54** und die Methylindole (**55**, **56**, **57**) werden in guten Umsätzen zu 100% innerhalb von 48 h bromiert. Andere Indol-Derivate (**57**, **58**, **59**, **60**, **61**, **62**, **63**, **64**, **67**) werden in unterschiedlichen Umsatzzraten abhängig von deren Substituenten umgesetzt. Zusätzlich werden die Verbindungen L-Kynurenin **46**, Anthranilsäure **48**, 4-*n*-Hexylresorcinol **71** (mit 11 Nebenprodukten), Chinoxalin **79** (in geringen Mengen, 3%) und Phenol **87** (23%)

bromiert, die von dem Grundgerüst des Indols abweichen. Diese Verbindungen werden allerdings in geringen Umsatzraten im Vergleich zu den anderen Indol-Derivaten umgesetzt. B38 scheint zu den Substraten **46**, **71**, **79**, **87** geringere Affinitäten aufzuweisen. Eine Ausnahme stellt die Anthranilsäure **48** dar, diese wird allerdings nicht nur zu einem monobromierten Produkt umgesetzt, sondern zu zwei monobromierten Produkten, die vermutlich in unterschiedlichen Positionen bromiert sind. Mittels LC-MS-Analyse und GC-MS-Analyse wurde zusätzlich die Bromierung von allen positiv getesteten Substraten bestätigt. Eine Ausnahme stellen die Substrate 3-Methylindol **56**, Phenol **87** und Chinoxalin **79** dar. Für diese konnte keine Masse der bromierten Substrate identifiziert werden.

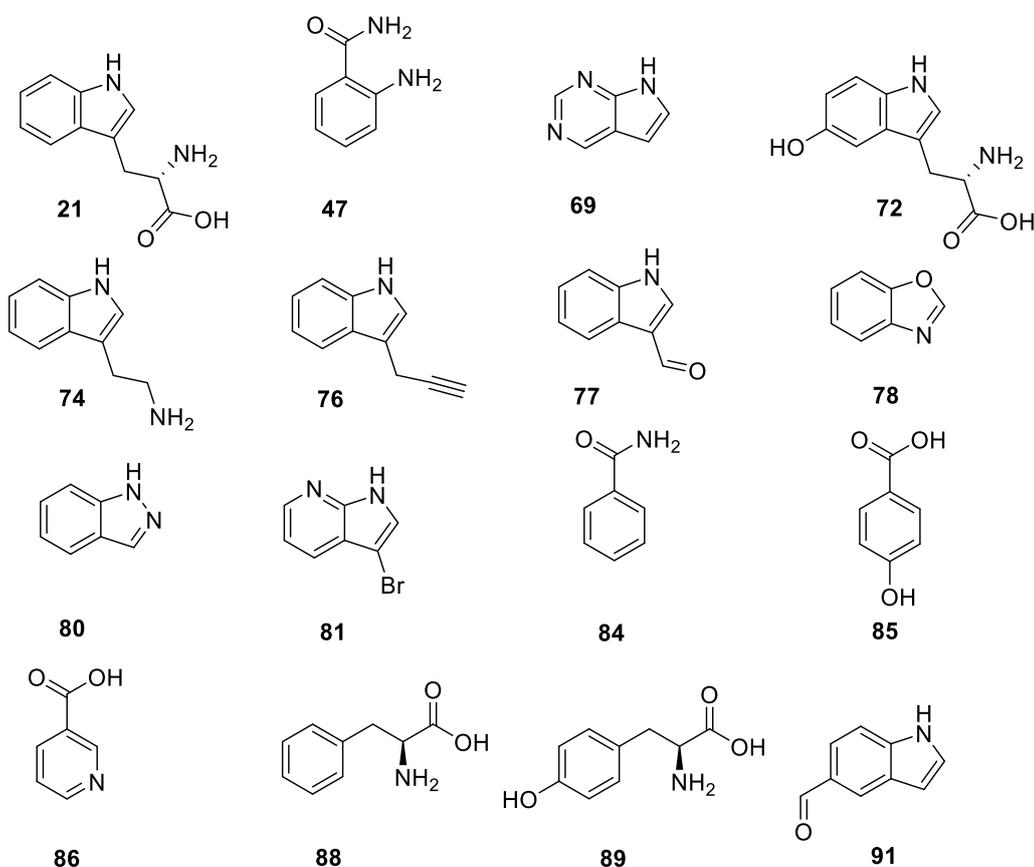


Abbildung 43: Strukturen der von B38 nicht bromiert wurden.

16 getestete Substrate wurden von B38 nicht umgesetzt (Abbildung 43). Zu diesen gehören alle getestete Aminosäuren (L-Tryptophan **21**, Tyrosin **88**, Phenylalanin **89**), aber auch das Tryptophan-Derivat 5-Hydroxytryptophan **72**. Obwohl L-Tryptophan **21** nicht umgesetzt wird, werden die sehr ähnlichen Substrate Tryptophol **73** und Indol-3-propionsäure **75** von B38 bromiert. Das Amin im L-Tryptophan **21** scheint eine Interaktion im aktiven Zentrum zu stören, weshalb dieses nicht halogeniert werden kann. Interessanterweise werden die beiden Carbaldehyde (Indol-3- und -5-carbaldehyd) nicht umgesetzt, die korrespondierenden Säuren aber schon. Dies gilt auch für die Anthranilsäure **48**, die

innerhalb von 48 h zu 100% bromiert wird, während das Anthranilamid **47** nicht akzeptiert wird. Hier scheint die Hydroxygruppe für eine Interaktion in der Substratbindetasche des aktiven Zentrums zu Sorgen, die eine Bromierung erst möglich macht und beim Aldehyd oder Amid fehlt. Weiterhin werden die Benzol-Derivate (Benzamid **84**, 4-Hydroxybenzoesäure **85**, Nicotinsäure **86**) nicht bromiert, während Phenol **87** zu 23% bromiert werden kann.

Im Ganzen lässt sich aus den Substrattests mit B38 nicht auf das natürliche Substrat schließen. Indol **54** und dessen Derivate wurden mit den höchsten Umsatzraten bromiert.

5.2.2.4. Substratanalysen mit der FHal HotH

Das Enzym, HotH wurde wie die anderen Enzyme zunächst mit L-Tryptophan **21** und Indol **54** auf dessen Aktivität getestet. Dabei stellte sich heraus, dass HotH analog zu BrvH, Pia-2 und B38 die Bromierung von L-Tryptophan **21** nicht katalysieren kann, aber die von Indol **54** (Abbildung 44).

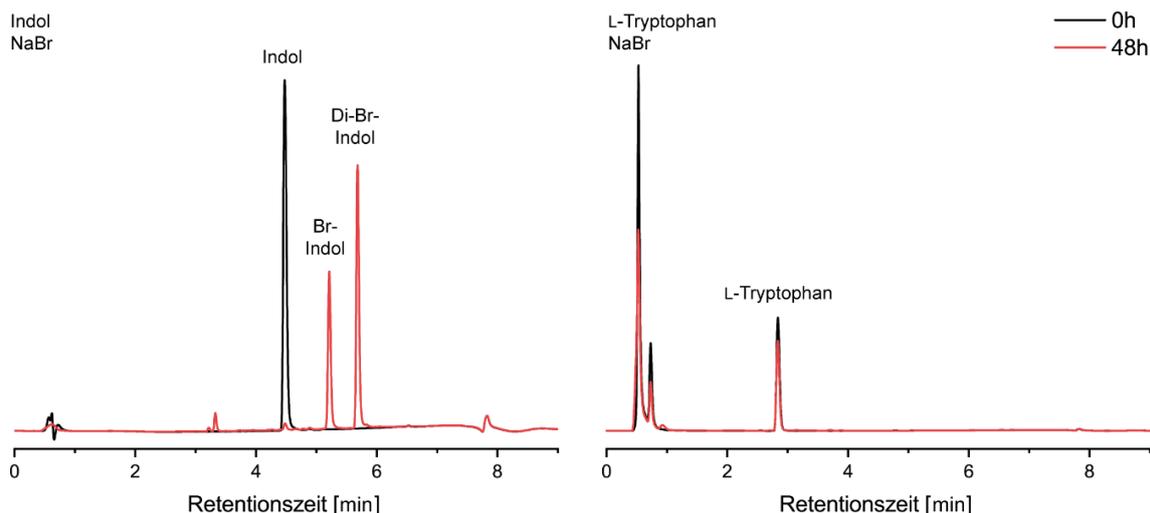


Abbildung 44: RP-HPLC-Chromatogramm von den Umsatzversuchen von HotH mit Indol (links) und L-Tryptophan (rechts) und NaBr als Halogenquelle inkubiert. Zur Cofaktor-Regenerierung wurden ADH und PrnF verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation von HotH mit Indol (t_R : 4.5 min) und NaBr entsteht als Produkt, sowohl Bromindol (t_R : 5.2 min, 36%) als auch Dibromindol (t_R : 5.8 min; 62%). Während keine Bromierung von L-Tryptophan (t_R : 2.8 min) durch HotH katalysiert wird.

Das Chromatogramm der RP-HPLC von dem Reaktionsansatz inkubiert mit HotH und Indol **54** zeigt, dass nach 48 h zu dem Eduktpeak (4.5 min) zwei weitere Peaks mit späteren Retentionszeiten (5.2 min und 5.8 min) gebildet worden sind. LC-ESI-MS-Messungen ergaben, dass es sich bei diesen beiden Produkten um Bromindol (36% Umsatz (RP-HPLC)) und Dibromindol (62% Umsatz (RP-HPLC)) handelt (Abbildung 45).

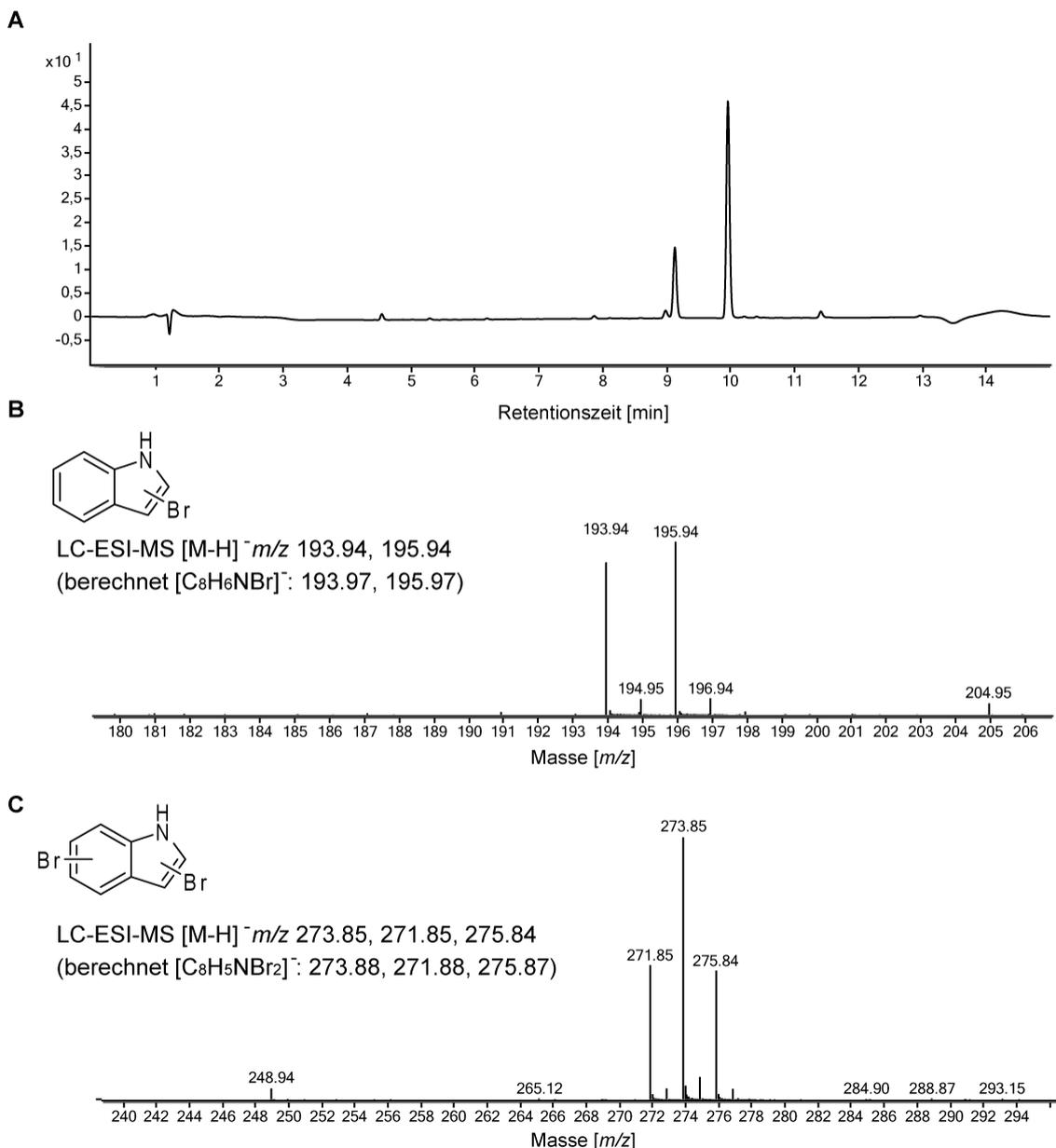


Abbildung 45: LC-ESI-MS-Chromatogramm von bromiertem und dibromiertem Indol, das aus der Inkubation von HotH mit Indol und NaBr nach 48 h gebildet wurde. **A:** 280 nm Chromatogramm, das die Produkte Bromindol (9.1 min) und Dibromindol (10 min) zeigt. **B:** MS⁻ Spektrum des Bromindols (9.1 min), das die korrekte Masse des Bromindols zeigt. **C:** MS⁻ Spektrum des Dibromindols (10 min), das die korrekte Masse des Dibromindols zeigt. Beide Massen wurden im Negativmodus aufgenommen.

Die Massenanalyse der beiden Produkte weist wie erwartet das typische Isotopenmuster des Broms auf (⁷⁹Br, ⁸¹Br), wodurch sich die Produkte eindeutig dem bromierten und dem dibromierten Indol zuordnen lassen. Indol wurde allerdings nicht zu 100% umgesetzt, 2% Edukt sind nach 48 h noch in der Reaktionslösung aufzufinden.

Dieses bestätigt, dass es sich bei der annotierten F-Hal HotH um ein aktives halogenierendes Enzym handelt. Insgesamt wurden Umsatzversuche mit HotH und 32 verschiedenen Verbindungen getestet, von denen 20 von HotH bromiert wurden (Abbildung 46). Es wurden hauptsächlich Indol-Derivate getestet, da diese in guten Umsätzen bromiert

wurden. Indol **54** und die einfach methylierten Indole (**55**, **56**, **57**) sowie 5-Fluorindol **61**, Indol-2-methanol **66** und Indol-3-propionsäure **75** werden von HotH nicht nur einfach bromiert, sondern auch dibromiert. Die anderen auf Umsatz positiv getesteten Substrate werden einfach bromiert. Ob eine Bromierung oder eine Dibromierung katalysiert wird, scheint somit vom Substrat abhängig zu sein. Zwei der auf Umsatz positiv getesteten Substrate weichen strukturell von den anderen Indol-Derivaten ab, werden aber dennoch von HotH bromiert. Dabei handelt es sich um L-Kynurenin **46** (24%), Azulen **70** (86%) und 4-*n*-Hexylresorcinol **71** (95%), die dennoch in guten Umsätzen bromiert werden.

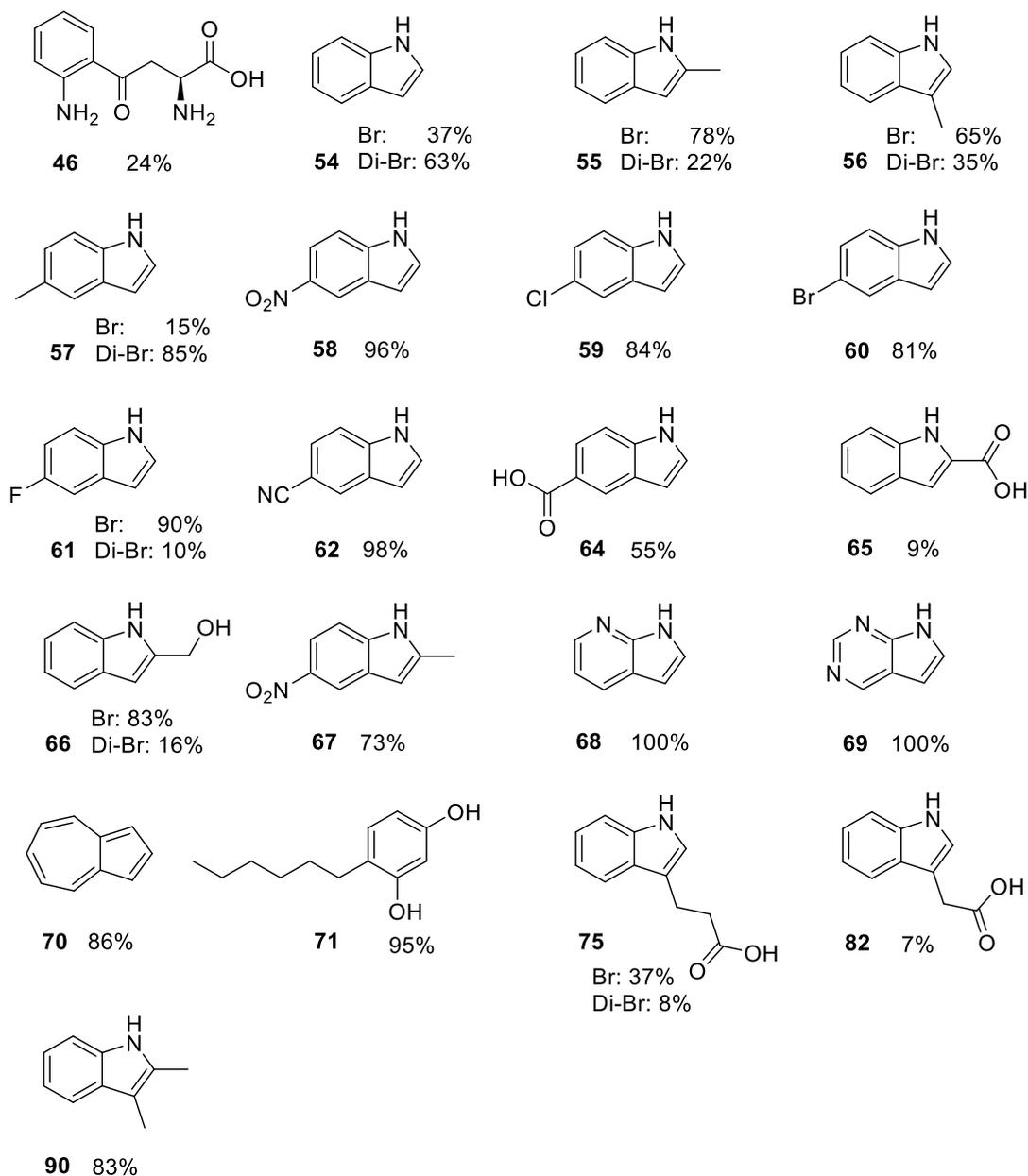


Abbildung 46: Strukturen der von HotH bromierten Substrate mit den prozentualen Produktumsätzen. Die prozentualen Produktumsätze wurden mittels RP-HPLC über die Flächen der Peaks ermittelt. P: Produktumsatz [%]; NP: Nebenprodukt Umsatz [%]

Für alle bromierten und dibromierten Verbindungen konnte die korrekte Masse mit passenden Isotopenmustern mittels LC-MS und GC-MS detektiert werden.

Keinen Umsatz zeigte HotH für 12 der 32 getesteten Verbindungen (Abbildung 47).

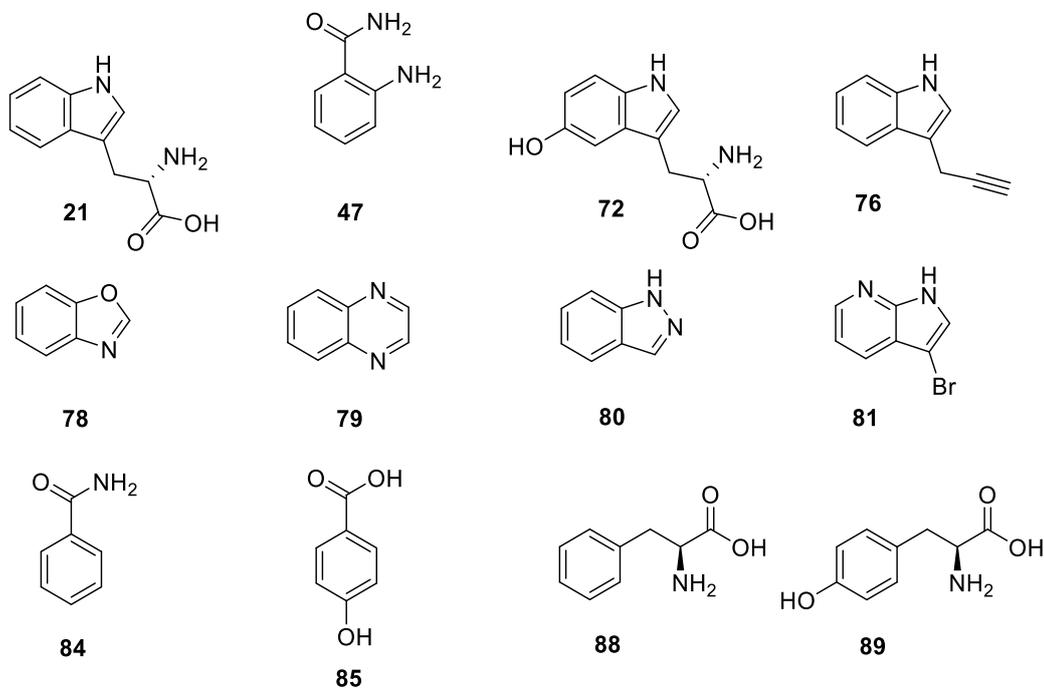


Abbildung 47: Strukturen der von HotH nicht bromierten Verbindungen.

HotH ist nicht in der Lage, die aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan **21**, Tyrosin **88** und Phenylalanin **89** zu bromieren sowie die getesteten Benzol-Derivate (**47**, **84**, **85**). 7-Azaindol **68** wird von HotH in guten Umsätzen bromiert, allerdings werden die anderen Azaindol-ähnlichen Verbindungen wie Benzoxazol **78**, Indazol **80**, 3-Brom-7-Azaindol **81** nicht umgesetzt. Wenn 3-Brom-7-azaindol **81** nicht umgesetzt wird, kann vermutet werden, dass 7-Azaindol **68** von HotH in C3-Position bromiert wird und aus diesem Grund das Produkt nicht weiter halogeniert werden kann.

Aus welchem Grund die Dibromierung auftritt geht aus diesen Versuchen nicht hervor. Eine Hypothese wäre, dass Verbindungen, die von HotH mit einer hohen Affinität bromiert werden können, auch dibromiert werden. Allerdings spricht dagegen, dass bei Indol, Indol-2-methanol und Indol-3-propionsäure kein vollständiger Umsatz beobachtet werden konnte. Die bereits bekannten Trp-Halogenasen KtzR und KtzQ sowie PrnA und PrnC und Bmp2 und Bmp5 treten zusammen im Gencluster auf [45, 83, 105]. Für HotH konnte gezeigt werden, dass zwei weitere putative F-Hals im selben Gencluster zu finden sind. Somit könnte HotH entweder wie KtzQ für die zweite Bromierung einer Verbindung zuständig sein oder wie im Fall von PrnA und PrnC oder Bmp2 und Bmp5 ein anderes Fragment in einer

Verbindung halogenieren. Bmp2 halogeniert zum Beispiel dessen natürliche Verbindung in einer Dreifachbromierung und Bmp5 in einer Dibromierung [105].

5.2.2.5. Vergleich der Substratumsätze der vier identifizierten Enzyme

Es wurde gezeigt, dass es sich bei allen vier identifizierten F-Hals (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) um aktive Enzyme handelt, die in der Lage sind Indol **54**, Indol-Derivate und ein paar weitere aromatische Verbindungen zu bromieren. Im Weiteren folgt ein kurzer Vergleich der Substrate der einzelnen Enzyme miteinander (Tabelle 10).

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der prozentualen Produktumsätze von BrvH, Pia-2, HotH und B38 nach 48 h Inkubation mit den einzelnen Substraten und NaBr. Hier werden nur die Substrate aufgelistet, die von mindestens einem der vier Enzyme bromiert wurden.; k.A.: Keine Angaben. Dieses Substrat wurde für das Enzym nicht getestet und dementsprechend können keine Angaben gemacht werden.; k.U.: Kein Umsatz. Dieses Substrat wurde getestet, aber wurde vom Enzym nicht umgesetzt.; NP: Nebenprodukte; Der prozentuale Produktumsatz wurde über die Integrale der RP-HPLC-Chromatogramme bestimmt.

Substrat	prozentualer Produktumsatz nach 48 h			
	BrvH	Pia-2	B38	HotH
Kynurenin 46	0%	0%	24%	24%
Anthranilsäure 48	100% (P1: 73%, P2: 27%)	36% (P1: 71%, P2: 29%)	100% (P1: 82%, P2: 18%)	0%
Indol 54	100%	100%	100%	Br: 37% DiBr: 63%
2-Methylindol 55	100%	100%	100%	Br: 78% DiBr: 22%
3-Methylindol 56	98%	98%	100%	Br: 65% DiBr: 35%
5-Methylindol 57	97%	98%	100%	Br: 15% DiBr: 85%
5-Nitroindol 58	89%	97 %	95%	96%
5-Chlorindol 59	41%	43%	47%	84%
5-Bromindol 60	52%	55%	65%	81%
5-Fluorindol 61	97%	100%	100%	Br: 90% DiBr: 10%
5-Cyanindol 62	99%	99%	99%	98%
5-Hydroxyindol 63	96%	94%	92%	k.A.

Substrat	prozentualer Produktumsatz nach 48 h			
	BrvH	Pia-2	B38	HotH
Indol-5-carbonsäure 64	95%	20 %	90%	55%
Indol-2-carbonsäure 65	35%	9%	35%	9%
Indol-2-methanol 66	100%	99%	100%	Br: 83% Di-Br: 16%
2-Methyl-5-nitroindol 67	78%	28% (4 NPs: 36%)	72%	73%
7-Azaindol 68	12%	96%	100%	100%
Pyrrol-2,3-pyrimidin 69	100%	100%	100%	100%.
Azulen 70	81%	98%	k.U	86%
4- <i>n</i> -Hexylresorcinol 71	67%	21% (4 NPs: 44%)	21% (11 NPs: 79%)	95%
Tryptophol 73	k.U.	5%	21%	k.A.
Indol-3-propionsäure 75	k.U.	2%	20%	Br: 37% Di-Br: 8%
Chinoxalin 79	k.U.	11%	3%	k.U
Indol-3-essigsäure 82	k.U.	k.U.	15%	7%
Phenol 87	k.U.	17%	23%	k.U.
2,3-Dimethylindol 90	k.U.	15%	31%	83%

Von keinem der Enzyme wurden die Verbindungen 5-Hydroxytryptophan **72**, Tryptamin **74**, Indol-3-azetonitril **76**, Indol-3-carbaldehyd **77**, Benzoxazol **78**, Indazol **80**, 3-Hydroxybenzoesäure **85** noch die aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan **21**, Tyrosin **88** und Phenylalanin **89** umgesetzt.

Generell scheinen sich die Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH bezüglich ihres Substratspektrums zu ähneln, da alle Indol **54** und dessen Derivate bromieren. Dennoch unterscheiden sie sich in manchen Substraten und in deren prozentualen Umsätzen, zum Beispiel für den Umsatz von 7-Azaindol **68**, welches von Pia-2, HotH und B38 zu über 95%

umgesetzt wird, während BrvH das Substrat nur zu 12% zum bromierten Produkt umsetzt oder 2,3-Dimethylindol **90**, welches nur von Pia-2, B38 und HotH bromiert wird.

Die Halogenindole (**59**, **60**, **61**) werden von BrvH, Pia-2 und B38 in der Reihenfolge umgesetzt, dass Fluorindol **61** mit dem höchsten prozentualen Umsatz und 5-Chlorindol **59** mit dem niedrigsten prozentualen Umsatz bromiert wird. HotH setzt 5-Chlorindol (84%) und 5-Bromindol (81%) in ähnlichem Maße um, während 5-Fluorindol zu 90% bromiert und 10% dibromiert wird. Die Substituenten Fluor, Brom und Chlor weisen alle einen +M -, -I -Effekt auf. Allerdings unterscheiden sich diese im Van-der-Waals Radius. Brom ist der größte Substituent, während Fluor der kleinste ist. Somit scheint eventuell Fluor mit dem kleineren Van-der-Waals Radius besser ins aktive Zentrum zu passen und wird deshalb mit einem höheren Umsatz als die anderen Halogenindole (**59**, **60**) halogeniert.

Ein weiterer großer Unterschied der Enzyme liegt in der Mono- und Dibromierung. HotH ist das einzige der vier Enzyme, das mehrere Substrate nicht nur mono-, sondern auch dibromiert.

Das Enzym BrvH zeigt keine Bromierungsaktivität zu Indol-Derivaten mit größeren Substituenten an C3-Position. Dazu zählen L-Tryptophan **21**, Tryptophol **73**, Tryptamin **74**, Indol-3-propionsäure **75** und Indol-3-essigsäure **82**. Pia-2, B38 und HotH können zwar auch nicht die Bromierung von L-Tryptophan **21** katalysieren, aber die von Tryptophol **74** und Indol-3-propionsäure **75**. Pia-2 weist sehr geringe Umsätze zu diesen Substraten auf (2% und 5%) im Gegensatz zu B38 (20% und 21%) oder HotH (Indol-3-propionsäure: Br: 37%; Di-Br: 8%), welches nicht nur die Bromierung, sondern auch die Dibromierung von Indol-3-propionsäure **75** katalysiert. Indol-3-propionsäure **75** unterscheidet sich vom L-Tryptophan **21** nur durch die Aminogruppe. Dieser Unterschied scheint ausreichend, um keine Halogenierung katalysieren zu können und liegt vermutlich in der korrekten Bindung im aktiven Zentrum begründet. Indol-3-essigsäure wird nur von B38 und HotH in geringen Umsätzen (15% und 7%) bromiert. Diese Verbindung ist in der Natur sehr interessant, da es in Pflanzen als Phytohormon vorkommt und zu der Klasse der Auxine gehört. Zusätzlich können manche Bakterien Indol-3-essigsäure produzieren, um zum Beispiel mit Pflanzen zu interagieren und diese zu kolonialisieren oder nutzen dieses auch als bakterielles Signalmolekül [159]. Eine nicht indolische Verbindung, die dennoch dem L-Tryptophan **21** ähnlich ist, ist das L-Kynurenin **46**. Dieses wird auch von B38 und HotH jeweils zu 24% bromiert. Somit scheinen sich B38 und HotH dahingehend von BrvH und Pia-2 zu unterscheiden, dass diese auch länger-kettige Seitenketten in C3-Position im Indolring akzeptieren.

Auch nicht indolische Verbindungen werden von den identifizierten F-Hals umgesetzt. Zu diesen gehört zum Beispiel Phenol **87**, das von Pia-2 und B38 in geringem Maße halogeniert wird oder auch die Anthranilsäure **48**. Diese wird von BrvH und B38 vollständig und von Pia-2 zu 36% innerhalb von 48 Stunden umgesetzt, wobei nicht nur ein, sondern zwei bromierte Produkte entstehen. Bei den beiden Produkten könnte es sich um die in *ortho* und *para* bromierte Anthranilsäure handeln. Denn die Trp-Halogenase PyrH halogeniert die Anthranilsäure in *para* Position, während PrnA diese in einem Mix aus *ortho* und *para* halogeniert. Der Umsatz der Monobromierung der Anthranilsäure kann für die Pharma- und Agrarindustrie interessant sein, da diese die halogenierte Anthranilsäure zur Synthese verwenden und in der chemischen Halogenierung häufig dihalogenierte Nebenprodukte in C3- und C5-Position entstehen [65].

Interessanterweise wird das Anthranilamid **47** von keiner der identifizierten F-Hals halogeniert. Somit zeigt sich erneut, dass der Unterschied im Amid zur Inakzeptanz führen kann. Im Unterschied dazu bevorzugen PrnA und PyrH beispielsweise das Anthranilamid **47** vor der Anthranilsäure **48** [65]. Auch andere Phenol-Derivate wie Benzamid **84**, 4-Hydroxybenzoesäure **85** oder Nicotinsäure **86** werden nicht von BrvH, Pia-2, B38 und HotH umgesetzt, obwohl sie strukturell der Anthranilsäure ähneln.

Eine weitere nicht indolische Verbindung ist das L-Kynurenin **46**. Dieses wird von B38 und HotH jeweils zu 24% bromiert. Im Vergleich dazu zeigen, die Trp-Halogenase PrnA und PyrH bessere prozentuale Umsätze [65].

Auch die nicht indolische Verbindung 4-*n*-Hexylresorcinol **71** wurde von allen vier identifizierten F-Hals akzeptiert. BrvH und HotH halogenierten diese zu einem bromierten Produkt, während der Umsatz von Pia-2 und B38 zu vielen Nebenprodukten führte. Alkylresorcinole wurden sowohl in Pflanzen, Insekten und Algen, als auch in Bakterien und Pilzen gefunden. Sie weisen viele biologische Aktivitäten wie antioxidante, antibakterielle, cytotoxische Wirkung auf und werden aber auch für die Signalweitergabe verwendet. Auch halogenierte Alkylresorcinole wurden identifiziert, deren Halogenierungen regioselektiv sind [160].

Um noch weitere Rückschlüsse bezüglich des natürlichen Substrates ziehen zu können, sollten noch weitere Substratklassen, die sich vom Indolring unterscheiden sowie phenolische Verbindungen und weitere Alkylresorcinole getestet werden.

5.2.3. Prominente Nebenreaktionen

Indole sind reaktive Heterozyklen mit der reaktivsten Stelle an C3-Position. Diese reagieren sehr gut über die elektrophile Substitution sowohl mit anderen Verbindungen als auch mit sich selbst zu Dimeren oder Trimeren [161].

Es traten bei den Enzymversuchen mit aufgereinigtem BrvH und Indol zwei Nebenprodukte auf, die mit der Zeit zunahm (Abbildung 48).

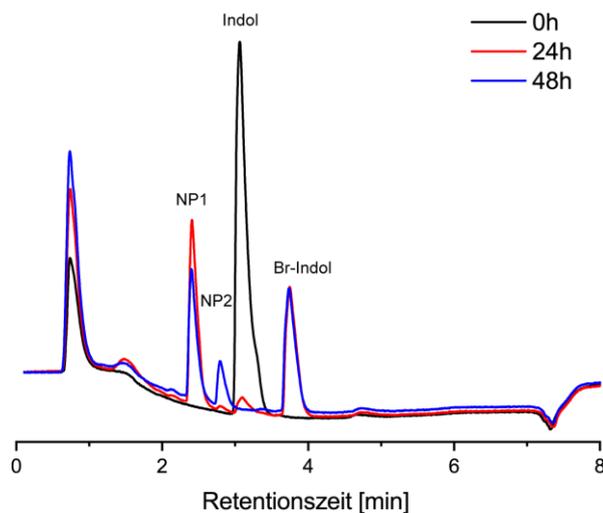


Abbildung 48: RP-HPLC (280 nm) des Reaktionsansatzes von aufgereinigtem BrvH mit Indol nach 24 h und 48 h bei 25°C. Indol (3.2 min) wird zu Bromindol (3.9 min) umgesetzt. Es entstehen zusätzlich zwei weitere Nebenprodukte, NP1 (2.5 min) und NP2 (2.9 min).

Diese Nebenprodukte traten nicht bei Enzymreaktionen mit Enzym im Lysat auf. Dieses legt nahe, dass eine Verbindung, die bei der Aufreinigung des Enzyms eingebracht wird mit Bromindol zu den Nebenprodukten 1 und 2 (NP1 und NP2) reagiert. Bei der Aufreinigung der Enzyme wurde für die Elution von der Kobalt-TALON Matrix Imidazol in hohen Konzentrationen (300 mM) eingebracht, um das Enzym von der Matrix zu verdrängen. Das heißt, dass in den Enzymreaktionsansätzen hohe Konzentrationen an Imidazol vorhanden waren, die sowohl mit Indol als auch dem Produkt Bromindol reagieren konnten. LC-MS-Messungen bestätigten, dass sich nach 48 h sowohl eine Verbindung bestehend aus Indol und Imidazol als auch die bromierte Verbindung gebildet haben (Abbildung 49).

Bei den gebildeten Produkten könnte es sich um 2-(1*H*-imidazol-4-yl)-1*H*-indol aber auch 2-(1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-indol handeln, da die C4- und C5-Position im Imidazolring die höchsten Elektronegativitäten aufweisen.

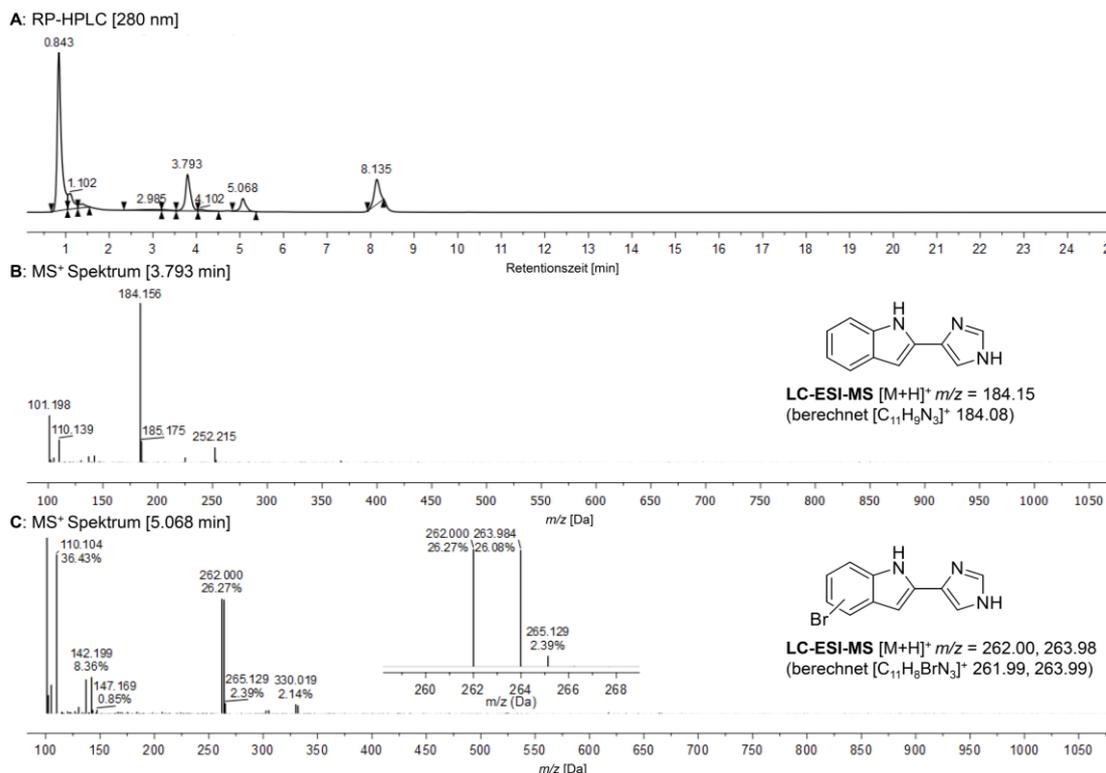
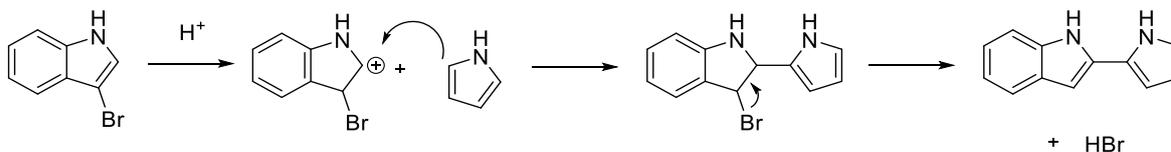


Abbildung 49: LC-ESI-MS Chromatogramme der Produkte von aufgereinigtem BrvH inkubiert mit Indol über 48 h bei 25°C. **A:** RP-HPLC Chromatogramm (280 nm) zeigt das Hauptprodukt, Bromindol (8.14 min) und die beiden Nebenprodukte NP1 (3.79 min) und NP2 (5.07 Min); **B:** MS⁺-Spektrum des NP1; **C:** MS⁺-Spektrum des NP2

Diese Produktbildung wurde schon von Bocchi und Palla mit Indol und Pyrrol beschrieben [162]. Diese postulierten, dass eine protische Säure ein Bromindolinium Kation bildet, welches die elektrophile reaktive Spezies hervorruft. Diese reagiert dann entweder mit Indol, Pyrrol oder in diesem Fall mit Imidazol und rearomatisiert durch die Abspaltung des Bromsubstituenten (Schema 1).



Schema 1: Postulierter Reaktionsmechanismus der Reaktion von 3-Bromindol mit Pyrrol von Bocchi und Palla [162].

Zusätzlich bildet sich nach 48 h noch ein weiteres Nebenprodukt (NP2), das nach 24 Stunden noch nicht vorhanden war. Dieses stellt die bromierte Spezies von NP1, 2-(1*H*-imidazol-4-yl)-1*H*-indol dar. NP2 könnte durch das entstandene Bromwasserstoff gebildet werden oder BrvH ist in der Lage 2-(1*H*-imidazol-4-yl)-1*H*-indol zu halogenieren. Dieses wurde allerdings nicht genauer untersucht.

Um der Nebenproduktbildung entgegen zu wirken, wurde nach der Enzymaufreinigung über eine Entsalzungssäule der Puffer sowohl von BrvH als auch von der Flavinreduktase, PrnF

gewechselt, was dazu führte, dass NP1 und NP2 nicht mehr gebildet wurden (Abbildung 50).

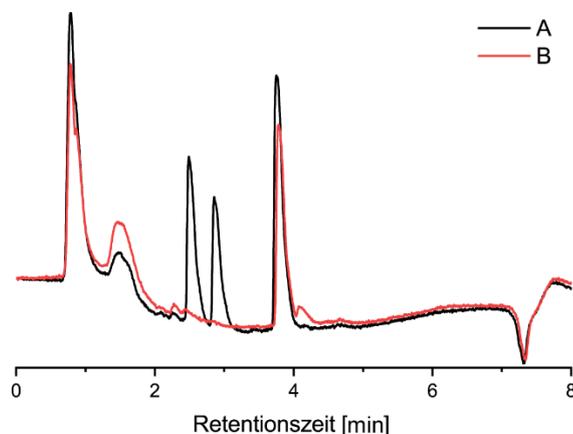


Abbildung 50: RP-HPLC-Chromatogramme (280 nm) der Enzymreaktionsansätze mit aufgereinigtem BrvH und Indol (0.5 mM) nach 18 h Inkubation bei 25°C. **A:** Enzymreaktion mit aufgereinigtem Enzym ohne Puffertausch; **B:** Enzymreaktion mit aufgereinigtem Enzym mit getauschtem Puffer ohne Imidazol.

Bei den größeren Reaktionsansätzen mittels *combi*CLEAs reagierten auch die Indol-Derivate 5-Hydroxyindol, 5-Cyanindol und Indol-2-methanol nach der Aufreinigung mit der präparativen HPLC. Nach der Aufreinigung der Produkte mit der präparativen RP-HPLC enthalten die Lösungen 0.1% TFA, was vermutlich die spontane Dimerisierung der Produkte förderte und in der Literatur schon beschrieben wurde [161, 162]. Wurde der TFA-Anteil für die Aufreinigung nicht eingesetzt, konnte 3-Brom-5-cyanindol erhalten werden. Für die anderen drei Substrate war dieses allerdings nicht möglich, da dennoch das Produkt spontan dimerisierte.

5.2.4. Bestimmung der Regioselektivität der einzelnen Enzyme

Im Folgenden wurde die Position der Bromierung der verschiedenen Substrate durch die vier Enzyme untersucht. Besonders interessant ist die Fragestellung, ob die Substituenten im Indolring Einfluss auf die Regioselektivität der FHal nehmen. Sowohl Frese *et al.* [82] als auch Hölzer *et al.* [80] konnten zeigen, dass unterschiedliche Substituenten zu veränderten Regioselektivitäten führen können. Zur Bestimmung der Position der Bromierung wurden die Enzyme jeweils mit den Kofaktor-regenerierenden Enzymen PrnF (Flavinreduktase) und RR-ADH (Alkoholdehydrogenase) immobilisiert. Für die Immobilisierung wurde die von Frese *et al.* etablierte Methode der *combi*CLEAs gewählt [27]. Hierbei werden die im Zell-Lysat befindlichen heterolog exprimierten Enzyme über deren enthaltene Lysine mittels Glutaraldehyd quervernetzt und somit immobilisiert. Für die Bestimmung der Regioselektivität wurden 1.5 mM Substrat in 500 mL Reaktionsansatz eingesetzt und mit den immobilisierten Enzymen bis zu 11 Tage bei 25°C inkubiert. Danach wurden das Rohprodukt extrahiert, über die präparative RP-HPLC aufgereinigt und mittels NMR-Spektroskopie analysiert.

5.2.4.1. 3-Bromindol

Für die Enzyme BrvH, Pia-2 und HotH wurde die Position der Bromierung im Indolring bestimmt. 3-Bromindol wurde aus der Reaktion mit BrvH mit einer Ausbeute von 24.6% (0.18 mmol; 35.9 mg) von Pia-2 von 35.6% (0.267 mmol; 52.05 mg) und von HotH von 16.8% (0.126 mmol; 24.6 mg) erhalten. Abbildung 51 zeigt das erhaltene ¹H-NMR Spektrum des von BrvH katalysierten 3-Bromindols. Dieses steht stellvertretend für die Produkte von Pia-2 und HotH, da durch die Enzyme das gleiche Produkt erhalten wurde und sich somit die NMR-Spektren gleichen.

Das Singulett bei 11.46 ppm (Pia-2, HotH: 11.47 ppm) kann dem Proton der NH-Gruppe zugeordnet werden kann. Die restlichen Signale befinden sich alle in einem Bereich mit einer chemischen Verschiebung zwischen 7.54 und 7.11 ppm, die dem aromatischen Bereich angehören und dem Indolring zugeordnet werden können. Das Doppeldublett bei 7.42 ppm (C⁷H) (Pia-2: 7.44 ppm, HotH: 7.43 ppm) weist eine ³J-Kopplung (8.2 Hz) zum C⁶H (7.18 ppm), während das Doppeldublett mit einer chemischen Verschiebung von 7.4 ppm (C⁴H) mit C⁵H (7.11 ppm, 7.9 Hz) vicinal koppelt. Außerdem weisen C⁶H (7.18 ppm) und C⁵H (7.11 ppm) eine ³J-Kopplung (6.9 Hz) auf. Somit ist das Proton bei 7.42 ppm der C7-Position im Indolring, das Proton bei 7.4 ppm der C4-Position, das Proton bei 7.18 ppm der C6-Position und das Proton bei 7.11 ppm der C5-Position zuzuordnen. Diese Zuordnungen werden von dem ¹H,¹H-COSY unterstrichen. Zusätzlich kann durch Kreuzkopplung der NH-Gruppe mit dem Proton an C2 die Bromierung an Position C3

bestätigt werden. Dieses Signal stellt ein Dublett dar, da es mit der NH-Gruppe des Indolrings schwach koppelt.

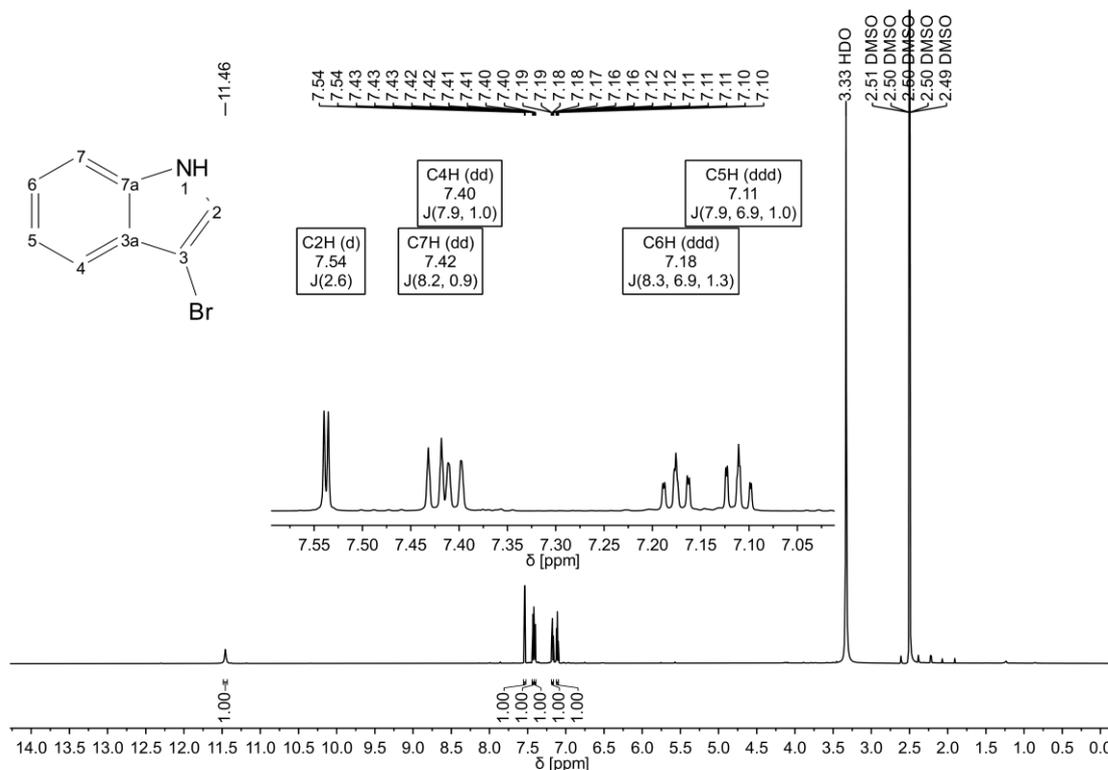


Abbildung 51: ¹H NMR-Spektrum von 3-Bromindol (600 MHz, DMSO-*d*₆); δ [ppm]: 11.46 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.18 (ddd, *J* = 8.3, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 7.11 (ddd, *J* = 7.9, 6.9, 1.0 Hz, 1H). Hergestellt durch die Bromierung von Indol über das immobilisierte Enzym, BrvH.

Somit kann gezeigt werden, dass die Enzyme BrvH, Pia-2 und HotH Indol in C3-Position zum 3-Bromindol bromieren. Die gemessene Masse, die über die Feinmassenanalyse (HRMS) bestimmt wurde, bestätigt zusätzlich das Produkt (theoretische Masse [C₈H₆BrN]⁻ *m/z* 194.9589; beobachtete Masse: 194.9862)

5.2.4.2. 3-Brom-2-methylindol

Die Position der Bromierung von 2-Methylindol der Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH konnte über NMR-spektroskopische Analyse an der C3-Position bestimmt werden. Dieses wurde in Ausbeuten 9.2% (0.069 mmol; 14.5 mg) von durch BrvH, von 18.9% (0.142 mmol; 29.6 mg) von Pia-2, von 19.1% (0.143 mmol; 29.9 mg) durch B38 und von 24.3% (0.1818 mmol; 38 mg) durch HotH erhalten. Alle vier ¹H NMR Spektren gleichen sich, da es sich um das gleiche Produkt handelt, wird in Abbildung 52 nur das Produkt 3-Brom-2-Methylindol aus der Inkubation von Pia-2 in *combi*CLEAs mit 2-Methylindol gezeigt.

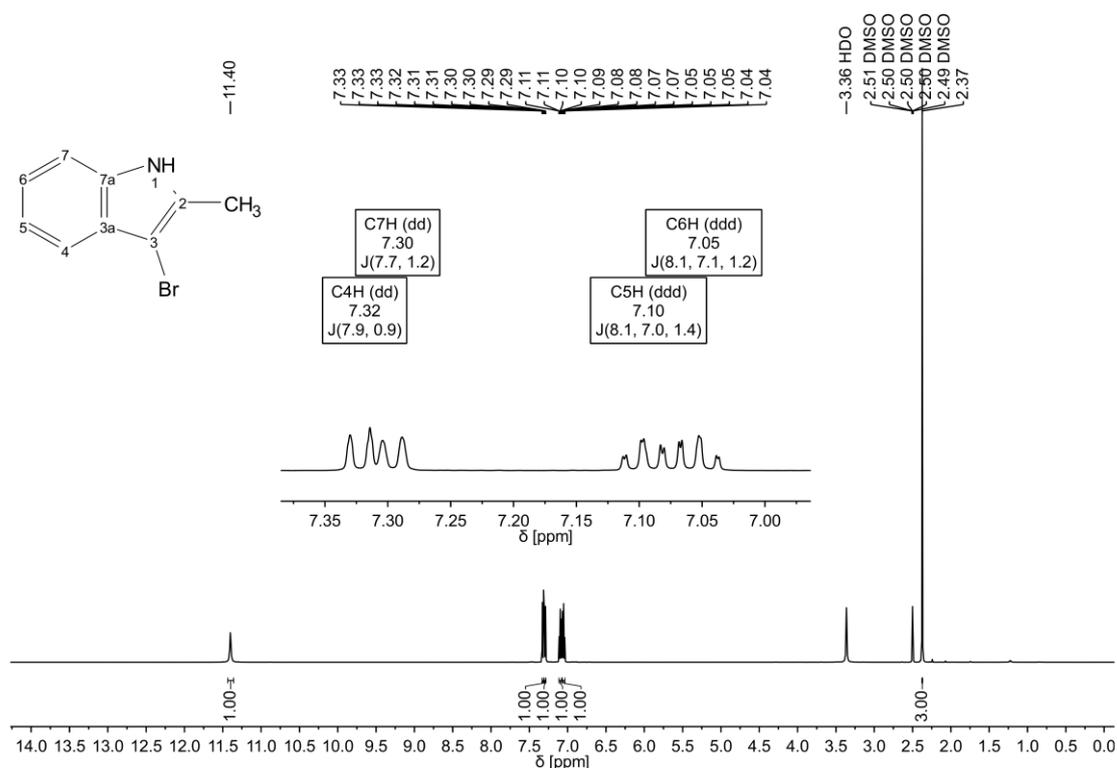


Abbildung 52: ¹H NMR-Spektrum von 3-Brom-2-methylindol (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.40 (s, 1H), 7.32 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 7.10 (ddd, *J* = 8.1, 7.0, 1.4 Hz, 1H), 7.05 (ddd, *J* = 8.1, 7.1, 1.2 Hz, 1H), 2.37 (s, 3H). Das Produkt wurde durch Pia-2, immobilisiert in *combi*CLEAs inkubiert mit 2-Methylindol erhalten. Dieses ¹H NMR Spektrum belegt die selektive Bromierung von Pia-2 in Position C3.

Das Signal mit einer chemischen Verschiebung von 11.4 ppm ist dem Proton der NH-Gruppe zuzuordnen. Das Singulett mit 2.37 ppm (BrvH, B38: 2.37 ppm; HotH: 2.38 ppm) und einem Integral von drei weist auf die Methylgruppe in C2-Position hin. Der aromatische Bereich weist mehrere Signale zwischen 7.32 und 7.05 ppm auf. ³*J*-Kopplungen mit 8.1 Hz weisen die Signale der Protonen C⁵H und C⁶H auf. Die Protonen C⁷H und C⁶H koppeln auch miteinander (7.7 Hz). ¹H,¹H-COSY Messungen ergaben, dass C⁴H und C⁵H (7.9 Hz) koppeln. Zusätzlich konnte über die Feinmassebestimmung (HRMS) die korrekte Masse des 3-Brom-2-methylindol (theoretische Masse [C₉H₇BrN] *m/z* 207.9767, beobachtete Masse: 207.9757) verifiziert werden. Somit konnten die Protonen Signale den Positionen im Indolring zugeordnet und gezeigt werden, dass die Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH die Bromierung von 2-Methylindol in C3-Position zum 3-Brom-2-methylindol katalysieren.

5.2.4.3. 2-Brom-3-methylindol

Aus den *combi*CLEAs der Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH jeweils inkubiert mit 3-Methylindol resultierte jeweils das Produkt 2-Brom-3-methylindol. Generell zeigten die Enzyme immobilisiert in *combi*CLEAs sehr geringe Ausbeuten mit 3-Methylindol als Substrat. So wurden mit BrvH 0.7% (5.5 μmol; 1.1 mg), Ausbeute, mit Pia-2 1.5% (0.0115 mmol; 2.4 mg) Ausbeute, mit B38 2.4% (0.0177 mmol; 3.7 mg) Ausbeute und mit

HotH 10.9% (0.0813 mmol; 17 mg) Ausbeute erhalten. Die Ausbeute von BrvH war so gering, dass nur ein $^1\text{H-NMR}$ Spektrum aufgenommen werden konnte. Dieses entspricht allerdings den $^1\text{H-NMR}$ Spektren der anderen Produkte, weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich um dasselbe Produkt handelt. Da die spektroskopischen Ergebnisse für alle vier Enzyme gleich sind, wird im Folgenden nur das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum vom Produkt von Pia-2 diskutiert (Abbildung 53).

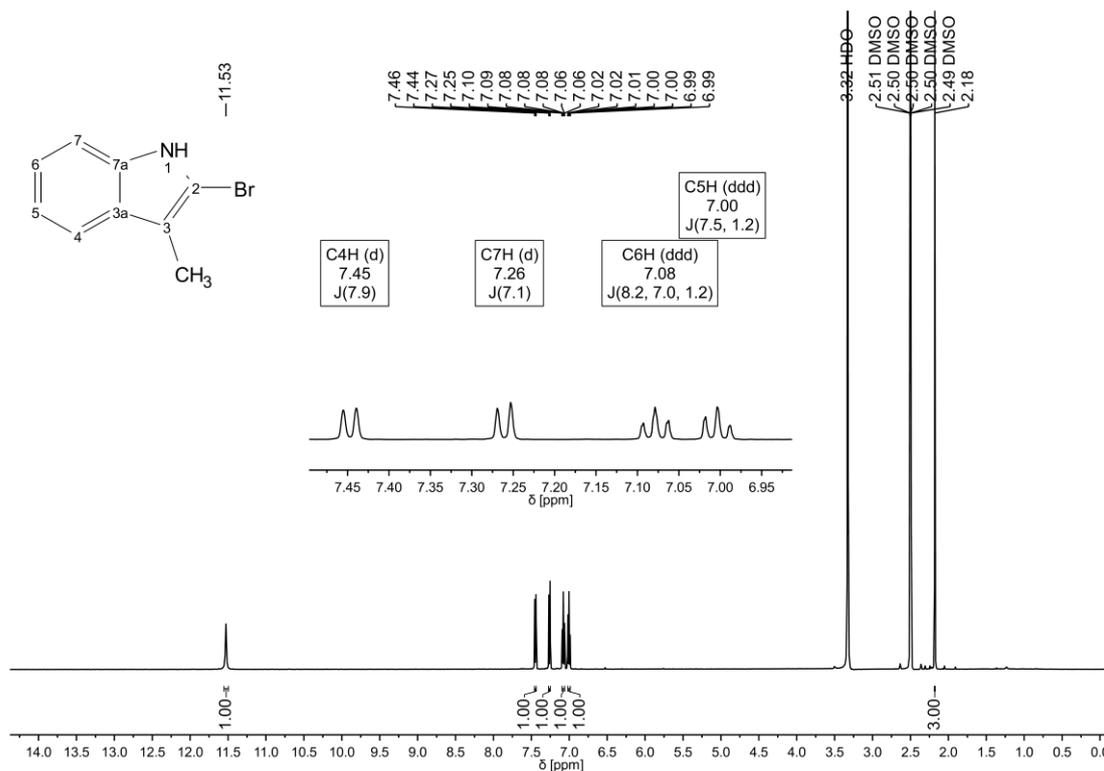


Abbildung 53: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2-Brom-3-methylindol (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.53 (s, 1H), 7.45 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.08 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.00 (ddd, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H). Das Produkt wurde durch Pia-2, immobilisiert in *combi*CLEAs inkubiert mit 3-Methylindol erhalten. Dieses $^1\text{H-NMR}$ Spektrum belegt die selektive Bromierung von Pia-2 in Position C2.

Das Singulett bei 11.53 ppm (BrvH, B38 11.53 ppm; HotH:11.54 ppm) zeigt das Proton des Stickstoffs und das Singulett bei 2.18 ppm mit einem Integral von 3 die Methylgruppe des 3-Methylindols. Die restlichen Signale sind im aromatischen Bereich des Spektrums wiederzufinden. Hier koppelt das C⁶H Proton bei 7.08 ppm über 3J -Kopplung mit dem C⁵H Proton bei 7.00 ppm (8.2 Hz/7.5 Hz) und weiterhin das C⁶H Signal bei 7.08 ppm mit dem C⁷H Dublett bei 7.26 ppm (7.0/7.1 Hz). Das $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$ Spektrum weist außerdem auf eine Kopplung zwischen dem Signal bei 7.00 ppm und 7.45 ppm Dublett (C⁴H) hin. Weiterhin ist keine Kopplung vom Indol-NH mit dem C²H sichtbar, was die Bromierung in Position C2 bestätigt. Somit lassen sich alle Signale den Protonen des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums zuordnen und bestätigen, dass die Bromierung in C2-Position stattgefunden hat, welches das Produkt 2-Brom-3-methylindol für alle vier Enzyme bestätigt.

5.2.4.4. 3-Brom-5-methylindol

5-Methylindol wurde zu 3-Brom-5-methylindol von den Enzymen BrvH (11.8%; 0.089 mmol; 18.5 mg), Pia-2 (26.2%; 0.196 mmol; 41mg) und HotH (35.1%; 0.263 mmol; 55mg) bromiert. Alle NMR-Analysen des erhaltenen 3-Brom-5-methylindol aus den mit den drei unterschiedlichen Enzymen inkubierten Ansätzen gleichen sich. Dieses unterstreicht, dass bei allen drei Enzymen dasselbe Produkt entstanden ist. Aus dem Grund wird im Folgenden nur das ^1H -NMR des 3-Brom-5-methylindols gezeigt, dass aus der Inkubation von BrvH in *combi*CLEAs mit 5-Methylindol erhalten wurde (Abbildung 54).

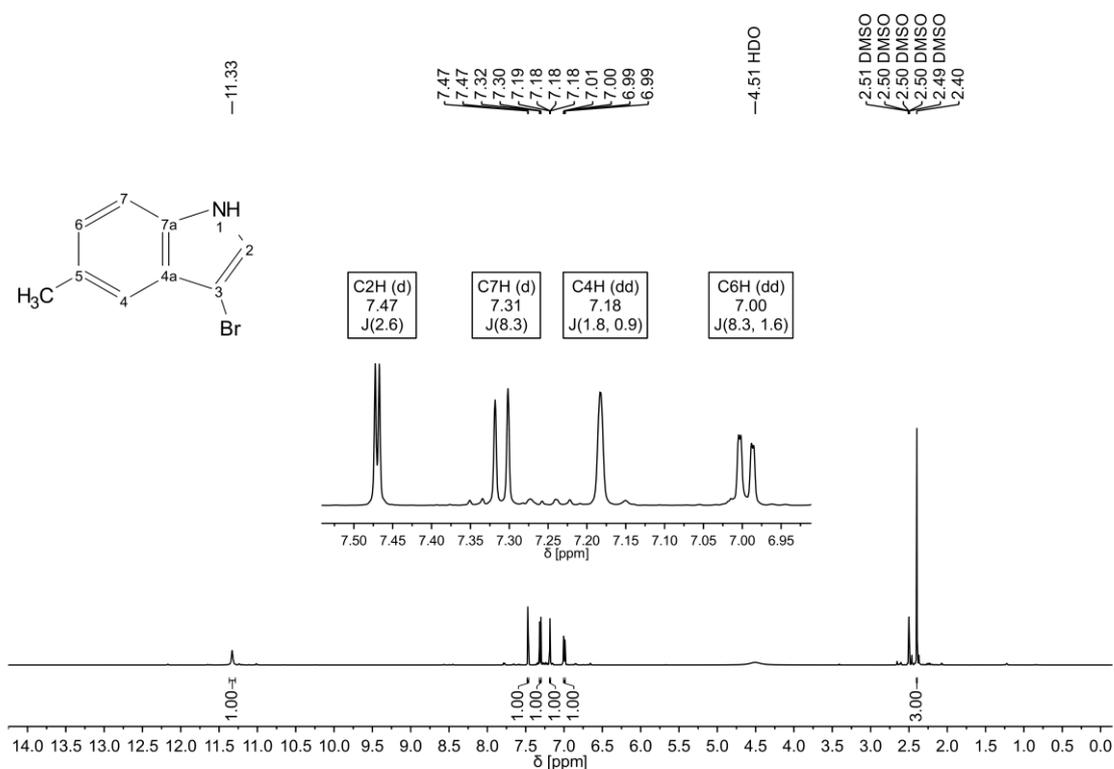


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Brom-5-methylindol (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.47 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 1.8, 0.9$ Hz, 1H), 7.00 (dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, 1H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit BrvH und 5-Methylindol erhalten.

Das Singulett bei 11.33 ppm lässt sich der NH-Gruppe des Indolrings zuordnen und das Singulett bei 2.40 ppm (HotH: 2.40 ppm, Pia-2: 2.39 ppm) mit einem Integral von drei der Methylgruppe an C5-Position des Indolrings. 3J -Kopplungen weisen die Protonen C⁶H und C⁷H (8.3 Hz) und 4J -Kopplung die Protonen C⁴H und C⁶H (1.8 Hz und 1.6 Hz) auf. Über $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY 2D-Spektroskopie koppelt C²H (7.47 ppm) mit dem Proton der Stickstoffgruppe und kann somit der C2-Position im 5 Ring des Indols zugewiesen werden, was bedeutet, dass die C2-Position nicht bromiert vorliegt. Somit lassen sich alle Protonen der ^1H -NMR Analysen zu ordnen und es zeigt sich, dass alle drei Enzyme (BrvH, Pia-2, HotH) die Bromierung in C3-Position zum 3-Brom-5-methylindol katalysieren.

5.2.4.5. 3-Brom-5-nitroindol

Die Regioselektivität der Bromierung von BrvH, Pia-2, B38 und HotH von 5-Nitroindol konnte über die Immobilisierung der jeweiligen Enzyme mittels *combi*CLEAs bestimmt werden. Für alle vier Enzyme wurde das gleiche Produkt, 3-Brom-5-nitroindol (Ausbeuten: BrvH: 4.5% (0.034 mmol; 8.2 mg), Pia-2: 12.8% (0.0954 mmol; 22.9 mg), B38: 9.8% (0.0733 mmol; 17.6 mg), HotH: 18.43% (0.138 mmol; 33 mg) erhalten. Aus diesem Grund wird im Folgenden das $^1\text{H-NMR}$ von 3-Brom-5-nitroindol aus der Katalyse mit Pia-2 stellvertretend für die anderen Enzyme diskutiert (Abbildung 55).

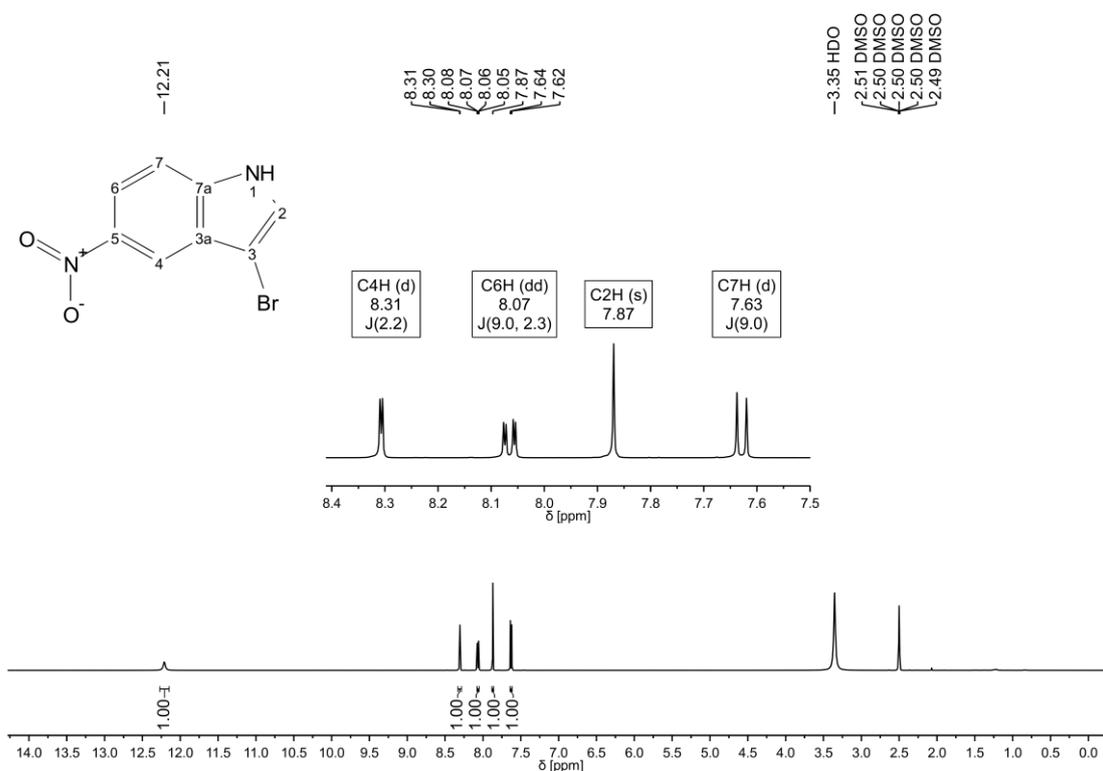


Abbildung 55: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 3-Brom-5-nitroindol (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.21 (s, 1H), 8.1 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 8.07 (dd, $J = 9.0, 2.3$ Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit Pia-2 und 5-Nitroindol erhalten.

Das Singulett bei 12.21 ppm (BrvH: 12.21 ppm, B38 und HotH: 12.20 ppm) ist dem Proton der Stickstoffgruppe des Indolrings zuzuordnen. Die anderen Signale sind alle im aromatischen Bereich zu finden (8.31 ppm bis 7.63 ppm). Hierbei weist das Doppeldublett bei 8.07 ppm eine 3J -Kopplung zum C⁷H (9.0 Hz) und eine 4J -Kopplung zum C⁴H (2.2 Hz/2.3 Hz) und kann somit der C6-Position zugeordnet werden. Das Singulett bei 7.87 ppm kann dem Proton an C2-Position zugeordnet werden. Da die C3-Position bromiert ist, kann es mit keinem anderen Proton koppeln. Bei den $^1\text{H-NMR}$ Analysen der halogenierten 5-Nitroindole von BrvH und B38 stellen diese Signale Dubletts dar. Dieses liegt in der Kopplung des C²H mit dem Stickstoffproton begründet. Weiterhin zeigen $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Analysen, dass das Signal bei 7.87 ppm mit dem Stickstoffproton koppelt und es

sich damit tatsächlich um das C²H handelt. Somit konnte über NMR-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen werden, dass die Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH 5-Nitroindol an der C3-Position bromieren. Zusätzlich bestätigte die HRMS-Messung die korrekte Masse des Produktes (theoretische Masse [C₈H₄BrN₂O₂]⁻ *m/z* 238.9462; beobachtete Masse: 238.9448)

5.2.4.6. 3-Brom-5-cyanindol

3-Brom-5-cyanindol wird von BrvH und Pia-2 mit einer Ausbeute von 31.6% (0.237 mmol; 52.3 mg) und 37.8% (0.282 mmol; 62 mg) erhalten. Beide Enzyme katalysieren die Bromierung von 5-Cyanindol an Position C3. Deshalb wird im Weiteren nur das ¹H-NMR Spektrum von 3-Brom-5-cyanindol gezeigt, dass aus der Inkubation von BrvH immobilisiert in *combi*CLEAs mit 5-Cyanindol erhalten wurde (Abbildung 56).

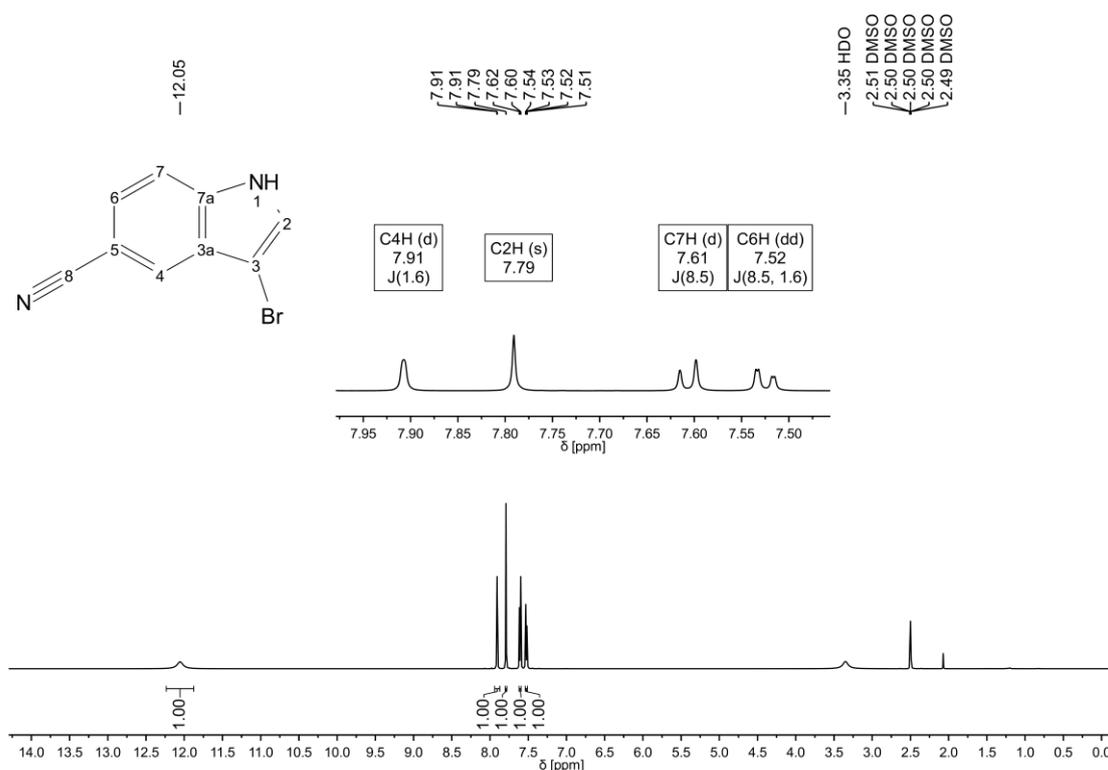


Abbildung 56: ¹H NMR-Spektrum von 3-Brom-5-cyanindol (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.05 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.5, 1.6 Hz, 1H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit BrvH und 5-Cyanindol erhalten.

Das Singulett bei 12.05 ppm (Pia-2: 12.04 ppm) zeigt das Stickstoffproton im Indolring. Die anderen Signale wurden alle im aromatischen Bereich identifiziert. Das Doppeldublett bei 7.52 ppm (Pia-2: 7.53 ppm) weist eine ³*J*-Kopplung zum C⁷H Signal bei 7.61 ppm (8.5 Hz) und eine ⁴*J*-Kopplung zum Dublett bei 7.91 ppm (1.6 Hz). Somit stellt das Doppeldublett (7.52 ppm/7.53 ppm) das C⁶H dar und das Dublett bei 7.91 ppm das Proton an C4-Position. Das Singulett bei 7.79 ppm ist dem C²H Proton zuzuordnen, da es im ¹H,¹H-COSY mit dem

Stickstoffproton koppelt. Damit kann geschlossen werden, dass BrvH und Pia-2 5-Cyanindol in C3-Position zum 3-Brom-5-cyanindol bromieren. Außerdem bestätigt die HRMS-Messung des Produktes die korrekte Masse (theoretische Masse $[\text{C}_9\text{H}_4\text{BrN}_2]^+$ m/z 218.9563; beobachtete Masse: 218.9551).

5.2.4.7. 3,5-Bromindol

Die Bestimmung der regioselektiven Bromierung von 5-Bromindol durch die Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH konnte über NMR-spektroskopische Analysen aufgeklärt werden. Die bromierten Produkte konnten mit einer Ausbeute von BrvH: 17.2% (0.129 mmol; 35.4 mg), Pia-2: 8.8% (0.066 mmol; 18 mg), B38: 2.9% (0.0216 mmol; 5.9 mg), HotH: 13.2% (0.099 mmol; 27 mg) erhalten werden. Da es sich bei allen 4 Enzymprodukten um 3,5-Bromindol handelt, wird im Folgenden nur das ^1H -NMR Spektrum aus der Katalyse von BrvH gezeigt (Abbildung 57).

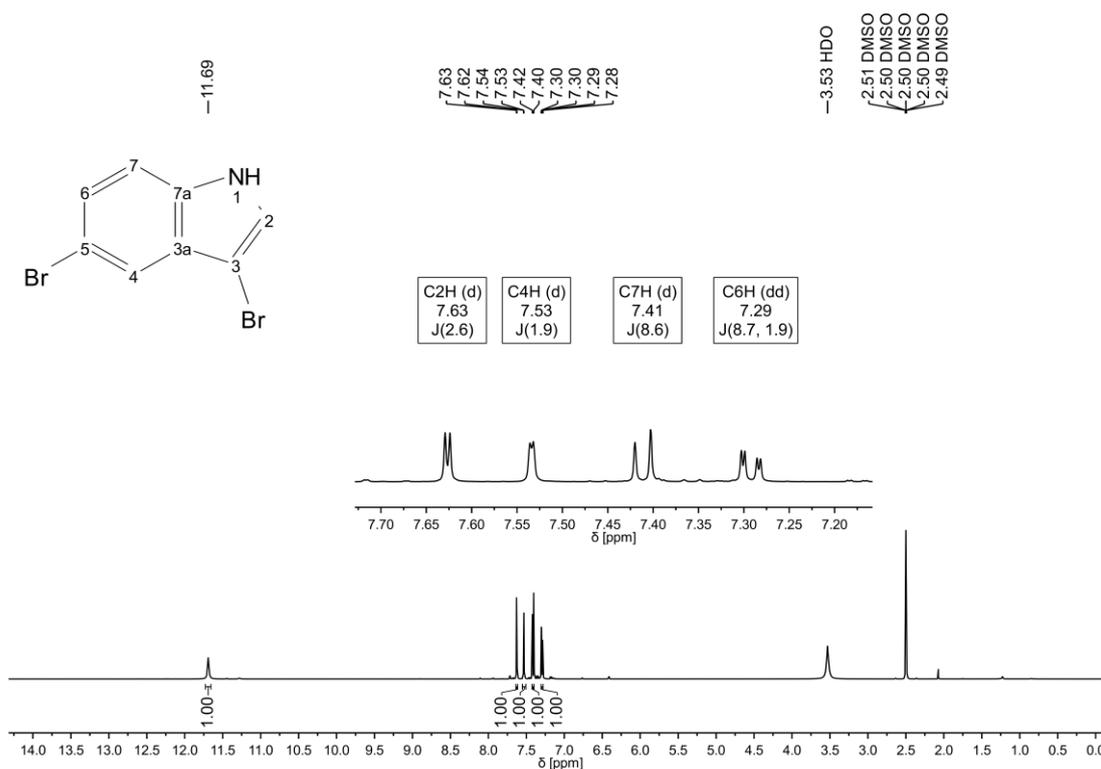


Abbildung 57: ^1H -NMR Spektrum von 3,5-Bromindol (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.69 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.29 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, 1H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit BrvH und 5-Bromindol erhalten.

Das Singulett an Position 11.69 ppm ist dem Proton des Stickstoffs im Indolring zuzuordnen. Die anderen Signale sind im aromatischen Bereich zu finden. Hier koppelt das Proton an C6-Position (7.29 ppm) mit dem Dublett bei 7.41 ppm (8.6/8.7 ppm, C^7H) und mit dem Dublett bei 7.53 ppm (1.9 Hz, C^4H). Mittels ^1H , ^1H -COSY-Analyse kann gezeigt werden, dass das Dublett bei 7.63 ppm mit dem Proton des Stickstoffs koppelt und somit der C2-

Position zuzuordnen ist. Das Doppeldublett des C⁶H koppelt mit den Protonen C⁷H und C⁴H. Durch die Kreuzkopplung im ¹H,¹H-COSY des NH zum C²H wird bestätigt, dass die Bromierung in C3-Position erfolgt. Dieses belegt, dass BrvH, Pia-2, B38 und HotH 5-Bromindol in der C3-Position zum 3,5-Bromindol bromieren. Die bestimmte Feinmasse des Produktes verifiziert zusätzlich, dass es sich um das Produkt handelt (theoretische Masse [C₈H₄Br₂N]⁻ m/z 271.8716; beobachtete Masse: 271.8711).

5.2.4.8. 3-Brom-5-fluorindol

Die Position der regioselektiven Bromierung von 5-Fluorindol durch BrvH und B38 konnte über die Inkubation der Enzyme in *combi*CLEAs mit dem Substrat identifiziert werden. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 7% (0.052 mmol; 11.2 mg) durch BrvH und 6.7% (0.0535 mmol; 11.4 mg) durch B38 erhalten. Da beide Enzymprodukte 3-Brom-5-fluorindol darstellen wird im Weiteren nur das ¹H-NMR Spektrum des Produkts katalysiert durch BrvH gezeigt (Abbildung 58).

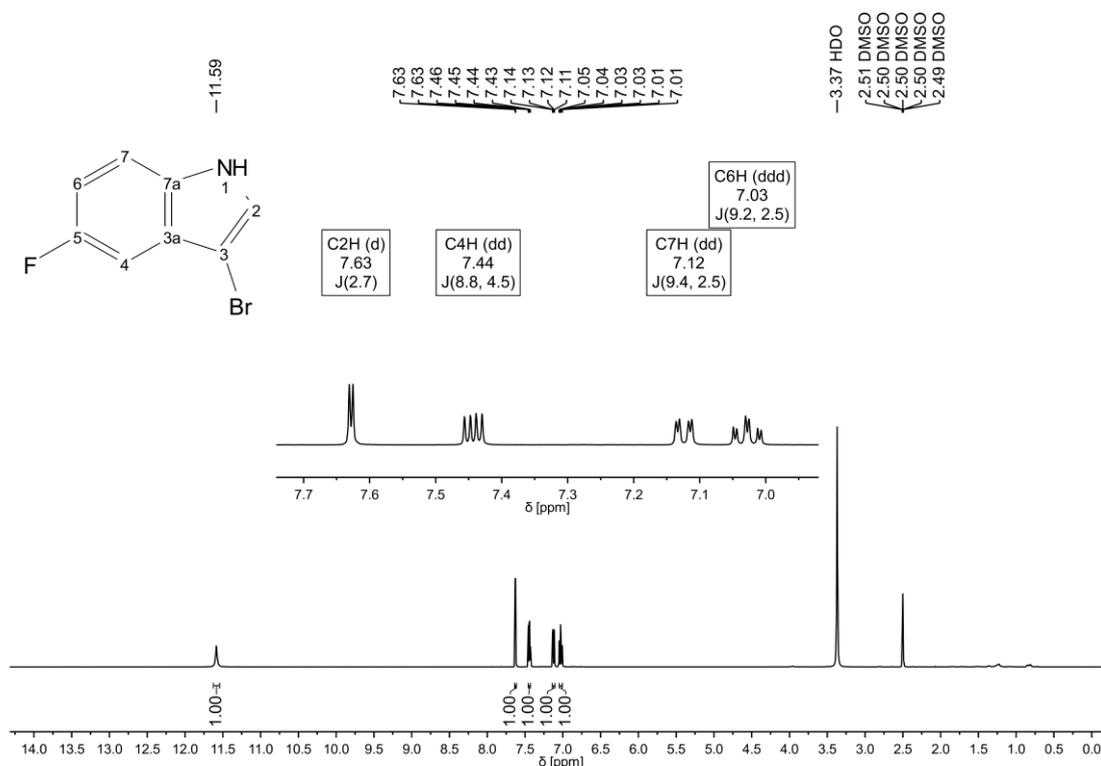


Abbildung 58: ¹H NMR Spektrum von 3-Brom-5-fluorindol ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.59 (s, 1H), 7.63 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 8.8, 4.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 9.4, 2.5 Hz, 1H), 7.03 (td, J = 9.2, 2.5 Hz, 1H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit BrvH und 5-Fluorindol erhalten.

Das Singulett bei 11.59 ppm (B38:11.58 ppm) ist dem Proton des Stickstoffs im Indol zuzuordnen.

Fluor hat auf die NMR-Analyse einen besonderen Einfluss, da es in der Natur zu 100% als ¹⁹F mit einer Spinquantenzahl von I = 1/2 vorkommt. Im ¹H-NMR sind Kopplungen bis zu

einem Abstand von etwa vier Bindungen durch die Kopplung mit ^{19}F nachweisbar [163]. C^6H (7.03 ppm) und C^7H (7.12 ppm) koppeln über 3J -Kopplungen miteinander (9.4 Hz, 2.5 Hz). C^4H weist eine Aufspaltung zum Doppeldublett auf, was durch den Fluorsubstituenten begründet ist. Das Signal von C^2H ist ein Dublett, da dieses Proton mit dem Proton der Stickstoffgruppe koppelt. Diese Kopplung kann im $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY nachgewiesen werden.

Im ^{13}C -NMR sind nicht nur die erwarteten 8 Signale, sondern 14 Signale zu erkennen, da auch die Signale der Kohlenstoffatome bis zu einem Abstand von 4 Bindungen koppeln können.

Durch die NMR-spektroskopischen Daten ist es möglich die Position der Bromierung an C3-Position nachzuweisen. Dieses zeigt, dass die Enzyme BrvH und B38 die Bromierung von 5-Fluorindol zum 3-Brom-5-fluorindol katalysieren. Zusätzlich wurde über die HRMS-Analyse bestätigt, dass es sich bei dem Produkt um 3-Brom-5-fluorindol handelt (theoretische Masse m/z $[\text{C}_8\text{H}_4\text{BrFN}]^-$ 211.9517; beobachtete Masse: 211.9518).

5.2.4.9. 5-Bromtryptophol

B38 wurde auf dessen regioselektive Bromierung von Tryptophol untersucht. Hierbei wurde das bromierte Produkt mit einer Ausbeute von 9.3% (0.07 mmol; 16.8 mg) erhalten. Durch die Analyse mittels ^1H -NMR, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- und ROESY-Spektroskopie konnte die Position der Bromierung ermittelt werden.

Zunächst wird auf das ^1H -NMR-Spektrum genauer eingegangen (Abbildung 59). Das Signal bei 11.06 ppm weist auf das Stickstoffproton im Indolring hin. Die Triplets bei 3.62 ppm und 2.80 ppm mit einem Integral von zwei zeigen die Protons der Seitenkette an C3-Position (C^9H und C^{10}H). Die restlichen Signale finden sich im aromatischen Bereich und somit im Indolring wieder. Über das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum lässt sich das Dublett bei 7.68 ppm dem C^2H zuordnen, da dieses mit dem Proton des Stickstoff koppelt. Weiterhin koppeln das Dublett bei 7.3 ppm mit dem Doppeldublett bei 7.15 ppm (8.5 Hz) über eine 3J -Kopplung. Dieses legt nahe, dass es sich bei dem Dublett um das Proton an C7-Position und bei dem Doppeldublett um das Proton an C6-Position handeln. Dieses wird durch das ROESY Spektrum bestätigt, da das C^7H mit dem Stickstoffproton koppelt. Somit ist das Dublett bei 7.19 ppm dem Proton an C4-Position zuzuordnen. Über die NMR-spektroskopischen Daten konnte die Position der Bromierung eindeutig an C5-Position gezeigt werden. B38 katalysiert die Bromierung von Tryptophol zu 5-Bromtryptophol.

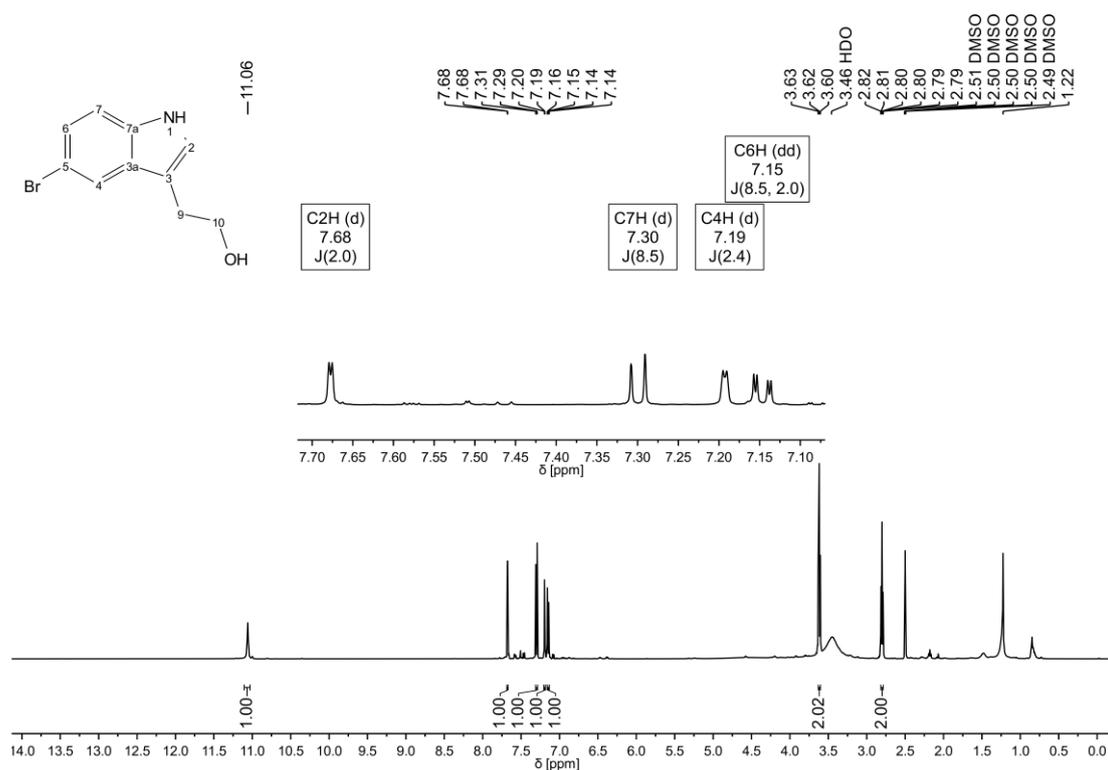


Abbildung 59: ^1H NMR Spektrum von 5-Bromtryptophol (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.06 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, 1H), 3.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.80 (t, $J = 7.2, 0.8$ Hz, 2H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit B38 und Tryptophol erhalten.

Zusätzlich wurde über die HRMS-Analyse bestätigt, dass es um das bromierte Tryptophol handelt (theoretische Masse $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BrNO}]^-$ m/z 237.9873; beobachtete Masse: 237.9868).

5.2.4.10. Bromindol-3-propionsäure

Die Position der Bromierung der Indol-3-propionsäure wurde für die Enzyme B38 und HotH untersucht. Dabei konnte für die Enzyme jeweils ein anderes Produkt identifiziert werden.

Aus den *combi*CLEAs mit B38 und Indol-3-propionsäure wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 7.9% (0.059 mmol; 15.9 mg) erhalten. Durch die Analyse mittels ^1H -NMR, $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- und ROESY-Spektroskopie wurde die Position der Bromierung gezeigt.

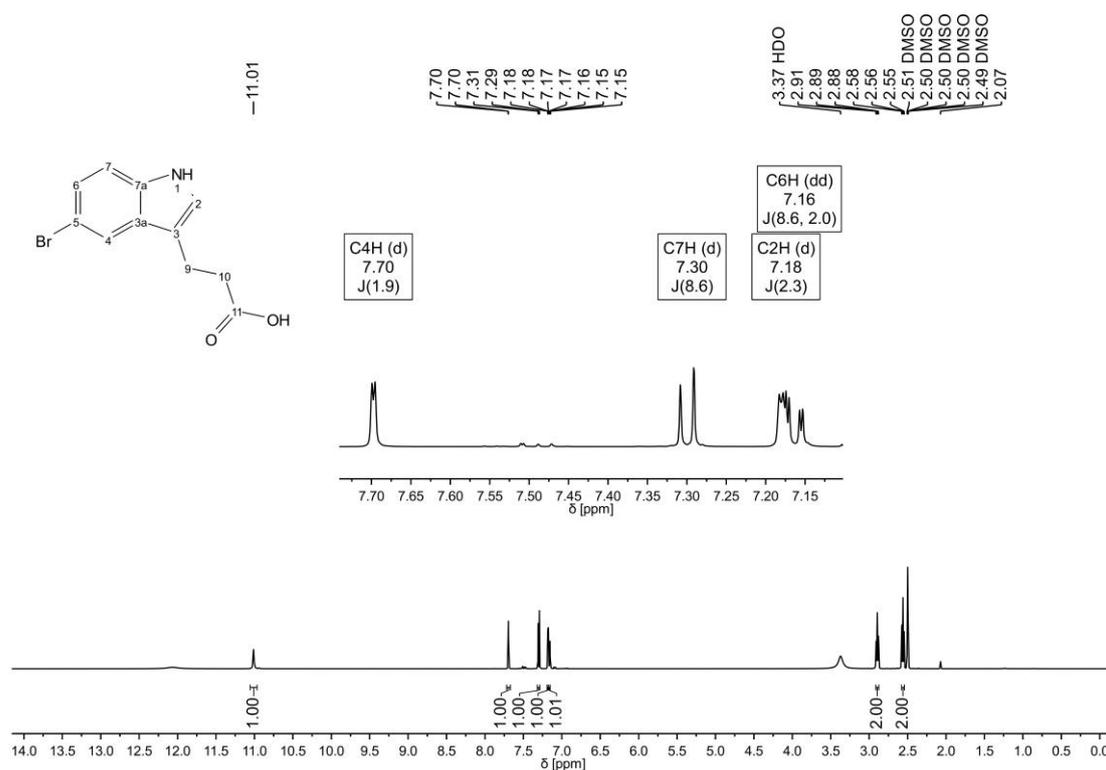


Abbildung 60: ^1H -NMR-Spektrum von 5-Bromindol-3-propionsäure (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.01 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 1H), 2.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H). Dieses Produkt wurde aus dem *comb*CLEA Ansatz mit B38 und Indol-3-propionsäure erhalten.

Über das ^1H -NMR Spektrum kann das Stickstoffproton dem Singulett bei 11.01 ppm zugeordnet werden (Abbildung 60). Die Triplets (2.90 ppm und 2.56 ppm) mit einem Integral von zwei können den Protonen der Seitenketten von C^9H und C^{10}H zugeordnet werden. Die restlichen Signale sind im aromatischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums zu finden. Mittels der $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektroskopie kann gezeigt werden, dass das Dublett bei 7.18 ppm mit dem Proton des Stickstoffs koppelt und somit dem C^2H entspricht, was die Bromierung in C2-Position ausschließt. Weiterhin koppelt das Dublett bei 7.3 ppm mit dem Doppeldublett bei 7.16 ppm (8.6 Hz) über eine 3J -Kopplung und das ROESY-Spektrum zeigt, dass das Dublett bei 7.3 ppm auch mit dem Proton des Stickstoffs kreuzkoppelt. Somit lässt sich das Proton bei 7.3 ppm C^7H und das Proton bei 7.16 ppm dem C^6H zuordnen. Das Dublett bei 7.7 ppm entspricht somit dem C^4H . Durch die NMR-spektroskopische Analyse konnte somit gezeigt werden, dass B38 die Bromierung von Indol-3-propionsäure zu 5-Bromindol-3-propionsäure katalysiert. Dieses wurde weiterhin durch die Masseanalyse (HRMS) bestätigt (theoretische Masse $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2]^-$ m/z 266.9895; beobachtete Masse: 266.0124)

Die bromierte Indol-3-propionsäure durch die Katalyse von HotH wurde mit einer Ausbeute von 7.5% (0.0562 mmol; 15 mg) erhalten. Das ^{13}C -NMR Spektrum des Produktes zeigt statt der erwarteten 11 Signale, 21 Signale (Abbildung 61).

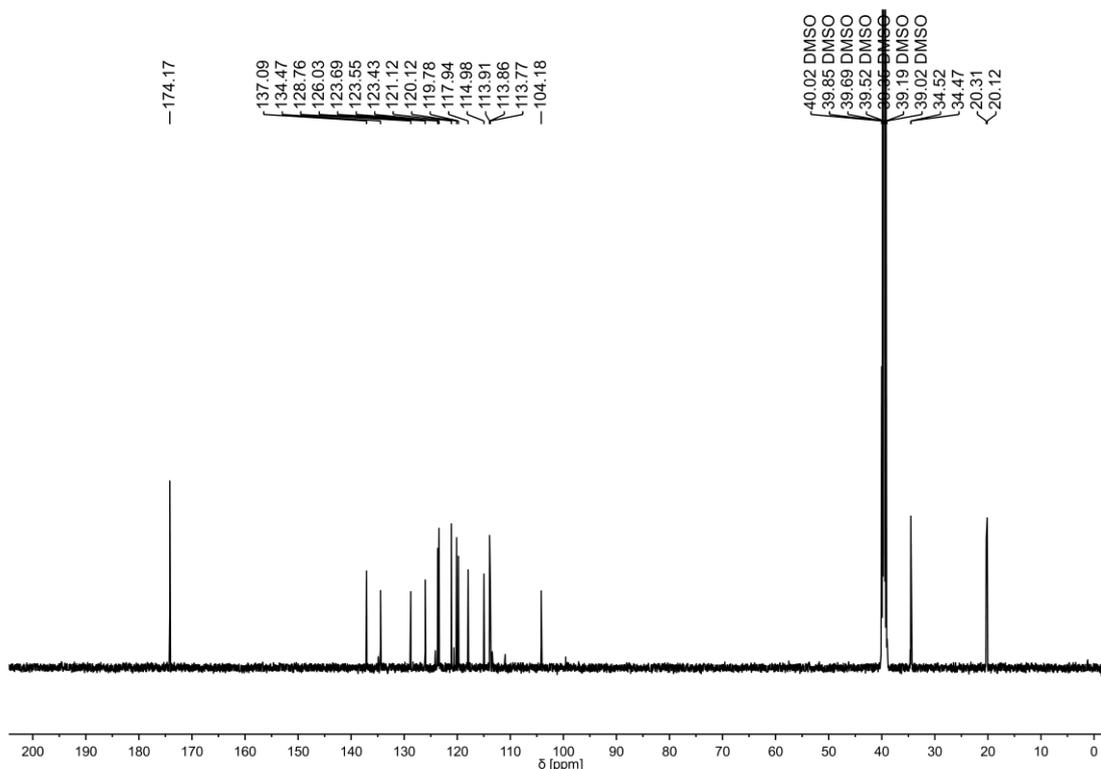


Abbildung 61: ^{13}C -NMR-Spektrum des bromierten Produktes durch HotH in combiCLEAs inkubiert mit Indol-3-propionsäure. (^{13}C NMR (126 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ 174.17, 137.09, 134.47, 128.76, 126.03, 123.69, 123.55, 123.43, 121.12, 120.12, 119.78, 117.94, 114.98, 113.91, 113.86, 113.77, 104.18, 40.02, 39.85, 39.69, 39.52, 39.35, 39.19, 39.02, 34.52, 34.47, 20.31, 20.12)

Dieses spricht dafür, dass es sich um eine Mischung von 2 bromierten Produkten handelt und somit die doppelte Anzahl an C-Atomen vorhanden sind. Vermutlich überlagert sich ein C-Atom Signal mit einem anderen, weshalb nur 21 statt 22 Signale aufzufinden sind.

Die Hypothese einer Bromierung an zwei unterschiedlichen Positionen wird durch das ^1H -NMR-Spektrum gestützt (Abbildung 62). In diesem sind zwei Stickstoffprotonen bei 11.03 ppm und 10.94 ppm aufzufinden. Die Protonen der CH_2 -Gruppen der Seitenkette an C3-Position sind bei den Signalen bei 2.91 ppm und bei 2.61–2.53 ppm mit den Integralen von vier zu finden. Auch dieses spricht für einen Mix von zwei Produkten, da für die CH_2 -Gruppe ein Integral von zwei erwartet wird. Bei dem Signal bei 12.1 ppm handelt es sich um die Carbonsäure der Verbindung. Die restlichen 8 Signale liegen im aromatischen Bereich. Auch hier wurden vier Signale erwartet. Die doppelte Anzahl an Protonensignalen im aromatischen Bereich weist wieder auf eine Mischung von zwei Produkten hin.

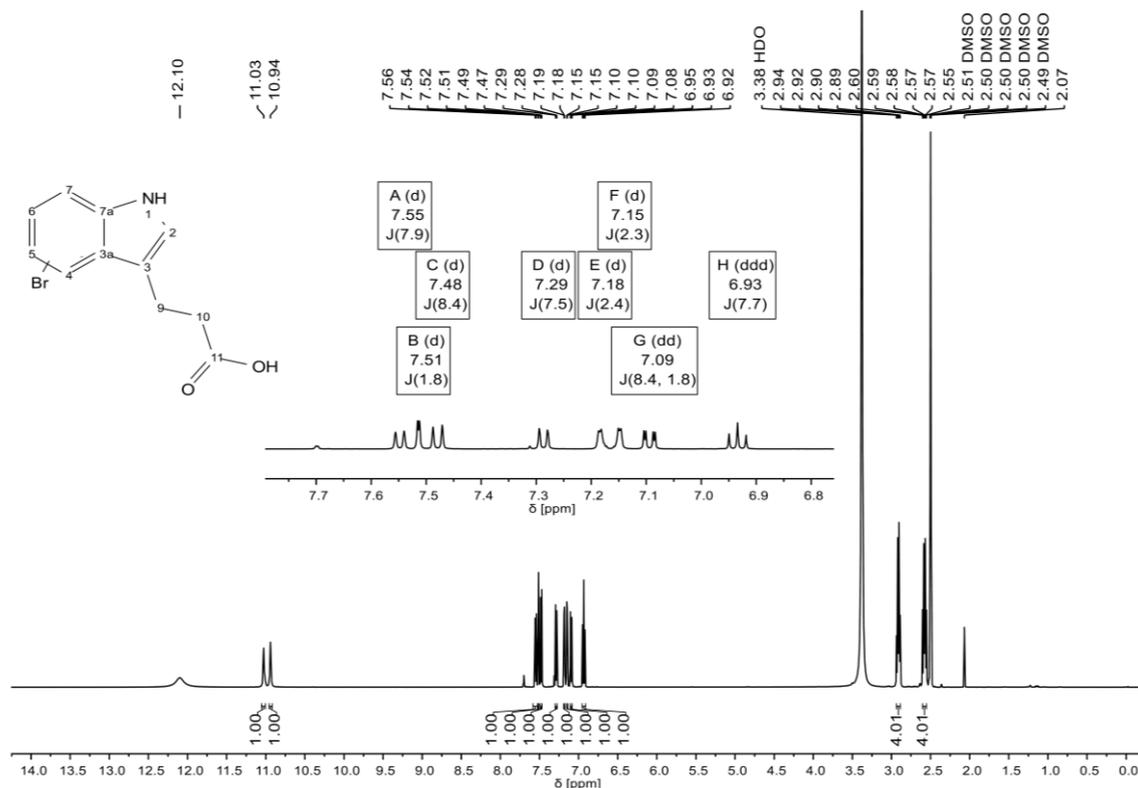


Abbildung 62: ^1H NMR Spektrum der bromierten Indol-3-propionsäure durch HotH (500 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.03 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 2.91 (q, $J = 7.9$ Hz, 4H), 2.61 – 2.53 (m, 4H). Dieses Produkt wurde aus dem *combi*CLEA Ansatz mit HotH und Indol-3-propionsäure erhalten.

Die genaue Position der Bromierung der beiden Produkte zu ermitteln, ist anhand der Daten nicht eindeutig möglich. Dennoch zeigt die LC-ESI-MS Messung, dass es sich um bromierte Indol-3-propionsäure handelt (theoretische Masse $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{BrNO}_2]^-$ m/z 265.99, 267.99; beobachtete Masse $[\text{M-H}]^-$ 265.99, 267.99). Der Vergleich des ^1H -NMR Spektrums des Produktmixes von HotH mit dem ^1H -NMR Spektrum der 5-Bromindol-3-propionsäure aus der Reaktion mit B38 zeigt, dass das charakteristische Signal bei 7.7 ppm, welches das C^4H Proton darstellt in der Produktmischung nicht vorhanden ist. Dieses weist daraufhin, dass in der Produktmischung katalysiert durch HotH keine 5-Bromindol-3-propionsäure enthalten ist. Zwei Protonensignale können jeweils einem C^2H (7.15 ppm, 7.18 ppm) zugeordnet werden, da beide Dubletts geringe 3J -Kopplungen zum NH aufweisen. Deshalb kann eine Bromierung in C2-Position ausgeschlossen werden. Wie oben erläutert, wird von zwei bromierten Produkten ausgegangen. Bei einem könnte es sich um 6-Bromindol-3-propionsäure handeln, da das Dublett bei 7.51 ppm (C^7H) über 4J -Kopplung mit dem Doppeldublett von C^5H bei 7.09 ppm (1.8 Hz) koppelt. C^5H zeigt außerdem eine 3J -Kopplung zum C^4H bei 7.48 ppm (8.4 Hz). Die übrig gebliebenen Signale weisen daraufhin, dass es sich bei dem anderen Produkt um 7-Bromindol-3-propionsäure oder 4-Bromindol-3-propionsäure handeln könnte. Denn das Signal bei 6.93 ppm zeigt ein Doppeldublett mit

identischer 3J -Kopplungen (7.7 Hz), welches mit C^6H oder C^5H koppelt, abhängig davon ob die C7- oder C4-Position bromiert ist. Die anderen Dubletts bei 7.59 ppm und 7.25 ppm zeigen 3J -Kopplung mit dem Proton bei 6.93 ppm (7.7 Hz). Somit scheint die entstandene Produktmischung aus der Inkubation von HotH mit Indol-3-propionsäure aus 6-Bromindol-3-propionsäure und 7- oder 4-Bromindol-3-propionsäure zu bestehen. Bisher wurde noch keine Trp-4-Halogenase identifiziert, weshalb zu vermuten ist, dass die Halogenierung von HotH auch nicht in C4-Position katalysiert wird und statt 4-Bromindol-3-propionsäure 7-Bromindol-3-propionsäure entsteht.

5.2.4.11. 3-Brom-7-azaindol

Die Bestimmung der Position der regioselektiven Bromierung von 7-Azaindol erfolgte für das Enzym Pia-2. Das bromierte Produkt wurde mit einer Ausbeute von 7.4% (0.056 mmol; 11 mg) erhalten. Durch 1H -NMR, ^{13}C -NMR und $^1H,^1H$ -COSY Spektroskopie konnte die Position der Bromierung eindeutig an Position C3 detektiert werden.

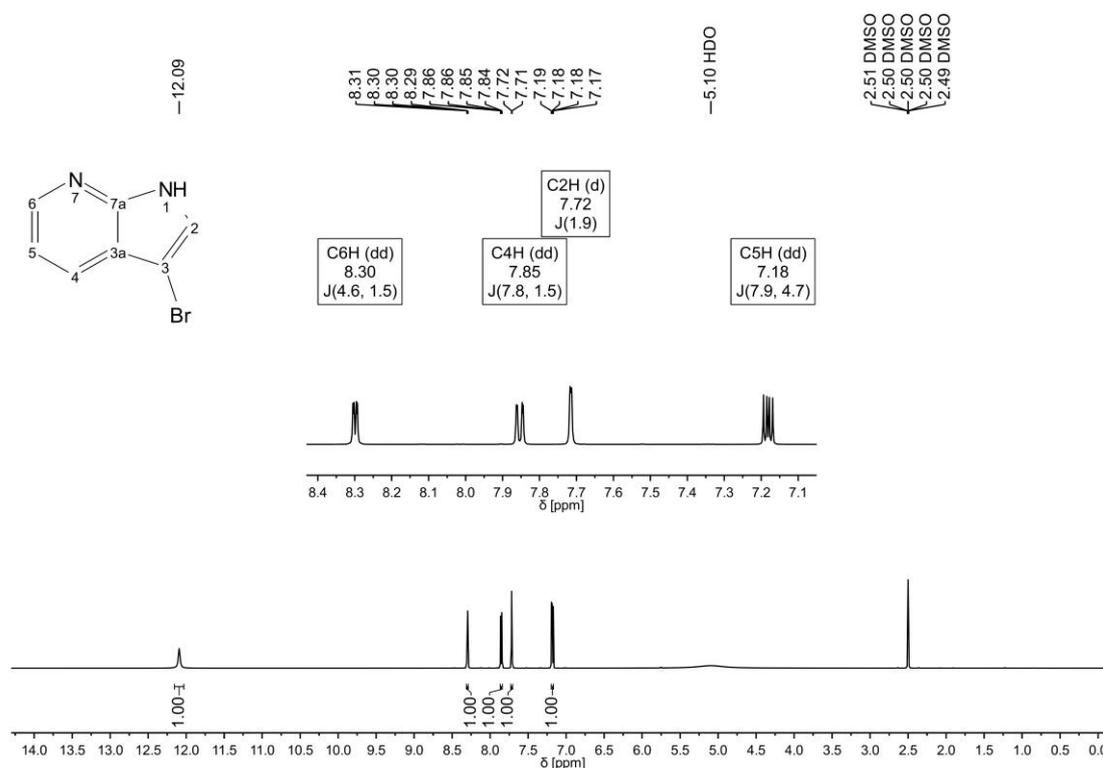


Abbildung 63: 1H NMR Spektrum von 3-Brom-7-azaindol aus den *combi*CLEAs mit Pia-2 und 7-Azaindol. 1H -NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 12.09 (s, 1H), 8.30 (dd, $J = 4.6, 1.5$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H). 7.18 (dd, $J = 7.9, 4.7$ Hz, 1H).

Im 1H -NMR Spektrum weist das Singulett bei 12.09 ppm auf das Proton des Stickstoffs darstellt (Abbildung 63). Die restlichen Signale sind im aromatischen Bereich wiederzufinden. Es koppelt das Doppeldoublett bei 7.18 ppm mit dem Doppeldoublett bei 8.3 ppm (4.6/4.7 Hz) und mit dem Doppeldoublett bei 7.85 ppm (7.8/7.9 Hz). Im $^1H,^1H$ -COSY

koppelt das Dublett bei 7.72 ppm mit dem Proton des Stickstoffs und lässt sich somit dem C²H Proton zuordnen. Weiterhin handelt es sich bei dem Signal bei 7.18 ppm um das C⁵H. Das C⁶H Proton ist durch den Stickstoff an C7-Position tieffeldverschoben und lässt sich so dem Signal bei 8.3 ppm zuordnen und das Signal bei 7.85 ppm, das auch über ⁴J-Kopplung mit dem C⁶H koppelt (1.5 Hz) kann somit dem C⁴H zugeordnet werden. Dieses zeigt, dass es sich bei dem Produkt um 3-Brom-7-azaindol handelt. Eine Analyse mittels HRMS war für das Produkt nicht möglich, allerdings erfolgte eine ESI-MS-Analyse, welche die korrekte Produktmasse von 3-Brom-7-azaindol bestätigte (theoretische Masse [C₇H₅BrN₂]⁺ 196.96; 198.96; beobachtete Masse [M+H]⁺ 196.96, 198.87).

5.2.4.12. Abschließende Diskussion der regioselektiven Bromierung

Insgesamt konnte für 12 verschiedene Substrate die Position der regioselektiven Bromierung bestimmt werden. Für alle Substrate wurden schlechte Ausbeuten erzielt, die dennoch für NMR-spektroskopische-Analysen ausreichten. Die höchste Ausbeute von 37.8% wurde mit den *combi*CLEAs von Pia-2 mit 5-Cyanindol erhalten. Dabei sollte erwähnt werden, dass für die Aufreinigung dieses Substrates die Aufarbeitung von der normalen Vorgehensweise differierte. Nach der Aufreinigung des bromierten 5-Cyanindol mittels präparativer RP-HPLC kam es zu Nebenprodukten bei denen es sich vermutlich um die spontane Dimerisierung von zwei bromierten 5-Cyanindolen in Gegenwart von Säuren handelt [161, 162]. Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung unter Ausschluß von TFA durchgeführt, wodurch die Nebenreaktionen unterbunden wurden und das Produkt erhalten werden konnte. Eventuell kann durch die generelle Aufreinigung ohne TFA für alle Produkte eine bessere Ausbeute erzielt werden.

Die Reaktionen der *combi*CLEAs wurden mittels RP-HPLC verfolgt, dabei wurde für kein Produkt nach 11 Tagen ein voller Umsatz erzielt. Die berechneten prozentualen Umsätze über die Integrale der analytischen RP-HPLC ergab prozentuale Umsätze zwischen 50 und 70%, wobei einige Substrate deutlich schlechter in den *combi*CLEA-Reaktionen umgesetzt wurden. RebH zum Beispiel setzt 1 mM L-Tryptophan innerhalb von 6 Tagen vollständig um [27]. Somit lässt sich sagen, dass die vier Enzyme immobilisiert in den *combi*CLEAs, einen geringere Umsatzrate zeigen als RebH.

Um bessere Ausbeuten zu erlangen, sollte die Methode der Aufreinigung optimiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass ein Großteil des Produktes bei Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC verloren wurde. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die bromierten Produkte nur schwer wasserlöslich sind, auch wenn diese in einer binären Wasser:Acetonitril (v/v 1:1) gelöst wurden. Es sollte im Weiteren getestet werden, ob statt der präparativen RP-HPLC, die Silika-Gel-Chromatografie mit anderen Lösungsmitteln zu

höheren Produktausbeuten führt. Thornton und seine Mitarbeiter reinigten 1986 durch die chemische Synthese erhaltenen 2- und 3-Bromindole über die Silika-Gel-Chromatografie (20% CH₂Cl₂ in CCl₄) auf und erhielten dabei gute Produktausbeuten [164]. Da allerdings bei den Enzymreaktionen nur mit geringen Produktmengen gearbeitet (10-50 mg) wurde, können hier ebenso hohe Produktverluste erfolgen.

Die regioselektive Bromierung der Enzyme BrvH, Pia-2 und HotH erfolgte für alle getesteten Substrate in C3-Position. Nur 3-Methylindol wurde an C2-Position bromiert. Die C3-Position ist im Indolring die reaktivste, gefolgt von der C2-Position. In der chemischen Synthese mit elementarem Brom wird bevorzugt in C3-Position bromiert [161]. Auch wenn die Enzyme diese Substrate alle in C3- oder C2-Position halogeniert haben, muss dieses nicht bedeuten, dass diese bevorzugt deren natürliches Substrat auch an der aktiviertesten Stelle halogenieren. Die Tryptophan-7-Halogenase, PrnA zum Beispiel halogeniert L-Tryptophan in C7-Position regioselektiv, aber die Substrate 5-Methylindol und 3-Methylindol werden von dieser in C2-Position halogeniert [80]. Auch RebH halogeniert L-Tryptophan in C7-Position regioselektiv, aber die Substrate 5-Hydroxytryptophan, 5-Methyltryptophan und 5-Aminotryptophan werden an den C6- oder C7-Positionen halogeniert. Außerdem findet bei den Substraten 5-Methyltryptophan und 5-Aminotryptophan die unspezifische Dibromierung an C6- und C7-Position statt [82]. Dieses zeigt, dass die Selektivität der F-Hals stark von dem Substrat abhängig ist. Somit kann zu diesem Zeitpunkt nur gesagt werden, dass die bisher bekannten Substrate von BrvH, Pia-2 und HotH alle an C3- oder C2-Position bromiert werden und es möglich ist, dass die Enzyme bei anderen Substraten, die dem natürlichen Substrat gleichen eine andere Regioselektivität aufweisen.

B38 katalysiert die Bromierung der getesteten Substrate ebenso wie die Enzyme BrvH, Pia-2 und HotH an C3-Position, allerdings mit drei Ausnahmen (3-Methylindol, Tryptophol und Indol-3-Propionsäure). 3-Methylindol wurde von B38 an der C2-Position bromiert, während Tryptophol und Indol-3-propionsäure, an der nicht aktivierten C5-Position bromiert wurden. Die Position der Halogenierung des 3-Methylindols deckt sich mit den Ergebnissen von BrvH, Pia-2 und HotH, da nach der C3-Position, die C2-Position, die am meisten aktivierte Position im Indolring ist. Die Halogenierung von Tryptophol und Indol-3-propionsäure an der weniger aktivierten C5-Position weicht allerdings von diesen Ergebnissen ab. Es könnte darauf hindeuten, dass B38 sein natürliches Substrat regioselektiv an C5-Position im Indolring bromiert. Pauletti *et al.* zeigen in der Literatur, dass viele marine Indol-Alkaloide eine Bromierung in C5-Position aufweisen [22]. B38 stammt aus einem marinen Habitat und könnte somit für die Bromierung von einem Indol-Alkaloid verantwortlich sein. Allerdings ist auch für B38 kein natürliches Substrat bekannt und somit eine genaue Aussage nicht möglich.

5.2.5. Bestimmung der Flavin-Abhängigkeit der Enzyme

Flavin-abhängige Halogenasen sind nicht die einzigen halogenierenden Enzyme. Andere halogenierende Enzyme benötigen nicht Flavin als Kofaktor, sondern andere Kofaktoren wie zum Beispiel Vanadium oder Wasserstoffperoxid [37, 38]. Um zu zeigen, dass es sich bei den identifizierten Enzymen um Flavin-abhängige Halogenase handelt, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

Bromperoxidasen bromieren organische Verbindungen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid [101]. Um zu zeigen, dass es sich um keine Bromperoxidase handelt, wurde Katalase im Überschuss zur Reaktion gegeben. Das Enzym baut Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab, wodurch in dessen Gegenwart die Bromperoxidase keine halogenierende Aktivität aufweisen kann [165]. Zu allen vier identifizierten Enzymen wurde Katalase zur Enzymreaktion gegeben (Abbildung 64).

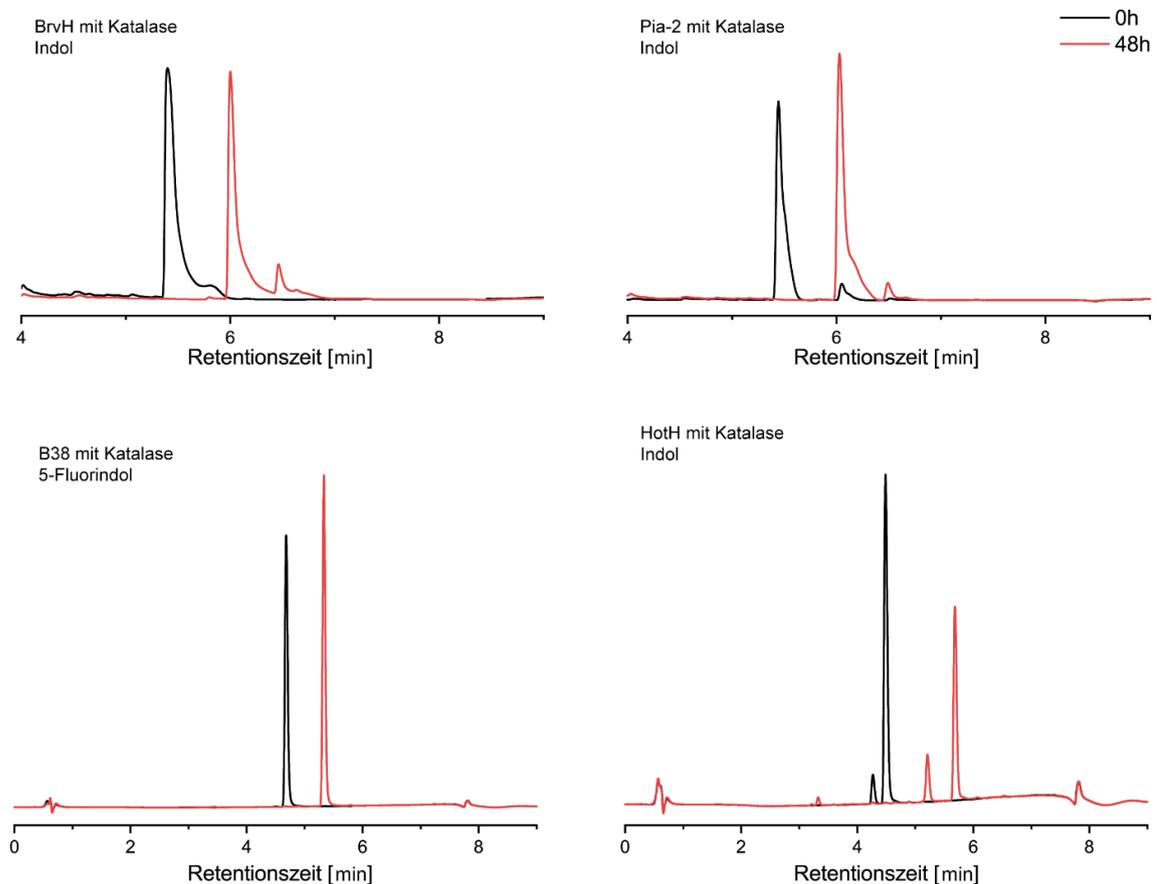


Abbildung 64: RP-HPLC Chromatogramme (280 nm) der Substrate von BrvH, Pia-2, B38 und HotH unter Zugabe von Katalase nach einer Reaktionszeit von 48 h. Alle Enzyme weisen trotz der Zugabe von Katalase weiterhin die gewohnte Halogenierungsaktivität auf und scheinen nicht negativ beeinflusst zu werden.

In Anwesenheit von Katalase wurde die Halogenierungsaktivität aller vier Enzyme nicht negativ beeinflusst und ein voller Umsatz des Substrats wurde durch die vier Enzyme erzielt. In Gegenwart der Katalase katalysieren die Enzyme BrvH (10%) und Pia-2 (5%) im

geringen Maße statt der einfachen Bromierung auch eine Dibromierung. HotH hat auch die Einfachbromierung (17.9%) und die Dibromierung (82.1%) katalysiert. Werden die prozentualen Umsätze der Enzyme mit und ohne Katalase verglichen, scheinen die Enzyme in Anwesenheit von Katalase aktiver zu sein. Dieses lässt darauf schließen, dass entstehendes Wasserstoffperoxid, die enzymatische Reaktion sogar stört, aber nicht für den Reaktionsmechanismus benötigt wird. Im Ganzen lässt sich sagen, dass alle vier Enzyme in Gegenwart von Katalase aktiv sind und es sich somit bei den Enzymen nicht um Bromperoxidasen handelt.

Es wurde außerdem über die Absorption die Bindung von FAD in den Enzymen nachgewiesen. Dieses erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Kottke (Universität Bielefeld). Für BrvH wurde nach der FAD-Rekonstitution ein UV/Vis-Spektrum erhalten, dass die Bindung von FAD in BrvH nachweist (Abbildung 65, A).

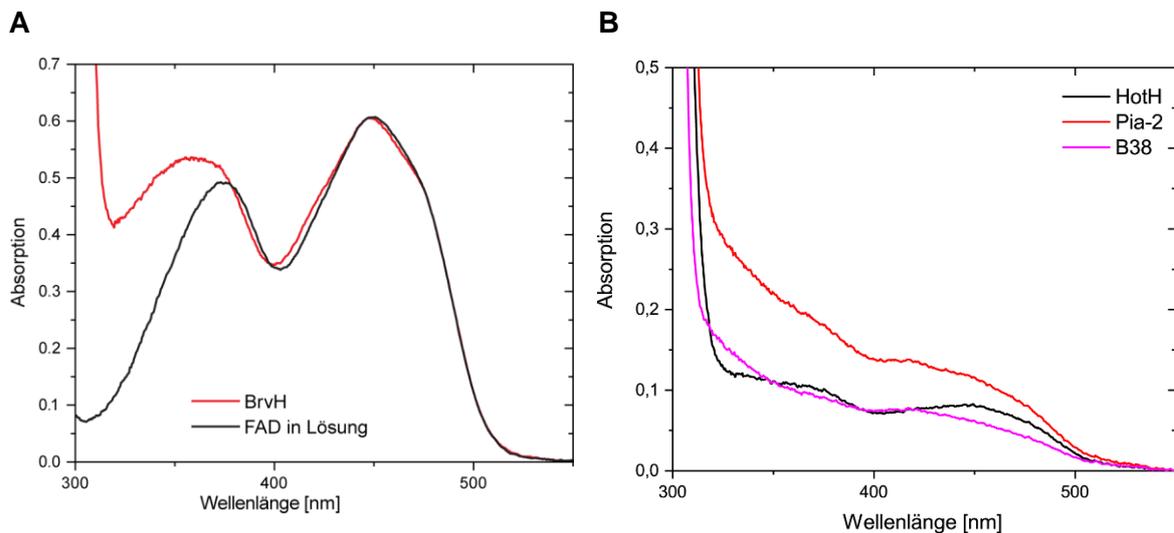


Abbildung 65: UV/Vis-Spektren der Enzyme BrvH (A), Pia-2, B38 und HotH (B) nach FAD Rekonstitution im Vergleich zu FAD in Lösung. Durch die Bindung von FAD in BrvH verändert sich auch die Umgebung von FAD. Dieses führt zu einem Shift der Bande von 373 nm zu 360 nm.

Da sich die Umgebung von FAD im Enzym ändert, ändert sich auch die Absorption des FAD, was im UV/Vis Spektrum visualisiert werden kann. So verschiebt sich die Bande von FAD im Enzym von 350 nm zu 348 nm und die Bande bei 373 nm zu 360 nm. Diese FAD-Rekonstitution wurde auch für Pia-2, B38 und HotH durchgeführt. Allerdings wurde hierbei ein UV/Vis-Spektrum erhalten, das die Bindung nicht in dem Maße bestätigt wie für BrvH (Abbildung 65, B). Für die Enzyme Pia-2, HotH und B38 sind allerdings ähnliche Tendenzen ersichtlich und es kann auch von einer FAD-Bindung mit sehr geringem Beladungsgrad ausgegangen werden. Leider war der Beladungsgrad so gering, dass dieser nicht bestimmt werden konnte. Beobachtungen von B38 zeigten, dass es sich bei diesem um ein gelbes Enzym handelt, was die Vermutung nahelegt, dass FAD gebunden wird (Abbildung 66).



Abbildung 66: Fotografie der Enzymlösung von B38 (20 mg/mL; rechts) im Vergleich dazu eine Nullprobe mit nur der Pufferlösung (Nullprobe; links). Dieses zeigt, dass es sich bei B38 um ein gelbes Enzym handelt.

Als letzte Beweisführung, dass es sich bei den Enzymen um Flavin-abhängige Halogenasen handelt, wurde das konservierte Lysin zu Alanin mutiert. In der Literatur wurde diese Mutante generiert, um die Relevanz des konservierten Lysins in F-Hals zu zeigen. Diese Mutation führte zur Inaktivierung der F-Hal [55]. Für die Punktmutation wurden Primer erstellt, die über die Position des Lysins ragen. Statt des Codons für Lysin (AAA) wurde das Codon für Alanin (GCG) in den Primern verwendet. Das konservierte Lysin befindet sich in der Trp-Halogenase PrnA an Position 79 [52]. Über *Alignments* von PrnA und den jeweiligen Enzymen, wurde die Position des konservierten Lysins für die vier neu identifizierten F-Hals bestimmt. Das konservierte Lysin in BrvH liegt somit an Position 83, in Pia-2 an Position 85, in B38 an Position 80 und in HotH an Position 82. Nach erfolgter PCR wurde die Wildtyp-DNA durch die Endonuklease DpnI abgebaut, wodurch sichergestellt wurde, dass nur die mutierte Sequenz im Reaktionsansatz vorhanden ist. Dieses beruht darauf, dass DpnI nur methylierte DNA verdaut und die PCR-Produkte noch keine Methylierung aufweisen [166]. Darauf wurden die PCR-Produkte in *E. coli* DH5 α amplifiziert und sequenziert (Eurofins Genomics). Dieses zeigte, dass die Mutation zum Alanin erfolgreich war und das Gen ansonsten unverändert ist. Daraufhin wurden die mutierten Gene in *E. coli* BL21 (DE3)_pGro7 exprimiert und eine Aktivitätsbestimmung durchgeführt (Abbildung 67).

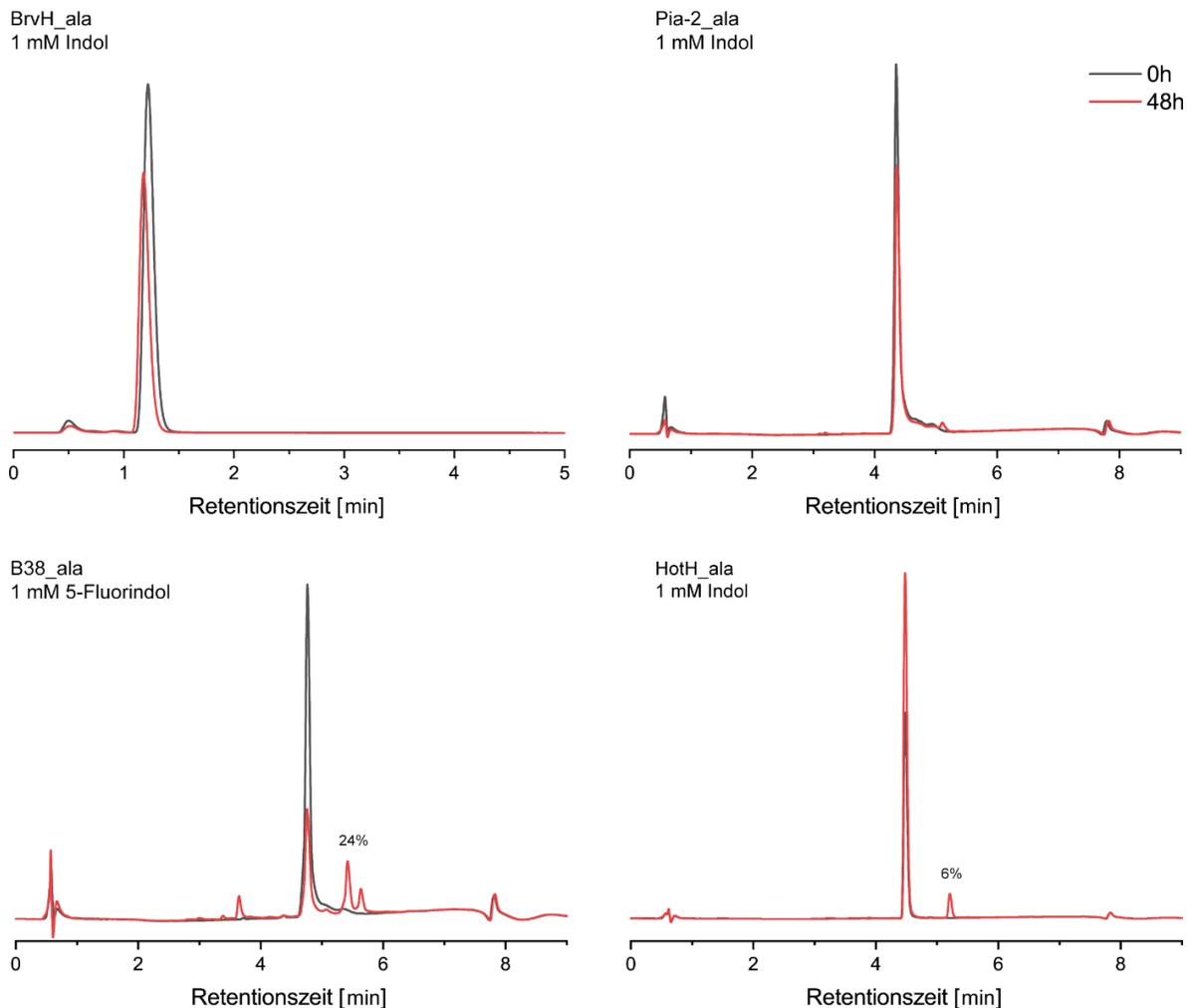


Abbildung 67: RP-HPLC-Chromatogramme (280 nm) der Reaktionsansätze der mutierten Enzyme (BrvH_K83A, Pia-2_K85A, B38_K80A, HotH_K82A mit Indol nach 0 h und 48 h. Die Enzyme BrvH und Pia-2 verlieren ihre halogenierende Aktivität durch die Mutation des Lysins zum Alanin vollständig, während B38_ala und HotH_ala noch immer eine geringe Aktivität aufweisen.

Aus diesem Experiment geht hervor, dass die Mutation des Lysins zum Alanin in den Enzymen BrvH und Pia-2 zu einer vollständigen Inaktivierung der Enzyme geführt hat. Dieses unterstreicht die anderen Experimente und beweist, dass es sich bei diesen Enzymen um Flavin-abhängige Enzyme handelt, deren Reaktionsmechanismus auf der Bindung des Flavins in der Flavinbindungstasche basiert.

Für B38 und HotH kann durch die erfolgten Experimente keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei diesen Enzymen um Flavin-abhängige Halogenasen handelt. Beide Enzyme weisen nach der Mutation des Lysins zum Alanin geringe Bromierungsaktivitäten auf (B38_K80A: 24%; HotH_K82A: 6%). Diese Aktivitäten sind im Vergleich zu den nicht mutierten Enzymen allerdings sehr gering (B38: 100% Umsatz; HotH: Br: 36%, Di-Br: 62%). Die Aufgabe des Lysins könnte auch von einem anderen Lysin innerhalb des Enzyms übernommen worden sein, was eine geringe Aktivität erklären würde. B38 besitzt insgesamt 13 Lysine von denen sich eins in der Nähe des mutierten

Lysins befindet (K58) und HotH besitzt 21 Lysine von denen sich auch eins in der Nähe des rausmutierten Lysins befindet (K75). Bei der Betrachtung des Halogenierungsmechanismus der F-Hals wäre es auch möglich, dass das gebildete HOBr den 10 Å-Tunnel ohne Stabilisierung durch das Lysin passiert und es somit zu einer geringen Halogenierungsaktivität kommt.

Dennoch sind HotH und B38 vermutlich F-Hals. Dies sollte allerdings noch weiter über zum Beispiel Röntgenstruktur-Analyse verifiziert werden. In den Aminosäuresequenzen von B38 und HotH sind in beiden die konservierten Aminosäure Bereich für die Flavinbindestelle (B38: GGG~~S~~A~~G~~; HotH: GGG~~S~~T~~A~~G) vorhanden, allerdings zeigte das UV/Vis Spektrum nur einen sehr geringen Beladungsgrad an FAD. Beobachtungen stützten die Bindung von FAD, da gelbes Enzym wahrgenommen wurde. Allerdings führte die Mutation des konservierten Lysins führten nicht zu einer vollständigen Inaktivierung, sondern verlangsamten den Umsatz nur. Die Mutation scheint damit das Enzym zu beeinflussen, aber nicht zu inaktivieren. Die Zugabe von Katalase zeigte für beide Enzyme, dass deren Reaktionsmechanismus nicht von Wasserstoffperoxid abhängig ist und es sich bei HotH und B38 nicht um Bromperoxidasen handelt.

5.2.6. Brom als favorisiertes Halogen

In der Literatur wurde beschrieben, dass marine F-Hals die Bromierung gegenüber der Chlorierung bevorzugen [18]. Die identifizierten F-Hals BrvH und B38 stammen aus einem marinen Metagenom. Pia-2 und HotH wurden aus Metagenomen identifiziert, die in Süßwasser isoliert wurden. Alle vier identifizierten Enzymen bevorzugen allerdings die Bromierung gegenüber der Chlorierung. Diese Präferenz wird für die Enzyme BrvH und B38 von der Literatur unterstrichen, während dies für Pia-2 und HotH nicht zustimmt.

Für BrvH und Pia-2 wurde nicht nur die Halogenierung mit NaBr und NaCl getestet, sondern auch die Iodierung mit NaI. Dieses führte allerdings für beide Enzyme zu keiner Halogenierung, weshalb keine weiteren Tests für die Iodierung durchgeführt wurden.

BrvH setzt Indol zu Bromindol in 48 h vollständig um, während die Chlorierung des Indols in dieser Zeitspanne nur zu 8.4% katalysiert wird. Die Umsätze wurden über die Flächen der Peaks im RP-HPLC-Chromatogramm im Triplikат bestimmt. Um dieses genauer zu beleuchten, wurden die Enzymreaktionen in eine Enzymreaktion eingesetzt, in der BrvH mit 1 mM Indol, 100 mM NaCl und verschiedenen NaBr-Konzentrationen (0 mM NaBr, 10 mM NaBr und 100 mM NaBr) inkubiert wurde (Abbildung 68).

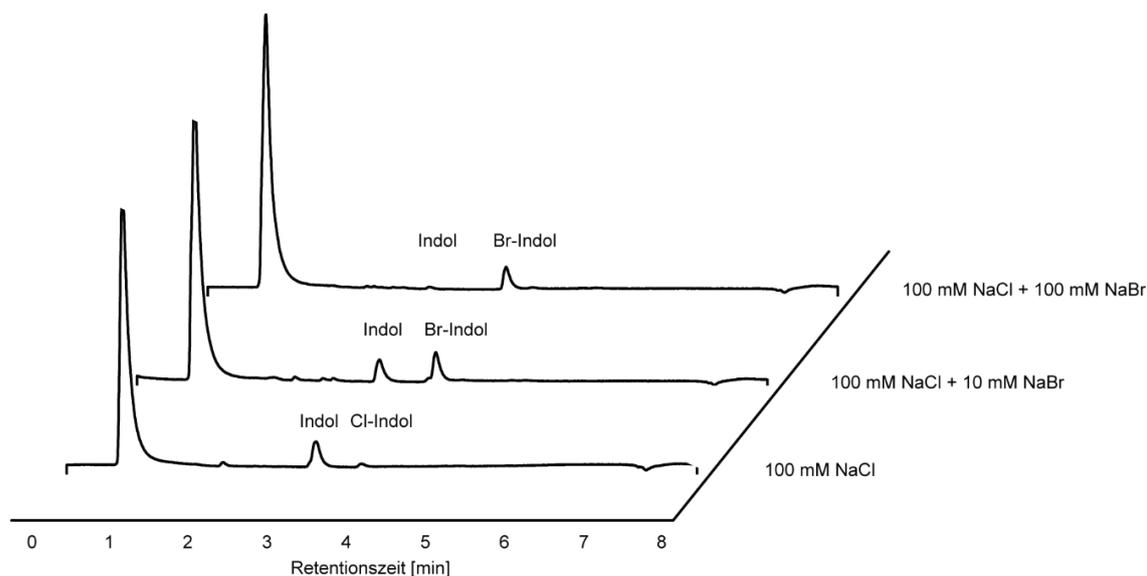


Abbildung 68: RP-HPLC der drei Halogenierungsansätzen von BrvH mit Indol, 100 mM NaCl und drei verschiedenen NaBr Konzentrationen (0 mM, 10 mM, 100 mM) nach 24 h bei 280 nm. Dieses zeigt, dass die Chlorierung nur im geringen Maße katalysiert wird, während, wenn genügend Bromid-Ionen zur Verfügung stehen, die Bromierung zu einem fast vollen Umsatz führt.

Diese Enzymreaktionen zeigen anschaulich die Präferenz der Bromierung. Sogar bei einem 10-fachen Überschuss von NaCl zu NaBr überwiegt die Bromierung. Bei einer 10 mM NaBr-Konzentration wird kein voller Umsatz erreicht, dieser wird erst bei 100 mM NaBr erzielt.

Leider waren die Konzentrationen des erhaltenen Chlorindols so gering, dass es nicht möglich war die Position der Chlorierung oder die Masse des chlorierten Produktes zu bestimmen. Da sich bei anderen F-Hals die Regioselektivität nicht mit dem Halogen ändert [82], wird davon ausgegangen, dass die Position der Chlorierung auch die C3-Position ist. Um die Masse des chlorierten Produktes von BrvH zu erhalten, wurde statt des Indols das 5-Nitroindol als Substrat eingesetzt. Dieses weist eine gute Ionisierung in der LC-ESI-MS-Messung auf und kann somit selbst bei geringen Mengen gut detektiert werden (Abbildung 69).

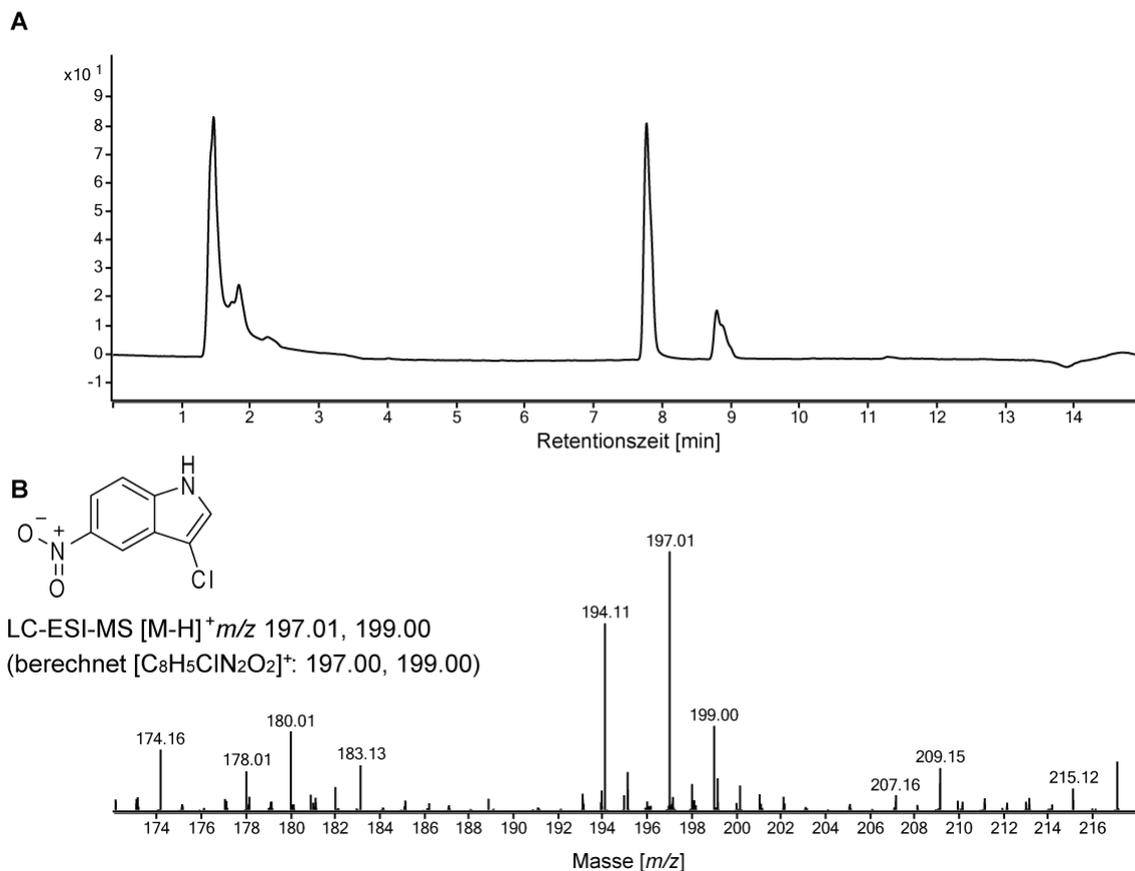


Abbildung 69: LC-MS Chromatogramme von Chlorindol aus der Enzymreaktion mit BrvH inkubiert mit 5-Nitroindol und NaCl für 48 h bei 25°C. **A:** LC-Chromatogramm 280 nm, das das Edukt, Indol (7.673 min) und das Produkt, Chlor-5-nitroindol (8.727 min) zeigt. **B:** MS⁺-Spektrum des Produkts, Chlor-5-nitroindol (8.727 min) ($[M+H]^+$ beobachtet: 197.01, 199.01 theoretisch: $[C_8H_5ClN_2O_2]^+$ 197.00 (³⁵Cl), 199.00 (³⁷Cl))

Die katalysierte Chlorierung von 5-Nitroindol zu Chlor-5-nitroindol durch BrvH beträgt 16% und ist somit höher als die Chlorierung von Indol. Mittels LC-ESI-MS-Analyse konnte die Masse des chlorierten 5-Nitroindols ($[M+H]^+$ beobachtet: 197.01, 199.01; theoretisch: $[C_8H_5ClN_2O_2]^+$ 197.00 (³⁵Cl), 199.00 (³⁷Cl)) nachgewiesen werden. Dieses bestätigt, dass BrvH nicht nur die Bromierung, sondern in geringem Masse auch die Chlorierung katalysieren kann.

Die F-Hal Pia-2 präferiert die Bromierung gegenüber der Chlorierung. Während es Indol innerhalb von 48 h zu 100% bromiert, chloriert es Indol zu 10.4%. Auch für mit Pia-2 wurde ein Brom über Chlor-Test durchgeführt, indem Pia-2 mit 1 mM Indol und drei verschiedenen Konzentrationen von NaBr (0 mM NaBr, 10 mM NaBr und 100 mM NaBr) inkubiert wurde (Abbildung 70).

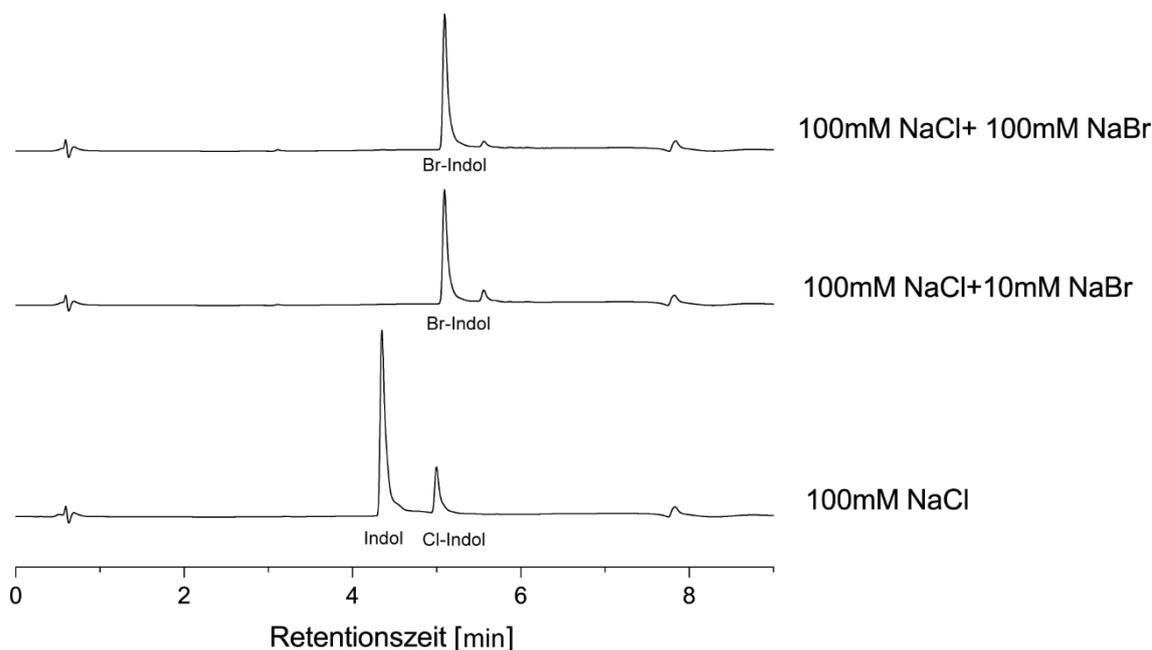


Abbildung 70: RP-HPLC (280 nm) der drei Halogenierungsansätzen von Pia-2 mit Indol, 100 mM NaCl und drei verschiedenen NaBr Konzentrationen (0 mM, 10 mM, 100 mM) nach 48 h Inkubation. Dieses zeigt, dass die Chlorierung nur im geringen Maße katalysiert wird, während, wenn genügend Brom-Ionen zur Verfügung stehen, die Bromierung der Chlorierung bevorzugt wird.

Dieser Test ergab, dass die F-Hal Pia-2 Bromid gegenüber Chlorid bevorzugt. Selbst wenn das 10-fache an Chlorionen zu Bromionen vorhanden sind, wird die Bromierung präferiert. Dieses wurde durch die Massenanalyse bestätigt. Dieses ergab, dass bei 100 mM NaCl ohne NaBr nur die Chlorierung katalysiert wurde ($[M-H]^-$ beobachtet: 150.01, 152.01; theoretisch: $[C_8H_6ClN]$ 151.02 (^{35}Cl), 153.02 (^{37}Cl)). In den Ansätzen, in denen zusätzlich zu den 100 mM NaCl, 10 mM und 100 mM NaBr vorhanden waren, nur die Masse des bromierten Produktes identifiziert werden konnte (100 mM NaCl+10 mM NaBr: $[M-H]^-$ beobachtet: 193.96, 195.96; theoretisch: $[C_8H_6BrN]$ 194.97 (^{79}Br);196.97 (^{81}Br); 100 mM NaCl+100 mM NaBr: $[M-H]^-$ beobachtet: 193.95, 195.95; theoretisch: $[C_8H_6BrN]$ 194.97 (^{79}Br),196.97 (^{81}Br)).

B38 bromiert auch zu 100% 5-Fluorindol innerhalb von 48 h und chloriert dieses in diesem Zeitraum zu 4% ($[M-H]^-$ beobachtet: 167.98, 169.98; theoretisch: $[C_8H_5ClFN]$ 168.01 (^{35}Cl), 170.01 (^{37}Cl)) (Abbildung 71).

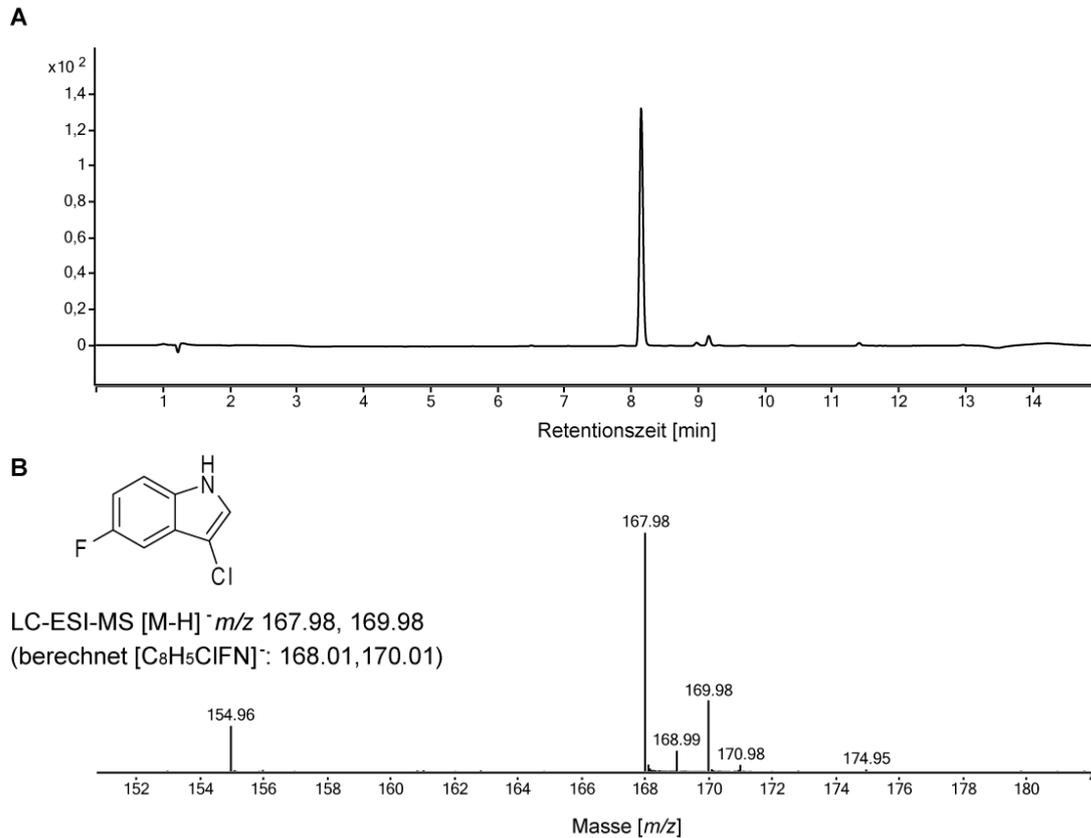


Abbildung 71: LC-MS Chromatogramme von Chlor-5-fluorindol aus der Enzymreaktion von B38 inkubiert mit 5-Fluorindol und NaCl für 48 h bei 25°C. **A:** LC-Chromatogramm 280 nm, das das Edukt, 5-Fluorindol (8,1 min) und das Produkt, Chlor-5-fluorindol (9,2 min) zeigt. **B:** MS des Produkts, Chlor-5-fluorindol (9,2 min) ($[M-H]^-$ beobachtet: 167.98, 169.98; theoretisch $[C_8H_5ClFN]^-$: 168.01, 170.01)

Dieses ist sehr ähnlich zum prozentualen Umsatz von BrvH mit NaCl innerhalb von 48 h. Diese marinen Halogenasen bevorzugen somit wie in der Literatur postuliert, Brom über Chlor. HotH stammt aus einem terrestrischem Habitat und sollte die Chlorierung der Bromierung bevorzugen. HotH bromiert Indol zu 36% und dibromiert zu 62% innerhalb von 48 Stunden, während die Chlorierung zu 27,6% innerhalb von 48 h katalysiert wird. Durch den höheren Umsatz zum Produkt und die Messung im LC-ESI-MS im Negativmodus war es möglich, die Masse des chlorierten Produktes zu messen. Diese entsprach dem Chlorindol (beobachtet: 149.99, 151.99; theoretisch $[C_8H_6ClN]^-$: 150.02, 152.02) (Abbildung 72).

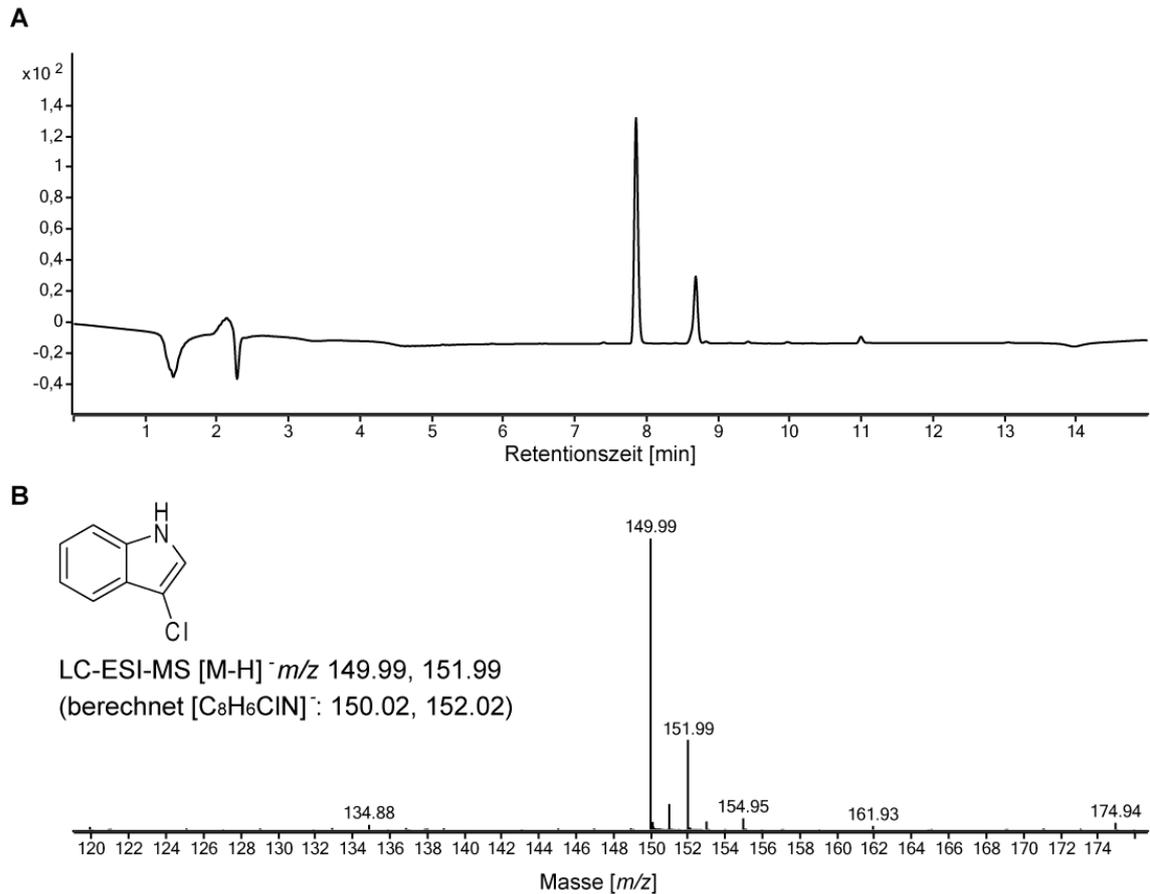


Abbildung 72: LC-MS Chromatogramme von Chlorindol aus der Enzymreaktion von HotH inkubiert mit Indol und NaCl für 48 h bei 25°C. **A:** LC-Chromatogramm 280 nm, dass das Edukt, Indol (7.9 min) und das Produkt, Chlorindol (8.7 min) zeigt. **B:** MS-Spektrum des Produkts, Chlorindol (8.7 min) ($[M-H]^-$ beobachtet: 149.99, 151.99; theoretisch $[C_8H_6ClN]^-$: 150.02, 152.02)

Somit bevorzugt HotH auch die Bromierung gegenüber der Chlorierung, wobei es eine etwas höhere Chlorierungsaktivität aufweist als BrvH, Pia-2 und B38. Die bisher bekannten F-Hals bevorzugen alle die Chlorierung gegenüber der Bromierung, außer die F-Hals Bmp5 und Bmp2. Die F-Hals Bmp5 und Bmp2 können allerdings nur die Bromierung und auch die Iodierung in geringem Maße katalysieren, aber eine Chlorierung ist nicht möglich. Somit sind die vier identifizierten F-Hals die ersten F-Hals, die sowohl bromieren als auch chlorieren können, aber die Bromierung bevorzugen. Erst 2019 wurden drei weitere F-Hals aus *Xanthomonas campestris* identifiziert, die auch die Bromierung der Chlorierung vorziehen [167]. In der Literatur wurde postuliert, dass terrestriale F-Hals die Chlorierung und marine F-Hals die Bromierung präferieren [18]. BrvH und B38 stammen aus einem marinen Metagenom-Datensatz, aber Pia-2 stammt aus einem Algenmetagenom, das in Süßwasser vorkommt und auch wurde HotH in einem Metagenom aus einer heißen Süßwasserquelle identifiziert. Es könnte sein, dass F-Hals generell aus dem wässrigen Milieu die Bromierung bevorzugen.

5.2.7. Bestimmung der kinetischen Parameter der F-Hals BrvH und Pia-2

Die BLASTp-Analyse ergab, dass BrvH aus dem Organismus *Brevundimonas* Bal 3 stammt. Allerdings konnte kein halogeniertes Produkt in diesem Organismus bisher nachgewiesen werden. Dieses macht die Identifizierung des natürlichen Substrats für BrvH sehr schwer. Aus diesem Grund wurden die Michaelis-Menten-Parameter für BrvH mit dem Substrat Indol ermittelt und mit den kinetischen Daten von den bekannten Trp-Halogenasen verglichen. Außerdem wurde für die anderen halogenierten Substrate die spezifische Aktivität bestimmt, um eine Aussage der Präferenzen des Enzyms bezüglich der Substituenten treffen zu können.

Der Substratumsatz wurde mit Hilfe der RP-HPLC identifiziert. Dazu wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 5 Minuten ein Teil der Enzymreaktionen mit Methanol gestoppt und in der RP-HPLC vermessen. Die Flächen der Peaks wurden zur Ermittlung des prozentualen Umsatzes genutzt. Über den prozentualen Umsatz wurde der Anstieg der Produktkonzentration berechnet, wodurch wiederum die Steigung (m) und somit die Produktbildungsgeschwindigkeit (v) bestimmt werden konnte (Abbildung 73).

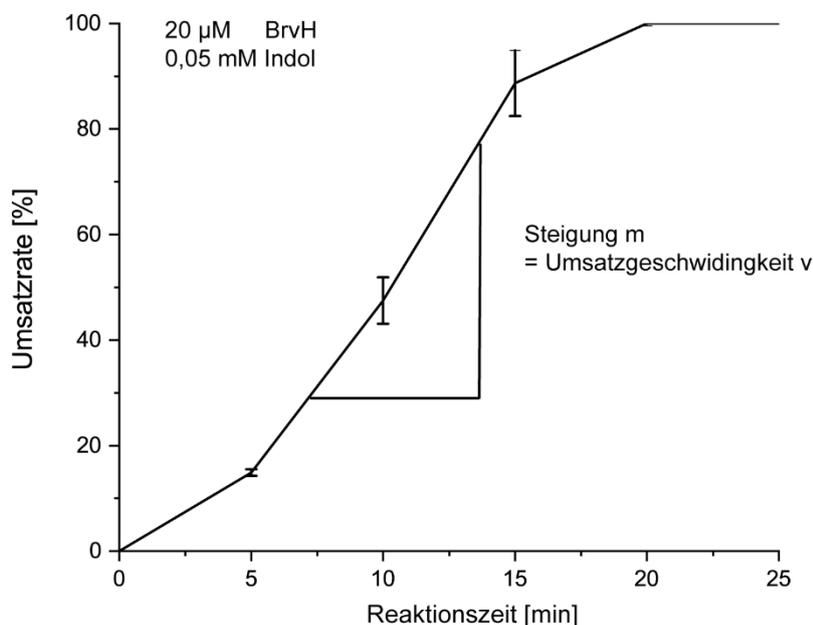


Abbildung 73: Graphische Darstellung des prozentualen Umsatzes von 0,05 mM Indol durch 20 μ M BrvH über 25 min. Nach 20 min Reaktionsdauer wird voller Umsatz erhalten. Außerdem wird ein Steigungsdreieck im Graphen dargestellt, um zu zeigen wie die Steigung m und somit die Umsatzgeschwindigkeit v des Enzyms ermittelt werden kann.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter ist es wichtig, dass der Umsatz von Edukt zu Produkt im linearen Bereich liegt. Dazu ist es notwendig, die Enzym- und Substratkonzentration dementsprechend anzupassen [168].

Da die Bestimmung des Umsatzes auf der RP-HPLC basiert, konnte die Substratkonzentration nur im geringen Maße angepasst werden. Umsätze unter 0,005 mM

Indol lieferten keine auswertbaren Chromatogramme. Aus diesem Grund wurden Enzymreaktionen mit Substratkonzentrationen zwischen 0.025 mM und 0.25 mM verwendet und die Enzymkonzentration verändert. Sechs verschiedene Enzymkonzentrationen (34 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM , 1 μM) wurden getestet, um eine Enzymkonzentration zu ermitteln, die den Umsatz von Edukt zu Produkt im linearen Bereich abbildet. Dabei zeigte sich, dass eine Enzymkonzentration von 10 μM gute Parameter liefert, weshalb mit dieser Enzymkonzentration sowohl die Kinetik (Michaelis-Menten-Parameter) als auch die spezifische Aktivität des Enzyms ermittelt wurden. Die Substratkonzentrationen wurden für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter in einem Bereich von 0.01 mM bis 0.1 mM Indol gewählt. Diese Messungen wurden in Triplikaten angefertigt und über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden alle 5 Minuten Proben entnommen, mit Methanol gestoppt und der Umsatz mit Hilfe der RP-HPLC bestimmt. Die nun ermittelte Produktbildungsgeschwindigkeit v wurde anschließend für alle Substratkonzentrationen (0.01 mM, 0.02 mM, 0.03 mM, 0.04 mM, 0.05 mM, 0.07 mM, 0.1 mM) bestimmt, mit dem Programm SimFit [148] aufgetragen und die Michaelis-Menten-Parameter bestimmt (Abbildung 74).

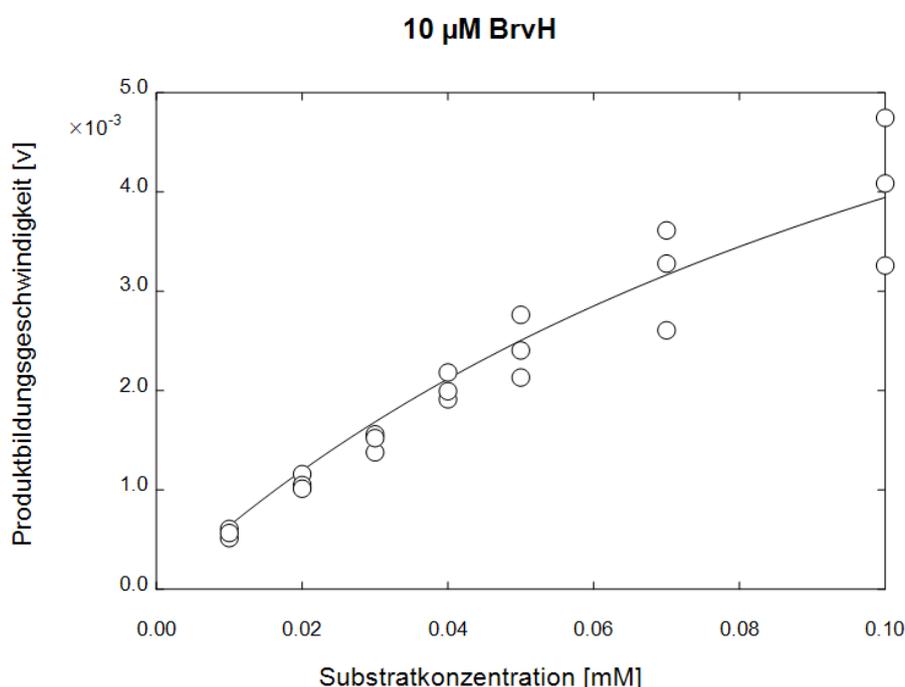


Abbildung 74: Graphische Darstellung der Produktbildungsgeschwindigkeit [v] gegen die Substratkonzentrationen [mM] des Enzyms BrvH, erstellt mit dem Programm Simfit. Mit dem Tool mmfit wurden im Folgenden die Parameter K_M (0.135mM) und v_{Max} ($9.28 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$) bestimmt.

Mit dem Tool mmFit des Programms simfit wurde im Folgenden die Michaelis-Menten Parameter bestimmt. Dieses ergab eine maximale Geschwindigkeit von $9.28 \mu\text{M L}^{-1} \text{min}^{-1}$ und eine Michaelis-Menten Konstante K_M von $135 \mu\text{M L}^{-1}$. Dieses ist die

Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Produktbildungsgeschwindigkeit des Enzyms erreicht wird. Weiterhin wurde ein k_{cat} von 0.928 min^{-1} für BrvH ermittelt.

Mit denselben Messungen und der gleichen Enzymkonzentration wurde dieses für Pia-2 durchgeführt, um BrvH und Pia -2 in Bezug auf deren Aktivität zu vergleichen (Abbildung 75).

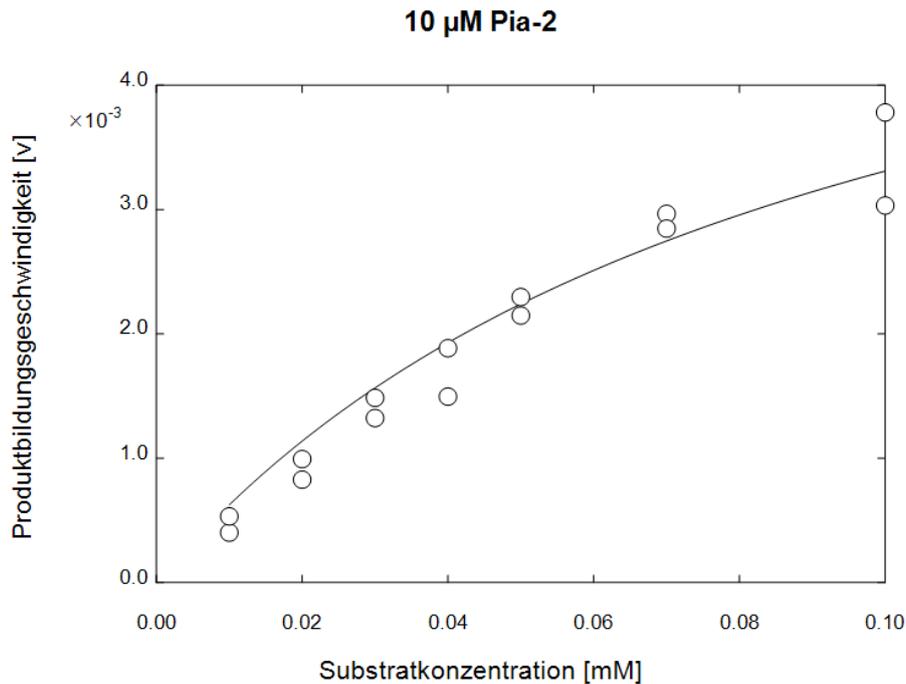


Abbildung 75: Graphische Darstellung der Produktbildungsgeschwindigkeit [v] gegen die Substratkonzentrationen [mM] des Enzyms, Pia-2, erstellt mit dem Programm Simfit. Mit dem Tool mmfit wurden im Folgenden die Parameter K_M (0.091 mM L^{-1}) und v_{max} ($6.33 \mu\text{M L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) bestimmt.

Auch für Pia -2 konnten die Michaelis-Menten-Parameter bestimmt werden. Für Pia-2 wurde eine maximale Geschwindigkeit von $6.33 \mu\text{M L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und eine Michaelis-Menten Konstante K_M von $91 \mu\text{M L}^{-1}$ bestimmt. Der Parameter k_{cat} beträgt 0.633 min^{-1} .

Generell implizieren geringe K_M -Werte eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat und die katalytische Aktivität oder auch Wechselzahl genannt, beschreibt wie viele Substratmoleküle pro Zeiteinheit zum Produkt umgesetzt werden [168]. Im Vergleich zu anderen Enzymen wie Chymotrypsin (K_M : $5000 \mu\text{M}$; k_{cat} von 100 Sek^{-1} [168]) weisen die F-Hals hohe Substratspezifitäten mit geringen Umsatzraten auf (Tabelle 11).

Tabelle 11: Auflistung der Michaelis-Menten-Parameter der F-Hals BrvH, Pia-2 sowie bekannter F-Hals.

F-Hal	K _M -Wert	K _{kat} -Wert
BrvH	135 μM L ⁻¹	0.9 min ⁻¹
Pia-2	91 μM L ⁻¹	0.6 min ⁻¹
RebH [79, 85]	2 μM L ⁻¹ ; 28.7 μM L ⁻¹	0.6 min ⁻¹ , 1.4 min ⁻¹
PrnA [56, 65, 85, 90]	17.1 μM L ⁻¹ ; 20.7 μM L ⁻¹ ; 49.9 μM L ⁻¹	1.1 min ⁻¹ ; 6.79 min ⁻¹
Thal [48]	110 μM L ⁻¹	2.8 min ⁻¹
Th-Hal [85]	12.2 μM L ⁻¹	4.3 min ⁻¹
SttH [85]	25.3 μM L ⁻¹	1.7 min ⁻¹
PyrH [47, 54, 169]	71 μM L ⁻¹ ; 109 μM L ⁻¹ ; 150 μM L ⁻¹	3.56 min ⁻¹
RadH [109]	277 μM L ⁻¹	3.2 min ⁻¹

Der Vergleich der Michaelis-Menten-Parameter von BrvH und Pia-2 zeigt, dass die beiden Enzyme ähnliche Umsätze zeigen und die Affinität von Pia-2 zu Indol circa doppelt so hoch ist wie die von BrvH. Die Michaelis-Menten-Parameter von BrvH und Pia-2 liegen weiterhin in einem ähnlichen Bereich zu den bekannten F-Hals mit ihrem natürlichen Substrat, wobei die Affinität der Trp-Halogenasen RebH, PrnA, Th-Hal und SttH größer ist und deren Molekülumsatz pro Minute auch höher ist. Die Affinität von RadH zu seinem Substrat ist zwar geringer im Vergleich zu dem von BrvH und Pia-2, aber dessen Molekülumsatz pro Minute ist mehr als 3-mal so hoch. Somit scheint Indol ein von BrvH und Pia-2 mit hoher Affinität gebundenes Substrat zusein, aber der k_{kat} weist daraufhin, dass es sich vermutlich bei Indol nicht um das natürliche Substrat handelt oder die beiden Enzyme sehr langsame Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen.

Weiterhin wurden die spezifischen Aktivitäten von BrvH zu anderen positiv umgesetzte Indol-Derivaten bestimmt und mit Indol verglichen. So ist es möglich Präferenzen des Enzyms zu den verschiedenen Indol-Derivaten zu sehen und so einen Hinweis auf das natürliche Substrat zu erhalten. Die spezifischen Aktivitäten (mU/mg) von BrvH zu den verschiedenen Substraten wurde mit 0.05 mM Substratkonzentration und 10 μM Enzymkonzentration bestimmt. Diese ist nicht nur abhängig von der Produktbildungsgeschwindigkeit v , sondern wird zusätzlich ins Verhältnis mit der Enzymkonzentration (c_E) und Enzymmasse (M_E) gesetzt (1).

$$\text{spezifische Aktivität } s = \frac{v}{c_E \cdot M_E} \cdot 10^9 \left[\frac{mU}{mg} \right] \quad (1)$$

c_E : Enzymkonzentration = 10 μM M_E : Enzymmasse = 56200 Da

Die berechneten spezifischen Aktivitäten wurden für alle acht getesteten Substrate im Triplikot bestimmt und deren Mittelwerte in Abbildung 76 als Balkendiagramm visualisiert.

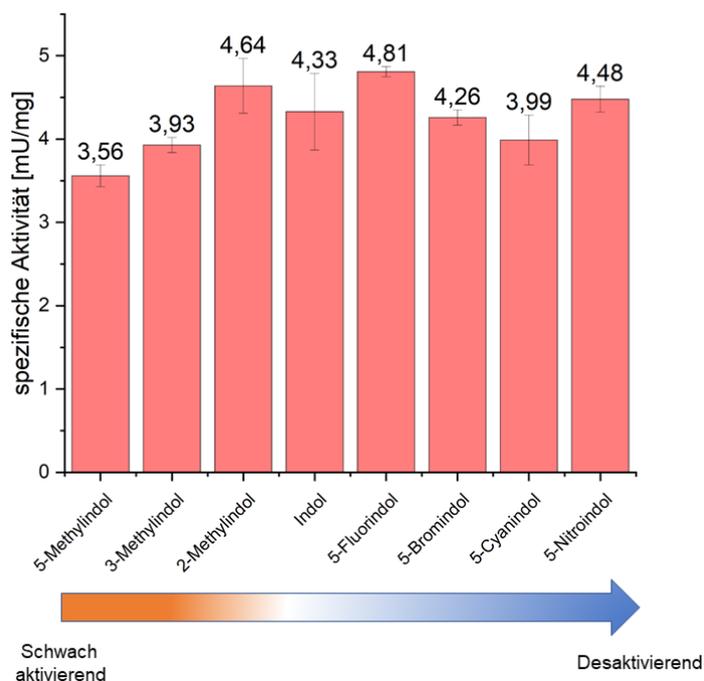


Abbildung 76: Balkendiagramm der spezifischen Aktivitäten [mU/mg] von BrvH bezüglich acht verschiedener Substrate (5-Methylindol, 3-Methylindol, 2-Methylindol, Indol, 5-Fluorindol, 5-Bromindol, 5-Cyanindol, 5-Nitroindol). Die Substrate sind aufgelistet nach ihren mesomeren und induktiven Effekten ihrer Substituenten. Dieses zeigt, dass die spezifischen Aktivitäten der identifizierten Substrate gering ausfallen, wobei die Indolderivate mit keinem oder desaktivierendem Substituenten gegenüber aktivierenden Substituenten bevorzugt werden.

Die bestimmten spezifischen Aktivitäten sind sehr ähnlich. Dennoch sind kleine Tendenzen zu erkennen. So wird die Bromierung von 5-Methylindol von den getesteten Substraten am langsamsten katalysiert und die von 5-Fluorindol am schnellsten. Beim Vergleich der Methylindole fällt auf, dass die Methylindole, die die Methylgruppe im Fünfring des Indolsrings tragen mit einer höheren spezifischen Aktivität umgesetzt werden als 5-Methylindol, dass die Methylgruppe im Sechring trägt. Dennoch weist BrvH die höchste spezifische Aktivität zu 5-Fluorindol auf, bei dem der Fluor-Substituent im Sechsring liegt.

Weiterhin wurden für diese Substrate die spezifischen Aktivitäten von Pia-2 und B38 ermittelt und mit BrvH verglichen (Abbildung 77).

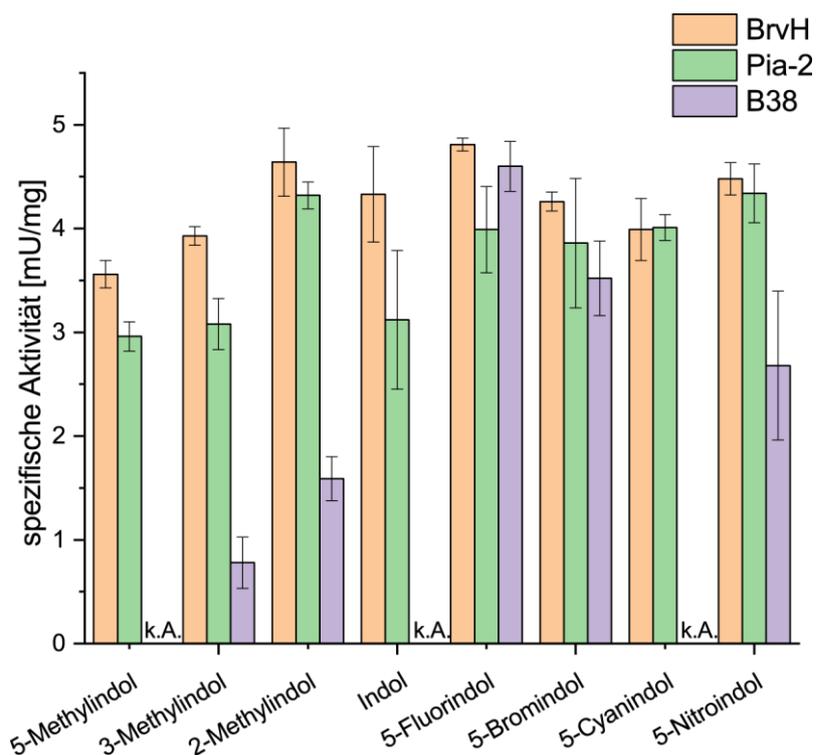


Abbildung 77: Balkendiagramm der spezifischen Aktivitäten [mU/mg] von BrvH, Pia-2 und B38 von acht verschiedenen Substraten (5-Methylindol, 3-Methylindol, 2-Methylindol, Indol, 5-Fluorindol, 5-Bromindol, 5-Cyanindol, 5-Nitroindol). k.A.: keine Angaben. Für diese Substrate wurde keine spezifische Aktivität des Enzyms bestimmt.

Im Vergleich zu BrvH weisen die Enzyme Pia-2 und B38 geringere spezifische Aktivitäten zu den Substraten 5-Methylindol, 3-Methylindol, 2-Methylindol, Indol, 5-Fluorindol, 5-Bromindol, 5-Cyanindol, 5-Nitroindol auf, wobei tendenziell für alle drei Enzyme ähnlich geringe spezifische Aktivitäten ermittelt wurden. Bei B38 ist die spezifische Aktivität für die Methylindole um mehr als das Dreifache kleiner zu BrvH und Pia-2. Generell liegt die spezifische Aktivität von B38 außer für 5-Fluorindol immer unterhalb der Aktivitäten von BrvH und Pia-2, was darauf hindeutet, dass das natürliche Substrat von B38 sich von dem natürlichen Substrat der Enzyme BrvH und Pia-2 unterscheiden könnte. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten der drei Enzyme zeigten, dass keines der getesteten Substrate mit hohen Aktivitäten umgesetzt wurde. Um diese Werte mit den bekannten Trp-Halogenasen zu vergleichen, wurden aus deren Wechselzahlen (RebH: 1.4 min^{-1} [79]; PrnA: 1.1 min^{-1} [65]) und deren Enzymmasse (RebH: 60297 g/mol ; PrnA: 60000 g/mol) die spezifische Aktivität berechnet: RebH: 23.2 mU/mg und PrnA: 18.3 mU/mg . Im Vergleich zu diesen sind die spezifischen Aktivitäten von BrvH, Pia-2 und B38 um mehr als das 4-fache geringer. Wie schon die ermittelten Michaelis-Menten-Parameter zeigten, weisen die Enzyme BrvH und Pia-2, aber auch B38 geringere Aktivitäten als die Trp-Halogenasen auf. Dieses kann entweder in einer generellen geringeren Aktivität der Enzyme begründet sein oder darin, dass die getesteten Substrate noch nicht dem natürlichen Substrat der Enzyme entsprechen.

5.2.8. Stabilität der identifizierten FHals

Um ein genaueres Bild der Enzyme bezüglich der Stabilität über einen längeren Zeitraum und bei unterschiedlichen Temperaturen zu erhalten, wurden verschiedene Tests bezüglich der Lager- und Thermostabilität durchgeführt.

5.2.8.1. Langzeitstabilität bei 4°C

Die Langzeitstabilität wurde näher untersucht, um herauszufinden für wie lange die Enzyme gelagert werden können, ohne dass sich deren Aktivität verringert. Dazu wurden die Enzyme bei 4°C gelagert und nach einer bestimmten Zeitspanne in eine Enzymreaktion (1 mM Indol, 1.25 mg/mL Enzym, 25°C, 48 h) eingesetzt. Anschließend wurde überprüft, ob die prozentuale Umsatzrate sich von der Umsatzrate mit Enzym (frischem Enzym), das nicht gelagert wurde unterscheidet (Abbildung 78).

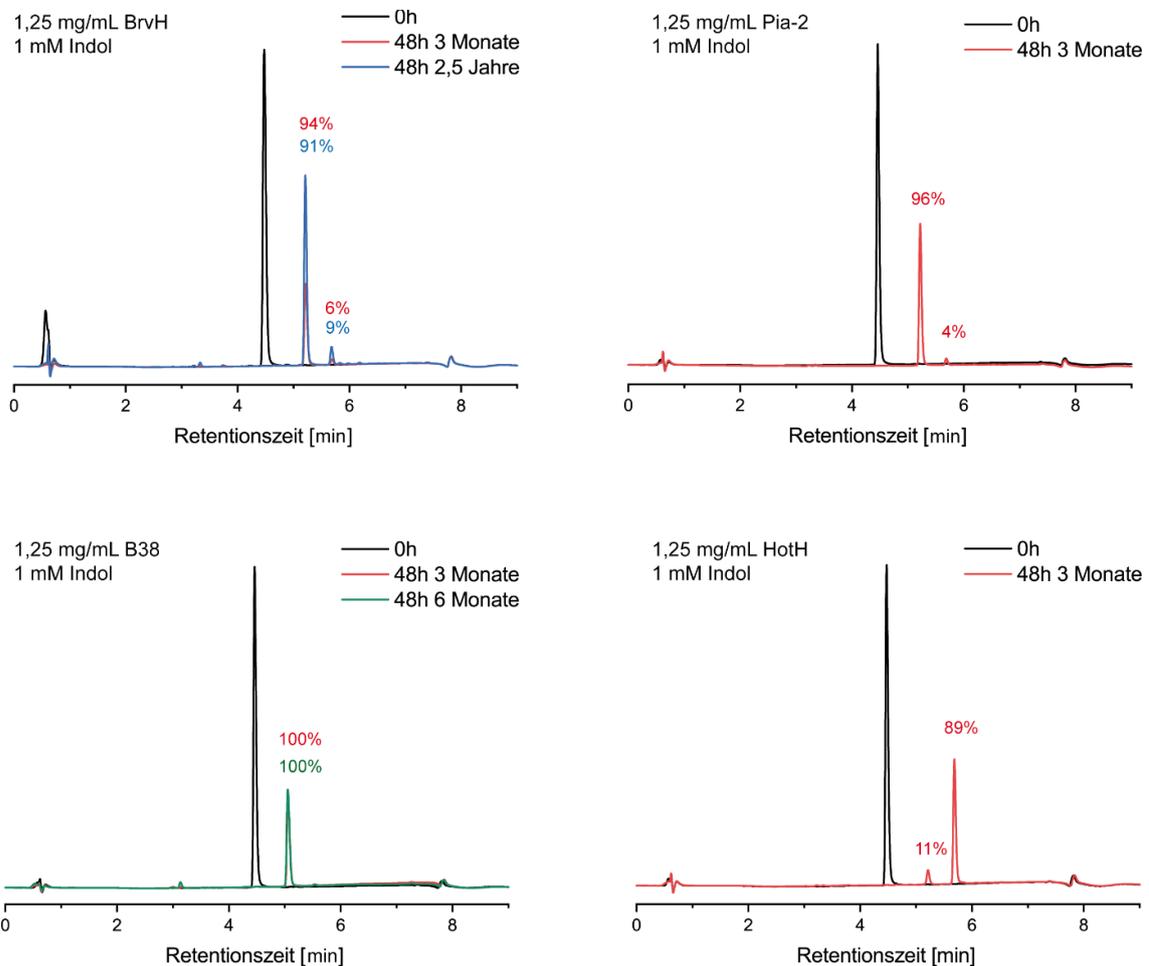


Abbildung 78: RP-HPLC-Chromatogramme der enzymatischen Reaktionsansätze nachdem die Enzyme BrvH, Pia-2, B38 und HotH für 3 Monate, 6 Monate oder 2.5 Jahre bei 4°C gelagert wurden. Dieses zeigt, dass die Enzyme bei der Lagerung bei 4°C aktiv bleiben.

Alle vier Enzyme sind nachdem sie für 3 Monate bei 4°C gelagert wurden aktiv. Frisch aufgereinigtes BrvH und Pia-2 bromieren Indol zu 100%. Nach 3 Monaten Lagerung von BrvH und Pia-2 bromieren diese Indol nicht nur, sondern dibromieren Indol auch zu 6%

bzw. 4%. BrvH nach 2.5 Jahren Lagerung ist noch immer aktiv, weist allerdings ebenfalls eine geringe Dibromierungsaktivität von 9% auf. Diese Dibromierungsaktivität scheint mit der Dauer der Lagerung gering zu steigen.

B38 verliert keine Bromierungsaktivität und ist nach 3 Monaten und 6 Monaten in der Lage mit der derselben Umsatzrate wie frisch aufgereinigtes B38 Indol zu 100% zu bromieren. Eine Dibromierungsaktivität tritt nicht auf.

Auch HotH verliert nach 3 Monaten Lagerung bei 4°C keine Aktivität. Allerdings weist das gelagerte Enzym auch eine höhere Dibromierungsaktivität gegenüber dem frisch aufgereinigten Enzym auf. Frisch aufgereinigtes HotH bromiert zu 36% und dibromiert zu 62%, während das 3 Monate gelagerte Enzym Indol zu 11% bromiert und zu 89% dibromiert, was zu vollständigem Umsatz des Edukts führt. Diese Experimente stellen heraus, dass alle vier Enzyme über 3 Monate bei 4°C gelagert werden können, ohne deren Aktivität zu verlieren. BrvH zeigt sogar noch nach 2.5 Jahren Lagerung bei 4°C einen vollständigen Umsatz des Eduktes. Somit scheinen alle vier Enzyme sehr stabil bei 4°C zu sein. Ein interessanter Aspekt ist, dass die Dibromierungsaktivität der Enzyme BrvH, Pia-2 und HotH zunimmt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Enzyme über den Zeitraum der Lagerung an Affinität verlieren und somit auch eine Dibromierung katalysieren können.

5.2.8.2. Thermostabilität der Enzyme

Die Thermostabilität ist eine wichtige Eigenschaft von Enzymen, wenn diese für industrielle Zwecke genutzt werden sollen. Häufig resultiert aus der Thermostabilität der Enzyme nicht nur eine größere Resistenz gegenüber Hitze, sondern wird auch mit einer generelleren Stabilität zum Beispiel in Bezug auf deren Langzeitstabilität, Proteolyse oder Lösungsmittelstabilität in Verbindung gebracht [93, 93, 114, 114]. In der Literatur wurden schon mehrere Ansätze die F-Hals in sogenannten Eintopf-Synthesen mit anderen Folgereaktionen zum Beispiel der Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung erwähnt [112], [116]. Für diesen Ansätzen sind stabile Enzyme von Vorteil, da chemische Reaktionen häufig mit organischen Lösungsmitteln und Hitze einhergehen [112]. Aus diesen Gründen wurde die Thermostabilität der FHals BrvH, Pia-2 und HotH eingehender untersucht.

Zur Untersuchung der Thermostabilität wurden zwei Methoden gewählt. Zunächst wurden die Enzyme in verschiedenen Temperaturen inkubiert und dem anschließend auf deren Aktivität getestet. In einer zweiten Untersuchung wurde die CD-Spektroskopie zur Identifizierung des Denaturierungspunktes des Enzyme genutzt.

5.2.8.2.1. Thermostabilitätsmessungen nach Inkubation der Enzyme in unterschiedlichen Temperaturen

Die FHals wurden bei unterschiedlichen Temperaturen für 30 Minuten inkubiert, abgekühlt und anschließend die Enzymreaktionsansätze bei 25°C mit 1.25 mg/mL Enzym, 1 mM Indol und dem Kofaktor-Regenerierungssystem durchgeführt. Nach 48 h wurden die Enzymreaktionen mit Methanol gestoppt, in der RP-HPLC vermessen und deren prozentuale Umsatzraten durch die Integrale der Peaks bestimmt.

BrvH wurde in drei verschiedenen Temperaturen inkubiert (41°C, 49°C und 55°C). Dieses ergab, dass BrvH bis zu einer Temperatur von 49°C vollständig aktiv ist. Bei 55°C wurden nur noch 18% in derselben Zeitspanne bromiert (Abbildung 79).

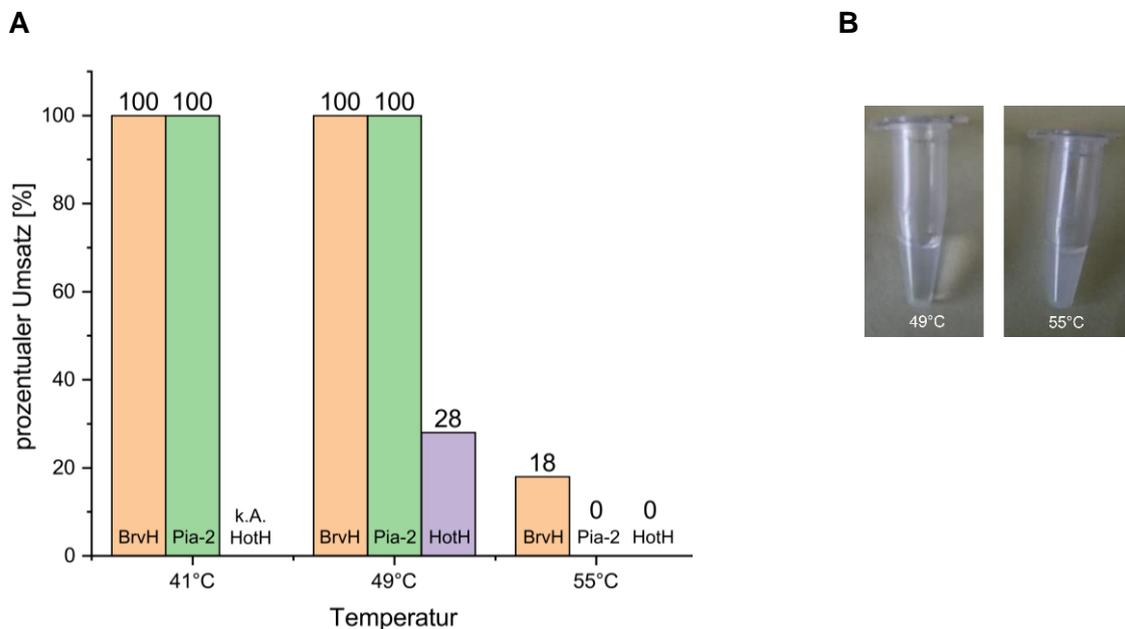


Abbildung 79: Die Fhals BrvH, Pia-2 und HotH bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. **A:** Balkendiagramm der prozentualen Umsätze von BrvH, Pia-2 und HotH nachdem diese für 30 min bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert wurden und dann die Reaktionsansätze bei 25°C für 48 h durchgeführt wurden. k.A.: hier können keine Angaben gemacht werden, da die Reaktionen bei der Temperatur für dieses Enzym nicht durchgeführt wurden. **B:** Fotografie der Enzymlösungen von BrvH nach Inkubation in 49°C (links) und 55°C (rechts) für 30 min. Nach 30 min bei 55°C liegt die Enzymlösung nicht mehr als klare Lösung vor, sondern ist weiß. Dieses deutet darauf hin, dass BrvH bei 55°C denaturiert wurde.

Beobachtungen bestätigen, dass nach der Inkubation von BrvH in 55°C das Enzym nicht mehr in Lösung vorliegt, sondern nach 30 min das Enzym ausgefallen ist, was an der weißen Färbung der Lösung zu erkennen ist (Abbildung 79, B).

Pia-2 wurde für 20 min bei den Temperaturen 41°C, 46°C und 49°C inkubiert, dann abgekühlt und die Enzymreaktionen eingesetzt. Die RP-HPLC Chromatogramme zeigen,

dass Pia-2 bis zu einer Temperatur von 46°C aktiv ist, aber bei einer Inkubationstemperatur von 49°C vollständig inaktiviert vorliegt (Abbildung 79, A).

Das Gen *hotH* wurde in einem Metagenom identifiziert, das aus einer heißen Quelle (45°C) aus Sagole, Süd Afrika stammt [170]. Um zu testen, ob HotH eine thermostabile Halogenase ist, wurde das Enzym bei 50°C und 55°C für 30 min inkubiert, abgekühlt und Umsatzreaktionen mit Indol bei 25°C durchgeführt. Nach der Inkubation bei 49°C wird Indol von HotH noch zu 28% bromiert, während frisches HotH Indol zu 98% sowohl bromiert als auch dibromiert. Dieses zeigt, dass HotH bei 49°C inaktiviert wird und nur noch teilweise aktiv ist. Nach der Inkubation bei 55°C ist HotH vollständig inaktiv.

Zur weiteren Ermittlung der genauen Denaturierungstemperatur sowie der Aufklärung der Sekundärstruktur der Enzyme wurde die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie angewandt. In der CD-Spektroskopie wird linearisiertes Licht auf eine unsymmetrische Probe geworfen, wodurch es zu unterschiedlichen Absorptionen durch rechts- und linksgängiges circular polarisiertes Licht kommt [171]. Durch diese Spektren kann der Gehalt an Sekundärstrukturelementen (α -Helix, β -Faltblatt) analysiert werden, da diese typische Spektren darstellen. Die FHals BrvH, Pia-2 und HotH wurden zunächst in den CD-Puffer (s. Material und Methoden) überführt und darauf in einem Wellenlänge-Bereich von 190 nm bis 260 nm über CD-Spektroskopie vermessen (Abbildung 80).

Die CD-Spektren von BrvH und Pia-2 bei einer Temperatur von 25°C zeigen deutlich charakteristische Banden im kurzwelligen UV-Bereich einer α -Helix. Somit lässt sich schlussfolgern, dass ein Großteil der Enzyme aus α -Helices aufgebaut ist. Das CD-Spektrum von HotH bei 26°C zeigt nicht so charakteristisch wie BrvH und Pia-2 die Banden für eine α -Helix.

Wenn Enzyme zum Beispiel durch erhöhte Temperaturen denaturiert werden, verändert sich die Sekundärstruktur des Enzyms und es wird inaktiviert. Dieses kann über CD-Spektroskopie beobachtet werden und somit die genaue Denaturierungstemperatur ermittelt werden. Aus dem Grund wurden CD-Spektren für BrvH und Pia-2 in einem Wellenlängen Bereich zwischen 190 nm und 260 nm bei Temperaturen zwischen 20°C und 90°C aufgenommen. Bei diesen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Messung in einem Wellenlängen-Bereich von 200 nm bis 240 nm mit einem Temperaturgradienten zwischen 26°C bis 80°C ausreicht, um die Denaturierungstemperatur zu ermitteln. Deshalb wurde HotH in diesem kleineren Wellenlänge-Bereich und Temperaturgradienten gemessen.

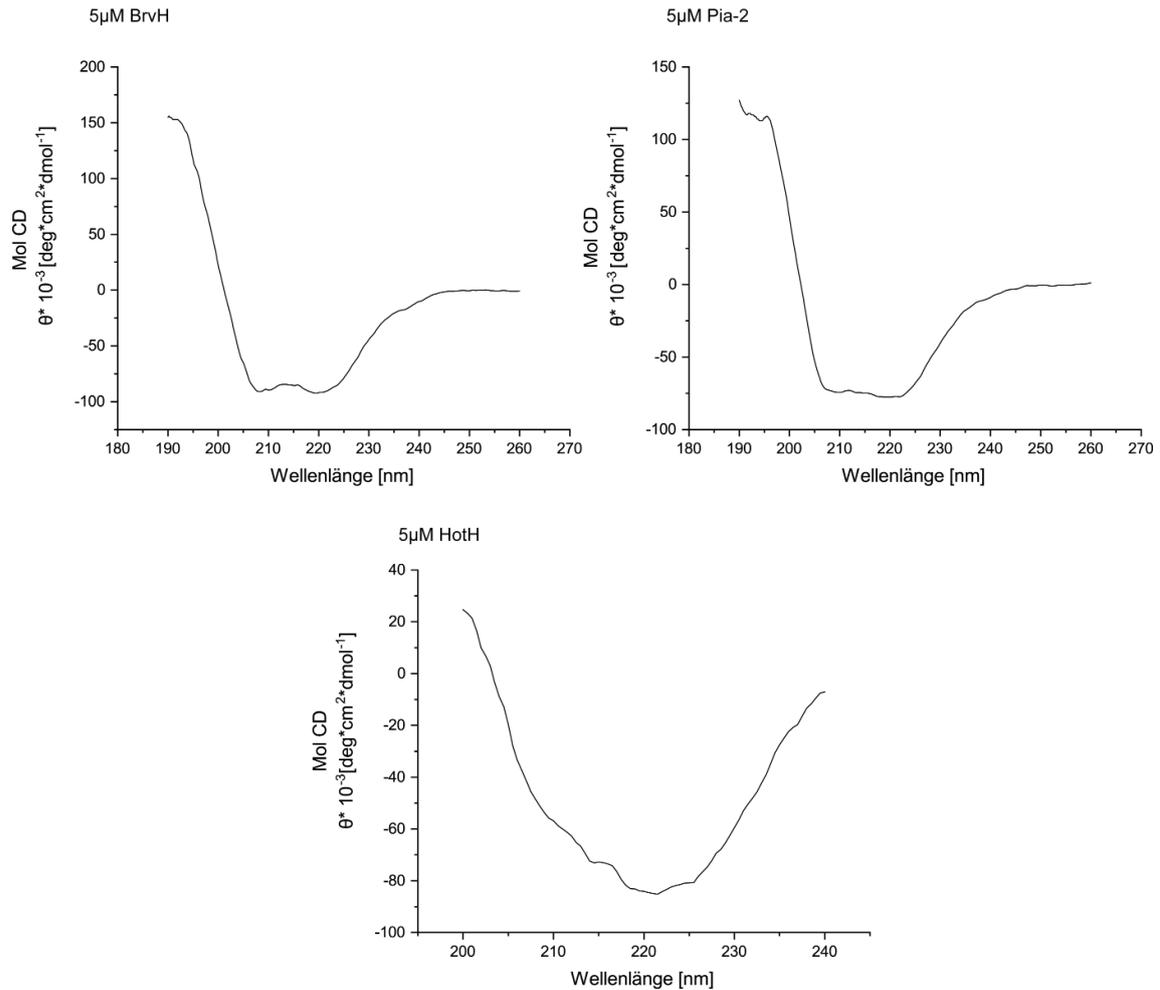


Abbildung 80: CD-Spektren von BrvH, Pia-2 und HotH bei 25°C (BrvH, Pia-2) bzw. 26°C (HotH) gemessen in einem Wellenlängen Bereich zwischen 190 nm und 260 nm (BrvH, Pia-2) bzw. 200 nm bis 240 nm (HotH) in 0.1 nm Schritten.

Aus den CD-Signalen konnte eine *Heatmap* für BrvH erstellt werden (Abbildung 81). Diese visualisiert im violetten Bereich zwischen 208 nm und 225 nm die ausgeprägte α -helikale Struktur. Die Farbe ändert sich allerdings mit der Temperatur von 50°C zu blau, welches auch eine Änderung der Sekundärstruktur widerspiegelt. Diese Änderung legt nahe, dass bei dieser Temperatur das Enzym denaturiert und somit seine native Struktur verliert.

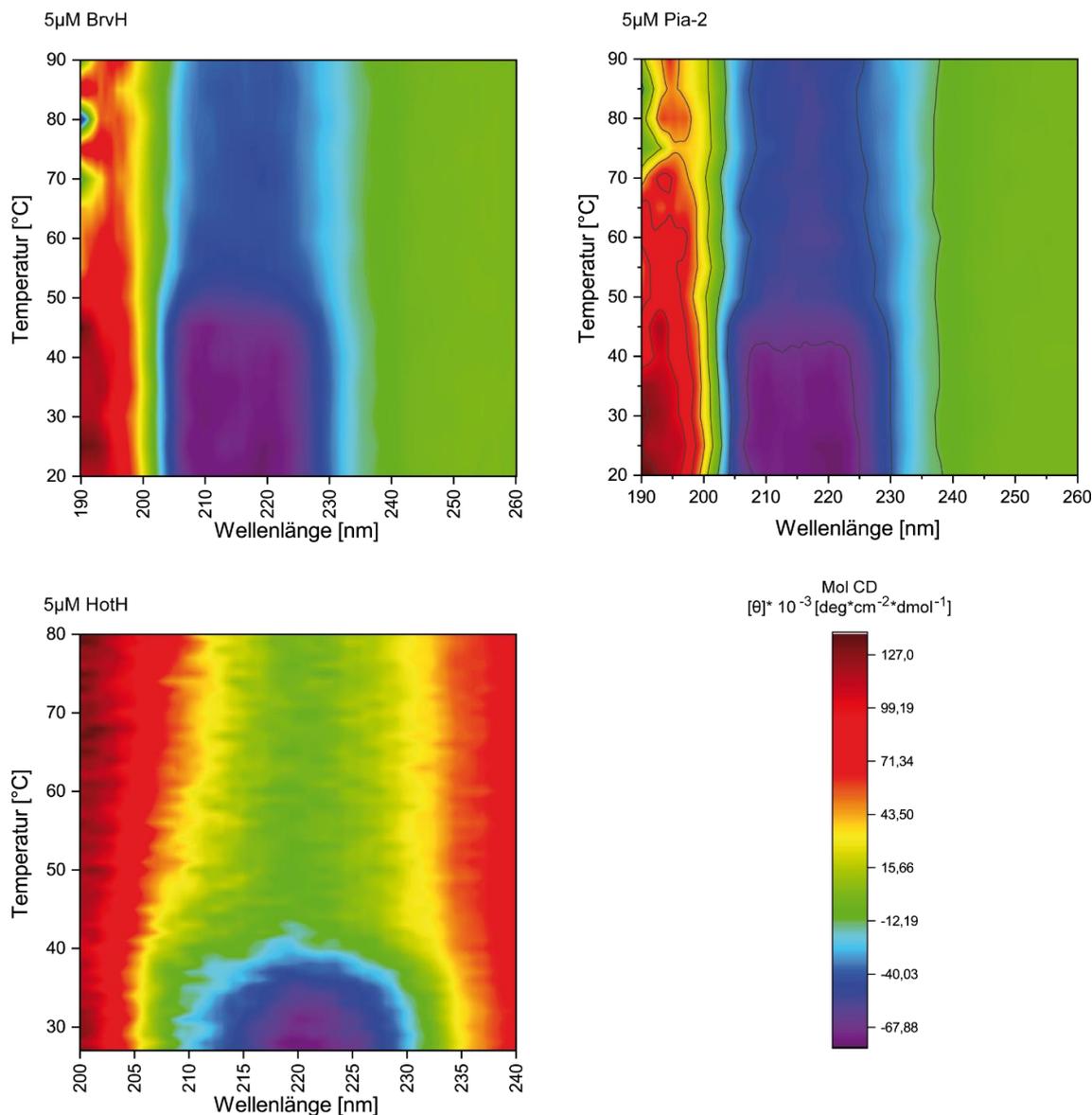


Abbildung 81: Ergebnisse der CD-Spektroskopie in einem Wellenlänge Bereich von 190 nm bis 260 nm über einen Temperaturgradienten von 20-90°C für BrvH und Pia-2 und für HotH in einem Wellenlänge Bereich von 200 nm bis 240 nm über einen Temperaturgradienten von 26-80°C. Aus den gemessenen CD-Signalen konnten für BrvH, Pia-2 und HotH *Heatmaps* erstellt werden, die die Sekundärstrukturelemente in unterschiedlichen Farben darstellt.

Für Pia-2 und HotH können die *Heatmaps* mit derselben Herangehensweise betrachtet werden. Dabei zeigt sich, dass in der *Heatmap* von Pia-2 der violette Bereich (α -helikale Struktur) zwischen 208 nm und 225 nm bis zu einer Temperatur von 45°C besteht, danach ändert sich die Farbe zum blauen Bereich.

Die *Heatmap* von HotH zeigt, dass der violette Bereich kaum ausgeprägt ist und ab 35°C in den blauen Bereich (-60 bis -15 Mol CD) und ab 42°C in den grünen Bereich (-12 bis 15 Mol CD) übergeht. Beim Vergleich der *Heatmaps* der drei Enzyme fällt auf, dass sich die *Heatmap* von HotH zu denen von BrvH und Pia-2 unterscheiden. Während bei BrvH und Pia 2 der Bereich von 210 nm-230 nm bis zu einer Temperatur von 90°C im blauen

Bereich (ca. -12 Mol CD) bleibt, liegt dieser Bereich im Spektrum von HotH ab über 40°C im grünen bis gelben Bereich (ca -12 bis 15 Mol CD). Die *Heatmaps* der drei Enzyme zeigen, dass BrvH vermutlich die thermostabilste der drei Enzyme ist, gefolgt von Pia-2 und dann HotH.

Der Punkt an dem sich die Sekundärstruktur verändert, wird als Denaturierungstemperatur angenommen und kann über die erste Ableitung der CD-Signale bei einer Wellenlänge von 220 nm berechnet werden. Das Maximum der ersten Ableitung stellt dabei die Denaturierungstemperatur dar.

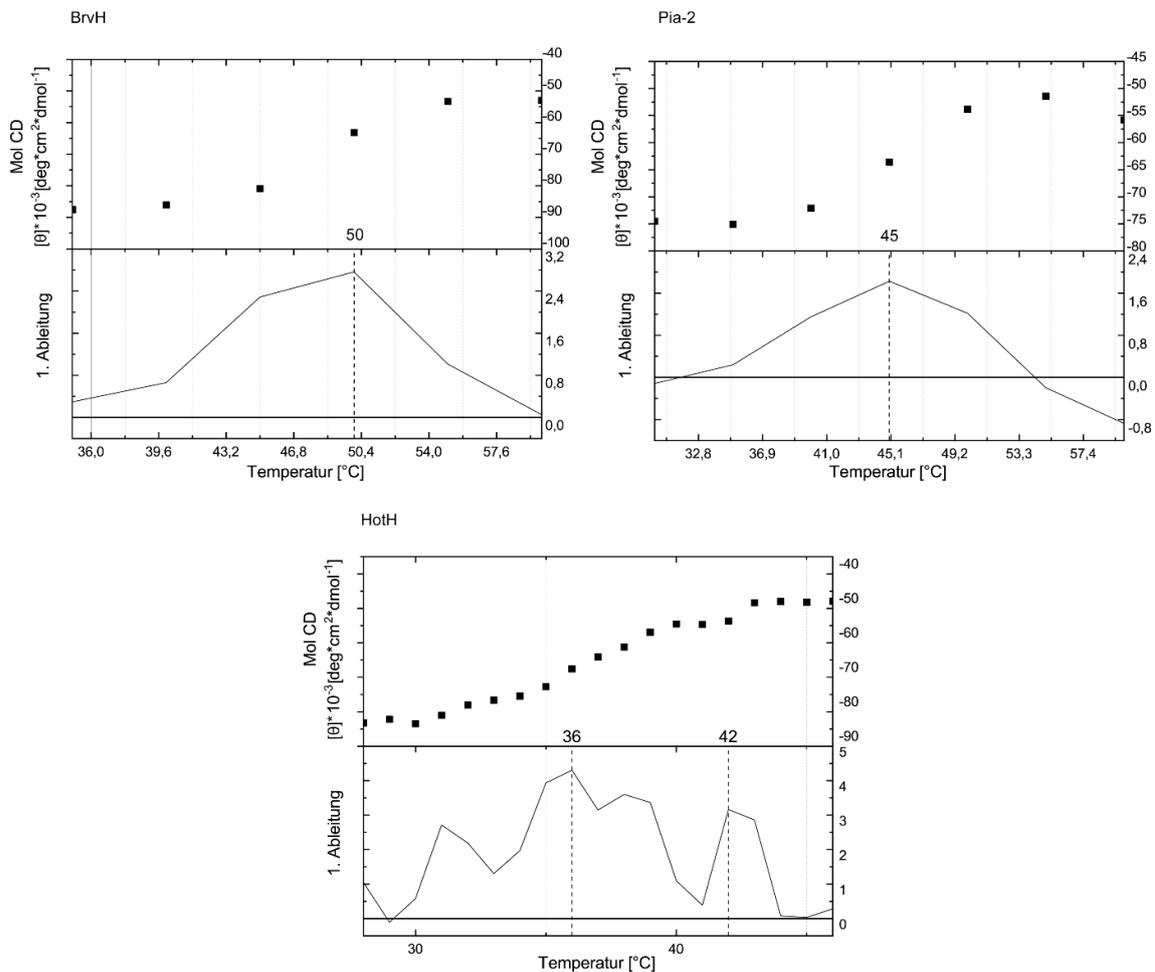


Abbildung 82: CD Spektroskopie Ergebnisse. Die CD-Signale gegen die vermessenen Temperaturen (BrvH, Pia-2: 20-90°C; HotH: 26-80°C) bei 220 nm aufgetragen und aus der Auftragung die 1. Ableitung bestimmt. Das Maximum der 1. Ableitung gibt die Denaturierungstemperatur wieder.

Diese 1. Ableitung und der dazugehörige Denaturierungspunkt wurde für die drei Enzyme BrvH, Pia-2 und HotH bestimmt (Abbildung 82). Die ermittelten Denaturierungstemperaturen der Enzyme bestätigen die Tendenzen die sich sowohl in den Umsatzversuchen (Abbildung 79) als auch schon bei der *Heatmap* angedeutet haben. BrvH weist die höchste Denaturierungstemperatur von 50°C auf, darauf folgt Pia-2 mit 45°C. Für HotH war die Berechnung des Denaturierungspunktes nicht so einfach, da zwei Maxima

(36°C und 42°C) der 1. Ableitung ermittelt wurden. Eine Ursache könnte sein, dass HotH zum Teil ab 36°C denaturiert, dass Enzym sich aber wieder zurückfalten und wieder die native Konformation annehmen kann. Dennoch stimmen die ermittelten Denaturierungspunkte nicht mit den Ergebnissen der Umsatzversuche überein. Bei diesen Experimenten konnte HotH nach 30 Minuten Inkubation bei 49°C Indol zu 28% bromieren, was bedeutet, dass das Enzym teilweise noch aktiv gewesen sein muss. Weiterhin haben sich die Ergebnisse der CD-Messung von HotH von denen von BrvH und Pia-2 unterschieden. Dieses wurde sowohl in der Ermittlung der Sekundärstruktur als in der *Heatmap* deutlich. Dieses spricht dafür, dass HotH eine andere Sekundärstruktur aufweisen könnte. Eventuell liegt HotH nicht richtig gefaltet vor oder es fehlt eine Aktivierung des Enzyms zur richtigen Faltung. Schließlich stammt HotH aus einer heißen Quelle (45°C) und sollte somit wenigstens bei dieser Temperatur stabil sein.

In der Literatur variieren die Angaben der Denaturierungstemperaturen der Trp-Halogenasen. 2016 publizierte Menon *et al.* eine neu identifizierte F-Hal (Th-Hal) und verglich die Denaturierungstemperaturen des Enzyms mit den bekannten Trp-Halogenasen über CD-Spektroskopie. Hierbei wurde festgestellt, dass die Denaturierungstemperaturen von PyrH, PrnA und RebH zwischen 30°C und 40°C liegen. [85] Damit scheinen BrvH, Pia-2 und HotH thermostabiler zu sein als diese. Allerdings wurde im Rahmen der Identifizierung thermophiler F-Hals mittels gerichtete Evolution von Poor *et al.* 2014 der Denaturierungstemperatur der F-Hal RebH von 52.4°C angegeben und wurde auch über CD-Spektroskopie ermittelt [93]. Diese scheint stimmig mit der von Schnepel *et al.* bestimmten halb-maximalen Denaturierungstemperatur für Thal von 47°C [95]. Somit lässt sich zum Vergleich der Enzyme mit bekannten F-Hals sagen, dass BrvH, Pia-2 und HotH vermutlich eine ähnliche Denaturierungstemperatur zu den bereits bekannten Trp-Halogenasen aufweisen.

6. Zusammenfassung

Bereits in der Antike wurden Naturstoffe aus Pflanzen gewonnen und zur medizinischen Anwendung verwendet. Heutzutage werden natürliche Verbindungen nicht nur als Krebstherapeutika und Antibiotika sondern auch für viele andere Zwecke angewandt. Dabei weisen häufig halogenierte Naturstoffe gegenüber den nicht halogenierten Metaboliten gesteigerte biologische Aktivitäten auf. Für die chemische Halogenierung über die elektrophile aromatische Substitution werden ein elementares Halogen, Lösungsmittel und Lewis-Säuren benötigt. Außerdem müssen Schutzgruppen für die Adressierung von nicht-aktivierten Kohlenstoffatomen eingefügt werden. Flavin-abhängige Halogenasen (F-Hals) stellen dazu eine umweltfreundliche Alternative dar, da diese regioselektiv nicht-aktivierte Kohlenstoffatome im wässrigen Milieu mit Luftsauerstoff und einem Halogenid-Salz bei Raumtemperatur halogenieren können. Leider weisen die bislang bekannten F-Hals geringe Aktivitäten und hohe Spezifitäten zu deren Substraten auf, was deren Einsatz in der organischen Synthese deutlich einschränkt.

Die ersten F-Hal-Gene wurden durch Mutagenese-Experimente in Bakterienstämmen entdeckt, welche halogenierte Sekundärmetabolite produzieren. Neue F-Hals konnten über degenerierte Primer oder in sequenzierten Genomen über deren konservierte Aminosäure-Bereiche detektiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, zum ersten Mal F-Hals in metagenomischen Datensätzen computergestützt zu identifizieren (Abbildung 83) und dadurch neue Enzyme zu detektieren, die sowohl ein größeres Substratspektrum als auch höhere Aktivitäten aufweisen. Da in Metagenomen nicht nur die genomische DNA eines Organismus, sondern vieler verschiedener Organismen aus einem Biotop vorhanden sind, können durch die Suche von F-Hals in metagenomischen Datensätzen in einem Schritt viele Organismen und zwar auch von nicht-kultivierbaren Organismen, abgesucht werden. Zudem kann durch die Wahl des Biotops gewünschte Eigenschaften von Enzymen gewählt werden, in dem zum Beispiel Metagenome aus salzreichen oder heißen Quellen gewählt werden. Dazu wurde in einer Zwei-Schritte Methode ein Profil-Hidden-Markov-Modell (pHMM) generiert, das auf den konservierten Bereichen der Tryptophan-Halogenasen (Trp-Halogenasen) basiert. 17 metagenomische Datensätze wurden nach F-Hals abgesucht, welche zu 296 putativen F-Hals führten. Die nähere Betrachtung ergab 113 Treffer, die die konservierten Aminosäure-Bereiche (GxGGG, das konservierte Lysin (K), WxWxIP) und eine Größe wie die bekannten F-Hals zwischen 400 und 700 Aminosäuren aufweisen. Basierend auf phylogenetischen Analysen wurden vier putative F-Hals (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) für *in vitro*-Experimente ausgewählt, um zu zeigen, dass es sich bei den detektierten putativen F-Hals um aktive halogenierende Enzyme handelt. Diese vier ausgewählten putative F-Hals bilden mit den Trp-Halogenasen eine Klade, daher wurde

angenommen, dass diese wie Trp-Halogenasen freies Substrat halogenieren können und die Möglichkeit besteht, dass sie das Substrat Tryptophan umsetzen. Bei näherer Betrachtung der umliegenden Gene der ausgewählten F-Hals fiel auf, dass BrvH, Pia-2 und HotH direkt neben einem weiteren F-Hal-Gen liegen und diese somit eventuell an der Biosynthese von mehrfachhalogenierten Verbindungen beteiligt sind.

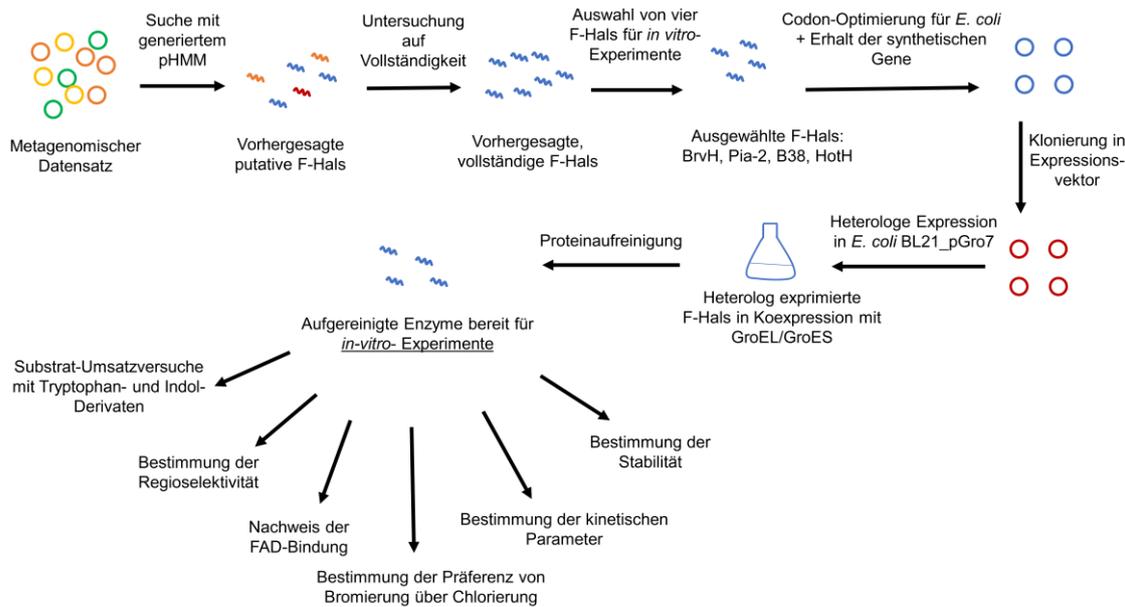


Abbildung 83: Ablaufschema der Identifizierung und Charakterisierung neuer Flavin-abhängiger Halogenasen aus metagenomischen Datensätzen durch bioinformatische Analysemethoden.

Für die *in vitro*-Experimente wurden zunächst die Gene der ausgewählten putativen Flavin-abhängigen Halogenasen für eine Expression in *E. coli* Codon optimiert, Restriktionsschnittstellen für die weitere Klonierung eingefügt und die synthetischen Gene von der Firma Invitrogen erhalten. Anschließend wurden diese in einen passenden Expressionsvektor kloniert und in *E. coli* BL21(DE3)_pGro7 transformiert sowie heterolog exprimiert. Die heterologe Expression erfolgte in Koexpression mit dem Chaperonsystem GroEL/GroES als Faltungshelfer und konnte mittels SDS-PAGE Analyse nachgewiesen werden. Im Folgenden zeigten Substrat-Umsatzversuche mit Tryptophan, Indol und deren Derivaten, dass alle vier ausgewählten Enzyme (BrvH, Pia-2, B38 und HotH) in der Lage sind, Indol biokatalytisch zu bromieren. Somit scheint das generierte pHMM aktive neue F-Hals aus metagenomischen Datensätzen identifizieren zu können. Obwohl BrvH, Pia-2, B38 und HotH mit den Tryptophan-Halogenasen eine Klade bilden und das pHMM basierend auf Trp-Halogenasen generiert wurde, können diese nicht L-Tryptophan halogenieren. Weitere Indol-Derivate und andere aromatische Verbindungen wurden getestet, die von den F-Hals BrvH, Pia-2, B38 und HotH halogeniert und manche von HotH auch zweifach halogeniert wurden (Abbildung 84).

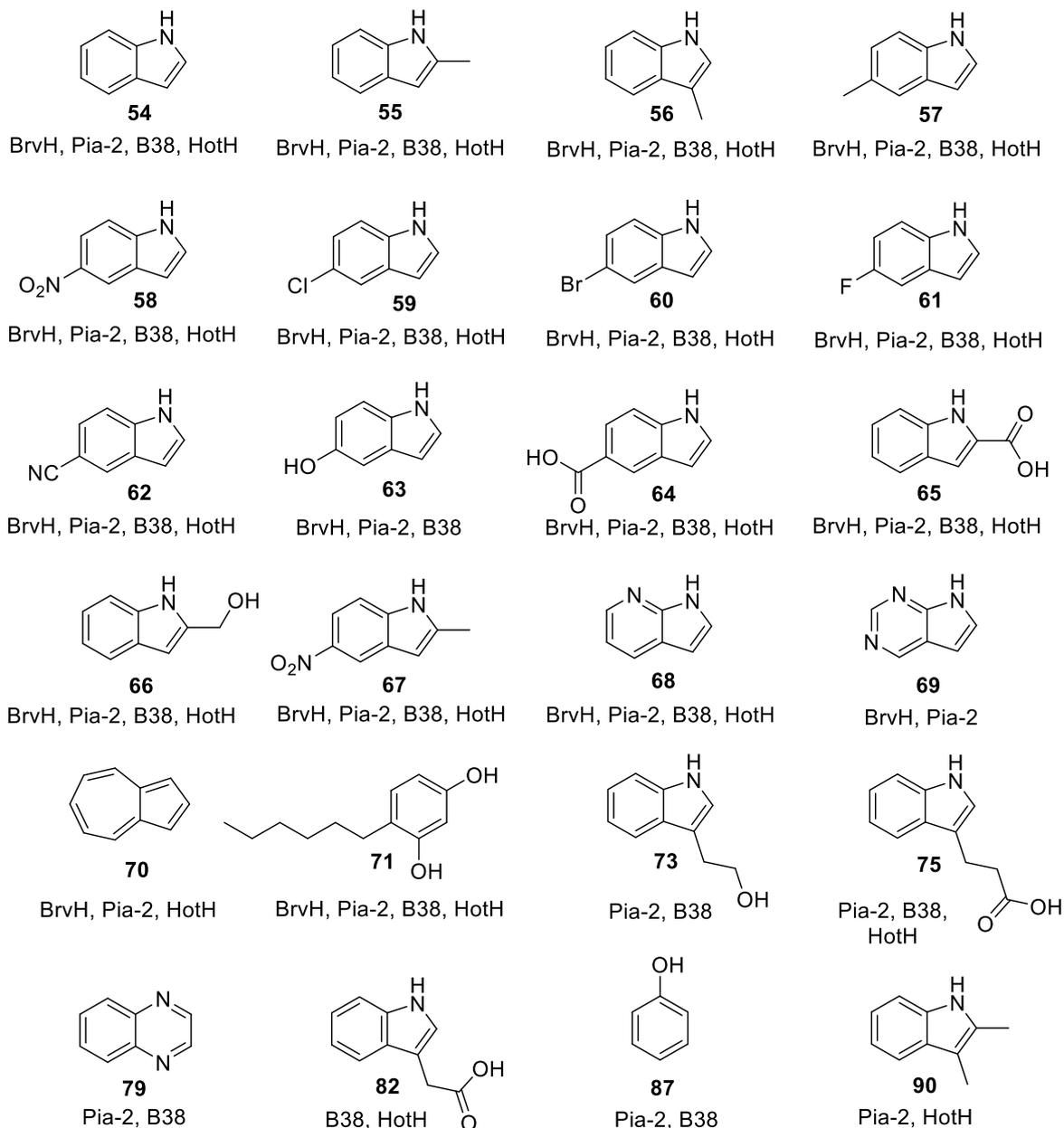


Abbildung 84: Verbindungen, die von den identifizierten F-Hals BrvH, Pia-2, B38 und HotH halogeniert werden.

Zur Bestimmung der Regioselektivitäten der F-Hals wurden diese als *combi*CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*) immobilisiert. Hierbei werden die Enzyme mit den Koenzymen (ADH und PrnF) mit Glutaraldehyd quervernetzt, wodurch diese stabilisiert werden und somit höhere Konzentrationen an Substrat (bis zu 100 mg Substrat) umgesetzt werden können. Die höheren Produktkonzentrationen konnten im Folgenden *via* NMR-Spektroskopie analysiert und die Position der Halogenierung bestimmt werden. Dies ergab, dass BrvH, Pia-2, B38 und HotH die Indol-Derivate in C3-Position, der am meisten aktivierten Position halogenieren. Wenn die C3-Position einen Substituenten trägt, wird die C2-Position halogeniert. Nur B38 katalysiert die Halogenierung von Tryptophol **73** und Indol-3-propionsäure **75** in der chemisch nicht aktivierten C5-Position.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle vier identifizierten Enzyme die Bromierung der Chlorierung vorziehen. Sogar bei einem 10-fachen Überschuss an Chloridionen bevorzugen BrvH und Pia-2 die Bromierung gegenüber der Chlorierung. Nur wenn Chlorid das einzige präsente Halogenid-Ion ist, wird in geringem Maße die Chlorierung von allen vier Enzymen katalysiert. Die bisher publizierten F-Hals bevorzugen die Chlorierung gegenüber der Bromierung, außer die F-Hals Bmp5 und Bmp2 sowie die neu identifizierten F-Hals aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. Die F-Hals Bmp5 und Bmp2 können allerdings nur die Bromierung und auch die Iodierung in geringem Maße katalysieren, aber eine Chlorierung ist nicht möglich. Somit sind die vier identifizierten F-Hals die ersten F-Hals, die sowohl bromieren als auch chlorieren können, aber die Bromierung bevorzugen. Erst 2019 wurden drei weitere F-Hals aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 identifiziert, die auch die Bromierung der Chlorierung vorziehen.

Um zu zeigen, dass es sich bei den halogenierenden Enzymen um Flavin-abhängige Halogenasen handelt, wurden verschiedene Nachweise durchgeführt. Zum einen wurden den Enzymreaktionen Katalase zugefügt, die vorhandenes Wasserstoffperoxid abbaut und somit das Ko-Substrat für eine potenzielle Peroxidase-Aktivität entfernt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zugabe der Katalase die Reaktion nicht negativ beeinflusst, sodass es sich bei den vier F-Hals nicht um Bromo- oder Chloroperoxidasen handeln kann. Zum anderen wurde als Nachweis einer FAD-Bindung eine FAD-Rekonstitution durchgeführt, indem die Enzyme mit FAD inkubiert wurde. Bei der Bindung von FAD im Enzym, ändert sich die Feinstruktur des UV/Vis-Absorptionsspektrums im Vergleich zu freiem FAD. So verschiebt sich die Absorptionsbande von FAD im Enzym von 350 nm zu 348 nm und die Bande bei 373 nm zu 360 nm. Für BrvH, Pia-2 und HotH zeigten die Messungen eine FAD-Bindung, während für B38 das Ergebnis nicht eindeutig war. Dennoch lässt sich sagen, dass es sich bei dem Enzym um ein gelbes Enzym handelt, was auf eine FAD-Bindung hindeutet. Zusätzlich wurde das in allen bekannten Trp-Halogenasen konservierte und für die Aktivität essenzielle Lysin der aktiven Tasche zu Alanin ausgetauscht (BrvH_K83A, Pia-2_K85A, B38_K80A, HotH_K82A). Die Experimente ergaben, dass es sich bei BrvH und Pia-2 eindeutig um Flavin-abhängige Halogenasen handelt, während die Ergebnisse für B38 und HotH nicht eindeutig sind. Allerdings zeigen die Sequenzähnlichkeiten sowie die gelbe Färbung der Enzyme, dass es sich vermutlich auch um Flavin-abhängige Halogenasen handelt.

Auch die Aktivität sowie die Stabilität der ausgewählten F-Hals wurde untersucht. Zur Aktivitätsbestimmung wurden von den F-Hals BrvH und Pia-2 die Michaelis-Menten-Parameter zu Indol bestimmt und mit denen von bekannten F-Hals zu deren natürlichem

Substrat verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Affinitäten von BrvH und Pia-2 vergleichbar sind mit denen der bekannten F-Hals, aber deren Umsatz pro Minute geringer ist. Zusätzlich wurden die spezifischen Aktivitäten von BrvH, Pia-2 und B38 zu verschiedenen Indol-Derivaten und Indol bestimmt und verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass diese für alle getesteten Indol-Derivate ähnlich sind und keine eindeutige Präferenz zu einem Derivat abzulesen ist. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass weder das natürliche Substrat noch der halogenierte Sekundärmetabolit der identifizierten F-Hals bekannt ist und diese vermutlich keine höheren Aktivitäten als die bereits bekannten F-Hals aufweisen.

Weiterhin wurden die Enzyme bezüglich ihrer Lager- und Hitzestabilität getestet. Dabei zeigte sich, dass die Enzyme über 3 Monate bei 4°C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden können. BrvH wies sogar nach 2,5 Jahren Lagerung bei 4°C keinen Aktivitätsverlust auf. Um die Denaturierungstemperatur der F-Hals BrvH, Pia-2 und HotH zu ermitteln wurden diese bei 41°C, 49°C und 55°C vorinkubiert und anschließend die Substrat-Umsatztests bei 25°C angesetzt. BrvH und Pia-2 waren nach der Inkubation bei 49°C noch vollständig aktiv, während HotH nach der Inkubation bei 49°C Aktivitätsverluste zeigt. Um die Denaturierungstemperatur zu bestimmen, wurden CD-Spektroskopie Messungen durchgeführt. Die Denaturierung der Enzyme führt zu einer deutlichen Sekundärstrukturänderung, was im die CD-Spektrum erkennbar ist. Es ergaben sich Denaturierungstemperaturen von 50°C für BrvH und 45°C für Pia-2. Für HotH war die Bestimmung nicht eindeutig, da zwei Maxima bei 36°C und 42°C ermittelt wurden. Es ist davon auszugehen, dass eine HotH eine Denaturierungstemperatur zwischen 36°C und 42°C besitzt. Die Ergebnisse decken sich mit denen der Trp-Halogenasen, die ähnliche Denaturierungstemperaturen aufweisen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein pHMM basierend auf den konservierten Bereichen der Trp-Halogenasen etabliert werden, mit dem zum ersten Mal eine Vielzahl von putativen F-Hals in verschiedenen metagenomischen Datensätzen identifiziert werden konnten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass alle ausgewählten F-Hals tatsächlich aktive halogenierende F-Hals darstellen. Weitere Charakterisierungen der Enzyme ergaben, dass sie die akzeptierten Substrate bevorzugt bromieren, aber auch chlorieren können. Die ermittelten kinetischen Parameter der charakterisierten F-Hals zeigten keine erhöhten Aktivitäten, wobei das natürliche Substrat dieser auch noch unbekannt ist.

7. Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein pHMM basierend auf Trp-Halogenasen generiert, mit dem 113 neue, putative F-Hal Sequenzen in 17 unterschiedlichen, meist marinen Metagenomen identifiziert wurden. Aus diesen identifizierten putativen F-Hals wurden vier in *in-vitro*-Experimenten auf deren Aktivität und Substratspektrum getestet. Dieses zeigte, dass mittels des pHMM erfolgreich aktive halogenierende F-Hals identifiziert werden konnten. In Zukunft können mit diesem pHMM weitere neue F-Hals identifiziert werden. Bei der Auswahl wäre es allerdings interessant auch weitentfernte Sequenzen auf deren Aktivität und Substratspektrum zu testen. Außerdem sollte bei der Wahl der F-Hal vorab mit Hilfe von AntiSMASH nach interessanten Genclustern von Naturstoffen gesucht werden, so dass nicht nur neue F-Hals identifiziert werden, sondern auch neue Polyketide, die biologische Aktivitäten aufweisen könnten.

Für die identifizierten F-Hals BrvH, Pia-2, B38 und HotH wäre es interessant, die natürlichen Substrate zu detektieren, um genaue Details zu deren Enzymaktivitäten zu erhalten. Da die Daten des „Algen+Symbiontenmetagenoms“ von Herrn Prof. Dr. Kruse zur Verfügung gestellt wurden und somit das Metagenom *in vitro* verfügbar ist, könnte hier versucht werden, den *Pseudomonas*-Stamm, in dem Pia-2 identifiziert wurde, zu isolieren und über LC-MS und GC-MS-Analysen halogenierte Verbindungen im Stamm zu detektieren. So könnte die Verbindung detektiert werden, in dessen Biosynthese Pia-2 aktiv ist. Die Röntgenstrukturaufklärung von *apo*-BrvH ergab, dass diese ein im Vergleich zu RebH recht offenes aktives Zentrum aufweist, indem größere Verbindungen halogeniert werden könnten. MibH ist in der Lage L-Tryptophan innerhalb einer Peptidkette zu halogenieren. Ähnliche Verbindungen oder auch Indol-Dimere könnten auch für BrvH getestet werden. In Abschnitt 5.2.3 wurde nach der Enzymreaktion von BrvH mit Indol in Anwesenheit von Imidazol 2-(1*H*-imidazol-4-yl)-1*H*-indol oder 2-(1*H*-imidazol-5-yl)-1*H*-indol detektiert sowie auch die bromierte Spezies, was daraufhin hindeuten könnte, dass größere Indol-Dimere halogeniert werden können. Weiterhin dient die Bromierung von den Verbindungen der chemischen Funktionalisierung für weitere Reaktionen wie die Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung. Die identifizierten F-Hals BrvH, Pia-2, B38 und HotH halogenieren eine Fülle an Indol-, aber auch Phenol-Derivaten. Diese könnten durch die weitere Suzuki-Miyaura Kreuzkupplung diversifiziert werden und so eine Reihe von regioselektiven (Hetero-)Aryl-substituierten Indol-Derivaten liefern. Weiterhin halogenieren BrvH und B38 die Anthranilsäure, und BrvH und HotH 4-*n*-Hexylresorcinol in guten prozentualen Umsätzen. Beide Substrate kommen in Verbindungen mit biologischen Aktivitäten vor und es könnte eine enzymatisch-chemische Synthese von den biologisch aktiven Verbindungen angestrebt werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Müller-Jahncke W-D, Friedrich C, Meyer U. Arzneimittelgeschichte. 2nd ed. Stuttgart: *Wiss. Verl.-Ges*; **2005**.
2. Gribble GW. Natural Organohalogens: A New Frontier for Medicinal Agents? *J. Chem. Educ.* **2004**;81:1441.
3. Blackwell WH. Poisonous and medicinal plants. Englewood Cliffs, N.J.: *Prentice Hall*; **1990**.
4. Drechsel E. Contribution to the chemistry of a sea animal. *Z.Biol.* **1896**; 33: 85–107.
5. Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. *Chem Biol.* **2008**; 15:99–109.
6. van Pée K-H. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annual Review of Microbiology. Annu. Rev. Microbiol.* **1996**;50:375–99.
7. Berger RS. 2, 6-Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. *Science.* **1972**;177:704–5.
8. Marumo S, Hattori H, Abe H, Munakata K. Isolation of 4-chloroindolyl-3-acetic acid from immature seeds of *Pisum sativum*. *Nature.* **1968**;219:959–60.
9. Kochanowska-Karamyan AJ, Hamann MT. Marine indole alkaloids: potential new drug leads for the control of depression and anxiety. *Chem Rev.* **2010**;110:4489–97.
10. Chen X, van Pée K-H. Catalytic mechanisms, basic roles, and biotechnological and environmental significance of halogenating enzymes. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2008**;40:183–93.
11. Falch BS, Koenig GM, Wright AD, Sticher O, Ruegger H, Bernardinelli G. Ambigol A and B: new biologically active polychlorinated aromatic compounds from the terrestrial blue-green alga *Fischerella ambigua*. *J. Org. Chem.* **1993**;58:6570–5.
12. Harris CM, Kannan R, Kopecka H, Harris TM. The role of the chlorine substituents in the antibiotic vancomycin: preparation and characterization of mono- and didechlorovancomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**;107:6652–8.
13. Xu Z, Yang Z, Liu Y, Lu Y, Chen K, Zhu W. Halogen bond: its role beyond drug-target binding affinity for drug discovery and development. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**;54:69–78.
14. Harris CM, Kannan R, Kopecka H, Harris TM. The role of the chlorine substituents in the antibiotic vancomycin: preparation and characterization of mono- and didechlorovancomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**;107:6652–8.
15. Pereira ER, Belin L, Sancelme M, Prudhomme M, Ollier M, Rapp M, et al. Structure-activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties. *J. Med. Chem.* **1996**;39:4471–7.
16. Cavallo G, Metrangolo P, Milani R, Pilati T, Priimagi A, Resnati G, Terraneo G. The Halogen Bond. *Chem. Rev.* **2016**;116:2478–601.
17. Gribble GW. A recent survey of naturally occurring organohalogen compounds. *Environ. Chem.* **2015**; 12:396.

18. van Pée K-H. Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch. Microbiol.* **2001**;175:250–8.
19. Gribble GW, Scheuer PJ, Moore RE, Faulkner DJ. Newly discovered naturally occurring organohalogenes. *J. Org. Chem.* **2018**;372-410
20. Franco LH, Joffé EBK, Puricelli L, Tatian M, Seldes AM, Palermo JA. Indole alkaloids from the tunicate aplidium meridiana. *J. Nat. Prod.* **1998**;61:1130–2.
21. Reyes F, Fernandez R, Rodriguez A, Francesch A, Taboada S, Avila C, Cuevas C. Aplicyanins A–F, new cytotoxic bromoindole derivatives from the marine tunicate Aplidium cyaneum. *Tetrahedron.* **2008**;64:5119–23.
22. Pauletti PM, Cintra LS, Braguine CG, da Silva Filho AA, Silva MLAE, Cunha WR, Januário AH. Halogenated indole alkaloids from marine invertebrates. *Mar. Drugs.* **2010**;8:1526–49.
23. Latham J, Brandenburger E, Shepherd SA, Menon BRK, Micklefield J. Development of Halogenase Enzymes for Use in Synthesis. *Chem. Rev.* **2018**;118:232–69.
24. Fauvarque J. The Chlorine Industry. *Pure and Applied Chemistry.* **1996**;68:1713–20.
25. Alonso F, Beletskaya IP, Yus M. Metal-Mediated Reductive Hydrodehalogenation of Organic Halides. *Chem. Rev.* **2002**;102:4009–92.
26. Brown S, O'Connor SE. Halogenase Engineering for the Generation of New Natural Product Analogues. *Chembiochem.* **2015**;16:2129–35.
27. Frese M, Sewald N. Enzymatic halogenation of tryptophan on a gram scale. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**;54:298–301.
28. Petty MA. An introduction to the origin and biochemistry of microbial halometabolites. *Bacteriol. Rev.* **1961**;25:111–30.
29. Shaw PD, Hager LP. An enzymatic chlorination reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**;81:1011–2.
30. Hammer PE, Hill DS, Lam ST, van Pée KH, Ligon JM. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **1997**;63:2147–54.
31. Murphy CD. New frontiers in biological halogenation. *J. Appl. Microbiol.* **2003**;94:539–48.
32. Wagner C, El Omari M, König GM. Biohalogenation: nature's way to synthesize halogenated metabolites. *J. Nat. Prod.* **2009**;72:540–53.
33. Latham J, Brandenburger E, Shepherd SA, Menon BRK, Micklefield J. Development of halogenase enzymes for use in synthesis. *Chem. Rev.* **2017**;118:232–69.
34. Hofmann B, Tölzer S, Pelletier I, Altenbuchner J, van Pée KH, Hecht HJ. Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases. *J. Mol. Biol.* **1998**;279:889–900.
35. Hofrichter M, Ullrich R. Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**;71:276.
36. Leblanc C, Vilter H, Fournier J-B, Delage L, Potin P, Rebuffet E, *et al.* Vanadium haloperoxidases: From the discovery 30 years ago to X-ray crystallographic and V K-edge absorption spectroscopic studies. *Coord. Chem. Rev.* **2015**;301:134–46.

37. Kühnel K, Blankenfeldt W, Turner J, Schlichting I. Crystal structures of chloroperoxidase with its bound substrates and complexed with formate, acetate and nitrate. *J. Biol. Chem.* **2006**; *18*;281(33):23990-8.
38. Carter-Franklin JN, Butler A. Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; *126*:15060–6.
39. Galonić DP, Vaillancourt FH, Walsh CT. Halogenation of unactivated carbon centers in natural product biosynthesis: trichlorination of leucine during barbamide biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**; *128*:3900–1.
40. Blasiak LC, Vaillancourt FH, Walsh CT, Drennan CL. Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in syringomycin biosynthesis. *Nature.* **2006**; *440*:368.
41. Galonić DP, Barr EW, Walsh CT, Bollinger Jr JM, Krebs C. Two interconverting Fe (IV) intermediates in aliphatic chlorination by the halogenase CytC3. *Nat. Chem. Biol.* **2007**; *3*:113.
42. Vaillancourt FH, Yin J, Walsh CT. SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII α -ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**; *102*:10111–6.
43. Hillwig ML, Liu X. A new family of iron-dependent halogenases acts on freestanding substrates. *Nat. Chem. Biol.* **2014**; *10*:921.
44. Hillwig ML, Fuhrman HA, Ittiarnornkul K, Sevco TJ, Kwak DH, Liu X. Identification and characterization of a welwitindolinone alkaloid biosynthetic gene cluster in the stigonematalean Cyanobacterium *Hapalosiphon welwitschii*. *Chembiochem.* **2014**; *15*:665–9.
45. Keller S, Wage T, Hohaus K, Hölzer M, Eichhorn E, van Pée K-H. Purification and Partial Characterization of Tryptophan 7-Halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**; *39*:2300–2.
46. Sánchez C, Butovich IA, Braña AF, Rohr J, Méndez C, Salas JA. The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol.* **2002**; *9*:519–31.
47. Zehner S, Kotzsch A, Bister B, Süßmuth RD, Méndez C, Salas JA, van Pée K-H. A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. *Chem Biol.* **2005**; *12*:445–52.
48. Seibold C, Schnerr H, Rumpf J, Kunzendorf A, Hatscher C, Wage T, et al. A flavin-dependent tryptophan 6-halogenase and its use in modification of pyrrolnitrin biosynthesis. *Biocatal. Biotransformation.* **2006**; *24*:401–8.
49. Kirner S, Hammer PE, Hill DS, Altmann A, Fischer I, Weislo LJ, et al. Functions Encoded by Pyrrolnitrin Biosynthetic Genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **1998**; *180*:1939–43.
50. Mascotti ML, Juri Ayub M, Furnham N, Thornton JM, Laskowski RA. Chopping and Changing: the Evolution of the Flavin-dependent Monooxygenases. *J. Mol. Biol.* **2016**; *428*:3131–46.
51. van Pée KH. Enzymatic chlorination and bromination. *Meth. Enzymol.* **2012**; *516*:237–57.
52. Dong C, Flecks S, Unversucht S, Haupt C, van Pée K-H, Naismith JH. Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination. *Science.* **2005**; *309*:2216–9.

53. Bitto E, Huang Y, Bingman CA, Singh S, Thorson JS, Phillips GN. The structure of flavin-dependent tryptophan 7-halogenase RebH. *Proteins*. **2008**;70:289–93.
54. Zhu X, Laurentis W de, Leang K, Herrmann J, Ihlefeld K, van Pée K-H, Naismith JH. Structural Insights into Regioselectivity in the Enzymatic Chlorination of Tryptophan. *J. Mol. Biol.* **2009**;391:74–85.
55. Yeh E, Blasiak LC, Koglin A, Drennan CL, Walsh CT. Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry*. **2007**;46:1284–92.
56. Flecks S, Patallo EP, Zhu X, Ernyei AJ, Seifert G, Schneider A, et al. New insights into the mechanism of enzymatic chlorination of tryptophan. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**;47:9533–6.
57. Yeh E, Cole LJ, Barr EW, Bollinger JM, Ballou DP, Walsh CT. Flavin redox chemistry precedes substrate chlorination during the reaction of the flavin-dependent halogenase RebH. *Biochemistry*. **2006**;45:7904–12.
58. Dym O, Eisenberg D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* **2001**;10:1712–28.
59. Dong C, Kotsch A, Dorward M, van Pée KH, Naismith JH. Crystallization and X-ray diffraction of a halogenating enzyme, tryptophan 7-halogenase, from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**;60:1438–40.
60. Ainsley J, Mulholland AJ, Black GW, Sparagano O, Christov CZ, Karabancheva-Christova TG. Structural Insights from Molecular Dynamics Simulations of Tryptophan 7-Halogenase and Tryptophan 5-Halogenase. *ACS Omega*. **2018**;3:4847–59.
61. Unversucht S, Hollmann F, Schmid A, van Pée K-H. FADH₂-Dependence of Tryptophan 7-Halogenase. *Adv. Synth. Catal.* **2005**;347:1163–7.
62. Eichhorn E, van der Ploeg JR, Leisinger T. Characterization of a Two-component Alkanesulfonate Monooxygenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1999**;274:26639–46.
63. Tiwari MK, Singh RK, Lee J-K, Zhao H. Mechanistic studies on the flavin:NADH reductase (PrnF) from *Pseudomonas fluorescens* involved in arylamine oxygenation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**;22:1344–7.
64. Payne JT, Andorfer MC, Lewis JC. Regioselective Arene Halogenation using the FAD-Dependent Halogenase RebH. *Angew. Chem.* **2013**;125:5379–82.
65. Shepherd SA, Karthikeyan C, Latham J, Struck A-W, Thompson ML, Menon BRK, et al. Extending the biocatalytic scope of regiocomplementary flavin-dependent halogenase enzymes. *Chem Sci*. **2015**;6:3454–60.
66. Shepherd SA, Menon BRK, Fisk H, Struck A-W, Levy C, Leys D, Micklefield J. A Structure-Guided Switch in the Regioselectivity of a Tryptophan Halogenase. *ChemBiochem*. **2016**;17:821–4.
67. Andorfer MC, Belsare KD, Girlich AM, Lewis JC. Aromatic Halogenation by Using Bifunctional Flavin Reductase-Halogenase Fusion Enzymes. *ChemBiochem*. **2017**;18:2099–103.
68. Ismail M, Schroeder L, Frese M, Kottke T, Hollmann F, Paul CE, Sewald N. Straightforward Regeneration of Reduced Flavin Adenine Dinucleotide Required for Enzymatic Tryptophan Halogenation. *ACS Catal.* **2019**;9:1389–95.

69. Schroeder L, Frese M, Müller C, Sewald N, Kottke T. Photochemically Driven Biocatalysis of Halogenases for the Green Production of Chlorinated Compounds. *ChemCatChem*. **2018**; *10*:3336–41.
70. Buedenbender S, Rachid S, Müller R, Schulz GE. Structure and action of the myxobacterial chondrochloren halogenase CndH: a new variant of FAD-dependent halogenases. *J. Mol. Biol.* **2009**; *385*:520–30.
71. Dorrestein PC, Yeh E, Garneau-Tsodikova S, Kelleher NL, Walsh CT. Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**; *102*:13843–8.
72. Weichold V, Milbredt D, van Pée K-H. Die spezifische enzymatische Halogenierung - von der Entdeckung halogenierender Enzyme bis zu deren Anwendung in vitro und in vivo. *Angew. Chem.* **2016**; *128*:6482–98.
73. Podzelinska K, Latimer R, Bhattacharya A, Vining LC, Zechel DL, Jia Z. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond. *J. Mol. Biol.* **2010**; *397*:316–31.
74. Pang AH, Garneau-Tsodikova S, Tsodikov OV. Crystal structure of halogenase PltA from the pyoluteorin biosynthetic pathway. *J. Struct. Biol.* **2015**; *192*:349–57.
75. Andorfer MC, Grob JE, Hajdin CE, Chael JR, Siuti P, Lilly J, et al. Understanding Flavin-Dependent Halogenase Reactivity via Substrate Activity Profiling. *ACS Catal.* **2017**; *7*:1897–904.
76. Zhao Y, Yan B, Yang T, Jiang J, Wei H, Zhu X. Purification and crystallographic analysis of a FAD-dependent halogenase from *Streptomyces* sp. JCM9888. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **2015**; *71*:972–6.
77. Fraley AE, Garcia-Borràs M, Tripathi A, Khare D, Mercado-Marin EV, Tran H, et al. Function and Structure of MalA/MalA', Iterative Halogenases for Late-Stage C-H Functionalization of Indole Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**; *139*:12060–8.
78. Flecks S. Reinigung und teilweise Charakterisierung der Balhimycin-Halogenase (BhaA) aus *Amycolatopsis balhimycina* und Erzeugung und Charakterisierung von Mutanten der Tryptophan-7-Halogenase (PrnA) aus *Pseudomonas fluorescens*; **2007**.
79. Yeh E, Garneau S, Walsh CT. Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**; *102*:3960–5.
80. Hölzer M, Burd W, Reißig H-U, van Pée K-H. Substrate Specificity and Regioselectivity of Tryptophan 7-Halogenase from *Pseudomonas fluorescens* BL915. *Adv. Synth. Catal.* **2001**; *343*:591–5.
81. Glenn WS, Nims E, O'Connor SE. Reengineering a tryptophan halogenase to preferentially chlorinate a direct alkaloid precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**; *133*:19346–9
82. Frese M, Guzowska PH, Voß H, Sewald N. Regioselective Enzymatic Halogenation of Substituted Tryptophan Derivatives using the FAD-Dependent Halogenase RebH. *ChemCatChem*. **2014**; *5*:1270-1276
83. Heemstra JR, Walsh CT. Tandem Action of the O₂ - and FADH₂ -Dependent Halogenases KtzQ and KtzR Produce 6,7-Dichlorotryptophan for Kutzneride Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**; *130*:14024–5.

84. Zeng J, Zhan J. Characterization of a tryptophan 6-halogenase from *Streptomyces toxytricini*. *Biotechnology Letters*. **2011**;33:1607–13.
85. Menon BRK, Latham J, Dunstan MS, Brandenburger E, Klemstein U, Leys D, et al. Structure and biocatalytic scope of thermophilic flavin-dependent halogenase and flavin reductase enzymes. *Org. Biomol. Chem*. **2016**;14:9354–61.
86. Xu L, Han T, Ge M, Zhu L, Qian X. Discovery of the new plant growth-regulating compound LYXLF2 based on manipulating the halogenase in *Amycolatopsis orientalis*. *Curr Microbiol*. **2016**;73:335–40.
87. Ryan KS. Biosynthetic gene cluster for the cladoniamides, bis-indoles with a rearranged scaffold. *PLoS ONE*. **2011**;6:e23694.
88. Ortega MA, Cogan DP, Mukherjee S, Garg N, Li B, Thibodeaux GN, et al. Two Flavoenzymes Catalyze the Post-Translational Generation of 5-Chlorotryptophan and 2-Aminovinyl-Cysteine during NAI-107 Biosynthesis. *ACS Chem. Biol*. **2017**;12:548–57.
89. Smith DRM, Uria AR, Helfrich EJN, Milbredt D, van Pée KH, Piel J, Goss RJM. An Unusual Flavin-Dependent Halogenase from the Metagenome of the Marine Sponge *Theonella swinhoei* WA. *ACS Chem Biol*. **2017**;12:1281–7.
90. Lang A, Polnick S, Nicke T, William P, Patallo EP, Naismith JH, van Pée KH. Changing the regioselectivity of the tryptophan 7-halogenase PrnA by site-directed mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2011**;50:2951–3.
91. Andorfer MC, Park HJ, Vergara-Coll J, Lewis JC. Directed Evolution of RebH for Catalyst-Controlled Halogenation of Indole C-H Bonds. *Chem Sci*. **2016**;7:3720–9.
92. Moritzer A-C, Minges H, Prior T, Frese M, Sewald N, Niemann HH. Structure-based switch of regioselectivity in the flavin-dependent tryptophan 6-halogenase Thal. *J. Biol. Chem*. **2018**;294, 2529-2542.
93. Poor CB, Andorfer MC, Lewis JC. Improving the stability and catalyst lifetime of the halogenase RebH by directed evolution. *Chembiochem*. **2014**;15:1286–9.
94. Payne JT, Poor CB, Lewis JC. Directed evolution of RebH for site-selective halogenation of large biologically active molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2015**;54:4226–30.
95. Schnepel C, Minges H, Frese M, Sewald N. A High-Throughput Fluorescence Assay to Determine the Activity of Tryptophan Halogenases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2016**;55:14159–63.
96. Wynands I, van Pée KH. A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 and detection of in vitro halogenase activity. *FEMS Microbiol. Lett*. **2004**;237:363–7..
97. Yamanaka K, Ryan KS, Gulder TAM, Hughes CC, Moore BS. Flavoenzyme-Catalyzed Atropo-Selective N,C-Bipyrrole Homocoupling in Marinopyrrole Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc*. **2012**;134:12434–7.
98. Mantovani SM, Moore BS. Flavin-linked oxidase catalyzes pyrrolizine formation of dichloropyrrole-containing polyketide extender unit in chlorizidine A. *J. Am. Chem. Soc*. **2013**;135:18032–5.
99. El Gamal A, Agarwal V, Diethelm S, Rahman I, Schorn MA, Sneed JM, et al. Biosynthesis of coral settlement cue tetrabromopyrrole in marine bacteria by a

- uniquely adapted brominase-thioesterase enzyme pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**; *113*:3797–802.
100. Schartz PC, Zerbe K, Abou-Hadeed K, Robinson JA. Bis-chlorination of a hexapeptide-PCP conjugate by the halogenase involved in vancomycin biosynthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2014**; *12*:5574–7.
101. Puk O, Huber P, Bischoff D, Recktenwald J, Jung G, Süssmuth RD, *et al.* Glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908: function of a halogenase and a haloperoxidase/perhydrolase. *Chem Biol.* **2002**; *9*:225–35.
102. Lin S, van Lanen SG, Shen B. Regiospecific chlorination of (S)-beta-tyrosyl-S-carrier protein catalyzed by SgcC3 in the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**; *129*:12432–8.
103. Magarvey NA, Beck ZQ, Golakoti T, Ding Y, Huber U, Hemscheidt TK, *et al.* Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from cyanobionts. *ACS Chem Biol.* **2006**; *1*:766–79.
104. Eustáquio AS, Gust B, Luft T, Li S-M, Chater KF, Heide L. Clorobiocin Biosynthesis in *Streptomyces*. *Chem Biol.* **2003**; *10*:279–88.
105. Agarwal V, El Gamal AA, Yamanaka K, Poth D, Kersten RD, Schorn M, *et al.* Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2014**; *10*:640.
106. Chen J-S, Su M, Shao L, Wang Y-X, Lin H-M, Chen D-J. Investigation of halogenation during the biosynthesis of ramoplanin in *Actinoplanes* sp. ATCC33076. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**; *100*:289–98.
107. Yin X, Zabriskie TM. The enduracidin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fungicidicus*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **2006**; *152*:2969–83.
108. Zeng J, Zhan J. A novel fungal flavin-dependent halogenase for natural product biosynthesis. *Chembiochem.* **2010**; *11*:2119–23.
109. Menon BRK, Brandenburger E, Sharif HH, Klemstein U, Shepherd SA, Greaney MF, Micklefield J. RadH: A Versatile Halogenase for Integration into Synthetic Pathways. *Angew. Chem.* **2017**; *129*:12003–7.
110. Neumann CS, Walsh CT, Kay RR. A flavin-dependent halogenase catalyzes the chlorination step in the biosynthesis of *Dictyostelium* differentiation-inducing factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**; *107*:5798–803.
111. Chooi Y-H, Cacho R, Tang Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chem Biol.* **2010**; *17*:483–94.
112. Frese M, Schnepel C, Minges H, Voß H, Feiner R, Sewald N. Modular Combination of Enzymatic Halogenation of Tryptophan with Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions. *ChemCatChem.* **2016**; *8*:1799–803.
113. Deb Roy A, Grüschow S, Cairns N, Goss RJM. Gene expression enabling synthetic diversification of natural products: chemogenetic generation of pacidamycin analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**; *132*:12243–5.
114. Liao HH. Thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase are also more stable to proteinase K, urea, detergents, and water-miscible organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**; *15*:286–92.
115. Durak LJ, Payne JT, Lewis JC. Late-Stage Diversification of Biologically Active Molecules via Chemoenzymatic C-H Functionalization. *ACS Catal.* **2016**; *6*:1451–4.

116. Latham J, Henry J-M, Sharif HH, Menon BRK, Shepherd SA, Greaney MF, Micklefield J. Integrated catalysis opens new arylation pathways via regiodivergent enzymatic C–H activation. *Nat Commun.* **2016**;7:11873
117. Runguphan W, Qu X, O'Connor SE. Integrating carbon–halogen bond formation into medicinal plant metabolism. *Nature.* **2010**;468:461
118. Runguphan W, O'Connor SE. Diversification of monoterpene indole alkaloid analogs through cross-coupling. *Org Lett.* **2013**;15:2850–3.
119. Fujimori DG, Hrvatin S, Neumann CS, Strieker M, Marahiel MA, Walsh CT. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**;104:16498–503.
120. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**;215:403–10.
121. Wang S, Xu Y, Maine EA, Wijeratne EMK, Espinosa-Artiles P, Gunatilaka AAL, Molnár I. Functional characterization of the biosynthesis of radicol, an Hsp90 inhibitor resorcylic acid lactone from *Chaetomium chiversii*. *Chem. Biol.* **2008**;15:1328–38.6.
122. Bayer K, Scheuermayer M, Fieseler L, Hentschel U. Genomic Mining for Novel FADH2-Dependent Halogenases in Marine Sponge-Associated Microbial Consortia. *Mar. Biotechnol.* **2013**;15:63–72.
123. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* **1998**;5:R245-R249.
124. Jack A. Gilbert, Christopher L. Dupont. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2011**;3:347–71.
125. Scholz MB, Lo C-C, Chain PSG. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: the current state of metagenomic data analysis. *Curr Opin Biotechnol.* **2012**;23:9–15.
126. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* **2016**;107:1–8.
127. Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp.* **2012**;2:3.
128. Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics.* **2015**;31:1674–6.
129. Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* **2010**;11:119.
130. Ausec L, Zakrzewski M, Goesmann A, Schlüter A, Mandic-Mulec I. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. *PLoS ONE.* **2011**;6:e25724.
131. Stöveken J, Singh R, Kolkenbrock S, Zakrzewski M, Wibberg D, Eikmeyer FG, et al. Successful heterologous expression of a novel chitinase identified by sequence analyses of the metagenome from a chitin-enriched soil sample. *J. Biotechnol.* **2015**;201:60–8.
132. Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics.* **1998**;14:755–63.

133. Churchill G. Stochastic models for heterogeneous DNA sequences. *Bull. Math. Biol.* **1989**;51:79–94.
134. Felsenstein J, Churchill GA. A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. *Mol Biol Evol.* **1996**;13:93–104.
135. Sharma EN, Kumar ED, Kaur ERK. Applying Hidden Markov Model to Protein Sequence Alignment. *Int. J. Inf. Technol. Decis. Mak.* **2011**;2:1031-1035
136. Sharma EN, Kumar ED. Investigating HMM in Protein Profile Analysis. *UNIASCIT.* **2012**;2:141–6.
137. Li K, Jia L, Sun X, Fei M, Irwin GW, Li C, et al., editors. Multiple Sequence Alignment by Improved Hidden Markov Model Training and Quantum-Behaved Particle Swarm Optimization: Life System Modeling and Intelligent Computing: Springer Berlin Heidelberg; **2010**.
138. Sharma EN, Kaur RK, Kumar D. Protein Profile Analysis: an exploration with HMM. *Int. j. adv. res. comput. sci.* **2011**;2.
139. Mistry J, Finn RD, Eddy SR, Bateman A, Punta M. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic Acids Res.* **2013**;41:121.
140. Barone R, Santi C de, Palma Esposito F, Tedesco P, Galati F, Visone M, et al. Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. *Front. Mar. Sci.* **2014**;1:4594.
141. Blin K, Wolf T, Chevrette MG, Lu X, Schwalen CJ, Kautsar SA, et al. antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res.* **2017**;45:36-41.
142. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, Jager V de, Zakrzewski P, Fischbach MA, et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **2011**;39:339-46.
143. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* **2012**;28:1647–9.
144. Willcott MR. MestRe Nova MestRe Nova. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**;131:13180.
145. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* **2016**;33:1870–4.
146. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2010**;38:695-9.
147. Burguillo FJ, Holgado M, Bardsley WG. Uso del paquete estadístico SIMFIT en la enseñanza del análisis de datos en ciencias experimentales/Using the SIMFIT Statistical Package to teach Data Analysis in Experimental Sciences. *Sci. Educ.* **2003**;4:8.
148. Bardsley WG. SIMFIT - A Computer Package for Simulation, Curve Fitting and Statistical Analysis Using Life Science Models. In: Schuster S, Rigoulet M, Ouhabi R, Mazat J-P, editors. Modern trends in biothermokinetics. Springer; **1993**;455–458.
149. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**;32:1792–7.

-
150. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**;4:406–25.
151. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **1985**;39:783–91.
152. Wilson MC, Mori T, Rückert C, Uria AR, Helf MJ, Takada K, et al. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature.* **2014**;506:58
153. Knoop V, Müller K. Gene und Stammbäume: Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik. 2nd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; **2009**.
154. Barriel V, Tassy P. Rooting with Multiple Outgroups: Consensus Versus Parsimony. *Cladistics.* **1998**;14:193–200.
155. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **2007**;23:2947–8.
156. Balkwill DL, Fredrickson JK, Romine MF. Sphingomonas and Related Genera. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes: Volume 7: Proteobacteria: Delta, Epsilon Subclass. New York, NY: Springer; **2006**;605–629.
157. Oh H-M, Giovannoni SJ, Ferriera S, Johnson J, Cho J-C. Complete genome sequence of *Erythrobacter litoralis* HTCC2594. *J. Bacteriol.* **2009**;191:2419–20.
158. Neubauer PR, Widmann C, Wibberg D, Schröder L, Frese M, Kottke T, et al. A flavin-dependent halogenase from metagenomic analysis prefers bromination over chlorination. *PLoS ONE.* **2018**;13:e0196797.
159. Remans R, Spaepen S, Vanderleyden J. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**;31:425–48.
160. Martins TP, Rouger C, Glasser NR, Freitas S, Fraissinette NB de, Balskus EP, et al. Chemistry, bioactivity and biosynthesis of cyanobacterial alkylresorcinols. *Nat Prod Rep* **2019**, doi: 10.1039/c8np00080h.
161. Heterocyclic Scaffolds II: Reactions and Applications of Indoles. Springer Berlin Heidelberg; **2011**.
162. Bocchi V, Palla G. Synthesis and spectroscopic characteristics of 2,3-biindolyl and 2,2-indolylpyrroles. *Tetrahedron.* **1984**;40:3251–6.
163. Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; **2010**.
164. Brennan, Erickson KL, Szmalc FS, Tansey MJ, Thornton JM. The Preparation and Spectral Characterization of 2-Haloindoles, 3-Haloindoles, and 2, 3-Dihaloindoles. *ChemInform.* **1987**;18.
165. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **1952**;195:133–40.
166. Li S, Wilkinson MF. Site-directed mutagenesis: a two-step method using PCR and Dpn I. *Biotechniques.* **1997**;23:588–90.
167. Ismail M, Frese M, Patschkowski T, Ortseifen V, Niehaus K, Sewald N. Flavin-Dependent Halogenases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 Prefer

Bromination over Chlorination. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, doi: 10.1002/adsc.201801591

168. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Stryer Biochemie. *Springer Berlin Heidelberg*; **2013**.
169. Muffler K, Kuetchou Ngnigha AR, Ulber R. Bestimmung kinetischer Parameter der FADH₂-abhängigen Tryptophan-5-Halogenase aus *Streptomyces rugosporus*. *Chemie Ingenieur Technik.* **2010**;82:121–7.
170. Tekere M, Lötter A, Olivier J, Venter S. Bacterial diversity in some South African thermal springs: a metagenomic analysis. *Proc. World Geotherm. Congr.* **2015**:19–25.
171. Johnson WC. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins.* **1990**;7:205–14.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung Flavin-abhängiger Halogenasen aus metagenomischen Datensätzen“ selbständig, ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommene Stellen, sind in jedem Fall unter Angaben der Quellen gekennzeichnet worden.

Bielefeld, April 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'P. Gies', is written above a horizontal line.

Unterschrift

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Å	Angström
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BNAH	1-Benzyl-1,4-dihydronicotinamide
bp	Basenpaar
br.	breit
BT	<i>Bootstrap</i>
cE	Enzymkonzentration
CD	Circulardichroismus
CLEAs	<i>cross-linked enzyme aggregates</i>
Cmp	Chloramphenicol
Co	Kobalt
CPO	Chlorperoxidase
d	Dublett, Schichtdicke
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIF-1	Differenzierungs-induzierenden Faktors 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
D _n	Deletionszustände
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
F	Verdünnungsfaktor
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAD-OOH	Flavinhydroperoxid
F-Hals	Flavin-abhängige Halogenasen
FMN	Flavin-Mononukleotid
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
HisTag	Hexahistidin-Tag
HK	Hauptkultur
HMM	Hidden-Markov-Modell
HOCL	hypohalogenes Chlor
HOX	hypohalogene Säure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HPO	Haloperoxidase
HR	<i>high resolution</i> (Hochauflösung)
Hz	Hertz
I _n	Insertionszustände
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
J	Kopplungskonstante
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
α-KG	α-Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen
K _{kat}	katalytische Aktivität
K _M	Michaelis-Menten Konstante
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>Liquid-chromatography</i> (Flüssigchromatographie)

Abkürzung	Bedeutung
Lys- ϵ NH-Cl	Chloramin
M	molare Masse, molar
m	Steigung
MALDI-ToF	matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion
MS	Masse-Spektrometrie
M_E	Enzymmasse (Da)
Min	Minuten
mol	Stoffmenge
MSA	Multiples Sequenz- <i>Alignment</i>
m/z	Masse-Ladungs-Verhältniss
NaBr	Natriumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH+H ⁺	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaX	Halogenid-Salz
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NJ	<i>neighbour joining</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
pHMM	Profil-HiddenMarkov-Modell
ppm	<i>parts per million</i>
Prodigal	<i>Prokaryotic dynamic programming genefinding algorithm</i>
ROESY	<i>rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy</i>
RP	<i>reverse phase</i> (Umkehrphase)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde, Singulett
t	Triplett
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyluroniumtetrafluoroborat
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
T_M	halbmaximale Inaktivierungstemperatur
t_R	Retentionszeit
Trp-Halogenasen	Tryptophan-Halogenasen
U	Unit, Enzymeinheit 1 U = 1 μ mol/min
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
BIS	sichtbares Licht
VK	Vorkultur
V_s	eingesetztes Volumen an Enzym
V_t	Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
z.B.	zum Beispiel
δ	chemische Verschiebung
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient (6,3 μ mol ⁻¹ mL*cm ⁻¹)
λ	Wellenlänge
μ	Mikro

